

# **Der Einfluss von körperlicher Aktivität auf renale Umbauprozesse in spontan hypertensiven Ratten**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

**Katja Braun**  
aus Gießen

Gießen 2018

Aus dem Physiologischen Institut,  
Direktor: Prof. Dr. R. Schultz,  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. K.-D. Schlüter

Gutachter: PD Dr. O. Dörr

Tag der Disputation: 16.05.2019



## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Arterielle Hypertonie und ihre Folgen.....	1
1.2 Arterielle Hypertonie und die Niere .....	1
1.2.1 Blutdruckregulation .....	1
1.2.2 Arterielle Hypertonie .....	2
1.2.3 Hypertensive Nephropathie.....	2
1.2.4 Prophylaxe und Therapie.....	3
1.2.4.1 Angiotensin-Converting-Enzym (ACE)-Hemmer.....	4
1.2.4.2 Sport.....	5
1.3 Versuchstiere.....	6
1.3.1 Spontan hypertensive Ratten.....	6
1.3.2 Wistar Hannover Ratten.....	6
1.4 Nierenfunktion und Molekulare Parameter.....	7
1.4.1 Nierenretentionsparameter .....	7
1.4.2 Extrazellulärmatrix .....	7
1.4.3 Ornithindecaboxylase .....	9
1.4.4 Parathormon-related Protein.....	10
1.4.5 Renin-Angiotensin-Aldosteron-System.....	12
1.5 Fragestellung.....	14
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>15</b>
2.1 Studiendesign.....	15
2.2 Tierkollektiv und Probenmaterial.....	16
2.2.1 Tierkollektiv.....	16
2.2.2 Probenmaterial .....	16
2.3 Allgemeines Material .....	17
2.3.1 Tierhaltung.....	17
2.3.2 Allgemeine Laborgeräte.....	17
2.3.3 Allgemeine Verbrauchsmaterialien.....	17
2.3.4 Chemikalien.....	18
2.3.5 Primer.....	19
2.3.6 Antikörper .....	19
2.3.7 EDV und Statistik.....	20
2.4 Methoden und spezielles Material.....	20
2.4.1 Blutdruckmessung, Trainingsparameter und Gewicht .....	20
2.4.1.1 Blutdruckmessung nach Riva-Rocci.....	21

2.4.1.2	Medikamentengabe.....	21
2.4.1.3	Trainingsparameter.....	21
2.4.1.4	Gewicht.....	21
2.4.2	Nierenfunktion.....	22
2.4.3	Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR).....	23
2.4.3.1	RNA-Isolation.....	23
2.4.3.2	cDNA-Synthese .....	24
2.4.3.3	RT- PCR .....	25
2.4.4	Western Blot (WB).....	26
2.4.4.1	Proteinisolation aus Nierengewebe .....	26
2.4.4.2	Gelelektrophorese.....	27
2.4.4.3	Proteintransfer .....	28
2.4.4.4	Immunoblot .....	29
2.4.5	Histologie.....	29
2.4.5.1	Siriusrot-Färbung .....	30
2.4.5.2	Lichtmikroskopie .....	30
2.4.6	Statisik.....	31
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>32</b>
3.1	Der Einfluss von Bluthochdruck.....	32
3.1.1	Blutdruck und Herzfrequenz.....	32
3.1.2	Körpergewicht.....	34
3.1.3	Nierengewicht und – funktion.....	34
3.1.4	Strukturproteine und Fibrosemarker.....	36
3.1.5	ODC und PTHrP-Rezeptor.....	39
3.1.6	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System.....	41
3.2	Der Einfluss körperlicher Aktivität auf normotensive und hypertensive Ratten	42
3.2.1	Blutdruck und Herzfrequenz.....	42
3.2.2	Laufdaten.....	43
3.2.3	Körpergewicht.....	44
3.2.4	Nierengewicht und – funktion.....	45
3.2.5	Strukturproteine und Fibrosemarker.....	46
3.2.6	ODC und PTHrP-Rezeptor.....	49
3.2.7	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System.....	51
3.3	Der Einfluss von Captopril und körperlicher Aktivität auf normotensive und hypertensive Ratten.....	52
3.3.1	Blutdruck und Herzfrequenz.....	52
3.3.2	Laufdaten.....	53

3.3.3	Gewicht.....	54
3.3.4	Nierengewicht und – funktion.....	54
3.3.5	Strukturproteine und Fibrosemarker.....	56
3.3.6	ODC und PTHrP-Rezeptor.....	60
3.3.7	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System.....	61
<b>4.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>62</b>
4.1	Bluthochdruck unter körperlicher Aktivität.....	62
4.2	Der Einfluss von körperlicher Aktivität auf bluthochdruckbedingte Adaptionsmechanismen der Niere.....	62
4.2.1	Nierenfunktion.....	63
4.2.2	Strukturproteine und Fibrosemarker.....	64
4.2.3	ODC .....	66
4.2.4	PTHrP-Rezeptor .....	67
4.3	Der Einfluss von Captopril auf bluthochdruck- und trainingsbedingte Adaptionsmechanismen der Niere.....	69
4.3.1	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System.....	69
4.3.2	Nierenfunktion.....	70
4.3.3	Strukturproteine und Fibrosemarker.....	70
4.3.4	ODC .....	71
4.3.5	PTHrP-Rezeptor .....	71
4.4	Schlussfolgerung.....	72
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>73</b>
<b>6.</b>	<b>Summary.....</b>	<b>74</b>
<b>7.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>75</b>
<b>8.</b>	<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>78</b>
8.1	Abbildungen .....	78
8.2	Tabellen.....	79
<b>9.</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>80</b>
<b>10.</b>	<b>Publikationsverzeichnis.....</b>	<b>94</b>
<b>11.</b>	<b>Erklärung zur Dissertation.....</b>	<b>95</b>
<b>12.</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>96</b>

# **1. Einleitung**

## **1.1 Arterielle Hypertonie und ihre Folgen**

Erhöhter Blutdruck führt jährlich weltweit zu geschätzten 9,4 Millionen Todesfällen und ist damit einer der wichtigsten globalen Risikofaktoren für Morbidität und Mortalität (65). Die Prävalenz der arteriellen Hypertonie liegt in Europa zwischen 30 % und 45 % und steigt mit dem Lebensalter an (73). Im Rahmen der bundesweiten Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1) lag bei 29,9 % der Frauen und 33,3 % der Männer eine Hypertonie vor (80). Damit hat fast jeder dritte Erwachsene einen nachgewiesenen Bluthochdruck.

Mit einer arteriellen Hypertonie steigt das Risiko von typischen Folge- und Begleiterkrankungen, wie Retinopathie, koronare Herzkrankheit, Linksherzinsuffizienz sowie zerebrovaskuläre Schädigungen im Sinne von Schlaganfällen oder Blutungen. Des Weiteren können sich auf dem Boden atherosklerotischer Veränderungen Aneurysmata und arterielle Verschlusskrankheiten entwickeln (36).

Im Rahmen der Pathophysiologie der arteriellen Hypertonie nimmt die Niere eine besondere Rolle ein: sie kann sowohl Ursache des Bluthochdrucks als auch Zielorgan einer hypertensiven Endorganschädigung sein. Diese Schäden sind neben dem Diabetes die häufigste Ursache für eine terminale Niereninsuffizienz (54).

## **1.2 Arterielle Hypertonie und die Niere**

### **1.2.1 Blutdruckregulation**

Der arterielle Blutdruck wird maßgeblich durch das Herzzeitvolumen und den peripheren Widerstand bestimmt. Über diese Stellgrößen kann der Körper den Blutdruck weitestgehend konstant halten und auf Druckschwankungen reagieren. Dabei werden kurzfristige, sowie mittel- und langfristige Mechanismen zur Blutdruckregulation unterschieden.

Kurzfristige Veränderungen werden meist reflektorisch über das vegetative Nervensystem gesteuert. Zu diesem Regelkreis gehören unter anderem die Barorezeptoren, die je nach Gefäßdehnung Einfluss auf das vegetative Nervensystem nehmen und damit peripheren Widerstand und Herzzeitvolumen entsprechend regulieren.

Zu den mittel- bis langfristigen Anpassungsmechanismen zählen das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) und die Regulation des extrazellulären Volumens über den Elektrolyt-Wasser-Haushalt (55). Diese Systeme werden im Wesentlichen durch die Niere gesteuert und beeinflusst.

Sinkt der arterielle Druck in den Nieren wird Renin aus dem juxtaglomerulären Apparat freigesetzt und führt zu einer vermehrten Bildung von Angiotensin I, das dann durch das Angiotensin-Konversionsenzym (ACE) zu Angiotensin II transformiert wird. Das Gewebshormon Angiotensin II wirkt vasokonstriktorisch und bewirkt eine Ausschüttung von Vasopressin, Aldosteron und Adrenalin. Aldosteron fördert u.a. die Natriumrückresorption und damit eine Wasserretention. Diese Mechanismen steigern den Blutdruck und wirken einer Minderperfusion entgegen.

### **1.2.2 Arterielle Hypertonie**

Definitionsgemäß gilt ein systolischer Blutdruck  $> 140$  mmHg und/oder ein diastolischer Blutdruck  $> 90$  mmHg als arterielle Hypertonie. Die Mehrzahl der Patienten leidet unter der primären Form der Hypertonie (90%). Bei der sogenannten essentiellen Hypertonie sind keine sekundären Krankheitsursachen nachweisbar. Es handelt sich um eine multifaktorielle, polygene Erkrankung. Als Risikofaktoren für die Entstehung einer essentiellen Hypertonie gelten Rauchen, erhöhter Alkoholkonsum, zunehmendes Alter, Übergewicht und körperliche Inaktivität (73, 9). Neben der medikamentösen Behandlung stellen somit Änderungen im Lebensstil eine wichtige Säule der antihypertensiven Therapiestrategien dar. So wird als Basistherapie allgemein eine Gewichtsreduktion, ein Beenden des Nikotinkonsums, eine salzarme Diät, ein moderater Alkoholkonsum und körperliche Aktivität empfohlen (73).

### **1.2.3 Hypertensive Nephropathie**

Die hypertensive Nephropathie ist zweithäufigste Ursache einer terminalen Niereninsuffizienz und erhöht das Risiko für diese um das 20fache (54). Als Risikofaktoren sind eine langjährige arterielle Hypertonie, positive Familienanamnese, männliches Geschlecht, Mikroalbuminurie, Diabetes mellitus, linksventrikuläre Hypertrophie, Alter  $> 50$ , Rauchen und ethnische Abstammung zu nennen. Es werden drei Stadien unterschieden:

1. Mikroalbuminurie (30 – 300 mg/Tag)
2. Benigne hypertensive Nephrosklerose mit Albuminurie ( $> 300$  mg/Tag)
3. Niereninsuffizienz bei arterio-arteriolosklerotischen Schrumpfnieren.

Es können pathologisch zwei Formen unterschieden werden: die maligne und die benigne Nephrosklerose. Häufiger ist die benigne Nephrosklerose, welche mit mikrovaskulären Veränderungen, wie Hyalinose der glomerulären Arteriolen, Intimaverdickung und Verbreiterung der Lamina elastica interna einher geht. Sie ist gekennzeichnet durch einen langsamen Krankheitsverlauf und führt nur selten zu einer terminalen Niereninsuffizienz. Bei der malignen Nephrosklerose kommt es histologisch zu fibrinoiden Nekrosen und myointimalen Hyperplasien verursacht durch exzessiven Bluthochdruck (110). Diese führen im Verlauf zu einem Verlust der Autoregulation in den afferenten Arteriolen und somit zu einer intraglomerulären Druckbelastung. Eine fokale segmentale Glomerulosklerose (FSGS) und glomeruläre Hypertrophien sind die Folge (77). Die entstehende interstitielle Fibrose kann über eine chronische Hypoxie im Bereich des Tubulointerstitiums erklärt werden, die profibrotisch auf Tubuluszellen, interstitielle Fibroblasten und Endothelzellen wirkt. Die Ursachen dieser Hypoxie sind multifaktoriell. Dazu zählen eine Imbalance vasoaktiver Substanzen, eine renale Anämie und ein gesteigerter Metabolismus tubulärer Zellen. Ein fortgeschrittener tubulointestinaler Schaden ist mit dem Verlust peritubulärer Kapillaren und Fibrose verbunden, die wiederum die Sauerstoffversorgung der umliegenden Zellen verschlechtert. Es resultieren Atrophien und Nekrosen, die wiederum profibrotisch wirken - ein Circulus vitiosus (78).

Klinisch lässt sich als erster Hinweis auf eine renale Schädigung eine Mikroalbuminurie feststellen (110). Die Diagnose wird bei langjähriger Hochdruckanamnese mit neu aufgetretener Proteinurie und steigenden Retentionsparametern sowie hypertensiven Folgeschäden anderer Organsysteme gestellt.

#### **1.2.4 Prophylaxe und Therapie**

Die aktuellen europäischen Leitlinien für das Management der arteriellen Hypertonie stellen die Früherkennung und Prävention in den Mittelpunkt. Eine Blutdruck-Screening-Messung wird bei einem Blutdruck < 120/80 mmHg alle fünf Jahre und bei hochnormalem Blutdruck (130–139/85–89 mmHg) mindestens jährlich empfohlen (120).

Die Therapie der arteriellen Hypertonie richtet sich nach der Höhe des Blutdrucks und dem Vorliegen von Risikofaktoren, Endorganschäden, Diabetes mellitus und kardiovaskulären oder renalen Erkrankungen. Aus diesen Faktoren lässt sich das kardiovaskuläre Gesamtrisiko abschätzen. Bereits ab einem hochnormalen Blutdruck (130–139/85–89 mmHg) und 1-2 Risikofaktoren werden Lebensstil-ändernde Maßnahmen empfohlen. Dies beinhaltet:

- Eine Einschränkung der Kochsalzzufuhr auf 5-6 g pro Tag.
- Eine Beschränkung des Alkoholkonsums auf nicht mehr als 20-30 g Alkohol pro Tag bei Männern und nicht mehr als 10-20 g pro Tag bei Frauen.
- Ein erhöhter Konsum von Gemüse, Früchten und Milchprodukten mit niedrigem Fettgehalt.
- Eine Gewichtsreduktion auf einen BMI von 25 kg/m<sup>2</sup> und einen Taillenumfang von < 102 cm bei Männern und < 88 cm bei Frauen.
- Regelmäßige Bewegung, z.B. moderates dynamisches Training für mindestens 30 Minuten an 5 bis 7 Tagen pro Woche.
- Eine Raucherberatung, mit dem Ziel das Rauchen zu beenden.

Eine zusätzliche medikamentöse Therapie ist ab einem Blutdruck > 140/90 mmHg indiziert. Zur Auswahl stehen Diuretika, Betablocker, Calciumantagonisten, Angiotensin-Converting-Enzym (ACE)-Hemmer und Angiotensin-Rezeptorblocker (ARB). Je nach Grunderkrankung, Kontraindikation und Begleiterkrankungen sind einzelne Antihypertensiva zu bevorzugen (68).

Endorganschäden, wie die hypertensive Nephropathie, verlaufen meist ohne klinische Symptome und führen oft zu einer chronischen Niereninsuffizienz. Zu den Frühzeichen gehören die Albuminurie und eine reduzierte glomeruläre Filtrationsrate (GFR). Diese Parameter dienen nicht nur der Einschätzung der renalen Situation, sondern auch des kardiovaskulären Gesamtrisikos. Ab einer Albuminurie > 10 mg/Tag, beziehungsweise eine Albumin-Kreatinin-Ratio von > 10 mg/g steigt das Risiko einer Niereninsuffizienz und kardiovaskulärer Komplikationen (69, 1).

Bei bestehender arterieller Nephropathie wird eine konsequente Blutdruckeinstellung < 130/80 mmHg empfohlen (73). Substanzklasse der ersten Wahl sind ACE-Hemmer, ARB und direkte Renin-Inhibitoren, deren nephroprotektive Wirkung belegt ist (73). Über die Beeinflussung des RAAS wird die Proteinurie und die Progression der Niereninsuffizienz im Vergleich zu Antihypertensiva anderer Substanzklassen effektiver gehemmt (29, 51).

#### **1.2.4.1 Angiotensin-Converting-Enzym (ACE)-Hemmer**

Zur Medikamentengruppe der ACE-Hemmer gehört unter anderem das Antihypertensivum Captopril. Als Inhibitor des Angiotensin-Converting-Enzyms hemmt es die Bildung von Angiotensin II aus Angiotensin I. Dadurch sinkt die Konzentration von Angiotensin II und Aldosteron. Indiziert ist Captopril bei einer arteriellen Hypertonie

zur Blutdrucksenkung, bei Herzinsuffizienz im Besonderen nach Myokardinfarkt um ein Remodelling günstig zu beeinflussen und zur Nephroprotektion bei diabetischer Nephropathie.

#### **1.2.4.2 Sport**

Es ist allgemein anerkannt, dass regelmäßige körperliche Aktivität positive kardiovaskuläre Effekte auf die Entwicklung und Behandlung von Bluthochdruck und seine Folgeschäden hat.

Die aktuellen Leitlinien für das Management der arteriellen Hypertonie (120) empfehlen in jedem Stadium der arteriellen Hypertonie regelmäßige körperliche Aktivität. Der Trainingsumfang ist nur ungenau definiert. Es wird beispielhaft zu Ausdauersport (Schwimmen, Laufen, Joggen) für mindestens 30 Minuten an 5-7 Tagen pro Woche geraten.

Im Rahmen der arteriellen Hypertonie nimmt die Niere eine besondere Rolle ein da sie sowohl Ursache als auch Zielorgan im Sinne einer hypertensiven Endorganschädigung sein kann. Ein erhöhter Blutdruck gilt als wesentlicher Risikofaktor für die Entstehung einer chronischen Nierenerkrankung (30). Die genauen Auswirkungen von körperlichem Training auf bluthochdruckbedingte Nierenschäden sind jedoch weiterhin unklar.

So konnte einerseits ein blutdrucksenkender Effekt durch Training beobachtet und renoprotektive Adaptionsmechanismen dokumentiert werden (2, 15, 30, 45). Andererseits gibt es jedoch auch, je nach Alter und Trainingsintensität, Hinweise auf einen schnelleren Progress hypertensiver Nierenschäden (18). Besonders kontrovers ist die Datenlage in Bezug auf die Auswirkung von regelmäßiger körperlicher Aktivität auf den Verlauf chronischer Nierenerkrankungen (7). Kuru et al. konnten eine Zunahme der histopathologischen Nierenschäden (arterielle Wandverdickung, fokale Tubulusathrophien, interstitielle entzündliche Infiltrate) in trainierten spontan hypertensiven Ratten (SHR) unter NO-Inhibition (N-Nitro-L-arginin-methylesterhydrochlorid) nachweisen (63). Regelmäßige Bewegung bewirkte dagegen in einigen Studien eine Abnahme der Glomerulosklerose am niereninsuffizienten Tiermodell (59). Des Weiteren gibt es Hinweise darauf, dass körperliche Aktivität in den Nieren normotensiver Ratten andere Anpassungsvorgänge induziert als in den hypertensiven Kontrollen. Trainierte SHR zeigten einen Abfall der Kreatininclearance, eine erhöhte Natriu- und Kaliurese sowie eine verminderte Angiotensin-II-Rezeptor Subtyp 1 (AT<sub>1</sub>-R) Expression im Gegensatz zu den normotensiven Kontrollen (15). Auch Ito et al. (2013)

wiesen nach, dass körperliche Aktivität oxidativen Stress in SHR reduzieren und gleichzeitig in normotensiven Ratten erhöhen kann.

### **1.3 Versuchstiere**

#### **1.3.1 Spontan hypertensive Ratten**

Die spontan hypertensive Ratte (SHR) ist das am häufigsten genutzte Tiermodell zur Erforschung der essentiellen Hypertonie und seiner Folgeschäden (62, 90). Der SHR-Stamm wurde 1963 erstmalig von Okamoto und Aoki durch die Kreuzung von Wistar Kyoto Ratten mit erhöhtem Blutdruck gezüchtet (83). Die Hypertonie wird polygenetisch vererbt (92). Die Tiere entwickeln nach 12-14 Wochen einen Bluthochdruck mit systolischen Werten zwischen 180 und 200 mmHg. Die weiblichen Ratten sind durch niedrigere systolische Blutdruckwerte von 175 mmHg gekennzeichnet (22, 90). Die ersten hypertensiven Nierenschäden sind ab der 30. Lebenswoche nachweisbar und nehmen mit dem Alter zu. In der 60. Lebenswoche sind ausgedehnte schwere Nierenschäden zu finden, die aber nicht immer zu einem Nierenversagen führen. Da die histomorphologischen Veränderungen denen des Menschen sehr ähnlich sind, ist die spontan hypertensive Ratte ein etabliertes Tiermodell zur Untersuchung der hypertensiven Nephropathie (62, 125). Die Nierenschäden umfassen renale Vaskulopathien, Tubulusatrophien, interstitielle Fibrose, Glomerulopathien mit begleitender Proteinurie und inflammatorische Infiltrationen (39).

Diese entstehen einerseits direkt durch den erhöhten Perfusionsdruck (91), andererseits durch eine überschießende Aktivierung des RAAS (58, 79). Der Einfluss des sympathischen Nervensystems scheint das Fortschreiten der Erkrankung weiter zu unterstützen (31).

#### **1.3.2 Wistar Hannover Ratten**

Die Wistar Hannover Ratten sind ein Albino-Ratten-Stamm, der in der Forschung weit verbreitet ist. Durch ihre Langlebigkeit und geringe Inzidenzrate an Spontantumoren eignen sie sich besonders für Langzeitstudien. Häufig wird bei Studien an SHR als normotensives Vergleichskollektiv die Wistar Kyoto Ratten eingesetzt. Diese zeigen aber im Vergleich zu den Wistar Hannover Ratten je nach Lieferant Unterschiede in den Blutdruckwerten und in der Wachstumsrate (62).

## 1.4 Nierenfunktion und Molekulare Parameter

### 1.4.1 Nierenretentionsparameter

Retentionsparameter sind im Blut quantitativ bestimmbare Substanzen, die bei abnehmender Nierenfunktion akkumulieren. Sie dienen der Diagnostik und Verlaufskontrolle von Nierenerkrankungen. Dazu gehören die harnpflichtigen Substanzen Kreatinin und Harnstoff, der Harnstoff-Stickstoff und das Protein Cystatin C. Die gemessenen Konzentrationen im Serum lassen Rückschlüsse auf die aktuelle GFR zu. Im klinischen Alltag wird häufig die Kreatininkonzentration im Blut zur Bestimmung der GFR genutzt. Kreatinin fällt hauptsächlich als Produkt des Muskelstoffwechsels an und wird in der Niere frei filtriert, nicht reabsorbiert und bis zu 15% aktiv sezerniert. Als Nachteil anzusehen ist, dass die Kreatininwerte erst ab einer 50%igen GFR-Einschränkung zuverlässig steigen. Daher ist dieser Parameter zur Früherkennung von Nierenfunktionseinschränkungen ungeeignet. Bei unterschiedlicher Muskelmasse sind die Werte nicht vergleichbar. Unter Kachexie und Bettlägerigkeit sind die Kreatininwerte falsch niedrig und bei Trainierten falsch hoch. Daher wurde für diese Arbeit der Blut-Harnstoff-Stickstoff (BUN) als Parameter der Nierenfunktion gewählt. Dabei wird der im Harnstoff enthaltende Stickstoffanteil gemessen und in mg/dl angegeben. Der Normwert für den Menschen liegt zwischen 6 – 25 mg/dl. Harnstoff ist ein Abbauprodukt des Proteinstoffwechsels und wird ebenfalls frei filtriert aber nur zu 40 % ausgeschieden. Die Harnstoffclearance ist direkt abhängig von GFR und Diurese und eignet sich daher als Maß für die Nierenfunktion. Bei starken Veränderungen im Proteinstoffwechsel wie z.B. bei proteinreicher Diät, ausgedehnten gastrointestinalen Blutungen, Kortisontherapie oder ausgedehntem Gewebezerfall können die Werte falsch erhöht sein. Bei Lebererkrankungen, niedriger Proteinzufuhr und kataboler Stoffwechsellage sind die BUN-Werte reduziert (114). In den SHR liegen die Normwerte in der 8. bis 30. Lebenswoche zwischen 12 und 25 mg/dl, wobei die weiblichen Tiere niedrigere Werte zwischen 12 – 17 mg/dl aufweisen (28, 52).

### 1.4.2 Extrazellulärmatrix

Ein Hauptmerkmal der hypertensiven Nephrosklerose ist die interstitielle Fibrose. Diese ist durch eine Anreicherung von extrazellulärer Matrix (ECM) gekennzeichnet. Kollagen als eines der Hauptbestandteile der ECM ist nicht nur Strukturprotein, sondern auch wichtig für Zelldifferenzierung, -wachstum und Zelladhäsion (3). Ein Frühzeichen der Fibrose ist die Entstehung und Anreicherung von Myofibroblasten aus Fibroblasten im

Interstitium. Myofibroblasten produzieren vorwiegend Kollagen I, III und Fibronectin, dessen Akkumulation zur interstitiellen Fibrose führt (76).

SHR sind ein etabliertes Tiermodell zur Untersuchung der arteriellen Hypertonie und einer natürlich entstehenden terminalen Niereninsuffizienz (39, 125). Ab der 30. Woche sind erste glomeruläre und arteriosklerotische Veränderungen nachweisbar. Parallel entwickelt sich eine Albuminurie, die altersabhängig steigt (25). Der Grad der Glomerulosklerose und damit die hypertensiven Nierenschäden sind progredient, führen aber nicht immer zu einer Niereninsuffizienz. 60-70 Wochen alte SHR zeigen histologisch eine schwere Nephrosklerose verbunden mit renalen und hämodynamischen Veränderungen (39, 40). Dazu gehören ein erhöhter intraglomerulärer Druck, ein reduzierter renaler Plasmafluss und eine steigende Filtrationsfraktion mit begleitender Proteinurie (125).

Kollagen I, III und Fibronectin sind die Hauptbestandteile der Extrazellulärmatrix, die im Laufe einer entstehenden Fibrose vermehrt gebildet werden, und dienen somit als Marker für den Verlauf (40, 124). Darüber hinaus gilt eine hohe Kollagen-1-Genexpression als ein unabhängiger Prädiktor für ein reduziertes renales Outcome (112).

Der Transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) ist ein ubiquitär vorkommendes Zytokin. Als Signalmolekül hat es para- und autokrine Wirkung auf Zellwachstum, Zelldifferenzierung, Entzündungs- und Regenerationsprozesse (16). So kann TGF- $\beta$  unter anderem die Expression von Fibronectin und Kollagen-1 in Fibroblasten und deren Integration ins Gewebe steigern (44). TGF- $\beta$ 1 induziert nicht nur die Synthese der ECM-Komponenten, sondern hemmt auch gleichzeitig deren Abbau (67). Aufgrund dieser profibrotischen Wirkung wird TGF- $\beta$ 1 eine zentrale Rolle bei der Entstehung der renalen Fibrose zugeschrieben. Die Expression ist im Rahmen chronischer Nierenerkrankungen entsprechend hochreguliert (10).

Das Glykoprotein Fibronectin ist wichtig für Zelladhäsion, -migration, -wachstum und -differenzierung. Splicevarianten des Fibronectin haben eine prognostische Funktion für das Ausmaß einer renalen Fibrose (23).

Die Proteoglykane Decorin und Biglycan sind biologisch aktive Strukturproteine und können gebunden an Matrixkomponenten oder löslich vorliegen. Small-Leucine-Rich-Proteoglykans (SLRP) beeinflussen Struktur und Anordnung der ECM und sind an Zelldifferenzierung, -proliferation und -apoptose beteiligt. Decorin wird durch renale Fibroblasten produziert, akkumuliert in der ECM bei fibrotischen Prozessen und zeigte sich als guter Marker für einen Progress chronischer Nierenerkrankungen. Ein Hauptbindungspartner ist Kollagen-1, dessen Anordnung dadurch beeinflusst wird. Bei

der tubulointerstitiellen Fibrose liegt Decorin vermehrt in gebundener Form vor und verliert damit seine Funktion als lösliches Signalmolekül. In dieser Form ist es in der Lage TGF- $\beta$  zu neutralisieren oder über verschiedene Rezeptoren antiapoptotisch zu wirken. Zusammenfassend wird Decorin eine antifibrotische Wirkung über die Interaktion mit TGF- $\beta$  und rezeptorvermittelte Signalkaskaden zugeschrieben. Biglycan kann ebenfalls an Kollagen-1 binden und ist bei fibrotischen Veränderungen hochreguliert. Eine vermehrte Expression kann durch TGF- $\beta$  induziert werden. Es gibt Hinweise darauf, dass Biglycan an profibrotischen und inflammatorischen Prozessen verschiedener Nierenerkrankungen beteiligt ist (102).

### 1.4.3 Ornithindecaboxylase

Die Ornithindecaboxylase (ODC) ist neben der Adenosylmethionindecaboxylase das geschwindigkeitsbestimmende Schlüsselenzym der Polyamin-Biosynthese. Sie katalysiert die Reaktion von L-Ornithin zu Putrescin und CO<sub>2</sub>. Zu den Polyaminen gehören Putrescin und die daraus entstehenden biogenen Amine Spermin und Spermidin. Aufgrund ihrer stabilisierenden Wirkung auf neusynthetisierte Desoxyribonukleinsäure (DNA), Ribonukleinsäure (RNA) und Membranlipide sind sie essentiell für Zellwachstum, -differenzierung und die Proteinbiosynthese (89). ODC hat eine sehr kurze Halbwertszeit (10 – 60 min) und wird ubiquitinunabhängig durch das Protein Antizym destabilisiert und im Proteasom abgebaut (8). Eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren und Onkogenen können die ODC-Expression und Aktivität erhöhen (88). Welche Rolle ODC im Rahmen chronischer Nierenerkrankungen einnimmt, ist aktuell wenig erforscht. Eine renale Expressionserhöhung wurde im Rahmen von Diabetes (86), nach einseitiger Nephrektomie (6, 42), sowie nach der Injektion von Testosteron, Wachstumshormonen und Hydrokortison nachgewiesen (100). Die durch den Diabetes bedingte Nierenhypertrophie wird durch die erhöhte ODC-Aktivität direkt beeinflusst und kann durch eine ODC-Hemmung aufgehalten werden (87, 113). Um den Zusammenhang zwischen der Entstehung von arteriellem Bluthochdruck und dem Einfluss der Polyamine zu untersuchen, wurde häufig der spezifische ODC-Inhibitor Difluoromethylornithine (DFMO) eingesetzt. In SHR bewirkt DFMO eine Reduktion der erhöhten Polyaminkonzentration in den arteriellen Gefäßen, sowie eine Senkung des Blutdrucks und der hypertensionbedingten Gefäßschäden (21, 109). Nach Angiotensin-II Infusionen erhöht sich neben dem Blutdruck die Polyaminkonzentration in den Gefäßen von Wistar-Kyoto Ratten. Dieser Effekt kann durch DFMO deutlich reduziert werden (43).

