

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus der Klinik für Nephrologie

**Strukturelle und funktionelle Veränderungen
des kardiovaskulären Systems
bei chronischer Niereninsuffizienz im Mausmodell**

Inaugural – Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Marion Irmgard Tewiele
aus Oberhausen

Essen 2009

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. M. Forsting

1. Gutachter: Herr Priv.-Doz. Dr. med. O. Witzke

2. Gutachter: Herr Priv.-Doz. Dr. med. H. Wieneke

Tag der mündlichen Prüfung: 7. Oktober 2009

Inhalte dieser Arbeit wurden wie folgt veröffentlicht:

38. Kongress der Gesellschaft für Nephrologie, München 2007:

M. Tewiele, M. Baumann, S. Song, K. Wu, Th. Philipp, A. Kribben, O. Witzke (2007):
Der Einfluß des Tyrosinkinaseinhibitors Imatinib auf das kardiovaskuläre System bei
der 5/6-Nephrektomie-induzierten Linksherzinsuffizienz der Maus.
Nieren- und Hochdruckkrankheiten 36, 435.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG	7
1.1. Chronische Niereninsuffizienz.....	7
1.2. Kardiovaskuläre Erkrankungen bei Urämie	8
1.3. 5/6-Nephrektomie als Modell der chronischen Niereninsuffizienz.....	9
1.4. Der Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib	9
1.5. Zielsetzung der Arbeit	11
2. VERSUCHSTIERE, MATERIAL UND METHODEN	12
2.1. Versuchstiere	12
2.2. Material	12
2.2.1. Instrumente und Geräte	12
2.2.2. Medikamente und Substanzen	14
2.3. Methoden.....	15
2.3.1. Untersuchungsablauf	15
2.3.2. Operationsmethoden.....	16
2.3.2.1. Genehmigung der Tierversuche	16
2.3.2.2. 5/6-Nephrektomie.....	16
2.3.2.3. Schein-Operation	19
2.3.3. Applikation von Imatinib	20
2.3.4. Bestimmung der Körpermasse	20
2.3.5. Uringewinnung	20
2.3.6. Serum- und Organentnahme.....	21
2.3.7. Bestimmung der Harnstoffkonzentration in Urin und Serum	21
2.3.8. Bestimmung der Kreatininkonzentration in Urin und Serum.....	22
2.3.9. Gefäßfunktionsmessung	22
2.3.9.1. Prinzip des Mulvany-Myographen.....	22
2.3.9.2. Gefäßpräparation	23

2.3.9.3.	Normalisation	24
2.3.9.4.	Versuchsdurchführung	25
2.3.10.	Bestimmung der β -Rezeptorendichte im Herz	28
2.3.10.1.	Prinzip der β -Rezeptorenbestimmung	28
2.3.10.2.	Herzpräparation.....	28
2.3.10.3.	Radioligandenbindung.....	29
2.3.11.	Echokardiografie der Herzen.....	29
2.3.11.1.	Praktisches Vorgehen	29
2.3.11.2.	Bestimmung der Herzfunktionsparameter.....	30
2.3.12.	Lipidperoxidation im Herz.....	32
2.3.12.1.	Prinzip	32
2.3.12.2.	Versuchsdurchführung	32
2.3.13.	Histologie	33
2.3.13.1.	Anfertigung der Gewebeschnitte	33
2.3.13.2.	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	34
2.3.13.3.	Siriusrot-Färbung.....	34
2.3.13.4.	Bestimmung der Kardiomyozytengröße.....	35
2.3.13.5.	Bestimmung der Fibrosedichte	35
2.3.14.	Statistische Methoden.....	36
3.	ERGEBNISSE	37
3.1.	Entwicklung der Körpermasse.....	37
3.2.	Laborparameter.....	38
3.3.	Organgewichte.....	40
3.4.	Gefäßfunktionsmessung	42
3.4.1.	Kontraktionsfähigkeit der Gefäße	42
3.4.2.	Endothelabhängige Relaxationsfähigkeit der Gefäße.....	43
3.4.3.	Endothelunabhängige Relaxationsfähigkeit der Gefäße.....	46

3.5.	β -Rezeptorendichte im Herz.....	48
3.6.	Echokardiografie-Ergebnisse	49
3.6.1.	Endsystolisches Volumen.....	49
3.6.2.	Enddiastolisches Volumen	50
3.6.3.	Schlagvolumen.....	51
3.6.4.	Ejektionsfraktion.....	52
3.6.5.	Verkürzungsfraktion	53
3.6.6.	Dicke der Vorderwand.....	54
3.6.7.	Dicke der Hinterwand.....	55
3.7.	Lipidperoxidation im Herz.....	56
3.8.	Histologische Auswertungen	57
3.8.1.	Kardiomyozytengröße	57
3.8.2.	Fibrosedichte.....	58
4.	DISKUSSION	61
4.1.	Merkmale der chronischen Niereninsuffizienz nach 5/6-Nephrektomie im Mausmodell.....	61
4.2.	Veränderungen im kardiovaskulären System der Maus bei chronischer Niereninsuffizienz.....	65
4.3.	Wirkung von Imatinib auf strukturelle und funktionelle Veränderungen nach 5/6-Nephrektomie.....	71
5.	ZUSAMMENFASSUNG	74
6.	LITERATURVERZEICHNIS	75
7.	VERZEICHNISSE	83
7.1.	Abbildungsverzeichnis.....	83
7.2.	Tabellenverzeichnis	85
7.3.	Abkürzungsverzeichnis	86
8.	ANHANG.....	87
8.1.	Danksagungen.....	87
8.2.	Lebenslauf	88

1. EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG

1.1. Chronische Niereninsuffizienz

Die chronische Niereninsuffizienz ist ein weltweites Gesundheitsproblem mit steigender Prävalenz und Inzidenz (Meisinger, 2006). Die Prävalenz der terminalen Niereninsuffizienz stieg in Deutschland von 1995 bis 2005 von 674 auf 1057 Fälle pro Millionen Einwohner, die Inzidenz der terminalen Niereninsuffizienz im gleichen Zeitraum von 145 auf 203 Fälle pro Millionen Einwohner pro Jahr (Frei, „Quasi-Niere-Bericht 2005/2006“).

Es ist eine dauerhafte Erkrankung, die durch eine Einschränkung aller Nierenfunktionen, exkretorisch und inkretorisch, gekennzeichnet ist. Die häufigste Ursache für eine terminale Niereninsuffizienz ist der Diabetes mellitus (Frei, „Quasi-Niere-Bericht 2005/2006“). Des Weiteren können viele andere Erkrankungen eine chronische Niereninsuffizienz hervorrufen. Dazu gehören glomeruläre, tubulointerstielle und vaskuläre Nierenerkrankungen und Systemerkrankungen wie Hypertonie, Autoimmunerkrankungen, systemische Infektionen, Steine und Infektionen des Urogenitaltrakts und Intoxikationen.

Die Einteilung der chronischen Niereninsuffizienz erfolgt in fünf Stadien anhand der glomerulären Filtrationsrate (GFR). Die chronische Niereninsuffizienz ist oft durch eine fortlaufende Abnahme der GFR und damit durch eine Progredienz der Krankheit gekennzeichnet. Bluthochdruck und Proteinurie, schlechte Einstellung eines Diabetes mellitus und Rauchen sind verantwortlich für schnelles Fortschreiten der Niereninsuffizienz (Levey, 2003).

Betroffen ist nicht nur die Niere, sondern die Urämie führt zu weiteren Störungen in verschiedenen Organsystemen, so im endokrinen, neurologischen, hämatologischen und vor allem im kardiovaskulären System.

Die im kardiovaskulären System auftretenden Veränderungen sind Teil des „Kardiorenenalen Syndroms“ (CRS). Nach Ronco (2008) werden 5 verschiedene Typen des CRS unterschieden. Typ 1 und Typ 2 beschreiben eine Verschlechterung der Nierenfunktion infolge akuter (Typ 1) bzw. chronischer (Typ 2) Herzinsuffizienz. Typ 3

und Typ 4 beschreiben Herzerkrankungen infolge akutem (Typ 3) bzw. chronischem (Typ 4) Nierenversagen. Das CRS Typ 5 umfaßt Herz- und Nierenerkrankungen als Folge einer Systemerkrankung, zum Beispiel einer Sepsis. In dieser Arbeit wurde ein Modell eines Kardioresalen Syndroms Typ 4 untersucht.

1.2. Kardiovaskuläre Erkrankungen bei Urämie

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind ein großes Problem der Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz. Sie stellen mit etwa 50 % die häufigsten Todesursachen bei terminal niereninsuffizienten Patienten dar. Im Jahr 2005 hatten kardiale Erkrankungen einen Anteil von 41 %, vaskuläre Erkrankungen einen Anteil von 12,1 % an den Ursachen aller Todesfälle von niereninsuffizienten Patienten in Deutschland (Frei, „Quasi-Niere-Bericht 2005/2006“). Das Risiko an einer Herzerkrankung zu versterben ist für urämische Patienten gegenüber der Normalbevölkerung gleichen Alters um das 10- bis 20-fache erhöht (Foley, 1998). Dialysepatienten, die jünger als 45 Jahre alt sind, haben sogar ein um den Faktor 100 erhöhtes Risiko für plötzlichen Herztod im Vergleich zur Normalbevölkerung gleichen Alters (Himmelfarb, 2002).

Die Ursachen für das erhöhte Risiko bei einer Niereninsuffizienz an einer Herzerkrankung zu versterben beruhen auf verschiedenen Mechanismen: Arrhythmien, Koronararterienerkrankungen oder Kardiomyopathien (Goldsmith, 2001). Die urämische Kardiomyopathie ist charakterisiert durch linksventrikuläre Hypertrophie mit Kardiomyozytenvergrößerung bei gleichzeitig verminderter Kardiomyozytenzahl, diffuse interstitielle Fibrose (Tyralla, 2002) und erhöhten systemischen oxidativen Stress (Kennedy, 2006). Oxidativer Stress spielt eine Rolle in der Entwicklung einer kardialen interstitiellen Fibrose (Amann, 2003). Eine kardiale interstitielle Fibrose wiederum ist assoziiert mit einem gehäuften Auftreten von Arrhythmien (Tyralla, 2002). Somit gibt es verschiedene Zusammenhänge und Theorien zur Entwicklung der verschlechterten Herzfunktion, aber es ist noch nicht eindeutig geklärt, wie es genau dazu kommt.

1.3. 5/6-Nephrektomie als Modell der chronischen Niereninsuffizienz

Die 5/6-Nephrektomie ist ein Nierenreduktionsmodell, welches zu einer chronischen Niereninsuffizienz führt. Entwickelt wurde dieses Modell 1952 von Platt et al. Er wollte herausfinden, wie die durch eine chronische Niereninsuffizienz im menschlichen Körper entstehenden Veränderungen im Tiermodell durch Verminderung der Nephronezahl nachempfunden werden können. Dazu entfernte er bei Ratten zunächst den oberen und unteren Pol der linken Niere und 10 bis 14 Tage später die gesamte rechte Niere. Durch strukturelle und funktionelle Untersuchungen kam er zu dem Schluss, dass die Veränderungen, die durch das Nierenversagen im menschlichen Körper entstehen, auch in den Ratten, als Folge dieser Nierenreduktion, nachzuweisen waren. Damit stand ein Modell zur Verfügung, die Pathophysiologie der chronischen Niereninsuffizienz recht einfach zu untersuchen. Dies ist noch heute sehr wichtig, da man bei Patienten als Studienobjekte zur Erforschung der chronischen Niereninsuffizienz schnell an die Grenzen des Machbaren stößt.

Es wurden weitere Methoden zur Reduktion der Nierenmasse entwickelt. So sollte in einem Modell eine Niereninsuffizienz durch Gabe von nephrotoxischen Medikamenten hervorgerufen werden, in einem anderen Modell wurde die Nierenmasse durch Elektrokoagulation der Nierenoberfläche verkleinert. Am häufigsten genutzt werden aber Verfahren, die eine, wenigstens annähernde, Quantifizierung der entfernten Nierenmasse zulassen.

Das Tiermodell der 5/6 Nephrektomie, bei dem 2/3 der linken Nierenmasse entfernt werden und die rechte Niere vollständig entfernt wird, bildet die Grundlage für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen.

1.4. Der Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib

Imatinib (Gleevec[®], Fa. Novartis-Pharma, Schweiz; früher: STI571) ist ein selektiver Tyrosinkinase-Inhibitor. Tyrosinkinasen bilden zusammen mit den Serin-Threonin-Kinasen die große Gruppe der Proteinkinasen, die Teil von Signaltransduktionswegen sind und eine zentrale Rolle in verschiedenen biologischen Prozessen, wie Zellwachstum, Stoffwechsel, Differenzierung und Apoptose spielen. Tyrosinkinasen

binden ATP und übertragen Phosphatgruppen von ATP auf Tyrosinreste verschiedener Substrate. Imatinib inhibiert die strukturell ähnlichen Tyrosinkinasen ABL, PDGF-R, c-kit und andere durch kompetitive Verdrängung von ATP aus der Enzymbindung (Hochhaus, 2002). Chemisch handelt es sich um ein 2-Phenylaminopyrimidin-Derivat mit der Summenformel $C_{29}H_{31}N_7 \times CH_4O_3S$ und einem Molekulargewicht von 589,71 g/mol, dessen Strukturformel in Abbildung 1 zu sehen ist.

Entwickelt wurde Imatinib, mit dem Wirkstoff Imatinib-mesylat, von Druker und Mitarbeitern 1996 in Zusammenarbeit mit der Firma Novartis-Pharma AG, Schweiz. Es wurde nach einem Wirkstoff gesucht, der Tyrosinkinasen kompetitiv hemmt. Druker und seine Mitarbeiter konnten nachweisen, dass Imatinib-Mesylat das Wachstum von bcr-abl-positiven Zellen hemmt. Bcr-abl-positive Zellen spielen bei der chronisch myeloischen Leukämie (CML) eine große Rolle. Imatinib bindet die Tyrosinkinase-Domäne der bcr-abl-positiven Zellen und unterbindet ihre onkogene Aktivität. Imatinib wird zurzeit in der Therapie der CML und bei gastrointestinalen Tumoren erfolgreich eingesetzt.

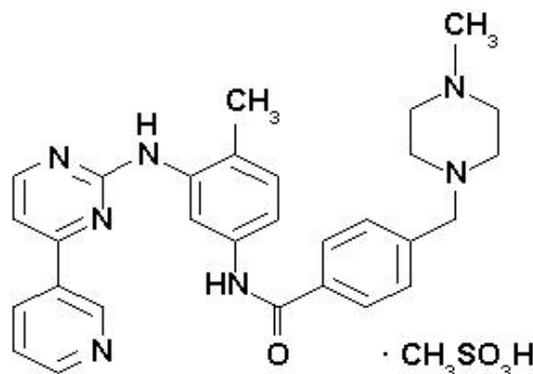


Abbildung 1: Strukturformel des 2-Phenylaminopyrimidin-Derivats Imatinib-Mesylat

Da festgestellt worden ist, dass es in Herzen bei Urämie zu einer Up-Regulation von spezifischen Wachstumsfaktoren wie PDGF und TGF kommt (Tyralla und Amann, 2002), wird in dieser Arbeit die Wirkung des Tyrosinkinase-Inhibitors Imatinib bei chronischer Niereninsuffizienz untersucht.

1.5. Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es in einem Mausmodell eines kardioresenalen Syndroms Typ 4 kardiovaskuläre und renale Veränderungen und die Wirkung des Tyrosinkinase-Inhibitors Imatinib auf diese Veränderungen zu untersuchen. Daraus ergaben sich folgende Fragen:

1. Welche Merkmale der chronischen Niereninsuffizienz können im Mausmodell nach 5/6-Nephrektomie nachgewiesen werden?
2. Welche Veränderungen im kardiovaskulären System der Maus treten bei chronischer Niereninsuffizienz auf?
3. Welchen Einfluss hat der Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib auf die durch 5/6-Nephrektomie entstandenen Veränderungen?

2. VERSUCHSTIERE, MATERIAL UND METHODEN

2.1. Versuchstiere

Die im Versuch verwendeten Tiere waren Mäuse vom Stamm Balb/c. Dieser Inzuchtstamm ist weit verbreitet und gehört zu den drei in der Versuchstierkunde am häufigsten benutzten Mäusestämmen. Bei den Mäusen handelte es sich um Albinos. Sie wurden bei Harlan Winkelmann geboren und aufgezogen. In den durchgeführten Versuchen wurden nur männliche Mäuse verwendet. Diese hatten zu Beginn der Studie ein Körpergewicht zwischen 24 und 28 g und ein Lebensalter von 2 Monaten. Sie wurden nach Lieferung in das Zentrale Tierlaboratorium während einer Eingewöhnung von 7 Tagen in Makrolonkäfigen Typ II in offener Haltung gehalten.

Als Nahrung diente in dem Untersuchungszeitraum pelletiertes Standard-Alleinfutter für Ratte/Maus/Hamster-Haltung namens 10 H 10. Das Futter stand uneingeschränkt zur Verfügung. Während des 24-stündigen Aufenthaltes im metabolischen Käfig wurden die Mäuse mit dem Haltungsfutter altromin 1321 versorgt. Wasser wurde ad libitum mittels Wasserflasche zugeführt.

In den Tierräumen herrschte eine konstante Temperatur von $20 \pm 0,5$ °C und eine Luftfeuchtigkeit von 55 ± 5 %. In den Tierräumen war von 7.00 bis 19.00 Uhr die Tagphase und entsprechend von 19.00 bis 7.00 Uhr die Nachtphase, eine Dämmerungsphase fehlte.

2.2. Material

2.2.1. Instrumente und Geräte

Instrumente und Geräte	Bezugsquelle
Arterienklemme, BH 105	Aesculap AG
Bulldog-Klemme, FB 328	Aesculap AG
Einmal-Skalpell, Japan No.15	Feather®
Elektrokauter, ICC Bipolar	Erbe Elektromedizin GmbH
Eppendorfgefäß, 1,5 ml	Eppendorf AG

Instrumente und Geräte	Bezugsquelle
Fadenschere, BC 324 R	Aesculap AG
Filter GF/C	Whatman GmbH
Fluoreszenz-Detektor	515 nm Anregungs- und 553 nm Emissionswellenlänge
Handschuhe, Safeskin Satin Plus	Kimberly Clark, Belgien
HPLC-Säule (4,6 x 100 mm)	Waters GmbH
Kanüle, 0,3 mm x 13 mm	BD Microlance, Irland
Klinische Chemie System: ADVIA 1650 Chemistry System	Bayer Vital GmbH
Korkplatte, 2 cm stark	unbekannt
Krankenunterlage	Noba Verbandsmittel, Danz GmbH & Co KG
Kühlvorrichtung	selbst erstellt aus Plastikbox mit Kühlflüssigkeit
Kühlzentrifuge, EBA 12 R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Metzenbaumschere, BC 601	Aesculap AG
Mikro-Federschere, OC 498 R	Aesculap AG
Mikro-Pinzette, RE 87	Weck, Solingen
Mikroskop zur OP, OPMI 1-FR	Carl Zeiss AG
Mikroskop zur Gefäßpräparation, Nr. 110103	Carl Zeiss AG
Mikroskop zur histologischen Auswertung, DFC 280	Leica, Tokyo, Japan
Mullkompressen, 10 x 12,5 cm	Noba Verbandsmittel Danz GmbH & Co KG
Mulvany-Aufnahmegerät LinearCorder WR 3310	GraphTec Corporation, Japan
Mulvany-Myograph: AutoDualWire Myograph System, 510A	Danish Myo Technology A/S, Aarhus, Denmark
Nahtmaterial zur Ligatur Polyester, geflochten, 6-0	Resorba Wundversorgung GmbH, Nürnberg
Nahtmaterial zum Wundverschluss, Polyglykolsäure, 5-0	Resorba Wundversorgung GmbH, Nürnberg
Pinzette des Kauters GK 690 R	Aesculap AG
Serumröhrchen Serum-Gel S1, 1,3 ml	Sarstedt AG und Co, Nümbrecht
Spritze, 1 ml	Terumo, Belgien
Stoffwechsellkäfig	UNO Roestvaststaal BV, Zevenaar, Holland
Ultraschallgerät Sonos 5500 Ultraschall-System	Hewlett Packard Company
Ultraschallkopf, 15-6L	Hewlett Packard Company
Waagen, SAC51 und SBC21	Scaltec Instruments GmbH
Wundspreizer	Eigenbau aus Büroklammer, Gummiring und Heftzwecke

Tabelle 1: Instrumente und Geräte

2.2.2. Medikamente und Substanzen

Medikamente und Substanzen	Bezugsquelle
CaCl ₂	AppliChem GmbH, Darmstadt
Carbachol	Sigma-Aldrich®
Desinfektionsmittel Spitacid	Ecolab, Düsseldorf
EDTA	Merck KGaA, Darmstadt
Eosin	Waldeck GmbH & Co Division Chroma, Münster
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Glucose	Merck KGaA, Darmstadt
Hämalaun	Merck KGaA, Darmstadt
Hämatoxylin	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Imatinib	Novartis Deutschland GmbH
Isofluran	Isofluran Curamed, Karlsruhe
Isoprenalin	Sigma-Aldrich®
KCl	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ketamin	Ceva GmbH, Düsseldorf
KH ₂ PO ₄	Merck KGaA, Darmstadt
Methanol (30%)	Merck KGaA, Darmstadt
MgSO ₄	Merck KGaA, Darmstadt
NaCl	AppliChem GmbH, Darmstadt
NaCl 0,9 %	Fresenius Kabi Deutschland GmbH
NaHCO ₃	AppliChem GmbH, Darmstadt
Nitroprussid-Natrium	Sigma-Aldrich®
Noradrenalin	Sigma-Aldrich®
Phenylephrin	Sigma-Aldrich®
Picro-Siriusrot	Waldeck GmbH & Co Division Chroma, Münster
Thiobarbitursäure (0,6%)	Sigma-Aldrich®
Trichloressigsäure (10%)	Sigma-Aldrich®
Xylazin	Ceva GmbH, Düsseldorf
Xylol	Sigma-Aldrich®

Tabelle 2: Medikamente und Substanzen

2.3. Methoden

2.3.1. Untersuchungsablauf

Der Untersuchungsablauf gliederte sich in zwei Versuchsteile. Teil A hatte eine Gesamtversuchsdauer von 8 Wochen, Teil B hatte eine Gesamtversuchsdauer von 24 Wochen.

Teil A bestand aus 4 Hauptgruppen, Teil B bestand aus 3 Hauptgruppen. In der ersten Hauptgruppe waren 5/6-nephrektomierte Mäuse (5/6), in der zweiten Hauptgruppe waren ebenfalls 5/6-nephrektomierte Mäuse, diesmal zusätzlich mit Imatinib-Gabe (5/6+I). In der dritten Hauptgruppe waren schein-operierte Mäuse (Schein-OP) und in der vierten Hauptgruppe (nur Teil A) waren ebenfalls schein-operierte Mäuse, diesmal zusätzlich mit Imatinib-Gabe (Schein-OP+I). Teil B untergliederte jede seiner Hauptgruppen zusätzlich in zwei Untergruppen (s. Abb. 3). Die Untergruppen unterschieden sich im Zeitpunkt des Versuchsendes nämlich entweder acht oder 24 Wochen nach der Operation. Bei Teil A endeten alle Versuche acht Wochen nach der Operation.

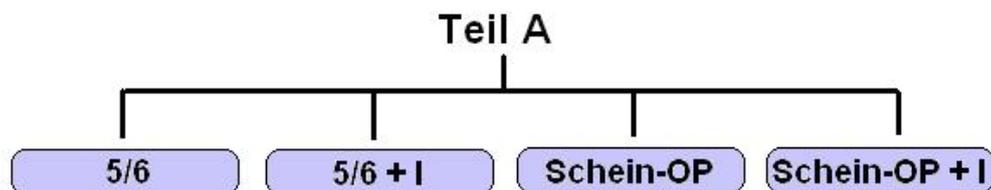


Abbildung 2: Aufbau Versuchsteil A

Teil A sah nach Ablauf der Gesamtversuchsdauer von acht Wochen folgende Untersuchungen vor: Gefäßfunktionsmessung und Bestimmung der β -Rezeptorendichte im Herzen. Teil B sah nach Ablauf der Versuchsdauer von acht oder 24 Wochen folgende Untersuchungen vor: Echokardiografie der Herzen in vivo, Messung der Lipidperoxidation im Herz, Bestimmung der Kardiomyozytengröße und der Fibrosedichte im Herz. Bestimmung von Körpergewicht, Laborparameter und Organengewichte wurden sowohl im Versuchsteil A als auch im Versuchsteil B durchgeführt.

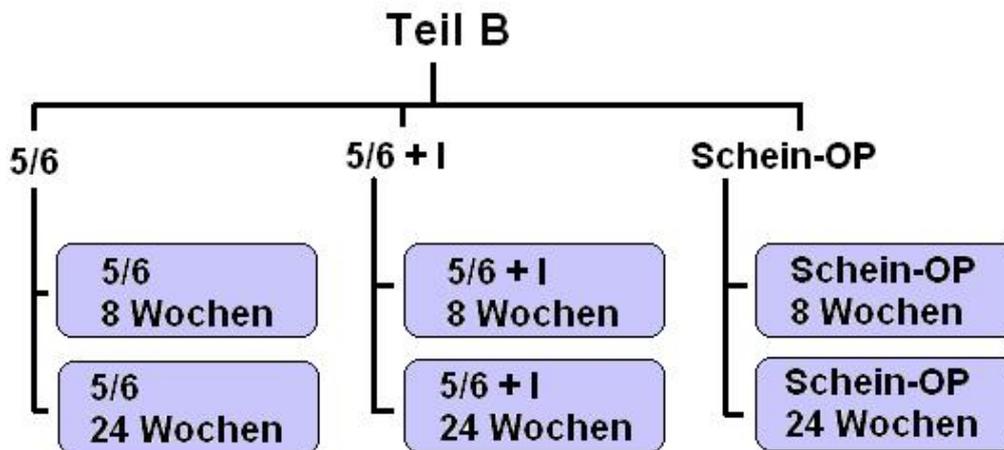


Abbildung 3: Aufbau Versuchsteil B

2.3.2. Operationsmethoden

2.3.2.1. Genehmigung der Tierversuche

Alle Versuche wurden im Zentralen Tierlaboratorium im Institutsgebäude-I des Universitätsklinikums Essen entsprechend einer Genehmigung nach § 8 Absatz 1 des Tierschutzgesetzes (Bezirksregierung Düsseldorf, Aktenzeichen: 50.05-230-69/04, Genehmigung: G-784/04 und Aktenzeichen: 50.05-230-101/05, Genehmigung G-856/05) durchgeführt.

