

Aus der Medizinischen Klinik
mit Schwerpunkt Nephrologie und Hypertensiologie
der Medizinischen Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin
Campus Berlin-Buch

DISSERTATION

Rolle von Aldosteron beim Angiotensin II-induzierten Endorganschaden

-Untersuchung an einem transgenen Tiermodell-

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité -
Universitätsmedizin Berlin

von

Georg Hilfenhaus

aus Hannover

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. F.C. Luft
2. Prof. Dr. med. K.F. Hilgers
3. Prof. Dr. M. Gekle

Datum der Promotion: 01.12.2006

Teile dieser Arbeit sind veröffentlicht in:

Fiebeler A, Nussberger J, Shagdarsuren E, Rong S, Hilfenhaus G, Al-Saadi N, Dechend R, Wellner M, Meiners S, Maser-Gluth C, Jeng AY, Webb RL, Luft FC, Müller DN
Aldosterone Synthase Inhibitor Ameliorates Angiotensin II-Induced Organ Damage.
Circulation 2005;111(23):3087-94

ZUSAMMENFASSUNG

Hintergrund: Aldosteron (Ald) und Angiotensin (Ang) II sind an der Ausbildung des kardiovaskulären Endorganschadens beteiligt. Zirkulierendes Ald wird hauptsächlich in den Nebennieren produziert, daneben ist eine lokale Synthese u.a. im Herz beschrieben. Die Ald-Konzentration ist von der Aktivität der Ald-Synthase (CYP11B2) abhängig. Wir prüften die Hypothese, ob die Reduktion von Ald durch Hemmung der CYP11B2 oder durch Adrenalektomie (ADX) den Endorganschaden vermindert. Ferner wurde untersucht, ob lokal im Herz eine relevante Ald-Synthese stattfindet. **Methoden:** Doppeltransgene Ratten (dTGR), die das humane Renin und Angiotensinogen überexprimieren, wurden von der 4. bis zur 7. Woche mit dem CYP11B2-Hemmer FAD286 oder mit Losartan (Los) behandelt. Eine weitere Tiergruppe wurde adrenalektomiert und erhielt zusätzlich Dexamethason (Dex) und 1% Salz. Dex- und Salz-behandelte dTGR dienten als Kontrollgruppe im ADX-Protokoll. **Ergebnisse:** Unbehandelte dTGR entwickelten eine Hypertonie, einen kardialen und renalen Schaden und wiesen eine 40%-Mortalität (5/13) nach 7 Wochen auf. FAD286 senkte die Mortalität auf 10% (1/10) und verminderte die Herzhypertrophie, Albuminurie, Zellinfiltration und Matrixablagerung in Herz und Niere. FAD286 hatte keinen Einfluß auf den Blutdruck nach 5 und 6 Wochen und senkte diesen leicht zur 7. Woche (177 ± 6 in dTGR+FAD286 und 200 ± 5 mmHg in dTGR). Los normalisierte den Blutdruck. Zirkulierende und kardiale Ald-Spiegel waren in FAD286- oder Los-behandelten dTGR gesenkt. ADX kombiniert mit Dex- und Salz-Behandlung senkte zirkulierendes und kardiales Ald auf kaum messbare Spiegel. In der 7. Woche hatten ADX-dTGR-Dex-Salz eine 22%-Mortalität verglichen mit 73% bei dTGR-Dex-Salz. Beide Gruppen waren in gleicher Weise hypertensiv (190 ± 9 und 187 ± 4 mmHg). Im Gegensatz dazu waren der kardiale Hypertrophie-Index, die Albuminurie, Zellinfiltration und Matrixablagerung nach ADX ($p < 0.05$) signifikant reduziert. **Schlussfolgerungen:** Ald spielt eine Schlüsselrolle in der Pathogenese des Ang II-induzierten Endorganschadens. Sowohl FAD286 als auch ADX senkten zirkulierende und kardiale Ald-Spiegel. Unsere Ergebnisse zeigen, dass das in den Nebennieren produzierte Ald die hauptsächliche Quelle für kardiales Ald darstellt.

Schlüsselworte: Aldosteron ▪ Angiotensin ▪ Herzinsuffizienz ▪ Renin ▪ Entzündung

ABSTRACT

Background: Aldosterone (Ald) and angiotensin (Ang) II both cause end-organ damage. Circulating Ald is produced in the adrenals; however, local cardiac synthesis has been reported. Ald concentration depends on the activity of Ald synthase (CYP11B2). We tested the hypothesis that reducing Ald by inhibiting CYP11B2 or by adrenalectomy (ADX) may ameliorate organ damage. Furthermore, we investigated if a significant Ald-synthesis takes place in the heart. **Methods:** Transgenic rats overexpressing both the human renin and angiotensinogen genes (dTGR) were treated with the CYP11B2 inhibitor FAD286 or losartan (Los). In protocol II, dTGR were adrenalectomized and received dexamethason (Dex) and 1% salt. Dex-treated dTGR-salt served as a control group in the ADX protocol. **Results:** Untreated dTGR developed hypertension, cardiac, and renal damage and a 40% mortality (5/13) at 7 weeks. FAD286 reduced mortality to 10% (1/10), ameliorated cardiac hypertrophy, albuminuria, cell infiltration, and matrix deposition in the heart and kidney. FAD286 had no effect on BP at week 5 and 6, but slightly reduced BP at week 7 (177±6 in dTGR+FAD286 and 200±5 mm Hg in dTGR). Los normalized BP during the entire study. Circulating and cardiac Ald levels were reduced in FAD286 or Los-treated dTGR. ADX combined with dex and salt treatment decreased circulating and cardiac Ald to barely detectable levels. At week 7, ADX-dTGR-dex-salt had a 22% mortality compared to 73% in dTGR-dex-salt. Both groups were similarly hypertensive (190±9 and 187±4 mm Hg). In contrast, cardiac hypertrophy index, albuminuria, cell infiltration, and matrix deposition were significantly reduced after ADX ($p<0.05$). **Conclusion:** Ald plays a key role in the pathogenesis of Ang II-induced organ damage. Both FAD286 and ADX reduced circulating and cardiac Ald levels. Our results show that Ald produced in the adrenals is the main source for cardiac Ald.

Key Words: aldosterone ▪ angiotensin ▪ heart failure ▪ renin ▪ inflammation

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG	1
1.1 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)	1
1.2 Aldosteron und sein Rezeptor	3
1.3 Lokale Aldosteronsynthese	8
1.4 Rolle des RAAS bei der Entwicklung von Organschäden	9
1.5 Das dTGR-Rattenmodell	12
1.6 Blockade der Wirkung von Aldosteron	13
1.6.1 Aldosteron-Antagonisten	14
1.6.2 Adrenalectomie (ADX)	15
1.6.3 Der Aldosteron-Synthase-Hemmer FAD286	15
1.7 Fragestellung	17
1.7.1 Welche Rolle spielt Ald beim Ang II-induzierten Endorganschaden?	17
1.7.2 Findet im Herz eine relevante lokale Ald-Synthese statt?	17
2 MATERIAL UND METHODEN	19
2.1 Materialien	19
2.2 Tierversuch	21
2.2.1 Tiere, Tierhaltung und Diät	21
2.2.2 Behandlungsprotokolle	21
2.2.3 ADX-Operation	23
2.2.4 Messung des Blutdrucks	23
2.2.5 Transthorakale Echokardiographie	23
2.3 Biochemische und hormonelle Messungen	24
2.3.1 Messung der renalen Albuminausscheidung	24
2.3.2 Messung von Renin, Kortikosteron und Aldosteron	24
2.4 Immunhistochemie	25
2.4.1 Entnahme der Organe	25
2.4.2 Färbungen	25
2.5 RT-PCR (<i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>)	26
2.5.1 RNA-Extraktion	26
2.5.2 Reverse Transkription	27
2.5.3 TaqMan RT-PCR	28
2.5.4 RT-PCR mittels SYBRGreen	29
2.6 Statistik	30

3	ERGEBNISSE	31
3.1	Einfluss von FAD286 auf die Plasma-Renin-Aktivität	31
3.2	Einfluss von FAD286 und Losartan auf Mortalität und Organschaden in dTGR (Protokoll I)	32
3.2.1	Mortalität in Protokoll I	32
3.2.2	Blutdruck in Protokoll I	33
3.2.3	Herzfunktion in Protokoll I	34
3.2.4	Nierenfunktion in Protokoll I	39
3.3	Einfluss der Adrenalectomie (ADX) auf Mortalität und Organschaden in dTGR (Protokoll II)	43
3.3.1	Mortalität in Protokoll II	44
3.3.2	Blutdruck in Protokoll II	45
3.3.3	Herzfunktion in Protokoll II	45
3.3.4	Nierenfunktion in Protokoll II	50
3.4	Einfluss der zusätzlichen Gabe von FAD286 bei adrenalectomierten dTGR (Protokoll III)	53
3.4.1	Mortalität, Blutdruck und Nierenfunktion in Protokoll III	53
3.4.2	Herzfunktion in Protokoll III	53
3.5	Einfluss von FAD286 und Losartan auf die Spiegel von Ald, Renin und Kortikosteron	55
3.5.1	Einfluss von FAD286 und Losartan auf plasmatisches und kardiales Ald	55
3.5.2	Einfluss von FAD286 und Los auf Renin und Kortikosteron im Plasma	56
3.6	Einfluss der ADX auf die Spiegel von Ald, Renin und Kortikosteron	56
3.6.1	Einfluss der ADX auf plasmatisches und kardiales Ald	56
3.6.2	Einfluss der ADX auf Renin und Kortikosteron im Plasma	58
3.7	Kardiale mRNA-Expression von CYP11B2, MR und 11 β -HSD2	58
4	DISKUSSION	59
4.1	Rolle von Ald am Ang II-induzierte Endorganschaden	59
4.1.1	Einfluss von FAD286 und ADX auf den Blutdruck	60
4.1.2	Einfluss von FAD286 und ADX auf die Herzhypertrophie	61
4.1.3	Einfluss von FAD286 und ADX auf die Herzfibrose	62
4.1.4	Einfluss von FAD286 und ADX auf den Nierenschaden	64
4.1.5	Einfluss von FAD286 und ADX auf die Entzündungszellinfiltration	67
4.1.6	Interaktion von Ald mit Ang II bei der Entwicklung des Organschadens	69
4.2	Lokale Synthese von Ald im Herz	71
4.2.1	Einfluss von Salz auf die Ald-Spiegel in Herz und Plasma	73
4.2.2	Kardiale Extraktion von zirkulierendem Ald	74
4.2.3	Schlussfolgerung zum kardialen Ald	75
5	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	77
6	LITERATURVERZEICHNIS	79
7	DANKSAGUNG	
	LEBENS LAUF	

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

11 β HSD2	11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 2
ACE	<i>angiotensin converting enzyme</i>
ACTH	adrenokortikotropes Hormon
ADX	Adrenalektomie
Ald	Aldosteron
Ang II	Angiotensin II
ANP	atriales natriuretisches Peptid
AOGEN	Angiotensinogen
APAAP	Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase
AT ₁ / AT ₂	Angiotensin-II-Rezeptor-Typ I bzw. II
cDNA	komplementäre DNA
C _T -Wert	<i>cycle threshold</i>
CYP11B2	Aldosteron-Synthase
DEX	Dexamethason
dTGR	doppeltransgene Ratte
EF	Ejektionsfraktion
ENaC	epithelialer Natriumkanal
Los	Losartan
MHC	<i>myosin heavy chain</i>
MR	Mineralokortikoid-Rezeptor
NaCl	Natriumchlorid
PAI-1	Plasminogen Aktivator Inhibitor-1
PRA	Plasma-Renin-Aktivität
PRC	Plasma-Renin-Konzentration
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RE	relative Einheiten
Ren	Renin
RIA	Radioimmunoassay
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	<i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>
SHRSP	<i>stroke-prone spontaneously hypertensive rats</i>
Tab	Tabelle
TGF- β 1	<i>transforming growth factor- β1</i>
vs.	versus
VSMC	<i>vascular smooth muscle cells</i>
WKY	Wistar-Kyoto-Ratten

Abb.	Abbildung
mRNA	Messenger-RNA
n	Anzahl
NF- κ B	<i>nuclear factor-kappa B</i>
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
TBS	<i>tris buffered saline</i>

1 EINLEITUNG

Herz-Kreislauf-Erkrankungen gehören weltweit zu den häufigsten Todesursachen, weshalb die Aufdeckung neuer therapeutischer Ansätze von hohem Interesse ist. Während Angiotensin II (Ang II) schon länger als schädigender Faktor in der Entwicklung von kardiovaskulären Erkrankungen bekannt war und Ang II-blockierende Medikamente seit der Veröffentlichung der CONSENSUS-Studie 1988 und der SOLVD-Studie 1991 zur Standardtherapie der Herzinsuffizienz gehören^{1,2}, ist das durch Ang II regulierte Aldosteron (Ald) erst in den letzten Jahren in den Mittelpunkt intensiver Herz-Kreislauf-Forschung gerückt. 1999 belegte die RALES-Studie (Randomized ALdactone Evaluation Study) erstmals einen eindeutigen therapeutischen Nutzen des Ald-Rezeptor-Blockers Spironolakton bei Patienten mit schwerer Herzinsuffizienz³. Es wurde die Frage aufgeworfen, ob nicht ein Großteil des Nutzens von Ang II-blockierenden Medikamenten wie ACE-Hemmern oder AT₁-Blockern einer Senkung der Ald-Ausschüttung zuzuschreiben sei. Ald, das bis zu diesem Zeitpunkt vor allem als klassisches Hormon der Nierenregulation bekannt war, wurde nun in Zusammenhang mit verschiedenen Krankheitsprozessen wie Fibrose, Hypertrophie und Inflammation gestellt. Bis heute sind immer noch viele Pathomechanismen, über die Ald Anteil an der Entstehung verschiedener Organschäden nimmt, unzureichend geklärt.

Diese Arbeit untersucht anhand eines transgenen Tiermodells, welche Rolle Ald bei der Entwicklung des Ang II-induzierten Organschadens spielt. Dabei wird auch die Frage behandelt, ob das Herz selbst Ald produziert und ob einer solchen kardialen Synthese eine pathophysiologische Bedeutung zukommt.

1.1 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)

Das RAAS spielt eine zentrale Rolle in der Regulation von Salzhaushalt und Blutdruck. Renin steuert die Bildung von Angiotensin I, das durch ACE (*angiotensin-converting-enzyme*) zu Ang II umgewandelt wird. Ang II wiederum stellt den Hauptstimulus der adrenalen Ald-Synthese dar.

Renin wird in den Granulazellen des juxtaglomerulären Apparates der Niere synthetisiert. Durch verschiedene Stimuli, wie niedrige Natriumkonzentration im Primärharn, Blutdruckabfall in den Nierenarterien oder Aktivitätssteigerung der sympathischen Nierennervenfasern, wird Renin vermehrt aus den juxtaglomerulären Zellen der Niere in den systemischen Kreislauf abgegeben.

Zusätzlich führt ein sinkender Ang II-Spiegel über einen negativen Feedback-Mechanismus zu einer gesteigerten Reninsekretion. Renin ist ein katalytisches Hormon, das aus dem überwiegend in der Leber gebildeten Angiotensinogen (AOPEN) das Dekapeptid Angiotensin I abspaltet. Vom Angiotensin I wird durch das Enzym ACE das physiologisch wirksame Oktapeptid Ang II abgespalten. ACE ist ein vorwiegend endothelial-gebundenes Enzym mit besonders hoher Konzentration in der Lunge. Zwei verschiedene Angiotensin-Rezeptoren (AT₁ und AT₂) sind bekannt, über die Ang II als Ligand seine verschiedenen physiologischen Funktionen vermittelt. Ang II wirkt vasokonstriktorisch und erhöht damit den peripheren Gefäßwiderstand. Es steigert die Natriumresorption direkt am proximalen Tubulus und verstärkt die ADH-Freisetzung aus dem Hypophysenhinterlappen, wodurch die Wasser-Reabsorption in den Sammelrohren der Niere erhöht wird. Zudem löst es im Hypothalamus den Durstmechanismus aus und steigert zusätzlich den Salzappetit. Die Ald-Sekretion wird durch Ang II maßgeblich reguliert, da Ang II den Hauptstimulus der Ald-Synthese in den Nebennieren darstellt. Hohe Ang II-Spiegel erzeugen also auch hohe Ald-Spiegel. Ald wiederum verhindert den renalen Salzverlust und fördert die Kaliumausscheidung der Niere. Die erhöhte Natriumkonzentration im Extrazellulärraum führt zu einer Expansion des Extrazellulär- und des Intravasalvolumens. Über diese Ang II- und Ald-induzierten Wirkmechanismen kommt es bei einem aktivierten RAAS zu einer Blutdruckerhöhung (Abb. 1).

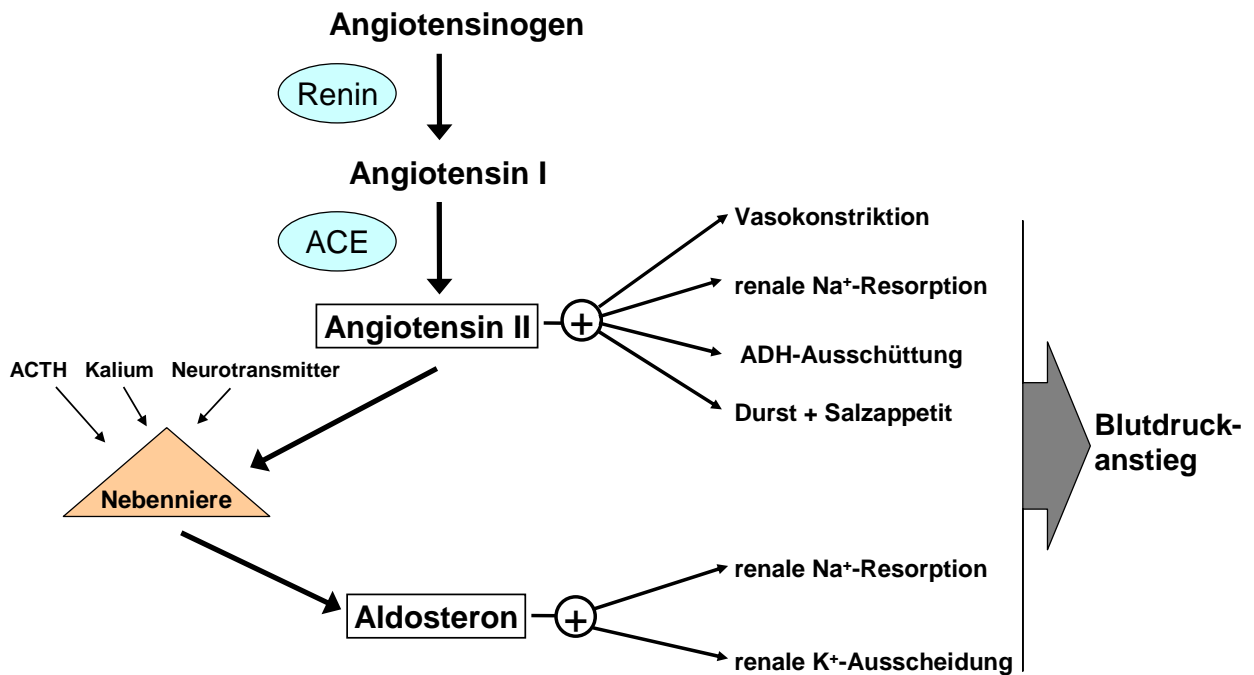


Abb. 1: Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System. Ang II ist der Hauptstimulus der adrenalen Ald-Ausschüttung. Durch Ang II und Ald kommt es über verschiedene Mechanismen zum Blutdruckanstieg.

In den letzten Jahren wurde festgestellt, dass das RAAS über die Regulation von Salzhaushalt und Blutdruck hinaus weiteren Einfluss nimmt. So treten Ang II und Ald als Mitspieler in zahlreichen proinflammatorischen und fibrotischen Signalwegen auf und wirken proliferativ an Herz und Gefäßen⁴⁻⁷.

Das oben beschriebene System wird auch als das zirkulierende RAAS bezeichnet und von einem lokalen RAAS unterschieden. So wurden Teile des Produktions- und Aktivierungsapparates des RAAS neben den klassischen Bildungsorten, wie Leber, Niere und Nebenniere, auch in weiteren Organen und Zellverbänden, wie z.B. in Herz und Gefäßen, nachgewiesen^{8,9}. Dies läßt vermuten, dass an diesen Orten Angiotensinogen bzw. Ang II und Ald lokal synthetisiert wird und direkt am Bildungsort autokrine oder parakrine Effekte vermitteln könnte. Das lokale RAAS ist in der Lage, die Gewebespiegel von Ang II und Ald um ein vielfaches im Vergleich zu den Plasmaspiegeln anzureichern. Beispielsweise ist die Ang II-Konzentration in den Nieren 1000-fach höher als im Plasma¹⁰. Die Regulation des lokalen RAAS scheint teilweise unabhängig vom zirkulierenden System stattzufinden⁸, wobei das benötigte Renin aus der Zirkulation ins Gewebe aufgenommen wird¹¹. Die Bedeutung des lokalen RAAS ist noch nicht vollständig geklärt, jedoch zeichnet sich ab, dass es u.a. eine Rolle in der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen spielen könnte^{8,12}.

1.2 Aldosteron und sein Rezeptor

Vor mehr als 50 Jahren entdeckten Sylvia Simpson und James Tait das Mineralokortikoid Aldosteron. Sie fanden im Jahre 1951 eine bisher unentdeckte Substanz mit bedeutender biologischer Aktivität im Nebennierenextrakt, der sie den Namen Electrocortin gaben¹³. Zwischen 1952 und 1953 isolierten sie 1 mg pures Electrocortin und bestimmten viele Aspekte dessen chemischer Struktur. In Zusammenarbeit mit Reichstein deckten sie schließlich 1954 die komplette Struktur auf und benannten es in Übereinstimmung mit den internationalen chemischen Klassifikationen zu Aldosteron um¹⁴.

Das in der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde produzierte Mineralokortikoid Ald wird aus Cholesterin über Pregnenolon und Progesteron zu 11-Desoxykortikosteron umgewandelt, welches wiederum zu 18-Hydroxykortikosteron und schließlich mittels der Ald-Synthase CYP11B2 zu Ald metabolisiert wird (Abb. 2). Die Ald-Synthase CYP11B2 stellt somit ein entscheidendes Glied im letzten Schritt der Ald-Synthese dar^{15,16}.

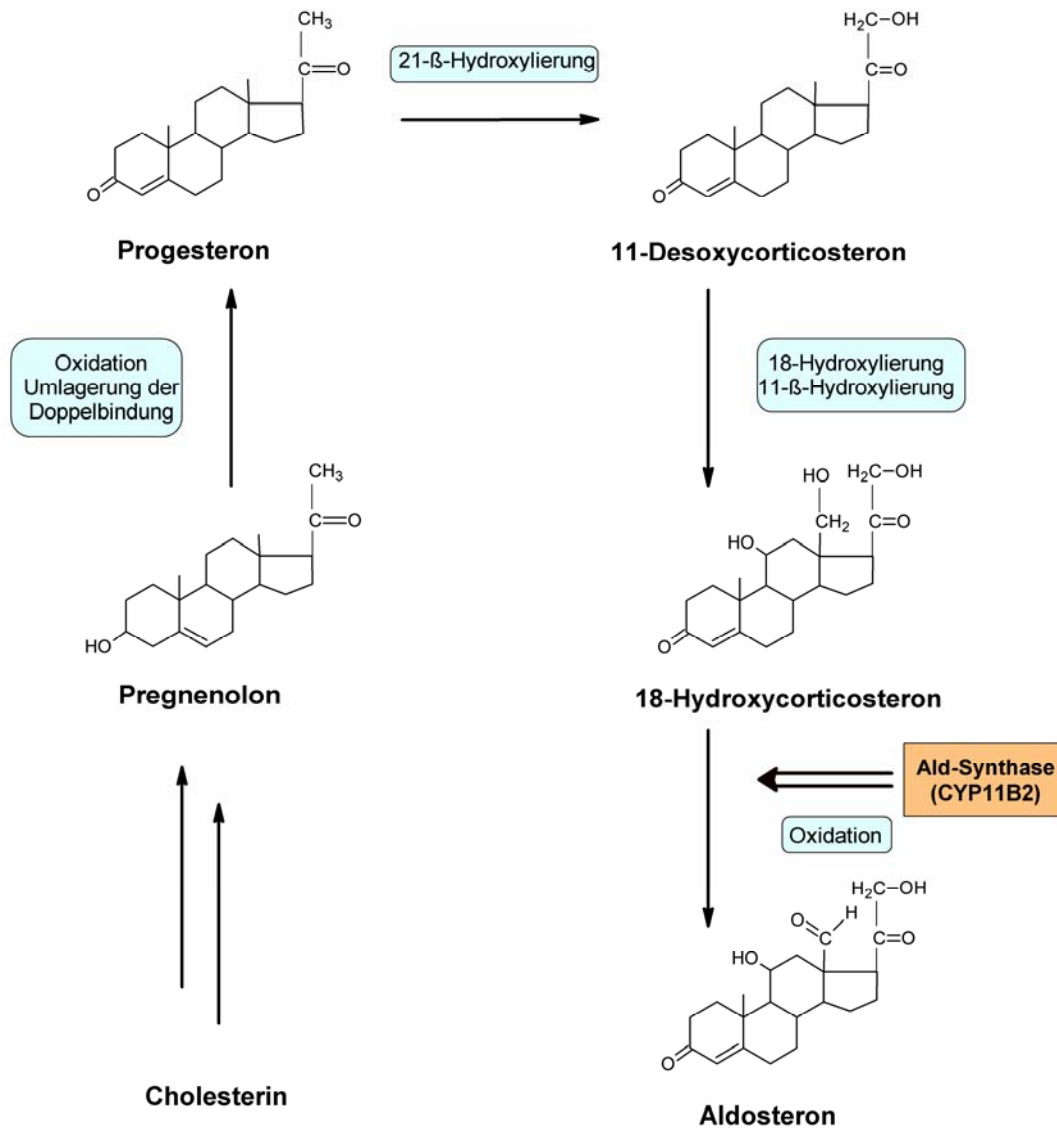


Abb. 2: Biosynthese von Aldosteron. Die Ald-Synthase CYP11B2 ist wichtig für den letzten Schritt der Biosynthese von Aldosteron.

Die adrenale Ald-Synthese wird hauptsächlich durch Ang II und Kalium, in geringerem Ausmaß durch ACTH (adrenokortikotropes Hormon) und Neurotransmitter wie Katecholamine stimuliert. Natriumretention, erhöhtes Extrazellulärvolumen und Kaliummangel supprimieren die adrenale Ald-Synthese. Zusätzlich werden dem Dopamin und dem atrialen natriuretischen Peptid (ANP) hemmende Einflüsse auf die Ald-Produktion in den Nebennieren zugeschrieben¹⁷.

Die höchste Bindungsaffinität von Ald wurde am Mineralokortikoid-Rezeptor (MR) beobachtet^{18,19}. Der MR, der u.a. im distalen Nephron der Niere exprimiert wird und der Superfamilie der Steroidhormonrezeptoren angehört, ist ein nukleärer Rezeptor, der sich im ungebundenen Zustand im Zytoplasma befindet. Nach Bindung von Ald beobachtet man die Translokation des MR-Komplexes in den Zellkern, wo er in Form eines Transkriptionsfaktors die Genexpression

moduliert und somit Einfluss auf die Biosynthese verschiedener Proteine nimmt²⁰. Neben dieser genomischen Signalübermittlung sind jedoch in den letzten Jahren auch vermehrt nicht-genomische Effekte von Ald beobachtet worden, die sich nicht mit dem Einfluss auf die Gentranskription erklären lassen. Diese Effekte sind innerhalb von 10 Minuten nachweisbar und treten damit wesentlich schneller als die klassischen genomischen Ald-Wirkungen auf. So wurde der hemmende Einfluss von physiologischen Ald-Konzentrationen auf den Natriumaustausch in Erythrozyten schon vor 40 Jahren von Spach und Streeten beschrieben²¹. Aufgrund des fehlenden Zellkerns der Erythrozyten konnte dieser Ald-Effekt nicht genomisch vermittelt sein. Weiter zeigte eine Studie an gesunden Männern, dass die Injektion von Ald innerhalb von 5 min den systemischen Gefäßwiderstand und das Herzminutenvolumen verändert, wobei das kurze Zeitintervall gegen einen genomischen Effekt spricht²². Diese schnellen nicht-genomischen Signalwege umfassen dabei die Aktivierung von Proteinkinasen wie den MAP-Kinasen (*mitogen activated protein kinase*)²³. Die Frage, ob die nicht-genomische Wirkung von Ald durch Bindung am MR vermittelt wird oder ob ein zweiter bisher unbekannter Rezeptor für Ald existiert, konnte bis heute nicht eindeutig geklärt werden²⁴. Während einige Arbeitsgruppen in Zellkulturexperimenten die rasche Ald-Wirkung mit einem MR-Blocker verhindern konnten²⁵, was für eine Signalvermittlung über den MR spricht, war dies bei anderen Gruppen nicht möglich²⁶.

Als Arriza et al. 1987 den MR klonen, fiel ihnen auf, dass Kortisol am MR über eine gleich hohe Bindungsaffinität wie Ald verfügt und somit ebenfalls als Ligand in Frage kommt²⁷. Da Kortisol im Kreislauf in einer 1000-fach höheren Konzentration als Ald vorhanden ist, würde dies bedeuten, dass der MR vorwiegend von Kortisol anstatt von Ald besetzt ist^{28,29}. Spätere Untersuchungen deckten jedoch auf, dass im epithelialen Zielgewebe von Ald das Enzym 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 2 (11 β -HSD2) Kortisol am Rezeptor zu nicht-bindungsfähigem Kortison metabolisiert^{29,30}. Dadurch bleibt die Ald-Spezifität des MR erhalten (Abb. 3).

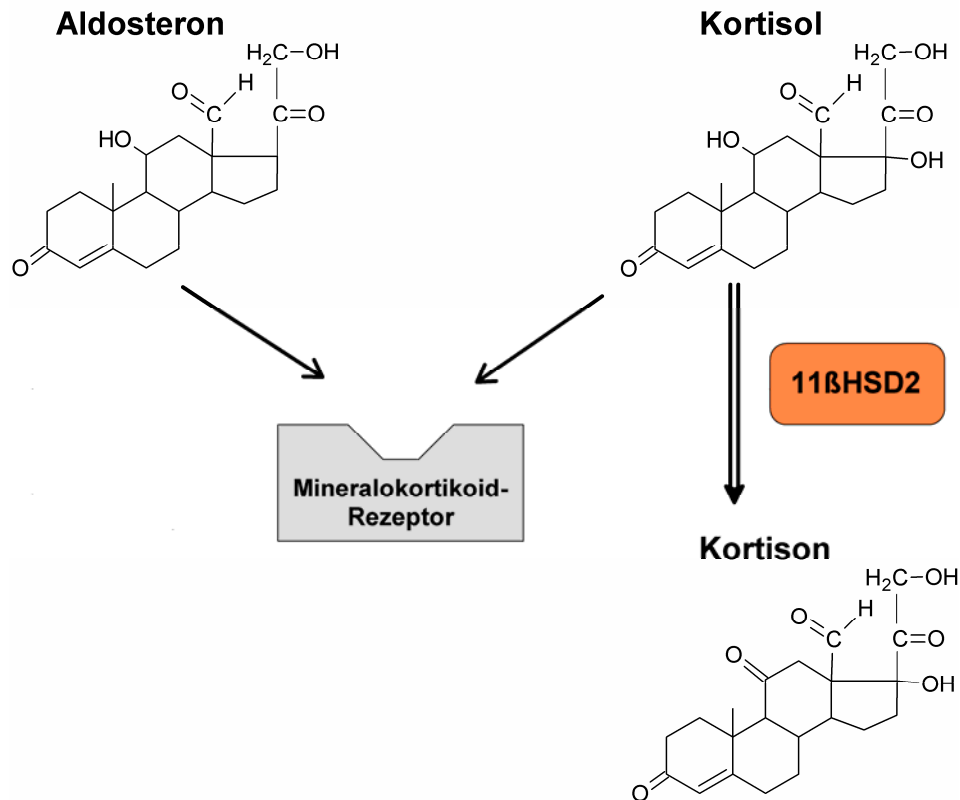


Abb. 3: Aldosteron und Körtisol konkurrieren um die Bindung am Mineralokortikoid-Rezeptor. 11β-HSD2 metabolisiert Körtisol zum am MR inaktiven Körtison.

Die wichtige Rolle von 11β-HSD2 wird auch am Beispiel des AME-Syndroms (*apparent mineralocorticoid excess syndrome*) deutlich, bei dem es durch eine Mutation im 11β-HSD2-Gen zur chronisch erhöhten MR-Aktivierung durch Körtisol mit folglich erhöhter Natriumrückresorption und Hypertonie kommt^{31,32}. Gleiches zeigt sich bei der 11β-HSD2-Blockade durch Carbenoxolon in uninephrektomierten Ratten, die ebenfalls Bluthochdruck und die beim Aldosteronismus bekannten Organschäden entwickeln³³. Während der MR im klassischen Ald-Zielgewebe durch 11β-HSD2 vor Körtisol geschützt ist, ist dies in anderen Geweben wie z.B. dem Myokard durch Fehlen der Co-Expression von MR und 11β-HSD2 nicht der Fall, wodurch es dort wahrscheinlich zur vorrangigen Bindung von Körtisol am MR kommt^{28,34}. Neuere Untersuchungen deuten jedoch darauf hin, dass Körtisol am ungeschützten MR anstelle eines Ald-imitierenden Einflusses einen antagonistischen Effekt erzeugt³⁴⁻³⁷ und es neben der 11β-HSD2 weitere Mechanismen gibt, die die MR-Selektivität für Ald unterstützen^{38,39}.

Eine besonders hohe Konzentration von Ald-Rezeptoren sind in den Epithelien von Niere, Colon, Schweiß- und Speicheldrüsen zu finden, wobei diese auch als klassische Zielgewebe für

die Mineralokortikoid-Wirkung angesehen werden⁴⁰. Hier reguliert Ald vor allem den Natriumtransport der Epithelzellen. So wird in der Niere der MR im distalen Nephron exprimiert und reguliert die Aktivität und Biosynthese des epithelialen Natriumkanals ENaC, der basolateralen Na^+/K^+ -ATPase sowie einer Reihe von Enzymen des Citratzyklus. Ald aktiviert den MR und steigert dadurch den Rückstrom von Natrium über den ENaC in die Epithelzellen des distalen Nephrons, aus denen die Natriumionen durch die basolateral liegende Na^+/K^+ -ATPase dem Blutkreislauf zugeführt werden⁴¹. Parallel zur gesteigerten Natriumretention wird osmotisch Wasser nachgezogen und über den luminalen K^+ -Kanal vermehrt Kalium ausgeschieden⁴² (Abb. 4). In den letzten Jahren sind weitere Zielproteine von Ald wie der luminalen Na^+/Cl^- -Kotransporter (NCC) erkannt worden⁴³. Damit ist der MR ein wichtiger Vermittler in der Homöostase des Wasser- und Elektrolythaushaltes. Dies wird besonders an MR-Knockout-Mäusen deutlich, die einen Pseudohypoaldosteronismus entwickeln und kurz nach der Geburt am Salzverlustsyndrom versterben⁴⁴.

