

Aus dem Center of Cardiovascular Research (CCR) Charité  
Campus Mitte der Medizinischen Fakultät Charité –  
Universitätsmedizin Berlin

**DISSERTATION**

Einfluss einer NO-unabhängigen Stimulation der löslichen  
Guanylatcyclase durch Riociguat auf den kardioresalen  
Endorganschaden im Tiermodell der chronischen  
Niereninsuffizienz (5/6-Nephrektomie)

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Kathrin Welkisch

aus Eisenhüttenstadt

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. B. Hoher

2. Prof. Dr. med. F. Lang

3. Priv.-Doz. Dr. med. Th. Dschietzig

Datum der Promotion: 29.01.2010

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>VI</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>VII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>VIII</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Literaturübersicht</b> .....	<b>3</b>
2.1 Die chronische Niereninsuffizienz .....	3
2.1.1 Risiko- und Progressionsfaktoren .....	3
2.1.2 Stadien der chronischen Niereninsuffizienz.....	4
2.1.3 Pathophysiologische Aspekte.....	5
2.1.4 Kardiale Veränderungen infolge der chronischen Niereninsuffizienz.....	7
2.1.5 Bisherige pharmakologische Therapiekonzepte zur Behandlung der chronischen Niereninsuffizienz.....	8
2.2 Riociguat (Bay 63-2521): Ein NO-unabhängiger Stimulator der Guanylatcyclase .....	10
2.2.1 Die Guanylatcyclase.....	11
2.2.2 Der NO-sGC-cGMP-Signaltransduktionsweg .....	13
2.2.3 Weitere physiologische Aktivatoren der sGC .....	14
2.2.4 Inhibitoren der sGC .....	15
2.2.5 Pharmakologische Stimulatoren und Aktivatoren der sGC .....	16
2.2.6 Der Effekt der NO-unabhängigen sGC-Stimulatoren und -Aktivatoren bei chronischer Niereninsuffizienz .....	19
2.2.7 Riociguat (BAY 63-2521).....	20
2.3 Das 5/6-Nephrektomie-Modell der Ratte .....	22
2.3.1 Histologische Veränderungen .....	22
2.3.2 Funktionelle Veränderungen .....	23
<b>3. Zielsetzung dieser Arbeit</b> .....	<b>25</b>
<b>4. Material und Methoden</b> .....	<b>26</b>
4.1 Material .....	26
4.1.1 Geräte .....	26

---

4.1.2	Chemikalien .....	26
4.2	Methoden.....	27
4.2.1	Studiendesign .....	27
4.2.2	Tierhaltung .....	28
4.2.3	Die Durchführung 5/6-Nephrektomie .....	28
4.2.4	Blutdruckmessung mit der „Tail-Cuff-Methode“ .....	29
4.2.5	Untersuchungen im Stoffwechsellkäfig .....	30
4.2.6	Laborchemische Untersuchungen .....	30
4.2.7	Berechnung der Glomerulären Filtrationsrate und der Albuminurie .....	31
4.2.8	Die Organentnahme.....	31
4.2.9	Histologische Methoden.....	32
4.2.10	Bestimmung des Glomeruloskleroseindex nach Rajj.....	36
4.2.11	Analyse des perivaskulären Fibroseindex .....	37
4.2.12	Digitale Morphometrie .....	38
4.2.13	Berechnungen und Statistik.....	41
<b>5.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>42</b>
5.1	Mortalität .....	42
5.2	Körper- und Organgewichte.....	42
5.3	Laborwerte.....	44
5.4	Kreatininclearance und Albuminurie .....	47
5.5	Blutdruck .....	49
5.6	Resultate der histologischen Untersuchungen der Nieren.....	51
5.7	Resultate der histologischen Untersuchungen der Herzen .....	53
<b>6.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>55</b>
6.1	Laborwerte und Mortalität.....	55
6.2	Kreatininclearance und Albuminurie .....	58
6.3	Körper- und Organgewichte.....	59
6.4	Histomorphologische Veränderungen der Herzen .....	60
6.5	Histomorphologische Veränderungen der Nieren.....	65
6.6	Blutdruck .....	66

---

<b>7. Zusammenfassung.....</b>	<b>70</b>
<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>72</b>
<b>Lebenslauf.....</b>	<b>88</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>89</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>90</b>

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1.</b> Strukturformel von Riociguat .....	20
<b>Abbildung 2.</b> Glomerula in PAS-Färbung .....	37
<b>Abbildung 3.</b> Histologische Herzausschnitte in Sirius-Red-Färbung .....	39
<b>Abbildung 4.</b> Relatives Gewicht des linken Ventrikels .....	43
<b>Abbildung 5.</b> Kreatininkonzentration im Serum .....	46
<b>Abbildung 6.</b> Harnstoffkonzentration im Serum .....	46
<b>Abbildung 7.</b> BNP-Konzentration im Serum .....	47
<b>Abbildung 8.</b> Kreatininclearance normiert auf das Körpergewicht der Tiere .....	48
<b>Abbildung 9.</b> Systolischer Blutdruck .....	50
<b>Abbildung 10.</b> Interstitielle Fibrose der Niere .....	52
<b>Abbildung 11.</b> Perivaskuläre Fibrose der Niere .....	52
<b>Abbildung 12.</b> Media-Lumen-Ratio des Herzens .....	54
<b>Abbildung 13.</b> Myozytendurchmesser .....	54
<b>Abbildung 14.</b> Histologische Nierenausschnitte in Sirius-Red-Färbung .....	66

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1.</b> Stadieneinteilung der chronischen Niereninsuffizienz nach den K/DOQI-Empfehlungen .....	4
<b>Tabelle 2.</b> Körper- und Organgewichte der 28 Wochen alten männlichen Wistar-Ratten am Ende des Versuches .....	43
<b>Tabelle 3.</b> Laborwerte .....	45
<b>Tabelle 4.</b> Albuminurie der männlichen Wistar-Ratten in den Wochen 0, 4 und 17 .....	49
<b>Tabelle 5.</b> Systolische Blutdrücke der männlichen Wistar-Ratten, jeweils in Woche 0, 2, 5, 9 und 15 gemessen .....	50
<b>Tabelle 6.</b> Ergebnisse der histologischen Untersuchungen der Nieren. ....	51
<b>Tabelle 7.</b> Ergebnisse der histologischen Untersuchungen der Herzen.....	53

## Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
ACE	Angiotensin-Konversions-Enzym
a. dest.	Aqua destillata
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
ApoE	Apolipoprotein E
BNP	B-type natriuretic peptide (brain natriuretic peptide)
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
CO	Kohlenmonoxid
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDRF	Endothelialer relaxierender Faktor
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
eNOS	Endotheliale NO-Synthase
Fe	Eisen
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GTP	Guanosintriphosphat
HTS	High-Throughput-Screen
iNOS	Induzierbare NO-Synthase
KDA	Kilo Dalton
K/DOQI	Kidney Disease Outcomes Quality Initiative
mtNOS	Mitochondriale NOS
NaCl	Natriumchlorid
NAD(P)+	Nicotinamidadenindinukleotid(phosphat)
NMDA	n-Methyl-D-Aspartat
nNOS	Neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
ODQ	1H-[1,2,4]oxadiazolol[4,3-a]quinoxalin-1-on
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase
PDE	Phosphodiesterase
PDZ	PSD95/Dlg/ZO-1
pGC	Partikuläre Guanylatcyclase



PGI <sub>2</sub>	Prostacyclin
PPIX	Protoporphyrin IX
PRA	Plasma-Renin-Aktivität
PTH	Parathormon
RAS	Renin-Angiotensin-System
RIA	Radioimmunoassay
sGC	Lösliche Guanylatcyclase
TGF-β1	Transformierender Wachstumsfaktor β1

## 1. Einleitung

Entsprechend zahlreich existierender Definitionen kann die chronische Niereninsuffizienz zusammenfassend als die Unfähigkeit der Nieren zur ausreichenden Ausscheidung harnpflichtiger Endprodukte des Eiweißstoffwechsels, mit daraus resultierender Konzentrationserhöhung dieser Substanzen (vor allem Kreatinin und Harnstoff) im Blut, bezeichnet werden. Die meisten Nierenerkrankungen, gleich welcher Ursache, können in einer Niereninsuffizienz enden. Das gilt nicht nur für primäre Erkrankungen des Nierenparenchyms, sondern auch für indirekte Schädigungen beispielsweise durch Stoffwechselstörungen, vaskuläre Erkrankungen oder Läsionen der ableitenden Harnwege.

Durch die internationale Erfassung aller Dialyse- und Transplantationspatienten in Europa und in den USA existieren recht genaue statistische Daten hinsichtlich der Epidemiologie der chronischen Niereninsuffizienz. Die Prävalenz der terminalen Niereninsuffizienz in Europa beträgt in etwa 700 Erkrankte pro eine Million Individuen, die Prävalenz früherer Stadien des chronischen Nierenversagens überschreitet diese Zahl um mehr als das 50-fache (El Nahas u. Bello, 2005). Weltweit ist insgesamt ein Anstieg der Anzahl jener Patienten mit einer chronischen Niereninsuffizienz zu verzeichnen, was sich insbesondere in einer Zunahme der dialysepflichtigen bzw. nierentransplantierten Patienten widerspiegelt (Lysaght et al., 2002). So hat sich beispielsweise in Großbritannien die jährliche Inzidenz für die terminale Niereninsuffizienz innerhalb der letzten zehn Jahre nahezu verdoppelt und beträgt aktuell etwa 101 Neuerkrankungen bezogen auf eine Million Einwohner und pro Jahr (The Renal Association, UK Renal Registry, 2004). Bei dieser Entwicklung spielen zwei Faktoren eine Rolle. Als erster sei das zunehmende Alter der Bevölkerung genannt, denn das Risiko für die Entstehung einer terminalen Niereninsuffizienz steigt mit zunehmendem Lebensalter (El Nahas u. Bello, 2005). Der zweite Faktor besteht in einer Zunahme der Patienten mit einem Diabetes mellitus vom Typ 2 nahezu epidemischen Ausmaßes. Deren Anzahl (derzeit etwa 154 Millionen) wird sich innerhalb der nächsten 20 Jahre voraussichtlich verdoppeln (King et al., 1998).

Ein weiterer Aspekt der chronischen Niereninsuffizienz sind konsekutive kardiovaskuläre Erkrankungen wie z. B. die Koronare Herzkrankheit, die Herzinsuffizienz und periphere vaskuläre oder auch cerebrovaskuläre Krankheiten. Diese weisen eine sehr hohe Prävalenz bei Personen mit einem chronischen Nierenversagen auf, wie eine Studie aus den USA mit dialysepflichtigen Patienten zu Beginn der Nierenersatztherapie verdeutlicht. Innerhalb dieser Patientengruppe be-

---

trug die Rate kardiovaskulärer Erkrankungen immerhin 52% (Foley et al., 2003; Haffner et al., 2005). Dabei wird die linksventrikuläre Hypertrophie als Folge der Druck- und Volumenbelastung im Rahmen der renalen Erkrankung als die häufigste Alteration beschrieben. Sie führt zu einer nicht unerheblichen Steigerung der Mortalität innerhalb dieser Patientengruppe (Silberberg et al., 1989; Foley et al., 1995).

Die Aufzählung all dieser Daten und Fakten soll verdeutlichen, dass eine ausgereifte Therapiestrategie mit dem Ziel, das Fortschreiten einer chronischen Niereninsuffizienz zu verlangsamen und damit verbunden den kardiovaskulären Folgeschäden vorzubeugen, unbedingt erforderlich ist. In dieser Arbeit wurde die therapeutische Kompetenz einer noch relativ neuen Substanz, des Riociguat (BAY 63-2521), geprüft. Diese Verbindung stimuliert die lösliche Guanylatcyclase (sGC), ein Enzym, welches physiologisch durch Stickstoffmonoxid (NO) aktiviert wird und eine zentrale Bedeutung bei der Regulation des kardiovaskulären Systems besitzt. Die Besonderheit besteht jedoch darin, dass Riociguat (BAY 63-2521), wie auch all die anderen sGC-Stimulatoren und -Aktivatoren, auf eine NO-unabhängige Art und Weise wirkt.

## 2. Literaturübersicht

### 2.1 Die chronische Niereninsuffizienz

#### 2.1.1 Risiko- und Progressionsfaktoren

Die wichtigsten unbeeinflussbaren Risikofaktoren für die chronische Niereninsuffizienz sind Alter, Geschlecht, familiäre Belastung und Rasse. Interessanterweise scheint die Rassenzugehörigkeit eine nicht unwesentliche Rolle hinsichtlich der Suszeptibilität für die chronische Niereninsuffizienz zu spielen. Dieser Aspekt wird deutlich, wenn man sich die epidemiologischen Daten zur terminalen Niereninsuffizienz für die afroamerikanische und weiße Bevölkerung in den USA betrachtet. So ist die Inzidenz innerhalb der weißen Bevölkerung 256, wohingegen sie bei Afroamerikanern 982 pro eine Million Einwohner und Jahr beträgt. Für die Prävalenz gelten die Werte 1004 innerhalb der weißen und 4432 innerhalb der afroamerikanischen Bevölkerung pro eine Million Einwohner (El Nahas u. Bello, 2005). Eine Ursache dafür könnte sein, dass der arterielle Hypertonus, als wichtigster beeinflussbarer Risiko- und Progressionsfaktor, in der schwarzen Bevölkerung wesentlich häufiger und schwerer ausgeprägt ist als innerhalb der weißen.

Ein erhöhtes Risiko für die chronische Niereninsuffizienz haben außerdem männliche und ältere Personen, was deren großen Anteil innerhalb der Patientengruppe, die eine Nierenersatztherapie erhalten, erklärt (The Renal Association, UK Renal Registry, 2004; United States Renal Data System, Annual data report, 2003).

Wie bereits erwähnt, ist der arterielle Hypertonus als bedeutendster beeinflussbarer Risiko- und Progressionsfaktor zu werten (Klahr et al., 1994; Jafar et al., 2003). Über eine Steigerung des effektiven Filtrationsdruckes kann dieser zu einer Proteinurie führen, einem relativ zuverlässigen Marker zur Beurteilung der Schwere und des Verlaufs einer chronischen Niereninsuffizienz (Iseki et al., 2003; Remuzzi et al., 1998). So weisen Patienten mit einer kontinuierlich hohen Proteinexkretion im Urin (>3-5 g in 24 h) eine deutlich raschere Progression auf als jene mit einer geringeren Proteinurie (<1-3 g in 24 h) (Remuzzi et al., 1998).

Des Weiteren haben auch Stoffwechselerkrankungen, hier insbesondere der Diabetes mellitus, einen großen Einfluss auf die Progression einer chronischen Niereninsuffizienz. Eine schlechte Blutzuckereinstellung, gleichgültig ob im Rahmen eines Diabetes mellitus Typ 1 oder Typ 2, beschleunigt das Fortschreiten einer diabetischen Nephropathie (The Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) Research Group, 1995; Adler et al., 2003). Ebenso scheinen sich

Störungen des Lipidstoffwechsels ungünstig auf die Entwicklung einer chronischen Niereninsuffizienz auszuwirken. So konnte durch Keane et al. 1991 ein Zusammenhang zwischen einer Hyperlipidämie und der Progression diabetischer und auch nichtdiabetischer Nephropathien nachgewiesen werden (Keane et al., 1991).

An letzter Stelle sei auch die Nierenschädigung durch Analgetika erwähnt. Es existieren einige Studien, die belegen, dass der übermäßige Gebrauch dieser Medikamente, insbesondere des Paracetamols und der nichtsteroidalen Antirheumatika, mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung einer chronischen Niereninsuffizienz einhergeht (Klag et al., 1996; Perneger et al., 1994; Morlans et al., 1990).

### 2.1.2 Stadien der chronischen Niereninsuffizienz

Es existieren unterschiedliche Klassifikationen für die Stadieneinteilung der chronischen Niereninsuffizienz. Als international anerkannt gilt jene, die den Empfehlungen der US-amerikanischen K/DOQI (Kidney Disease Outcomes Quality Initiative) folgt. Danach werden entsprechend der glomerulären Filtrationsrate (GFR) die Stadien der chronischen Niereninsuffizienz, wie in Tabelle 1 dargestellt, eingeteilt.

Stadium 1	Normale oder erhöhte GFR ( $\geq 90$ ml/min/1,73 m <sup>2</sup> ) bei Vorliegen eines Nierenschadens
Stadium 2	Leicht verringerte GFR von 60-89 ml/min/1,73 m <sup>2</sup> mit Nachweis eines Nierenschadens
Stadium 3	GFR von 30-59 ml/ min/1,73 m <sup>2</sup>
Stadium 4	GFR von 15-29 ml/ min/1,73 m <sup>2</sup>
Stadium 5	Terminale Niereninsuffizienz mit einer GFR $<15$ ml/ min/1,73 m <sup>2</sup>

**Tabelle 1.** Stadieneinteilung der chronischen Niereninsuffizienz nach den K/DOQI-Empfehlungen

Die chronische Niereninsuffizienz im Anfangsstadium ist dabei genauer definiert als ein Nierenschaden mit einer normalen bzw. erhöhten GFR für mehr als drei Monate. Als Nierenschaden wird entweder die strukturelle, z. B. histopathologische, Veränderung oder das Vorliegen von Markern einer renalen Schädigung (z. B. Proteinurie/Albuminurie, Hämaturie) verstanden. Kommt es trotz Ausschöpfung konservativer Behandlungsmöglichkeiten zu einer Progredienz

der chronischen Nierenerkrankung bis hin zu einer terminalen Niereninsuffizienz mit einem Anstieg der Serumkreatininwerte über 10 mg/dl, einer GFR < 15 ml/min/1,73 m<sup>2</sup> und einer zunehmenden Ausprägung urämischer Symptome, ist eine Nierenersatztherapie indiziert.

### 2.1.3 Pathophysiologische Aspekte

Einige chronische Nierenerkrankungen führen über Jahre hinweg progredient zur terminalen Niereninsuffizienz, welche assoziiert ist mit dem histologischen Nachweis einer Glomerulosklerose und tubulointerstitiellen Fibrose (Remuzzi et al., 1998; Rennke et al., 1989). Dabei kommt es zu einer Abnahme funktionstüchtiger Nephrone, während in den verbliebenen noch funktionierenden Glomerula eine gewisse Nierenrestfunktion aufrechterhalten wird. Allerdings führt diese zu einer intraglomerulären Drucksteigerung mit Hyperfiltration, welche durch das Vorhandensein eines arteriellen Hypertonus noch erheblich verstärkt wird. Die Folgen sind eine erhöhte Permeabilität mit Verlust der glomerulären Filterfunktion und die Ausbildung einer Proteinurie, die sich ihrerseits ungünstig auf die restliche Nierenfunktion auswirkt.

Die Ausprägung sowohl der Glomerulosklerose als auch der tubulointerstitiellen Fibrose ist abhängig von der Balance zwischen reparierenden und schädigenden Einflüssen. Im günstigsten Falle können die Strukturen im Sinne einer *Restitutio ad integrum* wieder voll funktionsfähig hergestellt werden. Hingegen setzen wiederholte oder kontinuierlich wirkende Noxen den Prozess erneut in Gang bzw. unterhalten ihn ständig, was in einer irreversiblen Glomerulosklerose und tubulointerstitiellen Fibrose mit Vernarbung des Nierengewebes endet.

#### 2.1.3.1 Glomerulosklerose

Die progressive Glomerulosklerose ist sehr gut vergleichbar mit der Atherosklerose (El Nahas et al., 1988). Beide sind charakterisiert durch eine Endothelschädigung und -dysfunktion, eine Proliferation der glatten Muskel- oder Mesangiumzellen und eine Schädigung der Perizyten bzw. der Podozyten in den Glomerula (El Nahas u. Bello, 2005). Eine wesentliche Rolle spielt dabei die Interaktion zwischen den Zellen des Glomerulums und den infiltrierenden, entzündlichen Zellen.

Hämodynamisch führt der glomeruläre Hypertonus, ähnlich dem systemischen Bluthochdruck, zu einer mechanischen Schädigung des Endothels im Sinne eines Scherrstresses mit der Folge einer endothelialen Dysfunktion. Diese äußert sich in der Ausschüttung proinflammatorischer Zyto- und Chemokine sowie der Produktion von Wachstumsfaktoren, welche entzündliche Zellen anlocken und einen mikroinflammatorischen Prozess in Gang setzen (Johnson et al., 1994).

Des Weiteren führt die Expression von Adhäsionsmolekülen durch die Endothelzellen zur Anhaftung und Verankerung dieser inflammatorischen Zellen an die glomeruläre Kapillarwand (El Nahas, 2003). Im weiteren Verlauf findet eine Infiltration von Monozyten/Makrophagen durch die Kapillarwand statt, welche eine Interaktion mit den Zellen des Glomerulums, wie z. B. den Mesangiumzellen, auslöst. Unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren, insbesondere dem *transforming growth factor  $\beta$ 1* (TGF- $\beta$ 1), kommt es zu einer Transformation und Entdifferenzierung der Mesangiumzellen zu embryonalen „Mesangioblasten“. Diese sind zur exzessiven Produktion extrazellulärer Matrix (ECM) in der Lage, woraufhin eine Ausdehnung des mesangialen Bindegewebes als Zeichen einer beginnenden Glomerulosklerose folgt (El Nahas, 2003).

Zusätzlich hat sich die Schädigung der Podozyten als ein wesentlicher Faktor in der Pathogenese der Glomerulosklerose herausgestellt. Einerseits erfahren diese Zellen eine Hypertrophie, andererseits resultiert als Folge einer Albuminbelastung der Podozyten eine Hochregulation der TGF- $\beta$ 1-Synthese (Abbate et al., 2002). Letztendlich führt dieser Wachstumsfaktor zu einer Apoptose der Podozyten, einem entscheidenden Schritt in der Pathogenese der Glomerulosklerose (Schiffer et al., 2001).

#### 2.1.3.2 Tubulointerstitielle Fibrose

Ähnlich der Glomerulosklerose ist auch die tubulointerstitielle Fibrose das Resultat aus Inflammation, Proliferation, Apoptose und Fibrose (El Nahas, 2003; Zeisberg et al., 2000). Die Ergebnisse experimenteller Studien lassen darauf schließen, dass die Proteinurie eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der tubulointerstitiellen Inflammation spielt (Schiepatti et al., 2003). So führt eine übermäßige Reabsorption von Albumin durch proximale Tubuluszellen *in vitro* zu einer vermehrten Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren, darunter auch Chemokinen (El Nahas u. Bello, 2005). Diese bewirken wiederum eine Infiltration entzündlicher Zellen ins renale Interstitium und fördern so die Interaktion zwischen diesen Zellen und den interstitiellen Fibroblasten. Unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren wie TGF- $\beta$ 1 oder dem *epidermal growth factor* (EGF) entwickeln sich ausgereifte Fibroblasten zum Phänotyp des Myofibroblasten zurück. Dies wird u. a. durch die Expression von  $\alpha$ -SMA, Vimentin und Desmin deutlich (Sappino et al., 1990). Des Weiteren kommt es zu einer Proliferation der Myofibroblasten und auch Fibroblasten, die assoziiert ist mit einer exzessiven Synthese extrazellulärer Matrix mit dem Resultat der interstitiellen Fibrose (Zeisberg et al., 2000; Iwano et al., 2004).

Neben den Fibroblasten und glomerulären Zellen sind auch die Epithelzellen der Tubuli zur Regression in der Lage. So transformieren einige dieser Zellen unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren, hier insbesondere des TGF- $\beta$ 1, in einen embryonalen Phänotyp, welcher interessanterweise Eigenschaften ähnlich denen der Myofibroblasten aufweist (El Nahas, 2003; Iwano et al., 2004; Fan et al., 1999). Damit wird ein Teil der Tubuluszellen Bestandteil des Zellpools aus interstitiellen Myofibroblasten und trägt so aktiv zur Entstehung einer interstitiellen Fibrose bei. Die Mehrheit der geschädigten Tubuluszellen erleidet allerdings den programmierten Zelltod (Apoptose), was einerseits die Atrophie der Tubuli zur Folge hat und andererseits zu atubulären Glomerula führt (El Nahas u. Bello, 2005).

#### 2.1.4 Kardiale Veränderungen infolge der chronischen Niereninsuffizienz

Kardiovaskuläre Komplikationen zählen bei Patienten mit einer chronischen Niereninsuffizienz zu den häufigsten Todesursachen; etwa 40% der Todesfälle sind darauf zurückzuführen (U.S. Renal Data System, Annual Report, 2004). Das Risiko an einem Plötzlichen Herztod zu versterben, ist bei urämischen Patienten um den Faktor 20 höher als in der Normalbevölkerung. Im Vergleich dazu ist bei Diabetikern, einer ebenfalls anerkannten Risikogruppe für den Plötzlichen Herztod, das Risiko nur um das Dreifache erhöht.

Als häufigste strukturelle Veränderung des Herzens besteht bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz eine linksventrikuläre Hypertrophie (Silberberg et al., 1989). Dabei ist die Zunahme der linksventrikulären Masse Folge einer chronischen Druck- und Volumenüberlastung. Zu den wichtigsten prädisponierenden Faktoren gehören neben einem arteriellen Hypertonus auch die Anämie und Hypervolämie infolge des chronischen Nierenversagens. Bei Patienten mit Dialysebehandlungen trägt zudem die Existenz einer arterio-venösen Fistel zur Entstehung einer linksventrikulären Hypertrophie bei (Del Greco et al., 1996; Dyadyk et al., 1999).

Morphologisch lassen sich zumeist die Merkmale sowohl einer exzentrischen als auch konzentrischen Hypertrophie finden (London et al., 1997). Letztere wird durch eine chronische Druckbelastung mit anhaltender Erhöhung der systolischen Wandspannung bedingt, so z. B. im Rahmen eines arteriellen Hypertonus oder infolge einer Aortenstenose. Hingegen bewirken eine renale Anämie, Hypervolämie und das Vorhandensein einer arterio-venösen Fistel eine Volumenbelastung. Es resultiert eine linksventrikuläre Dilatation, bei der Ventrikelwanddicke und Kammerolumen im Sinne einer exzentrischen Hypertrophie proportional zunehmen (London et al., 1994). Begünstigend auf das Vorliegen einer Mischform aus konzentrischer und exzentrischer Herzhypertrophie wirken sich auch zyklische Veränderungen des extrazellulären Flüssigkeitsvolumens



und Elektrolythaushaltes während einer Dialysebehandlung aus. Bereits kurzfristige Veränderungen der äußeren Bedingungen beeinflussen die Proteinsynthese der Kardiomyozyten. Durch Schreiber und Mitarbeiter konnte gezeigt werden, dass bereits innerhalb von drei Stunden nach Erhöhung des Aortendruckes eine signifikante Zunahme der Proteinsynthese (vor allem von Myosin und Kollagen) einsetzt (Schreiber et al., 1970). Während einer Dialysebehandlung kommt zu einer Reduktion des Blutvolumens und folglich auch des linksventrikulären Diameters, wodurch „akute“ Veränderungen der linksventrikulären Wanddicke induziert werden (steigendes Wand-zu-Lumen-Verhältnis). Grundlegend bestehen bei Patienten mit einer chronischen Niereninsuffizienz jedoch ein dauerhaft erhöhtes Herzzeitvolumen (z. B. als Folge der renalen Anämie) sowie erhöhte Auswurfarbeit, was sowohl zu der bereits beschriebenen Druck- als auch Volumenbelastung führt (London et al., 2002).

Neben einer linksventrikulären Hypertrophie umfassen die kardialen Strukturveränderungen bei chronischer Niereninsuffizienz auch die Expansion des kardialen Interstitiums im Sinne einer Myokardfibrose und Veränderungen der myokardialen Mikrozirkulation. Letzteres ist Folge einer Rarefizierung der intramyokardialen Kapillaren mit Zunahme der interkapillären Sauerstoffdiffusionsstrecke und Gefäßwandverdickung intramyokardialer Arterien (Amann et al., 2000).

Hinsichtlich der interstitiellen Fibrose konnte durch klinisch-autoptische Untersuchungen gezeigt werden, dass diese bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz stärker ausgeprägt ist, als bei jenen mit einem primären Hypertonus oder Diabetes mellitus (Mall et al., 1990). Dabei handelt es sich jedoch nicht um den narbigen Ersatz von Parenchymnekrosen, sondern um das Ergebnis einer primären Aktivierung der kardialen interstitiellen Fibrozyten. Eine kardiale Fibrose hat nicht nur die Vergrößerung des Herzens zur Folge, sie beeinträchtigt außerdem die elektromechanischen Eigenschaften des Myokards, so dass Herzrhythmusstörungen resultieren können (Weber et al., 1995).

#### 2.1.5 Bisherige pharmakologische Therapiekonzepte zur Behandlung der chronischen Niereninsuffizienz

Die bisherige Behandlung chronischer Nierenerkrankungen beschränkte sich auf die Optimierung bzw. Reduktion der beeinflussbaren Progressionsfaktoren. So stellte sich insbesondere die medikamentöse Kontrolle eines bestehenden arteriellen Hypertonus als die effektivste Maßnahme heraus (Jafar et al., 2003). Basierend auf der Hemmung des Renin-Angiotensin-Systems und angesichts eines auf der Senkung des intraglomerulären Druckes beruhenden „antiproteinur-

ischen Effektes“ haben sich ACE-Hemmer und Angiotensin-II-Rezeptorantagonisten als die geeigneten Präparate erwiesen (Remuzzi et al., 2002; Hilgers et al., 2004).

Hinsichtlich des Diabetes mellitus konnte durch die strenge Kontrolle und Optimierung der Blutzuckerwerte eine verlangsamte Progression der diabetischen Nephropathie nachgewiesen werden (United Kingdom Prospective Diabetes Study Group, 1998; Gaede et al., 2003).

Ähnlich verhält es sich mit der Hyperlipidämie. So konnte anhand experimenteller Modelle der chronischen Niereninsuffizienz, durch eine Senkung der Lipidkonzentration mit Hilfe von Hydroxy-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktasehemmern (Statinen), ein protektiver Effekt gesichert werden (El Nahas u. Bello, 2005).

Die Mehrheit der Patienten mit einer chronischen Nierenerkrankung wird mit einer Kombination aus mehreren Substanzen im Sinne einer „multidrug“-Therapie behandelt. Im Rahmen einer Metaanalyse, welche insgesamt 750 Versuche mit rund 400 000 Teilnehmern umfasste, konnte bei Patienten, die mit einer Kombination aus einem ACE-Hemmer, einem Statin und weiteren kardioprotektiven Substanzen wie z. B. Aspirin behandelt wurden, eine Reduktion kardiovaskulärer Folgeerkrankungen von bis zu 80 % ermittelt werden (Wald et al., 2003). Unter Berücksichtigung der weltweit steigenden Zahlen hinsichtlich der Prävalenz und Inzidenz für die chronische Niereninsuffizienz handelt es sich jedoch perspektivisch um ein sehr kostenintensives Therapiekonzept.