Zu den Auswirkungen von Sport auf die renale ODC-Expression gibt es zurzeit keine Daten. Sowohl im Herzmuskel als auch im Skelettmuskel steigt die ODC-Aktivität durch körperliche Aktivität (115, 116).

#### 1.4.4 Parathormon-related Protein

Das Parathormon-related Protein (PTHrP) gehört zur Familie der Parathormone (PTH). Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zum PTH aktiviert es ebenfalls den Typ-I-PTH/PTHrP-Rezeptor (PTH1-R). Die Auswirkungen auf Knochen und Nieren zur Aufrechterhaltung der Calciumhomöostase sind dementsprechend identisch. Dennoch wurden grundlegende Unterschiede zwischen diesen Proteinen beschrieben.

Das PTHrP-Gen ist deutlich komplexer, besteht aus neun unterschiedlichen Exons und kann damit zu zwölf verschiedenen Transkripten führen. Beim Menschen können gewebsspezifisch drei initiale Translationsprodukte unterschieden werden, während bei der Ratte nur eins beschrieben ist. Durch alternatives Spleißen entstehen beim Menschen drei Isoformen: PTHrP (1–36), PTHrP (38–94) und PTHrP (107–139) (105). Während PTH als klassisches endokrines Hormon aus der Nebenschilddrüse freigesetzt wird, wirkt PTHrP überwiegend para-/auto-/intrakrin und ist nahezu in jedem Gewebe nachweisbar (17, 24, 61, 104).

Ausschließlich PTHrP (1–36) kann neben PTH an den PTH1-R binden. Der PTH1-Rezeptor gehört zu den G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren. Meist wird über das  $G\alpha_s$ -Protein der Cyclo-AMP/Proteinkinase A(cAMP/PKA)-Signal-Weg aktiviert. Eine Desensibilisierung konnte bei wiederholter Aktivierung beobachtet werden (5).

Die Halbwertszeit der PTHrP-mRNA liegt zwischen 30 Minuten und 3 Stunden. Diese kann durch verschiedene Faktoren wie zum Beispiel TGF- $\beta$  beeinflusst werden (70).

In den letzten Jahren wurden zahlreiche physiologische Eigenschaften des PTHrP entdeckt. So wirkt PTHrP unter anderem als Wachstums- und Differenzierungsfaktor, als Vasodilatator und kalziotropes Hormon in den unterschiedlichsten Organsystemen (17). Eine Übersicht gibt eine Tabelle von Schlüter und Ross (2006):

**Tab. 1: Gewebespezifische Wirkungen von PTHrP**

Organ	Wirkung	Wirkmechanismus
<b>Knorpel</b>	Differenzierung	Intrakrin
<b>Knochen</b>	Osteolyse	Parakrin
<b>Haut/Haare</b>	Differenzierung	Autokrin/Parakrin
<b>Glatter Muskel</b>	Relaxation	Autokrin/Parakrin

<b>Endothel</b>	Apoptosetoleranz	Intrakrin
<b>Plazenta</b>	Wachstum	Intrakrin
<b>Herz (-muskel)</b>	Inotropie Chronotropie	Parakrin
<b>Brust/Laktation</b>	Ca <sup>2+</sup> -Transport in die Milch	Autokrin/Endokrin
<b>Niere</b>	Kalziumtransport Phosphattransport Renaler Blutfluss	Parakrin
<b>Lunge</b>	Surfactantbildung Differenzierung	Autokrin/Endokrin
<b>Magen-Darmtrakt</b>	Motilität, Differenzierung	Autokrin
<b>Leber</b>	Akut-Phase- Antwort	Parakrin
<b>Pankreas</b>	Differenzierung	Parakrin
<b>Nebenschilddrüse</b>	PTH-Freisetzung	Autokrin
<b>Zentralnervensystem</b>	ADH-Freisetzung Blutdruckregulation	Autokrin

PTHrP und der PTH1-R sind im gesamten Nierenparenchym und dem renalen Gefäßsystem nachweisbar (24, 96, 104). Die regulatorische Wirkung von PTHrP auf Glomeruli, Tubulusepithelzellen und Gefäßsystem sind in den letzten Jahren näher untersucht worden. Im Tubulussystem fördert es die Calciumreabsorption und inhibiert die Phosphat- und Bicarbonatreabsorption. PTHrP hat einen relaxierenden und proliferativen Effekt auf glatte Gefäßmuskelzellen. Durch mechanischen Stress und Vasokonstriktoren wie Angiotensin II, Serotonin und Bradykinin kann die Genexpression induziert werden. PTHrP wirkt somit als lokaler vasodilatierender Gegenspieler im kardiovaskulären System (CVS) (17, 24, 61, 104) und scheint eine Rolle bei der Entstehung der Hypertonie zu spielen.

In der Niere gilt PTHrP als potentester renaler Vasodilatator und steigert damit den renalen Blutfluss und die GFR. Durch die Induktion der Reninsekretion in den juxtaglomerulären Zellen nimmt PTHrP weiteren Einfluss auf Blutdruckregulation und Wasserhaushalt. (17, 24, 101)

Im Rahmen von Nierenschäden, -ischämien, bei chronischem oder akutem Nierenversagen, Nephropathien und Glomerulonephritiden wird PTHrP vermehrt

exprimiert, während der PTH1-Rezeptor supprimiert wird (17, 24, 74, 98). An Modellen zum akuten Nierenversagen wurde zudem der mitogene und regenerierende Effekt des PTHrP nach renalen Schäden deutlich (98, 107). Zunächst wurde dem PTHrP durch seine proliferative Wirkung auf Mesangium- und Tubulusepithelzellen eine renoprotektive Rolle zugeschrieben. In nachfolgenden Studien zur diabetischen Nephropathie zeigte sich jedoch, dass die Überexpression von PTHrP und seinem Rezeptor zu einer renalen Hypertrophie, Proteinurie und einem verschlechterten Outcome führte. Angiotensin II bewirkt diese PTHrP-Erhöhung, welche wiederum die TGF- $\beta$ -Expression induziert und für die Hypertrophie von Podozyten und Mesangiumzellen verantwortlich ist (95, 96). An diversen experimentellen Modellen zum akuten Nierenversagen konnten für PTHrP sowohl proinflammatorische als auch profibrotische Effekte nachgewiesen werden (84, 94).

Studien am hypertensiven Tiermodell lassen vermuten, dass PTHrP an der Entstehung genetisch bedingten Bluthochdrucks maßgeblich beteiligt sein könnte. An transgenen Mäusen konnte der hämodynamische Einfluss im Sinne einer Blutdrucksenkung durch eine selektive PTHrP-Überexpression bereits gezeigt werden (93). In SHR ist die PTHrP-Expression sowohl in den aortalen Gefäßen (81) als auch in den renalen Gefäßen erhöht (75). Im Gegensatz dazu ist der PTH1-R in der Niere um 65% herunterreguliert und führt zu einem erhöhten renovaskulären Widerstand (RVR) (75). Insgesamt scheint die vasodilatierende Eigenschaft von PTHrP in den SHR gestört (26). Ursächlich ist das in den SHR erhöhte Angiotensin II, das über den AT<sub>1</sub>-R blutdruckunabhängig die PTH1-R-mRNA in den SHR destabilisiert (118). Daher können AT<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten die PTH1-R-Expression in den SHR erhöhen und die PTH1-R-vermittelte renovaskuläre Dilatation wiederherstellen (118).

#### **1.4.5 Renin-Angiotensin-Aldosteron-System**

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) ist ein wichtiger Regelkreislauf zur Regulation von Blutdruck, Wasser- und Elektrolythaushalt. Wird die Kaskade aktiviert, schüttet der juxtaglomeruläre Apparat der Niere das Enzym Renin systemisch aus. Diese Reninfreisetzung kann durch einen niedrigen renalen Perfusionsdruck, eine Hypovolämie, eine Hyponatriämie oder durch hypotonen Harn ausgelöst werden. Das sympathische Nervensystem kann über  $\beta_1$ -Rezeptoren die Reninausschüttung ebenfalls erhöhen. Renin spaltet aus Angiotensinogen Angiotensin I ab. Das ACE katalysiert in einem zweiten Schritt die Reaktion vom Angiotensin I zum Endprodukt und Haupteffektor Angiotensin II. Angiotensin II wirkt vasokonstriktorisch, fördert Durst und Salzappetit, reduziert den renalen Blutfluss und die GFR und stimuliert die

Synthese von Aldosteron in der Nebenniere. Aldosteron wiederum steigert die Natrium- und Wasserrückresorption in der Niere. Beide Enzyme hemmen im Sinne einer negativen Rückkopplung die Reninsekretion. Insgesamt bewirkt das RAAS über diese Mechanismen eine Erhöhung des Blutdrucks und Stabilisierung der Hämodynamik (57).

Es gibt Hinweise, dass eine lokale intrarenale Aktivierung des RAAS an der Pathogenese von Bluthochdruck und Nierenschäden beteiligt ist. In SHR ist der erhöhte renale Angiotensin II-Spiegel auf eine gesteigerte Angiotensinogenproduktion zurückzuführen und wird für die hypertensiven Nierenschäden verantwortlich gemacht. Für diese These spricht, dass die pathologischen Nierenveränderungen durch einen ARB abgeschwächt oder sogar aufgehalten werden können. Im Zusammenhang mit chronischen Nierenerkrankungen ist ebenfalls eine übermäßige Aktivierung des RAAS beschrieben. Angiotensin II wirkt hier profibrotisch und führt zu einer Steigerung des glomerulären Hochdrucks und einer tubulointerstitiellen Hypoxie. (57) Darüber hinaus reduzieren ACE-Hemmer und ARB blutdruckunabhängig die Proteinurie bei chronischer Niereninsuffizienz (56).

Die Effekte von Angiotensin II im Rahmen der Hypertonie werden hauptsächlich über den  $AT_1$ -R vermittelt. Der Rezeptor ist in der gesamten Niere vertreten und unterliegt einer komplexen Regulation, die sich je nach Lokalisation unterscheidet. (79)

Einige Studien untersuchten bereits den Einfluss von Sport auf das RAAS. So bewirkt Schwimmtraining in SHR eine Reduktion der renalen  $AT_1$ -R Expression (15) und der Serum-Angiotensin II-Konzentration (123). Durch Ausdauertraining niedriger Intensität wurde nicht nur die Angiotensinogenexpression sondern auch das lokale RAAS in den Nierenarterien der SHR herabreguliert (48). Im Gegensatz dazu beobachteten Maeda et al. (2004) in Rattennieren unmittelbar nach einem Laufradtraining eine RAAS-Aktivierung. Angiotensinogen, ACE und Angiotensin II wurden trainingsbedingt hochreguliert (72).

## 1.5 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war es den Einfluss von erhöhter körperlicher Aktivität auf die renalen Umbauprozesse im Rahmen der arteriellen Hypertonie zu untersuchen. Die arterielle Hypertonie sowie ihre renalen Folgeschäden sind weit verbreitet und haben eine große Bedeutung als „Volkskrankheiten“. Sport, oder besser gesagt ein aktiver Lebensstil, als kostengünstige und vielen zugängliche Therapieoption wird in jedem Stadium der Hypertonie empfohlen. In welchem Umfang und in welchem Rahmen ist jedoch nicht genau definiert. Aktuell gibt es nur wenige Daten wie sich die körperliche Aktivität auf die Niere im Rahmen der Hypertonie auswirkt.

Um neue Erkenntnisse zu dieser Thematik zu gewinnen wurden SHR und Wistar-Ratten im Laufradmodell trainiert und die Nieren auf deren Funktion, Histologie und veränderte Expression wichtiger molekularer Parameter untersucht. Ergänzend wurde der Einfluss einer medikamentösen antihypertensiven Therapie mit der des Trainings verglichen. Des Weiteren stellte sich die Frage welche Bedeutung der Zeitpunkt des Trainingsbeginns und die Trainingsdauer auf die genannten Parameter hat. Zu diesem Zweck wurde einerseits das Alter zu Trainingsbeginn (6 Wochen und 12 Monate) und andererseits die Trainingsdauer (1,5, 3, und 6 Monate) variiert. Somit startete ein Teil der Tiere vor Entwicklung und ein Teil bei etabliertem Hypertonus mit dem Sport.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Studiendesign

In dieser Arbeit wurden insgesamt 36 Wistar Hannover Ratten und 66 SHR untersucht.

**Tab. 2: Einteilung und Kennzeichnung der untersuchten Tiere in Versuchsgruppen.**

Alter	Tier	Trainingsdauer	Medikation	Anzahl (n)	Abk.
1,5 Monate	Wistar			6	W 1,5
	SHR			6	S 1,5
3 Monate	SHR			6	S 3
	SHR	1,5 Monate		6	S 3-R
4,5 Monate	SHR			6	S 4,5
	SHR	3 Monate		6	S 4,5-R
7,5 Monate	Wistar			6	W 7,5
	Wistar	6 Monate		6	W 7,5-R
	SHR			6	S 7,5
	SHR	6 Monate		6	S 7,5-R
18 Monate	Wistar			6	W 18
	Wistar	6 Monate		6	W 18-R
	Wistar		6 Monate	6	W 18-C
	SHR			5	S 18
	SHR	6 Monate		6	S 18-R
	SHR		6 Monate	6	S 18-C
	SHR	6 Monate	6 Monate	6	S 18-CR

Das Körpergewicht und die Laufparameter wurden wöchentlich erhoben. Die Blutdruckwerte wurden in den ersten sechs Wochen ebenfalls wöchentlich gemessen, danach alle zwei Wochen. In den 7,5 Monate und 18 Monate alten Tieren ab der 13./14. Woche nur noch vierwöchentlich.

## **2.2 Tierkollektiv und Probenmaterial**

### **2.2.1 Tierkollektiv**

Die untersuchten Nieren entstammten jeweils aus sechs Wochen bis achtzehn Monate alten weiblichen SHR und Wistar Hannover Ratten. Diese Tiere wurden im Tierstall des Physiologischen Institutes der Justus-Liebig-Universität gezüchtet und unter konstanten Bedingungen (Temperatur  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , Luftfeuchtigkeit  $50 \pm 10\%$ ) bei natürlichem Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Die Tiere hatten zu jeder Zeit freien Zugang zu Trinkwasser und Futtermittel (Teklad Global 18% Protein Rodent Diet).

Die Tiere der Trainingsgruppen wurden einzeln mit freiem Zugang zu einem Laufrad gehalten. Der mit dem Laufrad verbundene Computer zeichnete sämtliche Trainingsparameter auf. Die jeweilige Kontrollgruppe bestand aus 6 bis 7 Tieren, die in Eurostandard Typ III Käfigen auf Einstreu WH - Grade 6 gehalten wurden.

### **2.2.2 Probenmaterial**

#### **Nieren**

Die untersuchten Nieren wurden nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei  $-80^\circ\text{C}$  bis zur Verarbeitung gelagert. Die Tiertötung und Organentnahme der 7,5 und 18 Monate alten Tiere fand im Rahmen der Arbeiten von Da Rebelo et al. (2012) und Horn (2015) statt.

#### **Plasma**

Das Blut wurde nach der Herzentnahme aspiriert und mit Lithiumheparin versetzt. Nach anschließendem Zentrifugieren bei 3.000 rpm für 10 Minuten wurden die Plasmaproben bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

## 2.3 Allgemeines Material

### 2.3.1 Tierhaltung

Einstreu WH - Grade 6	Altromin, Lage-Lippe
Gitterdeckel aus Edelstahl	Tecniplast GmbH, Hohenpeißenberg
Kunststoffkäfige aus Polycarbonat	Tecniplast GmbH, Hohenpeißenberg
Polycarbonat-Tränkeflaschen (720 ml)	Tecniplast GmbH, Hohenpeißenberg
Tränkekappen aus Edelstahl	Tecniplast GmbH, Hohenpeißenberg
Teklad Global 18% Prot. Rodent Diet	Harlan Europe
AGILO-Box 55 I	Rotho Kunststoff AG, Albrück
Bike Computer Topline BC 506	Sigma Elektro GmbH, Neustadt
Laufрад mit Ständer, ø 280 mm	Trixie, Trap

### 2.3.2 Allgemeine Laborgeräte

Homogenisator (Precellys 24)	PEQLAB, Erlangen
Laborwaage	Kern & Sohn GmbH, Balingen
MS2 Minishaker IKA®	IKA-Werke, Staufen
Schüttler	Biometra, Göttingen
UV-Stratalinker®2400	Stratagene, USA
Zentrifugen	Beckman Coulter, USA

### 2.3.3 Allgemeine Verbrauchsmaterialien

Blotterpapier	Biotec-Fischer, Reiskirchen
Einwegskalpell, steril	PFM medical AG, Köln
Glaskapillaren	Bayer, USA
Hamiltonspritze	Hamilton-Bonaduz, Schweiz
iCycler iQ PCR Plates, 96 well	BioRad, München
Kanüle	B.Braun, Melsungen
Leukofix	BSN medical GmbH, Hamburg
Membranen (Nitrocellulose) Protran®	Whatman GmbH, Dassel
MikroSchraubröhre 2ml	SARSTEDT, Nümbrecht
Micro Tubes	SARSTEDT, Nümbrecht
NuPAGE 10% Bis-Tris Gel (15well)	Life Technologies, USA
Pipettenspitzen	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg

Pipetten	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Spritze 10ml	B.Braun, Melsungen
Schwämme	Invitrogen, USA
U-förmige Wells	Greiner bio-one, Frickenhausen

### 2.3.4 Chemikalien

Aqua bidest	B. Braun, Melsungen
Albumin Fraktion V.	Roth, Karlsruhe
Cell Lysis Buffer	CellSignalling, USA
Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific, USA
Chloroform	Roth, Karlsruhe
DTT	Invitrogen, USA
dNTP	Invitrogen, USA
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Laemmli Lysis Buffer	Sigma-Aldrich
Methanol	Roth, Karlsruhe
M-MLV-RT	Invitrogen, USA
NuPAGE <sup>®</sup> Antioxidant	Invitrogen, USA
NuPAGE <sup>®</sup> Transfer Buffer (20x)	Life Technologies, USA
NuPAGE <sup>®</sup> MOPS SDS Running Buffer	Life Technologies, USA
Oligo dt	Invitrogen, USA
PMSF	Roth, Karlsruhe
RNAsin	Invitrogen, USA
5xRT-Puffer	Invitrogen, USA
Spectra Multicolor Protein Ladder	Thermo Scientific, USA
SYBR Green PCR-Mix	Invitrogen, USA
TBS (20x)	AppliChem GmbH, Darmstadt
peqGOLD TriFast	PEQLAB, Erlangen
Tween <sup>®</sup> 20	AppliChem GmbH, Darmstadt
Urea Nitrogen Colorimetric Detection Kit	Arbor Assays, USA

### 2.3.5 Primer

Primer	RefSeq	Primer Sequenz (forward;reverse)
AT <sub>1</sub>	(NM_030985.4)	5`-GAA GTC TCG CCT TCG CCG CA-3` 5`-CAG CCC TAT GGG GAG CGT CG-3`
β-Aktin	(NM_031144.3)	5`-GAA GTG TGA CGT TGA CAT CCG-3` 5`-TGC TGA TCC ACA TCT GCT GGA-3`
Biglycan	(NM_017087)	5`-TGA TTG AGA ATG GGA GCC TGA G-3` 5`-CCT TGG TGA TGT TGT TGG AGT G-3`
Kollagen 1	(NM_053304)	5`-GCG AAC AAG GTG ACA GAG-3` 5`-CCA GGA GAA CCA GCA GAG-3`
Decorin	(NM_024129)	5`-GGC AGT CTG GCT AAT GTT C-3` 5`-CTT CGG AGA TGT TGT TGT TAT G-3`
Fibronectin	(NM_019143)	5`-TGG AGC AAG AAG GAC AAC-3` 5`-CGG ACA TCT GTG AAG GAG-3`
ODC	(NM_012615)	5`-GAA GAT GAG TCA AAC GAG CA-3` 5`-AGT AGA TGT TTG GCC TCT GG-3`
PTH1-R	(NM_001145367.1)	5`-GGC TGC ACT GCA CGC GCA A-3` 5`-TTG CGC TTG AAG TCC AAC GC-3`
Renin	(NM_022177.3)	5`-GGA GGA TGC CTC TCT GGG CAC T-3` 5`-GAT TTC CCG GAC CGA GGG CA-3`
TGF-β1	(NM_021578)	5`-ATT CCT GGC GTT ACC TTG G-3` 5`-CCT GTA TTC CGT CTC CTT GG-3`

### 2.3.6 Antikörper

#### Primäre Antikörper

	Verdünnung	Hersteller
Aktin	1:1000	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Decorin	1:1000	Abnova
Biglycan	1:2000	Abcam
ODC	1:200	SantaCruz, Biotechnologie

PTH1-R	1:100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
--------	-------	----------------------------

### **Sekundäre Antikörper**

	Verdünnung	Hersteller
Anti-Rabbit IgG	1:2000	Affinity Biologicals, Canada
Anti-Mouse IgG	1:2000	Affinity Biologicals, Canada Anti-
Goat IgG	1:2000	DIANOVA GmbH, Hamburg

### **2.3.7 EDV und Statistik**

BZ Analyzer V3.60, Keyence (Japan)  
 BZ Viewer, Keyence (Japan)  
 ChemiCapt 5000, Vilber Lourmat (Frankreich)  
 i-control, Tecan GmbH (Crailsheim)  
 ImageJ  
 IQ5 Version 2.0, BioRad (München)  
 Magellan, Tecan GmbH (Crailsheim)  
 Microsoft Office Excel 2007  
 Microsoft Office PowerPoint 2007  
 Nano Drop 1000 V3.5.1  
 Quantity One, BioRad (München)

## **2.4 Methoden und spezielles Material**

### **2.4.1 Blutdruckmessung, Trainingsparameter und Gewicht**

Die entsprechenden Ergebnisse der 7,5 und 18 Monate alten Tiere wurden in den Arbeiten von Da Rebelo et al. (2012) und Horn (2015) erhoben.

#### **Material**

Tail-Cuff-Blutdruckmeßgerät:	TSE Systems GmbH, Bad Homburg
BloodPressure	209000-9002-4-S-Mod-M/R
Wärmebox mit Temperatursteuerung	
Restrainer (ø: 60 mm L: 200 mm)	

#### **2.4.1.1 Blutdruckmessung nach Riva-Rocci**

Die Blutdruckmessung erfolgte nicht-invasiv analog dem Verfahren nach Riva-Rocci am Menschen:

Bei der Tail-Cuff-Methode wird eine Druckmanschette und ein Photoplethysmograph an der Schwanzwurzel der Ratte angebracht. Durch dieses Verfahren kann sowohl der systolische Blutdruck, als auch die Herzfrequenz ermittelt werden. Die Tail-Cuff-Methode eignet sich aufgrund der fehlenden Invasivität gut zur Langzeitbeobachtung.

Es wurde darauf geachtet, dass die Ratten mindestens zehn Minuten vor Beginn der Messung in einer Wärmebox mit einer Temperatur von 32°C in einer ruhigen Umgebung im Restrainer saßen. Die Messung wurde begonnen, wenn sich eine auswertbare regelmäßige Pulskurve am Monitor darstellte. Die Manschette baut schrittweise Druck auf, bis die Arterie verschlossen und keine Pulskurve mehr ableitbar ist. Daraus ließ sich gemäß dem Verfahren nach Riva-Rocci der systolische Blutdruck ermitteln. Die Druckmessungen erfolgten in Serie mit je zehn Einzelmessungen und wurden unter gleichen Bedingungen wiederholt bis sich ein konstanter Wert einstellte. Lediglich die Signalverstärkung und der Blutdruckmessbereich wurden bei Bedarf angepasst.

#### **2.4.1.2 Medikamentengabe**

Die Nieren- und Serumproben der Tiere unter Captopriltherapie stammen aus der Arbeit von Da Rebelo et al. (2012). Die Medikation wurde für sechs Monate in einer Konzentration von 300 mg/l über das Trinkwasser zugeführt. Bei einer durchschnittlichen Trinkmenge von 20-25 ml/Tag entspricht dies einer Dosis von 30 mg/kg/Tag.

#### **2.4.1.3 Trainingsparameter**

Trainingsdaten wie Laufstrecke, Laufzeit und Geschwindigkeit wurden innerhalb des jeweiligen Versuchszeitraums kontinuierlich aufgezeichnet.

#### **2.4.1.4 Gewicht**

Das Körpergewicht sämtlicher Versuchstiere wurde wöchentlich bestimmt.

## 2.4.2 Nierenfunktion

Die Nierenfunktion wurde anhand der Blut-Harnstoff-Stickstoff-Konzentrationen im Rattenplasma ermittelt.

### Quantitative Messung von Blut-Harnstoff-Stickstoff (BUN)

Harnstoff als Abbauprodukt des Aminosäurestoffwechsels fällt während des Harnstoffzyklus in der Leber an. Er wird über die Niere frei filtriert, flussabhängig reabsorbiert und dient neben Kreatinin zur ersten Einschätzung der Nierenfunktion.

Der Blut-Harnstoff-Stickstoff lässt sich mithilfe eines Fertig-Kits photometrisch bestimmen.

### Material

Heparinplasma 1:20 (verdünnt mit Aqua bidest)

Urea Nitrogen Colorimetric Detection Kit (Arbor Assays, USA)

ELISA-Reader (Tecan GmbH, Crailsheim)

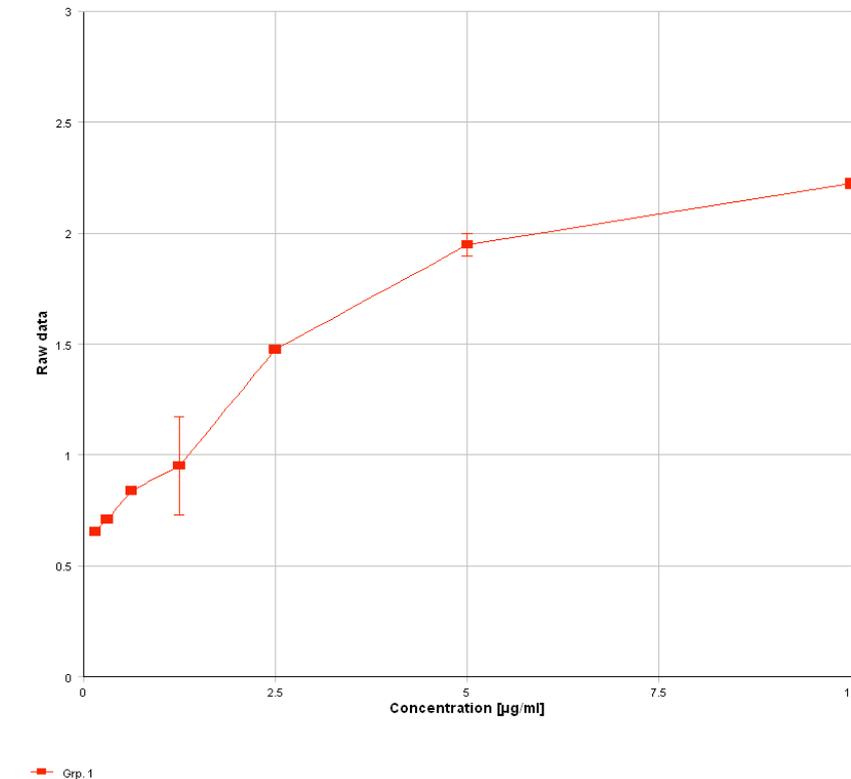
Der Harnstoffstickstoffgehalt im Plasma der Versuchstiere wurde kolorimetrisch mit Hilfe des Urea Nitrogen Colorimetric Detection Kit bestimmt. Das zuvor bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagerte Heparinplasma wurde bei Zimmertemperatur aufgetaut und im Verhältnis 1:20 mit Aqua bidest (a.b.) verdünnt. Aus der Standardprobe (NIST SRM 912a) wurden durch Verdünnung mit a.b. insgesamt sieben absteigende Standardkonzentrationen zum Ermitteln einer Standardkurve hergestellt.

Standard	1	2	3	4	5	6	7
BUN mg/dl	10	5	2,5	1,25	0,625	0,3125	0,156

Je 50  $\mu\text{l}$  Leerprobe a.b., Standardprobe 1.-7. und Messproben wurden in Doppelbestimmung in eine Mikrotiterplatte pipettiert. Nach Zufügen von je 75  $\mu\text{l}$  Reagenz A und anschließend Reagenz B inkubierten die Proben abgedeckt 30 Minuten bei Raumtemperatur. Um ein zeitgleiches Inkubieren zu ermöglichen wurde eine Mehrkanalpipette benutzt. Die optische Dichte wurde photometrisch bei 450 nm im ELISA-Reader bestimmt.

### Konzentrationsbestimmung:

Die Mittelwerte der Doppelbestimmungen der einzelnen Standardproben nach Abzug der Mittelwerte der Leerprobe dienten zum Erstellen der Standardkurve. Anhand dieser Standardkurve konnte computergestützt die BUN-Konzentration jeder einzelnen Probe errechnet werden.



