

## **5 Diskussion**

Der JGA der Niere spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Funktion der Säugerniere. Dabei ist er über den Mechanismus des TGF an der Anpassung der GFR und über die Freisetzung von Renin an der Regulation der Reabsortionskapazität des Nephrons beteiligt. Durch die Steuerung der Aktivität des systemischen RAAS greift er außerdem in die Regulation des Volumenstatus des Extrazellulärraumes ein. Wie andere wichtige physiologische Regulationsmechanismen wird die JGA Funktion durch verschiedene positive und negative Rückkopplungsmechanismen reguliert. Die Vorgänge am JGA sind von klinischer Bedeutung, da die renale Wirkung der wichtigsten Antihypertensiva mittelbar oder unmittelbar auf einer Interferenz mit den Regulationsmechanismen am JGA beruht [149, 150, 151, 152, 153, 154]. Ein möglichst umfassendes Verständnis dieser Regulationsmechanismen bildet daher die Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Therapie der arteriellen Hypertonie.

Ziel der hier vorgelegten Arbeit war es, zu einem besseren Verständnis der Interaktion des L-Arginin-NO Systems und der COX-2 assoziierten Prostaglandinproduktion in der Regulation der JGA Funktion beizutragen. Einen weiteren Schwerpunkt bildete die Untersuchung des Effektes einer vermehrten Sauerstoffradikalbildung am JGA auf die Expression der oben genannten Enzymsysteme.

### **5.1 Lokalisation und Regulation der COX-2-Expression in der Maus**

Die Resultate der Lokalisationsstudie für die COX-2-Expression in der Niere von Mäusen zeigen deutliche Unterschiede zur Ratte. Dies galt vor allem für die Verteilung der Zellen innerhalb des JGA. Während im Kortex der Mäuseniere der Hauptanteil der angefärbten Zellen zu den eigentlichen Macula densa-Zellen gehört, ist dies bei der Ratte nicht der Fall. Hier bilden an die Macula densa angrenzende oder der Macula densa gegenüberliegende Zellen des TAL die Mehrheit der JGA assoziierten immunreaktiven Zellen. Die für die Ratte typische kräftige Färbung einzelner TAL Zellen, die den lokalen Bezug zur Macula densa-Region nicht haben, fand sich in der Mäuseniere nur selten. Auch eine Färbung interstitieller Zellen der renalen Medulla war nur bei einzelnen Tieren nachweisbar. Über die Ursachen dieser Unterschiede und etwaige Auswirkungen

auf Regulationsvorgänge am JGA kann zum jetzigen Zeitpunkt nur spekuliert werden. In einer früheren Studie der Arbeitsgruppe von S. Bachmann wurde die Expression von COX-2 in unterschiedlichen Lokalisationen und unter unterschiedlichen experimentellen Konditionen untersucht [87]. In dieser Arbeit wurden mittels immunhistologischer Methoden Macula densa-Zellen von TAL-Zellen mit oder ohne lokalen Bezug zur Macula densa-Region unterschieden. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich das Ausmaß der Veränderung der COX-2-Expression in den unterschiedlichen Lokalisationen nicht unterschied. Diese Beobachtung bestätigt frühere Zellkulturstudien, welche sowohl für Macula densa- als auch für TAL Zellen eine Stimulation der Expression von COX-2 durch niedrige Natriumchlorid-Konzentrationen im Zellkulturmedium gezeigt haben. Voraussetzung für diesen Effekt ist ein funktionierender NKCC2, und eine Blockade des Transporters führt in der Ratte zu einer Stimulation der Expression von COX-2 [45, 155].

Zur Demonstration einer vergleichbaren Regulation der COX-2-Expression in Maus und Ratte wurden Wildtyp-Mäuse für 3 Tage mit dem Schleifendiuretikum Bumetanid behandelt und die Macula densa-assoziierte Expression von COX-2 untersucht. Diese Studie sollte gleichzeitig zur Validierung des Immunoassays und des Quantifizierungsverfahrens dienen. Nach der Behandlung zeigten die Mäuse eine hochsignifikante Steigerung der Anzahl COX-2-immunreaktiver Macula densa-Zellen im Vergleich zu den mit Placebo behandelten Tieren. Mit diesem Ergebnis wurde also auch für die Maus die grundlegende Abhängigkeit der Expression von COX-2 von der Funktion des NKCC2 gezeigt. Das Resultat bestätigt außerdem eine frühere Studie an einer Zellkultur immortalisierter muriner Macula densa-Zellen [45]. Der Mechanismus, über den ein verminderter Salzeinstrom in die Macula densa zu einer Stimulation der Expression von COX-2 führt, ist in seinen Einzelheiten noch nicht genau bekannt. Resultate von Zellkulturstudien an isolierten TAL Zellen zeigen eine Beteiligung von verschiedenen Mitogen- assoziierter Proteinkinasen (MAP Kinasen), welche eine Steigerung der Expression von COX-2 durch eine posttranskriptionelle Regulation bewirken können [156]. MAP Kinasen wie ERK oder p38 können außerdem über eine Aktivierung der zytosolischen Phospholipase A zu einer Freisetzung von Arachidonsäure aus der Zellmembran führen und damit die Menge an verfügbarem Substrat für die Cyclooxygenase steigern [157]. Der exakte

Mechanismus, über den die verminderte Chloridkonzentration im Medium zu einer Aktivierung der MAP Kinasen führt, ist unbekannt. Es wird jedoch vermutet, dass eine Absenkung des intrazellulären pH der Macula densa-Zelle zur Aktivierung der MAP Kinase-Kaskade führt [158]. Die Regulation des zytosolischen pH erfolgt über ein als Natrium-Protonenaustauscher (NHE) bezeichnetes Kanalprotein. Dieses vermittelt die Aufnahme eines Natriumions aus der Tubulusflüssigkeit in die Macula densa-Zelle, und im Austausch wird ein Proton in das Tubuluslumen sezerniert. Dieser Transportvorgang ist sekundär aktiv und wird durch den Konzentrationsgradienten von  $\text{Na}^+$  angetrieben. Sinkt dieser Gradient ab, kommt es zu einem Anstieg der Protonenkonzentration im Zytosol der Macula densa-Zelle und damit zu einem Absinken des pH [159]. Eine weitere Hypothese postuliert einen Zwischenschritt, bei dem die Aktivierung der MAP Kinase-Kaskade durch Aktivierung einer membranassoziierten Tyrosinkinase erfolgt [45].