2.3.2.2. 5/6-Nephrektomie

Für die 5/6-Nephrektomie wurde zur Narkose eine Mischung aus Narkosepräparaten und isotoner Kochsalzlösung vorbereitet (Xylazin 2 % 0,5 ml, Ketamin 10 % 1,0 ml, NaCl 0,9 % 13,5 ml). Von dieser Mischung wurden 0,15 ml pro 10 g Körpermasse und Maus intraperitoneal verabreicht, bei Bedarf bekam die Maus zusätzlich für kurze Zeit Isofluran über eine Maske.

Die Operation orientierte sich an der von Platt et al. (1952) beschriebenen Methode. Beidseitig wurde die Flankengegend der Maus geschoren und anschließend mit Desinfektionsmittel befeuchtet. Die Operation wurde in Bauchlage durchgeführt, die Maus lag auf einer saugfähigen Unterlage, unter der sich eine Korkplatte zum

Aufspannen der Körperhöhle befand. Die Maus wurde nicht weiter fixiert. Die Zunge wurde seitlich aus dem Maul gezogen, damit die Atemwege frei blieben.

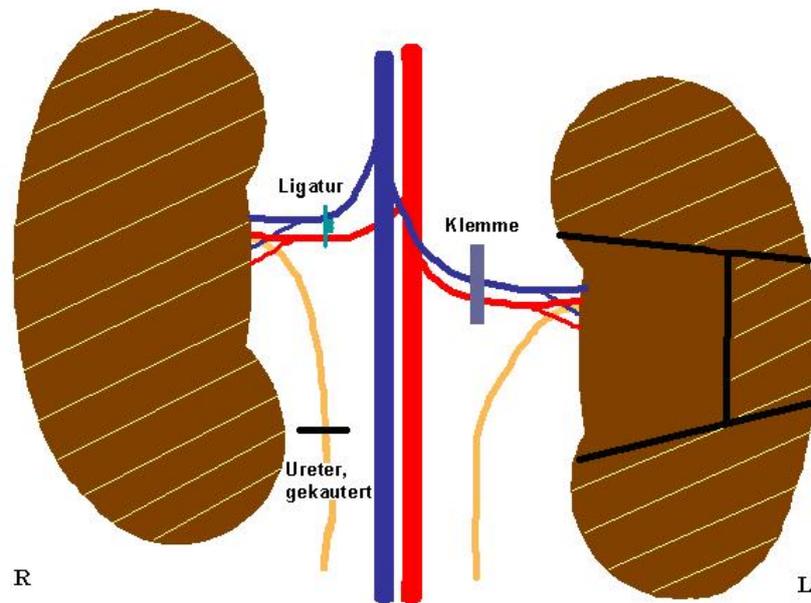


Abbildung 4: Schematische Darstellung der 5/6 Nephrektomie modifiziert nach Platt et al. Die schraffierte Nierenmasse wird chirurgisch unter dem Operationsmikroskop entfernt.

Es wurden 5/6 der Nierenmasse entfernt, schematisch dargestellt in Abbildung 4. Von der linken Niere der Maus wurden 2/3 entfernt (Abb. 5), die rechte Niere wurde vollständig entnommen. Zu Beginn wurde ein Hautschnitt in der linken Flankengegend gemacht, wobei größere Gefäße gekautert wurden, um den Blutverlust der Maus möglichst gering zu halten. Dann wurde die Muskulatur durchtrennt, so dass damit die Bauchhöhle der Maus eröffnet wurde. Mit zwei Wundspreizern wurde die Bauchhöhle aufgehalten. Dadurch entstand ein übersichtliches Operationsfeld.

Alle weiteren Operationsschritte erfolgten unter zu Hilfenahme eines Operationsmikroskops. Das retroperitoneale Fett und die Nierenkapsel wurden von der Niere getrennt, indem beides nach dorsal weg präpariert wurde. Der Urether wurde vorsichtig frei präpariert, ebenso der vordere und der hintere Nierenpol, dies ermöglichte später das Vorlagern des Organs. Arteria und Vena renalis wurden auf einer Länge von etwa 2-3 mm freigelegt (Abb. 4).



Abbildung 5: 5/6-Nephrektomie

Zu sehen ist die linke Niere der Maus vor (linkes Bild) und nach (rechtes Bild) Entfernung von 2/3 der Nierenmasse.

Die Gefäße wurden mit der Bulldogklemme abgeklemmt, so dass es bei den anschließenden Schnitfführungen nicht zu starken Blutungen kommen konnte. Jeweils etwa 1/3 von vorderem und hinterem Nierenpol sowie vom Rindenteil gegenüber dem Hilus wurden mit dem Skalpell entfernt (H-förmiger Schnitt) (Abb. 4). Das Nierenbecken durfte dabei nicht eröffnet werden.

Die Bulldogklemme wurde für zwei Sekunden geöffnet, so dass sich die entstandenen Schnittflächen mit Blut füllen und die Blutgerinnung einsetzen konnte. Die Ischämie des beschnittenen Organs wurde für fünf Minuten aufrecht gehalten. Diese Zeit reichte aus, um eine Gerinnung an den Schnittflächen zu gewährleisten und Nachblutungen zu verhindern. Muskulatur und Haut wurden in einem Schritt mit einer Naht verschlossen, es wurde resorbierbares Nahtmaterial verwendet.

Nachfolgend wurde die rechte Niere entfernt. Die Schnitfführung erfolgte wie auf der linken Seite, möglichst mit einem etwas kürzeren Hautschnitt. Bei Bedarf wurden Gefäße gekautert, um den Blutverlust möglichst gering zu halten. Der Ureter wurde freigelegt und mittels Elektrokauter verschlossen. Die Nierengefäße wurden freigelegt. Ein nicht resorbierbarer Faden wurde unter den Gefäßen durchgezogen und mit 3fachem chirurgischem Knoten verschlossen, so dass die Gefäße ligiert waren (Abb. 4). Dann konnte die rechte Niere entfernt werden. In gleicher Weise wie auf der linken Seite wurden Muskulatur und Haut verschlossen.

Um den Blutverlust auszugleichen wurde den Mäusen 1 ml 0,9 % NaCl subkutan gegeben. Für 30 bis 60 Minuten wurden die Käfige der Mäuse auf einer Wärmeplatte bei etwa 33 °C stehen gelassen, um eine Auskühlung der Mäuse zu verhindern.

2.3.2.3. **Schein-Operation**

Zur Narkose für die Schein-Operation wurde wie für die 5/6-Nephrektomie eine Mischung aus Narkosepräparaten und isotoner Kochsalzlösung vorbereitet (Xylazin 2 % 0,5 ml, Ketamin 10 % 1,0 ml, NaCl 0,9 % 13,5 ml). Von dieser Mischung wurden 0,15 ml pro 10 g Körpermasse und Maus intraperitoneal verabreicht, bei Bedarf bekam die Maus zusätzlich für kurze Zeit Isofluran über eine Maske.

Für die Schein-Operation wurde bei den Mäusen unter Narkose eine Inzision und anschließende Naht beidseits in der Flankengegend durchgeführt.

Die linke und rechte Flankengegend der Maus wurde geschoren und anschließend mit Desinfektionsmittel befeuchtet. Die Operation wurde in Bauchlage durchgeführt, die Maus lag auf einer saugfähigen Unterlage, unter der sich eine Korkplatte zum Aufspannen der Körperhöhle befand. Die Maus wurde nicht weiter fixiert. Die Zunge wurde mit einer Pinzette seitlich aus dem Maul gezogen, damit die Atemwege frei blieben.

Ein Hautschnitt wurde in der linken Flankengegend durchgeführt, wobei größere Gefäße gekautert wurden um den Blutverlust der Maus möglichst gering zu halten. Dann wurde die Muskulatur durchschnitten, so dass damit die Bauchhöhle eröffnet wurde. Muskulatur und Haut wurden gemeinsam mit einer einfachen, fortlaufenden Naht verschlossen, es wurde resorbierbares Nahtmaterial verwendet. Der gesamte Vorgang wurde anschließend in der rechten Flankengegend wiederholt.

Um den Blutverlust auszugleichen wurde den Mäusen 0,5 ml 0,9 % NaCl subkutan gegeben. Für 30 bis 60 Minuten wurden die Käfige der Mäuse auf einer Wärmeplatte bei etwa 33 °C gestellt, um eine Auskühlung der Mäuse während der Aufwachphase zu verhindern.

2.3.3. Applikation von Imatinib

Imatinib, Handelsname Gleevec® (Novartis Pharma, Schweiz), wurde mit einer Dosis von 10 mg/kg KG/d im Trinkwasser gelöst oral appliziert. Als Trinkwasser diente destilliertes Wasser. In einem Vorversuch war festgestellt worden, dass Imatinib in destilliertem Wasser gut in Lösung geht, sich aber nur schlecht in Leitungswasser löst.

In einem weiteren Vorversuch wurde die tägliche Wasseraufnahmemenge der 5/6-nephrektomierten Mäuse und der schein-operierten Mäuse bestimmt. Während des Hauptversuchs wurden die Mäuse wöchentlich gewogen. Entsprechend dieser Werte (durchschnittliche tägliche Wasseraufnahmemenge und aktuelles Körpergewicht) wurde für jede Maus Imatinib im Trinkwasser so konzentriert, dass es zur gewünschten Aufnahmemenge von 10 mg/kg KG/d kam.

Die Imatinib-Gabe begann am Tag der Operation (5/6-Nephrektomie oder Schein-OP) und endete am Tag der Organentnahme nach 8 oder 24 Wochen, je nach Versuchsgruppe.

2.3.4. Bestimmung der Körpermasse

Die Mäuse wurden am Tag der Operation und dann jeweils einmal pro Woche gewogen, bis zum Versuchende nach 8 oder 24 Wochen. Dazu wurden die Mäuse einzeln in eine sich auf der Waage befindenden Pappschachtel gesetzt. Das Gewicht wurde in Gramm (g) angegeben.

2.3.5. Uringewinnung

Nach Ablauf von 8 und 24 Wochen wurde von jeder Maus Urin gewonnen. Dazu wurden die Mäuse für 24 Stunden in Einzeltierstoffwechselkäfige der Firma UNO gesetzt. Während der gesamten Sammelperiode wurde der in einem Plastikgefäß aufgefangene Urin mittels einer Kühlvorrichtung auf 4 °C Temperatur gehalten, um einen bakteriell bedingten Proteinabbau und Verdunstung zu minimieren. Zudem wurde das Gefäß vor Licht geschützt.

Das Sammelgefäß wurde zu Beginn und nach Ablauf der 24 Stunden gewogen und die Gewichts Differenz als Urinmenge in ml angegeben.

2.3.6. Serum- und Organentnahme

Die Narkose zur Serum- und Organentnahme wurde mit Enfluran durchgeführt. Dazu wurden die Mäuse in einen Glasbehälter gesetzt, der gasförmiges Enfluran enthielt.

Zur Serumentnahme wurden die narkotisierten Mäuse auf dem Rücken liegend auf einer Unterlage fixiert. Zunächst wurde ein Hautschnitt im Bereich der Linea alba vom Becken bis zum Hals der Maus gesetzt und der Brustkorb und der Bauchraum eröffnet. Anschließend wurde die Vena cava freipräpariert und aus dieser mithilfe einer Kanüle und einer Spritze Blut entnommen. Das Blut wurde sofort in ein Serumröhrchen der Firma Sarstedt, Nümbrecht gegeben. Die Serumröhrchen wurden für 10 Minuten bei 2000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, dann das Serum mit einer Pipette abgenommen, in ein Eppendorf-Gefäß überführt und bei -20 °C bis zur weiteren Untersuchung gelagert. Anschließend folgte die Organentnahme.

Es wurden das Herz, die Lunge und die Niere (5/6-nephrektomierte Mäuse) beziehungsweise die Nieren (schein-operierte Mäuse) entnommen. Die Organe wurden von umliegendem Gewebe befreit, gewogen und anschließend in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Außerdem wurde ein Teil des Dünndarms zusammen mit den ihn versorgenden Gefäßen entnommen. Dies wurde in ein mit gekühltem Krebs-Henseleit-Puffer (Zusammensetzung siehe Tabelle 3) gefülltes Becherglas gegeben und sofort zur Gefäßfunktionsmessung verwendet.

2.3.7. Bestimmung der Harnstoffkonzentration in Urin und Serum

Die Parameter Urin-Harnstoff und Serum-Harnstoff-N (BUN, Blood-Urea-Nitrogen) wurden in einem Urease-abhängigen Verfahren bestimmt. Harnstoff wird durch Urease in Ammoniak und Kohlendioxid abgebaut. Ammoniak ergibt mit Phenol und Hypochlorid bei Anwesenheit von Natriumnitroprussid eine blaue Farbe, deren Intensität der Konzentration von Ammoniak und damit dem Harnstoff proportional ist. Diese blaue Farbe wird photometrisch gemessen. Die Urinproben wurden mit dem ADVIA 1650 Chemistry System der Firma Bayer gemessen.

Da 1 Mol Harnstoff zwei Atome Stickstoff enthält, ergibt sich folgende Umrechnungsformel:

Urin-Harnstoff-N [mg/dl] x 2,14 = Urin-Harnstoff [mg/dl]

bzw.

Serum-Harnstoff-N [mg/dl] x 2,14 = Serum-Harnstoff [mg/dl].

2.3.8. Bestimmung der Kreatininkonzentration in Urin und Serum

Die Kreatininbestimmung erfolgte mit der Methode nach Jaffé. Dabei bildet Kreatinin mit Pikrinsäure einen roten Komplex, dessen Konzentration photometrisch bei einer Wellenlänge von 546 nm gemessen wird. Diese von Jaffé entwickelte Methode ist unempfindlich, jedoch auch wenig spezifisch. Die Urinproben und Serumproben wurden mit dem ADVIA 1650 Chemistry System der Firma Bayer gemessen. Die Ergebnisse wurden mit der Einheit mg/dl angegeben.

2.3.9. Gefäßfunktionsmessung

Die Gefäßfunktion von Mesenterialarterien wurde mit dem Mulvany-Myographen (Auto Dual Wire Myograph System, 510A, Danish Myo Technology A/S, Aarhus, Dänemark) gemessen.

2.3.9.1. Prinzip des Mulvany-Myographen

Der Mulvany-Myograph wurde von M.J. Mulvany und W. Halpern entwickelt (Mulvany et al, 1977). Er dient zur Messung der mechanischen kontraktilen und relaxierenden Eigenschaften von isolierten kleinen Gefäßen (60 µm bis 3 mm).

Das Prinzip des Myographen beruht auf einer Bestimmung des vom isolierten Gefäß erzeugten effektiven transmuralen Drucks (p). Dieser wird bestimmt durch gleichzeitige Messung von Kraft und Abstand. Dazu werden zwei dünne Drähte durch ein isoliertes Gefäß geschoben. Ein Draht wird mit einem Kraftaufnehmer verbunden, der andere mit einem Abstandsmesser. Durch Messung der Kraft, die durch Kontraktion des Gefäßes auf die Drähte ausgeübt wird, kann die Wandspannung (T) bestimmt werden: $T = F/2g_1$ wobei F die vom Kraftaufnehmer registrierte Kraft ist und g_1 die Gefäßsegmentlänge. Durch Messung des Abstands zwischen den beiden Drähten

kann der Gefäßinnendurchmesser (l) berechnet werden: $l = [(\pi+2)d + 2f_1] / \pi$ wobei d für die Drahtdicke steht und f_1 für den Abstand zwischen den beiden Drähten. Der transmurale Druck p berechnet sich daraus wie folgt: $p = 2\pi T / [(\pi+2)d + 2f_1]$.

Durch Zugabe von Substanzen, die das Gefäß kontrahieren oder relaxieren lassen, können die Kontraktions- und Relaxationsfähigkeit von kleinen Gefäßen *in vitro*, durch Messung des transmuralen Drucks p , bestimmt werden.

Für die Messungen stand ein automatisierter Myograph (Auto Dual Wire Myograph System, 510A, Danish Myo Technology A/S, Aarhus, Dänemark) zur Verfügung.

2.3.9.2. Gefäßpräparation

Ein Teil des Dünndarms wurde zusammen mit den ihn versorgenden Gefäßen der Maus entnommen. Dies wurde in eine mit Sylgaard beschichtete und Krebs-Henseleit-Puffer gefüllte Petrischale gegeben. Der Krebs-Henseleit-Puffer wurde vorher und im folgenden Verlauf dauerhaft mit 95 % O₂ und 5 % CO₂ begast, um einen pH-Wert von 7,4 aufrecht zu halten. Die Zusammensetzung des Krebs-Henseleit-Puffers findet sich in Tabelle 3. Der Darm wurde am Rand der Petrischale mit Stecknadeln kreisförmig festgesteckt, so dass die Gefäße in die Mitte der Petrischale führten. Zwei Mesenterialarterien 2. Ordnung wurden mit Hilfe eines Lichtmikroskops separiert und von umliegendem Fettgewebe befreit. Jeder Versuch fand in Doppelbestimmung statt. Darum wurden jeweils zwei Arterien einer Maus zur Untersuchung entnommen.

Ein Draht von 40 µm Dicke wurde durch die Gefäße geschoben. Dies geschah ohne Berührung des Endothels, um dieses nicht zu schädigen. Die Gefäße wurden auf eine Länge von 2 mm gekürzt und anschließend in die mit Krebs-Henseleit-Puffer gefüllte Kammer des Myographen eingespannt. Dazu wurde ein zweiter Draht (40 µm dick) durch die Gefäße geführt. Ein Draht wurde mit dem Abstandsmesser des Myographen verbunden, der andere Draht mit dem Kraftaufnehmer des Myographen. Beide Arterien einer Maus befanden sich in derselben mit Krebs-Henseleit-Puffer gefüllten Kammer des Myographen.

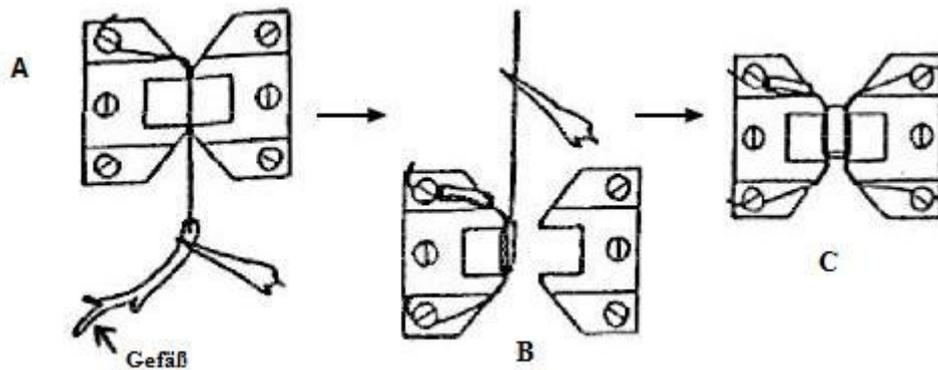


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Gefäßeinspannens in den Myographen

Ein Draht wird durch das Gefäß geschoben und mit dem linken Arm des Myographen verbunden (A), anschließend das Gefäß auf 2 mm gekürzt. Ein zweiter Draht wird durch das Gefäß geschoben (B) und mit dem anderen Arm des Myographen verbunden, so dass das Gefäß nun zwischen den beiden Armen des Myographen auf zwei Drähten aufgespannt ist (C). (Quelle: „Procedures for investigation of small vessels using small vessel myograph“, M.J. Mulvany, Dec 1988 / Mai 1990)

2.3.9.3. Normalisation

Um die Messergebnisse verschiedener Gefäße miteinander vergleichen zu können, mußten alle Gefäße vor Versuchsbeginn in eine definierte Vorspannung gebracht werden ($L_1 = 0,9 * L_{100}$; wobei L_1 der innere Umfang des Gefäßes bei definierter Vorspannung ist und L_{100} der innere Umfang des Gefäßes bei einem transmuralen Druck von 100 mmHg). Die Normalisation diente der Bestimmung dieses Wertes L_1 .

Zunächst mußte L_{100} bestimmt werden. L_{100} ist definiert als der innere Umfang des relaxierten Gefäßes bei einem transmuralen Druck von 100 mmHg. Dazu wurde das Gefäß im Krebs-Henseleit-Puffer-Bad relaxiert gehalten und in Schritten immer weiter passiv gedehnt. Nach jedem Schritt i wurde die Wandspannung (T_i) und der innere Umfang (L_i) bestimmt. Daraus konnte der effektive transmurale Druck (p_i) bei jedem Schritt bestimmt werden. Wenn der effektive transmurale Druck 100 mmHg überstiegen hatte, wurde der Vorgang gestoppt. Die Werte ergaben aufgetragen in ein Diagramm eine exponentielle Kurve. An der Kurve konnte nun L_{100} abgelesen werden. Der gesamte Vorgang wurde von dem Gerät automatisch durchgeführt. Dann konnte

L_1 bestimmt werden: $L_1 = 0,9 * L_{100}$. Zu Beginn des Versuches wurden die Gefäße auf L_1 vorgespannt.

Substanz	Konzentration	Bezugsquelle
NaCl	119 mM	AppliChem
KCl	4,7 mM	AppliChem
MgSO ₄	1,17 mM	Merck
NaHCO ₃	25 mM	AppliChem
KH ₂ PO ₄	1,18 mM	Merck
EDTA	0,027 mM	Merck
Glucose	5,5 mM	Merck
CaCl ₂	2,5 mM	AppliChem

**Tabelle 3: Zusammensetzung des Krebs-Henseleit-Puffers
Begasung mit 95 % O₂ und 5 % CO₂, pH-Wert 7,4**

2.3.9.4. Versuchsdurchführung

Kontraktions- und Relaxationsfähigkeit der Gefäße konnten in mehreren Schritten durch Zugabe verschiedener Substanzen bestimmt werden. Nach Zugabe einer Substanz wurde jeweils gewartet, bis es zu einem Plateau kam, d.h. keine weitere Zunahme der Kontraktion bzw. Relaxation, bevor der Wert abgelesen wurde. Im Folgenden sind die einzelnen Schritte zur Messung der Kontraktions- und Relaxationsfähigkeit beschrieben.

Die 100 % Kontraktionsfähigkeit der Gefäße wurde bestimmt durch Zugabe von KCl in einer Konzentration von 120 mM zum Organbad. Es kam zur Vasokonstriktion, die als 100 % Kontraktionsfähigkeit der Gefäße definiert wurde (Leineweber et al, 2006). Anschließend wurde das KCl durch dreimaliges Wechseln des Puffers in 5 min-Abständen aus dem Organbad entfernt. Das Gefäß relaxierte wieder.

Eine mögliche Schädigung des Gefäßendothels, entstanden durch Gefäßpräparation, wurde durch Zugabe von Noradrenalin und Carbachol ausgeschlossen. Dazu wurde zunächst Noradrenalin in einer Konzentration von 10^{-5} M zum Organbad gegeben. Es kam zur Vasokonstriktion. Carbachol in einer Konzentration von 10^{-4} M wurde

anschließend zum Organbad gegeben. Es kam zur Vasorelaxation. Wenn das Gefäß nach Zugabe von Carbachol nicht mindestens um 30 % relaxierte, wurde der Versuch mit diesem Gefäß abgebrochen, da eine Schädigung des Gefäßendothels vorlag. Hatte eine mindestens 30 %ige Relaxation stattgefunden, wurde Noradrenalin und Carbachol durch dreimaliges Wechseln des Puffers in 5 min-Abständen aus dem Organbad entfernt und der Versuch konnte mit diesem Gefäß fortgesetzt werden.

KCl (120 mM) und Noradrenalin (10^{-5} M) wurden zum Organbad gegeben. Es kam zur Vasokonstriktion. KCl und Noradrenalin wurden durch dreimaliges Wechseln des Puffers in 5 min-Abständen aus dem Organbad entfernt.

Die Kontraktionsfähigkeit der Gefäße wurde durch Zugabe von Phenylephrin zum Organbad in aufsteigenden Konzentrationen gemessen. Phenylephrin ist ein direktes α -Sympathomimetikum und führt zur muskulären Kontraktion von Gefäßen. Da es auch einen hier unerwünschten unspezifischen β_2 -mimetischen Effekt haben kann, wurde der Puffer im Organbad, zur Verhinderung dieser Wirkung, vor Zugabe von Phenylephrin mit Propranolol (nicht-selektiver β -Blocker) und Cocain (Reuptake-Inhibitor an Dopamin-, Noradrenalin- und Serotonin-Neuronen) versetzt. Phenylephrin wurde in aufsteigenden Konzentrationen (10^{-8} M bis 10^{-5} M) zum Organbad gegeben. Die Kontraktionskraft (mN) der Gefäße bei jeder Phenylephrinkonzentration wurde abgelesen und die Kontraktionsfähigkeit (% der maximalen Kontraktionsfähigkeit nach Zugabe von KCl, s.o.) berechnet. Phenylephrin wurde durch dreimaliges Wechseln des Puffers in 5 min-Abständen aus dem Organbad entfernt.

Die Relaxationsfähigkeit der Gefäße wurde zum einen endothelabhängig mit Carbachol und zum anderen endothelunabhängig mit Isoprenalin geprüft. Um die Relaxation messen zu können, mussten die Gefäße zunächst kontrahiert werden. Dies wurde durch Zugabe von Phenylephrin ($3 \cdot 10^{-6}$ M) zum Organbad erreicht. Der unspezifische β_2 -mimetische Effekt des Phenylephrin wurde bei der endothelabhängigen Relaxationsfähigkeitsmessung mit Carbochol wieder durch Zugabe von Propranolol und Cocain zum Organbad verhindert. Da die endothelunabhängige Relaxationsfähigkeit mit Isoprenalin (β -Sympathomimetikum) gemessen wurde, musste hier auf die Zugabe von Propranolol und Cocain verzichtet werden.

Zuerst wurde die endothelabhängige Relaxationsfähigkeit mit Carbachol (direktes Parasympathomimetikum an muscarinischen und nicotinischen Acetylcholinrezeptoren) gemessen. Nach Kontraktion der Gefäße mit Phenylephrin ($3 \cdot 10^{-6}$ M) wurde die Kontraktionskraft (mN) der Gefäße abgelesen. Dann wurde Carbachol in aufsteigenden Konzentrationen (10^{-8} M bis 10^{-5} M) zum Organbad gegeben. Auf Grund der durch Carbachol induzierten Relaxation der Gefäße, nahm die Kontraktionskraft der Gefäße mit jeder Erhöhung der Carbachol-Konzentration ab. Die verbleibende Kontraktionskraft (mN) der Gefäße bei jeder Carbacholkonzentration wurde abgelesen und die Kontraktionsfähigkeit (% der maximalen Kontraktionsfähigkeit nach Zugabe von KCl, s.o.) berechnet. Phenylephrin und Carbachol wurden durch viermaliges Wechseln des Puffers in 5 min-Abständen aus dem Organbad entfernt.