**Abb. 1: Ermittelte Standardkurve zur BUN-Konzentrationsbestimmung im Heparinplasma**

### 2.4.3 Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

#### Geräte

Nano Drop® ND-1000	PEQLAB, Erlangen
Thermocycler	Techne, Wertheim/Bestenheid
iCycler	BioRad, München

#### 2.4.3.1 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation erfolgte nach der Methode nach Chomczynski und Sacchi (13) unter Verwendung von Trifast. Alle Verfahrensschritte wurden auf Eis durchgeführt.

Initial wurde jeweils eine halbe Niere in Precelly-Röhrchen überführt. Durch Zugabe von 1 ml Trifast bzw. dem enthaltenen Guanidiniumthiocyanat und anschließendem

Homogenisieren im elektrischen Homogenisator bei 6000 rpm für zweimal 20 Sekunden wurden die Zellen lysiert sowie RNAsen und andere Enzyme inaktiviert. Zur Phasentrennung der nun in Phenol gelösten RNA wurde 200 µl Chloroform hinzugefügt, im Vortex gemischt und für 15 Minuten zentrifugiert (12500 rpm, 4°C). Dadurch bildeten sich drei abgrenzbare Schichten. Die obere wässrige Phase mit der gelösten RNA wurde in zuvor mit UV-Licht bestrahlte Mikroreaktionsgefäße überführt und mit der identischen Menge Isopropanol versetzt. Zur RNA-Fällung wurden die Proben bei -20°C über Nacht gekühlt. Durch Zentrifugieren (12500 rpm für 15 Minuten bei 4°C) entstand ein RNA-Pellet, welches mit 1 ml Ethanol 70% gewaschen und erneut zentrifugiert wurde. Das gewonnene Präzipitat trocknete für eine Stunde bei Raumtemperatur im Reaktionsgefäß und wurde anschließend für eine Stunde in 250 µl a.b. aufgenommen und gelöst.

Die vollständig gelöste RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei - 80°C gelagert.

#### **2.4.3.2 cDNA-Synthese**

Um eine Quantifizierung der RNA-Expression zu ermöglichen, wurde mit Hilfe eines Spektralphotometers (Nano Drop 1000<sup>®</sup>) die RNA-Konzentration der Proben gemessen und auf 3 µg RNA in 15 µl a.b. je Probe normiert.

Die Herstellung komplementärer DNA (cDNA) erfolgte durch Reverse Transkription im Thermocycler.

Dafür wurden 15 µl jeder Probe (3 µg RNA) in Mikroreaktionsgefäßen für 15 Minuten bei 60°C zur Denaturierung der Sekundärstruktur erhitzt. Nach Zugabe von 15 µl Reaktionsmix und anschließender Inkubation für eine Stunde bei 37°C durchlief die cDNA-Synthese mit Hilfe der Reversen Transkriptase (M-MLV-RT) folgende Schritte:

1. Das im Mix enthaltene synthetische Oligonukleotid (Oligo dt) lagerte sich an den Poly-A-Schwanz der RNA und diente damit der Reversen Transkriptase als Primer
2. Die Reverse Transkriptase synthetisiert einen komplementären DNA-Strang. Dabei entsteht ein RNA/DNA-Molekül.
3. Aus dem RNA/DNA-Molekül wird mit Hilfe der DNA-Polymerase doppelsträngige komplementäre DNA synthetisiert.

Ein Erhitzen der Proben auf 95°C für 5 Minuten inaktivierte die Reverse Transkriptase. Die gewonnene cDNA wurde auf 1:10 verdünnt und entweder direkt weiterverarbeitet oder bei - 20°C gelagert.

**15 µl Reaktionsmix**

---

6 µl	5xRT-Puffer
3 µl	Oligo dt
3 µl	dNTP's
1,5 µl	DTT
0,6 µl	RNAsin
0,9 µl	M-MLV-RT

**2.4.3.3 RT-PCR**

Die RT-PCR ist eine Methode zur Quantifizierung der mRNA-Expression. Mit Hilfe der DNA-Polymerase wird die zuvor gewonnene cDNA amplifiziert und mittels eines Fluoreszenzfarbstoffes markiert. In diesem Fall wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green verwendet, der an doppelsträngige DNA bindet. Das in Echtzeit gemessene Signal der Fluoreszenzmessung während der PCR korreliert proportional mit der Menge des entstandenen PCR-Produkts.

Da bei dieser Methode nicht zwischen verschiedenen PCR-Produkten (unspezifische Amplifikate) unterschieden werden kann, wurde zur Erhöhung der Spezifität im Anschluss eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt.

**17 µl PCR-Mix**

---

6,4 µl	a. b.
0,6 µl	Primer forward und reverse (1:10 verdünnt mit a.b.)
10 µl	SYBR Green PCR-Mix

Jeweils 3 µl der 1:10 verdünnten cDNA wurden als Doppelbestimmung in PCR-Tubes pipettiert. Als Leerprobe diente a.b. Nach Zugabe des PCR-Mix durchliefen die Proben das folgende Programm mit der dem jeweiligen Primer entsprechend angepasster Annealingtemperatur:

1. 95°C 15 Minuten zur Enzymaktivierung
2. insgesamt 45 Zyklen :
  - 95°C 30 Sekunden zur Denaturierung
  - XX°C 30 Sekunden zur Anlagerung der Primer (Annealingtemperatur)
  - 72°C 30 Sekunden zur DNA-Synthese
3. Schmelzkurvenanalyse

Relative Quantifizierung:

Da die  $\beta$ -Aktin-Expression durch die Versuchsbedingungen nicht beeinflusst wird, wurde es als Referenzgen bzw. Housekeeping-Gen gewählt. Vom Mittelwert der Ct-Werte (Anzahl der Zyklen bis Beginn der exponentiellen Phase) der Doppelbestimmungen jeder Probe wurde der jeweilige Ct-Wert des Referenzgens abgezogen ( $\Delta$ Ct). Durch die Bildung der Differenz der Ct-Werte der Vergleichsgruppen erhält man einen Wert, der die n-fache Genexpression der Gruppe A gegenüber der Gruppe B angibt ( $\Delta\Delta$ Ct).

#### 2.4.4 Western Blot (WB)

Das Western Blot-Verfahren erlaubt eine semiquantitative Bestimmung von Proteinen und eignet sich daher zur Untersuchung der Adaptationsmechanismen auf Proteinebene. Die zunächst aus Nierengewebe isolierten Proteine wurden mittels Gelelektrophorese entsprechend ihrer Größe aufgetrennt und auf Nitrocellulose übertragen. Der immunologische Proteinnachweis erfolgte indirekt durch an Sekundär-Antikörper gebundene Peroxidase. Diese katalysiert die Oxidation von Luminol und lässt sich als Lichtimpuls im Chemilumineszenz System detektieren.

#### Material

0,1 g Nierengewebe

#### Geräte

Ultraschallprozessor UP100H	Hielscher, Teltow
Thermoblock Dri-Block DB.2D	Labtech International, UK
XCell SureLockTMMini-Cell	Invitrogen, USA
XCell IITMBlot Module	Invitrogen, USA
Netzgerät	Biometra, Göttingen
Chemilumineszenz System	PEQLAB, Erlangen

##### 2.4.4.1 Proteinisolation aus Nierengewebe

Die Proteinisolation erfolgte aus jeweils 0,1 g gefrorenem Nierengewebe auf Eis. Zur Zellyse wurden die Proben in Precellys Rührchen mit je 500  $\mu$ l Lysis-Puffer versetzt und zweimal 20 Sekunden bei 6000 rpm homogenisiert.

**1 ml Lysis-Puffer**


---

100 µl	Cell Lysis Buffer
900 µl	a.b.
10 µl	0,1 M PMSF

Mittels Ultraschalles fand ein weiterer Zellaufschluss statt. Der, in der anschließenden Zentrifugation (10 Minuten bei 4°C mit 14000 xg) entstandene Überstand, wurde in einer 1:50 Verdünnung in ein Micro Tube überführt. 100 µl jeder Probe versetzt mit 40 µl Laemmli-Puffer wurden für fünf Minuten auf 95°C erhitzt um die Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine aufzulösen. Anschließend wurden die Proben bei - 20°C gelagert werden.

**2.4.4.2 Gelelektrophorese**

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine analytische Methode zur Auftrennung von Proteinen anhand ihrer Größe im elektrischen Feld. Das diskontinuierliche System arbeitet mit unterschiedlichen Porengrößen im Gel.

Als Puffersubstanz wurde BisTris im Rahmen der BisTris-SDS-PAGE von Invitrogen benutzt und nach Produktanleitung durchgeführt. Es handelt sich um Fertiggele mit entsprechenden Pufferlösungen.

**Laufpuffer**


---

50 ml	NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer
950 ml	Aqua bidest.

**Laufpuffer mit Antioxidant**


---

200 ml	Laufpuffer
500 µl	NuPAGE® Antioxidant

Die NuPAGE 10 % Bis-Tris Gele wurden vor Gebrauch zunächst mit a.b., und anschließend mit Laufpuffer gespült. Nach Aufbau der Gelkammer wurde der Raum zwischen den Gelen mit 180 ml Laufpuffer mit Antioxidant befüllt und auf Dichtigkeit überprüft. Anschließend wurde in die äußere Kammer 600 ml Laufpuffer gegossen.

Die zuvor bei - 20°C gelagerten Proben wurden für 5 Minuten bei 95°C erhitzt, abzentrifugiert und im Vortexer gemischt. Zur späteren Identifikation der Proteine

wurde jeweils die erste Geltasche mit 15 µl eines Markers aus einer Mischung vorgefärbter, standardisierter Proteine mit einer Größe von 10 bis 260 kDa befüllt. In die übrigen Taschen wurden jeweils 15 µl der jeweiligen Analysenproben pipettiert.

Danach wurde für 50 Minuten eine Spannung von 200 V angelegt.

#### 2.4.4.3 Proteintransfer

Die zuvor in der Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden zur weiteren Analyse auf Nitrocellulose-Membranen übertragen. Das hier verwendete Semi-dry-Blotverfahren hat den Vorteil des gleichmäßigen Proteintransfers in geringen Puffermengen.

##### 500 ml Transferpuffer

---

25 ml	NuPAGE® Transfer Buffer
375 ml	Aqua bidest.
100 ml	Methanol 100 %
500 µl	NuPAGE® Antioxidant

Initial wurden alle Membranen, Filterpapiere und Schwämme in Transferpuffer getränkt. Die Blotkammer wurde wie folgt, unter Vermeidung von Luftblasen zwischen den Schichten, aufgebaut:

Kathode (-)

---

- Zwei Schwämme
  - Filterpapier
  - Gel
  - Nitrocellulose-Membran
  - Filterpapier
  - Zwei Schwämme
- 

Anode (+)

Anschließend wurde die Kammer mit Transferpuffer befüllt und für 60 Minuten eine Spannung von 30 V angelegt.

#### **2.4.4.4 Immunoblot**

Zur Visualisierung der Proteine wurde ein Chemilumineszenzverfahren gewählt. Dazu wurde ein Primärantikörper eingesetzt, der spezifisch an das gesuchte Antigen bindet. Der anschließend hinzugefügte Sekundärantikörper bindet wiederum spezifisch an die Primärantikörper. Durch die an den Sekundärantikörper gebundene Peroxidase wird Luminol oxidiert und ein Lichtimpuls generiert, der im Chemilumineszenz System detektiert werden kann.

Zuvor mussten zum Blockieren freier unspezifischer Bindungsstellen die Membranen in 1 x TBS mit 5 % BSA und 0,1 % Tween<sup>®</sup>20 eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubieren. Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgte ebenfalls in 1 x TBS mit 5 % BSA und 0,1 % Tween<sup>®</sup>20 über Nacht auf dem Schüttler. Anschließend wurden die Membranen jeweils dreimal 10 Minuten auf dem Schüttler mit 1 x TBS und 0,1 % Tween<sup>®</sup>20 gewaschen um überschüssige ungebundene Antikörper zu entfernen. Der Sekundärantikörper wurde entsprechend hinzugefügt und für eine Stunde auf dem Schüttler inkubiert. Es erfolgte erneut das Waschen der Membranen für dreimal 10 Minuten wie oben beschrieben, wobei im letzten Waschschrift auf 0,1 % Tween<sup>®</sup>20 verzichtet wurde.

Die Detektion erfolgte im Chemilumineszenz System. Zuvor wurden die Membranen 2 Minuten lichtgeschützt in Luminol enthaltendem Chemiluminescent Substrate inkubiert. Die Lösungen wurden nach Produktanleitung verwendet und gelagert.

Relative Quantifizierung:

Als Bezugsgröße wurde  $\beta$ -Aktin gewählt um eventuelle Abweichungen in der Gesamtexpression zu normieren. Die Auswertung erfolgte computergestützt durch das Programm Quantity One (BioRad, München).

#### **2.4.5 Histologie**

Die Anfertigung von Gewebeschnitten mit anschließender Siriusrotfärbung erlaubt eine Quantifizierung des extrazellulären Kollagengehalts und fibrotischer Areale der Niere. Während kollagenenthaltende Strukturen sich rot darstellen, werden die Zellkerne durch eine Hämalaunlösung blau gefärbt. Die Auswertung erfolgt unter einem Lichtmikroskop.

**Material**

Bouinsche Lösung	Morphhisto, Frankfurt a. M.
TissueTek OCT compound	Sakura, Staufen
Siriusrot	Sigma, München
X-TRA-solv	Medite, Burgdorf
X-TRA-kitt	Medite, Burgdorf
Objekträger	Menzel, Braunschweig
Deckgläschen	Menzel, Braunschweig
Hämalaun sauer nach Mayer	Carl Roth, Karlsruhe

**Geräte**

Cryostat	Leica Microsystems, Nussloch
Biozero® Kompaktes Fluoreszenzmikroskop	Keyence Deutschland GmbH, Neulsenburg

Die Gewebeproben wurden mittels TissueTek OCT compound entsprechend der Produktanleitung eingebettet und der so entstandene Gewebeblock bei  $-35^{\circ}\text{C}$  im Gefriermikrotom geschnitten. Die  $10\ \mu\text{m}$  dicken Gewebeschnitte wurden auf fettfreie Glasobjekträgern aufgenommen und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

**2.4.5.1 Siriusrot-Färbung**

Die angefertigten Gewebeschnitte wurden zur weiteren Fixierung 24 Stunden in Bouinscher Lösung eingelegt. Die Anfärbung erfolgte anschließend in 0,1 % Siriusrot-/Pikrinsäurelösung für eine Stunde. Um eventuelle Farbüberschüsse zu entfernen wurden die Schnitte mit 0,01 N HCL und a.b. gereinigt. Die Kernfärbung erfolgte mit saurer Hämalaunlösung nach Mayer für 5-10 Minuten. Abschließend wurden die Schnitte 5 Minuten mit fließendem Wasser 5 Minuten gespült, in aufsteigender Ethanolreihe beginnend mit 50 %igem Ethanol dehydriert und in X-TRA-solv bis zur Eindeckelung gelagert. Die Präparate wurden zur Eindeckelung jeweils mit X-TRA-kitt beschichtet und mit einem Deckgläschen abgedeckt.

**2.4.5.2 Lichtmikroskopie**

Die Befundung der Schnitte erfolgte am elektronischen Fluoreszenzmikroskop Biozero® der Firma Keyence Deutschland GmbH. Die Präparate mit Hilfe der

Programme BZ Analyzer V3.60 (Keyence) und BZ Viewer (Keyence) zugeschnitten und fotografiert.

Das Bildbearbeitungs- und Bildverarbeitungsprogramm ImageJ diente zur Bildanalyse und Auswertung.

#### **2.4.6 Statistik**

Die Ergebnisse wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte im Zwei-Gruppen-Vergleich. Varianzgleichheit wurde mittels Levene-Tests geprüft. Abhängig vom Ergebnis wurde mit Mann-Whitney-U-Test oder zweiseitigem T-Test fortgefahren. Im Mehrgruppenvergleich wurden die Ergebnisse durch eine unifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) geprüft und anschließend in einem Post-hoc-Test (Student-Newman-Keuls-Prozedur) ausgewertet. Als statistisch signifikant wurde ein Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  angesehen und mit dem \*-Symbol gekennzeichnet.

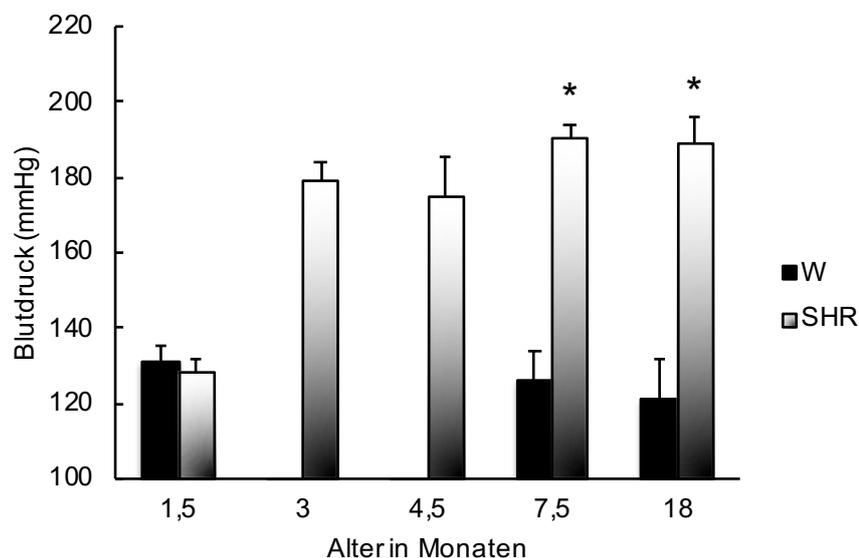
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Der Einfluss von Bluthochdruck

Zunächst werden die Ergebnisse der spontan hypertensiven und normotensiven Kontrolltiere dargestellt, um alters- und blutdruckabhängige Veränderungen zu untersuchen.

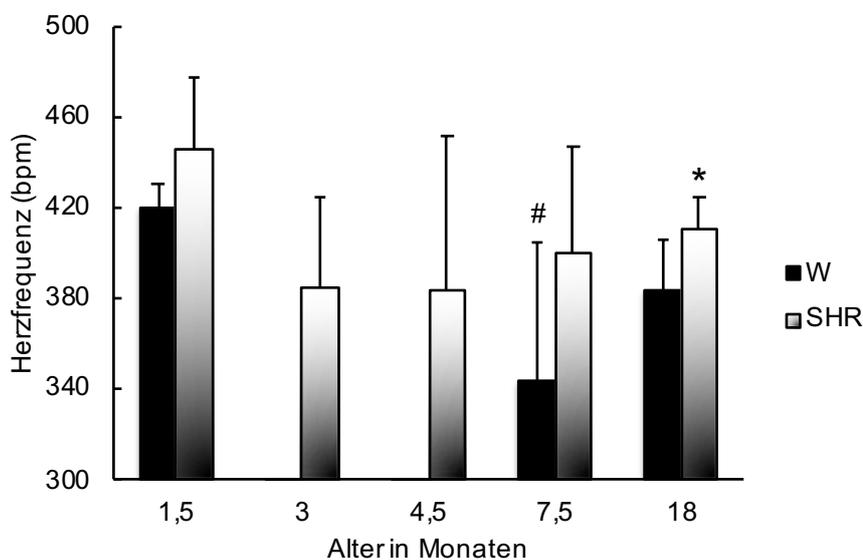
##### 3.1.1 Blutdruck und Herzfrequenz

Dargestellt sind die Blutdruckwerte am Ende der Versuchsdauer. Da sich der Hypertonus in den SHR erst im Alter von 7 bis 15 Wochen entwickelt (122), zeigte sich erst in der Gruppe der 3 Monate alten Tiere ein signifikanter Unterschied zwischen Wistar und SHR. Die normotensiven Kontrollen wiesen mit 1,5 Monaten einen systolischen Blutdruck von  $131 \pm 4$  mmHg, mit 7,5 Monaten  $126 \pm 8$  mmHg und mit 18 Monaten  $121 \pm 11$  mmHg auf. In den spontan hypertensiven Tieren lag der systolische Druck mit 1,5 Monaten noch bei  $128 \pm 4$  mmHg und stieg in den 3 Monate alten Tieren auf  $179 \pm 5$  mmHg. Der chronische Bluthochdruck ließ sich auch in den 4,5 Monate ( $175 \pm 10$  mmHg), 7,5 Monate ( $190 \pm 4$  mmHg) und 18 Monate alten SHR ( $189 \pm 7$  mmHg) dokumentieren.



**Abb. 2: Altersabhängiger Verlauf des systolischen Blutdrucks von Wistar-Ratten (W) und SHR.** Altersabhängiger Verlauf (1,5 Monate bis 18 Monate) des systolischen Blutdrucks von Wistar-Ratten (W) und SHR. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 6$  Tieren. \* =  $p < 0,05$  vs. Wistar-Ratten gleichen Alters.

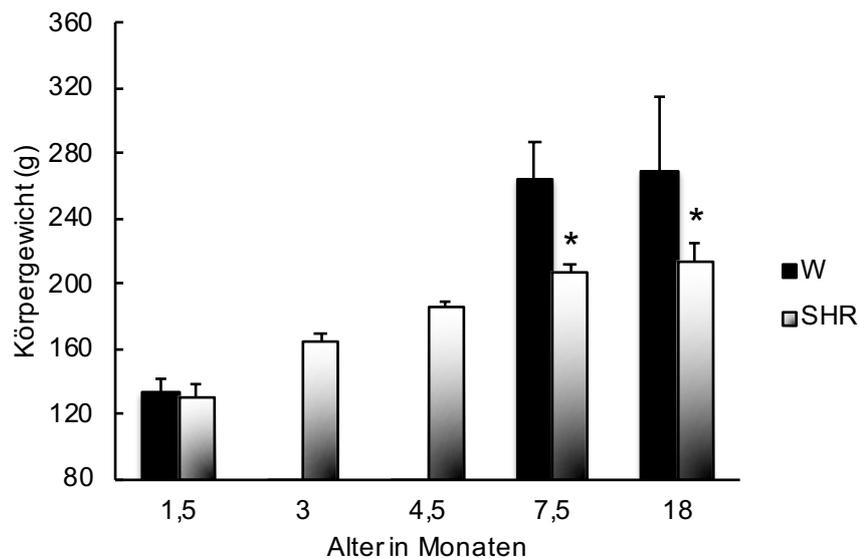
Im Alter von 1,5 Monaten lag die Herzrate der Wistar Ratten bei  $420 \pm 10$  bpm, die der SHR bei  $446 \pm 31$  bpm. Mit 3 Monaten wiesen die SHR eine Frequenz von  $385 \pm 40$  bpm, mit 4,5 Monaten von  $383 \pm 68$  bpm auf. In diesem Bereich lagen auch die Werte der 7,5 Monate ( $400 \pm 47$  bpm) und 18 Monate ( $411 \pm 14$  bpm) alten SHR. Die Herzrate der Wistar-Ratten sank altersabhängig und war in den 7,5 Monaten signifikant niedriger im Vergleich zu den 1,5 Monate alten Tieren ( $420 \pm 10$  bpm vs.  $343 \pm 62$  bpm). Im Alter von 18 Monaten wiesen die hypertensiven Tiere im Vergleich zu den altersentsprechenden Wistar-Ratten eine signifikant höhere Herzrate auf ( $411 \pm 14$  bpm vs.  $383 \pm 23$  bpm).



**Abb. 3: Altersabhängiger Verlauf der Herzfrequenz von Wistar-Ratten (W) und SHR.** Altersabhängiger Verlauf (1,5 Monate bis 18 Monate) der Herzfrequenz von Wistar-Ratten (W) und SHR. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 6$  Tieren. \* =  $p < 0,05$  vs. Wistar-Ratten gleichen Alters, # =  $p < 0,05$  vs. 1,5 Monate alte W.

### 3.1.2 Körpergewicht

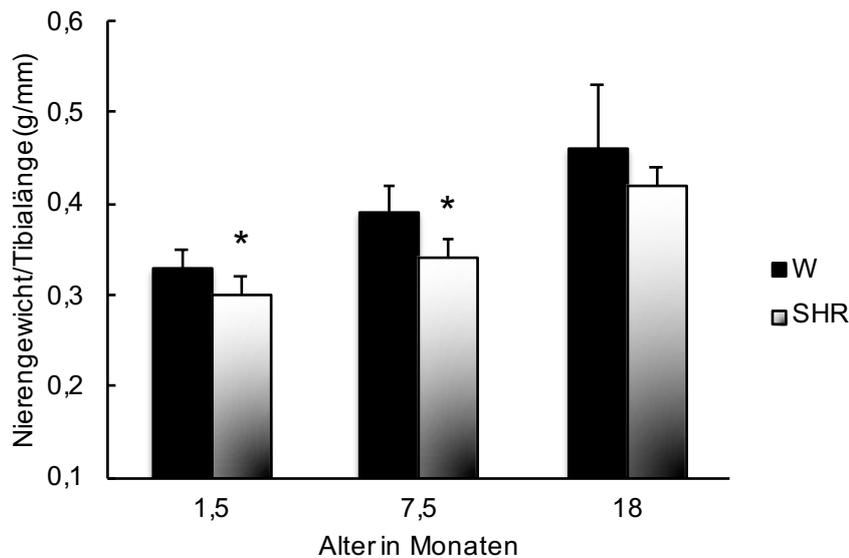
Das Körpergewicht 1,5 Monate alter Wistar-Ratten war ( $134 \pm 7$  g) mit dem der SHR ( $130 \pm 9$  g) vergleichbar. In den 7,5 ( $207 \pm 4$  g) und 18 ( $214 \pm 10$  g) Monate alten SHR zeigte sich jedoch ein signifikant niedrigeres Gewicht als in den altersgleichen normotensiven Kontrollen. Diese wogen mit 7,5 Monaten  $264 \pm 23$  g und mit 18 Monaten  $269 \pm 45$  g.



**Abb. 4: Altersabhängiger Verlauf des Körpergewichts von Wistar-Ratten (W) und SHR.** Altersabhängiger Verlauf (1,5 Monate bis 18 Monate) des Körpergewichts von Wistar-Ratten (W) und SHR. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 6$  Tieren. \* =  $p < 0,05$  vs. Wistar-Ratten gleichen Alters.

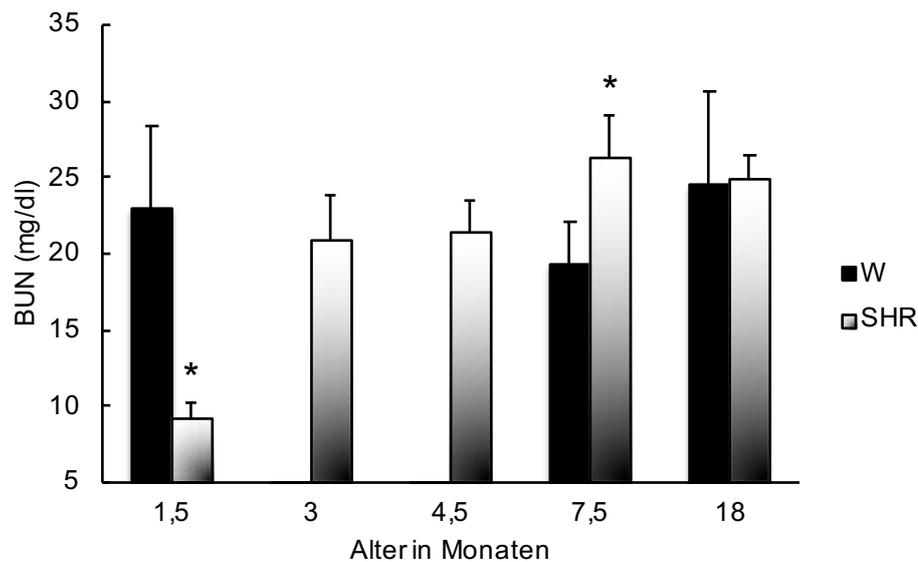
### 3.1.3 Nierengewicht und – funktion

Um eine Nierenhypertrophie zu detektieren wurde das Nierengewicht der jeweiligen Tiere auf ihre Tibiallänge normalisiert. Die spontan hypertensiven Tiere zeigten sowohl mit 1,5 Monaten (SHR:  $0,30 \pm 0,02$  g/mm vs. W:  $0,33 \pm 0,02$  g/mm) als auch mit 7,5 Monaten (SHR:  $0,34 \pm 0,02$  g/mm vs. W:  $0,39 \pm 0,03$  g/mm) im Vergleich zu den normotensiven Kontrollen ein signifikant reduziertes Nierengewicht. Die Tendenz bestätigte sich auch in der Gruppe der 18 Monate alten Tiere (SHR:  $0,42 \pm 0,02$  g/mm vs. W:  $0,46 \pm 0,07$  g/mm) ohne das Signifikanzniveau zu erreichen.



**Abb. 5: Altersabhängiger Verlauf des Nierengewichts von Wistar-Ratten (W) und SHR.** Altersabhängiger Verlauf (1,5 Monate bis 18 Monate) der Nierengewichte/Tibialänge von Wistar-Ratten (W) und SHR. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 6$  Tieren. \* =  $p < 0,05$  vs. Wistar-Ratten gleichen Alters.