Cheng et al fanden in einer weiteren Zellkulturstudie an Kaninchen TAL Zellen, dass die Expression von COX-2 NO-abhängig ist und durch den relativ spezifischen NOS1-Blocker 7-NI inhibiert werden kann [85]. Die Behandlung dieser Zellen mit dem NO Donor S-nitroso-N-acetyl-penicillamine (SNAP) oder mit einem stabilen cGMP Derivat (dibutryl cGMP) führte dagegen zu einer Stimulation der Expression von COX-2 [85]. Diese Resultate ließen auf eine Beteiligung des klassischen NO-Signaltransduktionswegs mit Stimulation der löslichen Isoform der Guanylatzyklase (sGC) schließen. Gegen diese Interpretation spricht jedoch, dass eine Expression von NOS1 in TAL-Zellen außerhalb der Macula densa nur nach Anwendung extremer experimenteller Konditionen nachgewiesen werden kann [13]. Auch das für die Bildung von cGMP erforderliche Enzym sGC ist im TAL normaler Tiere nicht nachweisbar [160]. Die physiologische Relevanz dieser Zellkulturdaten ist daher unklar.

Die Resultate der Lokalisationsstudie für COX-2 in der Niere der Maus zeigt also eine signifikante, durch Blockade des NKCC2 stimulierbare COX-2-Expression im JGA von Mäusen. Die Regulation der JGA assoziierten COX-2-Expression in der Maus entspricht demzufolge der Regulation in anderen Tiermodellen. Die an Mäusen gewonnenen Informationen über Interaktionsmechanismen am JGA können daher auf andere Tiermodelle und den Menschen übertragen werden.

## **5.2 Einfluss der alimentären Salzaufnahme auf die Expression von COX-2 und Renin in Kontroll- und NOS1-defizienten Mäusen**

### *5.2.1 Expression von COX-2 in NOS1<sup>-/-</sup> Mäusen*

Die Untersuchung der COX-2-Expression zeigte, dass Unterschiede in der Salzaufnahme sowohl in den Kontrollmäusen als auch in den NOS1-defizienten Tieren zu reziproken Veränderungen der Anzahl COX-2-immunreaktiver Zellen führten. Mit dieser Beobachtung konnte nachgewiesen werden, dass auch in der Maus eine inverse Korrelation von COX-2-Expression und alimentärer Salzaufnahme besteht. Dieses Resultat weist daher ebenfalls auf eine vergleichbare Regulation der Expression von COX-2 in Maus und Ratte hin [55]. Bei den Tieren mit normaler Salzaufnahme unterschied sich die Anzahl COX-2-immunreaktiver Macula densa-Zellen in den NOS1<sup>-/-</sup> nicht von der in den Kontrolltieren. Dieses Resultat wurde von uns auch mittels *Real time PCR* bestätigt [161]. In den Gruppen mit niedriger oder hoher Salzaufnahme bestand in den NOS1-defizienten Mäusen sogar eine Tendenz zu gesteigerten Zahlen COX-2-immunreaktiver Macula densa-Zellen, wobei dieser Unterschied nicht das Niveau der statistischen Signifikanz erreichte. Die Ergebnisse dieser Studie sprechen also nicht für eine bedeutsame Rolle von NOS1 in der Regulation der Expression von COX-2. Zu ähnlichen Schlussfolgerungen kommen die Autoren einer Studie von Castrop und Kollegen. In dieser Arbeit wurde die kortikale COX-2-Expression in Ratten zunächst durch Behandlung mit einem ACE-Hemmer und gleichzeitiger Gabe einer salzarmen Diät stimuliert. Anschließend wurde der Effekt einer unspezifischen Blockade der NOS-Funktion mittels L-NAME auf die Expression von COX-2 untersucht. Dabei konnten die Autoren keinen durch L-NAME hervorgerufenen Effekt auf die Expression von COX-2 nachweisen [89]. Diese Resultate stehen im Gegensatz zu anderen, mittels pharmakologischer Blockade von NOS in Rattenmodellen und in isolierten JGA-Präparationen erhobenen Resultaten. In diesen Studien wurde gezeigt, dass die gesteigerte Expression von COX-2 am JGA in Folge einer Salzdepletion und/oder ACE-Hemmergabe von NO abhängig ist [162]. Eine mögliche Erklärung für die widersprüchlichen Resultate wäre, dass die zurzeit kommerziell erhältlichen NOS-Blocker nicht (L-NAME) oder nur relativ (7-Nitroindazol) spezifisch für NOS1 sind [163, 164]. Rückschlüsse auf die Quelle von NO sind daher in den zitierten pharmakologischen Studien nur begrenzt möglich, da eine eventuelle Kompensation durch andere NOS-Isoformen durch die unspezifischen Inhibitoren