Dann wurde die endothelunabhängige Relaxationsfähigkeit mit Isoprenalin (β -Sympathomimetikum) gemessen. Nach Kontraktion der Gefäße mit Phenylephrin ($3 \cdot 10^{-6}$ M) wurde die Kontraktionskraft (mN) der Gefäße abgelesen. Dann wurde Isoprenalin in aufsteigenden Konzentrationen (10^{-8} M bis 10^{-5} M) zum Organbad gegeben. Auf Grund der durch Isoprenalin induzierten Relaxation der Gefäße, nahm die Kontraktionskraft der Gefäße mit jeder Erhöhung der Isoprenalin-Konzentration ab. Die verbleibende Kontraktionskraft (mN) der Gefäße bei jeder Isoprenalinkonzentration wurde abgelesen und die Kontraktionsfähigkeit (% der maximalen Kontraktionsfähigkeit nach Zugabe von KCl, s.o.) berechnet. Phenylephrin und Isoprenalin wurden durch dreimaliges Wechseln des Puffers in 5 min-Abständen aus dem Organbad entfernt.

Zur Kontrolle, ob die Gefäße maximal relaxieren können und vital sind, wurde nach Kontraktion der Gefäße mit Phenylephrin ($3 \cdot 10^{-6}$ M) Nitroprussid-Natrium (10^{-4} M) zum Organbad gegeben. Aus Nitroprussid-Natrium wird Stickstoffmonoxid (NO) freigesetzt, welches schnell zu einer maximalen Relaxation von Gefäßen führt. Die Messergebnisse der Gefäßfunktionsmessung durften nur verwendet werden, wenn es bei der Kontrolle mit Nitroprussid-Natrium zu einer maximalen Relaxation kam.

2.3.10. Bestimmung der β -Rezeptorendichte im Herz

Diese Untersuchung wurde freundlicherweise von PD Dr. Kirsten Leineweber und ihren Mitarbeitern im Institut für Pathophysiologie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

Die Bestimmung der β -Rezeptorendichte im Herz erfolgte durch Bindung mit (-)-[¹²⁵I]-Iodocyanopindolol (ICYP) als Radioligand nach einer Methode von Brodde et al. (1985).

2.3.10.1. Prinzip der β -Rezeptorenbestimmung

ICYP, ein vorwiegend β_2 -selektiver radioaktiv markierter Adrenozeptor-Antagonist, bindet spezifisch an β -Rezeptoren der isolierten Herzgewebe-Zellen. Gleichzeitig findet aber auch eine unspezifische Bindung statt. Die spezifische und unspezifische Bindung wird zusammen als Gesamtbindung bezeichnet und als Radioaktivität gemessen. (\pm)-CGP 12177, ein nicht-selektiver β -Adrenozeptorantagonist, der nicht radioaktiv markiert ist, wird in einem Parallelversuch dazugegeben und verdrängt ICYP aus seiner spezifischen Bindung, aber nicht aus der unspezifischen Bindung. Zurück bleibt die als Radioaktivität messbare unspezifische Bindung. Die Differenz aus Gesamtbindung und unspezifische Bindung ergibt die Menge der spezifischen Bindung.

2.3.10.2. Herzpräparation

Die Herzen wurden jeweils in 5 ml eines Präparationspuffers gegeben und in diesem Puffer mit einer Schere zerkleinert. Dies und alle weiteren Schritte der Herzpräparation erfolgten auf Eis. Es folgte die Homogenisierung mit einem Ultra Turrax-Gerät. Dazu wurde das Gewebe 10 sec lang bei vollem Schub und anschließend zweimal 20 sec bei 2/3-maximalem Schub homogenisiert mit je 1 min Pause zwischen den einzelnen Vorgängen. Die homogene Suspension wurde auf 15-20 ml mit dem Präparationspuffer aufgefüllt und anschließend über vier Lagen Mull filtriert. Dann wurde das Filtrat zentrifugiert, und zwar 20 min bei 10000 g und 4 °C. Der Überstand wurde verworfen und das nach der Zentrifugation am Boden des Röhrchens verbliebene Pellet in 1 ml Inkubationspuffer resuspendiert. (Inkubationspuffer: 10 mM Tris, 154 mM NaCl, 0,55 mM Ascorbinsäure, pH7,4) (Brodde et al. 1998).

2.3.10.3. Radioligandenbindung

Zur Radioligandenbindung wurden jeweils 2 mal 6 Röhrrchen für die Messung der Gesamtbindung und 2 mal 6 Röhrrchen für die Messung der unspezifischen Bindung vorbereitet (Messung in Doppelbestimmung). In die Röhrrchen wurden für die Gesamtbindung und die unspezifische Bindung aufsteigende Konzentrationen von ICYP (jeweils 50 µl) gegeben und jeweils 150 µl der in der Herzpräparation hergestellten Myokardzell-Suspension. Für die Messung der Gesamtbindung kamen noch jeweils 50 µl Inkubationspuffer zu dem Ansatz, für die Messung der unspezifischen Bindung wurden jeweils 50 µl (±)-CGP 12177 (1 µM) dazu gegeben und die Röhrrchen für 90 min bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Zum Beenden der Inkubation wurden 6 ml Inkubationspuffer in die Röhrrchen gegeben und alles schnell über Whatman GF/C Filter filtriert. Die Radioaktivität der Proben wurde in einem Gamma-Counter bestimmt.

Um die Ergebnisse der einzelnen Herzproben vergleichbar zu machen, wurde die β-Rezeptorendichte pro mg Protein angegeben. Die Proteinbestimmung der Myokardzell-Suspensionen erfolgte mit der Methode nach Bradford, 1976. Das Prinzip dieser Messung beruht darauf, dass sich der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine bindet und sich dabei sein Absorptionsmaximum von 495 nm auf 595 nm verschiebt. Die Proteinmenge kann anhand einer Bezugskurve quantifiziert werden. Es wurden 20 µl der Myokardzell-Suspension mit 1580 µl destilliertem Wasser verdünnt und 400 µl der Coomassie-Brilliant-Blue-G-250-Lösung (Coomassie-Lsg.) dazu gegeben. Die Extinktion wurde gegen einen Leerwert (20 µl Inkubationspuffer + 1580 µl destilliertem Wasser + 400 µl Coomassie-Lsg.) gemessen. Anhand einer vorher erstellten Bezugskurve konnte nun die Proteinkonzentration bestimmt werden.

2.3.11. Echokardiografie der Herzen

2.3.11.1. Praktisches Vorgehen

Zur Echokardiografie wurden die Mäuse narkotisiert (mit Ketamin und Xylazin), im Thorax- und Abdomenbereich geschoren und zur Konstanthaltung der Körpertemperatur auf eine Wärmeplatte gelegt. Die Zunge wurde mit einer Pinzette seitlich aus dem Maul gezogen, damit die Atemwege frei blieben. Die Haut wurde mit

Alkohol entfettet um eine gute Ankopplung des Ultraschallsignals zu gewährleisten. Zusätzlich wurde Ultraschallgel verwendet.

Es wurden mehrere Bild-Sequenzen der Mäuseherzen sowohl im Querschnitt (kurze Achse) als auch im Längsschnitt (lange Achse) aufgenommen. Anhand dieser Bilder wurden verschiedene Parameter in Diastole und Systole direkt ermittelt oder nach etablierten Methoden berechnet (Janssen, 2002; Yang, 1999).

In der kurzen Achse (Querschnitt) wurden die Dicke der Vorder- und Hinterwand sowohl in der Systole als auch in der Diastole gemessen. Zusätzlich wurde der Lumendurchmesser des linken Ventrikels in Diastole (LVIDd) und Systole (LVIDs) gemessen. Dabei wurde darauf geachtet, dass innerhalb der Querschnittsebene zwischen Ventilebene und Herzspitze gemessen wurde, in der das Lumen am größten war.

In der langen Achse (Längsschnitt) wurde das Lumen des linken Ventrikels gemessen und in cm angegeben. Des Weiteren wurde die Länge des linken Ventrikels gemessen, einmal als maximale Ausbreitung von der Mitralklappe bis zum Ende des Ventrikels (LVID apic und LVIS apic) und einmal von der Mitralklappe bis zum Beginn des Myokards beziehungsweise dem Ende des Lumens. Anhand beider Werte konnte als Differenz die Dicke des Myokards berechnet werden. Alle drei Werte wurden in cm angegeben.

2.3.11.2. Bestimmung der Herzfunktionsparameter

Die Berechnung der Herzfunktionsparameter aus den in der Echokardiographie ermittelten Werten erfolgte mittels etablierter Formeln.

Das endsystolische Volumen (ESV) wurde mit folgender Formel berechnet:

$$ESV = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot \frac{LVIS_{apic}}{2} \cdot \left(\frac{LVIDs}{2} \right)^2$$

Dabei stehen die Abkürzungen LVIS apic für die maximale Längenausbreitung der Vorderwand des linken Ventrikels in der langen Achse in der Systole LVIDs für den Durchmesser des Lumens des linken Ventrikels in der Systole. Das Ergebnis wurde in cm³ angegeben.

Das enddiastolische Volumen (EDV) wurde mit folgender Formel berechnet:

$$EDV = \frac{4}{3} \cdot \Pi \cdot \frac{LVID_{apic}}{2} \cdot \left(\frac{LVIDd}{2} \right)^2$$

Dabei stehen die Abkürzungen LVID apic für die maximale Längenausbreitung der Vorderwand des linken Ventrikels in der langen Achse in der Diastole und LVIDd für den Durchmesser des Lumens des linken Ventrikels in der Diastole. Das Ergebnis wurde in cm³ angegeben.

Das Schlagvolumen (SV) wurde mit folgender Formel berechnet:

$$SV = EDV - ESV$$

Dabei stehen die Abkürzungen EDV für enddiastolisches Volumen und ESV für endsystolisches Volumen. Das Ergebnis wurde in cm³ angegeben.

Die Ejektionsfraktion (=EF, Auswurffraktion) ist ein Parameter zur Bestimmung der Pumpleistung des linken Ventrikels. Es gibt an, wie viel Prozent des sich am Ende der Diastole im linken Ventrikel befindende Bluts ausgeworfen wird. Es wurde mit folgender Formel berechnet:

$$EF = \frac{EDV - ESV}{EDV} \cdot 100$$

Dabei stehen die Abkürzungen EDV für das enddiastolische Volumen, ESV für das endsystolische Volumen und SV für das Schlagvolumen. Das Ergebnis wurde in % angegeben.

Die Verkürzungsfraktion (=Fractional shortening, FS) ist ebenfalls ein Parameter zur Bestimmung der Pumpleistung des linken Ventrikels. Es wurde mit folgender Formel berechnet:

$$FS = \frac{LVIDd - LVIDS}{LVIDd} \cdot 100$$

Dabei steht die Abkürzungen LVIDd für den Durchmesser des Lumens im linken Ventrikel in der Diastole, LVIDs für den Durchmesser des Lumens im linken Ventrikel in der Systole, jeweils in der kurzen Achse. Das Ergebnis wurde in % angegeben.

2.3.12. Lipidperoxidation im Herz

Die Messung der Lipidperoxidation ist ein Nachweis zur Quantifizierung des oxidativen Stresses. Malondialdehyd (MDA) ist ein Produkt der Lipidperoxidation und kann damit zum Nachweis der Lipidperoxidation eingesetzt werden. Es sind zahlreiche weitere Methoden zur Quantifizierung des oxidativen Stresses bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Bestimmung von MDA (μg MDA pro g Herzgewebe) zum Nachweis der Lipidperoxidation und damit zur Quantifizierung des oxidativen Stresses eingesetzt. Diese Untersuchung wurde freundlicherweise mit Unterstützung von Dr. Marcus Baumann und seinen Mitarbeitern nach einer modifizierten Methode von Hong et al. (2000) im Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Maastricht, Niederlande, durchgeführt.

2.3.12.1. Prinzip

Zur Messung der Lipidperoxidation wird die Thiobarbitursäure-Reaktion genutzt. Dabei bildet Malondialdehyd (MDA), ein klassisches Lipidperoxidationsprodukt, mit Thiobarbitursäure (TBA) in saurer Lösung einen roten Farbkomplex. Dieser kann aufgrund seines konjugierten Doppelbindungssystems per Fluoreszenzmessung quantifiziert werden. Die Quantifizierung wurde mit einem HPLC-System (High performance liquid chromatography System) durchgeführt.

2.3.12.2. Versuchsdurchführung

Die Mäuseherzen wurden gewogen und anschließend homogenisiert (2 min mittels Ultraturrax). Zu 50 μl der homogenisierten Probe wurde 0,2 μl 0,2 %iges Butylhydroxytoluol (ein Antioxidans) und 400 μl 1 N NaOH gegeben und anschließend bei 60° C im Schüttelwasserbad 60 min inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde 1,5 ml Trichloressigsäure (TCA, 10 %), die außerdem 1 % Kaliumiodid enthielt, hinzugefügt, anschließend 10 min auf Eis inkubiert und dann 10 min bei 4° C mit 1500g zentrifugiert. Zu 0,5 ml des Überstands wurde 0,25 ml Thiobarbitursäure (TBA 0,6 %) gegeben und dieses Gemisch für 30 min auf 95° C

erhitzt. Nach erneuter Zentrifugation (1500g, 10 min) wurde 50 µl des Überstands in eine HPLC-Säule (4,6 x 100 mm, Fa. Waters) gegeben. Als Eluent diente 25 mmol/l KH₂PO₄ (pH 6,8) und 30 % Methanol bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min. Ein Fluoreszenz-Detektor (515 nm Anregungs- und 553 nm Emissionswellenlänge) wurde zum Nachweis der MDA eingesetzt. Die Quantifizierung erfolgte mittels einer Standardkurve, die mit Tetraethoxypropan erstellt worden war. Das Ergebnis wurde in µg MDA/g Herzgewebe angegeben.

2.3.13. Histologie

2.3.13.1. Anfertigung der Gewebeschnitte

Zunächst erfolgte zur Anfertigung von histologischen Schnitten die Fixierung des Organs in 4% gepuffertem Formaldehyd. Dies geschah sofort nach der Organentnahme. Anschließend erfolgte die Entwässerung des Gewebes in einer aufsteigenden Alkoholreihe, beginnend mit 70 %igem über 80 %igem bis hin zu 100 %igem Alkohol. Dabei wurde zu Anfang der 70 %ige Alkohol mehrmals gewechselt, um die Fixierungsflüssigkeit auszuwaschen. Die Alkoholreihe diente zur Entwässerung des Gewebes. Sie erfolgte stufenweise, um eine Schrumpfung des Gewebes zu verhindern. Zugleich führte dies zu einer Härtung des Gewebes und man gewann Platz für das Lösungsmittel des Einbettmittels, das Xylol. Nach einem Bad der Organhälfte in Xylol folgte das Einbetten in Paraffin, wobei das Organ dabei mehrere Gefäße mit Paraffin durchlief, da das erste durch Xylol stark verunreinigt war. Der gesamte Vorgang erfolgte automatisch in einem Entwässerungs- und einem Einbettautomaten.

Die Anfertigung der endgültigen histologischen Schnitte erfolgte mittels eines Schlitten-Mikrotoms. Bei dem Einspannen des Messers mussten Neigungswinkel und Schnittwinkel beachtet werden. Das Messer durfte nur über die Kante eindringen, parallel zur Oberfläche. Das Schneiden musste gleichmäßig und ohne Druck erfolgen. Das Anschneiden erfolgte manuell mit Kurbel, um eine ebene Oberfläche zu gewinnen. Dann wurde mit dem Feintrieb (4 µm) das Präparat geschnitten. Der entstandene Schnitt wurde mit einem Pinsel abgenommen und zügig in ein Wasserbad bei 42 – 45 °C überführt, damit sich der Schnitt entspannen konnte. Anschließend konnte der Schnitt auf einen Objektträger aufgezogen werden. Es folgte eine Trockenzeit von 30 bis 40 Minuten bei 37 °C.

2.3.13.2. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin Färbung, kurz als HE-Färbung bezeichnet, ist eine Übersichtsfärbung, die in jedem histologischen Labor als Standardfärbung eingesetzt wird. Die Zellkerne des Gewebes werden blau angefärbt, Zytoplasma, Bindegewebe und sonstige Strukturen rot angefärbt.

Zunächst wurden die sich auf dem Objektträger befindenden Gewebeschnitte zur Entparaffinierung in Xylol gegeben, welches einmal gewechselt wurde, um das Paraffin aus dem Gewebe heraus zu lösen. Anschließend wurden die Gewebeschnitte durch eine absteigende Alkoholreihe bis in destilliertes Wasser geführt, um Xylol heraus zu waschen und um das Gewebe schonend zu wässern.

Die Färbung der Zellkerne erfolgte in saurem Hämatoxylin für 5 min, und anschließendes Spülen für 10 min in fließendem Leitungswasser. Dadurch wurde durch den pH-Wechsel die Färbung stabilisiert. Anschließend wurde das übrige Gewebe mit Eosin gefärbt (5 min).

Nach Abschluß der Färbung wurden die Gewebeschnitte rasch über eine aufsteigende Alkoholreihe (70 %ig, 96 %ig, 100 %ig) in Xylol überführt, und anschließend mit einem Tropfen Eindeckmedium und einem Deckgläschen fixiert.

2.3.13.3. Siriusrot-Färbung

Fibrose im Gewebe kann mit der Siriusrot-Färbung nachgewiesen werden. Kollagenfasern, die Hauptbestandteil von Fibrose sind, erhalten durch Siriusrot eine rote Färbung, Zellkerne werden braun und Zytoplasma gelb gefärbt. Bilder von Siriusrot-gefärbten Herzen sind in den Abbildungen 26 und 27 zu sehen. Die Färbung wurde an in Paraffin eingebetteten Herzschnitten durchgeführt um eine mögliche Fibrose im Myokard anzuzeigen.

Dazu wurden die sich auf dem Objektträger befindenden Gewebeschnitte zunächst zur Entparaffinierung in Xylol gegeben, welches einmal gewechselt wurde, um das Paraffin aus dem Gewebe heraus zu lösen. Anschließend wurden die Gewebeschnitte durch eine absteigende Alkoholreihe bis in destilliertes Wasser geführt, um Xylol heraus zu waschen und um das Gewebe schonend zu wässern.

Nun wurden die Schnitte für eine Dauer von 10 Minuten in Hämalaun gegeben und anschließend für weitere 10 Minuten in Leitungswasser. Dies geschah zur Kernfärbung. Anschließend erfolgte die Anfärbung der Kollagenfasern, die bei Fibrose verdichtet vorhanden sind, mit Picro-Siriusrot (0,1 % Siriusrot in gesättigter Picrinsäure) für eine Dauer von 30 Minuten.

Nach Abschluß der Färbung wurden die Gewebeschnitte rasch über eine aufsteigende Alkoholreihe (70 %ig, 96 %ig, 100 %ig) in Xylol überführt, und anschließend mit einem Tropfen Eindeckmedium und einem Deckgläschen fixiert.

2.3.13.4. Bestimmung der Kardiomyozytengröße

Die entnommenen Herzen wurden in Formaldehyd (4 %) fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Es wurden 4 µm dicke transverse Schnitte hergestellt und die Herzschnitte mit einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung gefärbt (s. 3.3.13.2).

Die durchschnittliche Kardiomyozytengröße wurde in der endokardialen Schicht der Außenwand des linken Ventrikels bestimmt. Die Größe der Kardiomyozyten wurde durch Bestimmung der Querschnittsflächengröße in µm² quantifiziert. Geeignete Kardiomyozyten zur Bestimmung der Querschnittsfläche wurden dadurch gewählt, dass der Nucleus sichtbar sein musste und die die Zelle umgebenden Kapillaren einen nahezu kreisrunden Anschnitt vorweisen mussten. Es wurde die Querschnittsflächengröße von mindestens 20 Kardiomyozyten pro Herz gemessen und der Durchschnittswert in µm² für die Analyse verwendet (Heymans et al, 2005; Baumann et al, 2007).

2.3.13.5. Bestimmung der Fibrosedichte

Fibrose ist eine Vermehrung des Bindegewebes, dessen Hauptbestandteil Kollagenfasern sind. Zur Bestimmung der Fibrosedichte in den Mäuseherzen nach 24 Wochen wurden die entnommenen Herzen in Formaldehyd (4 %) fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Es wurden 4 µm dicke transverse Schnitte hergestellt und die Herzschnitte Siriusrot gefärbt. Dies ist eine Spezialfärbung für Kollagenfasern, die dabei rot angefärbt werden (zum Ablauf dieser Färbung siehe 3.3.13.3). Bilder von Siriusrot-gefärbtem Herzgewebe sind in Abbildung 17 zu sehen. Alle Siriusrot-gefärbten Herzschnitte wurden mit einem Lichtmikroskop (DFC 280, Leica, Tokyo, Japan) betrachtet und die Bilder an einen angeschlossenen Computer

übermittelt. Die Auswertung erfolgte an den digitalisierten Bildern mit Hilfe des NIH-Bild-Analyse-Systems für Histomorphometrie bei einer Vergrößerung von x200. Die Fibrosedichte im Herzen wurde bestimmt über die Quantifizierung des prozentualen Kollagenanteils an der gesamten Herzschnittfläche (Heymans et al, 2005; Baumann et al, 2007). Von jedem Herzen wurde an sieben verschiedenen Stellen der Aussenwand des linken Ventrikels der prozentuale Anteil bestimmt und der Durchschnittswert für die Analyse verwendet. Die Werte wurden angegeben in %.

2.3.14. Statistische Methoden

Die Mittelwerte und Standardabweichungen (SEM) wurden berechnet und angegeben. Auf statistische Signifikanz wurden die ermittelten Werte mittels ANOVA bzw. mit einem t-Test nach Student für unverbundene Stichproben bei normalverteilten Werten oder mittels Mann-Whitney-U-Test bei nicht normalverteilten Werten geprüft. Die Prüfung auf Normalverteilung erfolgte mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test. Die Auswertung der Gefäßfunktionsmessungen erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism. Eine Konzentrations-Reaktions Kurve (nicht-lineare Regressions-Analyse) wurde erstellt und die EC₅₀-Werte (Konzentration die zur 50 %igen Reaktion der Maximalreaktion führt) berechnet. Ein p-Wert < 0,05 wurde für alle statistischen Methoden als signifikant gewertet.

3. ERGEBNISSE

3.1. Entwicklung der Körpermasse

Die Entwicklung der Körpermasse der Mäuse wurde in den ersten 8 Wochen nach der Operation beobachtet. Sie ist dargestellt in Abbildung 7.

Während der ersten Woche nach der Operation wurde die Körpermasse der Mäuse, die eine 5/6-Nephrektomie bekommen hatten, kleiner, die Körpermasse der scheinoperierten Mäuse wurde größer (5/6: $25,3 \pm 0,4^*$ g, 5/6 + I: $24,1 \pm 0,6^{***}$ g, Schein-OP + I: $26,6 \pm 0,4$ g, Schein-OP: $26,8 \pm 0,4$ g. $***p < 0,001$, $*p < 0,05$ vs. Schein-OP). Von Beginn der zweiten Woche nach Operation bis zur 8. Woche wurde auch das Gewicht der 5/6-nephrektomierten Mäuse größer. Nach Ablauf der ersten 8 Wochen hatten die Mäuse aller Gruppen das gleiche Gewicht erreicht (5/6: $28,1 \pm 0,3$ g, 5/6 + I: $27,7 \pm 0,3$ g, Schein-OP + I: $28,4 \pm 0,4$ g, Schein-OP: $28,6 \pm 0,5$ g, keine signifikanten Unterschiede).

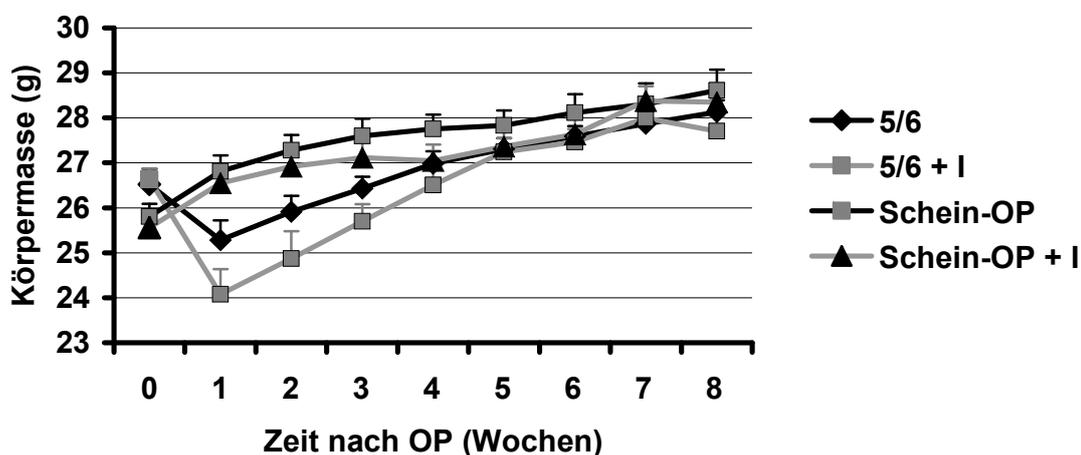


Abbildung 7: Entwicklung der Körpermasse

Übersicht über die ersten 8 Wochen nach Operation. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM, im Vergleich 5/6-nephrektomierte Mäuse mit (n=22-24) und ohne (n=19-22) Imatinib-Gabe und scheinoperierte Mäuse mit (n=13-16) und ohne (n=13-15) Imatinib-Gabe.

3.2. Laborparameter

Zur Feststellung der chronischen Niereninsuffizienz wurden nach Ablauf des Untersuchungszeitraums verschiedene Laborparameter der Mäuse bestimmt. Dazu gehörten die 24-Stunden-Urinmenge, die Urin-Kreatinin- und Urin-Harnstoff-Konzentration sowie die Serum-Kreatinin- und Serum-Harnstoff-Konzentration. Die Laborparameter der Mäuse der 8 Wochen-Gruppe sind in Tabelle 4 zu sehen, die Laborparameter der Mäuse der 24 Wochen-Gruppe sind in Tabelle 5 zu sehen.