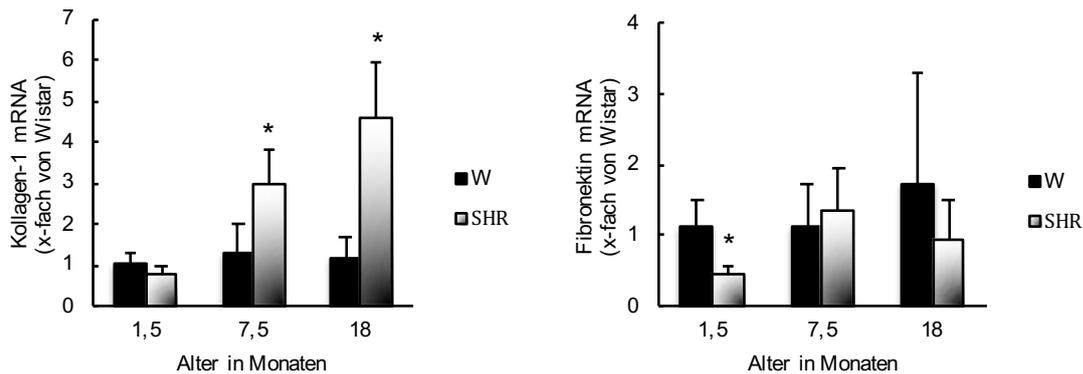
Die Nierenfunktion wurde anhand der BUN-Werte (Blut-Harnstoff-Stickstoff) bestimmt. Abb. 6 stellt die entsprechenden Ergebnisse dar. Die BUN-Werte der 1,5 Monate alten SHR lagen deutlich unter denen der normotensiven Kontrollen. Dieser Effekt kehrte sich mit 7,5 Monaten um. Im Alter von 18 Monaten war kein Unterschied zwischen den BUN-Werten der beiden Gruppen erkennbar.



**Abb. 6: Altersabhängiger Verlauf der Nierenfunktion von Wistar-Ratten (W) und SHR.** Altersabhängiger Verlauf (1,5 Monate bis 18 Monate) der BUN-Werte von Wistar-Ratten (W) und SHR. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 6$  Tieren. \* =  $p < 0,05$  vs. Wistar-Ratten gleichen Alters.

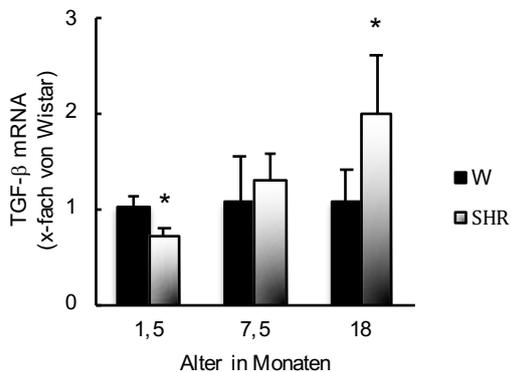
### 3.1.4 Strukturproteine und Fibrosemarker

Im Folgenden wurde der Einfluss von chronischem Bluthochdruck auf molekularbiologischer Ebene analysiert. Abb. 7 zeigt die veränderte Genexpression von Kollagen-1 und Fibronectin in der Niere. Diese Strukturproteine sind an der Bildung der Extrazellulärmatrix beteiligt und ihre Anreicherung führt zu einer Fibrose. Im Vergleich zu den Wistar-Ratten wurde die Kollagen-1-Expression in den 7,5 Monate alten SHR auf das  $3 \pm 0,8$ fache, in den 18 Monate alten SHR auf das  $4,6 \pm 1,35$ fache erhöht. Fibronectin dagegen zeigte lediglich in den jungen SHR eine Herabregulierung, im weiteren Verlauf jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.



**Abb. 7: Altersabhängiger Verlauf der Kollagen-1- und Fibronectin-mRNA-Expression von Wistar-Ratten (W) und SHR.** Altersabhängiger Verlauf (1,5 Monate bis 18 Monate) der Kollagen-1- und Fibronectin-mRNA-Expression von Wistar-Ratten (W) und SHR. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 6$  Tieren. \* =  $p < 0,05$  vs. Wistar-Ratten gleichen Alters.

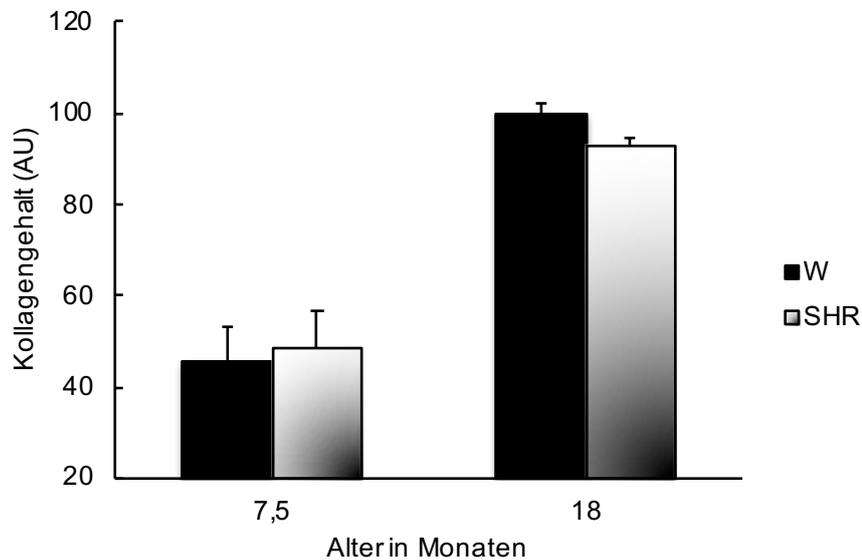
Als weiterer Fibrosemarker wurde TGF- $\beta$  untersucht. Die TGF- $\beta$ -Expression zeigte einen dem Kollagen-1 ähnlichen Verlauf. Abb. 8 stellt die Veränderungen der TGF- $\beta$ -Expression in den 1,5 bis 18 Monate alten Tieren dar.



**Abb. 8: Altersabhängiger Verlauf der TGF- $\beta$ -mRNA-Expression von Wistar-Ratten (W) und SHR.** Altersabhängiger Verlauf (1,5 Monate bis 18 Monate) der TGF- $\beta$ -mRNA-Expression von Wistar-Ratten (W) und SHR. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 6$  Tieren. \* =  $p < 0,05$  vs. Wistar-Ratten gleichen Alters.

Um fibrotische Umbauprozesse auf Proteinebene darzustellen wurden histologische Schnitte der 7,5 und 18 Monate alten Rattennieren angefertigt und mit der Sirius-Rot-Methode gefärbt. Dieses Verfahren erlaubt eine Quantifizierung des Kollagengehalts und dient damit dem Fibrosenachweis. Die Ergebnisse sind in Abb. 9 dargestellt und zeigen weder in den 7,5 Monate noch in den 18 Monate alten Tieren einen

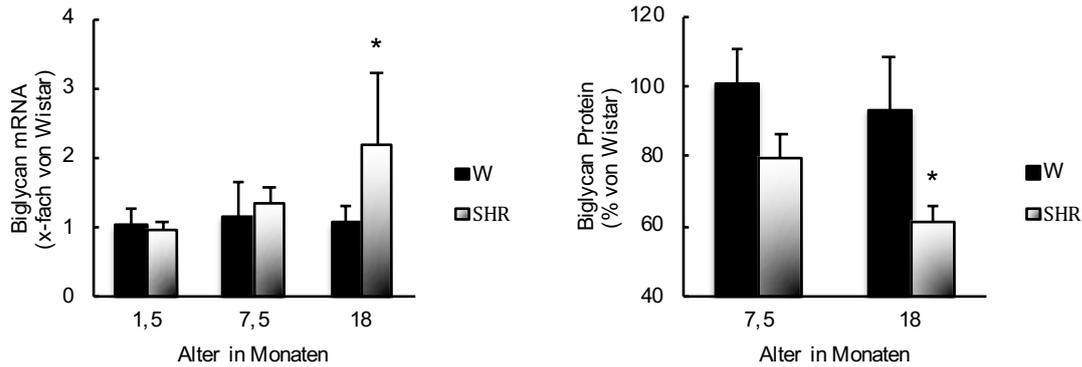
signifikanten Unterschied im Kollagengehalt zwischen den normotensiven und hypertensiven Ratten.



**Abb. 9: Kollagengehalt der histologischen Schnitte der 7,5 und 18 Monate alten Wistar-Ratten (W) und SHR.** Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 2$  Tieren. \* =  $p < 0,05$  vs. Wistar-Ratten gleichen Alters.

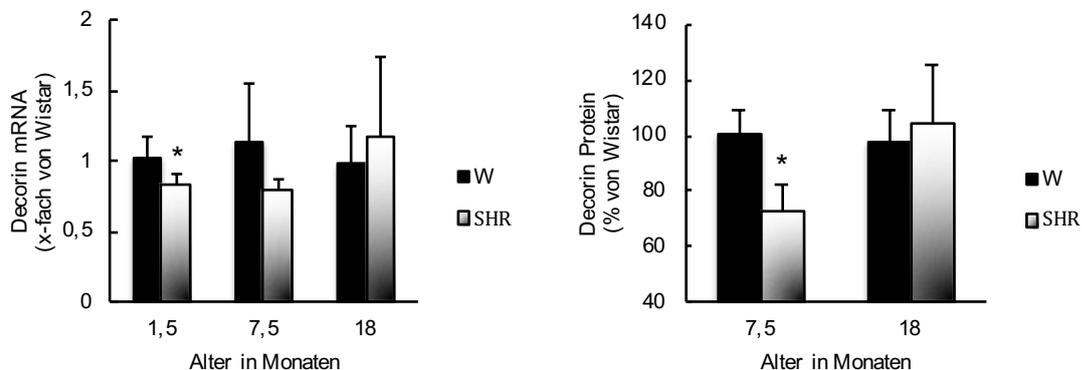
Die SLRP's Decorin und Biglycan dienen nicht nur als strukturelle Matrixkomponenten, sondern sind auch wichtige Signalmoleküle. Durch die wechselseitige Interaktion zwischen den SLRP's und profibrotischer Zytokine wie TGF- $\beta$  beeinflussen sie u.a. Umbauprozesse der Extrazellulärmatrix.

In den 18 Monate alten SHR zeigte sich ein signifikanter Anstieg der mRNA-Expression von Biglycan im Vergleich zu den normotensiven Kontrollen. Auf Proteinebene fiel die Biglycankonzentration jedoch signifikant ab.



**Abb. 10: Altersabhängiger Verlauf der Biglycan-mRNA-Expression und des Biglycanproteingehalts von Wistar-Ratten (W) und SHR.** Altersabhängiger Verlauf (1,5 Monate bis 18 Monate) der Biglycan-mRNA-Expression und des Biglycanproteingehalts (7,5 und 18 Monate) von Wistar-Ratten (W) und SHR. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 6$  (mRNA),  $n = 3$  Tieren (WB). \* =  $p < 0,05$  vs. Wistar-Ratten gleichen Alters.

Die mRNA-Expression von Decorin war in den 1,5 Monate alten SHR signifikant herab reguliert, dies zeigte sich ebenfalls in der Western-Blot-Analyse der 7,5 Monate alten Tiere. Im Alter von 18 Monaten war kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen erkennbar.

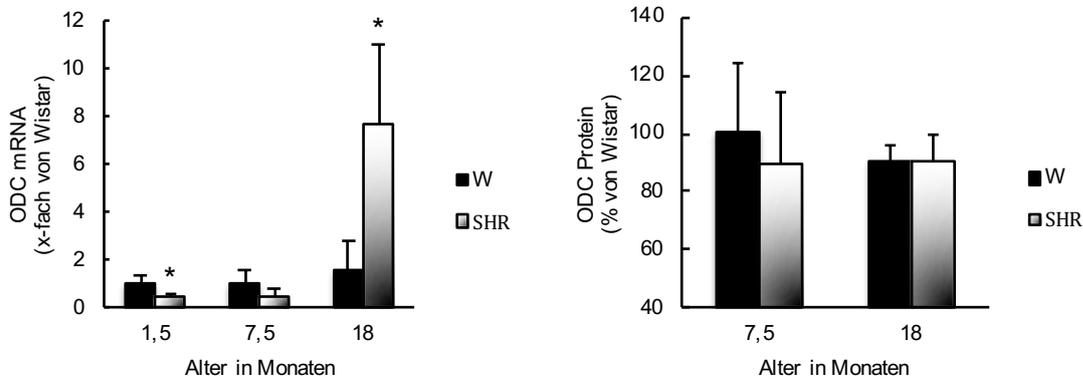


**Abb. 11: Altersabhängiger Verlauf der Decorin-mRNA-Expression und des Decorinproteingehalts von Wistar-Ratten (W) und SHR.** Altersabhängiger Verlauf (1,5 Monate bis 18 Monate) der Decorin-mRNA-Expression und des Decorinproteingehalts (7,5 und 18 Monate) von Wistar-Ratten (W) und SHR. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 6$  (mRNA),  $n = 3$  Tieren (WB). \* =  $p < 0,05$  vs. Wistar-Ratten gleichen Alters.

### 3.1.5 ODC und PTHrP-Rezeptor

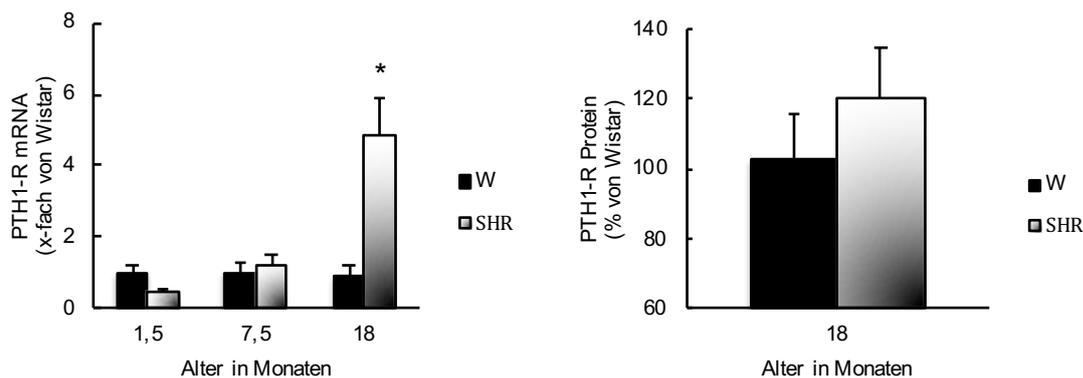
Wie in Abb. 12 dargestellt wird ODC in den SHR im Vergleich zu den normotensiven Kontrollen unterschiedlich exprimiert. Mit 1,5 Monaten lag die Syntheserate der ODC in den SHR 50 % unter derjenigen der Wistar-Ratten. Im Alter von 18 Monaten zeigte

sich ein signifikanter Anstieg um  $7,5 \pm 3,3$ fache. Dies spricht für eine hohe Proliferationsrate im Nierengewebe alter hypertensiver Ratten. Der Proteingehalt wurde durch die erhöhte Expression nicht beeinflusst und zeigte keinen Unterschied zwischen den Gruppen.



**Abb. 12: Altersabhängiger Verlauf der ODC-mRNA-Expression und des ODC-Proteingehalts von Wistar-Ratten (W) und SHR.** Altersabhängiger Verlauf (1,5 Monate bis 18 Monate) der ODC-mRNA-Expression und des ODC-Proteingehalts (7,5 und 18 Monate) von Wistar-Ratten (W) und SHR. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 6$  (mRNA),  $n = 3$  Tieren (WB). \* =  $p < 0,05$  vs. Wistar-Ratten gleichen Alters.

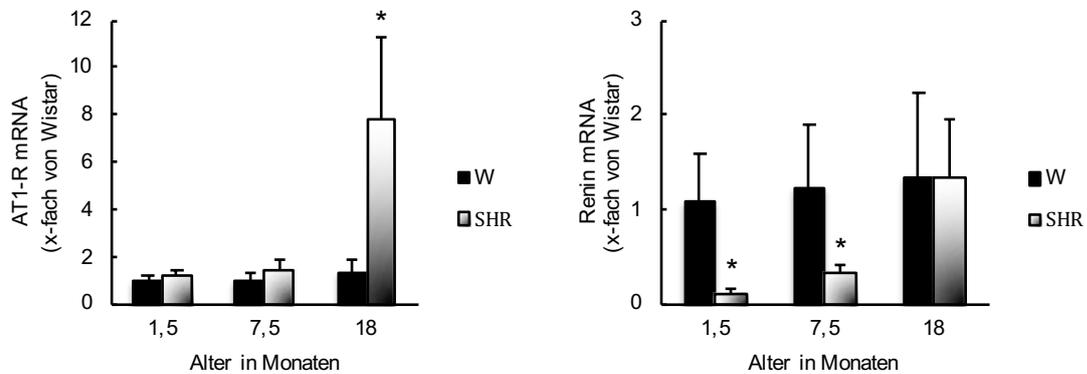
Die Expression des PTH1-Rezeptors vervielfachte sich im Nierengewebe der 18 Monate alten SHR gegenüber den Kontrollen. Diese Tendenz wurde auch auf Proteinebene nachgewiesen ohne das Signifikanzniveau zu erreichen.



**Abb. 13: Altersabhängiger Verlauf der PTH1-R-mRNA-Expression und des PTH1-R-Proteingehalts von Wistar-Ratten (W) und SHR.** Altersabhängiger Verlauf (1,5 Monate bis 18 Monate) der PTH1-R-mRNA-Expression und des PTH1-R-Proteingehalts (18 Monate) von Wistar-Ratten (W) und SHR. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 6$  (mRNA),  $n = 3$  Tieren (WB). \* =  $p < 0,05$  vs. Wistar-Ratten gleichen Alters.

### 3.1.6 Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Die AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Expression war in den 18 Monate alten SHR um das  $7,8 \pm 3,5$ fache erhöht, die Renin-Expression dagegen in den 1,5 und 7,5 Monate SHR signifikant herabreguliert.



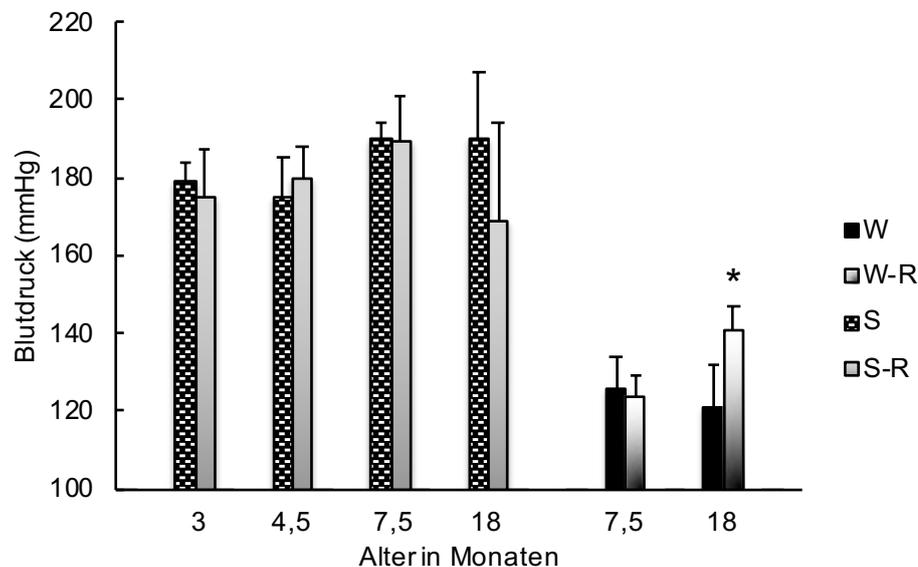
**Abb. 14: Altersabhängiger Verlauf der AT<sub>1</sub>-R- und Renin-mRNA-Expression von Wistar-Ratten (W) und SHR.** Altersabhängiger Verlauf (1,5 Monate bis 18 Monate) der AT<sub>1</sub>-R- und Renin-mRNA-Expression von Wistar-Ratten (W) und SHR. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 6$  Tieren. \* =  $p < 0,05$  vs. Wistar-Ratten gleichen Alters.

### 3.2 Der Einfluss körperlicher Aktivität auf normotensive und hypertensive Ratten

Um den Einfluss körperlicher Aktivität darzustellen, werden im Folgenden die Ergebnisse der Laufgruppen ihren normo- bzw. hypertensiven Kontrollgruppen gegenübergestellt.

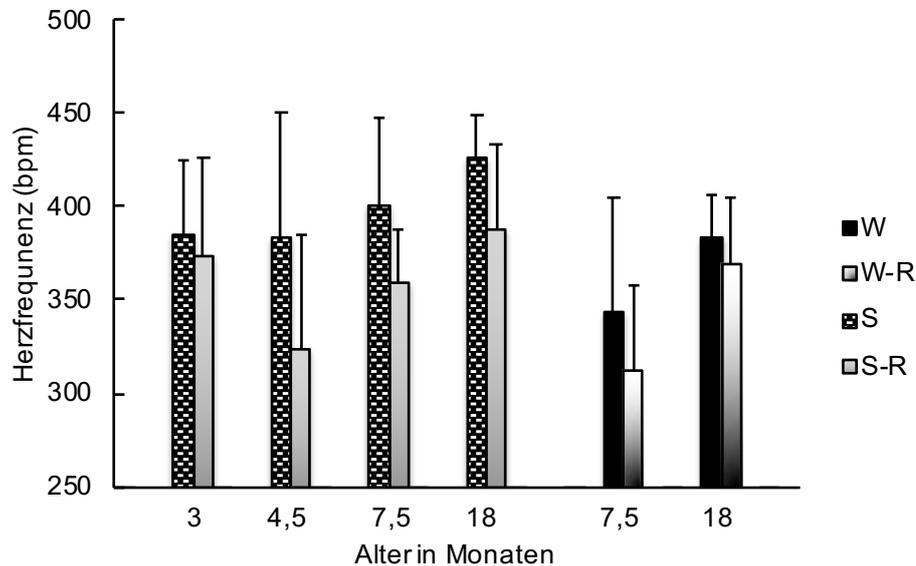
#### 3.2.1 Blutdruck und Herzfrequenz

Der systolische Blutdruck der spontan hypertensiven Tiere wurde durch das Lauftraining nicht beeinflusst. Sowohl die SHR, die prähypertensiv (3 Monate, 4,5 Monate und 7,5 Monate alte SHR) das Training begannen, als auch die Tiere im hypertensiven Stadium zeigten keine signifikanten Unterschiede zu den entsprechenden Nicht-Läufern. Dagegen stieg der systolische Blutdruck der normotensiven 18 Monate alten Läufer auf  $141 \pm 6$  mmHg im Vergleich zu den Nicht-Läufern ( $121 \pm 11$  mmHg).



**Abb. 15: Einfluss körperlicher Aktivität auf den systolischen Blutdruck.** Systolischer Blutdruck der Wistar-Ratten (W) und SHR im Alter von 3 Monaten bis 18 Monaten jeweils im Vergleich Nicht-Läufer gegen Läufer (R). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 6$  Tieren. \* =  $p < 0,05$  vs. Nicht-Läufer gleichen Alters.

Abb. 16. stellt die ermittelte durchschnittliche Herzfrequenz der normotensiven und hypertensiven Ratten im Vergleich zwischen Kontroll- und Trainingsgruppe dar. Es ist ein herzfrequenzsenkender Effekt durch das Training sichtbar aber nicht signifikant.



**Abb. 16: Einfluss körperlicher Aktivität auf die Herzfrequenz.** Herzfrequenz der Wistar-Ratten (W) und SHR im Alter von 3 Monaten bis 18 Monaten jeweils im Vergleich Nicht-Läufer gegen Läufer (R). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 6$  Tieren. \* =  $p < 0,05$  vs. Nicht-Läufer gleichen Alters.

### 3.2.2 Laufdaten

Die wöchentlich erhobenen Laufdaten wurden gemittelt und in Tab. 3 dargestellt. Die jungen im prähypertensiven Stadium gestarteten SHR legten eine größere Laufstrecke durch eine höhere Laufzeit als die alten SHR zurück. Die Laufgeschwindigkeit variierte nur gering zwischen den Gruppen und blieb über die Versuchsdauer konstant. Die normotensiven Tiere trainierten mit einer ähnlichen Laufgeschwindigkeit, jedoch mit einer durchschnittlich geringeren Laufzeit. Daher lag die durchschnittlich zurückgelegte Laufstrecke der Wistar-Ratten unter der, der SHR.

Tab. 3: Laufdaten der Wistar-Ratten (W) und SHR (S) im Alter von 3 Monaten bis 18 Monaten.

	Laufstrecke km/w	Laufgeschwindigkeit km/h	Laufzeit h/w
<b>S 3-R</b>	85,72 ± 13,83	3,01 ± 0,20	28,24 ± 2,96
<b>S 4,5-R</b>	75,63 ± 7,58	2,89 ± 0,20	25,98 ± 1,35
<b>S 7,5-R *</b>	58,59 ± 8,87	2,50 ± 0,22	21,48 ± 1,70
<b>S 18-R *</b>	48,82 ± 18,03	2,43 ± 0,24	6,10 ± 2,25
<b>W 7,5-R *</b>	24,7 ± 16,4	3,1 ± 0,4	8,6 ± 5,0
<b>W 18-R *</b>	29,7 ± 10,1	2,7 ± 0,4	10,3 ± 3,1

Laufstrecke, Laufgeschwindigkeit und Laufzeit der Wistar-Ratten (W) und SHR (S) im Alter von 3 Monaten bis 18 Monaten. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD von  $n = 6$  Tieren. \* = Die entsprechenden Werte wurden im Rahmen der Arbeiten von Da Rebelo et al (2012) und Horn (2015) erhoben.

### 3.2.3 Körpergewicht

Die SHR steigerten ihr Körpergewicht signifikant durch das Lauftraining. Dieser Effekt konnte bei den normotensiven Kontrollen nicht beobachtet werden.

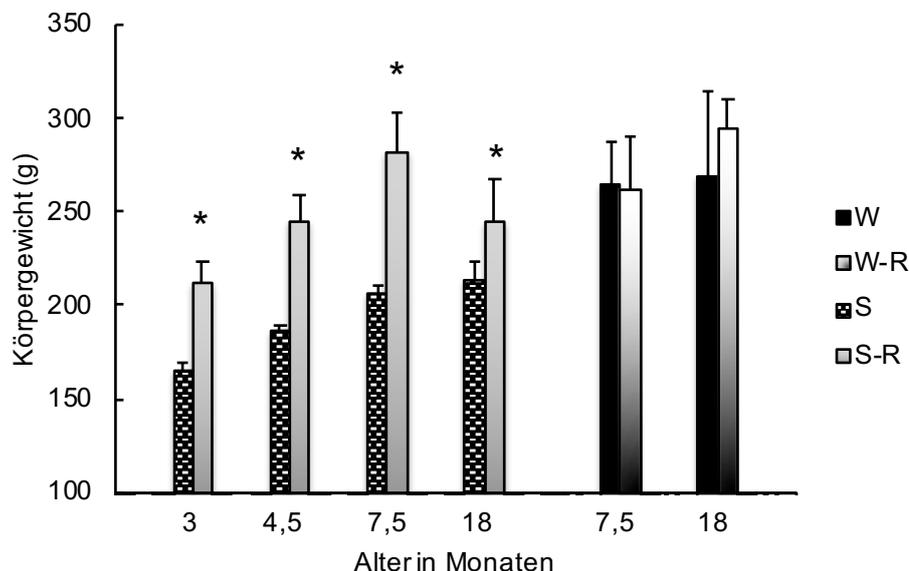
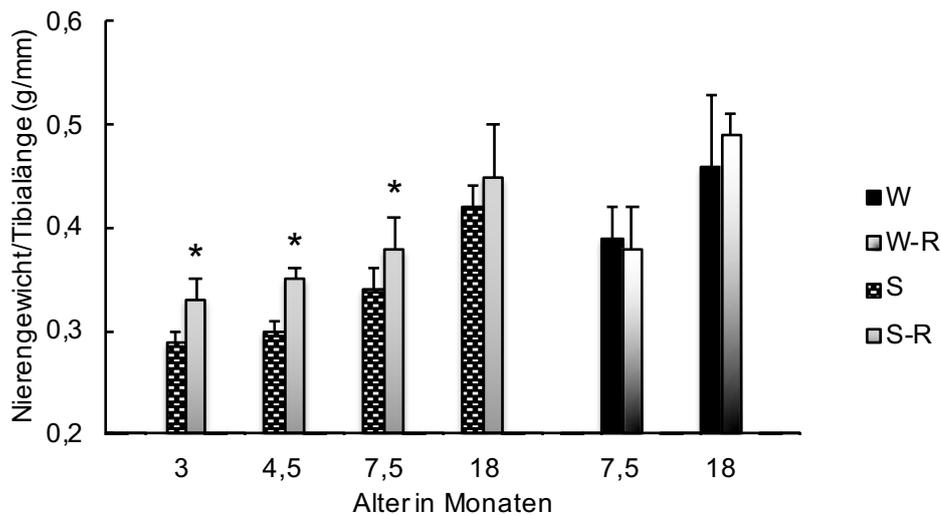


Abb. 17: Einfluss körperlicher Aktivität auf das Körpergewicht. Körpergewicht der Wistar-Ratten (W) und SHR im Alter von 3 Monaten bis 18 Monaten jeweils im Vergleich Nicht-Läufer gegen Läufer (R). Dargestellt sind Mittelwerte ± SD von  $n = 6$  Tieren. \* =  $p < 0,05$  vs. Nicht-Läufer gleichen Alters.

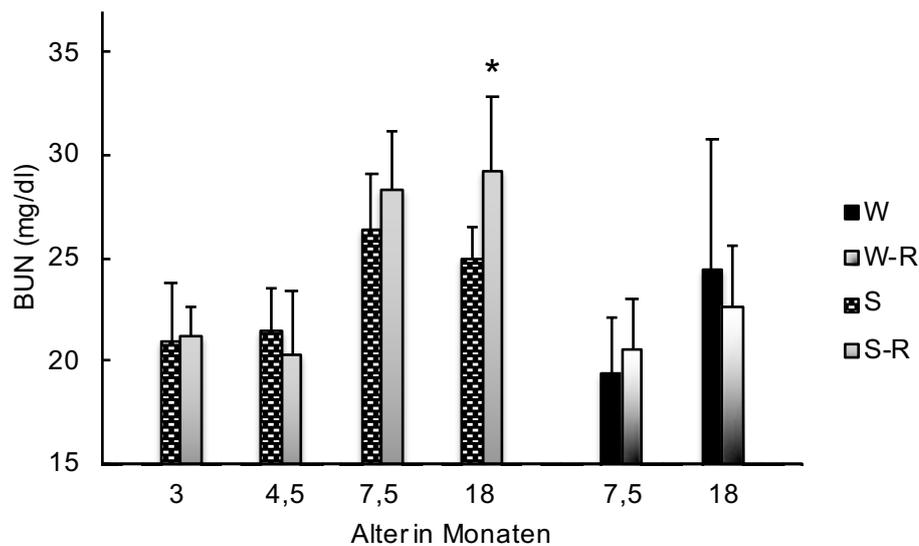
### 3.2.4 Nierengewicht und – funktion

Das Nierengewicht im Vergleich zwischen Läufern und Nicht-Läufern wurde wieder in Bezug zur Tibiallänge angegeben. In SHR, die im prähypertensiven Stadium mit dem Training begonnen haben, zeigte sich eine signifikante Zunahme des Nierengewichts. Diese Zunahme konnte weder in den alten SHR, noch in den Wistar-Ratten beobachtet werden.



