

5 Diskussion

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind die häufigste Todesursache bei Dialysepatienten [1]. Das Spektrum der auftretenden Komplikationen umfasst unter anderem interstitielle Myokardfibrose, linksventrikuläre Hypertrophie, Myokardinfarkte, Atherosklerose und Anämie.

Es wird vermutet, dass die interstitielle Myokardfibrose als direkte eigenständige Folge der Azotämie entsteht und nicht sekundär aufgrund arterieller Hypertonie [2]. Sie ist maßgeblich an systolischen und diastolischen Dysfunktionen bei azotämischen Patienten beteiligt. Die diastolische Dehnbarkeit des Ventrikels wird eingeschränkt und die Erregungsausbreitung wird behindert [23].

In der vorliegenden Arbeit wird der Einfluss eines A₁-Adenosinrezeptor-Antagonisten auf die Progression der interstitiellen Myokardfibrose im 5/6 Nephrektomie-Modell der Ratte untersucht.

5.1 Das 5/6 Nephrektomie-Modell der Ratte

Männliche Sprague-Dawley-Ratten werden im Alter von 5 Wochen in zwei Schritten einer 5/6 Nephrektomie unterzogen. Desweiteren werden bei Kontrolltieren Shamoperationen mit Dekapsulation der Nieren durchgeführt. Anschließend werden die Tiere zufällig in Gruppen eingeteilt und es wird der Wirkstoff SLV320 oder ein Placebo verabreicht.

Während der folgenden 12 Wochen zeigt sich bei den 5/6 nephrektomierten Tieren eine geringere Gewichtszunahme als bei den Kontrolltieren. Dies korrespondiert mit Beschreibungen des Modells in der Literatur [3] und ist zum einen dem körperlichen Stress durch den operativen Eingriff und zum anderen dem augenblicklich einsetzenden Nierenversagen nach der 5/6 Nephrektomie zuzuschreiben.

Das relative Nierengewicht der linken Niere ist bei den 5/6 nephrektomierten Tieren signifikant erhöht verglichen mit den shamoperierten Tieren. Dies ist der nach der Operation einsetzenden kompensatorischen Hypertrophie und zunehmenden Sklerosierung des verbliebenen Nierenrestes zuzuschreiben [100].

Am Ende von Woche 12 weisen die 5/6 nephrektomierten Tiere eine chronische Niereninsuffizienz auf. Die Plasmaspiegel an Kreatinin und Harnstoff sind signifikant erhöht verglichen mit denen der shamoperierten Tiere ($p < 0,01$). Die Werte der beiden Gruppen mit 5/6 nephrektomierten Tieren unterscheiden sich hingegen nicht.

Einen weiteren Beleg für die Eignung des Modells liefert die Betrachtung der Urinwerte. Vor Versuchsbeginn gibt es keine Unterschiede in der Ausscheidung von Gesamtprotein bzw. Albumin mit dem Urin zwischen den Gruppen. Am Ende von Woche 12 sind die Werte der 5/6 nephrektomierten Tiere gegenüber denen der shamoperierten signifikant erhöht ($p < 0,001$). Auch hier bestehen keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen der 5/6 nephrektomierten Tiere.

Die Beobachtung, dass auch die shamoperierten Tiere eine milde gesteigerte Proteinausscheidung am Ende von Woche 12 aufweisen, ist auf die geschlechtsabhängigen Proteine im Urin der männlichen Ratte zurück zu führen. Im Gegensatz zur weiblichen Ratten scheiden männliche geschlechtsreife Ratten physiologischerweise große Mengen spezifischer niedermolekularer geschlechtsabhängiger Proteine aus [105].

Die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) wird auf 100g Körpergewicht der Tiere bezogen um etwaige Größenunterschiede bei den Tieren zu nivellieren. Vergleicht man die Werte miteinander, so zeigen die 5/6 nephrektomierten Tiere in Woche 12 eine signifikante Verminderung der GFR gegenüber den Kontrolltieren ($p < 0,02$). Sowohl die 5/6 nephrektomierten als auch die shamoperierten Tiere weisen untereinander jeweils keine Unterschiede auf.

Aufgrund der hier vorliegenden Untersuchungsergebnisse kann demnach davon ausgegangen werden, dass die Verabreichung des Wirkstoffes SLV320 die Entwicklung und Ausprägung der Niereninsuffizienz nicht beeinflusst hat.

Der Zustand der Tiere ist während der 12 Versuchswochen so stabil, dass der Wirkstoff in ausreichender Menge auch von den kranken Tieren aufgenommen wird.

Die Trinkwasseraufnahme in Woche 12 ist bei den behandelten 5/6 nephrektomierten sowie den behandelten sham-operierten Tieren signifikant erhöht gegenüber den unbehandelten 5/6 nephrektomierten. Auch im Vergleich mit den unbehandelten sham-operierten Ratten zeigt sich ein Trend zu erhöhter Wasseraufnahme seitens der mit SLV320 behandelten Tiere. Dies ist auf die diuretische Wirkung des Wirkstoffs zurück zu führen.