Die 5/6-nephrektomierten Mäuse mit und ohne Imatinib zeigten sowohl nach 8 als auch nach 24 Wochen eine signifikant größere 24h-Urinmenge als die schein-operierten Mäuse. Nach 8 Wochen betrug die Urinmenge der 5/6-nephrektomierten Mäuse ohne Imatinib $2,95 \pm 0,20$ ml/24 h und die der 5/6-nephrektomierten Mäuse mit Imatinib $2,71 \pm 0,22$ ml/24 h. Damit gab es einen signifikanten Unterschied mit jeweils $p < 0,001$ gegenüber den schein-operierten Mäusen, die eine Urinmenge von $1,00 \pm 0,14$ ml/24 h hatten (Tab. 4).

	5/6	5/6 + I	Schein-OP	Schein-OP + I
24h-Urin-Menge (ml)	$2,95 \pm 0,20^{***}$	$2,71 \pm 0,22^{***}$	$1,00 \pm 0,14$	$0,86 \pm 0,15$
Urin-Kreatinin (mg/dl)	$17,3 \pm 0,9^{***}$	$17,4 \pm 0,9^{***}$	$42,4 \pm 2,8$	$45,2 \pm 1,0$
Urin-Harnstoff (mg/dl)	$1917 \pm 60^{***}$	$1965 \pm 61^{***}$	4749 ± 262	5214 ± 92
Serum-Kreatinin (mg/dl)	$0,46 \pm 0,04$	$0,51 \pm 0,03^*$	$0,43 \pm 0,02$	$0,43 \pm 0,01$
Serum-Harnstoff (mg/dl)	$46,8 \pm 4,9^{**}$	$49,5 \pm 4,2^{***}$	$29,0 \pm 1,2$	$27,1 \pm 1,1$

Tabelle 4: Laborparameter 8 Wochen nach Operation

von 5/6-nephrektomierten Mäusen $n=10-24$ (5/6 und 5/6 + Imatinib) und von schein-operierten Mäusen $n=8-16$ (Schein-OP und Schein-OP + Imatinib); die Werte sind Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$ vs. Schein-OP; keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen 5/6 und 5/6 + I, sowie keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen Schein-OP und Schein-OP + I.

Nach 24 Wochen betrug die Urinmenge der 5/6-nephrektomierten Mäuse ohne Imatinib $3,14 \pm 0,19$ ml/24 h und die der 5/6-nephrektomierten Mäuse mit Imatinib $3,36 \pm 0,27$ ml/24 h. Damit gab es einen signifikanten Unterschied mit jeweils $p < 0,001$ gegenüber den schein-operierten Mäusen, die eine Urinmenge von $0,99 \pm 0,08$ ml/24 h hatten (Tab. 5).

Der Kreatinin- und Harnstoffgehalt im Urin war bei den 5/6-nephrektomierten Mäusen nach 8 und nach 24 Wochen signifikant niedriger als der Kreatinin- und Harnstoffgehalt im Urin der schein-operierten Mäuse (8 Wochen-Gruppe: Kreatinin (mg/dl): $17,3 \pm 0,9$ (5/6) und $17,4 \pm 0,9$ (5/6 + I) vs. Schein-OP: $42,4 \pm 2,8$, jeweils $p < 0,001$; Harnstoff (mg/dl): 1917 ± 60 (5/6) und 1965 ± 61 (5/6+I) vs. Schein-OP: 4749 ± 262 , jeweils $p < 0,001$; 24 Wochen-Gruppe: Kreatinin (mg/dl): $19,3 \pm 1,6$ (5/6) und $21,74 \pm 1,9$ (5/6 + I) vs. Schein-OP: $44,29 \pm 7,03$, jeweils $p < 0,005$; Harnstoff (mg/dl): 1874 ± 93 (5/6) und 1873 ± 183 (5/6 + I) vs. Schein-OP: 3352 ± 569 , jeweils $p < 0,05$). Umgekehrt zeigte sich ein höherer Kreatinin- und Harnstoffgehalt im Serum der 5/6-nephrektomierten Mäuse als im Serum der schein-operierten Mäuse.

	5/6	5/6 +I	Schein-OP
24h-Urin-Menge (ml)	$3,14 \pm 0,19^{***}$	$3,36 \pm 0,27^{***}$	$0,99 \pm 0,08$
Urin-Kreatinin (mg/dl)	$19,3 \pm 1,6^{**}$	$21,74 \pm 1,9^{**}$	$44,29 \pm 7,03$
Urin-Harnstoff (mg/dl)	$1874 \pm 93^*$	$1873 \pm 183^*$	3352 ± 569
Serum-Kreatinin (mg/dl)	$0,44 \pm 0,02^*$	$0,44 \pm 0,02^*$	$0,38 \pm 0,06$
Serum-Harnstoff (mg/dl)	$50,4 \pm 2,4^{***}$	$54,9 \pm 2,7^{***}$	$30,1 \pm 1,3$

Tabelle 5: Laborparameter 24 Wochen nach Operation

von 5/6-nephrektomierten Mäusen n=12-22 (5/6 und 5/6 + I) und Schein-operierten Mäusen n=16 (Schein-OP); die Werte sind Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$ vs. Schein-OP; keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen 5/6 und 5/6 + I.

3.3. Organgewichte

Nach Ablauf des Untersuchungszeitraums von 8 Wochen wurden die Mäuse getötet und Organe entnommen. Die Organe wurden gewogen und zur Vergleichbarkeit der Quotient aus Organgewicht und Körpergewicht der Mäuse gebildet. Das Organgewicht bezogen auf das Körpergewicht von Herz und Niere ist in Abbildung 8 dargestellt.

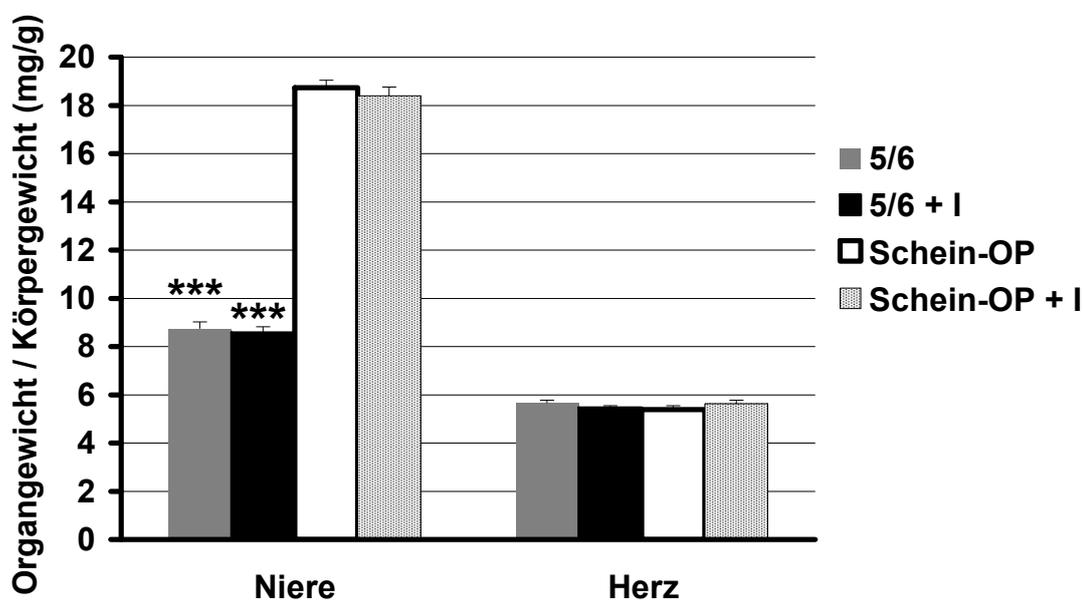


Abbildung 8: Nieren-, und Herzgewicht (mg/g) nach 8 Wochen

Das Organgewicht wurde bezogen auf das Körpergewicht der Mäuse. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM der 5/6-nephrektomierten Mäuse ohne (5/6, n=24) und mit (5/6 + I, n=21-22) Imatinib-Gabe und der schein-operierten Mäuse ohne (Schein-OP, n=16) und mit (Schein-OP + I, n=15) Imatinib-Gabe. *** $p < 0,001$ vs. Schein-OP und vs. Schein-OP + I.

Bei den Herzgewichten gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen der 5/6-nephrektomierten Mäuse und schein-operierten Mäusen (Abb. 8). Der Quotient aus Nierengewicht und Körpergewicht war signifikant kleiner bei den 5/6-nephrektomierten Mäusen als bei den schein-operierten Mäusen (mg/g: $8,7 \pm 0,3$ (5/6) und $8,6 \pm 0,2$ (5/6 + I) vs. $18,7 \pm 0,3$ (Schein-OP), jeweils $p < 0,001$).

Das Gewicht der linken Ventrikel wurde 8 Wochen nach Nephrektomie bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 9 dargestellt. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen beim Gewicht der linken Ventrikel. 5/6-nephrektomierte Mäuse ohne Imatinib-Gabe hatten ein linksventrikuläres Gewicht von $53,9 \pm 1,9$ mg, 5/6-nephrektomierte Mäuse mit Imatinib-Gabe $56,2 \pm 2,8$ mg. Die schein-operierten Mäuse ohne Imatinib-Gabe hatten ein linksventrikuläres Gewicht von $57,7 \pm 3,1$ mg, die schein-operierten Mäuse mit Imatinib-Gabe $55,9 \pm 2,9$ mg (Abb. 9).

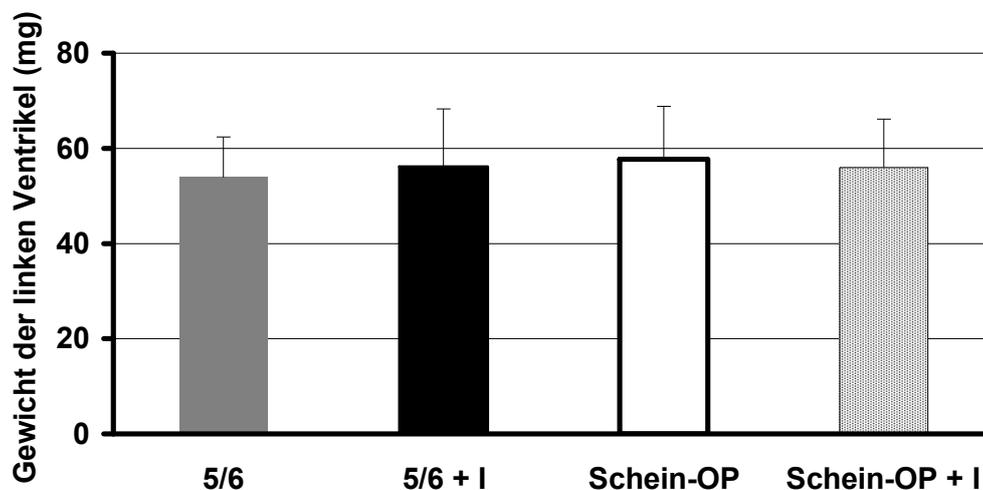


Abbildung 9: Gewicht der linken Ventrikel 8 Wochen nach Nephrektomie von 5/6-nephrektomierten Mäusen ohne (5/6, n=20) und mit (5/6 + I, n=19) Imatinib-Gabe und von schein-operierten Mäusen ohne (Schein-OP, n=13) und mit (Schein-OP + I, n=12) Imatinib-Gabe. Es gibt keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

3.4. Gefäßfunktionsmessung

3.4.1. Kontraktionsfähigkeit der Gefäße

Die Kontraktionsfähigkeit der Gefäße wurde mit steigenden Konzentrationen von Phenylephrin gemessen. Es wurden miteinander verglichen die Kontraktionsfähigkeit von Gefäßen der 5/6-nephrektomierten Mäuse (n=13) und der schein-operierten Mäuse (n=7) jeweils ohne Imatinib-Gabe (Abb. 10) und die Kontraktionsfähigkeit der 5/6-nephrektomierten Mäuse (n=10) und der schein-operierten Mäuse (n=6) jeweils mit Imatinib-Gabe (Abb. 11). Zusätzlich zur Darstellung der Kontraktionskraft in einer nicht-linearen Regressionskurve wurde zur besseren Vergleichbarkeit der $\log EC_{50}$ -Wert berechnet. Er gibt an, bei welcher Konzentration von Phenylephrin die halbmaximale (50 %ige) Kontraktionsfähigkeit der Gefäße erreicht ist.

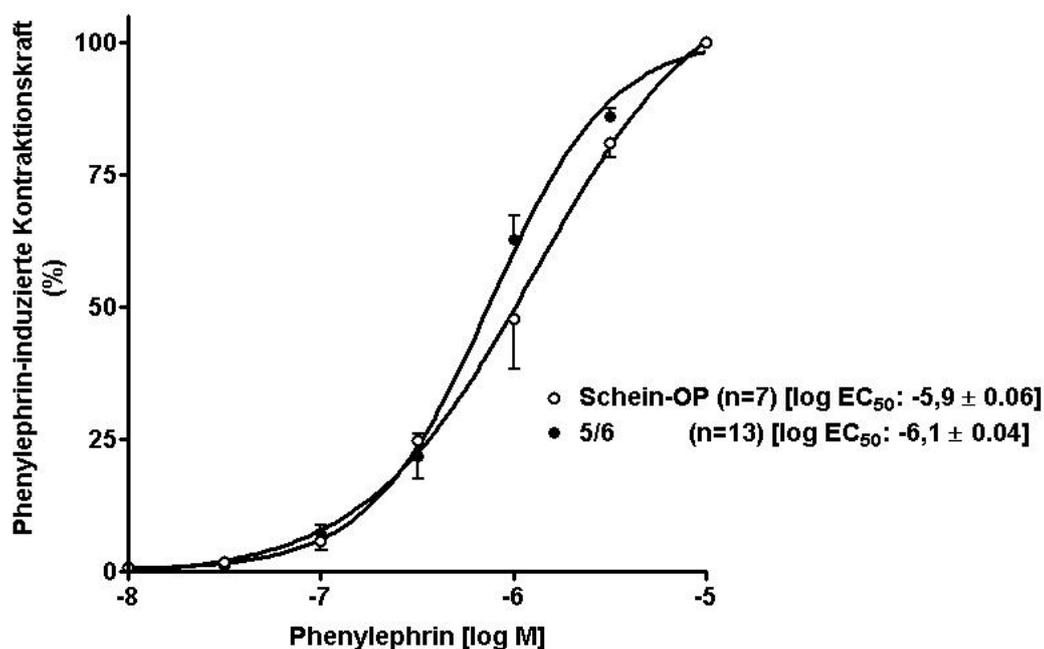


Abbildung 10: Kontraktionsfähigkeit (%) der Gefäße (Mäuse ohne Imatinib)

Bei steigender Konzentration von Phenylephrin (log M) Gefäße von schein-operierten Mäusen und Gefäße von 5/6-nephrektomierten Mäusen jeweils ohne Imatinib-Gabe im Vergleich. Der $\log EC_{50}$ gibt die Konzentration von Phenylephrin an, bei der es zur 50 %igen Kontraktion der Gefäße kommt. Die Werte sind angegeben als Mittelwerte \pm SEM. Es gibt keine signifikanten Unterschiede ($p=0,45$).

Es gab keine signifikanten Unterschiede bei den Gefäßen von Mäusen ohne Imatinib-Gabe ($\log EC_{50}$: $-6,1 \pm 0,04$ vs. $-5,9 \pm 0,06$, $p=0,45$) (Abb. 10), ebenso gab es keine signifikanten Unterschiede bei den Gefäßen von Mäusen mit Imatinib-Gabe ($\log EC_{50}$: $-6,1 \pm 0,04$ vs. $-6,0 \pm 0,02$, $p=0,68$) (Abb. 11).

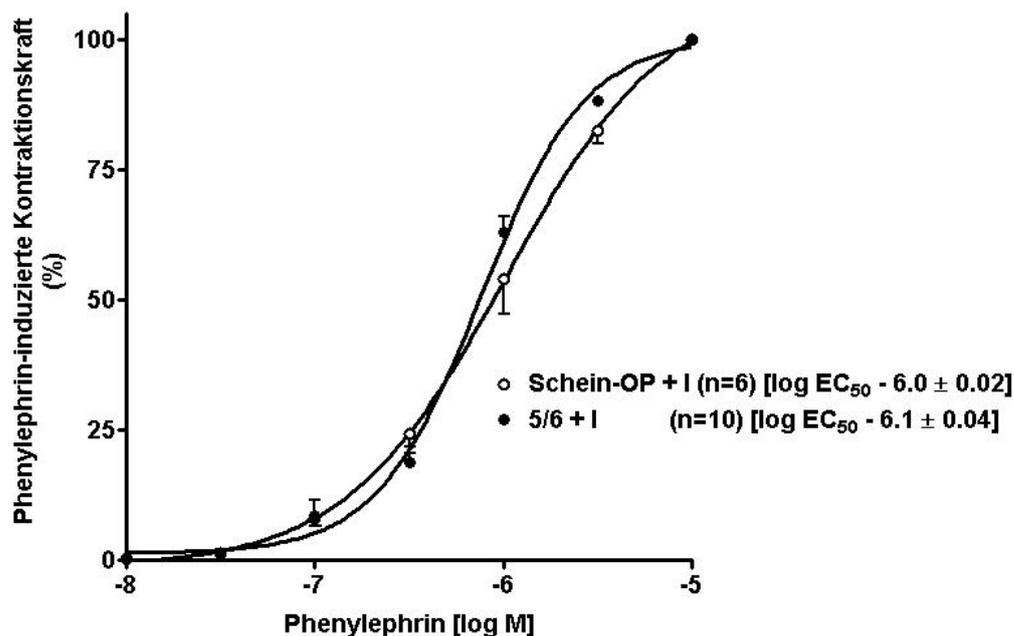


Abbildung 11: Kontraktionsfähigkeit (%) der Gefäße (Mäuse mit Imatinib)

Bei steigender Konzentration Phenylephrin Gefäße von schein-operierten Mäusen und Gefäße von 5/6-nephrektomierten Mäusen jeweils mit Imatinib-Gabe im Vergleich. Der $\log EC_{50}$ gibt die Konzentration von Phenylephrin an, bei der es zur 50 %igen Kontraktion der Gefäße kommt. Die Werte sind angegeben als Mittelwerte \pm SEM. Es gibt keine signifikanten Unterschiede ($p=0,68$).

3.4.2. Endothelabhängige Relaxationsfähigkeit der Gefäße

Die Messung der endothelabhängigen Relaxationsfähigkeit der Gefäße wurde mit steigenden Konzentrationen Carbachol im Organbad nach Vorkontraktion mit Phenylephrin durchgeführt. Verglichen wurden die Gefäße von 5/6-nephrektomierten Mäusen ($n=11$) und schein-operierten Mäusen ($n=6$) jeweils ohne Imatinib-Gabe (Abb. 12) und die Gefäße von 5/6-nephrektomierten Mäusen ($n=8$) und schein-operierten Mäusen ($n=5$) jeweils mit Imatinib-Gabe (Abb. 13). Auch hier wurde

zusätzlich zur Darstellung der Relaxationsfähigkeit in einer nicht-linearen Regressionskurve der $\log EC_{50}$ -Wert berechnet. Er gibt an, bei welcher Konzentration von Carbachol die halbmaximale (50 %ige) Relaxationsfähigkeit der Gefäße erreicht ist. Bei den Gefäßen der schein-operierten Tiere ohne Imatinib-Gabe reichte eine Konzentration von $\log -7,3 \pm 0,05$ M Carbachol im Organbad aus, um eine halbmaximale Relaxationsfähigkeit zu erreichen. Bei den Gefäßen der 5/6-nephrektomierten Tiere ohne Imatinib-Gabe war dazu eine Konzentration von $\log -6,9 \pm 0,06$ M Carbachol im Organbad nötig. Dies zeigt einen signifikanten Unterschied mit $p=0,016$ (Abb. 12).

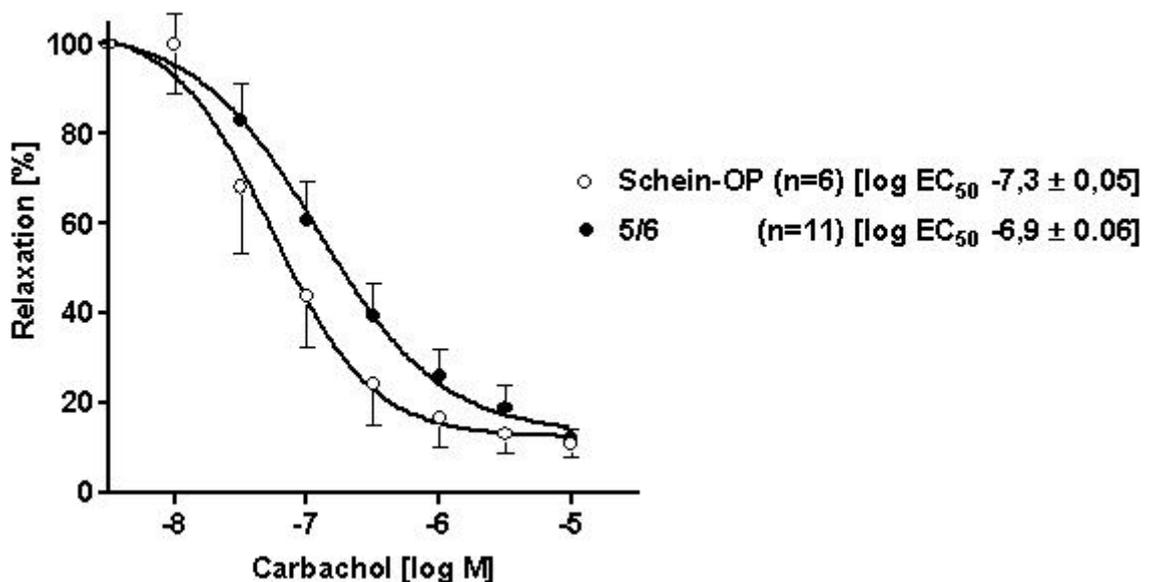


Abbildung 12: Endothelabhängige Relaxationsfähigkeit (%) der Gefäße (Mäuse ohne Imatinib)

Bei steigender Konzentration Carbachol (log M) Gefäße von schein-operierten Tieren und Gefäße von 5/6-nephrektomierten Tieren, jeweils ohne Imatinib-Gabe im Vergleich. Der $\log EC_{50}$ gibt die Konzentration von Carbachol an, bei der es zur 50 %igen Relaxation der Gefäße kommt. Die Werte sind angegeben als Mittelwerte \pm SEM. Es gibt einen signifikanten Unterschied mit $p=0,016$.

Keine signifikanten Unterschiede zeigten sich zwischen der Relaxationsfähigkeit der Gefäße von 5/6-nephrektomierten Tieren und schein-operierten Tieren jeweils mit Imatinib-Gabe. Für letztere war eine Konzentration von $\log -6,8 \pm 0,04$ M Carbachol im Organbad zur halbmaximalen Relaxation nötig, für die Gefäße der 5/6-nephrektomierten Tiere mit Imatinib-Gabe eine Konzentration von $\log -7,0 \pm 0,04$ M (Abb. 13).

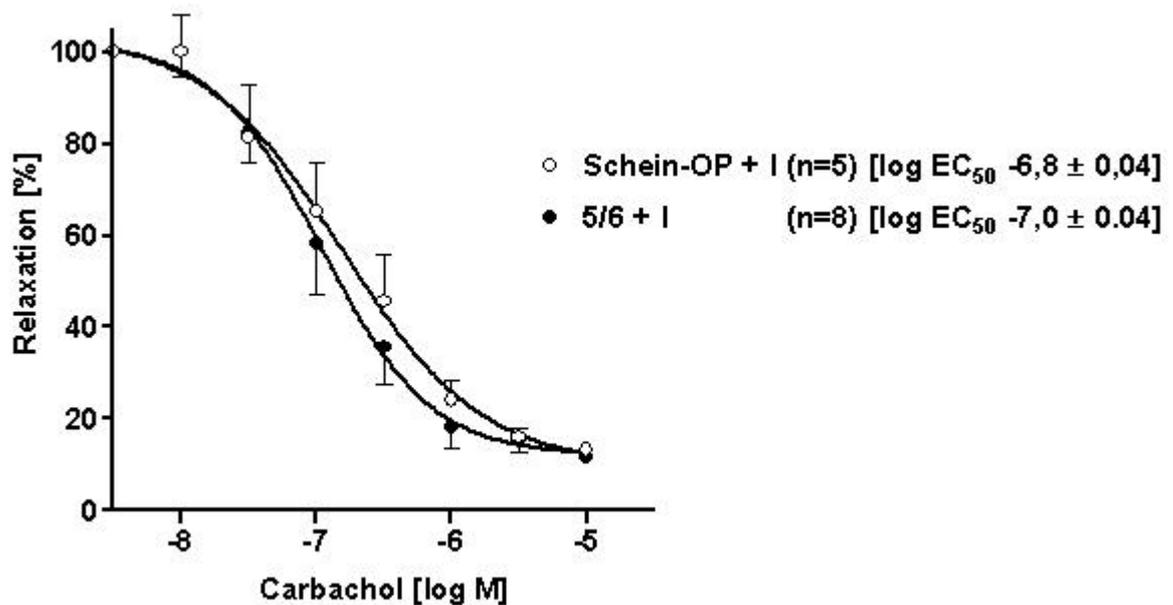


Abbildung 13: Endothelabhängige Relaxationsfähigkeit (%) der Gefäße (Mäuse mit Imatinib)

bei steigender Konzentration Carbachol (log M). Im Vergleich Gefäße von schein-operierten Mäusen und Gefäße von 5/6-nephrektomierten Mäusen, jeweils mit Imatinib-Gabe. Der $\log EC_{50}$ -Wert gibt die Konzentration von Carbachol an, bei der es zur 50 %igen Relaxation der Gefäße kommt. Die Werte sind angegeben als Mittelwerte \pm SEM. Es gibt keinen signifikanten Unterschied ($p=0,35$).

3.4.3. Endothelunabhängige Relaxationsfähigkeit der Gefäße

Die Messung der endothelunabhängigen Relaxationsfähigkeit der Gefäße wurde mit steigenden Konzentrationen Isoprenalin im Organbad nach Vorkontraktion mit Phenylephrin durchgeführt. Verglichen wurden die Gefäße von 5/6-nephrektomierten Mäusen (n=13) und schein-operierten Mäusen (n=7) jeweils ohne Imatinib-Gabe (Abb. 14) und die Gefäße von 5/6-nephrektomierten Mäusen (n=10) und schein-operierten Mäusen (n=6) jeweils mit Imatinib-Gabe (Abb. 15).

Bei der endothelunabhängigen Relaxationsfähigkeit der Gefäße zeigten sich keine signifikanten Unterschiede, das heißt die endothelunabhängige Relaxationsfähigkeit der Gefäße von schein-operierten Tieren und von 5/6-nephrektomierten Tieren war gleich (Abb.14) und die endothelunabhängige Relaxationsfähigkeit der Gefäße von schein-operierten Tieren und 5/6-nephrektomierten Tieren jeweils mit Imatinib-Gabe war gleich (Abb.15).