**Abb. 18: Einfluss körperlicher Aktivität auf das Nierengewicht.** Nierengewichte/Tibiallänge der Wistar-Ratten (W) und SHR im Alter von 3 Monaten bis 18 Monaten jeweils im Vergleich Nicht-Läufer gegen Läufer (R). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 6$  Tieren. \* =  $p < 0,05$  vs. Nicht-Läufer gleichen Alters.

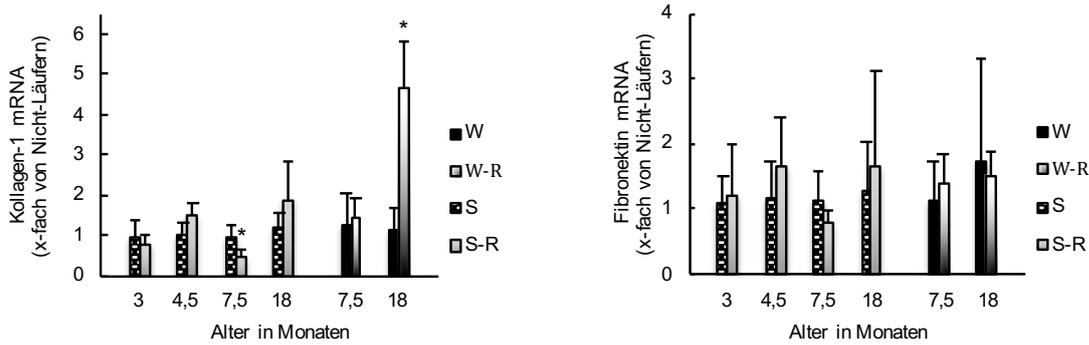
Die BUN-Werte der 18 Monate alten SHR stiegen durch das Training signifikant an ( $24,94 \pm 1,5$  mg/dl vs.  $29,27 \pm 3,6$  mg/dl) und sprechen für eine Einschränkung der Nierenfunktion gegenüber den Nicht-Läufern. Dies zeigte sich bereits im Alter von 7,5 Monaten ohne das Signifikanzniveau zu erreichen. Die BUN-Werte sowohl der normotensiven Ratten, als auch der 3 und 4,5 Monate alten SHR blieben durch die körperliche Aktivität unbeeinflusst. Die Ergebnisse sind in Abb. 19 dargestellt.



**Abb. 19: Einfluss körperlicher Aktivität auf die Nierenfunktion.** BUN-Werte der Wistar-Ratten (W) und SHR im Alter von 3 Monaten bis 18 Monaten jeweils im Vergleich Nicht-Läufer gegen Läufer (R). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 6$  Tieren. \* =  $p < 0,05$  vs. Nicht-Läufer gleichen Alters.

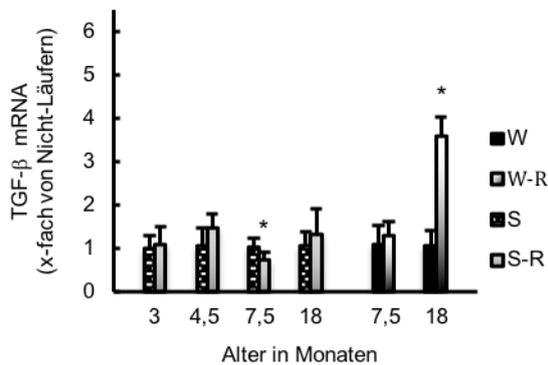
### 3.2.5 Strukturproteine und Fibrosemarker

Während die Fibronectin-mRNA-Expression durch das Training in allen Gruppen unbeeinflusst blieb, fiel eine unterschiedliche Regulierung der Kollagen-1-Expression in den normotensiven und hypertensiven Ratten auf. In den SHR, die im prähypertensiven Stadium mit dem Training begonnen haben, zeigte sich mit 7,5 Monaten eine signifikante Herabregulierung. Im Gegensatz dazu stieg die Expression in den 18 Monate alten SHR-Läufern wieder an ohne dabei signifikant gegenüber den Nicht-Läufern erhöht zu sein. In den 18 Monate alten Wistar-Ratten hingegen führte die körperliche Aktivität zu einer signifikanten Induktion der Kollagen-1-Expression um das  $4,7 \pm 1,1$ fache.



**Abb. 20: Einfluss körperlicher Aktivität auf die Kollagen-1- und Fibronectin-mRNA-Expression.** Kollagen-1- und Fibronectin-mRNA-Expression der Wistar-Ratten (W) und SHR im Alter von 3 Monaten bis 18 Monaten jeweils im Vergleich Nicht-Läufer gegen Läufer (R). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 6$  Tieren. \* =  $p < 0,05$  vs. Nicht-Läufer gleichen Alters.

Ähnliche Ergebnisse ergaben die Untersuchungen der TGF- $\beta$ -mRNA-Expression. Auch TGF- $\beta$  wurde in den 7,5 Monate alten SHR durch körperliche Aktivität herabreguliert in den alten Wistar-Ratten aber induziert. Abb. 21 stellt die Unterschiede dar.

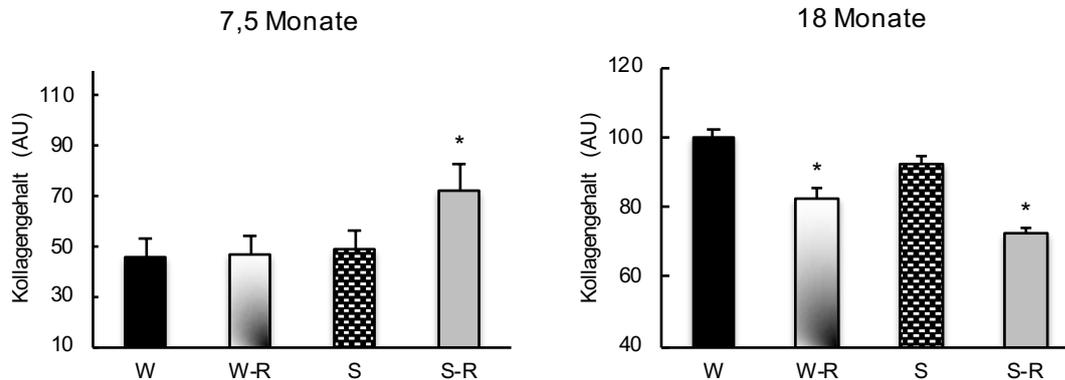


**Abb. 21: Einfluss körperlicher Aktivität auf die TGF- $\beta$ -mRNA-Expression.** TGF- $\beta$ -mRNA-Expression der Wistar-Ratten (W) und SHR im Alter von 3 Monaten bis 18 Monaten jeweils im Vergleich Nicht-Läufer gegen Läufer (R). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 6$  Tieren. \* =  $p < 0,05$  vs. Nicht-Läufer gleichen Alters.

Die entsprechenden histologischen Nierenschnitte zeigen einen signifikant erhöhten Kollagengehalt im Nierencortex der 7,5 Monate alten SHR durch das Training. Die 18 Monate alten SHR konnten dagegen durch Laufen den Kollagenanteil reduzieren.

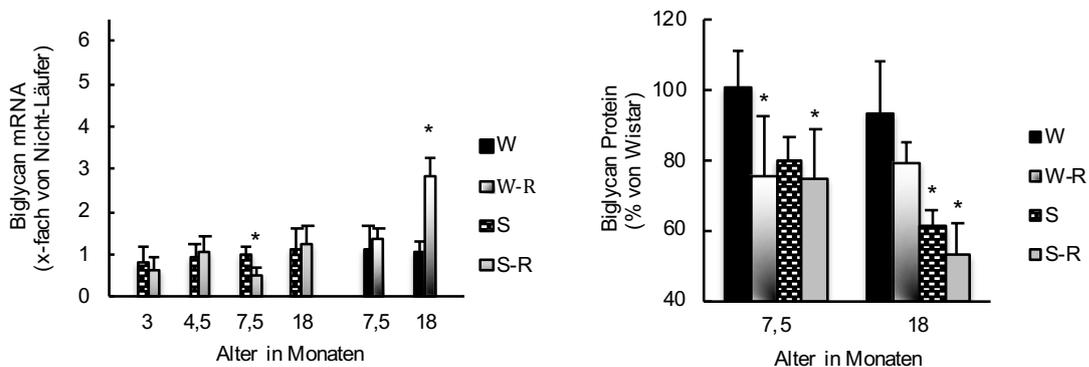
In den histologischen Schnitten der normotensiven Tiere fiel im Alter von 7,5 Monaten kein Unterschied zwischen Läufern und Nicht-Läufern auf. Im Alter von 18 Monaten

zeigte sich dann eine signifikante Reduktion des Kollagengehalts durch die körperliche Aktivität. Die Ergebnisse sind in Abb. 22 dargestellt.

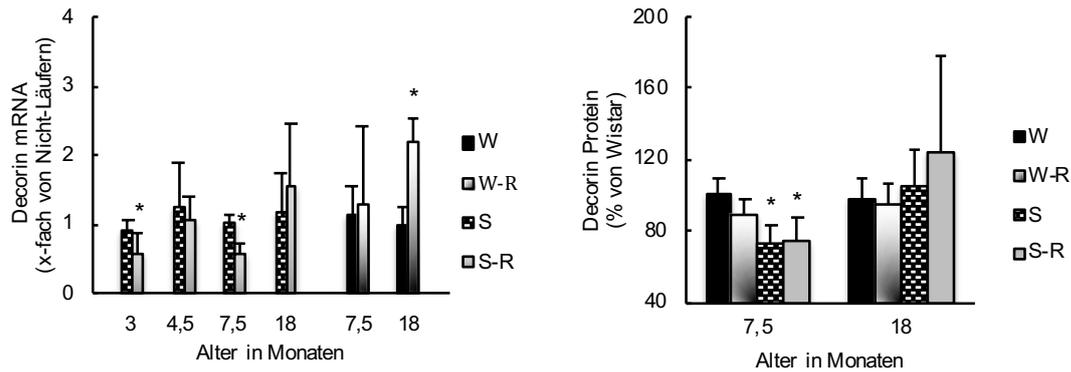


**Abb. 22: Einfluss körperlicher Aktivität auf den Kollagengehalt der histologischen Schnitte.** Kollagengehalt der histologischen Schnitte der 7,5 und 18 Monate alten Wistar-Ratten (W) und SHR jeweils im Vergleich Nicht-Läufer gegen Läufer (R). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 2$  Tieren. \* =  $p < 0,05$  vs. Nicht-Läufer gleichen Alters.

Wie in Abb. 23 und 24 dargestellt, wurde Biglycan und Decorin in den jungen trainierten SHR weniger exprimiert als in den entsprechenden Nicht-Läufern. Dieser Effekt war auf Proteinebene nicht erkennbar. Wie Kollagen-1 und TGF- $\beta$  wurden auch Decorin und Biglycan durch das Training in den normotensiven 18 Monate alten Ratten heraufreguliert.



**Abb. 23: Einfluss körperlicher Aktivität auf die Biglycan-mRNA-Expression und den Biglycanproteingehalt.** Biglycan-mRNA-Expression (3 Monate bis 18 Monate) und Biglycanproteingehalt (7,5 und 18 Monate) der Wistar-Ratten (W) und SHR. Die mRNA-Expression wird als x-faches der altersentsprechenden Nicht-Läufer und der Proteingehalt in % der altersentsprechenden normotensiven Kontrolle angegeben. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 6$  Tieren (mRNA),  $n = 3$  (WB). \* =  $p < 0,05$  vs. Nicht-Läufer gleichen Alters (mRNA), \* =  $p < 0,05$  vs. W gleichen Alters (WB).



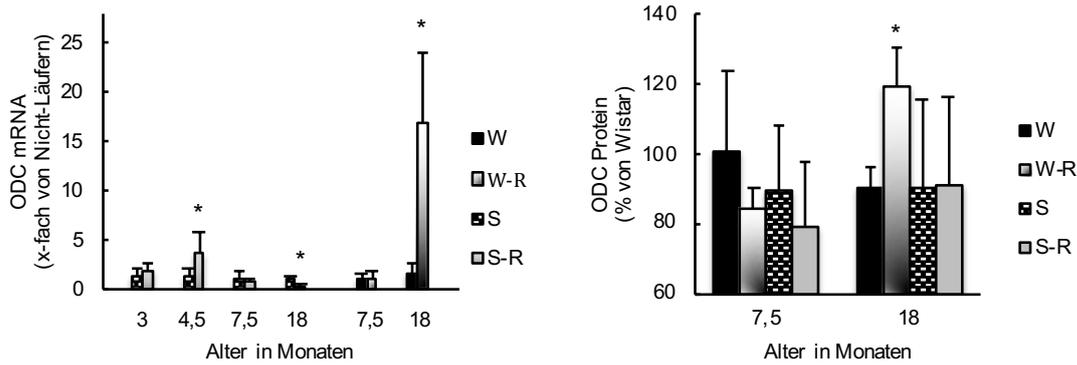
**Abb. 24: Einfluss körperlicher Aktivität auf die Decorin-mRNA-Expression und den Decorinproteingehalt.** Decorin-mRNA-Expression (3 Monate bis 18 Monate) und Decorinproteingehalt (7,5 und 18 Monate) der Wistar-Ratten (W) und SHR. Die mRNA-Expression wird als x-faches der altersentsprechenden Nicht-Läufer und der Proteingehalt in % der altersentsprechenden normotensiven Kontrolle angegeben. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 6$  Tieren (mRNA),  $n = 3$  (WB). \* =  $p < 0,05$  vs. Nicht-Läufer gleichen Alters (mRNA), \* =  $p < 0,05$  vs. W gleichen Alters (WB).

In der Zusammenschau lässt sich feststellen, dass die körperliche Aktivität bei den 18 Monate alten Wistar-Ratten zu einer Erhöhung der Expression von Strukturproteinen und Fibrosemakern führt. Im Gegensatz dazu scheinen diese Gene in den prähypertensiv mit dem Training gestarteten SHR im Alter von 7,5 Monaten herabreguliert. Diese Tiere wiederum zeigten in der Histologie einen erhöhten Kollagengehalt im Sinne einer Fibrose.

### 3.2.6 ODC und PTHrP-Rezeptor

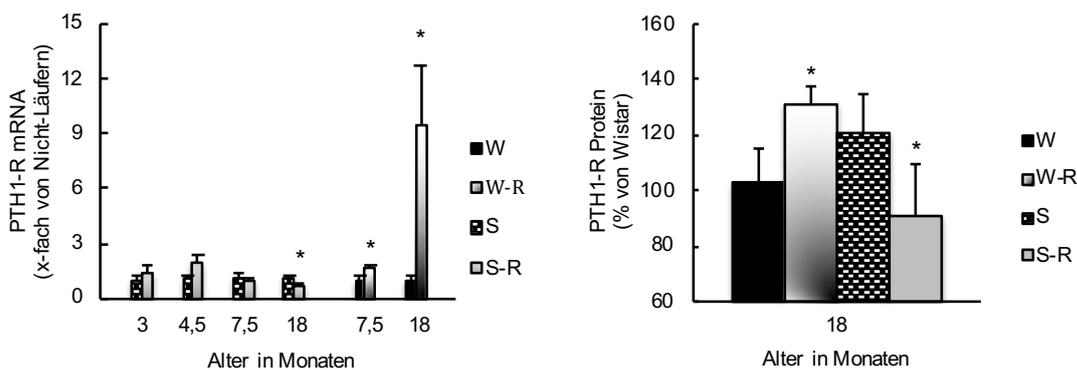
Wie in Abb. 25 dargestellt wird die ODC-Expression in normotensiven und spontan hypertensiven Ratten durch das Training unterschiedlich beeinflusst. Während die ODC in den 4,5 Monate alten SHR Läufern signifikant höher ist als in den entsprechenden Nicht-Läufern, wird sie in den alten SHR durch Laufen weniger exprimiert.

In den 18 Monate alten Wistar-Ratten wurde die ODC-Expression durch Laufen um das  $17 \pm 7,3$ fache erhöht. Dies zeigte sich auch auf Proteinebene.



**Abb. 25: Einfluss körperlicher Aktivität auf die ODC-mRNA-Expression und den ODC-Proteingehalt.** ODC-mRNA-Expression (3 Monate bis 18 Monate) und ODC-Proteingehalt (7,5 und 18 Monate) der Wistar-Ratten (W) und SHR. Die mRNA-Expression wird als x-faches der altersentsprechenden Nicht-Läufer und der Proteingehalt in % der altersentsprechenden normotensiven Kontrolle angegeben. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 6$  Tieren (mRNA),  $n = 3$  (WB). \* =  $p < 0,05$  vs. Nicht-Läufer gleichen Alters (mRNA), \* =  $p < 0,05$  vs. W gleichen Alters (WB).

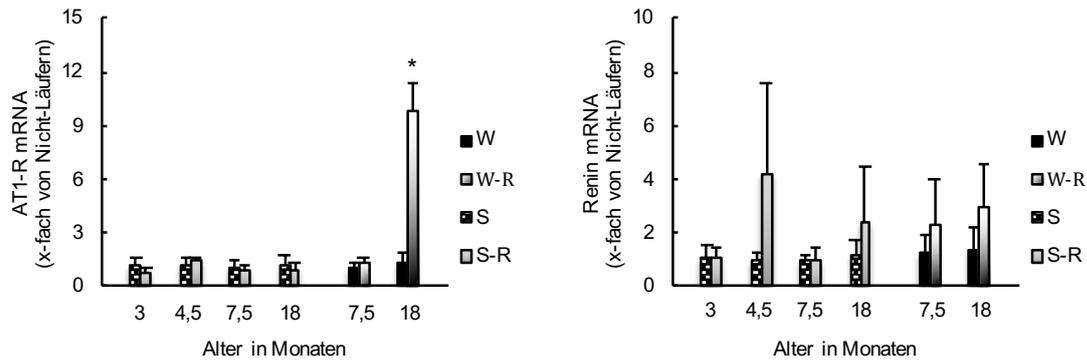
Die PTH1-R-Expression wurde sowohl in den jungen als auch in den 18 Monate alten Wistar-Ratten durch die körperliche Aktivität gesteigert. In den alten SHR konnte hingegen der im Vergleich zu den Wistar-Tieren erhöhte PTH1-R durch das Laufen wieder reduziert werden. Die veränderte mRNA-Expression spiegelte sich auf Proteinebene wieder.



**Abb. 26: Einfluss körperlicher Aktivität auf die PTH1-R-mRNA-Expression und den PTH1-R-Proteingehalt.** PTH1-R-mRNA-Expression (3 Monate bis 18 Monate) und PTH1-R-Proteingehalt (18 Monate) der Wistar-Ratten (W) und SHR jeweils im Vergleich Nicht-Läufer gegen Läufer (R). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 6$  Tieren (mRNA),  $n = 3$  (WB). \* =  $p < 0,05$  vs. Nicht-Läufer gleichen Alters.

### 3.2.7 Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Der AT<sub>1</sub>-Rezeptor wurde in den 18 Monate alten normotensiven Läufer signifikant hochreguliert, während sich in den anderen Gruppen kein Unterschied durch die körperliche Aktivität zeigte. Wie in Abb. 27 dargestellt, wird die Renin-Expression durch das Training nicht signifikant gesteigert.



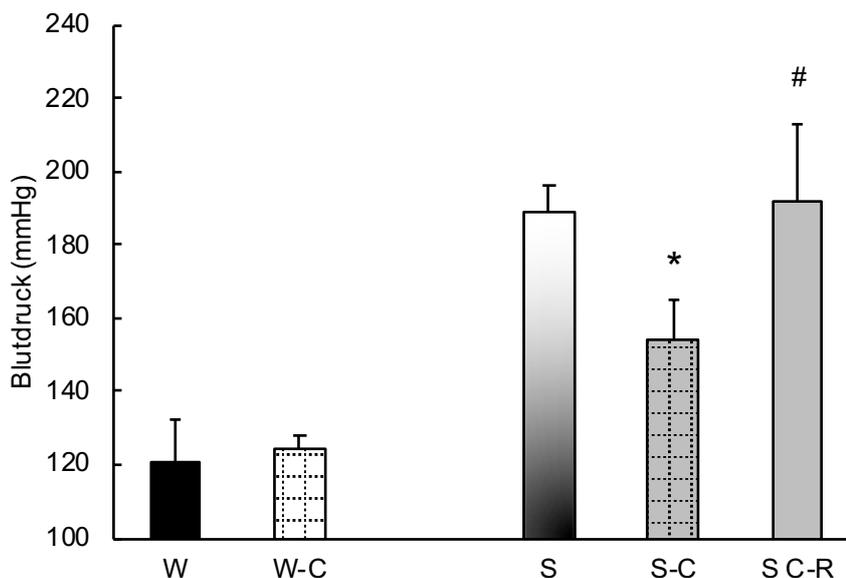
**Abb. 27: Einfluss körperlicher Aktivität auf die AT<sub>1</sub>-R- und Renin-mRNA-Expression.** AT<sub>1</sub>-R- und Renin-mRNA-Expression der Wistar-Ratten (W) und SHR im Alter von 3 Monaten bis 18 Monaten jeweils im Vergleich Nicht-Läufer gegen Läufer (R). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 6$  Tieren. \* =  $p < 0,05$  vs. Nicht-Läufer gleichen Alters.

### 3.3 Der Einfluss von Captopril und körperlicher Aktivität auf normotensive und hypertensive Ratten

Der Einfluss des ACE-Hemmers Captopril auf die renalen Umbauprozesse in normotensiven und hypertensiven Ratten in Verbindung mit körperlicher Aktivität wird im Folgenden dargestellt. Zu diesem Zweck wurden ausschließlich 18 Monate alte SHR, die ihr Training im hypertensiven Stadium (12 Monate) begonnen haben, untersucht.

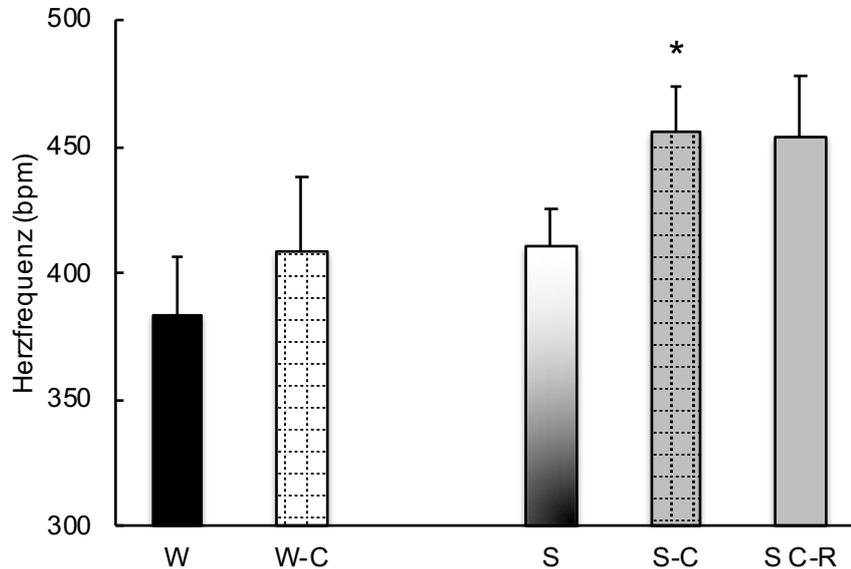
#### 3.3.1 Blutdruck und Herzfrequenz

Da Rebelo et al. (2012) dokumentierten bereits den signifikanten Blutdruckabfall der spontan hypertensiven Tiere unter der Captopril-Therapie (von  $189 \pm 7$  mmHg auf  $154 \pm 11$  mmHg). In der Trainingsgruppe konnte Captopril diesen Effekt nicht erzielen ( $192 \pm 21$  mmHg).



**Abb. 28: Einfluss von Captopril und körperlicher Aktivität auf den systolischen Blutdruck.** Systolischer Blutdruck der Wistar-Ratten (W) und SHR (S) im Alter von 18 Monaten unter Captopriltherapie (C) und/oder körperlicher Aktivität (R) im Vergleich zur Kontrollgruppe (S bzw. W). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 6$  Tieren. \* =  $p < 0,05$  vs. S bzw. W, # =  $p < 0,05$  vs. C.

Abb 29. stellt die Herzfrequenz am Ende der Versuchsreihe dar und zeigt einen zum Teil signifikanten Anstieg der Herzfrequenz in allen Tieren unter der Captopriltherapie. Das körperliche Training konnte diesen Anstieg nicht beeinflussen.



**Abb. 29: Einfluss von Captopril und körperlicher Aktivität auf die Herzfrequenz.** Herzfrequenz der Wistar-Ratten (W) und SHR (S) im Alter von 18 Monaten unter Captopriltherapie (C) und/oder körperlicher Aktivität (R) im Vergleich zur Kontrollgruppe (S bzw. W). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 6$  Tieren. \* =  $p < 0,05$  vs. S bzw. W.

### 3.3.2 Laufdaten

Die Laufdaten der alten SHR unter Captopriltherapie waren mit denen der Tiere ohne Medikation vergleichbar.

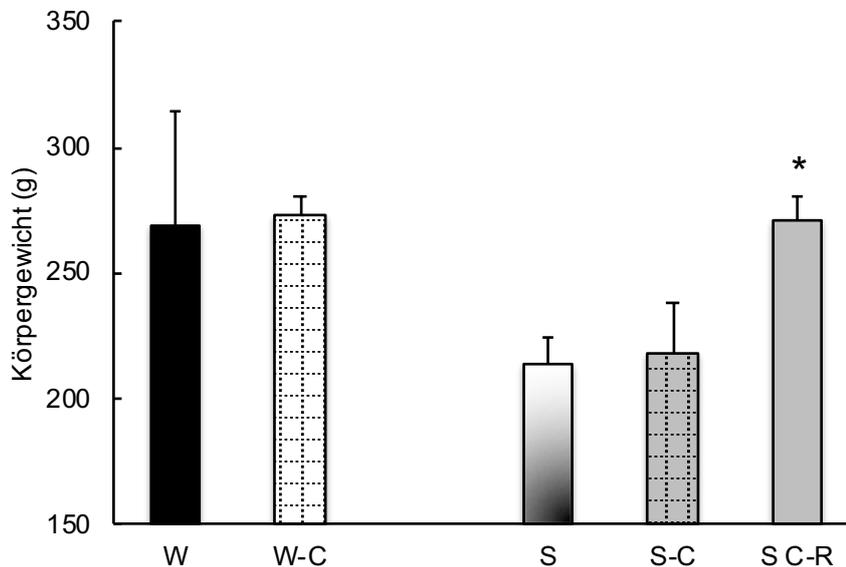
**Tab. 4: Laufdaten der Wistar-Ratten (W) und SHR (S) im Alter von 18 Monaten unter Captopriltherapie.**

	Laufstrecke km/w	Laufgeschwindigkeit km/h	Laufzeit h/w
<b>S 18-CR *</b>	45,7 $\pm$ 8,8	2,3 $\pm$ 0,1	19,4 $\pm$ 2,8

Laufstrecke, Laufgeschwindigkeit und Laufzeit der 18 Monate alten SHR (S) unter Captoprilmedikation (C). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 6$  Tieren. \* = Die entsprechenden Werte wurden im Rahmen der Arbeiten von Da Rebelo et al (2012) und Horn (2015) erhoben.

### 3.3.3 Gewicht

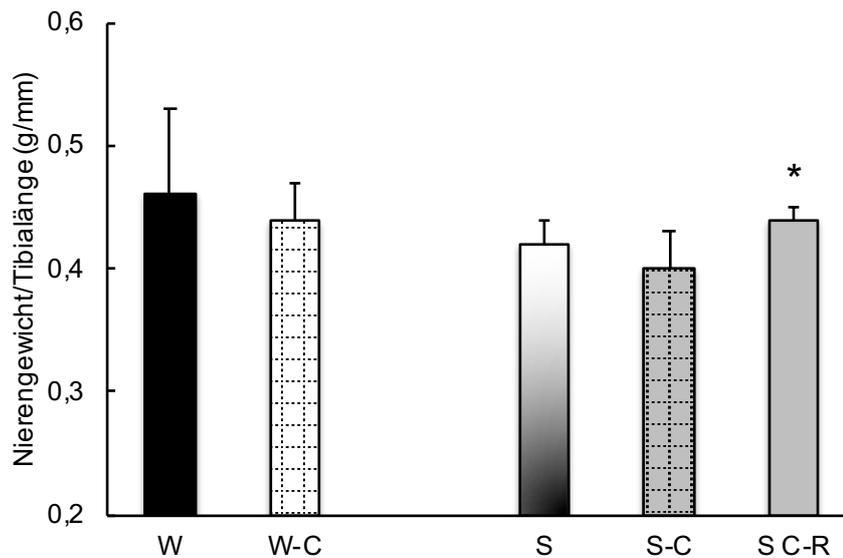
Captopril beeinflusste das Körpergewicht nicht. Wie zuvor bei den anderen SHR, nahmen die SHR auch unter Captopriltherapie durch das Training zu.



**Abb. 30: Einfluss von Captopril und körperlicher Aktivität auf das Körpergewicht.** Körpergewicht der Wistar-Ratten (W) und SHR (S) im Alter von 18 Monaten unter Captopriltherapie (C) und/oder körperlicher Aktivität (R) im Vergleich zur Kontrollgruppe (S bzw. W). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 6$  Tieren. \* =  $p < 0,05$  vs. S bzw. W.