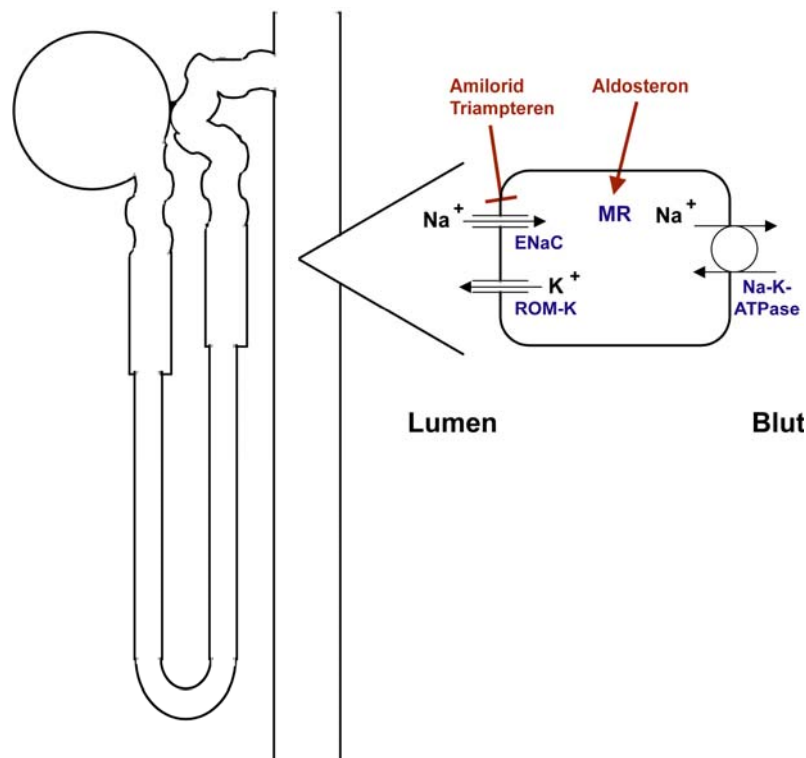


Abb. 4: Wirkung von Aldosteron im distalen Nephron. Aldosteron bindet an den Mineralokortikoid-Rezeptor (MR) und stimuliert die Synthese des epithelialen Natriumkanals (ENaC). Die ENaC-Funktion kann durch Kalium sparende Diuretika wie Amilorid und Triampteren blockiert werden. Bei der Natrium-Rückresorption im distalen Nephron sind außerdem der Kalium-Kanal (ROM-K) und die Na^+/K^+ -ATPase aktiviert. (Abb. entnommen aus⁴⁵)

Neben den klassischen epithelialen Zielgeweben wurden in den letzten Jahren auch andere nicht-epitheliale Gewebe identifiziert, die den MR exprimieren, wie bestimmte Regionen des ZNS^{46,47}, das Myokard⁴⁸⁻⁵⁰ und die Endothel- und glatten Muskelzellen der Gefäße^{51,52}. In diesen Geweben scheint die Rolle des MR und die Wirkung von Ald im Vergleich zum epithelialen Gewebe sehr unterschiedlich zu sein. So wird der MR im Myokard u.a. mit der Pathogenese der kardialen Fibrose in Zusammenhang gebracht⁵³.

1.3 Lokale Aldosteronsynthese

Während nach der Entdeckung von Ald die Nebennieren als einziger Ort der Synthese identifiziert wurden, deckten Untersuchungen der letzten Jahre auf, dass Ald möglicherweise auch außerhalb der Nebennieren in anderen Organen wie Herz, Gefäßen und Gehirn produziert wird. Diese lokale Ald-Synthese, die einen Bestandteil des lokalen RAAS darstellt, wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht. So wurde die Expression von CYP11B2, dem Schlüsselenzym der Ald-Synthese, in verschiedenen Hirnarealen von Ratten nachgewiesen und ein Einfluss von lokalem Ald auf die zerebrale Blutdruckregulation postuliert^{54,55}. Zudem fanden Gomez-Sanchez et al. geringe Mengen von Ald in den Gehirnen adrenaletomierter Ratten⁵⁶. In Blutgefäßen konnten ebenfalls Hinweise für eine lokale Ald-Synthese entdeckt werden. So exprimieren Endothelzellen und glatte Muskelzellen aus der humanen Pulmonalarterie mRNA der Ald-Synthase^{52,57} und auch in humanen Endothelzellen der Nabelvene (HVEC) wurde eine CYP11B2-Expression gefunden, die durch Vorinkubation mit Ang II stimuliert werden konnte⁵⁸. Im Perfusat isolierter Mesenterialarterien von Wistar-Kyoto-Ratten (WKY) konnte Ald nachgewiesen werden, wenn auch in wesentlich geringeren Konzentrationen als im Plasma⁵⁹. Da die Mesenterialarterien von adrenaletomierten Ratten im Vergleich zur Kontrollgruppe sogar eine höhere Ald-Konzentration im Perfusat aufwiesen, wurde auch hier auf eine lokale Ald-Produktion geschlossen. Dennoch ist die Frage nach einer vaskulären Ald-Synthese und deren physiologischen Bedeutung nicht eindeutig geklärt. So konnten Ahmad et al. die Ergebnisse von Takeda et al. an humanen vaskulären Endothelzellen nicht reproduzieren und fanden keine endotheliale CYP11B2-Expression⁶⁰.

Gegensätzliche Ergebnisse liegen vor allem zur Ald-Synthese des Herzens vor. Während in humanen RNA-Proben des gesunden adulten Herzens keine CYP11B2 mRNA nachgewiesen werden konnte^{61,62}, gelang dieser Nachweis in gesunden Rattenherzen⁶³. Zusätzlich wurde Ald und dessen Vorstufe Desoxykortikosteron sowohl im Homogenisat als auch im Perfusat von

isolierten Rattenherzen gefunden^{63,64}. Gomez-Sachez et al. adrenalektomierten gesunde Ratten und bestimmten nachfolgend die kardialen Ald-Spiegel. Dabei konnte bei 70% der Rattenherzen kein Ald nachgewiesen werden, nur bei 30% fanden sich geringe Ald-Spiegel; zusammen mit dem Befund einer extrem niedrigen CYP11B2-Expression in den Rattenherzen folgerten die Autoren, dass der weitaus größte Anteil des kardialen Ald der Zirkulation entstammt und im Herz allenfalls eine sehr geringe Ald-Synthese stattfindet⁶⁵. Vermehrte Hinweise auf eine potenzielle kardiale Ald-Produktion lassen sich im kranken Herz finden. So fanden Young et al. zwar keine CYP11B2-Expression in den Proben von gesunden Herzen, konnten jedoch CYP11B2 mRNA in Herzproben von Patienten mit Herzinsuffizienz nachweisen⁶². Mizumo et al. fanden bei herzinsuffizienten Patienten im venösen Koronarblut (Coronarsinus und Vena interventricularis) höhere Ald-Konzentrationen als im Blut der Aortenwurzel und erklärten diese Differenz mit einer lokalen Ald-Produktion im Herz⁶⁵. Demgegenüber erhoben Tsutamoto et al. bei einer vergleichbaren Studie genau entgegengesetzte Befunde^{66,67}.

Damit deuten viele Studien auf eine lokale extraadrenale Ald-Synthese in verschiedenen Organen hin, wobei insbesondere eine kardiale Ald-Produktion aufgrund gegensätzlicher Studienergebnisse bis zum jetzigen Zeitpunkt umstritten bleibt. Die möglicherweise wichtige Rolle einer lokalen Ald-Synthese wird deutlich, wenn man beachtet, dass an den Orten der lokalen Produktion parallel der MR vorhanden ist: er wird im Myokard⁴⁸⁻⁵⁰, in den Endothel- und glatten Muskelzellen der Gefäße^{51,52} und in bestimmten Regionen des ZNS^{46,47} exprimiert. Dadurch könnte lokal produziertes Ald im Rahmen des lokalen RAAS auf para- oder autokriner Ebene Signale vermitteln und evtl. auch auf pathophysiologische Prozesse Einfluss nehmen.

1.4 Rolle des RAAS bei der Entwicklung von Organschäden

Neben seiner zentralen Funktion in der Regulation von Salzhaushalt und Blutdruck scheint das RAAS auch eine bedeutende Rolle in der Entwicklung verschiedener kardiovaskulärer und renaler Krankheitsprozesse zu spielen. Dies wurde u.a. mit der Veröffentlichung der CONSENSUS-Studie 1988 und der SOLVD-Studie 1991 im Rahmen der Herzinsuffizienz offensichtlich^{1,2}. Beide Studie zeigten, dass die Gabe des ACE-Hemmers Enalapril die Mortalität bei Patienten mit schwerer Herzinsuffizienz senkt und die Herzfunktion verbessert. In den folgenden Jahren wurde das ACE-abhängige Ang II als potentieller Auslöser kardiovaskulärer Erkrankungen intensiv erforscht und neben den ACE-Hemmern die

Substanzklasse der Ang II-Rezeptor-Blocker entwickelt. Beide Medikamentengruppen wurden schließlich Teil der Standardtherapie bei Herzinsuffizienz.

Ald wurde zu diesem Zeitpunkt eine untergeordnete Rolle bei der Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen zugeschrieben. Zudem ging man davon aus, dass es durch die Gabe von ACE-Hemmern oder AT₁-Blockern über eine Suppression der Ang II-stimulierten Ald-Synthese zur parallelen Hemmung der Ald-Wirkung käme. Borghi et al. konnten jedoch an Patienten mit akutem Herzinfarkt zeigen, dass die durch die Gabe eines ACE-Hemmers anfänglich gesenkten Ald-Spiegel nach wenigen Tagen wieder anstiegen⁶⁸. Dieser sogenannte "*aldosterone escape*" wurde später auch von anderen Arbeitsgruppen im Rahmen der Herzinsuffizienz beschrieben⁶⁹. Mit der Veröffentlichung der zwei großen Studien RALES 1999 und EPHEsus 2003 wurde schließlich deutlich, dass neben Ang II auch Ald einen bedeutenden Einfluss auf die Entwicklung kardiovaskulärer Schäden nimmt. In der RALES-Studie wurde Patienten mit schwerer Herzinsuffizienz zusätzlich zur Standardtherapie der MR-Antagonist Spironolaktone verabreicht³. Die Studie wurde nach 24 Monaten vorzeitig abgebrochen, da die zusätzliche Gabe von Spironolaktone zu einer Reduktion der Mortalität um 30% geführt hatte. EPHEsus untersuchte die Effekte des selektiven MR-Antagonisten Eplerenon bei Patienten mit linksventrikulärer Dysfunktion nach akutem Herzinfarkt⁷⁰. Dabei kam es in der mit Eplerenon behandelten Gruppe ebenfalls zu einem signifikanten Abfall von Morbidität und Mortalität. Seitdem ist Ald in den Mittelpunkt intensiver Herz-Kreislauf-Forschung gerückt. Die Mechanismen, über die der schädigende Einfluss von Ald vermittelt wird, sind jedoch immer noch nicht vollständig geklärt.

Für Ang II konnten Tierstudien und Zellkulturversuche bereits eine Vielzahl von pathophysiologischen Prozessen aufdecken, über die es an der Entstehung kardiovaskulärer Schäden beteiligt ist. So kommt es bei einem aktivierten RAAS durch Ang II zur Hypertrophie von Myozyten, zu gesteigerter Kollagenablagerung mit myokardialer Fibrose und zur Apoptose in Myofibroblasten^{6,7,71}. Zusätzlich scheint Ang II seinen schädigenden Einfluss durch eine gesteigerte Expression von Matrix-Metalloproteinasen, durch verstärkten oxidativen Stress und durch eine NF-κB-vermittelte Entzündungsreaktion auszuüben^{72,73}. Neben diesen Effekten auf das Myokard ist Ang II auch an einer Schädigung der Koronargefäße beteiligt. So wurde für Ang II ein hypertrophischer, inflammatorischer und prothrombotischer Einfluss auf Koronararterien nachgewiesen⁷⁴. An Apolipoprotein E-defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass Ang II blutdruckunabhängig die Entstehung einer Atherosklerose fördert⁷⁵. Der prothrombotische Effekt von Ang II scheint u.a. über dessen Einfluss auf den Plasminogen Aktivator Inhibitor-1

(PAI-1) vermittelt zu sein. PAI-1 ist Teil des Gerinnungssystems und hemmt den Plasminogenaktivator, und damit die Fibrinolyse. Eine Studie an Patienten mit Herzinsuffizienz zeigte, dass die Gabe eines AT₁-Blockers signifikant PAI-1 unterdrückt ⁷⁶. Über all diese verschiedenen Mechanismen scheint Ang II an der Entstehung einer kardiovaskulären Erkrankung beteiligt zu sein.

Ald könnte über ähnliche Mechanismen am Herz schädigende Prozesse vermitteln, wie bisherige Studien vermuten lassen. So scheint Ald ebenfalls wie Ang II einen profibrotischen Einfluss am Myokard auszuüben ⁵. Neonatale Myozyten, die mit Ald stimuliert wurden, wiesen eine gesteigerte Zellhypertrophie auf ⁷⁷. Zudem deuten einige Studien auf eine proinflammatorische Wirkung von Ald am Herzmuskel hin ⁷⁸. An gesunden Probanden wurden nach der Applikation von Ald Anzeichen für eine akute endotheliale Dysfunktion beobachtet ⁷⁹. Der Zusammenhang zwischen Ald und einer kardiovaskulären Schädigung wird auch am Beispiel des primären Hyperaldosteronismus deutlich. Dabei handelt es sich um ein Krankheitsbild mit deutlich erhöhten Ald-Spiegeln, bei dem als Ursache häufig ein unilaterales Ald-produzierendes Adenom der Nebennierenrinde zu finden ist ⁸⁰. Patienten mit primärem Aldosteronismus können neben einer Hypertonie verschiedene Anzeichen einer kardiovaskulären Schädigung entwickeln. Rossi et al. fanden Anzeichen einer Herzhypertrophie, einer diastolischer Dysfunktion und einer vermehrten kardialen Kollagenablagerung in dieser Patientengruppe ⁸¹. Eine andere Arbeitsgruppe verglich das Risiko für Herzinfarkte, Vorhofflimmern und Schlaganfälle bei Patienten mit primärem Aldosteronismus gegenüber einer Patientengruppe mit essentieller Hypertonie ⁸². Dabei war das Risiko für die genannten Erkrankungen in der Gruppe mit primärem Aldosteronismus deutlich erhöht.

Während das RAAS im physiologischen Rahmen die Nierenfunktion reguliert und aufrecht erhält, kann ein pathologisch aktiviertes RAAS neben den kardiovaskulären Erkrankungen auch zum renalen Schaden und zur Nierenfunktionseinschränkung führen. Ang II fördert die Produktion von nephrotoxischen reaktiven Sauerstoff-Spezies und stimuliert durch eine gesteigerte Synthese von profibrotischen Zytokinen und Wachstumsfaktoren die renale Zellproliferation und den Gewebsumbau ⁸³. Verschiedene Studien legen die Vermutung nahe, dass neben Ang II vor allem Ald an der Entstehung eines Nierenschadens beteiligt ist. Rocha et al. infundierten SHRSP (*stroke-prone spontaneously hypertensive rats*) Ald in Kombination mit einer salzreichen Diät, worauf diese eine Albuminurie und einen schweren Nierenschaden entwickelten ⁸⁴.

Ang II und Ald scheinen in vielen Modellen ihren organschädigenden Einfluss über ähnliche Mechanismen, wie z.B. Zellproliferation, Fibrose oder Entzündungsreaktion zu vermitteln und nicht immer ist es möglich, den pathogenen Einfluss der beiden Hormone von einander abzugrenzen. Hinsichtlich der thrombotischen Mikroangiopathie in der Niere konnten Chander et al. jedoch demonstrieren, dass diese nur auf Ald und nicht zusätzlich auf Ang II zurückzuführen ist ⁸⁵. Sie infundierten adrenaletomierten SHRSP unter einer salzreichen Diät entweder Ald oder Ang II. Während in der mit Ald infundierten Gruppe eine ausgeprägte thrombotische Mikroangiopathie der Nieren zu beobachten war, konnte diese in den Nieren der mit Ang II infundierten SHRSP nicht gefunden werden.

1.5 Das dTGR-Rattenmodell

Für unsere Experimente nutzten wir ein transgenes Rattenmodell mit aktiviertem RAAS, in dem sich aufgrund stark erhöhter Ang II-Spiegel ein ausgeprägter renaler und kardiovaskulärer Endorganschaden entwickelt. Dieses Modell wurde von Ganten et al. und Fumikazu et al. entwickelt ^{86,87}. Die doppeltransgenen Ratten (dTGR) exprimieren neben ihrem eigenen RAAS das humane Renin (hREN)- und humane Angiotensinogen (hAOGEN)-Gen ⁸⁸. Sie gehen aus der Kreuzung der homozygoten humanen AOGEN-Linie und der homozygoten humanen Renin-Linie hervor. Humanes Renin spaltet nur humanes AOGEN, während Ratten-AOGEN (rAOGEN) nur als Substrat für Ratten-Renin (rREN) dient ⁸⁹. Das aus den beiden Systemen entstehende Angiotensin I ist identisch und wird gleichermaßen zu Ang II umgewandelt. Dieses zusätzliche humane Renin-Angiotensin-System führt im Vergleich zu nicht-transgenen Sprague-Dawley-Ratten zu drei- bis fünffach erhöhten Ang II-Spiegeln in Herz, Niere und Plasma und ist für eine Blutdruckerhöhung verantwortlich. Ratten, die nur einzeln transgen für entweder humanes AOGEN oder humanes Renin sind, sind normoton ⁸⁹. Unbehandelte dTGR entwickeln Bluthochdruck, Niereninsuffizienz, Vaskulopathie und eine schwere linksventrikuläre Herzhypertrophie ^{88,90,91} (Abb. 5). Sie sterben bereits im Alter von 7-9 Wochen. Histopathologisch weisen die Herzen der Tiere eine schwere linksventrikuläre Hypertrophie mit fokalen Nekrosearealen und entzündlichen Infiltraten auf. In den Nieren sind nephrosklerotische Veränderungen zu finden und in den Nierengefäßen zeigen sich sowohl starke Verdickungen der Intima und Media als auch hyaline Ablagerungen. Zudem entwickeln dTGR eine ausgeprägte Albuminurie, die mit einer renalen Infiltration von Leukozyten verbunden ist ⁹². Eine alleinige Blutdrucksenkung ohne Inhibitoren von Renin bzw. Ang II kann diese Veränderungen nicht

aufhalten, während die Blockade der Wirkungen von Renin oder Ang II den Endorganschaden verhindert⁹¹.

Aufgrund des Schweregrades der Nieren-, Herz- und Gefäßschädigung läßt sich an diesem Modell besonders gut die Pathogenese der durch Ang II-bedingten Organschäden untersuchen. Da Ang II den Hauptstimulus der Ald-Synthese darstellt, finden sich in den Tieren neben den erhöhten Ang II-Spiegeln auch 20-fach erhöhte Ald-Spiegel im Vergleich zu gesunden Sprague-Dawley-Ratten⁹³. Dadurch ist das Modell in besonderer Weise dazu geeignet, die Rolle von Ald am Ang II-induzierten Endorganschaden zu untersuchen.

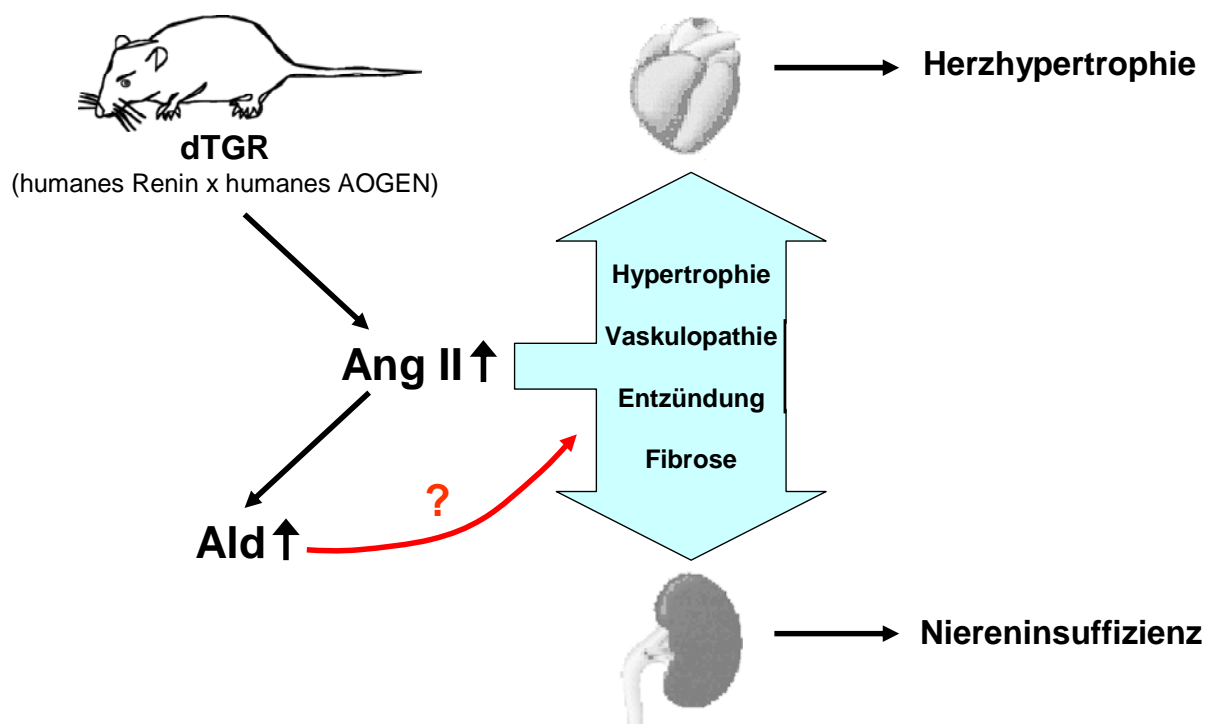


Abb. 5: Schema des doppeltransgenen Rattenmodells. dTGR entwickeln eine schwere Vaskulopathie, eine ausgeprägte linksventrikuläre Hypertrophie und eine Niereninsuffizienz. Da die hohen Ang II-Spiegel in dTGR zusätzlich hohe Ald-Spiegel induzieren, könnte auch Ald am Endorganschaden beteiligt sein.

1.6 Blockade der Wirkung von Aldosteron

Zur Klärung der Frage, welche Rolle Ald im dTGR-Modell am Ang II-induzierten Endorganschaden spielt, ist es erforderlich, die Ald-Wirkung in dTGR auszuschalten. Dies ist prinzipiell auf zwei Arten möglich. Zum einen kann der Rezeptor, über den Ald seine Wirkung vermittelt, medikamentös durch MR-Blocker wie Spironolakton oder Eplerenon blockiert

werden. Zum anderen kann der Ligand Ald selbst aus dem System entfernt werden, indem die Ald-Synthese unterbunden wird. Dazu werden entweder die Nebennieren als Hauptort der Ald-Produktion entnommen (ADX) oder es kommt ein Ald-Synthese-Hemmer zum Einsatz (FAD286). Diese verschiedenen Möglichkeiten, die Ald-Wirkung zu blockieren, unterscheiden sich in bestimmten Punkten: Ald-Antagonisten wie Spironolakton blockieren den MR für alle potentiell in Frage kommenden Liganden. Demgegenüber können bei der Blockierung der Ald-Synthese mittels ADX oder Ald-Synthese-Hemmer andere Liganden weiterhin am MR binden und Signale vermitteln. Hierbei ist vor allem Kortisol bzw. Kortikosteron zu nennen. Weiter ist zu beachten, dass durch die ADX zwar das zirkulierende Ald entzogen wird, im Gegensatz zum Einsatz eines Ald-Synthese-Hemmers jedoch eine extraadrenale lokale Ald-Synthese unbeeinflusst bleibt.

Einen indirekten Effekt auf die Ald-Wirkung üben Ang II-Rezeptorblocker wie z.B. Losartan (Los) aus. Ang II stellt den Hauptstimulus für die adrenale Ald-Synthese dar. Der AT₁-Blocker Losartan hemmt den stimulierenden Einfluss von Ang II an den Nebennieren, wodurch es zu einer Verminderung der adrenalen Ald-Produktion kommt. Verschiedene Studien haben jedoch gezeigt, dass dieser Effekt nicht dauerhaft ist, sondern dass es nach einer gewissen Zeit zu einem sogenannten "*aldosterone escape*" kommt⁹⁴, d.h. dass trotz fortbestehender Gabe des AT₁-Blockers die Ald-Spiegel im Blut wieder ansteigen.

1.6.1 Aldosteron-Antagonisten

Ald-Antagonisten blockieren den MR, wodurch die MR-vermittelte Signalinduktion und Wirkung von Ald unterbunden wird. Ausgehend von der chemischen Struktur des Ald wurde vor mehr als 40 Jahren Spironolakton als erster Ald-Antagonist entwickelt, dessen hauptsächliches Untersuchungs- und Einsatzgebiet die Regulierung des Salz-Wasserhaushalts war⁹⁵. Bereits bei den vorklinischen Untersuchungen fiel auf, dass zwischen den beobachteten antihypertensiven Effekten von Spironolakton und seiner Wirkung auf den Elektrolythaushalt keine Korrelation besteht und dass Spironolakton im Tiermodell vor den Folgen akuter Myokardnekrosen schützt^{96,97}. Diese Beobachtungen blieben jedoch für lange Zeit ohne therapeutische Konsequenz und Spironolakton wurde 1960 als kaliumsparendes Diuretikum zur Behandlung des primären Hyperaldosteronismus, bei Volumenbelastung, essentiellen Hypertonus und Hypokaliämie zugelassen. Da Spironolakton wegen seiner gleichzeitigen Wirkungen am Östrogen- und Progesteron-Rezeptor ein ungünstiges Nebenwirkungsprofil aufweist (in therapeutischer Dosis häufig Gynäkomastie, Libidoverlust, Impotenz und Periodestörungen), wurde nach

spezifischeren Antagonisten gesucht und 1987 Eplerenon entwickelt. In vitro-Studien haben gezeigt, dass Eplerenon zwar eine 10- bis 20-fach geringere Bindungsaffinität zum MR aufweist, jedoch im Gegensatz zu Spironolaktone eine äußerst geringe Affinität zu anderen Steroidrezeptoren wie dem Östrogen- und dem Progesteron-Rezeptor besitzt. Um eine stimulatorische Wirkung an diesen Rezeptoren auszulösen, wird eine >40-fach (am Östrogen-Rezeptor) bzw. 370-fach (am Progesteron-Rezeptor) höhere Eplerenon-Konzentration im Vergleich zu Spironolaktone benötigt⁹⁸.

1.6.2 Adrenalektomie (ADX)

Die Nebennieren stellen den hauptsächlichen Bildungsort des zirkulierenden Ald dar. Werden sie im Rattenmodell operativ entfernt, fallen die Ald-Spiegel im Plasma soweit ab, dass allenfalls nur noch geringste Mengen von Ald nachgewiesen werden können⁹⁹. Damit ist die Wirkung des zirkulierenden Ald-Systems nahezu vollständig ausgeschaltet, während jedoch eine potentielle lokale Ald-Synthese z.B. in Herz, Gefäßen und Gehirn unbeeinflusst bleibt. Zu beachten bleibt, dass die Nebennieren nicht nur Ald, sondern auch Glukokortikoide und die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin bilden. Eine ADX hat damit auch immer einen Abfall dieser Hormone zur Folge. Um den Einfluss dieser unerwünschten Nebenwirkungen der ADX zu minimieren, muß den Versuchstieren täglich Dexamethason substituiert werden. Dadurch wird der Mangel an Kortikosteron ausgeglichen und eine normale Gewichtszunahme bei physiologischen Glukose- und Insulinspiegeln im Plasma sichergestellt⁹⁹. Zusätzlich benötigen adrenalektomierte Versuchstiere eine erhöhte Salzzufuhr z.B. über das Trinkwasser, um den im Rahmen des ausgeprägten Ald-Mangels auftretenden renalen Salzverlust zu kompensieren.

1.6.3 Der Aldosteron-Synthase-Hemmer FAD286

Neben den MR-Antagonisten wurde in den letzten Jahren eine neue Substanzklasse entwickelt, die das Schlüsselenzym der Ald-Produktion, die Ald-Synthase (CYP11B2), hemmt und somit die Ald-Synthese blockiert. Der MR bleibt dabei unbeeinflusst. Das von Novartis (Novartis Institutes for Biomedical Research, East Hanover, USA) entwickelte FAD286 gehört zu dieser neuen Substanzklasse und ist ein Aromatase-Inhibitor (Abb. 6A). Zellkulturexperimente von Novartis zur Wirksamkeit des neuen CYP11B2-Inhibitors zeigten, dass FAD286 in nanomolarer Konzentration spezifisch die Ald-Synthase hemmt¹⁰⁰. Hierbei wurden die NCI-H295R-Zelllinie verwendet, die einem invasiven humanen adrenokortikalen Tumor entstammt und auf verschiedene Stimuli (wie z.B. Ang II), vergleichbar mit der Nebenniere, Ald synthetisiert¹⁰¹.

NCI-H295R-Zellen wurden mit $1\mu\text{M}$ Ang II und FAD286 in verschiedenen Konzentrationen über 24 Stunden inkubiert und die jeweilige Ald-Abgabe ins Medium gemessen. Die Versuche zeigten, dass FAD286 dosisabhängig die Ang II-induzierte Bildung von Ald in NCI-H295R-Zellen unterdrückt (Abb. 6B). Dabei lag die halbmaximale Hemmkonzentration IC_{50} (*inhibiting concentration 50%*) von FAD286 bei 37 ± 4 nM.

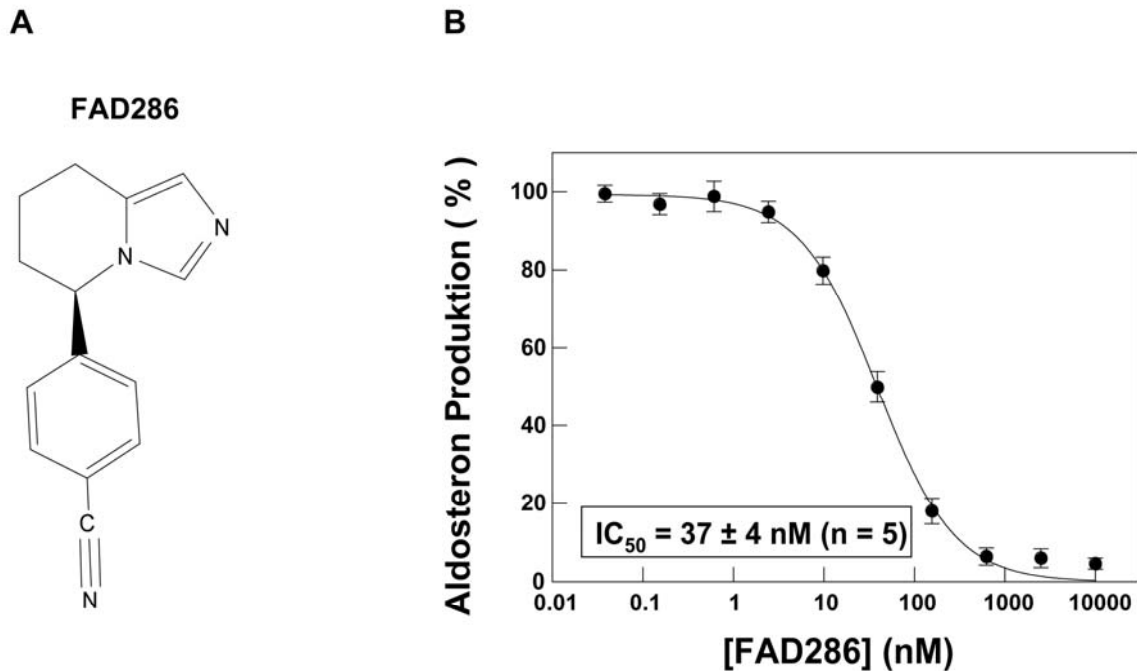


Abb. 6 A: Strukturformel von FAD286. FAD286 ist ein Synonym für (+)-(5R)-4-(5,6,7,8-tetrahydroimidazo[1,5-a]pyridin-5-yl) benzonitrile hydrochloride; **B: FAD286 in vitro.** FAD286 hemmt die Ang II-induzierte Ald-Synthese in NCI-H295R-Zellen mit einer IC_{50} von 37 ± 4 nM.

Bisher waren nur wenige Substanzen bekannt, die die Ald-Synthese blockieren. Fadrozol, ein Aromatase-Inhibitor, der eine Rolle in der Behandlung von Brustkrebs spielt, hemmt sowohl die Ald-Synthese als auch die Glukokortikoid-Produktion¹⁰². Ketoconazol¹⁰³, ein Antimykotikum, und Imidazolymethylentetrahydronaphthalen¹⁰⁴ stellen weitere Substanzen dar, die mehr oder weniger die Ald-Synthase CYP11B2 hemmen, jedoch eine eher geringe Selektivität aufweisen. Mit FAD286 steht nun erstmals ein Ald-Synthase-Inhibitor zur Verfügung, der spezifisch das Enzym CYP11B2 blockiert.

1.7 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit ist, folgende Fragen zur Rolle von Ald im dTGR-Modell zu klären:

1. Welche Rolle spielt Ald beim Ang II-induzierten Endorganschaden?
2. Findet im Herz eine relevante lokale Ald-Synthese statt?

1.7.1 Welche Rolle spielt Ald beim Ang II-induzierten Endorganschaden?

dTGR weisen stark erhöhte Ang II-Spiegel auf und entwickeln nach wenigen Wochen einen ausgeprägten Endorganschaden. Untersuchungen mit verschiedenen Ang II-Antagonisten haben gezeigt, dass die hohen Ang II-Spiegel für den Organschaden verantwortlich sind⁹². Bisher ist jedoch nicht vollständig geklärt, auf welchem Weg Ang II den Organschaden induziert. In dieser Arbeit wird die Hypothese untersucht, dass Ang II einen Teil seiner organschädigenden Wirkung über Ald vermittelt. Ang II stellt den Hauptstimulus der Ald-Synthese dar und hohe Ang II-Spiegel induzieren hohe Ald-Spiegel. Damit könnte auch Ald den Endorganschaden verursachen. Zur Klärung der Fragestellung wurden den Versuchstieren der Ligand Ald mittels des Ald-Synthese-Hemmers FAD286 oder durch ADX entzogen.

Im einzelnen wurden hierbei folgende Fragestellungen am dTGR-Modell untersucht:

- Blockiert der neue Ald-Synthese-Hemmer FAD286 in vivo suffizient die Ald-Produktion?
- Vermindert die Gabe von FAD286 die Ausprägung des Ang II-induzierten Organschadens?
- Vermindert ADX die Ausprägung des Ang II-induzierten Organschadens?
- Ist ein potentieller organprotektiver Effekt von FAD286 oder ADX blutdruckabhängig?

Die Ausprägung des Organschadens wurde dabei anhand von Mortalität, Herz- und Nierenfunktion bestimmt. Als Vergleichsgruppen dienten unbehandelte oder mit Los-behandelte dTGR in Protokoll I, bzw. Dexamthason (Dex) / Salz-behandelte dTGR in Protokoll II.

1.7.2 Findet im Herz eine relevante lokale Ald-Synthese statt?

Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass Ald auch außerhalb der Nebennieren lokal in verschiedenen Geweben produziert wird^{56,57}. Ungeklärt bleibt bisher, ob dies auch im Herz der Fall ist. Um diese Fragestellung anhand unseres dTGR-Modells zu untersuchen, wurden die Ald-Spiegel im Plasma und im Herz von adrenaletomierten Versuchstieren bestimmt. Im Fall einer lokalen Ald-Synthese im Herz wären bei den ADX-Tieren messbare Ald-Spiegel im Herzgewebe

zu erwarten. Um darüber hinaus zu erforschen, ob eine potentielle kardiale Ald-Produktion einen Einfluss auf den Ang II-induzierten Herzschaden hat, erhielten adrenaletomierte dTGR zusätzlich FAD286.

Im Detail wurden hierbei folgende Fragestellungen am dTGR-Modell untersucht:

- Welchen Einfluss hat die ADX auf die kardialen Ald-Spiegel?
- Welche Menge des kardialen Ald entstammt den Nebennieren?
- Führt die Gabe von FAD286 bei adrenaletomierten dTGR zu einer zusätzlichen Verminderung des kardiovaskulären Schadens?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien

Tab. 1 enthält eine Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Wirkstoffe. Die bei der Immunhistochemie eingesetzten Antikörper sind in Tab. 2 zusammengefasst. Die im Rahmen der RT-PCR verwendeten Primer und Sonden wurden von Biotex (Berlin-Buch) bezogen und sind in Tab. 3 aufgelistet. Alle verwendeten Sonden sind am 5'-Ende mit dem Reporterfarbstoff FAM (6-Carboxyfluoreszin) und am 3'-Ende mit dem Quencherfarbstoff TAMRA (6-Carboxytetramethylrhodamin) markiert.