Für den Wirkstoff SLV320 ist in Studien der Firma Solvay die diuretische Wirkung belegt (http://www.solvay-investors.com/static/wma/pdf/4/3/4/0/051004solvay_pharmaceuticals.pdf). Aber auch in anderen Arbeiten wird die diuretische Wirkung einer A_1 -AR-Blockade beschrieben. Lucas et al. untersuchten 2002 die Auswirkungen einer A_1 -AR-Antagonisierung in einem Modell für Herzinsuffizienz. Die erreichte Diurese ist doppelt so groß wie die durch Hydrochlorothiazid, jedoch geringer als die durch Furosemid.

Dieser diuretische Effekt kann sicherlich einer Volumenüberlastung bei beeinträchtigter Nierenfunktion oder Herzinsuffizienz entgegenwirken.

5.2 Blutdruck und Herzfrequenz

Die Tiere der verschiedenen Gruppen weisen während der gesamten Versuchsdauer keine signifikanten Unterschiede beim systolischen Blutdruck auf. Prae OP beträgt der Wert bei allen Gruppen im Mittel 112 mmHg, in Woche 12 beträgt er 126 mmHg. Hier liegt keine Hypertonie vor.

Es ist nicht ungewöhnlich, dass bei diesem Modell und der hier gewählten Operationsmethode innerhalb von 12 Wochen kein systemischer Bluthochdruck entsteht. Andere Methoden, wie beispielsweise die Ligatur von Ästen der Nierenarterie, führen zu einem sehr frühen Anstieg des Blutdrucks, welcher sogar unabhängig von der Entwicklung der Niereninsuffizienz ist [106]. Für die hier angewandte Methode, bei der beide Nierenpole legiert werden, wird betont, dass sich eine Hypertonie erst spät im Krankheitsverlauf einstellt [3].

Die Herzfrequenz beträgt prae OP bei allen Gruppen im Mittel 419 Schläge pro Minute. Im Verlauf von 12 Wochen zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Am Ende der Versuchszeit liegt der Mittelwert bei 358 Schlägen pro Minute. Diese leichte Erniedrigung des Mittelwertes ist auf die Gewöhnung der Tiere an die Messung zurück zu führen.

5.3 Klinische Chemie

Neben den Laborwerten, die das Modell als geeignet bestätigen, gibt es weitere interessante Ergebnisse.

Die mit SLV320 behandelten 5/6 nephrektomierten Tiere weisen einen signifikant niedrigeren CK-Spiegel im Plasma auf als die unbehandelten 5/6 nephrektomierten.

Das Enzym Creatinkinase (CK) hat zentrale Bedeutung für die Energiegewinnung in Organen, die extrem viel Energie verbrauchen, so auch im Herzmuskel [107].

Im Körper kommt es in drei verschiedenen Formen (Isoenzymen) vor, von denen das CK-MB herzspezifisch ist und bei Herzmuskelschädigungen in erhöhten Mengen im Blut vorkommt [108]. Die Aktivität der CK-MB kann jedoch mittels Autoanalyser im Serum der Ratten nicht zuverlässig bestimmt werden.

Die hier vorliegenden Untersuchungsergebnisse können dennoch dahingehend interpretiert werden, dass sich der Wirkstoff SLV320 derart positiv auf den Herzmuskel insbesondere der urämischen Tiere auswirkt, dass eine signifikant verminderte CK-Aktivität vorliegt.

Die Erfassung der CK-Werte erfolgt zwar typischerweise beim Monitoring akuter Myokarditiden [109] und nicht unbedingt im Zusammenhang mit der urämischen Kardiomyopathie, es haben sich jedoch auch Studien mit dem Verhalten der CK-Aktivität bei

anderen Herzerkrankungen befasst. Es werden bei einigen Patienten mit Herzrhythmusstörungen, angeborenen Herzfehlern oder Herzinsuffizienz erhöhte CK-Werte im Serum nachgewiesen [110], [111].

In der vorliegenden Studie zeigen die azotämischen Tiere einen deutlichen Trend zu erhöhter CK-Aktivität, was sicherlich auf eine Schädigung des Herzmuskels durch die urämische Kardiomyopathie zurückzuführen ist.

Ein weiteres Ergebnis untermauert diese These: auch die Werte von AST und ALT im Plasma der SLV320 behandelten 5/6 nephrektomierten Tiere sind signifikant niedriger als die der unbehandelten 5/6 nephrektomierten Tiere. Insbesondere die Aktivität der AST ist bei Schädigungen des Myokards erhöht [112]. Auch hier zeigt sich ein deutlicher Trend zu höheren Werten bei den unbehandelten azotämischen Tieren gegenüber beiden Sham-Gruppen. Unter der Gabe von SLV320 sind die Werte signifikant niedriger beim Vergleich der beiden Gruppen der 5/6 nephrektomierten Tiere.

Die Enzyme AST und ALT werden im Zusammenhang mit rheumatischer [113] und nicht-rheumatischer Myokarditis [114] untersucht. In weiteren Untersuchungen müsste geklärt werden, in wie fern hier eine urämische Myokarditis vorliegt oder ob die erhöhten Werte auf eine andere Myokardschädigung zurückzuführen sind.