ebenfalls verhindert wird. Die von uns untersuchten NOS1<sup>-/-</sup> Mäuse weisen keine renale NOS1-Aktivität auf [90]. Im Gegensatz dazu werden die anderen NOS-Isoformen exprimiert und sind funktionell intakt. Es wäre demzufolge möglich, dass in den NOS1<sup>-/-</sup> Mäusen eine kompensatorische Steigerung der NO Produktion durch andere NO Synthasen auftritt. Ein möglicher Mechanismus für einen negativen Rückkopplungsmechanismus von NO auf die Expression von NOS3 wurde von Vaziri und Kollegen beschrieben [165]. In der Nähe des JGA findet sich eine relevante Expression von NOS3 in endothelialen Zellen der glomerulären Gefäße [166] und in Zellen des TAL [30]. Die Existenz von NOS3 im TAL ist aber nicht allgemein akzeptiert, und die entsprechenden Tubulusabschnitte zeigen auch keine nennenswerte Diaphoraseaktivität (S. Bachmann, unveröffentlichte Resultate). Bei der Diskussion der Quellen für NO muss berücksichtigt werden, dass die tatsächliche Reichweite von NO im Kortex der Niere nicht bekannt ist. Eine direkte Messung der kortikalen NO Spiegel zeigte jedoch eine gleichmäßige NO-Konzentration im renalen Kortex von Ratten, zu der sowohl NOS1 als auch NOS3 beitragen [167]. Bei einer verminderten oder fehlenden NOS1-Aktivität im JGA wäre also trotzdem immer eine bestimmte Menge an NO vorhanden. Durch eine kompensatorische NOS3-Aktivitätssteigerung könnte diese Menge auch im JGA gesteigert werden. Hinweise für die Stichhaltigkeit dieser Hypothese finden sich in einer Studie von Castrop und Kollegen, in der die Autoren die Freisetzung von Renin aus den Nieren von NOS1- und NOS3-defizienten Mäusen nach einer definierten Furosemidgabe untersucht haben. Der Effekt von Furosemid auf die Freisetzung von Renin beruht auf der Aktivierung des Macula densa-Mechanismus und ist abhängig von NO [93]. In dieser Studie fanden die Autoren, dass die Freisetzung von Renin weder in NOS1- noch in NOS3-defizienten Mäusen beeinträchtigt war. Erst eine zusätzliche Behandlung beider Tierstämme mit dem unspezifischen NO Synthase Blocker L-NAME zeigte einen inhibitorischen Effekt. Die Autoren folgerten, dass eine bestimmte Menge NO im JGA vorhanden sein, dieses aber nicht notwendigerweise von NOS1 gebildet werden muss.

#### *5.2.2 Renale Renin-mRNA-Expression und Aktivität des systemischen RAS in NOS1<sup>-/-</sup> Mäusen mit normaler Salzaufnahme*

Die Untersuchung an NOS1<sup>-/-</sup> Mäusen zeigen eine Suppression der Renin-mRNA Produktion sowie der Plasmaaktivität des Enzyms. Dieses Resultat weist daher

auf eine stimulatorische Wirkung von NOS1 auf die Expression und die Freisetzung von Renin aus dem JGA hin. Damit werden frühere Beobachtungen an NOS1-defizienten Mäusen [168] und eine Reihe pharmakologischer Studien bestätigt, welche in verschiedenen Spezies eine Suppression des RAAS nach selektiver NOS1- oder unselektiver NOS-Blockade zeigen [169, 170]. In weiteren Studien konnte außerdem gezeigt werden, dass die Stimulation des RAAS, welche normalerweise durch eine Absenkung der Chloridkonzentration an der Macula densa, eine Blockade des NKCC2 durch Furosemid oder die Hemmung des RAAS durch ACE Hemmer hervorgerufen wird, durch Blockade der NO Produktion signifikant vermindert wird [171, 172, 173, 174]. Daneben gibt es Studien, in denen nach einer chronischen NOS-Blockade ein Anstieg der PRA beobachtet wurde [175, 176]. In der Literatur wird dieser Effekt jedoch als Folge der Hypertonie und der sekundären hypertensiven reno-vaskulären Veränderungen gewertet [177]. Eine arterielle Hypertonie bzw. Hypertonie-assoziierte strukturelle Veränderungen waren jedoch zum Zeitpunkt der Untersuchung in den NOS1-defizienten Mäusen nicht nachweisbar (Eigene Beobachtungen und [90]).

### **5.3 Morphologische Veränderungen und Expression von COX-2 und Renin in COX-2-defizienten Mäusen**

#### *5.3.1 Morphometrie an 3 Monate alten COX-2 -/- Mäusen*

Neben ihrer Rolle in der Regulation der Funktion der Niere sind Prostaglandine auch für die normale Entwicklung der Niere von Säugetieren von Bedeutung. So führt die Einnahme von NSAIDs in der Schwangerschaft zu einer Hypoplasie des renalen Kortex und einer verminderten Anzahl funktionierender Nephrone [178]. Besonders deutlich wird die Bedeutung der Prostaglandine für eine normale Nephrogenese bei der Untersuchung der Nieren von COX-2-defizienten Mäusen. Die Nieren der erwachsenen Tiere sind kleiner als die der Kontrollmäuse gleichen Alters und enthalten weniger Glomeruli. Histologische Untersuchungen zeigen eine Persistenz undifferenzierten Parenchyms im subkapsulären Anteil des Kortex und ein Reifungsdefizit der dort gelegenen Glomeruli. Die unreifen Glomeruli sind insgesamt kleiner und enthalten weniger Zellen als die Glomeruli der Kontrolltiere. Im Gegensatz dazu sind die früher angelegten Glomeruli der tiefer gelegenen Schichten normal entwickelt und zeigen deutliche Anzeichen für eine

Hypertrophie. Die Quantifizierung der Größenveränderungen der Glomeruli in den 3 Monate alten COX-2-defizienten Mäusen bestätigt die Beobachtungen früherer Studien an diesen Tieren [98, 99, 100]. Bei den meisten Nagetieren ist die Glomerulogenese mit der Geburt noch nicht abgeschlossen, und eine postnatale Induktion neuer Glomeruli in der nephrogenen Zone ist Voraussetzung für eine normale Nierenentwicklung. In der Maus endet die Phase der Neuanlage von Glomeruli erst mit dem 7. postnatalen Tag [179]. Untersuchungen von Norwood und Kollegen zeigen, dass die pränatale Nierenentwicklung in den COX-2-defizienten Tieren nicht beeinträchtigt ist und erste morphologische Alterationen am 10. postnatalen Tag nachweisbar werden [180]. Die Ursachen für die normale Entwicklung der pränatal angelegten Glomeruli sind unklar. Vermutlich ist jedoch eine transplazentare Versorgung der Feten mit Prostaglandinen der Mutter für dieses Phänomen verantwortlich [181].

Der Mechanismus, der zur Hypertrophie der tiefen Nephrone führt, ist nicht genau bekannt. Die Beobachtung, dass die jungen COX-2-/- Mäuse trotz der hochgradig reduzierten Anzahl funktionierender Nephrone eine normale GFR aufweisen, lässt auf eine erhebliche Hyperfiltration der verbleibenden Nephrone schließen. Diese Resultate zeigen, dass eine glomeruläre Hyperfiltration und Hypertrophie auch ohne durch COX-2 gebildete Prostaglandine möglich ist. Ein potentieller Mechanismus der die vermutete Hyperfiltration auch in Abwesenheit von COX-2 aufrecht erhalten kann, stellt die im Anschluss an diesen Abschnitt diskutierte gesteigerte Expression von NOS1 im JGA der COX-2-defizienten Mäuse dar.