Tab. 1: Übersicht der verwendeten Chemikalien und Wirkstoffe

<i>Substanz</i>	<i>Firma</i>
Aceton	Sigma, Deisenhofen
Aktivkohle	
Chloroform	
Dexamethason	
Isopropanol	
Levamisol	
Naphtol-AS-Bi-Phosphat	
C-1000 ssniff (Standardfutter)	Ssniff, Soest
FAD286-Futter-Sondermischung	
Losartan-Futter-Sondermischung	
Mayers Hämalaun-Lösung	Merck, Darmstadt
Neufuchsin	
Superskript II Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
Trizol [®] -Reagenz	
TaqMan [®] Universal PCR Master Mix	PE Biosystems, Weiterstadt
SYBRGreen PCR Master Mix	
FAD286	Novartis, East Hanover, USA
ELISA-Kit	CellTrend, Berlin
Tritium-markierte Steroide	Amersham Biosciences, Freiburg
¹²⁵ I-Aldosteron	Medipro AG, Teufen, Schweiz
Dextra T-70	Pharmacia Fine Chemicals, Schweden
APAAP-Komplex	Dako, Hamburg
GelTol-Medium	Coulter-Immunotech, Hamburg
Vectashield-Medium	Vector Laboratories, Burlingame, USA

Tab. 2: Übersicht der verwendeten Antikörper (Immunhistochemie)

<i>Antikörper</i>	<i>Firma</i>
anti-CD4	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-CD86	
anti-Ox6	
anti-MHC Klasse-II	
anti-ED-1	Serotec, Düsseldorf
anti-CD8	
anti-Fibronektin	Paesel, Duisburg
anti-Kollagen-IV	Southern Biotechnology, USA
Kaninchen-anti-Maus-IgG	Dako, Hamburg
Maus-anti-Kaninchen-IgG	
Cy3-konjugierter anti-Maus	Dianova, Hamburg
Cy3-konjugierter anti-Kaninchen	

Tab. 3: Übersicht der verwendeten Primer und Sonden (RT-PCR)

<u>α-MHC</u>	
Vorwärts-Primer:-	5' AAC GCC CAA GCC CGC TTG AA 3'
Rückwärts-Primer:	5' CAT TGG CAC GGA CTG CGT CA 3'
<u>β-MHC</u>	
Vorwärts-Primer:	5' GAG CCT CCA GAG TTT GCT GAA GGA 3'
Rückwärts-Primer:	5' TTG GCA CGG ACT GCG TCA TC 3'
<u>ANP</u>	
Vorwärts-Primer:	5' AGT GGC AAT GCG ACC AAG CTG T 3'
Rückwärts-Primer:	5' TCG CAA AAG ATC CCA AGC CCT T 3'
<u>CYP11B2</u>	
Vorwärts-Primer:	5' AGA GGC TGG GCC TCC TTG 3'
Rückwärts-Primer:	5' CAT TGA ATG TAG GGC ATG GAT GA 3'
Sonde:	5' TCA TGA CCT GAA CCC TGG TAG CCT GAA G 3'
<u>18S</u>	
Vorwärts-Primer:	5' ACA TCC AAG GAA GGC AGC AG 3'
Rückwärts-Primer:	5' TTC GTC ACT ACC TCC CCG G 3'
Sonde:	5' CGC GCA AAT TAC CCA CTC CCG A 3'
<u>Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase</u>	
Vorwärts-Primer:	5' ACT TGC TCG AGA TGT CAT GAA GG 3'
Rückwärts-Primer:	5' GTA ATC CAG CAG GTC AGC AAA GA 3'

2.2 Tierversuch

2.2.1 Tiere, Tierhaltung und Diät

Als Versuchstiere dienten 4 Wochen alte männliche dTGR, die bei Lieferung ein durchschnittliches Gewicht von 57 ± 2 g aufwiesen. Sie wurden von der Firma RCC Ltd. (Biotechnology & Animal Breeding Division, Füllinsdorf, Schweiz) bezogen. Die Ratten wurden in Käfigen bei $24 \pm 2^\circ\text{C}$ Raumtemperatur, 60% Luftfeuchtigkeit und einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden bei künstlichem Licht gehalten. Als Nahrung erhielten sie eine Standarddiät für Ratten (C-1000 Ssniff), die 0,2% Natrium enthielt, sowie Leitungswasser ad libitum. Abhängig vom Protokoll wurde dem Leitungswasser 1% NaCl zugesetzt. Alle Richtlinien für Tierhaltung der American Physiological Society wurden befolgt und eine Versuchsgenehmigung der örtlichen Behörden lag vor (Genehmigung # G 408/97).

2.2.2 Behandlungsprotokolle

Drei verschiedene Behandlungsprotokolle wurden aufgestellt:

Protokoll I

In diesem Protokoll wurden dTGR von der 4. bis zu 7. Woche mit dem Ald-Synthase-Hemmer FAD286 in einer Dosis von 4 mg/kg/Tag (im Futter; n=10) oder dem AT₁-Blocker Losartan (Los) in einer Dosis von 30 mg/kg/Tag (im Futter; n=8) behandelt (Abb. 7). Unbehandelte dTGR (n=13) dienten als Kontrollgruppe. Alle Ratten wurden nach der 7. Woche getötet.

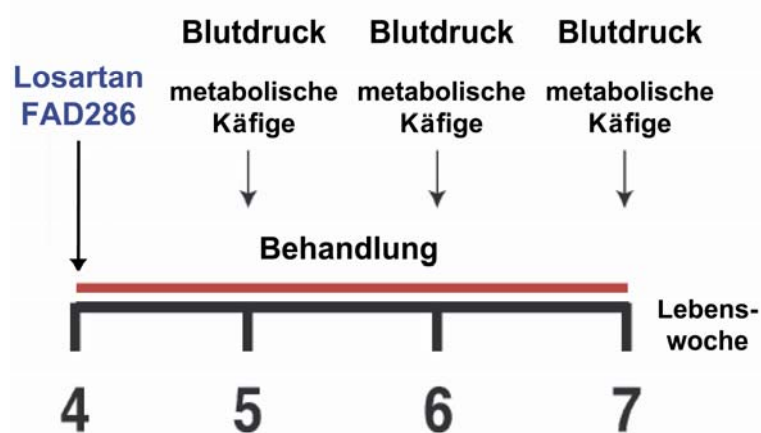


Abb. 7: In Behandlungsprotokoll I erhielten 4 Wochen alte dTGR über 3 Wochen FAD286 oder Los. Wöchentlich wurden der Blutdruck gemessen und Urinproben gesammelt.

Protokoll II

In diesem Protokoll wurden dTGR (n=12) in der 4. Lebenswoche adrenaletomiert und mit nicht-adrenaletomierten dTGR (n=9) verglichen (Abb. 8). Um den Verlust an Glukokortikoiden durch die Adrenaletomie (ADX) auszugleichen, erhielten beide Gruppen eine tägliche Einzeldosis Dexamethason (Dex) von 12 µg/kg/Tag intraperitoneal. Wie von Stanton et al. berichtet, ist diese Dosierung der Dex-Substitution ausreichend, um die normale Gewichtszunahme, die glomeruläre Filtrationsrate und die Nüchtern-Glukose- und Insulinspiegel im Plasma aufrechtzuerhalten⁹⁹. Desweiteren wurde dem Trinkwasser 1% NaCl zugesetzt, um den renalen Salzverlust bei Aldosterondepletion auszugleichen. Alle Ratten wurden nach der 7. Woche getötet.

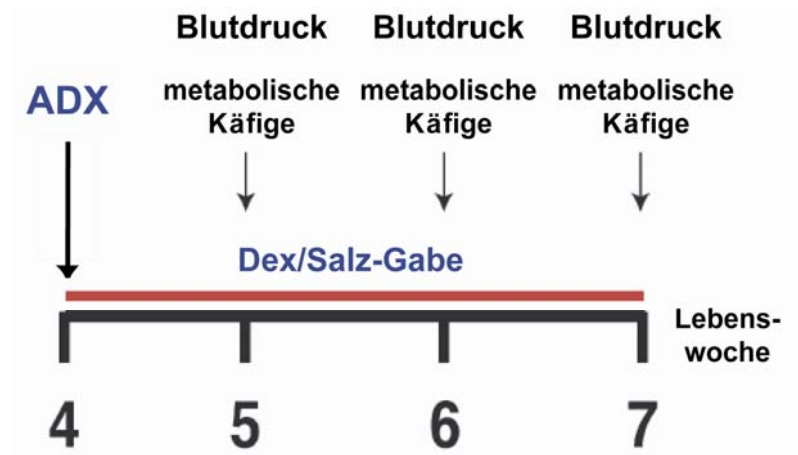


Abb. 8: In Behandlungsprotokoll II wurden 4 Wochen alte dTGR adrenaletomiert und über 3 Wochen mit Dex/Salz substituiert. Wöchentlich wurden der Blutdruck gemessen und Urinproben gesammelt.

Protokoll III

Dieses Protokoll war identisch mit Protokoll II, jedoch wurde eine zusätzliche Gruppe von adrenaletomierten dTGR mit FAD286 in einer Dosierung von 4 mg/kg/Tag (im Futter; n=12) behandelt, um jegliche Ald-Synthase-Aktivität außerhalb der Nebennieren zu blockieren. Zudem wurden die Ratten erst nach 9 Wochen getötet (Abb. 9).

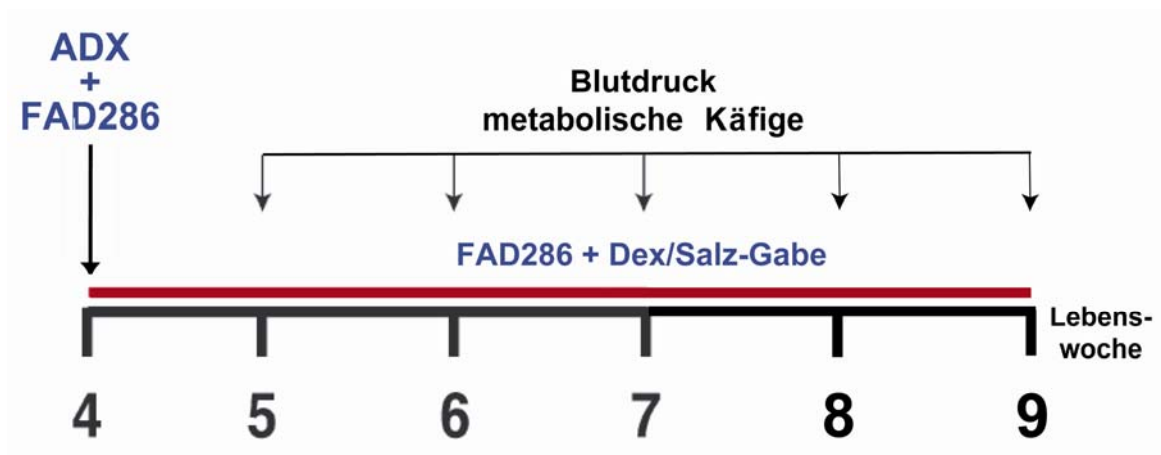


Abb. 9: In Behandlungsprotokoll III wurden 4 Wochen alte dTGR adrenalectomiert und zusätzlich über 5 Wochen mit FAD286 behandelt. Wöchentlich wurden der Blutdruck gemessen und Urinproben gesammelt.

Während der Behandlung bzw. nach der ADX wurde in allen Protokollen Körpergewicht, Blutdruck und renale Proteinausscheidung gemessen und eine Echokardiographie durchgeführt. Nach Versuchsende wurden Blutproben entnommen und es erfolgte eine histologische Aufarbeitung der Herzen und Nieren aller Versuchstiere.

2.2.3 ADX-Operation

Um die Nebennieren zu entfernen, wurden die Ratten durch Insufflation eines Isofluran(3%)-Luft-Gemischs narkotisiert. Bilateral erfolgte eine dorsolumbale Hautinzision mit Eröffnung des Retroperitonealraums und beidseitiger Entfernung der Nebennieren.

2.2.4 Messung des Blutdrucks

Die Messung des systolischen Blutdrucks erfolgte mittels der Tail-Cuff-Methode, bei der die Ratten eine leichte Äthernarkose erhielten. Die Messungen begannen in der 5. Woche und wurden bis zum Versuchsende jeweils einmal pro Woche durchgeführt.

2.2.5 Transthorakale Echokardiographie

Jeweils kurz vor Versuchsende (Protokoll I + II in der 7. Woche; Protokoll III in der 9. Woche) wurden die Ratten echokardiographiert. Zur Durchführung der Ultraschalluntersuchung erhielten die Ratten zunächst eine Insufflationsnarkose mit 3% Isofluran, die während der gesamten Untersuchung aufrecht erhalten wurde. Um optimale Untersuchungsbedingungen zu schaffen,

wurde der Brustkorb vom Haarkleid befreit und die zu untersuchende Ratte in Rückenlage fixiert. Nach dem Auftragen des Ultraschallgels wurde mit einem gebräuchlichen Ultraschallgerät und einem 15 MHz Phased-Array-Schallkopf das Herz in der kurzen parasternalen Achse dargestellt. Mittels des M-Mode-Verfahrens wurde die Herzaktion aufgezeichnet und die Durchmesser des linken Ventrikels, der linksventrikulären Hinterwand und des Ventrikelseptums während Systole und Diastole gemessen, sowie die linksventrikuläre Ejektionsfraktion bestimmt. Die totale Herzwanddicke wurde aus der Summe der Durchmesser von Septum und linksventrikulärer Hinterwand berechnet. Es wurden jeweils 3 Messungen pro Herz durchgeführt, die dann gemittelt und statistisch ausgewertet wurden.

2.3 Biochemische und hormonelle Messungen

2.3.1 Messung der renalen Albuminausscheidung

Die renale Albuminausscheidung wurde bei den Ratten in der 5., 6. und 7. Woche gemessen. Hierfür wurden sie in metabolische Käfige gesetzt und der Urin über 24 h gesammelt. Die Bestimmung der Albuminkonzentration des Urins erfolgte mittels eines kommerziellen ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*)-Kits.

2.3.2 Messung von Renin, Kortikosteron und Aldosteron

Die Blutproben der Versuchstiere wurden mit dem Verfahren der Dekapitation gewonnen und bei -20°C gelagert. Die Plasma-Renin-Aktivität (PRA) und die Plasma-Renin-Konzentration (PRC) wurden mit einem Enzym-Kinetik-Assay nach Poulsen und Jorgensen bestimmt¹⁰⁵.

Im Serum enthaltenes Kortikosteron wurde mit einem organischen Lösungsmittel aus dem Plasma extrahiert. Die nachfolgende Messung erfolgte mittels eines speziellen Radioimmunoassays (RIA), bei welchem Tritium-markierte Steroide und spezifische Antikörper eingesetzt wurden¹⁰⁶.

Zur Messung von Ald kam ein kompetitiver RIA zum Einsatz¹⁰⁷. Bei diesem Verfahren konkurrieren das im Plasma enthaltene Ald und eine zugefügte Menge radioaktiv markierten Ald (Tracer) um die Bindung an einer definierten Menge von spezifisch gegen Ald gerichteten Antikörpern. Es kommt zur Bildung von Ald-Antikörper-Komplexen, wobei die gebundene Radioaktivität umso höher ist, je weniger Ald in der Plasmaprobe vorhanden war. Die Trennung des freien vom gebundenen Ald erfolgt durch Zugabe von Aktivkohle. Freies radioaktiv-markiertes Ald wird durch Oberflächenadsorption an die Aktivkohle gebunden und kann nun

abzentrifugiert werden. Anschließend wird eine Messung der Radioaktivität der verbleibenden Probe durchgeführt. Die Bestimmung der Ald-Konzentration in der Probe erfolgt mit Hilfe einer Standardkurve, die durch die Messungen verschiedener Standardlösungen mit definierten Ald-Konzentrationen erstellt wurde. Im einzelnen wurden 25 µl des zu untersuchenden Plasmas oder der Standardlösung (0 bis 32 pg Ald in Pufferlösung) in 75 µl Pufferlösung (Na₃PO₄, 0,05 mol/L, pH 7,5) pipettiert. Ein Gemisch (0,5 ml) von Antiserum (Verdünnung 1:480000) und ¹²⁵I-Aldosteron (2000 cpm) wurde zugegeben. Die Proben wurden bei 4 °C 48 h inkubiert. Danach wurde 0,6 ml Aktivkohle-Suspension (10 mg / L in einer wässrigen Lösung von 1mg / L Dextran) hinzugefügt und das Gemisch wurde bei 4 °C weitere 6 min inkubiert. Nach der Zentrifugation bei 4 °C und 5000 x g für 20 min wurde der Überstand und die Aktivkohle separat in einem Gamma-Zähler (Autogamma 800C, Packard) gemessen.

2.4 Immunhistochemie

2.4.1 Entnahme der Organe

Die Ratten wurden unter Äthernarkose im Alter von 7 (Protokoll I + II) oder 9 (Protokoll III) Wochen durch Dekapitation getötet. Die Nieren und Herzen wurden entnommen und in eiskalter Kochsalzlösung gewaschen, trocken getupft und gewogen. Für die Immunhistochemie wurden die Nieren sagittal und die Herzen horizontal geschnitten, in -35°C kalten Isopentan schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.4.2 Färbungen

Für die immunhistochemischen Gewebeuntersuchungen kamen die APAAP-Methode (Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase) und die Immunfluoreszenz zum Einsatz. Aus den bei -80°C gelagerten Nieren und Herzen wurden 6 µm dicke Gefrierschnitte angefertigt und an der Luft getrocknet. Die Schnitte wurden mit kaltem Aceton fixiert, luftgetrocknet und mit Tris-Puffer-Lösung (TBS: 0,05M Tris Puffer, 0,15M NaCl, pH 7,6) gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte in einer Feuchtigkeitskammer für 60 min bei Raumtemperatur mit den entsprechenden primären Antikörpern inkubiert. Zur Bestimmung der Zellinfiltration wurden folgende monoklonale Antikörper verwendet: anti-CD4, anti-ED-1 und anti-CD8, anti-MHC (*major histocompatibility complex*) Klasse-II, anti-CD86 und anti-Ox6. Zur Darstellung von fibrotischen Veränderungen kamen die polyklonalen Antikörper anti-Fibronectin und anti-Kollagen-IV zum Einsatz. Anschließend wurden die Schnitte mit TBS gewaschen.

Bei der **APAAP-Methode** wurden die Gewebeschnitte nun mit einem Brückenantikörper (Kaninchen-anti-Maus-IgG; Maus-anti-Kaninchen-IgG) bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert und erneut mit TBS gespült. Der APAAP-Komplex wurde hinzugegeben und die Schnitte für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Immunreaktivität wurde durch Entwicklung in einem Gemisch aus Naphtol-AS-Bi-Phosphat und Neufuchsin dargestellt. Endogene alkalische Phosphatase wurde durch Hinzugabe von 10 mM Levamisol zur Substratlösung blockiert. Die Schnitte wurden leicht in Mayers Hämalaun-Lösung gegengefärbt, mit Leitungswasser gespült und mit GelTol-Medium eingedeckt.

Für die **Immunfluoreszenz** wurden die Gewebeschnitte nach Inkubation mit dem primären Antikörper und Spülen mit TBS (s.o.) mit einem Cy3-konjugierten sekundären anti-Maus- bzw. anti-Kaninchen-Antikörper im Dunkeln bei Raumtemperatur 60 min inkubiert. Nach dem Waschen mit TBS wurden die Schnitte mit DAPI (Diaminophenylindol) gegengefärbt und mit Vectashield-Medium eingedeckt. Als Kontrollen wurden Gewebeschnitte nur mit dem sekundären Antikörper inkubiert unter Auslassung des Primärantikörpers, wobei es zu keiner spezifischen Immunfärbung kam. Dadurch konnte eine nichtspezifische Bindung des sekundären Antikörpers am Gewebeschnitt ausgeschlossen werden.

Die APAAP- und Immunfluoreszenz-Färbungen wurden mit einem Zeiss Axioplan-2-Mikroskop (Zeiss, Jena) analysiert und mit dem Axiovision-3-Multichannel-Bildbearbeitungsprogramm (Zeiss, Jena) digital gespeichert bzw. mit einem Color Reversal Film Agfa CTX 100 fotografiert. Die semiquantitative Auswertung von infiltrierten Zellen in den Nieren und den Herzen (CD4+, CD8+, ED1+, MHC-Klasse II+, CD86+ und Ox6+-Zellen) wurde mit einem Computerprogramm zum Zellzählen der Firma Zeiss (KS 300 3.0, Zeiss, Jena) vorgenommen. Es wurden 15 verschiedene Areale von jeder Herz- und Nierenprobe (n=5 pro Gruppe) ohne Kenntnis der Gruppenzugehörigkeit ausgewertet. Die Kollagen IV- und Fibronectinablagerungen in den Gewebeschnitten wurden basierend auf der Intensität der Anfärbung semiquantitativ mit relativen Einheiten (0-5+) bewertet.

2.5 RT-PCR (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*)

2.5.1 RNA-Extraktion

Für die RT-PCR wurde die Gesamt-RNA aus dem linksventrikulären Herzwewebe nach dem Trizol[®] Protokoll (Gibco Life Technology, Deutschland) isoliert. Trizol[®] ist eine patentierte gebrauchsfertige Lösung aus Phenol und Guanidinisothiocyanat, mit der Gesamt-RNA aus

Zellen oder Geweben isoliert werden kann. Mit der Verwendung von Trizol[®] wurde eine Vereinfachung der von Chomczynski et al. (1987) entwickelten Methode zur RNA-Isolierung erreicht¹⁰⁸. Das Reagenz löst Zellwände und Zellkomponenten auf, wobei die RNA jedoch intakt bleibt. Durch Zugabe von Chloroform und darauffolgender Zentrifugation wird die Trizol[®]-Lösung in eine wäßrige und eine organische Phase aufgetrennt, wobei die RNA ausschließlich in der wäßrigen Phase verbleibt, und so isoliert werden kann.

Dem Trizol-Protokoll folgend wurde das tiefgefrorene Herzgewebe unter sterilen Bedingungen pulverisiert und im Trizol[®]-Reagenz gelöst (100 mg/ml Trizol). Bei Raumtemperatur wurden die Proben 5 min inkubiert, mit 0,2 ml Chloroform geschüttelt, weitere 3 min inkubiert und anschließend 15 min bei 12000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die wäßrige Phase wurde in eine neue Tube überführt, 0,5 ml Isopropanol zugesetzt, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und 10 min bei 12000 g und 4 °C zentrifugiert. Dabei setzte sich das RNA-Pellet ab und der Überstand konnte verworfen werden. Nach einem Waschvorgang mit 75%igem Ethanol, 5 min Zentrifugieren bei 7500 x g und 4 °C wurde das Pellet getrocknet, je nach Pelletgröße in 20-100 µl RNase freiem Wasser gelöst, portioniert und bei -85 °C gelagert.

2.5.2 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription (RT) ist der erste Schritt bei der Untersuchung der Genexpression mittels der RT-PCR (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*). Dabei wird die isolierte RNA mit einer "Reversen Transkriptase" in ihre komplementäre DNA-Sequenz (cDNA) konvertiert, die dann mittels PCR quantifiziert werden kann. "Reverse Transkriptasen" sind DNA-Polymerasen, die RNA als Matrize verwenden. Das 3'-Ende eines Primers liefert dabei den Startpunkt für die Synthese des cDNA-Stranges, wobei ein RNA-DNA-Hybrid entsteht. Dieser Schritt wird auch als Einzelstrang-Synthese bezeichnet. In der anschließenden PCR-Amplifikation dient nur der cDNA-Strang als Matrize.

Verwendet wurde die Superskript II Reverse Transkriptase, wobei zuerst 2 µg der isolierten RNA mit 2,5 µl Oligo(dT)-Adaptor-Primer (20 µM) versetzt und auf 12 µl mit DEPC-Wasser aufgefüllt wurden. Nach 5 min bei 70 °C wurde der Versuchsansatz sofort auf Eis gestellt. Nach der Zugabe von 4 µl 5x Erst-Strang-Puffer, 2 µl DTT (0,1 M) und 1 µl dNTP Mix (10 mM) wurde der Ansatz für 2 min bei 42 °C inkubiert, bevor 1 µl Superskript II (200 U/µl) zugegeben wurde. Anschließend erfolgte eine Inkubation von 1 h bei 42 °C, bevor die Reaktion durch Erhitzen (90 °C für 5 min) gestoppt wurde.

2.5.3 TaqMan RT-PCR

Zur Bestimmung der RNA-Expression von CYP11B2 wurde die Real-Time TaqMan RT-PCR verwendet. Bei dieser Methode werden mittels der Taq-Polymerase einzelne komplementäre Oligonukleotide, die sich an die aufgetrennte DNA-Doppelhelix angelagert haben, zu einem Strang verbunden. Neben den Primern hybridisiert zusätzlich eine Sonde an den Matrizenstrang. Diese besteht aus einem sequenzspezifischen Oligonukleotid, das zwischen den beiden Primern an die Zielsequenz bindet, am 5'-Ende mit einem fluoreszierenden „Reporter“-Farbstoff markiert ist und am 3'-Ende einen „Quencher“-Farbstoff trägt. Wird die intakte Sonde bei einer spezifischen Wellenlänge von 488 nm angeregt, so wird die Fluoreszenz des "Reporter"-Farbstoffs aufgrund der räumlichen Nähe zum "Quencher" durch einen Fluoreszenz-Energietransfer unterdrückt. Wenn nach der Hybridisierung von Primer und Sonde an den Matrizenstrang die Taq-Polymerase die einzelnen Nukleotide zusammenfügt, trifft sie auch auf die Sonde. Da die Taq-Polymerase neben ihrer Polymeraseaktivität noch eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität aufweist, wird die Sonde vom Matrizenstrang abgetrennt und geschnitten. Dadurch wird der Abstand zwischen dem fluoreszierenden Farbstoff und dem Quencher-Farbstoff größer, der Fluoreszenz-Energietransfer wird ausgeschaltet und der Reporter-Farbstoff gibt nach Anregung mit einer Wellenlänge von 488 nm sein Fluoreszenzsignal ab. Sonden, die während der PCR nicht an den DNA-Strang angelagert waren, werden nicht hydrolysiert. Somit wird die räumliche Nähe zwischen den beiden Farbstoffen auch nicht unterbrochen und die nicht angelagerten Sonden geben daher kein Signal ab. Auf diese Weise ist es möglich, an der Stärke des Fluoreszenzsignals die Akkumulation der PCR-Produkte abzulesen. Dies wird mit Hilfe des ABI PRISM™ 7700 Sequence Detektors im geschlossenen Reaktionsgefäß Zyklus für Zyklus erfasst. Die Real Time TaqMan PCR erfordert also keine post-PCR Auswertung per Gel-Elektrophorese. Als Referenz können bei der TaqMan PCR bekannte Mengen von Ziel-cDNA, die zuvor aus einer cRNA revers transkribiert wurden, als Standardkurve amplifiziert werden. Die sogenannten C_T -Werte (*Cycle Threshold*) werden in Abhängigkeit von der Standard-cDNA-Menge anhand des Auswertungsprogramms aufgetragen und dienen als Bezug für die Messwerte der Proben.

Die Durchführung der RT-PCR erfolgte mit dem ABI PRISM™ 7700 Sequence Detection System (PE Biosystems). Aus dem TaqMan® Universal PCR Master Mix, den Primern und der Sonde wurde auf Eis der PCR-Reaktionsmix hergestellt. Die verwendeten Primer und Sonden sind in Tab. 3 aufgeführt. Vom PCR-Reaktionsmix wurden für jede Probe 20 µl in eine Kavität einer 96-Lochplatte pipettiert. Danach wurden 5 µl der zu quantifizierenden cDNA

hinzugegeben. Wie im EZ-RT-PCR TaqMan-Kit Protokoll beschrieben, wurde folgendes PCR-Programm verwendet: Zuerst wurden die PCR-Ansätze 2 min bei 50°C inkubiert, danach erfolgten 30 min bei 60°C und 5 min bei 95°C. Die Amplifikation erfolgte in 45 Zyklen von jeweils 20 sec bei 94°C und 1 min bei 60°C. Für jede Probe erfolgte eine Dreifach-Bestimmung. Zur Bestimmung des C_T -Wertes wurde die ABI PRISMTM Sequence Detection Software (Version 1.6) verwendet.

2.5.4 RT-PCR mittels SYBRGreen

Für die Messung der RNA-Expression von α -MHC (*myosin heavy chain*), β -MHC und ANP (atriales natriuretisches Peptid) kam die Real-time RT-PCR mit SYBRGreen zum Einsatz. Der zur cDNA-Quantifizierung verwendete Fluoreszenzfarbstoff SYBRGreen interkaliert während der Primer-Verlängerungsreaktion in die neu gebildete doppelsträngige DNA und generiert ein Fluoreszenzsignal, das proportional zur DNA-Konzentration ist. Der Nachteil dieser Methode im Vergleich zur TaqMan RT-PCR ist, dass auch unspezifische PCR-Produkte und Primer-Dimere mitgemessen werden und dadurch das Ergebnis bei der Quantifizierung verfälschen können. Dies kann überprüft werden, indem die Messung der Fluoreszenz bei einer erhöhten Temperatur durchgeführt wird, bei der die Primer-Dimere bereits aufgeschmolzen sind, die längeren spezifischen PCR-Produkte aber noch doppelsträngig vorliegen.

Die Durchführung dieser RT-PCR erfolgte mit dem *5700 Sequence Detection System* (Applied Biosystems) und dem SYBRGreen PCR Master Mix. Das Reaktionsvolumen betrug 25 μ l, wobei die Primer in einer Konzentration von 0,3 oder 0,9 mol/L vorlagen und 1 μ l cDNA enthalten waren. Das nachfolgende PCR-Programm bestand aus 10 min Denaturierung bei 95 °C, gefolgt von 40 Zyklen bestehend aus jeweils 15 sec bei 95 °C und 1 min bei 65 °C.

In allen durchgeführten RT-PCR Experimenten (TaqMan-Sonde und SYBRGreen) wurde zur Quantifizierung das jeweilige Zielgen auf die ubiquitär exprimierten nicht regulierten Referenzgene (*housekeeping gens*) 18S (bei CYP11B2, MR und 11 β HSD2) bzw. Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (bei α - und β -MHC und ANP) normalisiert. Bei der Real-time PCR mittels SYBRGreen und TaqMan-Sonden wurde zur Quantifizierung eine auf einer Verdünnungsreihe basierende Standardkurve für das Zielgen und das Referenzgen verwendet. Die C_T -Werte der analysierten Proben wurden dann anhand der Standardkurve umgerechnet.

2.6 Statistik

Die ermittelten Daten sind als arithmetischer Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Die Ald-Spiegel im Serum und im Herzgewebe und die Renin- und Kortikosteronkonzentrationen im Plasma wurden als Median mit der dazugehörigen Spannweite (Range) dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede der Mittelwerte wurden mit einem ANOVA-Test und dem Scheffe-Test überprüft. Für die Blutdruck-Verläufe wurde ein repeated ANOVA-Test verwendet. Ein nicht-parametrischer Test wurde für die Differenzen zwischen Median-Werten durchgeführt. Die Mortalitätsrate wurde mittels der Kaplan-Meier Analyse ausgewertet. Ein Wert von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant erachtet. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der statistischen Software StatView[®] (Abacus Concept Inc., USA).

3 ERGEBNISSE

3.1 Einfluss von FAD286 auf die Plasma-Renin-Aktivität

Die Plasma-Renin-Aktivität (PRA) zeigt an, wieviel AOPEN mittels Renin zu Angiotensin I umgewandelt wird und nimmt damit auch indirekt Einfluss auf die Höhe der Ang II-Spiegel. Da wir in unserem Tiermodell mit FAD286 spezifisch die Ald-Spiegel senken wollten ohne die Ang II-Spiegel zu beeinflussen, prüften wir *in vitro*, ob FAD286 die enzymatische Wirksamkeit von Renin beeinflusst.

Die Plasmaprobe einer unbehandelten dTGR wurde mit dem Renin-Inhibitor Aliskiren (2 μM) oder mit FAD286 (1 μM) inkubiert und nach 60 min wurde die Menge von neu gebildetem Angiotensin I bestimmt. Während der Renin-Inhibitor die Renin-vermittelte Umwandlung von AOPEN zu Angiotensin I weitgehend unterdrückte, konnte bei FAD286 kein Unterschied zur Kontrolle festgestellt werden (Abb. 10). Damit scheint FAD286 keinen Einfluss auf die PRA zu haben.

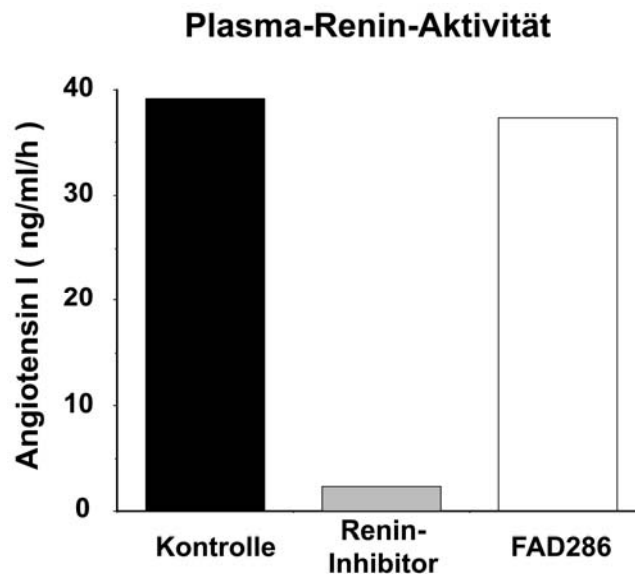


Abb. 10: Plasma-Renin-Aktivität von einer unbehandelten Ratte. Der Renin-Inhibitor Aliskiren (2 μM) bzw. FAD286 (1 μM) wurde mit der Plasmaprobe inkubiert und die Menge von Angiotensin I nach 60 min bestimmt.

3.2 Einfluss von FAD286 und Losartan auf Mortalität und Organschaden in dTGR (Protokoll I)

Um den Einfluss von Ald am Ang II-induzierten Endorganschaden im dTGR-Modell genauer untersuchen zu können, wurden die dTGR in Protokoll I von der 4. bis zur 7. Woche mit dem Ald-Synthase-Hemmer FAD286 oder dem AT₁-Blocker Los behandelt. Ziel dieses Versuchsteils war es, mittels FAD286 die Ald-Synthese im gesamten Körper der Versuchstiere zu unterdrücken und somit auch eine potentielle lokale Ald-Produktion in Herz und Gefäßen auszuschalten. Unbehandelte dTGR entwickelten schwere Organschäden und dienten als kranke Kontrollgruppe. In Los-behandelten dTGR war der pathogene Stimulus Ang II blockiert, weshalb sich in diesen Tieren keine Organschäden ausbildeten und sie als gesunde Kontrollgruppe dienten. Die Endorganschäden wurden in den einzelnen Gruppen anhand von Mortalität, Blutdruck, Herz- und Nierenfunktion und histologischen Organuntersuchungen beurteilt.

3.2.1 Mortalität in Protokoll I

In Protokoll I wiesen unbehandelte dTGR bei Versuchsende nach 7 Lebenswochen eine Mortalität von 40% (5/13) auf, während bis zu diesem Zeitpunkt nur 10% (1/10) der FAD286-behandelten dTGR starben und alle Los-behandelten dTGR überlebten (Abb. 11). Somit senkte FAD286 die Mortalitätsrate um 75% im Vergleich zu unbehandelten dTGR.

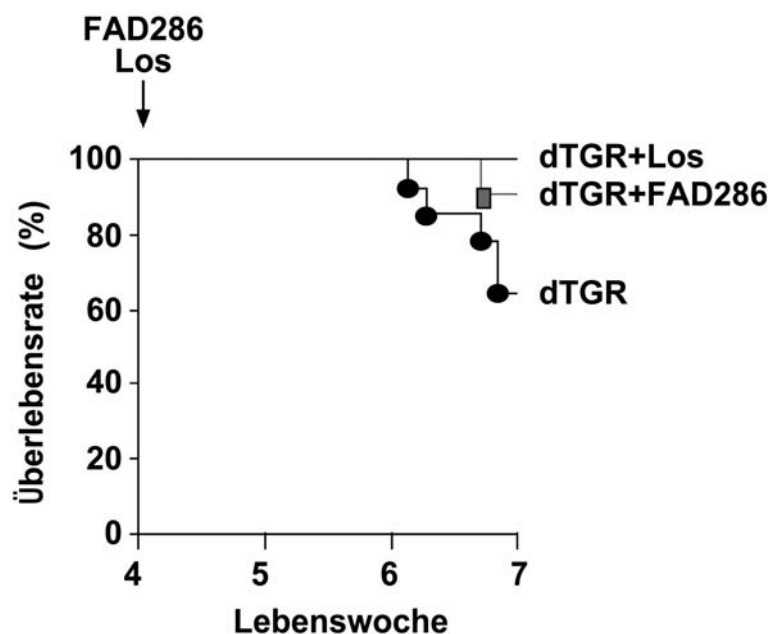


Abb. 11: Mortalität der dTGR in Protokoll I. FAD286 senkt die Mortalität in dTGR auf 10% im Vergleich zu 40% bei unbehandelten dTGR.

3.2.2 Blutdruck in Protokoll I

Unbehandelte dTGR entwickeln innerhalb weniger Wochen eine ausgeprägte Hypertonie. Da eine medikamentöse Ald-Blockade in höheren Dosen zu einer Blutdrucksenkung führt, stellte sich die Frage, ob die Verminderung der Mortalität in Protokoll I auf einem blutdrucksenkenden Effekt von FAD286 basierte.

