

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen
Abteilung Innere Medizin III
Ärztlicher Direktor : Professor Dr. L. Seipel

**Einfluß von Endothelin-Rezeptor-Antagonisten,
Losartan und Nebivolol auf die Isoformen
der myokardialen Protein Kinase C in der Urämie**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der

MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

THORSTEN AMEND

aus Tübingen

2003

Dekan : Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter : Privatdozent Dr. B. Brehm
2. Berichterstatter : Privatdozent Dr. S. Isenmann

meinen Eltern
Johanna und Hans-Peter Amend
gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Die urämische Kardiomyopathie	1
1.2	Die Proteinkinase C	3
1.2.1	Charakterisierung der Proteinkinase C	3
1.2.2	Expression der PKC am Rattenherz	4
1.2.3	Signaltransduktion der PKC	5
1.3	PKC-beeinflussende Hormonsysteme	9
1.3.1	Das Endothelin-System	10
1.3.2	Das Renin-Angiotensin-System	11
1.3.3	Beeinflussung des Endothelin- und des Renin-Angiotensin-Systems	11
1.4	Ziel der Studie	13
2.	Material und Methoden	14
2.1	Versuchsaufbau	14
2.1.1	Versuchstiere und Haltung	14
2.1.2	Totalnephrektomie	14
2.1.3	2/3-Nephrektomie	15
2.1.4	SHAM-Operation der Kontrolltiere	15
2.1.5	Gruppeneinteilung	17
2.2	Lösung und Applikation der Medikamente	17
2.2.1	Endothelin-Antagonisten BSF302146 und BSF302872	18
2.2.2	Losartan	18
2.2.3	Nebivolol	18

2.3	Verlaufsparemeter	18
2.3.1	Stoffwechselkäftig	18
2.3.2	Blutentnahme	19
2.3.3	Plethysmographische Blutdruckmessung	19
2.4	Explantation	20
2.4.1	Blutentnahme aus der Vena cava inferior	20
2.4.2	Organentnahme	20
2.5	Laborchemische Methoden	21
2.5.1	Proteinbestimmung nach Bradford	21
2.5.2	SDS-Gelelektrophorese	21
2.5.3	Westernblot	23
2.5.4	Immunfloureszenz und Filmentwicklung	24
2.5.5	Computerauswertung	25
2.6	Formeln und Statistik	25
3.	Ergebnisse	26
3.1	PKC-Isoformen am Rattenherz	26
3.2	Quantitative Expression der PKC-Isoformen	26
3.2.1	Endothelin-Antagonisten	27
3.2.2	Losartan	27
3.2.3	Kombinationstherapie: Losartan und ET _A -Antagonist	28
3.2.4	Nebivolol	28
3.3	Der LV/K-Quotient	32
3.4	Der systolische Blutdruck	34
3.5	Endothelin-Exkretion im Urin	37
3.6	Protein-Exkretion im Urin	41

4.	Diskussion	45
4.1	Methodenkritik	45
4.1.1	Tiermodell	45
4.1.2	Blutdruckmessung	45
4.1.3	Stoffwechselkäfig	46
4.1.4	Probengewinnung und Aufbereitung	46
4.1.5	Gelelektrophorese, Immuno-Blotting und Banden-Auswertung	47
4.2	Die PKC-Isoformen am Rattenherz	48
4.3	PKC-Expression, Herzgewicht und Blutdruck in der Urämie	49
4.4	Wirkung der medikamentösen Behandlung auf die PKC-Expression, Herzgewicht und Blutdruck	53
4.4.1	Endothelin-Rezeptor-Antagonisten	53
4.4.2	Losartan und Kombination (Losartan und ET _A -Antagonist)	55
4.4.3	Nebivolol	56
4.5	Protein-und Endothelin-Exkretion im Urin	58
4.5.1	Endothelin-Rezeptor-Antagonist	59
4.5.2	Losartan und Kombination	60
4.5.3	Nebivolol	61
4.6	Fazit	62
5.	Zusammenfassung	64
6.	Tabellarischer Anhang	67
7.	Anhang	94
6.1	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	94
6.2	Literaturverzeichnis	95

1. Einleitung

1.1 Die urämische Kardiomyopathie

Die Vergrößerung des Herzens in der Urämie ist ein schon lang bekanntes Charakteristikum, das erstmals Mitte des 19. Jahrhunderts von Richard Bright beschrieben wurde.²⁴ Viele Jahrzehnte lang wurde die Erforschung dieses Phänomens vernachlässigt. Erst mit der Entdeckung von molekularbiologischen Methoden und deren Anwendung wurde der Weg für eine weiter reichende Erforschung der kardialen Hypertrophie geebnet. Noch heute stellen kardiovaskuläre Komplikationen bei chronisch niereninsuffizienten Patienten sowohl im Rahmen der Dialysepflichtigkeit als auch nach erfolgreicher Nierentransplantation mit 50 % die häufigste Todesursache dar.¹⁰⁷ Dies zeigt, dass noch heute, über hundert Jahre nach Brights Entdeckung dieses Phänomen ein aktuelles Thema bei der Behandlung niereninsuffizienter Patienten ist.

Eine morphologische Manifestation der urämischen Kardiomyopathie ist die linksventrikuläre Hypertrophie (LVH). Diese führt unter anderem zu einer Erhöhung des kardialen Perfusionswiderstandes und stellt somit einen entscheidenden Risikofaktor für die Mortalität sowohl bei essentiellen Hypertonikern als auch bei Dialysepatienten dar^{82, 106, 132} Die strukturellen Veränderungen von Herz und Gefäßen zeigen sich auch in einer interstitiellen Fibrosierung des Myokards, in einer reduzierten intramyokardialen Kapillarisation mit Erhöhung der interkapillären Diffusionsstrecke, sowie einer Gefäßwandhypertrophie intramyokardialer und peripher-elastischer Arterien.^{5, 84} Längerfristig haben diese strukturellen Herzveränderungen eine systolische Dysfunktion zur Folge.

Die durch Niereninsuffizienz verursachte Hypertonie und Anämie, welche eine Druck- und Volumenbelastung für das Herz bedeuten, sind nicht allein Ursache der veränderten kardialen Morphologie und Funktion. Eine fortschreitende Zunahme des Verhältnisses von Herzgewicht zu Körpergewicht wird auch bei streng normotensiv eingestellten und mit rekombiniertem, humanem Erythropoietin behandelten Dialysepatienten beobachtet.^{28, 55, 112, 133} Eine zunehmende Bedeutung erlangen daher Hormone, auch „urämische Toxine“ genannt, die im Serum und Gewebe von Niereninsuffizienten eine abnorme Konzentration aufweisen und strukturelle sowie metabolische Veränderungen am Herzen hervorrufen. Sowohl das Endothelin-System als auch das Renin-Angiotensin-System zählen zu diesen sogenannten „urämischen Toxinen“. Ihre Konzentration und Aktivität sind in der Urämie erhöht.^{60, 66, 139} Ausserdem ist die Verfügbarkeit von Stickoxid (NO), einem wichtigen Antagonisten dieser beiden Hormonsysteme, vermindert.^{8, 116}

Aufgrund der Beobachtungen, dass Stimuli wie Endothelin-1 und Angiotensin II das Herz strukturell und funktionell beeinflussen und beide Hormonsysteme über den Phospholipase C-Weg auf die Proteinkinase C (PKC) wirken, wurde der PKC eine bedeutende Beteiligung am Prozess der kardialen Hypertrophie zugesprochen.^{9, 131} Sowohl experimentelle als auch klinische Studien konnten seither Verbindungen zwischen einer veränderten PKC-Expression und einer daraus resultierenden Auswirkung auf das kardiovaskuläre System herstellen.^{21, 51, 64, 68, 130} Selektiv mit bestimmten PKC-Isoformen transfizierte Kardiomyozyten zeigen hierbei eine erhöhte Synthese von Genen, den sogenannten „immediate early genes“ (z.B. c-fos und c-jun), deren mRNA typischerweise im Zustand der kardialen Hypertrophie vermehrt exprimiert werden.^{68, 130}

Die Herzhypertrophie ist also durch die Aktivierung der Proteinkinase C, die Expression von „immediate early genes“ und die Entwicklung eines erhöhten Zellvolumens sowie erhöhter Proteinanhäufung in den Kardiomyozyten in Abwesenheit einer Zellteilung charakterisiert. Trotz einer Fülle von experimenteller Daten, die die Entwicklung und das Voranschreiten der kardialen Hypertrophie im Zustand der Urämie betrachten, existieren bisher nur wenig Erkenntnisse über das Verhalten der kardialen PKC-Konzentration auf die urämische Stoffwechselsituation.

1.2 Die Proteinkinase C

1.2.1 Charakterisierung der Proteinkinase C

Bei der Entdeckung der Proteinphosphorylierung in den 50er Jahren des vorherigen Jahrhunderts wurde diesem biochemischen, durch sogenannte Kinasen katalysierten Prozeß schon damals eine Schlüsselrolle in der Zellfunktion zugeschrieben. Anfänglich als eine einzige Kinase beschrieben, konnten bis heute zwölf Unterformen isoliert werden.^{104, 105, 141} Biochemische und immunologische Studien konnten zeigen, daß Proteinkinasen in allen Körpergeweben exprimiert werden.^{54, 152} Die heute bekannten Proteinkinasen werden in Tyrosin-Kinasen und Serin/Threonin-Kinasen unterteilt. Zu letzteren zählt man die Proteinkinase C (PKC). Unterschiede in der Aktivierung durch Kalzium und Phospholipide führten zu einer weiteren Unterteilung in drei Gruppen.³³

Der Gruppe der konventionellen Isoformen gehören die α -, β_1 -, β_2 - und γ - PKC an, zu deren Aktivierung die Anwesenheit von Kalzium und Phospholipiden notwendig ist. Die zweite Gruppe, bestehend aus den neuartigen Isoformen δ , ϵ , θ , η und μ , zeichnet sich durch eine fehlende Kalziumbindungsstelle aus; Phospholipide sind jedoch weiterhin zur Aktivierung notwendig. Die atypischen Proteinkinasen C ζ , λ und τ besitzen keine der beiden Domänen, werden also Kalzium- und Phospholipid-unabhängig aktiviert (Tabelle 1.1).

Einige Isoformen, die PKC α oder ζ scheinen in sämtlichen Körpergeweben vorzukommen, andere (PKC β_2 , δ und ϵ) sind weitverbreitet, während Isoformen wie zum Beispiel die PKC λ nur in bestimmten Gewebetypen (Muskel- und Fettgewebe) vorzufinden ist.^{96, 102, 152}

	konventionell	neuartig	atypisch
Isoformen	$\alpha, \beta_1, \beta_2, \gamma$	$\delta, \epsilon, \theta, \eta, \mu$	ζ, λ, τ
Kalziumbindungsstelle	vorhanden	fehlt	fehlt
Phospholipidbindungsstelle	vorhanden	vorhanden	fehlt

Tabelle 1.1 : Klassifizierung der Proteinkinase C-Isoformen.³³

1.2.2 Expression der PKC am Rattenherz

Immuno-technische sowie auf PCR-basierende Methoden weisen auf das Vorkommen verschiedener PKC-Isoformen am Rattenherzen hin.⁷¹ Mehrere Studien belegen das Vorhandensein der Isoformen α , δ , ϵ und ζ . Kontrovers hingegen wird die Expression weiterer PKC-Isoformen diskutiert.^{17, 34, 91, 111}

Der Gehalt an PKC in Rattenherzen ist abhängig vom Entwicklungsstadium der Ratten. In der fetalen Entwicklung ist die Expression am höchsten, doch innerhalb der ersten beiden postnatalen Wochen sinken die Konzentrationen der Kalzium-abhängigen Isoformen PKC α und β sowie der neuartigen PKC δ stetig.^{31, 118} Im Gegensatz dazu ist die Abnahme der Expression der PKC ϵ nur gering. Sie wird auch am erwachsenen Tier weiterhin auf hohem Niveau exprimiert.^{31, 118}

Die molekulare und strukturelle Vielfältigkeit der Proteinkinase C weist auf spezifische Funktionen der Isoformen hin. Ein Vergleich der Tertiärstruktur der Kinase zeigt Unterschiede in der Oberflächenbeschaffenheit. Die molekularen Eigenschaften, wie die Abhängigkeit von Kofaktoren und die Substratspezifität, sind ähnlich, jedoch nicht vollständig übereinstimmend. PKC-Isoformen können

daher gleiche und auch voneinander abweichende Funktionen übernehmen. Beweise für die spezifischen Funktionen der einzelnen PKCs liefern Studien, die durch selektive Überexpression der Unterformen einen Zusammenhang mit Veränderungen im Zellstoffwechsel herstellen.^{65, 130}

1.2.3 Signaltransduktion der PKC

Zur besseren Veranschaulichung der PKC-Signaltransduktion soll das Schaubild 1.1 dienen. Die jeweiligen Schritte der PKC-Aktivierung sind mit Zahlen gekennzeichnet und werden im folgenden näher erklärt :

1. Im ersten Schritt bildet ein extrazellulärer Ligand mit einem membranären, hochaffinen Oberflächenrezeptor einen Rezeptor-Liganden-Komplex. Dieser Komplex ermöglicht die Übertragung des Signals von extrazellulär nach intrazellulär. Liganden an solchen membranären Rezeptoren können Endothelin-1 (ET-1), Angiotensin II (Ang II) oder auch Agonisten am α_1 -Rezeptor (z.B. Noradrenalin) sein.^{15, 50, 80, 114}
2. Der membranäre Oberflächenrezeptor besitzt die Fähigkeit intrazellulär G-Proteine zu binden. G-Protein bestehen aus drei Untereinheiten (α , β und γ) und haben die Eigenschaft Guanosphosphate anzulagern.³⁹ Formiert sich nun ein Rezeptor-Liganden-Komplex, so bewirkt dies die Abspaltung von Guanosindiphosphat (GDP) von der α -Einheit des G-Proteins und anschließender Anlagerung von Guanosintriphosphat (GTP) an die Stelle des GDPs. Die α -GTP-Untereinheit dissoziiert vom $\beta\gamma$ -Komplex und bewirkt eine Signalweiterleitung intrazellulär.

3. Der entstandene α -GTP-Komplex besitzt die Fähigkeit mehrere Effektormoleküle zu aktivieren. Für die Aktivierung der PKC ist die Phospholipase C (PLC) wichtig. Die Stimulierung dieses Enzyms führt zur Hydrolyse von membranärem Phosphoinositol-4,5-Bisphosphonat (PIP₂) in Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP₃) und 1,2-Diazylglyzerol (DAG).^{50, 114, 142} ET-1 und Ang II besitzen zudem noch die Fähigkeit, die Phospholipase A₂ und die Phospholipase D zu stimulieren. Die Aktivierung dieser Enzyme bewirkt eine zusätzliche Akkumulation von DAG.^{20, 42, 115}
4. Das lipophile DAG verbleibt in der Zellmembran und aktiviert direkt die Proteinkinase C, welche im aktivierten Zustand an Phospholipidmembranen gebunden ist.
5. Das bei der Stimulierung der PLC ebenfalls freigesetzte IP₃ mobilisiert Kalzium-Vorräte aus dem endoplasmatischen Retikulum. Diese werden unter IP₃-Einfluss vermehrt ins Zytoplasma abgegeben und bewirken eine erhöhte intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration.
6. Bei der Aktivierung der konventionellen Proteinkinasen sind zwei Schritte von Bedeutung: Im ersten Schritt fördert die gestiegene, intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration die Bindung von Ca²⁺ an die inaktive PKC. Dies führt zu einer veränderten Konformation und damit zu einer Translokation der im inaktiven Zustand im Zytosol gelegenen PKC an die Phospholipid-Membranen. In einem zweiten Schritt bindet die membranständige PKC Diazylglyzerol (DAG), was eine Enzymaktivierung zur Folge hat.^{100, 101}

7. Stimulierung der Gentranskription:

Eine Aktivierung der PKC-Signalkaskade durch Besetzung der transmembranär Rezeptoren durch mitogene Faktoren wie Angiotensin II oder Endothelin-1 hat die Stimulation der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAP-Kinase) durch sequentielle Phosphorylierung zur Folge. Die phosphorylierte MAP-Kinase transloziert in den Zellkern und induziert dort die vermehrte Expression von frühembryonalen Genen, den sogenannten „early genes“ (z.B. c-fos, c-jun, Egr-1). Die durch die PKC aktivierte MAP-Kinase ist an nukleären Reaktionen, die zu zellulärem Wachstum und zur Differenzierung beitragen, beteiligt. Weiterhin wird durch die Phosphorylierung des Na^+/K^+ -Austauschers der intrazelluläre pH-Wert gesteigert, ein stimulierendes Signal für die DNA-Synthese. Beide Stoffwechselwege, sowohl die MAP-Kinasen-Aktivierung als auch die Stimulation des Na^+/K^+ -Austauschers, werden durch die Proteinkinase C gesteuert und begünstigen sich gegenseitig bei der Expression spezifischer Gensequenzen. Neben der erhöhten Transkription von DNA-Sequenzen kommt es auch zu einer Suppression bestimmter Gene.^{70, 79, 86, 122, 129, 137}

8. Auswirkungen auf die Herzmechanik:

Konsequenzen aus der Phosphorylierung intrazellulärer Proteine ergeben sich nicht nur für die Veränderungen im Zellstoffwechsel, sondern auch für die veränderten Bedingungen der Herzmechanik. Der durch die Aktivierung der Phospholipase C (PLC) entstandene ‚second messenger‘ IP_3 setzt Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern frei.⁸⁵ Außerdem wird durch Öffnung membranständiger Kalzium-Kanäle zusätzlich Ca^{2+} von extrazellulär mobilisiert.^{47, 155} Die Phosphorylierung von Myosinleichtketten (MLC = myosin light chain) bewirkt eine Zunahme der Ca^{2+} -Sensitivität des kontraktile Apparats. Außerdem wird durch die Phosphorylierung des Na^+/K^+ -Austauschers der intrazelluläre pH-Wert erhöht, was ebenfalls eine positive Wirkung auf die Kontraktilität hat.^{88, 146}

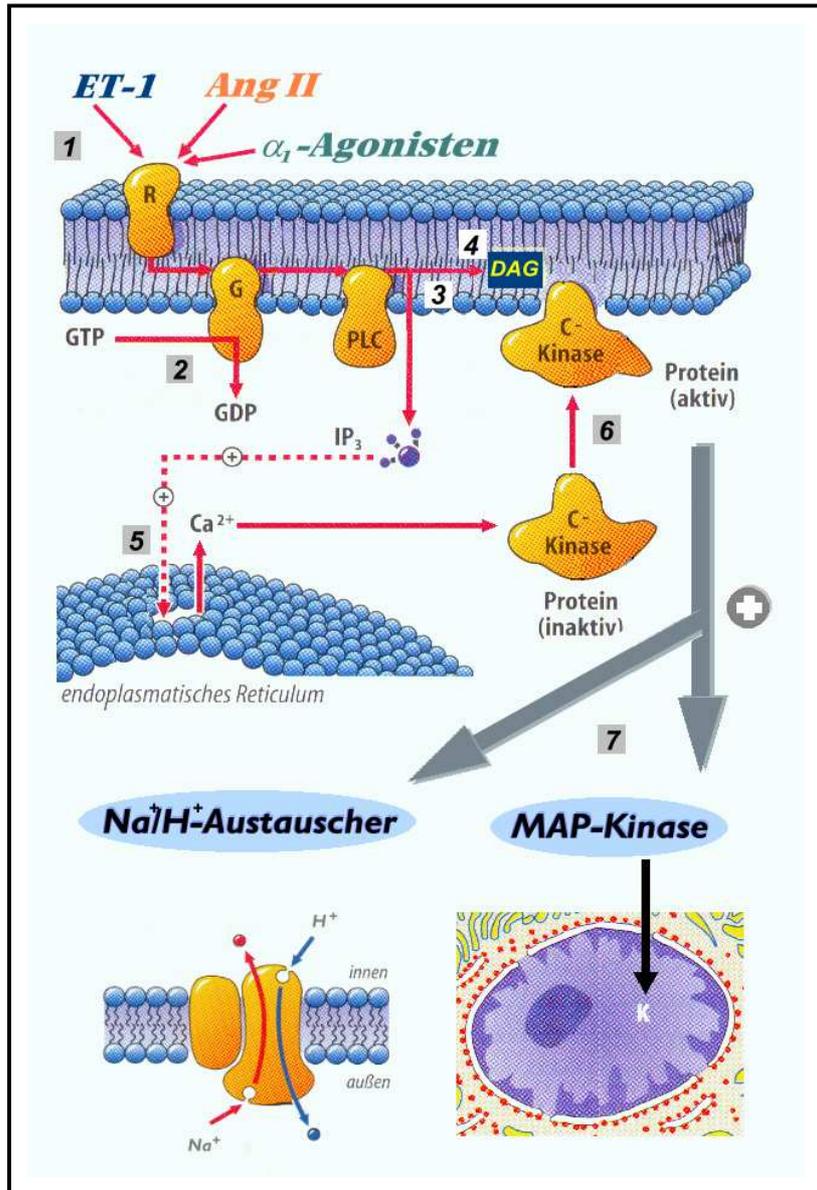


Schaubild 1.1 : Schema der PKC-Signaltransduktion

LEGENDE:

ET-1 : Endothelin-1	Ang II : Angiotensin II
R : Liganden-Rezeptor, extrazellulär	G : G-Protein
GTP/GDP : Guanosin-tri/di-Phosphat	PLC : Phospholipase C
DAG : Diazylglyzerol	IP₃ : Inositol-tri-Phosphat
C-Kinase od. PKC : Proteinkinase C	MAP-Kinase : mitogen aktivierte Proteinkinase

Zusammenfassend betrachtet wirkt sich die Aktivierung der PKC positiv inotrop auf die Herzmuskulatur aus.

1.3 PKC-beeinflussende Hormonsysteme

Eine wesentliche Ursache der Hypertrophie des Herzens ist die Kompensation einer erhöhten Nachlast oder einer gestörten Herzfunktion. So können veränderte mechanische Bedingungen am Herzen, wie zum Beispiel die Dehnung des Herzmuskels oder eine erhöhte Druckbelastung des Ventrikelsystems einen Anstieg der Proteinsynthese im Herzmuskel bewirken.^{63, 95} Bei diesem Prozess wird ein physikalisches Signal (Dehnung und Druck) in ein biochemisches Signal in Form eines „second messengers“ (IP₃ und DAG) umgewandelt.

Die Signale, die zu einem Myozytenwachstum sowie zu einer Proliferation kardialer Fibroblasten führen, stammen jedoch auch von Wachstums- sowie neurohumeralen Faktoren. Beispiele hierfür sind Angiotensin II, Endothelin-1, α_1 -adrenerge Agonisten, Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (FGF) und Insulin-ähnliche Wachstumsfaktoren.^{2, 9, 10, 15, 61, 80, 108, 131, 138} Für die kardiale Hypertrophie im Rahmen einer urämischen Stoffwechselsituation ist vor allem das Renin-Angiotensin-System (RAS) sowie das Endothelin-System von Bedeutung.^{60, 66, 139} Wegen ihrer bedeutenden Beteiligung an der urämischen Kardiomyopathie und zum besseren Verständnis der Wirkung der (in der vorliegenden Studie) verwendeten Antagonisten an diesen beiden Hormonsystemen, wird im folgenden näher auf sie eingegangen.

1.2.1 Das Endothelin-System

Die Wirkung des stärksten, bisher bekannten Vasokonstriktors beschränkt sich nicht nur auf das Gefäßsystem.^{155, 156} Schon bald nach seiner Entdeckung in den späten 80er Jahren des vorigen Jahrhunderts konnte eine Beziehung zwischen dem Endothelin-1 und der Herzhypertropie hergestellt werden.^{60, 61, 138}

Im Gewebe von Ratten kommen die drei Endothelin-Isoformen ET-1, ET-2 und ET-3 vor.⁵⁸ Die ET-1-Bildung findet hauptsächlich in den Endothelzellen statt, jedoch besitzen auch viele andere Zellen die Fähigkeit zur Synthese und Sekretion.¹²⁴ Im Herzgewebe wird ET-1 von Kardiomyozyten, Fibroblasten, Endothelzellen und glatten Muskelzellen sezerniert und wirkt sowohl in parakriner als auch in autokriner Weise.^{60, 77, 78} Die ET-1-Synthese wird durch Faktoren wie Angiotensin II und Katecholamine begünstigt.^{69, 126} Stickstoffmonoxid (NO) und Prostazyklin hingegen hemmen die Bildung von ET-1 über die Stimulation der Guanylatzyklase und die Produktion von cAMP. Weiterhin inhibiert das atriale natriuretische Peptid die ET-Bildung.^{110, 113}

Es existieren zwei Typen von Endothelin-Rezeptoren am Rattenherzen, der ET_A- und der ET_B-Rezeptor.^{6, 59, 125} Die Rezeptoren sind in verschiedene G-Protein-gekoppelte Signaltransduktionswege integriert: Während die ET_A-Aktivierung über den Phospholipase C-Weg zur Stimulierung der Proteinkinase C führt, wird bei der Aktivierung des ET_B-Rezeptors durch Anregung der kalziumabhängigen NO-Synthase (eNOS) Stickstoffmonoxid freigesetzt.^{7, 114} Die ET_A- und die ET_B-Rezeptoren wurden nach ihrer unterschiedlichen Bindungsaffinität für die drei Endothelin-Isoformen klassifiziert, wobei der ET_A-Rezeptor ET-1 > ET-2 > ET-3 bindet. Der ET_B-Rezeptor besitzt für alle drei Isoformen die gleiche Affinität.^{6, 53} Der ET_A-Rezeptor ist überwiegend an den inotropen und wachstumsfördernden Eigenschaften des ET-1 beteiligt.⁶¹ Die Blockade des ET_B-Rezeptors hingegen verringert die pulmonale Clearance des zirkulierenden ET-1 und reduziert die

NO-abhängige Vasodilatation. Mit Hilfe von Endothelin-Rezeptor-Antagonisten wird eine genauere Untersuchung des Endothelin-Systems möglich. Es wird zwischen selektiven ET_A- oder ET_B- und unselektiven ET_{AB}-Antagonisten unterschieden.

1.2.2 Das Renin-Angiotensin-System

Das zirkulierende Renin-Angiotensin-System (RAS) besteht aus Angiotensinogen, welches durch die Einwirkung von Renin, in Angiotensin I (Ang I) gespalten wird. Ang I wird durch das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) in Ang II umgewandelt. Ang II aktiviert die Plasmamembranrezeptoren AT₁ und AT₂, die aufgrund ihrer Affinität zu spezifischen, nicht-peptidergen Antagonisten unterschieden werden.^{143, 153} Das RAS kommt in einer Vielzahl von Geweben vor, ein Hinweis darauf, dass lokal produziertes Ang II Einwirkung auf die Gewebefunktion hat. Auch das Herz hat die Möglichkeit, sämtliche Komponenten des RAS selber zu synthetisieren.^{36, 37, 41} Seine Aktivierung führt längerfristig zu einer kardiovaskulären Hypertrophie und zu einer Myokardfibrose.^{129, 150} Die positive Korrelation zwischen der Expression des RAS und der linksventrikulären Hypertrophie, ebenso wie die vorteilhaften Effekte von RAS-Inhibitoren, weisen auf eine bedeutende Beteiligung von Angiotensin II als kardiovaskulären Wachstumsfaktor hin.¹⁵⁸

1.2.3 Beeinflussung des Endothelin- und des Renin-Angiotensin-Systems

Das RAS und das ET-System sind beide an der Regulierung kardiovaskulärer und juxtaglomerulärer Funktionen der Niere beteiligt und beeinflussen sich gegenseitig. So fördert Ang II die Bildung von ET-1.⁶⁹ Folglich wird eine durch Ang II hervorgerufene kardiale Hypertrophie unter anderem durch eine erhöhte ET-1-Expression im Gewebe verursacht.⁶⁰ Andererseits kommt es zu einer verstärkten Konversion von Ang I zu Ang II unter ET-1-Einfluss.⁶⁷ Allerdings inhibiert ET-1 das RAS vor allem durch die Hemmung der Renin-Sekretion von juxtaglomerulären Zellen.^{3, 73, 140}

Bedeutend für die Expression von ET-1 und Ang II ist auch das Stickoxid-System (NO). Ist die Gewebsmasse der Niere verringert sinkt der Gehalt an NO im Nierengewebe stark.⁴ NO hat sowohl auf die ET-1-Sekretion als auch auf das RAS einen inhibierenden Einfluss.^{29, 72} Eine reduzierte NO-Konzentration führt also zum Anstieg der Aktivität der an der urämischen Kardiomyopathie beteiligten Enzymsysteme (Schaubild 1.2).

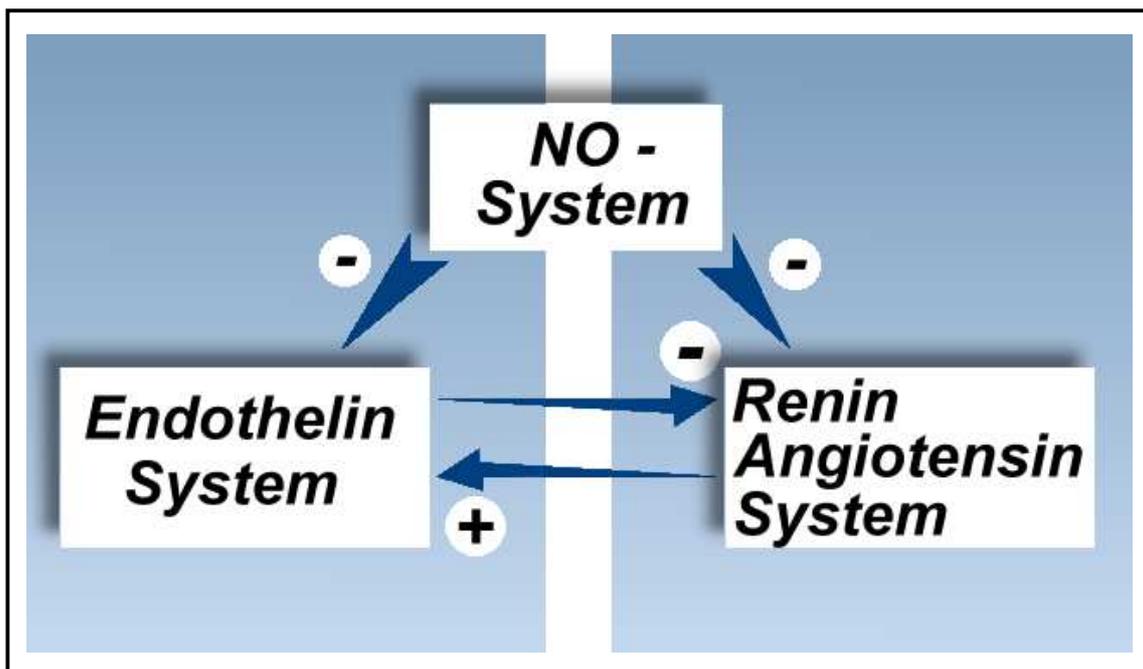


Schaubild 1.2 : Wechselwirkungen zwischen dem Endothelin-, dem Renin-Angiotensin- und dem NO-System

1.4 Ziel der Studie

Die Beteiligung der Proteinkinase C am Prozeß der kardialen Hypertrophie ist bekannt. Bei mehreren Modellen der Herzhypertrophie konnten erhöhte Konzentrationen verschiedener PKC-Isoformen nachgewiesen werden. Bislang liegen jedoch keine Daten über eine veränderte Expression von PKC-Isoformen an Rattenherzen nach 5/6-Nephrektomie vor. Ziel der Studie ist daher die Veränderungen der PKC-Isoformen im Myokard bei urämischer Kardiomyopathie zu untersuchen. Weiterhin wird die Wirkung einer Behandlung der urämischen Ratten mit dem selektiven ET_A- (BSF 302146) oder unselektiven ET_{AB}-Antagonisten (BSF 302872), Losartan (selektiver AT₁-Rezeptor-Antagonist) oder Nebivolol (selektiver β₁-Blocker mit NO-freisetzender Wirkung) auf die PKC-Expression untersucht. In einer weiteren Gruppe wird Losartan und der selektive ET_A-Antagonist (BSF 302146) in Kombination verabreicht.