### *5.3.2 Expression von NOS1 in COX-2-/- Mäusen*

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Macula densa-assoziierte Expression von NOS1 in den COX-2-defizienten Mäusen signifikant über der der Kontrolltiere lag. Dabei ergaben sich erhebliche Unterschiede im Expressionsmuster. So war die NOS1-Expression in den JGA der juxtamedullären Glomeruli besonders ausgeprägt, während dies für die entwickelten subkapsulären Nephrone in geringerem Maße zutraf. Im Gegensatz dazu wiesen die JGA der kleinen subkapsulär gelegenen unreifen Glomeruli keine NOS1-IR auf. Die Quantifizierung der Enzymaktivität von NOS1 durch die

Diaphorasereaktion erbrachte ähnliche Ergebnisse wie das Immunoassay. Diese Resultate wurden außerdem mittels *Real time RT-PCR* bestätigt [161].

Neben den bereits dargestellten renalen Veränderungen weisen die COX-2-defizienten Mäuse auch eine erhebliche Abwehrschwäche auf. Diese manifestiert sich in einer erhöhten Anfälligkeit für bakterielle Harnwegsinfektionen und kann zu einer chronischen Entzündungsreaktion und damit zur Akkumulation inflammatorischer Zellen in der Niere führen [98]. Die durch diese Zellen gebildeten Mediatoren könnten mit den Vorgängen am JGA interferieren. Berücksichtigt man die morphologischen und immunologischen Veränderungen der COX-2-defizienten Mäuse, so ergeben sich verschiedene Ansätze zur Interpretation der erhobenen Befunde.

- Morphologischer Interpretationsansatz

Wie bereits diskutiert, weist der renale Kortex der COX-2-defizienten Mäuse Anzeichen einer erheblichen Störung der Nephrogenese auf. Er ist insgesamt verkleinert, und die Anzahl funktionierender Nephrone ist reduziert. Während die im subkapsulären Anteil des renalen Kortex gelegenen Glomeruli signifikant kleiner als die Glomeruli der Kontrollmäuse sind, weisen die tiefer gelegenen Glomeruli Zeichen einer erheblichen Hypertrophie auf. Diese Hypertrophie betrifft das gesamte Nephron inklusive des JGA und ist vermutlich die Erklärung für die normalen GFR Werte bei den 3 Monate alten Tieren [97]. In Anbetracht der in dieser Studie gefundenen morphologischen Veränderungen der reifen Glomeruli erscheint es daher denkbar, dass die beobachtete vermehrte NOS1-Expression eine Hypertrophie und Hyperplasie des JGA der juxtamedullären Nephrone widerspiegelt. Ebenso wäre es jedoch denkbar, dass die vermehrte NOS1-Expression den primären Effekt darstellt und über eine Steigerung der glomerulären Perfusion und des intraglomerulären Druckes zu der beobachteten kompensatorischen Hypertrophie führt. Hinweise für eine entsprechende Rolle von NO bei der Pathogenese einer glomerulären Hypertrophie fanden sich zum Beispiel bei Tiermodellen der diabetischen Nephropathie [182, 183].

- Funktioneller Interpretationsansatz

Die SNGFR und die Expression und Freisetzung von Renin wird durch eine Reihe von Rückkopplungsmechanismen stabilisiert. Als Möglichkeit zur Erklärung der gesteigerten Expression von NOS1 wäre daher eine funktionelle Interaktionen



innerhalb der Signalkaskade am JGA in Betracht zu ziehen. So ist es denkbar, dass die bei den COX-2-/- Mäuse fehlende vasodilatierende Wirkung der Prostaglandine am JGA zu einem inadäquat hohen Tonus der afferenten Arteriole und damit zu einer niedrigen SNGFR führt. Die daraus resultierende Verminderung der Chloridkonzentration der Tubulusflüssigkeit an der Macula densa wäre ein gut definierter Stimulator der Expression von NOS1 [184].

Ein weiterer Rückkopplungskreis, über den die Expression von NOS1 gesteigert werden könnte, beruht auf der inhibitorischen Wirkung von Ang II auf die Expression von NOS1 [185]. Da die PRA von COX-2-defizienten Mäusen vermindert ist, könnte auch die daraus folgende Verminderung der Ang II Konzentration am JGA zu der beobachteten Steigerung der Expression von NOS1 führen.

Als dritte funktionelle Interaktion innerhalb des JGA kommt auch eine direkte hemmende Wirkung von COX-2-Produkten auf die NOS-Expression in Frage. Dieser Mechanismus scheint bei der Kontrolle der NOS2-Expression stimulierter Phagozyten eine wichtige Rolle zu spielen [186]. Beispiele für eine hemmende Wirkung von Prostaglandinen auf die Expression von NOS1 gab es allerdings zum Zeitpunkt der Studie nicht.

- Inflammatorischer Interpretationsansatz

COX-2-/- Mäuse weisen ein deutlich erhöhtes Risiko für Infektionen des Urogenitaltraktes auf. Die durch eine chronische Infektion ausgelöste Akkumulation inflammatorischer Zellen in den Nieren ist vermutlich mit einer vermehrten Bildung von Sauerstoffradikalen assoziiert. Analog zu der von Welch und Kollegen für die SHR formulierten Hypothese [187] könnten diese die Bioverfügbarkeit von NO und damit die Effektivität der NOS1 reduzieren. Da NO eine hemmende Wirkung auf die Expression von NOS ausübt [165] könnte die gesteigerte Expression von NOS1 daher auch auf die verminderte Verfügbarkeit von NO im JGA zurückgeführt werden. In diesem Falle wäre die gesteigerte Expression von NOS1 im JGA der Tiere nicht notwendigerweise mit erhöhten Konzentrationen von NO verbunden.