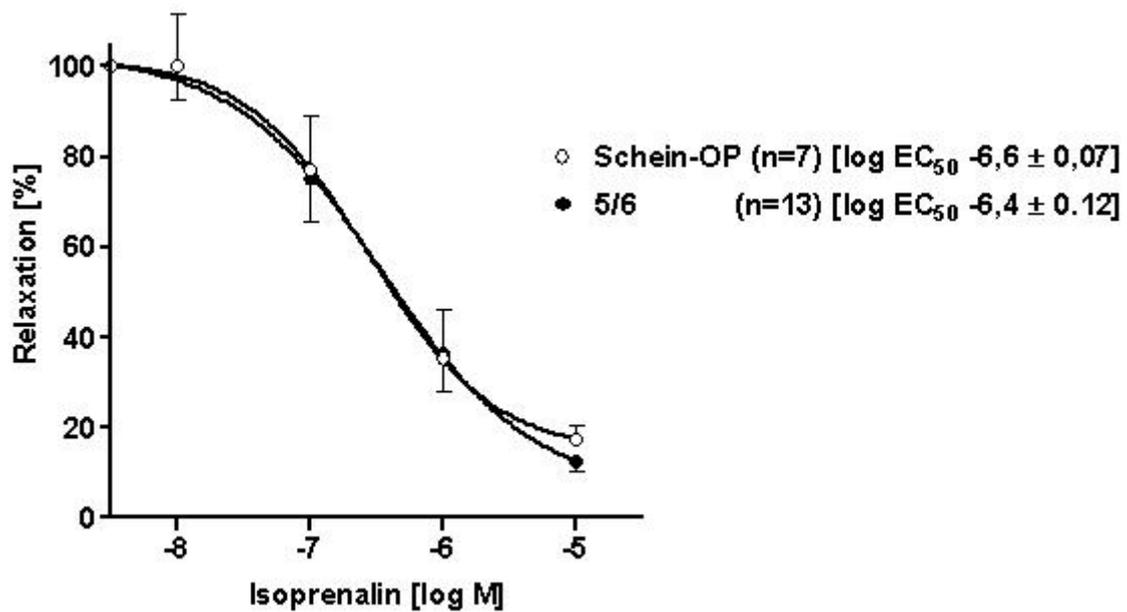


Abbildung 14: Endothelunabhängige Relaxationsfähigkeit (%) der Gefäße (Mäuse ohne Imatinib)

Bei steigender Konzentration von Isoprenalin (log M) Gefäße von schein-operierten Tieren und Gefäße von 5/6-nephrektomierten Tieren ohne Imatinib-Gabe im Vergleich. Es gibt keine signifikanten Unterschiede ($p=0,79$).

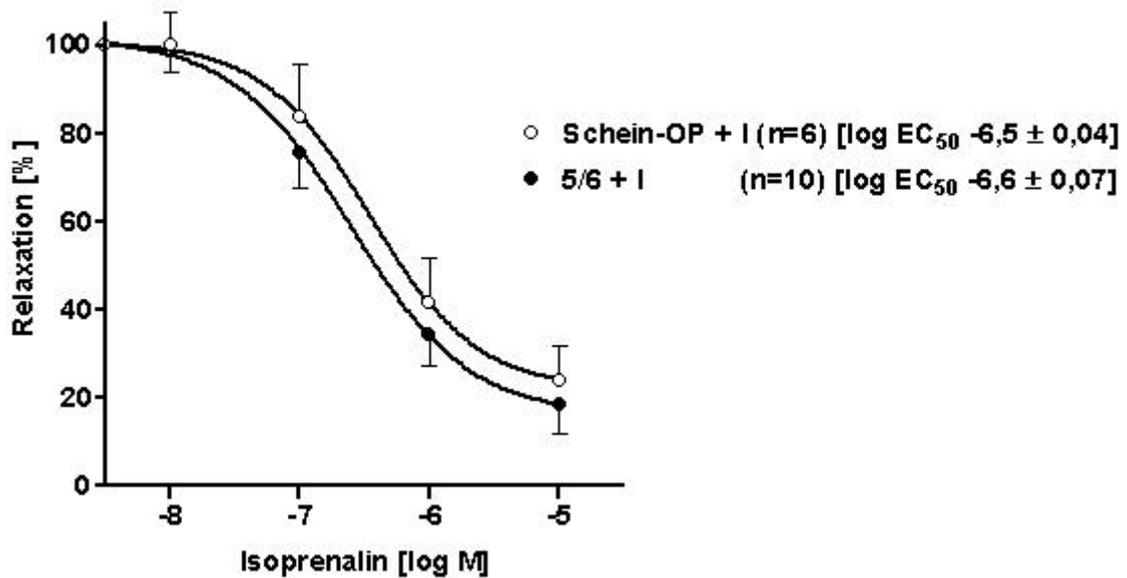


Abbildung 15: Endothelunabhängige Relaxationsfähigkeit (%) der Gefäße (Mäuse mit Imatinib).

Bei steigender Konzentration von Isoprenalin (log M) Gefäße von scheinoperierten Tieren und Gefäße von 5/6-nephrektomierten Tieren jeweils mit Imatinib-Gabe im Vergleich. Es gibt keine signifikanten Unterschiede ($p=0,11$).

3.5. β -Rezeptorendichte im Herz

Die β -Rezeptorendichte wurde im linken und rechten Ventrikel der Mäuseherzen bestimmt. Es gab weder im linken noch im rechten Ventrikel signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen.

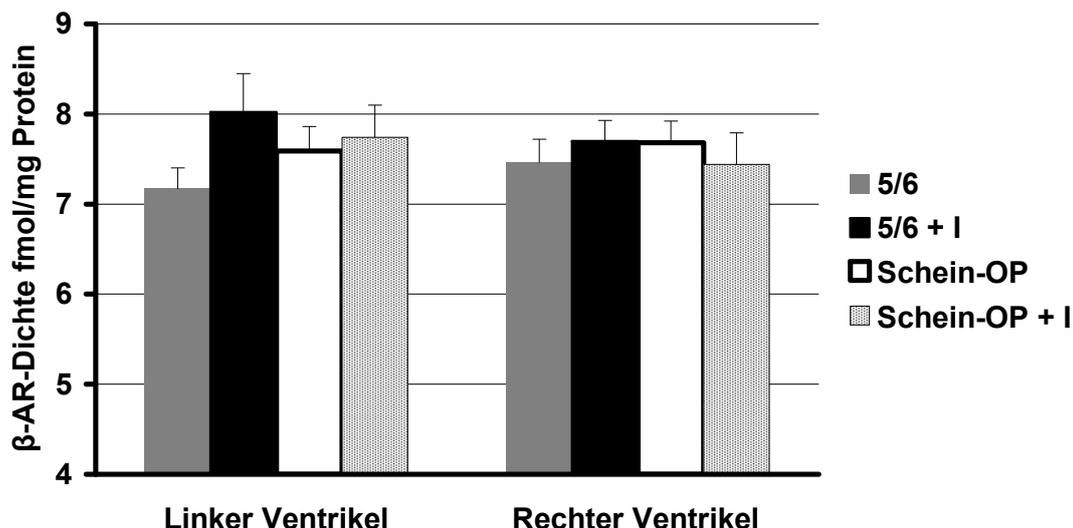


Abbildung 16: β -Rezeptorendichte im linken und rechten Ventrikel der Herzen von 5/6-nephrektomierten Mäusen ohne (5/6, n=20) und mit (5/6 + I, n=19) Imatinib-Gabe und schein-operierten Mäusen ohne (Schein-OP, n=14) und mit (Schein-OP + I, n=14) Imatinib-Gabe nach 8 Wochen; Werte sind Mittelwerte \pm SEM [fmol/mg Protein].

Im linken Ventrikel betrug die β -Rezeptorendichte der 5/6-nephrektomierten Mäuse $7,17 \pm 0,23$ fmol/mg, der 5/6-nephrektomierten Mäuse mit Imatinib-Gabe $8,02 \pm 0,43$ fmol/mg, der schein-operierten Mäuse $7,59 \pm 0,27$ fmol/mg und der schein-operierten Mäuse mit Imatinib-Gabe $7,74 \pm 0,36$ fmol/mg (Abb. 16). Es gab keine signifikanten Unterschiede (5/6 vs. Schein-OP: $p=0,24$, 5/6 vs. 5/6 + I: $p=0,09$).

Im rechten Ventrikel betrug die β -Rezeptorendichte der 5/6-nephrektomierten Mäuse $7,46 \pm 0,26$ fmol/mg, der 5/6-nephrektomierten Mäuse mit Imatinib-Gabe $7,7 \pm 0,23$ fmol/mg, der schein-operierten Mäuse $7,68 \pm 0,24$ fmol/mg und der schein-operierten Mäuse mit Imatinib-Gabe $7,44 \pm 0,35$ fmol/mg (Abb. 16). Auch hier gab es keine signifikanten Unterschiede (5/6 vs. Schein-OP: $p=0,53$, 5/6 vs. 5/6+I: $p=0,49$).

3.6. Echokardiografie-Ergebnisse

3.6.1. Endsystolisches Volumen

Echokardiografisch wurden Parameter gemessen, mit denen über eine Berechnungsformel das Blutvolumen am Ende der Systole im linken Ventrikel bestimmt werden konnte (s. 3.3.11.2). Das endsystolische Blutvolumen war in allen Gruppen gleich.

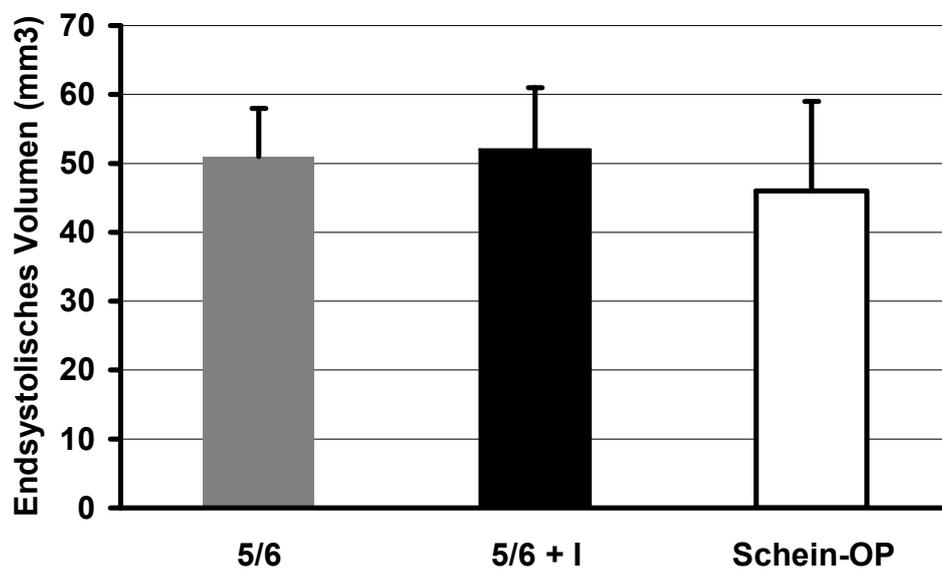


Abbildung 17: Endsystolisches Volumen im linken Ventrikel (mm³) von 5/6-nephrektomierten Mäusen ohne (5/6, n=10) und mit (5/6 + I, n=9) Imatinib-Gabe und schein-operierten Mäusen (Schein-OP, n=8). Werte sind Mittelwerte ± SEM. Es gibt keine signifikanten Unterschiede.

Im linken Ventrikel der 5/6-nephrektomierten Mäuse betrug das endsystolische Volumen $51 \pm 7 \text{ mm}^3$, im linken Ventrikel der 5/6-nephrektomierten Mäuse mit Imatinib-Gabe war das endsystolische Volumen $52 \pm 9 \text{ mm}^3$ und im linken Ventrikel der schein-operierten Mäuse $46 \pm 13 \text{ mm}^3$ groß. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Abb. 17).

3.6.2. Enddiastolisches Volumen

Das enddiastolische Blutvolumen im linken Ventrikel wurde, wie das endsystolische Volumen, anhand echokardiografisch ermittelter Parameter über eine Berechnungsformel bestimmt (s. 3.3.11.2).

In den linken Ventrikeln der 5/6-nephrektomierten Mäusen war das enddiastolische Volumen $70 \pm 8 \text{ mm}^3$ groß, die 5/6-nephrektomierten Mäuse mit Imatinib-Gabe hatten ein enddiastolisches Blutvolumen im linken Ventrikel von $65 \pm 11 \text{ mm}^3$. Im linken Ventrikel der schein-operierten Mäuse betrug das enddiastolische Volumen $92 \pm 23 \text{ mm}^3$. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen gefunden werden (Abb. 18).

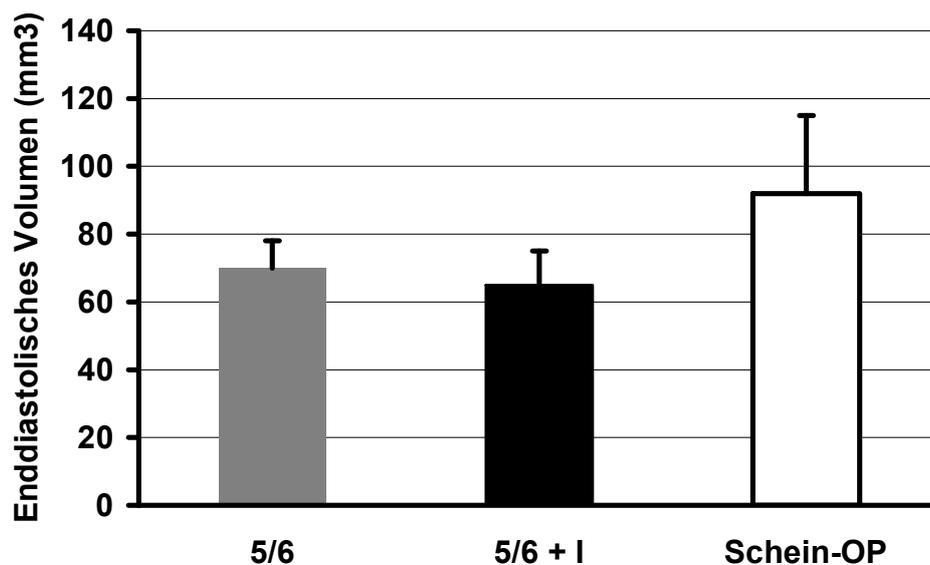


Abbildung 18: Enddiastolisches Volumen im linken Ventrikel (mm³) von 5/6-nephrektomierten Mäusen ohne (5/6, n=10) und mit (5/6 + I, n=9) Imatinib-Gabe und von schein-operierten Mäusen (Schein-OP, n=6). Werte sind Mittelwerte \pm SEM. Es gibt keine signifikanten Unterschiede.

3.6.3. Schlagvolumen

Das Schlagvolumen des linken Ventrikels der Mäuse wurde anhand echokardiografisch ermittelter Parameter berechnet (s. 3.3.11.2).

Die 5/6-nephrektomierten Mäuse hatten ein Schlagvolumen des linken Ventrikels von $18 \pm 2 \text{ mm}^3$, die 5/6-nephrektomierten Mäuse von $13 \pm 2 \text{ mm}^3$. Das Schlagvolumen der linken Ventrikel von schein-operierten Mäusen war mit $36 \pm 9 \text{ mm}^3$ scheinbar größer, es zeigten sich aber keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (5/6 vs. Schein-OP: $p=0,12$; 5/6 vs. 5/6 + I: $p=0,06$; 5/6 + I vs. Schein-OP: $p=0,06$) (Abb. 19).

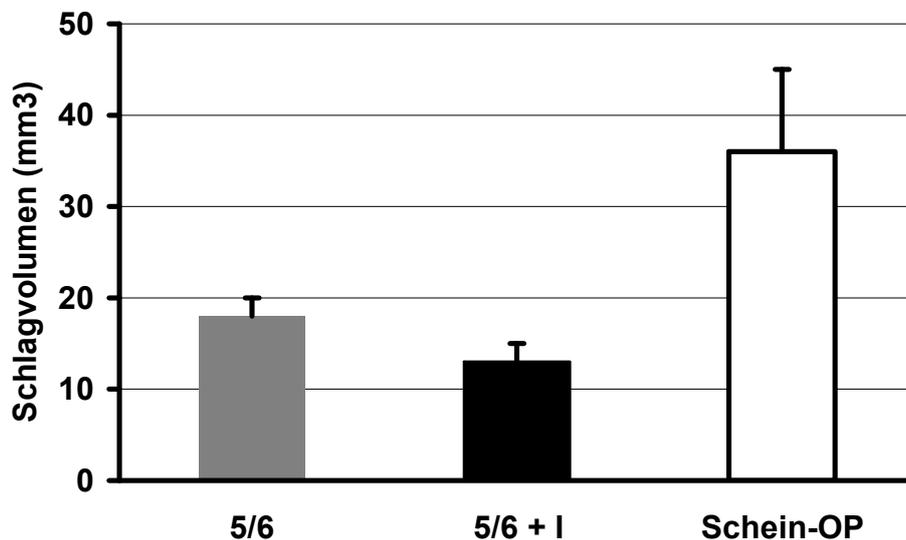


Abbildung 19: Schlagvolumen des linken Ventrikels (mm^3) von 5/6-nephrektomierten Mäusen ohne (5/6, $n=10$) und mit (5/6 + I, $n=9$) Imatinib-Gabe und von schein-operierten Mäusen (Schein-OP, $n=6$). Werte sind Mittelwerte \pm SEM. Es gibt keine signifikanten Unterschiede.

3.6.4. Ejektionsfraktion

Die Ejektionsfraktion des linken Ventrikels wurde anhand einer Formel mit echokardiografisch ermittelten Parametern berechnet. Es zeigte sich eine signifikant verminderte Ejektionsfraktion des linken Ventrikels von Mäusen, die einer 5/6-Nephrektomie unterzogen worden waren, verglichen mit den schein-operierten Mäusen. Bei den schein-operierten Mäusen wurde eine Ejektionsfraktion von $38,8 \pm 4,4$ % ermittelt. Die 5/6-nephrektomierten Mäuse hatten eine Ejektionsfraktion von $26,1 \pm 2,8$ % ($p=0,04$ vs. Schein-OP), die 5/6-nephrektomierten Mäuse mit Imatinib-Gabe hatten eine Ejektionsfraktion von $18,6 \pm 2,6$ % ($p=0,005$ vs. Schein-OP) (Abb. 20).

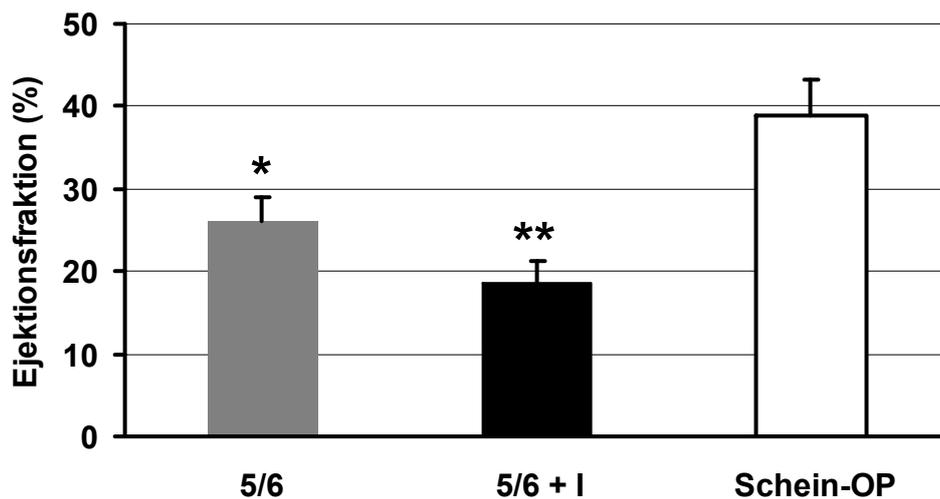


Abbildung 20: Ejektionsfraktion (%) des linken Ventrikels von 5/6-nephrektomierten Mäusen ohne (5/6, n=8) und mit (5/6 + I, n=5) Imatinib-Gabe und von schein-operierten (Schein-OP, n=6) Mäusen. Werte sind Mittelwerte \pm SEM. * $p<0,05$ und ** $p<0,01$ vs. Schein-OP.

3.6.5. Verkürzungsfraction

Die Verkürzungsfraction der linken Ventrikel wurde durch Berechnung mit echokardiografisch ermittelten Parametern bestimmt. Die Verkürzungsfraction der linken Ventrikel von schein-operierten Mäusen betrug $21,6 \pm 4,7$ %. Die Verkürzungsfraction von 5/6-nephrektomierten Mäusen ohne Imatinib-Gabe betrug $11,1 \pm 2,4$ %, die Verkürzungsfraction der 5/6-nephrektomierten Mäuse mit Imatinib-Gabe betrug $8,4 \pm 2,7$ %. Es zeigten sich signifikant niedrigere Werte für die 5/6-nephrektomierten Mäuse ohne Imatinib-Gabe ($p=0,04$) und für die 5/6-nephrektomierten Mäuse mit Imatinib-Gabe ($p=0,03$) gegenüber den schein-operierten Mäusen (Abb. 21).

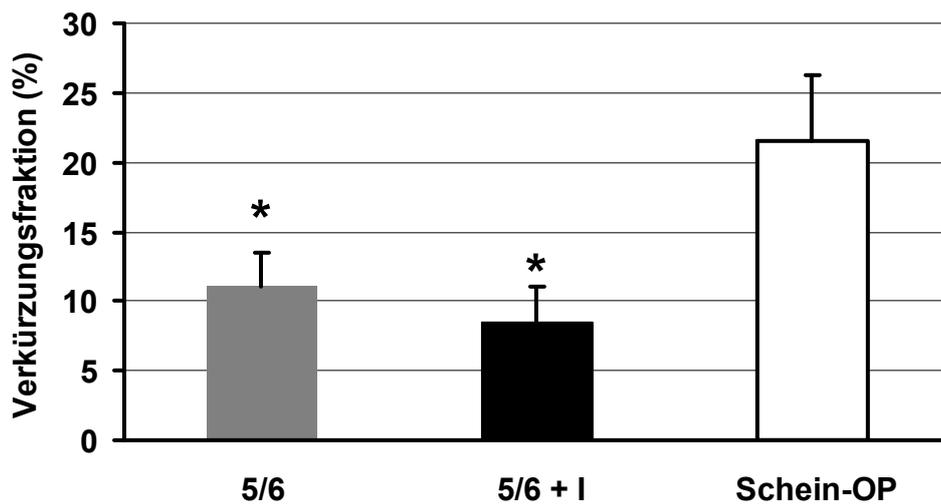


Abbildung 21: Verkürzungsfraction (%) des linken Ventrikels von 5/6-nephrektomierten Mäusen ohne (5/6, n=10) und mit (5/6 + I, n=6) Imatinib-Gabe und von schein-operierten (Schein-OP, n=6) Mäusen. Werte sind Mittelwerte \pm SEM. * $p<0,05$ vs. Schein-OP.

3.6.6. Dicke der Vorderwand

Die Dicke der Vorderwand des linken Ventrikels wurde echokardiografisch bestimmt. Es wurde die kleinste Dicke während der Diastole und die größte Dicke während der Systole gemessen. In der Diastole hatte die Vorderwand des linken Ventrikels von schein-operierten Mäusen eine Dicke von $0,91 \pm 0,08$ mm, in der Systole war die Vorderwand dieser Mäuse $1,11 \pm 0,11$ mm dick. Bei 5/6-nephrektomierten Mäusen hatte die Vorderwand des linken Ventrikels in der Diastole eine Dicke von $0,85 \pm 0,06$ mm, beziehungsweise $1,12 \pm 0,11$ mm in der Systole. Die Vorderwand des linken Ventrikels war bei 5/6-nephrektomierten Mäusen mit Imatinib-Gabe in der Diastole $0,93 \pm 0,08$ mm und in der Systole $1,12 \pm 0,10$ mm dick. Die Dicke der Vorderwand war sowohl während der Diastole als auch während der Systole in allen Gruppen gleich groß, es gab keine signifikanten Unterschiede (Abb. 22).

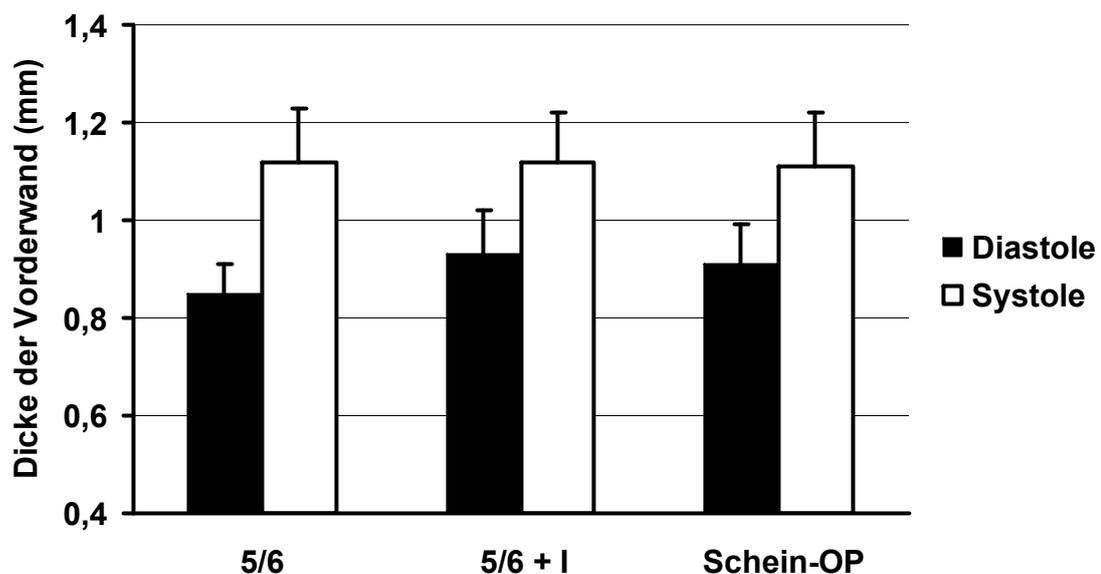


Abbildung 22: Dicke der Vorderwand des linken Ventrikels (mm) in Diastole (schwarze Balken) und Systole (weiße Balken) 24 Wochen nach Operation von 5/6-nephrektomierten Mäusen ohne (5/6, n=11) und mit (5/6 + I, n=11) Imatinib-Gabe und von schein-operierten Mäusen (Schein-OP, n=8). Werte sind Mittelwerte \pm SEM. Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen.