In der durchgeführten Studie wird außerdem der Einfluß der Endothelin- sowie Angiotensin-Rezeptor-Antagonisten auf das Herzgewicht, den Blutdruck und die Nierenfunktion urämischer Ratten untersucht. Ergänzend wird die Veränderung der Endothelin-Konzentration im Urin beobachtet.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchsaufbau

2.1.1 Versuchstiere und Haltung

Die Untersuchungen wurden an männlichen Sprague-Dawley-Ratten (Charles River, Sulzfeld) durchgeführt. Die Haltung der Tiere erfolgte unter standardisierten Bedingungen (Raumtemperatur 22,5° C, Luftfeuchtigkeit ~ 60 g/m³) in Einzelkäfigen (Ehret, Emmendingen). Es herrschte ein künstlicher Tag/Nacht-Rhythmus im 12 Stundenwechsel. Die Tiere hatten freien Zugang zu Trinkwasser und Standardfutter (Altromin 1320, Altromin, Lage).

2.1.2 Totalnephrektomie

Nach einwöchiger Ruhephase in Einzelkäfigen wurde die rechtseitige Nephrektomie durchgeführt. Die Narkose der Tiere erfolgte durch intraperitoneale Applikation eines Gemisches aus Ketanest (0,3 ml 50 mg/ml Ketamin), Rompun 2% (0,09 ml Xylazinhydrochlorid) und Atropin (0,02 ml). Vor Präparationsbeginn wurde die rechte Flanke mittels Nassrasur von Fellhaaren befreit. Nach Erreichen der erwünschten Narkosetiefe wurden die Tiere in Bauchlage auf der Operationsunterlage fixiert. Nach gründlicher Desinfektion des Operationsgebietes erfolgte ein circa 20 mm langer, in ausreichendem Abstand unterhalb des Rippenbogens geführter Hautschnitt. Der Peritonealraum wurde durch Durchtrennung der Bauchmuskulatur und Spaltung der Bauchfellfaszie eröffnet. Daraufhin ließ sich die Niere aus dem intraperitonealen Gewebe nach außen luxieren. Durch vorsichtiges Zupfen mit den Fingerspitzen wurde die Organkapsel eingerissen und abgestreift. Auf diese Weise blieb die Nebenniere unversehrt. Die anschließende Ligation (Vicryl, Stärke 3/0, resorbierbar, Ethicon, Norderstedt) und Durchtrennung des freiliegenden Nierenstils gab das Organ frei. Das Feuchtgewicht des entfernten Organs wurde sofort auf einer Feinwaage (KB BA 100, Sartorius AG, Göttingen) bestimmt.

Der muskuläre Wundverschluß erfolgte mittels resorbierbarem Faden (Vicryl, Stärke 0/0, Nadel CT-2 plus, Ethicon, Norderstedt), die Hautadaption mit monophilem, nicht resorbierbarem Faden (Polyamid, Stärke 2/0, Nadel FS1 24 mm, 3/8c., Ethicon, Norderstedt). Während der Aufwachphase wurde das Auskühlen der Tiere durch Rotlichtbestrahlung verhindert.

2.1.3 2/3-Nephrektomie

In einem zweiten chirurgischen Eingriff am siebten postoperativen Tag wurden die Tiere analog der ersten Operation narkotisiert, die kontralaterale, linke Niere präpariert und unter Schonung der Nebenniere die Nierenkapsel entfernt. Anschließend erfolgte die Resektion von jeweils 1/3 der beiden Polenden. Die sanfte Kompression der entstandenen Wundflächen des Restorgans mit einer sterilen Kompresse führte zu einem Sistieren der Blutung. Es folgte der Wundschluß wie bei der Totalnephrektomie beschrieben. Das Gewicht des resezierten Parenchyms wurde mittels Feinwaage bestimmt.

2.1.4 SHAM-Operation der Kontrolltiere

Die Tiere der Kontrolle wurden zweimal scheinoperiert und zwar bis einschließlich der Dekapsulation der Nieren. Die Nieren selber blieben jedoch unversehrt. Diese Tiere wurden in die Kontroll-Gruppe aufgenommen.

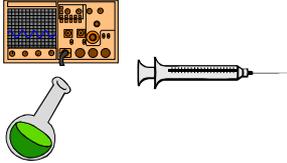
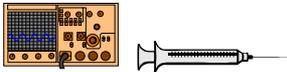
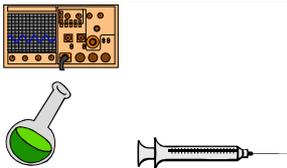
Woche	Versuchsablauf	
-2	<ul style="list-style-type: none"> • Blutdruck • Stoffwechselläufig • Blutentnahme 	
-1	<ul style="list-style-type: none"> • Totalnephrektomie rechts 	1.OP
0	<ul style="list-style-type: none"> • 2/3-Nephrektomie links • Beginn der Medikation 	2.OP 
1		
2	<ul style="list-style-type: none"> • Blutdruck • Blutentnahme 	
3		
4	<ul style="list-style-type: none"> • Stoffwechselläufig • Blutentnahme 	
5		
6	<ul style="list-style-type: none"> • Blutdruck 	
7		
8	<ul style="list-style-type: none"> • Stoffwechselläufig • Blutentnahme 	
9		
10		
11		
12	<ul style="list-style-type: none"> • Blutdruck • Stoffwechselläufig • Blutentnahme • Organ-Explantation  	

Schaubild 2.1 : Versuchsablauf und Messzeitpunkte verschiedener Diagnostika

2.1.5 Gruppeneinteilung

Die Versuchstiere wurden in sieben Gruppen aufgeteilt und erhielten unterschiedliche Medikamente über ihr Trinkwasser (Tabelle 2.1).

	Gruppe	5/6 NE	Medikation	Dosierung
1	Kontrolle	nein*	keine	
2	SNX	ja	keine	
3	SNX/ET_A	ja	selektiver ET _A -Antagonist (BSF 302146)	30 mg/kg KG
4	SNX/ET_{AB}	ja	unselektiver ET _{AB} -Antagonist (BSF 302872)	30 mg/kg KG
5	SNX/L	ja	Losartan	10 mg/kg KG
6	SNX(L/ET_A)	ja	Losartan und ET _A -Antagonist (BSF 302146)	10 bzw. 30 mg/kg KG
7	SNX/N	ja	Nebivolol	1 mg/kg KG

Tabelle 2.1 : Gruppeneinteilung, Charakteristika sowie Medikation und Medikamenten-Dosierung in den einzelnen Gruppen;

NE = Nephrektomie

SNX = subtotal (5/6) nephrektomierte Tiere

***** = SHAM-operiert

2.2 Lösung und Applikation der Medikamente

Am dritten postoperativen Tag der Zweit-OP wurde mit der Medikamentenverabreichung in den Gruppen 3 bis 7 begonnen. Eine fortlaufende Dosisanpassung der gelösten Substanzen war durch eine wöchentliche Gewichtsmessung der Tiere gewährleistet. Das Medikament wurde den Trinkflaschen untergemischt. Die aufzufüllende Trinkwassermenge berechnete sich aus der protokollierten Trinkmenge der letzten 48 Stunden zuzüglich einer Reserve von 30 ml. Bei konstanter Flüssigkeitsaufnahme wurde die Zieldosis erreicht. Aluminium-Manschetten um die Trinkflaschen sollten das Medikament vor Lichtzerfall schützen.

2.2.1 Endothelin-Rezeptor-Antagonisten BSF302146 und BSF302872

Zur Lösung der Endothelin-Rezeptor-Antagonisten (ET-Antagonisten) wurde Trinkwasser mit 1 N NaOH auf pH 9 alkalisiert, das Medikament gelöst und anschließend der pH-Wert mit 1 N HCl auf pH 7 zurücktitriert. Das verflüssigte Medikament wurde den Tieren in der entsprechenden Dosierung in die Trinkflaschen appliziert.

2.2.2 Losartan

Losartan war in Wasser ausreichend löslich. Daher war kein spezielles Vorgehen zur Lösung des Medikaments notwendig.

2.2.3 Nebivolol

Nebivolol war in Leitungswasser nicht ausreichend löslich. Deshalb wurde zur Solubilisierung des Medikaments zweifach deionisiertes Wasser verwendet. Außerdem wurde Methyl-Zellulose in einem Verhältnis von 2:1 (Methyl-Zellulose : Nebivolol) untergemischt. Die verwendete Methyl-Zellulose diente als Lösungsvermittler.

2.3 Verlaufsparemeter

Um die Wirkung der Urämie und der Medikamentengabe auf den Stoffwechsel zu beobachten, erfolgte die Bestimmung von Verlaufsparemetern aus Blut und Urin. Außerdem wurde eine unblutige Blutdruckmessung mittels der „tail-cuff-Methode“ vorgenommen.

2.3.1 Stoffwechselkäfig

Um Urinparameter, wie die Protein-Exkretion, Endothelin-1-Konzentration sowie die Urinmenge bestimmen zu können, wurden die Versuchstiere 24 Stunden lang in einem Spezialkäfig (Metabolic cage, Techniplast, Buguggiate, Italien) gehalten. Diese Käfige erlauben, Urin und Faeces getrennt zu sammeln und die Trinkmengen genau zu bestimmen. Die so gewonnenen Sammelurine sind im Zentrallabor des Universitätsklinikums Tübingen bestimmt worden. Für die Messung von Protein wurde der Hitachi Multianalyser 747 (Japan) verwendet.

Die Bestimmung der ET-1 aus dem Urin führte die Immunodiagnostik GmbH (Bensheim) durch und basierte auf immunoreaktiven Methoden.⁷⁶ Proben, die nicht sofort einer Untersuchung unterzogen wurden, lagerten im Gefrierschrank bei einer Temperatur von -20°C .

2.3.2 Blutentnahme

Die Gewinnung von Blut erfolgte durch Setzen einer Läsion im Bereich der Rattenschwanzspitze. Durch vorsichtiges Ausstreichen des Schwanzes in Richtung Läsion konnte das Blut über eine Kapillare in ein EDTA-Cup bzw. Eppendorfgefäß (für die Serumparameter) überführt werden. Anschließend wurden die Aliquots mit dem Serumblut zentrifugiert. Die Messung der Serumwerte erfolgte mit dem Hitachi Multianalyser 747 (Japan). Die Bestimmung des ET-1-Spiegels im Blut wurde von der Immunodiagnostik GmbH (Bensheim) durchgeführt.

2.3.3 Plethysmographische Blutdruckmessung

Der verwendete Plethysmograph stammte aus der Werkstatt des Physiologischen Instituts Tübingen und wurde anhand von Literaturvorgaben konstruiert.¹⁰⁹ Nach einer Vorwärmzeit der Tiere in einer Wärmekammer für 15 Minuten bei 35°C erfolgte die Messung des arteriellen, systolischen Blutdrucks in der Schwanzarterie. Hierbei wurde zuerst die Druckmanschette, dann der Detektor auf den Schwanz aufgeschoben. Über ein Piezoelement kann dieser Detektor das Pulsieren des Gefäßes nach entsprechender Signalverstärkung und –umwandlung akustisch wiedergegeben. Der Druck in der aufblasbaren Druckmanschette wurde mittels Quecksilbermanometer dargestellt. Beim Messvorgang konnte ein Druck von 200 mmHg aufgebaut, anschließend mit maximal 10 mmHg pro Sekunde wieder abgelassen und die Höhe der Quecksilbersäule zum Zeitpunkt des Beginns der Pulsation notiert werden. Somit ergab sich der systolische Blutdruck. Zur Verifizierung des Ergebnisses wurde die Messung, nach einer jeweils einminütigen Pause zwischen den Messungen, noch zweimal wiederholt. Das arithmetische Mittel der drei Einzelwerte zählte als Endwert.

2.4 Explantation

Am Ende der zwölften postoperativen Versuchswoche erfolgte die letzte Blutentnahme sowie die Explantation der Organe. Als Anästhetikum diente ein Substanzgemisch aus Ketamin (0,6 ml) und Rompun 2% (0,18 ml), das analog zu den Nephrektomien intraperitoneal appliziert wurde. Nach Erreichen der erwünschten Narkosetiefe legte eine mediane Thorakotomie und ein medianer Bauchschnitt die Organe des Brust- und Bauchraums frei.

2.4.1 Blutentnahme aus der Vena cava inferior

Durch Interposition des Intestinums auf die linke Seite stellte sich die Vena cava inferior und ihre Bifurkation dar. Mittels einer Butterfly-Kanüle (B.Braun AG Melsungen) wurde im Bereich der Aufzweigung das Gefäß punktiert, das gewonnene Blut auf die auf Eis vorgekühlten Monovetten (2,7 ml EDTA-Monovette für die Endothelin-Bestimmung) verteilt und anschließend zentrifugiert (2000g, 15 Minuten, 4° C, Megafuge 1.0R, Heraeus, Hanau). Die Lagerung des Plasmas bzw. Serums bis zur Bestimmung erfolgte im Gefrierschrank bei -20° Celcius.

2.4.2 Organentnahme

Im Anschluß an die Blutentnahme erfolgte die sofortige Explantation von Herz, Lunge, Niere, Gehirn, Aorta, Halsschlagadern und Mesenterialarterien. Nach Spülung der Organe in 0,9% NaCl-Lösung wurden sie von Binde- und Fettgewebe befreit, das Herz zusätzlich noch in Vorhöfe, linken und rechten Ventrikel zerlegt. Die Organteile wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und im Gefrierschrank bei -80° Celcius aufbewahrt. Die Kühlkette wurde bei diesem Vorgang nicht unterbrochen.

2.5 Laborchemische Methoden

Aus dem bei der Explantation gewonnenen linken Ventrikel wurde mittels Homogenisator (Polytron PT3000, Kinematic AG, Littau, Schweiz) unter Zusatz von 4 ml 50 mM Tris-Puffer ein Homogenat hergestellt. Die Proben wurden während des gesamten Vorgang auf Eis gekühlt, dann schockgefroren und anschließend wieder im Gefrierschrank bei -80° Celcius aufbewahrt.

2.5.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Proteinbestimmung diente die Methode von Bradford.²² Pro Ansatz wurden dabei 1200 μ l H_2O , 200 μ l Dye-Reagenz (Bio-Rad, München), 200 μ l 0,1 N NaOH und 0,5 μ l des Homogenats eingesetzt und gegen eine Konzentrationsreihe aus Rinderalbumin gemessen. Es erfolgte eine Dreifachbestimmung sowohl der Extinktion des Standards, als auch der Kontrollen bei einer Wellenlänge von 595 nm am Eppendorf Photometer 1101M.

2.5.2 SDS-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Proteingemischen in Abhängigkeit von Molekulargewicht und Ladung. Für die Durchführung wurde das vertikale Gelelektrophoresesystem von Hoefer der SE 600-Serie und das Power Supply EPS 600 verwendet (beide Systeme von Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Glasplatten (18x16 cm), Trennplatten, Kämmen (15 Zinken, 1 mm breit), Abstandhalter (1 mm breit) und Plattenhalter (Gel caster) entstammen ebenfalls der SE 600-Serie. Im ersten Schritt wurden die Gele angefertigt (Tabelle 2.2).

	Zusammensetzung	Gellänge	Geldicke
Sammelgel	3 % Bisacrylamid/Acrylamid 1 % SDS 0,5 M Tris-HCl pH 6,8	4 cm	1 mm
Trenngel	9 % Bisacrylamid/Acrylamid 1 % SDS 1,5 M Tris-HCl pH 8,8	12 cm	1 mm
Elektrophorese- puffer	25 mM Tris-HCl 192 mM Glycin 0,1 % SDS		

Tabelle 2.2: Zusammensetzung und Schichtung der verwendeten Bisacrylamidgele

Nach zehnmütiger Entgasung wurde durch Zugabe einer zehnpromzentigen APS (Ammoniumperoxodisulfatlösung, 1 µl/ml Sammelgel, 0,75 µl/ml Trenngel) und TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin, 10 µl/ml Sammelgel, 3,5 µl/ml Trenngel) die Polymerisation gestartet und die noch flüssigen Gele vorsichtig in die Gelkammer geschichtet. Im Anschluß an die Polymerisation beider Gele folgte das Einsetzen der Gelplatten in die Gelelektrophoresekammer .

Das aus den linken Herzen gewonnene Homogenat wurde kurz vor der Verwendung aus dem Gefrierschrank (-80° C) herausgeholt und aufgetaut. Im folgenden Schritt wurden die Proben mit Tris-Puffer 1:10 verdünnt (50 mM Tris-HCl, pH 7,4) und anschliessend Probenpuffer (130 mM Tris-HCl, pH 6,8, 4% SDS, 20% Glycerin, 10% β-Mercaptoethanol, 0,01% Bromphenolblau) im Verhältnis 1:1 hinzugefügt. Es folgte die Denaturierung im Thermomixer comfort (70° C, 3 Minuten, Eppendorf, Hamburg). Nach Abkühlung der Proteinproben wurden die Geltaschen mit dem Proben-Tris-Puffer-Gemisch so beschickt, dass jede Tasche 30 µg Protein enthielt. Die verwendete Konzentration des Proteins in der Gelelektrophorese wurde durch Optimierung in Versuchen mit Standardreihen ermittelt.

In jeder Versuchsreihe wurden Eichproteine (Prestained Protein Molecular Standards (14300-200000 kDa) GibcoBRL) mitgeföhren. Die Elektrophorese fand bei konstanter Stromstärke über Nacht statt.

Reagenziennachweis:

- Rotiphorese Gel 30 (Carl Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe)
- 10 % SDS Soln (Bio Whittaker, Walkersville, USA)
- Ammoniumperoxodisulfat (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe)
- N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg)

2.5.3 Westernblot

Der Transfer der Proteine vom Trenngel auf eine Nitrozellulosemembran (Hybond-C, 0,45 Micron, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) erfolgte nach der Methode von Towbin et al. (1979). Die Blotdauer betrug 30 min bei 500 mA (Hofer EPS 2A200, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) und Kühlung auf 15° Celcius (Kühlaggregat Julabo F25, Kirchheim/Teck).

	Zusammensetzung
Blot-Puffer	25 mM Tris-HCl 192 mM Glycin
PBS-Puffer	140 mM Natriumchlorid 2,7 mM Kaliumchlorid 6,5 mM Di-Natrium-Hydrogenphosphat 1,5 mM Kalium-di-Hydrogenphosphat Tween 20 (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn)

Tabelle 2.3 : Zusammensetzung der Blot- und Elektrophorese-Puffer

Nach abgeschlossener Übertragung wurden freie Bindungsstellen auf der Membran für eine Stunde mit einer Rinderalbuminlösung (5% Milchpulver, 3% bovines Albumin BSA, Carl Roth GmbH & CoKG in 1 % PBS-Puffer) abgeblockt.

Anschließend erfolgte die Inkubation der Nitrozellulose für drei Stunden bei Raumtemperatur mit monoklonalen Antikörpern (in 10% Milchpulver und 1% PBS-Puffer), die jeweils spezifisch für eine PKC-Isoform waren (Tabelle 2.4). Nachfolgend wurde nicht gebundene Antikörper durch dreimaliges Waschen (5 Minuten pro Waschgang) der inkubierten Nitrozellulose-Membran in je 50 ml PBS-Puffer entfernt. Anschließend erfolgte die Zugabe des peroxidase-konjugierten Zweit-Antikörpers (aus Pferde-Serum), der für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert wurde und selektiv an den Erst-Antikörper gebunden wurde. Es schloß sich ein weiterer Waschgang an.

Erst-Antikörper	Antikörper-Serum aus	Verdünnung (in PBS)	Zweit-Antikörper-Serum aus	Verdünnung (in PBS)
α	Kaninchen	1:5000	Pferden (gegen die Erst-Antikörper von Mäusen oder Kaninchen)	1:1000
β_1	Mäusen	1:4000		1:1000
β_2	Mäusen	1:4000		1:1000
δ	Kaninchen	1:3000		1:500
ϵ	Kaninchen	1:3000		1:1000
ζ	Kaninchen	1:3000		1:1000

Tabelle 2.4 : Art, Konzentrierung und Herkunft der verwendeten Erst-Antikörper gegen die PKC-Isoformen (Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim) sowie der Zweit-Antikörper aus Pferdeserum (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

2.5.4 Immunfluoreszenz und Filmentwicklung

Um die gebundenen Zweitantikörper sichtbar zu machen wurden sie mittels Entwicklerlösung (Ecl+Plus, Amersham, Freiburg) zum Fluoreszieren gebracht. Die Belichtung des Films (Hyperfilm Ecl, Amersham) für die Dauer von bis zu 12 Minuten fand in einer Röntgenfilmkassette unter Rotlichtbedingungen statt. Anschließend wurde der Film im Röntgenfilmentwickler der Radiologischen Abteilung des Universitätsklinikums Tübingen entwickelt.

2.5.5 Computerauswertung

Für die Bestimmung der Schwärzung wurden die Filme eingescannt (Scanner: Agfa-Duoscan T1200). Anschließend erfolgte die Messung der optischen Dichte der einzelnen Banden (OD/mm² = optische Dichte der eingescannten Banden bezogen auf die geschwärzte Fläche in mm²) mit einem Spezialprogramm ImageMaster (Pharmacia Biotech).

2.6 Formeln und Statistik

Um einen Vergleich der Herzgewichte der Ratten zu ermöglichen, wurde das Körpergewicht zum Zeitpunkt der Explantation berücksichtigt und der LV/K-Quotient jedes einzelnen Tieres errechnet. Dieser Quotient ergab sich bei Division des linksventrikulären Gewichts durch das Körpergewicht. Um bei der LV/K-Quotienten-Messung eine Normalverteilung zu erhalten, wurde eine zehner-logarithmische Verteilung der Werte angenommen.

$$\text{LV/K} = \frac{\text{linksventrikuläres Gewicht [g]}}{\text{Gewicht der Ratte [g]}}$$

Die Auswertung der PKC-Konzentrationen sowie des LV/K-Quotienten erfolgte mittels Dunnett's Test. Die statistische Auswertung des Verlaufs von Blut-, Urin- und Blutdruckwerten erfolgte mittels Manova. Das Signifikanz-Niveau wurde durch den F-Test ausgedrückt.

Angegeben ist jeweils der arithmetische Mittelwert (MW) und die Standardabweichung vom Mittelwert der Stichprobe (SEM). Als signifikant wurde ein Signifikanzniveau (der Irrtumswahrscheinlichkeit p) von p<0,05 angenommen. Sämtliche statistischen Berechnungen wurden auf dem Statistik-Programm Jump (Version 4.0) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 PKC-Isoformen am Rattenherz

Mit dem im Versuch verwendeten Western-Blot-Protokoll konnten sowohl im Herz-Extrakt als auch im Gehirn-Extrakt der Ratten nach zwölf Versuchswochen die PKC-Isoformen α (~79 kDa), β_1 (~82 kDa), δ (~76 kDa), ε (~97 kDa) und ζ nachgewiesen werden. Die PKC β_1 reagierte stark mit dem Gehirn-Extrakt, jedoch nur gering mit dem Herz-Homogenat. Für die PKC ζ ergaben sich drei Banden (zwischen 60 und 80 kDa) im Herzhomogenat, d.h. sie lag im fraktionierten Zustand vor. Diese Isoform zeichnet sich durch ihre Sensitivität für proteolytische Spaltung aus.¹⁴⁹ Eine quantitative Bestimmung war daher nicht möglich. Die Proteinkinase β_2 war im Gehirn-Extrakt vorhanden. Sie konnte jedoch mit dem im Versuch verwendeten Protokoll nicht im Herz-Extrakt nachgewiesen werden.

3.2 Quantitative Expression der PKC-Isoformen

Die im Tierversuch hergestellte Urämie hatte unterschiedliche Auswirkungen auf die Expression der PKC-Isoformen. Die Konzentration der PKC α der SNX-Gruppe lag im Vergleich zu den SHAM-operierten Tieren um fast 19 % höher. Die Expression der PKC δ in der SNX-Gruppe hingegen war nach zwölfwöchiger Versuchsphase um ca. 35 % geringer. Bei beiden Isoformen war die Differenz zwischen der SNX-Gruppe und der Kontrollgruppe signifikant verschieden. Die PKC-Isoform ε hingegen zeigte keine statistischen Unterschiede zwischen den nephrektomierten, nicht behandelten Tieren und den SHAM-operierten Tieren (Tabelle 3.1).

Gruppen	PKC α (n = 7)	S	PKC δ (n = 7)	S	PKC ε (n = 7)	S
Kontrolle	100,0 \pm 0,1	*p<0,05	99,9 \pm 0,5	*p<0,05	99,7 \pm 0,8	
SNX	118,9 \pm 4,3		64,8 \pm 5,9		98,5 \pm 3,5	

Tabelle 3.1: Expression der PKC-Isoformen am Rattenherz bei Tieren mit (SNX) und ohne Nephrektomie (Kontrolle); MW \pm SEM in %
*p< = signifikant unterschiedlich zu SNX

3.2.1 Endothelin-Rezeptor-Antagonisten

Bei den mit ET-Antagonisten behandelten Ratten zeigten die drei bestimmten Proteinkinase-Isoformen unterschiedliche Tendenzen. Die Expression der PKC α waren in der Gruppe SNX/ET_A-Gruppe (-25 %) und SNX/ET_{AB}-Gruppe (-25 %) stark erniedrigt. Für beide Gruppen ergab sich eine Signifikanz im Vergleich zur SNX-Gruppe. Die PKC δ -Konzentration hingegen stieg in beiden Gruppen deutlich an (SNX/ET_A: +32 %, SNX/ET_B: +28 %). Jedoch erreichten die Werte keine Signifikanz gegenüber den unbehandelten SNX-Tieren. Die PKC ε war gegenüber den SNX-Tieren in beiden Gruppen nicht verändert (SNX/ET_A: -3 %, SNX/ET_{AB}: -5 %) (Tabelle 3.2, Schaubild 3.1).

3.2.2 Losartan

In der mit Losartan behandelten Gruppe (SNX/L) war die Konzentration der PKC-Isoform α um 34 % niedriger und damit signifikant unterschiedlich gegenüber der unbehandelten SNX-Gruppe. Die PKC δ wies einen um 31 % erhöhten Mittelwert auf. Trotz des starken Anstiegs der Konzentration dieser Isoform erlangte der Wert keine statistische Signifikanz. Nur gering war die Verringerung der PKC ε -Konzentration. Mit einem um 5 % kleineren Mittelwert erlangte auch diese Isoform keinen statistischen Unterschied im Vergleich mit der unbehandelten SNX-Gruppe (Tabelle 3.2, Schaubild 3.2).

3.2.3 Kombinationstherapie: Losartan und ET_A-Antagonist

Eine signifikante Senkung (-33 %) der Konzentration am Herzen nach zwölf Versuchswochen ergab sich für die PKC α nach Behandlung mit der Medikamentenkombination. Dem gegenüber konnte für die δ -Isoform eine Erhöhung der Expression um 42 % verzeichnet werden. Auch dieser Wert erlangte Signifikanz. Der Mittelwert der ε -PKC war um 3% geringer und damit statistisch nicht von Bedeutung im Vergleich zur unbehandelten SNX-Gruppe (Tabelle 3.2, Schaubild 3.2).

3.2.4 Nebivolol

Die PKC-Isoform α wurde von der Nebivolol-Behandlung nur wenig beeinflusst. Für die PKC α ergab sich eine um 11 % geringere Konzentration (nicht signifikant) im Vergleich zur SNX-Gruppe. Ein starker Unterschied war für die Konzentrationen der PKC δ in der Nebivolol-behandelten Gruppe im Vergleich zu den unbehandelten SNX-Tieren festzustellen. Es ergab sich eine ungefähr 72 %-ige Differenz, die statistische Signifikanz aufwies.

Gruppen	PKC α (n = 7)	S	PKC δ (n = 7)	S	PKC ε (n = 7)	S
SNX	118,9 \pm 4,3		64,8 \pm 5,9		98,5 \pm 3,5	
SNX/ET _A	89,3 \pm 2,5	*p<0,05	85,4 \pm 5,5		95,3 \pm 2,6	
SNX/ET _{AB}	88,9 \pm 2,9	*p<0,05	82,8 \pm 6,1		93,4 \pm 4,1	
SNX/L	78,4 \pm 5,2	*p<0,05	85,2 \pm 5,8		93,2 \pm 4,0	
SNX(L/ET _A)	79,8 \pm 2,7	*p<0,05	92,2 \pm 4,7	*p<0,05	95,2 \pm 3,9	
SNX/N	105,8 \pm 3,4		111,4 \pm 7,0	*p<0,05	90,2 \pm 2,9	

Tabelle 3.2: Expression der PKC-Isoformen am Rattenherz bei nephrektomierten Tieren ohne und mit medikamentöser Behandlung; MW \pm SEM in %

*p< = signifikant unterschiedlich zu SNX

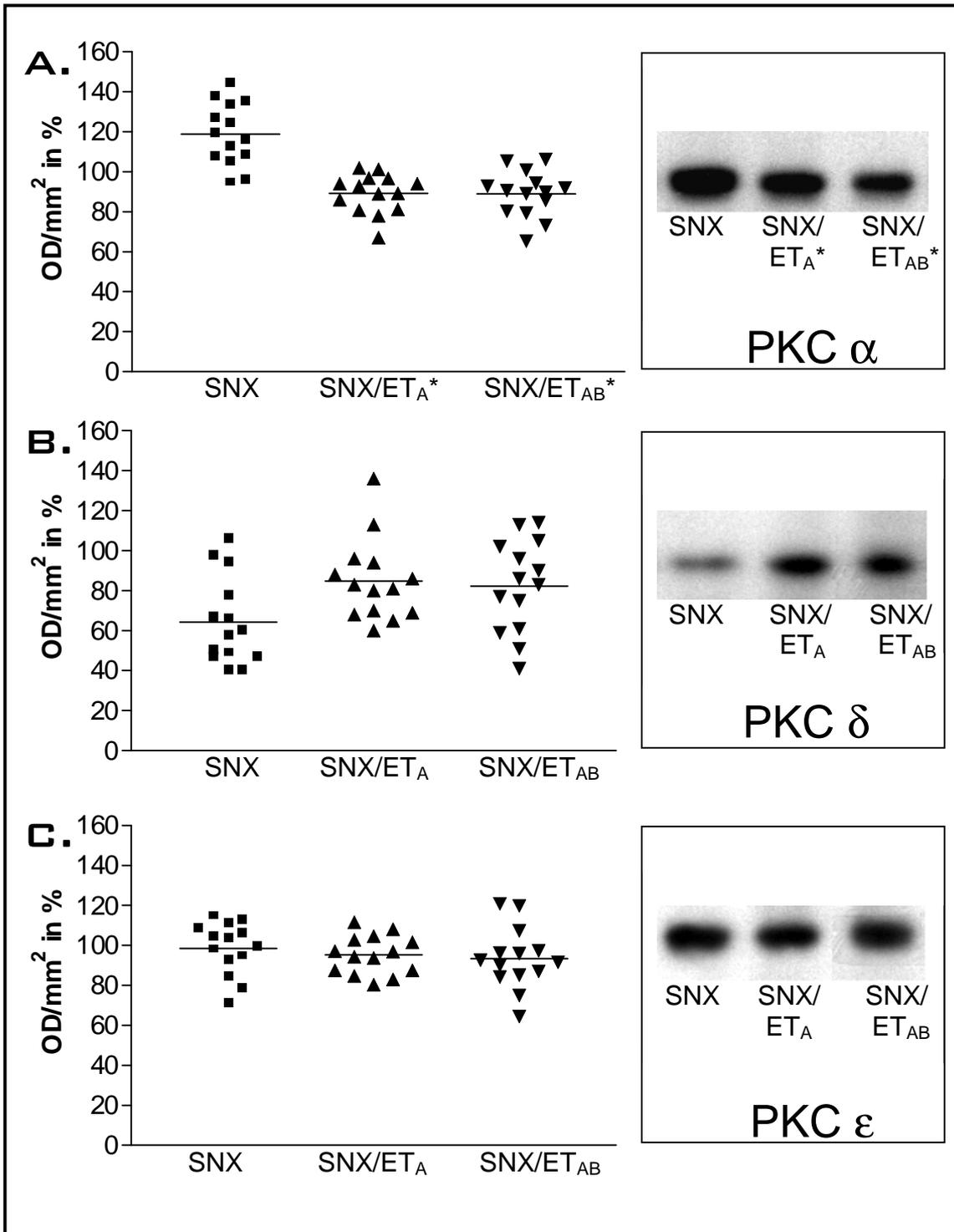


Schaubild 3.1 : Expression der PKC-Isoformen am urämischen Rattenherzen nach zwölfwöchiger Behandlung mit den ET- Antagonisten im Vergleich zur unbehandelten SNX-Gruppe. * = Signifikanz, Linie = MW, OD/mm² = optische Dichte pro Fläche in mm².