Zur Aufklärung der Mechanismen, die zu einer Steigerung der NOS1-Expression im JGA der COX-2-/- Mäuse führen wurden verschiedene experimentelle Ansätze gewählt. Ein Ansatz beruht auf der Tatsache, dass die Nierenentwicklung in der

Maus mit der Geburt noch nicht abgeschlossen ist und dass es noch bis zum 7. Lebensstag zur Induktion und Entwicklung neuer Glomeruli kommt [179]. Die Entwicklungsstörung der COX-2<sup>-/-</sup> Mäuse ist dadurch gekennzeichnet, dass insbesondere diese postnatale Entwicklungsphase unterbrochen zu sein scheint, und erste Unterschiede in der Morphologie der Nieren in früheren Studien erst ab dem 10. postnatalen Tag nachgewiesen werden konnten [100]. Bei der Messung der mRNA Konzentration von NOS1 in COX-2-defizienten Mäusen mittels *real time PCR* wurde eine Steigerung der NOS1-mRNA Expression ab dem dritten Lebensstag beobachtet [161]. Dies weist auf eine funktionelle Genese der gesteigerten NOS1-Expression hin.

In einem weiteren experimentellen Ansatz wurde ein Zellkulturmodell von immortalisierten Maus-Macula densa-Zellen untersucht [45]. Dabei zeigte sich ein inhibitorischer Effekt von PGE<sub>2</sub>, dem mutmaßlichen Hauptprodukt von COX-2 am JGA [45, 188], auf die Expression von NOS1. Dieser Effekt wird vermutlich über eine Steigerung der cAMP Konzentration in der Macula densa-Zelle vermittelt [161].

### 5.3.3 Expression von Renin in COX-2<sup>-/-</sup> Mäusen

In den 3 Monate alten COX-2<sup>-/-</sup> Mäusen wurde eine signifikant verminderte Fraktion Renin-immunreaktiver JGA gefunden. Dieses Resultat bestätigt das Konzept einer Stimulation der Expression von Renin durch COX-2-abhängig gebildete Prostaglandine [97, 189]. So konnte für eine Reihe experimenteller Bedingungen, die mit einer Stimulation des RAAS einhergehen, auch eine gesteigerte Expression von COX-2 nachgewiesen werden. Dies betrifft vor allem experimentelle Bedingungen, die zu einer Stimulation des RAAS über den Macula densa-Mechanismus führen. Zu diesen Bedingungen gehören eine alimentäre Salzrestriktion, eine Blockade des NKCC2 mittels Furosemid oder Bumetanid, eine unilaterale Nierenarterienstenose, sowie eine Inhibition des RAAS mit ACE Inhibitoren oder AT1 Antagonisten [87, 93]. Für eine Reihe der genannten Konditionen konnte außerdem nachgewiesen werden, dass eine Stimulation des RAAS durch Inhibition von COX-2 reduziert oder ganz verhindert werden kann [189, 190]. In der bestehenden Literatur finden sich jedoch auch widersprechende Resultate, die zur Zeit unerklärt sind [191].

#### *5.3.4 Renale Morphologie in 12 Monate alten COX-2-/- Mäusen*

Die Untersuchung der glomerulären Morphologie der 12 Monate alten COX-2-defizienten Mäuse zeigte ausgeprägte sklerotische Veränderungen der juxtamedullär gelegenen Glomeruli. Das Ausmaß dieser Veränderungen reichte von Zeichen einer mesangialen Matrixvermehrung und Anheftungen des Kapillarknäuels an das parietale Blatt der Bowman Kapsel bis hin zur Bildung typischer sklerotischer Halbmonde und globaler Sklerosierung. Die Morphologie dieser Läsionen erfüllte die Kriterien einer sekundären fokal segmentalen Glomerulosklerose [192, 193].

Die Entwicklung dieser morphologischen Veränderungen steht am Ende einer ganzen Reihe von Nierenerkrankungen [194]. Dabei sind die morphologischen Schäden nicht spezifisch kausal. Das etablierte Modell zum Studium der Folgen einer reduzierten Nierenmasse ist das Modell der 5/6 nephrektomierten Ratte. In diesem Modell wird durch eine einseitige Nephrektomie und eine anschließende 2/3 Resektion der anderen Niere die Menge des vorhandenen Nierenparenchyms stark reduziert. Direkt im Anschluss an die Reduktion kommt es zunächst zu einer Phase mit einer eingeschränkten Autoregulation der renalen Perfusion. Dadurch wird der systemische Blutdruck nicht mehr durch die präglomerulären Widerstandsgefäße abgeschwächt, und es kommt durch Steigerung des Filtrationsdrucks zu einer glomerulären Hypertonie und Hyperfiltration. Diese Effekte werden durch lokal produzierte vasodilatierende Prostaglandine ausgelöst, und eine unspezifische Inhibition der Prostaglandinbildung durch Indometacin normalisiert die Autoregulation [101]. Persistiert die Hyperfiltration über längere Zeit, treten kompensatorische Wachstumsvorgänge auf, die zur Hypertrophie der verbliebenen Nephrone führen [102]. Nach Ausbildung dieser hypertrophischen Veränderungen kommt es zu einer vorübergehenden Phase mit nur minimalen histologischen Veränderungen und kompensierter Retention [105, 195]. Im Anschluss an diese Phase beginnt dann die Entwicklung glomerulosklerotischer Veränderungen, welche letztendlich zum Verlust des gesamten Nephrons führen. Auch bei der Entstehung der sklerotischen Veränderungen sind Prostanoiden beteiligt, und die verantwortliche Cyclooxygenase-Isoform ist COX-2 [103, 104]. Die Beobachtung glomerulosklerotischer Läsionen in den alten COX-2-defizienten Mäusen weist daher auf eine multifaktorielle Genese der Schädigung hin.

Grundvoraussetzung für die Entwicklung der glomerulären Hypertrophie und Glomerulosklerose ist eine Aufhebung der Autoregulation und die damit verbundene glomeruläre Hyperfiltration. NO ist ein effektiver Vasodilatator am JGA und eine Applikation von NO schwächt die TGF Antwort ab [196]. Die Beobachtung einer massiv gesteigerten NOS1-Expression im JGA der hypertrophierten Glomeruli macht daher eine ursächliche Beteiligung dieses Enzyms an der Pathogenese der Glomerulosklerose wahrscheinlich. Ein Beweis für diese postulierte Rolle von NOS1 kann mit den vorgelegten Experimenten jedoch nicht erbracht werden.