3.6.7. Dicke der Hinterwand

Die Dicke der Hinterwand des linken Ventrikels wurde echokardiografisch bestimmt. Es wurde die kleinste Dicke während der Diastole und die größte Dicke während der Systole gemessen. In der Diastole hatte die Hinterwand des linken Ventrikels von schein-operierten Mäusen eine Dicke von $1,06 \pm 0,09$ mm, in der Systole war die Hinterwand dieser Mäuse $1,27 \pm 0,13$ mm dick. Bei 5/6-nephrektomierten Mäusen ohne Imatinib-Gabe hatte die Hinterwand des linken Ventrikels in der Diastole eine Dicke von $1,06 \pm 0,09$ mm, beziehungsweise $1,19 \pm 0,09$ mm in der Systole. Die Hinterwand des linken Ventrikels war bei 5/6-nephrektomierten Mäusen mit Imatinib-Gabe in der Diastole $1,08 \pm 0,09$ mm und in der Systole $1,24 \pm 0,10$ mm dick. Die Dicke der Hinterwand war sowohl während der Diastole als auch während der Systole in allen Gruppen gleich groß, es gab keine signifikanten Unterschiede (Abb. 23).

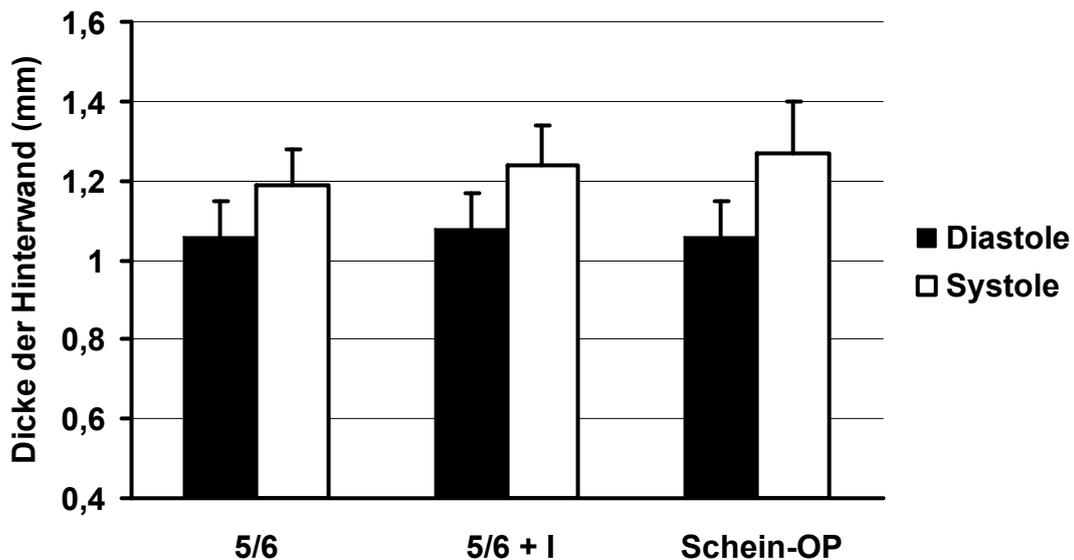


Abbildung 23: Dicke der Hinterwand des linken Ventrikels (mm) in Diastole (schwarze Balken) und Systole (weiße Balken) 24 Wochen nach Operation von 5/6-nephrektomierten Mäusen ohne (5/6, n=11) und mit (5/6 + I, n=11) Imatinib-Gabe und von schein-operierten Mäusen (Schein-OP, n=8). Werte sind Mittelwerte \pm SEM. Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen.

3.7. Lipidperoxidation im Herz

Die Lipidperoxidation wurde 8 und 24 Wochen nach Operation in den Herzen von 5/6-nephrektomierten Mäusen ohne (n=5-6) und mit (n=5-6) Imatinib-Gabe, und von schein-operierten Mäusen (n=6) untersucht. Da Malondialdehyd (MDA) das Hauptoxidiationsprodukt ist, wurden die Ergebnisse in μg MDA pro g Herzgewebe angegeben.

Nach 8 Wochen war die Lipidperoxidation in den Herzen der 5/6-nephrektomierten Mäusen größer als in den Herzen der schein-operierten Mäuse ($90,6 \pm 6,0 \mu\text{M}$ vs. $52,1 \pm 7,2 \mu\text{M}$, $p < 0,01$). Auch die Herzen der 5/6-nephrektomierten Mäuse mit Imatinib-Gabe zeigten nach 8 Wochen eine höhere Lipidperoxidation als die schein-operierten Mäuse ($80,9 \pm 9,5 \mu\text{M}$ vs. $52,1 \pm 7,2 \mu\text{M}$, $p < 0,05$). 24 Wochen nach Operation ließen sich keine signifikanten Unterschiede bei der Lipidperoxidation in den Herzen der Gruppen feststellen (Schein-OP: $72,9 \pm 5,2 \mu\text{M}$ vs. 5/6: $96,4 \pm 11,5 \mu\text{M}$ ($p = 0,12$) und Schein-OP vs. 5/6 + I: $85,3 \pm 7,7 \mu\text{M}$ ($p = 0,22$)) (Abb. 24).

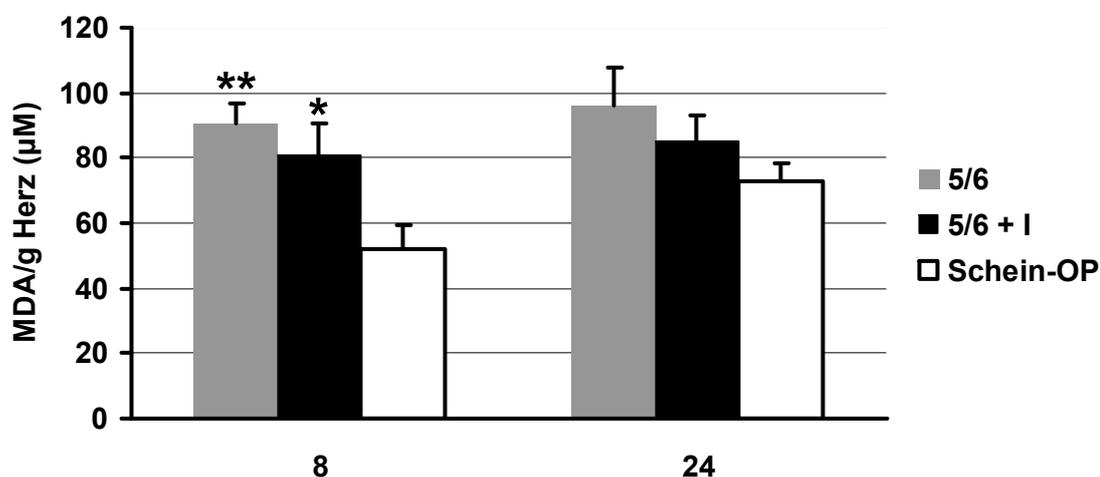


Abbildung 24: Lipidperoxidation im Herz

8 und 24 Wochen nach Operation Werte von 5/6-nephrektomierten Mäusen ohne (5/6, n=5-6) und mit (5/6 + I, n=6) Imatinib-Gabe und von schein-operierten Mäusen (Schein-OP, n=6). Werte sind Mittelwerte \pm SEM. ** $p < 0,01$ und * $p < 0,05$ vs. Schein-OP nach 8 Wochen.

3.8. Histologische Auswertungen

3.8.1. Kardiomyozytengröße

Im linken Ventrikel der Herzen wurde nach 24 Wochen im Lichtmikroskop mit Hilfe eines Computerprogramms die Größe der Kardiomyozyten gemessen.

Die Kardiomyozyten im linken Ventrikel der Herzen von 5/6-nephrektomierten Mäusen hatten eine Größe von $480,6 \pm 29,9 \mu\text{m}^2$. Die Kardiomyozyten der schein-operierten Mäuse waren $435,9 \pm 24,5 \mu\text{m}^2$ groß. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen ihnen ($p=0,27$). Die Kardiomyozytengröße der 5/6-nephrektomierten Mäuse mit Imatinib-Gabe betrug $439,7 \pm 35,6 \mu\text{m}^2$. Sie unterschied sich nicht signifikant von den 5/6-nephrektomierten Mäusen ($p=0,40$) und unterschied sich nicht signifikant von den schein-operierten Mäusen ($p=0,93$) (Abb. 25).

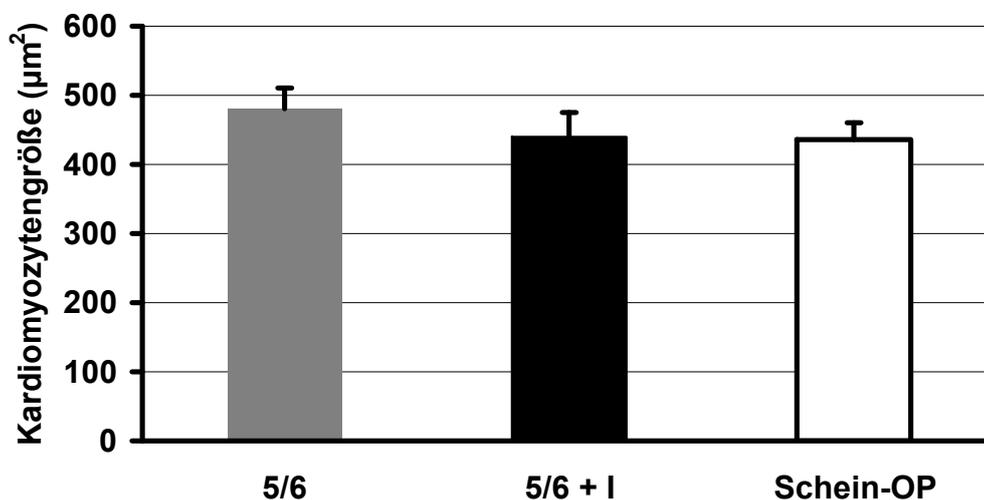


Abbildung 25: Kardiomyozytengröße im linken Ventrikel der Herzen

5/6-nephrektomierte Mäuse ohne (5/6, n=7) und mit (5/6 + I, n=6) Imatinib-Gabe und schein-operierte Mäuse (Schein-OP, n=7). Werte sind Mittelwerte \pm SEM. Es gibt keine signifikanten Unterschiede.

3.8.2. Fibrosedichte

Im linken Ventrikel der Herzen wurde nach 24 Wochen im Lichtmikroskop an Siriusrot-gefärbten Gewebeschnitten mit Hilfe eines Computerprogramms die Fibrosedichte bestimmt. Bilder der Siriusrot-Färbung sind in Abbildung 26 und 27 zu sehen. Der Hauptbestandteil von Fibrose, einer Vermehrung des Bindegewebes, sind Kollagenfasern. Die Fibrosedichte ist daher angegeben als prozentualer Anteil der Kollagenfläche an der Gesamtgewebsfläche im transversalen Schnitt des Herzgewebes (%).

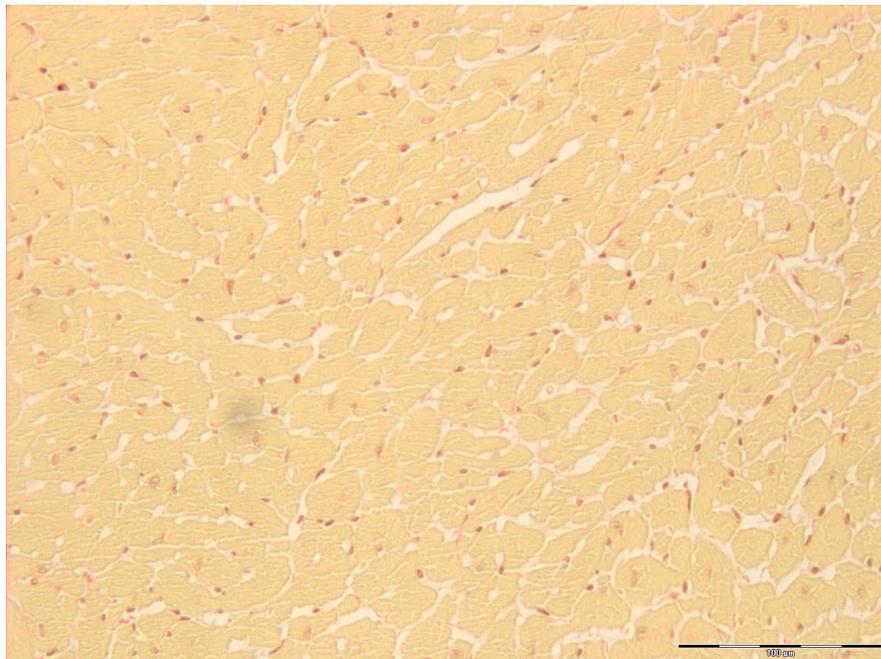


Abbildung 26: Siriusrotfärbung linker Ventrikel einer schein-operierten Maus
Transversaler Schnitt durch das Herz einer schein-operierten Maus 24 Wochen nach Operation. Kollagenfasern sind rot, Zytoplasma gelb und Zellkerne braun gefärbt. Der Eichbalken im Bild rechts unten hat eine Länge von 100 µm.

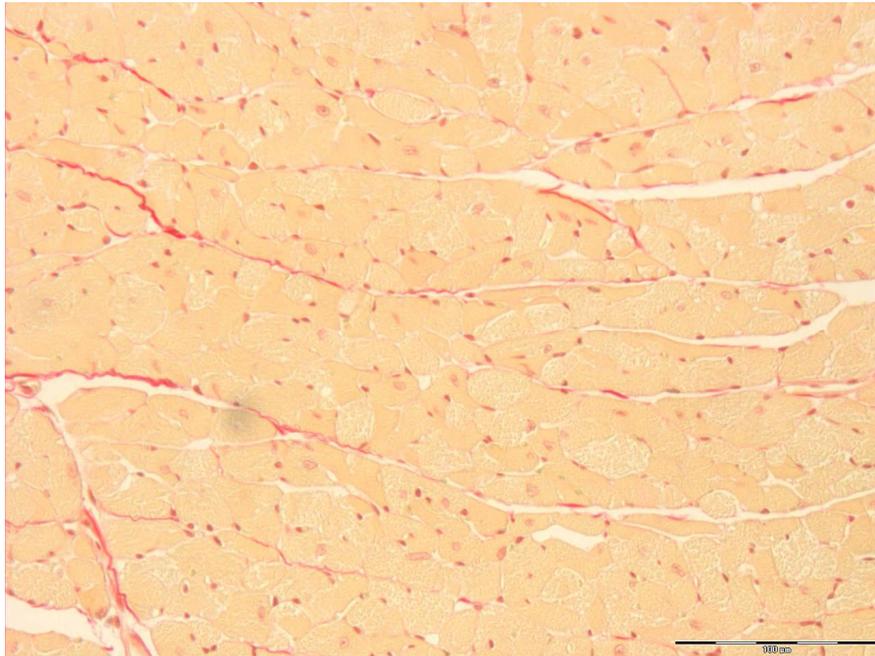


Abbildung 27: Siriusrotfärbung linker Ventrikel einer 5/6-nephrektomierten Maus
Transversaler Schnitt durch das Herz einer 5/6-nephrektomierten Maus
24 Wochen nach Operation. Kollagenfasern sind rot, Zytoplasma gelb und
Zellkerne braun gefärbt. Der Eichbalken im Bild rechts unten hat eine Länge von
100 μm.

Die Fibrosedichte im linken Ventrikel der 5/6-nephrektomierten Mäuse betrug $5,50 \pm 0,18$ %. Die Fibrosedichte im linken Ventrikel der schein-operierten Mäuse betrug $2,52 \pm 0,34$ %. Hier gab es einen signifikanten Unterschied mit $p < 0,001$. Die Fibrosedichte im linken Ventrikel der 5/6-nephrektomierten Mäuse mit Imatinib-Gabe war $3,52 \pm 0,52$ %. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zu den 5/6-nephrektomierten Mäusen ohne Imatinib-Gabe mit $p = 0,016$. Keinen signifikanten Unterschied in der Fibrosedichte des Herzens gab es zwischen den 5/6-nephrektomierten Mäusen mit Imatinib-Gabe und den schein-operierten Mäusen (Abb. 28).

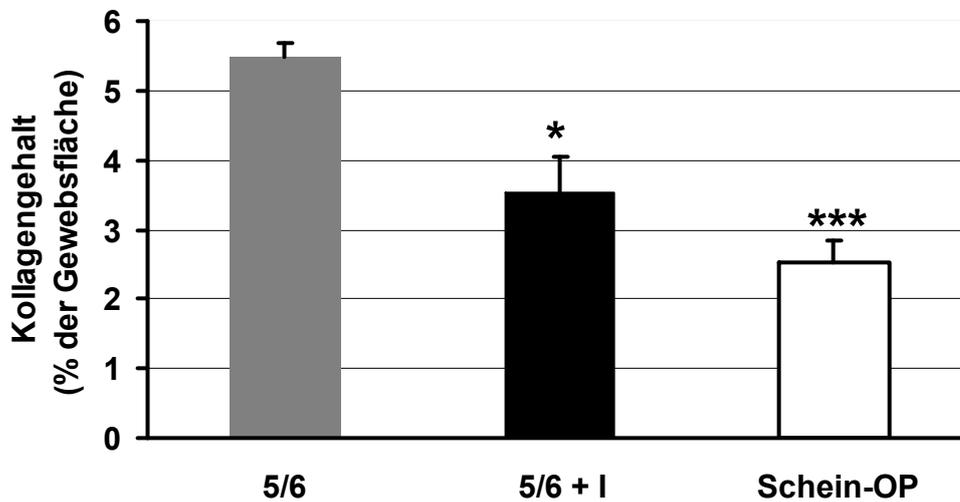


Abbildung 28: Fibrosedichte im linken Ventrikel der Herzen

Die Fibrosedichte ist quantifiziert als prozentualer Anteil der Kollagenfläche an der Gesamtgewebsfläche. Nach 24 Wochen Herzen von 5/6-nephrektomierten Mäusen ohne (n=7) und mit (n=5) Imatinib-Gabe und schein-operierten Mäusen (n=7), Werte sind Mittelwerte \pm SEM. *p=0,016 vs. 5/6 und ***p<0,001 vs. 5/6. Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen 5/6 + I und Schein-OP.

4. DISKUSSION

4.1. Merkmale der chronischen Niereninsuffizienz nach 5/6-Nephrektomie im Mausmodell

Eine 5/6-Nephrektomie führt zu dem Krankheitsbild der chronischen Niereninsuffizienz. Dies ist bereits in mehreren Studien nachgewiesen worden. Hauptsächlich wurde dieses Nierenreduktionsmodell bisher an Ratten durchgeführt, seltener mit Mäusen. Aber auch Studien zur chronischen Niereninsuffizienz an Kaninchen (de Kimpe, 1999) Hunden (Rutherford et al, 1977) und Schweinen (Ravnskov, 1975) nutzten das Modell der 5/6-Nephrektomie. Wir haben uns für die Maus entschieden, weil sie ein wichtiger Bestandteil in der labor-experimentellen Erforschung von Krankheiten ist und bisher nicht ausführlich zur Untersuchung der chronischen Niereninsuffizienz herangezogen wurde.

Die chronische Niereninsuffizienz wird anhand verschiedener Parameter diagnostiziert. Dazu gehören die Polyurie, die durch eine eingeschränkte Konzentrationsfähigkeit der Nieren entsteht, die Anreicherung von Stoffwechselabbauprodukten wie Kreatinin und Harnstoff im Blut, ein vermehrtes Ausscheiden von Protein im Urin bei gleichzeitig vermindertem Ausscheiden der harnpflichtigen Substanzen wie Kreatinin und Harnstoff und eine verminderte glomeruläre Filtrationsrate (GFR), welche sich in der Kreatinin-Clearance widerspiegelt (Al Banchaabouchi, 1998). In den Experimenten der vorliegenden Arbeit konnten an Mäusen des Stamms Balb/c nach 5/6-Nephrektomie Merkmale der chronischen Niereninsuffizienz nachgewiesen werden. Dies waren eine erhöhte Urinmenge, eine erhöhte Harnstoffkonzentration im Serum und verminderte Kreatinin- und Harnstoffkonzentration im Urin.

Die Urinmenge war nach 5/6-Nephrektomie deutlich erhöht. Es kam zu einer Verdreifachung der ausgeschiedenen Urinmenge der nephrektomierten Mäuse im Vergleich zu den schein-operierten Mäusen. Dies stellte auch Gagnon 1988 in einer Studie zur chronischen Niereninsuffizienz fest. Allerdings wurde ein anderes Nierenreduktionsmodell genutzt, die rechte Nierenrinde wurde durch Elektrokoagulation vermindert bei vollständiger Nephrektomie der linken Niere. Als Kontrollgruppen wurden schein-operierte Mäuse und zusätzlich nicht-behandelte Mäuse eingesetzt. In dem Modell kam es zu einer deutlichen Zunahme der

Urinmenge. Die niereninsuffizienten Mäuse gaben im Vergleich zu den scheinoperierten Mäusen 36 % mehr Urin ab, im Vergleich zu den nicht-behandelten Mäusen die doppelte Menge Urin (Gagnon, 1988). Auch Al Banchaabouchi et al. stellten eine deutliche Polyurie von nephrektomierten Mäusen im Vergleich zu scheinoperierten Mäusen fest. Die abgesetzte Urinmenge war etwa viermal so groß (Al Banchaabouchi, 1998).

Die Untersuchung der Kreatinin- und Harnstoffkonzentration im Serum der Mäuse brachte folgende Ergebnisse: Die Harnstoffkonzentration war im Serum bei den nephrektomierten Mäusen sowohl nach 8 als auch nach 24 Wochen signifikant gegenüber den scheinoperierten Mäusen erhöht. Die Kreatininkonzentration im Serum aber zeigte bei den nephrektomierten Mäusen im Vergleich zu den scheinoperierten Mäusen nach 8 Wochen keinen Unterschied, nach 24 Wochen einen, zwar signifikanten, aber nur leichten Anstieg. Kreatinin- und Harnstoffkonzentration im Serum sind wichtige Laborparameter in der Diagnostik von Nierenerkrankungen beim Menschen. Die Kreatininkonzentration im Serum hat dabei eine bedeutendere Rolle als die Serumharnstoffkonzentration. Bei der Maus ist dies genau umgekehrt der Fall. Hier kommt der Harnstoffkonzentration in Serum und Urin eine größere Bedeutung zu als den Kreatininkonzentrationen. Mäuse haben sehr niedrige Serumkreatinin-Normalwerte, sie liegen im Bereich von 0,1 mg/dl oder darunter (Gagnon, 1990). Viele Analyseautomaten, die für menschliche Laborproben entwickelt wurden, haben ihre untere Nachweisgrenze für Kreatinin jedoch bei einer Konzentration von etwa 0,4 mg/dl, sodass die niedrigen Konzentrationen Kreatinin im Mäuseserum nur sehr unzuverlässig bestimmt werden können. Darum können Serumkreatininkonzentrationen nicht zum Nachweis einer reduzierten Nierenfunktion bei Mäusen herangezogen werden (Gagnon, 1990). Auch Gibb verwies bereits 1985 darauf, dass zur Diagnostik der Nierenfunktion bei Mäusen die Harnstoffkonzentration in Serum und Urin als zuverlässigerer Parameter herangezogen werden kann als die Serumkreatininkonzentration (Gibb, 1985). Gibb nutzte in seiner Studie die Harnstoffkonzentration im Serum sogar als Marker zur Quantifizierung des Nierenschadens. Die Nierenreduktion erfolgte bei den männlichen Mäusen vom Stamm CBA/J in seiner Studie durch Verbrennung der Rinde der rechten Niere und gleichzeitiger Entfernung des oberen und unteren Nierenpols durch Ligatur und, mit zwei Wochen Verzögerung, vollständiger Nephrektomie der linken Niere. Die Harnstoffwerte lagen 8 Wochen nach der Nephrektomie bei 158 mg/dl, bei den Kontrollmäusen bei 20 mg/dl (Gibb, 1985). Auch Grindle (2006) kam zu der Erkenntnis, dass die Konzentration von Harnstoff in

Urin und Serum der Maus zuverlässig in Autoanalyse-Systemen getestet werden kann und dass Serum-Harnstoff ein guter Marker der chronischen Niereninsuffizienz bei 5/6-nephrektomierten Mäusen ist. Da die laborchemischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit auch mit einem Autoanalyse-System durchgeführt wurden, muss bedacht werden, dass die gemessenen Kreatininkonzentrationen nur kritisch betrachtet werden dürfen. Das heißt, dass keine oder nur eine leichte Erhöhung der Kreatininkonzentration im Serum der Mäuse den Zustand einer chronischen Niereninsuffizienz nicht ausschließt. Da die Harnstoffkonzentrationen eine signifikante Erhöhung aufwiesen, lag der Zustand der Niereninsuffizienz vor.

Die Albuminurie wurde von Grindle (2006) als zuverlässiger und leicht zu bestimmender Marker für Erkrankungen der Niere bei Mäusen ausgewiesen. Sie untersuchte in ihrer Studie Mäuse der Stämme DBA2/J, A/J und C57BL/6J. In der vorliegenden Arbeit wurde die Albuminurie nicht untersucht. Es traten Schwierigkeiten auf. Der Urin der Mäuse wurde in Stoffwechselfäßen über 24 Stunden gesammelt. Es konnte nicht verhindert werden, dass Teile des während dieser Zeit den Mäusen zur Verfügung stehenden Futters mit in den Urin gerieten. Selbst kleinste Mengen verfälschten den tatsächlichen Proteingehalt des Urins sehr stark was daran erkennbar war, dass im Urin der schein-operierten Mäuse eine sehr hohe Protein-Konzentration gemessen wurde. Gagnon konnte eine Proteinurie nachweisen. Sechs Wochen nach Induktion einer chronischen Niereninsuffizienz durch Elektrokoagulation der Oberfläche der rechten und Nephrektomie der linken Niere bei C57BL/6-Mäusen zeigten die Mäuse eine Proteinurie von $0,47 \pm 0,4$ mg/ml. Die schein-operierten Mäuse in dieser Studie hatten eine Proteinkonzentration im Urin von $0,13 \pm 0,05$ mg/ml (Gagnon, 1988). Ma und Fogo konnten eine Proteinurie beim Stamm C57/BL6 jedoch nur in den ersten 4 Wochen nach Nephrektomie nachweisen, danach normalisierte sich der Urin-Proteingehalt wieder. Eine zunehmende Proteinurie konnten sie jedoch beim Stamm 129/sv zeigen. Der Proteingehalt im Urin stieg von $17,2 \pm 1$ mg/24 Stunden in Woche 0 bis auf $36,3 \pm 6,6$ mg/24 Stunden in Woche 12 nach Nephrektomie (Ma und Fogo, 2003). Somit ist anzunehmen, dass eine Ausbildung einer Proteinurie bei nephrektomierten Mäusen stammspezifisch ist und nicht allgemein für Mäuse angenommen beziehungsweise ausgeschlossen werden kann.