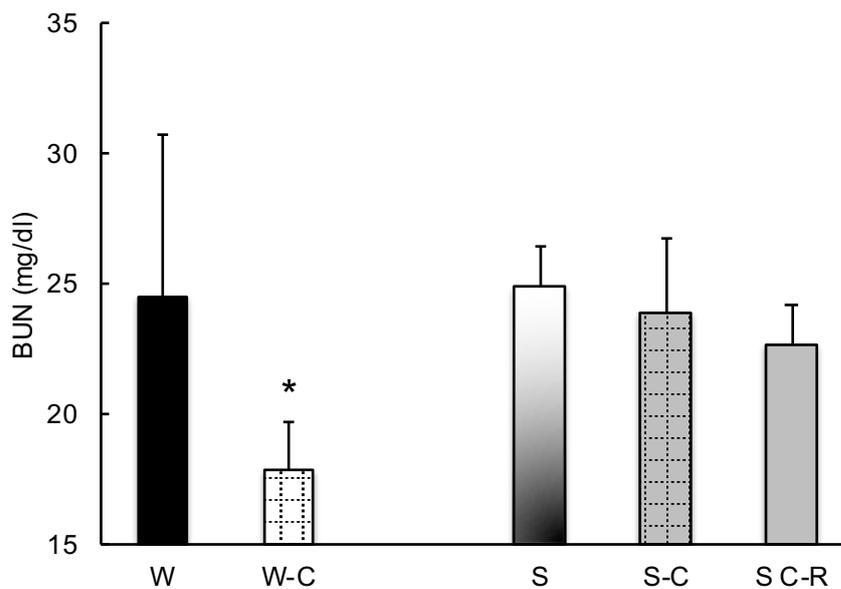
### 3.3.4 Nierengewicht und – funktion

Die spontan hypertensiven und normotensiven Ratten ohne Medikation unterschieden sich im Verhältnis des Nierengewichts zur Tibiallänge nicht von der Captoprilgruppe. Die unter der körperlichen Aktivität beobachtete Nierenhypertrophie der SHR, trat auch unter Captoprilgabe auf.



**Abb. 31: Einfluss von Captopril und körperlicher Aktivität auf das Nierengewicht.** Nierengewichte/Tibialänge der Wistar-Ratten (W) und SHR (S) im Alter von 18 Monaten unter Captopriltherapie (C) und/oder körperlicher Aktivität (R) im Vergleich zur Kontrollgruppe (S bzw. W). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 6$  Tieren. \* =  $p < 0,05$  vs. S bzw. W

Die BUN-Konzentration in den Wistar-Ratten wurde durch Captopril signifikant von  $24,48 \pm 6,2$  mg/dl auf  $17,88 \pm 1,8$  mg/dl gesenkt. In den SHR konnte dies nicht beobachtet werden. Es fiel aber auf, dass die trainingsbedingte Erhöhung der BUN-Konzentration unter Captopril ausblieb ( $29,27 \pm 3,6$  mg/dl vs.  $22,7 \pm 1,5$  mg/dl) und somit die Nierenfunktion verbessert werden konnte.

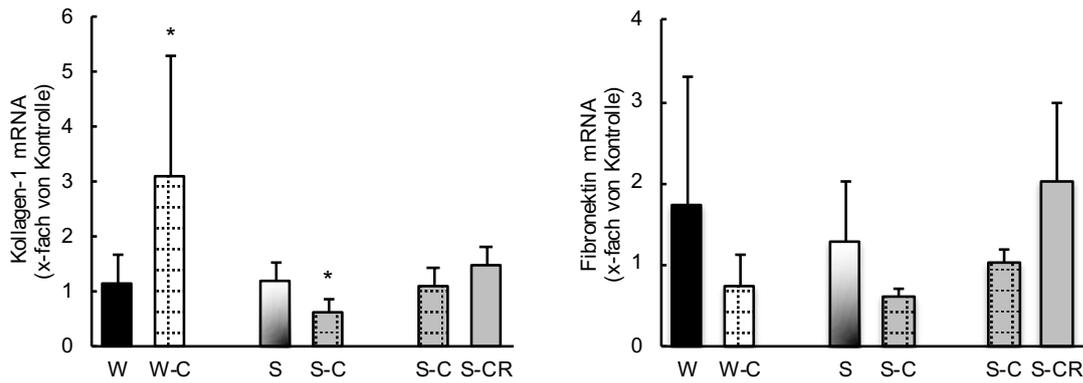


**Abb. 32: Einfluss von Captopril und körperlicher Aktivität auf die Nierenfunktion.** BUN-Werte der Wistar-Ratten (W) und SHR (S) im Alter von 18 Monaten unter Captopriltherapie (C) und/oder körperlicher Aktivität (R) im Vergleich zur Kontrollgruppe (S bzw. W). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 6$  Tieren. \* =  $p < 0,05$  vs. S bzw. W

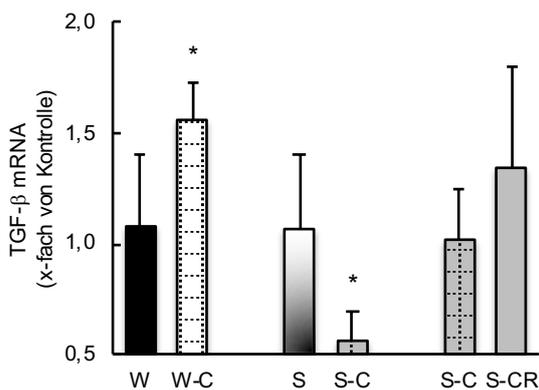
### 3.3.5 Strukturproteine und Fibrosemarker

Der Einfluss von Captopril auf die mRNA-Expression der extrazellulären Matrixproteine unterschied sich in den normotensiven und hypertensiven Ratten. Bei den Wistar Ratten wurde Kollagen-1 und TGF- $\beta$  durch den ACE-Inhibitor signifikant hochreguliert. Im Gegensatz dazu wurde die Expression dieser Gene mithilfe von Captopril in den SHR signifikant reduziert und wirkte somit antifibrotisch.

Die Therapie bewirkte sowohl in den Wistar als auch in den SHR eine Reduktion der Fibronectin-Expression, jedoch nicht signifikant. Dieser Effekt blieb unter körperlicher Aktivität aus. Die entsprechenden Ergebnisse sind in Abb. 33 und 34 dargestellt.

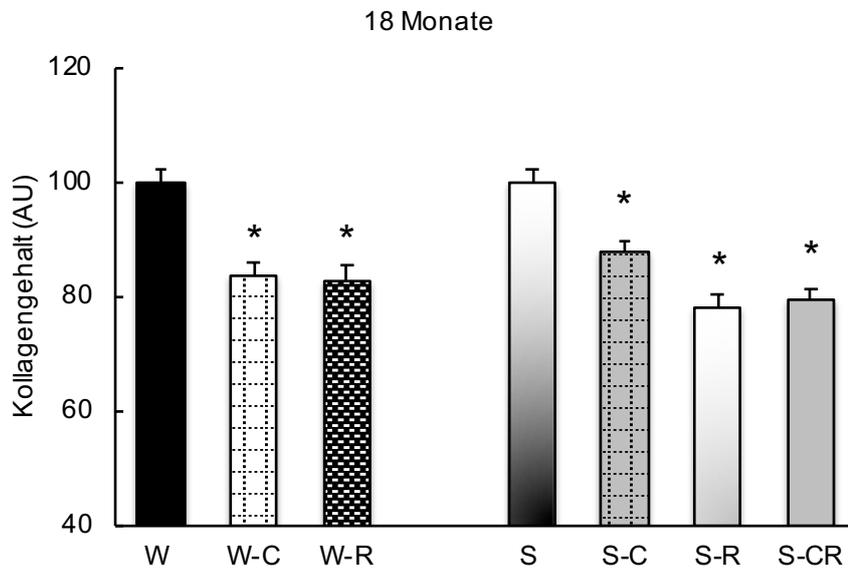


**Abb. 33: Einfluss von Captopril und körperlicher Aktivität auf die Kollagen-1- und Fibronectin-mRNA-Expression.** Kollagen-1- und Fibronectin-mRNA-Expression der Wistar-Ratten (W) und SHR (S) im Alter von 18 Monaten unter Captopriltherapie (C) und/oder körperlicher Aktivität (R) im Vergleich zur Kontrollgruppe (S, W, S-C). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 6$  Tieren. \* =  $p < 0,05$  vs. S bzw. W.



**Abb. 34: Einfluss von Captopril und körperlicher Aktivität auf die TGF- $\beta$ -mRNA-Expression.** TGF- $\beta$ -mRNA-Expression der Wistar-Ratten (W) und SHR (S) im Alter von 18 Monaten unter Captopriltherapie (C) und/oder körperlicher Aktivität (R) im Vergleich zur Kontrollgruppe (S, W, S-C). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 6$  Tieren. \* =  $p < 0,05$  vs. S bzw. W

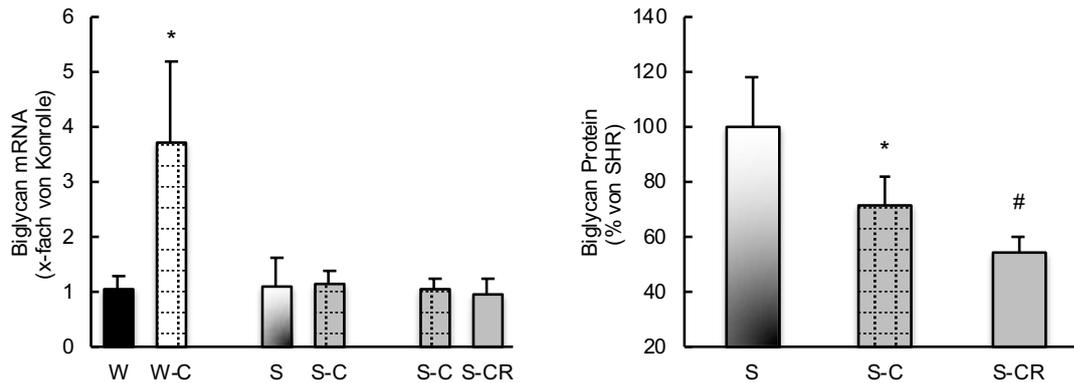
Die Ergebnisse der histologischen Schnitte zeigen eine Reduktion des Kollagengehalts sowohl durch die ACE-Inhibition als auch durch die körperliche Aktivität in Wistar-Ratten und SHR. Ein additiver Effekt der Medikation in Kombination mit erhöhter körperlicher Aktivität konnte nicht festgestellt werden.



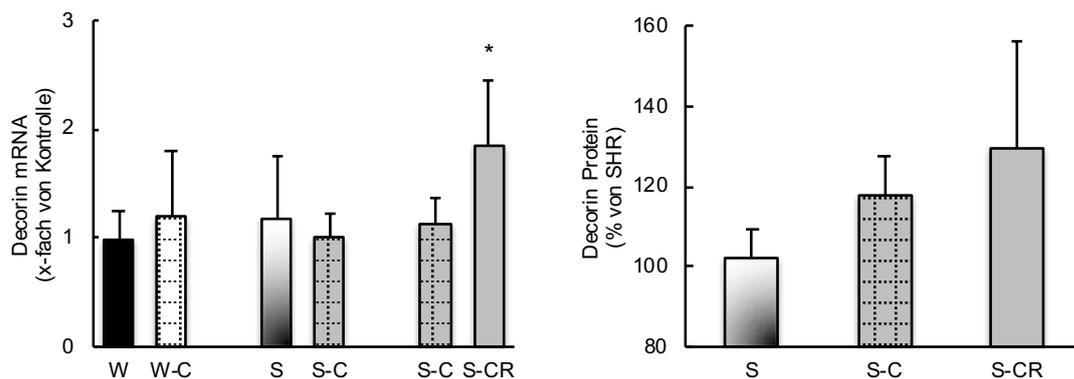
**Abb. 35: Einfluss von Captopril und körperlicher Aktivität auf den Kollagengehalt der histologischen Nierenschnitte.** Kollagengehalt der histologischen Nierenschnitte der 18 Monate alten Wistar-Ratten (W) und SHR (S) unter Captopriltherapie (C) und körperlicher Aktivität (R) im Vergleich zur Kontrollgruppe (S bzw. W). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 2$  Tieren. \* =  $p < 0,05$  vs. S bzw. W

Captopril bewirkt in den alten Wistar-Ratten eine zum Teil signifikant erhöhte Expression von Biglycan und Decorin. Damit zeigen die SLRP's einen ähnlichen Verlauf wie TGF- $\beta$  und Kollagen-1 unter der ACE-Inhibition.

Wie in Abb. 37 dargestellt, konnte in den SHR lediglich die Kombination aus Lauftraining und Captopril die Decorin-mRNA-Konzentration erhöhen. Die medikamentöse Therapie reduzierte Biglycan auf Proteinebene signifikant. Dieser Effekt wurde durch die körperliche Aktivität deutlich verstärkt (Abb. 36).



**Abb. 36: Einfluss von Captopril und körperlicher Aktivität auf die Biglycan-mRNA- und Protein-Expression.** Biglycan-mRNA- und Protein-Expression der Wistar-Ratten (W) und SHR (S) im Alter von 18 Monaten unter Captopriltherapie (C) und/oder körperlicher Aktivität (R). Die mRNA-Expression wird als x-faches der Kontrolle (W, S, S-C) und der Proteingehalt in % der SHR ohne Intervention (S) angegeben. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 6$  Tieren (mRNA),  $n = 3$  (WB). \* =  $p < 0,05$  vs. Kontrolle (mRNA), \* =  $p < 0,05$  vs. S (WB), # =  $p < 0,05$  vs. C.

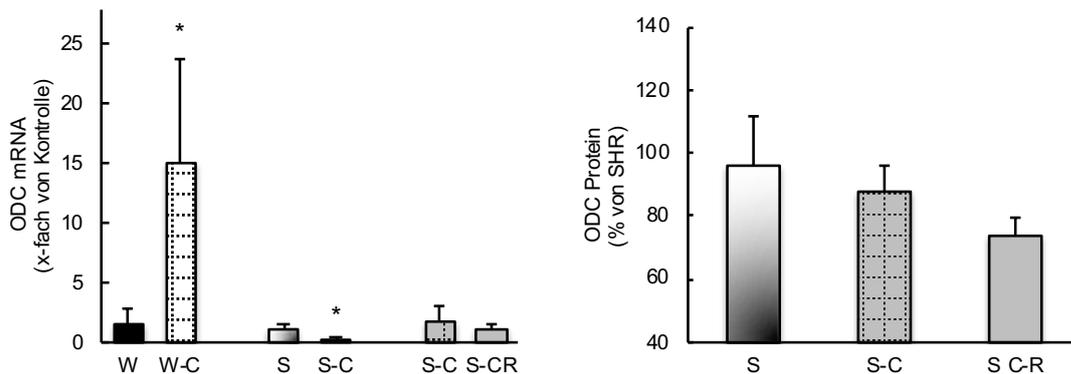


**Abb. 37: Einfluss von Captopril und körperlicher Aktivität auf die Decorin-mRNA- und Protein-Expression.** Decorin-mRNA- und Protein-Expression der Wistar-Ratten (W) und SHR (S) im Alter von 18 Monaten unter Captopriltherapie (C) und/oder körperlicher Aktivität (R). Die mRNA-Expression wird als x-faches der Kontrolle (W, S, S-C) und der Proteingehalt in % der SHR ohne Intervention (S) angegeben. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 6$  Tieren (mRNA),  $n = 3$  (WB). \* =  $p < 0,05$  vs. Kontrolle (mRNA), \* =  $p < 0,05$  vs. S (WB).

Diese Ergebnisse sprechen für einen antifibrotischen und nephroprotektiven Effekt der Captopriltherapie in spontan hypertensiven Ratten, der durch körperliche Aktivität zusätzlich verstärkt wird. Die normotensiven Tiere zeigten trotz erhöhter Expression der Fibrosemaker unter dem ACE-Inhibitor ebenfalls eine Reduktion des Kollagengehalts in der Nierenhistologie.

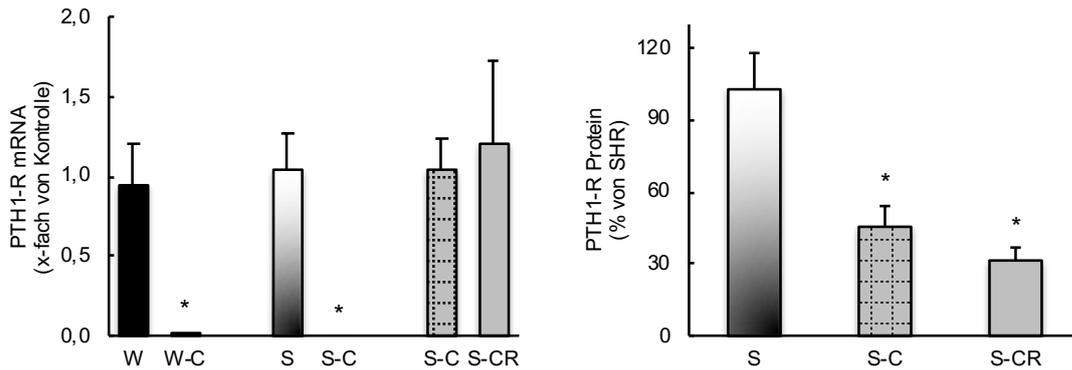
### 3.3.6 ODC und PTHrP-Rezeptor

Die Captopriltherapie hatte sowohl in den normotensiven als auch in den spontan hypertensiven Tieren denselben Effekt auf die ODC-Expression wie das Lauftraining. Die ODC als Proliferations- und Regenerationsmarker wurde in den Wistar Ratten um das  $15 \pm 9$ fache hochreguliert, in den SHR um 50% supprimiert. Auf Proteinebene deutete sich diese Herabregulierung ebenfalls an. Die körperliche Aktivität zeigte unter dem ACE-Hemmer keine zusätzliche Wirkung.



**Abb. 38: Einfluss von Captopril und körperlicher Aktivität auf die ODC-mRNA- und Protein-Expression.** ODC-mRNA- und Protein-Expression der Wistar-Ratten (W) und SHR (S) im Alter von 18 Monaten unter Captopriltherapie (C) und/oder körperlicher Aktivität (R). Die mRNA-Expression wird als x-faches der Kontrolle (W, S, S-C) und der Proteingehalt in % der SHR ohne Intervention (S) angegeben. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 6$  Tieren (mRNA),  $n = 3$  (WB). \* =  $p < 0,05$  vs. Kontrolle (mRNA), \* =  $p < 0,05$  vs. S (WB).

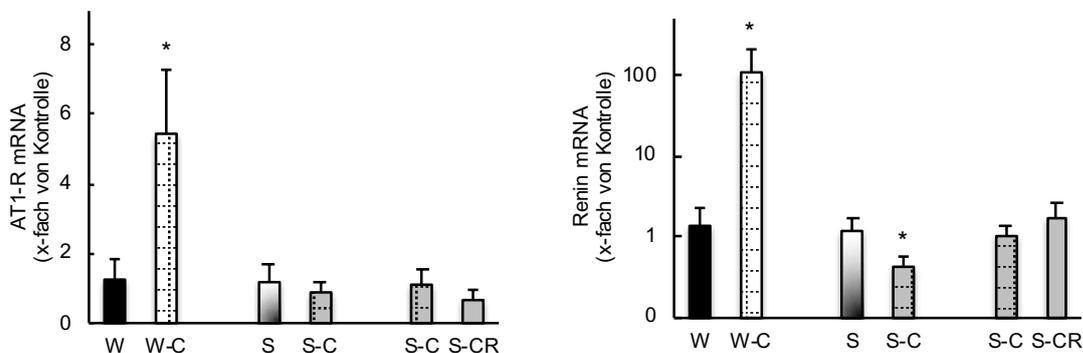
Wie in Abb. 39. dargestellt, wird die PTH1-R-Expression durch Captopril in Wistar Ratten und SHR gleichermaßen signifikant reduziert. Die Western-Blot-Analyse der spontan hypertensiven Ratten unter Captoprilbehandlung bestätigten dieses Ergebnis auf Proteinebene. Die körperliche Aktivität hatte keinen zusätzlichen Effekt. Diese Ergebnisse zeigen eine Wechselwirkung zwischen dem RAAS und dem vasodilatatorisch wirkenden PTH1-R.



**Abb. 39: Einfluss von Captopril und körperlicher Aktivität auf die PTH1-R-mRNA- und Protein-Expression.** PTH1-R-mRNA- und Protein-Expression der Wistar-Ratten (W) und SHR (S) im Alter von 18 Monaten unter Captopriltherapie (C) und/oder körperlicher Aktivität (R). Die mRNA-Expression wird als x-faches der Kontrolle (W, S, S-C) und der Proteingehalt in % der SHR ohne Intervention (S) angegeben. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 6$  Tieren (mRNA),  $n = 3$  (WB). \* =  $p < 0,05$  vs. Kontrolle (mRNA), \* =  $p < 0,05$  vs. S (WB).

### 3.3.7 Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Unter der Captopriltherapie stieg die  $AT_1$ -R- und Renin-Expression in den Wistar-Ratten signifikant an, während die SHR deutlich weniger Renin-mRNA aufwiesen. Die körperliche Aktivität hatte keinen ergänzenden Effekt zur Medikation.



**Abb. 40: Einfluss von Captopril und körperlicher Aktivität auf die  $AT_1$ -R und Renin-mRNA-Expression.**  $AT_1$ -R und Renin-mRNA-Expression der Wistar-Ratten (W) und SHR (S) im Alter von 18 Monaten unter Captopriltherapie (C) und/oder körperlicher Aktivität (R) im Vergleich zur Kontrollgruppe (S, W, S-C). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 6$  Tieren. \* =  $p < 0,05$  vs. S bzw. W.

## 4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt körperlicher Aktivität auf hypertensivbedingte Umbauprozesse der Niere am Model der spontan hypertensiven Ratte untersucht. Um die pathophysiologische Rolle des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems in diesem Zusammenhang näher zu analysieren, wurde ein Teil der Tiere mit dem ACE-Inhibitor Captopril behandelt.

### 4.1 Bluthochdruck unter körperlicher Aktivität.

In zahlreichen Studien konnte der blutdrucksenkende Effekt regelmäßiger körperlicher Aktivität nachgewiesen werden (9, 19). Dabei hing das Ausmaß der Blutdrucksenkung von Trainingsintensität, Dauer und Trainingsmethode ab.

Dieser Einfluss körperlicher Aktivität konnte in dieser Studie nicht beobachtet werden.

Das Lauftraining bewirkte in keiner Versuchsgruppe eine signifikante Blutdrucksenkung. Die entsprechenden Ergebnisse der 3 und 4,5 Monate alten SHR stimmen mit den Beobachtungen von Da Rebelo et al. (2012) und Horn (2015) überein. Diese Diskrepanz könnte durch die insgesamt deutlich höhere Trainingsintensität (50 – 80km/Woche, 2,5 – 3km/h) im hier angewandten Studienmodell verursacht sein. Meist wurden Untersuchungen unter geringer bis mäßiger körperlicher Belastung durchgeführt (7 – 8km/Woche, 1,2 km/h) (2, 15, 30, 45). Dieser Unterschied spiegelt sich auch im Körpergewicht der SHR wieder. Während vorwiegend eine Abnahme des Körpergewichts beschrieben wurde, erhöhte sich in dieser Untersuchung das Körpergewicht der SHR durch die körperliche Aktivität signifikant. Das Körpergewicht der normotensiven Kontrollen blieb durch das Laufen unbeeinflusst. Diese Ergebnisse sprechen für eine belastungsabhängige Organhypertrophie unter Bluthochdruck. Entsprechend zeigten sich die Nierengewichte der trainierten SHR erhöht.

### 4.2 Der Einfluss von körperlicher Aktivität auf bluthochdruckbedingte Adaptionenmechanismen der Niere.

Wie Bluthochdruck sich auf die Niere und die Entstehung von hypertensiven Nephropathien auswirkt ist Gegenstand vieler Forschungsarbeiten. Die spontan hypertensive Ratte wird als ideales Tiermodell zur Untersuchung dieser Fragestellung angesehen (39, 125). So geht Hultström et al. (2012) davon aus, dass Gefäßpathologien Ausgangspunkt für hypertensive Nierenschäden sind. Diese entstehen, wenn die Kapazität der myogenen Autoregulation der Niere überschritten

wird. Denn der intravasale Druck kann nur in einem bestimmten Bereich trotz Blutdruckschwankungen konstant gehalten werden. Ein erhöhter renaler Perfusionsdruck im juxtamedullären Kortex führt zur Mediahypertrophie der präglomerulären Arteriolen. Diese führt wiederum in einem Teil der Glomeruli zur Minderperfusion und Tubulusatrophie. Die verbliebenen Glomeruli reagieren kompensatorisch mit einer Hyperfiltration. Die Filtrationsfraktion kann über eine Konstriktion der Vas efferens erhöht werden. Der daraus resultierende intraglomeruläre Druckanstieg führt zu einer gesteigerten GFR, Proteinurie und letztendlich einer Nephrosklerose. Diese funktionellen Veränderungen resultieren in einer Aktivierung des RAAS und einem erhöhten Sympathikotonus.

Im Alter von 10 Wochen steigt der Blutdruck in SHR. Ab der 30. Woche nehmen die nachweisbaren hypertensiven Nierenschäden zu und sind ab der 60. Woche in Form glomerulärer und arteriolarer Sklerose, entzündlicher Infiltrate, interstitieller Fibrose und atropher dilatierter Tubuli histologisch nachweisbar (39).

Es ist allgemein anerkannt, dass regelmäßige körperliche Aktivität positive kardiovaskuläre Effekte auf die Entwicklung und Behandlung von Bluthochdruck und seine Folgeschäden hat.

Die genauen Auswirkungen von körperlichem Training auf bluthochdruckbedingte Nierenschäden sind jedoch wenig untersucht.

#### **4.2.1 Nierenfunktion**

In dieser Studie konnte eine erhöhte Plasma-BUN-Konzentration als Parameter der Nierenfunktion unter körperlicher Aktivität in den hypertensiven Ratten nachgewiesen werden. Dieser Anstieg blieb in den normotensiven Tieren aus. Die Erhöhung der BUN-Konzentration lässt auf eine belastungs- und blutdruckbedingte reduzierte Nierenfunktion schließen. Der unter Sport vermehrt anfallende Harnstoff akkumuliert sobald die GFR nicht mehr kompensatorisch erhöht werden kann (119). Interessanterweise blieb diese BUN-Erhöhung in den SHR unter einer Captopriltherapie aus. Dies lässt vermuten, dass die Beeinflussung der Nierenfunktion in den hypertensiven Tieren über das RAAS vermittelt wird. Insgesamt deuten die Ergebnisse auf unterschiedliche renale Kompensationsmechanismen zwischen normo- und hypertensiven Ratten hin. Ein möglicher Erklärungsansatz könnte die im Folgenden festgestellte unterschiedliche Adaption an die körperliche Belastung auf molekularer Ebene sein.

#### 4.2.2 Strukturproteine und Fibrosemarker

Die Nephrosklerose als Ausdruck einer hypertensiven Nierenschädigung kann in milder Form in SHR bereits im Alter von zehn Wochen nachgewiesen werden. Diese interstitielle Fibrose ist auf den juxtamedullären Cortex beschränkt und in der 70. Lebenswoche vollausgeprägt (46). Typische morphologische Veränderungen der Nephrosklerose sind Vaskulopathien mit Intima- und Mediaverdickung, Tubulusatrophien, interstitielle Fibrose mit Kollagen-1-Ablagerungen, Glomerulopathien und interstitielle inflammatorische Infiltration.

In den prähypertensiv mit dem Training gestarteten 7,5 Monate alten SHR bewirkte das Training eine Steigerung des Nierengewichts und histologisch eine interstitielle Kollagenanreicherung. Interessanterweise wurde auf molekulargenetischer Ebene die mRNA-Expression zentraler Fibrosemarker wie Kollagen-1, TGF- $\beta$ , Decorin und Biglycan herabreguliert. In den normotensiven Tieren konnten diese trainingsbedingten Effekte nicht beobachtet werden.

Eine vergleichbare Studie von Agarwal et al. (2011) zeigte in 23-Wochen alten SHR nach einem 16-Wochen-Lauftraining ebenfalls eine Reduktion der Kollagen-1-Expression. Im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit waren in trainierten SHR histologisch weniger fibrotische und glomeruläre Schäden nachweisbar (2). Auch Kohzuki et al. (2001) konnten eine trainingsbedingte Verbesserung der Glomerulosklerose in 5/6-nephrektomierten SHR histologisch nachweisen (59).

Diese Diskrepanz könnte durch den deutlichen Unterschied in Trainingsintensität und Dauer begründet sein. Agarwal et al. und Kohzuki et al. wählten ein Protokoll mit moderater Intensität (5 Tage/Woche, 1 h/d, 18 m/min für 16 Wochen und 20 m/min für 4 Wochen), wohingegen die Tiere dieser Studie (42 – 50 m/min, 30 - 60 km/Woche für 6 Monate) ein Training höherer Intensität durchführten. So zeigen beispielsweise Wistar-Ratten nach einem 12-wöchigen High Intensity Training histologisch nachweisbare glomeruläre und fibrotische Veränderungen und erhöhte Plasma-BUN-Werte. Diese Veränderungen könnten die Entstehung von späteren Nierenerkrankungen begünstigen (5).

Die reduzierte Menge Decorin in den SHR, die durch das Training weiter supprimiert wurde, könnte eine weitere Erklärung für die fibrotischen Veränderungen sein. Decorin gilt als antifibrotisch und kollagenstabilisierend. Decorin-defiziente Mäuse entwickeln in einem niereninsuffizienten Tiermodell eine gesteigerte Fibrose, der ein massiver Verlust an Tubuluszellen vorausgeht. Dieses Phänomen geht einer TGF- $\beta$ -Erhöhung voraus und scheint rein Decorin-abhängig zu sein (103). Im Vergleich zu den SHR

zeigten die Wistar einen niedrigeren Biglycangehalt und konnten diesen durch das Training reduzieren. In fibrotischen Nierenerkrankungen akkumuliert Biglycan interstitiell und wird durch TGF- $\beta$  induziert. Biglycan scheint ungünstige Effekte über Interaktionen mit TGF- $\beta$  auf fibrotische und inflammatorische Veränderungen der Niere zu haben (103).