Der systolische Blutdruck stieg bei unbehandelten dTGR von der 5. bis zur 7. Woche kontinuierlich an von 135 ± 4 mmHg in der 5. Woche über 153 ± 6 mmHg in der 6. Woche bis 200 ± 5 mmHg in der 7. Woche. FAD286-behandelte dTGR zeigten identisch erhöhte systolische Blutdruckwerte nach 5 und 6 Wochen (141 ± 4 und 152 ± 8 mmHg), wobei der Blutdruckanstieg nach 7 Wochen mit 177 ± 6 mmHg im Vergleich zu unbehandelten dTGR leicht geringer ausfiel. Im Gegensatz zu den beiden ersteren Gruppen normalisierte Los den systolischen Blutdruck, sodass es auch nach 7 Wochen mit 107 ± 5 mmHg zu keinem nennenswerten Blutdruckanstieg gekommen war (Abb. 12). Diese Messungen deuten darauf hin, dass in unserem Tiermodell FAD286 die Mortalität weitgehend unabhängig vom Blutdruck gesenkt hat.

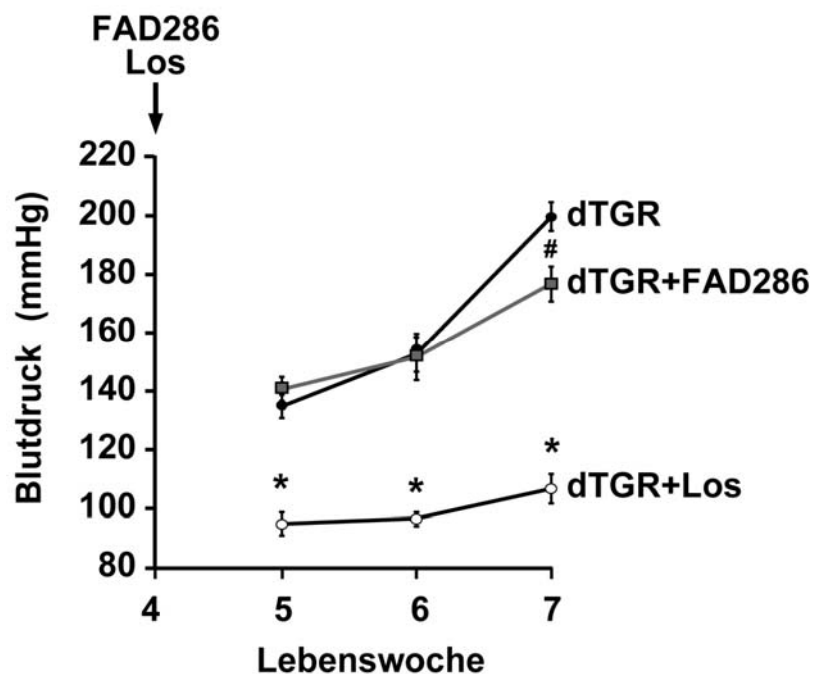


Abb. 12: Systolischer Blutdruck der dTGR in Protokoll I. FAD286- und unbehandelte dTGR zeigen einen annähernd identischen Blutdruckanstieg, während Los den Blutdruck normalisiert. $n=8-12$ pro Gruppe; * $p < 0,001$ vs. dTGR / dTGR-FAD286, # $p < 0,005$ vs. dTGR

3.2.3 Herzfunktion in Protokoll I

Unbehandelte dTGR entwickeln nach kurzer Zeit eine schwere linksventrikuläre Herzhypertrophie mit Infiltration von Entzündungszellen. Um den Einfluss von FAD286 auf die Herzfunktion beurteilen zu können, wurde der kardiale Hypertrophie-Index, die totale Herzwanddicke und die kardiale Ejektionsfraktion bestimmt. Zusätzlich wurde die mRNA-Expression verschiedener Hypertrophie-Marker gemessen und die Infiltration von Entzündungszellen ins Herzgewebe untersucht.

Kardialer Hypertrophie-Index

Der kardiale Hypertrophie-Index, der das Verhältnis von Herzgewicht zu Körpergewicht (mg/g) angibt, und bei Versuchsende nach 7 Wochen bestimmt wurde, zeigte deutliche Unterschiede zwischen den Gruppen. So wiesen unbehandelte dTGR einen deutlich erhöhten kardialen Hypertrophie-Index von $4,9 \pm 0,2$ mg/g auf, der durch FAD286-Behandlung signifikant auf $4,4 \pm 0,1$ gesenkt wurde. Los-behandelte dTGR zeigten im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen einen wesentlich geringeren kardialen Hypertrophie-Index von $3,1 \pm 0,03$ (Abb. 13).

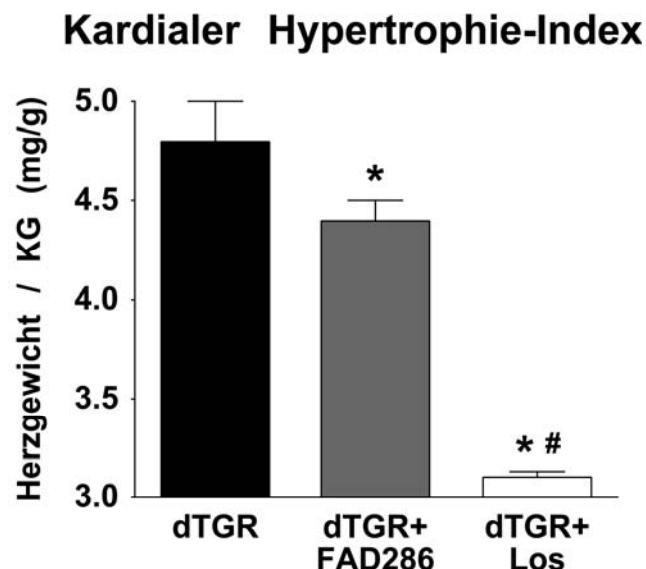


Abb. 13: Kardialer Hypertrophie-Index der Gruppen in Protokoll I. FAD286 senkt den Hypertrophie-Index signifikant im Vergleich zu unbehandelten dTGR. Los vermindert den Index deutlich im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen. $n=8-9$ pro Gruppe; * $p<0,05$ bzw. $0,001$ vs. dTGR, # $p<0,001$ vs. dTGR-FAD286

Totale Herzwanddicke in der Echokardiographie

Die Verminderung der Ang II-induzierten Herzhypertrophie durch FAD286 spiegelte sich auch in dem Ergebnis der Echokardiographie kurz vor Versuchsende wieder. Diese zeigte, dass unbehandelte dTGR eine ausgeprägte konzentrische Herzhypertrophie entwickelt hatten, während diese bei FAD286-behandelten Ratten im Vergleich signifikant geringer ausfiel. Los-behandelte dTGR wiesen keine pathologische Herzvergrößerung auf. Zur Quantifizierung der Herzhypertrophie wurde dabei sonographisch die totale Herzwanddicke bestimmt, die sich aus der Summe von Septum und linksventrikulärer Hinterwand berechnet. Unbehandelte dTGR wiesen eine totale Wanddicke von $3,7 \pm 0,01$ mm auf, wobei der enddiastolische Durchmesser des linken Ventrikels im Normbereich lag. Die Behandlung mit FAD286 oder Losartan reduzierte die totale Wanddicke signifikant auf $3,3 \pm 0,004$ bzw. $2,5 \pm 0,006$ mm (Abb. 14).

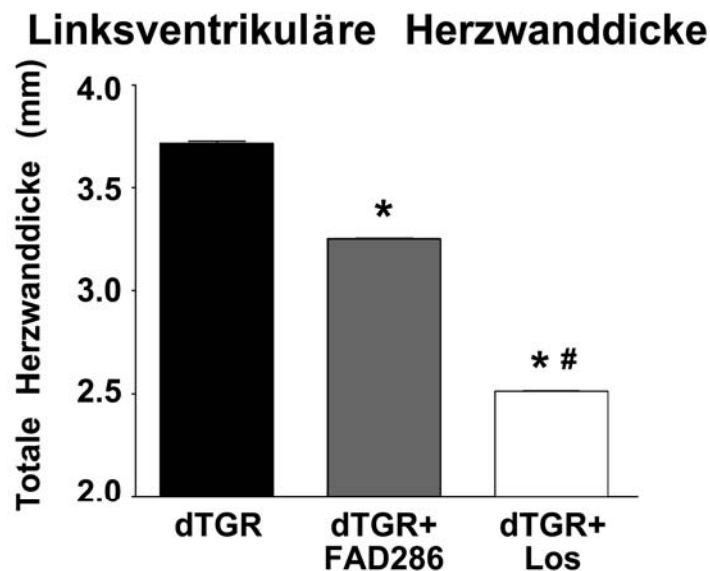


Abb. 14: Totale linksventrikuläre Herzwanddicke (Summe aus Septum und linksventrikulärer Hinterwand). FAD286 senkt die totale Herzwanddicke signifikant im Vergleich zu unbehandelten dTGR. Bei Los-behandelten dTGR kommt es zu einer deutlichen Abnahme der totalen Herzwanddicke im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen. $n=8-12$ pro Gruppe; * $p < 0,005$ bzw. $0,001$ vs. dTGR, # $p < 0,001$ vs. dTGR-FAD286

Ejektionsfraktion in der Echokardiographie

In der 7. Lebenswoche erfolgte die echokardiographische Messung der linksventrikulären Ejektionsfraktion (EF), die die tatsächliche Herzauswurfleistung angibt und als Verhältnis von endsystolischem zu enddiastolischem linksventrikulärem Volumen definiert ist. Während unbehandelte dTGR mit $80,4 \pm 1,5$ % eine verminderte EF aufwiesen, war diese bei FAD286-

behandelten dTGR deutlich auf $86,0 \pm 0,6$ % gesteigert (Abb.15). Los-behandelte dTGR zeigten mit $87,6 \pm 0,4$ % keine Verminderung ihrer EF. Damit wird deutlich, dass die Behandlung mit FAD286 nicht nur der strukturellen Entwicklung einer Herzhypertrophie vorbeugte, sondern auch direkt die kardiale Funktionsleistung schützte.

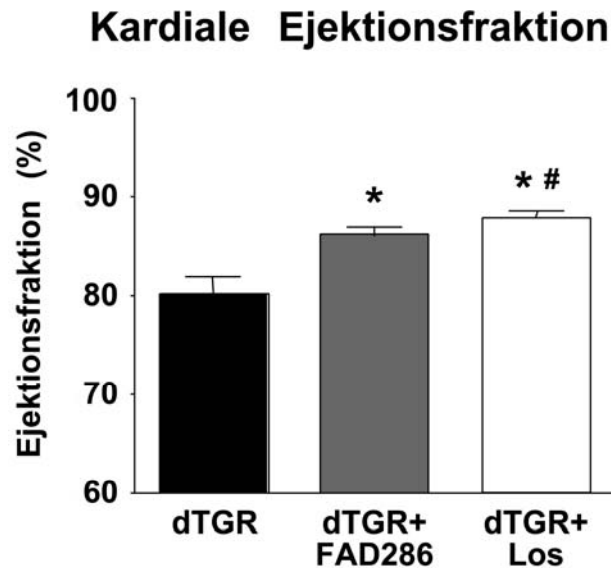


Abb. 15: Kardiale Ejektionsfraktion der Gruppen in Protokoll I. Während es in unbehandelten dTGR zu einem Abfall der EF kommt, vermindert die Behandlung mit FAD286 diesen kardialen Funktionsverlust. Los-behandelte dTGR zeigen keine Einschränkung der EF. $n=8-12$ pro Gruppe; * $p < 0,005$ bzw. $0,001$ vs. dTGR, # $p < 0,001$ vs. dTGR-FAD286

Kardiale mRNA-Expression von ANP sowie α - und β -MHC

Der protektive Effekt von FAD286 bei der Entwicklung einer linksventrikulären Herzhypertrophie konnte auch anhand verschiedener Hypertrophie-Marker nachgewiesen werden. So untersuchten wir die mRNA-Expression des atrialen natriuretischen Peptids (ANP), das die glatte Gefäßmuskulatur relaxiert, die Wasser- und Salzausscheidung in der Niere erhöht und somit einen Gegenspieler des Ald darstellt. Da es u.a. auch im linken Ventrikel synthetisiert wird und bei Zunahme der Herzmasse ansteigt, ist es zudem als kardialer Hypertrophie-Marker geeignet.

Die im linken Ventrikel gemessene Expression von ANP mRNA un behandelter dTGR war mit $21,41 \pm 2,20$ relativen Einheiten (RE) im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen stark erhöht. Die ANP mRNA in FAD286-behandelten dTGR war mit $10,2 \pm 1,44$ RE dagegen deutlich gesenkt, wobei es durch Los-Behandlung zu einer weiteren Abnahme auf $4,40 \pm 0,81$ RE kam (Abb 16).

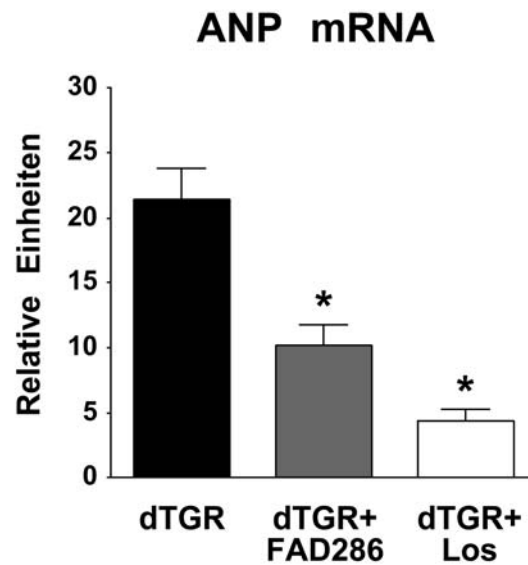


Abb. 16: mRNA-Expression von ANP im linken Ventrikel. FAD286-behandelte dTGR zeigen deutlich niedrigere ANP mRNA-Werte im linken Ventrikel als unbehandelte dTGR. Durch Los kommt es im Vergleich zu FAD286 zu einer weiteren Reduktion der ANP mRNA-Expression. $n=6-8$ pro Gruppe; * $p<0,005$ bzw. $0,001$ vs. dTGR

Desweiteren wurde die Expression von α - und β -Myosin Heavy Chain (MHC) mRNA im linken Ventrikel gemessen. α - und β -MHC sind Untereinheiten des Myosins, das als kontraktiles Protein maßgeblich an der Herzfunktion beteiligt ist. Wie beim Menschen kommt es auch in Rattenherzen bei der Entwicklung einer Herzhypertrophie im Rahmen des sogenannten "remodeling" zu einem Shift vom α -MHC zum fetalen β -MHC¹⁰⁹. Dieser Anstieg der β -MHC mit parallelem Abfall der α -MHC im linken Ventrikel war in den Herzen der unbehandelten dTGR deutlich ausgeprägt. FAD286 verminderte und Los verhinderte den bei unbehandelten dTGR ausgeprägten Abfall des α -MHC ($28,1\pm 0,5$ bzw. $65,1\pm 2,8$ vs. $18,6\pm 3,6$ RE) (Abb. 17). Parallel dazu kam es in FAD286- bzw. Los-behandelten dTGR zu einem verminderten bzw. keinem Anstieg des fetalen β -MHC im Gegensatz zu unbehandelten dTGR ($18,8\pm 1,6$ bzw. $6,7\pm 0,6$ vs. $27,2\pm 3,3$ RE). Damit wurde der Shift vom α -MHC zum fetalen β -MHC durch die Gabe von FAD286 vermindert und bei Los-behandelten dTGR völlig aufgehoben.

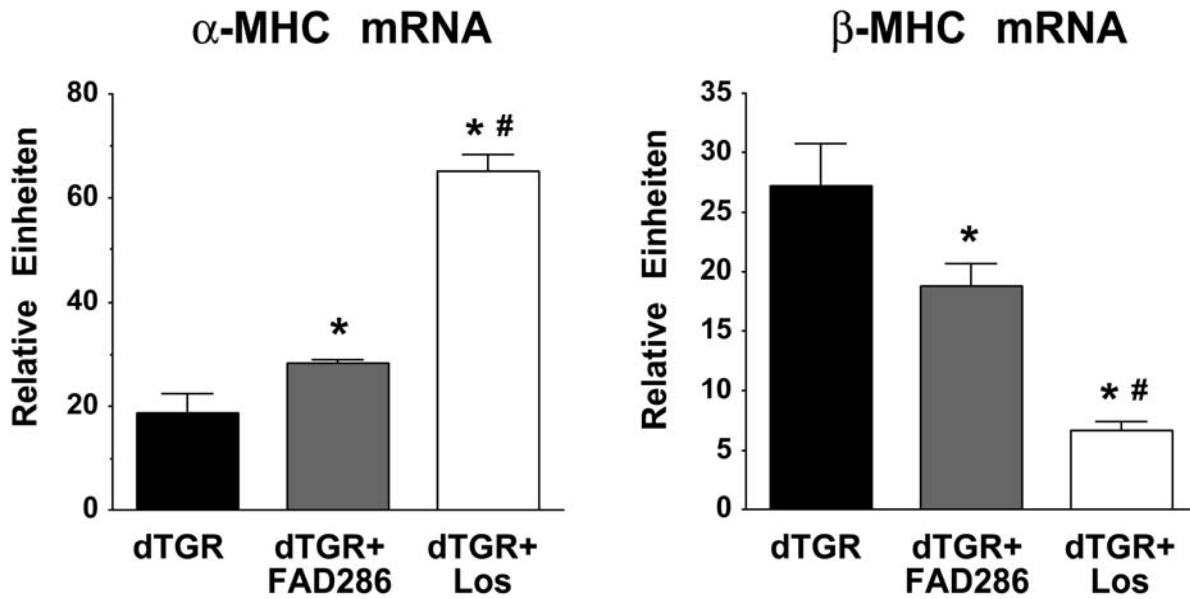


Abb. 17: mRNA-Expression von α - und β -Myosin Heavy Chain (MHC) im linken Ventrikel. Unbehandelte dTGR zeigen einen ausgeprägten Shift vom α -MHC zum fetalen β -MHC, während die Behandlung mit FAD286 diese Verlagerung deutlich vermindert und Los sie aufhebt. $n=6-7$ pro Gruppe; * $p<0,05$ bzw. $0,001$ vs. dTGR, # $p<0,05$ vs. dTGR-FAD286

Zusammenfassung Herzfunktion

Unbehandelte dTGR entwickeln eine Herzhypertrophie mit eingeschränkter Herzfunktion. Dies zeigt sich deutlich in der Erhöhung von kardialer Hypertrophie-Index und totaler Herzwanddicke, der Abnahme der echokardiographischen Ejektionsfraktion und dem Anstieg der mRNA-Expression von ANP und β -MHC im linken Ventrikel. Die Behandlung der Ratten mit FAD286 konnte diesen kardialen Krankheitsverlauf wesentlich bremsen, so dass es nur zu einer mäßigen Herzhypertrophie mit deutlich gesenkten Hypertrophie-Markern kam. Los verhinderte die Entwicklung von kardialer Dysfunktion und Hypertrophie.

3.2.4 Nierenfunktion in Protokoll I

Unbehandelte dTGR entwickeln nach wenigen Wochen eine Niereninsuffizienz mit nephrosklerotischen Veränderungen und schwerer Albuminurie. Um den Einfluss von FAD286 auf die Nierenfunktion beurteilen zu können, wurde die Albuminausscheidung gemessen sowie die Infiltration von Entzündungszellen und die renale Ablagerung von Kollagen IV und Fibronektin bestimmt.

Renale Albuminausscheidung

Zur Beurteilung einer Nierenschädigung wurde die renale Albuminausscheidung gemessen, da eine Proteinurie als uncharakteristisches Anzeichen bei fast allen Nephropatienten auftritt. Die in der 7. Woche durchgeführte Bestimmung der renalen Albuminausscheidung über 24 Stunden zeigte, dass FAD286 die bei unbehandelten dTGR beobachtete Niereninsuffizienz reduzierte, während Los diese sogar komplett verhinderte. So wurde die hohe renale Albuminausscheidung unbehandelter dTGR ($20,3 \pm 4,3$ mg/d) durch die FAD286-Behandlung signifikant auf $9,6 \pm 1,7$ mg/d und damit um 47% gesenkt. Los-behandelte dTGR zeigten keine Albuminurie (Abb. 18).

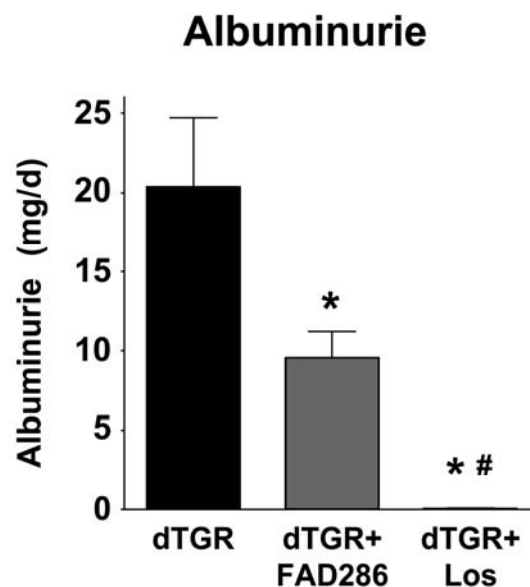


Abb. 18: Renale Albuminausscheidung der dTGR in Protokoll I. Bei FAD286-behandelten dTGR ist die renale Albuminausscheidung im Vergleich zu unbehandelten dTGR deutlich vermindert. Los-behandelte dTGR entwickeln keine Albuminurie. $n=8-10$ pro Gruppe; * $p<0,005$ bzw. $0,001$ vs. dTGR, # $p<0,005$ vs. dTGR-FAD286

Renale Infiltration von Entzündungszellen

Ang II führt im dTGR-Modell zur renalen Entzündungsreaktion mit der Infiltration verschiedener Entzündungszellen. Wir bestimmten den Anteil von ED1-positiven Monozyten / Makrophagen, von CD4- und CD8-positiven T-Zellen und von dendritischen Zellen in den entnommenen Nierenproben, um das Ausmaß der Zellinfiltration und des Nierenschadens abschätzen zu können. So wird eine glomeruläre, perivaskuläre und interstitielle Infiltration von Immunzellen bei einer Reihe von Nierenerkrankungen beobachtet. Dies bezieht sich nicht nur auf klassisch-immunologische renale Erkrankungen, sondern auch auf andere Nierenerkrankungen, wie die renovaskuläre Hypertonie mit stark aktiviertem Renin-Angiotensin-System ¹¹⁰.

Unbehandelte dTGR wiesen mit $18,8 \pm 2,3$ ED1-positiven Zellen pro Sichtfeld im Nierengewebe eine massive interstitielle und perivaskuläre Infiltration von Monozyten / Makrophagen auf, die durch FAD286 und Los deutlich gesenkt wurde ($7,8 \pm 1,4$ bzw. $6,6 \pm 0,4$ ED1-positive Zellen/Sichtfeld) (Abb. 19A+B). Die Verminderung der renalen Entzündungsreaktion durch FAD286 und Los im Vergleich zu unbehandelten dTGR, zeigte sich auch bei der Bestimmung CD4-positiver ($13,4 \pm 1,5$ und $10,8 \pm 0,9$ vs. $28,2 \pm 0,7$ Zellen/Sichtfeld) (Abb. 19C) und CD8-positiver T-Zellen ($10,2 \pm 1,0$ und $6,2 \pm 0,7$ vs. $14,8 \pm 1,4$ Zellen/Sichtfeld; $p < 0,05$). Desweiteren verglichen wir zwischen den Gruppen den Anteil von dendritischen Zellen ($8,3 \pm 1,2$ und $4,7 \pm 0,4$ vs. $14,0 \pm 1,2$ Zellen/Sichtfeld; $p < 0,05$) und CD86-positiven Zellen ($15,4 \pm 1,8$ und $11,8 \pm 1,2$ vs. $25,2 \pm 3,5$ Zellen/Sichtfeld; $p < 0,001$) und erhielten ähnliche Ergebnisse. FAD286 konnte somit effektiv die renale Infiltration von Entzündungszellen vermindern und dadurch die Entwicklung einer Entzündungsreaktion in den Nieren unterdrücken.

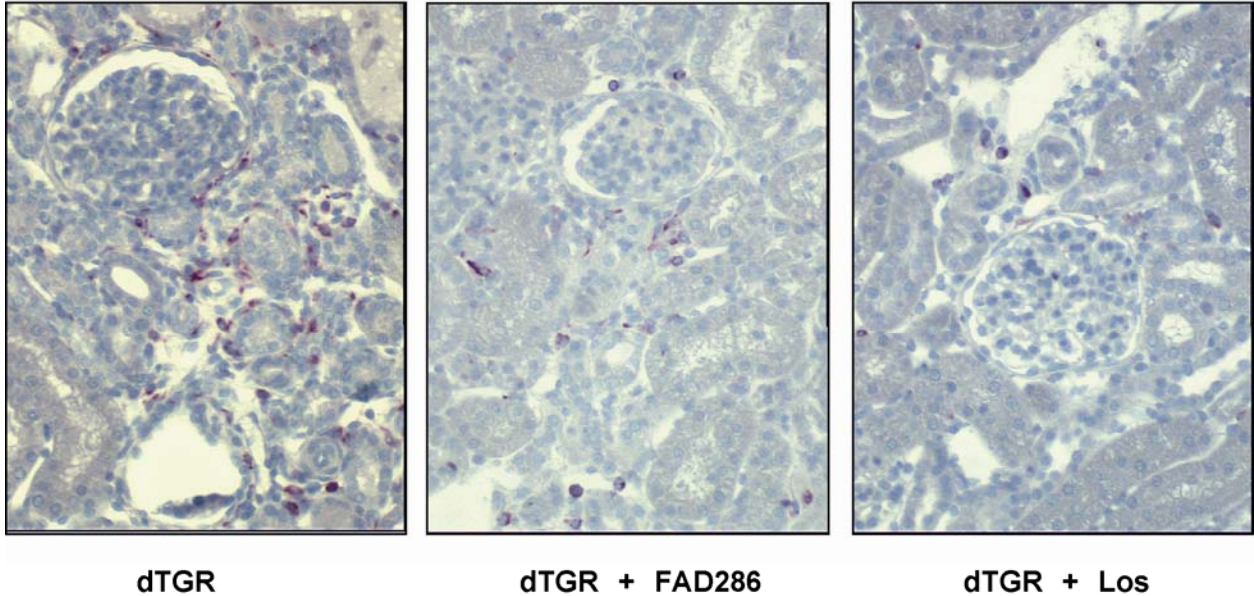
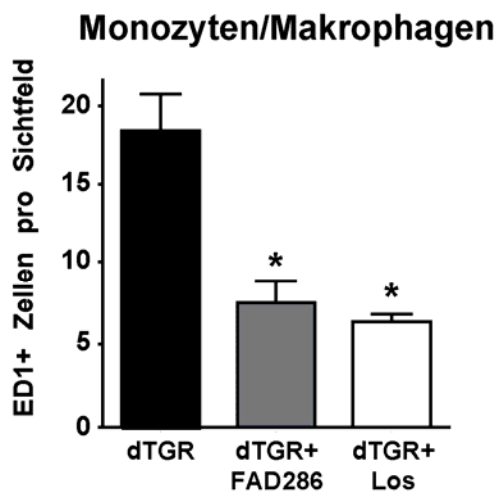
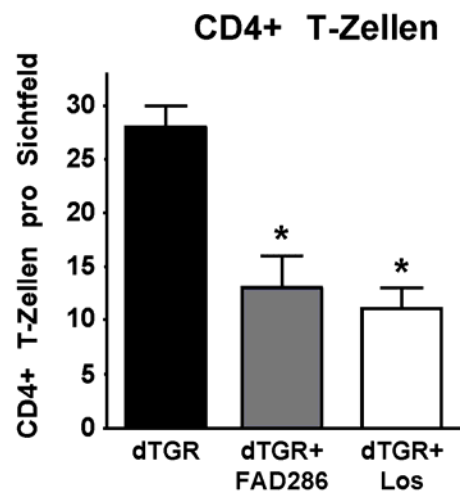
A**Monozyten/Makrophagen****B****C**

Abb. 19 A: Infiltration von Monozyten/Makrophagen im Nierengewebe. **B:** Semiquantitative Auszählung ED1-positiver Zellen in den Nierenproben. **C:** Infiltration von CD4-positiven T-Zellen im Nierengewebe. FAD286 und Los senken in gleichem Maße die Infiltration von Monozyten/Makrophagen und CD4-positiven T-Zellen in den Nieren im Vergleich zu unbehandelten dTGR. $n=5$ pro Gruppe; $*p<0,001$ vs. dTGR

Expression von Kollagen IV und Fibronektin in den Nieren

Die gesteigerte extrazelluläre Synthese von Matrixproteinen wie Kollagen IV geht einher mit einer eingeschränkten Nierenfunktion. Die Nieren unbehandelter dTGR zeigen nach wenigen Wochen eine massive Vermehrung der extrazellulären Matrix als Ausdruck einer renalen Fibrose. Um den Einfluss von FAD286 und Los auf die Fibrosierung der Nieren beurteilen zu können, untersuchten wir die Kollagen IV-Expression in den einzelnen Gruppen. Dabei war die Ablagerung von Kollagen IV in den Nieren von FAD286- und Los-behandelten Tieren im Vergleich zu unbehandelten dTGR vermindert. Die Semiquantifizierung von Kollagen IV im Gewebeschnitt zeigte, dass FAD286 die Kollagen-Ablagerungen im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich senkte, wenn auch nicht im gleichen Ausmaß wie Los. So wurde bei Kollagen IV der Score von (5+) bei unbehandelten dTGR auf (2+) bei FAD286-behandelten und (1+) bei Los-behandelten dTGR gesenkt. (Abb 20).

Kollagen IV

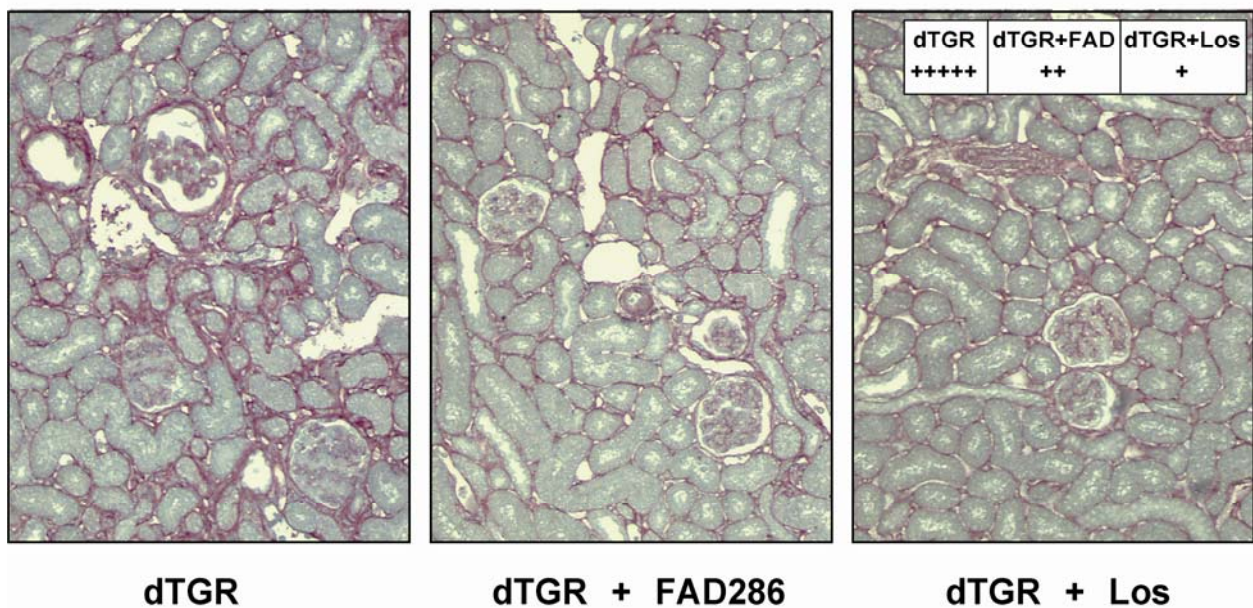


Abb. 20: Expression von Kollagen IV in den Nieren der einzelnen Gruppen. Unbehandelte dTGR zeigen massive Kollagen IV-Ablagerungen (Score 5+) in den Nieren. Die renale Kollagen IV-Expression wird durch FAD286 (Score 2+) und Los (Score 1+) deutlich vermindert.

Zusammenfassung Nierenfunktion

Die Untersuchung der Nierenfunktion und -histologie zeigte deutlich, dass FAD286 vor einem Ang II-induzierten Nierenschaden schützt. So verminderte FAD286 die ausgeprägte Albuminurie unbehandelter dTGR. Zudem kam es unter FAD286-Behandlung zu einer weit geringeren renalen Infiltration von Entzündungszellen und zu einer Abnahme der Expression von Matrixproteinen in den Nieren. Los konnte den renalen Krankheitsverlauf stoppen, indem es Albuminurie und renale Matrixproteinablagerung weitestgehend verhinderte und die Entzündungszellinfiltration in den Nieren zu gleichen Maßen wie FAD286 senkte.

3.3 Einfluss der Adrenalectomie (ADX) auf Mortalität und Organschaden in dTGR (Protokoll II)

Um die Rolle von Ald in der Pathogenese des Ang II-induzierten Organschadens genauer untersuchen zu können, wurden in Protokoll II 4 Wochen alte dTGR adrenalectomiert und mit nicht-adrenalectomierten dTGR verglichen. Um den ADX-bedingten Verlust an Glukokortikoiden und Salz auszugleichen, wurden beide Gruppen mit Dex und Salz substituiert. Ziel dieses Versuchsteils war es, die Ald-Produktion der Nebennieren auszuschalten und damit das zirkulierende Ald zu entfernen. Eine potentielle lokale Ald-Produktion in Herz und Gefäßen bliebe durch die ADX weitgehend unbeeinflusst, womit in diesem Versuchsprotokoll der Anteil des zirkulierenden vom Anteil des lokalen Ald-Systems am Ang II-induzierten Organschaden unterschieden werden kann. Die Endorganschäden wurden in den einzelnen Gruppen anhand von Mortalität, Blutdruck, Herz- und Nierenfunktion und histologischen Organuntersuchungen beurteilt.

3.3.1 Mortalität in Protokoll II

Bei kumulativer Analyse von Protokoll II und III wiesen die nur mit Salz und Dex behandelten Ratten (dTGR-Dex-Salz) nach 7 Lebenswochen eine Mortalität von 73% (16/22) auf, während bis zu diesem Zeitpunkt nur 22% (5/23) der adrenaletomierten dTGR (ADX-dTGR-Dex-Salz) starben (Abb. 21). Im Protokoll III waren nach 9 Wochen alle dTGR-Dex-Salz gestorben, während im gleichen Zeitraum nur 38% der ADX-dTGR-Dex-Salz verstarben. Somit war die Mortalitätsrate bei adrenaletomierten dTGR im Vergleich zu nicht-adrenaletomierten dTGR nach 7 Wochen um 70% gesenkt.

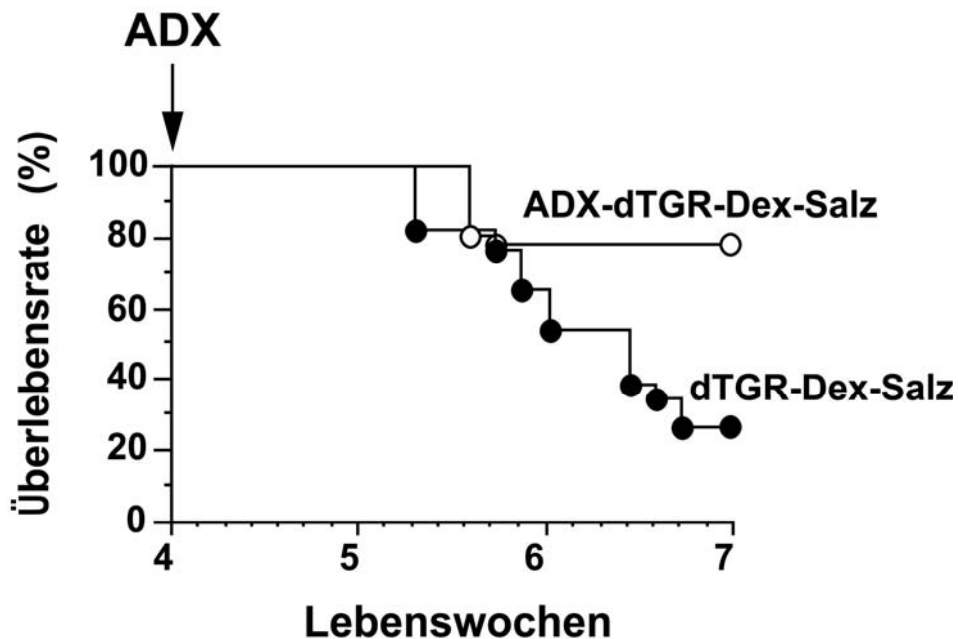


Abb. 21: Kumulative Analyse der Mortalität aus Protokoll II und III. Adrenaletomierte dTGR weisen nach 7 Wochen eine 70% geringere Sterblichkeit als nicht-adrenaletomierte dTGR auf.