## 2.2 Riociguat (Bay 63-2521): Ein NO-unabhängiger Stimulator der Guanylatcyclase

Die Endothelschicht der Blutgefäße stellt nicht nur die anatomische Grenze zwischen Blut und Gefäßwand dar, sondern weist auch wichtige regulatorische Funktionen auf. Dazu gehören die Modulation des Gefäßtonus, die Beeinflussung der Thrombozytenaggregation und die Regulation des Gefäßwachstums. Zu den vom Endothel gebildeten Mediatoren gehören u. a. das Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>), das Endothelin und der *Endothelium-derived relaxin factor* (EDRF). Letzterer wurde 1980 durch Furchgott und Mitarbeiter entdeckt, die diese Substanz angesichts ihrer Fähigkeit zur Relaxation der Gefäße den beschreibenden Namen „*endothelium-derived relaxin factor*“ (EDRF) gaben (Furchgott et al., 1980). Sechs Jahre später fanden sowohl Furchgott als auch Ignarro unabhängig voneinander heraus, dass es sich bei EDRF vermutlich um Stickstoffmonoxid (NO) handelt, eine Theorie, die ein Jahr später ihre Bestätigung fand (Ignarro et al., 1987; Palmer et al., 1987).

NO wirkt über eine Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase (sGC) relaxierend an der glatten Gefäßmuskulatur, ist aber auch an der Regulation einer Vielzahl anderer physiologischer Prozesse in Säugetieren beteiligt. So spielt der NO-sGC-cGMP-Signaltransduktionsweg u. a. eine entscheidende Rolle im Immunsystem als Bestandteil der unspezifischen Abwehrreaktion, beim Zellwachstum bzw. der -proliferation und bei der neuronalen Transmission (Schmidt et al., 1994).

In zahlreichen experimentellen und klinischen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass ein Mangel an endogenem NO, beispielsweise verursacht durch eine verminderte endotheliale Freisetzung, maßgeblich zur Entwicklung kardiovaskulärer, pulmonaler, endothelialer, renaler und hepatischer Erkrankungen sowie erektiler Dysfunktionen beiträgt (Evgenov et al., 2006).

Die bisherige Therapie einiger dieser Erkrankungen beinhaltete die exogene Zufuhr von NO durch organische Nitrate oder andere NO-Donatoren (z. B. Molsidomin) bzw. „Nitro-Vasodilatoren“ (z. B. Nitroprussidnatrium). Allerdings ist die Wirkung dieser Substanzen limitiert durch einen insuffizienten Biometabolismus (Li et al., 2006), die Entwicklung einer Nitrattoleranz bei kontinuierlicher Applikation (Munzel et al., 2005) und die unspezifischen Interaktionen mit anderen Verbindungen, wie dies z. B. bei der Peroxynitrit-vermittelten Tyrosinnitration der Fall ist (Dikalov et al., 1998). Dennoch zeigen Patienten, die mit organischen Nitraten behandelt wurden, meist eine Verbesserung ihrer Symptomatik. Es sei jedoch

angemerkt, dass keine überzeugenden Studien existieren, die eine verminderte Mortalität infolge dieser Therapie belegen (Evgenov et al., 2006).

Erst kürzlich wurden durch die Arbeitsgruppe um Johannes-Peter Stasch Verbindungen entwickelt und hergestellt, die auf einem direkten Weg, also NO-unabhängig, die lösliche Guanylatcyclase aktivieren bzw. stimulieren und damit erhebliche Vorteile gegenüber den bisherigen Therapieansätzen aufweisen. Eine dieser Substanzen, auf welche in den nächsten Kapiteln noch genauer eingegangen wird, ist Riociguat. Diese Verbindung gehört zu den löslichen Guanylatcyclase-Stimulatoren und hat ihre therapeutische Kompetenz bereits bei der Behandlung der pulmonalen Hypertonie (die Resultate der Phase II-Studie wurden im Juni 2007 veröffentlicht) unter Beweis gestellt.

### 2.2.1 Die Guanylatcyclase

Die Guanosin-Nukleotidyl-(Guanylyl-, Guanylat-)Cyclase ist ein ubiquitär vorkommendes Signaltransduktionsenzym, welches die Umwandlung von Guanosin-5'-triphosphat (GTP) in den second messenger cyclo-Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP) katalysiert. Das cGMP konnte erstmalig 1963 im Urin von Ratten (Ashman et al., 1963) und zu einem späteren Zeitpunkt in fast allen Geweben der Tiere nachgewiesen werden (Goldberg et al., 1969). Es besitzt eine große Anzahl intrazellulärer Bindungsproteine, über welche die biologischen Effekte vermittelt werden. Diese können in drei Gruppen aufgeteilt werden: cGMP-abhängige Proteinkinasen, cGMP-regulierte Ionenkanäle und cGMP-bindende Phosphodiesterasen (Hofmann et al., 2006; Beavo et al., 1995). Erwähnenswert erscheint dabei, dass eine wichtige Funktion der ersten Gruppe, also der cGMP-abhängigen Proteinkinasen, die Relaxation glatter Muskulatur darstellt.

Nach ihrer Verteilung in aufgetrennten Gewebefractionen werden zwei Formen der Guanylatcyclase unterschieden. Zum Einen gibt es die partikuläre membrangebundene Guanylatcyclase (particulate GC, pGC), welche als Rezeptor für das ANP (atriales natriuretisches Peptid) dient; zum Anderen existiert eine cytosolische lösliche Guanylatcyclase, die ein Rezeptor für gasförmige Liganden, speziell für NO und CO (Kohlenmonoxid), darstellt (Evgenov et al., 2006).

#### 2.2.1.1 Struktur der löslichen Guanylatcyclase

Bei der löslichen Guanylatcyclase handelt es sich um ein heterodimeres Enzym, welches aus einer größeren  $\alpha$ -Untereinheit und einer kleineren häm-bindenden  $\beta$ -Untereinheit besteht, wobei sich auch Homodimere dieser Untereinheiten formieren können (Zabel et al., 1999). Es existie-

ren vier sGC-Untereinheiten:  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$  und  $\beta_2$ , die in ihrem Molekulargewicht je nach Spezies und Isoform zwischen 73 und 82 KDa für die  $\alpha$ - und 70 bis 76 KDa für die  $\beta$ -Untereinheit variieren. Die  $\alpha_1/\beta_1$ - und  $\alpha_2/\beta_1$ -Heterodimere stellen zwei funktionell nicht zu unterscheidende Isoformen der sGC dar und gehören zu den bisher am besten untersuchten Varianten (Mayer et al., 2001; Zabel et al., 1998). Die  $\alpha_1/\beta_1$ -sGC kommt ubiquitär in nahezu allen Geweben vor, wird jedoch insbesondere in der Lunge, im Gehirn und den Thrombozyten exprimiert, während die  $\alpha_2/\beta_1$ -Isoform hauptsächlich im Gehirn und der Plazenta zu finden ist (Mergia et al., 2003). Im Gegensatz zur  $\alpha_1$ -Untereinheit weist die  $\alpha_2$ -Untereinheit eine Konsensussequenz auf, die eine Interaktion mit PDZ-Domänen ermöglicht (Hoffmüller et al., 1999). Über diese Domäne bindet die  $\alpha_2/\beta_1$ -sGC an einem Komplex aus nNOS, NMDA-Kanal und PSD95 synaptischer Membranen und könnte somit an der Modulation der synaptischen Übertragung beteiligt sein (Russwurm et al., 2001).

Die  $\beta$ -Untereinheit enthält eine N-terminale hämbindende Domäne, welche eine Länge von etwa 200 Aminosäuren aufweist (Lyer et al., 2003; Nioche et al., 2004; Pellicena et al., 2004). Die prosthetische Hämgruppe ist entscheidend für die Aktivierung der sGC durch NO und führt zu einem charakteristischen Peak bei 431 nm im UV/Vis-Spektrum (Soret-Bande). Dabei ist das Häm über Histidin<sub>105</sub> der  $\beta$ -Untereinheit mit dem zentralen Eisenatom sowie über die angrenzenden Aminosäuren der Häm-Propionsäuren Tyrosin<sub>135</sub>, Serin<sub>137</sub> und Arginin<sub>139</sub> komplexiert (Pellicena et al., 2004; Schmidt et al., 2004; Wedel et al., 1994). Es sei angemerkt, dass ein Austausch des Histidins zur Expression einer hämfreien sGC führt (Wedel et al., 1994; Zhao et al., 1998; Martin et al., 2001), und dass eine nachträgliche Rekonstruktion dieses Enzyms mit Häm dennoch nicht die Wiederherstellung der Aktivierbarkeit durch NO zur Folge hat (Förster et al., 1996). Die  $\alpha$ -Untereinheit scheint für die Bindung des Häms eine nur untergeordnete Rolle zu spielen, vermutlich ist sie jedoch von Bedeutung für die Bindung der NO-unabhängigen sGC-Stimulatoren (Stasch et al., 2001; Koglin et al., 2003).

Neben der N-terminalen hämbindenden Domäne besteht die sGC auch aus einer Dimerisierungsdomäne und einer C-terminalen katalytischen Cyclasedomäne (Lucas et al., 2000). Dabei lässt sich für die katalytische Domäne eine ausgeprägte Sequenzhomologie zu den entsprechenden Domänen der partikulären Guanylatcyclase und der Adenylatcyclase nachweisen. Allen drei Domänen gemein ist, dass sie sich aus zwei identischen bzw. stark homologen, in typischer Kopf-Schwanz-Position gegenüberliegenden Untereinheiten formieren (Sunahara et al., 1998; Tesmer et al., 1997). Es werden die katalytischen Domänen beider Untereinheiten für die Bildung eines aktiven katalytischen Zentrums benötigt (Mayer et al., 2001; Hobbs et al., 2000;

Winger et al., 2005). Hinsichtlich der Dimerisierungsdomäne sei abschließend erwähnt, dass auch hier eine gewisse Homologie zur entsprechenden Sequenz der pGC besteht, und dass beide Domänen vermutlich eine ähnliche Sekundärstruktur aufweisen. Durch Zhao und Mitarbeiter konnte gezeigt werden, dass C-terminale Deletionsmutanten, die eine solche Domäne beinhalten, dennoch zur Dimerisierung befähigt sind (Zhao et al., 1997).

### 2.2.2 Der NO-sGC-cGMP-Signaltransduktionsweg

Stickstoffmonoxid (NO) stellt den physiologischen Aktivator der löslichen Guanylatcyclase (sGC) dar. Es wird mit Hilfe eines im Endothel exprimierten Enzyms, der NO-Synthase, als Produkt der enzymatischen Konversion von L-Arginin zu L-Citrullin gebildet (Mayer und Andrew, 1998). Dabei wird die Aktivität dieses endothelialen Enzyms insbesondere über die Konzentration der freien intrazellulären Calciumionen reguliert. Bisher konnten vier Isoformen der NO-Synthase identifiziert werden. Dazu gehört die neuronale NOS (nNOS, NOS I), welche für die Signalübertragung nitruiniger Neurone sowie deren Modulation verantwortlich ist. Eine andere Isoform ist die induzierbare NOS (iNOS, NOS II), die eine wichtige Rolle in der Immunabwehr spielt, jedoch keiner  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Regulation unterliegt. Weitere Isoformen stellen die endotheliale NOS (eNOS, NOS III) und die erst kürzlich identifizierte mitochondriale NOS (mtNOS) dar. Die Aktivität der endothelialen NOS führt zur bereits oben genannten Relaxation der Gefäßwand, wohingegen die mitochondriale NOS vermutlich einen Einfluss auf die Biogenese der Mitochondrien hat (Ghafourifar und Richter, 1997; Elfering et al., 2002; Nisoli et al., 2003).

Aufgrund seines gasförmigen Aggregatzustandes kann NO leicht durch Membranen diffundieren und auf diesem Weg nicht nur autokrin sondern auch parakrin wirken. Vermutlich existiert über eine reversible Bindung an Hämoglobin sogar eine endokrine Wirkung (Luchsinger et al., 2003). Voraussetzung für die NO-induzierte Aktivierung der sGC ist, dass das zentrale Eisenatom der prosthetischen Häm-Gruppe im reduzierten Zustand vorliegt ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Eine Umwandlung in die oxidierte Form ( $\text{Fe}^{3+}$ ) hat zur Folge, dass die sGC nicht mehr sensitiv für NO ist und demnach nicht mehr durch dieses aktiviert werden kann (Foerster et al., 1996; Ignarro et al., 1986). Wie bereits oben erwähnt, ist das Häm über Histidin<sub>105</sub> der  $\beta$ -Untereinheit am zentralen Eisenatom komplexiert und bildet einen pentakoordinierten Histidyl-Häm-Komplex. Die Bindung von NO an das zentrale Eisenatom hat die Ausbildung einer kurzlebigen hexakoordinierten Histidin-Häm-NO-Zwischenstufe zur Folge, welche wiederum in eine pentakoordinierte Nitrosyl-Häm-Formation zerfällt (Evgenov et al., 2006). Spektroskopisch bedeutet der Übergang vom

pentakoordinierten Histidyl-Häm-Komplex zum ebenfalls pentakoordinierten Nitrosyl-Häm-Komplex eine Verschiebung der Soret-Bande im UV/Vis-Spektrum von 431 nm zu 398 nm.

Es sei allerdings angemerkt, dass der Mechanismus der sGC-Aktivierung durch NO noch nicht vollständig geklärt ist. So konnte beispielsweise durch verschiedene Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass die Konversion der hexakoordinierten Histidin-Häm-NO-Zwischenstufe zum pentakoordinierten Nitrosyl-Häm-Komplex von der Konzentration freien Stickstoffmonoxids abhängt, was wiederum eine zweite NO-Bindungsstelle voraussetzt (Ballou et al., 2002; Zhao et al., 1999). Des Weiteren fand man mit Hilfe spektroskopischer Untersuchungen heraus, dass eine zwar NO-gebundene jedoch eigentlich inaktive Form der sGC existiert (Cary et al., 2005; Russwurm et al., 2004). Dieser Zustand findet sich in Gegenwart niedriger NO-Konzentrationen und kann jederzeit durch das Hinzufügen von NO, dem sGC-Substrat GTP oder dem Reaktionsprodukt cGMP zur aktiven sGC transformiert werden (Cary et al., 2005; Russwurm et al., 2004). Letztendlich bewirkt die Ausbildung des Nitrosyl-Häm-Komplexes und die damit verbundene Spaltung der Histidyl-Häm-Bindung eine 200- bis 400-fache Aktivierung der sGC (Humbert et al., 1990; Stone und Marletta et al., 1996; Hönicka et al., 1999).

Allerdings ist der sGC-cGMP-Reaktionsweg nicht der einzige, der durch das NO aktiviert wird. Aufgrund seiner Reaktivität mit eisenhaltigen katalytischen Zentren kann NO, insbesondere in höheren Konzentrationen, auch auf verschiedene andere Enzyme einwirken (Evgenov et al., 2006). In sehr hohen Konzentrationen entfaltet NO sogar zytotoxische Wirkungen durch Komplexierung von Eisen-Schwefel-Verbindungen im aktiven Zentrum von Enzymen, die für den Energiehaushalt der Zellen essentiell sind (Nathan et al., 1992). Diese alternativen Mechanismen könnten die bereits bekannten gegenteiligen Funktionen des NO zur Folge haben. Auf diese Weise ließen sich die proaggregatorischen (Li et al., 2003) und antiaggregatorischen (Gambaryan et al., 2004; Schwarz et al., 2001) Effekte in den Thrombozyten sowie die proatherosklerotischen (Feil et al., 2005; Wolfsgruber et al., 2003) und antiatherosklerotischen (Melichar et al., 2004; Sinnaeve et al., 2001) Effekte innerhalb der Blutgefäße erklären.

### 2.2.3 Weitere physiologische Aktivoren der sGC

Neben NO können auch das ebenfalls gasförmige Kohlenmonoxid (CO) sowie das Protoporphyrin IX (PPIX) zu einer Aktivierung der sGC führen. Hinsichtlich des CO ist, ähnlich wie bei NO, die Bindung an das zentrale Eisenatom der prosthetischen Hämgruppe Voraussetzung für die Aktivierung der sGC, wobei diese jedoch nur maximal um das fünffache möglich ist (Friebe et al., 1996; Hönicka et al., 1999; Denninger et al., 2000).

Das Protoporphyrin IX ist die direkte Vorstufe des Häms. Durch den Ferrochelatase-katalysierten Einbau von zweiwertigem Eisen wird die Biosynthese von Häm vervollständigt. Um die Funktion des zentralen Eisenatoms des Häms näher zu verstehen, wurden bereits in der Vergangenheit zahlreiche Versuche mit der Protoporphyrin IX-haltigen, also eisenfreien sGC-Rekonstruktion, durchgeführt (Ignarro et al., 1982; Ignarro et al., 1984). Aufgrund des Fehlens des zentralen Eisenatoms ist es dem PPIX nicht möglich, eine Bindung mit dem Histsidin<sub>105</sub> der  $\beta$ -Untereinheit einzugehen, wodurch ein Nitrosyl-Häm-Komplex initiiert wird. Dies wiederum hat eine Aktivierung der sGC zur Folge (Ignarro et al., 1984; Friebe et al., 1997; Friebe und Kösling, 1998).

#### 2.2.4 Inhibitoren der sGC

Inhibitoren der sGC, beispielsweise ODQ (1H-[1,2,4]oxadiazolol[4,3-a]quinoxalin-1-on), NS2028, Methylenblau oder Ferricyanid, bewirken durch Oxidation des zentralen Eisenatoms der prosthetischen Hämgruppe eine Umwandlung des Enzyms in eine NO-unsensitive Form (Hwang et al., 1998; Kannan et al., 1995; Mayer et al., 1993; Olesen et al., 1998; Schrammel et al., 1996; Zhao et al., 2000). Das ODQ im Besonderen hat bereits bei Vorliegen nur geringer Konzentrationen die Oxidation der sGC zur Folge und führt in hohen Konzentrationen zur unspezifischen Oxidation weiterer Hämproteine (Feelisch et al., 1999; Zhao et al., 2000). Diese konzentrationsabhängige Wirkung und damit relative Spezifität hat ODQ zu einem häufig verwendeten biochemischen Hilfsmittel werden lassen, um die pGC- und sGC-vermittelten Wirkungen im Gewebe zu differenzieren.

Die Oxidation des zentralen Eisenatoms der Hämgruppe und die damit verbundene Überführung der sGC in einen NO-unsensitiven Zustand kann auch endogen durch reaktive Sauerstoff- und Nitrogenspecies verursacht werden. Dazu gehören u. a. das Superoxid-Radikal ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) und Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ), welche durch oxidativen Stress generiert werden (Stasch et al., 2006). Damit ist der NO-sGC-cGMP-Signaltransduktionsweg einerseits durch eine reduzierte Bioverfügbarkeit des NO und andererseits durch die Änderung des Redox-Zustandes der sGC limitiert. Das hat nicht nur die Unempfindlichkeit gegenüber endogenem sondern auch exogen zugeführtem NO, beispielsweise in Form NO-freisetzender Medikamente, zur Folge (Stasch et al., 2006).



### 2.2.5 Pharmakologische Stimulatoren und Aktivatoren der sGC

Die sGC-Stimulatoren und -Aktivatoren sind zwei neuartige Medikamentengruppen, die eine NO-unabhängige Aktivierung der sGC bewirken.

Die anfänglich entwickelten Verbindungen stimulieren die sGC auf einem direkten Weg und erhöhen damit die Sensitivität der reduzierten Form dieses Enzyms für bereits geringe Konzentrationen von NO. Die sGC-Aktivatoren hingegen wirken nicht nur NO-unabhängig, sondern sind auch in der Lage, oxidierte oder gar hämfreie Formen der sGC zu aktivieren.

Neben der klinischen Bedeutung bei der Behandlung verschiedenster Erkrankungen haben sich sowohl die NO-unabhängigen aber Häm-abhängigen sGC-Stimulatoren als auch die NO- und Häm-unabhängigen sGC-Aktivatoren als wertvolle Werkzeuge bei der Erforschung der Physiologie und Pathophysiologie des NO-sGC-cGMP-Signaltransduktionsweges herausgestellt (Evgenov et al., 2006).

#### 2.2.5.1 NO-unabhängige aber Häm-abhängige sGC-Stimulatoren

Im Jahre 1994 wurden durch Wissenschaftler der Bayer HealthCare AG unerwartet Derivate des 5-substituierten-2-Furaldehyd-Hydrazon als direkte NO-unabhängige Stimulatoren der sGC entdeckt. Ursprünglich suchte man nach Verbindungen, welche über eine Steigerung der NO-Synthese, also NO-abhängig, die sGC in Endothelzellen von Schweinen zu stimulieren vermögen.

Die neuen Substanzen wiesen allerdings eine unerwünschte Besonderheit auf: Ihre Potenz hinsichtlich der sGC-Stimulation war lichtabhängig und stieg unter Lichtexposition an.

Im Dezember 1994 wurde unabhängig davon durch Ko und Mitarbeiter eine strukturell ähnliche Verbindung beschrieben, das Indazolderivat YC-1, welches zu einer cGMP-vermittelten Hemmung der Thrombozytenaggregation führte. Später konnte gezeigt werden, dass diese antiaggregatorische Wirkung von YC-1 auf einer direkten und NO-unabhängigen Aktivierung der sGC beruht; YC-1 wurde damit als ein Stimulator hochgereinigter sGC charakterisiert. Vorteil dieser Substanz war, dass ihre Potenz nicht durch vorherrschende Lichtverhältnisse beeinflusst wurde (Ko et al., 1994; Friebe et al., 1996; Hoenicka et al., 1999; Mulsch et al., 1997).

In den folgenden Jahren wurden weitere unterschiedliche Verbindungen identifiziert, welche die sGC auf eine NO-unabhängige Art und Weise aktivieren, jedoch im Vergleich zu YC-1 z. T. um das Tausendfache wirksamer sind (Ko et al., 1994; Fernandez et al., 2001; Lee et al., 2001; Selwood et al., 2001; Straub et al., 2001; Zhang et al., 2003). Zu diesen Substanzen gehören u. a. Bay 41-2272, Bay 41-8543, CMF-1571, A-350619 und Riociguat (Bay 63-2521). Die genannten

sGC-Stimulatoren sind der Familie der Indazole mit YC-1 als Leitsubstanz zuzuordnen. Daneben existieren noch weitere sGC-Stimulatoren, welche zwar eine gänzlich andere Struktur, aber einen den Indazolen ähnlichen Wirkmechanismus aufweisen und der Familie der Aryl-Acrylamide zugehörig sind (Miller et al., 2003; Nakane, 2003; Nakane et al., 2006; Zhang et al., 2003).

#### *Die molekulare Wirkungsweise der sGC-Stimulatoren*

Charakteristisch für alle sGC-Stimulatoren ist einerseits die Abhängigkeit von der Präsenz einer reduzierten prosthetischen Hämgruppe und andererseits die in Kombination mit NO vorhandene streng synergistische Enzymaktivierung. Letzteres bedeutet, dass NO-Konzentrationen, die eine nur schwache sGC-Aktivierung zur Folge hätten, in der Gegenwart von sGC-Stimulatoren (beispielsweise YC-1) in ihrer Wirkung potenziert werden (Friebe et al., 1996; Friebe et al., 1998; Hoenicka et al., 1999). Dieser Effekt basiert, zumindest teilweise, auf einer Stabilisation des Nitrosyl-Häm-Komplexes und der erforderlichen Transformation des NO-aktivierten Enzyms in einen höheren Aktivierungszustand (Cary et al., 2005; Russwurm et al., 2004). Des Weiteren wird durch YC-1 die eigentlich schwache CO-induzierte sGC-Aktivierung stark potenziert (Stone und Marletta, 1995, 1996; Friebe et al., 1996; Hoenicka et al., 1999; Denninger et al., 2000). Dieser Aspekt lässt eine mögliche physiologische Wirkung von CO in Anwesenheit einer endogenen YC-1-ähnlichen Substanz vermuten, welche allerdings bisher noch nicht gefunden werden konnte (Cary und Marletta, 2001; Mayer und Kösling, 2001).

Der genaue Mechanismus der sGC-Aktivierung durch NO-unabhängige Stimulatoren konnte bisher noch nicht vollständig geklärt werden. Insbesondere die vermeintliche Lokalisation der Bindungsstelle ist Gegenstand kontroverser Diskussionen. Es existieren dazu folgende Theorien, die am Beispiel von YC-1 erläutert werden sollen. Wie bereits unter 2.1.1 erwähnt, bestehen zwischen den katalytischen Domänen der Adenylatcyclase und der sGC Sequenzhomologien (Sunahara et al., 1998). Durch verschiedene Studien (Friebe et al., 1999; Friebe et al., 1997) konnte gezeigt werden, dass YC-1 mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit an die katalytische Domäne der sGC bindet und das Enzym auf eine Weise beeinflusst, die der Forskolin-induzierten Aktivierung der Adenylatcyclase ähnelt (Mayer et al., 2001; Tesmer et al., 1997). Im Gegensatz dazu konnte anhand spektroskopischer Untersuchungen demonstriert werden, dass sich YC-1-induzierte Effekte (wie beispielsweise Alterationen der CO-Häm-Bindung) in den Häm-enthaltenden Fragmenten der  $\beta$ -Untereinheit und vor allem in Abwesenheit der katalytischen Domäne bemerkbar machen (Denninger et al., 2000).

Zum aktuellen Zeitpunkt erscheinen beide Theorien durchaus plausibel, eine genaue Klärung des Lokalisationsortes der Bindungsstelle für NO-Stimulatoren wird jedoch erst durch zukünftige Studien erfolgen.

#### 2.2.5.2 *NO- und Häm-unabhängige sGC-Aktivatoren*

Neben den oben beschriebenen NO-unabhängigen aber Häm-abhängigen sGC-Stimulatoren konnte in einem „High-Throughput-Screen“ (HTS) eine weitere Substanzklasse identifiziert werden, welche die sGC ebenfalls NO-unabhängig aktiviert, sonst jedoch vollständig andere Charakteristika aufweist. Über 900 000 Verbindungen wurden mit diesem Verfahren untersucht, wobei im Jahre 2002 als erster NO-unabhängiger sGC-Aktivator das BAY 58-2667 identifiziert werden konnte. Diese Substanz aktiviert die sGC bereits in subnanomolaren Konzentrationen und weist im Gegensatz zu den sGC-Stimulatoren in Kombination mit NO eine nur additive nicht aber synergistische Wirkung auf (Stasch et al., 2002c). Wie auch die nachfolgend entwickelten Verbindungen dieser Substanzklasse (z. B. HMR-1766), besitzt BAY-58-2667 die Eigenschaft, oxidierte oder gar hämfreie Varianten der sGC zu aktivieren (Stasch et al., 2002c).

#### *Die molekulare Wirkungsweise der sGC-Aktivatoren*

Im Gegensatz zu den sGC-Stimulatoren, deren Wirkung durch Oxidation oder Entfernung der prosthetischen Hämgruppe der sGC beinahe vollständig aufgehoben wird, potenziert sich die durch BAY 58-2667-induzierte Enzymaktivierung noch (Stasch et al., 2002c).

Mit Hilfe zahlreicher Aktivitäts- und Bindungsuntersuchungen, insbesondere spektroskopischer Analysen, konnte gezeigt werden, dass die prosthetische Hämgruppe durch BAY 58-2667 ersetzt wird (Evgenov et al., 2006). Die Hämgruppe und BAY 58-2667 konkurrieren dabei über ihre negativ geladenen Carboxyl-Gruppen um die Häm-Bindungsstelle der sGC (Pellicena et al., 2004; Schmidt et al., 2004; Schmidt et al., 2005). Die verstärkte Wirkung der sGC-Aktivatoren bei Vorhandensein einer oxidierten prosthetischen Hämgruppe lässt sich durch deren, im Vergleich zur reduzierten Form deutlich verminderten, Affinität zur Häm-Bindungsstelle erklären (Schmidt et al., 2004). Daraus resultiert ein weiterer interessanter Aspekt der sGC-Aktivierung: Zwischen BAY 58-2667 oder auch HMR-1766 besteht ein Synergismus mit ODQ. Während die sGC-Stimulatoren in Gegenwart von ODQ gehemmt werden, führt die Oxidation des Häms durch ODQ zu einer erhöhten Bindung der sGC-Aktivatoren und damit Potenzierung deren Wirkung.

### 2.2.6 Der Effekt der NO-unabhängigen sGC-Stimulatoren und -Aktivatoren bei chronischer Niereninsuffizienz

Basierend auf den Ergebnissen früherer Untersuchungen, die den NO-Donatoren einen vorbeugenden Effekt auf die Matrix-Akkumulation und der daraus folgenden renalen Fibrose bestätigten (Peters et al., 2003), konnte mit Hilfe erst kürzlich durchgeführter experimenteller Studien eine Verbesserung der renalen Schädigung durch einen Anstieg der intrazellulären cGMP-Konzentration nachgewiesen werden. Dabei war die Erhöhung des intrazellulären cGMP's wiederum die Folge einer direkten Stimulation der sGC. So führte die Verabreichung von BAY 41-2272 an Ratten mit einer akuten Glomerulonephritis, determiniert durch eine reduzierte Proteinurie, zu einer Abnahme der renalen Dysfunktion. Deutlich wurde dieser Effekt durch einen Rückgang sowohl der TGF $\beta$ -Produktion als auch des kollagenfaserreichen Bindegewebes sowie der Makrophageninfiltration (Peters et al., 2004). In einer anschließenden Studie konnte weiterhin gezeigt werden, dass BAY 41-2272 einen Anstieg der cGMP-Konzentration in Mesangiumzellen bewirkte, was deren verminderte Proliferation und eine reduzierte Produktion von Matrixproteinen zur Folge hatte (Hohenstein et al., 2005).

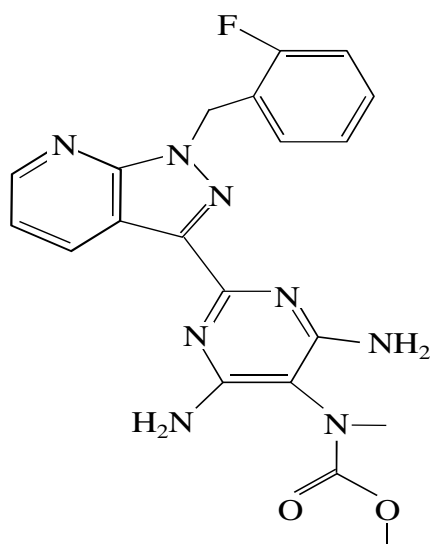
Im Rahmen einer Nierenerkrankung tritt interessanterweise kompensatorisch eine Hochregulation der sGC-Expression und damit korrelierend ein Anstieg der cGMP-Konzentration auf (Peters et al., 2004; Hohenstein et al., 2005). Dabei scheint es sich um einen endogenen protektiven Mechanismus zu handeln, welcher wiederum den therapeutischen Nutzen der sGC-Stimulatoren bei der Prävention renaler Erkrankungen bestätigt.