Denkbar ist auch ein gestörter Kollagenumsatz, der sowohl in alten Wistar (41), als auch in alten SHR (40) bereits nachgewiesen wurde. Der vermehrte Kollagengehalt resultiert aus einer Induktion kollagenstabilisierender Proteine und einer Hemmung des Kollagenabbaus durch Erhöhung des Gewebeinhibitors der Metalloprotease-1 (TIMP1) und Reduktion der Matrix-Metalloprotease-9 (MMP-9). Durch die steigende Kollagenkonzentration wird die Kollagen-1-mRNA-Expression supprimiert (41). Unterstützt wird diese Theorie durch die Ergebnisse von Hultström et al. (2012), die auf Proteinebene eine Reduktion von MMP-9 und eine Erhöhung von TIMP1 in 15 Monate alten SHR nachwies. Das Training könnte diese Effekte verstärkt und zu den oben genannten Unterschieden zwischen SHR und Wistar geführt haben. So wäre es möglich das Sport trotz der reduzierenden Wirkung auf die Expression der Fibrosemarker nicht ausreicht um die Kollagenanreicherung zu senken.

Die Adaption an die körperliche Aktivität der alten Tiere, die erst im Alter von einem Jahr mit dem Lauftraining begonnen haben, unterscheiden sich grundsätzlich von denen der jungen Tiere.

Eine erhöhte BUN-Konzentration gibt Anhalt auf eine trainingsbedingte Verschlechterung der Nierenfunktion in den SHR mit hoher körperlicher Aktivität. Während in Wistar Ratten die mRNA-Expression von Kollagen-1, TGF- $\beta$ , Decorin und Biglycan durch das Training gesteigert wurde, wurde die ohnehin erhöhte Expression in den SHR nicht weiter heraufreguliert.

Die Ergebnisse lassen auf fehlende Kompensationsmechanismen der alten SHR an die körperliche Belastung schließen. Einige Studien deuteten bereits daraufhin das intensive körperliche Aktivität das Risiko für den Progress hypertensiver Nierenschäden erhöhen kann (5, 7, 63). Svarstad et al (2008) beobachteten sowohl in gesunden als auch in hypertensiven Patienten einen Abfall von GFR und effektivem renalem Plasmafluss (ERPF) während des Trainings (12, 111). Die alten Tiere sind womöglich schlechter in der Lage sich der veränderten Hämodynamik anzupassen wie die jüngeren Ratten. Dies könnte die beobachteten Unterschiede erklären.

Kontrovers scheint, dass sowohl die Nieren der normotensiven, als auch der hypertensiven Tiere nach dem Lauftraining einen geringeren Kollagengehalt aufwiesen.

Ein möglicher Erklärungsansatz könnte ein durch körperliche Aktivität induzierter erhöhter Kollagenabbau sein. Nicht nur Matrixmetalloproteasen sind an diesem Abbau beteiligt, sondern auch Autophagozytose. Durch diesen Prozess ist die Niere in der Lage TGF- $\beta$ -induzierte Kollagenanreicherungen im Rahmen fibrotischer Nierenerkrankungen zu reduzieren ohne die erhöhte Kollagen-mRNA-Expression zu beeinflussen (34, 53). Autophagozytose kann durch multiple intra- und extrazelluläre Faktoren hochreguliert werden. Zu diesen Induktoren zählen unter anderem TGF- $\beta$ , oxidativer Stress und hypoxische Zustände, die wiederum bei starker körperlicher Belastung steigen.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass SHR unter intensivem körperlichem Training Zeichen progredienter hypertensiver Nierenschäden zeigen. Es konnte abhängig von Alter und hypertensivem Stadium bei Trainingsbeginn zwischen fibrotisch-hypertrophen und funktionellen Veränderungen unterschieden werden. Die Ergebnisse zeigen deutliche Unterschiede in der transkriptionalen Regulation wichtiger Struktur- und Fibrosemarker zwischen normotensiven und hypertensiven Ratten unter intensivem Training. Diese führen zu eingeschränkten Kompensationsmechanismen der SHR an die körperliche Belastung.

#### **4.2.3 ODC**

ODC als initiales geschwindigkeitsbestimmendes Enzym des Polyaminstoffwechsels ist essentiell für die Zellproliferation, Zelldifferenzierung und die Proteinbiosynthese. Die Polyaminkonzentration und -synthese ist in schnell proliferierendem Gewebe gesteigert und wird durch verschiedene Wachstumsfaktoren induziert (35). Im arteriellen Gefäßsystem der SHR ist sowohl die ODC-Aktivität (122), als auch die Polyaminkonzentration (109) im Vergleich zu normotensiven Ratten deutlich erhöht. Die Gabe des spezifischen ODC-Inhibitors DFMO bewirkt in diesen Tieren, dass der Bluthochdruck und die damit einhergehenden Gefäßveränderungen sich weniger ausgeprägt entwickeln (21, 109). Der Zusammenhang zwischen Bluthochdruck und der renalen Ornithindecaboxylase ist wenig erforscht. Hayashi et al. (2002) wiesen in Dahl-Salz-sensitiven Ratten (SS) eine eingeschränkte renale ODC-Aktivität bei gleichzeitig erhöhtem ODC-Protein nach. Eine DFMO-Gabe erhöhte und Spermidin erniedrigte den Blutdruck in SS unter Salzbelastung (33). Diese Ergebnisse stehen im Kontrast zu der blutdrucksenkenden Eigenschaft von DFMO in anderen Hypertoniemodellen (43, 108, 109).

In der hier durchgeführten Arbeit konnte eine erhöhte renale ODC-Expression in den alten SHR (18 Monate) nachgewiesen werden. Die Proteinkonzentration blieb dabei unverändert. Ein gesteigerter ODC-Abbau könnte dies erklären. Sowohl oxidativer Stress, als auch eine erhöhte Polyaminkonzentration sind in SHR nachgewiesen und führen zu einer Induktion ODC-abbauender Mechanismen (88). Interessanterweise sind neben der ODC-Expression die Fibrosemarker Kollagen-1, TGF- $\beta$  und Biglycan gesteigert. Dies weist auf hypertrophe renale Umbauprozesse in SHR hin, die kennzeichnend für die hypertensive Nephropathie sind. Die ebenfalls erhöhte ODC-Expression in verschiedenen Studienmodellen mit Nierenhypertrophie unterstützt diese These (6, 42, 86, 100).

Die spontan hypertensiven Tiere, die im prähypertensiven Stadium mit dem Training begonnen haben, zeigten nach drei Monaten körperlicher Belastung einen Anstieg der renalen ODC-Expression verbunden mit einem erhöhten Nierengewicht. Eine Aktivierung von ODC und ein Anstieg der Polyaminkonzentration in Verbindung mit körperlicher Aktivität konnte bereits in einigen Studien nachgewiesen werden (115, 116). Dieser Effekt war jedoch nach 6 Monaten Training nicht mehr nachweisbar. Im Gegenteil, in den alten SHR bewirkte die körperliche Aktivität sogar eine deutliche Reduktion der ODC-Expression bei ausbleibender Nierenhypertrophie. Die Befunde deuten auf eine protektive Wirkung von Sport auf die Entstehung einer bluthochdruckbedingten Nierenhypertrophie im Alter hin.

Die entsprechenden normotensiven Kontrollen zeigten im Alter von 18 Monaten einen trainingsbedingten Anstieg der renalen ODC-mRNA- und Protein-Konzentration. Parallel dazu steigen die Fibrosemarker ohne das Nierengewicht zu beeinflussen. Inwiefern diese Veränderungen eine protektive oder schädigende Wirkung auf die Nieren im Alter haben sollte Gegenstand zukünftiger Studien sein.

#### **4.2.4 PTHrP-Rezeptor**

Im Alter von 7,5 Monaten untersuchte SHR zeigten keinen signifikanten Unterschied in der renalen PTH1-R-Expression im Vergleich zu den normotensiven Kontrollen. Das körperliche Training vor Beginn der Entwicklung des Bluthochdrucks hatte keinen Effekt auf die Expression des PTH1-R. Massfelder et al. (2002) beschrieben eine gestörte Vasodilatation im renalen Gefäßsystem der SHR durch eine Suppression des PTH1-R und eine Erhöhung des PTHrP. Die gesteigerte PTHrP-Expression in den 3 Monate alten Tieren konnte jedoch nur in den renalen Gefäßen nachgewiesen werden

und nicht in der Gesamtniere. Dies könnte erklären warum in dieser Arbeit kein Unterschied zwischen normo- und hypertensiven Tieren festgestellt werden konnte.

Einer der bemerkenswertesten Befunde ist der Einfluss der körperlichen Aktivität auf die renale PTH1-R-Expression der alten Tiere. Während in den Nieren normotensiver Wistar-Ratten die Expression des PTH1-Rezeptors trainingsbedingt massiv anstieg, wurde er in den SHR durch Sport supprimiert. Die physiologische Funktion des PTHrP als vasodilatierender Gegenspieler im renalen Gefäßsystem der SHR ist durch die reduzierte PTH1-R-Expression ohnehin gestört (26, 75) und scheint durch die körperliche Belastung weiter eingeschränkt. Es kann angenommen werden, dass dadurch der RVR weiter ansteigt, die GFR entsprechend fällt und dies zu der beobachteten BUN-Erhöhung in den SHR führt. Die eingeschränkte Nierenfunktion deutet auf eine Progression der hypertensiven Nierenschäden hin. Diese Herabregulation des PTH1-Rezeptors wird gleichermaßen nach einer akuten Nierenschädigung in den Tubuluszellen beschrieben (98, 107).

Es gibt jedoch auch Hinweise, dass eine Reduktion des PTH1-R protektive Effekte auf Angiotensin-II-bedingte Nierenschädigungen hat (71). In diesem Fall wäre Sport in der Lage die erhöhte PTH1-R-Expression der alten SHR abzuschwächen, aber nicht suffizient genug um die Nierenfunktion zu erhalten. Der große Altersunterschied zwischen den hier untersuchten Tieren und denen in der Literatur mit einer renalen PTH1-R-Suppression beschriebenen, schränkt die Vergleichbarkeit der Studien sehr ein (75, 118).

Die normotensiven Tiere kompensieren die körperliche Belastung mit einer Erhöhung des PTH1-Rezeptors. Dieser Effekt könnte über eine ebenfalls gesteigerte Expression des AT<sub>1</sub>-Rezeptors vermittelt sein. Unterstützt wird diese These durch Ergebnisse nach Angiotensin-II-Infusionen, die ebenfalls AT<sub>1</sub>-Rezeptor-vermittelt die renale PTH1-R-Expression in Wistar-Ratten erhöhen konnten (71).

### **4.3 Der Einfluss von Captopril auf bluthochdruck- und trainingsbedingte Adaptionsmechanismen der Niere.**

#### **4.3.1 Renin-Angiotensin-Aldosteron-System**

Das lokale RAAS der Niere ist im Rahmen der Hypertonie übermäßig aktiviert und die hohen renalen Angiotensin-II-Konzentrationen in SHR stehen im Verdacht für die hypertensiven Nierenschäden verantwortlich zu sein (58, 79). In der vorgelegten Arbeit bestätigt sich eine entsprechende RAAS-Aktivierung in den SHR. Sowohl die AT<sub>1</sub>-Rezeptor-, als auch die Renin-Expression wurde in den hypertensiven Tieren altersabhängig hochreguliert. Durch die Captoprilgabe konnte die Reninerhöhung signifikant gesenkt werden. Die ausbleibende Wirkung auf den AT<sub>1</sub>-Rezeptor durch die Medikation wurde bereits durch Castro-Moreno et al. (2012) demonstriert. Die Arbeitsgruppe beobachtete in SHR den Angiotensin II senkenden Effekt von Captopril verbunden mit einer verbesserten renalen Hämodynamik, konnte aber ebenfalls keine Veränderung der AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Expression nachweisen (11). Das Laufradtraining hatte unter der Medikation keinen ergänzenden Effekt.

Die Reaktion der normotensiven Tiere auf das Training und die Medikation unterscheidet sich wieder deutlich von denen der SHR. Die AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Expression erhöhte sich signifikant unter der körperlichen Belastung. Die Hochregulation des PTH1-R in diesen Tieren könnte für die fehlende Steigerung der Renin-Expression verantwortlich sein. Die reninsenkende Wirkung einer übermäßigen PTH1-R-Expression wurde bereits beschrieben (27).

Interessanterweise hat die Captoprilgabe den gleichen Effekt auf die AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Expression wie das Training und steigert zusätzlich die von Renin.

Es stellt sich die Frage, ob diese Veränderungen als Aktivierung des RAAS zu interpretieren sind, oder eine trainingsbedingte Angiotensin-II-Reduktion eine kompensatorische Erhöhung bewirkt hat. Nähere Untersuchungen zur renalen Angiotensin-II-Konzentration könnten hier zu weiteren Erkenntnissen führen.

Insgesamt führte die Captoprilgabe zu einer Hemmung des renalen RAAS und einer verbesserten Nierenfunktion. Obwohl das Training eine ähnliche Wirkung auf die Expression hatte, konnte es die BUN-Werte nicht senken. Für das körperliche Training konnte kein zusätzlicher Effekt unter der Medikation nachgewiesen werden.

### 4.3.2 Nierenfunktion

ACE-Hemmer und AT<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten senken zuverlässig den Blutdruck, reduzieren oxidativen Stress (66) und verlangsamen den Progress chronischer Nierenerkrankungen (47, 117). Durch eine Hemmung des RAAS wird die Entstehung einer hypertensiven Nephropathie histologisch und funktionell in SHR abgeschwächt bzw. aufgehalten (49, 58, 60, 82). Dieser renoprotektive Effekt konnte in der vorgelegten Arbeit bestätigt werden. Captopril senkte die BUN-Werte in den alten Wistar Ratten signifikant und wirkte der trainingsbedingten BUN-Erhöhung in den SHR entgegen.

### 4.3.3 Strukturproteine und Fibrosemarker

Die Captoprilgabe veränderte neben den BUN-Werten auch die Expression der Moleküle der extrazellulären Matrix in den SHR. Kollagen-1, TGF- $\beta$  und Biglycan wurden deutlich reduziert. Der Einfluss der RAAS-Inhibition auf die renale Proteoglykanexpression deckt sich mit den Ergebnissen von Sasamura et al. (2001), die in hypertensiven Ratten unter einem ARB ebenfalls eine Reduktion der Biglycan-mRNA beobachteten (99).

Das Training unter der Medikation hatte einen additiven Effekt: die Decorin-Expression wurde gesteigert und die Biglycanmenge auf Proteinebene weiter reduziert.

Die Ergebnisse legen nahe, dass die Therapie mit einem ACE-Hemmer in Verbindung mit Sport die renalen Fibrosierungs- und Umbauprozesse im Rahmen der Hypertonie positiv beeinflussen. In der Literatur finden sich Studien, die diese These unterstützen: In 5/6-nephrektomierten Wistar verbesserte die Kombination aus ACE-Hemmer und Training die Glomerulosklerose und das Serumkreatinin in größerem Maß als Sport oder die Medikation alleine (50). Auch Kohzuki et al. (2001) demonstrierten, dass die Therapiekombination die Glomerulosklerose in 5/6-nephrektomierten SHR stärker reduziert im Vergleich zu einer Monotherapie.

Obwohl die ACE-Inhibition eine Verbesserung der Nierenfunktion und -histologie in der normotensiven Vergleichsgruppe bewirkte, stieg die Expression der Struktur- und Fibrosemarker Kollagen-I, TGF- $\beta$  und Biglycan an. Ähnliche Veränderungen der Expression sind in der normotensiven Trainingsgruppe zu beobachten und stehen im Konflikt mit der aktuellen Literatur. Eine mögliche Erklärung könnte das fortgeschrittene Alter der Tiere sein. Mit dem Alter nehmen die Expression von Fibrosemarkern wie TGF- $\beta$ , sowie strukturelle Veränderungen (Glomerulosklerose, interstitielle Fibrose)

stetig zu (97). Dieser Alterungsprozess scheint in den Wistar Ratten durch Captopril beschleunigt. Warum die antifibrotische Wirkung der Medikation auf mRNA-Ebene in diesen Tieren nicht nachweisbar ist, bedarf weiterführender Studien.

#### 4.3.4 ODC

Es liegen nur wenige Daten zum Einfluss von Captopril auf die ODC-Expression vor. Frühere Studien konnten bereits nachweisen, dass die im Rahmen einer myokardialen Hypertrophie erhöhte ODC-Aktivität und Polyaminkonzentration durch Captopril gesenkt werden kann (37, 106). In der vorliegenden Arbeit hatte die Captopriltherapie den gleichen Effekt auf die renale ODC-Expression wie das Training. Captopril induzierte in den normotensiven Tieren die ODC-Expression entsprechend der Fibrosemarker, während sie in den SHR herabreguliert wurde. Eine zusätzliche Wirkung von körperlichem Training unter der Captopriltherapie auf die ODC-Expression konnte nicht nachgewiesen werden.

#### 4.3.5 PTHrP-Rezeptor

Die renale PTHrP-Expression wird durch das RAAS beeinflusst und ist im Rahmen von Bluthochdruck und Nephropathien erhöht (71, 81, 85, 96, 98, 107). Es gibt vermehrt Hinweise, dass PTHrP an den durch Angiotensin II bedingten Nierenschäden beteiligt ist. Über den AT<sub>1</sub>-Rezeptor steigert Angiotensin II die renale PTHrP-Konzentration, während die PTH1-Rezeptor-Expression in Tubuluszellen supprimiert und die PTH1-R-mRNA destabilisiert wird (71, 118).

Unter der Captopriltherapie wurde die PTH1-R-Expression sowohl in den SHR als auch in den normotensiven Kontrollen signifikant reduziert. In den hypertensiven Tieren bestätigte sich dieses Ergebnis auch auf Proteinebene. Das Training zeigte zwar keinen zusätzlichen Effekt zu der medikamentösen Therapie, war aber gleichermaßen in der Lage die PTH1-R-Konzentration zu senken.

Aus der Literatur sind verschiedenartige Effekte von RAAS-Inhibitoren auf das PTHrP-System bekannt: Einerseits bewirkten ACE-Hemmer und AT<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten in einigen Studien eine Hochregulation des PTH1-R oder inhibierten zumindest eine Herunterregulation (85, 118). Andererseits senkte Losartan die nachgewiesene Überexpression von PTHrP und PTH1-R in Wistar Ratten nach Angiotensin II-Infusionen (71).

Die Reduktion des PTH1-R in beiden Gruppen lässt hier aufgrund der verbesserten Nierenfunktion einen protektiven Mechanismus vermuten.

#### **4.4 Schlussfolgerung**

Die normo- und hypertensiven Ratten zeigten unterschiedliche renale Adaptationsmechanismen unter der körperlichen Aktivität. Während das Training in den alten SHR zu einer Verschlechterung der Nierenfunktion führte, blieb die Nierenfunktion der normotensiven Vergleichsgruppe trotz Hochregulation der Struktur- und Fibrosemarker unbeeinflusst. Günstige Auswirkungen auf die renalen Adaptationsprozesse hatte das Training der SHR mit Beginn im prähypertensiven Stadium und in den alten SHR unter einer Captopriltherapie. Die Tiere profitierten von einer deutlich verbesserten Zusammensetzung der Matrixkomponenten auf mRNA-Ebene. Captopril bewirkte in Wistar-Ratten und SHR gleichermaßen eine Verbesserung der Nierenfunktionswerte. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Inhibition des RAAS ähnliche Veränderungen in der transkriptionalen Regulation der untersuchten Gene nach sich zieht, wie das Training. Die körperliche Aktivität konnte den positiven Effekt des ACE-Hemmers in den SHR noch steigern.

Zusammenfassend lässt sich daraus eine Empfehlung zu präventivem Sport unter regelmäßigen Blutdruckkontrollen ableiten. Darüber hinaus sollte bei etabliertem Hypertonus, besonders im Alter, das Training nur in Kombination mit einem ACE-Hemmer durchgeführt werden.

## 5. Zusammenfassung

Die arterielle Hypertonie ist mit einer Prävalenz zwischen 30 % und 45 % in Europa einer der wichtigsten kardiovaskulären Risikofaktoren. Neben Schlaganfällen und ischämischen Herzerkrankungen, ist die hypertensive Nephropathie eine direkte Folge des Bluthochdrucks. Diese kann aus einem langjährigen Bluthochdruck resultieren und ist selbst zweithäufigste Ursache einer terminalen Niereninsuffizienz.

Regelmäßige körperliche Aktivität wird zur Prävention und Behandlung der Hypertonie von vielen Fachgesellschaften, wie der Deutschen Hochdruckliga in aktuellen Leitlinien empfohlen. Beispielhaft wird ein moderates Ausdauertraining (Joggen, Fahrradfahren oder Schwimmen) für 30 Minuten 5-7 Tage pro Woche genannt. Die Auswirkungen der körperlichen Belastung auf die Entstehung und den Progress hypertensiver Nierenschäden sind jedoch nur unzureichend erforscht.

In der vorliegenden Arbeit wurde der altersabhängige Einfluss körperlicher Aktivität auf die Nierenfunktion und die renale parenchymale Genexpression hypertensiver Ratten untersucht. Neben den hämodynamischen Parametern (Blutdruck und Herzfrequenz), wurden regelmäßig das Körpergewicht und die Laufdaten erhoben. Die molekularbiologischen Adaptationen von insgesamt 36 Nieren normotensiver und 66 Nieren hypertensiver Ratten wurden mittels Real-time-PCR, Immunoblots und histologischer Schnitte analysiert. Die BUN-Werte als Maß für die Nierenfunktion wurde im Rattenplasma bestimmt.

Die Ergebnisse der aktuellen Studie zeigen deutliche Unterschiede trainingsbedingter renaler Adaptationsmechanismen zwischen normotensiven und hypertensiven Tieren. In keiner Gruppe konnte ein blutdrucksenkender Effekt des intensiven Ausdauertrainings nachgewiesen werden. In den alten SHR, die das Training bei bereits etabliertem Hypertonus begannen, bewirkte die körperliche Belastung eine Verschlechterung der Nierenfunktion. In den entsprechenden normotensiven Kontrollen blieb die Nierenfunktion trotz einer Hochregulation der Struktur- und Fibrosemarker erhalten. Captopril hatte eine dem Training ähnliche Wirkung auf die Genexpression der Laufgruppen, verbesserte aber die Nierenfunktion deutlich. Als einer der bemerkenswertesten Befunde ist hier die unterschiedliche Regulation des PTH1-Rezeptors zu nennen. Die verbesserte Nierenfunktion unter einer Reduktion des renalen PTH1-R in den SHR lässt auf einen protektiven Mechanismus schließen.

Die hypertensiven Tiere, die bereits im prähypertensiven Stadium mit dem Training begannen, zeigten im Gegensatz zu den alten Tieren eine verbesserte Zusammensetzung der Matrixkomponenten auf m-RNA-Ebene.

## 6. Summary

With a prevalence rate ranging from 30 % to 45 %, arterial hypertension is one of the most important cardiovascular risk factors in Europe. In addition to strokes and ischemic heart disease, hypertensive nephropathy is a direct result of hypertension. It may result from chronic hypertension and is even the second leading cause of end-stage renal failure.

Regular physical activity is recommended for prevention and treatment of hypertension by many professional societies in current guidelines, such as the German Hypertension League. For example, a moderate endurance exercise (jogging, cycling or swimming) for 30 minutes 5-7 days per week is mentioned. However, the impact of physical stress on the onset and progression of hypertensive kidney damage has been, so far, inadequately researched.

In the present work, the age-related influence of physical activity on renal function and renal parenchymal gene expression of hypertensive rats has been investigated. In addition to the hemodynamic parameters (blood pressure and heart rate), the body weight and the data of physical activity were collected regularly. The molecular biological adaptations with a total of 36 kidney normotensive and 66 hypertensive rat kidneys were analyzed by real-time PCR, immunoblots and histological sections. The BUN values as a measure of renal function were determined in rat plasma.

The results of the current study show clear differences in training-related renal adaptation mechanisms between normotensive and hypertensive animals. In none of the groups was a blood pressure lowering effect of intensive endurance training be demonstrated. In the old SHR, which started training with the already established hypertension, the physical stress caused a worsening of kidney function. In the corresponding appropriate normotensive controls, renal function was maintained despite upregulation of structural and fibrosis markers. Captopril had a training-like effect on gene expression of the exercising groups, but significantly improved kidney function. One of the most notable findings is the different regulation of the PTH1-R. Improved renal function with a reduction of renal PTH1-R in the SHR suggests a protective mechanism.

The hypertensive animals which started training already in the prehypertensive stage showed, in contrast to the old animals, an improved composition of the matrix components at the m-RNA level.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

a.b. (Aqua bidest.)	zweifach destilliertes Wasser (steril)
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin-Converting-Enzym
ARB	Angiotensin-Rezeptorblocker
AT <sub>1</sub> -R	Angiotensin-II-Rezeptor Subtyp 1
BSA	Bovines Serum Albumin
Bpm	Herzfrequenz pro Minute
BUN	Blut-Harnstoff-Stickstoff
C	Captoprilgruppe
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CVS	kardiovaskuläres System
DFMO	α-difluoromethylornithine
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DEGS1	Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland
dNTP	Desoxyribonukleotidphosphat
DTT	Dithiotretol
ECM	Extrazellulärmatrix
ERPF	effektiver renaler Plasmafluss
FSGS	fokale segmentale Glomerulosklerose
°C	Grad Celsius
g	Gramm
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
h	Stunde
HCL	Chlorwasserstoff
km	Kilometer

mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
M-MLV	Moloney Murine Leukemia Virus
MMP-9	Matrix-Metalloproteinase-9
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
n	Anzahl
ODC	Ornithindecaboxylase
Oligo-dt	Oligo-desoxy-Thymidin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PTH	Parathormon
PTHrP	Parathormon-related Protein
PTH1-R	Typ-I-PTH/PTHrP-Rezeptor
R	Laufgruppe
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	Real-Time Polymerase-Kettenreaktion
RVR	Renovaskulärer Widerstand
SD	Standardabweichung
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat- Polyacrylamidgelelektrophorese
SHR/S	spontan hypertensive Ratte
SLRP	Small-Leucine-Rich-Proteoglykans
SS	Dahl-Salz-sensitive Ratten
Tab.	Tabelle
TBS	Tris buffered saline
TGF-β	Transforming growth factor beta
TIMP-1	Tissue inhibitor of metalloproteases-1

Tris	Tris-hydroxymethylamiononethan
u.a.	unter anderem
vs.	versus
W	Wistar-Ratten
w	Woche
WB	Western Blot

## 8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### 8.1 Abbildungen

Abb. 1: Ermittelte Standardkurve zur BUN-Konzentrationsbestimmung im Heparinplasma .....	23
Abb. 2: Altersabhängiger Verlauf des systolischen Blutdrucks von Wistar-Ratten (W) und SHR. ....	32
Abb. 3: Altersabhängiger Verlauf der Herzfrequenz von Wistar-Ratten (W) und SHR.....	33
Abb. 4: Altersabhängiger Verlauf des Körpergewichts von Wistar-Ratten (W) und SHR. ....	34
Abb. 5: Altersabhängiger Verlauf des Nierengewichts von Wistar-Ratten (W) und SHR... ..	35
Abb. 6: Altersabhängiger Verlauf der Nierenfunktion von Wistar-Ratten (W) und SHR. ....	36
Abb. 7: Altersabhängiger Verlauf der Kollagen-1- und Fibronektin-mRNA-Expression von Wistar-Ratten (W) und SHR. ....	37
Abb. 8: Altersabhängiger Verlauf der TGF- $\beta$ -mRNA-Expression von Wistar-Ratten (W) und SHR. ....	37
Abb. 9: Kollagengehalt der histologischen Schnitte der 7,5 und 18 Monate alten Wistar-Ratten (W) und SHR.....	38
Abb. 10: Altersabhängiger Verlauf der Biglycan-mRNA-Expression und des Biglycanproteingehalts von Wistar-Ratten (W) und SHR.....	39
Abb. 11: Altersabhängiger Verlauf der Decorin-mRNA-Expression und des Decorinproteingehalts von Wistar-Ratten (W) und SHR. ....	39
Abb. 12: Altersabhängiger Verlauf der ODC-mRNA-Expression und des ODC-Proteingehalts von Wistar-Ratten (W) und SHR.....	40
Abb. 13: Altersabhängiger Verlauf der PTH1-R-mRNA-Expression und des PTH1-R-Proteingehalts von Wistar-Ratten (W) und SHR.....	40
Abb. 14: Altersabhängiger Verlauf der AT <sub>1</sub> -R- und Renin-mRNA-Expression von Wistar-Ratten (W) und SHR.....	41
Abb. 15: Einfluss körperlicher Aktivität auf den systolischen Blutdruck.....	42
Abb. 16: Einfluss körperlicher Aktivität auf die Herzfrequenz. ....	43
Abb. 17: Einfluss körperlicher Aktivität auf das Körpergewicht.....	44
Abb. 18: Einfluss körperlicher Aktivität auf das Nierengewicht.....	45
Abb. 19: Einfluss körperlicher Aktivität auf die Nierenfunktion.....	46
Abb. 20: Einfluss körperlicher Aktivität auf die Kollagen-1- und Fibronektin-mRNA-Expression. ....	47
Abb. 21: Einfluss körperlicher Aktivität auf die TGF- $\beta$ -mRNA-Expression.....	47
Abb. 22: Einfluss körperlicher Aktivität auf den Kollagengehalt der histologischen Schnitte. ....	48