3.3.2 Blutdruck in Protokoll II

Unbehandelte dTGR entwickeln innerhalb weniger Wochen einen ausgeprägten Bluthochdruck. Da hohe Ald-Spiegel eine Hypertonie begünstigen und Ald-Entzug zu einem Blutdruckabfall führen kann, stellte sich auch in Protokoll II die Frage, ob die Verminderung der Mortalität auf einer ADX-bedingten Blutdrucksenkung basierte. Die Messung des systolischen Blutdrucks zur 7. Woche zeigte fast identisch erhöhte Blutdruckwerte von dTGR-Dex-Salz und ADX-dTGR-Dex-Salz (190 ± 9 und 187 ± 4 mmHg) (Abb. 22). Damit hatte die ADX keinen nennenswerten Einfluss auf den Grad der Hypertonie und verminderte die Mortalität in dTGR blutdruckunabhängig.

systolische Blutdruck

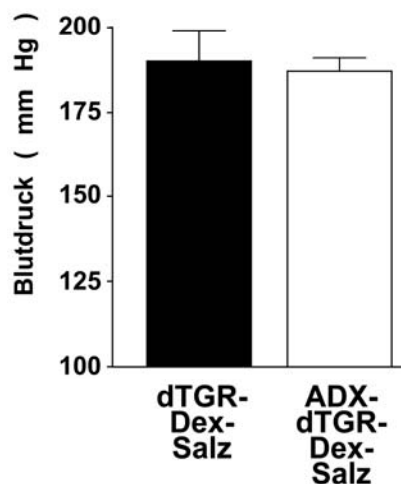


Abb. 22: Systolischer Blutdruck der dTGR in Protokoll II nach 6 Wochen. ADX-dTGR-Dex-Salz und dTGR-Dex-Salz zeigen annähernd gleich hohe Blutdruckwerte. ADX hatte keinen nennenswerten Einfluss auf den Blutdruck. $n=5-7$ pro Gruppe; $p>0,05$

3.3.3 Herzfunktion in Protokoll II

Unbehandelte dTGR entwickeln nach wenigen Wochen eine schwere linksventrikuläre Herzhypertrophie mit kardialer Fibrose und Entzündungszellinfiltration. Um den Einfluss der ADX auf den Herzschaden beurteilen zu können, wurde der kardiale Hypertrophie-Index, die totale Herzwanddicke, die Expression von Hypertrophie-Markern, die Ablagerung von Fibronectin im Herzmuskel und die kardiale Infiltration von Entzündungszellen gemessen.

Kardialer Hypertrophie-Index

Der kardiale Hypertrophie-Index, der bei Versuchsende nach 7 Wochen bestimmt wurde, zeigte deutliche Unterschiede zwischen beiden Gruppen. dTGR-Dex-Salz wiesen einen eindeutig erhöhten kardialen Hypertrophie-Index von $5,7 \pm 0,4$ mg/g auf, der durch die ADX signifikant auf $4,5 \pm 0,1$ gesenkt wurde (Abb. 23). Somit bremst der Entzug des zirkulierenden Ald mittels ADX die Entwicklung der bei dTGR-Dex-Salz ausgeprägten Herzhypertrophie.

Kardialer Hypertrophie-Index

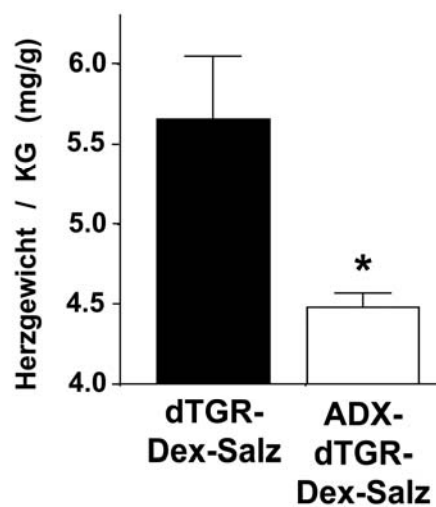


Abb. 23: Kardialer Hypertrophie-Index beider Gruppen in Protokoll II. Bei adrenaletomierten dTGR ist bei Versuchsende nur eine geringgradige Herzhypertrophie festzustellen, während nicht-adrenaletomierte dTGR eine ausgeprägte kardiale Hypertrophie entwickelt haben. $n=5-7$ pro Gruppe; $*p < 0,05$

Totale Herzwanddicke in der Echokardiographie

Wie anhand des kardialen Hypertrophie-Indexes deutlich wurde, entwickelten adrenaletomierte dTGR eine weniger ausgeprägte Herzhypertrophie als die entsprechende Kontrollgruppe (dTGR-Dex-Salz). Dies bestätigte sich auch bei der Bestimmung der totalen Herzwanddicke mittels Echokardiographie. dTGR-Dex-Salz wiesen eine totale Wanddicke von $3,7 \pm 0,06$ mm auf, während diese bei ADX-dTGR-Dex-Salz nur $3,3 \pm 0,09$ mm betrug (Abb. 24).

Linksventrikuläre Herzwanddicke

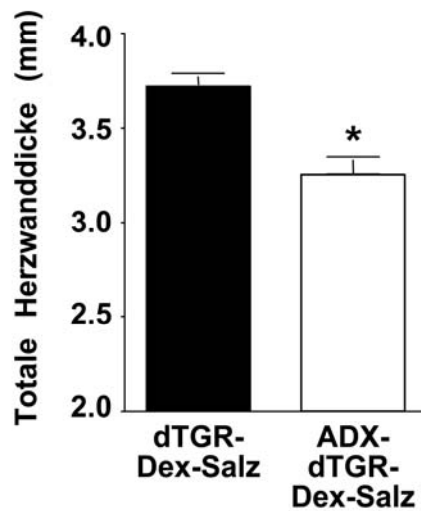


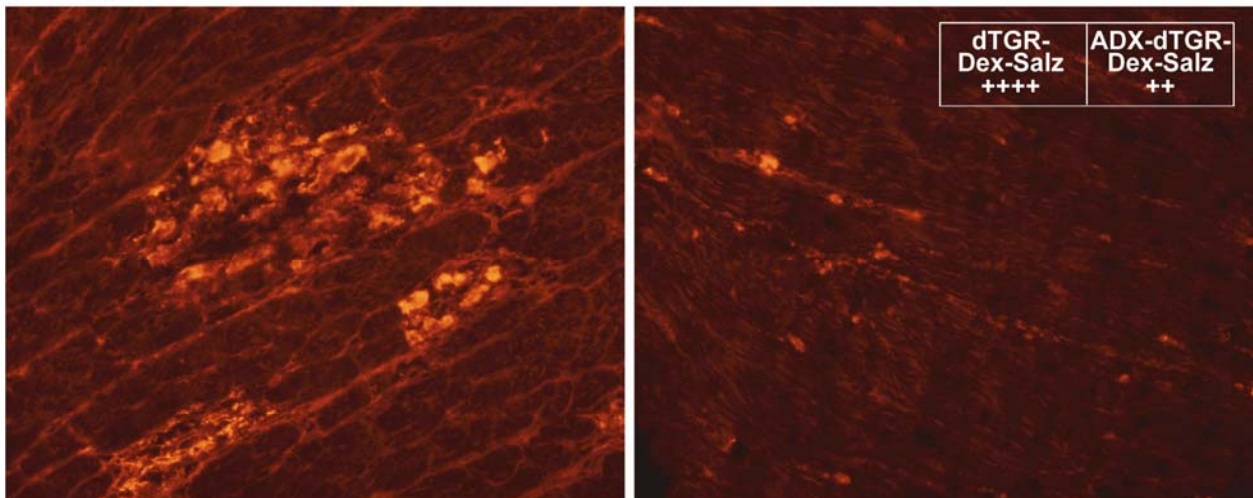
Abb. 24: Totale linksventrikuläre Herzwanddicke in Protokoll II. In ADX-dTGR-Dex-Salz fällt die totale Herzwanddicke im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne ADX signifikant geringer aus. $n=5-7$ pro Gruppe; $*p<0,01$

Kardiale Expression von Kollagen I und Fibronectin

Die Proteine Kollagen I und Fibronectin werden von Fibroblasten synthetisiert und bilden einen Bestandteil der extrazellulären Matrix. Kommt es durch krankhafte Prozesse im Herz zur verstärkten Synthese und Ablagerung von extrazellulären Matrix-Proteinen, entwickelt sich eine kardiale Fibrose. Der Herzmuskel verliert an Elastizität und Leistungsfähigkeit, wodurch es zu kardialen Funktionseinschränkungen kommt.

In unserem Experiment wurde die kardiale Expression von Kollagen I und Fibronectin als Maß für eine sich entwickelnde Herzfibrose bestimmt. Während sich bei den dTGR-Dex-Salz nach Semiquantifizierung eine hohe kardiale Ablagerung von Kollagen I mit einem Score von (4+) in den Herzschnitten darstellte, war diese in der adrenaletomierten Versuchsgruppe mit einem Score von (2+) deutlich vermindert (Abb. 25). Gleiches zeigte sich bei der Bestimmung von Fibronectin in den Herzschnitten. Auch hier bewirkt die ADX eine deutliche Abnahme der Fibronectin-Expression von einem Score von (4+) auf einen Score von (2+) (Abb. 26).

Kollagen I

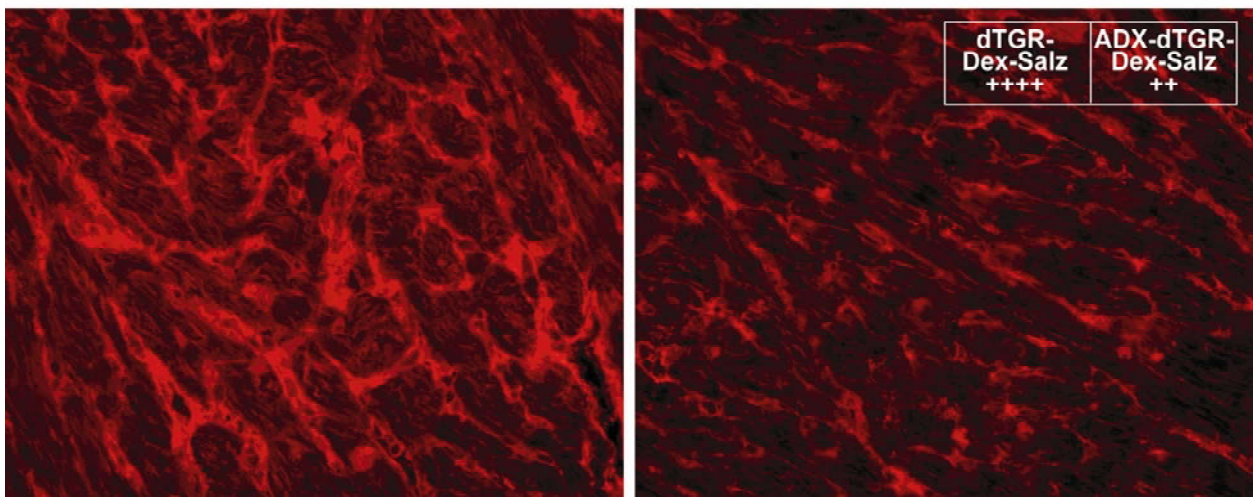


dTGR-Dex-Salz

ADX-dTGR-Dex-Salz

Abb. 25: Expression von Kollagen I in den Herzen beider Gruppen. dTGR-Dex-Salz weisen deutliche Kollagen I-Ablagerungen in den Herzen auf (Score 4+), während diese bei den ADX-dTGR-Dex-Salz weitgehend verhindert wurden (Score 2+).

Fibronektin



dTGR-Dex-Salz

ADX-dTGR-Dex-Salz

Abb. 26: Expression von Fibronektin in den Herzen beider Gruppen. dTGR-Dex-Salz weisen deutliche Fibronektin-Ablagerungen in den Herzen auf (Score 4+), während diese bei ADX-dTGR-Dex-Salz weitgehend verhindert wurden (Score 2+).

Kardiale Infiltration von Entzündungszellen

Die kardiale Infiltration von Entzündungszellen wurde durch die ADX im Vergleich zu den dTGR-Dex-Salz deutlich vermindert. Die Anfärbung der Herzproben auf ED1-positive Monozyten und Makrophagen zeigte, dass ADX-dTGR-Dex-Salz nur halb so viele ED1-positive Zellen im Herzgewebe aufwies wie dTGR-Dex-Salz ($6,6 \pm 0,2$ vs. $14,6 \pm 3,4$ Zellen/Sichtfeld). Auch die Anzahl CD4-positiver T-Zellen war in den Herzproben der ADX-dTGR-Dex-Salz im Vergleich zu den dTGR-Dex-Salz halbiert ($5,8 \pm 0,7$ vs. $12,6 \pm 2,9$ Zellen/Sichtfeld) (Abb. 27).

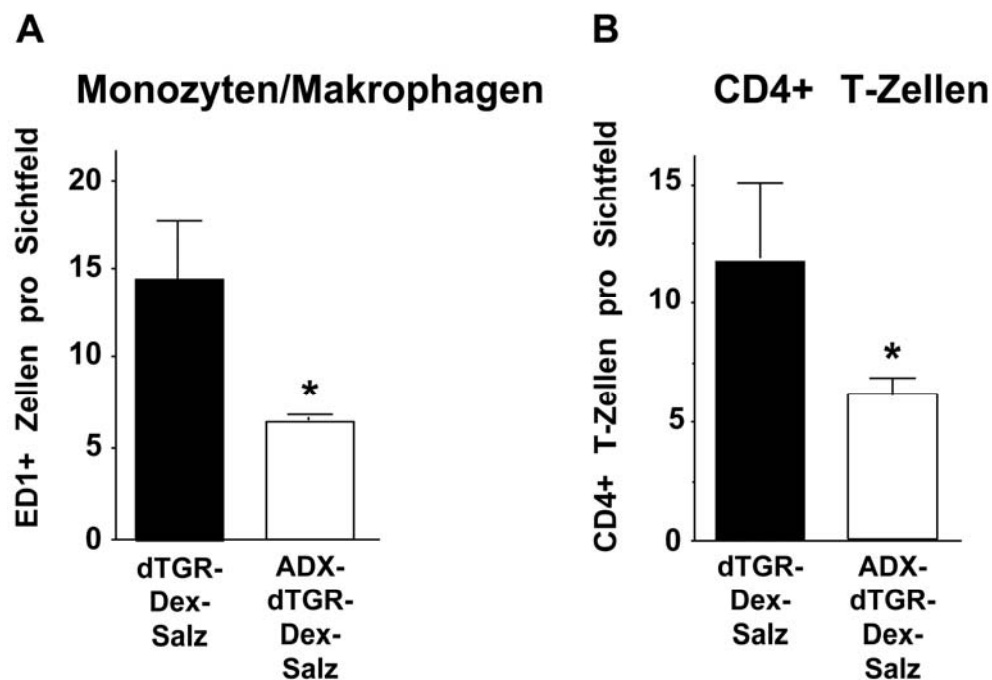


Abb. 27: Infiltration von Monozyten/Makrophagen (A) und CD4-positiven T-Zellen (B) im Herzgewebe. ADX halbiert die Anzahl der ED1- und CD4-positiven Zellen im Herzgewebe im Vergleich zu dTGR-Dex-Salz. $n=5$ pro Gruppe; $*p<0,05$

Zusammenfassung Herzfunktion

Während nur mit Dex und Salz behandelte dTGR einen ausgeprägten Herzschaden entwickelten, fiel dieser in zusätzlich adrenaletomierten Ratten deutlich geringer aus. So führte ADX zu einer Senkung des kardialen Hypertrophie-Index und einer Abnahme der totalen Herzwanddicke. Zudem verringerte sich die Verschiebung vom α -MHC zum fetalen β -MHC. Der protektive Effekt der ADX bei der Entwicklung einer Herzfibrose spiegelte sich in einer geringeren Expression von Kollagen I und Fibronectin wieder. Die Infiltration von Entzündungszellen ins Herzgewebe wurde durch ADX halbiert.

3.3.4 Nierenfunktion in Protokoll II

Unbehandelte dTGR entwickeln in wenigen Wochen eine Niereninsuffizienz mit schwerer Albuminurie. Um den Einfluss der ADX auf die Nierenfunktion beurteilen zu können, wurde in Protokoll II in beiden Gruppen die renale Albuminausscheidung gemessen sowie die Infiltration von Entzündungszellen und die Kollagen IV-Expression in den Nieren bestimmt.

Renale Albuminausscheidung

Die ADX verhinderte den Nierenschaden im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dies zeigte sich deutlich anhand der Albuminausscheidung, die einen wichtigen Parameter in der Beurteilung einer Niereninsuffizienz darstellt. ADX-dTGR-Dex-Salz wiesen zur 7. Woche mit $1,5 \pm 0,7$ mg/d eine fast im Normbereich liegende renale Albuminausscheidung auf, während dTGR-Dex-Salz mit $47,8 \pm 18,3$ mg/d eine ausgeprägte Albuminurie entwickelt hatten (Abb. 28).

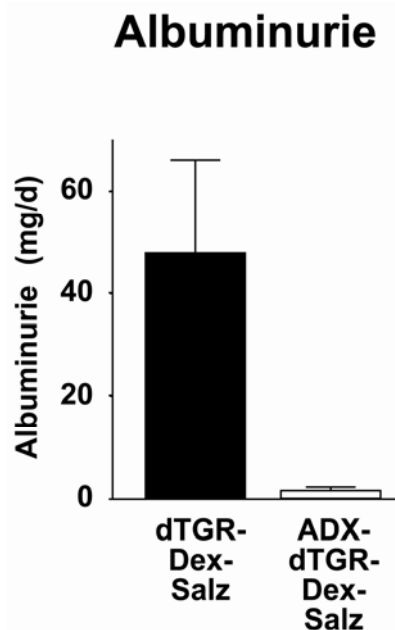


Abb. 28: Renale Albuminausscheidung beider Gruppen in Protokoll II. Während dTGR-Dex-Salz eine ausgeprägte Albuminurie aufwies, wurde diese in der Gruppe der ADX-dTGR-Dex-Salz vollständig verhindert. $n=6-8$ pro Gruppe; $p^* < 0,05$

Renale Infiltration von Entzündungszellen

Ebenso wie FAD286 in Protokoll I verhinderte die ADX in Protokoll II die Entwicklung einer ausgeprägten renalen Entzündungsreaktion. So bestimmten wir den Anteil von ED1-positiven Monozyten/Makrophagen, CD4- und CD8-positiven T-Zellen und dendritischen Zellen in den entnommenen Nierenproben, um das Ausmaß der Entzündungsreaktion und des Nierenschadens

in beiden Gruppen abschätzen zu können. Während dTGR-Dex-Salz mit $19,2 \pm 2,9$ ED1-positiven Zellen pro Sichtfeld eine massive Monozyten- und Makrophagen-Infiltration aufwies, war diese in der adrenaletomierten Vergleichsgruppe mit $10,8 \pm 1,0$ Zellen/Sichtfeld deutlich reduziert (Abb. 29A). Der protektive Einfluss der ADX hinsichtlich einer renalen Entzündungsreaktion im Vergleich zu dTGR-Dex-Salz zeigte sich auch bei der Anfärbung CD4-positiver und CD8-positiver T-Zellen ($16,2 \pm 1,5$ vs. $26,4 \pm 1,6$ bzw. $7,7 \pm 0,5$ vs. $11,3 \pm 1$ Zellen/Sichtfeld; $p < 0,01$) (Abb. 29B) sowie dendritischer Zellen ($4,7 \pm 0,2$ vs. $8,7 \pm 0,6$) (Abb. 29C).

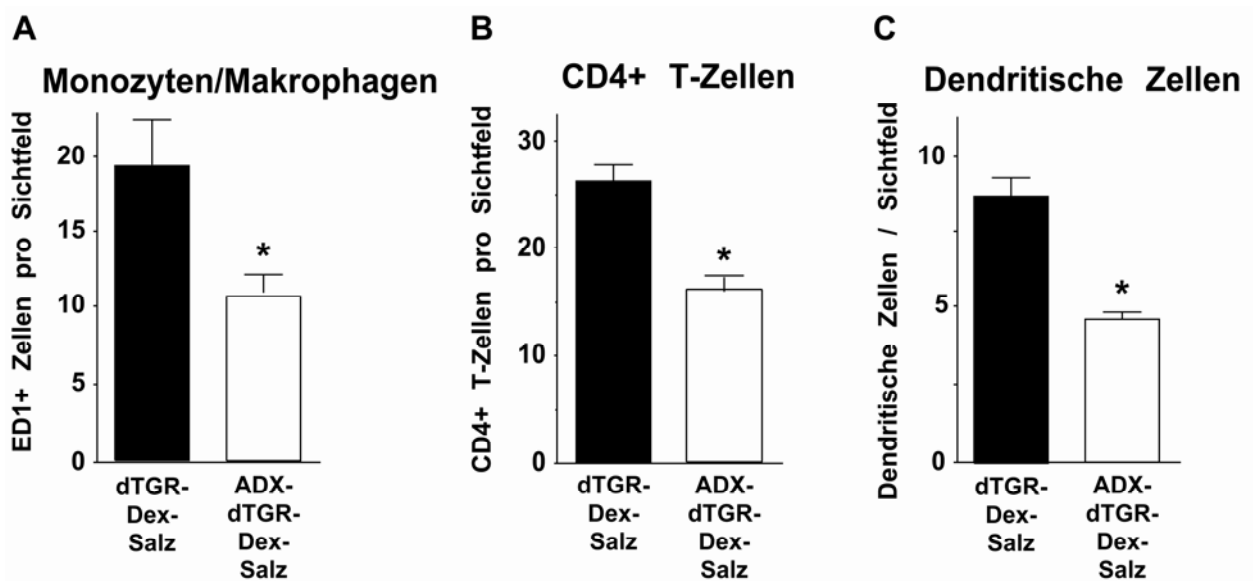
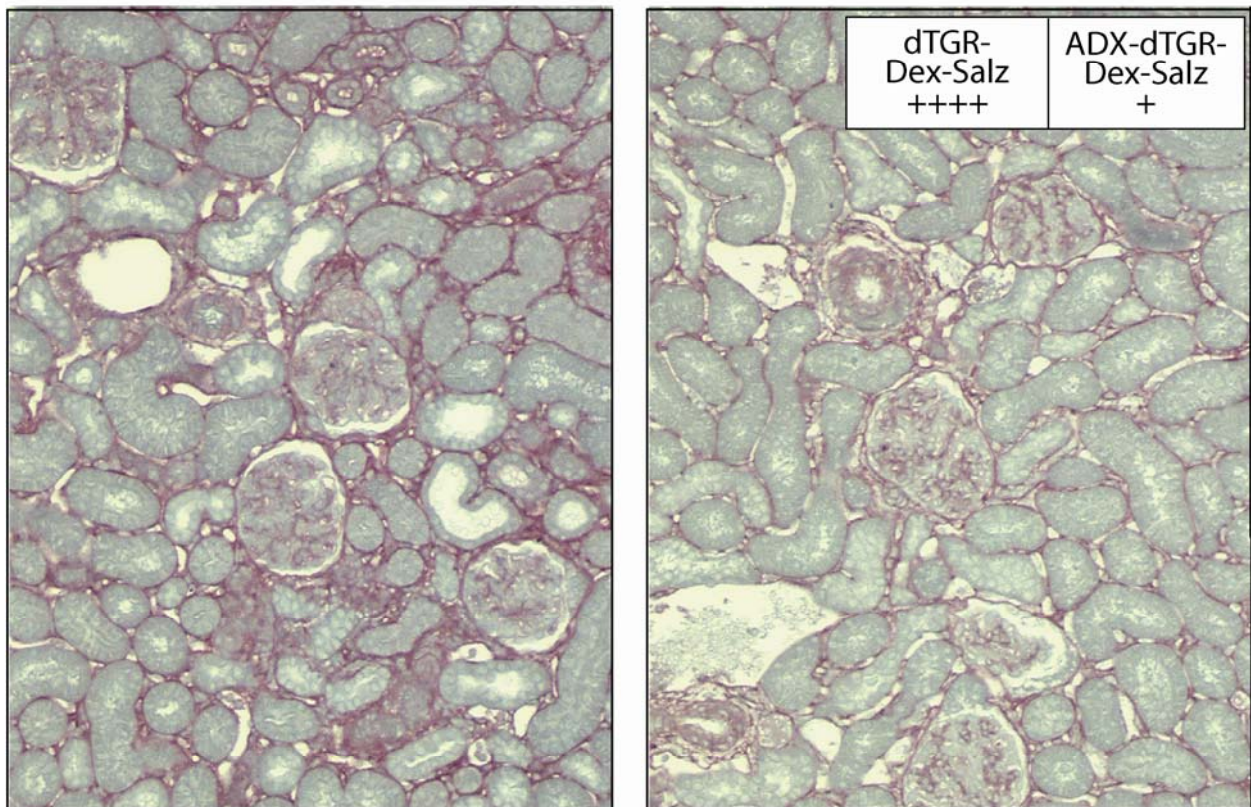


Abb. 29: Infiltration von Monozyten/Makrophagen (A), CD4-positiven T-Zellen (B) und Dendritischen Zellen (C) in den Nierenschnitten beider Gruppen. Adrenaletomierte dTGR zeigen im Vergleich zu nicht-adrenaletomierten dTGR eine deutlich verminderte renale Infiltration von Entzündungszellen. $n=4-5$ pro Gruppe; $p^* < 0,05$

Renale Expression von Kollagen IV

In den Nieren unbehandelter dTGR kommt es durch die gesteigerte Synthese von Matrixproteinen wie Kollagen IV zur renalen Fibrose. Um den Einfluss der ADX auf die Nierenfibrose beurteilen zu können, untersuchten wir in Protokoll II die renale Kollagen IV-Expression beider Gruppen. Dabei war die Ablagerung von Kollagen IV in den Nieren adrenaletomierter dTGR im Vergleich zur nicht-adrenaletomierten Kontrollgruppe (dTGR-Dex-Salz) deutlich vermindert. So zeigte die Semiquantifizierung von Kollagen IV im renalen Gewebeschnitt von dTGR-Dex-Salz einen Score von (4+), der bei den ADX-dTGR-Dex-Salz nur (1+) betrug (Abb. 30).

Kollagen IV



dTGR-Dex-Salz

ADX-dTGR-Dex-Salz

Abb. 30: Renale Kollagen IV-Expression beider Gruppen in Protokoll II. dTGR-Dex-Salz zeigen massive Kollagen IV-Ablagerungen in den Nieren (Score 4+), während in der adrenaletomierten Gruppe die gesteigerte Kollagen IV-Expression weitgehend unterbunden ist.

Zusammenfassung Nierenfunktion

Die Untersuchungen der Nierenfunktion und -histologie zeigte deutlich, dass die ADX vor dem Ang II-induzierten Nierenschaden schützt. So wurde die ausgeprägte Albuminurie unbehandelter dTGR durch die ADX vollständig verhindert. Zudem kam es in der adrenaletomierten Versuchsgruppe zu einer weit geringeren renalen Infiltration von Entzündungszellen und zu einer Abnahme der Expression von Kollagen IV.

3.4 Einfluss der zusätzlichen Gabe von FAD286 bei adrenaletomierten dTGR (Protokoll III)

Um zu prüfen, ob eine potentielle lokale Ald-Synthese (z.B. in Herz und Gefäßen) Einfluss am Ang II-induzierten Endorganschaden nimmt, wurden in Protokoll III adrenaletomierte dTGR zusätzlich mit FAD286 behandelt (ADX-dTGR-Dex-Salz+FAD286). Damit wurde in dieser Versuchsgruppe sowohl die Synthese von zirkulierendem als auch von lokalem Ald unterbunden, während in der rein adrenaletomierten Tiergruppe (ADX-dTGR-Dex-Salz) eine potentielle lokale Ald-Synthese weitgehend unbeeinflusst blieb. Diese Studie wurde 9 Wochen durchgeführt, da bis zur 7. Woche keine erkennbaren Unterschiede zwischen den Gruppen festzustellen waren. Obwohl auch eine nicht-adrenaletomierte Kontrollgruppe (dTGR-Dex-Salz) mitgeführt wurde, konnten diese wegen der sehr hohen Mortalität nach 9 Wochen nicht als Vergleichsgruppe heran gezogen werden. Die Endorganschäden wurden in beiden Versuchsgruppen anhand von Mortalität, Blutdruck, Herz- und Nierenfunktion und histologischen Organuntersuchungen beurteilt.

3.4.1 Mortalität, Blutdruck und Nierenfunktion in Protokoll III

Wie in 4.3 beschrieben senkt die ADX im Vergleich zu nicht-adrenaletomierten dTGR die Mortalität blutdruckunabhängig und verhindert die Entwicklung einer ausgeprägten Albuminurie. In Protokoll III konnte bei Versuchsende nach 5 Behandlungswochen bei den FAD286-behandelten ADX-dTGR-Dex-Salz jedoch keine weitere signifikante Reduktion der Mortalität im Vergleich zu unbehandelten ADX-dTGR-Dex-Salz festgestellt werden. Desweiteren war zwischen FAD286-behandelten und unbehandelten ADX-dTGR-Dex-Salz kein Unterschied im Blutdruck oder der Albuminurie zu beobachten.

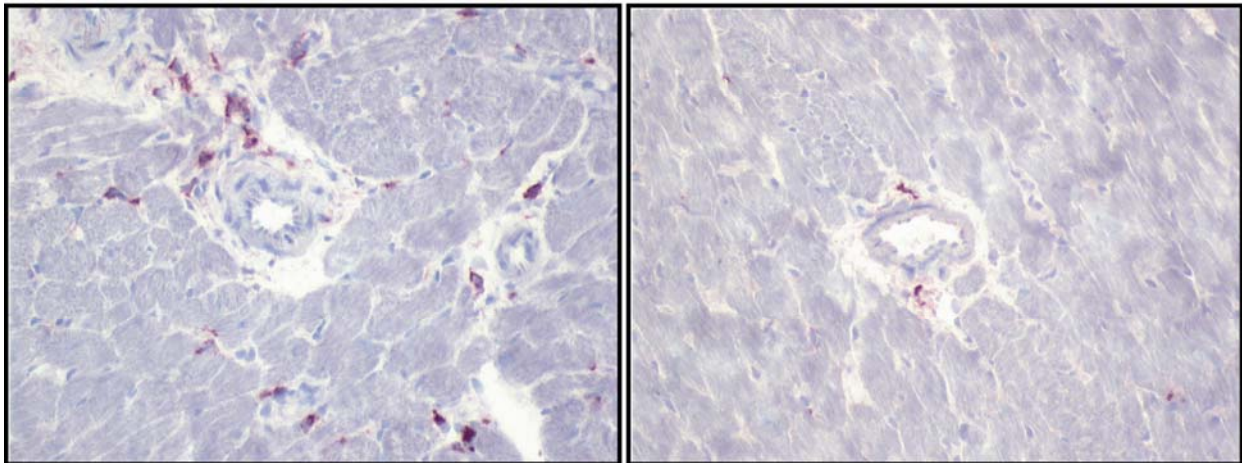
3.4.2 Herzfunktion in Protokoll III

Die ADX verminderte die Ausprägung einer Herzhypertrophie und senkte die kardiale Infiltration von Entzündungszellen im Vergleich zu nicht-adrenaletomierten dTGR (siehe 4.3.3). Dagegen führte in Protokoll III eine zusätzliche Behandlung mit FAD286 zu keiner weiteren Reduktion der kardialen Hypertrophie. Jedoch fiel die Infiltration von Entzündungszellen wie Monozyten / Makrophagen und T-Zellen im Herzgewebe der zusätzlich mit FAD286 behandelten ADX-dTGR-Dex-Salz nach 9 Lebenswochen signifikant geringer aus. So wurde die kardiale Infiltration von ED1-positiven Zellen durch die zusätzliche FAD286-Behandlung im Vergleich zu unbehandelten ADX-dTGR-Dex-Salz halbiert ($7,4 \pm 0,5$ vs.

14,5±1,4 Zellen/Sichtfeld). Sowohl die Anfärbung CD4-positiver T-Zellen (6,5±0,2 vs. 13,6±0,9 Zellen/Sichtfeld), als auch CD8-positiver T-Zellen (5,13±0,4 vs. 10,3±1,2 Zellen/Sichtfeld) erbrachte ähnliche Resultate (Abb. 31A-D).

A

Monozyten/Makrophagen

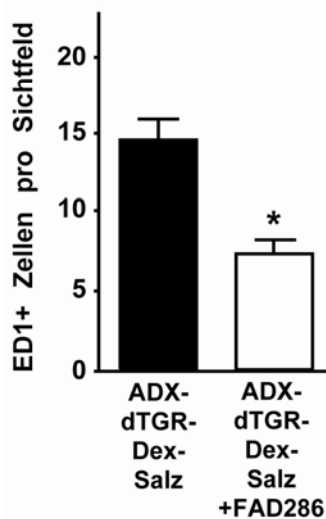


ADX-dTGR-Dex-Salz

ADX-dTGR-Dex-Salz+FAD286

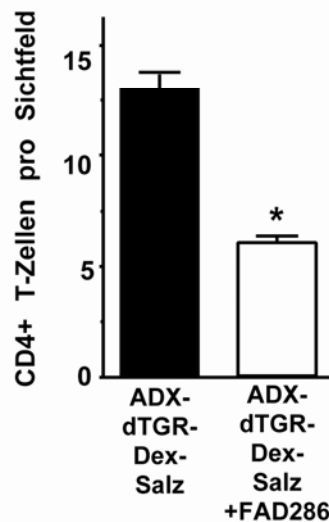
B

Monozyten/Makrophagen



C

CD4+ T-Zellen



D

CD8+ T-Zellen

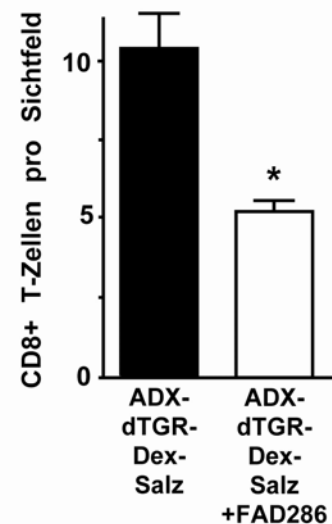


Abb. 31A: Infiltration von Monozyten/Makrophagen in den Herzproben. **B-D:** Semiquantitative Auszählung ED1-positiver Zellen sowie CD4- und CD8-positiver T-Zellen in den Herzen beider Gruppen aus Protokoll III. Die zusätzliche Behandlung von ADX-dTGR-Dex-Salz mit FAD286 über 5 Wochen führt zu einer weiteren Abnahme der kardialen Infiltration von Entzündungszellen im Vergleich zu unbehandelten ADX-dTGR-Dex-Salz. $n=5-8$ pro Gruppe; $p^*<0,001$

Die Ergebnisse aus Protokoll III zeigen, dass das am kardialen und renalen Endorganschaden beteiligte Ald größtenteils in den Nebennieren synthetisiert wird. Die zusätzliche Blockade einer potentiellen lokalen Ald-Produktion in adrenalektomierten Tieren führte zu keiner nennenswerten Reduktion der Endorganschäden.

3.5 Einfluss von FAD286 und Losartan auf die Spiegel von Ald, Renin und Kortikosteron

3.5.1 Einfluss von FAD286 und Losartan auf plasmatisches und kardiales Ald

Um den Einfluss von FAD286 und Los auf die Ald-Spiegel in Herz und Plasma messen zu können, wurde bei Versuchsende in Protokoll I beiden Tiergruppen Blutproben und Herzgewebe entnommen. Sowohl FAD286- als auch Los-Behandlung senkten im Vergleich zu unbehandelten dTGR die zirkulierenden und kardialen Ald-Spiegel. Dabei betrug das gemessene Ald im Serum nach FAD286-Behandlung 136 (81-454) pg/ml und nach Los-Behandlung 131 (8-296) pg/ml, während unbehandelte dTGR einen Ald-Spiegel im Serum von 408 (114-1410) pg/ml aufwiesen. Ebenso waren die kardialen Ald-Spiegel nach FAD286-Behandlung mit 458 (274-827) pg/g und nach Los-Behandlung mit 500 (173-3460) pg/g deutlich gesenkt im Vergleich zu unbehandelten dTGR mit 3826 (302-14286) pg/g (Abb. 32). Somit senkte FAD286 die Ald-Spiegel im Serum um 67% und im Herz um 88%. Bei der Los-Behandlung fiel die Senkung mit 68% für Ald im Serum und 87% für Ald im Herz ähnlich aus. Die höchsten plasmatischen und kardialen Ald-Spiegel fanden sich in unbehandelten dTGR mit den schwersten Organschäden.