Dem Wirkstoff SLV320 kann hier eine kardioprotektive Wirkung zugeschrieben werden, die zu einer signifikant erniedrigten Enzymaktivität von solchen Enzymen führt, die typischerweise bei Myokardschädigungen in erhöhten Mengen im Plasma vorkommen.

5.4 Interstitielle Myokardfibrose

Bei der Untersuchung der interstitiellen Myokardfibrose interessiert der prozentuale Anteil interstitiellen Gewebes im Herzmuskel. Es werden die SLV320 behandelten mit den nicht behandelten urämischen Tieren verglichen.

Die SLV320 behandelten 5/6 nephrektomierten Tiere zeigen eine signifikant verminderte interstitielle Fibrose des Myokards im Vergleich zu den unbehandelten 5/6 nephrektomierten.

Die unbehandelten azotämischen Tiere zeigen einen Trend zu erhöhter Myokardfibrose, wenn der Unterschied zu den shamoperierten auch nicht signifikant ist. Es wird jedoch in anderen Veröffentlichungen gezeigt, dass Ratten mit experimentell erzeugter Urämie bereits nach 90 Tagen eine signifikant erhöhte interstitielle Myokardfibrose aufweisen [29].

Dieser Effekt der Niereninsuffizienz wird als herzspezifisch betrachtet, da beispielsweise an der Leber derselben Tiere weder eine Expansion der Glisson'schen Dreiecke noch vermehrt intralobuläres Kollagen vorliegen.

Es ist nicht verwunderlich, dass sich die einzelnen Gruppen im relativen Herzgewicht nicht unterscheiden. Das relative Herzgewicht ist üblicherweise ein Maß für die Hypertrophie der Cardiomyozyten [115]. Dafür fehlen hier die Voraussetzungen wie beispielsweise eine Hypertonie. Wenn man außerdem bedenkt, dass das Bindegewebe lediglich einen Anteil von 1,4 bis 1,8% am Bildausschnitt bei der Untersuchung des Herzmuskels hat, dann kann man auch bei einer signifikanten Verminderung der interstitiellen Fibrose, wie sie hier vorliegt, keine Unterschiede im relativen Herzgewicht erwarten.

Auch die shamoperierten Tiere, die mit dem Wirkstoff SLV320 behandelt werden, zeigen einen Trend zu geringerer interstitieller Myokardfibrose, wenn man sie mit den unbehandelten shamoperierten Tieren vergleicht. Somit kann dem Wirkstoff SLV320 eine antifibrotische Wirkung zugesprochen werden.

Die molekularen Mechanismen, über die SLV320 seine antifibrotische Wirkung entfaltet, sind unbekannt.

5.5 Zusammenfassende Bewertung der Untersuchungsergebnisse

In der vorliegenden Arbeit hat sich das 5/6 Nephrektomiemodell der Ratte als funktionierend und geeignet erwiesen, eine chronische Niereninsuffizienz zu erzeugen. Die Tiere können in unterschiedliche Gruppen eingeteilt und mit dem Wirkstoff SLV320 oder einem Placebo behandelt werden. Am Ende der 12 Versuchswochen lässt sich bei den 5/6 nephrektomierten Tieren eine chronische Niereninsuffizienz anhand erhöhter Kreatinin- und Harnstoffwerte im Plasma, einer verringerten GFR und einer gesteigerten Proteinurie und Albuminurie nachweisen.

Das vorliegende Nierenversagen wird von einer nephrogenen Kardiomyopathie begleitet. Muskelenzyme mit nachgewiesener Herkunft aus dem Herzmuskel werden in erhöhten Mengen im Plasma der urämischen Tiere nachgewiesen. Außerdem ist die interstitielle Myokardfibrose bei diesen Tieren gesteigert.

Wichtigstes Untersuchungsergebnis ist eine signifikant verminderte interstitielle Myokardfibrose bei den 5/6 nephrektomierten SLV320 behandelten Ratten. Dies stellt eine Behandlungsmöglichkeit einer wichtigen Komponente der urämischen Kardiomyopathie dar. Begleitend wird durch den Wirkstoff SLV320 eine signifikante Verminderung der Plasmaaktivität der Muskelenzyme CK, AST und ALT bei den azotämischen Tieren erreicht. Weitere Untersuchungen müssen die molekularen Mechanismen klären, die der Wirkung von SLV320 zugrunde liegen, um eine therapeutische Nutzung zur Behandlung der urämischen Kardiomyopathie zu ermöglichen.

Im November 2006 beschreiben Funakoshi et al. eine Studie an transgenen Mäusen mit einer erheblichen Überexpression des A₁-Adenosin-Rezeptors. Diese Tiere zeigen eine

signifikante kardiale Dilatation und eine verminderte kardiale Kontraktilität im Alter von sechs Wochen sowie eine signifikant erhöhte Mortalität im Alter von 15 Wochen. Diese physiologischen Veränderungen werden begleitet von einer gesteigerten Expression von Kollagen-Genen [116].