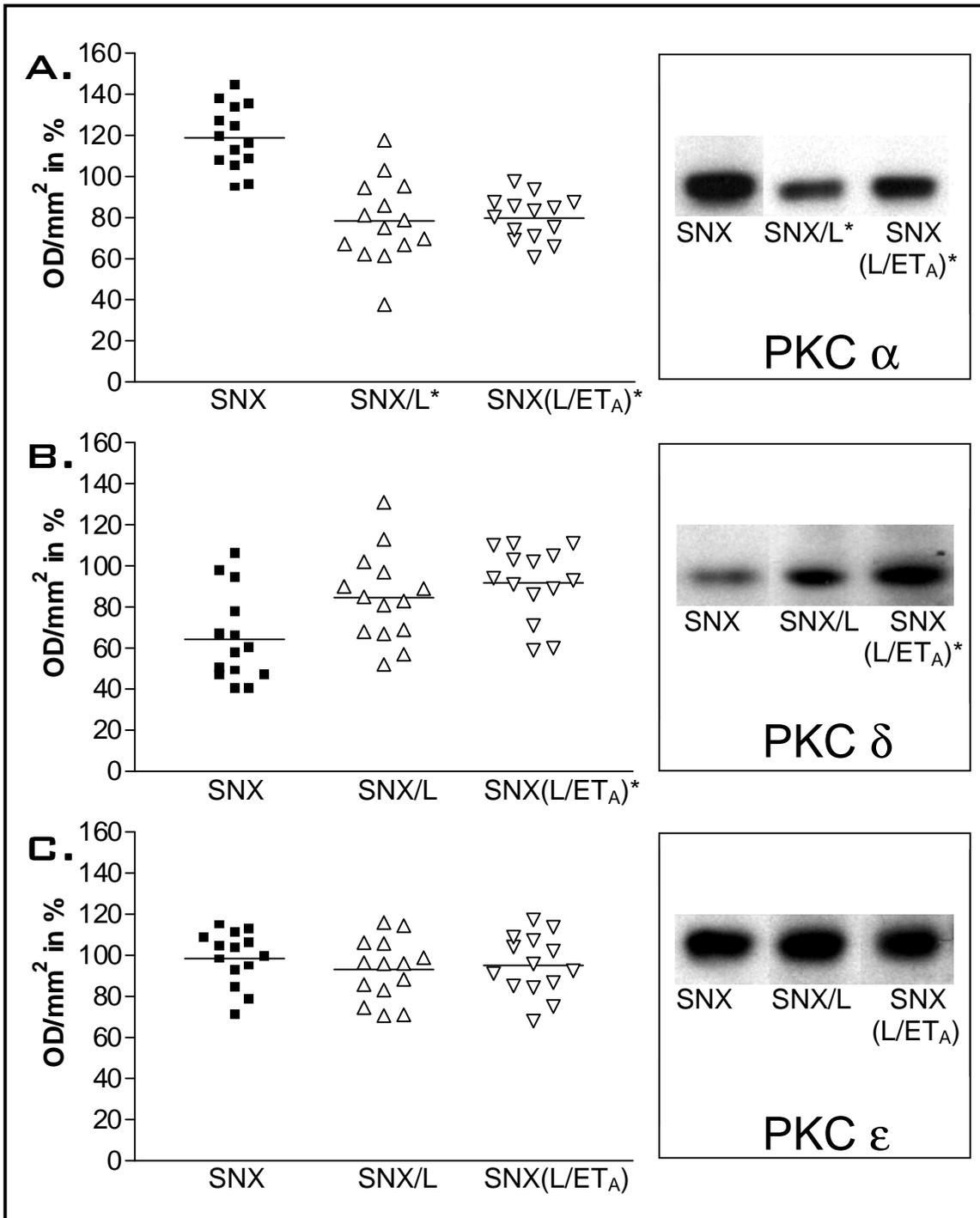


Schaubild 3.2 : Expression der PKC-Isoformen am urämischen Rattenherzen nach zwölfwöchiger Behandlung mit Losartan und der Medikamentenkombination im Vergleich zur unbehandelten SNX-Gruppe. * = Signifikanz, Linie = MW
 OD/mm² = optische Dichte pro Fläche in mm²

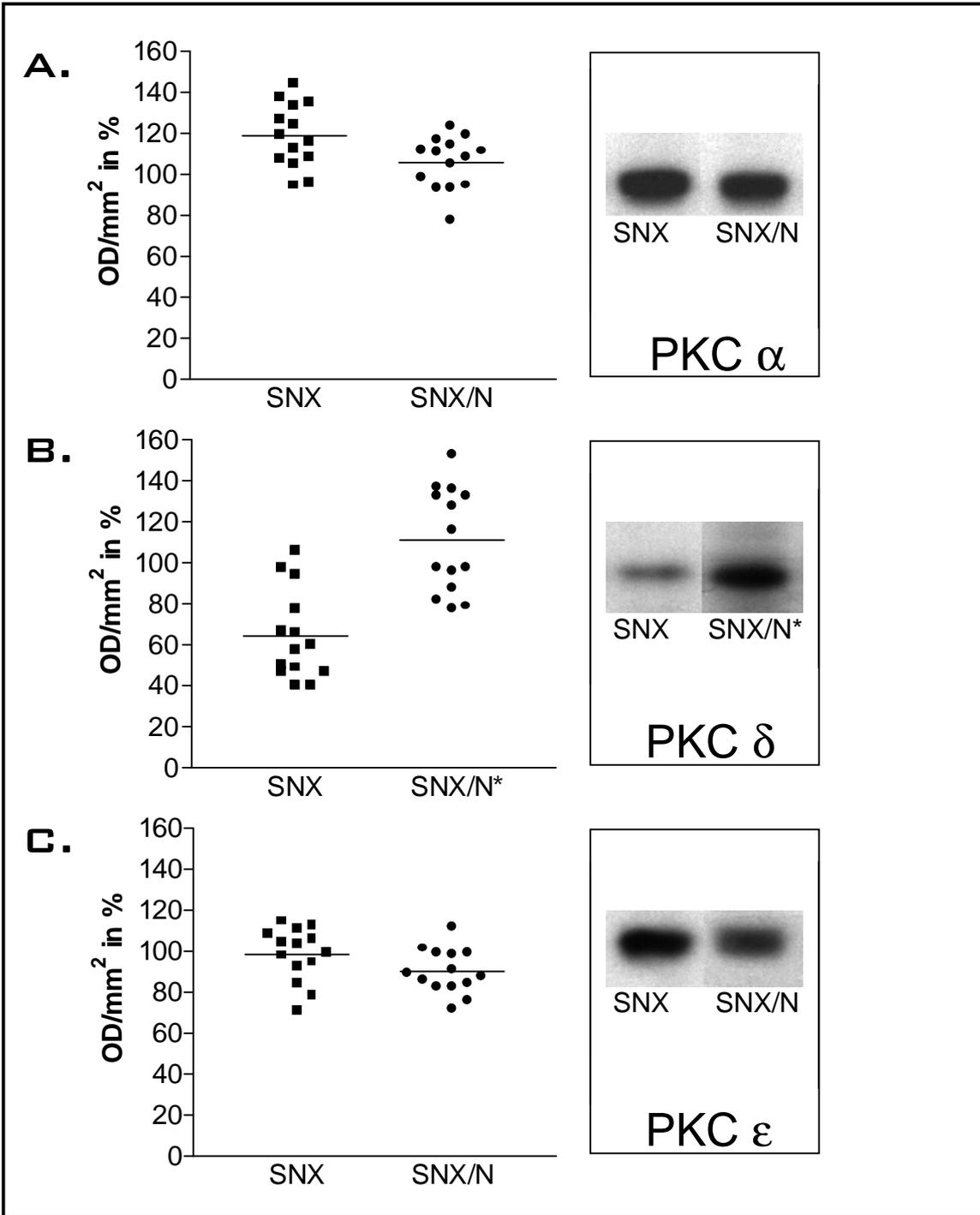


Schaubild 3.3 : Expression der PKC-Isoformen am urämischen Rattenherzen nach zwölfwöchiger Behandlung mit dem selektiven β_1 -Blocker Nebivolol im Vergleich zur unbehandelten SNX-Gruppe. * = Signifikanz, Linie = MW, OD/mm² = optische Dichte pro Fläche in mm².

Die PKC ε hingegen wies eine tendenzielle Verringerung (-8 %) ihrer Konzentration nach zwölfwöchiger Behandlung auf. Ihr Wert war jedoch nicht signifikant niedriger als der Wert der SNX-Gruppe (Tabelle 3.2, Schaubild 3.3).

3.3 Der LV/K-Quotient

Der LV/K-Quotient ergibt sich aus dem Gewicht des linken Ventrikels in Bezug auf das Körpergewicht der Ratten. Erwartungsgemäß war der Mittelwert des LV/K-Quotienten nach zwölfwöchiger Versuchsdauer in der unbehandelten SNX-Gruppe im Vergleich zur SHAM-operierten Kontrollgruppe um ungefähr 49 % gestiegen. Die Differenz erlangte Signifikanz.

Die Ergebnisse der mit Medikamenten behandelten Gruppen wurden mit der SNX-Gruppe verglichen. Hierbei ergaben sich unterschiedlich ausgeprägte Tendenzen für die Gruppen, die unter Einfluss der ET-Antagonisten standen. Beide Gruppen zeigten einen Abfall des LV/K-Quotienten am Ende der Behandlung, jedoch war er bei der SNX/ET_A-Gruppe (-18 %) signifikant, bei der SNX/ET_{AB}-Gruppe (-7 %) nur gering und nicht signifikant erniedrigt.

Sowohl in der SNX/L-Gruppe als auch in der mit der Medikamentenkombination behandelten SNX(L/ET_A)-Gruppe ergaben sich signifikant kleinere LV/K-Quotienten am Ende des Versuchs. In beiden Gruppen sanken die Mittelwerte um 17 %, verglichen mit der unbehandelten SNX-Gruppe.

Der Wert des LV/K-Quotienten der mit Nebivolol behandelten Tiere (SNX/N) war im Vergleich zur SNX-Gruppe signifikant erniedrigt (-27 %) und lag dem Mittelwert der SHAM-operierten Kontrollgruppe am nächsten (Tabelle 3.3, Schaubild 3.4).

Gruppen	n	LV/K	log LV/K	Signifikanz
Kontrolle	11	0,00179 ± 0,00005	-2,747 ± (-4,301)	*p<0,05
SNX	30	0,00267 ± 0,00017	-2,574 ± (-3,770)	
SNX/ET _A	8	0,00219 ± 0,00018	-2,659 ± (-3,745)	*p<0,05
SNX/ET _{AB}	12	0,00247 ± 0,00030	-2,607 ± (-3,523)	
SNX/L	10	0,00221 ± 0,00015	-2,656 ± (-3,824)	*p<0,05
SNX(L/ET _A)	12	0,00221 ± 0,00017	-2,655 ± (-3,766)	*p<0,05
SNX/N	11	0,00195 ± 0,00012	-2,711 ± (-3,921)	*p<0,05

Tabelle 3.3 : Quotient aus Gewicht des linken Ventrikels und dem Körpergewicht am Versuchsende in der zwölften Woche sowie Angabe der logarithmierten Werte; MW ± SEM

*p< = signifikant unterschiedlich zur SNX-Gruppe

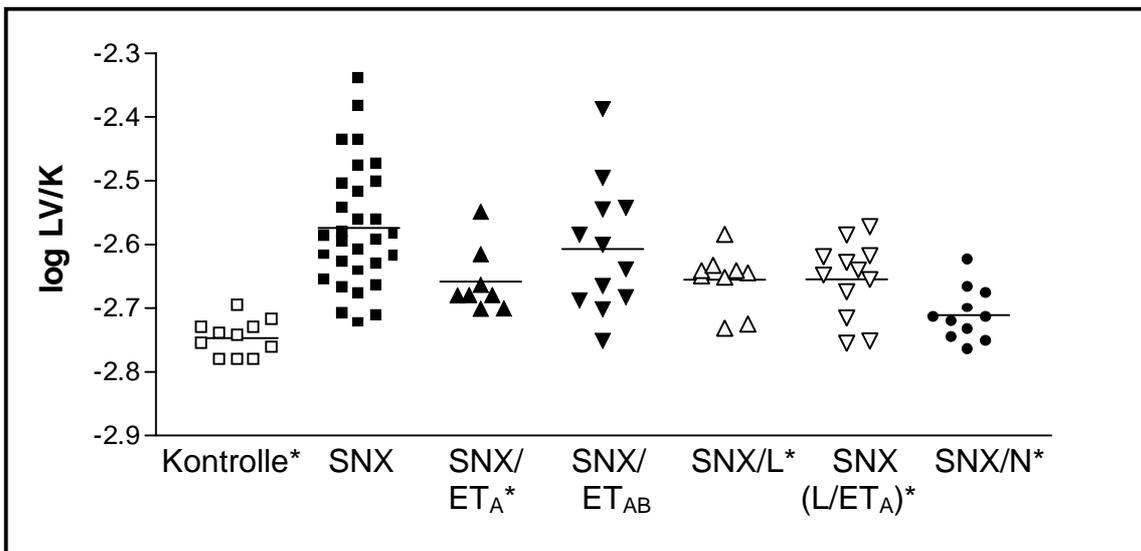


Schaubild 3.4 : Darstellung der logarithmierten Quotienten aus Gewicht des linken Ventrikels bezogen auf das Herzgewicht der Ratten; * = Signifikanz, Linie = MW.

3.4 Der systolische Blutdruck

Im Gruppenvergleich der SNX- und Kontroll-Tiere zeigte die Gruppe der unbehandelten SNX-Tiere eine signifikante Zunahme des systolischen Blutdrucks während der gesamten Versuchsdauer. Die maximale Differenz der Blutdruckwerte war mit 33 mmHg in der zwölften Versuchswoche am größten.

Die Medikamentenapplikation an die 5/6-nephrektomierten Ratten hatte durchweg eine positive Wirkung auf deren Blutdruck. Alle Gruppen zeigten im Verlauf der zwölfwöchigen Behandlung einen signifikant erniedrigten systolischen Blutdruck im Vergleich zur SNX-Gruppe. In der SNX/ET_A-Gruppe war anfänglich ein erhöhter Druck auffällig, der auf dem Niveau der SNX-Tiere lag. Im Verlauf wies diese Gruppe eine immer größer werdende Differenz auf, die am Ende der Behandlung mit 27 mmHg maximal war. Auch in der Gruppe der SNX/ET_{AB}-Tiere war der Blutdruckunterschied zu Beginn nur gering von SNX verschieden. Die größte Differenz ergab sich in der sechsten Woche mit 28 mmHg. Am Versuchsende war der RR-Wert mit 10 mmHg nur gering von der SNX verschieden (Tabelle 3.4, Schaubild 3.5a).

Die Gruppe der SNX/L-Tiere, deren Blutdruckwert nur präoperativ und in der zwölften Woche gemessen wurde, wies mit 35 mmHg die größte RR-Differenz im Vergleich zu den SHAM-operierten Tieren auf (Tabelle 3.4, Schaubild 3.5a). Die Gruppe der SNX(L/ET_A)-Tiere hatte auch schon zwei Wochen postoperativ einen erniedrigten Blutdruck, der sich im Studienverlauf konstant hielt und in der sechsten Woche mit 35 mmHg maximal war. Einen ganz ähnlichen Verlauf nahm die Blutdruckkurve der Nebivolol-behandelten Tiere. Ihre Werte waren konstant auf normotensivem Niveau (Tabelle 3.4, Schaubild 3.5b).

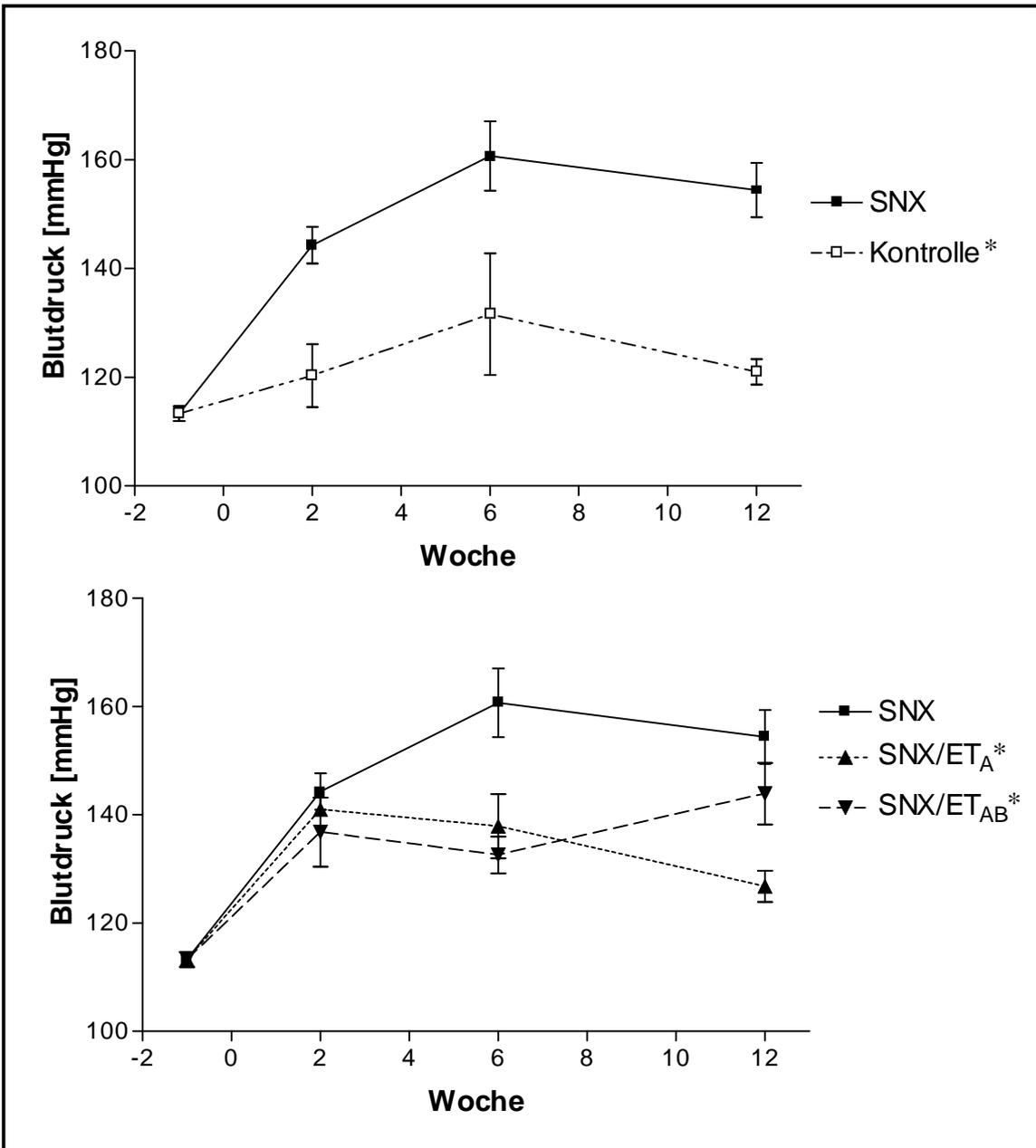


Schaubild 3.5a :

Verlauf des systolischen Blutdrucks [mmHg] der SHAM-operierten Kontrollgruppe, der unbehandelten SNX-Gruppe und der mit dem selektiven ET_A- und unselektiven ET_{AB}-Antagonisten (BSF302146 bzw. BSF302872) behandelten Tiergruppen. * = Signifikanz, MW ± SEM

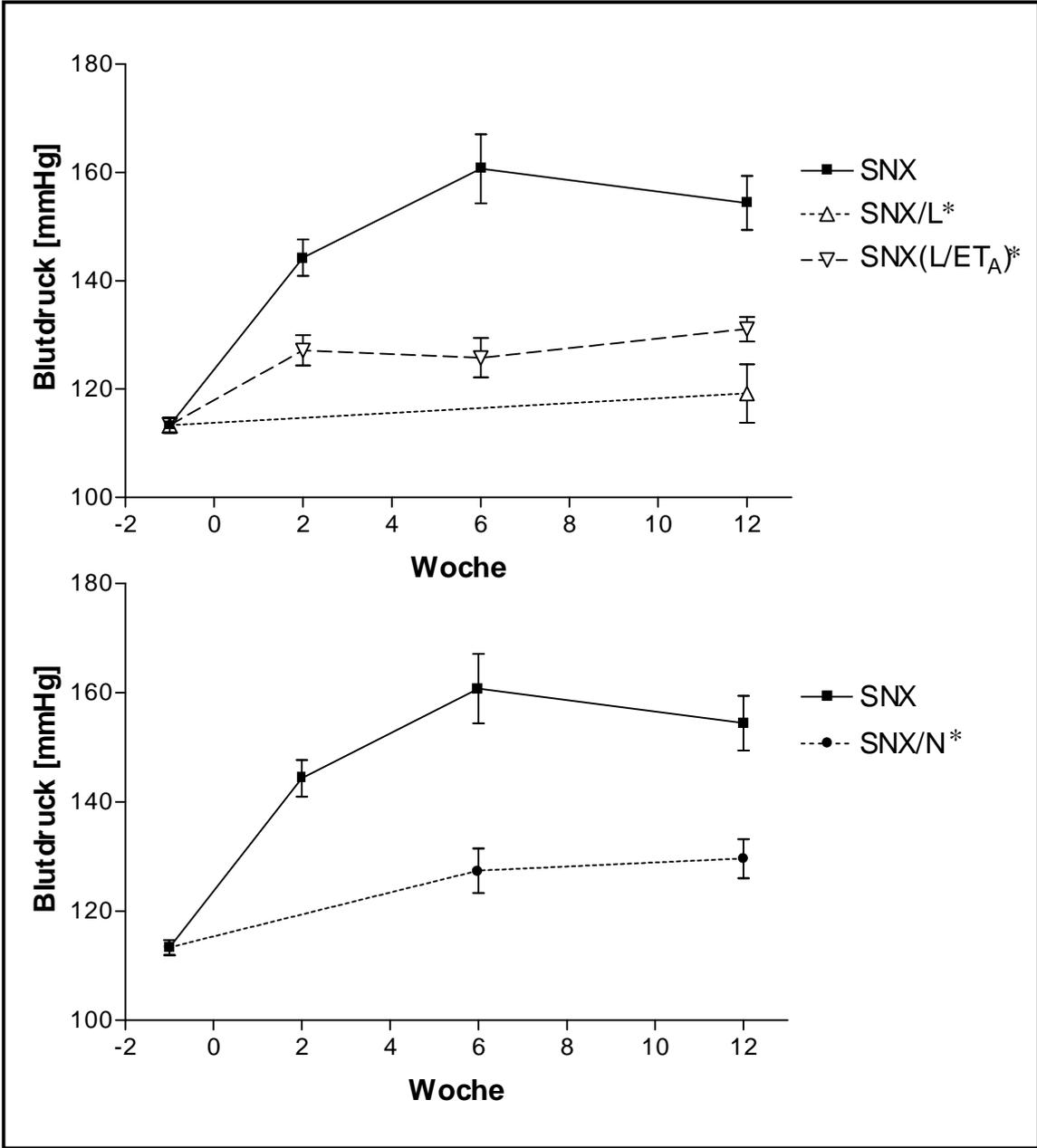


Schaubild 3.5b :

Verlauf des systolischen Blutdrucks [mmHg] der Losartan- und Nebivolol-behandelten Tiergruppen, der Kombinationsgruppe (Losartan + ET_A-Rezeptor-Antagonist) und SNX-Gruppe; * = Signifikanz, MW ± SEM.

Gruppen	präop.	2.Woche	Δ	6.Woche	Δ	12.Woche	Δ	S
Kontrolle	113 ± 1 (n = 67)	120 ± 6 (n = 10)	22	132 ± 11 (n = 7)	29	121 ± 2 (n = 5)	33	p<0,05
SNX		144 ± 3 (n = 16)		161 ± 6 (n = 5)		154 ± 5 (n = 18)		
SNX/ ET _A		141 ± 1 (n = 13)	3	138 ± 6 (n = 7)	23	127 ± 3 (n = 8)	27	p<0,05
SNX/ ET _{AB}		137 ± 6 (n = 10)	7	133 ± 3 (n = 7)	28	144 ± 6 (n = 10)	10	p<0,05
SNX/ L		—		—		119 ± 5 (n = 9)	35	p<0,001
SNX (L/ET _A)		127 ± 3 (n = 12)	17	126 ± 4 (n = 12)	35	131 ± 2 (n = 23)	23	p<0,001
SNX/ N		—		127 ± 4 (n = 14)	34	130 ± 4 (n = 23)	24	p<0,05

Tabelle 3.4 : Blutdruckwerte [mmHg] im Verlauf der zwölfwöchigen

Versuchsdauer; MW ± SEM

Δ = Blutdruck-Differenz im Vergleich zur SNX-Gruppe

p< : Verlauf statistisch signifikant unterschiedlich zur SNX-Gruppe

3.5 Endothelin-Exkretion im Urin

Die ET-1-Konzentration im Urin wurde viermalig aus dem Sammelurin der Stoffwechselläufige untersucht. In der unbehandelten SNX-Gruppe ergab sich schon beim ersten postoperativen Meßpunkt in der vierten Woche eine um 3,5-fach erhöhte ET-1-Exkretion gegenüber der SHAM-operierten Kontrollgruppe. Die Werte stiegen weiterhin stark an und erreichten das 6-fache des Mittelwertes der Kontrolltiere am Versuchsende. Der Verlauf war statistisch

signifikant. Die SNX/ET_A-Gruppe zeigte während der zwölfwöchigen Behandlungsphase im Durchschnitt eine um das 1,5-fach geringere ET-1-Ausscheidung im 24-Stunden-Urin als die zum Vergleich herangezogene SNX-Gruppe. Eine ähnlich starke durchschnittliche Senkung konnte in der SNX/ET_{AB}-Gruppe registriert werden. Im Gegensatz zur SNX/ET_A-Gruppe erlangte diese Versuchsgruppe keine Signifikanz gegenüber den unbehandelten SNX-Tieren (Tabelle 3.5, Schaubild 3.6a). Für die SNX/L-Gruppe wurde postoperative Werte nur in der letzten Versuchswoche erhoben, die keine signifikante Änderung im Vergleich zur Bezugsgruppe SNX ergaben.

Gruppen	präop.	4.Woche	8.Woche	12.Woche	S
Kontrolle	77 ± 11 (n = 6)	376 ± 43 (n = 4)	570 ± 93 (n = 6)	664 ± 50 (n = 9)	p<0,05
SNX		1317 ± 152 (n = 5)	2010 ± 265 (n = 5)	4034 ± 534 (n = 18)	
SNX/ET _A		980 ± 309 (n = 7)	1233 ± 237 (n = 6)	2905 ± 564 (n = 10)	p<0,05
SNX/ET _{AB}		763 ± 168 (n = 6)	2027 ± 250 (n = 5)	3340 ± 618 (n = 11)	
SNX/L		—	—	3031 ± 481 (n = 11)	
SNX(L/ET _A)		635 ± 187 (n = 12)	—	2139 ± 256 (n = 12)	p<0,05
SNX/N		555 ± 89 (n = 14)	1072 ± 146 (n = 14)	845 ± 148 (n = 15)	p<0,05

Tabelle 3.5 : ET-1-Ausscheidung im 24-Stunden-Urin [fmol/ml*24h];

Verlaufsbeobachtung; MW ± SEM

S = Signifikanz, p< = Verlauf statistisch signifikant
unterschiedlich zur SNX-Gruppe

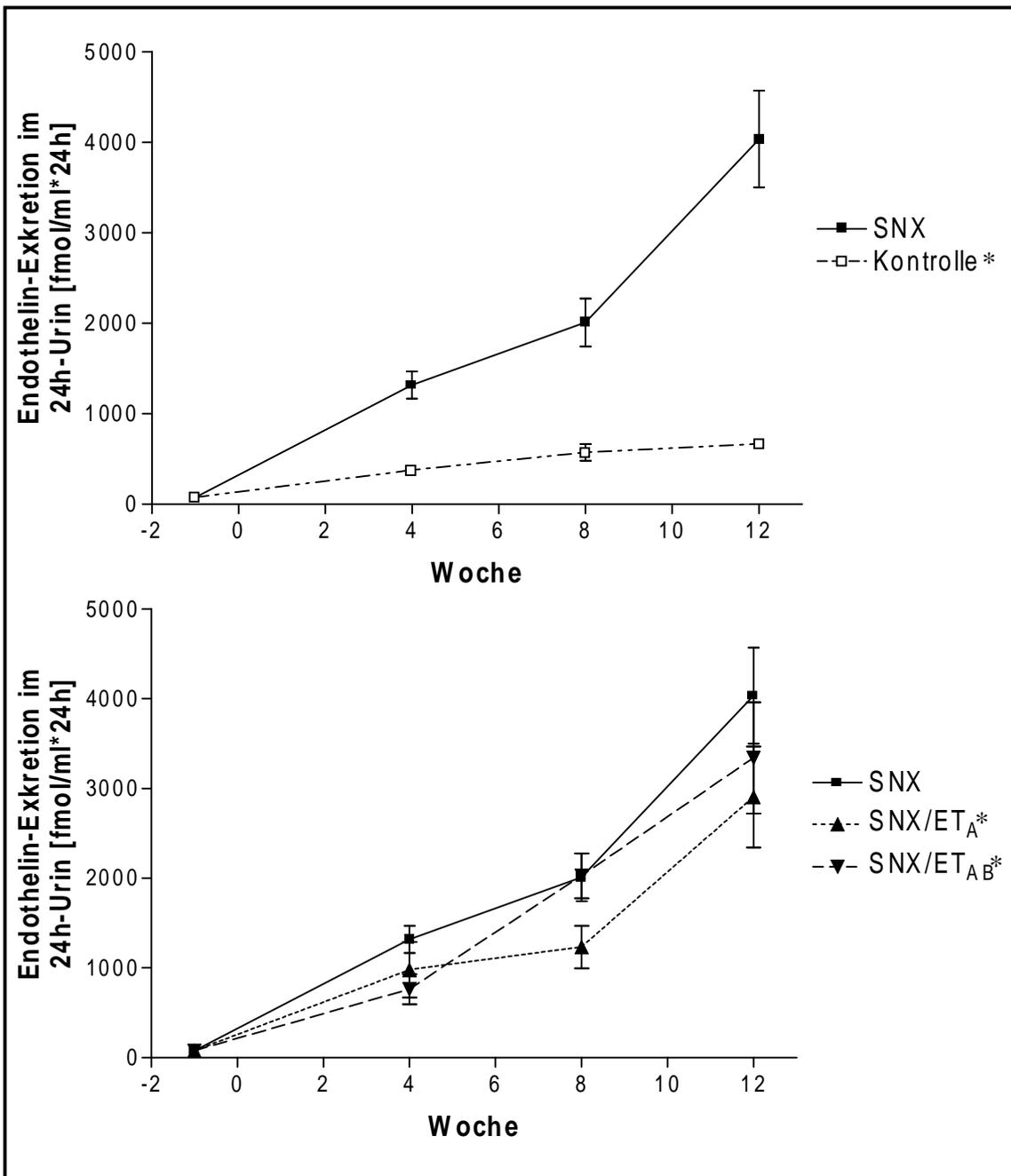


Schaubild 3.6a :

Verlauf der ET-1-Konzentration im 24-Stunden-Urin [fmo/ml*24h] in der SHAM-operierten Kontrollgruppe, der unbehandelten SNX-Gruppe und den mit dem ET_A- und ET_{AB}-Antagonisten (BSF302146 bzw. BSF302872) behandelten Tiergruppen. * = Signifikanz, MW ± SEM.