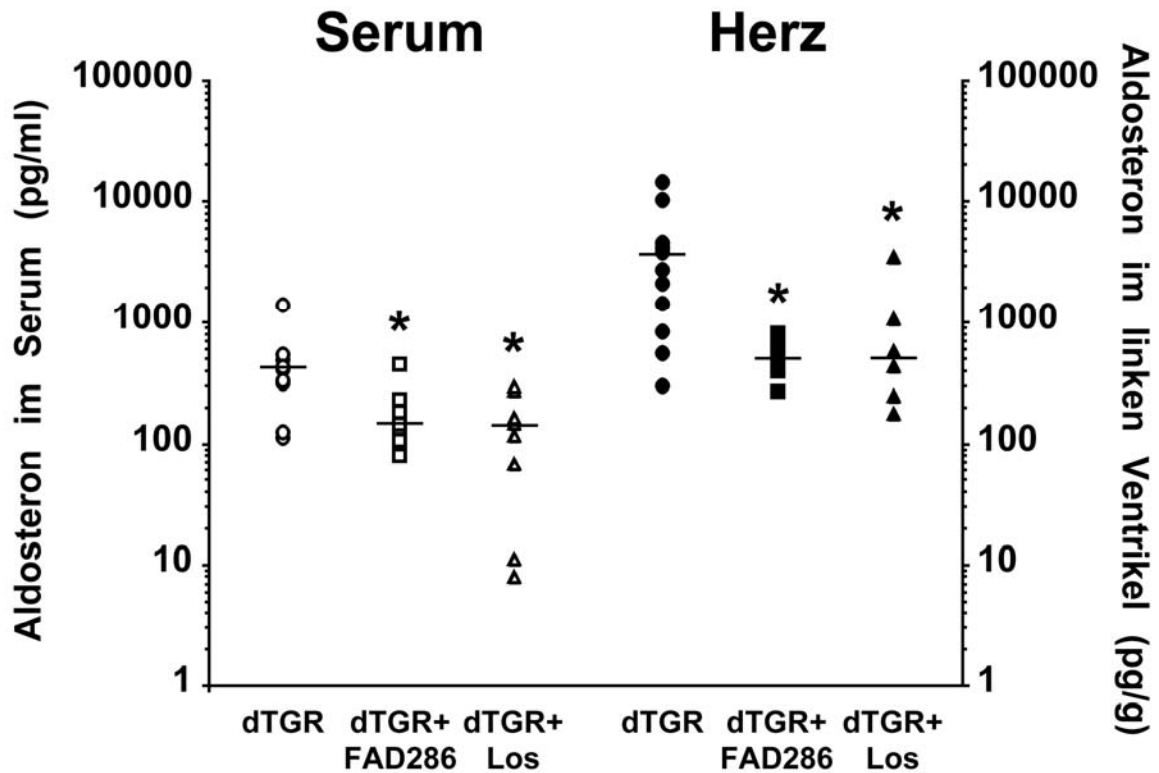


Abb. 32: Ald-Spiegel in Serum und Herz nach FAD286- oder Los-Behandlung (log-Skala). FAD286 senkt die Ald-Spiegel in Serum und Herz um 67% bzw. 88%. Los senkt die Ald-Spiegel in Serum und Herz im gleichen Ausmaß. $n=8-9$ pro Gruppe; $*p<0,05$ vs. dTGR

3.5.2 Einfluss von FAD286 und Los auf Renin und Kortikosteron im Plasma

Unbehandelte dTGR wiesen mit 53 (13-173) ng/ml/h sehr hohe Plasma-Renin-Konzentrationen (PRC) auf, wobei die höchsten PRC in den Tieren mit den schwersten Organschäden gefunden wurden. FAD286 und Los hatten keinen Einfluss auf die PRC und die Kortikosteron-Spiegel im Plasma. Die PRC für FAD286- und Los-behandelte dTGR betrug 8,0 (5,3-50) und 41 (13-57) ng/ml/h. Die Kortikosteron-Spiegel von FAD286- oder Los-behandelten Tieren waren mit 416 (187-563) bzw. 395 (310-409) ng/ml im Vergleich zu den Kontrollen (459; 103-524 ng/ml) nicht signifikant verschieden. Damit scheint der organprotektive Effekt von FAD286 nicht auf einer Beeinflussung der Renin- und Kortikosteron-Spiegel zu beruhen.

3.6 Einfluss der ADX auf die Spiegel von Ald, Renin und Kortikosteron

3.6.1 Einfluss der ADX auf plasmatisches und kardiales Ald

Um zu bestimmen, wie effektiv die ADX die Ald-Spiegel in Plasma und Herz senkte und welchen Einfluss die Substitution mit Dex und Salz hatte, wurde in Protokoll II beiden

Tiergruppen bei Versuchsende Blutproben und Herzgewebe entnommen. Von besonderem Interesse war dabei die Frage, wie weit die kardialen Ald-Spiegel nach einer ADX abfallen würden, da dies Auskunft über eine potentielle kardiale Ald-Synthese gibt.

Bei Versuchsende nach 7 Lebenswochen war bei den dTGR-Dex-Salz das Ald im Serum um 84% von 408 (114-1410) auf 65 (25-699) pg/ml und im Herz um 93% von 3826 (302-14286) auf 267 (102-3621) pg/g im Vergleich zu unbehandelten dTGR gefallen. Die zusätzliche ADX von Dex-Salz-behandelten dTGR führte nach 7 Wochen zu einer weiteren Reduktion der Ald-Spiegel in Serum und Herz auf 2,0 (<1,6-10) pg/ml bzw. 27 (13-45) pg/g (Abb. 33). Dies entspricht einer Senkung der Ald-Spiegel in Plasma und Herzgewebe von 97% bzw. 90% im Vergleich zu dTGR-Dex-Salz und von 99,5% bzw. 99,3% im Vergleich zu unbehandelten dTGR und damit einer nahezu vollständigen Entfernung des plasmatischen und kardialen Ald.

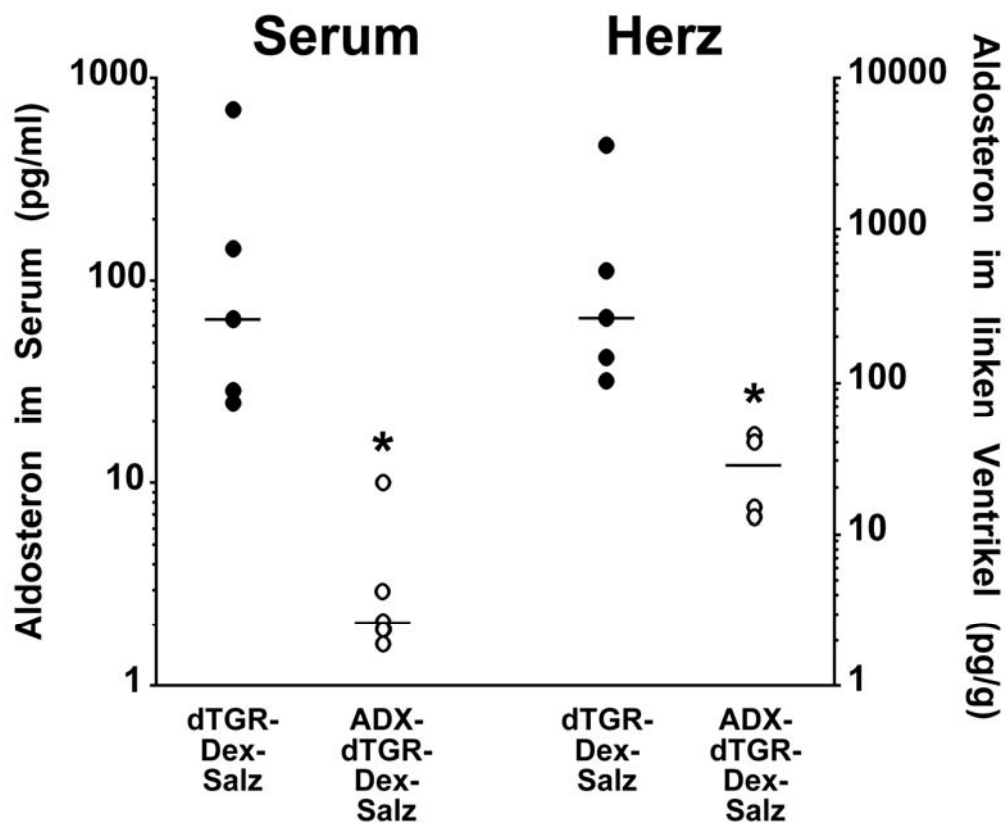


Abb. 33: Ald-Spiegel in Serum und Herz nach Dex-Salz-Substitution und ADX (log-Skala). ADX senkt die Ald-Spiegel in Plasma und Herzgewebe um 97% bzw. 90% im Vergleich zu dTGR-Dex-Salz. $n=8-9$ pro Gruppe; * $p<0,05$ vs. dTGR-Dex-Salz

In Protokoll III waren nach 9 Wochen die Ald-Spiegel in den Herzen aller adrenaletomierten Ratten unter 20 pg/g gefallen [10 (<6,7-19) pg/g], was im Vergleich mit den leicht höheren kardialen Ald-Spiegeln nach 7 Wochen möglicherweise für eine Auswaschphase des Ald aus dem Herzgewebe spricht. Die zusätzliche Behandlung von adrenaletomierten dTGR (ADX-dTGR-Dex-Salz) mit FAD286 führte nach 9 Wochen zu nicht nachweisbaren Ald-Spiegeln im Serum (<1,6 pg/ml) bei 7 von 8 Ratten und kardialen Ald-Konzentrationen unter 10 pg/g in allen 5 untersuchten Herzen.

3.6.2 Einfluss der ADX auf Renin und Kortikosteron im Plasma

Die Behandlung mit Dex und Salz führt nach 7 Wochen zu einer 85%-Abnahme der PRC von 53 (13-173) ng/ml/h in unbehandelten dTGR zu niedrigen Normalwerten von 8,0 (8,0-48) ng/ml/h in dTGR-Dex-Salz (Normalwert für SD-Ratten in unserem Labor: 23 ng/ml/h). Die Kortikosteron-Spiegel im Serum sanken gleichermaßen um 62% von 459 (103-524) ng/ml in unbehandelten dTGR auf 173 (57-317) ng/ml in Dex-Salz-behandelten dTGR. Nach zusätzlicher ADX von dTGR-Dex-Salz bleibt die PRC mit 16 (8-28) ng/ml/h niedrig und die Kortikosteron-Konzentration im Serum fiel unter die Nachweißgrenze (Assay-Nachweißgrenze <1ng/ml).

3.7 Kardiale mRNA-Expression von CYP11B2

Wir bestimmten in den Herzproben aus Protokoll II die mRNA-Expression der Ald-Synthase CYP11B2, welche uns als möglichen Hinweis auf eine potentielle kardiale Ald-Synthese besonders interessierte. Sowohl in den Herzen der dTGR-Dex-Salz als auch in den Herzproben der ADX-dTGR-Dex-Salz wurde eine niedrige mRNA-Expression von CYP11B2 nachgewiesen (22,3±19,3 bzw. 9,4±2,8 RE). Zwischen den beiden Tiergruppen konnte bei allerdings hoher Varianz innerhalb der Gruppen kein signifikanter Unterschied der CYP11B2-Expression gefunden werden. Eine Analyse von zwei Subgruppen mit Herzhypertrophie bzw. mit terminaler Herzinsuffizienz zeigte zudem keine Hochregulation der CYP11B2 mRNA.

4 DISKUSSION

Wir konnten mit dieser Arbeit anhand des dTGR-Modells zeigen:

- 1) Ald spielt eine zentrale Rolle in der Entstehung des Ang II-induzierten Endorganschadens.
- 2) FAD286 und ADX vermindern blutdruckunabhängig den Ang II-induzierten Organschaden.
- 3) Der neue Ald-Synthese-Hemmer FAD286 blockiert suffizient die Ald-Synthese und senkt die Ald-Spiegel in-vivo.
- 4) 99% des kardialen Ald wird nicht lokal im Herz synthetisiert, sondern entstammt den Nebennieren.
- 5) Eine potentielle Ald-Synthese im Herz scheint keinen Einfluss auf den Ang II-induzierten Organschaden zu nehmen.

4.1 Rolle von Ald am Ang II-induzierte Endorganschaden

Wir benutzten für unsere Experimente ein dTGR-Modell mit stark erhöhten Ang II-Spiegeln, in dem sich nach wenigen Wochen schwere Herz- und Nierenschäden entwickeln. Da die Gabe des AT₁-Blockers Los diese Endorganschäden verhindert, wurde bislang vor allem Ang II als schädigender Faktor im dTGR-Modell identifiziert. Ang II stellt jedoch den Hauptstimulus für die adrenale Ald-Synthese dar, weshalb im dTGR-Modell neben Ang II auch Ald massiv erhöht ist. Los hemmt wiederum den stimulierenden Einfluss von Ang II auf die Ald-Produktion. Damit könnte auch Ald an der Vermittlung des Endorganschadens beteiligt sein.

Um die Rolle von Ald am Ang II-induzierten Organschaden im dTGR-Modell untersuchen zu können, blockierten wir die Ald-Synthese mittels des neuen Ald-Synthese-Hemmers FAD286 oder durch ADX. Wir konnten zeigen, dass dadurch der Ang II-induzierte Endorganschaden deutlich vermindert wurde. Während unbehandelte dTGR nach 7 Lebenswochen schwere Herz- und Nierenschäden begleitet von einer hohen Mortalität aufwies, kam es in FAD286-behandelten oder adrenaletomierten dTGR zur einer eindrucksvollen Senkung des Endorganschadens und der Sterberate. Der organprotektive Effekt von FAD286 und ADX zeigte sich in einer verbesserten kardialen Ejektionsfraktion, einer verminderten linksventrikulären Hypertrophie, einer Senkung von Fibrose und Entzündungszellinfiltration in Herz und Niere, als auch einer verringerten Albuminurie. Damit konnten wir aufdecken, dass in unserem dTGR-

Modell neben Ang II Ald eine zentrale Rolle in der Entstehung des Endorganschadens spielt. Die Ergebnisse unserer Studie stellen zudem die erstmalige Beschreibung eines organprotektiven Effekts in vivo durch den neuen Ald-Synthase-Hemmer FAD286 dar. FAD286 senkte den Ald-Spiegel in unserem Rattenmodell um 67% und zeigte ex vivo keinen Einfluss auf die Plasma-Renin-Aktivität.

Bisher wurde der Einfluss von Ald in der Entstehung von Herz- und Nierenerkrankungen vor allem mit Hilfe von MR-Antagonisten untersucht. Suzuki et al. zeigten in einem tierexperimentellen Modell zur Herzinsuffizienz, dass die Behandlung mit dem MR-Blocker Eplerenon das linksventrikuläre *Remodeling* verminderte und die Herzfunktion verbesserte¹¹¹. Auch bei SHRSP verminderte die Gabe eines MR-Antagonisten den kardialen und renalen Schaden^{112,113}. In den zwei großen Multizenter-Studien RALES und EPHEBUS konnte die Morbidität und Mortalität herzkranker Patienten durch die Gabe eines MR-Blockers verbessert werden^{3,70}. Auch unsere Arbeitsgruppe zeigte in früheren Studien, dass die Behandlung mit einem MR-Antagonisten in unserem dTGR-Modell den kardialen und renalen Schaden vermindert und die Mortalität senkt^{25,93}. Anstatt den MR pharmakologisch zu blockieren, entfernten wir in dieser Arbeit den Liganden Ald, indem wir die Ald-Synthese hemmten bzw. die Nebennieren entnahmen. Auch Rocha et al. entfernten den Liganden Ald mittels ADX in einem Modell mit ebenfalls erhöhten Ang II-Spiegeln¹¹⁴. Wistar-Ratten erhielten den NO-Synthase-Hemmer L-NAME in Kombination mit einer Ang II-Infusion. Wurden die Ratten 3 Tage vor der Behandlung adrenaletomiert, entwickelten sie deutlich geringere kardiale und renale Schäden. Erhielten adrenaletomierte Ratten zusätzlich eine Ald-Infusion, traten die Organschäden wieder unverändert auf. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit unseren Beobachtungen am dTGR-Modell und zeigen, dass Ald eine wichtige Rolle bei der Entstehung des Ang II-induzierten Endorganschadens spielt.

4.1.1 Einfluss von FAD286 und ADX auf den Blutdruck

dTGR entwickeln nach wenigen Wochen eine ausgeprägte Hypertonie. Weder FAD286 noch ADX führten zu einer Senkung des hohen Blutdrucks. Daraus schlossen wir, dass Ald in unserem Modell den Organschaden blutdruckunabhängig induzierte und der protektive Effekt von FAD286 und ADX nicht auf eine antihypertensive Wirkung zurückzuführen war. Diese Erkenntnisse decken sich mit den Daten früherer Versuche unserer Arbeitsgruppe zum Einfluss des Blutdrucks im dTGR-Modell. So führte eine alleinige Blutdrucksenkung mit einer Dreifachkombination aus Hydralazin, Reserpin und Hydrochlorothiazid nur zu einer marginalen

Verminderung der Organschäden⁹¹. Auch in anderen Studien wurde deutlich, dass die protektiven Effekte von MR-Antagonisten oder ADX nicht auf einer Senkung des Blutdrucks beruhen. Rocha et al. konnten in einem Tiermodell den L-NAME-/Ang II-induzierten Organschaden mittels Eplerenon oder ADX blutdruckunabhängig senken¹¹⁴. Ebenso senkte Spironolakton in SHRSP den renalen Schaden, ohne dabei den Blutdruck zu vermindern¹¹⁵. In uninephrektomierten Ald/Salz-behandelten Ratten verhinderte die lokale Gabe eines MR-Antagonisten in die Hirnkammern zwar den Bluthochdruck, hatte jedoch keinen Einfluss auf die Herzfibrose¹¹⁶.

4.1.2 Einfluss von FAD286 und ADX auf die Herzhypertrophie

Verschiedene klinische Studien konnten zeigen, dass zirkulierende Ald-Spiegel positiv mit dem Grad der linksventrikulären Hypertrophie korreliert sind¹¹⁷⁻¹¹⁹. Der Zusammenhang zwischen hohen Ald-Spiegeln und der Entstehung einer Herzhypertrophie wurde auch in unserer Studie deutlich. Während unbehandelte dTGR eine schwere linksventrikuläre Herzhypertrophie entwickelten, wurde diese sowohl durch FAD286 als auch durch ADX signifikant vermindert. Dies zeigte sich in einem niedrigeren kardialen Hypertrophie-Index und einer geringeren totalen linksventrikulären Herzwanddicke. Parallel dazu waren in den FAD286-behandelten bzw. adrenaletomierten Tieren der Hypertrophiemarker ANP halbiert und der in unbehandelten dTGR ausgeprägte Shift vom α -MHC zum fetalen β -MHC vermindert. Die hohen Ald-Spiegel in unserem Modell hatten also Anteil an der Entwicklung der kardialen Hypertrophie.

Bereits 1992 veröffentlichten Brilla et al. Ergebnisse einer tierexperimentellen Studie zur kardialen Hypertrophie und Fibrose, die den Einfluss von Ald auf die linksventrikuläre Herzhypertrophie deutlich machten⁵. Uninephrektomierte Ratten entwickelten unter einer salzreichen Diät nach 8 Wochen eine schwere linksventrikuläre Hypertrophie mit kardialer Fibrose, wenn sie zusätzlich eine Ald-Infusion erhielten. Nachfolgende Studien konnten in verschiedenen Tiermodellen zeigen, dass die Gabe eines MR-Antagonisten die Entstehung einer linksventrikulären Herzhypertrophie deutlich bremst^{111,114}. Auch im dTGR-Modell wurde die kardiale Hypertrophie durch die Gabe von Spironolakton signifikant vermindert⁹³. Verschiedene klinische Studien an Patienten mit essentieller Hypertonie oder Herzinsuffizienz zeigen, dass sich diese tierexperimentellen Erkenntnisse auch auf den Menschen übertragen lassen. In zwei Studien wurden Patienten mit essentieller Hypertonie mit Spironolakton oder Eplerenon behandelt, was jeweils zu einer signifikanten Verminderung der linksventrikulären Masse führte^{120,121}. Gleiches konnte für Patienten mit Herzinsuffizienz nachgewiesen werden¹²².

Ob Ald in unserem Versuch auf direktem Weg die Entstehung einer Herzhypertrophie beeinflusste, oder ob sich diese eher sekundär als Kompensation anderer Ald-induzierter Herzschädigungen wie z.B. der Herzfibrose entwickelte, bleibt unklar. Zellkulturexperimente anderer Arbeitsgruppen deuten jedoch auf einen direkten proliferationsfördernden Einfluss von Ald hin. Untersuchungen an VSMC (*vascular smooth muscle cells*) zeigen, dass Ald die Zellproliferation steigert oder zumindest den proliferativen Einfluss von Ang II potenziert^{123,124}. Zudem führte die Stimulation von neonatalen Myozyten mit Ald zu einer gesteigerten Zellhypertrophie⁷⁷.

4.1.3 Einfluss von FAD286 und ADX auf die Herzfibrose

1992 publizierten Brilla und Weber Ergebnisse eines Tierversuchs, der sich mit experimenteller Herzfibrose beschäftigte und grundlegende neue Erkenntnisse im Zusammenhang mit Ald hervorbrachte⁵. Uninephrektomierte Ratten erhielten eine salzreiche Diät und über eine implantierte Minipumpe wurde kontinuierlich Ald infundiert. Nach 8 Wochen hatten die Tiere einen Bluthochdruck entwickelt und es ließ sich eine deutliche perivaskuläre und interstitielle Herzfibrose nachweisen. Dabei war die kardiale Fibrose gleichermaßen im hypertrophierten linken Ventrikel und im nicht-hypertrophierten rechten Ventrikel zu finden. Im Gegensatz dazu konnte bei hypertensiven Ratten mit infrarenaler Aortenverengung (*aorta banding*), bei denen keine erhöhten Plasmaspiegel von Ald und Ang II vorlagen, jedoch eine linksventrikuläre Hypertrophie auftrat, in beiden Ventrikeln keine myokardiale Fibrose gefunden werden¹²⁵. Daraus wurde geschlossen, dass die kardiale Fibrose nicht eine Folge von linksventrikulärer Hypertrophie oder chronischer Drucküberlastung darstellte, sondern durch hohe Ald-Spiegel bedingt war. Wir konnten zeigen, dass auch in unserem dTGR-Modell bei einer salzreichen Diät hohe Ald-Spiegel zur Entstehung einer kardialen Fibrose maßgeblich beitragen und diese nicht allein auf hohe Ang II-Spiegel zurückzuführen ist. Wir bestimmten Kollagen und Fibronectin in den Herzen unserer Versuchstiere, um den Grad einer kardialen Fibrose abschätzen zu können. Während wir in den Herzen von dTGR-Dex-Salz eine deutliche Fibrose nachweisen konnten, war die kardiale Expression von Kollagen und Fibronectin bei Ratten, bei denen wir das zirkulierende Ald mittels ADX entfernt hatten, halbiert.

Experimente von Brilla et al. mit dem MR-Blocker Spironolakton zeigen, dass Ald seinen profibrotischen Einfluss über den klassischen MR vermittelt¹²⁶. Ratten mit renovaskulärer Hypertonie oder chronischer Ald-Infusion wurden mit einer niedrigen und einer hohen Dosis Spironolakton behandelt. Im Gegensatz zur hohen Dosis konnte die niedrige Dosis den

Bluthochdruck und die linksventrikuläre Hypertrophie nicht verhindern. Beide Dosen Spironolakton konnten jedoch die interstitielle und perivaskuläre Fibrose in den Herzen der Versuchstiere unterbinden. Ähnliche Ergebnisse erbrachten frühere Versuche unserer Arbeitsgruppe, in denen wir zeigten, dass die Gabe von Spironolakton auch in unserem dTGR-Modell die kardiale Produktion extrazellulärer Matrix vermindert und somit einer Fibrose-Entwicklung entgegenwirkt⁹³. In der jetzigen Studie entfernten wir den Liganden Ald anstatt den Rezeptor zu blockieren und konnten auch dadurch der Entstehung einer kardialen Fibrose vorbeugen.

Ob Ald einen direkten Einfluss auf die Kollagen-Synthese in Fibroblasten ausübt oder seine profibrotische Wirkung indirekt vermittelt, ist bislang umstritten. Brilla et al. inkubierten kardiale Fibroblasten in der Zellkultur mit Ald und konnten eine gesteigerte Kollagen-Synthese beobachten, die durch Vorinkubation mit Spironolakton blockiert wurde¹²⁷. In Versuchen anderer Autoren zeigte Ald jedoch keinen Einfluss auf die Kollagen-Synthese kardialer Fibroblasten, während Ang II diese steigerte¹²⁸. Gegen einen direkten Einfluss von Ald auf die Fibrose-Entwicklung spricht das lange Zeitintervall von einigen Wochen bis erhöhte Ald-Spiegel zu einem nachweisbaren Anstieg der kardialen Kollagen-Expression führen^{129,130}. Im Gegensatz dazu ist bereits 7 Tage nach einer Ang II-Infusion eine beginnende Fibrose zu beobachten¹²⁹.

Wir konnten in unserem Modell nicht klären, ob Ald unabhängig von Ang II die kardiale Fibrose vermittelte, oder durch Interaktion mit dem AT₁-Rezeptor die bekannte profibrotische Wirkung von Ang II potenzierte. Der Einsatz des AT₁-Blockers Los senkte die hohen Ang II-induzierten Ald-Spiegel, so dass eine isolierte Betrachtung von Ald unabhängig von Ang II im dTGR-Modell nicht möglich war. Verschiedene Arbeitsgruppen untersuchten jedoch den Einfluss einer Hemmung der Ang II-Wirkung auf die Ald-induzierte Herzfibrose. In zwei solcher Studien hatten ACE-Hemmer und AT₁-Rezeptor-Blocker nur geringe Effekte auf die durch Ald und Salz induzierte kardiale Fibrose^{36,131}, während in einer Studie von Robert et al. der profibrotische Einfluss von Ald am Herz durch Los komplett verhindert wurde¹³². Robert et al. stellten die Hypothese auf, dass ihre gegensätzlichen Ergebnisse auf einer höheren Dosierung des AT₁-Blockers beruhten und ACE-Hemmer über eine Verminderung des Bradykinin-Abbaus einen profibrotischen Einfluss nehmen. Ob dies der Fall ist, bleibt Inhalt weiterer Forschung. Damit bleibt vorläufig unklar, wieweit eine Interaktion mit Ang II für den profibrotischen Effekt von Ald verantwortlich ist. Fest steht jedoch, dass Ald eine zentrale Bedeutung in der Entstehung der kardialen Fibrose in dTGR zukommt. Dies deckt sich mit der Beobachtung vieler klinischer

Studien, dass die protektiven Effekte einer Blockade der Ald-Wirkung u.a. durch eine Verminderung der kardialen Kollagenablagerung bedingt sein könnten¹³³⁻¹³⁶.

4.1.4 Einfluss von FAD286 und ADX auf den Nierenschaden

Als eine der ersten zeigten Greene et al. 1996 in Rattenexperimenten, dass Ald möglicherweise eine bedeutende Rolle in der Pathogenese der Niereninsuffizienz einnimmt¹³⁷. Sie benutzten das "*remnant kidney model*", bei dem es durch Entfernung großer Nierenanteile zur renalen Schädigung und Hyperfiltration im verbleibenden Nierengewebe kommt¹³⁸. In diesem Modell wiesen sie mehr als 10-fach erhöhte Ald-Spiegel nach und demonstrierten, dass der Nierenschaden durch Gabe des AT₁-Antagonisten Los oder des ACE-Hemmers Enalapril vermindert wurde. Erhielten die Ratten jedoch parallel eine Ald-Infusion, um die erhöhten Ald-Spiegel aufrecht zu erhalten, hatte die Gabe von Los oder Enalapril keinen renoprotektiven Einfluss und es kam wie bei unbehandelten Tieren zu Proteinurie, Hypertonie und Glomerulosklerose. In einem ähnlichen Versuch an SHRSP wurde der protektive Effekt eines ACE-Hemmers ebenfalls durch die Infusion von Ald aufgehoben⁸⁴. Rocha et al. verabreichten gesunden Ratten unter einer salzreichen Diät Ang II und einen NO-Synthase-Hemmer, wodurch diese u.a. Bluthochdruck, Proteinurie und eine renale Arteriopathie entwickelten¹¹⁴. Die Blockade des Einflusses von Ald durch ADX oder Eplerenon in den Versuchstieren verhinderte den Nierenschaden blutdruckunabhängig. Wurde der ADX-Gruppe zusätzlich Ald über eine Minipumpe zugeführt, kam es erneut zum renalen Schaden. Diese Studien zeigen, dass erhöhte Ald-Spiegel maßgeblich den Nierenschaden in den jeweiligen Modellen verursachten und der protektive Einfluss von AT₁-Antagonisten und ACE-Hemmern vor allem auf die indirekte Senkung der Ald-Konzentration zurückzuführen ist. Diese Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen unserer Studie. Auch im dTGR-Modell waren die Ald-Spiegel im Plasma massiv erhöht und wir konnten zeigen, dass diese den Nierenschaden mitverursachten. So verminderte die Blockierung der Ald-Synthese mittels FAD286 die renale Schädigung, was sich in einer Halbierung der Albuminurie sowie Verminderung der Entzündungszellinfiltration und Kollagen IV-Expression in den Nieren zeigte. Gleiche renoprotektive Effekte beobachteten wir bei Ratten, denen wir die Nebennieren entfernt hatten und die folglich kein zirkulierendes Ald aufwiesen. In dieser Gruppe konnte die Albuminurie durch ADX sogar komplett verhindert werden.

Greene et al. beobachteten nach der Infusion von Ald keinen weiter bestehenden renoprotektiven Effekt von Los oder Enalapril¹³⁷. Dies spricht abgesehen von der Stimulation der Ald-Synthese gegen einen direkten Einfluss von Ang II auf den Nierenschaden. Im Gegensatz dazu müssen wir

in unserem dTGR-Modell von einem zusätzlichen schädlichen Einfluss der ebenfalls hohen Ang II-Spiegel ausgehen. So konnte Los im Vergleich zu FAD286 den renalen Schaden effektiver unterbinden, womit es zu keiner Albuminurie und einer stärkeren Senkung der renalen Kollagen-Ablagerung kam. Unter Umständen könnte die unter Los-Behandlung beobachtete Blutdrucksenkung diesen zusätzlichen protektiven Effekt des AT₁-Blockers erklären.

Um die Rolle einer MR-Blockade auf den Gefäßschaden in SHRSP unter salzreicher Diät zu untersuchen, implantierten Rocha et al. Versuchsratten Spironolakton-Pellets¹¹⁵. Bei Versuchsende wiesen Spironolakton-behandelte Ratten im Vergleich zu unbehandelten SHRSP eine verminderte Albuminurie und geringere nephrosklerotische Veränderungen auf, ohne dass es zu einer Senkung des systolischen Blutdrucks gekommen war. In einem ähnlichen Versuch gaben Zhou et al. SHRSP den NO-Synthase-Hemmer L-NAME, worauf diese einen Nierenschaden mit Nephrosklerose und Albuminurie entwickelten¹¹³. Die zusätzliche Gabe des spezifischen MR-Blockers Eplerenon verringerte den Nierenschaden ebenfalls deutlich. Eine Kombination aus Eplerenon und einem ACE-Hemmer erbrachte keine zusätzliche Verbesserung im Vergleich zur Eplerenon-Monotherapie.

Die renoprotektive Wirkung einer MR-Blockade demonstriert, dass der Ald-induzierte Nierenschaden MR-vermittelt ist. Die wichtige Rolle des MR in diesem pathophysiologischen Prozess wird auch durch histologische Untersuchungen an SHRSP von Horiuchi et al. unterstrichen¹³⁹. Bei SHRSP, die nach Geburt Bluthochdruck und Nephrosklerose entwickeln, konnten schon im Alter von 6 Wochen erhöhte renale Konzentrationen des MR im Vergleich zu WKY gefunden werden. Ähnliche Ergebnisse ergab eine erst kürzlich veröffentlichte Studie an Patienten mit Niereninsuffizienz und Proteinurie. Nierenbiopsien zeigten, dass Patienten mit hochgradiger Proteinurie eine mehr als 4-fach erhöhte Konzentration von MR RNA im Nierengewebe aufwiesen als Patienten mit geringgradiger Proteinurie¹⁴⁰. Diese Daten lassen vermuten, dass u.U. auch im Normbereich liegende Ald-Spiegel über eine erhöhte renale Konzentration von MR einen Nierenschaden induzieren können bzw. der schädliche Einfluss erhöhter Ald-Spiegel dadurch weiter potenziert wird. Die Beobachtungen aus unserem und anderen Versuchen belegen, dass hohe Ald-Spiegel in Kombination mit einer hohen Salzzufuhr einen MR-vermittelten Nierenschaden induzieren. Welchen Anteil Ang II zum Ald-induzierten Nierenschaden beisteuert, bleibt weiter zu klären.

Eine Anzahl verschiedener pathologischer Prozesse, über die Ald den beobachteten Nierenschaden induzieren könnte, wurden in den letzten Jahren aufgedeckt. So scheint PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor-1*), ein primärer Inhibitor des fibrinolytischen Systems, eine

Rolle im Ald-induzierten Nierenschaden zu spielen. Erhöhte PAI-1-Spiegel sind an der Pathogenese von Glomerulosklerose und tubulointerstitieller Fibrose beteiligt¹⁴¹. Dabei induziert PAI-1 die renale Fibrose wahrscheinlich durch Mikrothrombosen und gesteigerte Ablagerung extrazellulärer Matrix. Ald steigert durch Interaktion mit Ang II die PAI-1-Expression in kultivierten Endothelzellen¹⁴² und eine humane Studie zeigte, dass im Rahmen einer salzarmen Diät die PAI-1-Spiegel im Plasma signifikant mit der Ald-Konzentration korrelieren¹⁴³. In einem Rattenmodell, bei dem die Nieren bestrahlt wurden, kam es zu einem 8-fachen Anstieg der Expression von PAI-1 mRNA¹⁴⁴. Die Tiere entwickelten eine Glomerulosklerose mit Albuminurie, die durch Gabe eines AT₁- oder MR-Antagonisten signifikant gesenkt werden konnte. Dabei wurde der renoprotektive Effekt des MR-Blockers zumindest teilweise der Verminderung der PAI-1-Expression zugeschrieben. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Ald einen Teil seines schädlichen Einflusses auf die Niere durch Erhöhung der PAI-1-Konzentration vermittelt.

Von Sun et al. veröffentlichte Studien zeigen auf, dass Ald u.a. durch Stimulation der Synthese von TGF- β 1 (*transforming growth factor- β 1*) den renalen Schaden begünstigt¹⁴⁵. TGF- β 1 ist ein Zytokin, das die Differenzierung und Proliferation von Fibroblasten fördert und die Kollagen-Synthese steigert¹⁴⁵. Uninephrektomierte Ratten, die über 6 Wochen Ald und 1% NaCl im Trinkwasser erhielten, entwickelten eine diffuse renale Fibrose. Diese war mit einer erhöhten Bindungsintensität von ACE und AT₁-Rezeptoren sowie einer deutlichen Erhöhung der Expression von TGF- β 1 und Kollagen mRNA in den Fibrosearealen assoziiert. In einer anderen Studie wurde der Einfluss von Antioxidanzien auf den Ald-induzierten Nierenschaden untersucht¹⁴⁶. SHRSP erhielten neben einem ACE-Hemmer eine Ald-Infusion, wodurch es zum Nierenschaden mit thrombotischer Mikroangiopathie, tubulärer Ischämie und Proteinurie kam. Da die zusätzliche Gabe eines Antioxidanz den Ald-induzierten Nierenschaden verminderte, könnte Ald auch über die Bildung von freien Sauerstoffradikalen die renale Schädigung verursachen. Diese Vermutung wird auch durch einen früheren Versuch unserer Arbeitsgruppe unterstrichen, in dem die Gabe von Entacapon den Nierenschaden in dTGR verringerte¹⁴⁷. Entacapon ist ein Katechol-O-Methyltransferase-Hemmer, der u.a. antioxidative Eigenschaften aufweist¹⁴⁸.

Die in Tierstudien gewonnene Erkenntnis, dass Ald maßgeblich an der Entwicklung eines Nierenschadens beteiligt ist, spiegeln sich auch in klinischen Studien wieder. 1982 beobachteten Hene et al., dass bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung, die Ald-Spiegel im Plasma erhöht waren, wenn die Kreatinin-Clearance weniger als 50% des Normwerts betrug¹⁴⁹. Schon

20 Jahre davor waren Conn et al. aufgefallen, dass 85% der Patienten mit primärem Hyperaldosteronismus eine Proteinurie aufwiesen¹⁵⁰. Weiter zeigten klinische Studien, dass bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung und Einnahme eines ACE-Hemmers oder AT₁-Blockers die zusätzliche Gabe des MR-Antagonisten Spironolakton zu einer Verminderung der Proteinurie führt^{151,152}. Gleiches konnte für Patienten mit Typ 2 Diabetes und beginnender Nephropathie nachgewiesen werden¹⁵³. Zudem kam es bei Patienten mit diabetischer Nephropathie unter Behandlung mit Spironolakton zu einem Abfall von Kollagen IV im Urin, woraus auf eine geringere Kollagen IV-Expression in der Niere geschlossen wurde¹⁵¹.