Abb. 23: Einfluss körperlicher Aktivität auf die Biglycan-mRNA-Expression und den Biglycanproteingehalt. ....	48
Abb. 24: Einfluss körperlicher Aktivität auf die Decorin-mRNA-Expression und den Decorinproteingehalt.....	49
Abb. 25: Einfluss körperlicher Aktivität auf die ODC-mRNA-Expression und den ODC-Proteingehalt.....	50
Abb. 26: Einfluss körperlicher Aktivität auf die PTH1-R-mRNA-Expression und den PTH1-R-Proteingehalt.....	50
Abb. 27: Einfluss körperlicher Aktivität auf die AT <sub>1</sub> -R- und Renin-mRNA-Expression.....	51
Abb. 28: Einfluss von Captopril und körperlicher Aktivität auf den systolischen Blutdruck.....	52
Abb. 29: Einfluss von Captopril und körperlicher Aktivität auf die Herzfrequenz.....	53
Abb. 30: Einfluss von Captopril und körperlicher Aktivität auf das Körpergewicht. ....	54
Abb. 31: Einfluss von Captopril und körperlicher Aktivität auf das Nierengewicht.....	55
Abb. 32: Einfluss von Captopril und körperlicher Aktivität auf die Nierenfunktion.....	56
Abb. 33: Einfluss von Captopril und körperlicher Aktivität auf die Kollagen-1- und Fibronectin-mRNA-Expression. ....	57
Abb. 34: Einfluss von Captopril und körperlicher Aktivität auf die TGF- $\beta$ -mRNA-Expression. ....	57
Abb. 35: Einfluss von Captopril und körperlicher Aktivität auf den Kollagengehalt der histologischen Nierenschnitte. ....	58
Abb. 36: Einfluss von Captopril und körperlicher Aktivität auf die Biglycan-mRNA- und Protein-Expression.....	59
Abb. 37: Einfluss von Captopril und körperlicher Aktivität auf die Decorin-mRNA- und Protein-Expression.....	59
Abb. 38: Einfluss von Captopril und körperlicher Aktivität auf die ODC-mRNA- und Protein-Expression.....	60
Abb. 39: Einfluss von Captopril und körperlicher Aktivität auf die PTH1-R-mRNA- und Protein-Expression.....	61
Abb. 40: Einfluss von Captopril und körperlicher Aktivität auf die AT <sub>1</sub> -R und Renin-mRNA-Expression. ....	61

## 8.2 Tabellen

Tab. 1: Gewebespezifische Wirkungen von PTHrP .....	10
Tab. 2: Einteilung und Kennzeichnung der untersuchten Tiere in Versuchsgruppen.....	15
Tab. 3: Laufdaten der Wistar-Ratten (W) und SHR (S) im Alter von 3 Monaten bis 18 Monaten.....	44
Tab. 4: Laufdaten der Wistar-Ratten (W) und SHR (S) im Alter von 18 Monaten unter Captopriltherapie.....	53

## 9. Literatur

1. Ärnlöv J, Evans J, Meigs J, et al. *Low-Grade Albuminuria and Incidence of Cardiovascular Disease Events in Nonhypertensive and Nondiabetic Individuals*. *Circulation* 2005;112(7):969–975.
2. Agarwal D, Elks C, Reed S, et al. *Chronic exercise preserves renal structure and hemodynamics in spontaneously hypertensive rats*. *Antioxidants Redox Signal* 2011;16(2):139–52
3. Alexakis, Maxwell, Bou-Gharios. *Organ-Specific Collagen Expression: Implications for Renal Disease*. *Nephron Exp Nephrol* 2005;102(3-4):e71–e75.
4. Amizuka, Henderson, Hoshi, et al. *Programmed cell death of chondrocytes and aberrant chondrogenesis in mice homozygous for parathyroid hormone-related peptide gene deletion*. *Endocrinology* 1996;137(11):5055–5067.
5. Aparicio, Tassi, Nebot, et al. *High-intensity exercise may compromise renal morphology in rats*. *International journal of sports medicine* 2014;639–44.
6. Austin III H. A, Goldin H, Gaydos DA, Preuss H. G. *Polyamine metabolism in compensatory renal growth*. *Kidney International* 1983;23: 581–587
7. Bergamaschi, Boim, Moura, et al. *Effects of long-term training on the progression of chronic renal failure in rats*. *Med Sci Sport Exer* 1997;29(2):169–74.
8. Blantz, Satriano, Gabbai, Kelly. *Biological effects of arginine metabolites*. *Acta Physiol Scand* 2000;168(1):21–25.
9. Börjesson M, Onerup A, Lundqvist S, Dahlöf B. *Physical activity and exercise lower blood pressure in individuals with hypertension: narrative review of 27 RCTs*. *Brit J Sport Med* 2016;50(6):356–361.
10. Böttinger E, Bitzer M. *TGF-beta signaling in renal disease*. *J Am Soc Nephrol Jasn* 2002;13(10):2600–10.

11. Castro-Moreno, Pardo, Hernández-Muñoz, et al. *Captopril avoids hypertension, the increase in plasma angiotensin II but increases angiotensin 1–7 and angiotensin II-induced perfusion pressure in isolated kidney in SHR*. *Autonomic Autacoid Pharmacol* 2012;32(3-4):61–69.
12. Chaves A, Buchpiguel C, Praxedes J, et al. *Glomerular Filtration Rate Measured by <sup>51</sup>Cr-EDTA Clearance: Evaluation of Captopril-Induced Changes in Hypertensive Patients with and without Renal Artery Stenosis*. *Clinics* 2010;607–612.
13. Chomczynski P, Sacchi N. *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. *Analytical Biochemistry* 1987;156–159.
14. Chung U, Lanske B, Lee K, et al. *The parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor coordinates endochondral bone development by directly controlling chondrocyte differentiation*. *Proc National Acad Sci* 1998;95(22):13030–13035.
15. Ciampone S, Borges R, de Lima I, et al. *Long-term exercise attenuates blood pressure responsiveness and modulates kidney angiotensin II signalling and urinary sodium excretion in SHR*. *J Renin-angio-ald S* 2011;12(4):394–403.
16. Clark, Coker. *Transforming growth factor-beta (TGF-beta)*. *Int J Biochem Cell Biology* 1998;30(3):293–8.
17. Clemens T, Cormier S, Eichinger A, et al. *Parathyroid hormone-related protein and its receptors: nuclear functions and roles in the renal and cardiovascular systems, the placental trophoblasts and the pancreatic islets*. *Brit J Pharmacol* 2001;134(6):1113–1136.
18. Clorius, Mann, Schmidlin, et al. *Clinical evaluation of patients with hypertension and exercise-induced renal dysfunction*. *Hypertension* 1987;10(3):287–293.
19. Cornelissen V, Smart N. *Exercise Training for Blood Pressure: A Systematic Review and Meta-analysis*. *J Am Hear Assoc* 2013;2(1):e004473.

20. Da Rebelo R, Schreckenber R, Schlüter K. *Adverse cardiac remodelling in spontaneously hypertensive rats: acceleration by high aerobic exercise intensity.* J Physiology 2012;590(21):5389–5400.
21. Demougeot C, Prigent-Tessier A, Marie C, Berthelot A. *Arginase inhibition reduces endothelial dysfunction and blood pressure rising in spontaneously hypertensive rats.* J Hypertens 2005;23(5):971.
22. Doggrell S, Brown L. *Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure.* Cardiovasc Res 1998;39(1):89–105.
23. Eismann U, Sommer M, Kosmehl H, et al. *Fibronectin splice variants--prognostic markers for the stage of renal interstitial fibrosis in the rat.* Nephron 2002;92(2):379–88.
24. Esbrit, Santos, Ortega, et al. *Parathyroid hormone-related protein as a renal regulating factor. From vessels to glomeruli and tubular epithelium.* American journal of nephrology 2001;21(3):179–84.
25. Feld L, Liew J, Galaske R, et al. *Selectivity of renal injury and proteinuria in the spontaneously hypertensive rat.* Kidney Int 1977;12(5):332–343.
26. Fiaschi-Taesch, Endlich, Massfelder, et al. *Renovascular parathyroid hormone-related protein in spontaneously hypertensive rats: dilator or trophic factor?* Kidney Int Suppl 1998;67:S207–10.
27. Fritsch S, Lindner V, Welsch S, et al. *Intravenous delivery of PTH/PTHrP type 1 receptor cDNA to rats decreases heart rate, blood pressure, renal tone, renin angiotensin system, and stress-induced cardiovascular responses.* J Am Soc Nephrol Jasn 2004;15(10):2588–600.
28. Fukuda Satoshi, Tsuchikura Satoru, Iida Haruzo. *Age-Related Changes in Blood Pressure, Hematological Values, Concentrations of Serum Biochemical Constituents and Weights of Organs in the SHR/Izm, SHRSP/Izm and WKY/Izm.* Exp Anim Tokyo 2004;53(1):67–72.

29. Gansevoort, Sluiter, Hemmeler, et al. *Antiproteinuric effect of blood-pressure-lowering agents: a meta-analysis of comparative trials*. *Nephrol Dial Transpl* 1995;10(11):1963–74.
30. Garcia-Pinto A, de Matos V, Rocha V, et al. *Low-Intensity physical activity beneficially alters the ultrastructural renal morphology of spontaneously hypertensive rats*. *Clin São Paulo Braz* 2011;66(5):855–63.
31. Gattone II V, Evan A., Overhage M, Severs W. *Developing renal innervation in the spontaneously hypertensive rat: evidence for a role of the sympathetic nervous system in renal damage*. *J of Hypertension* 1990; 8:423–428.
32. Goomer, Johnson, Burton, et al. *The tetrabasic KKKK(147-150) motif determines intracrine regulatory effects of PthrP 1-173 on chondrocyte PPI metabolism and matrix synthesis*. *Endocrinology* 2000;141(12):4613–22.
33. Hayashi T, Tsujino T, Iwata S, et al. *Decreased Ornithine Decarboxylase Activity in the Kidneys of Dahl Salt-Sensitive Rats*. *Hypertens Res* 2002;25(5):787–795.
34. He, Livingston MJ, Dong. *Autophagy in Acute Kidney Injury and Repair*. *Nephron Clin Pract* 2014;127(1-4):56–60.
35. Heby O. *Role of polyamines in the control of cell proliferation and differentiation*. *Differentiation* 1981;19(1 3):1–20.
36. Herold G. *Innere Medizin* Gerd Herold Verlag, Köln, 2014
37. Himizu M, Uda I, Aihara K, et al. *Abnormal Polyamine Metabolism in hypertensive cardiac hypertrophy*. *Jpn Circulation J* 1988;52(10):1209–1215.
38. Horn, A. *Interaktion zwischen körperlicher Aktivität, einem Hypertonus und gewebespezifischen Adaptationen bei spontan hypertensiven Ratten*. 2015 <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2016/11988/>.
39. Hultström M. *Development of structural kidney damage in spontaneously hypertensive rats*. *J Hypertens* 2012;30(6):1087.

40. Hultström M, Leh S, Skogstrand T, Iversen BM. *Upregulation of tissue inhibitor of metalloproteases-1 (TIMP-1) and procollagen-N-peptidase in hypertension-induced renal damage*. Nephrol. Dial. Transplant. 2008;23(3):896–903.
41. Hultström M, Leh S, Paliege A, et al. *Collagen-binding proteins in age-dependent changes in renal collagen turnover: microarray analysis of mRNA expression*. Physiol Genomics 2012;44(10):576–86.
42. Humphreys M. H, Etheredge S. B, Lin S. Y, Ribstein J, Marton L. J. *Renal ornithine decarboxylase activity, polyamines, and compensatory renal hypertrophy in the rat*. Am J Physiol. 1988;255: 270–277
43. Ibrahim J, Hughes AD, Schachter M, Sever PS. *Depletion of resistance vessel polyamines attenuates angiotensin II induced blood pressure rise in rats*. Clinical and Experimental Hypertension 1996;18(6):811–830.
44. Igotz, Massagué. *Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix*. J Biological Chem 1986;261(9):4337–45.
45. Ito D, Ito O, Cao P, et al. *Effects of exercise training on nitric oxide synthase in the kidney of spontaneously hypertensive rats*. Clin Exp Pharmacol P 2013;40(2):74–82.
46. Iversen BM, Amann K, Kvam FI, et al. *Increased glomerular capillary pressure and size mediate glomerulosclerosis in SHR juxtamedullary cortex*. American Journal of Physiology-Renal Physiology 1998;274(2):F365–F373.
47. Jafar T, Stark P, Schmid C, et al. *Progression of chronic kidney disease: the role of blood pressure control, proteinuria, and angiotensin-converting enzyme inhibition: a patient-level meta-analysis*. Annals of internal medicine 2003;244–52.
48. Jr. S, Zampieri T, Ruggeri A, et al. *Downregulation of the Vascular Renin-Angiotensin System by Aerobic Training – Focus on the Balance Between Vasoconstrictor and Vasodilator Axes – [Internet]*. Circulation Journal 2014;

[http://www.jstage.jst.go.jp/article/circj/advpub/0/advpub\\_CJ-14-1179/\\_article](http://www.jstage.jst.go.jp/article/circj/advpub/0/advpub_CJ-14-1179/_article)

49. Kanazawa, Abe, Yasujima, et al. *Effects of antihypertensive therapy on the renal function in spontaneously hypertensive rats (SHR) with renal ablation.* Nihon Jinzo Gakkai shi 1990;33–44.
50. Kanazawa M, Kawamura T, Li L, et al. *Combination of exercise and enalapril enhances renoprotective and peripheral effects in rats with renal ablation.* Am J Hypertens 2006;19(1):80–6.
51. Kasiske, Kalil, Ma, et al. *Effect of antihypertensive therapy on the kidney in patients with diabetes: a meta-regression analysis.* Ann Intern Med 1993;118(2):129–38.
52. Kato T, Mizuguchi N, Ito A. *Blood pressure, renal biochemical parameters and histopathology in an original rat model of essential hypertension (SHRSP/Kpo strain).* Biomed Res 2015;36(3):169–177.
53. Kim S, Na H-J, Ding Y, et al. *Autophagy Promotes Intracellular Degradation of Type I Collagen Induced by Transforming Growth Factor (TGF)- $\beta$ 1.* J Biol Chem 2012;287(15):11677–11688.
54. Klag M, Whelton P, Randall B, et al. *Blood Pressure and End-Stage Renal Disease in Men.* New Engl J Medicine 1996;334(1):13–18.
55. Klinke R, Silbernagl S. *Lehrbuch der Physiologie* Thieme Verlag, Stuttgart, 2005
56. Kobori H, Mori H, Masaki T, Nishiyama A. *Angiotensin II Blockade and Renal Protection.* Current Pharmaceutical Design 2013;19(17):3033–3042.
57. Kobori H, Nangaku M, Navar G, Nishiyama A. *The Intrarenal Renin-Angiotensin System: From Physiology to the Pathobiology of Hypertension and Kidney Disease.* Pharmacol Rev 2007;59(3):251–287.

58. Kobori H, Ozawa Y, Suzaki Y, Nishiyama A. *Enhanced intrarenal angiotensinogen contributes to early renal injury in spontaneously hypertensive rats*. J. Am. Soc. Nephrol. 2005;16(7):2073–80.
59. Kohzuki M, Kamimoto M, Wu X-M, et al. *Renal protective effects of chronic exercise and antihypertensive therapy in hypertensive rats with chronic renal failure*. J Hypertens 2001;19(10):1877.
60. Komatsu, Frohlich, Ono, et al. *Glomerular dynamics and morphology of aged spontaneously hypertensive rats. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibition*. Hypertens Dallas Tex 1979 1995;25(2):207–13.
61. Kramann R, Schneider R. *Parathyroid hormone–related protein and regulation of cell survival in the kidney*. Kidney International 2013;83(5):777–779.
62. Kurtz, Morris. *Biological variability in Wistar-Kyoto rats. Implications for research with the spontaneously hypertensive rat*. Hypertension 1987;10(1):127–131.
63. Kuru O, Şentürk Ü, Gülkesen H, et al. *Physical Training Increases Renal Injury in Rats with Chronic NOS Inhibition*. Renal Failure 2009;27(4):459–463.
64. Lanske, Divieti, Kovacs, et al. *The Parathyroid Hormone (PTH)/PTH-Related Peptide Receptor Mediates Actions of Both Ligands in Murine Bone\** \* This work was supported by National Institute of Health Grants DK-47038 and AM-03564. Endocrinology 1998;139(12):5194–5204.
65. Lawes C, Hoorn S, Rodgers A, for the of Hypertension I. *Global burden of blood-pressure-related disease, 2001*. Lancet 2008;371(9623):1513–1518.
66. Lazaro A, Gallego-Delgado J, Justo P, et al. *Long-term blood pressure control prevents oxidative renal injury*. Antioxidants Redox Signal 2005;7(9-10):1285–93.
67. Lee S-Y, Kim S, Choi M. *Therapeutic targets for treating fibrotic kidney diseases*. Transl Res 2015;165(4):512–530.

68. *Leitlinien für das Management der arteriellen Hypertonie*. Deutsche Gesellschaft für Kardiologie- Herz- und Kreislaufforschung e.V. 2014
69. Levey A, Cattran D, Friedman A, et al. *Proteinuria as a Surrogate Outcome in CKD: Report of a Scientific Workshop Sponsored by the National Kidney Foundation and the US Food and Drug Administration*. *Am J Kidney Dis* 2009;54(2):205–226.
70. Li H, He G, Yao H, et al. *TGF- $\beta$  Induces Degradation of PTHrP Through Ubiquitin-Proteasome System in Hepatocellular Carcinoma*. *J Cancer* 2015;6(6):511–518.
71. Lorenzo O, Ruiz-Ortega M, Esbrit P, et al. *Angiotensin II Increases Parathyroid Hormone-Related Protein (PTHrP) and the Type 1 PTH/PTHrP Receptor in the Kidney*. *J Am Soc Nephrol* 2002;13(6):1595–1607.
72. Maeda S, Iemitsu M, Jesmin S, et al. *Acute exercise causes an enhancement of tissue renin–angiotensin system in the kidney in rats [Internet]*. *Acta Physiologica Scandinavica* 2004;  
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-201X.2005.01459.x/abstract>
73. Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, et al. *2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC)*. *J. Hypertens.* 2013;31(7):1281–357.
74. Massfelder T, Helwig J-J. *The parathyroid hormone-related protein system: more data but more unsolved questions*. *Curr Opin Nephrol Hy* 2003;12(1):35.
75. Massfelder T, Taesch N, Fritsch S, et al. *Type 1 parathyroid hormone receptor expression level modulates renal tone and plasma renin activity in spontaneously hypertensive rat*. *J Am Soc Nephrol Jasn* 2002;13(3):639–48.
76. Meran S, Steadman R. *Fibroblasts and myofibroblasts in renal fibrosis*. *Int J Exp Pathol* 2011;92(3):158–167.

77. Meyrier. *Nephrosclerosis: A Term in Quest of a Disease*. *Nephron* 2015;0(0):276–282.
78. Nangaku M. *Chronic Hypoxia and Tubulointerstitial Injury: A Final Common Pathway to End-Stage Renal Failure*. *J Am Soc Nephrol* 2006;17(1):17–25.
79. Navar LG, Kobori H, Prieto-Carrasquero M. *Intrarenal angiotensin II and hypertension*. *Curr. Hypertens. Rep.* 2003;5(2):135–43.
80. Neuhauser, H, Thamm M, Ellert U. *Blutdruck in Deutschland 2008–2011*. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, 2013. 56(5-6):795-801.
81. Noda, Masakuni et al. *Increased Expression of Parathyroid Hormone–Related Peptide Gene in Blood Vessels of Spontaneously Hypertensive Rats*. *Hypertension* 30.5 (1997): 1284-1288. Web. 06 April. 2018.
82. Ohashi H, Matsunaga M, Yoshida H, et al. *Prevention of nephrosclerosis and cardiac hypertrophy by captopril treatment of spontaneously hypertensive rats* [Internet]. *Japanese circulation journal* 1985:
83. Okamoto K, Aoki K. *Development of a Strain of Spontaneously Hypertensive Rats*. *Jpn Circulation J* 1963;27(3):282–293.
84. Ortega A, Rámila D, Ardura J, et al. *Role of Parathyroid Hormone–Related Protein in Tubulointerstitial Apoptosis and Fibrosis after Folic Acid–Induced Nephrotoxicity* [Internet]. *Journal of the American Society of Nephrology* 2005;
85. Ortega A, Rámila D, Izquierdo A, et al. *Role of the Renin-Angiotensin System on the Parathyroid Hormone–Related Protein Overexpression Induced by Nephrotoxic Acute Renal Failure in the Rat*. *J Am Soc Nephrol* 2005;16(4):939–949.
86. Pedersen SB, Flyvbjerg A, Grønbaek H, Richelsen B. *Increased ornithine decarboxylase activity in kidneys undergoing hypertrophy in experimental diabetes*. *Molecular and cellular Endocrinology* 1992;

87. Pedersen SB, Flyvbjerg A, Richelsen B. *Inhibition of renal ornithine decarboxylase activity prevents kidney hypertrophy in experimental diabetes.* Am. J. Physiol. 1993;264(2 Pt 1):C453–6.
88. Pegg A. *Regulation of Ornithine Decarboxylase.* J Biol Chem 2006;281(21):14529–14532.
89. Pegg A. *Mammalian polyamine metabolism and function.* Iubmb Life 2009;61(9):880–894.
90. Pinto Y, Paul M, Ganten D. *Lessons from rat models of hypertension from Goldblatt to genetic engineering.* Cardiovasc Res 1998;39(1):77–88.
91. Polichnowski AJ, Cowley AW. *Pressure-induced renal injury in angiotensin II versus norepinephrine-induced hypertensive rats.* Hypertension 2009;54(6):1269–77.
92. Pravenec M, Kurtz T. *Recent Advances in Genetics of the Spontaneously Hypertensive Rat.* Curr Hypertens Rep 2010;12(1):5–9.
93. Qian J, Lorenz JN, Maeda S, et al. *Reduced blood pressure and increased sensitivity of the vasculature to parathyroid hormone-related protein (PTHrP) in transgenic mice overexpressing the PTH/PTHrP receptor in vascular smooth muscle.* Endocrinology 1999;140(4):1826–33.
94. Rámila D, Ardura J, Esteban V, et al. *Parathyroid hormone-related protein promotes inflammation in the kidney with an obstructed ureter [Internet].* Kidney International 2007
95. Romero M, Ortega A, Izquierdo, et al. *Parathyroid hormone-related protein induces hypertrophy in podocytes via TGF-1 and p27Kip1: implications for diabetic nephropathy.* Nephrology Dialysis Transplantation 2010;25(8):2447–2457.
96. Romero M, Ortega A, Olea N, et al. *Novel Role of Parathyroid Hormone-Related Protein in the Pathophysiology of the Diabetic Kidney: Evidence from Experimental and Human Diabetic Nephropathy.* J Diabetes Res 2013:162846.

97. Ruiz-Torres, Bosch, O'Valle, et al. *Age-related increase in expression of TGF-beta1 in the rat kidney: relationship to morphologic changes*. Journal of the American Society of Nephrology : JASN 1998;782–91.
98. Santos S, Bosch RJ, Ortega A, et al. *Up-regulation of parathyroid hormone-related protein in folic acid-induced acute renal failure*. Kidney international 2001;60(3):982–995.
99. Sasamura H, Shimizu-Hirota R, Nakaya H, Saruta T. *Effects of AT1 Receptor Antagonist on Proteoglycan Gene Expression in Hypertensive Rats*. Hypertens Res 2001;24(2):165.
100. Satriano. *Kidney growth, hypertrophy and the unifying mechanism of diabetic complications*. Amino Acids 2007;33(2):331–339.
101. Saussine C, Massfelder T, Parnin F, et al. *Renin stimulating properties of parathyroid hormone-related peptide in the isolated perfused rat kidney*. Kidney Int 1993;44(4):764–773.
102. Schaefer L. *Small Leucine-Rich Proteoglycans in Kidney Disease*. J Am Soc Nephrol 2011;22(7):1200–1207.
103. Schaefer L, Macakova K, Raslik I, et al. *Absence of decorin adversely influences tubulointerstitial fibrosis of the obstructed kidney by enhanced apoptosis and increased inflammatory reaction*. Am. J. Pathol. 2002;160(3):1181–91.
104. Schlüter -D. *PTH and PTHrP: Similar Structures but Different Functions*. News Physiological Sci Int J Physiology Prod Jointly Int Union Physiological Sci Am Physiological Soc 1999;14:243–249.
105. Schlüter KD., Ross G. (2006) *Intrakrine, parakrine und autokrine Funktionen des PTH/PTHrP-Systems*. In: Ganten D., Ruckpaul K., Köhrle J. (eds) *Molekularmedizinische Grundlagen von para- und autokrinen Regulationsstörungen*. Molekulare Medizin. Springer, Berlin, Heidelberg

106. Shimizu M, Irimajiri O, Nakano T, et al. *Effect of captopril on isoproterenol-induced myocardial ornithine decarboxylase activity*. J Mol Cell Cardiol 1991;23(6):665–670.
107. Soifer N, Why S, Ganz M, et al. *Expression of parathyroid hormone-related protein in the rat glomerulus and tubule during recovery from renal ischemia*. [Internet]. Journal of Clinical Investigation 1992;
108. Soltis EE, Newman PS, Hypertension O-J. *Polyamines, vascular smooth muscle, and deoxycorticosterone acetate-salt hypertension*. [Internet]. Hypertension 1991;
109. Soltis EE, Newman PS, Olsen J. W. *Eflornithine treatment in SHR: potential role of vascular polyamines and ornithine decarboxylase in hypertension*. Clinical and Experimental Hypertension 1994;16(5):595–610.
110. Steffel J., Lüscher T. (Hrsg.), *Niere und Ableitende Harnwege*, Springer-Lehrbuch, DOI 10.1007/978-3-642-28236-2\_11, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg 2014
111. Svarstad E, Myking O, Ofstad J, et al. *Effect of Light Exercise on Renal Hemodynamics in Patients with Hypertension and Chronic Renal Disease* [Internet]. Scandinavian Journal of Urology and Nephrology 2008; <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080%2F003655902762467648>
112. Tachaudomdach C, Kantachavesiri S, Wongraphairot S, et al. *High Collagen I Gene Expression as an Independent Predictor of Adverse Renal Outcomes in Lupus Nephritis Patients With Preserved Renal Function*. Archives Pathology Laboratory Medicine 2015;139(3):378–87.
113. Thomson S, Deng A, Bao D, et al. *Ornithine decarboxylase, kidney size, and the tubular hypothesis of glomerular hyperfiltration in experimental diabetes*. J Clin Invest 2001;107(2):217–224.
114. Traynor J, Mactier R, Geddes C, Fox J. *How to measure renal function in clinical practice*. Bmj 2006;333(7571):733–737.

115. Turchanowa, Rogozkin, Milovic, et al. *Influence of physical exercise on polyamine synthesis in the rat skeletal muscle*. Eur J Clin Invest 2000;30(1):72–78.
116. Wang W, Zhang H, Xue G, et al. *Exercise Training Preserves Ischemic Preconditioning in Aged Rat Hearts by Restoring the Myocardial Polyamine Pool*. Oxid Med Cell Longev 2014; 2014:457–429.
117. Weir M. *Effects of renin-angiotensin system inhibition end-organ protection: Can we do better?* Clin Ther 2007;29(9):1803–1824.
118. Welsch S, Schordan E, Coquard C, et al. *Abnormal Renovascular Parathyroid Hormone-1 Receptor in Hypertension: Primary Defect or Secondary to Angiotensin II Type 1 Receptor Activation?* Endocrinology 2006;147(9):4384–4391.
119. William E. Garrett, Donald T. Kirkendall *Exercise and Sport Science*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2000
120. Williams B, Mancia G, Spiering W, et al. *2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension*. Eur Heart J 2018;
121. Wilson KM, Magargal W, Berecek KH. *Long-term captopril treatment. Angiotensin II receptors and responses*. Hypertension 1988;11(2\_pt\_2):1148.
122. Yamori Y, Igawa T, Kanbe T, et al. *Mechanisms of structural vascular changes in genetic hypertension: analyses on cultured vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats [Internet]*. 1981; <http://www.clinsci.org/content/61/s7/121s.abstract>
123. Zamo FS, Barauna VG, Chiavegatto, et al. *The renin–angiotensin system is modulated by swimming training depending on the age of spontaneously hypertensive rats*. Life Sci 2011;89(3-4):93–99.
124. Zeisberg M, Neilson EG. *Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis*. J. Am. Soc. Nephrol. 2010;21(11):1819–34.

125. Zhou X, Frohlich E. *Ageing, hypertension and the kidney: new data on an old problem*. *Nephrol Dial Transpl* 2003;18(8):1442–1445.

## 10. Publikationsverzeichnis

Braun K, Atmanspacher F, Schreckenbergr R, Grgic I, Schlüter K.-D.

Effect of free running wheel exercise on renal expression of parathyroid hormone receptor type 1 in spontaneously hypertensive rats.

Physiological Reports 2018;6(17):e13842.

### **Poster:**

Braun K, Schreckenbergr R, Schlüter K.-D.

Influence of physical activity on kidney remodeling in hypertensive rats

79. Jahrestagung Deutsche Gesellschaft für Kardiologie - Herz und Kreislaufforschung e.V. (2013)

## 11. Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

## **12. Danksagung**

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. K.-D. Schlüter für die Überlassung des Themas und die hervorragende Betreuung bedanken.

Ebenso danke ich Herrn Dr. Rolf Schreckenbergr für die Unterstützung und Beratung während der gesamten Arbeitsphase.

Allen technischen Assistenten und Mitdoktoranden danke ich, vor allem aber Frau Nadine Woitasky für die angenehme Atmosphäre, die Einarbeitung in die Laborarbeit und die Hilfe bei molekularbiologischen Fragen.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Herrn Dr. Emmanuel Schneck für die Korrektur dieser Arbeit.

Bastian danke ich für den unermüdlichen Zuspruch, die Geduld, den Rückhalt und das Verständnis in den letzten Jahren.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie für die Motivation und die Unterstützung in allen Lebenslagen und besonders während dieser Arbeit bedanken.