Auch bei chronisch verlaufenden Glomerulonephritiden konnte für das BAY 41-2272 ein aus therapeutischer Sicht positiver Effekt auf das Fortschreiten der progressiven Sklerose und Deposition von Matrixproteinen durch Verminderung der TGF $\beta$ -Expression nachgewiesen werden (Wang et al., 2005; Wang et al., 2006). Dieser protektive Einfluss beruhte ebenfalls auf einer Erhöhung der cGMP-Konzentration durch eine direkte Stimulation der sGC. Die im Vergleich dazu festgestellte Wirkung des PDE-Inhibitors Pentoxifyllin, das dem Abbau des cGMP's vorbeugt, wurde bei weitem übertroffen (Wang et al., 2006).

Darüber hinaus hatte eine insgesamt 18-wöchige BAY 58-2667-Behandlung bei Ratten mit einer subtotalen Nephrektomie neben einer Verlangsamung der Progression einer chronischen Niereninsuffizienz auch ein Absinken des Blutdruckes sowie eine Reduktion der linksventrikulären Hypertrophie und der koronaren Wanddicke zur Folge (Kalk et al., 2006).

### 2.2.7 Riociguat (BAY 63-2521)

Wie bereits mehrfach erwähnt, gehört Riociguat zu den NO-unabhängigen sGC-Stimulatoren. Es ist hinsichtlich seiner Struktur anderen sGC-Stimulatoren (beispielsweise BAY 41-2272 oder BAY 41-8543) sehr ähnlich und wurde ebenfalls, basierend auf dem YC-1 als Leitstruktur, synthetisiert (Straub et al., 2001; Stasch et al., 2001; Stasch et al., 2002a; Stasch et al., 2002b).



**Abbildung 1.** Strukturformel von Riociguat

Die Stimulation der sGC durch Riociguat erfolgt dosisabhängig, wobei die Enzymaktivität bis auf das 73-fache gesteigert werden kann. In Kombination mit dem NO-Donator DEA/NO (2-(N,N-diethylamino)-diazenolat-2-oxid) ist sogar eine Erhöhung der sGC-Aktivität auf das 112-fache möglich (Schermyly et al., 2008).

Mit dem Ziel, Riociguat zur Behandlung der pulmonalen Hypertonie einzusetzen, wurde die Substanz erst kürzlich im Rahmen einer randomisierten, placebokontrollierten Blindstudie hinsichtlich seiner Verträglichkeit, Sicherheit und seiner pharmakodynamischen sowie -kinetischen Eigenschaften geprüft. Dabei konnte in dieser Phase-I-Studie, das heißt nach der Verabreichung an gesunde, männliche Probanden, eine gute Verträglichkeit und ein hohes Sicherheitsprofil bis zu einer Einzeldosis von 5 mg oral festgestellt werden. Des Weiteren fielen eine dosisabhängige Reduktion des diastolischen Blutdruckes sowie eine Steigerung der Herzrate auf. Zwischen den einzelnen Individuen zeigte sich jedoch eine starke Variabilität der pharmakokinetischen Eigenschaften von Riociguat (Frey et al., 2007).

Die folgende Phase-II-Studie, durchgeführt an Patienten mit einer moderaten bis schweren pulmonalen Hypertonie, ergab eine ebenfalls dosisabhängige Verbesserung der wichtigen hämodynamischen Parameter (systolischer Blutdruck, systemischer Gefäßwiderstand, mittlerer Pulmonalarteriendruck, pulmonaler Gefäßwiderstand, kardialer Index) im Vergleich zu inhaliertem NO. Dabei korrelierten diese Effekte sehr stark mit den jeweiligen Plasmakonzentrationen des Riociguat (Hossein et al., 2007).

Nach diesen sehr vielversprechenden Ergebnissen aus den Phase-I- und -II-Studien wurde im Jahr 2008 mit der Phase-III-Studie begonnen, also mit der Untersuchung an einer größeren Patientengruppe.

## 2.3 Das 5/6-Nephrektomie-Modell der Ratte

Mit Hilfe dieses Tiermodells wird durch die umfassende Reduktion funktionalen Nierengewebes eine chronische Niereninsuffizienz bis hin zum Urämiesyndrom induziert. Es wurde bereits 1932 durch Chanutin beschrieben und umfasst zwei chirurgische Interventionen. Während der ersten Operation wird nach Dekapsulation der Niere eine partielle Nephrektomie durchgeführt. Diese kann prinzipiell durch drei verschiedene Methoden erfolgen: durch Resektion von zwei Dritteln der Niere, Infarzierung von zwei Dritteln der Niere durch Ligatur von Ästen der A. renalis oder durch die Ligatur beider Nierenpole (Strauch et al., 1988). Während der zweiten Operation einige Tage später wird dann eine totale Nephrektomie der kontralateralen, dekapsulierten Niere vorgenommen (Kleinknecht et al., 1988). Letztendlich führen alle drei Methoden zu einer Dezi- mierung des funktionalen Nierengewebes um 75 %, gelegentlich bis hin zu 90 %.

### 2.3.1 Histologische Veränderungen

Unmittelbar nach der Reduktion des Nierengewebes im Rahmen einer 5/6-Nephrektomie begin- nen Anpassungsvorgänge, die durch die höhere Belastung des übrigen Nierengewebes bedingt sind. So kommt es in dieser Phase zu einer Hypertrophie der Glomerula und damit zur Steige- rung der Filtrationsoberfläche (Waldherr et al., 1988). Histomorphologisch zeigen sich neben einer deutlichen Zunahme des glomerulären Durchmessers auch eine Dilatation von Kapillar- schlingen sowie die Vergrößerung der Kapillaroberfläche. Diese Veränderungen haben ihr Ma- ximum etwa 10 Wochen nach der 5/6-Nephrektomie erreicht (Shimamura et al., 1975).

Als Folge der erhöhten glomerulären Filtrationsrate des einzelnen Nephrons findet parallel dazu eine Dilatation der Tubuli statt. Diese äußert sich in einer Zunahme der inneren und äußeren Di- ameter sowie einer zellulären Hypertrophie und Hyperplasie. Häufig kommt es dabei auch zu einer Abflachung der Tubuluszellen und fokalem Verlust des tubulären Bürstensaumes (Waldherr et al., 1988).

In den nun nachfolgenden Wochen setzt in den Glomerula eine unregelmäßige Ausdehnung der mesangialen Matrix und der mesangialen Zellen ein, die von umschriebenen Ablösungen einzel- ner Endothel- und Epithelzellen von der glomerulären Basalmembran begleitet wird (Shimamura et al., 1975). Histomorphologisch finden sich entlang einiger Kapillarschlingen Vakuolisierungen von Podozyten und große Podozyten, die zahlreiche Proteintröpfchen enthal- ten. Resultat dieser Veränderungen ist eine Glomerulosklerose, die sich zunächst nur segmental am Gefäßpol oder aber in der Umgebung der Konvolute proximaler und distaler Tubuli manifes-

tiert. Im weiteren Verlauf kommt es jedoch zu einer Zunahme von Anzahl und Größe dieser sklerotischen Läsionen, was einen vollständigen Funktionsverlust der einzelnen Glomerula zur Folge hat (Waldherr et al., 1988).

In den Tubuli entstehen aufgrund einer gesteigerten Proteinurie und relativen Reabsorptionsüberlastung Proteinansammlungen. Aus der damit zusammenhängenden tubulären Einengung resultieren wiederum mikrozystische Dilatationen und eine progressive Tubulusatrophie, die mit einer interstitiellen Fibrose und mononukleären Zellinfiltration einhergeht.

An den Blutgefäßen kann in Abhängigkeit vom Blutdruck eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Verdickung der Media nachgewiesen werden. Insbesondere scheinen davon kleine und mittelgroße Arterien betroffen zu sein, die zudem subendotheliale fibrinoide Einlagerungen zeigen.

Die oben beschriebenen histologischen Veränderungen weisen zwar einen progressiven Charakter auf, allerdings kann das Ausmaß der Nierenschädigung zwischen einzelnen Tieren variieren. So hat neben dem prozentualen Anteil des entfernten Nierengewebes auch das Alter des Tieres Einfluss auf die Ausdehnung der Läsionen. Demnach zeigen jüngere Ratten eine ausgeprägtere glomeruläre Hypertrophie. Zudem weisen junge wachsende Tiere im Vergleich zu den älteren Ratten eine deutlich höhere metabolische Rate auf, was eine raschere Selbstintoxikation und damit kürzere Überlebenszeit zur Folge hat. Das Geschlecht hat ebenfalls einen nicht unerheblichen Effekt auf die Ausprägung der renalen Schädigung. Bekanntlich nehmen weibliche Tiere weniger Nahrung zu sich als männliche, was, zusätzlich zu den hormonellen Unterschieden, den Grad der Hyperfiltration zu beeinflussen vermag (Waldherr et al., 1988).

Zuletzt sei erwähnt, dass auch die Auswahl des Rattenstammes eine nicht zu unterschätzende Rolle spielt. Beispielsweise entwickeln einige Stämme trotz Nierenschädigung nahezu keine Glomerulosklerose (Grond et al., 1986).

### 2.3.2 Funktionelle Veränderungen

Der postoperative Verlauf kann entsprechend der Schwere der Nierenfunktionsstörung in vier Stadien eingeteilt werden. So folgt dem anfänglichen akuten Nierenversagen direkt nach der Operation eine vorübergehende Verbesserung der Nierenfunktion. An diese schließt sich das Stadium der „stabilen“ chronischen Niereninsuffizienz an, welches wiederum bei zunehmender Verschlechterung der renalen Funktion in das finale Nierenversagen übergeht. Sowohl Dauer als



auch Ausprägung der jeweiligen Stadien können zwischen den einzelnen Tieren stark variieren (Kleinknecht et al., 1988).

Das initiale akute Nierenversagen ist von nur kurzer Dauer und gekennzeichnet durch einen drastischen Anstieg des Plasmakreatininspiegels, der jedoch innerhalb weniger Tage wieder sinkt (Boudet et al., 1978). In dieser Phase kann gelegentlich eine frühe Sterblichkeit beobachtet werden, die abhängig ist vom Alter der Ratten, dem Volumen des entfernten Nierengewebes und der Fütterung (Ritz et al., 1978). Des Weiteren weisen Tiere innerhalb dieses Stadiums einen Gewichtsverlust (Laouari et al., 1982) und Stagnation ihres linearen Wachstums auf.

Etwa 24 Stunden nach der Operation setzt eine Verbesserung der Nierenfunktion ein, die anfänglich rasch und im weiteren Verlauf allmählich progredient stattfindet. Dies ist begründet in einer funktionellen Hypertrophie des verbliebenen Nierengewebes und kann zwischen einer und sechs Wochen andauern. Zudem entwickeln sich innerhalb dieser Phase die histologisch nachweisbaren Läsionen des Nierenrestgewebes, die in das Stadium der „stabilen“ chronischen Niereninsuffizienz führen. Die GFR beträgt zu diesem Zeitpunkt etwa 20-40 % der GFR der Kontrollgruppen. Das Fortschreiten der morphologischen Nierenschädigung bewirkt eine weitere Verschlechterung der renalen Funktion bis hin zum finalen Nierenversagen.

Sehr häufig bildet sich auch ein arterieller Hypertonus aus, der in seiner Ausprägung und dem Zeitpunkt seines Auftretens stark variieren kann. In den meisten Fällen korreliert der Blutdruckanstieg jedoch mit dem Absinken der GFR (Kleinknecht et al., 1988).

### 3. Zielsetzung dieser Arbeit

Im Jahre 1994 gelang mit der Entdeckung des YC-1 als Leitsubstanz der sGC-Stimulatoren die Entwicklung einer völlig neuartigen Wirkstoffklasse. Die dazugehörigen Präparate wirken ähnlich den organischen Nitraten, unterscheiden sich sonst jedoch grundlegend von letzteren, insbesondere hinsichtlich ihres Wirkmechanismus und der Effektivität. So aktivieren die sGC-Stimulatoren das Zielenzym für Stickstoffmonoxid (NO), die lösliche Guanylatcyclase (sGC), direkt und vor allem auf eine NO-unabhängige Art und Weise. Riociguat ist eine dieser neuartigen Substanzen. Es stellte seine Effektivität bereits bei der Behandlung der pulmonalen Hypertonie unter Beweis und befindet sich aktuell in Phase III der klinischen Prüfung.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Beurteilung der therapeutischen Kompetenz von Riociguat bei der Behandlung der chronischen Niereninsuffizienz. Vor allem aber soll der Einfluss des Pharmakons auf die Ausprägung kardiovaskulärer Folgeschäden geprüft werden. Im Vordergrund stehen vergleichende histologische Untersuchungen der Herzen und Nieren urämischer Wistar-Ratten, von denen ein Teil mit Riociguat behandelt wurde.

Rückblickend konnte in früheren Untersuchungen den NO-Donatoren ein vorbeugender Effekt auf die Matrix-Akkumulation und der daraus folgenden renalen Fibrose nachgewiesen werden (Peters et al., 2003). In einer weiteren, zeitlich späteren Studie wurde außerdem gezeigt, dass BAY 41-2272, ebenfalls ein sGC-Stimulator, einen Anstieg der cGMP-Konzentration in Mesangiumzellen zur Folge hatte. Dies wiederum führte zu einer verminderten Proliferation und Produktion von Matrixproteinen (Hohenstein et al., 2005). In dieser Arbeit soll nun geklärt werden, ob und inwieweit sich diese positive Wirkung auch auf Riociguat zurückführen lässt.

Weitere zu beantwortende Fragen sind:

1. Hat die Verabreichung von Riociguat an Ratten mit einer chronischen Niereninsuffizienz eine Verbesserung der renalen Funktion zur Folge?
2. Werden neben der renalen Fibrose auch andere histologische Parameter, wie z. B. die Glomerulosklerose, beeinflusst?
3. Hat Riociguat Auswirkungen auf die linksventrikuläre Myokardhypertrophie am niereninsuffizienten Rattenmodell?

## 4. Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Geräte

- ArtPad II, WACOM EUROPE, Neuss
- Autoanalyzer, HITACHI POWER TOOLS EUROPE, Deutschland
- Beckmann Kühlzentrifuge CEN J2-21, BECKMANN INSTRUMENTS, USA
- Blutdruckmessanlage, RHEMA LABORTECHNIK, Deutschland
- CCD-Kamera, KP-140, HITACHI EUROPE, Düsseldorf
- Histokinette TP1020, LEICA, Nussloch
- MacIntosh PowerPC 750/100, Fa. APPLE MacIntosh, USA
- Mess- und Stoffwechsellkäfige, SCHERING, Deutschland
- Mikroskop Axiovert 100, ZEISS AG, Stuttgart
- Mikroskop BH2, OLYMPUS, Hamburg
- Mikrotom Jung RM2025, LEICA, Nussloch
- Nahtmaterial, ETHICON, Norderstedt
- Operationsinstrumente, AESCULAP AG, Tuttlingen
- Operationsmikroskop, ZEISS AG, Stuttgart
- PowerLab/4sp, ADINSTRUMENTS, Hastings, England
- Tischzentrifuge Biofuge 13, HERAEUS, Berlin
- Tissue Tek Unikassetten, LEICA, Nussloch

#### 4.1.2 Chemikalien

Verwendet wurden Fest- und Feinchemikalien der Firmen: C. ROTH GmbH & Co., Karlsruhe; E. MERCK AG, Darmstadt; SIGMA, München.

Des Weiteren kamen Filme und Chemikalien von KODAK, Hemel Hampstead, England zur Anwendung.

Die Fütterung der Tiere erfolgte mit der Standarddiät 1320, Haltungsdiet für Ratten und Mäuse, ALTROMIN, Deutschland.

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Studiendesign

Die männlichen Wistar-Ratten wurden im Alter von zehn Wochen und einem Gewicht von 320 - 340 g randomisiert in drei Gruppen eingeteilt:

Gruppe 1 – 5/6-Nephrektomie + Kontrollfutter ( $n = 15$ )

Gruppe 2 – 5/6-Nephrektomie + Behandlung mit Riociguat ( $n = 12$ )

Gruppe 3 – Sham-Operation + Kontrollfutter ( $n = 10$ )

Nach Durchführung der 5/6-Nephrektomie wurde den Tieren eine Woche Zeit gegeben, sich von dem chirurgischen Eingriff zu erholen, bevor mit der Verabreichung von Riociguat begonnen wurde (Woche 0). Allerdings erfolgte bereits in dieser Woche zum Einen die Bestimmung der Glomerulären Filtrationsrate (GFR), und zum Anderen wurde die erste Blutdruckmessung mittels „Tail-Cuff-Methode“ durchgeführt.

Die Dauer der Studie belief sich auf insgesamt 18 Wochen. Während der Versuchsperiode wurden die Tiere wöchentlich gewogen, und der Blutdruck wurde via „Tail-Cuff-Methode“ in den Wochen 0, 2, 5, 9 und 15 gemessen. Zudem wurden die Tiere in den Wochen 0, 4 und 17 in Stoffwechselkäfige verbracht, um 24-Stunden-Sammelurin zu erhalten. Parallel dazu erfolgten Blutentnahmen aus den retroorbitalen Venen zur Bestimmung der Serumkreatininkonzentration. Anhand derer und der Kreatininkonzentration im Urin konnte unter Verwendung der entsprechenden Standardformel die GFR errechnet werden. Zusätzlich wurde der 24-Stunden-Sammelurin auf seinen Albumingehalt hin untersucht, um eine Aussage über die Albuminurie zu treffen.

Nach 18 Wochen wurden die Tiere getötet. Ratten, die bereits vor Versuchsende verstarben, wurden nicht in die Auswertung miteinbezogen. Es wurden Blutproben zur Bestimmung der Serumkonzentrationen der Aspartat-Amino-Transferase (ASAT), Alanin-Amino-Transferase (ALAT), alkalischen Phosphatase (AP), Glutamat-Dehydrogenase (GLDH), Creatinkinase (CK), des Kreatinins, Harnstoffs und Gesamteiweißes entnommen. Weiterhin wurden die Serumkonzentrationen des atrialen natriuretischen Peptides (ANP) und des b-type natriuretic peptide (BNP) sowie die Plasma-Renin-Aktivität gemessen.

Es wurden außerdem die Herzen und Nieren entnommen und zunächst gewogen. Im Anschluss daran wurden die Organe fixiert und in Paraffin eingebettet. Mit Hilfe eines Mikrotoms erfolgte die Anfertigung von Gewebeschnitten, welche gefärbt und letztendlich histologisch ausgewertet werden konnten.

#### 4.2.2 Tierhaltung

Alle Untersuchungen wurden unter Beachtung des Deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt (Anzeigennummer G 0264/01). Das Aktenzeichen der behördlichen Genehmigung lautet 50.05-240-15/02 Nr. 400/A14, das Datum belief sich vom 01.05.2002 bis 30.04.2005.

Die Ratten wurden unter kontrollierten Umgebungsbedingungen mit 20 °C Temperatur, 46 % Luftfeuchtigkeit und einer Lichtperiode von 6.00 Uhr bis 18.00 Uhr gehalten. Die Tiere hatten freien Zugang zum Futter, auch Wasser wurde ihnen *ad libitum* zur Verfügung gestellt. Bei dem pelletierten Futter handelte es sich um ein standardisiertes Ratten- und Mäuse-Alleinfuttermittel (Altromin®, Altromin Co., Lage, Deutschland).

#### 4.2.3 Die Durchführung 5/6-Nephrektomie

##### 4.2.3.1 *Vorbereitung und Anästhesie*

Zur Operationsvorbereitung wurde den Tieren zwölf Stunden vor Operationsbeginn das Futter entzogen, Trinkwasser erhielten sie jedoch weiterhin *ad libitum*. Außerdem wurden die Tiere gewogen. Es erfolgte eine Inhalationsnarkose mit Isofluran, und die Ratten wurden nach erfolgreicher Narkoseeinleitung auf einen beheizten Tisch plaziert, um die Aufrechterhaltung der Körpertemperatur zu gewährleisten. Das Operationsfeld wurde großzügig geschoren und desinfiziert. Die Zunge des jeweiligen Tieres wurde seitlich aus dem Maulwinkel herausgezogen, um ein Zurückfallen und eine Verlegung der Trachea zu vermeiden. Zudem erfolgte eine Beträufelung der Zunge und der Augen mit physiologischer Kochsalzlösung zur Vorbeugung einer Austrocknung.

##### 4.2.3.2 *Operationsmethode*

Die 5/6-Nephrektomie wurde, wie von Gretz et al. 1988 beschrieben, durchgeführt. Der Zugang erfolgte über die rechte bzw. linke Flanke. Dabei wurde nach Aufsuchen des Rippenbogens und der Spina iliaca dorsalis cranialis in der Mitte dieser Orientierungspunkte und etwa 1 cm lateral der Wirbelsäule ein Hautschnitt vorgenommen. Nach Abspreizen der Fascia thoracolumbalis von der Haut erfolgte die Durchtrennung der Bauchmuskeln (M. obliquus externus und internus abdominis, Pars lumbalis des M. transversus abdominis und M. rectus abdominis). Während der ersten Operation wurde die rechte Niere komplett entfernt und die zu- und abführenden Gefäße ligiert. Die Operationswunde wurde anschließend unter Verwendung von Vicryl 4/0 (Ethicon, Norderstedt) schichtweise mit Einzelknopfnähten verschlossen. Nach einer zweiwöchigen Erho-

lungsphase erfolgte die zweite Operation, bei der über eine Inszision der linken Flanke und nach wie bereits oben beschriebener Durchtrennung der Bauchmuskeln die linke Niere dargestellt wurde. Im nächsten Schritt wurde diese dekapsuliert, anschließend erfolgte die Resektion der beiden Nierenpole. Auf diese Art und Weise wurden insgesamt 2/3 der linken Niere entfernt. Der Wundverschluss erfolgte auch hier mit Vicryl 4/0.

Bei den Kontrolltieren wurde eine Sham-Operation durchgeführt, das heißt, die jeweilige Niere wurde lediglich dekapsuliert und die Wunde anschließend wieder verschlossen.

#### 4.2.4 Blutdruckmessung mit der „Tail-Cuff-Methode“

Die sogenannte „Tail-Cuff-Methode“ bezeichnet eine nicht-invasive Blutdruckmessung am Schwanz der Tiere unter Verwendung einer Druckmanschette und eines piezoelektrischen Pulsaufnehmers. Mit diesem Verfahren können der systolische Blutdruck und die Herzfrequenz bestimmt werden.

Vor den eigentlichen Messungen wurden die Tiere zunächst etwa zehn Minuten lang mit Hilfe einer Rotlichtlampe, die in einem Abstand von ca. 40 cm zum Käfig aufgestellt wurde, vorgewärmt. Dies sollte eine gesteigerte Durchblutung in der Schwanzarterie bewirken. Im Anschluss daran wurde jedes einzelne Tier zur Fixierung in eine Plexiglas-Röhre gesetzt, welche durch Verschieben der Stirnwand an die Größe der jeweiligen Ratte angepasst werden konnte. Der Durchmesser musste dabei so gewählt werden, dass sich die Ratte nicht umdrehen konnte. Durch eine Öffnung im Bereich der Rückwand der Röhre wurde der Schwanz herausgeführt, so dass eine aufblasbare Druckmanschette an der Schwanzwurzel angelegt werden konnte. Damit die Körpertemperatur des Tieres nach dem Vorwärmen konstant blieb, befand sich neben der Plexiglasröhre in etwa 40 cm Abstand ebenfalls eine Rotlichtlampe.

Die Druckmanschette bestand aus einem kurzen Kunststoffrohr, ein Schlauch stellte die Verbindung zu dem im Steuerteil integriertem Druckgenerator her, mit dessen Hilfe die Manschette schrittweise (5 mmHg/sec) aufgeblasen wurde. Die kontinuierliche Druckerhöhung hatte eine arterielle Okklusion zur Folge. Der vollständige Verschluss der Schwanzarterie wurde durch den Pulssensor registriert (keine erkennbare Pulsation). Anschließend wurde der Druck der Manschette allmählich wieder reduziert. In dem Moment, in dem die Pulswelle nach der Okklusion erstmalig wieder einsetzte, wurde der aktuelle Druck auf der Manschette als systolischer Blutdruck gemessen.

Distal der Druckmanschette wurde an einer der seitlichen Schwanzvenen der Pulsabnehmer mit Hilfe eines Pflasterstreifens befestigt. Die Ratte durfte sich während der Blutdruckmessung nicht bewegen, da sämtliche Bewegungsartefakte vom Pulsabnehmer wiedergegeben wurden, und ein korrektes Ablesen der Druckkurve nicht möglich gewesen wäre.

Kernstück des Pulsaufnehmers war eine hochempfindliche Infrarot-Leuchtdiodenkombination (Opto-Sensor), die den Lichtdurchgang durch den Schwanz registrierte. Dabei führten die durch Blutdruckschwankungen verursachten Änderungen im Durchmesser der Gefäße zu einer veränderten Lichtdurchlässigkeit, welche vom Opto-Sensor gemessen und in ein elektrisches Signal umgewandelt wurde. Nach elektronischer Verstärkung und Filterung konnte aus diesem Signal die Pulskurve ermittelt werden.

Sobald sich das Tier in der Röhre beruhigt hatte, wurden die Messungen vorgenommen. Zunächst erschien hierbei der festgestellte Puls mit Hilfe der Powerlab Software® graphisch dargestellt. Nach etwa zehn Sekunden Pulsmessung wurde auf Knopfdruck die Druckmanschette bis zum Erreichen eines vorgewählten Drucks mit Luft gefüllt, danach setzte wie bereits oben beschrieben die Messung des systolischen Blutdruckes ein, welcher ebenfalls graphisch dargestellt wurde. Bei 30 mm Hg entlüftete sich die Druckmanschette selbstständig und die Messung war beendet.

Pro Tier wurden fünf Messungen durchgeführt - jeweils während der Wochen 0, 2, 5, 9 und 15 woraus der Mittelwert ermittelt wurde.

Damit sich die Tiere an diese Prozedur gewöhnen konnten, wurde die Messung mehrmals simuliert und erst anschließend die eigentliche Bestimmung des Blutdruckes vorgenommen.

Die Herzfrequenz wurde kontinuierlich aus dem Pulssignal durch Mittelwertbildung errechnet.

#### 4.2.5 Untersuchungen im Stoffwechselkäfig

Zunächst wurden die Ratten gewogen und dann für 24 Stunden in die Stoffwechselkäfige gesetzt. Hier hatten die Tiere freien Zugang zu einer vorher genau definierten Menge an Futter und Wasser. Nach Ablauf der 24 Stunden wurden sowohl die aufgenommene Futter- und Wassermenge als auch das abgesetzte Urinvolumen protokolliert. Zudem wurde eine Blutentnahme aus dem retroorbitalen Venenplexus zur Bestimmung der Serumkreatininkonzentration durchgeführt.

#### 4.2.6 Laborchemische Untersuchungen

Das Blut wurde bei 4 °C mit 4000 UpM 15 min. lang in der Beckmann Kühlzentrifuge zentrifugiert, das Plasma anschließend abpipettiert und bei -20 °C bis zur Durchführung der Analyse

gelagert. Der Nachweis der Enzymaktivitäten im Plasma erfolgte, ebenso wie die quantitative Bestimmung von Kreatinin, Harnstoff und des Gesamtproteins, photometrisch mit Hilfe des Standard Analyzer (Hitachi Power Tools Europe, Deutschland). Auch die Urinuntersuchungen, das heißt die quantitative Bestimmung von Kreatinin und Albumin, wurden im Autoanalyser durchgeführt.

Die Messungen der Plasmakonzentrationen des atrialen natriuretischen Peptides (ANP), des brain natriuretic peptide (BNP) und der Plasmareninaktivität fanden hingegen mittels Radioimmunoassay (RIA) statt.

#### 4.2.7 Berechnung der Glomerulären Filtrationsrate und der Albuminurie

Die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) ist das pro definierter Zeiteinheit von den Glomerula der Nieren filtrierte Volumen. Es wird in der Regel in der Einheit ml/min angegeben und ist einer der wichtigsten Parameter zur Beurteilung der Nierenfunktion. Die Ermittlung der GFR ist u. a. durch die Bestimmung der Clearance von Kreatinin möglich. Dabei wird der Quotient aus Kreatinin im Urin ( $U_C$ ) und Kreatinin im Serum ( $S_C$ ) mit dem Urinfluss ( $U_{vol}$ ) in ml/min multipliziert.

$$GFR = \frac{U_C \times U_{vol}}{S_C}$$

Im Rahmen des letzten Stoffwechselfersuches in Woche 17 erfolgte auch die Bestimmung der Albuminkonzentration im Urin, anhand derer die Albuminurie ermittelt werden konnte. Diese errechnet sich aus dem gemessenen Albumingehalt in mg/ml im Urin multipliziert mit dem innerhalb von 24 Stunden abgesetzten Urinvolumen in ml.

#### 4.2.8 Die Organentnahme

Für die Organentnahme wurden die Tiere erneut narkotisiert (Inhalationsnarkose mit Isofluran). Nach der Entnahme von Blutproben wurden die Tiere getötet und neben den Nieren bzw. dem Nierenrestgewebe auch die Herzen entfernt. Die Organe wurden in 0,9%iger NaCl-Lösung gespült, gewogen und im Anschluss daran in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei  $-70\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert. Zu einem späteren Zeitpunkt erfolgte dann die Fixierung der Organe in Formalin 4 %, und sie wurden, wie unter 4.2.9 beschrieben, weiterverarbeitet.



## 4.2.9 Histologische Methoden

### 4.2.9.1 *Fixierung*

Mit Hilfe der Fixierung soll eine postmortale Autolyse bzw. Heterolyse des Gewebes und ein Herauslösen von Zellbestandteilen während histochemischer Reaktionen verhindert werden.

Bei diesem Versuch wurde als Fixierlösung Formaldehyd verwendet. Dieses Fixierungsmittel führt zu einer Vernetzung der Proteine untereinander, indem es Methylenbrücken zwischen freien Aminogruppen der Proteinmoleküle bildet. Die Proteinmoleküle werden dadurch aus dem Sol- in einen Gelzustand überführt und bilden ein Raumgefüge. Die Organe wurden über einen Zeitraum von 24 Stunden in 4%igem Formaldehyd fixiert.

### 4.2.9.2 *Einbettung*

Um dünne und gleichmäßige Schnitte herstellen zu können, muss das Material Stabilität und eine gleichmäßige Konsistenz aufweisen. Es erfolgte daher im Anschluss an die Fixierung eine Einbettung des Gewebes in heißes Paraffinwachs. Diese wurde in einer Histokinette in folgender Art und Weise durchgeführt:

#### I. Entwässerung:

Da Paraffin nicht wasserlöslich ist, musste das Gewebe in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert werden (70%iges, 80%iges, 2 x 96%iges Ethanol und 3 x Ethanol absolut).