Zusammenfassend belegen die tierexperimentellen und klinischen Studien, dass Ald neben der physiologischen Regulation des Wasser- und Elektrolythaushaltes in der Niere auch renale Schäden induzieren kann. In unserem Modell haben wir dies anhand hoher Ald-Spiegel und einer salzreichen Diät beobachtet. Ob auch physiologische Ald-Konzentrationen bei niedriger Salzzufuhr ähnliche renale Schäden verursachen und welche Rolle Ang II dabei einnimmt, bleibt Inhalt weiterer Forschung.

4.1.5 Einfluss von FAD286 und ADX auf die Entzündungszellinfiltration

Schon frühere Experimente unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass die hohen Ang II-Spiegel im dTGR-Modell lokale Entzündungsreaktionen induzieren. So konnte in den Herzen und Nieren unbehandelter dTGR eine hohe Entzündungszellinfiltration gefunden werden, die durch die Behandlung mit einem AT₁-Blocker oder ACE-Hemmer verhindert wurde⁹⁰. Durch nachfolgende Versuche mit verschiedenen immunsuppressiven Substanzen konnte gezeigt werden, dass diese lokalen Entzündungsprozesse auch Einfluss auf das pathophysiologische Geschehen in diesem Modell haben und für den Endorganschaden mitverantwortlich sind. So verhinderte die Gabe von Cyclosporin A in dTGR die renale und kardiale Infiltration von Entzündungszellen. Gleichzeitig senkte Cyclosporin A die Mortalität und verminderte die Albuminurie und Herzhypertrophie¹⁵⁴. Dieser protektive Effekt einer Entzündungshemmung auf den Endorganschaden konnte auch mit Dexamethason und dem NF-κB-Inhibitor PDTC gezeigt werden. Auch hier kam es neben der Blockade der lokalen Entzündungsreaktion parallel zur Abnahme von Albuminurie, Kollagen-Expression und Mortalität^{73,155}. Damit war deutlich geworden, dass die Ang II-induzierte Entzündungsreaktion im dTGR-Modell an der Entstehung des Endorganschadens beteiligt ist. Über welche Mechanismen Ang II seine immunstimulatorische Wirkung vermittelte und ob Ald dabei eine Rolle spielte, war zu diesem Zeitpunkt nicht vollständig geklärt.

In unserem Versuch zum Einfluss von Ald im dTGR-Modell konnten wir nun zeigen, dass die Senkung der Ald-Spiegel sowohl durch FAD286 als auch durch ADX die lokale Entzündungsreaktion im Herz- und Nierengewebe verminderte: Vergleichbar zu Los senkte FAD286 die Infiltration von Entzündungszellen in den Nieren um die Hälfte. Ebenso war die Anzahl von Immunzellen sowohl in den Nieren als auch in den Herzen von adrenaletomierten Ratten im Vergleich zu nicht-adrenaletomierten Tieren halbiert. Unsere Daten belegen, dass die hohen Ald-Spiegel in unserem Modell an der Entstehung lokaler Entzündungsreaktionen beteiligt sind und Ang II zumindest einen Teil seiner immunstimulatorischen Wirkung über die Erhöhung der Ald-Konzentration vermittelt. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit einem vorangegangenen Versuch unserer Arbeitsgruppe zum Einfluss von Spironolakton im dTGR-Modell⁹³. Dabei hatte die Gabe von Spironolakton die kardiale Infiltration von Monozyten/Makrophagen gesenkt und die NF-κB-Aktivierung reduziert. Der proinflammatorische Effekt von Ald wurde auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben. Blasi et al. infundierten uninephrektomierten Ratten Ald in Kombination mit einer salzreichen Diät und beobachteten nach 4 Wochen einen ausgeprägten Nierenschaden⁴. Dieser ging einher mit renaler Leukozyteninfiltration und erhöhter Genexpression proinflammatorischer Mediatoren wie Osteopontin, MCP-1, IL-6 und IL-1β. Sowohl der Nierenschaden, als auch die renale Entzündungsreaktion wurden in diesem Modell durch die Gabe von Eplerenon gesenkt. In einem ähnlichen Versuch wurde uninephrektomierten Ratten ebenfalls Ald und Salz gegeben, wodurch die Tiere nach 5 Wochen eine Entzündungszellinfiltration und eine erhöhte Kollagen-Expression in den Herzen aufwiesen⁷⁸. Aus dem parallelen Auftreten von Zellinfiltration und Kollagen-Ablagerungen im Herz schlossen die Autoren auf eine mögliche profibrotische Wirkung der Entzündungszellen. So könnten diese über eine Ausschüttung von Wachstumsfaktoren oder Zytokinen, die Fibroblasten stimulieren, einen profibrotischen Einfluss ausüben¹⁵⁶. Auch in unserem Versuch war nach 7 bzw. 9 Wochen in den Herzen der dTGR sowohl eine Infiltration von Entzündungszellen als auch eine gesteigerte Kollagen-Ablagerung zu beobachten. Beides wurde durch FAD286 oder ADX signifikant vermindert.

Ob die lokale Entzündungsreaktion direkt durch Ald induziert wird und dann an der Entstehung des Organschadens z.B. durch profibrotischen Einfluss beteiligt ist, oder eher ein sekundäres Phänomen nach bereits erfolgter Gewebsveränderungen darstellt, können wir mit unserem Versuch nicht beantworten. Die organprotektive Wirkung von immunsuppressiven Substanzen in unserem Modell^{73,154,155} lassen jedoch auf einen frühen Einfluss der lokalen Entzündungsreaktion auf die Entstehung des Organschadens schließen. Zudem konnten Fujisawa

et al. Mineralokortikoid/Salz-induzierte inflammatorische Veränderungen in den Herzen von uninephrektomierten Ratten bereits 4-8 Tage nach Behandlungsbeginn beobachten¹⁵⁷. Rocha et al. infundierten uninephrektomierten Ratten Ald und konnten noch vor Beginn kardialer Gefäßveränderungen eine gesteigerte Expression von Entzündungsmediatoren wie COX-2, MCP-1 und Osteopontin nachweisen¹⁵⁸. Damit scheint die lokale Entzündungsreaktion direkt durch Ald vermittelt zu sein und stellt einen Weg dar, über den Ald den Endorganschaden auch in unserem Modell vermittelt.

4.1.6 Interaktion von Ald mit Ang II bei der Entwicklung des Organschadens

In unserem dTGR-Modell konnten wir zeigen, dass Ald Anteil am Ang II-induzierten Endorganschaden hat. Durch Expression des humanen Renins und AOPEN weisen die transgenen Ratten stark erhöhte Ang II-Spiegel auf⁸⁶. Da Ang II der Hauptstimulus für die Ald-Synthese in den Nebennieren ist, kommt es parallel zu einem massiven Anstieg der Ald-Konzentration in der Zirkulation⁹³. Die Senkung dieser hohen Ald-Spiegel in dTGR mittels FAD286 oder ADX hatte eine deutliche Verminderung von Organschaden und Mortalität zur Folge. Ald selbst hatte also offensichtlich einen schädigenden Einfluss im dTGR-Modell. Dies wirft die Frage auf, ob Ald seine schädigende Wirkung unabhängig von Ang II oder durch Interaktion mit Ang II vermittelt. Bei ersterem würde die Stimulation der Ald-Synthese durch Ang II die einzige Interaktion von beiden Hormonen darstellen, während bei letzterem Ald nur in Kombination mit Ang II den Organschaden verursachen könnte, z.B. indem es den schädlichen Einfluss von Ang II potenziert. Diese Frage konnten wir in unserem dTGR-Modell nicht beantworten, da es dazu nötig gewesen wäre, den Einfluss von Ang II zu unterbinden, ohne gleichzeitig Einfluss auf die Ald-Synthese zu nehmen. Die Gabe von Los blockiert zwar die Wirkung von Ang II am AT₁-Rezeptor, vermindert jedoch auch parallel die stimulatorische Wirkung von Ang II auf die Ald-Synthese. Die unabhängige Wirkung von Ald und Ang II am Endorganschaden und eine potentielle Interaktion beider Hormone konnte in anderen Tiermodellen genauer differenziert werden. Hierzu wurden Mineralokortikoide wie Ald oder Deoxykortikosteron den Versuchstieren von außen zugeführt, womit die Wirkung von Ang II mittels AT₁-Blocker oder ACE-Hemmer unterbunden werden konnte ohne gleichzeitig Einfluss auf die Ald-Spiegel zu nehmen. Vier Studien untersuchten den Einfluss von AT₁-Blocker und ACE-Hemmer auf den Mineralokortikoid-induzierten Nierenschaden an Ratten. In zwei Studien verminderten AT₁-Blocker und ACE-Hemmer den durch kontinuierliche Gabe von Salz und Mineralokortikoiden verursachten Nierenschaden^{159,160}, was auf eine Interaktion von Ald und

Ang II im Schädigungsprozeß hindeutete. In den beiden anderen Studien schien eine Blockade von AT₁-Rezeptor oder ACE keinen Einfluss auf die renale Schädigung in diesem Modell zu haben^{161,162}. Warum es in den Studien zu gegensätzlichen Ergebnissen kam, bleibt weitgehend unklar. In zwei weiteren Studien verhinderten AT₁-Blocker und ACE-Hemmer sowohl bei SHRSP als auch im *Remnant Kidney Model* weitgehend den Nierenschaden. Wurde in beiden Modellen zusätzlich Ald infundiert, verloren jedoch beide Medikamente ihre renoprotektive Wirkung^{84,137}. Die Autoren schlossen daraus, dass der renoprotektive Effekt beider Medikamente auf die Suppression der adrenalen Ald-Synthese zurückzuführen sei und damit nicht Hinweis auf einen direkten nierenschädlichen Einfluss von Ang II liefere. In einem weiteren Versuch infundierten Chander et al. adrenaletomierten SHRSP sowohl Ald als auch Ang II⁸⁵. Während sie in der zusätzlich mit Ald infundierten Gruppe eine ausgeprägte thrombotische Mikroangiopathie der Niere beobachteten, war diese sowohl in der rein adrenaletomierten als auch in der zusätzlich mit Ang II infundierten Gruppe nicht zu finden. Sie schlossen daraus, dass in diesem Modell allein Ald für die Mikroangiopathie verantwortlich war, während Ang II keinen Einfluss hatte. Damit deuten mehrere Studien darauf hin, dass Ald unabhängig von Ang II den Nierenschaden vermittelt und der renoprotektive Effekt von Ang II-Hemmern auf eine Senkung der Ald-Konzentration zurückzuführen ist. Warum zwei Studien gegensätzliche Ergebnisse lieferten, bedarf weiterer Klärung.

Widersprüchliche Ergebnisse finden sich auch im Rahmen der kardialen Fibrose. Robert et al. behandelten uninephrektomierte Ratten mit Ald und Salz und konnten die sich daraus entwickelnde Herzfibrose durch Gabe des AT₁-Blockers Los verhindern¹³². Gleichzeitig stellten sie fest, dass durch die Gabe von Ald und Salz die Konzentration der AT₁-Rezeptoren im Herz angestiegen war. Zwei vorangegangene Studien konnten im gleichen Modell jedoch keine antifibrotische Wirkung von Los oder einem ACE-Hemmer finden^{36,131}. Die durch Ald vermittelte Hochregulation der AT₁-Rezeptoren-Dichte scheint indes gesichert. Neben Robert et al. beobachteten auch viele andere Arbeitsgruppen eine gesteigerte Expression von AT₁-Rezeptoren in den Herzen, Gefäßen und Nieren von Ratten, die chronisch Ald erhalten hatten^{132,145,163,164}. Zellkulturexperimente mit VSMC zeigten ebenfalls einen Anstieg der AT₁-Rezeptoren-Dichte nach Inkubation mit Ald^{124,165,166}. Zudem konnte in den Herzen und Nieren von Ratten als auch in kultivierten Myozyten nach Ald-Gabe eine gesteigerte ACE-Expression beobachtet werden^{145,167,168}. Damit könnte Ald die schädigende Wirkung von Ang II auf zwei Wegen potenzieren. Durch die erhöhte ACE-Expression käme es lokal zu einer gesteigerten Ang II-Synthese und über die vermehrte Anzahl von AT₁-Rezeptoren könnte Ang II ein stärkeres

Signal induzieren. Zellkulturversuche an VSMC zeigen, dass Ald auch in der Lage ist über nicht-genomische Mechanismen die frühe Signalvermittlung von Ang II zu verstärken. Ald potenzierte sowohl die Ang II-induzierte ERK-1/2-Phosphorylierung²⁵, als auch die Ang II-vermittelte Zellproliferation^{123,124}.

Damit lässt sich festhalten, dass während in-vitro Experimente viele Hinweise für eine potentielle Interaktion von Ald und Ang II liefern, die Ergebnisse aus Tierversuchen bislang keine klare Linie erkennen lassen. Hinsichtlich des Nierenschadens deuten Versuche an Ratten jedoch tendenziell darauf hin, dass Ald seine schädigende Wirkung unabhängig von Ang II vermittelt.

4.2 Lokale Synthese von Ald im Herz

Seit längerem wird die Frage untersucht, ob Ald auch außerhalb der Nebennieren lokal in anderen Organen synthetisiert wird. Auf der Suche nach einer solchen lokalen Ald-Produktion steht vor allem das Herz im Mittelpunkt intensiver Forschung. Gomez-Sanchez et al. adrenalektomierten gesunde Ratten und bestimmten nach 2, 7 bzw. 8 Tagen die kardialen Ald-Spiegel⁶⁵. Dabei konnte kumulativ nur bei 30% der Rattenherzen geringe Ald-Spiegel nachgewiesen werden, während in den anderen Herzen kein Ald auffindbar war. In Kombination mit einer extrem niedrigen kardialen CYP11B2-Expression folgerten die Autoren daraus, dass der weitaus größte Anteil des kardialen Ald der Zirkulation entstammt und im Herz allenfalls eine sehr geringe Ald-Synthese stattfindet. Auch wir widmeten uns der Frage nach einer kardialen Ald-Synthese in unserem dTGR-Modell und konnten die Erkenntnisse von Gomez-Sanchez et al. bestätigen. So entfernten wir in Protokoll II und III den dTGR die Nebennieren, substituierten sie mit Dex und Salz und bestimmten nach 3 bzw. 5 Wochen die Ald-Spiegel in Herz und Plasma. 3 Wochen nach der ADX waren die Ald-Spiegel im Vergleich zur nicht-adrenalektomierten und nur mit Dex/Salz-behandelten Kontrollgruppe im Plasma um 97% und in den Herzen um 90% abgefallen. Wurden die Ald-Spiegel adrenalektomierter Tiere mit denen von komplett unbehandelten dTGR verglichen, waren die Ald-Konzentrationen 3 Wochen nach der ADX sowohl im Plasma als auch im Herzen um mehr als 99% vermindert. In Protokoll III kam es 5 Wochen nach der ADX zu einem weiteren Abfall der kardialen Ald-Spiegel, so dass diese im Vergleich zur nur mit Dex/Salz-behandelten Kontrollgruppe um 96% gesunken waren. Diese Daten zeigen, dass in unserem transgenen Tiermodell das meiste, wenn nicht sogar alles kardiale Ald den Nebennieren entstammt und nicht lokal im Herz synthetisiert wird.

Ob eine relevante physiologische Ald-Synthese im gesunden Herz stattfindet, ist derzeit höchst umstritten. So hat man in den letzten Jahren vor allem versucht, die Existenz der Ald-Synthase CYP11B2 in Herzproben nachzuweisen, um damit auf eine mögliche kardiale Ald-Produktion zu schließen. Silvestre et al. konnten die Expression der Ald-Synthase mittels quantitativer RT-PCR in gesunden Rattenherzen nachweisen und zeigen, dass diese durch Ang II-Gabe, u.a. ein Stimulus für eine erhöhte CYP11B2-Expression in den Nebennieren, im Herz gesteigert wurde⁶³. Zusätzlich wurde Ald und dessen Vorstufe Deoxykortikosteron sowohl im Homogenisat als auch im Perfusat von isolierten Rattenherzen nachgewiesen^{63,64}. Dabei erhöhte die Perfusion mit Ang II oder ACTH die Abgabe von Ald ins Perfusat und die Ald-Konzentration in den Herzen am Ende der Perfusion⁶³. Beides wurde als de novo-Synthese interpretiert. Spätere Versuche zeigten jedoch, dass sich die kardiale CYP11B2-Expression innerhalb verschiedener Rattenstämme unterscheidet. So konnte in den Herzen von Sprague Dawley Ratten Ald-Synthase mRNA nach chronischer Stimulation mit Ang II nachgewiesen werden, nicht jedoch unter basalen Ang II-Spiegeln wie es für die WKY oder SHRSP berichtet wurde¹⁶⁹. Keine CYP11B2-Expression konnte in den Herzen von Mäusen gefunden werden⁶². In humanen RNA-Proben des fetalen Herzens und der adulten Aorta konnte CYP11B2 mRNA nachgewiesen werden, wobei die Expression im Vergleich zur Nebenniere 1000-fach geringer ausfiel⁶¹. Dieser Nachweis gelang zwei Arbeitsgruppen jedoch nicht in RNA-Proben von gesunden adulten Herzen^{61,62}. In zwei weiteren Studien konnten erst nach 40-50 PCR-Zyklen sehr niedrige Spiegel von kardialer CYP11B2 mRNA gefunden werden^{170,171}. Somit gibt es keine eindeutigen Daten für eine Ald-Synthese im gesunden menschlichen Herz. Diese verschiedenen Studien deuten darauf hin, dass Ald möglicherweise im geringen Maße im gesunden Rattenherz, jedoch nicht im gesunden Herzen des Menschen oder der Maus synthetisiert wird.

Während die Existenz und Relevanz einer lokalen Ald-Synthese im gesunden Herzen umstritten ist, muss ihr unter pathophysiologischen Bedingungen eine größere Bedeutung eingeräumt werden. Young et al fanden zwar keine CYP11B2-Expression in den Proben von gesunden humanen Herzen, konnten jedoch CYP11B2 mRNA in den Herzen von Patienten mit Herzinsuffizienz nachweisen⁶². Auch andere Arbeitsgruppen konnten in mindestens einigen Myokardproben von Patienten mit Herzinsuffizienz eine gut messbare CYP11B2-Expression finden^{170,171}. Dabei waren die CYP11B2 mRNA-Spiegel korreliert mit den myokardialen Kollagenspiegeln und invers korreliert mit der linksventrikulären Ejektionsfraktion. Die CYP11B2-Expression und die Kollagenspiegel waren bei Patienten, die mit einer Kombination

aus Spironolakton und ACE-Hemmer behandelt wurden, niedriger als bei unbehandelten Patienten¹⁷⁰.

Bei Patienten mit hypertropher Kardiomyopathie (HCM) wurden neben einem 4-fachen Anstieg der kardialen Ald-Konzentration ein 7-facher Anstieg der CYP11B2-Expression im Myokard im Vergleich zur Kontrollgruppe beschrieben¹⁷². Bei Ratten, denen mittels Okklusion einer Koronararterie ein Myokardinfarkt induziert wurde, verdoppelte der Herzinfarkt im angrenzenden nicht-infarzierten Myokard die CYP11B2-Expression und verdreifachte die kardialen Ald-Spiegel¹⁷³. Da zudem die kardiale Ang II-Konzentration erhöht war und der infarktbedingte Ald-Anstieg durch Los blockiert werden konnte, wurde postuliert, dass Ang II über den AT₁-Rezeptor den Ald-Anstieg vermittelte. Die durch den Myokardinfarkt induzierte Kollagenablagerung im nicht-infarzierten linken Ventrikel konnte zudem sowohl durch Spironolakton als auch Los verhindert werden. Diese Daten lassen vermuten, dass durch den chronischen Stress im kranken Herz eine gesteigerte CYP11B2-Expression stattfindet. Diese bedingt eine erhöhte kardiale Synthese von Ald, was dann möglicherweise über parakrine und autokrine Mechanismen den pathologischen Prozess weiter negativ verstärkt. In unserem Modell konnten wir zwar eine geringe basale CYP11B2-Expression in den Herzen aller Gruppen nachweisen, die Analyse von zwei Subgruppen mit Herzhypertrophie bzw. mit terminaler Herzinsuffizienz zeigte jedoch keine Hochregulation der CYP11B2 mRNA.

4.2.1 Einfluss von Salz auf die Ald-Spiegel in Herz und Plasma

Gomez-Sanchez et al. unterteilten ihre Versuchsratten in zwei Gruppen mit einer salzarmer und einer salzreicher Diät. Dabei stellten sie fest, dass die salzarme Diät die Ald-Spiegel sowohl im Plasma als auch im Herz erhöhte, während eine salzreiche Diät diese abfallen ließ⁶⁵. Wir konnten dies in unserem Modell bestätigen. So führte die Dex-Salz-Behandlung zu einem 6-fachen Abfall der zirkulierenden und einem 14-fachen Abfall der kardialen Ald-Spiegel im Vergleich zu unbehandelten dTGR. Im Einklang mit unseren Beobachtungen berichteten Silvestre et al., dass Ratten, die eine Woche eine salzarme und kaliumreiche Diät erhielten, erhöhte Ald-Spiegel und eine gesteigerte CYP11B2-Expression im Herz aufwiesen⁶³. Konträr sind jedoch die Ergebnisse einer anderen Arbeitsgruppe, die nach einer 4-wöchigen salzreichen Diät sowohl in WKY als auch SHRSP eine gesteigerte kardiale Ald-Synthese und CYP11B2-Expression beobachteten, obgleich die Ald-Spiegel im Plasma abfielen^{174,175}. Seit langem ist bekannt, dass eine salzreiche Diät die Ald-Synthese in den Nebennieren vermindert und die zirkulierenden Ald-Spiegel senkt¹⁷⁶. Die von Gomez-Sanchez und uns beobachtete starke

Korrelation zwischen den kardialen und den zirkulierenden Ald-Spiegel in Abhängigkeit mit einer salzarmen oder salzreichen Diät deutet an, dass die Ald-Synthese in Herz und Nebennieren entweder gleichen Regulationsmechanismen folgt oder kardiales Ald größtenteils der Zirkulation entstammt. Ob die gegensätzlichen Ergebnisse von Takeda et al. durch die Entwicklung einer salzbedingten Herzhypertrophie oder andere Einflüsse erklärt werden können, bleibt bislang unklar.

4.2.2 Kardiale Extraktion von zirkulierendem Ald

Die hohen kardialen Ald-Spiegel und der hohe Herz-Plasma-Quotient in unbehandelten dTGR überraschten uns. In nicht-transgenen Sprague-Dawley-Ratten betragen die Ald-Spiegel im Plasma 143 pg/ml und im Herz 140 pg/g, welche mit den gemessenen Werten von Gomez-Sanchez et al. übereinstimmen⁶⁵. Beim Vergleich dieser Werte mit den in unserem dTGR-Modell gemessenen Werten stellten wir einen 3-fachen Ald-Anstieg im Plasma fest, jedoch einen 30-fachen Anstieg der kardialen Ald-Spiegel. Dieser Sachverhalt lässt vermuten, dass eine beträchtliche Menge des zirkulierenden Ald vom Herz extrahiert wird. Diese Interpretation wird dadurch unterstützt, dass wir eine Korrelation zwischen den Ald-Spiegeln von Herz und Plasma in Protokoll I und II fanden. Auch Silvestre et al. berichteten, dass die Ald-Konzentrationen im Rattenmyokard rund 17 mal höher als im Plasma sind, zogen jedoch daraus den Schluss, dass Ald lokal im Myokard synthetisiert wird⁶³. Sie unterstrichen ihre Hypothese mit der Beobachtung, dass die kardiale Ald-Konzentration im isolierten Herz nach Perfusion mit Ang II oder ACTH anstieg.

Ob Ald im Herz lokal synthetisiert wird oder es durch Extraktion aus der Zirkulation zur Anreicherung von Ald im Myokard kommt, wurde auch mit Hilfe des Herzkatheters untersucht. Zwei Arbeitsgruppen verglichen die Ald-Konzentrationen in dem arteriellen Koronarblut (Aortenwurzel) und dem venösen Koronarblut (Coronarsinus und Vena interventricularis anterior) in gesunden Probanden und Patienten mit Herzinsuffizienz. Beide Arbeitsgruppen kamen zu gegensätzlichen Ergebnissen. Mizuno et al. berichteten, dass bei Patienten mit Herzinsuffizienz in der Vena interventricularis anterior und im Coronarsinus ~20% höhere Ald-Spiegel im Plasma als in der Aortenwurzel gemessen wurden, woraus sie folgerten, dass Ald aus dem Herz in die Koronarzirkulation sezerniert und somit lokal im Herz produziert wurde⁶⁶. Keine Unterschiede zwischen den Ald-Spiegeln wurden bei gesunden Probanden gefunden. Ähnliche Beobachtungen machten Yamamoto et al. bei Patienten mit essentieller Hypertonie, jedoch waren die Ald-Spiegel im Coronarsinus und der Vena interventricularis anterior nur

geringfügig im Vergleich zur Aortenwurzel erhöht¹⁷⁷. Im Gegensatz dazu wurden von einer anderen Arbeitsgruppe bei gesunden Probanden als auch bei Patienten mit Herzinsuffizienz oder Myokardinfarkt ca. 20% niedrigere Ald-Spiegel im Coronarsinus als in der Aortenwurzel gemessen^{67,178,179}. Erhielten die Patienten mit Herzinsuffizienz zusätzlich Spironolakton, konnte kein signifikanter Gradient zwischen den Ald-Spiegeln in der Aortenwurzel und dem Coronarsinus festgestellt werden. Diese Daten lassen den Schluss zu, dass anstatt einer kardialen Ald-Synthese Ald aus der Zirkulation ins Herz aufgenommen und im Myokard angereichert wird. Diese kardiale Ald-Extraktion scheint durch Spironolakton gehemmt zu werden.

Die Hypothese einer kardialen Ald-Extraktion wurde zudem durch biochemische Untersuchungen von Gomez-Sanchez et al. unterstützt, die zeigen, dass Ald im Herz zu einem weniger polaren und höher potenten Derivat acetyliert wird¹⁸⁰. Die myokardiale Ald-Konzentration war im Vergleich zum Plasma 10-fach erhöht, wobei 68% davon monoacetyliert war. Weil acetyliertes Ald weniger polar ist, wird es leichter in fettreichem Gewebe angereichert und könnte dadurch evtl. die hohe kardiale Ald-Konzentration erklären. Solche Derivate werden bei Körpertemperatur im Blut innerhalb von Minuten hydrolysiert und wurden unter Umständen deshalb bisher nicht nachgewiesen. Einen ähnlichen Ansatz verfolgt Funder, indem er die Hypothese aufstellt, dass Ald u.U. im Myokard gebunden wird, evtl. durch eine Interaktion mit der sehr reaktiven Aldehydgruppe am C18-Atom des Ald¹⁸¹. Eine solche Speicherung oder Bindung des Ald im Myokard würde auch erklären, warum Gomez-Sanchez et al. in ihren adrenaletomierten Ratten nach 8 Tagen noch bei einem Teil geringe kardiale Ald-Spiegel nachweisen konnten. Wir verwendeten in unseren Versuchen mit 3 bzw. 5 Wochen post ADX ein wesentlich längeres Zeitintervall zur Bestimmung kardialer Ald-Spiegel. Hierbei konnten wir zeigen, dass selbst 3 Wochen nach ADX die geringen kardialen Ald-Spiegel bis zur 5. Woche weiter abfielen. Diese Ergebnisse lassen die Überlegung aufkommen, ob Ald wesentlich länger im Herzgewebe gespeichert bleibt als bisher vermutet, bzw. die Auswaschphase in unserem Modell mehr als 3 Wochen beträgt.

4.2.3 Schlussfolgerung zum kardialen Ald

Zusammenfassend zeigen unsere Untersuchungen, dass in unserem dTGR-Modell das meiste, wenn nicht alles kardiale Ald in den Nebennieren produziert und über die Zirkulation ins Herz aufgenommen wird. Eine hohe Salzzufuhr führt zum parallelen Abfall der zirkulierenden und kardialen Ald-Spiegel. Zudem sind unsere Messungen vereinbar mit der Hypothese, dass nach

der Entfernung der Nebennieren Ald wesentlich länger im Herz gespeichert bleibt, als bisher angenommen.

Unsere Untersuchungen an adrenalektomierten dTGR, die zusätzlich FAD286 erhielten, zeigen, dass die in unserem Modell beobachteten Herzschäden durch zirkulierendes und nicht durch kardial produziertes Ald induziert wurden. Während eine potentielle Ald-Synthese im Herz durch ADX nicht beeinflusst worden wäre, hätte FAD286 diese blockiert. Adrenalektomierte Ratten, die zusätzlich FAD286 bekamen, wiesen abgesehen von einer geringen Verminderung der kardialen Zellinfiltration keine Verbesserung der Herzparameter auf. Dies deutet darauf hin, dass entweder keine kardiale Ald-Synthese existiert oder sie keinen Einfluss auf den Organschaden nimmt. Das schädigende Ald stammte damit aus den Nebennieren. Trotzdem können wir nicht gänzlich ausschließen, dass eine geringe lokale Ald-Synthese im Herz stattfindet. So konnten wir in den Herzen aller Gruppen eine niedrige basale Expression von CYP11B2 mRNA nachweisen. Falls dieser Befund eine geringe kardiale Ald-Synthese widerspiegelt, scheint diese doch einen kaum nennenswerten Anteil an der kardialen Ald-Konzentration einzunehmen. Zudem ist zu bedenken, dass die bisher gefundenen Konzentrationen der CYP11B2 mRNA in den Herzen und Gefäßen von Ratten zwar wesentlich geringer als in den Nebennieren sind, unter Beachtung der hohen Gesamtmasse des Herzgefäßsystems jedoch eine signifikante Summe der extraadrenalen Ald-Produktion zu erwarten wäre. Dem steht jedoch die Beobachtung entgegen, dass die Ald-Konzentration im Plasma von adrenalektomierten Ratten in den meisten Studien unter der Nachweisgrenze lag^{64,65}. Trotzdem wäre ein lokaler Einfluss einer geringen kardialen Ald-Synthese auf para- und autokriner Ebene vorstellbar. So zeigen Zellkulturexperimente, dass schon nanomolare Ald-Konzentrationen die EGF-induzierte frühe Signalübertragung in CHO-Zellen¹⁸² oder die Ang II-induzierte Signalinduktion in glatten Gefäßmuskelzellen potenzieren^{25,124}. Wie weit unsere Untersuchungen am Rattenmodell auf den Mensch übertragbar sind, ist schwer zu beurteilen. Die derzeitige Studienlage lässt erkennen, dass die Voraussetzungen für eine mögliche kardiale Ald-Synthese zwischen verschiedenen Spezies und sogar innerhalb einer Spezies sehr unterschiedlich ausgeprägt sind.

5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

An doppeltransgenen Ratten (dTGR), die das humane Renin und Angiotensinogen überexprimieren und dadurch vielfach erhöhte Ang II- und Ald-Spiegel aufweisen, untersuchten wir die Rolle von Ald im Ang II-induzierten Endorganschaden. Wir senkten die hohen Ald-Spiegel mittels ADX und waren zudem erstmals in der Lage durch Gabe des neuen Ald-Synthase-Hemmers FAD286 die Ald-Synthese auch pharmakologisch zu blockieren. Damit gelang es uns, den Liganden Ald zu entfernen ohne Einfluss auf den MR zu nehmen. Sowohl FAD286 als auch ADX verminderten den Ang II-induzierten Endorganschaden deutlich. So kam es bei FAD286-behandelten oder adrenaletomierten Tieren im Vergleich zu unbehandelten dTGR zu einer wesentlich geringeren Ausbildung von Herzhypertrophie, Herzfibrose, Entzündungszellinfiltration, Nierenschaden und Albuminurie. Weder FAD286 noch ADX führten zu einer relevanten Senkung des Blutdrucks. Diese Ergebnisse zeigen, dass in unserem Modell Ald eine zentrale Rolle in der Vermittlung des Ang II-induzierten Endorganschadens spielt. Der Einsatz von FAD286 stellt die erstmalige Beschreibung eines organprotektiven Effekts durch einen Ald-Synthase-Hemmer in vivo da. Damit könnte FAD286 in Zukunft eine therapeutische Alternative zu den bisher verwendeten MR-Antagonisten wie Spironolaktone oder Eplerenon darstellen. Unser Modell eignete sich nicht zur Klärung der Frage, ob Ald seine organschädigende Wirkung unabhängig oder durch Interaktion mit Ang II vermittelt. Da hierzu auch in der Literatur gegensätzliche Angaben zu finden sind, bedarf es weiterer Forschung auf diesem Gebiet.

Der zweite Teil unserer Studie widmete sich der Frage, ob lokal im Herz eine relevante Ald-Synthese stattfindet und diese evtl. einen Anteil am Ald-vermittelten Herzschaden hat. Hierzu bestimmten wir die kardiale Ald-Konzentration der verschiedenen Gruppen und konnten zeigen, dass in den Herzen adrenaletomierter Tiere nur noch geringste Mengen von Ald nachweisbar waren. Wir schlossen daraus, dass in unserem transgenen Tiermodell das meiste, wenn nicht sogar alles kardiale Ald den Nebennieren entstammt und nicht lokal im Herz synthetisiert wird. Den hohen Herz-Plasma-Quotienten der Ald-Konzentration in unbehandelten dTGR führten wir auf eine Extraktion von zirkulierendem Ald ins Herzgewebe zurück. Weil die zusätzliche Gabe von FAD286 bei adrenaletomierten Ratten zu keiner nennenswerten Verbesserung des Organschadens führte, scheint in unserem Modell das pathophysiologisch-bedeutsame Ald ausschließlich den Nebennieren zu entstammen.

Weiterer Forschung wird sich zukünftig auch vermehrt mit der Rolle von Glukokortikoiden am MR-vermittelten Organschaden beschäftigen. Kortisol, das am MR über eine gleiche Bindungsaffinität wie Ald verfügt²⁷ und im Kreislauf in einer 1000-fach höheren Konzentration als Ald vorliegt, wird zwar durch das Enzym 11 β -HSD2 von einer Bindung am MR abgehalten^{29,30}, jedoch nicht vollständig und nicht in allen Geweben^{28,34}. Vor allem im Myokard scheint durch Fehlen der 11 β -HSD2 ein großer Teil der MR ständig mit Kortisol besetzt zu sein, wobei in diesem Fall bisher von einem antagonistischen Kortisol-Effekt ausgegangen wurde³⁴⁻³⁷. Neuere Untersuchungen lassen jedoch die Überlegung aufkommen, ob in bestimmten Situationen, wie z.B. oxidativem Stress, auch Kortisol bzw. Kortikosteron eine aktivierende Wirkung am kardialen MR aufweist und dadurch vergleichbar mit hohen Ald-Spiegeln Herzschäden induziert¹⁸³. Zudem entwickeln uninephrektomierte Ratten Bluthochdruck und die beim Hyperaldosteronismus bekannten Organschäden, wenn sie mit dem 11 β -HSD2-Hemmer Carbenoxolon behandelt wurden³³. Da MR-Antagonisten neben Ald auch immer den Einfluss von Kortisol am MR blockieren, könnte der in vielen Studien nachgewiesene protektive Effekt von Spironolakton u.U. auch auf der Hemmung von Glukokortikoiden am MR beruhen. Wir konnten in unserem Modell zwar mit FAD286 die Wirkung von Ald untersuchen ohne den MR zu beeinflussen, einen zusätzlich schädlichen Effekt von Kortikosteron am MR jedoch nicht ausschließen. Zukünftige Studien werden die Rolle von Glukokortikoiden am MR genauer klären müssen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Swedberg K, Kjeksus J. Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure: results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). *Am J Cardiol* 1988;62(2):60A-66A.
2. Effect of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fractions and congestive heart failure. The SOLVD Investigators. *N Engl J Med* 1991;325(5):293-302.
3. Pitt B, Zannad F, Remme WJ, et al. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 1999;341(10):709-17.
4. Blasi ER, Rocha R, Rudolph AE, Blomme EA, Polly ML, McMahon EG. Aldosterone/salt induces renal inflammation and fibrosis in hypertensive rats. *Kidney Int* 2003;63(5):1791-800.
5. Brilla CG, Weber KT. Mineralocorticoid excess, dietary sodium, and myocardial fibrosis. *J Lab Clin Med* 1992;120(6):893-901.
6. Schnee JM, Hsueh WA. Angiotensin II, adhesion, and cardiac fibrosis. *Cardiovasc Res* 2000;46(2):264-8.
7. Geisterfer AA, Peach MJ, Owens GK. Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circ Res* 1988;62(4):749-56.
8. Bader M, Peters J, Baltatu O, Muller DN, Luft FC, Ganten D. Tissue renin-angiotensin systems: new insights from experimental animal models in hypertension research. *J Mol Med* 2001;79(2-3):76-102.
9. Dzau VJ, Re R. Tissue angiotensin system in cardiovascular medicine. A paradigm shift? *Circulation* 1994;89(1):493-8.
10. Klahr S, Morrissey J. Angiotensin II and gene expression in the kidney. *Am J Kidney Dis* 1998;31(1):171-6.
11. Muller DN, Fischli W, Clozel JP, et al. Local angiotensin II generation in the rat heart: role of renin uptake. *Circ Res* 1998;82(1):13-20.
12. Slight SH, Joseph J, Ganjam VK, Weber KT. Extra-adrenal mineralocorticoids and cardiovascular tissue. *J Mol Cell Cardiol* 1999;31(6):1175-84.
13. Tait JF, Simpson SA, Grundy HM. The effect of adrenal extract on mineral metabolism. *Lancet* 1952;1(3):122-4.
14. Simpson SA, Tait JF, Wettstein A, et al. [Constitution of aldosterone, a new mineralocorticoid.]. *Experientia* 1954;10(3):132-3.
15. Curnow KM, Tusie-Luna MT, Pascoe L, et al. The product of the CYP11B2 gene is required for aldosterone biosynthesis in the human adrenal cortex. *Mol Endocrinol* 1991;5(10):1513-22.
16. Kawamoto T, Mitsuuchi Y, Toda K, et al. Role of steroid 11 beta-hydroxylase and steroid 18-hydroxylase in the biosynthesis of glucocorticoids and mineralocorticoids in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(4):1458-62.
17. Quinn SJ, Williams GH. Regulation of aldosterone secretion. *Annu Rev Physiol* 1988;50:409-26.