Die Kreatinin-Clearance, die beim Menschen eine große Bedeutung zur Bestimmung des Grads der Niereninsuffizienz hat, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht bestimmt.

Die Kreatinin-Clearance ist bei Mäusen kein guter Marker für die Nierenfunktion (Gibb, 1985). Dennoch konnte in der Studie von Al Banchaabouchi et al. eine signifikante Verminderung der Kreatinin-Clearance festgestellt werden. In dieser Studie wurde eine Nierenreduktion an Mäusen vom Stamm C57BL x Swiss-Webster durchgeführt, mit vollständiger Nephrektomie der rechten Niere und Ligatur eines Astes der linken Nierenarterie (Al Banchaabouchi, 1998). In anderen Studien zur Nierenfunktion an Mäusen wurde jedoch, ebenso wie in der vorliegenden Arbeit, auf die Bestimmung der Kreatinin-Clearance verzichtet (Ma und Fogo, 2003; Gagnon, 1988). Die Bestimmung der Kreatinin-Clearance hat wohl eine Bedeutung in Nephrektomie-Modellen mit Ratten. So war die Kreatinin-Clearance bei Ratten nach 5/6-Nephrektomie in einer Studie von Vaziri et al. (2003) deutlich vermindert. Auch Hasdan et al. (2002) fanden bei Ratten eine verminderte Kreatinin-Clearance. Da die Kreatinin-Clearance im Mausmodell keine große Bedeutung hat, wurde in dieser Arbeit auf die Bestimmung verzichtet.

Ein progressives Nierenversagen, wie es in einer Studie von Gibb (1985) nach Nierenreduktion nachgewiesen werden konnte, konnte in der vorliegenden Arbeit nach der 5/6-Nephrektomie nicht beobachtet werden. Dies deckt sich mit den Ergebnissen anderer Studien. So zeigte sich in der Studie von Gabizon (1985) ebenfalls eine konstante Urämie in Mäusen nach Verbrennung nahezu der gesamten Rinde der einen Niere und Nephrektomie der kontralateralen Niere. Ebenso konnte in der Studie von Gagnon et al. (1990) eine konstante Urämie nachgewiesen werden. Eine progrediente Insuffizienz zeigte sich bei Gibb (1985). Allerdings wurde in dieser Studie ein anderer Mäusestamm, CBA/J, verwendet, und ein anderes Nierenreduktionsmodell gewählt. Dem oberen und unteren Pol der rechten Niere wurde hier durch Ligatur der jeweils zuführenden Arterie die Funktion genommen und die linke Niere nephrektomiert. Die Progredienz wurde anhand steigender Serum-Harnstoff-Konzentrationen angenommen. Allerdings wurden die Mäuse in dieser Studie nur über zehn Wochen beobachtet (Gibb, 1985). In der vorliegenden Arbeit war die durchschnittliche Serum-Harnstoff-Konzentration nach 8 Wochen $46,8 \pm 4,9$ mg/dl bei den 5/6-nephrektomierten Mäusen und nach 24 Wochen $50,4 \pm 2,4$ mg/dl, es zeigten sich keine Unterschiede und damit eine konstante Urämie.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Merkmale der chronischen Niereninsuffizienz nach 5/6-Nephrektomie in der Maus zu finden waren. Dies waren

eine Polyurie, erhöhte Harnstoffkonzentration im Serum sowie verminderte Harnstoff- und Kreatininkonzentrationen im Urin.

4.2. Veränderungen im kardiovaskulären System der Maus bei chronischer Niereninsuffizienz

Urämie führt zu funktionellen und strukturellen Veränderungen am Herzen und an extrakardialen Gefäßen. Dies wurde bereits sowohl klinisch an Patienten in Urämie beobachtet als auch experimentell an teilnephrektomierten Ratten untersucht (Amann, 2002). Zu diesen kardiovaskulären Veränderungen bei Urämie gehören linksventrikuläre Hypertrophie, Hypertrophie der Kardiomyozyten, Vermehrung des interstitiellen Gewebes, erhöhter oxidativer Stress und beeinträchtigte Vasodilatation. Diese durch chronische Niereninsuffizienz bedingten kardiovaskulären Veränderungen sind Teil des „Kardiorenenalen Syndroms“ (CRS). Die primäre Funktionsstörung von einem der Organe, Herz und Niere, resultiert oft in sekundärer Funktionsstörung des zweiten Organs (Ronco, 2008). Das kardiorenale Syndrom wurde von Ronco in 5 Typen unterteilt. CRS Typ 1 umfasst akutes Nierenversagen bedingt durch akute Herzinsuffizienz, CRS Typ 2 umfasst progressives Nierenversagen bedingt durch chronische Herzinsuffizienz. Beim CRS Typ 3 wird eine akute Dysfunktion des Herzens durch akutes Nierenversagen ausgelöst, CRS Typ 4 beschreibt ein chronisches Nierenversagen, das zu verminderter Herzfunktion, Herzhypertrophie und/oder erhöhtem Risiko für ein kardiovaskuläres Ereignis führt. Zum CRS Typ 5 gehören durch eine Systemerkrankung, zum Beispiel eine Sepsis, ausgelöstes Herz- und Nierenversagen. In dieser Arbeit wurde das kardiorenale Syndrom Typ 4 (nach Ronco, 2008) untersucht. Ziel dieser Arbeit war es festzustellen, ob funktionelle und strukturelle Veränderungen im kardiovaskulären System bei Urämie auch im Mausmodell zu beobachten sind.

Eine linksventrikuläre Hypertrophie konnte in der vorliegenden Arbeit am Mausmodell nicht nachgewiesen werden. Sowohl beim Gewicht der gesamten Herzen als auch beim Gewicht allein der linken Ventrikel zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Die Herzen waren somit immer gleich schwer. Zu diesem Ergebnis kam auch Bro. Sie führte an Apolipoprotein-E-defizienten C57BL/6 Mäusen eine 5/6-Nephrektomie durch und untersuchte 36 Wochen danach das Herzgewicht. Sie konnte keine Veränderung des Herzgewichts nach 5/6-Nephrektomie feststellen (Bro, 2008).

Jedoch konnte Kennedy einen Anstieg des Herzgewichts nach Teilnephrektomie nachweisen. Er untersuchte dies an Mäusen vom Stamm CD1. Es kam zu einem Anstieg des Verhältnisses von Herzgewicht zu Körpergewicht von etwa $3,9 \times 10^3$ bei schein-operierten Mäusen auf etwa $4,8 \times 10^3$ bei teilnephrektomierten Mäusen (Kennedy, 2008). Auch Rabkin et al. konnten einen Anstieg des Verhältnisses von Herz- zu Körpergewicht ($2,35 \times 10^3$ bei schein-operierten auf $3,64 \times 10^3$ bei 5/6-nephrektomierten Sprague-Dawley Ratten) nachweisen (Rabkin, 2008). Die Dicke der Hinterwand und der Vorderwand wurden in der vorliegenden Studie anhand von Echokardiografie-Bildern der Herzen während Systole und Diastole gemessen. Hier konnten keine Unterschiede aufgedeckt werden. In einer anderen Studie (Borges et al. 2008) wurde die Dicke der Ventrikelwand unter dem Mikroskop an in Paraffin eingebetteten und gefärbten Herzschnitten gemessen. Die Herzen stammten von männlichen Swiss-Mäusen, die ein bzw. vier Wochen zuvor einer „One-kidney-one-clip“-Operation unterzogen worden waren. Dabei war die linke Niere entfernt und das Lumen der rechten Nierenarterie durch einen Clip eingeengt worden. Es kam zu einer signifikanten Verdickung der Ventrikelwand sowohl ein als auch vier Wochen nach der Operation. Außerdem konnte in dieser Studie ein signifikanter Anstieg der Kardiomyozytengröße im linken Ventrikel festgestellt werden (Borges, 2008). Kennedy et al. untersuchten an Mäusen vom Stamm CD1 nach 5/6-Nephrektomie ebenfalls die Querschnittsfläche der Kardiomyozyten. Sie fanden, dass die Größe der Fläche kontinuierlich zunahm. Nach vier Wochen zeigte sich noch keine signifikante Größenzunahme (Zunahme um 24 %), doch nach sechs Wochen waren die Kardiomyozyten der 5/6-nephrektomierten Mäuse um 38 % signifikant größer, nach acht Wochen sogar um 45 % signifikant größer als die der schein-operierten Mäuse (Kennedy, 2008). In der vorliegenden Studie zeigte sich bei der Messung der Kardiomyozytengröße im linken Ventrikel, dass die Kardiomyozyten in den Mäusen aller Gruppen durchschnittlich die gleiche Größe hatten. Damit ist anzunehmen, dass es stammspezifisch ist, ob bei chronischer Niereninsuffizienz nach 5/6-Nephrektomie im Mausmodell eine Hypertrophie des linken Ventrikels und eine Hypertrophie der einzelnen Kardiomyozyten entsteht.

Eine Kardiomyopathie konnte echokardiographisch bei den 5/6-nephrektomierten Mäusen nachgewiesen werden. Sie war gekennzeichnet durch signifikant verminderte Ejektionsfraktion und Verkürzungsfraktion verglichen mit diesen Werten bei den schein-operierten Mäusen. Die Ejektionsfraktion gibt an, wie viel Prozent des Blutes, das sich am Ende der Diastole im linken Ventrikel befindet, in das Kreislaufsystem

gepumpt wird. Die Verkürzungsfraction gibt an, um wie viel Prozent sich das Herz durch Kontraktion von der Diastole zur Systole verkürzt und ist damit, wie die Ejektionsfraction, ein Mass für die Pumpleistung des Herzens. Eine erhöhte Ejektions- und Verkürzungsfraction konnten Rabkin et al. (2008) an männlichen Sprague-Dawley Ratten 16 Wochen nach 5/6-Nephrektomie feststellen. Die Verkürzungsfraction erhöhte sich von 41 % auf 50 %, die Ejektionsfraction von 78 % auf 86 %. Gleichzeitig wiesen sie eine signifikante Verkleinerung der linken Ventrikelgröße und eine Hypertrophie der Ventrikelwand nach. So kann man annehmen, dass zwar prozentual die Ejektionsfraction anstieg, das tatsächliche Schlagvolumen aber kleiner war.

Oxidativer Stress scheint eine wichtige Komponente in der Entwicklung der kardiovaskulären Veränderungen bei chronischer Niereninsuffizienz zu sein. Ronco et al. (2008) nahmen an, dass oxidativer Stress zu Apoptose und Nekrose in Myozyten führt, dass oxidativer Stress assoziiert ist mit Arrhythmien und endothelialer Dysfunktion und dass es eine potentielle Rolle in der Pathogenese des kardierenalen Syndroms spielt (Ronco, 2008). Kennedy et al. (2006) nahmen sogar an, dass oxidativer Stress der Hauptfaktor in der Pathogenese von kardiovaskulären Erkrankungen bei Niereninsuffizienz ist. Oxidativer Stress ist eine Verschiebung eines Gleichgewichts zugunsten reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). ROS sind sehr reaktionsfreudige Formen des Sauerstoffs. Im Körper werden ständig ROS gebildet. Sie können eine normale Signalwirkung für zelluläre Prozesse haben. Sie können aber auch toxisch sein. Überschießende Bildung von ROS kann durch körpereigene Antioxidantien, enzymatisch und nicht-enzymatisch, reguliert werden. Fällt diese Regulation aus dem Gleichgewicht dann kommt es zu einer überschießenden Produktion von ROS und damit zu oxidativem Stress (Molavi, 2004). Die Konzentration von oxidativem Stress kann nicht direkt gemessen werden. Oxidativer Stress wird indirekt über den Nachweis der, aufgrund der großen Reaktionsfreudigkeit der ROS z.B. mit Lipiden und Proteinen, entstehenden Produkte quantifiziert. Aufgrund der Vielzahl der Produkte gibt es eine Reihe verschiedener Möglichkeiten oxidativen Stress nachzuweisen. In einer Studie von Hasdan et al. (2002) wurden oxidative Proteinprodukte (AOPPs: advanced oxidative proteine products) zur Quantifizierung des oxidativen Stresses herangezogen. In der vorliegenden Arbeit wurde oxidativer Stress anhand eines Produkts der Lipidperoxidation, Malondialdehyd (MDA), nachgewiesen. Die Konzentration von MDA wurde im Herzen untersucht. Es ergaben sich für 5/6-nephrektomierte Mäuse signifikant höhere MDA-Konzentrationen im Vergleich zu schein-operierten Mäusen 8 Wochen nach Nephrektomie. Dies ist ein

Hinweis darauf, dass Herzen von Mäusen mit chronischer Niereninsuffizienz erhöhtem oxidativem Stress ausgesetzt sind. Jedoch konnte 24 Wochen nach Nephrektomie kein Unterschied mehr nachgewiesen werden. Dies deckt sich mit einer Studie von Hasdan et al. In dieser Studie konnten drei Tage nach Reduktion der Nierenmasse in männlichen Wistar Ratten erhöhte AOPP-Konzentrationen im Plasma gemessen werden, aber schon zehn Tage nach Nierenmassereduktion war keine Erhöhung mehr messbar (Hasdan, 2002). Vaziri et al. (2003) untersuchten den oxidativen Stress in Tieren nach 5/6-Nephrektomie. Sie untersuchten die MDA-Konzentration im Plasma von Sprague Dawley Ratten 6 Wochen nach Nierenreduktion. Die Nierenreduktion war durch chirurgische Entfernung des oberen und unteren Drittels der linken Niere bei vollständiger Nephrektomie der rechten Niere erfolgt. Bei ihren Untersuchungen konnten sie signifikant erhöhte Plasma-MDA-Konzentrationen nachweisen. Die MDA-Konzentration im Plasma der nephrektomierten Ratten war etwa doppelt so hoch wie die der schein-operierten Ratten. Dies zeigte einen erhöhten systemischen oxidativen Stress an und ließ eine verminderte Aktivität von Antioxidantien vermuten (Vaziri, 2003). In zahlreichen anderen Studien konnte ebenfalls eine Erhöhung des systemischen oxidativen Stresses bei Niereninsuffizienz beobachtet werden. Jedoch wurde erst in wenigen Studien speziell das Herzgewebe von chronisch niereninsuffizienten Individuen auf oxidativen Stress untersucht. Kennedy et al. bestimmten in homogenisierten linken Ventrikeln von Sprague Dawley Ratten 4 Wochen nach 5/6-Nephrektomie die Konzentration von carbonylierten Proteinen. Dies ist ebenfalls ein Marker für oxidativen Stress. Dabei zeigten sich, wie auch in der vorliegenden Arbeit, signifikant erhöhte Werte bei den 5/6-nephrektomierten im Vergleich zu den schein-operierten Tieren (Kennedy, 2006). Gleichzeitig wurde in dieser Studie der systemische oxidative Stress untersucht. Dazu wurde sowohl die Konzentration von carbonylierten Proteinen im Plasma bestimmt, als auch die Plasma-MDA-Konzentration. Für beide Methoden zeigte sich ein signifikant erhöhter systemischer oxidativer Stress der 5/6-nephrektomierten im Vergleich zu den schein-operierten Tieren (Kennedy, 2006).

Bei der Entwicklung von Fibrose ist eine Erhöhung des oxidativen Stresses von Bedeutung. Die selektive Vermehrung des interstitiellen fibrotischen Gewebes im Herzen bei Urämie wurde bereits in den 1940er Jahren beschrieben. Diese Ergebnisse wurden später sowohl in Experimenten zur Niereninsuffizienz als auch in Studien an urämischen Patienten bestärkt (Tyralla, 2002). In dieser Arbeit konnte nach 24 Wochen ebenfalls eine Vermehrung des interstitiellen Gewebes, von 2,5 % bei schein-

operierten Mäusen auf 5,5 % bei teilnephrektomierten Mäusen, nachgewiesen werden. Eine deutliche Zunahme der Fibrose konnte auch Kennedy 2008 nachweisen. Hier kam es bereits vier Wochen nach 5/6-Nephrektomie in CD1-Mäusen zu einer Zunahme der Fibrosedichte im Herzen auf das 12-fache gegenüber den scheinoperierten Mäusen. Nach 6 Wochen zeigte sich ein weiterer Anstieg des Anteils der Fibrose auf das 16-fache, acht Wochen nach Nephrektomie sogar auf das 49-fache (Kennedy, 2008). Auch Amann untersuchte welche Bedeutung oxidativer Stress bei der Entwicklung von kardiovaskulären Strukturveränderungen bei chronischer Niereninsuffizienz hat (Amann, 2002). Dazu wurde die Wirkung einer Behandlung mit einem antioxidant wirkenden Medikament (Tocopherol) auf die Strukturveränderungen im kardiovaskulären System von Ratten nach Teilnephrektomie untersucht. Das Ergebnis war, dass die interstitielle Fibrose in den Herzen der antioxidant behandelten teilnephrektomierten Ratten niedriger war als in den nicht-antioxidant-behandelten teilnephrektomierten Ratten. Daraus schloss Amann, dass oxidativer Stress eine Rolle spielt in der Entwicklung von interstitieller Fibrose im Herzen bei chronischer Niereninsuffizienz (Amann, 2002).

Die endothelabhängige Vasodilatationsfähigkeit der Mesenterialarterien war bei den Gefäßen der 5/6-nephrektomierten Mäusen im Vergleich zu den Gefäßen von scheinoperierten Mäusen eingeschränkt. Dies zeigte sich anhand signifikant niedrigerer EC_{50} -Werte als Reaktion auf Carbachol im Myographen. Zu dem Ergebnis, dass die endothelabhängige Vasodilatationsfähigkeit bei Urämie eingeschränkt ist, kamen auch Morris et al (2001). Sie untersuchten subkutane Widerstandsarterien von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz auf ihre Vasodilatationsfähigkeit im Myographen. Als Substanz zum Testen nutzten sie Acetylcholin. Jedoch gab es in dieser Studie keinen signifikanten Unterschied bei den EC_{50} -Werten, sondern bei der maximalen Relaxationsfähigkeit. Die Gefäße der urämischen Patienten konnten durchschnittlich nur bis maximal 77 % relaxieren, die Gefäße der Kontrollgruppe bis 98 % (Morris, 2001). Thuraishingham et al. fanden 1999 in ihrer Studie zur endothelabhängigen Relaxationsfähigkeit von urämischen Gefäßen keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Sie untersuchten Mesenterialarterien, wie in der vorliegenden Arbeit, allerdings von Ratten (Wistar Kyoto), ebenfalls nach 5/6-Nephrektomie. Die EC_{50} -Werte waren bei den Gefäßen der Kontrollratten und der urämischen Ratten gleich. Lediglich fanden sie eine Tendenz zu verminderter Relaxationsfähigkeit der urämischen Rattengefäße bei einer niedrigen Acetylcholin-Konzentration von 10^{-8} M. Die Untersuchung der Relaxationsfähigkeit der

Mesenterialarterien wurde schon 28 bis 30 Tage, also etwa 4 Wochen, nach der Entfernung der rechten Niere (zweizeitige Nephrektomie) durchgeführt (Thuraisingham, 1999). Dies lässt vermuten, dass die Einschränkung der endothelabhängigen Relaxationsfähigkeit erst nach längerer Einwirkung der Urämie auf die Gefäße eintritt. Die Versuche der vorliegenden Arbeit waren erst acht Wochen nach Nephrektomie durchgeführt worden und dabei wurde eine deutliche Einschränkung der endothelabhängigen Relaxationsfähigkeit gefunden. Die endothelunabhängige Vasodilatation sowie die Vasokonstriktion zeigten keine Unterschiede zwischen den Gefäßen der nephrektomierten Mäuse und der scheinoperierten Mäuse. Dies lässt den Schluss zu, dass Gefäßendothel durch Urämie geschädigt wird. Die Entwicklung von endothelialer Dysfunktion steht ebenso wie die Entwicklung von Fibrose im Zusammenhang mit erhöhtem systemischen oxidativem Stress (Hasdan et al. 2002). In ihrer Studie stellten sie fest, dass die Superoxid-Produktion in der Wand von Gefäßen schon wenige Tage nach Nierenreduktion erhöht war, und dass dies ein wichtiger pathogenetischer Faktor in der Entwicklung von endothelialer Dysfunktion in Widerstandsgefäßen ist. Für diese Studie wurde eine Nierenreduktion an männlichen Wistar-Ratten durch Ligatur der beiden Hauptäste der linken Nierenarterie bei vollständiger Nephrektomie der rechten Niere durchgeführt (Hasdan et al., 2002). Endotheliale Dysfunktion bildet ein wichtiges Bindeglied zwischen Krankheiten wie Hypertonie, chronische Niereninsuffizienz oder Diabetes und dem hohen Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse, dem Patienten mit diesen Erkrankungen ausgesetzt sind (Endemann und Schiffrin, 2004).

In einigen Studien ist bisher die These aufgestellt worden, dass Urämie zu einer verminderten β -Rezeptorendichte führt. 1987 konnte Bree dies in einem Experiment nachweisen. Dazu inkubierte er homogenisierte Rattenlungen in Plasma von urämischen Patienten. Zur Kontrolle dienten zum einen in Plasma von einer gesunden Kontrollperson inkubierte Rattenlunge und zum anderen in Puffer inkubierte Rattenlunge. Die anschließend gemessenen β -Rezeptorendichten ((-)[¹²⁵I]-Iodocyanopindolol-Bindung) in der Lunge waren 60 % bis 90 % niedriger nach Inkubation in urämischen Ultrafiltrat (Bree, 1987). Bestätigt wurden diese Befunde von Ferchland (1998). Er veröffentlichte die These, dass inhibitorische Substanzen in urämischem Plasma mit β -Rezeptoren interferieren und zu einer verminderten Empfindlichkeit führen. Auch er hatte Gewebe von Ratten (Leber und Lunge) und zusätzlich von Menschen (Myometrium) mit urämischem Plasma inkubiert und die β -Rezeptorendichte anschließend in diesem Gewebe gemessen (Ferchland, 1998). In

der vorliegenden Arbeit war die β -Rezeptorendichte in den Herzen von 5/6-nephrektomierten Mäusen jedoch gleich groß wie in den Herzen von schein-operierten Mäusen. Zu diesem Ergebnis kam auch eine Studie von Dhein (2000). Eine 5/6-Nephrektomie wurde in Wistar-Ratten durchgeführt und 6 bis 7 Wochen danach die β -Rezeptorendichte im linken Ventrikel bestimmt. Auch hier zeigte sich kein Unterschied der β -Rezeptorendichte zwischen den Ventrikeln der schein-operierten und den der 5/6-nephrektomierten Ratten (Dhein, 2000).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass es im kardiovaskulären System der Maus nach 5/6-Nephrektomie zu strukturellen Veränderungen, wie vermehrter Fibrose, und zu funktionellen Veränderungen, wie verminderte Ejektions- und Verkürzungsfraction und verminderte endothelabhängige Vasodilatationsfähigkeit, kommt. Diese Veränderungen sind möglicherweise bedingt durch erhöhten oxidativen Stress.

4.3. Wirkung von Imatinib auf strukturelle und funktionelle Veränderungen nach 5/6-Nephrektomie

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Mäuse vom Stamm Balb/c nach 5/6-Nephrektomie mit Imatinib-Behandlung eine chronische Niereninsuffizienz entwickelten, die sich nur in wenigen Punkten von der Niereninsuffizienz der 5/6-nephrektomierten Mäuse ohne Behandlung unterschied.

Die ermittelten Laborwerte wiesen keine Unterschiede zwischen den 5/6-nephrektomierten Mäusen ohne Imatinib-Gabe und denen mit Imatinib-Gabe auf. Sowohl die Urinmenge war bei den nephrektomierten Mäusen mit Imatinib-Gabe gleich groß wie die der unbehandelten nephrektomierten Mäuse als auch die Kreatinin- und Harnstoffkonzentration im Serum und im Urin. In einer Studie von Gilbert et al. wurde Wistar Ratten mit einer mesangialen proliferativen Glomerulonephritis sechs Tage lang Imatinib verabreicht. Es konnte kein Einfluss auf eine Proteinurie festgestellt werden. Weitere Befunde bezüglich einer chronischen Niereninsuffizienz wurden in dieser Studie nicht angegeben (Gilbert et al. 2001).

Die kardiale Fibrose wurde durch die kontinuierliche Applikation des Tyrosinkinase-Inhibitors Imatinib reduziert. Im Herzen der 5/6-nephrektomierten Mäuse ohne

Imatinib-Gabe betrug die Fibrosedichte 5,5 %, im Herzen von 5/6-nephrektomierten Mäusen mit Imatinib-Gabe war die Fibrosedichte mit 3,5 % signifikant niedriger. Diese Beobachtung deckt sich mit einer Studie von Schellings (2006). In dieser Studie wurden hypertensive Ren2-Ratten hinsichtlich der Fibrosedichte im Herzen untersucht. Die Hälfte der Ratten wurde mit Imatinib behandelt, die andere Hälfte der Ratten blieb unbehandelt. Es zeigte sich eine signifikante Verminderung der Fibrosedichte im Herzen nach Imatinib-Gabe im Vergleich zu den nicht-behandelten hypertensiven Ratten (4,6 % vs. 5,5 %, $p < 0,05$) (Schellings, 2006). Dass Imatinib in der Lage ist, die Bildung von Fibrose zu vermindern, zeigt auch ein Casereport von Distler et al. (2008). Einer an Mischkollagenose erkrankten Patientin mit Lungenfibrose wurde zwanzig Wochen lang täglich Imatinib verabreicht. Die Fibrose in der Lunge reduzierte sich dadurch nachweislich. In einer weiteren Studie konnten Distler et al. nachweisen, dass Bleomycin-induzierte dermale Fibrose im Mausmodell durch die Behandlung mit Imatinib reduziert werden konnte (Distler et al., 2008).