#### II. Entfernung des Ethanols:

Ethanol wurde durch ein Intermedium (in diesem Fall handelte es sich um Xylol) entfernt. Dabei wurde das Xylol nach jeweils vier Stunden insgesamt zweimal erneuert.

#### III. Lagerung des Gewebes in flüssigem Paraffin:

Dies geschah zunächst eine Stunde lang in 56 °C warmem Paraffin. Im Anschluss daran wurde das Gewebe für die Dauer von zwei Stunden in ein weiteres Paraffinbad überführt.

Diese Schritte erfolgten über Nacht automatisch in einer Histokinette.

#### IV. Einbettung in Tissue Tek Unikassetten

Von den durch die Einbettung entstandenen Blöcken wurden mit Hilfe eines Mikrotoms drei und ein  $\mu\text{m}$  dicke Schnitte angefertigt und auf silanisierte Objektträger aufgebracht.

##### 4.2.9.3 *Färbung*

Für die histologischen Untersuchungen waren folgende Färbungen notwendig: HE- nach Mayer, Elastica-van-Gieson-, Sirius-Red- und PAS-Färbung.

Prinzipiell wurden alle Färbungen folgendermaßen durchgeführt:

##### I. Entparaffinieren und Rehydratisieren:

Dazu wurden die Paraffinschnitte zunächst 2 x 10 Minuten in Xylol gelegt und im Anschluss daran mit Ethanol gemäß der absteigenden Alkoholreihe (jeweils fünf Minuten in 100-, 96-, 80- und 70%igem Ethanol) bewässert.

##### II. Einsatz der Färbelösungen:

Nach dem Entparaffinieren wurden die Schnitte mit den einzelnen Färbelösungen behandelt.

##### III. Dehydratisieren:

Dies erfolgte gemäß der aufsteigenden Alkoholreihe (jeweils fünf Minuten in 70-, 80-, 96- und 100%igem Ethanol) und mit Hilfe von Xylol (2 x 10 Minuten).

##### IV. Eindecken:

Anschließend wurden alle Schnitte mit Deckglas und Roti®-Histokitt (C. Roth GmbH & Co., Karlsruhe) eingedeckt.

### *PAS-Färbung*

Das Prinzip der Perjodsäure-Schiff-Reaktion beruht auf der Darstellung von zwei benachbarten Aldehydgruppen mit Hilfe der fuchsin-schwefeligen Säure. Zuvor werden durch die Perjodsäure Kohlenhydrate zu Aldehydgruppen hydrolysiert. Das Ergebnis der PAS-Färbung besteht darin, dass Kohlenhydrate purpur und Zellkerne blau erscheinen.

Aus folgenden Komponenten besteht die Färbelösung:

1. Schiff'sches Reagenz
2. Saures Hämalaun nach Mayer:
  - 1 g Hämatoxillin + 0,2 g Natriumjodatin + 50 g Kalialaun in 1 l aqua dest lösen, dazu noch 50 g Chloralhydrat + 1 g kristalline Zitronensäure geben
  - vor Gebrauch filtrieren

Durchführung der Färbung:

1. Entparaffinieren und bewässern
2. Abspülen in aqua dest.
3. 5 min in 0,5% Perjodsäure färben
4. 1-2 min in aqua dest. spülen
5. 15 min in Schiff'schem Reagenz inkubieren
6. Dreimaliges Waschen in aqua dest.
7. 3 min Kernfärbung in Hämalaun
8. Bläuen der Kerne unter fließendem Leitungswasser
9. 1-2 min in aqua dest. spülen
10. Entwässern und Eindecken

### *HE-Färbung nach Mayer*

Die HE-Färbung beruht auf dem Prinzip der Elektronenadsorption, wobei das Hämatoxylin (bzw. Hämalaun) als positiv geladener Farbstoff die Basophilie einer Struktur anzeigt. Demzufolge erscheinen Zellkerne, aber auch saure Schleimsubstanzen und Bakterien blau. Mit Hilfe des Eosins gelingt die Darstellung des Zytoplasmas in einem nuancierten roten Farbton.

Im Detail besteht die Färbelösung aus Mayers Hämalaunlösung als fertige Verbrauchslösung und der 0,1%igen Eosinlösung. Letztere wurde folgendermaßen hergestellt: 0,5 % Eosin wurde in 100 ml Ethanol absolut gelöst und im Anschluss daran ein Tropfen Eisessig hinzugefügt.

Folgende Arbeitsschritte waren notwendig:

1. Entparaffinieren und bewässern
2. Spülen in aqua dest.
3. 1:30 min Hämalaun nach Mayer
4. 10 min unter fließendem handwarmen Leitungswasser
5. Spülen in aqua dest.
6. 30 sek in 0,1%igem Eosin
7. Spülen in aqua dest.
8. Entwässern und eindecken

#### *Sirius-Red-Färbung*

Sirius Red ist ein anionischer Farbstoff, der aufgrund seiner enthaltenen Sulfonsäuregruppen basische Gruppen im Kollagenmolekül rot anfärbt.

Folgende Färbelösungen waren notwendig:

1. Gesättigte wässrige Pikrinsäure:
  - 7,5 – 10 g Pikrinsäure in 250 ml heißem aqua dest. lösen
  - 6 – 7,5 g Pikrinsäure in 250 ml kaltem aqua dest. lösen
  - beide Ansätze mischen und filtrieren
2. Sirius Red – 0,1%ige Lösung:
  - 0,2 g Sirius Red in 200 ml gesättigter wässriger Pikrinsäure lösen, mischen und filtrieren
  - pH-Wert: 2,0
3. HCL 0,001 M:
  - 0,5 ml HCL in 199,5 ml abs. Ethanol

Die Sirius-Red-Färbung wurde nach der Junqueira et al. publizierten Methode folgendermaßen durchgeführt:

1. Entparaffinieren
2. 60 min in 0,1%iger Sirius-Red-Lösung
3. Kurz spülen in 0,01 M HCL
4. Entwässern
5. Eindecken

### *Elastica-van-Gieson-Färbung*

Diese Färbung dient insbesondere der Darstellung elastischer Fasern, beispielsweise derer in Gefäßwänden. Zunächst werden durch das Resorcin die Hüllschichten der Fasern aufgeraut, danach kann sich an dieser derart vergrößerten Oberfläche das Fuchsin über die Grenzflächenadsorption an die Fasern anlagern. Als Ergebnis der Färbung erscheinen elastische Fasern dunkelviolett, Zellkerne schwarz, Bindegewebe rot, Muskulatur und Cytoplasma gelb.

Als Färbelösung wurde Resorcin-Fuchsin-Lösung nach Weigert verwendet.

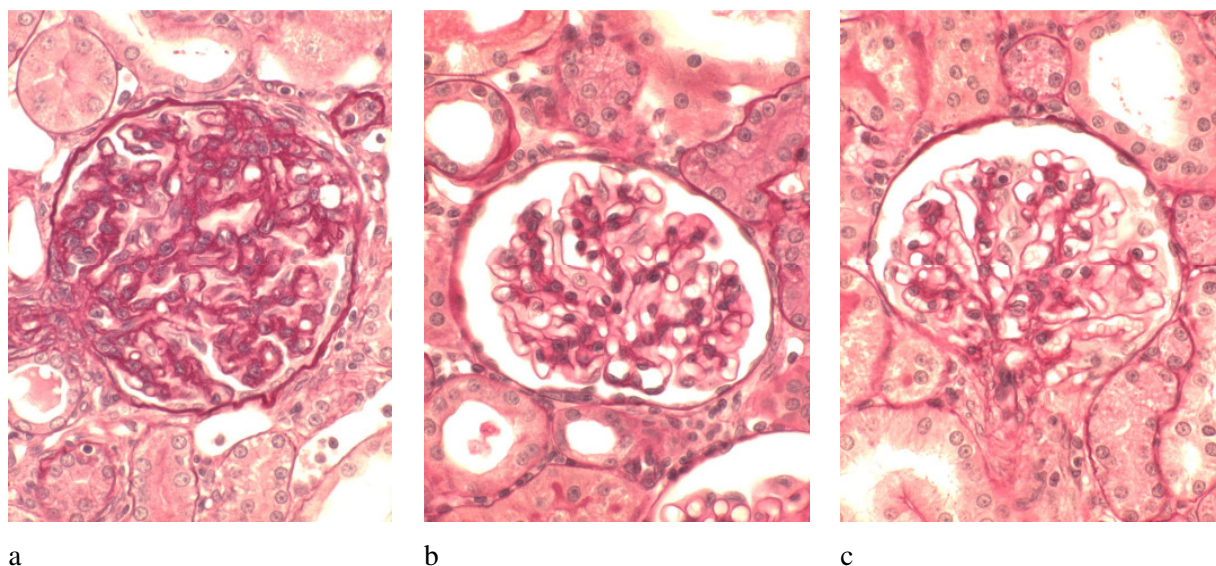
Die Durchführung der Färbung beinhaltet folgende Arbeitsschritte:

1. Entparaffinieren
2. 10 Minuten in Resorcin-Fuchsin-Lösung im Brutschrank bei 60 °C
3. Spülen in Leitungswasser
4. Spülen in aqua dest.
5. Entwässern:
  - 2 x spülen in 96 % Ethanol
  - 2 Minuten in absoluten Ethanol
  - 2 x 5 Minuten in Xylol
6. Eindecken

#### 4.2.10 Bestimmung des Glomeruloskleroseindex nach Rajj

Das Ausmaß der Glomerulosklerose wurde anhand des Flächenanteils PAS-positiver Ablagerungen im Glomerulum beurteilt (nach Rajj et al., 1984). Dahingehend erfolgte die Kategorisierung der Glomerula eines jeweiligen Schnittes entsprechend der nachfolgenden Schweregrade:

- Schweregrad 0 entspricht keiner Sklerose;
- Schweregrad 1 entspricht einer Sklerose bis zu 25 % der Fläche des Glomerulums;
- Schweregrad 2 entspricht einer Glomerulosklerose mit einem Flächenanteil zwischen 25 und 50 %;
- Schweregrad 3 entspricht 50 bis 75 % Sklerose;
- Schweregrad 4 entspricht 75 bis 100 % PAS-positiver Ablagerungen (Sklerose) im Glomerulum.



**Abbildung 2.** Glomerula in PAS-Färbung, Vergrößerung 1:200. Der Flächenanteil der PAS-positiven Ablagerungen innerhalb der Glomerula deutet auf den jeweiligen Schweregrad der Glomerulosklerose hin. (a) 5/6-Nephrektomie, (b) 5/6-Nephrektomie + Riociguat, (c) Unauffälliger Befund (gesunde Kontrolltiere).

Bei 400-facher Vergrößerung wurden 80 Glomerula eines Schnittpräparates pro Tier beurteilt und dem jeweiligen Schweregrad zugeordnet.

Im Anschluss daran wurde der Schweregrad der Glomerulosklerose mit der Anzahl betroffener Glomerula multipliziert und auf die Gesamtzahl der erfassten Glomerula bezogen.

Beispiel: 40 Glomerula zeigen den Schädigungsgrad 1, die übrigen 40 weisen den Schädigungsgrad 3 auf.

$$\text{Glomeruloskleroseindex} = \frac{1 \times 40 + 3 \times 40}{80} = 2$$

Die Bewertung der einzelnen Schnitte erfolgte durch zwei Personen, die keine Kenntnis über die Gruppenzugehörigkeit der Tiere hatten.

Nach Ermittlung des Mittelwertes + SEM konnten die Gruppen statistisch ausgewertet werden.

#### 4.2.11 Analyse des perivaskulären Fibroseindex

Für die Beurteilung der perivaskulären Fibrose wurde der Durchmesser des Gefäß umgebenden Bindegewebes ins Verhältnis zum Durchmesser der Tunica media des entsprechenden Gefäßes gesetzt. Die Bewertung erfolgte anhand der mit Sirius Red eingefärbten

Herz- und Nierenschnitte, wobei ausschließlich Arterien herangezogen wurden, die quer angeschnitten waren und deren Gefäßwand eine gleichmäßige Stärke aufwies. Die Ausprägung der perivaskulären Fibrose wurde in fünf Schweregrade eingeteilt: 1 (0-25 %), 2 (25-50 %), 3 (50-75 %), 4 (75-100 %) und 5 (>100 %). Im Einzelnen bedeutet dies, dass bei einer perivaskulären Fibrose von 50 % der Durchmesser des Bindegewebes halb so groß wie der Durchmesser der Gefäßmedia ist. Der Schweregrad wurde dann mit der Anzahl der Gefäße multipliziert und prozentual auf die Gesamtzahl der beurteilten Arterien bezogen.

$$\text{Perivaskulärer Fibroseindex} = \frac{1 \times n + 2 \times n + 3 \times n + 4 \times n + 5 \times n}{N}$$

Dabei ist  $n$  die Anzahl der Gefäße, welche den jeweiligen Schweregrad aufweisen,  $N$  entspricht der Gesamtzahl der untersuchten Arterien.

Alle Gewebeschnitte wurden auf diese Weise von zwei unabhängigen Personen bewertet, denen die Gruppenzugehörigkeit unbekannt war. Im Anschluss daran erfolgte die statistische Auswertung der Gruppen.

#### 4.2.12 Digitale Morphometrie

Zur Analyse der interstitiellen Fibrose und der Media zu Lumen-Ratio wurde ein digitales Bildverarbeitungssystem genutzt.

Dazu wurde auf einem MacIntosh PowerPC 750/100 das Programm NIH Image, Version 1.61 (*shareware* des National Institut of Health, USA), installiert.

Für die morphometrische Analyse wurden Ausschnitte eines jeden histologischen Präparates mit einem Mikroskop (Axiovert 100, Zeiss, Deutschland) eingestellt und mit einer CCD-Kamera (Hitachi Europe, Düsseldorf) fotografiert. Die dabei entstandenen analogen Bilder wurden auf den Computer übertragen, wobei ein digitales Foto entstand. Die Einstellung der zu untersuchenden Gesichtsfelder erfolgte über einen elektromotorischen Objektisch am Mikroskop. Die digitalen Bilder wurden mit dem Programm NIH Image 1.6 analysiert, und die quantitativen Ergebnisse in einer Text-Datei gespeichert.

#### *Interstitielle Fibrose*

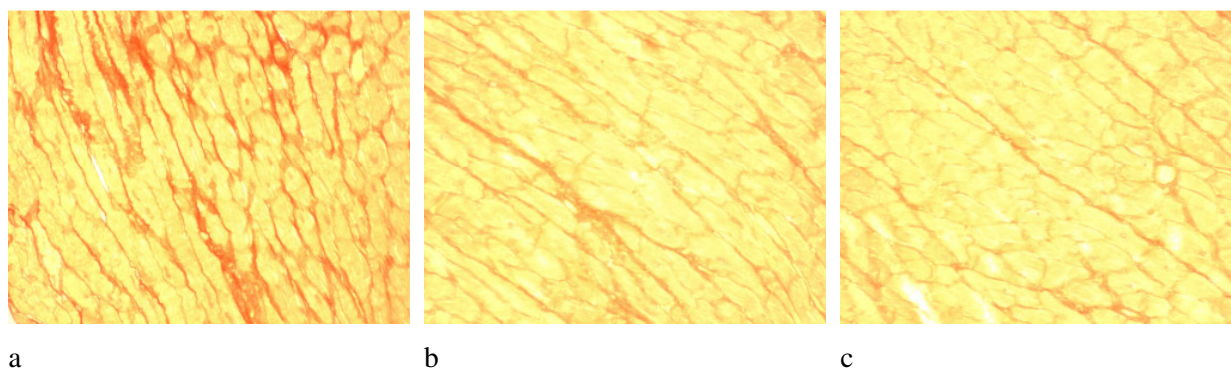
Die Auswertung der interstitiellen Fibrose erfolgte mit Hilfe des oben beschriebenen Bildverarbeitungssystems an Sirius-Red-gefärbten Herz- und Nierenschnitten bei einer Vergrößerung von

320x. Neben den gleichen Licht- und Blendeinstellungen war auch die optimale Einstellung des Threshold von Bedeutung.

Threshold-Bestimmung und Auswertung mit dem Makro:

Um kamerabedingte Artefakte zu minimieren, war es erforderlich, den optimalen Threshold (Graustufe) zu ermitteln. Dazu wurde eine zufällige Auswahl von Objektträgern getroffen (mindestens 15 % aller Schnitte) und mit Hilfe des Mikroskops Bildausschnitte eingestellt, die keine Gefäße enthielten und möglichst frei von Artefakten waren. Die Ausschnitte wurden mit der bereits oben erwähnten CCD-Kamera fotografiert. Zur Feststellung des Anteils an kollagener Matrix pro Bildausschnitt wurden die Farbbilder vom Typ RGB color in Bilder 8-bit (greyscale) konvertiert. Danach wurde im Threshold-Modus eine Schwarz-Weiß-Grenze (zwischen 0 und 255 Graustufen) festgelegt, wobei möglichst nur die zu messende Fläche, also das Bindegewebe, schwarz erscheinen sollte. Aus allen ermittelten Threshold-Werten wurde der Mittelwert berechnet, welcher abschließend in das Makro integriert und für alle nachfolgenden Analysen verwendet wurde.

Für die Bestimmung der interstitiellen Fibrose wurden von jedem Präparat 30 zufällig ausgewählte Bildausschnitte vermessen. Dabei ermittelte der Computer sowohl die Gesamtfläche als auch den Sirius-Red-positiven Anteil in Pixeln, so dass die interstitielle Fibrose letztendlich als prozentualer Anteil zur Gesamtfläche des jeweiligen Bildausschnittes angegeben werden konnte.



**Abbildung 3.** Histologische Herzausschnitte in Sirius-Red-Färbung, Vergrößerung 1:200. (a) 5/6-Nephrektomie, (b) 5/6-Nephrektomie + Riociguat, (c) Unauffälliger Befund (Tiere mit Sham-OP). Die rot gefärbten Anteile markieren die interstitielle Fibrose.



### *Media zu Lumen-Ratio*

Neben der Bestimmung der interstitiellen Fibrose erfolgte mit Hilfe der digitalen Morphometrie auch die Analyse der Media zu Lumen-Ratio. Hierfür wurden Herz- und Nierenschnitte verwendet, die mittels Elastica-van-Gieson-Färbung behandelt wurden.

Zunächst wurden die Präparate mit Hilfe des Mikroskopes nach geeigneten Arterien durchsucht, wobei ausschließlich Gefäße in Betracht kamen, die quer angeschnitten waren und deren Gefäßwand eine gleichmäßige Stärke aufwies. Anhand des mit der CCD-Kamera erzeugten digitalen Fotos, welches in einer 400-fachen Vergrößerung erschien, erfolgten die Vermessungen mit Hilfe eines digitalen Zeichenbrettes (Wacom ArtPad II). Damit wurden die äußere und die innere Begrenzung der Tunica media markiert, und im Anschluss daran die innere Fläche, also der Lumenquerschnitt, sowie der Gesamtquerschnitt durch das Programm Image in Pixeln angegeben. Daraus erfolgte im nächsten Schritt die Berechnung der Mediafläche und der Media zu Lumen-Ratio. Folgendes Beispiel soll dies veranschaulichen:

Gesamtfläche der Arterie 90.000 (Pixel)

Lumenfläche der Arterie 30.000 (Pixel)

$$\text{Mediafläche} = \text{Gesamtfläche} - \text{Lumenfläche} = 90.000 - 30.000 = 60.000$$

$$\text{Media zu Lumen-Ratio} = \frac{\text{Mediafläche}}{\text{Lumenfläche}} = \frac{60.000}{30.000} = 2$$

### *Durchmesser der Kardiomyozyten*

Die Bestimmung der Myozytendurchmesser erfolgte an 1 µm dicken, HE-gefärbten Herzpräparaten. Es wurden, wie bereits oben beschrieben, Bildausschnitte mit Hilfe der an das Mikroskop angeschlossenen CCD-Kamera in den MacIntosh PowerPC 750/100 eingelesen und anschließend mit dem Programm Image, Version 1.61 analysiert. Insgesamt wurden pro Präparat 30 zufällig ausgewählte und quer über den Schnitt verteilte Myozyten vermessen. Im Einzelnen wurde dabei der Durchmesser eines jeden Myozyten in Höhe des Zellkernes und möglichst im rechten Winkel zum Faserverlauf mittels digitalen Zeichenbrettes (Wacom ArtPad II) markiert. Die Angabe des Durchmessers erfolgte zunächst in Pixel, wurde dann aber mit Hilfe eines Umrechnungsfaktors

umgerechnet. Die Festlegung dieses Faktors erfolgte in einer Zählkammer unter den gleichen Bedingungen und bei der gleichen Vergrößerung wie bei der Bestimmung der Kardiomyozytendurchmesser mit dem Ergebnis, dass 2300 Pixel 1 mm entsprechen.

#### 4.2.13 Berechnungen und Statistik

Zunächst wurde der Kruskal-Wallis-Test angewandt, um vorab herauszufinden, ob signifikante Unterschiede zwischen den drei Gruppen vorliegen. Bei positivem Ergebnis ( $p < 0,05$ ) wurden im nächsten Schritt die einzelnen Gruppen mit dem Mann-Whitney-U-Test für zwei unabhängige Stichproben verglichen. Der U-Test nach Mann-Whitney ist ein parameterfreies Testverfahren, er setzt weder eine Normalverteilung noch eine Varianzhomogenität der Messgröße voraus. Er prüft auf Lageunterschiede zwischen den Populationen und wird für den Vergleich ordinalskaliertter Merkmale verwendet.

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms SPSS 11.0 für Windows.

Als Signifikanzniveau wurde  $p < 0,05$  festgelegt. Eine entsprechende Kennzeichnung der sich signifikant unterscheidenden Daten erfolgte in den Tabellen durch die Zeichen \* bzw. †. Gelegentlich konnten auch hochsignifikante Differenzen ( $p < 0,001$ ) erfasst werden. Entsprechende Daten wurden mit \*\* bzw. ‡ markiert.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Mortalität

Die Behandlung mit Riociguat wurde gut von den Ratten vertragen, Nebenwirkungen bzw. Unverträglichkeiten sind nicht beobachtet worden. Während des Versuches sind sechs von 15 Tieren mit 5/6-Nephrektomie und ohne medikamentöse Therapie verstorben (40 %). Von den 15 Ratten mit 5/6-Nephrektomie und Behandlung mit Riociguat sind insgesamt vier verstorben (26,7 %), während alle zehn Sham-operierten Tiere überlebten.

### 5.2 Körper- und Organgewichte

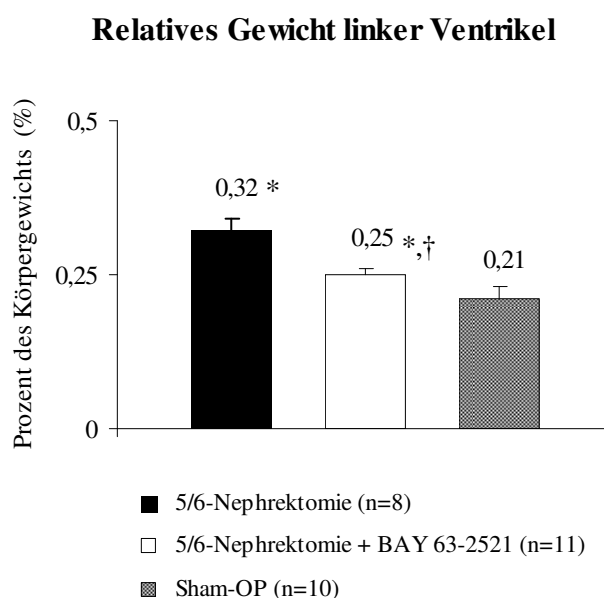
Es wurden die Körper- und Organgewichte der Tiere aus den jeweiligen Gruppen miteinander verglichen. Am Ende des Versuches war das durchschnittliche Körpergewicht der Ratten aus den beiden urämischen Gruppen signifikant niedriger als das der Kontrolltiere mit Sham-OP.

Im Gegensatz dazu fällt auf, dass das durchschnittliche relative Herzgewicht, also das Gewicht des Herzens als prozentualer Anteil am Körpergewicht, bei den Tieren mit 5/6-Nephrektomie signifikant höher war als bei den Kontrollen. Dies traf insbesondere auf das relative Gewicht der linken Ventrikel zu. Allerdings war der Effekt der Linksherzvergrößerung bei den mit Riociguat behandelten Ratten deutlich geringer ausgeprägt als bei jenen mit 5/6-Nephrektomie und ohne medikamentöse Therapie. Das absolute Gewicht der linken Ventrikel war in der behandelten Gruppe, verglichen mit den unbehandelten urämischen Tieren, sogar hochsignifikant niedriger ( $p < 0,001$ ).

Signifikante Unterschiede zwischen den beiden 5/6-nephrektomierten Gruppen ergab auch der Vergleich der relativen Gewichte der rechten Ventrikel. So fanden sich bei jenen Ratten, welche Riociguat über das Futter verabreicht bekamen, deutlich niedrigere Werte. Hingegen konnte zwischen der mit Riociguat behandelten Gruppe und jener mit Zustand nach Sham-OP kein großer Unterschied festgestellt werden.

Parameter	5/6-Nephrektomie (n = 9)	5/6-Nephrektomie + Riociguat (n = 11)	Sham-OP (n = 10)
<b>Körpergewicht (in g)</b>	415,0 ± 16,45*	408,73 ± 10,93*	502,0 ± 23,84
<b>Herz (in g)</b>	1,54 ± 0,09	1,31 ± 0,05	1,37 ± 0,06
<b>Herz relativ (in %)</b>	0,38 ± 0,03*	0,32 ± 0,01*	0,28 ± 0,03
<b>Rechter Ventrikel (in g)</b>	0,21 ± 0,03	0,15 ± 0,005*, †	0,18 ± 0,01
<b>Rechter Ventrikel relativ (in %)</b>	0,05 ± 0,006*	0,04 ± 0,001†	0,04 ± 0,003
<b>Linker Ventrikel (in g)</b>	1,33 ± 0,05*	1,01 ± 0,04‡	1,04 ± 0,04
<b>Linker Ventrikel relativ (in %)</b>	0,32 ± 0,02*	0,25 ± 0,01*, †	0,21 ± 0,02

**Tabelle 2.** Körper- und Organgewichte der 28 Wochen alten männlichen Wistar-Ratten am Ende des Versuches. Die relativen Gewichtsangaben entsprechen dem prozentualen Anteil des Organgewichtes am Körpergewicht. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardfehler, †/‡p < 0,05/0,001 versus 5/6-Nephrektomie, \*p < 0,05 versus Sham-OP.



**Abbildung 4.** Relatives Gewicht des linken Ventrikels. Die relativen Gewichtsangaben entsprechen dem prozentualen Anteil des Ventrikelgewichtes am Körpergewicht. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardfehler, †p < 0,05 versus 5/6-Nephrektomie, \*p < 0,05 versus Sham-OP.

### 5.3 Laborwerte

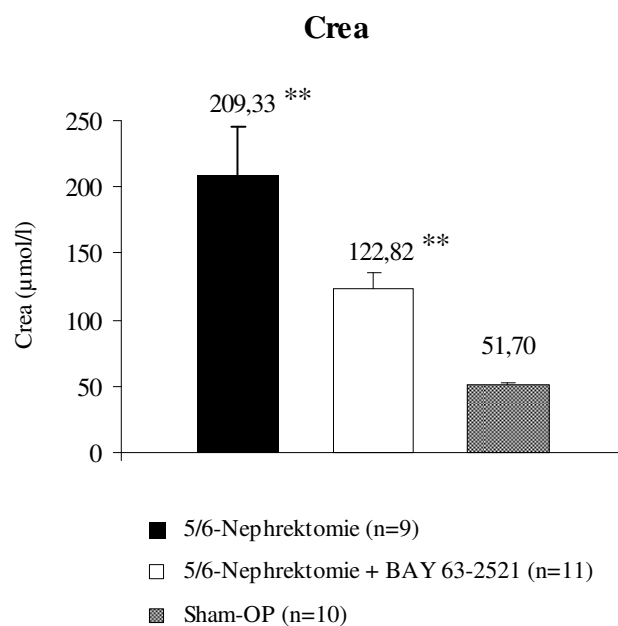
Am Ende des 18-wöchigen Versuches wurden die Tiere getötet, und es erfolgte neben der Organentnahme auch die Abnahme von Blutproben. Wie Tabelle 3 zeigt, existieren für die Laborwerte AST, ALT, AP, GLDH, LDH und CK keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen.

Hinsichtlich der Plasmakonzentrationen von Kreatinin und Harnstoff wiesen die 5/6-nephrektomierten Tiere im Vergleich zu der Sham-OP-Kontrollgruppe jedoch deutlich höhere Werte auf. Bei den behandelten Ratten waren diese beiden Parameter nicht signifikant, aber erkennbar niedriger als bei den unbehandelten (CREA:  $p \leq 0,056$ , UREA:  $p \leq 0,067$ ).

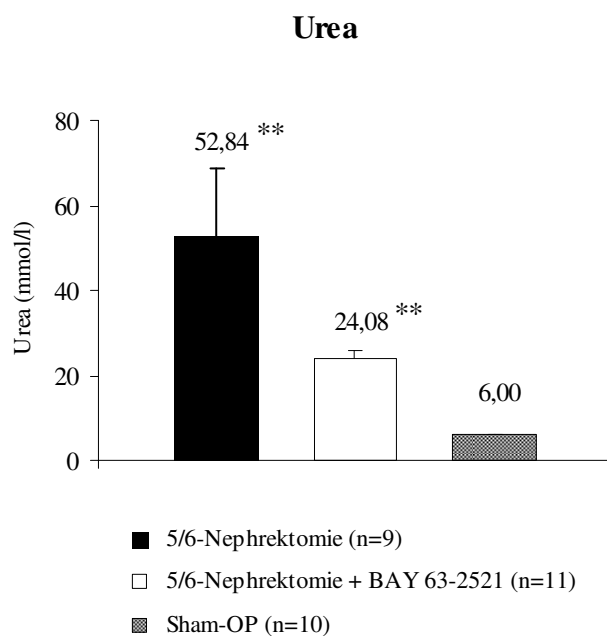
Des Weiteren fanden sich bei den urämischen Ratten beider Gruppen eine, verglichen mit den scheinoperierten Tieren, signifikant geringere Proteinkonzentration und supprimierte Plasma-Renin-Aktivität. Die urämischen Tiere wiesen zudem deutlich höhere BNP-Konzentrationen als die Sham-OP-Gruppe auf. Allerdings waren die BNP-Konzentrationen der mit Riociguat behandelten Tiere signifikant niedriger als jene der nicht therapierten Ratten.