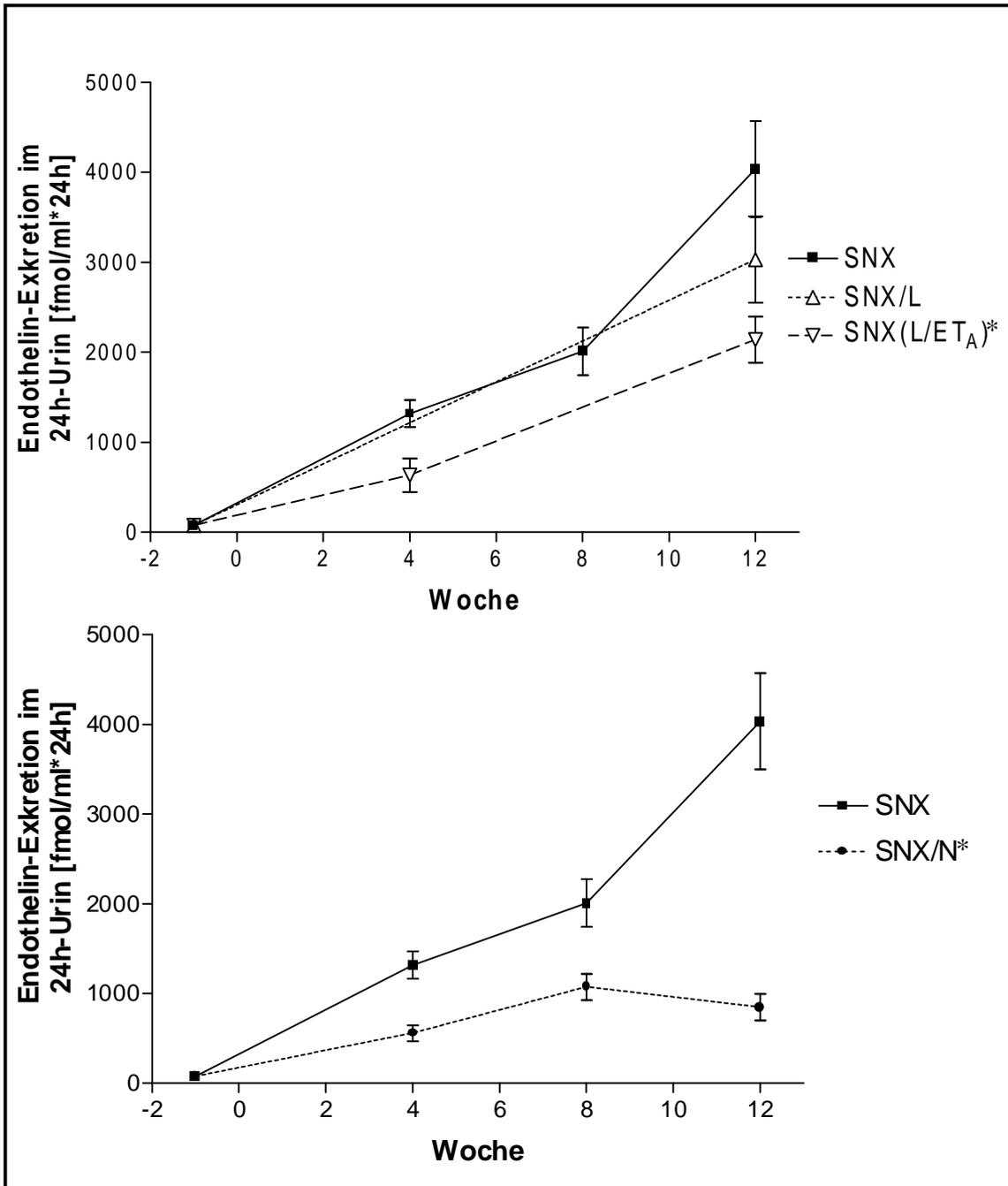


Schaubild 3.6b :

Verlauf der ET-1-Konzentration im 24-Stunden-Urin [fmol/ml*24h] in den mit Losartan- und Nebivolol-behandelten Tiergruppen, der Kombinationsgruppe (Losartan + ET_A-Antagonist) und der unbehandelten SNX-Gruppe. * = Signifikanz, MW ± SEM.

Deutliche Differenzen bezüglich der ET-1-Exkretion waren in der Kombinationsgruppe SNX(L/ET_A) zu verzeichnen. An beiden postoperativen Messpunkten, in der vierten und zwölften Versuchswoche, war eine Halbierung der ET-1-Ausscheidung im Urin im Gruppenvergleich mit den SNX-Tieren feststellbar. In der SNX/N-Gruppe waren die Mittelwerte um bis zu 5-mal niedriger als in der Bezugsgruppe SNX. Die größte Differenz war in der zwölften Versuchswoche zu verzeichnen. (Tabelle 3.5, Schaubild 3.6b).

3.6 Protein-Exkretion im Urin

Die in einer Periode von 24 Stunden gesammelten Urinproben wurden auf ihre Proteinkonzentration untersucht. Dabei waren die Werte am ersten postoperativen Messpunkt Woche für die SNX-Gruppe noch auf dem Normalniveau gelegen. Zu späteren Messzeitpunkten stieg die Protein-Exkretion stark an. Die maximale Konzentration wurde in der letzten Versuchswoche erreicht und betrug das 10-fache des Mittelwertes der SHAM-operierten Kontrolltiere.

Ein deutlich langsamerer Anstieg der Protein-Konzentration im Urin war in allen medikamentös behandelten Gruppen zu verzeichnen. Durchschnittlich sank die Protein-Exkretion in der SNX/ET_A-Gruppe um das 3-fache, in der SNX/ET_{AB}-Gruppe um das 2-fache (Tabelle 3.6, Schaubild 3.7a). Die alleinige Behandlung mit Losartan konnte eine Verringerung um durchschnittlich das 4-fache bewirken, während eine zusätzliche Verabreichung des ET_A-Antagonisten (SNX(L/ET_A)-Gruppe) keine weitere Verbesserung bewirkte. Im Gegenteil, der Mittelwert sank durchschnittlich nur um das 3-fache. Aufgrund der hohen Varianz der Einzelwerte und der damit einhergehenden großen Standardabweichung, konnte keine dieser Gruppen eine Veränderung auf signifikantem Niveau im Vergleich zur unbehandelten SNX-Gruppe aufweisen. Einzig die mit Nebivolol behandelte Gruppe senkte die Protein-Exkretion im Urin um das 5-fache. Für diesen Verlauf ergab sich ein signifikanter Unterschied (Tabelle 3.6, Schaubild 3.7b).

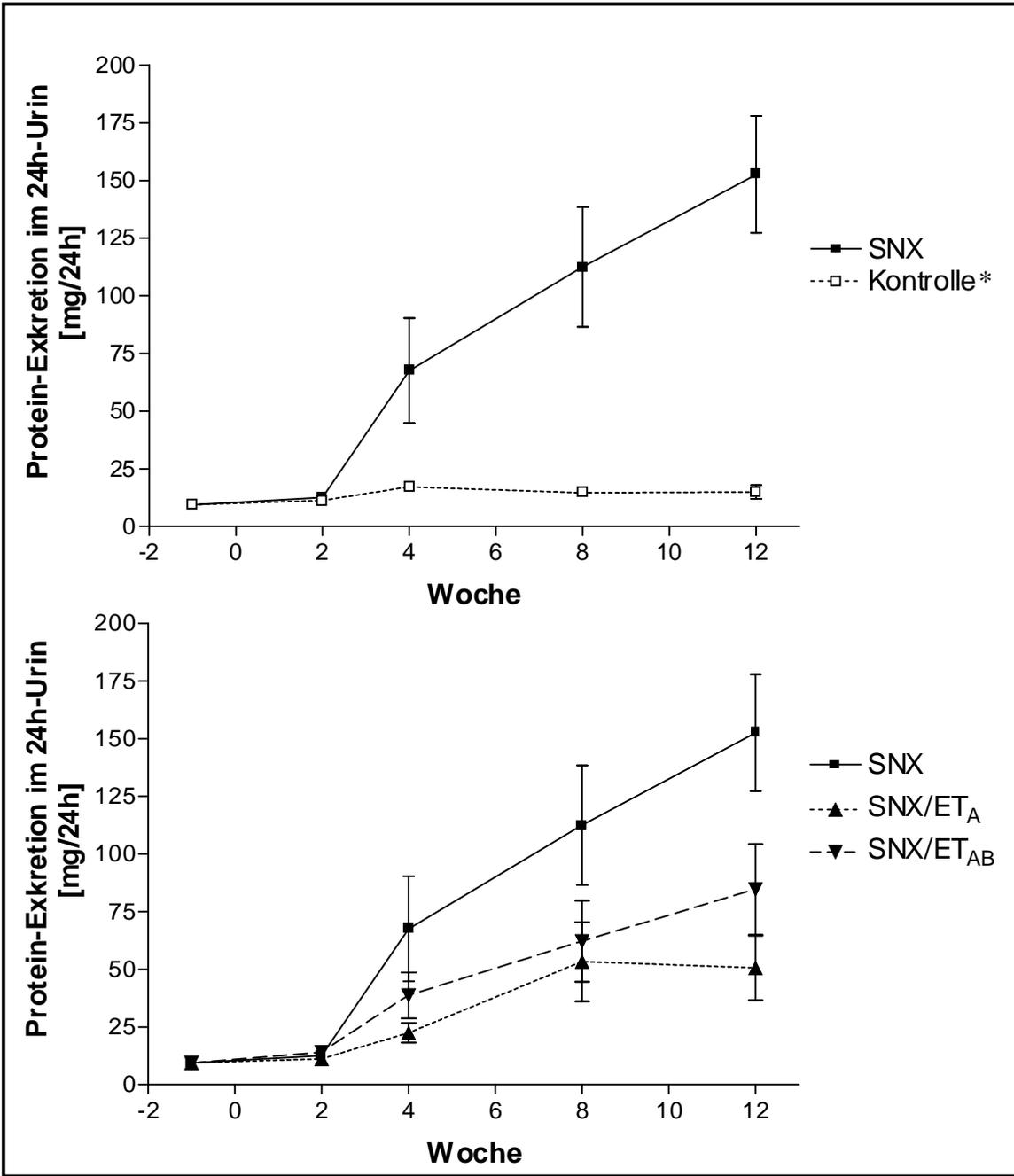


Schaubild 3.7a :

Im Urin ausgeschiedene Proteinmenge [mg/24h] im Versuchsverlauf in der operierten Kontrollgruppe, der unbehandelten SNX-Gruppe und den mit den ET_A- und ET_{AB}-Antagonisten (BSF302146 bzw. BSF302872) behandelten Tiergruppen. * = Signifikanz, MW ± SEM.

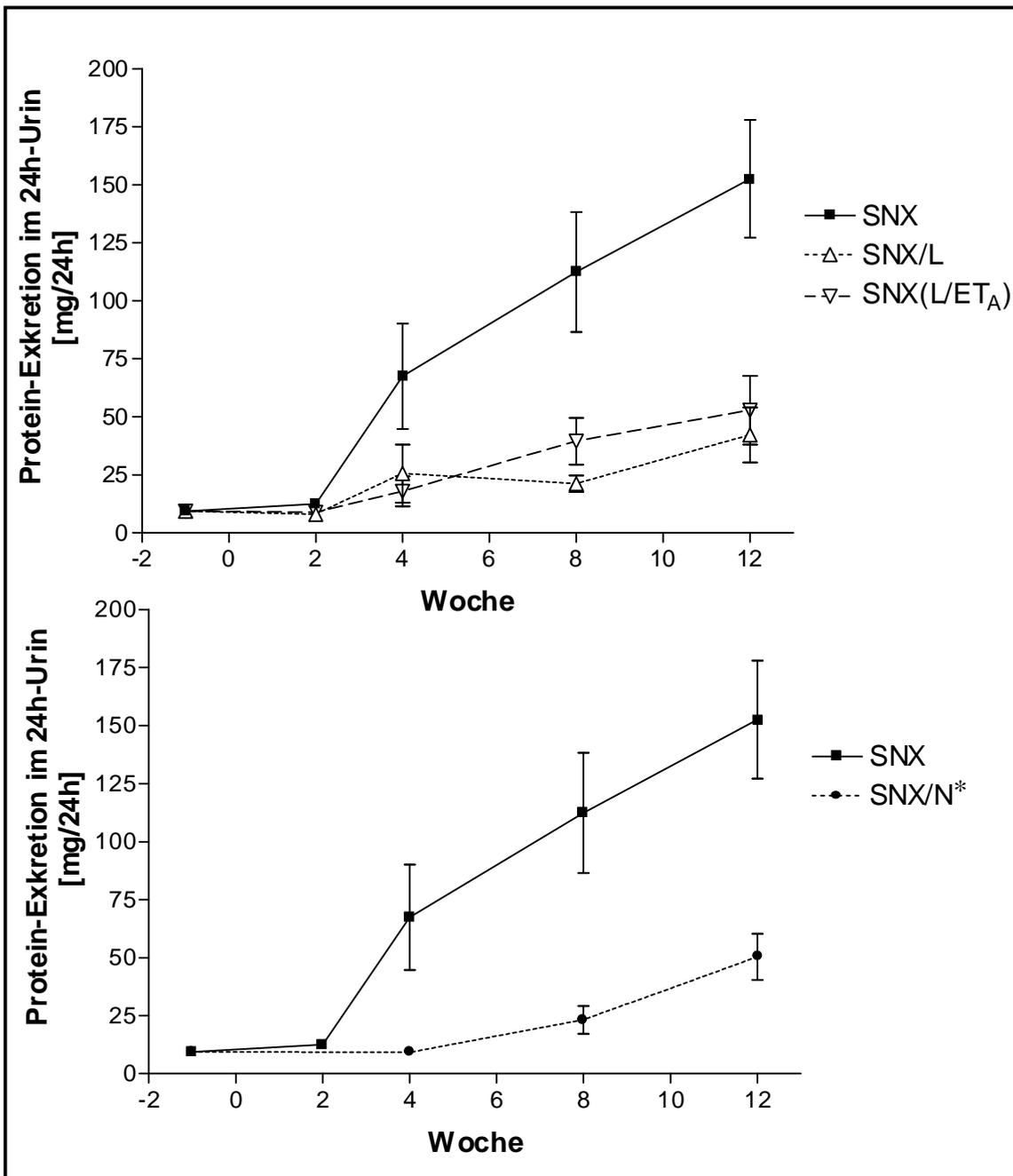


Schaubild 3.7b :

Im Urin ausgeschiedene Proteinmenge [mg/24h] im Versuchsverlauf in den mit Losartan- und Nebivolol-behandelten Gruppen, der Kombinationsgruppe (Losartan + ET_A-Antagonist) und der unbehandelten SNX-Gruppe. * = Signifikanz, MW ± SEM.

Gruppen	präop.	2.Woche	4.Woche	8.Woche	12.Woche	S
Kontrolle	9 ± 1 (n = 34)	11 ± 1 (n = 7)	17 ± 2 (n = 8)	15 ± 2 (n = 10)	15 ± 3 (n = 9)	p<0,05
SNX		13 ± 2 (n = 15)	67 ± 23 (n = 15)	112 ± 26 (n = 18)	153 ± 25 (n = 16)	
SNX/ET _A		11 ± 2 (n = 10)	22 ± 4 (n = 9)	53 ± 17 (n = 8)	51 ± 14 (n = 9)	
SNX/ET _{AB}		14 ± 2 (n = 12)	39 ± 10 (n = 11)	62 ± 18 (n = 11)	85 ± 20 (n = 9)	
SNX/L		8 ± 1 (n = 13)	26 ± 13 (n = 10)	21 ± 4 (n = 11)	42 ± 12 (n = 10)	
SNX(L/ET _A)		9 ± 1 (n = 12)	18 ± 6 (n = 12)	39 ± 10 (n = 12)	53 ± 15 (n = 12)	
SNX/N		—	9 ± 2 (n = 14)	23 ± 6 (n = 14)	50 ± 10 (n = 22)	p<0,05

Tabelle 3.6 : Protein-Ausscheidung im 24-Stunden-Urin [mg/24h];

Verlaufsbeobachtung; MW ± SEM

S = Signifikanz, p< = Verlauf statistisch signifikant
unterschiedlich zur SNX-Gruppe

4. Diskussion

4.1 Methodenkritik

4.1.1 Tiermodell

Für die in vivo-Untersuchung nephrologischer Fragestellungen sind zahlreiche Nephropathie-Modelle etabliert. Für das chronische Nierenversagen ist die 5/6-Nephrektomie die bevorzugte Methode.

Es existieren jedoch zahlreiche Variationen dieses Verfahrens. Die Massenreduktion wird entweder durch chirurgische Polektomie oder durch ischämische Infarzierung erreicht.^{25, 26} Bei letzterer Methode wird nach einseitiger Nephrektomie an der kontralateralen Niere durch Ligation von Arterienästen ein ischämischer Gewebeuntergang provoziert.^{4, 11, 99} Bei der chirurgischen Entfernung von 2/3 der kontralateralen Niere orientiert man sich am Ausgangsgewicht der zuvor entfernten Niere. Allerdings hypertrophiert die verbliebene Niere in der Zeit zwischen den Operationen teilweise sehr stark, so dass eine exakte 2/3-Reduktion im Einzelfall schwierig ist. Manche Arbeitsgruppen führen die Operationen in einem zeitlichen Abstand von sieben Tagen (siehe vorliegende Studie) durch, andere innerhalb von 48 Stunden, manche sogar in einer Sitzung.^{38, 48, 89, 154} Generell bedeutet jedoch eine kürzere Regenerationsphase eine höhere Belastung für den Organismus der Tiere. Bei nur einer Sitzung ist das perioperative Risiko mit dem Risiko einer zweiten Narkose abzuwägen. Die variantenreiche Modifikation der Methode führt teilweise zu recht unterschiedlichen Resultaten.

4.1.2 Blutdruckmessung

Die plethysmographische Blutdruckmessung am Schwanz erfasst den systolischen Blutdruck am wachen Versuchstier. Zur Messung war eine Erwärmung der Tiere notwendig. Dies stellt eine mögliche Fehlerquelle dar, da individuelle Reaktionen der Tiere auf die Wärmebelastung nicht berücksichtigt werden. Ausserdem ist die Plethysmographie bei ängstlichen Tieren nicht

durchführbar. Andere Arbeitsgruppen führen die Blutdruckmessung deshalb unter Narkose durch.¹⁹ Doch auch die kreislaufdeprimierende Wirkung von Anästhetika kann zu Verzerrungen der Messergebnisse führen. Für die Versuchstiere besteht weiterhin ein zusätzliches Letalitäts-Risiko durch jede weitere Narkose. Sehr genaue Ergebnisse hingegen liefern invasive Messtechniken beispielsweise durch Implantation eines Drucksensors, der fortlaufend sowohl den systolischen als auch den diastolischen Blutdruck registriert.¹⁴⁸ Dieses Verfahren ist jedoch nicht nur aufwendig und teuer sondern auch mit erheblichen Risiken für das Versuchstier behaftet.

4.1.3 Stoffwechselkäfig

Der Einsatz von Stoffwechselkäfigen bietet neben der Bilanzierung von Trinkmenge und Urinvolumen den Vorteil der Uringewinnung zur weiteren Analyse im Labor. Allerdings stellt der 24-stündige Aufenthalt der Versuchstiere in den engen Käfigen einen nicht zu unterschätzenden Stressfaktor dar, der sich sowohl auf die Stoffwechselsituation (z.B. Hormone) als auch auf das Verhalten (z.B. Trinkmenge) der Tiere auswirken kann. Ausserdem enthielt der gesammelte Urin häufig Spuren von Tierfutter, welches nicht wie vorgesehen im Behältnis für feste Materialien aufgefangen wurde. Inwieweit Gährungs- und Zersetzungsprozesse sowie die Futterreste im Urin die gemessenen Laborparameter beeinflussen ist nicht bekannt. Deshalb sind biochemische Veränderungen im Urin nicht auszuschliessen.

4.1.4 Probengewinnung und Aufbereitung

Zur Gewinnung des Homogenats aus dem linken Ventrikel wurde am letzten Versuchstag das Herz explantiert. Problematisch ist die Proteolyse der Proteine in ischämischen Phasen. Während der Explantation entstand solch eine Phase durch die Herstellung der Blutleere und anschliessende Zerlegung des Herzens in seine verschiedenen Bestandteile. Um die Ischämiezeit kurz zu halten wurde direkt nach der Blutentnahme das Herz als erstes Organ explantiert, sofort bearbeitet und schockgefroren. Die Kühlkette wurde auch für die Proteinbestimmung und Probenherstellung durch Kühlung mit Eis weiterhin

aufrechterhalten. Trotz dieser vorsichtigen Vorgehensweise lag die PKC ζ im fraktionierten Zustand vor. Allerdings zeichnet sie sich durch ihre stark proteolytische Eigenschaft aus. Diese Beobachtung wurde auch schon von anderen Autoren beschrieben.^{18, 149}

4.1.5 Gel-Elektrophorese, Immuno-Blotting und Banden-Auswertung

Die Banden der elektrophoretisch aufgetrennten und auf Nitrozellulose übertragenen Proteine wurden auf einer Filmfolie sichtbar gemacht. Um unter den Banden die gesuchte Bande der PKC-Isoform ausfindig zu machen, wurde neben den Standardproteinen auch ein Hirn-Homogenat im Versuch mitlaufen gelassen. Dieses Hirnhomogenat enthielt alle PKC-Isoformen in ausreichenden Mengen. So war gewährleistet, dass der PKC-Isoform die Bande mit der richtigen Molekularmasse zugewiesen wurde.

Die Auswertung der Filmfolie mittels Scanner und einer speziellen Software birgt eine Unsicherheit. Beim Bestimmen der Dichte der Bande spielt auch der Film-Hintergrund eine Rolle. Er bildet besonders bei schwachen Banden einen stark verzerrenden Faktor, weil der Hintergrund sich zusätzlich zur Bande aufsummiert. Bei dunkleren Banden spielt dieser Effekt keine so grosse Rolle. Um dieses Problem zu umgehen, gibt es eine computertechnische und eine rechnerische Lösung. Zum einen könnte man den Hintergrund mittels einer Bildbearbeitungssoftware abziehen. Für die in der vorliegenden Studie verwendete rechnerische Variante musste zusätzlich eine Protein-Standardreihe mitlaufen gelassen werden. Aus dieser ergab sich eine Steigungskurve. Die Werte der Protein-Proben konnten somit aus der Steigungskurve abgelesen werden. Zur Vermeidung unnötiger Verzerrungen durch die Bildbearbeitung, wurde letztere Variante bevorzugt (Tabelle 6.14).

4.2 Die PKC-Isoformen am Rattenherz

Die Erforschung des Vorkommens verschiedener PKC-Isoformen am Rattenherz ist schon seit längerer Zeit Gegenstand kontroverser Diskussionen. Pucéat et al. wiesen mittels immunoreaktiver Methoden die Proteinkinasen α , δ , ε und ζ nach, konnten jedoch weder β - noch γ -Isoform detektieren.¹¹¹ Rybin und Steinberg konzentrierten ihre Untersuchungen auf die Expression der Proteinkinasen am sich entwickelnden Rattenherz.¹¹⁸ Mittels Western Blot-Technik konnten sie an fetalen und neonatalen Herzen die Isoformen α , δ , ε und ζ nachweisen. Jedoch waren die Konzentrationen aller Isoformen in neonatalen Herzen geringer als in Herzen fetaler Ratten. Das Absinken der Isoformen setzte sich auch in den adulten Tieren fort. Die PKC α konnte sogar überhaupt nicht mehr nachgewiesen werden. Spätere Versuche von Disatnik et al. wiesen zusätzlich die β -Isoform nach.³⁴ Die Expression der α -, β -, ε -, ζ - und η -Isoform wurde mittels PCR sowohl in neonatalen als auch in adulten Ventrikeln von Ratten bestätigt. In der durchgeführten Studie konnten die Proteinkinase C-Isoformen α , β_1 , δ , ε und ζ nach zwölf Wochen Versuchsdauer nachgewiesen werden. Die Detektion der PKC-Isoform β_2 gelang nicht.

Während das Vorhandensein der Isoformen δ und ε als gesichert galt, gab es lange Zeit Diskussionen über die PKC α . Ihr Vorkommen in adulten Rattenherzen wurde durch eine ausführliche Studie von Rybin und Steinberg unterstützt.¹¹⁹ Der Nachweis der α -Isoform in dieser Studie hing von der Spezifität des eingesetzten Erst-Antikörpers ab. Einige der verwendeten α -Antikörper hatten eine nicht ausreichende Selektivität für die Bindung an das Protein. Der im vorliegenden Versuch eingesetzte Antikörper gegen die α -Isoform wies eine hohe Spezifität auf. Er erlangte noch mit einer Verdünnung von 1:5000 sehr gute Ergebnisse bei der Immuno-Blot-Technik. Andere Erst-Antikörper benötigten sehr viel höhere Konzentrationen für eine erfolgreiche Versuchsdurchführung. Sowohl am adulten Rattenherz als auch in der Kontrolle (Rattenhirn) zeigte sich eine deutliche Bande bei ~80 kDa. Dieses Ergebnis

stimmte mit den Angaben über die festgestellte Grösse dieser PKC-Isoform in der Rybin-Studie überein und lässt eine hohe Selektivität des verwendeten Antikörpers vermuten.

Bogoyevitch et al. wiesen die PKC β_1 am Rattenherz nach.¹⁸ Wie auch in der vorliegenden Studie konnten sie nur geringe Mengen am Herzen feststellen, verglichen mit den hohen Konzentrationen im Gehirn.

Ursprünglich wurde die Masse der PKC ζ mit 64 kDa angegeben.⁹⁸ Neuere Studien lieferten Beweise für ein 80 kDa PKC ζ -Protein, das sich durch seine Sensitivität für proteolytische Spaltung auszeichnete. Auch im durchgeführten Versuch lag diese PKC-Isoform im fraktionierten Zustand vor.

4.3 PKC-Expression, Herzgewicht und Blutdruck in der Urämie

An den hypertrophierten linken Herzen der unbehandelten SNX-Tieren stieg die Konzentration der PKC α . Gleichzeitig sank die der PKC δ signifikant. Bisher zeigten Studien vor allem eine Verbindung zwischen der erhöhten Konzentration von PKC-Isoformen und der kardialen Hypertrophie. Kariya et al. und Shubeita et al. transfizierten neonatale Kardiomyozyten von Ratten mit DNA, die für aktive Formen der PKC β bzw. PKC α und β kodierte.^{68, 130} Einhergehend mit der selektiven Erhöhung der PKC-Konzentration zeigte sich in beiden Studien eine erhöhte Expression von Genen, die typischerweise im Zustand der Herzhypertrophie vermehrt auftraten. In einer späteren Studie von Bogoyevitch et al. wurde die PKC β jedoch als eine nur in geringer Konzentration vorkommende Isoform am Rattenherz beschrieben.¹⁸ Auch in der vorliegenden Studie war die PKC β_1 , sowohl bei nephrektomierten als auch bei nicht-nephrektomierten Tieren, nur in geringer Konzentration, die PKC β_2 sogar gar nicht nachweisbar. Ein bedeutender Einfluss der β -Isoform auf den Prozess der kardialen Hypertrophie ist daher eher unwahrscheinlich.

Betrachtet man weitere kardiovaskuläre Parameter in urämischen Individuen, so fällt der typischerweise erhöhte Blutdruck ins Auge. Schon 1871 beschrieb Traube die Hypertonie von Nierenerkrankten und machte die Hypervolämie als hauptsächlichen Faktor dafür verantwortlich.¹⁴⁵ Erst sehr viel später, nämlich 1976, wurde zum ersten Mal auch ein Hormonsystem als Auslöser für die Hypertonie-Problematik ausgemacht. Beretta-Piccoli et al. beschrieben damals das RAS als einen weiteren Faktor in der Hypertonie-Genese der Niereninsuffizienz.¹⁴ Später wurde auch die Beteiligung von Noradrenalin sowie des Endothelin-Systems nachgewiesen.^{27, 157} Auch die Blutdruckwerte der vorliegenden Studie zeigten in der Gruppe der nephrektomierten, nicht behandelten Tiere schon in der zweiten Versuchswoche eine deutliche Erhöhung im Vergleich zu den SHAM-operierten Ratten. Während der gesamten Versuchsdauer blieben die Werte auf einem signifikant erhöhten Niveau.

Gu und Bishop beschäftigten sich in ihrer Studie speziell mit der Blutdruckerhöhung und deren Auswirkung auf die PKC-Isoformen am Rattenherz.⁵¹ Mittels des Modells „aortic banding“ wurde an den Tieren künstlich eine linksventrikuläre Druckbelastung erzeugt. Nach einer zweiwöchigen Versuchsphase und einer linksventrikulären Massenvermehrung von 50% bei den Aorten-konstrangierten Tieren, konnte eine erhöhte Expression der PKC ϵ und der beiden β -PKCs nachgewiesen werden. Andere Isoformen (α , δ und ζ) wiederum blieben in ihrer Konzentration unverändert. Auch Fryer et al. beschäftigten sich in ihrer Studie mit der Auswirkung der Hypertonie auf die kardiale PKC-Konzentration.⁴³ Anders als im Versuch von Gu und Bishop verwendeten Fryer et al. transgene Ratten (sogenannte TGR(mRen2)27-Ratten). Ihre Hypertonie resultierte aus der genetischen Veranlagung. Nach einer zwölfwöchigen Versuchsphase war die Konzentration der PKC δ deutlich erhöht, die der PKC ϵ jedoch erniedrigt. Diese zwei Beispiele weisen auf eine unterschiedliche Reaktion der PKC-Isoformen auf die linksventrikuläre Belastung hin.

Auffällig war die Feststellung, dass ein erhöhtes Herzgewicht mit einer erniedrigten Konzentration der PKC δ einherging. Zu ähnlichen Ergebnissen kam eine Studie von Mischak et al.⁹⁰ Hierbei zeigten die selektiv PKC δ -exprimierenden Fibroblasten einen kompletten Abbruch der Proliferation. Auch in einer neueren Studie von Fukumoto et al. wiesen glatte Muskelzellen, welche die δ -Isoform vermehrt synthetisierten ein gehemmtes Wachstum im Vergleich zu unveränderten glatten Muskelzellen auf.⁴⁴ Die sowohl in den eben genannten Studien als auch in der vorliegenden Studie gemachten Beobachtungen lassen eine antiproliferative Eigenschaft der δ -Isoform vermuten.

Ganz gegenteilig hingegen verhielt sich die PKC α . Bei den unbehandelten SNX-Tieren zeigte sich im Vergleich mit den SHAM-operierten Tieren eine stark erhöhte PKC α einhergehend mit dem hypertrophen linksventrikulären Myokard. Westermann et al. stellten eine Assoziation dieser Isoform mit dem Golgi-Apparat fest.¹⁵¹ Deshalb wurde eine wichtige Funktion der PKC α im posttranslationalen Prozess angenommen. Dies wäre ein wichtiger Hinweis für eine spezifische Beteiligung dieser Isoform an der vermehrten Bildung von Proteinen, die typischerweise in den frühembryonalen Phasen gebildet werden und im Falle späterer kardialer Hypertrophieprozesse wieder aktiviert werden.^{70, 79, 122, 129, 137} Die Versuche mit transfizierten Kardiomyozyten von Mohammadi et al. wiesen auf eine Beteiligung der PKC α bei der kardialen Hypertrophie hin.⁹⁴ Jedoch konnten Gu und Bishop keinen Einfluss dieser Isoform bei der Vermehrung des Volumens kardialer Zellen feststellen.⁵¹ Ursache dieser Differenzen könnte unter anderem die geringe Selektivität der in früheren Studien verwendeten PKC α -Antikörper sein (siehe 4.2).¹¹⁹

Zwischen der erhöhten Expression der PKC ϵ und dem hypertrophen Prozess am Rattenherzen wurde schon häufig eine Verbindung hergestellt. Sowohl Gu und Bishop als auch Jalili et al. wiesen Konzentrationserhöhungen dieser Isoform in verschiedenen, zur Hypertrophie führenden Modellen nach.^{51, 64}

Eine neuere Studie von James et al. jedoch kommt zu einem ganz anderem Ergebnis.⁶⁵ Sie transfizierten Kardiomyozyten von Ratten mit dem PKC ε -Gen, die folglich die ε -Isoform der PKC überexprimierten. Die Untersuchungen von James et al. ergaben, dass die transfizierten Kardiomyozyten nicht wie erwartet hypertrophierten, jedoch ihre strukturelle Morphologie stark veränderten. Ihre Beteiligung am Prozess der kardialen Hypertrophie ist deshalb nicht wahrscheinlich. Dies stimmt überein mit der Beobachtung einer nur gering veränderten PKC ε -Konzentration in der durchgeführten Studie.