#### **5.4 Effekt einer antioxidativen Behandlung auf Blutdruck und oxidativen Stress sowie die Expression von NOS1, COX-2 und Renin im JGA von SHR und WKY**

##### *5.4.1 Effekt von Apocynin auf die Ausscheidung von 8-Isoprostan $F2\alpha$ im Urin von SHR und WKY*

Die Ausscheidung von 8-Isoprostan  $F2\alpha$  im Urin wurde in verschiedenen Studien an Tiermodellen und am Menschen als Marker für die systemische Produktion von Sauerstoffradikalen verwendet (Übersicht in [118]). In einer Studie an SHR fanden die Autoren eine vermehrte Ausscheidung von 8-Iso-Prostaglandin  $F2\alpha$  im Urin von SHR [123]. In dieser Studie wurde desweiteren gezeigt, dass die zweiwöchige systemische Administration des membranpermeablen SOD Analogon TEMPOL zu einer signifikanten Reduktion der Ausscheidung um 39% führt [123]. Die Autoren folgerten aus diesen Resultaten, dass die systemische Konzentration von Sauerstoffradikalen in den SHR erhöht ist und dass die Applikation von TEMPOL zu einer Verminderung dieser Konzentration führt. In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen zeigte sich auch in der hier vorgelegten Studie eine vermehrte Isoprostanausscheidung in den SHR. Diese wurde durch die Behandlung der Tiere mit Apocynin um 42% vermindert. Die Behandlung mit Apocynin reduzierte die Ausscheidung von Isoprostanen also in ähnlichem Ausmaß wie die Behandlung mit TEMPOL. Dieses Resultat kann als Hinweis auf die Wirksamkeit der Behandlung gewertet werden. Folgt man der Interpretation der TEMPOL Resultate, so ergibt sich, dass die beiden Behandlungsschemata ähnlich effektiv in der Reduktion der Sauerstoffradikalbildung waren. Die antioxidative Wirkung von Apocynin in SHR wurde auch von anderen Autoren bestätigt [197, 198].

#### 5.4.2 Effekt von Apocynin auf den systolischen Blutdruck von SHR und WKY

SHR werden als Tiermodell für eine salzabhängige, hereditäre Form der essentiellen Hypertonie verwendet. In der vorliegenden Studie wurden 7 Wochen alte Tiere untersucht. Zu diesem Zeitpunkt werden die erhöhten Blutdruckwerte durch eine gesteigerte Aktivität des sympathischen Nervensystems und eine erhöhte Kontraktilität der glatten Gefäßmuskulatur aufrechterhalten. Die Komponenten des RAAS sind supprimiert [199, 200]. Die an den unbehandelten Tieren gemessenen systolischen Blutdruckwerte von 176 mmHg für SHR und 132 mmHg für WKY entsprechen den für Tiere diesen Alters publizierten Werten [83]. Trotz des Effektes auf die Isoprostankonzentration führte die Behandlung mit Apocynin nicht zu einer Reduktion der Blutdruckwerte. Dieses Ergebnis erscheint auf den ersten Blick überraschend, da die Wirksamkeit antioxidativer Behandlungsansätze in verschiedenen hypertensiven Tiermodellen inklusive der SHR experimentell gut belegt ist. Neben den schon erwähnten TEMPOL Studien konnte eine blutdrucksenkende Wirkung in SHR auch für andere Antioxidantien gezeigt werden [125, 198]. Ein Ansatz zur Erklärung der fehlenden blutdrucksenkenden Wirkung von Apocynin besteht durch die unterschiedliche Wirkungsweise der verwendeten Antioxidantien. Während Apocynin eine Inhibition der NADPH Oxidase-Enzymaktivität bewirkt und damit die Bildung von Sauerstoffradikalen verhindert, beruht der Effekt von TEMPOL und anderen Antioxidantien auf der Fähigkeit, vorhandene Radikale zu metabolisieren [125, 201]. Es wäre also möglich, dass NADPH Oxidase zwar signifikant zur Bildung von Sauerstoffradikalen beiträgt, dass diese Sauerstoffradikale jedoch nicht entscheidend an der Pathogenese der Hypertonie beteiligt sind. Hinweise für die Stichhaltigkeit dieser Hypothese finden sich in Studien von Xu und Kollegen [202]. Bei ihrem Versuch, die Sauerstoffradikal-Hypothese der arteriellen Hypertonie in DOCA-Salz Ratten in Einklang mit der vermuteten gesteigerten Aktivität des Sympathikus zu bringen, konnten die Autoren zeigen, dass TEMPOL einen signifikant inhibitorischen Effekt auf die Aktivität des sympathischen Nervensystems hat und dass die antihypertensive Wirkung von TEMPOL durch eine Blockade der sympathischen Ganglien mit Hexamethonium vermindert werden kann. Dieser Effekt ist unabhängig von einer eventuellen Steigerung der Bioverfügbarkeit von NO im peripheren Gefäßbett und in der Niere [202]. Die Autoren folgern aus diesen Studien, dass der antihypertensive Effekt von

TEMPOL hauptsächlich durch eine Verminderung des Sympathikotonus hervorgerufen wird. Die exakte Funktionsweise dieses sympatho-inhibitorischen Effektes von TEMPOL ist nicht bekannt. Vermutlich beruht er auf einer Veränderung des Gleichgewichtes von NO und ROS in den sympathischen Kernen der rostralen ventrolateralen Medulla oblongata [203]. NO-unabhängige Effekte von TEMPOL konnten auch von anderen Autoren gezeigt werden [204].