Parameter	5/6-Nephrektomie (n = 9)	5/6-Nephrektomie + Riociguat (n = 11)	Sham-OP (n = 10)
AST (in U/l)	50,96 ± 9,58	44,11 ± 6,02	55,52 ± 3,52
ALT (in U/l)	33,53 ± 4,71	43,61 ± 3,62	40,81 ± 3,09
AP (in U/l)	77,56 ± 7,14	85,18 ± 3,96	88,70 ± 3,47
GLDH (in U/l)	14,38 ± 4,92	10,78 ± 3,36	11,41 ± 3,67
LDH (in U/l)	107,33 ± 27,94	77,18 ± 10,55	132,80 ± 14,40
CK (in U/l)	96,11 ± 13,99	80,91 ± 5,17	109,50 ± 8,00
CREA (in µmol/l)	209,33 ± 36,71 <sup>**</sup>	122,82 ± 12,15 <sup>**</sup>	51,70 ± 0,76
UREA (in mmol/l)	52,84 ± 15,64 <sup>**</sup>	24,08 ± 1,95 <sup>**</sup>	6,00 ± 0,29
Protein (in g/l)	54,97 ± 1,65 <sup>**</sup>	54,20 ± 0,51 <sup>**</sup>	65,66 ± 0,53
PRA (in ng/ml/h)	0,7 ± 0,17 <sup>**</sup>	0,68 ± 0,14 <sup>**</sup>	2,62 ± 0,37
ANP (in pg/ml)	487,25 ± 54,04	285,70 ± 36,97 <sup>†</sup>	319,0 ± 51,48
BNP (in pg/ml)	47,26 ± 6,43 <sup>**</sup>	23,07 ± 2,62 <sup>**</sup> , (‡)	16,73 ± 2,5

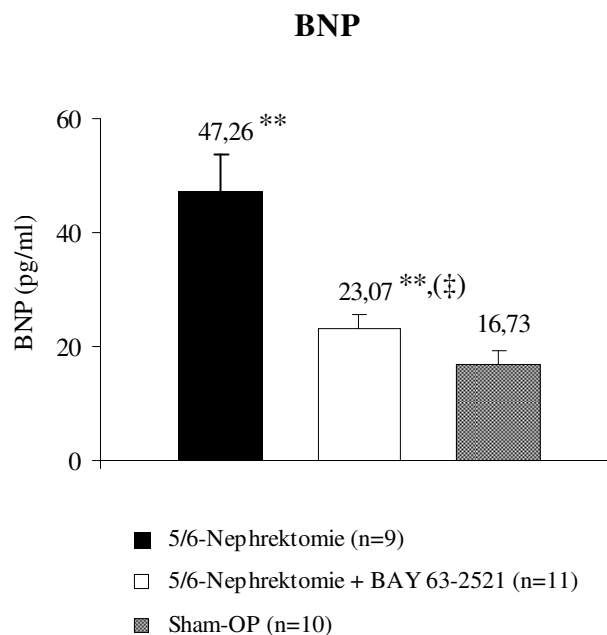
**Tabelle 3.** Abkürzungen: AST = Aspartat-Amino-Transferase, ALT = Alanin-Amino-Transferase, AP = alkalische Phosphatase, GLDH = Glutamat-Dehydrogenase, LDH = Laktat-Dehydrogenase, CK = Kreatinkinase, CREA = Kreatinin, UREA = Harnstoff, PRA = Plasma-Renin-Aktivität, ANP = atriales natriuretisches Peptid, BNP = b-type natriuretic peptide (= brain natriuretic peptide). Angegeben sind Mittelwerte ± Standardfehler, <sup>†/‡</sup>p < 0,05/0,001 versus 5/6-Nephrektomie, (‡)p = 0,001 versus 5/6-Nephrektomie, <sup>\*\*</sup>p < 0,05/0,001 versus Sham-OP.



**Abbildung 5.** Kreatininkonzentration im Serum. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, \*\*  $p < 0,001$  versus Sham-OP.



**Abbildung 6.** Harnstoffkonzentration im Serum. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, \*\*  $p < 0,001$  versus Sham-OP.



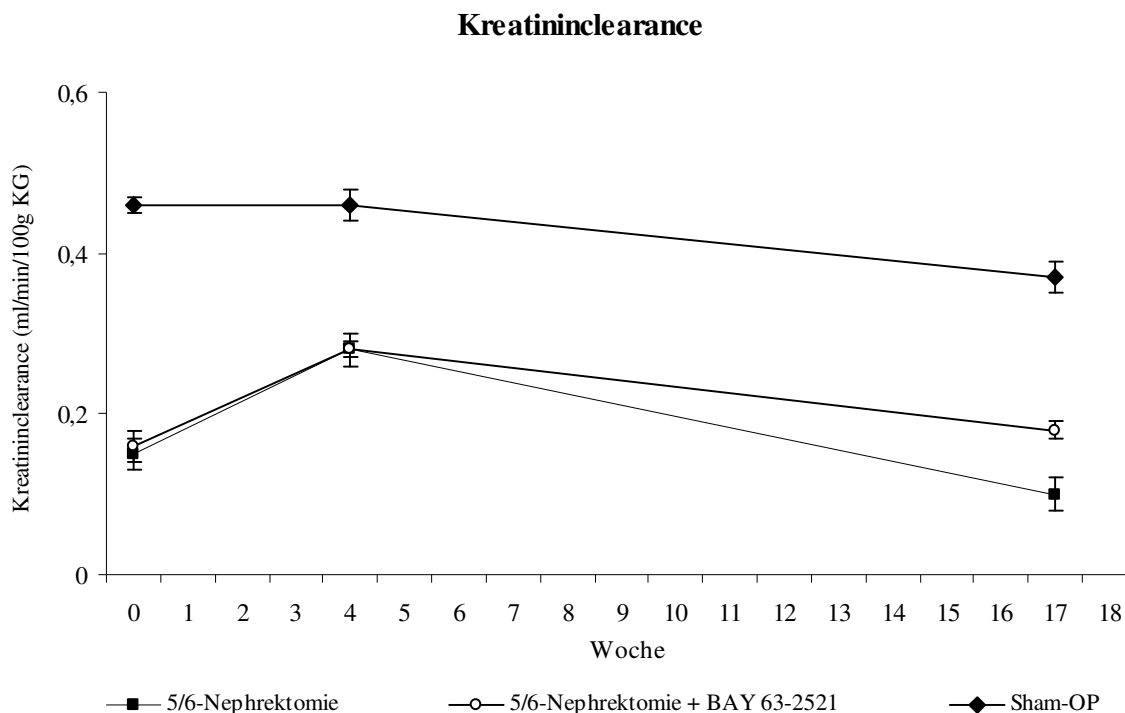
**Abbildung 7.** BNP (b-type natriuretic peptide). Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, <sup>(†)</sup>p = 0,001 versus 5/6-Nephrektomie, \*\* p < 0,001 versus Sham-OP.

#### 5.4 Kreatininclearance und Albuminurie

In den Wochen 0, 4 und 17 wurden die Ratten in Stoffwechsellkäfige verbracht, um 24-Stunden-Sammelurin zu gewinnen. Ziel war die Bestimmung der Kreatininkonzentration im Urin. Parallel dazu erfolgten zur Feststellung der Kreatininkonzentration im Serum Blutentnahmen aus den retroorbitalen Venen. Anhand dieser beiden Werte wurde, normiert auf das Gewicht der Tiere (ml/min/100g KG), die Kreatininclearance und damit auch die GFR berechnet.

Erwartungsgemäß war diese bei den urämischen Tieren deutlich geringer. Auch brachte der Vergleich der beiden nephrektomierten Gruppen keine signifikanten Unterschiede. Allerdings konnte am Ende des Versuches eine erkennbar höhere GFR (p < 0,065) bei den mit Riociguat behandelten Ratten im Vergleich zu den unbehandelten Tieren ermittelt werden.





**Abbildung 8.** Kreatinin clearance der männlichen Wistar-Ratten, bestimmt in den Versuchswochen 0, 4 und 17. Die Werte wurden auf das Gewicht der Tiere normiert und sind in ml/min/100g KG angegeben. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, \*\* $p < 0,001$  versus Sham-OP.

Neben der Bestimmung der Kreatininkonzentration im 24-Stunden-Sammelurin wurde dieser auch auf seinen Albumingehalt (in mg/ml) hin untersucht. Anhand dieses Wertes konnte nach Multiplikation mit der Gesamtmenge des innerhalb von 24 Stunden abgesetzten Urinvolumens (in ml) die Albuminurie ermittelt werden.

Die nephrektomierten Ratten wiesen im Vergleich zu den scheinoperierten Tieren eine deutlich höhere Albuminurie auf. Die Behandlung mit Riociguat hatte dabei keinen Einfluss auf die Proteinurie.

<b>Albuminurie (in mg/d):</b>			
<b>Versuchswoche</b>	<b>5/6-Nephrektomie (n = 9)</b>	<b>5/6-Nephrektomie + Riociguat (n = 10)</b>	<b>Sham-OP (n = 10)</b>
<b>Woche 0</b>	2,12 ± 0,67*	2,79 ± 0,63**	0,32 ± 0,06
<b>Woche 4</b>	68,94 ± 13,54**	71,72 ± 17,11**	1,03 ± 0,26
<b>Woche 17</b>	274,11 ± 46,40**	338,4 ± 24,89**	30,71 ± 9,60

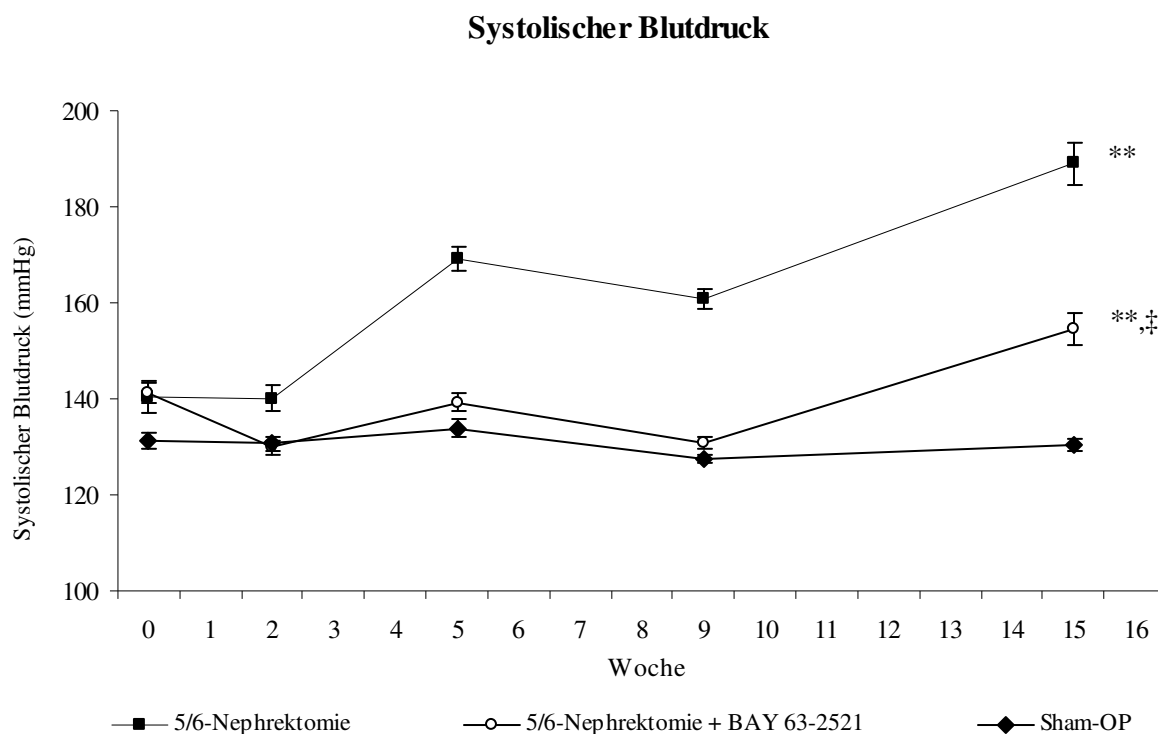
**Tabelle 4.** Albuminurie der männlichen Wistar-Ratten in den Wochen 0, 4 und 17. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardfehler, \*/\*\* p < 0,05/0,001 *versus* Sham-OP.

## 5.5 Blutdruck

Während der Versuchsperiode wurde der Blutdruck mit Hilfe der „Tail-Cuff-Methode“ in den Wochen 0, 2, 5, 9 und 15 gemessen. Wie in Abbildung 7 verdeutlicht, stieg der systolische Blutdruck der Tiere mit 5/6-Nephrektomie ohne Behandlung im Laufe der Zeit deutlich an. Zwar ließ sich auch bei den behandelten Ratten ein Blutdruckanstieg feststellen, welcher jedoch im Vergleich dazu signifikant geringer ausgeprägt war.

RR systolisch (in mmHg):			
Versuchswoche	5/6-Nephrektomie	5/6-Nephrektomie + Riociguat	Sham-OP
Woche 0	140,30 ± 3,25 n = 15	141,40 ± 2,12 <sup>*</sup> n = 15	131,30 ± 1,68 n = 10
Woche 2	140,07 ± 2,66 <sup>*</sup> n = 15	129,87 ± 1,54 <sup>†</sup> n = 15	130,70 ± 1,51 n = 10
Woche 5	169,17 ± 2,68 <sup>**</sup> n = 15	139,33 ± 1,93 <sup>*,‡</sup> n = 15	133,89 ± 1,75 n = 9
Woche 9	160,67 ± 2,06 <sup>**</sup> n = 15	130,79 ± 1,19 <sup>‡</sup> n = 15	127,50 ± 0,95 n = 10
Woche 15	188,99 ± 4,48 <sup>**</sup> n = 10	154,54 ± 3,34 <sup>**,‡</sup> n = 13	130,50 ± 1,24 n = 10

**Tabelle 5.** Systolische Blutdrücke der männlichen Wistar-Ratten, jeweils in Woche 0, 2, 5, 9 und 15 gemessen. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardfehler, <sup>†/‡</sup>p < 0,05/0,001 versus 5/6-Nephrektomie, <sup>\*/\*\*</sup>p < 0,05/0,001 versus Sham-OP. Des Weiteren ist die Anzahl der untersuchten Tiere (n) angegeben.



**Abbildung 9.** Systolischer Blutdruck. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardfehler, <sup>†</sup>p < 0,001 versus 5/6-Nephrektomie, <sup>\*\*</sup>p < 0,001 versus Sham-OP.

## 5.6 Resultate der histologischen Untersuchungen der Nieren

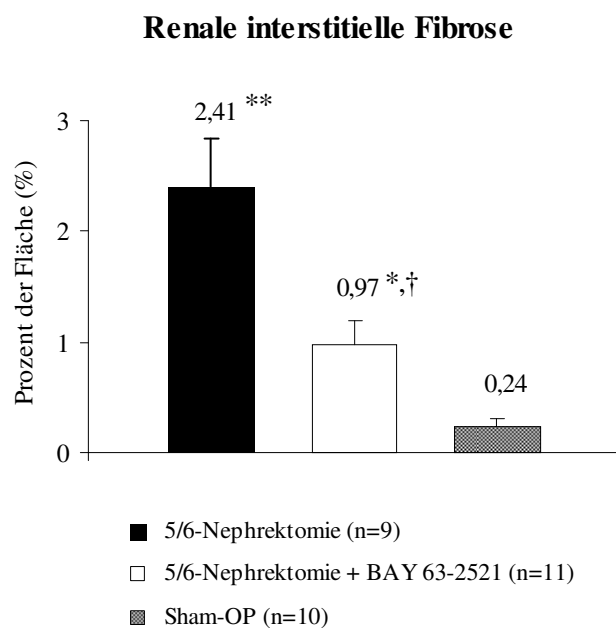
Am Ende des Versuches, nachdem die Tiere getötet worden sind, erfolgte die Organentnahme. Dabei wurden sowohl die Herzen als auch die Nieren entnommen und histologisch aufgearbeitet. Zur Bestimmung des Ausmaßes der Glomerulosklerose wurde der Flächenanteil PAS-positiver Ablagerungen innerhalb der Glomerula ermittelt. Dabei zeigte sich ein hochsignifikanter Unterschied zwischen den urämischen und scheinoperierten Tieren. Der Vergleich der beiden urämischen Gruppen untereinander ergab hingegen keine wesentlichen Differenzen.

Anders stellten sich die Ergebnisse für die perivaskuläre und die interstitielle Fibrose dar. Die histologische Untersuchung erfolgte in beiden Fällen an Sirius-Red-gefärbten Schnitten. Während die Beurteilung der perivaskulären Fibrose mit Hilfe eines semiquantitativen Scores erfolgte, wurde die interstitielle Fibrose über digitale Morphometrie analysiert. Es konnten ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen den nephrektomierten und den scheinoperierten Tieren nachgewiesen werden. Allerdings war diese Differenz bei jenen Ratten, die eine Behandlung mit Riociguat erfahren hatten, deutlich weniger ausgeprägt.

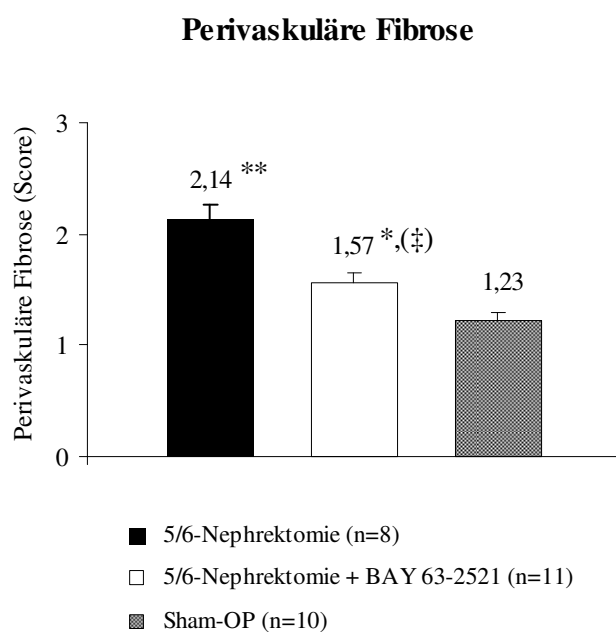
Die Auwertung der Media zu Lumen-Ratio erfolgte ebenfalls mit Hilfe der digitalen Morphometrie an Schnitten, die zuvor mit Elastica-van-Gieson-Färbung behandelt wurden. Hier konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen festgestellt werden.

Parameter	5/6-Nephrektomie (n = 9)	5/6-Nephrektomie + Riociguat (n = 11)	Sham-OP (n = 10)
<b>Glomerulosklerose (Score)</b>	2,44 ± 0,2**	2,07 ± 0,15**	1,05 ± 0,01
<b>Interstitielle Fibrose (in % der Fläche)</b>	2,41 ± 0,43**	0,97 ± 0,22*, †	0,24 ± 0,06
<b>Perivaskuläre Fibrose (Score)</b>	2,14 ± 0,12**	1,57 ± 0,09*, (‡)	1,23 ± 0,06
<b>Media-Lumen-Ratio</b>	3,48 ± 0,25	3,42 ± 0,21	3,26 ± 0,26

**Tabelle 6.** Ergebnisse der histologischen Untersuchungen der Nieren. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardfehler, †/‡ p < 0,05/0,001 versus 5/6-Nephrektomie, (‡) p = 0,001 versus 5/6-Nephrektomie, \*\*/\*\*\* p < 0,05/0,001 versus Sham-OP.



**Abbildung 10.** Interstitielle Fibrose der Niere. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler,  $^\dagger p < 0,05$  versus 5/6-Nephrektomie,  $^{**} p < 0,05/0,001$  versus Sham-OP.



**Abbildung 11.** Perivaskuläre Fibrose der Niere. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler,  $^{(\ddagger)} p = 0,001$  versus 5/6-Nephrektomie,  $^{***} p < 0,05/0,001$  versus Sham-OP.

## 5.7 Resultate der histologischen Untersuchungen der Herzen

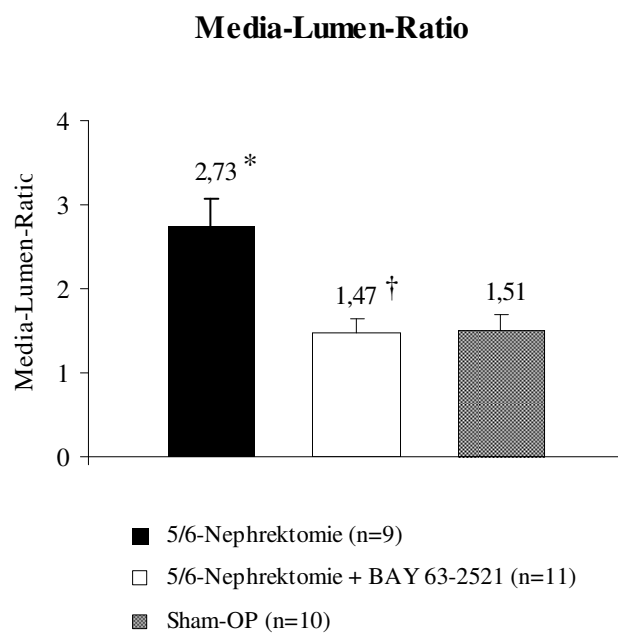
Wie bereits erwähnt, wurden nach dem Tod der Tiere auch die Herzen entnommen und histologisch aufgearbeitet. Es erfolgte neben der Beurteilung der Media zu Lumen-Ratio und der Analyse von perivaskulärer sowie interstitieller Fibrose auch die Bestimmung der Myozytendurchmesser. Diese wurden anhand 1 µm dicker, HE-gefärbter Präparate mit Hilfe der digitalen Morphometrie vermessen. In der anschließenden statistischen Auswertung konnten signifikante Unterschiede zwischen den urämischen Tieren beider Gruppen (mit deutlich höheren Myozytendurchmessern) und jenen Ratten mit Sham-OP ermittelt werden. Der Vergleich der urämischen Gruppen untereinander ergab jedoch lediglich einen Trend zu geringeren Werten der Myozytendiameter zugunsten der behandelten Tiere.

Deutlich unterschied sich hingegen die Media zu Lumen-Ratio. Diese war sowohl bei den Ratten mit Sham-OP als auch bei den mit Riociguat behandelten Tieren signifikant geringer als bei den unbehandelten nephrektomierten Ratten.

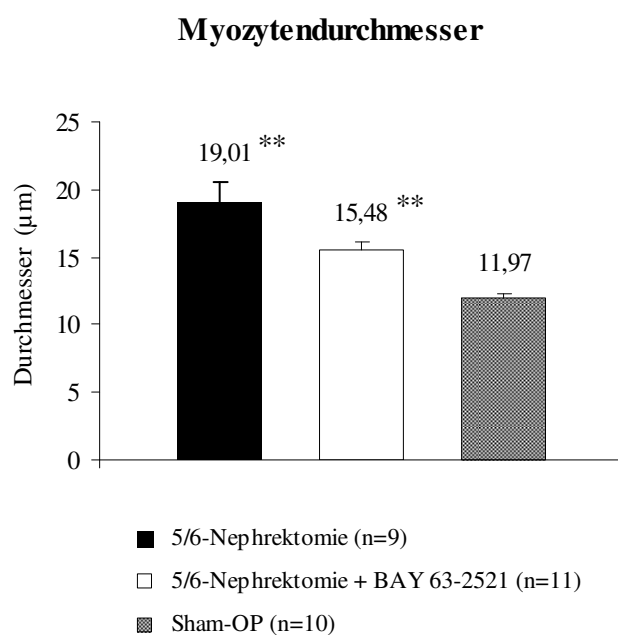
Hinsichtlich der perivaskulären und der interstitiellen Fibrose fanden sich zwischen den drei Gruppen keine wesentlichen Differenzen.

Parameter	5/6-Nephrektomie (n = 9)	5/6-Nephrektomie + Riociguat (n = 11)	Sham-OP (n = 10)
Interstitielle Fibrose (in % der Fläche)	2,26 ± 0,42	1,92 ± 0,26	2,4 ± 0,22
Media-Lumen-Ratio	2,73 ± 0,35*	1,47 ± 0,17 <sup>†</sup>	1,51 ± 0,18
Perivaskuläre Fibrose (Score)	2,07 ± 0,17	1,96 ± 0,19	1,86 ± 0,15
Myozytendurchmesser (in µm)	19,01 ± 1,53**	15,48 ± 0,63**	11,97 ± 0,29

**Tabelle 7.** Ergebnisse der histologischen Untersuchungen der Herzen. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardfehler, <sup>†</sup>p < 0,05/0,001 versus 5/6-Nephrektomie, \*\*p < 0,05/0,001 versus Sham-OP.



**Abbildung 12.** Media-Lumen-Ratio des Herzens. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler,  $^\dagger p < 0,05/0,001$  versus 5/6-Nephrektomie, \*  $p < 0,05$  versus Sham-OP.



**Abbildung 13.** Myozytendurchmesser. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, \*\*  $p < 0,001$  versus Sham-OP.

## 6. Diskussion

In diesem Versuch konnte anhand eines Tiermodells des chronischen Nierenversagens ein insgesamt positiver Effekt von Riociguat auf die renale und die daraus resultierende kardiale Schädigung nachgewiesen werden.

Die chronische Niereninsuffizienz ist assoziiert mit einer verminderten NO-Verfügbarkeit. Diese begründet sich einerseits durch eine reduzierte NO-Produktion (Vaziri et al., 1998; Rocznik et al., 1999; Schmidt & Baylis, 2000) bzw. durch Inaktivierung von NO durch reaktive Sauerstoffradikale (Vallance et al., 1992; Varizi et al., 2002; Varizi et al., 2004b). Andererseits ist die verminderte NO-Verfügbarkeit auch Folge einer Dysfunktion der sGC (Sindhu et al., 2004; Varizi et al., 2004a). Letztendlich führen sowohl ein Defizit an NO als auch eine Dysfunktion der sGC zu einer Erhöhung des Blutdruckes und zu einer Progression renaler Erkrankungen (Himmelfarb et al., 2002; Varizi et al., 2004b).

Riociguat gehört zu einer neuartigen Substanzklasse, deren Vertreter eine direkte, NO-unabhängige Stimulation der löslichen Guanylatcyclyase (sGC) bewirken. Es besteht dabei eine streng synergistische Enzymaktivierung. Das heißt, dass NO-Konzentrationen, die eine nur schwache sGC-Aktivierung zur Folge hätten, durch sGC-Stimulatoren in ihrer Wirkung potenziert werden (Friebe et al., 1996; Friebe et al., 1998; Hoenicka et al., 1999).

Seine gute Wirksamkeit stellte Riociguat bereits bei der Behandlung der pulmonalen Hypertonie unter Beweis. Patienten mit dieser Erkrankung wiesen in den entsprechenden Studien eine signifikante Verbesserung aller wesentlichen hämodynamischen Parameter auf. Dieser Effekt überstieg die Wirkung von inhaliertem NO bei Weitem und scheint zudem dosisabhängig zu sein (Grimminger et al.; 2009). Basierend auf diesen insgesamt sehr positiven Ergebnissen wurde erst kürzlich mit der Phase III der klinischen Studien begonnen. Ziel ist es, bezogen auf eine größere Patientengruppe, weitere Daten hinsichtlich des therapeutischen Nutzens und der Sicherheit von Riociguat zu generieren.

### 6.1 Laborwerte und Mortalität

Anhand der in Tabelle 3 zusammengestellten Laborparameter können zunächst Schädigungen, der größeren Organsysteme im Sinne von Nebenwirkungen weitestgehend ausgeschlossen werden. Zwischen den einzelnen Gruppen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich



der Transaminasen, der AP, LDH, GLDH und CK. Es fanden sich somit keine Hinweise für eine Kardio- bzw. Hepatotoxizität oder Rhabdomyolyse infolge der Behandlung mit Riociguat.

Die bisherigen klinischen Studien zur pulmonalen Hypertonie ergaben bezüglich der Verträglichkeit von Riociguat ähnlich positive Ergebnisse. So wurden während der Phase I-Studie von den gesunden, männlichen Probanden Dosierungen bis zu 5 mg gut toleriert (Frey et al., 2008). Allerdings scheint bei dieser hohen Dosierung das Risiko einer Hypotension zu bestehen, so dass als Maximaldosis derzeit 2,5 mg empfohlen werden (Grimminger et al., 2009).

Bestärkt wird die Annahme der guten Verträglichkeit und hohen Sicherheit von Riociguat auch durch den Vergleich der Mortalität zwischen den beiden 5/6-nephrektomierten Gruppen. Bei den behandelten Ratten betrug diese 27 % und war damit geringer als in der Gruppe der unbehandelten Tiere (40 %).

Die Retentionswerte Kreatinin und Harnstoff waren bei den 5/6-nephrektomierten Ratten erwartungsgemäß signifikant höher als bei den scheinoperierten Tieren. Des Weiteren wiesen die urämischen Ratten eine deutlich supprimierte Plasma-Renin-Aktivität und verminderte Proteinkonzentration im Plasma auf. Diese Ergebnisse entsprechen damit den von Strauch und Gretz publizierten Daten zum Tiermodell des chronischen Nierenversagens (Strauch und Gretz, 1988; Gretz, 1995). Hinsichtlich der Plasma-Renin-Aktivität sei an dieser Stelle noch erwähnt, dass eine Stimulation der Reninsekretion u. a. durch eine Abnahme des renalen Perfusionsdruckes, durch eine renale sympathische Innervierung über  $\beta_1$ -Adrenorezeptoren oder vermittelt durch humorale Faktoren, wie beispielsweise Prostaglandinen, Angiotensin II oder Kininen, erfolgt. Interessanterweise hängt die Plasma-Renin-Aktivität auch von der Art und Weise der 5/6-Nephrektomie ab. So lässt sich nach Infarzierung des Nierengewebes, beispielsweise durch Ligatur von Ästen der A. renalis, eine vergleichsweise hohe Plasma-Renin-Aktivität nachweisen. In dem Modell der Polresektion, wie in unserem Versuch erfolgt, ist diese hingegen deutlich supprimiert (Gretz, 1995).

Der Vergleich der beiden urämischen Gruppen hinsichtlich ihrer Kreatinin- und Harnstoffkonzentrationen im Plasma ergab bei den behandelten Tieren einen Trend (CREA:  $p = 0,056$ , UREA:  $p = 0,067$ ) zu niedrigeren Werten. Diese Befunde korrelieren mit der am Ende unseres Versuches ermittelten, höheren Kreatininclearance bei den behandelten Ratten im Vergleich zu den unbehandelten. Die Gabe von Riociguat scheint somit einer Verschlechterung der renalen Funktion bei chronischer Niereninsuffizienz entgegenzuwirken.

Bei den nephrektomierten Ratten beider Gruppen fanden sich weiterhin signifikant höhere BNP-Konzentrationen, als dies bei den Tieren mit Sham-OP der Fall war. Allerdings wiesen die mit Riociguat behandelten Tiere einen geringeren Anstieg dieses natriuretischen Peptids im Vergleich zu den nicht therapierten Ratten auf. Zudem konnten in der unbehandelten Gruppe vergleichsweise deutlich höhere ANP-Konzentrationen ermittelt werden.