In der vorliegenden Studie wurde erstmals die kardiale PKC-Konzentration nach zwölfwöchiger Urämie-Phase bestimmt. Nach wie vor ist nicht bekannt, in welchem Ausmass die einzelnen Faktoren (Hypertonie, RAS, Endothelin-System und Katecholamine) am hypertrophen Prozess beteiligt sind. Die Auswirkung auf das Herz und die PKC-Isoformen bei einer medikamentösen Blockade einzelner Systeme soll im nächsten Abschnitt diskutiert werden. Doch schon jetzt zeigt sich die Komplexität der Konzentrationsbestimmung von PKC-Isoformen am Beispiel der Studien von Gu und Bishop sowie Fryer et al.^{43, 51} Beide Studien benutzten Tiere mit erhöhter linksventrikulärer Belastung jedoch bei Anwendung eines anderen Studienkonzepts (s.o.). Die Reaktion der PKC-Isoformen fiel völlig unterschiedlich aus.

Hinweise für spezifische Funktionen einzelner Proteinkinasen sind schon existent. So wurde der PKC α eine Funktion im posttranslationalen Prozess zugesprochen.⁹⁴ Die PKC ε hingegen beeinflusst die Zell-Morphologie, nicht jedoch die kardiale Hypertrophie.⁶⁵ Die PKC δ soll vor allem anti-proliferativ wirken. In einem an diese Studie anknüpfenden Versuch wird die Reaktion der PKC-Isoformen auf die selektive Stimulation mit „urämischen Toxinen“ (wie z.B. Endothelin) betrachtet. Sie soll differenziert den Einfluss der PKC-verändernden Faktoren klären.

4.4 Wirkung der medikamentösen Behandlung auf die PKC-Expression, Herzgewicht und Blutdruck

4.4.1 Endothelin-Rezeptor-Antagonisten

In den Gruppen der SNX-Tiere, die mit den ET-Antagonisten behandelt wurden, (SNX/ET_A und SNX/ET_{AB}) zeigte sich in beiden Gruppen die gleiche Tendenz. Deutlich sank die Konzentration der PKC α . Bei der PKC δ hingegen war ein Anstieg zu verzeichnen. Ein leichtes jedoch nicht signifikantes Absinken wurde bei der PKC ϵ registriert. Die Unterschiede zwischen den mit dem selektiven ET_A-Antagonisten und den mit unselektivem ET_{AB}-Antagonisten behandelten Gruppen waren nur marginal. Somit scheint die zusätzliche Blockung des ET_B-Rezeptors für die Expression der PKC-Isoformen nicht von Bedeutung zu sein. Ursache für diesen Effekt könnten die von Aramori et al. festgestellten Unterschiede in den Signaltransduktionsmechanismen der ET_A- und ET_B-Rezeptoren haben.⁷ Sie fanden heraus, dass die Stimulierung des ET_A-Rezeptors eine Weiterreichung des Signals über den Phospholipase C-Weg führte und damit eine Aktivierung der PKC bewirkte.¹¹⁴ Die Stimulation des ET_B-Rezeptors hingegen aktivierte die Kalzium-abhängige NO-Synthase (eNOS). Die mitogene Wirkung wurde deshalb vor allem dem ET_A-Rezeptor zugeschrieben, der über die PKC Einfluss auf die Gentranskription hat.

Bisher existieren nur Kurzzeitstudien über die Wirkung von Endothelin auf die PKC von Kardiomyozyten. Sie weisen auf eine vornehmliche Aktivierung der PKC δ und ϵ hin, machen jedoch keine Aussage zur Langzeitwirkung von Endothelin.^{18, 30, 75} Die Aktivierung ist ein nur Minuten dauernder Prozess, der die längerfristigen Wirkungen der Endothelin-Rezeptoren-Stimulation nicht in Betracht zieht.¹¹¹ Im allgemeinen hatte die Blockung der ET-Rezeptoren eine positive Wirkung auf das Herzgewicht. Sowohl bei selektiver als auch bei unselektiver Blockade ergab sich eine Senkung des Quotienten aus linkem Ventrikel und Körpergewicht (LV/K-Quotient). Allerdings sank er bei SNX/ET_A stärker als bei SNX/ET_{AB} und erlangte nur bei SNX/ET_A Signifikanz. Zu einem ganz ähnlichen Ergebnis kamen Wolf et al., die nach zwölfwöchiger

Behandlung subtotal-nephrektomierter Ratten mit dem selektiven ET_A -Antagonisten LU 302146 ein erniedrigtes Herzgewicht im Vergleich zur unbehandelten Gruppe feststellen konnten.¹⁵⁴ Im Gegensatz hierzu war unter Behandlung der SNX-Tiere mit dem unselektiven ET_{AB} -Antagonisten LU302872 keine bedeutende Veränderung des Herzgewichts nachweisbar. Das Körpergewicht aller Versuchsgruppen lag in dieser Studie auf gleichem Niveau.

Betrachtet man die Blutdruckwerte so zeigte der Effekt der selektiven bzw. unselektiven ET-Blockade auch hier Unterschiede. Im Verlauf der zwölfwöchigen Behandlung sank in beiden Gruppen der Blutdruck signifikant, doch nur die Werte der SNX/ ET_A -Gruppe erlangten gegen Studienende fast Normalniveau. Da sich die Expression der PKC-Isoformen in der SNX/ ET_A - und SNX/ ET_{AB} -Gruppe kaum unterschieden, wurde die Konzentrationsveränderung vermutlich vor allem durch die Blockade der Rezeptoren und nicht so sehr durch die Blutdrucksenkung beeinflusst. Bestätigt werden diese Ergebnisse durch Studien von Brochu et al. und Benigni et al. die ebenfalls nephrektomierte Ratten untersuchten.^{12, 25, 26}

Die spezielle Betrachtung der ET_B -Rezeptor-Blockade zeigte auf, dass sich im Falle der PKC-Konzentration kein zusätzlicher Effekt ergab und das Herzgewicht eher negativ beeinflusst wurde. Vor allem die Wirkung des mitogenen Rezeptors ET_A hatte Einfluss auf die PKC-Expression. Bei Ausbildung der kardialen Hypertrophie scheint trotzdem auch der ET_B -Rezeptor beteiligt zu sein. Modesti et al. gaben das Verhältnis von ET_A : ET_B -Rezeptoren an Herzen von Ratten mit 5:1 an.⁹² Trotz dieses ungleichen Verhältnisses in der Rezeptorendichte, scheint dem ET_B -Rezeptor eine wesentliche Funktion bei der Verhinderung der kardialen Hypertrophie zuzukommen. Eine Blockierung dieses Rezeptors wirkte sich daher nicht vorteilhaft auf das Herzgewicht aus.

4.4.2 Losartan und Kombination (Losartan und ET_A-Antagonist)

Die Veränderungen der PKC-Konzentrationen bei der Behandlung nephrektomierter Ratten mit dem AT₁-Rezeptor-Antagonisten Losartan sowie die Kombinationsbehandlung mit Losartan und dem selektiven ET_A-Antagonisten waren mit der Gruppe vergleichbar, die den ET_A-Antagonisten erhalten hatte. Allerdings war die Senkung der PKC α -Konzentration bei Losartan-Applikation noch deutlicher und der Anstieg der PKC δ -Konzentration der Kombinationsgruppe stärker und auch signifikant gegenüber der SNX-Gruppe. Ein Blick auf die Wirkungsweise der Hormon-Systeme könnte diese auffällig ähnliche Reaktion der C-Kinasen bei Gabe von ET_A-Antagonisten und Losartan erklären. Sowohl das Endothelin-System als auch das RAS wirken über die Hormone Endothelin-1 bzw. Angiotensin II auf transmembranäre Rezeptoren. Die Stimulierung dieser Rezeptoren mündet gemeinsam in den Phospholipase C-Weg und führt zu einer Aktivierung der Proteinkinase C.^{50, 114} Eine ähnliche Veränderung der PKC-Konzentrationen bei der Blockade dieser beiden Rezeptoren gründet deshalb auf der übereinstimmenden Signaltransduktion.

Die Kombination von Losartan und ET_A-Antagonist zeigte nochmals einen Anstieg der PKC δ -Konzentration, die sich somit signifikant von der unbehandelten SNX-Gruppe unterschied. Die Veränderungen dieser Isoform erlangte in keiner der anderen drei Gruppen (SNX/ET_A, SNX/ET_{AB} oder SNX/L) Signifikanz. Die Auswirkungen der verstärkten Senkung der PKC α - bzw. der erhöhten PKC δ -Expression in den mit Losartan behandelten Gruppen hatte jedoch keine Auswirkung auf das linksventrikuläre Gewicht. Der LV/K-Quotient beider Gruppen (SNX/L und SNX(L/ET_A)) erreichte das Niveau der SNX/ET_A-Gruppe. Eine noch stärkere Senkung hin zu den Normalwerten war auch durch die Kombinationsbehandlung nicht möglich.

Positive Effekte einer Losartan-Behandlung auf die kardiale Hypertrophie konnten schon bei verschiedenartig gestalteten Studien festgestellt werden. Sowohl bei spontan hypertensiven Ratten als auch in Studien mit operativ hergestellter Aortenkonstriktion und damit einhergehender linksventrikulärer Druckbelastung konnten ein Absinken des Herzgewichts bzw. des LV/K-Quotienten nach Behandlung mit Losartan nachgewiesen werden.^{81, 83, 93} In der Studie von Greene et al. wurde dieser Effekt auch an niereninsuffizienten Ratten aufgezeigt.⁴⁸ Allerdings erhielten die Ratten in dieser Studie zusätzlich einen ACE-Hemmer. Daher ist ein Vergleich mit der vorliegenden Studie nur bedingt möglich. Die positive Wirkung der Losartan-Behandlung bei niereninsuffizienten Individuen beschränkte sich nicht nur auf das Herz sondern galt für das gesamte kardiovaskuläre System. In beiden mit Losartan behandelten Gruppen ergab sich eine deutliche Senkung des Blutdrucks im Verlauf der Behandlung. Bestätigt wird diese Beobachtung durch gleichgeartete Studien von Lafayette et al. und Mayer et al.^{74, 87}

Insgesamt lässt sich sagen, dass die Behandlung mit ET_A-Antagonisten oder mit Losartan im Endeffekt die gleichen biochemischen bzw. kardiovaskulären Reaktionen hervorruft. Die Kombinationsbehandlung erbringt keinen zusätzlichen Vorteil für den urämischen Organismus.

4.4.3 Nebivolol

Grundlage für die Behandlung der nephrektomierten Ratten mit dem selektiven β_1 -Rezeptor-Antagonisten, waren Beobachtungen die in folgenden Studien gemacht wurden. In experimentell reduziertem Nierengewebe stellte die Forschungsgruppe um Aiello et al. ein zeitabhängiges Absinken der renalen NO-Konzentration fest.⁴ Schon einige Jahre früher wurde dem NO eine inhibitorische Wirkung auf die ET-Sekretion bzw. Plasma-Renin-Aktivität zugeschrieben.^{29, 72} In einer neueren Studie von Brehm et al. wurde die hemmende Wirkung von NO auf die ET-1-Expression durch Nachweis einer verminderten mRNA-Konzentration des transkribierten Endothelin-Gens bestätigt.²³

Nebivolol ist nicht nur ein β_1 -Rezeptoren-Blocker sondern setzt zusätzlich NO frei. Eine Behandlung mit Nebivolol könnte also das NO-Defizit verringern.

Ein blutdrucksenkender Effekt wurde nicht nur in der vorliegenden Studie sondern auch in Hypertonie-Studien, festgestellt.^{136, 147} Die Wirkung der Nebivolol-Behandlung auf die kardiale Situation stellt sich durch deren Einfluss auf das Endothelin-System, das RAS, den Blutdruck und die renale Funktion komplex dar. Die Auswirkung auf den LV/K-Quotienten war deutlich. Während die mit Losartan- oder ET-Antagonisten-behandelten Ratten zwar eine signifikante Erniedrigung des linksventrikulären Gewichts erreichten, waren ihre durchschnittlichen Werte jedoch noch weit von den nicht-nephrektomierten Tieren (SHAM-Gruppe) entfernt. Die zwölfwöchige Applikation von Nebivolol zeigte eine noch sehr viel stärkere Senkung des LV/K-Quotienten, der in dieser Gruppe fast das Niveau der SHAM-operierten Tiere erreichte.

Betrachtet man nun die Wirkung von Nebivolol auf die PKC-Isoformen so fällt vor allem die δ -Isoform auf. Ihre Konzentration stieg signifikant um über 70 % im Vergleich zur unbehandelten SNX-Gruppe. Die Expression der PKC α und ϵ sanken in dieser Gruppe. Sie waren jedoch nicht signifikant unterschiedlich zur SNX-Gruppe. Die Auswirkung der β_1 -Blockade und Freisetzung von NO durch Nebivolol zeigten sich deshalb vor allem in der gesteigerten Expression der δ -Isoform. Wie schon im vorhergehenden Abschnitt (4.2) diskutiert wurde, scheint dieser Isoform vor allem ein antiproliferativer Effekt zuzukommen.^{44, 90} Im Vergleich zu den mit ET-Antagonisten- oder Losartan-behandelten Gruppen zeigte sich nach Nebivolol-Applikation eine noch stärker erhöhte Expression der PKC δ , der ein noch niedrigeres Herzgewicht (fast Normalniveau) nach zwölfwöchiger Behandlungsdauer gegenüberstand.

Die Stimulation α_1 -adrenerger Rezeptoren konnte bisher mit der Hypertrophie von Ratten-Kardiomyozyten in Verbindung gebracht werden.^{127, 134} Von van de Waters et al. wurde eine gewisse α_1 -antagonistische Wirkung des β_1 -selektiven Nebivolols beschrieben.¹⁴⁷ Dieser Effekt trat nur bei hoher Dosierung auf und wurde an Arterien von Ratten und Hasen festgestellt. Die in der vorliegenden

Studie verwendete Dosierung von 1 mg/kg Körpergewicht entsprachen ungefähr der maximal verwendeten Dosierung der Forschungsgruppe um van de Waters. Indirekte Einflüsse auf die PKC-Expression dürften allerdings eine grössere Rolle spielen. Die NO-Freisetzung durch Nebivolol hat bedeutenden Einfluss auf das Endothelin-System und das RA-System. Wie Brehm et al. feststellten verringerte sich unter Nebivolol der Gehalt an mRNA für Prä-Pro-Endothelin.²³ Desweiteren sank die Plasma-Renin-Aktivität, wie Chan et al. beobachteten.²⁹ Daher wird eine indirekte Beeinflussung der PKC-Expression durch die Behandlung mit Nebivolol angenommen. Bisher existieren noch keine Daten über die direkte oder indirekte Wirkung von Nebivolol auf die PKC-Expression.

4.5 Protein- und Endothelin-Exkretion im Urin

Endothelin-1 spielt eine bedeutende Rolle für das Fortschreiten einer chronischen Niereninsuffizienz. Schon sehr bald nach seiner Entdeckung wurde in subtotal-nephrektomierten Ratten eine erhöhte renale Konzentration des vasoaktiven Peptids registriert.^{11, 99} Dieselben Beobachtungen wurden auch an Patienten mit Niereninsuffizienz gemacht. Die Stärke der Exkretion von ET-1 ging hierbei sogar mit dem Stadium der Erkrankung einher.⁹⁷ Orisio et al. berichteten von einer verstärkten Expression von ET-1, die in Verbindung mit einem Fortschreiten der Glomerulosklerose und verstärkter Proteinurie am Tiermodell mit subtotaler Nephrektomie stand.⁹⁹ Diese Beobachtung bestätigte sich auch in der vorliegenden Studie. Endothelin- und Protein-Exkretion im Urin waren in der unbehandelten SNX-Gruppe mehrfach erhöht gegenüber den nicht-nephrektomierten Tieren (SHAM-Gruppe). Betrachtet man das RA-System so scheint auch dieses Hormonsystem entscheidend am Prozess der glomerulären Sklerose beteiligt zu sein.^{40, 56} Insgesamt positiv auf die Progredienz der Niereninsuffizienz wirkte sich hierbei eine Behandlung durch Antagonisten an Rezeptoren dieser beiden Hormonsysteme aus. Sowohl unselektive und selektive ET-Antagonisten als auch Losartan konnten eine Progression der Glomerulosklerose verhindern.^{12, 40, 46, 56}

4.5.1 Endothelin-Rezeptor-Antagonisten

Die oben gemachten Feststellungen lassen auf einen Einfluss der ET-Antagonisten und von Losartan auf die renale ET-1-Exkretion schliessen. In der mit ET_A-Antagonisten behandelten Gruppe sank in der vorliegenden Studie die ET-1-Exkretion im Urin im Verlauf der zwölfwöchigen Behandlung signifikant gegenüber den unbehandelten SNX-Tieren. In der mit dem unselektiven ET_{AB}-Antagonisten behandelten Gruppe konnte das Absinken keine Signifikanz erreichen und erlangte nur in der vierten Woche das Niveau der SNX/ET_A-Gruppe. Dies lässt nicht nur eine unterschiedliche Reaktion der ET-1-Exkretion auf die Behandlung mit den verschiedenen selektiven ET-Antagonisten vermuten. Wie Roubert et al. in ihrer Studie feststellten, veränderte sich das Verhältnis und erhöhte sich die Konzentration der ET_A- und ET_B-Rezeptoren in der Niereninsuffizienz.¹¹⁷ Die Studie zeigte einen deutlich erhöhten Anteil der ET_B-Rezeptoren auf. Deshalb wurde diesem Rezeptortyp eine besondere Bedeutung in der Niereninsuffizienz beigemessen. Iwasaki et al. konnten sogar einen autoinduktorischen Effekt der ET-1-Synthese über den ET_B-Rezeptor an mesangialen Zellen erkennen.⁶² Einen bedeutenden Effekt auf die ET-1-Exkretion sollte daher vor allem die Behandlung mit dem unselektiven ET_{AB}-Antagonisten bringen. Die positive Wirkung auf die ET-1-Exkretion war nach ET_{AB}-Behandlung jedoch nicht annähernd so stark wie nach Verabreichung des selektiven ET_A-Blockers.

Die Auswirkungen machten sich auch in der Protein-Ausscheidung im Urin bemerkbar, was auch schon in anderen Studien festgestellt wurde.^{12, 26, 46} Während die selektive Blockade eine um 3-fach erniedrigte Protein-Exkretion aufwies, war bei der unselektiven Blockade durchschnittlich nur eine 2-fache Senkung im Vergleich zu den unbehandelten SNX-Tieren zu verzeichnen. Auch hier bestätigte sich die stärkere Wirksamkeit einer selektiven Endothelin-Rezeptoren-Blockade in urämischen Ratten. Beachtet werden sollte deshalb auch die Studie von Ozaki et al.¹⁰³ Sie konnten eine ET_B-Rezeptor gesteuerte Aufnahme von ET-1 in Endothelzellen registrieren. Auch die Beobachtungen

von Fukuroda et al. wiesen diesem Rezeptor eine Clearance-Funktion bei der Entfernung von zirkulierendem ET-1 zu.⁴⁵ Diese Eigenschaft könnte durch die zusätzliche ET_B-Blockade verloren gegangen sein.

4.5.2 Losartan und Kombination

In vitro wie auch in vivo Versuche zeigten, dass Angiotensin II ein potenter Stimulator der ET-1-Synthese war.^{1, 69} Dies ist Grundlage für die Betrachtung der ET-1-Exkretion im Urin nach Behandlung der nephrektomierten Ratten mit Losartan. Schon mehrfach konnte in ähnlich konzipierten Studien ein Absinken der ET-1-Exkretion im Urin nachgewiesen werden.^{32, 78} Wesentlich besser als die Gruppen SNX/L und SNX/ET_A schnitt die Kombinationsgruppe (ET_A-Antagonist und Losartan) ab. Ihre Werte lagen deutlich unter den Exkretionswerten der unbehandelten SNX-Gruppe und der Mittelwerte der Monotherapien. Daher wird ein synergistischer Effekt dieser beiden Medikamente bei der Reduktion der renalen ET-1-Ausscheidung angenommen.

Betrachtet man die Protein-Exkretion im Urin nach Losartan-Therapie, so war ein Absinken der Ausscheidung zu verzeichnen. Die Erkenntnisse, dass Angiotensin II in hohen Dosen zu einer Proteinurie führte und durch selektive Blockade des Angiotensin II-Rezeptors verhindert werden konnte, waren schon in den 70er Jahren des vorigen Jahrhunderts gemacht worden.^{16, 135} Spätere Studien, die mit Losartan arbeiteten, wiesen eine Verminderung der renalen Schädigung und eine erhöhte selektive Protein-Permeabilität unter Behandlung mit Losartan nach. Gleichzeitig sank die Proteinurie in diesen Studien.^{74, 87} In der vorliegenden Studie ergab die Behandlung nephrektomierter Ratten mit Losartan, ET_A-Antagonisten oder die Kombination dieser Medikamente den gleichen Effekt auf die renale Protein-Exkretion. In allen drei Gruppen war die ET-1-Exkretion im Verlauf der zwölfwöchigen Behandlungsphase im Vergleich zu den unbehandelten SNX-Tieren um ungefähr das 3-fache gesunken.

4.5.3 Nebivolol

Kourembanas et al. hatten schon einige Zeit vorher nachgewiesen, dass NO ein potenter Inhibitor der ET-1-Synthese ist.⁷² Folglich scheint im Modell der 5/6-nephrektomierten Ratten ein Mangel an NO zu herrschen, der zu einer erhöhten renalen ET-1-Produktion und gesteigerten ET-1-Exkretion im Urin führt. Nebivolol besitzt zusätzlich zur β_1 -Blockade noch die Eigenschaft der NO-Freisetzung in den Zellen und könnte so dem renalen Mangel und damit der erhöhten ET-1-Synthese entgegen wirken. In der vorliegenden Studie war der Urin-ET-1-Spiegel in der mit Nebivolol-behandelten Gruppe am deutlichsten gesenkt. Er erreichte nahezu das Niveau der nicht-nephrektomierten Kontrolltiere (SHAM). Wie Greven und Gabriels nachweisen konnten, hatte die NO-Substitution mit Nebivolol auch eine positive Wirkung auf die renale Funktion.⁴⁹ Bemerkbar machte sich dieser Effekt in der Protein-Exkretion der Nieren. Sie war in der durchgeführten Studie um das 3-fache gesunken im Vergleich zu den unbehandelten SNX-Tieren. Daher kann Nebivolol eine nephroprotektive Funktion zugesprochen werden.

4.6 Fazit

In der vorliegenden Studie sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- Hat die urämische Stoffwechselsituation einen Einfluss auf die Expression von PKC-Isoformen am linken Ventrikel subtotal-nephrektomierter Ratten?
- Wie wirkt sich die medikamentöse Behandlung mit Endothelin-Antagonisten, Losartan oder Nebivolol auf die PKC-Expression aus?
- Hat die medikamentöse Behandlung einen Effekt auf das linksventrikuläre Gewicht?
- Erbringt die zusätzliche Blockung des ET_B-Rezeptors einen Vorteil gegenüber der selektiven ET_A-Blockade?
- Hat die Kombinationsbehandlung aus ET_A-Antagonisten und Losartan Vorteile gegenüber den Monotherapien?
- Wie beeinflussen die Medikamente die renale Protein- bzw. ET-1-Exkretion?

Die durchgeführte Studie zeigte den Einfluss der Urämie auf die Expression der PKC-Isoformen α und δ am linken Ventrikel. Mit der linksventrikulären Hypertrophie ging ein Anstieg der PKC α einher. Gleichzeitig kam es zu einem Absinken der PKC δ . Daher wurde der PKC α eine proliferative Eigenschaft zugeschrieben, der PKC δ eher eine anti-proliferative.

Die medikamentöse Behandlung mit den ET-Antagonisten und Losartan bzw. in Kombination führten tendenziell zur Reduktion der PKC α -Konzentration. Die PKC δ hingegen war in höheren Konzentrationen nachweisbar. Der Anstieg der PKC δ in der Nebivolol-behandelten Gruppe war auffällig stärker als in den Gruppen, die mit Losartan oder mit ET-Antagonisten behandelt wurden. In dieser Gruppe erlangte das Herzgewicht nahezu das Niveau der nicht-nephrektomierten Ratten (SHAM). Die Absenkung in den anderen Gruppen war geringer als in der Nebivolol-Gruppe.

Eher nachteilig wirkte sich eine zusätzliche Blockade des ET_B-Rezeptors bei der Behandlung mit dem unselektiven ET_{AB}-Antagonisten aus. Im Vergleich zur selektiven ET_A-Blockade sank das Herzgewicht nicht signifikant. Die Veränderungen bei den PKC-Isoformen waren jedoch ungefähr gleich stark ausgeprägt wie bei den mit dem ET_A-Antagonisten behandelten Tieren. Daher wurde angenommen, dass das linksventrikuläre Gewicht in der mit unselektiven ET_{AB}-Antagonisten behandelten Gruppe durch die verminderte NO-Freisetzung verursacht wurde.

Ungefähr gleiche Wirkung auf das Herzgewicht und die PKC-Isoformen hatte die Behandlung mit ET_A-Antagonisten, Losartan und deren Kombination. Die Kombinationsbehandlung erbrachte hier keine weiteren Vorteile gegenüber den Monotherapien. Die Beeinflussung des PKC-Signaltransduktionsweges in urämischen Ratten durch selektive Blockade der stimulierenden Hormonrezeptoren scheint nur bis zu einem gewissen Grade die kardiale Hypertrophie zu verhindern. Deshalb wurden weitere Faktoren z.B. die verminderte NO-Konzentration in kardialen Zellen für die Progredienz der Herzhypertrophie beschuldigt.

Betrachtet man die Nierenfunktion, so wurde ein nephroprotektiver Effekt unter Behandlung mit den ET-Antagonisten und Losartan beobachtet. Allerdings war die Senkung der Proteinurie und der ET-1-Exkretion im Urin in der Nebivolol-Gruppe am deutlichsten. Die zusätzliche Blockade des ET_B-Rezeptors hatte auch an der Niere eher nachteilige Effekte. Sie machte sich vor allem in einer geringeren Absenkung der ET-1- und der Protein-Ausscheidung im Vergleich zu der selektiven ET_A-Blockade bemerkbar machten.

5. Zusammenfassung

Die linksventrikuläre Hypertrophie (LVH) stellt eine der wichtigsten kardiovaskulären Komplikationen in der Niereninsuffizienz dar. Die Proteinkinase C (PKC) besitzt eine bedeutende Funktion in der Regulation der kardialen Hypertrophie. Sowohl das Endothelin-1 (ET-1) als auch das Angiotensin II (Ang II) aktivieren die Proteinkinase C-Isoformen. Beide Hormonsysteme sind in der Urämie erhöht.

Bisher existieren keine Studien, die die Veränderung der PKC-Isoformen in der Urämie untersuchen. An Ratten wurden nach zwölfwöchiger Urämiephase die PKC-Isoformen charakterisiert und quantifiziert. Durch Blockade des Signaltransduktionsweges der Proteinkinase C mit dem selektiven ET_A-Antagonisten BSF 302146 (ET_A), dem unselektiven ET_{AB}-Antagonisten BSF 302872 (ET_{AB}), dem β_1 -selektiven Blocker Nebivolol (N) und AT₁-Antagonist Losartan (L) sowie durch Kombination von ET_A-Antagonist und Losartan (L/ET_A) wurden die Veränderungen der PKC-Isoformen im Vergleich zu den unbehandelten SNX untersucht. Weiterhin wurde das linksventrikuläre Gewicht, der Blutdruck und Nierenfunktionsparameter wie die Proteinurie und die ET-1-Exkretion zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessen.

Es wurden männliche Sprague-Dawley Ratten verwendet, die einer 5/6-Nephrektomie unterzogen wurden. Eine Kontrollgruppe dekapsuliert und die Nebennieren geschont. Die Kontrollgruppe wie auch die 5/6-nephrektomierte Gruppe (SNX) erhielten keine Medikamente. Die anderen SNX-Gruppen erhielten entweder SNX/ET_A, SNX/ET_{AB}, SNX/L, SNX(L/ET_A) oder SNX/N.

Nach zwölf Wochen wurden die PKC-Isoformen α , δ und ϵ im linksventrikulären Herzhomogenat bestimmt. Die unbehandelten SNX-Ratten wiesen eine um 19 % erhöhte Konzentration der PKC α ($p < 0,05$) und eine um 35 % erniedrigte PKC δ ($p < 0,05$) im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Der Quotient aus linksventrikulärem Gewicht und Körpergewicht (LV/K) stieg um 49 % ($p < 0,05$) an. Die medikamentöse Behandlung führte in den Gruppen SNX/ET_A,

SNX/ET_{AB}, SNX/L und SNX(L/ET_A) zur signifikanten Senkung der Konzentration der PKC α zwischen 25 % (SNX/ET_A und SNX/ET_{AB}) und über 33 % (SNX/L und SNX(L/ET_A)) im Vergleich zur SNX-Gruppe. Die PKC δ stieg in diesen vier Gruppen deutlich an. Sie betrug bei SNX/ET_A 32%, bei SNX/ET_{AB} 28 %, bei SNX/L 31 % und bei SNX(L/ET_A) sogar 42 %. Signifikanz erreichte jedoch nur die letzte Gruppe.

Der LV/K-Quotient sank um 17 % (SNX/L und SNX(L/ET_A)) bzw. 18 % (SNX/ET_A) (alle $p < 0,05$). Die SNX/N-Gruppe erreichte sogar den LV/K-Quotienten der Kontrollgruppe (-27 %, $p < 0,05$) und verhinderte eine myokardiale Hypertrophie. In dieser Gruppe lag die Konzentration der PKC α um 11 % unter dem Niveau der SNX-Gruppe, die PKC δ hingegen stieg um 72 % ($p < 0,05$). Die PKC ϵ wies in allen Behandlungsgruppen keine Veränderung gegenüber der Kontrollgruppe auf.

Betrachtete man die Nierenfunktion der SNX-Tiere, so fiel eine um durchschnittlich 3,5-fach erhöhte ET-1- und eine um 10-fach erhöhte Protein-Ausscheidung (beide $p < 0,05$) im Vergleich zur nicht-nephrektomierten Kontrollgruppe auf. Die medikamentöse Behandlung mit ET_A oder N verringerte die ET-1-Exkretion signifikant.

In der vorliegenden Studie zeigte sich, dass mit dem Anstieg der PKC α -Konzentration und dem Absinken der PKC δ -Konzentration eine kardiale Hypertrophie einher ging. Bisher stellten Studien vor allem eine Verbindung zwischen erhöhter Expression von PKC-Isoformen und der Massenvermehrung am Herzen her.^{18, 68} Der PKC δ konnte jedoch vor allem eine antiproliferative Wirkung zugeschrieben werden. Die proliferative Wirkung der PKC α ist vereinbar mit der Beteiligung dieser Isoform am posttranslationalen Prozess in Kardiomyozyten.¹⁵¹ Der PKC ϵ konnte keine Beteiligung an der myokardialen Hypertrophie nachgewiesen werden.