Für Apocynin konnte eine antihypertensive Wirkung in DOCA-Salz Ratten sowie in Tiermodellen von Angiotensin- und Aldosteron-induzierter Hypertonie beschrieben werden [141, 205, 206, 207]. Gemeinsames Kennzeichen dieser Tiermodelle ist, dass die Ausbildung der Hypertonie mit einer signifikanten Entzündungsreaktion verbunden ist [208, 209]. Die daraus resultierende renale Inflammation ist eine Voraussetzung für die Entwicklung hypertensiver Endorganschäden [210, 211, 212]. NADPH Oxidase ist eine notwendige Komponente des *Membrane attack* Komplexes der inflammatorischen Zellen. Eine chronische Inhibition des Enzyms während der Ausbildung der Inflammation wird daher vermutlich zu einer Verminderung der pro-fibrotischen und pro-proliferativen Effekte der Phagozyten und damit auch zu einer sekundären Verminderung der Hypertonie führen [213, 214, 215]. Eine signifikante renale Entzündungsreaktion ist bei den SHR jedoch erst ab der 30. Lebenswoche nachweisbar [216]. Der renale Effekt von Apocynin in den 10 Wochen alten SHR beruht daher auf einer Blockade der NADPH Oxidase in ortständigen Phagozyten und nichtinflammatorischen Zellen [106, 107, 108]. Demzufolge ist in den SHR ein ähnlich ausgeprägter antihypertensiver Effekt von Apocynin wie er bei den oben genannten Tiermodellen beobachtet wird nicht zu erwarten.

#### *5.4.3 Effekt von Apocynin auf die Macula densa-assoziierte Expression von NOS1 in SHR und WKY*

Die in der vorliegenden Studie beschriebene vermehrte Expression von NOS1 im JGA von SHR bestätigt eine Reihe früherer Beobachtungen [125, 217]. In den jungen SHR konnte außerdem auch eine gesteigerte Expression von NOS2 und NOS3 nachgewiesen werden, und auch die Ausscheidung der NO-Abbauprodukte Nitrat und Nitrit im Urin war erhöht [125, 217]. In unserer Studie führte die Behandlung mit Apocynin zu einer signifikanten Verminderung der Anzahl NOS1-

immunreaktiver Macula densa-Zellen im JGA der SHR. Damit entsteht ein Widerspruch zu der oben erwähnten Studie von Vaziri und Kollegen [218]. In dieser Studie führte die chronische Behandlung junger SHR mit dem Antioxidans Lazaroid (Desmethyltirilazad) nicht zu einer Verminderung der NOS1-Proteinmenge im Extrakt kompletter Nieren. Die Expression der anderen NOS-Isoformen war dagegen deutlich vermindert [125]. Bei der Interpretation dieser Resultate muss man jedoch Unterschiede in der Methodik der Messung der NOS-Proteinmenge berücksichtigen. Zusätzlich zu den Zellen der Macula densa wird NOS1 auch noch in verschiedenen anderen epithelialen und vaskulären Strukturen der Niere exprimiert. Insbesondere in der renalen Medulla finden sich hohe Konzentrationen des Enzyms. Das an dieser Stelle gebildete NO ist offenbar an der Regulation epithelialer Transportvorgänge beteiligt und steigert die medulläre Perfusion [219]. Über die physiologische Regulation von NOS in diesen Zellen ist wenig bekannt, es ist aber anzunehmen, dass sie unabhängig von der Macula densa erfolgt [220]. Zieht man nun in Betracht, dass die Anzahl der Macula densa-Zellen im Vergleich zur Gesamtzahl NOS1-produzierender Zellen in der Niere gering ist [166], so erscheint es denkbar, dass selbst größere Veränderungen der NOS1-Expression in der Macula densa im Extrakt kompletter Nieren der Detektion entgehen. Die von uns verwendete Methode der Quantifizierung einzelner immunreaktiver Macula densa-Zellen und die Normalisierung der gewonnenen Daten mit der Anzahl der durch den Schnitt getroffenen Glomeruli ermöglicht dagegen eine gezielte Beurteilung der Veränderungen der Expression in der Macula densa [13, 81].

Die Auswirkung von Apocynin auf die renale Expression von NOS1 ist bisher nicht untersucht worden. Studien, die den Einfluss von Apocynin auf die Expression und Aktivität von NOS3 untersuchen kommen zu unterschiedlichen Ergebnissen. So führt die Behandlung in diabetischen Tieren und in DOCA-Salz Ratten zur Reduktion einer initial erhöhten NOS3-Expression [221, 222]. Dagegen wird in Dahl-salzsensitiven hypertensiven Ratten die normalerweise verminderte Expression von NOS3 gesteigert [223]. Der Mechanismus, über den Apocynin eine Suppression der renalen NOS1-Expression auslöst, ist nicht bekannt. Geht man jedoch davon aus, dass Apocynin zu einer Steigerung der Menge von verfügbarem NO führt, so ergeben sich verschiedene Erklärungsmöglichkeiten.

NO hat eine inhibitorische Wirkung auf die Expression von NOS [165]. Dieser Effekt wird entweder über den lösliche Guanylatzyklase-cGMP Signal-Transduktionsweg [122] oder über eine Steigerung der PGE Produktion durch COX-Isoformen vermittelt [161]. Andererseits könnte auch der Prozess der temporalen Adaptation des TGF herangezogen werden. Eine Steigerung der verfügbaren NO-Menge am JGA führt zu einer Dilatation der afferenten Arteriole und damit zu einer Steigerung der SNGFR. Die daraus resultierende Vermehrung der NaCl-Zufuhr zur Macula densa würde dann ebenfalls eine Verminderung der Synthese von NOS1 nach sich ziehen.

#### *5.4.4 Effekt von Apocynin auf die Macula densa-assoziierte Expression von COX-2 in SHR und WKY*

Frühere Studien an SHR zeigen, dass die renale Prostaglandinsynthese und die Prostaglandinausscheidung im Urin gesteigert ist [224]. Der größte Teil der COX-Aktivität ist jedoch auf die renale Medulla konzentriert, wo sowohl COX-1 als auch COX-2 in großen Mengen exprimiert werden [224]. Dies bedeutet, dass die mit dem Urin ausgeschiedene Prostaglandinmenge nicht notwendigerweise mit der Prostaglandinproduktion am JGA korreliert. Messungen der kortikalen COX-2-Expression in SHR fehlen weitgehend [225].