Die Freisetzung und damit der Anstieg von BNP sowie ANP im Plasma geschehen infolge einer Dehnung der Herzkammern (BNP) bzw. Vorhöfe (ANP) z. B. im Rahmen einer chronischen Herzinsuffizienz. Beide natriuretischen Peptide führen zu einer Ausscheidung von Natrium und Flüssigkeit über die Niere sowie zu einer Erweiterung von Blutgefäßen, was letztendlich sowohl den Blutdruck als auch die Füllung des Herzens senkt. Zudem wird die Ausschüttung von Aldosteron und Renin vermindert, was u. a. auch zur Supprimierung der Plasma-Renin-Aktivität bei den urämischen Tieren beiträgt. In diagnostischer Hinsicht stellen vor allem BNP bzw. das N-terminale Fragment des proBNP (NT-proBNP) zuverlässige Marker zur Beurteilung des Schweregrades sowie der Progression einer myokardialen Schädigung dar. Bei akuter Herzinsuffizienz korrelieren die BNP- bzw. NT-proBNP-Plasmaspiegel mit den intrakardialen Drücken und der NYHA-Klasse. Bei dekompensierter Herzinsuffizienz ist außerdem eine Prognosebeurteilung anhand dieser Marker möglich. Bei chronischer stabiler Herzinsuffizienz ergeben sich hingegen Limitationen. In diesem Fall können trotz eingeschränkter Pumpfunktion gelegentlich auch normale BNP-Spiegel ermittelt werden (Angermann und Ertl, 2004). Dennoch besitzt die Bestimmung von BNP bei Patienten mit einer chronischen Niereninsuffizienz einen gewissen prognostischen Wert. Ein weiterer Aspekt ist das gute Ansprechen dieses Peptids auf eine medikamentöse Behandlung (Hoher et al., 2004; Silver et al., 2004; Takami et al., 2004). So konnte bereits durch die Therapie mit Diuretika, ACE-Hemmern, Angiotensin-II-Rezeptorantagonisten und Spironolacton eine Reduktion der BNP- sowie NT-proBNP-Plasmaspiegel erreicht werden, welche mit einer Verbesserung der klinischen und hämodynamischen Situation korrelierte (Angermann und Ertl, 2004). Anhand der Reduktion der BNP-Konzentration kann somit die Effektivität eines medikamentösen Therapieschemas überprüft werden.

Unter Berücksichtigung der genannten Eigenschaften beider natriuretischer Peptide, insbesondere jedoch des BNP, scheint Riociguat demnach einen protektiven Effekt auf die Entwicklung einer Herzinsuffizienz zu aufzuweisen.

## 6.2 Kreatininclearance und Albuminurie

Über die endogene Kreatininclearance kann bekanntlich die GFR gemessen werden. Kreatinin ist als Clearance-Parameter geeignet, da dessen Freisetzung aus dem Muskel homogen und weitestgehend konstant erfolgt. Der Nachteil der Verwendung von Kreatinin besteht darin, dass es nicht nur filtriert, sondern in geringem Maße auch tubulär sezerniert wird. Bei normaler oder nur gering eingeschränkter Nierenfunktion ist der Anteil des tubulär sezernierten Kreatinins vernachlässigbar klein. Hingegen kann bei schwerer Nierenfunktionsstörung dieser Anteil durchaus über 50 % der ausgeschiedenen Kreatininmenge betragen. Die Folge sind zu hohe Messwerte, das heißt, die GFR wird in diesen Fällen überschätzt. Grundlegend besteht eine Abhängigkeit der GFR von den Eigenschaften der Filtermembran sowie von den hydrostatischen und kolloidosmotischen Druckdifferenzen.

Die Verabreichung von Riociguat führte zumindest am Ende des Versuches bei den behandelten Ratten zu einer trendmäßig höheren GFR ( $p < 0,065$ ) im Vergleich zu den nicht therapierten urämischen Tieren. Demnach haben sich die Unterschiede erst allmählich im Versuchsverlauf entwickelt (siehe Abb. 6). Unter Berücksichtigung auch der Serumkonzentrationen von Kreatinin und Harnstoff nach Tötung der Tiere wurde die Progression der Niereninsuffizienz durch die Behandlung mit Riociguat verlangsamt.

Auf die Proteinurie hatte die Verabreichung von Riociguat keinen positiven Effekt. So ergab der Vergleich der beiden urämischen Gruppen keine Unterschiede hinsichtlich der Albuminausscheidung im Urin. Zu einer Proteinurie kommt es u. a. infolge einer erhöhten glomerulären Permeabilität mit Verlust der Siebfunktion und aufgrund einer kompensatorischen Hyperperfusion der noch funktionstüchtigen Glomerula. Durch einen arteriellen Hypertonus wird diese noch erheblich verstärkt. In diesem Versuch führte die Verabreichung von Riociguat jedoch zu einer deutlichen Senkung des systolischen Blutdruckes, so dass eigentlich eine Abnahme der Proteinausscheidung zu erwarten gewesen wäre. Allerdings existieren in der Literatur andere Arbeiten, in denen ebenfalls, trotz Behandlung mit kompetenten blutdrucksenkenden Substanzen, keine positive Wirkung hinsichtlich einer Proteinurie festgestellt werden konnte. So haben beispielsweise Calcium-Antagonisten vom Nifedipin-Typ (Dihydropyridine) keinen anti-proteinurischen Effekt (Nathan et al., 2005). Ebenso konnte für BAY 58-2667, einem Aktivator der sGC, eine sehr gute blutdrucksenkende Wirkung bei 5/6-nephrektomierten Ratten nachgewiesen werden. Die Proteinurie der niereninsuffizienten Tiere blieb davon jedoch unbeeinflusst (Kalk et al., 2006).

Letztendlich muss offen bleiben, auf welchen pathophysiologischen Vorgängen der fehlende antiproteinurische Effekt trotz Blutdrucksenkung durch Riociguat beruht. Vielleicht spielt hierbei die Glomerulosklerose eine entscheidende Rolle, deren Fortschreiten durch Riociguat ebenfalls kaum beeinflusst wurde. Formalpathogenetisch resultiert diese u. a. in einer Verbreiterung der Basalmembran, wodurch die Filtrationsbarriere gegenüber kleinmolekularen Proteinen funktionell erheblich beeinträchtigt wird. Die Folge ist eine Permeabilitätsstörung mit Auftreten einer Albuminurie.

### 6.3 Körper- und Organgewichte

Wie in Tabelle 2 ersichtlich, wiesen die altersgleichen männlichen Wistar-Ratten signifikante Unterschiede hinsichtlich ihres Körpergewichtes auf. So waren die urämischen Tiere deutlich leichter als die scheinoperierten Ratten. Diese Ergebnisse decken sich mit jenen bereits 1982 durch Laouari et al. gezeigten, nach denen Ratten nach einer 5/6-Nephrektomie einen Gewichtsverlust (Laouri et al., 1982) und eine Stagnation ihres linearen Wachstums erleiden.

Des Weiteren fiel bei den nephrektomierten Tieren ein durchschnittlich höheres relatives Herzgewicht auf. Bezogen auf das Körpergewicht eines jeden Tieres waren jedoch sowohl der rechte als auch der linke Ventrikel bei den mit Riociguat behandelten Ratten signifikant leichter. Verursacht wird eine kardiale Gewichtszunahme vor allem durch eine Herzmuskelhypertrophie. Erreicht diese einen bestimmten Grad, der durch das sogenannte kritische Herzgewicht markiert ist, kommt es zusätzlich zu einer Hyperplasie der Myokardmyozyten. Es existieren zahlreiche Versuche, in welchen am Modell der 5/6-Nephrektomie die Entwicklung einer linksventrikulären Hypertrophie gezeigt werden konnte (Kennedy et al., 2003; Amann et al., 2003). Die Erhöhung der linksventrikulären Masse resultiert dabei aus einer Kombination aus exzentrischer und konzentrischer linksventrikulärer Hypertrophie (Foley et al., 1992).

Bereits zu Beginn einer renalen Erkrankung lassen sich bei einer Vielzahl der Patienten kardiale Veränderungen nachweisen. Mit zunehmender Verschlechterung der Nierenfunktion kommt es zu einer parallelen Progression der linksventrikulären Veränderungen (Levin et al., 1996). So kann bei 75 % der erwachsenen dialysepflichtigen Patienten eine linksventrikuläre Hypertrophie gefunden werden. Diese ist in 42 % der Fälle vordergründig konzentrisch und in 44 % überwiegend exzentrisch, wobei bei letzterer die Dilatation des linken Ventrikels dominiert (Foley et al., 1992). Diese Anpassungsvorgänge haben letztendlich eine Herzmuskelhypertrophie zur Folge, deren Ausmaß offensichtlich durch Riociguat reduziert wird.

## 6.4 Histomorphologische Veränderungen der Herzen

Wie bereits erwähnt, bewirkt Riociguat eine Reduktion insbesondere des linksventrikulären Gewichtes. Dieser makroskopische Effekt konnte im Wesentlichen histologisch bestätigt werden.

Zunächst einmal wiesen beide urämischen Gruppen eine, im Vergleich zu den scheinoperierten Ratten, deutliche Zunahme der Myozytendurchmesser auf. Allerdings fiel diese bei den mit Riociguat behandelten Tieren geringer aus. So ergab der Vergleich mit den unbehandelten 5/6-nephrektomierten Ratten einen Trend zu niedrigeren Werten. Unter Berücksichtigung auch der makroskopischen Ergebnisse trat in unserem Niereninsuffizienz-Modell demnach eine signifikante Myokardhypertrophie auf, welche jedoch durch die Behandlung mit Riociguat abgemildert wurde.

Charakterisiert ist eine Hypertrophie durch eine Vergrößerung der Kardiomyozyten, eine gesteigerte Proteinsynthese und eine Umgestaltung des Sarkomers. Diese strukturellen Anpassungsvorgänge des Myokards infolge einer Druck- bzw. Volumenbelastung werden dabei durch mechanische Stimuli, lokal gebildete Wachstumsfaktoren sowie vasoaktive Substanzen initiiert (Grossmann 1980; Mann et al., 1989; Dzau, 1993).

Zu den häufigsten Ursachen der linksventrikulären Hypertrophie zählt die hypertensive Herzkrankheit. In mehr als drei Viertel der Fälle ist eine chronische Herzinsuffizienz Folge eines langjährig bestehenden arteriellen Hypertonus, bei häufig gleichzeitig vorliegender koronarer Herzkrankheit (Eriksson et al., 1989; Ho et al., 1993). Als wichtige Ursache der linksventrikulären Hypertrophie bei chronischer Niereninsuffizienz konnte entsprechend der Canadian Cohort Study neben dem Anstieg des arteriellen Blutdruckes auch die Abnahme des Hämoglobinspiegels identifiziert werden (Levin et al., 1999). Des Weiteren spielen eine gesteigerte Aktivität des sympathischen Nervensystems sowie eine, infolge des Nierenversagens bestehende, Hypervolämie eine wesentliche Rolle (Rambausek et al., 1985).

Für Riociguat konnte in dieser Arbeit eine deutliche Senkung des systolischen Blutdruckes nachgewiesen werden. Es stellen sich daher nun die Fragen, inwieweit die Reduktion der linksventrikulären Hypertrophie Resultat dieser antihypertensiven Wirkung ist, und welche Rolle die in dieser Arbeit ebenfalls nachgewiesene verbesserte Nierenfunktion dabei spielt. Als Beispiel für die Entstehung einer Linksherzvergrößerung, welche zumindest teilweise von einer Erhöhung des mittleren arteriellen Blutdruckes dissoziiert ist, sei eine Studie von Hüting und Mitarbeitern erwähnt. In dieser konnte selbst bei strikt normotensiven Dialysepatienten eine progressive Zunahme der linksventrikulären Septum- und Hinterwanddicke des Herzens gezeigt werden (Hüting et al., 1988). In den Fällen einer isolierten Blutdrucksenkung scheinen die oben bereits

genannten und an der Entwicklung der linksventrikulären Hypertrophie infolge eines chronischen Nierenversagens ebenfalls beteiligten Faktoren zum Tragen zu kommen. So konnte einerseits eine positive Korrelation zwischen der linksventrikulären Masse und der Hämoglobinkonzentration festgestellt werden (Silberberg et al., 1989). Andererseits hatte die Korrektur der Anämie durch Verabreichung von rekombinantem humanen Erythropoetin (rhEPO) eine Verbesserung der linksventrikulären Hypertrophie bei chronisch niereninsuffizienten Patienten zur Folge (Amann et al., 2000).

In einer anderen Studie konnte allerdings gezeigt werden, dass die Entstehung einer linksventrikulären Hypertrophie nicht vollständig durch die genannten Faktoren erklärt wird. So blieb bei experimenteller Niereninsuffizienz trotz medikamentöser Senkung des Blutdruckes durch Antihypertensiva, diuretische Therapie, Sympathikusblockade ( $\alpha$ - und  $\beta$ -Blockade) und Korrektur der Anämie der Quotient aus Herz- und Körpergewicht erhöht (Rambausek et al., 1985). Ein weiterer, in dieser Arbeit bisher noch nicht berücksichtigter Aspekt hinsichtlich der Entstehung einer Myokardhypertrophie bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz, konnte durch London und Mitarbeiter gezeigt werden (London et al., 1990). Diese wiesen eine Reduktion der Aortenelastizität, gemessen anhand der Pulswellengeschwindigkeit, bei chronisch niereninsuffizienten Patienten nach. Die Folgen sind eine Erhöhung der Blutdruckamplitude sowie eine Überhöhung des systolischen Spitzendruckes ohne aber Beeinflussung des mittleren arteriellen Druckes. Für den linken Ventrikel bedeutet das eine gesteigerte pulsatile Herzarbeit, das heißt, dass mehr kinetische Energie notwendig ist, um das systolisch ausgeworfene Blut in der Aorta zu beschleunigen (Amann et al., 2000). Bei subtotal nephrektomierten Ratten wurde bereits nach zwei Wochen eine signifikante Zunahme der aortalen Gefäßwanddicke im Vergleich zu den Kontrolltieren gefunden. Diese beruhte auf einer Zunahme der extrazellulären Matrix und der Anzahl glatter Gefäßmuskelzellen bei gleichzeitiger Abnahme des Anteils an elastischen Fasern (Amann et al., 2000).

In unserem Versuch erfolgte weder eine Bestimmung des Blutbildes zur Erfassung einer eventuellen Anämie, noch wurde die Aorta der Ratten einer histologischen Untersuchung unterzogen. Dennoch handelt es sich sowohl bei der Anämie als auch bei der Wandverdickung der Aorta um direkte bzw. indirekte Folgen eines chronischen Nierenversagens. Durch die Verabreichung von Riociguat konnte eine leichte Verbesserung der Nierenfunktion und deutliche Verringerung der histopathologischen renalen Läsionen erreicht werden. Allerdings kann dieser positive Effekt ebenso wie die Reduktion der Herzmuskelhypertrophie auch die Folge eines niedrigeren Blutdruckes in dieser Gruppe sein. Demnach ist mit unserer Versuchsanordnung keine Aussage hin-

sichtlich eines blutdruckunabhängigen, spezifischen Effektes von Riociguat auf den kardialen Endorganschaden möglich.

Neben den genannten indirekten Faktoren, die der Verschlechterung einer Herzinsuffizienz vorbeugen (Blutdrucksenkung, Verbesserung der Nierenfunktion), ist auch eine direkte kardiale Wirkung von Riociguat zu diskutieren. Entsprechend einer Studie von Hare und Stamler ist die Aktivierung der sGC durch NO bei einer kardialen Insuffizienz durch verschiedene Mechanismen reduziert. Diese beinhalten neben einer verminderten Freisetzung und einem gesteigerten Abbau von NO auch die Deaktivierung durch Superoxide mit konsekutiver Bildung von Peroxynitrit (Hare und Stamler, 2005). Neben der Reduktion von NO als physiologischem Aktivator der sGC behindert Peroxynitrit auch direkt die kardiovaskuläre Funktion, z. B. durch Stimulation von Matrix-Metalloproteasen und des nukleären Enzyms Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) (Pacher et al., 2005). Durch Nitrate als NO-Donatoren wird zwar ein NO-Defizit ausgeglichen, allerdings bewirken diese bei Herzinsuffizienz auch eine gesteigerte Bildung von Peroxynitrit. Neben der bereits erwähnten Nitrattoleranz stellt dieser Aspekt einen weiteren wesentlichen Nachteil dieser Substanzen dar.

Wie bereits erläutert, kann bei 5/6-nephrektomierten Ratten eine Gefäßwandverdickung der Aorta mit daraus resultierender Reduktion der Elastizität nachgewiesen werden. Auch die intramyokardialen Gefäße sind von einer solchen Wandverdickung betroffen. Diese beruht auf einer deutlichen Hypertrophie der glatten Gefäßwandzellen sowie einer nur geringen Zunahme der Zellzahl (Törnig et al., 1999). Sowohl in klinischen (Barenbrock et al., 1994) als auch in histologischen Untersuchungen konnte bei Patienten mit langjähriger Dialysedauer eine Wandverdickung kleiner intramyokardialer aber auch peripherer Arterien nachgewiesen werden. Diese war jedoch nicht atherosklerotisch bedingt, sondern beruhte vor allem auf einer Mediahypertrophie (Amann et al., 2000).

In unserer Arbeit wurde zur Erfassung einer eventuellen Wandverdickung intramyokardialer Gefäße die Media zu Lumen-Ratio ermittelt. Dabei wiesen die unbehandelten urämischen Ratten signifikant höhere Werte auf. Bei jenen urämischen Tieren, die Riociguat über das Futter verabreicht bekamen, fand sich hingegen eine vergleichsweise deutlich reduzierte Wanddicke der arteriellen Herzgefäße. Sicherlich beruht diese größtenteils auf der in dieser Arbeit ebenfalls nachgewiesenen Senkung des systemischen Blutdruckes in der behandelten Gruppe. Andererseits existieren auch Studien, die belegen, dass eine Zunahme der Wanddicke arterieller Gefäße im Rahmen einer chronischen Niereninsuffizienz auch unabhängig vom systemischen Blutdruck auftreten kann (Kakinuma et al., 1992; Amann et al., 1995; Törnig et al., 1996).

Offenbar scheint Parathormon (PTH) für die Genese dieser Strukturveränderung ein wesentlicher permissiver Faktor zu sein. Es ist bekannt, dass die Expression der PTH/PTHrp-Rezeptoren durch Angiotensin II stimuliert wird (Pirola et al., 1993; Okano et al., 1995). Im Rahmen einer Urämie kommt es jedoch zu einer Downregulation der PTH/PTHrp-Rezeptoren (Urena et al., 1994), wobei dann vermutlich eine gesteigerte Sensitivität für Parathormon besteht (Törnig et al., 1999). Diese Downregulation der PTH/PTHrp-Rezeptoren bewirkt mit großer Wahrscheinlichkeit eine Steigerung der proliferationsfördernden, trophischen Effekte des Angiotensin II (Pirola et al., 1993). Letztendlich hat die Gefäßwandverdickung eine Störung der myokardialen Mikrozirkulation zur Folge, die durch eine zusätzliche Rarefizierung der intramyokardialen Kapillaren mit Zunahme der interkapillären Sauerstoffdiffusionsstrecke noch verstärkt wird (Amann et al., 1995; Törnig et al., 1996; Amann et al., 1992). Hinsichtlich der Reduktion der intramyokardialen Kapillarisation konnte beispielsweise eine verminderte Längendichte dieser Gefäße gezeigt werden. Das heißt, dass die Gesamtlänge der Kapillaren pro Volumen Myokard im linken Ventrikel chronisch niereninsuffizienter Tiere im Vergleich zu den Kontrollen bzw. Tieren mit renovaskulärem Hypertonus und ähnlich gearteter linksventrikulärer Hypertrophie signifikant geringer war (Amann et al., 1992). Demnach scheint im Rahmen einer chronischen Niereninsuffizienz die Angiogenese gehemmt zu werden. Diese ist jedoch notwendig, um während der Massenzunahme des linken Ventrikels eine adäquate Kapillarisation des Myokards zu gewährleisten (Amann et al., 2000). Die Folge ist eine reduzierte Ischämietoleranz des Herzmuskels mit konsekutiver Erhöhung der kardiovaskulären Mortalität. Der Tod infolge einer kardialen Ischämie scheint auch in unserem Versuch eine wesentliche Rolle gespielt zu haben, da immerhin 40 % der unbehandelten urämischen Ratten noch vor Beendigung des Versuches verstarben. Durch die Verabreichung von Riociguat konnte hingegen eine Abnahme der Sterblichkeit erreicht werden.

Neben dem, in der vorliegenden Arbeit, eindeutig nachgewiesenem Effekt von Riociguat auf die Mediahypertrophie kardialer Gefäße konnte in anderen Studien auch eine positive Wirkung hinsichtlich der Entwicklung einer Atherosklerose gezeigt werden. So wurde Riociguat beispielsweise 14 Wochen lang ApoE-knockout-Mäusen verabreicht, welche anschließend im Vergleich zu den unbehandelten Tieren eine deutliche Reduktion der atherosklerotischen Plaques in der Aorta aufwiesen (Stasch und Hobbs, 2009). Des Weiteren hemmt Riociguat die Migration glatter Muskelzellen aus der Tunica media menschlicher Koronararterien, einem frühen Mechanismus bei der Entstehung einer Atherosklerose (Stasch und Hobbs, 2009).



Auf die interstitielle bzw. perivaskuläre Fibrose des Herzens hatte die Verabreichung von Riociguat keinen Einfluss. Es sei jedoch angemerkt, dass sich zwischen den drei Gruppen insgesamt keine wesentlichen Unterschiede hinsichtlich einer kardialen Fibrose feststellen ließen. Sowohl die urämischen als auch die scheinoperierten Tiere wiesen einen ähnlichen Flächenanteil an interstitieller und einen ähnlichen Grad der perivaskulären Fibrose auf. Vermutlich war die Dauer des Versuches zu kurz und die u. a. durch Katecholamine sowie Angiotensin II induzierte Expression von Kollagen hätte erst zu einem späteren Zeitpunkt eingesetzt. Andererseits scheint der Anstieg des Volumenanteils interstitiellen Bindegewebes nach subtotaler Nephrektomie quantitativ ohnehin eher bescheiden zu sein. Die absolute Zunahme einer interstitiellen Fibrose ist, nebenbei bemerkt, auch nicht entscheidend für das Ausmaß einer kardialen Funktionsstörung. Von größerer Bedeutung sind die räumliche Anordnung der Bindegewebsfasern und deren Zusammensetzung, insbesondere in Bezug auf die beteiligten Kollagenisotypen (Amann et al., 2000). Grundsätzlich hat die Entstehung einer kardialen Fibrose erhebliche funktionelle Auswirkungen auf die Dehnungs-Spannungs-Beziehung (stress-strain) während der systolischen Kontraktion zur Folge. Sie bewirkt zudem eine Störung der linksventrikulären Compliance während der diastolischen Füllung und fördert die Entstehung von Arrhythmien durch eine inhomogene Ausbreitung der Erregungswelle durch den linken Ventrikel (Weber et al., 1994). Dabei werden vor allem Arrhythmien vom Reentry-Typ begünstigt.

Einen wesentlichen pathogenetischen Faktor, sowohl bei der Entstehung der Myokardfibrose als auch der Ausbildung der linksventrikulären Hypertrophie und Wandverdickung intramyokardialer Gefäße bei chronischer Niereninsuffizienz, scheint das lokale Renin-Angiotensin-System (RAS) darzustellen. Denn obwohl die Plasma-Renin-Aktivität bei chronischer Niereninsuffizienz im Normalfall eher niedrig ist, bewirkt eine Langzeitbehandlung mit ACE-Hemmern eine signifikante Abnahme, wenngleich nicht komplette Rückbildung der linksventrikulären Hypertrophie (Canella et al., 1993). Hinsichtlich der Myokardfibrose ergaben zudem experimentelle Beobachtungen, dass die Expansion des kardialen Interstitiums durch frühzeitige Behandlung mit ACE-Hemmern vollständig verhindert werden kann (Törnig et al., 1996). In den vergangenen Jahren konnte insbesondere in kardialen aber auch in vaskulären Myozyten und Fibroblasten jede einzelne Komponente des RAS nachgewiesen werden (Dostal et al., 1992; Zhang et al., 1995). Die mechanische Dehnung von Kardiomyozyten infolge einer chronischen Druck- bzw. Volumenbelastung bewirkt eine verstärkte autokrine Freisetzung von Angiotensin II im lokalen myokardialen RAS. Dies konnte einerseits *in vitro* an isolierten, auf Silikonmembra-

nen gedehnten Kardiomyozyten gezeigt werden und wurde andererseits *in vivo* im Tiermodell bestätigt (Sadoshima et al., 1993).

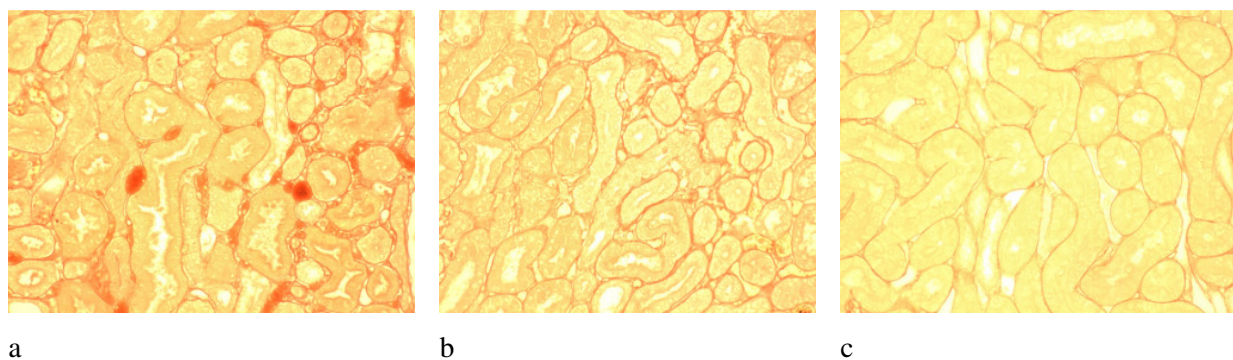
Perspektivisch erscheinen meiner Ansicht nach weitere Versuche sinnvoll, in denen die therapeutische Kompetenz von Riociguat bei 5/6-nephrektomierten Ratten mit jener eines ACE-Hemmers wie Captopril oder Enalapril verglichen werden. Nur so kann eingeschätzt werden, ob die Wirkungen der beiden Medikamente gleichwertig sind, und ob nicht gar eine kombinierte Verabreichung das therapeutische Optimum darstellt.

## 6.5 Histomorphologische Veränderungen der Nieren

In der Literaturübersicht am Anfang dieser Arbeit wurde bereits ausführlich über die renalen histopathologischen Veränderungen bei chronischer Niereninsuffizienz berichtet. Auch wurde auf die aus therapeutischer Sicht positiven Effekte NO-unabhängiger sGC-Stimulatoren und -Aktivatoren eingegangen. Die Wirkung von Riociguat auf die histologisch nachweisbaren Veränderungen der Niere soll daher nur kurz diskutiert werden.

Wie bereits unter 2.2.6 erwähnt, kann im Rahmen einer Nierenerkrankung eine Hochregulation der sGC-Expression mit konsekutivem Anstieg der intrazellulären cGMP-Konzentration nachgewiesen werden (Peters et al., 2004; Hohenstein et al., 2005). Es handelt sich dabei um einen kompensatorischen Mechanismus im Sinne einer endogenen Protektion. Als Folge der erhöhten cGMP-Konzentration tritt ein Rückgang der TGF $\beta$ -Produktion und damit verbunden ein Rückgang der Produktion von Matrixproteinen sowie der Makrophageninfiltration ein. Durch die Verabreichung von Substanzen, die einen aktivierenden Effekt auf die sGC aufweisen, kann dieser Mechanismus noch erheblich verstärkt werden. Diese Verbindungen besitzen demnach antifibrotische Eigenschaften (Wang et al., 2005).

Riociguat verfügt als Stimulator der sGC ebenfalls über dieses Charakteristikum. So weisen die Nieren der mit dieser Substanz behandelten urämischen Ratten eine, im Vergleich zu den unbehandelten Tieren, deutlich verminderte interstitielle und auch perivaskuläre Fibrose auf. Dieser Effekt beruht, wie bereits erwähnt, auf einer Erhöhung der intrazellulären cGMP-Konzentration. Er scheint damit unabhängig von der Reduktion des systemischen Blutdruckes zu sein, wird durch diese allenfalls gefördert.



**Abbildung 14.** Histologische Nierenausschnitte in Sirius-Red-Färbung, Vergrößerung 1:200. (a) 5/6-Nephrektomie, (b) 5/6-Nephrektomie + Riociguat, (c) Unauffälliger Befund (Tiere mit Sham-OP). Die rot gefärbten Anteile markieren die interstitielle Fibrose.

Ähnlich positive Ergebnisse hinsichtlich der Progredienz einer chronischen Niereninsuffizienz konnten durch die Verabreichung von Sildenafil (Viagra<sup>®</sup>) erreicht werden. Diese Substanz wirkt bekanntlich über eine Inhibition der Phosphodiesterase 5, mit der Folge eines Anstiegs der cGMP-Konzentration. Die mit Sildenafil behandelten, ebenfalls 5/6-nephrektomierten Ratten wiesen in dieser Studie eine verzögert einsetzende Proteinurie und geringere histopathologische Schäden auf (Rodriguez-Iturbe et al., 2005). In einem sich anschließenden, zweiten Versuch wurde Sildenafil mit Losartan sowie der Kombination aus beiden Medikamenten verglichen. Allerdings wurde mit der Verabreichung erst vier Wochen nach der 5/6-Nephrektomie begonnen. Die verzögerte Behandlung mit Sildenafil hatte weder einen Einfluss auf die Proteinurie noch auf die Entwicklung histopathologischer Läsionen in der Niere, wohingegen sich eine bestehende Hypertonie und Azotämie verbesserten (Rodriguez-Iturbe et al., 2005). Dies lässt vermuten, dass mit der Verabreichung von Sildenafil frühzeitig begonnen werden muss, um eine Wirkung auf die Niere zu erreichen. Demnach scheinen Substanzen, die eine intrazelluläre cGMP-Erhöhung bewirken, einen vorbeugenden Effekt auf die Entwicklung einer chronischen Niereninsuffizienz zu haben.

Hinsichtlich der Glomerulosklerose konnten zwischen den behandelten und unbehandelten urämischen Ratten überraschenderweise keine wesentlichen Unterschiede festgestellt werden. Scheinbar hat Riociguat auf diese kaum einen nachweisbaren Effekt.

## 6.6 Blutdruck

Das Modell der 5/6-Nephrektomie geht unabhängig vom Rattenstamm mit der Entstehung eines arteriellen Hypertonus einher (Shimamura et al., 1975; Purkerson et al., 1976; Fassi et al., 1998).