Die medikamentöse Behandlung mit ET_A, ET_{AB}, L, L/ET_{AB} und N verhinderte den Anstieg bzw. das Absinken der PKC-Isoformen und führte zu einer Verringerung der kardialen Hypertrophie. Kaum Unterschiede existierten in der Expression der PKC-Isoformen nach Behandlung mit ET_A oder ET_{AB}. Ursache hierfür könnte die Beeinflussung der Gentranskription über den ET_A-Rezeptor sein. Der ET_B-Rezeptor wirkt über eine andere Signalkaskade.⁷ Die kombinierte Gabe von Losartan und ET_A-Antagonist brachte keine weiteren Vorteile für das kardiovaskuläre System. Die PKC-Veränderungen durch N dürften durch die NO-Wirkung auf das ET-System und das RAS zustande gekommen sein.^{23, 29}

Schon seit längerem ist bekannt, dass ein Fortschreiten der Niereninsuffizienz mit der erhöhten Aktivität des ET- und des RA-Systems zusammenhängt.^{40, 56, 97, 99} Im Gegensatz zu der unselektiven ET_{AB}-Blockade konnte die ET_A-Blockade die Proteinurie und die ET-1-Exkretion im Urin senken. Ursache könnte die Antagonisierung der Clearance-Funktion des ET_B-Rezeptors sein. Die Beobachtung eines renalen NO-Mangels in niereninsuffizienten Individuen gab Anlass einen nephroprotektiven Effekt von Nebivolol zu vermuten.⁴

Für niereninsuffiziente Patienten dürften die in der vorliegenden Studie gemachten Erkenntnisse Hoffnung geben. Die Behandlung mit ET_A-Antagonisten und/oder mit Losartan oder mit Nebivolol hatten gute kardioprotektive und nephroprotektive Effekte. Eine positive Wirkung dieser Medikamente dürfte deshalb auch bei der Behandlung niereninsuffizienter Patienten zu erwarten sein.

6. Tabellarischer Anhang

6.1 Proteinkinasen

Gruppen	PKC α (n = 7)	PKC δ (n = 7)	PKC ε (n = 7)
SNX/N ₁₀	117,1 \pm 3,9	121,3 \pm 8,4	99,96 \pm 3,8
SNX/N ₃₀	102,9 \pm 5,7	114,3 \pm 14,9	101,2 \pm 6,1

Tabelle 6.1: Expression der PKC-Isoformen am Rattenherz bei nephrektomierten Tieren ohne und mit Nebivolol-Behandlung; MW \pm SEM in %
SNX/N₁₀ bzw. SNX/N₃₀ : Gruppe von SNX-Tieren die mit 10 bzw.30 mg Nebivolol/kg Körpergewicht behandelt wurden

6.2 LV/K-Quotient

Gruppen	n	LV/K	log LV/K
SNX/N ₁₀	9	0,00264 \pm 0,00019	-2,589 \pm 0,033
SNX/N ₃₀	13	0,00283 \pm 0,00025	-2,565 \pm 0,033

Tabelle 6.2 : Quotient aus Gewicht des linken Ventrikels und dem Körpergewicht am Versuchsende in der zwölften Woche sowie Angabe der logarithmierten Werte; MW \pm SEM

6.3 Verlauf des systolischen Blutdrucks

Gruppen	präop.	2.Woche	Δ RR	6.Woche	Δ RR	12.Woche	Δ RR
SNX/N ₁₀	113 \pm 1 (n = 67)	134 \pm 8	10	153 \pm 10	8	141 \pm 6	13
SNX/N ₃₀		131 \pm 8	13	151 \pm 11	10	164 \pm 10	10

Tabelle 6.3 : Blutdruckwerte [mmHg] im Verlauf der zwölfwöchigen Versuchsdauer; MW \pm SEM
 Δ RR = Blutdruck-Differenz im Vergleich mit der SNX-Gruppe

6.4 Endothelinspiegel im Blut

Gruppen	n	ET-Spiegel
Kontrollen	10	3,08 ± 0,61
SNX	19	5,09 ± 0,37
SNX/ET _A	11	5,88 ± 0,75
SNX/ET _{AB}	12	5,60 ± 0,81
SNX/L	10	2,86 ± 0,25
SNX(L/ET _A)	12	3,96 ± 0,31
SNX/N	11	3,36 ± 0,47
SNX/N ₁₀	7	4,76 ± 1,10
SNX/N ₃₀	12	3,45 ± 0,31

Tabelle 6.4 : immuno-reaktive Bestimmung des Endothelin-1-Spiegels (ET-1) im Blutplasma [fmol/ml]; MW ± SEM;

6.5 Endothelin-Exkretion im Urin

Gruppen	präoperativ	4.Woche	8.Woche	12.Woche
SNX/N ₁₀	77 ± 11 (n = 6)	1197 ± 556 (n = 7)		2153 ± 553 (n = 9)
SNX/N ₃₀		733 ± 247 (n = 8)	687 ± 147 (n = 9)	2089 ± 280 (n = 13)

Tabelle 6.5 : Endothelin-Ausscheidung im 24-Stunden-Urin [fmol/ml*24h]; Verlaufsbeobachtung; MW ± SEM;

6.6 Proteinausscheidung

Gruppen	präop.	2.Woche	4.Woche	8.Woche	12.Woche
SNX/N₁₀	9 ± 1 (n = 34)	24 ± 8 (n = 12)	101 ± 35 (n = 12)	158 ± 52 (n = 11)	127 ± 41 (n = 21)
SNX/N₃₀		34 ± 15 (n = 13)	41 ± 15 (n = 13)	61 ± 19 (n = 13)	203 ± 55 (n = 13)

Tabelle 6.6 : Protein-Ausscheidung im 24-Stunden-Urin [mg/24h];
Verlaufsbeobachtung; MW ± SEM;

6.7 Getrunkene Wassermenge

Gruppen	präop.	2.Woche	4.Woche	8.Woche	12.Woche
Kontrollen	29 ± 1 (n = 94)	39 ± 4 (n = 9)	37 ± 3 (n = 8)	43 ± 4 (n = 11)	36 ± 2 (n = 10)
SNX		69 ± 5 (n = 17)	64 ± 4 (n = 18)	68 ± 3 (n = 22)	73 ± 3 (n = 20)
SNX/ET_A		46 ± 3 (n = 13)	55 ± 2 (n = 13)	64 ± 3 (n = 12)	59 ± 5 (n = 12)
SNX/ET_{AB}		54 ± 5 (n = 12)	59 ± 3 (n = 12)	66 ± 4 (n = 12)	71 ± 3 (n = 12)
SNX/L		70 ± 3 (n = 13)	90 ± 3 (n = 11)	65 ± 5 (n = 11)	60 ± 4 (n = 11)
SNX(L/ET_A)		59 ± 5 (n = 12)	62 ± 3 (n = 12)	51 ± 4 (n = 12)	49 ± 4 (n = 12)
SNX/N			54 ± 4 (n = 14)	46 ± 3 (n = 14)	42 ± 2 (n = 23)
SNX/N₁₀		55 ± 3 (n = 8)	55 ± 4 (n = 12)	65 ± 5 (n = 11)	58 ± 9 (n = 9)
SNX/N₃₀		52 ± 6 (n = 8)	45 ± 3 (n = 13)	54 ± 8 (n = 13)	53 ± 4 (n = 13)

Tabelle 6.7 : Getrunkene Wassermenge in 24 Stunden [ml/24h];
Verlaufsbeobachtung; MW ± SEM;

6.8 Ausgeschiedene Urinmenge

Gruppen	präop.	2.Woche	4.Woche	8.Woche	12.Woche
Kontrollen	12 ± 0,3 (n = 63)	20 ± 4 (n = 9)	18 ± 2 (n = 8)	18 ± 2 (n = 11)	17 ± 1 (n = 10)
SNX		43 ± 3 (n = 17)	44 ± 4 (n = 23)	48 ± 2 (n = 22)	54 ± 4 (n = 20)
SNX/ET _A		30 ± 3 (n = 13)	31 ± 3 (n = 13)	35 ± 2 (n = 12)	40 ± 3 (n = 10)
SNX/ET _{AB}		34 ± 4 (n = 12)	36 ± 2 (n = 11)	44 ± 3 (n = 12)	43 ± 4 (n = 11)
SNX/L		44 ± 2 (n = 13)	42 ± 3 (n = 12)	45 ± 5 (n = 12)	42 ± 2 (n = 11)
SNX(L/ET _A)		41 ± 3 (n = 12)	36 ± 2 (n = 12)	35 ± 3 (n = 12)	38 ± 4 (n = 12)
SNX/N			31 ± 2 (n = 14)	31 ± 2 (n = 14)	31 ± 2 (n = 23)
SNX/N ₁₀		40 ± 3 (n = 8)	39 ± 3 (n = 12)	46 ± 5 (n = 11)	41 ± 6 (n = 9)
SNX/N ₃₀		31 ± 2 (n = 8)	30 ± 2 (n = 13)	31 ± 4 (n = 13)	35 ± 3 (n = 13)

Tabelle 6.8 : Ausgeschiedene Urinmenge in 24 Stunden [ml/24h];
Verlaufsbeobachtung; MW ± SEM;

6.9 Gewicht

Gruppen	präop.	2.Woche	4.Woche	8.Woche	12.Woche	S
Kontrollen	213 ± 1 (n = 95)	316 ± 10 (n = 7)	346 ± 7 (n = 10)	382 ± 11 (n = 11)	422 ± 7 (n = 11)	
SNX		313 ± 8 (n = 19)	338 ± 10 (n = 18)	394 ± 9 (n = 20)	427 ± 7 (n = 19)	
SNX/ET _A		299 ± 5 (n = 13)	338 ± 6 (n = 13)	392 ± 12 (n = 12)	425 ± 11 (n = 10)	
SNX/ET _{AB}		293 ± 8 (n = 12)	339 ± 7 (n = 12)	393 ± 8 (n = 12)	414 ± 9 (n = 12)	
SNX/L			319 ± 8 (n = 13)	375 ± 13 (n = 12)	405 ± 14 (n = 11)	
SNX(L/ET _A)		288 ± 8 (n = 12)	347 ± 5 (n = 12)	414 ± 9 (n = 12)	468 ± 13 (n = 12)	
SNX/N			339 ± 5 (n = 14)		409 ± 6 (n = 23)	
SNX/N ₁₀		292 ± 6 (n = 8)	326 ± 6 (n = 12)	387 ± 25 (n = 11)	449 ± 12 (n = 9)	
SNX/N ₃₀		280 ± 7 (n = 8)	304 ± 12 (n = 13)	340 ± 14 (n = 13)	376 ± 17 (n = 13)	

Tabelle 6.9 : Verlauf des Gewichts während der zwölfwöchigen
Versuchsperiode [mg]; MW ± SEM;

6.10 Gefressene Futtermenge

Gruppen	präop.	2.Woche	4.Woche	8.Woche	12.Woche
Kontrollen	29 ± 0,5 (n = 99)	30 ± 1 (n = 7)	31 ± 3 (n = 4)	31 ± 3 (n = 10)	31 ± 1 (n = 11)
SNX		29 ± 1 (n = 19)	31 ± 1 (n = 18)	29 ± 1 (n = 21)	26 ± 1 (n = 20)
SNX/ET _A		27 ± 1 (n = 13)	29 ± 1 (n = 13)	28 ± 1 (n = 12)	26 ± 1 (n = 11)
SNX/ET _{AB}		28 ± 2 (n = 12)	30 ± 1 (n = 12)	31 ± 1 (n = 12)	30 ± 1 (n = 12)
SNX/L		32 ± 2 (n = 11)	25 ± 1 (n = 11)	24 ± 2 (n = 11)	26 ± 2 (n = 11)
SNX(L/ET _A)		34 ± 1 (n = 12)	31 ± 2 (n = 12)	23 ± 2 (n = 12)	16 ± 2 (n = 12)
SNX/N			26 ± 1 (n = 14)	23 ± 1 (n = 14)	26 ± 1 (n = 23)
SNX/N ₁₀		32 ± 2 (n = 8)	34 ± 2 (n = 12)	31 ± 2 (n = 11)	28 ± 3 (n = 9)
SNX/N ₃₀		30 ± 4 (n = 8)	33 ± 2 (n = 13)	28 ± 2 (n = 13)	28 ± 2 (n = 13)

**Tabelle 6.10 : Gefressene Futtermenge in 24 Stunden [mg/24h];
Verlaufsbeobachtung; MW ± SEM;**

6.11 Urinparameter

6.11.1 Natrium

Gruppen	präop.	2.Woche	4.Woche	8.Woche	12.Woche
Kontrollen	184 ± 7 (n = 69)	176 ± 21 (n = 8)	219 ± 10 (n = 8)	212 ± 18 (n = 10)	155 ± 18 (n = 11)
SNX		183 ± 13 (n = 17)	256 ± 19 (n = 17)	263 ± 21 (n = 20)	288 ± 21 (n = 20)
SNX/ET _A		178 ± 16 (n = 13)	177 ± 19 (n = 11)	154 ± 11 (n = 11)	210 ± 17 (n = 10)
SNX/ET _{AB}		190 ± 11 (n = 20)	217 ± 14 (n = 11)	237 ± 14 (n = 12)	197 ± 14 (n = 12)
SNX/L		232 ± 14 (n = 13)	225 ± 16 (n = 11)	218 ± 28 (n = 12)	166 ± 21 (n = 11)
SNX(L/ET _A)		221 ± 29 (n = 12)	189 ± 22 (n = 12)	102 ± 15 (n = 12)	127 ± 14 (n = 23)
SNX/N			199 ± 12 (n = 14)	172 ± 11 (n = 14)	150 ± 11 (n = 22)
SNX/N ₁₀		218 ± 17 (n = 12)	222 ± 13 (n = 12)	127 ± 12 (n = 11)	169 ± 16 (n = 21)
SNX/N ₃₀		222 ± 27 (n = 13)	161 ± 11 (n = 13)	98 ± 16 (n = 13)	152 ± 17 (n = 13)

Tabelle 6.11.1 : Natrium-Ausscheidung im 24-Stunden-Urin [mmol/24h];

Verlaufsbeobachtung; MW ± SEM;

6.11.2 Kalium

Gruppen	präop.	2.Woche	4.Woche	8.Woche	12.Woche
Kontrollen	34 ± 1 (n = 69)	45 ± 3 (n = 8)	53 ± 3 (n = 8)	54 ± 5 (n = 10)	40 ± 6 (n = 11)
SNX		42 ± 3 (n = 17)	52 ± 2 (n = 17)	60 ± 5 (n = 20)	49 ± 3 (n = 20)
SNX/ET _A		39 ± 2 (n = 13)	47 ± 4 (n = 11)	47 ± 4 (n = 11)	56 ± 2 (n = 10)
SNX/ET _{AB}		36 ± 3 (n = 20)	54 ± 2 (n = 11)	56 ± 3 (n = 12)	43 ± 3 (n = 12)
SNX/L		50 ± 1 (n = 13)	55 ± 2 (n = 11)	45 ± 3 (n = 12)	50 ± 3 (n = 11)
SNX(L/ET _A)		47 ± 5 (n = 12)	50 ± 5 (n = 12)	42 ± 3 (n = 12)	38 ± 3 (n = 23)
SNX/N			44 ± 2 (n = 14)	45 ± 2 (n = 2)	41 ± 1 (n = 22)
SNX/N ₁₀		33 ± 1 (n = 12)	50 ± 2 (n = 12)	32 ± 2 (n = 11)	42 ± 3 (n = 21)
SNX/N ₃₀		38 ± 2 (n = 13)	40 ± 2 (n = 13)	33 ± 3 (n = 13)	37 ± 3 (n = 13)

**Tabelle 6.11.2 : Kalium-Ausscheidung im 24-Stunden-Urin [mmol/24h];
Verlaufsbeobachtung; MW ± SEM;**

6.11.3 Kalzium

Gruppen	präop.	2.Woche	4.Woche	8.Woche	12.Woche
Kontrollen	1,9 ± 0,1 (n = 69)	2,1 ± 0,4 (n = 8)	2,6 ± 0,4 (n = 8)	2,5 ± 0,8 (n = 10)	1,3 ± 0,2 (n = 11)
SNX		3,4 ± 0,4 (n = 17)	5,1 ± 0,8 (n = 17)	3,5 ± 0,3 (n = 20)	2,5 ± 0,3 (n = 20)
SNX/ET _A		2,2 ± 0,3 (n = 13)	2,2 ± 0,3 (n = 11)	2,1 ± 0,3 (n = 11)	2,0 ± 0,3 (n = 10)
SNX/ET _{AB}		2,6 ± 0,4 (n = 20)	2,6 ± 0,3 (n = 11)	2,5 ± 0,3 (n = 12)	2,1 ± 0,3 (n = 12)
SNX/L		4,6 ± 0,4 (n = 13)	2,7 ± 0,3 (n = 11)	3,6 ± 0,4 (n = 12)	2,0 ± 0,2 (n = 11)
SNX(L/ET _A)		3,8 ± 0,4 (n = 12)	1,1 ± 0,1 (n = 12)	0,7 ± 0,1 (n = 12)	0,5 ± 0,1 (n = 23)
SNX/N			0,8 ± 0,1 (n = 14)	0,6 ± 0,04 (n = 14)	0,6 ± 0,1 (n = 22)
SNX/N ₁₀		1,9 ± 0,2 (n = 12)	1,6 ± 0,2 (n = 12)	0,8 ± 0,1 (n = 11)	0,9 ± 0,1 (n = 21)
SNX/N ₃₀		1,8 ± 0,2 (n = 13)	1,5 ± 0,1 (n = 13)	1,0 ± 0,2 (n = 13)	1,2 ± 0,1 (n = 13)

Tabelle 6.11.3 : Kalzium-Ausscheidung im 24-Stunden-Urin [mmol/24h];
Verlaufsbeobachtung; MW ± SEM;

6.11.4 Phosphat

Gruppen	präop.	2.Woche	4.Woche	8.Woche	12.Woche
Kontrollen	8 ± 1 (n = 69)	18 ± 7 (n = 8)	49 ± 1 (n = 8)	53 ± 15 (n = 10)	20 ± 4 (n = 11)
SNX		20 ± 3 (n = 16)	33 ± 5 (n = 17)	78 ± 19 (n = 15)	77 ± 14 (n = 19)
SNX/ET _A		26 ± 4 (n = 12)	12 ± 3 (n = 10)	39 ± 12 (n = 11)	52 ± 12 (n = 10)
SNX/ET _{AB}		29 ± 3 (n = 18)	19 ± 3 (n = 11)	85 ± 11 (n = 12)	36 ± 8 (n = 12)
SNX/L		11 ± 2 (n = 11)	23 ± 6 (n = 11)	10 ± 2 (n = 12)	26 ± 7 (n = 11)
SNX(L/ET _A)		10 ± 1 (n = 12)	7 ± 1 (n = 12)	60 ± 15 (n = 12)	48 ± 9 (n = 23)
SNX/N			53 ± 12 (n = 14)	47 ± 13 (n = 14)	76 ± 11 (n = 22)
SNX/N ₁₀		4 ± 1 (n = 12)	39 ± 10 (n = 12)	28 ± 8 (n = 11)	62 ± 10 (n = 21)
SNX/N ₃₀		24 ± 14 (n = 13)	8 ± 2 (n = 13)	40 ± 20 (n = 13)	26 ± 6 (n = 13)

**Tabelle 6.11.4 : Phosphat-Ausscheidung im 24-Stunden-Urin
[mmol/24h]; Verlaufsbeobachtung; MW ± SEM;**

6.11.5 Kreatinin

Gruppen	präop.	2.Woche	4.Woche	8.Woche	12.Woche
Kontrollen	0,06 ± 0,01 (n = 19)	0,23 ± 0,04 (n = 8)	0,25 ± 0,02 (n = 8)	0,25 ± 0,03 (n = 9)	0,19 ± 0,01 (n = 7)
SNX		0,22 ± 0,01 (n = 17)	0,38 ± 0,02 (n = 16)	0,57 ± 0,06 (n = 16)	0,52 ± 0,05 (n = 18)
SNX/ET _A		0,17 ± 0,01 (n = 13)	0,22 ± 0,03 (n = 10)	0,27 ± 0,03 (n = 11)	0,42 ± 0,04 (n = 10)
SNX/ET _{AB}		0,18 ± 0,02 (n = 12)	0,28 ± 0,02 (n = 11)	0,41 ± 0,03 (n = 11)	0,29 ± 0,03 (n = 10)
SNX/L		0,30 ± 0,06 (n = 12)	0,41 ± 0,03 (n = 11)	0,58 ± 0,07 (n = 11)	0,58 ± 0,06 (n = 10)
SNX(L/ET _A)		0,37 ± 0,04 (n = 12)	0,51 ± 0,06 (n = 12)	0,62 ± 0,08 (n = 11)	0,33 ± 0,06 (n = 12)
SNX/N			0,30 ± 0,03 (n = 14)	0,36 ± 0,02 (n = 14)	0,37 ± 0,03 (n = 21)
SNX/N ₁₀		0,26 ± 0,03 (n = 10)	0,48 ± 0,06 (n = 10)	0,72 ± 0,28 (n = 10)	0,46 ± 0,07 (n = 9)
SNX/N ₃₀		0,28 ± 0,06 (n = 8)	0,35 ± 0,05 (n = 9)	0,32 ± 0,04 (n = 9)	0,26 ± 0,04 (n = 12)

**Tabelle 6.11.5 : Kreatinin-Clearance [ml/min];
Verlaufsbeobachtung; MW ± SEM;**

6.11.6 Harnstoff

Gruppen	präop.	2.Woche	4.Woche	8.Woche	12.Woche
Kontrollen	477 ± 19 (n = 69)	840 ± 95 (n = 8)	858 ± 29 (n = 8)	919 ± 66 (n = 9)	712 ± 83 (n = 11)
SNX		585 ± 37 (n = 17)	853 ± 43 (n = 17)	1112 ± 82 (n = 19)	843 ± 41 (n = 19)
SNX/ET _A		732 ± 70 (n = 13)	763 ± 58 (n = 11)	641 ± 49 (n = 11)	968 ± 46 (n = 10)
SNX/ET _{AB}		719 ± 51 (n = 20)	881 ± 31 (n = 11)	871 ± 26 (n = 11)	655 ± 35 (n = 11)
SNX/L		646 ± 22 (n = 13)	776 ± 33 (n = 11)	854 ± 54 (n = 12)	830 ± 41 (n = 10)
SNX(L/ET _A)		811 ± 46 (n = 12)	800 ± 76 (n = 12)	767 ± 54 (n = 12)	718 ± 58 (n = 23)
SNX/N			787 ± 30 (n = 14)	851 ± 34 (n = 14)	821 ± 28 (n = 22)
SNX/N ₁₀		537 ± 27 (n = 12)	819 ± 43 (n = 12)	516 ± 38 (n = 11)	789 ± 61 (n = 21)
SNX/N ₃₀		690 ± 42 (n = 13)	691 ± 23 (n = 13)	553 ± 47 (n = 13)	623 ± 47 (n = 13)

**Tabelle 6.11.6 : Phosphat-Ausscheidung im 24-Stunden-Urin
[mmol/24h];
Verlaufsbeobachtung; MW ± SEM;**

6.12 Blutparameter

6.12.1 Hämoglobin

Gruppen	präop.	2.Woche	4.Woche	8.Woche	12.Woche
Kontrollen	14,2 ± 0,1 (n = 49)	15,6 ± 0,2 (n = 7)	16,5 ± 0,2 (n = 7)	16,4 ± 0,2 (n = 9)	14,3 ± 0,5 (n = 9)
SNX		13,8 ± 0,2 (n = 19)	14,4 ± 0,3 (n = 20)	14,2 ± 0,2 (n = 17)	13,8 ± 0,2 (n = 14)
SNX/ET _A		13,9 ± 0,3 (n = 13)	14,8 ± 0,3 (n = 8)	14,5 ± 0,3 (n = 10)	13,3 ± 0,4 (n = 11)
SNX/ET _{AB}		13,8 ± 0,4 (n = 12)	14,4 ± 0,5 (n = 6)	14,8 ± 0,4 (n = 11)	13,1 ± 0,3 (n = 11)
SNX/L		12,8 ± 0,3 (n = 11)	14,1 ± 0,3 (n = 10)	14,1 ± 0,3 (n = 8)	12,5 ± 0,6 (n = 11)
SNX(L/ET _A)		13,8 ± 0,2 (n = 12)	14,3 ± 0,3 (n = 9)	14,4 ± 0,5 (n = 4)	13,4 ± 0,4 (n = 21)
SNX/N			15,9 ± 0,7 (n = 3)	15,2 ± 0,2 (n = 9)	15,0 ± 0,23 (n = 19)
SNX/N ₁₀		14,9 ± 0,5 (n = 8)	15,2 ± 0,2 (n = 10)		14,2 ± 0,3 (n = 19)
SNX/N ₃₀		15,7 ± 0,2 (n = 8)	15,8 ± 0,3 (n = 8)		13,8 ± 0,5 (n = 11)

Tabelle 6.12.1 : Hämoglobin im EDTA-Blut [mmol/l];

Verlaufsbeobachtung; MW ± SEM;

6.12.2 Erythrozyten

Gruppen	präop.	2.Woche	4.Woche	8.Woche	12.Woche
Kontrollen	6,7 ± 0,06 (n = 49)	7,9 ± 0,1 (n = 7)	8,2 ± 0,2 (n = 7)	8,6 ± 0,2 (n = 9)	7,4 ± 0,2 (n = 9)
SNX		6,9 ± 0,1 (n = 19)	7,2 ± 0,2 (n = 20)	7,2 ± 0,1 (n = 18)	7,2 ± 0,2 (n = 15)
SNX/ET _A		6,8 ± 0,1 (n = 13)	7,1 ± 0,2 (n = 8)	7,4 ± 0,2 (n = 10)	6,7 ± 0,2 (n = 11)
SNX/ET _{AB}		6,8 ± 0,2 (n = 12)	7,0 ± 0,2 (n = 6)	7,7 ± 0,2 (n = 11)	6,7 ± 0,2 (n = 11)
SNX/L		6,7 ± 0,2 (n = 11)	7,0 ± 0,2 (n = 10)	7,2 ± 0,2 (n = 9)	6,7 ± 0,2 (n = 11)
SNX(L/ET _A)		6,8 ± 0,1 (n = 12)	7,0 ± 0,2 (n = 9)	7,4 ± 0,3 (n = 4)	7,2 ± 0,2 (n = 21)
SNX/N			7,9 ± 0,3 (n = 3)	8,0 ± 0,1 (n = 9)	7,9 ± 0,2 (n = 19)
SNX/N ₁₀		7,4 ± 0,3 (n = 8)	7,7 ± 0,1 (n = 10)		7,4 ± 0,2 (n = 19)
SNX/N ₃₀		7,7 ± 0,1 (n = 8)	8,0 ± 0,1 (n = 8)		7,3 ± 0,3 (n = 11)

Tabelle 6.12.2 : Erythrozytenzahl im EDTA-Blut [$\times 10^{12}$];
Verlaufsbeobachtung; MW ± SEM;

6.12.3 Hämatokrit

Gruppen	präop.	2.Woche	4.Woche	8.Woche	12.Woche	
Kontrollen	48 ± 0,5 (n = 49)	45 ± 2 (n = 7)	48 ± 1 (n = 7)	49 ± 1 (n = 9)	41 ± 1 (n = 9)	
SNX		40 ± 1 (n = 19)	42 ± 1 (n = 20)	42 ± 1 (n = 19)	40 ± 1 (n = 15)	
SNX/ET _A		41 ± 1 (n = 13)	42 ± 1 (n = 8)	43 ± 1 (n = 10)	37 ± 1 (n = 11)	
SNX/ET _{AB}		41 ± 1 (n = 12)	41 ± 1 (n = 6)	43 ± 1 (n = 11)	38 ± 11 (n = 11)	
SNX/L		43 ± 1 (n = 11)	43 ± 1 (n = 10)	40 ± 1 (n = 9)	36 ± 1 (n = 11)	
SNX(L/ET _A)		40 ± 0,5 (n = 12)	46 ± 1 (n = 9)	40 ± 2 (n = 4)	39 ± 1 (n = 21)	
SNX/N			44 ± 2 (n = 3)	42 ± 1 (n = 9)	43 ± 1 (n = 19)	
SNX/N ₁₀			45 ± 1 (n = 8)	46 ± 0,5 (n = 10)		41 ± 1 (n = 19)
SNX/N ₃₀			44 ± 2 (n = 8)	48 ± 1 (n = 8)		42 ± 2 (n = 11)

Tabelle 6.12.3 : Hämatokrit [%];

Verlaufsbeobachtung; MW ± SEM;

6.12.4 Leukozyten

Gruppen	präop.	2.Woche	4.Woche	8.Woche	12.Woche
Kontrollen	10,1 ± 0,3 (n = 48)	14,5 ± 2,2 (n = 7)	12,2 ± 2,1 (n = 7)	9,8 ± 1,0 (n = 9)	8,6 ± 1,1 (n = 9)
SNX		19,6 ± 1,9 (n = 19)	17,9 ± 1,1 (n = 21)	17,3 ± 1,1 (n = 19)	14,7 ± 1,2 (n = 15)
SNX/ET _A		12,2 ± 2,1 (n = 13)	14,4 ± 2,3 (n = 8)	15,1 ± 2,0 (n = 10)	10,6 ± 0,8 (n = 12)
SNX/ET _{AB}		15,1 ± 1,8 (n = 12)	16,9 ± 2,4 (n = 6)	12,1 ± 1,4 (n = 11)	7,8 ± 1,1 (n = 11)
SNX/L		10,9 ± 1,0 (n = 12)	14,7 ± 1,1 (n = 11)	19,1 ± 1,1 (n = 9)	17,4 ± 1,5 (n = 11)
SNX(L/ET _A)		15,8 ± 1,7 (n = 12)	9,2 ± 0,7 (n = 9)	11,7 ± 1,2 (n = 4)	13,0 ± 1,6 (n = 21)
SNX/N			17,1 ± 1,5 (n = 3)	17,4 ± 0,6 (n = 9)	14,5 ± 1,5 (n = 19)
SNX/N ₁₀		18,7 ± 1,4 (n = 8)	17,1 ± 1,0 (n = 10)		13,6 ± 1,6 (n = 19)
SNX/N ₃₀		13,6 ± 1,5 (n = 8)	11,7 ± 2,0 (n = 8)		6,8 ± 1,2 (n = 11)

Tabelle 6.12.4 : Leukozytenzahl im EDTA-Blut [G/l];
Verlaufsbeobachtung; MW ± SEM;

6.12.5 Thrombozyten

Gruppen	präop.	2.Woche	4.Woche	8.Woche	12.Woche
Kontrollen	576 ± 21 (n = 48)	605 ± 36 (n = 7)	504 ± 25 (n = 7)	535 ± 60 (n = 9)	634 ± 72 (n = 9)
SNX		635 ± 51 (n = 19)	547 ± 33 (n = 20)	591 ± 43 (n = 19)	721 ± 48 (n = 15)
SNX/ET _A		607 ± 65 (n = 13)	550 ± 25 (n = 8)	615 ± 50 (n = 10)	825 ± 52 (n = 10)
SNX/ET _{AB}		580 ± 52 (n = 12)	626 ± 49 (n = 5)	657 ± 47 (n = 11)	807 ± 23 (n = 11)
SNX/L		567 ± 26 (n = 11)	645 ± 38 (n = 10)	802 ± 36 (n = 9)	670 ± 60 (n = 10)
SNX(L/ET _A)		839 ± 73 (n = 12)	560 ± 40 (n = 9)	457 ± 112 (n = 4)	775 ± 42 (n = 21)
SNX/N			609 ± 135 (n = 3)	709 ± 42 (n = 9)	801 ± 40 (n = 19)
SNX/N ₁₀		683 ± 29 (n = 8)	684 ± 38 (n = 10)		878 ± 30 (n = 19)
SNX/N ₃₀		697 ± 21 (n = 8)	612 ± 28 (n = 8)		776 ± 60 (n = 11)

**Tabelle 6.12.5 : Thrombozytenzahl im EDTA-Blut [G/l];
Verlaufsbeobachtung; MW ± SEM;**

6.12.6 Natrium (Blut)

Gruppen	präop.	2.Woche	4.Woche	8.Woche	12.Woche
Kontrollen	141 ± 1 (n = 46)	144 ± 1 (n = 7)	143 ± 0,5 (n = 11)	145 ± 1 (n = 10)	138 ± 2 (n = 11)
SNX		142 ± 0,5 (n = 17)	143 ± 0,5 (n = 21)	144 ± 0,5 (n = 21)	144 ± 0,3 (n = 20)
SNX/ET _A		145 ± 1 (n = 12)	143 ± 0,5 (n = 13)	144 ± 1 (n = 12)	142 ± 1 (n = 12)
SNX/ET _{AB}		144 ± 2 (n = 12)	143 ± 0,5 (n = 12)	145 ± 1 (n = 12)	142 ± 1 (n = 12)
SNX/L		141 ± 1 (n = 7)	143 ± 1 (n = 13)	142 ± 1 (n = 8)	145 ± 1 (n = 8)
SNX(L/ET _A)		138 ± 1 (n = 12)	143 ± 4 (n = 12)	134 ± 2 (n = 10)	138 ± 2 (n = 23)
SNX/N			134 ± 4 (n = 14)	137 ± 0,5 (n = 14)	139 ± 0,5 (n = 23)
SNX/N ₁₀		139 ± 0,5 (n = 10)	135 ± 0,5 (n = 10)	140 ± 2 (n = 10)	140 ± 1 (n = 21)
SNX/N ₃₀		138 ± 2 (n = 8)	140 ± 1 (n = 9)	142 ± 2 (n = 9)	145 ± 2 (n = 12)