Auf die myokardiale Funktion hatte Imatinib keine protektive Wirkung. Es zeigte sich auch keine die Herzfunktion verschlechternde Wirkung von Imatinib, wie dies von Kerkelä et al. (2006) beschrieben worden war. Sie beobachteten, dass sich bei zehn Patienten, die aufgrund einer chronisch myeloischen Leukämie mit Imatinib behandelt wurden, die Herzfunktion verschlechterte. Dies wurde quantifiziert anhand deutlich verminderter Ejektionsfraktion und klinischen Symptomen der Herzinsuffizienz. Desweiteren verabreichten Kerkelä et al. C57BL/6 Mäusen Imatinib über drei oder sechs Wochen und stellten auch hier eine herzscheidende Wirkung fest. Allerdings bekamen die Mäuse in diesem Versuch sehr hohe Dosierungen von Imatinib, nämlich täglich 50, 100 oder 200 mg pro kg Körpergewicht (Kerkelä et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde das Medikament lediglich in einer Dosierung von 10 mg/kg Körpergewicht gegeben, so dass aufgrund des großen Konzentrationsunterschieds von einem vernachlässigbar geringen toxischen Effekt auf das Herz ausgegangen werden kann. Mithilfe der Echokardiografie wurde die kardiale Funktion untersucht. Dabei hatten sich eine verminderte Ejektionsfraktion und eine verminderte Verkürzungsfraktion bei den 5/6-nephrektomierten Mäusen ohne Imatinib-Gabe, verglichen mit den schein-operierten, gezeigt. Es zeigte sich keine Verbesserung und keine Verschlechterung der Herzfunktion anhand dieser Parameter, wenn die Mäuse nach 5/6-Nephrektomie kontinuierlich Imatinib erhalten hatten.

Der Nachweis von oxidativem Stress erfolgte durch Bestimmung von Malondialdehyd (MDA), einem Produkt der Lipidperoxidation. Es konnte gezeigt werden, dass es in Urämie nach 5/6-Nephrektomie zu einem Anstieg des oxidativen Stresses kommt. Die Gabe von Imatinib führte nicht zu einer Verminderung des oxidativen Stresses. Die Konzentration MDA im Herzgewebe war nach 5/6-Nephrektomie mit Imatinib-Gabe genauso groß wie ohne Imatinib-Gabe nach der Nephrektomie. In einer Studie von Kumar et al. wurde anhand von Zellkulturen gezeigt, dass oxidativer Stress zu mitochondrialer Dysfunktion und Zelltod führen kann. In dieser Studie konnten sie nachweisen, dass Imatinib Signalwege hemmt, die zu mitochondrialer Dysfunktion und Zelltod führen, und dadurch die negative Wirkung des oxidativen Stresses auf Zellen abmildert (Kumar et al., 2003). Dieser in vitro nachgewiesene mildernde Effekt konnte in der vorliegenden Arbeit in vivo nicht festgestellt werden.

Zusammenfassend wurden strukturelle Veränderungen, wie Fibrose, im kardiovaskulären System der Maus bei chronischer Niereninsuffizienz durch Imatinib gemildert. Auf funktionelle Veränderungen, wie die verminderte Ejektions- und Verkürzungsfraction, hatte Imatinib jedoch keinen Einfluss.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Chronisch niereninsuffiziente Patienten haben gegenüber Personen gleichen Alters ohne Nierenerkrankung ein 10- bis 20-fach erhöhtes Risiko an einer kardiovaskulären Erkrankung zu versterben. Ziel der Arbeit war es, im Mausmodell eines kardioresalen Syndroms Typ 4 kardiovaskuläre und renale Veränderungen und die Wirkung des Tyrosinkinase-Inhibitors Imatinib auf diese Veränderungen zu analysieren.

Unbehandelte oder mit Imatinib behandelte Balb/c-Mäuse wurden einer 5/6-Nephrektomie oder in einer Kontrollgruppe einer Schein-Operation unterzogen und bis 24 Wochen beobachtet. Die Nierenfunktion wurde durch Marker im Urin und Serum gemessen. Die Herzfunktion wurde echokardiografisch untersucht und die Gefäßfunktion im Mulvany-Myographen analysiert. Der Fibrosierungsgrad und die Kardiomyozytengröße des linken Ventrikels wurden histologisch gemessen. Der oxidative Stress wurde durch die Malondialdehyd-Konzentration im Herzen bestimmt.

24 Wochen nach 5/6-Nephrektomie kam es, verglichen mit schein-operierten Mäusen, zu einer verminderten Ejektionsfraktion ($26,1 \pm 2,8 \%$ vs. $38,8 \pm 4,4 \%$, $p < 0,05$) und Verkürzungsfraktion ($11,1 \pm 2,4 \%$ vs. $21,6 \pm 4,7 \%$, $p < 0,05$) des Herzens. Im Herzen kam es zu vermehrter Fibrose ($5,5 \pm 0,18 \%$ vs. $2,52 \pm 0,34 \%$, $p < 0,001$). Die Gefäßfunktion war in der endothelabhängigen Vasodilatationsfähigkeit 8 Wochen nach 5/6-Nephrektomie eingeschränkt.

Unter Imatinib kam es, gegenüber den 5/6-nephrektomierten Mäusen ohne Imatinib, zu einer geringeren Vermehrung der kardialen Fibrose ($3,52 \pm 0,52 \%$ vs. $5,5 \pm 0,18 \%$, $p < 0,05$) ohne signifikante Verbesserung der Herz- und Gefäßfunktion. Die Malondialdehyd-Konzentration war im Myokard der 5/6-nephrektomierten Mäuse mit und ohne Imatinib gegenüber schein-operierten Mäusen nach 8 Wochen erhöht ($80,9 \pm 9,5 \mu\text{M}$ vs. $90,6 \pm 6,0 \mu\text{M}$ vs. $52,1 \pm 7,2 \mu\text{M}$, $p < 0,005$ vs. Schein-Operation).

Zusammenfassend kommt es nach 5/6-Nephrektomie bei der Maus zu funktionellen und strukturellen Veränderungen im Sinne einer urämischen Kardiomyopathie. Der Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib hat die strukturellen Veränderungen reduziert ohne die funktionellen Veränderungen zu beeinflussen. Als mögliche Ursache scheint oxidativer Stress eine große Bedeutung für die Entwicklung des kardioresalen Syndroms Typ 4 zu haben.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- 1.) Al Banchaabouchi, M., Marescau, B., D`Hooge, R., Van Marck, E., Van Daele, A., Levillain, O., De Deyn, P.P. (1998):
Biochemical and histopathological changes in nephrectomized mice.
Metabolism. 47, 355-361.
- 2.) Amann, K., Törnig, J., Buzello, M., Kuhlmann, A., Gross, M.L., Adamczak, M., Buzello, M., Ritz, E. (2002):
Effect of antioxidant therapy with dl- α -tocopherol on cardiovascular structure in experimental renal failure.
Kidney Int. 62, 877-884.
- 3.) Amann, K., Törnig, J., Kugel, B., Gross, M.L., Tyralla, K., El-Shakmak, A., Szabo, A., Ritz, E. (2003):
Hyperphosphatemia aggravates cardiac fibrosis and microvascular disease in experimental uremia.
Kidney Int. 63, 1296-1301.
- 4.) Baumann, M., Janssen, B.J., Hermans, J.J., Peutz-Kootstra, C., Witzke, O., Smits, J.F., Struijker Boudier, H.A. (2007):
Transient AT₁ receptor-inhibition in prehypertensive spontaneously hypertensive rats results in maintained cardiac protection until advanced age.
J. Hypertens. 25, 207-215.
- 5.) Borges, G.R., Salgado, H.C., Silva, C.A., Rossi, M.A., Prado, C.M., Fazan, R.Jr. (2008):
Changes in hemodynamic and neurohumoral control cause cardiac damage in one-kidney, one-clip hypertensive mice.
Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol. 295, 1904-1913.
- 6.) Bradford, M.M. (1976):
A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
Anal. Biochem. 72, 248-254.

- 7.) Bree, F., Souchet, T., Baartad, R., Fontenaille, C., Lhoste, F., Tillement, J.P. (1987) :
Inhibition of (-)[¹²⁵I]-Iodocyanopindolol binding to rat lung beta adrenoceptors by uremic plasma ultrafiltrates.
Biochem. Pharmacol. 36, 3121-3125.
- 8.) Bro S., Bollano E., Bruel A., Olgaard K., Nielsen L.B. (2008):
Cardiac structure and function in a mouse model of uraemia without hypertension.
Scand J Clin Lab Invest. 68, 660-666.
- 9.) Brodde, O.E., Brinkmann, M., Schemuth, R., O`Hara, N., Daul, A. (1985):
Terbutaline-induced desensitization of human lymphocyte β_2 -Adrenoceptors; Accelerated restoration of β -adrenoceptor responsiveness by prednisone and ketotifen.
J. Clin. Invest. 76, 1096-1101.
- 10.) Brodde, O.E., Bruck, H., Leineweber, K. (2006):
Cardiac Adrenoceptors: Physiological and pathophysiological relevance.
J. Pharmacol. Sci. 100, 323-337.
- 11.) Brodde, O.E., Vogelsang, M., Broede, A., Michel-Reher, M., Beisenbusch-Schäfer, E., Hakim, K., Zerkowski, H.R. (1998):
Diminished responsiveness of G_s-coupled receptors in severely failing human hearts: no difference in dilated versus ischemic cardiomyopathy.
J. Cardiovasc. Pharmacol. 31, 585-589.
- 12.) De Kimpe, J., Cornelis, R., Mees, L., Vanholder, R., Verhoeven, G. (1999):
74As-arsenate metabolism in flemish giant rabbits with renal insufficiency.
J Trace Elem Med Biol. 13, 7-14.
- 13.) Dhein, S., Rhönert, P., Markau, S., Kotchi-Kotchi, E., Becker, K., Poller, U., Osten, B., Brodde, O.E. (2000):
Cardiac beta-adrenoceptors in chronic uremia: studies in humans and rats.
J Am Coll Cardiol. 36, 608-617.

- 14.) Distler, J.H.W., Distler, O. (2008):
Intracellular tyrosine kinases as novel targets for anti-fibrotic therapy in systemic sclerosis.
Rheumatology. 47, v10-v11.
- 15.) Distler, J.H.W., Manger, B., Spriewald, B.M., Schett, G., Distler, O. (2008):
Treatment of pulmonary fibrosis for twenty weeks with imatinib mesylate in a patient with mixed connective tissue disease.
Arthritis Rheum. 58, 2538-2542.
- 16.) Endemann, D.H., Schiffrin, E.L. (2004):
Endothelial dysfunction.
J Am Soc Nephrol. 15, 1983-1992.
- 17.) Foley, R.N., Parfrey, P.S., Sarnak, M.J. (1998):
Epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease.
J. Am. Soc. Nephrol. 9 (12 Suppl): S16-23.
- 18.) Frei, U., Schober-Halstenberg, H.J. (2006):
QuaSi-Niere Jahresbericht 2005/2006, Nierenersatztherapie in Deutschland.
ISBN: 3-9809996-2-9.
- 19.) Ferchland, A., Rettkowski, O., Pönicke, K., Deuber, H.J., Osten, B., Brodde, O.E. (1998):
Effects of uremic plasma on α - and β -adrenoceptor subtypes.
Nephron. 80, 46-50.
- 20.) Gabizon, D., Goren, E., Shaked, U., Averbukh, Z., Rosenmann, E., Modai, D. (1985):
Induction of chronic renal failure in the mouse: a new model.
Nephron. 40, 349-352.
- 21.) Gagnon, R.F., Ansari, M. (1990):
Development an progression of uremic changes in the mouse with surgically induced renal failure.
Nephron 54, 70-76.

- 22.) Gagnon, R.F., Gallimore, B. (1988):
Characterization of a mouse model of chronic uremia.
Urol. Res. 16, 119-126.
- 23.) Gibb, I.A., Hamilton, D.N.H. (1985):
An experimental model of chronic renal failure in mice.
Clin. Immunol. Immunopathol. 35, 276-284.
- 24.) Gilbert, R.E., Kelly, D.J., McKay, T., Chadban, S., Hill, P.A., Cooper, M.E.,
Atkins, R.C., Nikolic-Paterson, D.J. (2001):
PDGF signal transduction inhibition ameliorates experimental mesangial
proliferative glomerulonephritis.
Kidney Int. 59, 1324-1332.
- 25.) Goldsmith, D.J.A., Covic, A. (2001):
Coronary artery disease in uremia: Etiology, diagnosis, and therapy.
Kidney Int. 60, 2059-2078.
- 26.) Grindle, S., Garganta, C., Sheehan, S., Gile, J., Lapierre, A., Whitmore, H.,
Paigen, B., DiPetrillo, K. (2006):
Validation of high-throughput methods for measuring blood urea nitrogen and
urinary albumin concentrations in mice.
Comp. Med. 56, 482-486.
- 27.) Hasdan, G., Benchetrit, S., Rashid, G., Green, J., Bernheim, J., Rathaus, M.
(2002):
Endothelial dysfunction and hypertension in 5/6-nephrectomized rats are
mediated by vascular superoxide.
Kidney Int. 61, 586-590.
- 28.) Heymans, S., Lupu, F., Terclavers, S., Vanwetswinkel, B., Herbert, J.M.,
Baker, A., Collen, D., Carmeliet, P., Moons, L. (2005):
Loss or inhibition of uPA or MMP-9 attenuates LV remodelling and dysfunction
after acute pressure overload in mice.
Am. J. Pathol. 166, 15-25.

- 29.) Himmelfarb, J., McMenamin, E., McMonagle, E. (2002):
Plasma aminothiols oxidation in chronic hemodialysis patients.
Kidney Int. 61, 705-716.
- 30.) Himmelfarb, J., Stenvinkel, P., Alp Ikizler, T., Hakim, R.M. (2002):
The elephant in uremia: Oxidant stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia.
Kidney Int. 62, 1524-1538.
- 31.) Hochhaus, A. (2002):
Der selektive Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib (STI571) bei hämatologischen und onkologischen Erkrankungen.
Dtsch. Med. Wochenschr. 127, 451-456.
- 32.) Hong, Y.L., Yeh, S.L., Chang, C.Y., Hu, M.L. (2000):
Total plasma malondialdehyde levels in 16 taiwanese college students determined by various thiobarbituric acid tests and an improved high-performance liquid chromatography-based method.
Clin. Biochem. 33, 619-625.
- 33.) Janssen, B., Debets, J., Leenders, P., Smits, J. (2002):
Chronic measurement of cardiac output in conscious mice.
Am. J. Physiol. Regulatory. Integrative. Comp. Physiol. 282, 928-935.
- 34.) Kennedy, D.J., Vetteth, S., Periyasamy, S.M., Kanj, M., Fedorova, L., Khouri, S., Kahaleh, M.B., Xie, Z., Malhotra, D., Kolodkin, N.I., Lakatta, E.G., Fedorova, O.V., Bagrov, A.Y., Shapiro, J.I. (2006):
Central role for the cardiotonic steroid marinobufagenin in the pathogenesis of experimental uremic cardiomyopathy.
Hypertension 47, 488-495.
- 35.) Kennedy, D.J., Elkareh, J., Shidyak, A., Shapiro, A.P., Smaili, S., Mutgi, K., Gupta, S., Tian, J., Morgan, E., Khouri, S., Cooper, C.J., Periyasamy, S.M., Xie, Z., Malhotra, D., Fedorova, O.V., Bagrov, A.Y., Shapiro, J.I. (2008):
Partial nephrectomy as a model for uremic cardiomyopathy in the mouse.
Am. J. Physiol. Renal. Physiol. 294, F450-F454.

- 36.) Kerkelä, R., Grazette, L., Yacobi, R., Iliescu, C., Patten, R., Beahm, C., Walters, B., Shevtsov, S., Pesant, S., Clubb, F.J., Rosenzweig, A., Salomon, R.N., Van Etten, R.A., Alroy, J., Durand, J.B., Force, T. (2006):
Cardiotoxicity of the cancer therapeutic agent imatinib mesylate.
Nat. Med. 12, 908-916.
- 37.) Kumar, S., Mishra, N., Raina, D., Saxena, S., Kufe, D. (2003):
Abrogation of the cell death response to oxidative stress by the c-Abl tyrosine
kinase inhibitor STI571.
Mol. Pharmacol. 63, 276-282.
- 38.) Leineweber, K., Böse, D., Vogelsang, M., Haude, M., Erbel, R., Heusch, G.
(2006):
Intense vasoconstriction in response to aspirate from stented saphenous vein
aortocoronary bypass grafts.
J. Am. Coll. Cardiol. 47, 981-986.
- 39.) Levey, A.S., Coresh, J., Balk, E., Kausz, A.T., Levin, A., Steffes, M.W.,
Hogg, R.J., Perrone, R.D., Lau, J., Eknoyan, G. (2003):
National kidney foundation practice guidelines for chronic kidney disease:
evaluation, classification, and stratification.
Ann. Intern. Med. 139, 137-147.
- 40.) Ma, L.J., Fogo, A.B. (2003):
Model of robust induction of glomerulosclerosis in mice: Importance of genetic
background.
Kidney Int. 64, 350-355.
- 41.) Meisinger, C., Döring, A., Löwel, H. (2006):
Chronic kidney disease and risk of incident myocardial infarction and all-cause
and cardiovascular disease mortality in middle-aged men and women from the
general population.
Eur. Heart. J. 27, 1245-1250.

- 42.) Molavi, B., Mehta, J.L. (2004):
Oxidative stress in cardiovascular disease: molecular basis of its deleterious effects, its detection, and therapeutics considerations.
Curr. Opin. Cardiol. 19, 488-493.
- 43.) Morris, S.T.W., McMurray, J.J.V., Spiers, A., Jardine, A.G. (2001):
Impaired endothelial function in isolated human uremic resistance arteries.
Kidney Int. 60, 1077-1082.
- 44.) Mulvany, M.J., Halpern, W. (1977):
Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats.
Circ. Res. 41, 19-26.
- 45.) Platt, R., Roscoe, M.H., Emyss Smith, F. (1952):
Experimental Renal Failure.
Clinical Science 11, 217-228.
- 46.) Rabkin, R., Awwad, I., Chen, Y., Ashley, E.A., Sun, D., Sood, S., Clusin, W., Heidenreich, W., Piecha, G., Gross, M.L. (2008):
Low-dose growth hormone is cardioprotective in uremia.
J. Am. Soc. Nephrol. 19, 1774–1783.
- 47.) Ravnskov, U., Johansson, B.G., Ljunger, L. (1975):
Proteinuria in pigs with experimentally induced renal damage.
Contrib. Nephrol. 1, 50-61.
- 48.) Ronco, C., Haapio, M., House, A.A., Anavekar, N., Bellomo, R. (2008):
Cardiorenal syndrome.
J. Am. Coll. Cardiol. 52, 1527-1539.
- 49.) Rutherford, W.E., Bordier, P., Marie, P., Hruska, K., Harter, H., Greenwalt, A., Blondin, J., Haddad, J., Bricker, N., Slatopolsky, E. (1977):
Phosphate control and 25-hydroxycholecalciferol administration in preventing experimental renal osteodystrophy in the dog.
J. Clin. Invest. 60, 332-341.

- 50.) Schellings, M.W., Baumann, M., van Leeuwen, R.E., Duisters, R.F., Janssen, S.H., Schroen, B., Peutz-Kootstra, C.J., Heymans, S., Pinto, Y.M. (2006):
Imatinib attenuates end-organ damage in hypertensive homozygous TGR(mRen2)27 rats.
Hypertension 47, 467-474.
- 51.) Thuraisingham, R.C., Raine, A.E. (1999):
Maintenance of normal agonist-induced endothelium-dependent relaxation in uraemic and hypertensive resistance vessels.
Nephrol. Dial. Transplant. 14, 70-75.
- 52.) Tyralla, K., Amann, K. (2002):
Cardiovascular changes in renal failure.
Blood. Purif. 20, 462-465.
- 53.) Vaziri, N.D., Dicus, M., Ho, N.D., Boroujerdi-Rad, L., Sindhu, R.K., (2003):
Oxidative stress and dysregulation of superoxide dismutase and NADPH oxidase in renal insufficiency.
Kidney Int. 63, 179-185.
- 54.) Yang, X.P., Liu, Y.H., Rhaleb, N.E., Kurihara, N., Kim, H.E., Carretero, O.A. (1999):
Echocardiographic assessment of cardiac function in conscious and anesthetized mice.
Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. 277, 1967-1974.

7. VERZEICHNISSE

7.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformel des 2-Phenylaminopyrimidin-Derivats Imatinib-Mesylat	10
Abbildung 2: Aufbau Versuchsteil A.....	15
Abbildung 3: Aufbau Versuchsteil B.....	16
Abbildung 4: Schematische Darstellung der 5/6 Nephrektomie	17
Abbildung 5: 5/6-Nephrektomie	18
Abbildung 6: Schematische Darstellung des Gefäßeinspannens in den Myographen	24
Abbildung 7: Entwicklung der Körpermasse	37
Abbildung 8: Nieren-, und Herzgewicht (mg/g) nach acht Wochen	40
Abbildung 9: Gewicht der linken Ventrikel 8 Wochen nach Nephrektomie	41
Abbildung 10: Kontraktionsfähigkeit (%) der Gefäße (Mäuse ohne Imatinib)	42
Abbildung 11: Kontraktionsfähigkeit (%) der Gefäße (Mäuse mit Imatinib)	43
Abbildung 12: Endothelabhängige Relaxationsfähigkeit (%) der Gefäße (Mäuse ohne Imatinib)	44
Abbildung 13: Endothelabhängige Relaxationsfähigkeit (%) der Gefäße (Mäuse mit Imatinib),.....	45
Abbildung 14: Endothelunabhängige Relaxationsfähigkeit (%) der Gefäße (Mäuse ohne Imatinib)	46
Abbildung 15: Endothelunabhängige Relaxationsfähigkeit (%) der Gefäße (Mäuse mit Imatinib).....	47
Abbildung 16: β -Rezeptorendichte im linken und rechten Ventrikel der Herzen	48
Abbildung 17: Endsystolisches Volumen im linken Ventrikel (mm ³)	49
Abbildung 18: Enddiastolisches Volumen im linken Ventrikel (mm ³).....	50

Abbildung 19: Schlagvolumen des linken Ventrikels (mm ³)	51
Abbildung 20: Ejektionsfraktion (%) des linken Ventrikels.....	52
Abbildung 21: Verkürzungsfraktion (%) des linken Ventrikels	53
Abbildung 22: Dicke der Vorderwand des linken Ventrikels (mm).....	54
Abbildung 23: Dicke der Hinterwand des linken Ventrikels (mm).....	55
Abbildung 24: Lipidperoxidation im Herz	56
Abbildung 25: Kardiomyozytengröße im linken Ventrikel der Herzen.....	57
Abbildung 26: Siriusrotfärbung linker Ventrikel einer schein-operierten Maus.....	58
Abbildung 27: Siriusrotfärbung linker Ventrikel einer 5/6-nephrektomierten Maus	59
Abbildung 28: Fibrosedichte im linken Ventrikel der Herzen	60

7.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Instrumente und Geräte	13
Tabelle 2:	Medikamente und Substanzen.....	14
Tabelle 3:	Zusammensetzung des Krebs-Henseleit-Puffers	25
Tabelle 4:	Laborparameter 8 Wochen nach Operation.....	38
Tabelle 5:	Laborparameter 24 Wochen nach Operation.....	39

7.3. Abkürzungsverzeichnis

5/6	Gruppe der 5/6-nephrektomierten Mäuse
5/6+I	Gruppe der 5/6-nephrektomierten Mäuse mit Imatinib-Gabe
β-AR	β-Adrenozeptor
Abb	Abbildung
ATP	Adenosin-tri-phosphat
d	Tag
EF	Ejektionsfraktion
et al.	et alii
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
h	Stunde
HG	Herzgewicht
HPLC	High performance liquid chromatography
ICYP	(-)-[¹²⁵ I]-Iodocyanopindolol
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
MDA	Malondialdehyd
mg	Milligramm
ml	Milliliter
PDGF-R	Platelet-derived-growth-factor-receptor
Schein-OP	Gruppe der schein-operierten Mäuse
Schein-OP+I	Gruppe der schein-operierten Mäuse mit Imatinib-Gabe
sec	Sekunde
TBARS	Thiobarbitursäure reaktive Substanzen

8. ANHANG

8.1. Danksagungen

Danken möchte ich allen Mitarbeitern der Klinik für Nephrologie des Universitätsklinikums Essen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Oliver Witzke für die Überlassung des Themas dieser Dissertation und für sein großes Engagement bei der Betreuung und Förderung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. Andreas Kribben möchte ich für seine ständige Diskussionsbereitschaft und für die hilfreichen Doktorandenseminare danken.

Ich danke Herrn Dr. med. Kun Wu und Herrn Song Su für die ständige Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei der Durchführung von Versuchen und die immer freundliche und angenehme Zusammenarbeit.

Frau Priv.-Doz. Dr. Kirsten Leineweber danke ich für die Hilfe bei der Planung und Umsetzung der Versuche zur Gefäßfunktionsmessung. Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. Heusch danke ich für die freundliche Unterstützung bei den Gefäßfunktionsmessungen. Frau Magdalene Vogelsang möchte ich für die gute Einarbeitung in den Umgang mit dem Mulvany-Myographen und ihre Unterstützung bei der Durchführung dieser Versuche danken.

Herrn Dr. med. Marcus Baumann danke ich für die Hilfestellung und Einarbeitung in die Echokardiographie sowie für die Einarbeitung in die histologischen Auswertungen.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Thomas Buck danke ich für die freundliche Bereitstellung des Ultraschallgeräts und des Ultraschallkopfes zur Durchführung der Echokardiographien.

Ich danke Herrn Christian Lösch vom Institut für Epidemiologie für die Hilfestellung bei der statistischen Auswertung der Daten.

Besonders möchte ich meiner Familie danken, für die große moralische Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit, wodurch die Fertigstellung erst möglich wurde.

8.2. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Marion Irmgard Tewiele
Geburtsdatum und -ort: 25. Januar 1980 in Oberhausen
Staatsbürgerschaft: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung

1986 – 1990 Biemenhorster Grundschule, Bocholt
1990 – 1999 St.-Georg-Gymnasium, Bocholt

Berufsausbildung

1999 – 2002 Staatlich anerkannte Schule für technische Assistenten in der Medizin am Universitätsklinikum Essen

Studium

2002 – 2008 Studium der Humanmedizin, Universität Duisburg-Essen

Sep. 2004 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Famulaturen: Klinik für Nieren- und Hochdruckkrankheiten,
Universitätsklinikum Essen
Abteilung für Allgemeinchirurgie,
St. Agnes Hospital, Bocholt
Klinik für Gynäkologie, Semaschko-Krankenhaus,
Nishnij Novgorod, Russland

Praktisches Jahr: Abteilung für Chirurgie, Ev. Krankenhaus, Oberhausen
Klinik für Innere Medizin, Universitätsklinikum Essen
Praxis für Allgemeinmedizin, André Terhorst, Hamminkeln

Dez. 2008 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und Approbation