Allerdings ist die Entwicklung des Bluthochdruckes stark abhängig von der Art der partiellen Reduktion des renalen Parenchyms (Gretz et al., 1993). So kann bei den Infarktmodellen ein rascher, von einer hohen Plasma-Renin-Aktivität begleiteter Blutdruckanstieg beobachtet werden. Ursächlich ist eine Hypoperfusion der an das infarzierte Gewebe angrenzenden Glomerula mit konsekutiver Steigerung der Reninsekretion und der damit verbundenen Bildung von Angiotensin II. Außerdem erfolgt im weiteren Verlauf eine vermehrte Aldosteronfreisetzung in der Nebennierenrinde, so dass die Hypertonie durch eine Natrium- und Wasserretention unterhalten wird (Meyer und Rennke, 1988).

Auf das Modell der Polresektion, welches wir gewählt haben, treffen diese Beobachtungen hingegen nicht zu. Hier steigt der Blutdruck nur allmählich an und erreicht erst nach 15 Wochen ähnlich hohe Werte, wie sie bei den Infarktmodellen nachgewiesen wurden (Gretz et al., 1993; Griffin et al., 1994). Der Blutdruckanstieg basiert dabei auf einer Salz- und Wasserretention und geht mit einer Suppression des Renin-Angiotensin-Systems einher. Dies erklärt, warum die nephrektomierten Ratten in unserem Versuch eine deutlich geringere Plasma-Renin-Aktivität im Vergleich zu den scheinoperierten, gesunden Tieren aufwiesen.

Trotz niedriger Plasma-Renin-Aktivität konnte jedoch in einigen Studien bei 5/6-nephrektomierten Ratten eine Senkung des Blutdruckes durch die Gabe eines ACE-Hemmers (Enalapril, Captopril) erreicht werden (Anderson et al., 1985; Ots et al., 1998). Es ist daher zusätzlich eine gesteigerte Aktivität des bereits oben erwähnten lokalen Renin-Angiotensin-Systems zu vermuten.

Insgesamt ist an der Regulation des Blutdruckes eine Vielzahl weiterer, ebenfalls ineinander greifender Systeme beteiligt, auf welche in dieser Arbeit jedoch nicht näher eingegangen werden soll. Von Bedeutung ist, dass Riociguat, wie insbesondere Abbildung 7 zu entnehmen ist, zu einer deutlichen Reduktion des systolischen Blutdruckes im Vergleich zu den unbehandelten, urämischen Tieren führte. Dieser Effekt des sGC-Stimulators wird vor allem durch eine cGMP-vermittelte Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur erreicht. Die Senkung des Blutdruckes infolge einer Verbesserung der Nierenfunktion spielt dabei wahrscheinlich eine nur untergeordnete Rolle. Bestärkt wird diese Annahme durch zahlreiche andere Versuche, die eine Korrelation zwischen der Entstehung eines arteriellen Hypertonus und Veränderungen des NO-sGC-cGMP-Signaltransduktionsweges darlegen. Beispielsweise war die maximale cGMP-Produktion in den Lungen spontan hypertensiver Ratten um etwa das Dreifache geringer als bei den Wistar-Kyoto-Tieren in der Kontrollgruppe (Kojda et al., 1998). Zudem wiesen spontan hypertensive Ratten eine deutlich reduzierte sGC-Expression im Vergleich zu den Tieren vom Wildtyp auf (Kloss et al., 2000; Morawietz et al., 2001; Ruetten et al., 1999). Kompensatorisch reagieren die vaskulä-

ren Endothelzellen hypertensiver Ratten mit einer gesteigerten NO-Produktion (Kagota et al., 2006). Allerdings trägt dieser Mechanismus mit sehr großer Wahrscheinlichkeit zu einer sGC-Desensibilisierung bei. So führten sowohl ein chronisches Defizit von NO in eNOS-knockout-Mäusen, als auch die plötzliche Beendigung der endothelialen NO-Synthese in Mäusen vom Wildtyp zu einer gesteigerten Sensitivität der sGC für NO. Die Folge war eine gesteigerte Relaxation der glatten Gefäßmuskelzellen nach Verabreichung von „Nitro-Vasodilatoren“. Hingegen induzierten hohe NO-Konzentrationen in diesem Versuch eine Desensibilisierung der sGC (Brandes et al., 2000; Hussain et al., 1999). Neben dieser, als Nitrattoleranz bezeichneten, Limitation der klassischen NO-Donatoren wirkt sich auch oxidativer Stress hinderlich auf die Wirksamkeit dieser Substanzen aus. Pathophysiologisch beruht dieser Effekt auf einer Erhöhung der Angiotensin-II-Konzentration mit nachfolgender Stimulation der NAD(P)H-Oxidase, welche wiederum eine vermehrte Produktion von Superoxiden bewirkt (Harrison et al., 2003). Diese reagieren mit NO, woraufhin die Bildung von Peroxynitrit erfolgt, so dass weniger NO für die Stimulation der sGC zur Verfügung steht (Chirkov und Horowitz, 2007; Franco und Oparil, 2006; Munzel et al., 2005). Stimulatoren der sGC, wie z. B. Riociguat, unterliegen nicht diesen Limitationen, da sie auf eine NO-unabhängige Art und Weise wirken. Sie besitzen demnach einen entscheidenden Vorteil gegenüber den herkömmlichen NO-Donatoren. Dieser positive Aspekt wurde auch in einer erst kürzlich von Schermuly und Mitarbeitern an Kaninchen mit vorhandener Nitrattoleranz durchgeführten Studie deutlich. Die Arterien dieser Tiere wiesen trotz der Nitrattoleranz eine durch Riociguat vermittelte Vasorelaxation auf. Zudem hatte die Verabreichung des sGC-Stimulators die Reduktion einer akuten Vasokonstriktion pulmonaler Arterien in isolierten Mäuselungen zur Folge (Schermuly et al., 2008).

In den klinischen Studien zur pulmonalen Hypertonie bewirkte die Behandlung mit Riociguat eine signifikante Senkung des systemischen Blutdruckes und des systemischen Widerstandes. Interessanterweise war diese allgemeine Vasodilatation kaum von relevanten Nebenwirkungen begleitet (Grimminger et al., 2009).

Nun gehört der arterielle Hypertonus zu den wichtigsten Faktoren, die das Fortschreiten einer chronischen Niereninsuffizienz begünstigen. Demzufolge beruhen die in dieser Arbeit ebenfalls nachgewiesenen Verbesserungen der Nierenfunktion und -morphologie vermutlich zu einem sehr großen Anteil auf diesem Effekt. Wie groß genau dieser Anteil ist, kann anhand dieser Studie jedoch nicht bemessen werden. Es sei lediglich auf die bereits unter 5.5 beschriebenen antifibrotischen Eigenschaften sGC-aktivierender Substanzen hingewiesen, die eine zumindest partiell blutdruckunabhängige Wirkung des Riociguat auf die Progredienz einer chronischen Niereninsuffizienz nahelegen.

Letztendlich kann das Vorhandensein vermeintlich blutdruckunabhängiger Wirkungen von Riociguat hinsichtlich der Progredienz einer chronischen Nieren- und Herzinsuffizienz nur vermutet, die Evidenz jedoch nicht eindeutig belegt werden. Zur Lösung dieses Problems werden weitere Studien erforderlich sein, in denen beispielsweise versucht wird, den blutdrucksenkenden Einfluss von Riociguat durch die Gabe einer niedrigen Dosis zu minimieren. Zudem könnten vergleichende Versuche hilfreich sein, in denen die Effekte von Riociguat auf den Blutdruck und die Nierenfunktion denjenigen eines rein antihypertensiven Medikamentes gegenübergestellt werden. Interessant könnte auch der Vergleich von Riociguat mit Sildenafil sein, oder welche Wirkung eine Kombinationstherapie dieser beiden Substanzen hat.

Ein weiterer, nicht zu vernachlässigender Aspekt ist die kurze Dauer des Versuches. Zwar konnten über den kompletten Zeitraum von 18 Wochen konstant niedrigere Blutdruckwerte bei den mit Riociguat behandelten Ratten beobachtet werden, allerdings ist damit noch keine Aussage hinsichtlich der Langzeitwirkung dieser Substanz getroffen. Diesbezüglich sollten längerfristig angelegte Studien erfolgen, in denen die Wirkungen von Riociguat auf den Blutdruck und die Niere erfasst werden können.

## 7. Zusammenfassung

Chronische Nierenerkrankungen sind assoziiert mit oxidativem Stress, einer reduzierten NO-Verfügbarkeit und einer Dysfunktion der löslichen Guanylatcyclyase (sGC). Die Folgen sind eine Erhöhung des Blutdruckes sowie eine weitere Verschlechterung der renalen Erkrankung.

Auf diesen pathophysiologischen Mechanismen basierend wurde in dieser Arbeit die therapeutische Wirkung einer neuartigen Substanz, des Riociguat, bei der Behandlung der chronischen Niereninsuffizienz anhand eines Tiermodells geprüft. Weiterhin wurde der Einfluss von Riociguat hinsichtlich kardialer Folgeschäden beurteilt.

Riociguat ist ein Stimulator der sGC, welcher in Kombination mit NO zu einer streng synergistischen Enzymaktivierung führt. Die Gegenwart einer nur geringen NO-Konzentration ist dabei völlig ausreichend, da deren Wirkung auf die sGC durch Riociguat um ein Vielfaches potenziert wird.

Für diesen Versuch wurden männliche Wistar-Ratten im Alter von zehn Wochen randomisiert in drei Gruppen eingeteilt: 5/6-Nephrektomie, 5/6-Nephrektomie mit Verabreichung von Riociguat über das Futter und Sham-Operation. Die Dauer der Studie belief sich auf insgesamt 18 Wochen. Während dieses Zeitraumes wurden wiederholt Messungen des systolischen Blutdruckes durchgeführt sowie die Kreatininclearance und Albuminurie bestimmt. Am Ende des Versuches erfolgten neben der Entnahme von Blutproben auch jene der Herzen und Nieren, welche histologischen Untersuchungen unterzogen wurden.

Die Behandlung mit Riociguat hatte vor allem eine Senkung des systolischen Blutdruckes zur Folge (unbehandelte *versus* behandelte Tiere:  $189 \pm 4,48$  *versus*  $155 \pm 3,34$  mmHg,  $p < 0,001$ ). Des Weiteren fanden sich bei den behandelten Ratten geringere kardiale Folgeschäden. Morphologisch äußerten sich diese in einem signifikant geringeren linksventrikulären Gewicht, einer deutlich verminderten Gefäßwanddicke intramyokardialer Arterien sowie eines trendmäßig kleineren Diameters kardialer Myozyten. Noch bestärkt wird die Annahme der Verbesserung kardialer Folgeschäden bei den behandelten Tieren durch die signifikant geringeren Konzentrationen der natriuretischen Peptide ANP und BNP im Plasma dieser Ratten. Hinsichtlich der Nierenfunktion konnten trendmäßig niedrigere Plasmakonzentrationen von Kreatinin und Harnstoff (CREA:  $p < 0,056$ , UREA:  $p < 0,067$ ) bei den behandelten Tieren gemessen werden. Korrelierend fiel bei diesen Ratten am Versuchsende auch die GFR höher aus ( $p < 0,065$ ) im Vergleich zu den unbehandelten Tieren. Histomorphologisch wiesen die Nieren jener Ratten, die Riociguat über das

Futter verabreicht bekamen, eine deutlich verminderte interstitielle sowie perivaskuläre Fibrose auf. Die Glomerulosklerose blieb hingegen unbeeinflusst.

Zusammenfassend hat in unserem Modell die Stimulation der sGC durch Riociguat eine Verlangsamung der Progression einer chronischen Niereninsuffizienz zur Folge. Des Weiteren bewirkt die Substanz eine deutliche Reduktion des systemischen Blutdruckes und die Verbesserung des kardialen Endorganschadens.



## Literaturverzeichnis

- Abbate, M.; Zoja, C.; Morigi, M. (2002). Transforming growth factor-beta 1 is up-regulated by podocytes in response to excess intrglomerular passage of proteins: a central pathway in progressive glomerulosclerosis. *Am J Pathol*, **161**: 2179-93.
- Adler, A. I.; Stevens, R. J.; Manley, S. E. (2003). Development and progression of nephropathy in type 2 diabetes: the United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS 64). *Kidney Int*, **63**: 225-32.
- Amann, K.; Wiest, G.; Zimmer, G.; Gretz, N.; Ritz, E.; Mall, G. (1992). Reduced capillary density in the myocardium of uremic rats. A stereological study. *Kidney Int*, **42**: 1111-7.
- Amann, K.; Neusüß, R.; Ritz, E.; Irzyniec, T.; Wiest, G.; Mall, G. (1995). Changes of vascular architecture independent of blood pressure in experimental uremia. *Am J Hypertens*, **8**: 409-17.
- Amann, K.; Wiest, G.; Neusüß, R.; Irzyniec, T.; Ritz, E.; Mall, G. (1995). Vascular hypertrophy in uremia is independent of hypertension. *Am J Hypert*, **8**: 409-17.
- Amann, K. (2000). Herz- und Gefäßveränderungen bei chronischer Niereninsuffizienz: strukturelle Ursachen für einen vernachlässigten Risikofaktor. *Journal für Hypertonie*, **4**: 49-60.
- Amann, K.; Tyralla, K.; Gross, M. L. (2003). Cardiomyocyte loss in experimental renal failure: prevention by ramipril. *Kidney Int*, **63**: 1708-13.
- Anderson, S.; Meyer, T. W.; Rennke, H. G. (1985). Control of glomerular hypertension limits glomerular injury in rats with reduced renal mass. *J Clin Invest*, **75**: 612-19.
- Angermann, C. E.; Ertl, G. (2004). Natriuretic peptides – new diagnostic markers in heart disease. *Herz*, **29**: 609-17.
- Ashman, D. F.; Lipton, R.; Melicow, M. M.; Price, T. D. (1963). Isolation of adenosine 3',5' - monophosphate from rat urine. *Biochem Biophys Res Commun*, **11**: 330-4.
- Ballou, D. P.; Zhao, Y.; Brandish, P. E.; Marletta, M. A. (2002). Revisiting the kinetics of nitric oxide (NO) binding to soluble guanylate cyclase: the simple NO-binding model is incorrect. *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**: 12097-101.
- Barenbrock, M.; Spieker, C.; Laske, V.; Heidenreich, S.; Hohage, H.; Bachmann, J.; Hoeks, A. P. G.; Rahn, K. H. (1994). Studies of vessel wall properties in hemodialysis patients. *Kidney Int*, **45**: 1397-400.
- Beavo, J. A. (1995). Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev*, **75**: 725-48.

- Boudet, J. et al. (1978). Experimental chronic renal failure in the rat by electrocoagulation of the renal cortex. *Kidney Int*, **14**: 82-6.
- Brandes, R. P.; Kim, D.; Schmitz-Winnenthal, F. H., Amidi, M.; Godecke, A.; Mulsch, A.; Busse, R. (2000). Increased nitrovasodilator sensitivity in endothelial nitric oxide synthase knockout mice: role of soluble guanylyl cyclase. *Hypertension*, **35**: 231-6.
- Canella, G.; Paoletti, E.; Delfino, E.; Pelosos, G.; Molinari, S.; Traverso, G. B. (1993). Regression of left ventricular hypertrophy in hypertensive dialysed uremic patients on long term anti-hypertensive therapy. *Kidney Int*, **44**: 881-6.
- Cary, S. P.; Marletta, M. A. (2001). The case of CO signalling: why the jury is still out. *J Clin Invest*, **107**: 1071-3.
- Cary, S. P.; Winger, J. A., Marletta, M. A. (2005). Tonic and acute nitric oxide signalling through soluble guanylate cyclase is mediated by nonheme nitric oxide, ATP and GTP. *Proc Natl Acad Sci USA*, **102**: 13064-9.
- Chirkov, Y. Y.; Horowitz, J. D. (2007). Impaired tissue responsiveness to organic nitrates and nitric oxide: a new therapeutic frontier? *Pharmacol Ther*, **116**: 287-305.
- Del Greco, F.; Simon, N. M.; Roguska, J. (1996). Hemodynamic studies in chronic uremia. *Circulation*, **40**: 87-92.
- Denninger, J. W.; Schelvis, J. P.; Brandish, P. E.; Zhao, Y.; Babcock, G. T.; Marletta, M. A. (2000). Interaction of soluble guanylate cyclase with YC-1: kinetic and resonance Raman studies. *Biochemistry*, **39**: 4191-8.
- Dikalov, S.; Fink, B.; Skatchkov, M.; Stalleicken, D.; Bassenge, E. (1998). Formation of reactive oxygen species by pentaerithryltetranitrate and glyceryl trinitrate *in vitro* and development of nitrate tolerance. *J Pharmacol Exp Ther*, **286**: 938-44.
- Dostal, D. E.; Rothblum, K. N.; Chernin, M. I. (1992). Intracardiac detection of angiotensinogen and renin: a localized renin-angiotensin system in neonatal rat heart. *Am J Physiol*, **263**: C838-50.
- Dyadyk, O. I.; Bagniy, A. E.; Yorovaya, N. F. (1999). Disorders of left ventricular structure and function in chronic uremia: how often, why and what to do with it? *Eur J Heart Failure*, **1**: 327-35.
- Dzau, V. J. (1993). The role of mechanical and humoral factors in growth regulation of vascular smooth muscle and cardiac myocytes. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, **2**: 27-32.
- Elfering, S. L.; Sarkela, T. M., Giulivi, C. (2002). Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*, **277**: 38079-86.
- El Nahas, A. M. (1988). Glomerulosclerosis: a form of atherosclerosis. *Nephrology*, **2**: 1206-20.
- El Nahas, A. M. (2003). Plasticity of kidney cells: role in kidney remodelling and scarring. *Kidney Int*, **64**: 1553-63.

- El Nahas, A. M.; Bello, A. K. (2005). Chronic kidney disease: the global challenge. *Lancet*, **365**: 331-340.
- Eriksson, H.; Svardsudd, K.; Larsson, B. (1989). Risk factors for heart failure in the general population: the study of men born in 1913. *Eur Heart J*, **10**: 647-56.
- Evgenov, O. V.; Pacher, P.; Schmidt, P. M.; Hasko, G.; Schmidt, H. H. H. W.; Stasch, J. P. (2006). NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov*, **5** (9): 755-68.
- Fan, M. J.; Ng, Y. Y.; Hill, P. A. (1999). Transforming growth factor-beta regulates tubular epithelial myofibroblast transdifferentiation in vitro. *Kidney Int*, **56**: 1455-67.
- Fassi, A.; Sangalli, F.; Maffi, R. (1998). Progressive glomerular injury in the MWF rat is predicted by inborn nephron deficit. *J Am Soc Nephrol*, **9**: 1399-406.
- Feelisch, M.; Kotsonis, P.; Siebe, J.; Clement, B.; Schmidt, H. H. (1999). The soluble guanylyl cyclase inhibitor 1H-[1,2,4]oxadiazolol[4,3-a]quinoxalin-1-one is a nonselective heme protein inhibitor of nitric oxide synthase and other cytochrome P-450 enzymes involved in nitric oxide donor bioactivation. *Mol pharmacol*, **56**: 243-53.
- Feil, R.; Feil, S.; Hofmann, F. (2005). A heretical view on the role of NO and cGMP in vascular proliferative diseases. *Trends Mol Med*, **11**: 71-5.
- Fernandez, P. A.; Bellamy, T.; Kling, M.; Madge, D. J.; Selwood, D. L. (2001). A convenient route to the soluble guanylate cyclase activator YC-1 and its N<sub>2</sub> reiosomer. *Heterocycles*, **55**: 1813-6.
- Förster, J.; Harteneck, C.; Malkewitz, J.; Schultz, G.; Kösling, D. (1996). A functional heme-binding site of soluble guanylyl cyclase requires intact N-termini of alpha<sub>1</sub> and beta<sub>1</sub> subunits. *Eur J Biochem*, **240**: 380-6.
- Foley, R. N.; Parfrey, P. S.; Harnett, J. D. (1992). Clinical and echocardiographic disease in patients starting end-stage renal disease. *Kidney Int*, **47**: 186-92.
- Foley, R. N.; Parfrey, P. S.; Harnett, J. D.; Kent, G. M.; Murray, D. C.; Barre, P. E. (1995). The prognostic importance of left ventricular geometry in uremic cardiomyopathy. *J Am Soc Nephrol*, **5**: 2024-31.
- Foley, R. N.; Herzog, C. A.; Collins, A. J. (2003). Smoking and cardiovascular outcomes in dialysis patients: the United States Renal Data System Wave 2 study. *Kidney int*, **63**: 1462-67.
- Franco, V.; Oparil, S. (2006). Is there a new treatment for hypertensive disease in the horizon? Role of soluble guanylate cyclase. *Hypertension*, **48**: 822-3.
- Frey, R.; Mück, W.; Unger, S.; Artmeier-Brandt, U.; Weimann, G.; Wensing, G. (2007). Riociguat, an oral soluble guanylate cyclase stimulator, has a favourable safety profile and decreases peripheral vascular resistance in healthy male volunteers. *BMC Pharmacol*, **7** (Suppl 1): P20.

- Frey, R.; Mück, W.; Unger, S.; Artmeier-Brandt, U.; Weimann, G.; Wensing, G. (2008). Single-dose pharmacokinetics, tolerability and safety of the soluble guanylate cyclase stimulator Riociguat; an ascending-dose study in healthy male volunteers. *J Clin Pharmacol*, **48**: 926-34.
- Friebe, A.; Schultz, G.; Kösling, D. (1996). Sensitizing soluble guanylyl cyclase to become a highly CO-sensitive enzyme. *EMBO J*, **15**: 6863-8.
- Friebe, A.; Wedel, B.; Harteneck, C.; Foerster, J.; Schultz, G.; Kösling, D. (1997). Functions of conserved cysteines of soluble guanylyl cyclase. *Biochemistry*, **36**: 1194-8.
- Friebe, A.; Kösling, D. (1998). Mechanism of YC-1-induced activation of soluble guanylyl cyclase. *Mol Pharmacol*, **53**: 123-7.
- Friebe, A.; Russwurm, M.; Mergia, E.; Koesling, D. (1999). A point-mutated guanylyl cyclase with features of the YC-1-stimulated enzyme: implications for the YC-1 binding site? *Biochemistry*, **38**: 15253-7.
- Furchgott, R. F.; Zawadzki, J. V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, **288**: 373-6.
- Gaede, P.; Vedel, P.; Larsen, N. (2003). Multifactorial intervention and cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes. *N Engl Med*, **348**: 383-93.
- Gambaryan, S. (2004). Potent inhibition of human platelets by cGMP analogs independent of cGMP-dependent protein kinase. *Blood*, **103**: 2593-600.
- Ghafourifar, P.; Richter, C. (1997). Nitric oxide synthase activity in mitochondria. *FEBS Lett.*, **418**: 291-6.
- Ghofrani, H. A.; Weimann, G.; Frey, R.; Voswinckel, R.; Thamm, M.; Bölkow, D.; Weissmann, N.; Mück, W.; Unger, S.; Wensing, G.; Schermuly, R. T.; Grimminger, F. (2007). Riociguat, an oral soluble guanylate cyclase stimulator, has a favourable safety profile, improves cardiopulmonary haemodynamics and has therapeutic potential in pulmonary hypertension. *BMC Pharmacol*, **7** (Suppl 1): S8.
- Goldberg, N. D.; Dietz, S. B.; O'Toole, A. G. (1969). Cyclic guanosine 3',5' -monophosphate in mammalian tissues and urines. *J Biol Chem*, **244**: 4458-66.
- Gretz, N.; Waldherr, R.; Strauch, M. (1993). The remnant kidney model. In: Gretz, N.; Strauch, M., Eds. *Experimental and Genetic Rat Models of Chronic Renal Failure*. Basel: Karger: 1-28.
- Gretz, N. (1995). The development of hypertension in the remnant kidney model after either pole resection or partial infarction of the kidney. *J Am Soc Nephrol [Letter]*, **5**: 1839-40.
- Griffin, K. A.; Picken, M.; Bidani, A. K. (1994). Method of renal reduction is a critical modular of subsequent hypertension and glomerular injury. *J Am Soc Nephrol*, **4**: 2023-31.

- Grimminger, F.; Weimann, G.; Frey, R.; Voswinckel, R.; Thamm, M.; Bölkow, D.; Weissmann, N.; Mück, W.; Unger, S.; Wensing, G.; Schermuly, R. T.; Ghofrani, H. A. (2009). First acute haemodynamic Study of soluble guanylate cyclase stimulator riociguat in pulmonary hypertension. *Eur Respir J*, doi: 10.1183/09031936.00039808.
- Grond, J. (1986). Analysis of renal structural and functional features in two rat strains with a different susceptibility to glomerular sclerosis. *Lab Invest*, **54**: 77-83.
- Grossmann, W. (1980). Cardiac hypertrophy: Useful adaptation or pathological process? *Am J Med*, **69**: 576-84.
- Haffner, D.; Hocher, B.; Müller, D.; Simon, K.; König, K.; Richter, C. M.; Eggert, B.; Schwarz, J.; Godes, M.; Nissel, R.; Querfeld, U. (2005). Systemic cardiovascular disease in uremic rats induced by 1,25(OH)2D3. *J Hypertens*, **23**: 1067-75.
- Hare, J. M.; Stamler, J. S. (2005). NO/redox disequilibrium in the failing heart and cardiovascular system. *J Clin Invest*, **115**: 509-17.
- Harrison, D. G.; Cai, H.; Landmesser, U.; Griendling, K. K. (2003). Interactions of angiotensin II with NAD(P)H oxidase, oxidant stress and cardiovascular disease. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, **4**: 51-61.
- Hilgers, K. F.; Dotsch, J.; Rascher, W.; Mann, J. F. (2004). Treatment strategies in patients with chronic renal disease: ACE inhibitors, angiotensin receptor antagonists, or both? *Pediatr Nephrol*, **19**: 956-61.
- Himmelfarb, J.; Stenvinkel, P.; Ikizler, T. A.; Hakim, R. M. (2002). The elephant in uremia: oxidant stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia. *Kidney Int*, **62**: 1524-38.
- Ho, K. K.; Anderson, K. M.; Kannel, W. B. (1993). Survival after onset of congestive heart failure in Framingham Heart Study Subjects. *Circulation*, **88**: 107-15.
- Hobbs, A.J. (2000). Soluble Guanylate Cyclase. *Emerg Therap Targets*, **4**: 735-49.
- Hocher, B.; Ziebig, R.; Krause, R.; Asmus, G.; Neumayer, H. H.; Liefeldt, L.; Stasch, J. P. (2004). Relaxin is an independent risk factor predicting death in male patients with end-stage kidney disease. *Circulation*, **109**: 2266-8.
- Hoenicke, M.; Becker, E. M.; Apeler, H.; Sirichoke, T.; Schroder, H.; Gerzer, R.; Stasch, J. P. (1999). Purified soluble guanylyl cyclase expressed in a baculovirus/Sf9 system: stimulation by YC-1, nitric oxide, and carbon monoxide. *J Mol Med*, **77**: 14-23.
- Hoffmüller, U.; Russwurm, M.; Kleinjung, F.; Ashurst, J.; Oschkinat, H.; Volkmer-Engmert, R.; Kösling, D.; Schneider-Mergener, J. (1999). Interaction of a PDZ protein domain with a synthetic library of all human protein C termini. *Angew Chem Int Ed Engl*, **38**: 2000-4.
- Hofmann, F.; Feil, R.; Kleppisch, T.; Schlossmann, J. (2006). Function of cGMP-dependent protein kinases as revealed by gene deletion. *Physiol Rev*, **86**: 1-23.

- Hohenstein, B.; Daniel, C.; Wagner, A.; Stasch, J. P.; Hugo, C. (2005). Stimulation of soluble guanylyl cyclase inhibits mesangial cell proliferation and matrix accumulation in experimental glomerulonephritis. *Am J Physiol Renal Physiol*, **288**: F685-93.
- Hüting, J.; Kramer, W.; Schütterle, G.; Wizemann, V. (1988). Analysis of left ventricular changes associated with chronic hemodialysis. *Nephron*, **49**: 284-90.
- Humbert, P.; Niroomand, F.; Fischer, G.; Mayer, B.; Kösling, D.; Hinsch, K. D.; Gausepohl, H.; Frank, R.; Schultz, G.; Böhme, E. (1990). Purification of soluble guanylyl cyclase from bovine lung by a new immunoaffinity chromatographic method. *Eur J Biochem*, **190**: 273-8.
- Hwang, T. L.; Wu, C. C.; Teng, C. M. (1998). Comparison of two soluble guanylyl cyclase inhibitors, methylene blue and ODQ, on sodium nitroprusside-induced relaxation in guinea-pig trachea. *Br J Pharmacol*, **125**: 1158-63.
- Ignarro, L. J.; Wood, K. S.; Wolin, M. S. (1982). Activation of purified soluble guanylate cyclase by protoporphyrin IX. *Proc Natl Acad Sci USA*, **79**: 2870-3.
- Ignarro, L. J.; Ballot, B.; Wood, K. S. (1984). Regulation of soluble guanylate cyclase activity by porphyrins and metalloporphyrins. *J Biol Chem*, **259**: 6201-7.
- Ignarro, L. J.; Adams, J. B.; Horwitz, P. M.; Wood, K. S. (1986). Activation of soluble guanylate cyclase by NO-hemoproteins involves NO-heme exchange. Comparison of heme-containing and heme-deficient enzyme forms. *J Biol Chem*, **261**: 4997-5002.
- Ignarro, L. J.; Buga, G. M.; Wood, K. S.; Byrns, R. E.; Chaudhuri, G. (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA*, **84**: 9265-9.
- Iseki, K.; Ikemiya Y.; Iseki, C.; Takishita, S. (2003). Proteinuria and the risk of developing end stage renal disease. *Kidney Int*, **63**: 1468-73.
- Iwano, M.; Neilson, E. G. (2004). Mechanism of tubulointerstitial fibrosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, **13**: 279-84.
- Jafar, T. H.; Stark, P. C.; Schmid, C. H. (2003). Progression of chronic kidney disease: the role of blood pressure control, proteinuria, and angiotensin-converting enzyme inhibition; a patient level metaanalysis. *Ann Intern Med*, **139**: 244-52.
- Johnson, R. J. (1994). The glomerular response to injury: progression or resolution? *Kidney Int*, **45**: 1769-82.
- Kagota, S.; Yamaguchi, Y.; Tanaka, N.; Kubota, Y.; Kobayashi, K.; Nejime, N.; Nakamura, K.; Kunitomo, M.; Shinozuka, K. (2006). Disturbances in nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate system in SHR/NDmcr-cp rats, a model of metabolic syndrome. *Life Sci*, **78**: 1187-96.
- Kakinuma, Y.; Kawamura, T.; Bills, T.; Yoshioka, T.; Ichikawa, I.; Fogo, A. (1992). Blood pressure-independent effect of angiotensin inhibition on vascular lesions of chronic renal failure. *Kidney Int*, **42**: 46-55.