Tabelle 6.12.6 : Natrium-Konzentration im Serum [mmol/l];
Verlaufsbeobachtung; MW ± SEM;

6.12.7 Kalium (Blut)

Gruppen	präop.	2.Woche	4.Woche	8.Woche	12.Woche
Kontrollen	6,4 ± 0,3 (n = 28)	7,0 ± 0,2 (n = 4)	7,2 ± 0,2 (n = 10)	7,5 ± 0,4 (n = 4)	8,4 ± 0,3 (n = 11)
SNX		6,8 ± 0,3 (n = 19)	7,8 ± 0,3 (n = 21)	7,6 ± 0,3 (n = 21)	7,2 ± 0,2 (n = 20)
SNX/ET _A		8,4 ± 0,8 (n = 4)	7,7 ± 0,3 (n = 13)	9,3 ± 0,3 (n = 5)	6,2 ± 0,2 (n = 11)
SNX/ET _{AB}		7,7 ± 0,3 (n = 12)	8,0 ± 0,2 (n = 12)	8,8 ± 0,2 (n = 5)	7,4 ± 0,3 (n = 12)
SNX/L		7,0 ± 0,3 (n = 10)	7,2 ± 0,2 (n = 13)	7,9 ± 0,3 (n = 9)	8,1 ± 0,3 (n = 9)
SNX(L/ET _A)		8,8 ± 0,3 (n = 12)	8,0 ± 0,3 (n = 12)	8,3 ± 0,6 (n = 12)	8,4 ± 0,3 (n = 23)
SNX/N			9,7 ± 0,4 (n = 14)	9,3 ± 0,2 (n = 14)	8,5 ± 0,3 (n = 23)
SNX/N ₁₀		8,8 ± 0,2 (n = 10)	9,7 ± 0,3 (n = 10)	11,2 ± 0,6 (n = 10)	9,4 ± 0,3 (n = 21)
SNX/N ₃₀		9,9 ± 0,7 (n = 8)	9,0 ± 0,4 (n = 9)	9,8 ± 0,4 (n = 9)	10,0 ± 0,8 (n = 12)

Tabelle 6.12.7 : Kalium-Konzentration im Serum [mmol/l];

Verlaufsbeobachtung; MW ± SEM;

6.12.8 Kalzium (Blut)

Gruppen	präop.	2.Woche	4.Woche	8.Woche	12.Woche
Kontrollen	2,4 ± 0,04 (n = 42)	2,5 ± 0,05 (n = 8)	2,3 ± 0,14 (n = 11)	2,2 ± 0,04 (n = 10)	2,4 ± 0,06 (n = 10)
SNX		2,6 ± 0,05 (n = 18)	2,3 ± 0,15 (n = 21)	2,4 ± 0,05 (n = 21)	2,6 ± 0,03 (n = 18)
SNX/ET _A		2,6 ± 0,07 (n = 13)	2,6 ± 0,03 (n = 13)	2,3 ± 0,07 (n = 12)	2,5 ± 0,05 (n = 12)
SNX/ET _{AB}		2,7 ± 0,05 (n = 11)	2,5 ± 0,08 (n = 12)	2,4 ± 0,04 (n = 12)	2,6 ± 0,05 (n = 12)
SNX/L		2,7 ± 0,05 (n = 10)	2,6 ± 0,06 (n = 13)	2,7 ± 0,06 (n = 9)	2,4 ± 0,1 (n = 6)
SNX(L/ET _A)		2,5 ± 0,05 (n = 12)	2,5 ± 0,08 (n = 12)	2,2 ± 0,2 (n = 11)	2,3 ± 0,08 (n = 23)
SNX/N			2,2 ± 0,09 (n = 14)	2,1 ± 0,04 (n = 14)	2,4 ± 0,1 (n = 23)
SNX/N ₁₀		2,8 ± 0,02 (n = 10)	2,7 ± 0,04 (n = 10)	2,7 ± 0,2 (n = 10)	2,4 ± 0,08 (n = 20)
SNX/N ₃₀		2,4 ± 0,17 (n = 8)	2,5 ± 0,04 (n = 9)	2,5 ± 0,18 (n = 9)	2,1 ± 0,23 (n = 12)

Tabelle 6.12.8 : Kalzium-Konzentration im Serum [mmol/l];
Verlaufsbeobachtung; MW ± SEM;

6.12.9 Phosphat (Blut)

Gruppen	präop.	2.Woche	4.Woche	8.Woche	12.Woche
Kontrollen	5,4 ± 0,24 (n = 42)	4,8 ± 0,16 (n = 8)	4,9 ± 0,17 (n = 8)	5,1 ± 0,15 (n = 10)	4,6 ± 0,14 (n = 10)
SNX		3,9 ± 0,15 (n = 18)	4,1 ± 0,26 (n = 20)	4,8 ± 0,16 (n = 21)	4,2 ± 0,14 (n = 20)
SNX/ET _A		4,4 ± 0,18 (n = 13)	4,3 ± 0,15 (n = 13)	4,8 ± 0,17 (n = 10)	4,1 ± 0,17 (n = 12)
SNX/ET _{AB}		4,6 ± 0,14 (n = 11)	4,6 ± 0,27 (n = 11)	4,7 ± 0,13 (n = 12)	4,5 ± 0,18 (n = 12)
SNX/L		3,5 ± 0,21 (n = 10)	4,7 ± 0,16 (n = 13)	4,8 ± 0,34 (n = 7)	3,9 ± 0,20 (n = 7)
SNX(L/ET _A)		7,6 ± 0,57 (n = 11)	9,3 ± 0,85 (n = 12)	6,1 ± 0,43 (n = 12)	7,8 ± 0,42 (n = 23)
SNX/N			9,2 ± 0,19 (n = 14)	7,7 ± 0,12 (n = 14)	8,1 ± 0,32 (n = 23)
SNX/N ₁₀		8,8 ± 0,59 (n = 10)	9,5 ± 0,35 (n = 10)	6,4 ± 1,00 (n = 9)	7,9 ± 0,15 (n = 21)
SNX/N ₃₀		8,1 ± 0,53 (n = 8)	9,3 ± 0,3 (n = 9)	7,1 ± 0,44 (n = 8)	10,0 ± 1,04 (n = 12)

Tabelle 6.12.9 : Phosphat-Konzentration im Serum [mmol/l];
Verlaufsbeobachtung; MW ± SEM;

6.12.10 Kreatinin (Blut)

Gruppen	präop.	2.Woche	4.Woche	8.Woche	12.Woche
Kontrollen	48 ± 2 (n = 50)	54 ± 2 (n = 8)	58 ± 2 (n = 11)	66 ± 3 (n = 10)	63 ± 2 (n = 11)
SNX		110 ± 6 (n = 19)	89 ± 5 (n = 21)	87 ± 5 (n = 20)	107 ± 5 (n = 20)
SNX/ET _A		95 ± 4 (n = 13)	97 ± 3 (n = 12)	97 ± 4 (n = 12)	102 ± 9 (n = 12)
SNX/ET _{AB}		96 ± 1 (n = 12)	98 ± 2 (n = 12)	100 ± 2 (n = 12)	108 ± 10 (n = 12)
SNX/L		92 ± 8 (n = 12)	85 ± 7 (n = 13)	81 ± 11 (n = 9)	83 ± 6 (n = 11)
SNX(L/ET _A)		82 ± 2 (n = 12)	60 ± 3 (n = 12)	58 ± 5 (n = 12)	93 ± 3 (n = 23)
SNX/N			96 ± 4 (n = 14)	96 ± 2 (n = 14)	90 ± 3 (n = 22)
SNX/N ₁₀		78 ± 4 (n = 10)	68 ± 3 (n = 10)	71 ± 14 (n = 10)	97 ± 5 (n = 21)
SNX/N ₃₀		74 ± 6 (n = 8)	63 ± 4 (n = 9)	68 ± 6 (n = 9)	114 ± 15 (n = 12)

Tabelle 6.12.10 : Kreatinin-Konzentration im Serum [µmol/l];
Verlaufsbeobachtung; MW ± SEM;

6.12.11 Harnstoff (Blut)

Gruppen	präop.	2.Woche	4.Woche	8.Woche	12.Woche
Kontrollen	38 ± 2 (n = 43)	35 ± 3 (n = 8)	37 ± 2 (n = 11)	38 ± 3 (n = 10)	40 ± 2 (n = 10)
SNX		111 ± 4 (n = 19)	97 ± 4 (n = 20)	94 ± 6 (n = 21)	97 ± 5 (n = 20)
SNX/ET _A		83 ± 8 (n = 13)	93 ± 5 (n = 10)	77 ± 4 (n = 11)	98 ± 8 (n = 12)
SNX/ET _{AB}		94 ± 4 (n = 11)	102 ± 6 (n = 12)	81 ± 5 (n = 12)	100 ± 8 (n = 12)
SNX/L		107 ± 5 (n = 12)	113 ± 6 (n = 11)	110 ± 17 (n = 8)	95 ± 5 (n = 8)
SNX(L/ET _A)		90 ± 3 (n = 12)	80 ± 2 (n = 11)	80 ± 6 (n = 12)	77 ± 2 (n = 23)
SNX/N			86 ± 2 (n = 14)	85 ± 2 (n = 14)	82 ± 3 (n = 22)
SNX/N ₁₀		107 ± 4 (n = 10)	93 ± 4 (n = 10)	102 ± 8 (n = 10)	92 ± 5 (n = 21)
SNX/N ₃₀		96 ± 9 (n = 8)	93 ± 5 (n = 9)	99 ± 6 (n = 9)	109 ± 15 (n = 12)

Tabelle 6.12.11 : Harnstoff-Konzentration im Serum [mmol/l];
Verlaufsbeobachtung; MW ± SEM;

6.13 Feuchtgewichte der Organe

Gruppen	Körpergew.	Herz gesamt	Ventrikel li.	Ventrikel re.	Vorhöfe
Kon- trolle	422 ± 7 (n = 11)	1,14 ± 0,03 (n = 11)	0,76 ± 0,02 (n = 11)	0,18 ± 0,01 (n = 11)	0,13 ± 0,02 (n = 11)
SNX	427 ± 7 (n = 19)	1,66 ± 0,06 (n = 30)	1,22 ± 0,04 (n = 31)	0,24 ± 0,01 (n = 31)	0,16 ± 0,01 (n = 31)
SNX/ ET_A	425 ± 11 (n = 10)	1,30 ± 0,04 (n = 11)	0,97 ± 0,03 (n = 10)	0,21 ± 0,01 (n = 10)	0,11 ± 0,01 (n = 12)
SNX/ ET_{AB}	414 ± 9 (n = 12)	1,42 ± 0,08 (n = 12)	1,06 ± 0,07 (n = 12)	0,20 ± 0,01 (n = 10)	0,12 ± 0,01 (n = 12)
SNX/L	405 ± 14 (n = 11)	1,31 ± 0,05 (n = 10)	0,93 ± 0,04 (n = 10)	0,23 ± 0,01 (n = 10)	0,12 ± 0,01 (n = 11)
SNX (L/ET_A)	480 ± 14 (n = 12)	1,53 ± 0,07 (n = 12)	1,07 ± 0,05 (n = 12)	0,26 ± 0,01 (n = 12)	0,19 ± 0,01 (n = 12)
SNX/N	440 ± 12 (n = 11)	1,22 ± 0,03 (n = 11)	0,85 ± 0,02 (n = 11)	0,22 ± 0,01 (n = 11)	0,15 ± 0,01 (n = 11)
SNX/N₁₀	453 ± 13 (n = 9)	1,71 ± 0,12 (n = 9)	1,18 ± 0,07 (n = 9)	0,31 ± 0,03 (n = 9)	0,19 ± 0,02 (n = 9)
SNX/N₃₀	375 ± 19 (n = 13)	1,47 ± 0,08 (n = 13)	1,03 ± 0,06 (n = 13)	0,26 ± 0,01 (n = 13)	0,17 ± 0,01 (n = 13)

**Tabelle 6.13.1 : Feuchtgewicht der Organe zum Zeitpunkt der
Explantation am Versuchsende [g]; MW ± SEM;**

Gruppen	Niere li.	Niere re.	Lunge	Gehirn
Kontrollen	1,4 ± 0,04 (n = 11)	1,37 ± 0,10 (n = 4)	1,43 ± 0,04 (n = 11)	2,09 ± 0,03 (n = 11)
SNX	1,85 ± 0,06 (n = 31)		1,68 ± 0,06 (n = 30)	2,01 ± 0,02 (n = 30)
SNX/ET_A	1,72 ± 0,07 (n = 11)		1,62 ± 0,06 (n = 12)	2,05 ± 0,02 (n = 9)
SNX/ET_{AB}	1,76 ± 0,06 (n = 11)		1,44 ± 0,03 (n = 10)	2,07 ± 0,03 (n = 12)
SNX/L	1,36 ± 0,06 (n = 10)		1,51 ± 0,04 (n = 11)	1,88 ± 0,02 (n = 10)
SNX(L/ET_A)	2,14 ± 0,11 (n = 12)		1,64 ± 0,06 (n = 12)	2,09 ± 0,03 (n = 12)
SNX/N	1,52 ± 0,04 (n = 11)		1,49 ± 0,06 (n = 11)	1,99 ± 0,03 (n = 11)
SNX/N₁₀	2,17 ± 0,20 (n = 8)		1,64 ± 0,06 (n = 9)	2,02 ± 0,05 (n = 9)
SNX/N₃₀	1,86 ± 0,14 (n = 12)		1,48 ± 0,07 (n = 13)	1,96 ± 0,03 (n = 13)

**Tabelle 6.13.2 : Feuchtwicht der Organe zum Zeitpunkt der
Explantation am Versuchsende [g]; MW ± SEM;**

6.14 Steigungsformeln der Standardreihen

I. PKC α _a

$$\text{PKC}\alpha_{a1} \text{ in } \mu\text{g} = 7,008 + 1,200 \times \text{PKC}\alpha_{a1} [\text{OD}/\text{mm}^2]$$

$$\text{PKC}\alpha_{a2} \text{ in } \mu\text{g} = 0,538 + 1,575 \times \text{PKC}\alpha_{a2} [\text{OD}/\text{mm}^2]$$

$$\text{PKC}\alpha_{a3} \text{ in } \mu\text{g} = 9,736 + 1,422 \times \text{PKC}\alpha_{a3} [\text{OD}/\text{mm}^2]$$

$$\text{PKC}\alpha_{a4} \text{ in } \mu\text{g} = 4,031 + 1,333 \times \text{PKC}\alpha_{a4} [\text{OD}/\text{mm}^2]$$

$$\text{PKC}\alpha_{a5} \text{ in } \mu\text{g} = 3,193 + 2,087 \times \text{PKC}\alpha_{a5} [\text{OD}/\text{mm}^2]$$

$$\text{PKC}\alpha_{a6} \text{ in } \mu\text{g} = -1,877 + 1,467 \times \text{PKC}\alpha_{a6} [\text{OD}/\text{mm}^2]$$

$$\text{PKC}\alpha_{a7} \text{ in } \mu\text{g} = 4,041 + 1,581 \times \text{PKC}\alpha_{a7} [\text{OD}/\text{mm}^2]$$

II. PKC α _b

$$\text{PKC}\alpha_{b1} \text{ in } \mu\text{g} = -3,123 + 2,517 \times \text{PKC}\alpha_{b1} [\text{OD}/\text{mm}^2]$$

$$\text{PKC}\alpha_{b2} \text{ in } \mu\text{g} = -0,135 + 1,745 \times \text{PKC}\alpha_{b2} [\text{OD}/\text{mm}^2]$$

$$\text{PKC}\alpha_{b3} \text{ in } \mu\text{g} = 4,23 + 1,091 \times \text{PKC}\alpha_{b3} [\text{OD}/\text{mm}^2]$$

$$\text{PKC}\alpha_{b4} \text{ in } \mu\text{g} = 2,633 + 0,993 \times \text{PKC}\alpha_{b4} [\text{OD}/\text{mm}^2]$$

$$\text{PKC}\alpha_{b5} \text{ in } \mu\text{g} = -4,839 + 2,065 \times \text{PKC}\alpha_{b5} [\text{OD}/\text{mm}^2]$$

$$\text{PKC}\alpha_{b6} \text{ in } \mu\text{g} = -0,653 + 4,635 \times \text{PKC}\alpha_{b6} [\text{OD}/\text{mm}^2]$$

$$\text{PKC}\alpha_{b7} \text{ in } \mu\text{g} = 1,757 + 1,344 \times \text{PKC}\alpha_{b7} [\text{OD}/\text{mm}^2]$$

III. PKC δ _a

$$\text{PKC}\delta_{a1} \text{ in } \mu\text{g} = 10,855 + 2,345 \times \text{PKC}\delta_{a1} [\text{OD}/\text{mm}^2]$$

$$\text{PKC}\delta_{a2} \text{ in } \mu\text{g} = -1,097 + 3,810 \times \text{PKC}\delta_{a2} [\text{OD}/\text{mm}^2]$$

$$\text{PKC}\delta_{a3} \text{ in } \mu\text{g} = 1,440 + 3,007 \times \text{PKC}\delta_{a3} [\text{OD}/\text{mm}^2]$$

$$\text{PKC}\delta_{a4} \text{ in } \mu\text{g} = -4,716 + 2,628 \times \text{PKC}\delta_{a4} [\text{OD}/\text{mm}^2]$$

$$\text{PKC}\delta_{a5} \text{ in } \mu\text{g} = 3,061 + 2,400 \times \text{PKC}\delta_{a5} [\text{OD}/\text{mm}^2]$$

$$\text{PKC}\delta_{a6} \text{ in } \mu\text{g} = -2,301 + 2,851 \times \text{PKC}\delta_{a6} [\text{OD}/\text{mm}^2]$$

$$\text{PKC}\delta_{a7} \text{ in } \mu\text{g} = -0,299 + 3,398 \times \text{PKC}\delta_{a7} [\text{OD}/\text{mm}^2]$$

IV. PKC δ _b

$$\text{PKC}\delta_b1 \text{ in } \mu\text{g} = 7,263 + 1,883 \times \text{PKC}\delta_b1 \text{ [OD/mm}^2\text{]}$$

$$\text{PKC}\delta_b2 \text{ in } \mu\text{g} = 0,288 + 3,387 \times \text{PKC}\delta_b2 \text{ [OD/mm}^2\text{]}$$

$$\text{PKC}\delta_b3 \text{ in } \mu\text{g} = -0,261 + 4,301 \times \text{PKC}\delta_b3 \text{ [OD/mm}^2\text{]}$$

$$\text{PKC}\delta_b4 \text{ in } \mu\text{g} = -12,369 + 2,302 \times \text{PKC}\delta_b4 \text{ [OD/mm}^2\text{]}$$

$$\text{PKC}\delta_b5 \text{ in } \mu\text{g} = -0,139 + 1,754 \times \text{PKC}\delta_b5 \text{ [OD/mm}^2\text{]}$$

$$\text{PKC}\delta_b6 \text{ in } \mu\text{g} = 4,195 + 2,039 \times \text{PKC}\delta_b6 \text{ [OD/mm}^2\text{]}$$

$$\text{PKC}\delta_b7 \text{ in } \mu\text{g} = -0,320 + 3,296 \times \text{PKC}\delta_b7 \text{ [OD/mm}^2\text{]}$$

V. PKC ϵ _a

$$\text{PKC}\epsilon_a1 \text{ in } \mu\text{g} = 7,330 + 2,888 \times \text{PKC}\epsilon_a1 \text{ [OD/mm}^2\text{]}$$

$$\text{PKC}\epsilon_a2 \text{ in } \mu\text{g} = 1,642 + 6,007 \times \text{PKC}\epsilon_a2 \text{ [OD/mm}^2\text{]}$$

$$\text{PKC}\epsilon_a3 \text{ in } \mu\text{g} = 5,584 + 3,065 \times \text{PKC}\epsilon_a3 \text{ [OD/mm}^2\text{]}$$

$$\text{PKC}\epsilon_a4 \text{ in } \mu\text{g} = 1,142 + 2,123 \times \text{PKC}\epsilon_a4 \text{ [OD/mm}^2\text{]}$$

$$\text{PKC}\epsilon_a5 \text{ in } \mu\text{g} = 8,045 + 4,739 \times \text{PKC}\epsilon_a5 \text{ [OD/mm}^2\text{]}$$

$$\text{PKC}\epsilon_a6 \text{ in } \mu\text{g} = 2,061 + 2,339 \times \text{PKC}\epsilon_a6 \text{ [OD/mm}^2\text{]}$$

$$\text{PKC}\epsilon_a7 \text{ in } \mu\text{g} = -0,433 + 1,350 \times \text{PKC}\epsilon_a7 \text{ [OD/mm}^2\text{]}$$

VI. PKC ϵ _b

$$\text{PKC}\epsilon_b1 \text{ in } \mu\text{g} = 2,967 + 4,372 \times \text{PKC}\epsilon_b1 \text{ [OD/mm}^2\text{]}$$

$$\text{PKC}\epsilon_b2 \text{ in } \mu\text{g} = -1,564 + 7,897 \times \text{PKC}\epsilon_b2 \text{ [OD/mm}^2\text{]}$$

$$\text{PKC}\epsilon_b3 \text{ in } \mu\text{g} = 2,857 + 3,640 \times \text{PKC}\epsilon_b3 \text{ [OD/mm}^2\text{]}$$

$$\text{PKC}\epsilon_b4 \text{ in } \mu\text{g} = -1,982 + 3,781 \times \text{PKC}\epsilon_b4 \text{ [OD/mm}^2\text{]}$$

$$\text{PKC}\epsilon_b5 \text{ in } \mu\text{g} = -2,521 + 5,011 \times \text{PKC}\epsilon_b5 \text{ [OD/mm}^2\text{]}$$

$$\text{PKC}\epsilon_b6 \text{ in } \mu\text{g} = 2,722 + 2,356 \times \text{PKC}\epsilon_b6 \text{ [OD/mm}^2\text{]}$$

$$\text{PKC}\epsilon_b7 \text{ in } \mu\text{g} = -2,529 + 1,584 \times \text{PKC}\epsilon_b7 \text{ [OD/mm}^2\text{]}$$

7. Anhang

7.1 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ACE	Angiotensin Konversions-Enzym
Ang (I bzw. II)	Angiotensin (I bzw. II)
AT ₁ bzw. AT ₂	selektiver Angiotensin-1- oder Angiotensin-2-Rezeptor
cAMP	zyklisches Adenosin-Mono-Phosphat
cGMP	zyklisches Guanosin-Mono-Phosphat
C-Kinase/PKC	Proteinkinase C
DAG	Diazylglyzerol
ECE	Endothelin-Konversions-Enzym
ET (-1, -2 od. -3)	Endothelin (-1, 2 od. 3)
ET _A	Endothelin-Rezeptor Typ A
ET _{AB}	Endothelin-Rezeptor Typ A und B
ET _B	Endothelin-Rezeptor Typ B
GDP/GTP	Guanosin-Di/Tri-Phosphat
IP ₃	Inositol-Tri-Phosphat
irET-1	immuno-reaktives Endothelin-1
LV/K	Quotient aus Gewicht des linken Ventrikels und dem Körpergewicht
LVH	linksventrikuläre Hypertrophie
MAP-Kinase	mitogen-aktivierte Proteinkinase
MLC	Myosin-Leichte-Ketten (engl.: myosin light chain)
NO	Stickstoffmonoxid (= Stickoxid)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (engl.: polymerase chain r.)
PIP ₂	Phosphoinositol-Bis-Phosphat
PLC	Phospholipase C
RAS/RA-System	Renin-Angiotensin-System
sham, engl.	Schein

7.2 Literaturverzeichnis

- 1 Abassi Z.A., Klein H., Golomb E., Keiser H.R., (1993)
Regulation of the urinary excretion of endothelin in the rat.
Am. J. Hypertens. 6: 453-457
- 2 Aceto J.F., Baker K.M., (1990)
Angiotensin II receptor-mediated stimulation of protein synthesis in chick heart cells.
Am. J. Physiol. 258: H806-H813
- 3 Ackermann M., Ritthaler T., Riegger G., Kurtz A., Kramer B.K., (1995)
Endothelin inhibits cAMP-induced renin release from isolated renal juxtaglomerular cells.
J. Cardiovasc. Pharmacol. 26: S135-S137
- 4 Aiello S., Noris M., Todeschini M., Zappella S., Foglieni C., Benigni A., Corna D., Zoja C., Cavallotti D., Remuzzi G., (1997)
Renal and systemic nitric oxide synthesis in rats with renal mass reduction.
Kidney Int. 52: 171-181
- 5 Amann K., Wiest G., Neusüß R., Irzyniec T., Ritz E., Mall G., (1995)
Vascular hypertrophy in uraemia is independent of hypertension
Am. J. Hypertens. 8: 409-417
- 6 Arai H., Hori S., Aramori I., Ohkubo H., Nakanishi S., (1990)
Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor.
Nature 348: 730-732
- 7 Aramori I., Nakanishi S., (1992)
Coupling of two endothelin receptor subtypes to differing signal transduction in transfected Chinese hamster ovary cells.
J. Biol. Chem. 267: 12468-12474
- 8 Ashab I., Peer G., Blum M., Wollman Y., Chernihovsky T., Hassner A., Schwartz D., Cabili S., Silverberg D., Iaina A., (1995)
Oral administration of L-Arginine and Captopril in rats prevents chronic renal failure by nitric oxide production.
Kidney Int. 47: 1515-1521
- 9 Baker K.M., Aceto J.F., (1990)
Angiotensin II stimulation of protein synthesis and cell growth in chick heart cells.
Am. J. Physiol. 259: H610-H618

- 10** Baker K.M., Chernin M.I., Wixson S.K., Aceto J.F., (1990)
Renin-Angiotensin System involvement in pressure-overload cardiac hypertrophy in rats.
Am. J. Physiol. 259: H324-H332
- 11** Benigni A., Perico N., Gaspari F., Zoja C., Bellizzi L., Gabanelli M., Remuzzi G., (1991)
Increased renal endothelin production in rats with reduced renal mass.
Am. J. Physiol. 260: F331-F339
- 12** Benigni A., Zoja C., Corna D., Orisio S., Longaretti L., Bertani T., Remuzzi G., (1993)
A specific endothelin subtype A receptor antagonist protects against injury in renal disease progression.
Kidney Int. 44: 440-444
- 13** Benigni A., Remuzzi G., (1999)
Endothelin antagonists
Lancet 353: 133-138
- 14** Beretta-Piccoli C., Weidmann P., De Chatel R., Reubi F., (1976)
Hypertension associated with early stage kidney disease. Complementary roles of circulating renin, the body sodium/volume state and duration of hypertension.
Am. J. Med. 61: 739-747
- 15** Bishopric N.H., Simpson P.C., Ordahl C.P., (1987)
Induction of the skeletal α -actin gene in α_1 -adrenoceptor-mediated hypertrophy of rat cardiac myocytes.
J. Clin. Invest. 80: 1194-1199
- 16** Blantz R.C., Konnen K.S., Tucker B.J., (1976)
Angiotensin II effects upon the glomerular microcirculation and ultrafiltration coefficient of the rat.
J. Clin. Invest. 57: 419-434
- 17** Bogoyevitch M.A., Glennon P.E., Andersson M.B., Clerk A., Lazou A., Marshall C.J., Parker P.J., Sugden P.H., (1994)
Endothelin-1 and fibroblast growth factors stimulate the mitogen-activated protein kinase signaling cascade in cardiac myocytes. The potential role of the cascade in the integration of two signaling pathways leading to myocyte hypertrophy.
J. Biol. Chem. 269: 1110-1119

- 18** Bogoyevitch M.A., Parker P.J., Sugden P.H., (1993)
Characterization of Protein kinase C isotype expression in adult rat heart. Protein kinase C- ϵ is a major isotype present, and it is activated by phorbol esters, epinephrine, and endothelin.
Circ. Res. 72: 757-767
- 19** Bohlender J., Gerbault S., Kramer J., Gross M., Kirchengast M., Dietz R., (2000)
Synergistic effects of AT₁ and ET_A receptor blockade in a transgenic, Angiotensin II-dependent, rat model.
Hypertension 35: 992-997
- 20** Booz G.W., Taher M.M., Baker K.M., Singer H.A., (1994)
Angiotensin II induces phosphatidic acid formation in neonatal rat cardiac fibroblasts: evaluation of the roles of Phospholipases C and D.
Mol. Cell. Biochem. 141: 135-143
- 21** Bowling N., Walsh R.A., Song G., Estridge T., Sandusky G.E., Fouts R.L., Mintze K., Pickard T., Roden R., Bristow M.R., Sabbah H.N., Mizrahi J.L., Gromo G., King G.L., Vlahos C.J., (1999)
Increased Protein kinase C activity and expression of Ca²⁺-sensitive isoforms in the failing human heart.
Circulation 99: 384-391
- 22** Bradford M.M., (1976)
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
Anal. Biochem. 72: 248-254
- 23** Brehm B.R., Bertsch D., von Fallois J., Wolf S.C., (2000)
 β -blockers of the third generation inhibit Endothelin-1 liberation, mRNA production and proliferation of human coronary smooth muscle and endothelial cells.
J. Cardiovasc. Pharmacol. 36: S401-S403
- 24** Bright R.,
Tabular view of the morbid appearance in 100 cases connected with albuminous urine with observations.
- 25** Brochu E., Lacasse S., Lariviere R., Kingma I., Grose J.H., Lebel M., (1999)
Differential effects of Endothelin-1 antagonists on erythropoietin-induced hypertension in renal failure.
J. Am. Soc. Nephrol. 10: 1440-1446

- 26** Brochu E., Lacasse S., Moreau C., Lebel M., Kingma I., Grose J.H., Lariviere R., (1999)
Endothelin ET(A) receptor blockade prevents the progression of renal failure and hypertension in uraemic rats.
Nephrol. Dial. Transplant. 14: 1881-1888
- 27** Campese V.M., Romoff M.S., Levitan D., Lane K., Massry S.G., (1981)
Mechanisms of autonomic nervous system dysfunction in uremia.
Kidney Int. 20: 246-253
- 28** Cannella G., La Canna G., Sandrini M., Gaggiotti M., Nordio G., Movilli E., Mombelloni S., Visioli O., Maiorca R., (1991)
Reversal of left ventricular hypertrophy following recombinant human erythropoietin treatment of anaemic dialysed uraemic patients.
Nephrol. Dial. Transplant. 6: 31-37
- 29** Chan T.Y., Woo K.S., Nicholls M.G., (1992)
The application of nebivolol in essential hypertension: a double-blind, randomized, placebo-controlled study.
Int. J. Cardiol. 35: 387-395
- 30** Clerk A., Bogoyevitch M.A., Anderson M.B., Sugden P.H., (1994)
Differential activation of Protein kinase C isoforms by Endothelin-1 and phenylephrine and subsequent stimulation of p42 and p44 mitogen-activated protein kinases in ventricular myocytes cultured from neonatal rat hearts.
J. Biol. Chem. 269: 32848-32857
- 31** Clerk A., Bogoyevitch M.A., Fuller S.J., Lazou A., Parker P.J., Sugden P.H., (1995)
Expression of Protein kinase C isoforms during cardiac ventricular development.
Am. J. Physiol. 269: H1087-1097
- 32** D'Amours M., Lebel M., Grose J.H., Lariviere R., (1999)
Renal and vascular effects of chronic nitric oxide synthase inhibition: involvement of Endothelin-1 and Angiotensin II.
Can. J. Physiol. Pharmacol. 77: 8-16
- 33** Dekker L.V., Parker P.J., (1994)
Protein kinase C--a question of specificity.
Trends Biochem. Sci. 19: 73-77
- 34** Disatnik M.H., Buraggi G., Mochly-Rosen D., (1994)
Localization of Protein kinase C isozymes in cardiac myocytes.
Exp. Cell. Res. 210: 287-297