In der hier vorliegenden Studie fand sich eine im Vergleich zu den Kontrolltieren niedrige basale Expression von COX-2 im JGA der SHR. Diese wurde durch die Behandlung mit Apocynin nicht beeinflusst. Die Ursachen für die Suppression der COX-2-Expression in den unbehandelten SHR sind nicht bekannt. Gegen eine direkte inhibitorische Wirkung der ROS auf die Synthese von COX-2 sprechen Resultate einer Studie von Li und Kollegen [226], in der die kortikale Expression von COX-2 in diabetischen Ratten durch die Behandlung mit einem Antioxidans vermindert wurde. Auch eine Suppression der COX-2-Expression durch Mineralokortikoide [62] ist unwahrscheinlich, da SHR mit etablierter Hypertonie verminderte Plasmakonzentrationen dieser Hormone aufweisen [227]. In einer Studie von Höcherl und Kollegen konnten die Autoren zeigen, dass eine Interferenz mit der Innervation der Niere keinen Einfluss auf die renale Expression von COX-2 hat [228]. Der gesteigerte Sympathikotonus der SHR ist daher vermutlich ebenfalls nicht für die beobachtete Suppression der COX-2-Expression im JGA verantwortlich.



Die niedrige basale COX-2-Expression im JGA der SHR könnte theoretisch auch auf eine inhibitorische Wirkung der Hypertonie auf die Expression von COX-2 zurückzuführen sein. So zeigen z.B. die dem hohen Blutdruck ausgesetzten kontralateralen Nieren des Goldblatt-Modells eine verminderte Expression von COX-2 [87]. Im Gegensatz zu den SHR ist dieses Modell allerdings durch eine Aktivierung des RAAS gekennzeichnet [83, 229]. Die verminderte Expression von COX-2 kann daher durch die inhibitorische Wirkung erhöhter Ang II Konzentrationen erklärt werden [230]. Der Mechanismus einer etwaigen Inhibition der COX-2-Expression durch hypertensive Blutdruckwerte bleibt daher unklar.

In verschiedenen Studien konnte eine stimulierende Wirkung von NO auf die Expression von COX-2 in der Niere gezeigt werden [85, 231]. Läßt man die bereits diskutierten widersprechenden Studien [87, 89] außer acht, so könnte man die verminderte COX-2-Expression in den SHR auch mit der verminderten NO-Wirkung im JGA der Tiere erklären [121]. Die Beobachtung einer unveränderten COX-2-Expression im JGA der mit Apocynin behandelten SHR würde in diesem Falle gegen eine gesteigerte Verfügbarkeit von NO in den behandelten Tieren sprechen.

#### *5.4.5 Effekt von Apocynin auf die JGA-assoziierte Expression von Renin und die Aktivität des systemischen RAS von SHR und WKY*

Die Frage nach der Aktivität des RAS in SHR wird in der Literatur kontrovers diskutiert [83, 232, 233]. In der hier vorliegenden Studie zeigte sich eine sehr niedrige basale PRA, eine reduzierte Fraktion Renin-mRNA-exprimierender JGA sowie eine ebenfalls reduzierte Anzahl von JGA mit Renin-IR. Diese Resultate stimmen mit Studien überein, in denen eine Suppression der PRA in 14-16 Wochen alten SHR gefunden wurde [234]. Die Suppression des RAAS in den jungen SHR wurde von den Autoren dieser früheren Studien als kompensatorische Reaktion auf den hohen Blutdruck gedeutet. Daneben gibt es eine Reihe von Studien, welche eine unveränderte oder sogar gesteigerte Aktivität des RAAS zeigen [83]. Ursachen dieser widersprechenden Angaben liegen vermutlich vor allem in technischen Details begründet. So bestand längere Zeit kein Konsens über die Auswahl der Kontrolltiere. Unterschiede in der Anästhesie, der Probengewinnung und der Messung der PRA kommen hinzu. Wie bereits in der Studie von Bagby und Kollegen gezeigt werden konnte, ist die Aktivität des sympathischen Nervensystems in den SHR stark erhöht [83]. Die Freisetzung von

Renin aus den granulären Zellen des JGA wird auch durch das sympathische Nervensystem gesteuert, und diese Steuerung erfolgt über afferente renale Nerven in einem Zeitrahmen von Minuten [235]. Dies bedeutet, dass selbst kurze Phasen gesteigerten Stresses, wie sie zum Beispiel während der Blutabnahme aus der Schwanzvene auftreten, zu einer selektiven Steigerung der PRA der SHR führen können. Verschiedene, für die Anästhesie der Tiere verwendete Substanzen steigern ebenfalls die Freisetzung von Renin [236]. Eine weitere Möglichkeit zur Erklärung der unterschiedlichen Ergebnisse findet sich in genetischen Veränderungen, welche durch den ständig fortgesetzten Prozess der Inzucht in den relativ kleinen Kolonien gefördert werden [83, 237].

Bei der Auswertung der Resultate dieser Studie zeigt sich ein diskrepanter Effekt von Apocynin auf die verschiedenen Parameter des RAS der SHR. Während die Plasmaaktivität und mRNA Expression von Renin durch die Behandlung nicht beeinflusst wurden, ist die renale Renin-IR in den behandelten SHR erniedrigt. Bei der Interpretation dieser Beobachtung muss berücksichtigt werden, dass Renin in den granulären Zellen der afferenten Arteriole gespeichert wird und die Menge an immunreaktivem Protein daher nicht notwendigerweise die aktuelle Intensität der Renin-Expression widerspiegelt. Zur Beurteilung der Effekte am JGA scheint daher die direkte Messung der Renin-mRNA Expression der geeignete Parameter zu sein.

Der stimulierende Effekt von NO auf die Expression und Exkretion von Renin wurde in einer Reihe von Studien in verschiedenen Tiermodellen dokumentiert (Übersicht in [235]). Die stark suppressierte PRA in den hier beschriebenen SHR könnte daher durch den mangelnden Effekt von NO am JGA erklärt werden [82, 238]. Folgt man diesem Interpretationsansatz, würde der fehlende Effekt von Apocynin auf Expression und Freisetzung von Renin ebenfalls gegen eine signifikante Steigerung der NO Konzentrationen am JGA der behandelten Tiere sprechen.