18. Funder JW, Feldman D, Edelman IS. Specific aldosterone binding in rat kidney and parotid. *J Steroid Biochem* 1972;3(2):209-18.
19. Feldman D, Funder JW, Edelman IS. Evidence for a new class of corticosterone receptors in the rat kidney. *Endocrinology* 1973;92(5):1429-41.
20. Rogerson FM, Brennan FE, Fuller PJ. Mineralocorticoid receptor binding, structure and function. *Mol Cell Endocrinol* 2004;217(1-2):203-12.
21. Spach C, Streeten DH. Retardation Of Sodium Exchange In Dog Erythrocytes By Physiological Concentrations Of Aldosterone, In Vitro. *J Clin Invest* 1964;43:217-27.
22. Schmidt BM, Montealegre A, Janson CP, et al. Short term cardiovascular effects of aldosterone in healthy male volunteers. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84(10):3528-33.
23. Hendron E, Stockand JD. Activation of mitogen-activated protein kinase (mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase) cascade by aldosterone. *Mol Biol Cell* 2002;13(9):3042-54.
24. Boldyreff B, Wehling M. Rapid aldosterone actions: from the membrane to signaling cascades to gene transcription and physiological effects. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003;85(2-5):375-81.
25. Mazak I, Fiebeler A, Muller DN, et al. Aldosterone potentiates angiotensin II-induced signaling in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 2004;109(22):2792-800.
26. Harvey BJ, Higgins M. Nongenomic effects of aldosterone on Ca²⁺ in M-1 cortical collecting duct cells. *Kidney Int* 2000;57(4):1395-403.
27. Arriza JL, Weinberger C, Cerelli G, et al. Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science* 1987;237(4812):268-75.
28. Funder JW. Glucocorticoid and mineralocorticoid receptors: biology and clinical relevance. *Annu Rev Med* 1997;48:231-40.
29. Rogerson FM, Fuller PJ. Mineralocorticoid action. *Steroids* 2000;65(2):61-73.
30. Funder JW, Pearce PT, Smith R, Smith AI. Mineralocorticoid action: target tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated. *Science* 1988;242(4878):583-5.
31. Stewart PM, Corrie JE, Shackleton CH, Edwards CR. Syndrome of apparent mineralocorticoid excess. A defect in the cortisol-cortisone shuttle. *J Clin Invest* 1988;82(1):340-9.
32. Wilson RC, Harbison MD, Krozowski ZS, et al. Several homozygous mutations in the gene for 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in patients with apparent mineralocorticoid excess. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80(11):3145-50.
33. Young MJ, Moussa L, Dilley R, Funder JW. Early inflammatory responses in experimental cardiac hypertrophy and fibrosis: effects of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase inactivation. *Endocrinology* 2003;144(3):1121-5.
34. Qin W, Rudolph AE, Bond BR, et al. Transgenic model of aldosterone-driven cardiac hypertrophy and heart failure. *Circ Res* 2003;93(1):69-76.
35. Young M, Fullerton M, Dilley R, Funder J. Mineralocorticoids, hypertension, and cardiac fibrosis. *J Clin Invest* 1994;93(6):2578-83.
36. Young MJ, Funder JW. The renin-angiotensin-aldosterone system in experimental mineralocorticoid-salt-induced cardiac fibrosis. *Am J Physiol* 1996;271(5 Pt 1):E883-8.

37. Gomez-Sanchez EP, Venkataraman MT, Thwaites D, Fort C. ICV infusion of corticosterone antagonizes ICV-aldosterone hypertension. *Am J Physiol* 1990;258(4 Pt 1):E649-53.
38. Bhargava A, Pearce D. Mechanisms of mineralocorticoid action: determinants of receptor specificity and actions of regulated gene products. *Trends Endocrinol Metab* 2004;15(4):147-53.
39. Lombes M, Kenouch S, Souque A, Farman N, Rafestin-Oblin ME. The mineralocorticoid receptor discriminates aldosterone from glucocorticoids independently of the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Endocrinology* 1994;135(3):834-40.
40. Farman N, Rafestin-Oblin ME. Multiple aspects of mineralocorticoid selectivity. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001;280(2):F181-92.
41. Garty H, Palmer LG. Epithelial sodium channels: function, structure, and regulation. *Physiol Rev* 1997;77(2):359-96.
42. Palmer LG, Frindt G. Aldosterone and potassium secretion by the cortical collecting duct. *Kidney Int* 2000;57(4):1324-8.
43. Kim GH, Masilamani S, Turner R, Mitchell C, Wade JB, Knepper MA. The thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter is an aldosterone-induced protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(24):14552-7.
44. Berger S, Bleich M, Schmid W, et al. Mineralocorticoid receptor knockout mice: pathophysiology of Na⁺ metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(16):9424-9.
45. Fiebeler A. (Alte) Neue Medikamente: Aldosteron-Antagonisten zur Behandlung kardiovaskulärer und nephrologischer Erkrankungen. *Dtsch Med Wochenschr* 2004;129:2491-2496.
46. de Kloet ER, Van Acker SA, Sibug RM, et al. Brain mineralocorticoid receptors and centrally regulated functions. *Kidney Int* 2000;57(4):1329-36.
47. Coirini H, Marusic ET, De Nicola AF, Rainbow TC, McEwen BS. Identification of mineralocorticoid binding sites in rat brain by competition studies and density gradient centrifugation. *Neuroendocrinology* 1983;37(5):354-60.
48. Lombes M, Alfaidy N, Eugene E, Lessana A, Farman N, Bonvalet JP. Prerequisite for cardiac aldosterone action. Mineralocorticoid receptor and 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the human heart. *Circulation* 1995;92(2):175-82.
49. Lombes M, Oblin ME, Gasc JM, Baulieu EE, Farman N, Bonvalet JP. Immunohistochemical and biochemical evidence for a cardiovascular mineralocorticoid receptor. *Circ Res* 1992;71(3):503-10.
50. Pearce P, Funder JW. High affinity aldosterone binding sites (type I receptors) in rat heart. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1987;14(11-12):859-66.
51. Kornel L. Colocalization of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and mineralocorticoid receptors in cultured vascular smooth muscle cells. *Am J Hypertens* 1994;7(1):100-3.
52. Hatakeyama H, Miyamori I, Fujita T, Takeda Y, Takeda R, Yamamoto H. Vascular aldosterone. Biosynthesis and a link to angiotensin II-induced hypertrophy of vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1994;269(39):24316-20.
53. Young MJ, Funder JW. Mineralocorticoid receptors and pathophysiological roles for aldosterone in the cardiovascular system. *J Hypertens* 2002;20(8):1465-8.
54. Gomez-Sanchez CE, Zhou MY, Cozza EN, Morita H, Foecking MF, Gomez-Sanchez EP. Aldosterone biosynthesis in the rat brain. *Endocrinology* 1997;138(8):3369-73.

55. MacKenzie SM, Clark CJ, Fraser R, Gomez-Sanchez CE, Connell JM, Davies E. Expression of 11beta-hydroxylase and aldosterone synthase genes in the rat brain. *J Mol Endocrinol* 2000;24(3):321-8.
56. Gomez-Sanchez EP, Ahmad N, Romero DG, Gomez-Sanchez CE. Is aldosterone synthesized within the rat brain? *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005;288(2):E342-6.
57. Takeda R, Hatakeyama H, Takeda Y, et al. Aldosterone biosynthesis and action in vascular cells. *Steroids* 1995;60(1):120-4.
58. Takeda Y, Miyamori I, Yoneda T, et al. Regulation of aldosterone synthase in human vascular endothelial cells by angiotensin II and adrenocorticotropin. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81(8):2797-800.
59. Takeda Y, Miyamori I, Yoneda T, et al. Production of aldosterone in isolated rat blood vessels. *Hypertension* 1995;25(2):170-3.
60. Ahmad N, Romero DG, Gomez-Sanchez EP, Gomez-Sanchez CE. Do human vascular endothelial cells produce aldosterone? *Endocrinology* 2004;145(8):3626-9.
61. Kayes-Wandover KM, White PC. Steroidogenic enzyme gene expression in the human heart. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85(7):2519-25.
62. Young MJ, Clyne CD, Cole TJ, Funder JW. Cardiac steroidogenesis in the normal and failing heart. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(11):5121-6.
63. Silvestre JS, Robert V, Heymes C, et al. Myocardial production of aldosterone and corticosterone in the rat. Physiological regulation. *J Biol Chem* 1998;273(9):4883-91.
64. Takeda Y, Yoneda T, Demura M, Miyamori I, Mabuchi H. Cardiac aldosterone production in genetically hypertensive rats. *Hypertension* 2000;36(4):495-500.
65. Gomez-Sanchez EP, Ahmad N, Romero DG, Gomez-Sanchez CE. Origin of aldosterone in the rat heart. *Endocrinology* 2004;145(11):4796-802.
66. Mizuno Y, Yoshimura M, Yasue H, et al. Aldosterone production is activated in failing ventricle in humans. *Circulation* 2001;103(1):72-7.
67. Tsutamoto T, Wada A, Maeda K, et al. Transcardiac gradient of aldosterone before and after spironolactone in patients with congestive heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol* 2003;41 Suppl 1:S19-22.
68. Borghi C, Boschi S, Ambrosioni E, Melandri G, Branzi A, Magnani B. Evidence of a partial escape of renin-angiotensin-aldosterone blockade in patients with acute myocardial infarction treated with ACE inhibitors. *J Clin Pharmacol* 1993;33(1):40-5.
69. Jorde UP, Vittorio T, Katz SD, Colombo PC, Latif F, Le Jemtel TH. Elevated plasma aldosterone levels despite complete inhibition of the vascular angiotensin-converting enzyme in chronic heart failure. *Circulation* 2002;106(9):1055-7.
70. Pitt B, Remme W, Zannad F, et al. Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2003;348(14):1309-21.
71. Kajstura J, Cigola E, Malhotra A, et al. Angiotensin II induces apoptosis of adult ventricular myocytes in vitro. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29(3):859-70.
72. Nakamura K, Fushimi K, Kouchi H, et al. Inhibitory effects of antioxidants on neonatal rat cardiac myocyte hypertrophy induced by tumor necrosis factor-alpha and angiotensin II. *Circulation* 1998;98(8):794-9.

73. Theuer J, Dechend R, Muller DN, et al. Angiotensin II induced inflammation in the kidney and in the heart of double transgenic rats. *BMC Cardiovasc Disord* 2002;2:3.
74. White M, Racine N, Ducharme A, de Champlain J. Therapeutic potential of angiotensin II receptor antagonists. *Expert Opin Investig Drugs* 2001;10(9):1687-701.
75. Daugherty A, Manning MW, Cassis LA. Angiotensin II promotes atherosclerotic lesions and aneurysms in apolipoprotein E-deficient mice. *J Clin Invest* 2000;105(11):1605-12.
76. Goodfield NE, Newby DE, Ludlam CA, Flapan AD. Effects of acute angiotensin II type 1 receptor antagonism and angiotensin converting enzyme inhibition on plasma fibrinolytic parameters in patients with heart failure. *Circulation* 1999;99(23):2983-5.
77. Okoshi MP, Yan X, Okoshi K, et al. Aldosterone directly stimulates cardiac myocyte hypertrophy. *J Card Fail* 2004;10(6):511-8.
78. Sun Y, Zhang J, Lu L, Chen SS, Quinn MT, Weber KT. Aldosterone-induced inflammation in the rat heart: role of oxidative stress. *Am J Pathol* 2002;161(5):1773-81.
79. Farquharson CA, Struthers AD. Aldosterone induces acute endothelial dysfunction in vivo in humans: evidence for an aldosterone-induced vasculopathy. *Clin Sci (Lond)* 2002;103(4):425-31.
80. Conn JW. Presidential address. I. Painting background. II. Primary aldosteronism, a new clinical syndrome. *J Lab Clin Med* 1955;45(1):3-17.
81. Rossi GP, Di Bello V, Ganzaroli C, et al. Excess aldosterone is associated with alterations of myocardial texture in primary aldosteronism. *Hypertension* 2002;40(1):23-7.
82. Milliez P, Girerd X, Plouin PF, Blacher J, Safar ME, Mourad JJ. Evidence for an increased rate of cardiovascular events in patients with primary aldosteronism. *J Am Coll Cardiol* 2005;45(8):1243-8.
83. Wolf G. Angiotensin II as a mediator of tubulointerstitial injury. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15 Suppl 6:61-3.
84. Rocha R, Chander PN, Zuckerman A, Stier CT, Jr. Role of aldosterone in renal vascular injury in stroke-prone hypertensive rats. *Hypertension* 1999;33(1 Pt 2):232-7.
85. Chander PN, Rocha R, Ranaudo J, Singh G, Zuckerman A, Stier CT, Jr. Aldosterone plays a pivotal role in the pathogenesis of thrombotic microangiopathy in SHRSP. *J Am Soc Nephrol* 2003;14(8):1990-7.
86. Ganten D, Wagner J, Zeh K, et al. Species specificity of renin kinetics in transgenic rats harboring the human renin and angiotensinogen genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(16):7806-10.
87. Fukamizu A, Seo MS, Hatae T, et al. Tissue-specific expression of the human renin gene in transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;165(2):826-32.
88. Bohlender J, Fukamizu A, Lippoldt A, et al. High human renin hypertension in transgenic rats. *Hypertension* 1997;29(1 Pt 2):428-34.
89. Bohlender J, Menard J, Wagner J, Luft FC, Ganten D. Human renin-dependent hypertension in rats transgenic for human angiotensinogen. *Hypertension* 1996;27(3 Pt 2):535-40.
90. Mervaala EM, Muller DN, Park JK, et al. Monocyte infiltration and adhesion molecules in a rat model of high human renin hypertension. *Hypertension* 1999;33(1 Pt 2):389-95.
91. Mervaala E, Muller DN, Schmidt F, et al. Blood pressure-independent effects in rats with human renin and angiotensinogen genes. *Hypertension* 2000;35(2):587-94.

92. Luft FC, Mervaala E, Muller DN, et al. Hypertension-induced end-organ damage: A new transgenic approach to an old problem. *Hypertension* 1999;33(1 Pt 2):212-8.
93. Fiebeler A, Schmidt F, Muller DN, et al. Mineralocorticoid receptor affects AP-1 and nuclear factor-kappaB activation in angiotensin II-induced cardiac injury. *Hypertension* 2001;37(2 Part 2):787-93.
94. Naruse M, Tanabe A, Sato A, et al. Aldosterone breakthrough during angiotensin II receptor antagonist therapy in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2002;40(1):28-33.
95. Kagawa CM, Sturtevant FM, Van Arman CG. Pharmacology of a new steroid that blocks salt activity of aldosterone and desoxycorticosterone. *J Pharmacol Exp Ther* 1959;126(2):123-30.
96. Sturtevant FM. Prevention by adrenal-regeneration hypertension by an aldosterone-blocker. *Endocrinology* 1959;64(2):299-300.
97. Selye H. Protection by a steroid-spirolactone against certain types of cardiac necroses. *Proc Soc Exp Biol Med* 1960;104:212-3.
98. de Gasparo M, Joss U, Ramjoue HP, et al. Three new epoxy-spirolactone derivatives: characterization in vivo and in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* 1987;240(2):650-6.
99. Stanton B, Giebisch G, Klein-Robbenhaar G, Wade J, DeFronzo RA. Effects of adrenalectomy and chronic adrenal corticosteroid replacement on potassium transport in rat kidney. *J Clin Invest* 1985;75(4):1317-26.
100. Fiebeler A, Nussberger J, Shagdarsuren E, et al. Aldosterone synthase inhibitor ameliorates angiotensin II-induced organ damage. *Circulation* 2005;111(23):3087-94.
101. Gazdar AF, Oie HK, Shackleton CH, et al. Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses multiple pathways of steroid biosynthesis. *Cancer Res* 1990;50(17):5488-96.
102. Hausler A, Monnet G, Borer C, Bhatnagar AS. Evidence that corticosterone is not an obligatory intermediate in aldosterone biosynthesis in the rat adrenal. *J Steroid Biochem* 1989;34(1-6):567-70.
103. Bureik M, Hubel K, Dragan CA, et al. Development of test systems for the discovery of selective human aldosterone synthase (CYP11B2) and 11beta-hydroxylase (CYP11B1) inhibitors. Discovery of a new lead compound for the therapy of congestive heart failure, myocardial fibrosis and hypertension. *Mol Cell Endocrinol* 2004;217(1-2):249-54.
104. Ulmschneider S, Muller-Vieira U, Mitrenga M, et al. Synthesis and evaluation of imidazolylmethylenetetrahydronaphthalenes and imidazolylmethyleneindanes: potent inhibitors of aldosterone synthase. *J Med Chem* 2005;48(6):1796-805.
105. Poulsen K, Jorgensen J. An easy radioimmunological microassay of renin activity, concentration and substrate in human and animal plasma and tissues based on angiotensin I trapping by antibody. *J Clin Endocrinol Metab* 1974;39(5):816-25.
106. Vecsei P. Glucocorticoids: cortisol, corticosterone, compound S and their metabolites. In: Jaffe B, Behrmann, HR, ed. *Methods of Hormone Radioimmunoassays*. New York, NY: Academic Press, 1979: 767-796.
107. Nussberger J, Waeber B, Brunner HR, Burris JF, Vetter W. Highly sensitive microassay for aldosterone in unextracted plasma: comparison with two other methods. *J Lab Clin Med* 1984;104(5):789-96.

108. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162(1):156-9.
109. Schwartz K, Chassagne C, Boheler KR. The molecular biology of heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1993;22(4 Suppl A):30A-33A.
110. Haller H, Park JK, Dragun D, Lippoldt A, Luft FC. Leukocyte infiltration and ICAM-1 expression in two-kidney one-clip hypertension. *Nephrol Dial Transplant* 1997;12(5):899-903.
111. Suzuki G, Morita H, Mishima T, et al. Effects of long-term monotherapy with eplerenone, a novel aldosterone blocker, on progression of left ventricular dysfunction and remodeling in dogs with heart failure. *Circulation* 2002;106(23):2967-72.
112. Tanabe A, Naruse M, Hara Y, et al. Aldosterone antagonist facilitates the cardioprotective effects of angiotensin receptor blockers in hypertensive rats. *J Hypertens* 2004;22(5):1017-23.
113. Zhou X, Ono H, Ono Y, Frohlich ED. Aldosterone antagonism ameliorates proteinuria and nephrosclerosis independent of glomerular dynamics in L-NAME/SHR model. *Am J Nephrol* 2004;24(2):242-9.
114. Rocha R, Stier CT, Jr., Kifor I, et al. Aldosterone: a mediator of myocardial necrosis and renal arteriopathy. *Endocrinology* 2000;141(10):3871-8.
115. Rocha R, Chander PN, Khanna K, Zuckerman A, Stier CT, Jr. Mineralocorticoid blockade reduces vascular injury in stroke-prone hypertensive rats. *Hypertension* 1998;31(1 Pt 2):451-8.
116. Young M, Head G, Funder J. Determinants of cardiac fibrosis in experimental hypermineralocorticoid states. *Am J Physiol* 1995;269(4 Pt 1):E657-62.
117. Schunkert H, Hense HW, Muscholl M, et al. Associations between circulating components of the renin-angiotensin-aldosterone system and left ventricular mass. *Heart* 1997;77(1):24-31.
118. El-Gharbawy AH, Nadig VS, Kotchen JM, et al. Arterial pressure, left ventricular mass, and aldosterone in essential hypertension. *Hypertension* 2001;37(3):845-50.
119. Delles C, Schmidt BM, Muller HJ, Oehmer S, Klingbeil AU, Schmieder RE. Functional relevance of aldosterone for the determination of left ventricular mass. *Am J Cardiol* 2003;91(3):297-301.
120. Pitt B, Reichek N, Willenbrock R, et al. Effects of eplerenone, enalapril, and eplerenone/enalapril in patients with essential hypertension and left ventricular hypertrophy: the 4E-left ventricular hypertrophy study. *Circulation* 2003;108(15):1831-8.
121. Sato A, Hayashi M, Saruta T. Relative long-term effects of spironolactone in conjunction with an angiotensin-converting enzyme inhibitor on left ventricular mass and diastolic function in patients with essential hypertension. *Hypertens Res* 2002;25(6):837-42.
122. Tsutamoto T, Wada A, Maeda K, et al. Effect of spironolactone on plasma brain natriuretic peptide and left ventricular remodeling in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2001;37(5):1228-33.
123. Min LJ, Mogi M, Li JM, Iwanami J, Iwai M, Horiuchi M. Aldosterone and Angiotensin II Synergistically Induce Mitogenic Response in Vascular Smooth Muscle Cells. *Circ Res* 2005.

124. Xiao F, Puddefoot JR, Barker S, Vinson GP. Mechanism for aldosterone potentiation of angiotensin II-stimulated rat arterial smooth muscle cell proliferation. *Hypertension* 2004;44(3):340-5.
125. Brilla CG, Pick R, Tan LB, Janicki JS, Weber KT. Remodeling of the rat right and left ventricles in experimental hypertension. *Circ Res* 1990;67(6):1355-64.
126. Brilla CG, Matsubara LS, Weber KT. Antifibrotic effects of spironolactone in preventing myocardial fibrosis in systemic arterial hypertension. *Am J Cardiol* 1993;71(3):12A-16A.
127. Brilla CG, Zhou G, Matsubara L, Weber KT. Collagen metabolism in cultured adult rat cardiac fibroblasts: response to angiotensin II and aldosterone. *J Mol Cell Cardiol* 1994;26(7):809-20.
128. Fullerton MJ, Funder JW. Aldosterone and cardiac fibrosis: in vitro studies. *Cardiovasc Res* 1994;28(12):1863-7.
129. Campbell SE, Janicki JS, Weber KT. Temporal differences in fibroblast proliferation and phenotype expression in response to chronic administration of angiotensin II or aldosterone. *J Mol Cell Cardiol* 1995;27(8):1545-60.
130. Robert V, Silvestre JS, Charlemagne D, et al. Biological determinants of aldosterone-induced cardiac fibrosis in rats. *Hypertension* 1995;26(6 Pt 1):971-8.
131. Brilla CG, Matsubara LS, Weber KT. Anti-aldosterone treatment and the prevention of myocardial fibrosis in primary and secondary hyperaldosteronism. *J Mol Cell Cardiol* 1993;25(5):563-75.
132. Robert V, Heymes C, Silvestre JS, Sabri A, Swynghedauw B, Delcayre C. Angiotensin AT1 receptor subtype as a cardiac target of aldosterone: role in aldosterone-salt-induced fibrosis. *Hypertension* 1999;33(4):981-6.
133. Zannad F, Alla F, Dousset B, Perez A, Pitt B. Limitation of excessive extracellular matrix turnover may contribute to survival benefit of spironolactone therapy in patients with congestive heart failure: insights from the randomized aldactone evaluation study (RALES). Rales Investigators. *Circulation* 2000;102(22):2700-6.
134. MacFadyen RJ, Barr CS, Struthers AD. Aldosterone blockade reduces vascular collagen turnover, improves heart rate variability and reduces early morning rise in heart rate in heart failure patients. *Cardiovasc Res* 1997;35(1):30-4.
135. Modena MG, Aveta P, Menozzi A, Rossi R. Aldosterone inhibition limits collagen synthesis and progressive left ventricular enlargement after anterior myocardial infarction. *Am Heart J* 2001;141(1):41-6.
136. Hayashi M, Tsutamoto T, Wada A, et al. Immediate administration of mineralocorticoid receptor antagonist spironolactone prevents post-infarct left ventricular remodeling associated with suppression of a marker of myocardial collagen synthesis in patients with first anterior acute myocardial infarction. *Circulation* 2003;107(20):2559-65.
137. Greene EL, Kren S, Hostetter TH. Role of aldosterone in the remnant kidney model in the rat. *J Clin Invest* 1996;98(4):1063-8.
138. Anderson S, Meyer TW, Rennke HG, Brenner BM. Control of glomerular hypertension limits glomerular injury in rats with reduced renal mass. *J Clin Invest* 1985;76(2):612-9.
139. Horiuchi M, Nishiyama H, Hama J, et al. Characterization of renal aldosterone receptors in genetically hypertensive rats. *Am J Physiol* 1993;264(2 Pt 2):F286-91.

140. Quinkler M, Zehnder D, Eardley KS, et al. Increased expression of mineralocorticoid effector mechanisms in kidney biopsies of patients with heavy proteinuria. *Circulation* 2005;112(10):1435-43.
141. Eddy AA. Plasminogen activator inhibitor-1 and the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002;283(2):F209-20.
142. Brown NJ, Kim KS, Chen YQ, et al. Synergistic effect of adrenal steroids and angiotensin II on plasminogen activator inhibitor-1 production. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85(1):336-44.
143. Brown NJ, Agirbasli MA, Williams GH, Litchfield WR, Vaughan DE. Effect of activation and inhibition of the renin-angiotensin system on plasma PAI-1. *Hypertension* 1998;32(6):965-71.
144. Brown NJ, Nakamura S, Ma L, et al. Aldosterone modulates plasminogen activator inhibitor-1 and glomerulosclerosis in vivo. *Kidney Int* 2000;58(3):1219-27.
145. Sun Y, Zhang J, Zhang JQ, Ramires FJ. Local angiotensin II and transforming growth factor-beta1 in renal fibrosis of rats. *Hypertension* 2000;35(5):1078-84.
146. Stier CT, Jr., Zuckerman A, Harashima H, Chander PN. Antioxidants reduce aldosterone-induced renal vascular injury in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. [abstract P4.03]. Proceedings of the International Society of Hypertension, Chicago, IL, USA.
147. Helkamaa T, Finckenberg P, Louhelainen M, et al. Entacapone protects from angiotensin II-induced inflammation and renal injury. *J Hypertens* 2003;21(12):2353-63.
148. Marcocci L, Maguire JJ, Packer L. Nitecapone: a nitric oxide radical scavenger. *Biochem Mol Biol Int* 1994;34(3):531-41.
149. Hene RJ, Boer P, Koomans HA, Mees EJ. Plasma aldosterone concentrations in chronic renal disease. *Kidney Int* 1982;21(1):98-101.
150. Conn JW, Knopf RF, Nesbit RM. Clinical Characteristics Of Primary Aldosteronism From An Analysis Of 145 Cases. *Am J Surg* 1964;107:159-72.
151. Sato A, Hayashi K, Saruta T. Antiproteinuric effects of mineralocorticoid receptor blockade in patients with chronic renal disease. *Am J Hypertens* 2005;18(1):44-9.
152. Bianchi S, Bigazzi R, Campese VM. Antagonists of aldosterone and proteinuria in patients with CKD: an uncontrolled pilot study. *Am J Kidney Dis* 2005;46(1):45-51.
153. Sato A, Hayashi K, Naruse M, Saruta T. Effectiveness of aldosterone blockade in patients with diabetic nephropathy. *Hypertension* 2003;41(1):64-8.
154. Mervaala E, Muller DN, Park JK, et al. Cyclosporin A protects against angiotensin II-induced end-organ damage in double transgenic rats harboring human renin and angiotensinogen genes. *Hypertension* 2000;35(1 Pt 2):360-6.
155. Muller DN, Shagdarsuren E, Park JK, et al. Immunosuppressive treatment protects against angiotensin II-induced renal damage. *Am J Pathol* 2002;161(5):1679-93.
156. Weber KT. From inflammation to fibrosis: a stiff stretch of highway. *Hypertension* 2004;43(4):716-9.
157. Fujisawa G, Dilley R, Fullerton MJ, Funder JW. Experimental cardiac fibrosis: differential time course of responses to mineralocorticoid-salt administration. *Endocrinology* 2001;142(8):3625-31.
158. Rocha R, Rudolph AE, Friedrich GE, et al. Aldosterone induces a vascular inflammatory phenotype in the rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283(5):H1802-10.

159. Kim S, Ohta K, Hamaguchi A, et al. Role of angiotensin II in renal injury of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Hypertension* 1994;24(2):195-204.
160. Wada T, Kanagawa R, Ishimura Y, Inada Y, Nishikawa K. Role of angiotensin II in cerebrovascular and renal damage in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *J Hypertens* 1995;13(1):113-22.
161. Dworkin LD, Levin RI, Benstein JA, et al. Effects of nifedipine and enalapril on glomerular injury in rats with deoxycorticosterone-salt hypertension. *Am J Physiol* 1990;259(4 Pt 2):F598-604.
162. Sorooshian M, Olson JL, Meyer TW. Effect of angiotensin II blockade on renal injury in mineralocorticoid-salt hypertension. *Hypertension* 2000;36(4):569-74.
163. Schiffrin EL, Franks DJ, Gutkowska J. Effect of aldosterone on vascular angiotensin II receptors in the rat. *Can J Physiol Pharmacol* 1985;63(12):1522-7.
164. Sun Y, Weber KT. Angiotensin II and aldosterone receptor binding in rat heart and kidney: response to chronic angiotensin II or aldosterone administration. *J Lab Clin Med* 1993;122(4):404-11.
165. Ullian ME, Schelling JR, Linas SL. Aldosterone enhances angiotensin II receptor binding and inositol phosphate responses. *Hypertension* 1992;20(1):67-73.
166. Ullian ME, Walsh LG, Morinelli TA. Potentiation of angiotensin II action by corticosteroids in vascular tissue. *Cardiovasc Res* 1996;32(2):266-73.
167. Sun Y, Ratajska A, Zhou G, Weber KT. Angiotensin-converting enzyme and myocardial fibrosis in the rat receiving angiotensin II or aldosterone. *J Lab Clin Med* 1993;122(4):395-403.
168. Harada E, Yoshimura M, Yasue H, et al. Aldosterone induces angiotensin-converting-enzyme gene expression in cultured neonatal rat cardiocytes. *Circulation* 2001;104(2):137-9.
169. Rudolph AE, Blasi ER, Delyani JA. Tissue-specific corticosteroidogenesis in the rat. *Mol Cell Endocrinol* 2000;165(1-2):221-4.
170. Satoh M, Nakamura M, Saitoh H, et al. Aldosterone synthase (CYP11B2) expression and myocardial fibrosis in the failing human heart. *Clin Sci (Lond)* 2002;102(4):381-6.
171. Yoshimura M, Nakamura S, Ito T, et al. Expression of aldosterone synthase gene in failing human heart: quantitative analysis using modified real-time polymerase chain reaction. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(8):3936-40.
172. Tsybouleva N, Zhang L, Chen S, et al. Aldosterone, through novel signaling proteins, is a fundamental molecular bridge between the genetic defect and the cardiac phenotype of hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 2004;109(10):1284-91.
173. Silvestre JS, Heymes C, Oubenaissa A, et al. Activation of cardiac aldosterone production in rat myocardial infarction: effect of angiotensin II receptor blockade and role in cardiac fibrosis. *Circulation* 1999;99(20):2694-701.
174. Takeda Y, Yoneda T, Demura M, Miyamori I, Mabuchi H. Sodium-induced cardiac aldosterone synthesis causes cardiac hypertrophy. *Endocrinology* 2000;141(5):1901-4.
175. Takeda Y, Yoneda T, Demura M, Furukawa K, Miyamori I, Mabuchi H. Effects of high sodium intake on cardiovascular aldosterone synthesis in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 2001;19(3 Pt 2):635-9.

-
176. Volpe M, Rubattu S, Ganten D, et al. Dietary salt excess unmasks blunted aldosterone suppression and sodium retention in the stroke-prone phenotype of the spontaneously hypertensive rat. *J Hypertens* 1993;11(8):793-8.
 177. Yamamoto N, Yasue H, Mizuno Y, et al. Aldosterone is produced from ventricles in patients with essential hypertension. *Hypertension* 2002;39(5):958-62.
 178. Tsutamoto T, Wada A, Maeda K, et al. Spironolactone inhibits the transcardiac extraction of aldosterone in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2000;36(3):838-44.
 179. Hayashi M, Tsutamoto T, Wada A, et al. Relationship between transcardiac extraction of aldosterone and left ventricular remodeling in patients with first acute myocardial infarction: extracting aldosterone through the heart promotes ventricular remodeling after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2001;38(5):1375-82.
 180. Gomez-Sanchez CE, Foecking MF, Gomez-Sanchez EP. Aldosterone esters and the heart. *Am J Hypertens* 2001;14(6 Pt 2):200S-205S.
 181. Funder JW. Cardiac synthesis of aldosterone: going, going, gone.? *Endocrinology* 2004;145(11):4793-5.
 182. Krug AW, Schuster C, Gassner B, et al. Human epidermal growth factor receptor-1 expression renders Chinese hamster ovary cells sensitive to alternative aldosterone signaling. *J Biol Chem* 2002;277(48):45892-7.
 183. Funder JW. Is aldosterone bad for the heart? *Trends Endocrinol Metab* 2004;15(4):139-42.

7 DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. F.C. Luft für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe bedanken, in der ich neben der Arbeit im Labor auch intensiv in wissenschaftliche Denkprozesse eingebunden wurde.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Anette Fiebeler, die mich in meinem Forschungsjahr mit großem Engagement betreut und gefördert hat. Sie hat mein wissenschaftliches Verständnis in unzähligen Gesprächen vorangebracht und es mir ermöglicht auch über mein Dissertationsthema hinaus zahlreiche wissenschaftliche Erfahrungen zu sammeln. Vor allem ihrer unermüdlichen Unterstützung ist es zu verdanken, dass ich meine Arbeit zügig fertig stellen konnte.

Zudem möchte ich Herrn PD Dr. Dominik Müller danken, der mir während meiner Arbeit bei vielen Fragen zur Seite stand und dessen Gedankenanstöße ich immer sehr geschätzt habe.

Vor allem Petra Quass und Carsten Lindschau bin ich für die freundliche Arbeitsatmosphäre und ihre exzellente Unterstützung bei zahlreichen laborchemischen Herausforderungen sehr verbunden.

Weiterhin möchte ich Maren Wellner, Erdenechimeg Shagdarsuren, Song Rong, Nidal Al-Saadi und Ralf Dechend meinen herzlichen Dank aussprechen.

Ebenso war die Zusammenarbeit mit Astrid Schiche und Jutta Meisel äußerst bereichernd und auch Gabi N'diaye, Mathilde Schmidt, May-Britt Köhler und Reika Langanki möchte ich sehr danken.

Schliesslich möchte ich mich bei meinen Eltern, Anna Melchers und Martina Altenähr für das Lesen des Manuskripts und die Unterstützung in den letzten zwei Jahren bedanken.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich, Georg Hilfenhaus, versichere an Eides statt, dass die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema "Rolle von Aldosteron beim Angiotensin II-induzierten Endorganschaden" von mir eigenständig und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt, und die benutzten Hilfsmittel, sowie die Literatur vollständig aufgeführt sind.

Berlin, den 01. Dezember 2005

Georg Hilfenhaus

LEBENS LAUF

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.