- Kalk, P. et al. (2006). NO-independent activation of soluble guanylate cyclase prevents disease progression in rats with 5/6 nephrectomy. *Br J Pharmacol*, **148**: 853-9.
- Kannan, M. S.; Johnson, D. E. (1995). Modulation of nitric oxide-dependent relaxation of pig tracheal smooth muscle by inhibitors of guanylyl cyclase and calcium activated potassium channels. *Life Sci*, **56**: 2229-38.
- Keane, W. F.; Kasiske, B. L.; O'Donnell, M. P. (1991). The role of altered lipid metabolism in the progression of renal disease: experimental evidence. *Am J Kidney Dis*, **17** (suppl 1): 38-42.
- Kennedy, D.; Omran, E.; Periyasamy, S. M. (2003). Effect of chronic renal failure on cardiac contractile function, calcium cycling, and gene expression of proteins important for calcium homeostasis in the rat. *J Am Soc Nephrol*, **14**: 90-7.
- King, H.; Aubert, R. E.; Herman, W. H. (1998). Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care*, **21**: 1414-31.
- Klag, M. J.; Whelton, P. K.; Perneger, T. V. (1996). Analgesics and chronic renal disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, **5**: 236-41.
- Klahr, S.; Levey A. S.; Beck, G. J. et al. (1994). The effects of dietary protein restriction and blood-pressure control on the progression of chronic renal failure. *N Engl J Med*, **330**: 877-84.
- Kleinknecht, C.; Laouari, D.; Burtin, M. (1988). Uremic rat model: experience with young rats. *Contrib Nephrol*, **60**: 27-38.
- Kloss, S.; Bouloumie, A.; Mulsch, A. (2000). Aging and chronic hypertension decrease expression of rat aortic soluble guanylyl cyclase. *Hypertension*, **35**: 43-7.
- Ko, F. N.; Wu, C. C.; Kuo, S. C.; Lee, F. Y.; Teng, C. M. (1994). YC-1, a novel activator of platelet guanylate cyclase. *Blood*, **84**: 4226-33.
- Koglin, M.; Behrends, S. (2003). A functional domain of the  $\alpha_1$  subunit of soluble guanylyl cyclase is necessary for activation of the enzyme by nitric oxide and YC-1 but is not involved in heme binding. *J Biol Chem*, **278**: 12590-7.
- Kojda, G.; Kottenberg, K.; Hacker, A.; Noack, E. (1998). Alterations of the vascular and the myocardial guanylate cyclase/cGMP-system induced by long-term hypertension in rats. *Pharm Acta Helv*, **73**: 27-35.
- Laouari, D. et al. (1982). Importance of proteins in the deterioration of the remnant kidneys, independently of other nutrients. *Int J Pediatr Nephrol*, **3**: 263-9.
- Lee, F. Y. et al. (2001). Synthesis of 1-benzyl-3-[5'-hydroxymethyl-2'-furyl]indazole analogues as novel antiplatelet agents. *J Med Chem*, **44**: 3746-9.
- Levin, A. et al. (1996). Prevalent left ventricular hypertrophy in the predialysis population: identifying opportunities for intervention. *Am J Kidney Dis*, **27**: 347-54.

- Levin, A.; Thompson, C. R.; Ethier, J. (1999). Left ventricular mass index increase in early renal disease: Impact of decline in hemoglobine. *Am J Kidney Dis*, **34**: 125-34.
- Li, Y. (2003). A stimualtory role for cGMP-dependent ptoein kinase in platelet activation. *Cell*, **112**: 77-86.
- Li, Y. (2006). Mitochondrial aldehyde dehydrogenase-2 (ALDH2) Glu504Lys polymorphism contributes to the variation in efficacy of sublingual nitroglycerin. *J Clin Invest*, **116**: 506-11.
- London, G. M.; Marchais, S. J.; Safar, M. E.; Genest, A. F.; Guerin, A. P.; Metivier, F.; Chedid, K.; London, A. M. (1990). Aortic and large artery compliance in end-stage renal failure. *Kidney Int*, **37**: 137-42.
- London, G. M.; Guerin, A. P.; Marchais, S. J. (1994). Pathophysiology of left ventricular hypertrophy in dialysis patients. *Blood Purif*, **12**: 277-83.
- London, G. M.; Parfrey, P. S. (1997). Cardiac disease in chronic uremia: pathogenesis. *Adv Ren Replace Ther*, **4**: 194-211.
- London, G. M. (2002). Left ventricular alterations and end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant*, **17 Suppl**: 29-36.
- Lucas, K. A.; Pitari, G. M.; Kazerounian, S.; Ruiz-Stewart, I.; Park, J.; Schulz, S.; Chepenik, K. P.; Waldman, S. A. (2000). Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev*, **52**: 375-414.
- Luchsinger, B. P.; Rich, E. N.; Gow, A. J.; Williams, E. M.; Stamler, J. S.; Singel, D. J. (2003). Routes to S-nitroso-hemoglobin formation with heme redox and preferential reactivity in the beta subunits. *Proc Natl Acad Sci USA*, **100**: 461-6.
- Lyer, L. M.; Anantharaman, V.; Aravind, L. (2003). Ancient conserved domains shared by animal soluble guanylyl cyclases and bacterial signalling proteins. *BMC Genomics*, **4**: 5.
- Lysaght, M. J. (2002). Maintenance dialysis population dynamics: current trends and long-term implications. *J Am Soc Nephrol*, **13**: 37-40.
- Mall, G.; Huther, W.; Schneider, J.; Lundin, P.; Ritz, E. (1990). Diffuse intermyocardiocytic fibrosis in uraemic patients. *Nephrol Dial Transplant*, **5**: 39-44.
- Mann, D. L.; Kent, R. L.; Cooper, G. (1989). Load regulation of the propertiese of feline cardiocytes: growth induction by cellular deformation. *Circ Res*, **64**: 1079-90.
- Martin, E.; Lee, Y. C.; Murad, F. (2001). YC-1 activation of human soluble guanylyl cyclase has both heme-dependent and heme-independent components. *Proc Natl Acad Sci USA*, **98**: 12938-42.
- Mayer, B; Andrew, P. (1998). Nitric oxide synthases: catalytic function and progress towards selective inhibition. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, **358**: 127-33.



- Mayer, B.; Brunner, F.; Schmidt, K. (1993). Novel actions of methylene blue. *Eur Heart J*, **14** (Suppl. 1): 22-6.
- Mayer, B.; Koesling, D. (2001). cGMP signalling beyond nitric oxide. *Trends Pharmacol Sci*, **22**: 546-8.
- Melichar, V. O. (2004). Reduced cGMP signaling associated with neointimal proliferation and vascular dysfunction in late-stage atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, **101**: 16671-6.
- Mergia, E.; Russwurm, M.; Zoidl, G.; Kösling, D. (2003). Major occurrence of the new  $\alpha_2\beta_1$  isoform of NO-sensitive guanylyl cyclase in brain. *Cell Signal*, **15**: 189-95.
- Meyer, T. W.; Rennke, H. G. (1988). Progressive glomerular injury after limited renal infraction in the rat. *Am J Physiol*, **254**: F854-62.
- Miller, L. N.; Nakane, M.; Hsieh, G. C.; Chang, R.; Kolasa, T.; Moreland, R. B.; Brioni, J. D. (2003). A-350619: a novel activator of soluble guanylyl cyclase. *Life Sci*, **72**: 1015-25.
- Morawietz, H.; Weber, M.; Rueckschloss, U.; Lauer, N.; Hacker, A.; Kojda, G. (2001). Upregulation of vascular NAD(P)H oxidase subunit gp91phox and impairment of the nitric oxide signal transduction pathway in hypertension. *Biochem Biophys Res Commun*, **285**: 1130-5.
- Morlans, M.; Laporte, J. R.; Vidal, X. (1990). End-stage renal disease and non-narcotic analgesics: a case-control study. *Br J Clin Pharmacol*, **30**: 717-23.
- Mulsch, A. et al. (1997). Effect of YC-1, an NO-independent, superoxide-sensitive stimulator of soluble guanylyl cyclase, on smooth muscle responsiveness to nitrovasodilators. *Br J Pharmacol*, **120**: 681-9.
- Munzel, T.; Daiber, A.; Mulsch, A. (2005). Explaining the phenomenon of nitrate tolerance. *Circ Res*, **97**: 618-28.
- Nakane, M. (2003). Soluble guanylyl cyclase: physiological role as an NO receptor and the potential molecular target for therapeutic application. *Clin Chem Lab Med*, **41**: 865-70.
- Nakane, M.; Kolasa, T.; Chang, R.; Miller, L. N.; Moreland, R. B.; Brioni, J. D. (2006). Acrylamide analog as a novel nitric oxide-independent soluble guanylyl cyclase activator. *J Pharmacol Sci*, **102**: 231-8.
- Nathan, C. (1992). Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB*, **6**: 3051-64.
- Nathan, S.; Pepine, C. J.; Bakris, G. L. (2005). Calcium antagonists: effects on cardio-renal risk in hypertensive patients. *Hypertension*, **46**: 637-42.
- Nioche, P. (2004). Femtomolar sensitivity of a NO sensor from *Clostridium botulinum*. *Science*, **306**: 1550-3.
- Nisoli, E.; Clementi, E.; Paolucci, C.; Cozzi, V.; Tonello, C.; Sciorati, C.; Bracale, R.; Valerio, A.; Francolini, M.; Moncada, S.; Carruba, M. O. (2003). Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science*, **299**: 896-9.

- Ots, M.; Mackenzie, H. S.; Troy, J. L. (1998). Effects of combination therapy with enalapril and losartan on the rate of progression of renal injury in rats with 5/6 renal mass ablation. *J Am Soc Nephrol*, **9**: 224-30.
- Pacher, P.; Schulz, R.; Liaudet, L.; Szabo, C. (2005). Nitrosative stress and pharmacological modulation of heart failure. *Trends Pharmacol Sci*, **26**: 302-10.
- Palmer, R. M.; Ferrige, A. G.; Moncada, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, **327**: 524-6.
- Pellicena, P.; Karow, D. S.; Boon, E. M.; Marletta, M. A.; Kuriyan, J. (2004). Crystal structure of an oxygen-binding heme domain related to soluble guanylate cyclases. *Proc Natl Acad Sci USA*, **101**: 12854-9.
- Perneger, T. V.; Whelton, P. K.; Klag, M. J. (1994). Risk of kidney failure associated with the use of acetaminophen, aspirin and nonsteroidal antiinflammatory drugs. *N Engl J Med*, **331**: 1675-79.
- Peters, H. et al. (2004). Expression and activity of soluble guanylate cyclase in injury and repair of anti-thy1 glomerulonephritis. *Kidney Int*, **66**: 2224-36.
- Peters, H. et al. (2003). NO mediates antifibrotic actions of L-arginine supplementation following induction of anti-thy1 glomerulonephritis. *Kidney Int*, **64**: 509-18.
- Pirola, C. J.; Wang, H.; Kamyar, A.; Wu, S.; Enomoto, H.; Sharifi, B.; Forrester, J. S.; Clemens, T. L.; Fagin, J. A. (1993). Angiotensin II regulates parathyroid hormone-related protein expression in cultured rat aortic smooth muscle cells through transcriptional and posttranslational mechanism. *J Biol Chem*, **268**: 1987-94.
- Purkerson, M. L.; Hoffsten, P. E.; Klahr, S. (1976). Pathogenesis of glomerulopathy associated with renal infraction in rats. *Kidney Int*, **9**: 407-417.
- Okano, K.; Pirola, C. J.; Wang, H. M.; Forrester, J. S.; Fagin, J. A.; Clemens, T. L. Involvement of cell cycle and mitogen-activated pathways in induction of parathyroid hormone-related protein gene expression in rat aortic smooth muscle cells. *Endocrinology*, **136**: 1782-9.
- Olesen, S. P. et al (1998). Characterization of NS 2028 as a specific inhibitor of soluble guanylyl cyclase. *Br J Pharmacol*, **123**: 299-309.
- Rambašek, M.; Ritz, E.; Mall, G. (1985). Myocardial hypertrophy in rats with renal insufficiency. *Kidney Int*, **28**: 775-87.
- Remuzzi, G.; Bertani, T. (1998). Pathophysiology of progressive nephropathies. *N. Engl. Med.*, **339**: 1448-56.
- Remuzzi, G.; Ruggenenti, P.; Perico, N. (2002). Chronic renal diseases: renoprotective benefits of renin-angiotensin system inhibition. *Ann Intern Med*, **136**: 604-15.

- Rennke, H. G.; Anderson, S.; Brenner, B. M. (1989). Structural and functional correlations in the progression of renal disease. In: Tisher, C. C.; Brenner, B. M. Renal Pathology. Philadelphia: Lippincott: 43-66.
- Ritz, E. et al. (1978). Protein restriction in the conservative management of uremia. *Am J Clin Nutr*, **31**: 1703-11.
- Roczniak, A.; Fryer, J. N.; Levine, D. Z.; Burns, K. D. (1999). Downregulation of neuronal nitric oxide synthase in the rat remnant kidney. *J Am Soc Nephrol*, **10**: 704-13.
- Rodriguez-Iturbe, B.; Ferrebuz, A.; Vanegas, V.; Quiroz, Y.; Espinoza, F.; Pons, H.; Vaziri, N. D. (2005). Early treatment with cGMP phosphodiesterase inhibitor ameliorates progression of renal damage. *Kidney Int*, **68**: 2131-42.
- Ruetten, H.; Zabel, U.; Linz, W.; Schmidt, H. H. (1999). Downregulation of soluble guanylyl cyclase in young and aging spontaneously hypertensive rats. *Circ Res*, **85**: 534-41.
- Russwurm, M.; Koesling, D. (2004). NO activation of guanylyl cyclase. *EMBO J*, **23**: 4443-50.
- Russwurm, M.; Wittau, N.; Kösling, D. (2001). Guanylyl cyclase/PSD-95 interaction: targeting of the nitric oxide-sensitive  $\alpha_2\beta_1$  guanylyl cyclase to synaptic membranes. *J Biol Chem*, **276**: 44647-52.
- Sadoshima, J.; Xu, Y.; Slayter, H. S. (1993). Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. *Cell*, **75**: 977-84.
- Sappino, A. P.; Schurch, W.; Gabbiani, G. (1990). Differentiation repertoire of fibroblastic cells: Expression of cytoskeletal proteins as marker of phenotypic modulations. *Lab Invest*, **63**: 144-61.
- Schermully, R. T.; Stasch, J. P.; Pullamsetti, S. S.; Middendorff, R.; Mueller, H. D.; Schlüter, K. D.; Dingendorf, A.; Kolosionek, E.; Kaulen, C.; Dumitrascu, R.; Weissmann, N.; Mittendorf, J.; Klepetko, W.; Seeger, W.; Ghofrani, H. A.; Grimminger, F. (2008). Expression and function of soluble guanylate cyclase in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*, **32**: 881-91.
- Schiepatti, A.; Remuzzi, G. (2003). Proteinuria and its consequences in renal disease. *Acta Paediatr Suppl*, **92**: 9-13.
- Schiffer, M.; Bitzer, M.; Roberts, I. S. D. (2001). Apoptosis in podocytes induced by TGF- $\beta$  and Smad7. *J Clin Invest*, **108**: 807-16.
- Schmidt, H. H. H. W.; Walter, U. (1994). NO at work. *Cell*, **78**: 919-25.
- Schmidt, P. M.; Schramm, M.; Schroder, H.; Wunder, F.; Stasch, J. P. (2004). Identification of residues crucially involved in the binding of the heme moiety of soluble guanylate cyclase. *J Biol Chem*, **279**: 3025-32.

- Schmidt, P. M.; Rothkegel, C.; Wunder, F.; Schroder, H.; Stasch, J. P. (2005). Residues stabilizing the heme moiety of the nitric oxide sensor soluble guanylate cyclase. *Eur J Pharmacol*, **513**: 67-74.
- Schmidt, R. J.; Baylis, C. (2000). Total nitric oxide production is low in patients with chronic renal disease. *Kidney Int*, **58**: 1261-6.
- Schrammel, A.; Behrends, S.; Schmidt, K.; Koesling, D.; Mayer, B. (1996). Characterization of 1H-[1,2,4]oxadiazolol[4,3-a]quinoxalin-1-one as a heme-site inhibitor of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Mol Pharmacol*, **50**: 1-5.
- Schreiber, S. S.; Oratz, C. E.; Evan, I. (1970). Myosin, myoglobin and collagen synthesis in acute cardiac overload. *Am J Physiol*, **219**: 481-6.
- Schwarz, U. R.; Walter, U.; Eigenthaler, M. (2001). Taming platelets with cyclic nucleotides. *Biochem Pharmacol*, **62**: 1153-61.
- Selwood, D. L. et al. (2001). Synthesis and biological evaluation of novel pyrazoles and indazoles as activators of the nitric oxide receptor, soluble guanylate cyclase. *J Med Chem*, **44**: 78-93.
- Shimamura, T.; Morrison, A. B. (1975). A progressive glomerulosclerosis occurring in partial five-sixths nephrectomized rats. *Am J Pathol*, **79**: 95-106.
- Silberberg, J. S.; Barre, P. E.; Prichard, S. S.; Sniderman, A. D. (1989). Impact of left ventricular hypertrophy on survival in end-stage renal disease. *Kidney Int.*, **36**: 286-90.
- Silberberg, J. S.; Rahal, D. P.; Patton, D. R.; Sniderman, A. D. (1989). Role of anaemia in the pathogenesis of left ventricular hypertrophy in end-stage renal disease. *Am J Cardiol*, **64**: 222-4.
- Silver, M. A.; Maisel, A.; Yancy, C. W.; McCullough, P. A.; Burnett, J. R.; Francis, G. S.; Mehra, M. R.; Peacock, W. F.; Fonarow, G.; Gibler, W. B.; Morrow, D. A.; Hollander, J. (2004). BNP Consensus Panel 2004: a clinical approach for the diagnostic, prognostic, screening, treatment monitoring, and therapeutic roles of natriuretic peptides in cardiovascular diseases. *Congest Heart Fail*, **10**: 1-30.
- Sindhu, R. K.; Ehdaie, A.; Varizi, N. D.; Roberts, C. K. (2004). Effects of chronic renal failure on caveolin-1, guanylate cyclase and AKT protein expression. *Biochem Biophys Acta*, **1690**: 231-7.
- Sinnaeve, P. (2001). Soluble guanylate cyclase  $\alpha_1$  and  $\beta_1$  gene transfer increases NO responsiveness and reduces neointima formation after balloon injury in rats via antiproliferative and antimigratory effects. *Circ Res*, **88**: 103-9.
- Stasch, J. P.; Becker, E. M.; Alonso-Alija, C.; Apeler, H.; Dembrowsky, K.; Feurer, A.; Gerzer, R.; Minuth, T.; Perzbon, E.; Pleiss, U.; Schroder, W.; Stahl, E.; Steinke, W.; Straub, A.; Schramm, M. (2001). NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase. *Nature*, **410**: 212-5.

- Stasch, J. P.; Alonso-Alija, C.; Apeler, H.; Dembowski, K.; Feurer, A.; Minuth, T.; Perzborn, E.; Schramm, M.; Straub, A. (2002a). Pharmacological actions of a novel NO-independent guanylyl cyclase stimulator, BAY 41-8543: in vitro studies. *Br J Pharmacol*, **135**: 333-43.
- Stasch, J. P.; Dembowski, K.; Perzborn, E.; Stahl, E.; Schramm, M. (2002b). Cardiovascular actions of a novel NO-independent guanylyl cyclase stimulator, BAY 41-8543: in vivo studies. *Br J Pharmacol*, **135**: 344-55.
- Stasch, J. P.; Schmidt, P.; Alonso-Alija, C.; Apeler, H.; Dembowski, K.; Haerter, M.; Heil, M.; Minuth, T.; Perzborn, E.; Pleiss, U.; Schramm, M.; Schroeder, W.; Schroder, H.; Stahl, E.; Steinke, W.; Wunder, F. (2002c). NO- and haem-independent activation of soluble guanylyl cyclase: molecular basis and cardiovascular implications of a new pharmacological principle. *Br J Pharmacol*, **136**: 773-783.
- Stasch, J. P., et al. (2006). Targeting the heme-oxidized nitric oxide receptor for selective vasodilatation of diseased blood vessels. *J Clin Invest*, **116**: 2552-61.
- Stasch, J. P.; Hobbs, A. J. (2009). No-independent, haem-dependent soluble guanylate cyclase stimulators. *Handb Exp Pharmacol*, **191**: 277-308.
- Stone, J. R.; Marletta, M. A. (1995). The ferrous heme of soluble guanylate cyclase: formation of hexacoordinate complexes with carbon monoxide and nitrosomethane. *Biochemistry*, **34**: 16397-403.
- Stone, J. R.; Marletta, M. A. (1996). Spectral and kinetic studies on the activation of soluble guanylate cyclase by nitric oxide. *Biochemistry*, **35**: 1093-9.
- Straub, A. et al. (2001). NO-independent stimulators of soluble guanylate cyclase. *Bioorg Med Chem Lett*, **11**: 781-4.
- Strauch, M.; Gretz, N. (1988). Animal models to induce renal failure: a historical survey. *Contrib Nephrol*, **60**: 1-8.
- Sunahara, R. K.; Beuve, A.; Tesmer, J. J.; Sprang, S. R.; Garbers, D. L.; Gilman, A. G. (1998). Exchange of substrate and inhibitor specificities between adenylyl and guanylyl cyclases. *J Biol Chem*, **273**: 16332-8.
- Takami, Y.; Horio, T.; Iwashima, Y.; Takiuchi, S.; Kamide, K.; Yoshihara, F.; Nakamura, S.; Nakahama, H.; Inenaga, T.; Kangawa, K.; Kawano, Y. (2004). Diagnostic and prognostic value of plasma brain natriuretic peptide in non-dialysis-dependent CRF. *Am J Kidney Dis*, **44**: 420-8.
- Tesmer, J. J.; Sunahara, R. K.; Gilman, A. G., Sprang, S. R. (1997). Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with Gs $\alpha$ -GTP $\gamma$ S. *Science*, **278**: 1907-16.
- Tesmer, J. J.; Sprang, S. R. (1998). Structure, catalytic mechanism and regulation of adenylyl cyclase. *Curr Opin Struct Biol*, **8**: 713-9.

- The Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) Research Group (1995). Effect of intensive therapy on the development and progression of diabetic nephropathy in the DCCT. *Kidney Int*, **47**: 1703-20
- The Renal Association. UK Renal Registry. The Sixth annual report. Available at: [www.renalreg.com/home.htm](http://www.renalreg.com/home.htm) (accessed Dec 22, 2004).
- Törnig, J.; Amann, K.; Ritz, E.; Nichols, C.; Zeier, M.; Mall, G. (1996). Arteriolar wall thickening, capillary rarefaction and interstitial fibrosis in the heart of rats with renal failure: the effects of ramipril, nifedipine and moxonidine. *J Am Soc Nephrol*, **7**: 667-75.
- Törnig, J.; Gross, M. L.; Simonaviciene, A.; Mall, G.; Ritz, E.; Amann, K. (1999). Hypertrophy of intramyocardial arteriolar smooth muscle cells in experimental renal failure. *J Am Soc Nephrol*, **10**: 77-83.
- United Kingdom Prospective Diabetes Study Group (1998). Tight blood pressure control and risk of makrovaskular and mikrovaskular complications in type 2 diabetes (UKPDS 38). *BMJ*, **317**: 703-13.
- United States Renal Data System. Annual data report (2003). Incidence and prevalence of ESRD. *Am J Kidney Dis* 2003, **42** (suppl 5): S37-173.
- United States Renal Data System. Annual Data Report (2004). Atlas of End-Stage Renal Disease in the United States, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD.
- Urena, P.; Kubrusly, M.; Mannstadt, M.; Hruby, M.; Trinh, M. M.; Silve, C.; Lacour, B.; Abou-Samra, A. B.; Segre, G. V.; Drueke, T. (1994). The renal PTH/PTHrp receptor is down regulated in rats with chronic renal failure. *Kidney Int*, **45**: 605-11.
- Vallance, P.; Leone, A.; Calver, A.; Collier, J.; Moncada, S. (1992). Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet*, **339**: 572-5.
- Varizi, N. D.; Ni, Z.; Wang, X. Q.; Ovesi, F.; Zhou, X. J. (1998). Downregulation of nitric oxide synthase in chronic renal insufficiency: role of excess PTH. *Am J Physiol*, **274**: F642-9.
- Varizi, N. D.; Ni, Z.; Oveysi, F.; Liang, K.; Pandian, R. (2002). Enhanced nitric oxide inactivation and protein nitration by reactive oxygen species in renal insufficiency. *Hypertension*, **39**: 135-41.
- Varizi, N. D. (2004a). Oxidative stress in uremia: nature, mechanisms, and potential consequences. *Semin Nephrol*, **24**: 469-73.
- Varizi, N. D. (2004b). Roles of oxidative stress and antioxidant therapy in chronic kidney disease and hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, **13**: 93-9.
- Wald, N. J.; Law, M. R. (2003). A strategy to reduce cardiovascular disease by more than 80%. *BMJ*, **326**: 1419-22.

- Waldherr, R.; Gretz, N. (1988). Natural course of the development of histological lesions after 5/6 nephrectomy. *Contrib Nephrol*, **60**: 64-72.
- Wang, Y. et al. (2005). Stimulation of soluble guanylate cyclase slows progression in anti-thy1-induced chronic glomerulosclerosis. *Kidney Int*, **68**: 47-61.
- Wang, Y. et al. (2006). Enhancing cGMP in experimental progressive renal fibrosis: soluble guanylate cyclase stimulation vs. phosphodiesterase inhibition. *Am J Physiol Renal Physiol*, **290**: F167-76.
- Weber, K. T.; Sun, Y.; Tyagi, S. C.; Cleutjens, J. P. (1994). Collagen network of the myocardium: function, structural remodeling and regulatory mechanisms. *J Mol Cell Cardiol*, **26**: 279-92.
- Weber, K. T., et al. (1995). Connective tissue and repair in the heart. Potential regulatory mechanism. *Ann N Y Acad Sci*, **752**: 286-99.
- Wedel, B. (1994). Mutation of His-105 in the  $\beta_1$  subunit yields a nitric oxide-insensitive form of soluble guanylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA*, **91**: 2592-6.
- Winger, J. A.; Marletta, M. A. (2005). Expression and characterization of the catalytic domains of soluble guanylate cyclase: interaction with the heme domain. *Biochemistry*, **44**: 4083-90.
- Wolfgruber, W. (2003). A proatherogenic role for cGMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, **100**: 13519-24.
- Zabel, U.; Weeger, M.; La, M.; Schmidt, H. H. H. W. (1998). Human soluble guanylate cyclase: functional expression and revised isoenzyme family. *Biochem J*, **335**: 51-7.
- Zabel, U.; Hausler, C.; Weeger, M.; Schmidt, H. H. H. W. (1999). Homodimerization of soluble guanyl cyclase subunits. Dimerization analysis using a glutathione s-transferase affinity tag. *J Biol Chem*, **274**: 18149-52.
- Zeisberg, M.; Strutz, F.; Müller, G. A. (2000). Renal fibrosis: an update. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, **10**: 315-20.
- Zhang, H. Q.; Zhiren, X.; Teodozyj, K.; Dinges, J. (2003). A concise synthesis of ortho-substituted aryl-acrylamide-potent activators of soluble guanylyl cyclase. *Tetrahedron Lett*, **44**: 8661-3.
- Zhang, X.; Dostal, D. E.; Reiss, K. (1995). Identification and activation of autocrine renin-angiotensin system in adult ventricular myocytes. *Am J Physiol*, **269**: 1791-802.
- Zhao, Y.; Marletta, M. A. (1997). Localization of the heme binding region in soluble guanylate cyclase. *Biochemistry*, **36**: 15959-64.
- Zhao, Y.; Schelvis, J. P.; Babcock, G. T.; Marletta, M. A. (1998). Identification of histidine 105 in the  $\beta_1$  subunit of soluble guanylate cyclase as the heme proximal ligand. *Biochemistry*, **37**: 4502-9.

- 
- Zhao, Y.; Brandish, P. E.; Ballou, D. P.; Marletta, M. A. (1999). A molecular basis for nitric oxide sensing by soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**: 14753-8.
- Zhao, Y.; Brandish, P. E.; DiValentin, M.; Schelvis, J. P.; Babcock, G. T.; Marletta, M. A. (2000). Inhibition of soluble guanylate cyclase by ODQ. *Biochemistry*, **39**: 10848-54.



## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen, all denen, die mich bei meiner Arbeit unterstützt haben, zu danken.

An erster Stelle sei Dr. Philipp Kalk erwähnt, der jederzeit ein offenes Ohr für all meine unzähligen Fragen hatte. Danken möchte ich ihm auch für seine große Hilfe bei der statistischen Auswertung der Daten und für die vielen Stunden Zeit, die er in diesen Versuch investierte. Seine konstruktive Kritik und Diskussionsbereitschaft, aber auch sein Vertrauen waren nicht nur eine Unterstützung für mich. Retrospektiv waren sie auch eine große Bereicherung für diese Arbeit.

Bei den wissenschaftlichen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Berthold Hoher möchte ich mich für die praktische Arbeit bedanken, die sie mir abgenommen haben.

Herrn Prof. Dr. Berthold Hoher danke ich einerseits für die Überlassung des Dissertationsthemas und andererseits für die Betreuung dieser Arbeit. An dieser Stelle möchte ich auch Herrn PD Dr. Johannes-Peter Stasch meinen Dank aussprechen, der seine Zustimmung zu dieser Dissertation gab und mir Informationsmaterial zur Verfügung stellte.

Ein besonderer Dank gilt meiner besten Freundin Verena Dumitsch, die mir bei der Erstellung der Graphiken mehr als hilfreich war. Auch bei „technischen“ Problemen war sie, als wenn es selbstverständlich wäre, sofort zur Stelle und behob diese beinahe spielend. Dafür vielen Dank.

Dann wäre da noch mein Lebenspartner Marko Minack, dem ich für sein Verständnis, seine „moralische“ Unterstützung und vor allem aber für seinen Humor danken möchte. Mochten die Zeiten auch noch so stressig sein, wir beide hatten immer was zu lachen.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern, insbesondere meiner Mutter, danken. Ohne ihre Unterstützung wäre weder diese Arbeit noch das Studium überhaupt möglich gewesen. All das Vertrauen, welches sie in mich setzte, ließ mich zu einem Menschen werden, der voller Zuversicht und Optimismus in die Zukunft blickt.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbst und ohne unzulässige Hilfe verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt. Die der benutzten Literatur wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Weiterhin erkläre ich, dass ich an keiner anderen Stelle ein Promotionsverfahren beantragt habe oder hatte.

Berlin, den 26. Juni 2009

Kathrin Welkisch