- 35** Dostal D.E., Baker K.M., (1992)
Angiotensin II stimulation of left ventricular hypertrophy in adult rat heart.
Mediation by the AT₁ receptor.
Am. J. Hypertens. 5: 276-280
- 36** Dostal D.E., Rothblum K.N., Chernin M.I., Cooper G.R., Baker K.M.,
(1992)
Intracardiac detection of angiotensinogen and renin: a localized Renin-
Angiotensin System in neonatal rat heart.
Am. J. Physiol. 263: C838-C850
- 37** Dostal D.E., Rothblum K.N., Conrad K.M., Cooper G.R., Baker K.M.,
(1992)
Detection of Angiotensin I and II in cultured rat cardiac myocytes and
fibroblasts.
Am. J. Physiol. 263: C851-C863
- 38** Dumont Y., D'Amours M., Lebel M., Larivière R., (2001)
Blood pressure-independent effect of angiotensin AT₁ receptor blockade
on renal endothelin-1 production in hypertensive uremic rats
J. Hypertens. 19: 1479-1487
- 39** Dzau V.J., (1994)
Cell biology and genetics of angiotensin in cardiovascular disease.
J. Hypertens. 12: S3-S10
- 40** Egido J., (1996)
Vasoactive hormones and renal sclerosis: Nephrology Forum
Kidney Int. 49: 578-597
- 41** Endo-Mochizuki Y., Mochizuki N., Sawa H., Takada A., Okamoto H.,
Kawaguchi H., Nagashima K., Kitabatake A., (1995)
Expression of renin and angiotensin-converting enzyme in human hearts.
Heart Vessels 10: 285-293
- 42** Ford D.A., Gross R.W., (1989)
Plasmenylethanolamine is the major storage depot for arachidonic acid in
rabbit vascular smooth muscle and is rapidly hydrolyzed after Angiotensin
II stimulation.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 3479-3483
- 43** Fryer L.G., Holness M.J., Decock J.B., Sugden M.C., (1998)
Cardiac Protein kinase C expression in two models of cardiac hypertrophy
associated with an activated cardiac Renin-Angiotensin System: effects of
experimental hyperthyroidism and genetic hypertension (the mRen-2 rat).
J. Endocrinol. 158: 27-33

- 44** Fukumoto S., Nishizawa Y., Hosoi M., Koyama H., Yamakawa K., Ohno S., Morii H., (1997)
Protein Kinase C δ Inhibits the Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells by Suppressing G₁ Cyclin Expression
J. Biol. Chem. 272 (21): 13816-13822
- 45** Fukuroda T., Fujikawa T., Ozaki S., Ishikawa K., Yano M., Nishikibe M., (1994)
Clearance of circulating Endothelin-1 by ET_B receptors in rats.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 199: 1461-1465
- 46** Gómez-Garre D., Largo R., Liu X.H., Gutierrez S., Lopez-Armada M.J., Palacios I., Egido J., (1996)
An orally active ET_A/ET_B receptor antagonist ameliorates proteinuria and glomerular lesions in rats with proliferative nephritis.
Kidney Int. 50: 962-972
- 47** Goto K., Kasuya Y., Matsuki N., Takuwa Y., Kurihara H., Ishikawa T., Kimura S., Yanagisawa M., Masaki T., (1989)
Endothelin activates the dihydropyridine-sensitive, voltage-dependent Ca²⁺ channel in vascular smooth muscle.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 3915-3918
- 48** Greene E.L., Kren S., Hostetter T.H., (1996)
Role of aldosterone in the remnant kidney model in the rat.
J. Clin. Invest. 98: 1063-1068
- 49** Greven J., Gabriels G., (2000)
Effect of Nebivolol, a novel β_1 -selective adrenoceptor antagonist with vasodilating properties, on kidney function.
Arzneim. Forsch. Drug Res. 50: 973-979
- 50** Griendling K.K., Berk B.C., Ganz P., Gimbrone M.A., Alexander R.W., (1987)
Angiotensin II stimulation of vascular smooth muscle phosphoinositide metabolism. State of the art lecture.
Hypertens. 9: III181-185
- 51** Gu X., Bishop S.P., (1994)
Increased Protein kinase C and isozyme redistribution in pressure-overload cardiac hypertrophy in the rat.
Circ. Res. 75: 926-931
- 52** Hatch M., Freel R.W., Shahinfar S., Vaziri N.D., (1996)
Effects of the specific Angiotensin II receptor antagonist Losartan on urate homeostasis and intestinal urate transport
Am. Soc Pharm. Exp. Ther. 276: 187-193

- 53** Hocher B., Thöne-Reinecke C., Bauer C., Raschack M., Neumayer H.H., (1997)
The paracrine Endothelin System: Pathophysiology and implications in clinical medicine.
Eur. J. Clin. Biochem. 35: 175-189
- 54** Hug H., Sarre T.F., (1993)
Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction
Biochem. J. 291: 329-343
- 55** Hüting J., Kramer W., Schutterle G., Wizemann V., (1989)
Analysis of left-ventricular changes associated with chronic hemodialysis. A noninvasive follow-up study.
Nephron 49: 284-290
- 56** Ichikawa I., Harris R.C., (1991)
Angiotensin actions in the kidney : renewed insight into the old hormone.
Kidney Int. 40: 583-596
- 58** Inoue A., Yanagisawa M., Kimura S., Kasuya Y., Miyauchi T., Goto K., Masaki T., (1989)
The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 2863-2867
- 59** Ishikawa T., Li L.M., Shinmi O., Kimura S., Yanagisawa M., Goto K., Masaki T., (1991)
Characteristics of binding of Endothelin-1 and Endothelin-3 to rat hearts. Developmental changes in mechanical responses and receptor subtypes.
Circ. Res. 69: 918-926
- 60** Ito H., Hirata Y., Adachi S., Tanaka M., Tsujino M., Koike A., Nogami A., Murumo F., Hiroe M., (1993)
Endothelin-1 is an autocrine/paracrine factor in the mechanism of Angiotensin II-induced hypertrophy in cultured rat cardiomyocytes.
J. Clin. Invest. 92: 398-403
- 61** Ito H., Hirata Y., Hiroe M., Tsujino M., Adachi S., Takamoto T., Nitta M., Taniguchi K., Marumo F., (1991)
Endothelin-1 induces hypertrophy with enhanced expression of muscle-specific genes in cultured neonatal rat cardiomyocytes.
Circ. Res. 69: 209-215
- 62** Iwasaki S., Homma T., Matsuda Y., Kon V., (1995)
Endothelin receptor subtype B mediates autoinduction of Endothelin-1 in rat mesangial cells.
J. Biol. Chem. 270: 6997-7003

- 63** Izumo S., Nadal-Ginard B., Mahdavi V., (1988)
Protooncogene induction and reprogramming of cardiac gene expression produced by pressure overload.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 339-343
- 64** Jalili T., Takeishi Y., Walsh R.A., (1999)
Signal transduction during cardiac hypertrophy: the role of G α_q , PLC β_1 , and PKC.
Cardiovasc. Res. 44: 5-9
- 65** James B., Strait I., Martin J.L., Bayer A., Mestril R., Eble D.M., Samarel A.M. (2001)
Role of protein kinase C- ϵ in hypertrophy of cultured neonatal rat ventricular myocytes.
Am. J. Phys. 280: H756-H766
- 66** Kakinuma Y., Kawamura T., Bills T., Yoshioka T., Ichikawa I., Fogo A., (1992)
Blood pressure-independent effect of angiotensin inhibition on vascular lesions of chronic renal failure.
Kidney Int. 42: 46-55
- 67** Kawaguchi H., Sawa H., Yasuda H., (1991)
Endothelin simulates Angiotensin I to Angiotensin II conversion in pulmonary artery endothelial cells.
J. Mol. Cell. Cardiol. 22: 839-842
- 68** Kariya K., Karns L.R., Simpson P.C., (1991)
Expression of a constitutively activated mutant of the β -isozyme of protein kinase C in cardiac myocytes stimulates the promoter of the β -myosin heavy chain isogene.
J. Biol. Chem. 266: 10023-10026
- 69** Kohno M., Horio T., Ikeda M., Yokokawa K., Fukui T., Yasunari K., Kurihara N., Takeda T., (1992)
Angiotensin II stimulates Endothelin-1 secretion in cultured rat mesangial cells.
Kidney Int. 42: 860-866
- 70** Komuro I., Katoh Y., Kaida T., Shibazaki Y., Kurabayashi M., Hoh E., Takaku F., Yazaki Y., (1991)
Mechanical loading stimulates cell hypertrophy and specific gene expression in cultured rat cardiac myocytes. Possible role of Protein kinase C activation.
J. Biol. Chem. 266: 1265-1268

- 71** Kosaka Y., Ogita K., Ase K., Nomura H., Kikkawa U., Nishizuka Y., (1988)
The heterogeneity of Protein kinase C in various rat tissues.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 151: 973-981
- 72** Kourembanas S., McQuillan L.P., Leung G.K., Faller D.V., (1993)
Nitric oxide regulates the expression of vasoconstrictors and growth factors by vascular endothelium under both normoxia and hypoxia.
J. Clin. Invest. 92: 99-104
- 73** Kramer B.K., Schricker K., Scholz H., Clozel M., Riegger G.A., Kurtz A., (1995)
Role of endothelins for renin regulation.
Kidney Int. 55: S119-S121
- 74** Lafayette R.A., Mayer G., Park S.K., Meyer T.W., (1992)
Angiotensin II receptor blockade limits glomerular injury in rats with reduced renal mass.
J. Clin. Invest. 90: 766-771
- 75** Lamers J.M., Eskildsen-Helmond Y.E., Resink A.M., de Jonge H.W., Bezstarosti K., Sharma H.S., van Heugten H.A., (1995)
Endothelin-1-induced Phospholipase C- β and D and protein kinase C isoenzyme signaling leading to hypertrophy in rat cardiomyocytes.
J. Cardiovasc. Pharmacol. 26: S100-S103
- 76** Larivière R., D'Amours M., Lebel M., Kingma I., Grose J.H., Caron L., (1997)
Increased immunoreactive Endothelin-1 levels in blood vessels and glomeruli of rats with reduced renal mass.
Kidney Blood Press. Res. 20: 372-380
- 77** Larivière R., Deng L.Y., Day R., Sventek P., Thibault G., Schiffrin E.L., (1995)
Increased Endothelin-1 gene expression in the endothelium of coronary arteries and endocardium in the DOCA-salt hypertensive rat.
J. Mol. Cell. Cardiol. 27: 2123-2131
- 78** Larivière R., Lebel M., Kingma I., Grose J.H., Boucher D., (1998)
Effects of Losartan and Captopril on Endothelin-1 production in blood vessels and glomeruli of rats with reduced renal mass.
Am. J. Hypertens. 11: 989-997
- 79** Lazou A., Bogoyevitch M.A., Clerk A., Fuller S.J., Marshall C.J., Sugden P.H., (1994)
Regulation of mitogen-activated protein kinase cascade in adult rat heart preparations in vitro.
Circ. Res. 75: 932-941

- 80** Lee H.R., Henderson S.A., Reynolds R., Dunmon P., Yuan D., Chien K.R., (1988)
 α 1-adrenergic stimulation of cardiac gene transcription in neonatal rat myocardial cells. Effects on myosin light chain-2 gene expression.
J. Biol. Chem. 263: 7352-7358
- 81** Liu X., Sentex E., Golfman L., Takeda S., Osada M., Dhalla N.S., (1999)
Modification of cardiac subcellular remodeling due to pressure overload by Captopril and Losartan.
Clin. Exp. Hypertens. 21: 145-156
- 82** London G.M., Fabiani F., Marchais S.J., (1987)
Uremic cardiomyopathy: an inadequate left ventricular hypertrophy
Kidney Int. 31: 973-980
- 83** Magga J., Kalliovalkama J., Romppanen H., Vuolteenaho O., Porsti I., Kahonen M., Tolvanen J.P., Ruskoaho H., (1999)
Differential regulation of cardiac adrenomedullin and natriuretic peptide gene expression by AT₁ receptor antagonism and ACE inhibition in normotensive and hypertensive rats.
J. Hypertens. 17: 1543-1552
- 84** Mall G., Huther W., Schneider J., Lundin P., Ritz E., (1990)
Diffuse intermyocardiocytic fibrosis in uraemic patients.
Nephrol. Dial. Transplant. 5: 39-44
- 85** Marsden P.A., Danthuluri N.R., Brenner B.M., Ballermann B.J., Brock T.A., (1989)
Endothelin action on vascular smooth muscle involves inositol trisphosphate and calcium mobilization.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 158: 86-93
- 86** Marshall C.J., (1995)
Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation.
Cell 80: 179-185
- 87** Mayer G., Lafayette R.A., Oliver J., Deen W.M., Myers B.D., Meyer T.W., (1993)
Effects of Angiotensin II receptor blockade on remnant glomerular permselectivity.
Kidney Int. 43: 346-353
- 88** MacLeod K.T., (1991)
Regulation and interaction of intracellular calcium, sodium and hydrogen ions in cardiac muscle.
Cardioscience 2 (2): 71-85

- 89** Meggs L.G., Ben-Ari J., Gammon D., Choudhury M., Goodman A.I., (1990)
Adaptive myocardial hypertrophy in the renal ablation model
Am. J. Hypertens. 3: 33-38
- 90** Mischak H., Goodnight J.A., Kolch W., Martiny-Baron G., Schaechtle C., Kazanietz M.G., Blumberg P.M., Pierce J.H., Mushinski J.F., (1993)
Overexpression of protein kinase C- δ and - ϵ in NIH 3T3 cells induces opposite effects on growth, morphology, anchorage dependence, and tumorigenicity.
J. Biol. Chem. 268: 6090-6096
- 91** Mochly-Rosen D., Henrich C.J., Cheever L., Khaner H., Simpson P.C., (1990)
A Protein kinase C isozyme is translocated to cytoskeletal elements on activation.
Cell. Regul. 1: 693-706
- 92** Modesti P.A., Vanni S., Paniccia R., Bandinelli B., Bertolozzi L., Polidori G., Sani G., Semeri G.G.N., (1999)
Characterization of Endothelin-1 receptor subtypes in isolated human cardiomyocytes.
J. Cardiovasc. Pharmacol. 34: 333-339
- 93** Mohabir R., Young S.D., Strosberg A.M., (1994)
Role of angiotensin in pressure overload-induced hypertrophy in rats: effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors, an AT₁ receptor antagonist, and surgical reversal.
J. Cardiovasc. Pharmacol. 23: 291-299
- 94** Mohammadi K., Rouet-Benzineb P., Laplace M., Crozatier B., (1997)
Protein kinase C activity and expression in rabbit left ventricular hypertrophy.
J. Mol. Cell. Cardiol. 29: 1687-1694
- 95** Morgan H.E., Baker K.M., (1991)
Cardiac hypertrophy. Mechanical, neural, and endocrine dependence.
Circulation 83: 13-25
- 96** Nishizuka Y., (1988)
The molecular heterogeneity of Protein kinase C and its implications for cellular regulation.
Nature 334: 661-665

- 97** Ohta K., Hirata Y., Shichiri M., Kanno K., Emori T., Tomita K., Marumo F., (1991)
Urinary excretion of Endothelin-1 in normal subjects and in patients with renal disease.
Kidney Int. 39: 307-311
- 98** Ono Y., Fujii T., Ogita K., Kikkawa U., Igarashi K., Nishizuka Y., (1989)
Protein kinase C ζ subspecies from rat brain: its structure, expression, and properties.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 3099-3103
- 99** Orisio S., Benigni A., Bruzzi I., Corna D., Perico N., Zoja C., Benatti L., Remuzzi G., (1993)
Renal endothelin gene expression is increased in remnant kidney and correlates with disease progression.
Kidney Int. 43: 354-358
- 100** Orr J.W., Newton A.C., (1992a)
Interaction of Protein kinase C with phosphatidylserine. 1. Cooperativity in lipid binding.
Biochemistry 31: 4661-4667
- 101** Orr J.W., Newton A.C., (1992b)
Interaction of Protein kinase C with phosphatidylserine. 2. Specificity and regulation.
Biochemistry 31: 4667-4673
- 102** Osada S., Mizuno K., Saido T.C., Akita Y., Suzuki K., Kuroki T., Ohno S., (1990)
A phorbol ester receptor/protein kinase, nPKC ϵ , a new member of the protein kinase C family predominantly expressed in lung and skin.
J. Biol. Chem. 265: 22434-22440
- 103** Ozaki S., Ohwaki K., Ihara M., Fukuroda T., Ishikawa K., Yano M., (1995)
ET_B-mediated regulation of extracellular levels of Endothelin-1 in cultured human endothelial cells.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 209: 483-489
- 104** Palmer R.H., Parker P.J., (1995)
Expression, purification and characterization of the ubiquitous Protein kinase C-related kinase 1.
Biochem. J. 309: 315-320
- 105** Palmer R.H., Ridden J., Parker P.J., (1995)
Cloning and expression patterns of two members of a novel Protein-kinase-C-related kinase family.
Eur. J. Biochem. 227: 344-351

- 106** Parfrey P.S., Harnett J.D., Griffiths S.M., (1990)
The clinical course of left ventricular hypertrophy in dialysis patients.
Nephron 55: 114-120
- 107** Parfrey P.S., (1993)
Cardiac and cerebrovascular disease in chronic uremia.
Am. J. Kidney Dis. 21: 77-80
- 108** Parker T.G., Chow K.L., Schwartz R.J., Schneider M.D., (1990)
Differential regulation of skeletal α -actin transcription in cardiac muscle
by two fibroblast growth factors.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 7066-7070
- 109** Pfeffer J.M., Pfeffer M.A., Frohlich E.D., (1971)
Validity of an indirect tail-cuff method for determining systolic arterial
pressure in unanesthetized normotensive and spontaneously
hypertensive rats.
J. Lab. Clin. Med. 78: 957-962
- 110** Prins B.A., Hu R.M., Nazario B., Pedram A., Frank H.J., Weber M.A.,
Levin E.R., (1994)
Prostaglandin E₂ and prostacyclin inhibit the production and secretion of
endothelin from cultured endothelial cells.
J. Biol. Chem. 269: 11938-11944
- 111** Pucéat M., Hilal-Dandan R., Strulovici B., Brunton L.L., Brown J.H., (1994)
Differential regulation of protein kinase C isoforms in isolated neonatal
and adult rat cardiomyocytes.
J. Biol. Chem. 269: 16938-16944
- 112** Rambausek M., Ritz E., Mall G., Mehls O., Katus H., (1985)
Myocardial hypertrophy in rats with renal insufficiency.
Kidney Int. 28: 775-782
- 113** Razandi M., Pedram A., Rubin T., Levin E.R., (1996)
PGE₂ and PGI₂ inhibit ET-1 secretion from endothelial cells by stimulating
particulate guanylate cyclase.
Am. J. Physiol. 270: H1342-H1349
- 114** Resink T.J., Scott-Burden T., Buhler F.R., (1988)
Endothelin stimulates Phospholipase C in cultured vascular smooth
muscle cells.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 157: 1360-1368

- 115** Resink T.J., Scott-Burden T., Buhler F.R., (1990)
Activation of multiple signal transduction pathways by endothelin in cultured human vascular smooth muscle cells.
Eur. J. Biochem. 189: 415-421
- 116** Reyes A.A., Purkerson M.L., Karl I., Klahr S., (1992)
Dietary supplementation with L-Arginine ameliorates the progression of renal disease in rats with subtotal nephrectomy.
Am. J. Kidney Dis. 20: 168-176
- 117** Roubert P., Gillard-Roubert V., Pourmarin L., Cornet S., Guilnard C., Plas P., Pirotzky E., Chabrier P.E., Braquet P., (1994)
Endothelin receptor subtypes A and B are up-regulated in an experimental model of acute renal failure
Mol. Pharmacol. 45: 182-188
- 118** Rybin V.O., Steinberg S.F., (1994)
Protein kinase C isoform expression and regulation in the developing rat heart.
Circ. Res. 74: 299-309
- 119** Rybin V.O., Steinberg S.F., (1997)
Do adult rat ventricular myocytes express Protein kinase C- α ?
Am. J. Physiol. 41: H2485-H2491
- 120** Sadoshima J., Izumo S., (1993a)
Molecular characterization of Angiotensin II--induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT₁ receptor subtype.
Circ. Res. 73: 413-423
- 121** Sadoshima J., Izumo S., (1993b)
Signal transduction pathways of Angiotensin II--induced c-fos gene expression in cardiac myocytes in vitro. Roles of phospholipid-derived second messengers.
Circ. Res. 73: 424-438
- 122** Sadoshima J., Jahn L., Takahashi T., Kulik T.J., Izumo S., (1992)
Molecular characterization of the stretch-induced adaptation of cultured cardiac cells. An in vitro model of load-induced cardiac hypertrophy.
J. Biol. Chem. 267: 10551-10560
- 123** Sadoshima J., Xu Y., Slayter H.S., Izumo S., (1993)
Autocrine release of Angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro.
Cell 75: 977-984

- 124** Sakurai T., Yanagisawa M., Inoue A., Ryan U.S., Kimura S., Mitsui Y., Goto K., Masaki T., (1991)
cDNA cloning, sequence analysis and tissue distribution of rat Preproendothelin-1 mRNA.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 175: 44-47
- 125** Sakurai T., Yanagisawa M., Takawa Y., Miyazaki H., Kimura S., Goto K., Masaki T., (1990)
Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor.
Nature 348: 732-735
- 126** Schiffrin E.L., (1999)
Role of Endothelin-1 in Hypertension
Hypertens. 34: 876-881
- 127** Schluter K.D., Piper H.M., (1992)
Trophic effects of catecholamines and parathyroid hormone on adult ventricular cardiomyocytes.
Am. J. Physiol. 263: H1739-H1746
- 128** Schunkert H., Dzau V.J., Tang S.S., Hirsch A.T., Apstein C.S., Lorell B.H., (1990)
Increased rat cardiac angiotensin converting enzyme activity and mRNA expression in pressure overload left ventricular hypertrophy. Effects on coronary resistance, contractility, and relaxation.
J. Clin. Invest. 86: 1913-1920
- 129** Schunkert H., Sadoshima J., Cornelius T., Kagaya Y., Weinberg E.O., Izumo S., Riegger G., Lorell B.H., (1995)
Angiotensin II-induced growth responses in isolated adult rat hearts. Evidence for load-independent induction of cardiac protein synthesis by Angiotensin II.
Circ. Res. 76: 489-497
- 130** Shubeita H.E., Martinson E.A., Van Bilsen M., Chien K.R., Brown J.H., (1992)
Transcriptional activation of the cardiac myosin light chain 2 and atrial natriuretic factor genes by Protein kinase C in neonatal rat ventricular myocytes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 1305-1309

- 131** Shubeita H.E., McDonough P.M., Harris A.N., Knowlton K.U., Glembotski C.C., Brown J.H., Chien K.R., (1990)
Endothelin induction of inositol phospholipid hydrolysis, sarcomere assembly, and cardiac gene expression in ventricular myocytes. A paracrine mechanism for myocardial cell hypertrophy.
J. Biol. Chem. 265: 20555-20562
- 132** Silberberg J.S., Barre P.E., Prichard S.S., Sniderman A.D., (1989)
Impact of left ventricular hypertrophy on survival in end-stage renal disease.
Kidney Int. 36: 286-290
- 133** Silberberg J.S., Rahal D.P., Patton D.R., Sniderman A.D., (1989)
Role of anemia in the pathogenesis of left ventricular hypertrophy in end-stage renal disease.
Am. J. Cardiol. 64: 222-224
- 134** Simpson P.C., Kariya K., Karns L.R., Long C.S., Karliner J.S., (1991)
Adrenergic hormones and control of cardiac myocyte growth.
Mol.Cell. Biochem. 104: 35-43
- 135** Steiner R.W., Blantz R.C., (1979)
Acute reversal by saralasin of multiple intrarenal effects of Angiotensin II.
Am. J. Physiol. 237: F386-F391
- 136** Stoleru L., Wijns W., van Eyll C., Bouvy T., Van Nueten L., Pouleur H., (1993)
Effects of D-Nebivolol and L-Nebivolol on left ventricular systolic and diastolic function: comparison with D-L-Nebivolol and Atenolol.
J. Cardiovasc. Pharmacol. 22: 183-190
- 137** Sugden P.H., Bogoyevitch M.A., (1995)
Intracellular signalling through protein kinases in the heart.
Cardiovasc. Res. 30: 478-492
- 138** Suzuki T., Hoshi H., Mitsui Y., (1990)
Endothelin stimulates hypertrophy and contractility of neonatal rat cardiac myocytes in a serum-free medium.
FEBS Lett. 268: 149-151
- 139** Suzuki T., Kumazaki T., Mitsui Y., (1993)
Endothelin-1 is produced and secreted by neonatal rat cardiac myocytes in vitro.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 191: 823-830

- 140** Takagi M., Tsukada H., Matsuoka H., Yagi S., (1989)
Inhibitory effect of endothelin on renin release in vitro.
Am. J. Physiol. 257: E833-838
- 141** Takai Y., Kishimoto A., Iwasa Y., Kawahara Y., Mori T., Nishizuka Y.,
Tamura A., Fujii T., (1979)
A role of membranes in the activation of a new multifunctional protein
kinase system.
J. Biochem. 86: 575-578
- 142** Taylor S.J., Chae H.Z., Rhee S.G., Exton J.H., (1991)
Activation of the β_1 isozyme of Phospholipase C by α subunits of the Gq
class of G proteins.
Nature 350: 516-518
- 143** Timmermanns P.B., Wong P.C., Chiu A.T., Herblin W.F., (1991)
Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists.
Trend. Pharmacol. Sci. 12: 55-62
- 144** Towbin H., Staehelin T., Gordon J., (1979)
Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to
nitrocellulose sheets: procedure and some applications.
Proc. Natl. Acad. Sci USA 76: 4350-4354
- 145** Traube L., (1871)
Concerning the interrelation between cardiac and renal diseases.
(Collected Contribution to Pathology and Physiology).
Clinical Investigations Vol. II, Part 1: 290-353
- 146** Ushio-Fukai M., Nishimura J., Kobayashi S., Kanaide H., (1995)
Endothelin-1 and Endothelin-3 regulate differently vasoconstrictor
responses of smooth muscle of the porcine coronary artery.
Br. J. Pharmacol. 114: 171-179
- 147** Van de Water A., Janssens W., Van Neuten J., Xhonneux R., De Cree J.,
Verhaegen H., Reneman R.S., Janssen P.A., (1988)
Pharmacological and hemodynamic profile of Nebivolol, a chemically
novel, potent, and selective β_1 -adrenergic antagonist.
J. Cardiovasc. Pharmacol. 11: 552-563
- 148** Wang C., Zou L., Navar L.G., (1997)
Renal responses to AT₁ blockade in Angiotensin II-induced hypertensive
rats.
J. Am. Soc. Nephrol. 8: 535-542

- 149** Ways D.K., Cook P.P., Webster C., Parker P.J., (1992)
Effect of phorbol esters on Protein kinase C- ζ .
J. Biol. Chem. 267: 4799-4805
- 150** Weber K.T., Brilla C.G., Janicki J.S., Reddy H.K., Campbell S.E., (1991)
Myocardial fibrosis: role of ventricular systolic pressure, arterial hypertension, and circulating hormones.
Basic Res. Cardiol. 86: 325-331
- 151** Westermann P., Knoblich M., Maier O., Lindschau C., Haller H., (1996)
Protein kinase C bound to the Golgi apparatus supports the formation of constitutive transport vesicles.
Biochem. J. 320: 651-658
- 152** Wetsel W.C., Khan W.A., Merchenthaler I., Rivera H., Halpern A.E., Phung H.M., Negro-Vilar A., Hannun Y.A., (1992)
Tissue and cellular distribution of the extended family of Protein kinase C isoenzymes.
J. Cell. Biol. 117: 121-33
- 153** Wexler R.R., Carini D.J., Duncia J.V., Johnson A.L., Wells G.J., Chiu A.T., Wong P.C., Timmermanns P.B., (1992)
Rationale for the chemical development of angiotensin II receptor antagonists.
Am. J. Hypertens. 5: 209S-220S
- 154** Wolf S.C., Gaschler F., Brehm S., Klaussner M., Amann K., Risler T., Brehm B.R., (2000)
Endothelin-receptor antagonists in uremic cardiomyopathy.
J. Cardiovasc. Pharmacol. 36: S348-S350
- 155** Yanagisawa M., Kurihara H., Kimura S., Goto K., Masaki T., (1988)
A novel peptide vasoconstrictor, endothelin, is produced by vascular endothelium and modulates smooth muscle Ca²⁺ channels.
J. Hypertens. 6: S188-S191
- 156** Yanagisawa M., Kurihara H., Kimura S., Tomobe Y., Kobayashi M., Mitsui Y., Yazaki Y., Goto K., Masaki T., (1988)
A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells.
Nature 332: 411-415
- 157** Yasuda M., Kohno M., Tahara A., Itagane H., Toda I., Akioka K., Teragaki M., Oku H., Takeuchi K., Takeda T., (1990)
Circulating immunoreactive endothelin in ischemic heart disease.
Am. Heart J. 119: 801-806

- 158** Zhang X., Dostal D.E., Reiss K., Cheng W., Kajstura J., Li P., Huang H., Sonnenblick E.H., Meggs L.G., Baker K.M., (1995)
Identification and activation of autocrine Renin-Angiotensin System in adult ventricular myocytes.
Am. J. Physiol. 269: H1791-H1802

DANKSAGUNG

Bedanken möchte ich mich bei all denjenigen, die diese Dissertation ermöglicht und zu ihrem Gelingen beigetragen haben.

Herrn PD Dr. Bernhard Brehm und Frau Dr. Sabine Wolf danke ich für die Überlassung des Themas, die fachliche Unterstützung sowie die gute Betreuung der Arbeit.

Besonders danken möchte ich Ralf Mattes, der in allen Versuchsphasen ein absolut zuverlässiger, freundlicher und hilfsbereiter Arbeitskollege war.

Für ihre gute und engagierte Hilfe bei der Einarbeitung in die praktische Versuchsdurchführung und während des Versuchs danke ich Sybille Brehm, Frank Gaschler, Jens Freudenberg und Benjamin Wiesinger.

Frau Dr. Martina Klaußner und Frau Janina Smykowski danke ich für ihre Unterstützung sowohl fachlich als auch mental. Ihre zahlreichen Ratschläge waren ein entscheidender Beitrag für meine Arbeit.

Vielen Dank an Herrn Dr. Reinhard Vonthein vom Institut für Medizinische Biometrie für seine geduldige und freundliche Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Daten.

Meinen herzlichen Dank an Esther, die mich nicht nur durch das mehrmalige Korrekturlesen der Doktorarbeit unterstützt hat. Sie gab mir die ebenso notwendige wie hilfreiche Motivation und sorgte immer für eine einfallsreiche Abwechslung.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern für ihre großartige Unterstützung während der Doktorarbeit und des gesamten Studiums.

LEBENS LAUF

Persönliche Angaben :

Name : Thorsten Amend
Geburtsdatum : 31.12.1974
Geburtsort : Tübingen
Familienstand : ledig
Staatsangehörigkeit : deutsch

Schulische Ausbildung :

1981 bis 1983
Kreuzerfeld-Grundschule in Rottenburg
1983 bis 1985
Bästenhardt-Grundschule in Mössingen
1985 bis 1991
Quenstedt-Gymnasium in Mössingen
1991 bis 1994
Wirtschafts-Gymnasium in Tübingen mit Abitur

Wehrdienst :

1994-1995
Sanitätsdienst bei der Bundeswehr in Horb und Pfullendorf

Universitäre Ausbildung :

1995 bis 2002
Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen

September 1997
Ärztliche Vorprüfung

September 1998
Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

April 2001
Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

10/2001 bis 9/2002
Praktisches Jahr an der Kreisklinik Reutlingen
Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Tübingen
(Innere Medizin, Chirurgie, Radiologie)

20. November 2002
Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Veröffent- lichung :

Wolf SC, Amend T, Risler T, Amann K, Brehm BR
Influence of endothelin receptor antagonists on myocardial protein kinase C isoforms in uraemic cardiomyopathy
Clinical Science 2002 Sep 1; 103 Suppl 1: 276S-279S