

ZUSAMMENFASSUNG

Die ersten 1.000 Tage des Lebens zwischen Konzeption und dem Ende des 2. Lebensjahres sind von großer Bedeutung für die Entwicklung eines Kindes. In dieser Zeit wird die Grundlage für die Gesundheit im späteren Leben gelegt. Einige Nierenerkrankungen konnten mit ungünstigen perinatalen Bedingungen und Ereignissen assoziiert werden. Intrauterine Mangelzustände prädisponieren sowohl für eine verminderte Nierenfunktion im frühen Erwachsenenalter, als auch für ungünstige Verläufe von Glomerulopathien und ein erhöhtes Risiko für terminale Niereninsuffizienz. Epidemiologische Studien konnten ebenfalls zeigen, dass eine experimentelle intrauterine Wachstumsrestriktion (IUGR) zu einem erhöhten Risiko für schlechtere Nierenfunktion im späteren Leben führt. So wurden in verschiedenen Studien eine pro-inflammatorische molekulare Signatur in der frühen Nierenentwicklung, Anfälligkeit für Hypertonie und ungünstige Verläufe von mesangioproliferativen Glomerulonephritis mit IUGR assoziiert. Auf der anderen Seite ergaben sich aus Ernährungsinterventionsstudien Hinweise, dass n-3 mehrfach ungesättigte Fettsäuren (n-3 PUFA) renoprotektiv, anti-inflammatorisch und anti-hypertensiv wirken können. In der vorliegenden Studie sollte daher untersucht werden, ob die Anfälligkeit von IUGR-Nachkommen für eine Nierenschädigung im späteren Leben durch eine postnatale und zeitbegrenzte Ernährungsintervention verringert werden kann. Hierzu wurde zunächst die Hypothese untersucht, dass IUGR-Nachkommen ein höheres Risiko für Blutdruckerhöhung, Gefäßdysregulationen und einen schwereren Verlauf einer Thy1-Nephritis haben. Zum anderen untersuchten wir, ob eine postnatale Nahrungsanreicherung mit n-3 PUFA und Cholin die Zellmembran-Zusammensetzung modifiziert, den Blutdruck senkt und den Schweregrad einer Thy1-Nephritis mildert.

Um diese Fragen zu klären, wurde eine IUGR am 18. Gestationstag auf zwei Arten induziert. Durch bilaterale Ligatur (LIG) der utero-plazentaren Gefäße wurde eine experimentelle utero-plazentare Insuffizienz herbeigeführt. Durch eine entsprechende Schein-Operation ohne Gefäßligatur, wurde intrauteriner Stress (IUS) induziert. Kontroll-Nachkommen (C) von unbeeinträchtigten Muttertieren ohne Operation wurden mit Nachkommen der beiden IUGR-Gruppen verglichen. Am postnatalen Tag (PND) 2 wurden alle Nachkommen zu Kontroll-Muttertieren gegeben („fostering“) und dabei die Wurfgröße auf 6 Männchen und 2 Weibchen angeglichen. Von PND2 bis PND39 wurden die Würfe entweder mit Kontrollnahrung (CONTR; 1:20 n-3/n-6 Fettsäureverhältnis, 0.03 g Docosahexaensäure (DHA), 1 g Cholin/kg Nahrung) oder Interventionsnahrung (N3PUFA; 1:1 n-3/n-6 Fettsäureverhältnis, 5 g DHA, 5 g Cholin) gefüttert, anschließend erhielten alle Tiere Kontrollnahrung. An PND40 wurden Blutdruckkatheter implantiert und nach einer

Erholungsphase sowohl Blutdruck als auch Herzfrequenz kontinuierlich gemessen. An PND53 wurde mittels Thy1-Antikörperinjektion eine experimentelle Glomerulonephritis in allen Gruppen, ausgenommen einer Kontroll-Kontroll (CC) Gruppe, induziert. An PND39 (Weibchen) und PND67 (Männchen) wurden die Nieren entnommen. Histologie, Proteomics und Lipidomics wurden herangezogen, um im longitudinalen Verlauf Veränderungen der unterschiedlichen Prozeduren und Interventionen auf molekularen Ebene zu untersuchen.

Sowohl weibliche als auch männliche Nachkommen aus beiden IUGR-Modellen hatten ein niedrigeres Geburtsgewicht, zeigten jedoch kein signifikantes postnatales Aufholwachstum. An PND33 senkte die n-3 PUFA Nahrung in IUGR-Ratten sowohl die Triglyceride als auch das Gesamtcholesterin. Des Weiteren hatte die Ernährungsintervention einen signifikanten Einfluss auf die Phospholipid (PL)-Zusammensetzung des Nierencortexgewebes an PND39. PL die Arachidonsäure (AA, 20:4, n-6) enthalten, waren stark herunter reguliert, wie z.B. Phosphatidylcholin (PC) 38:4 (20:4, 18:0), das in allen Interventionsgruppen um ca. 75% reduziert war. Im Gegensatz dazu waren DHA-haltige PL in diesen Gruppen stark erhöht. PC 40:6, eine Komposition aus 22:6 und 18:0, war um das Zwei- bis Dreifache erhöht. Auch an PND67, d.h. vier Wochen nach Beendigung der Ernährungsintervention, waren noch Veränderungen in der PL-Zusammensetzung präsent. Obwohl kein signifikanter Nahrungseffekt auf AA-haltige PL mehr festgestellt werden konnte, waren DHA-haltige PL in den Interventionsgruppen weiterhin signifikant erhöht. Weitere molekulare Veränderungen wurden mittels Proteom-Analyse des Nierencortex an PND39 untersucht. Es wurden 62 durch Plazentainsuffizienz veränderte Proteine (LIG-CONTR vs. C-CONTR) identifiziert, die unter Ernährungsintervention wiederum gegenläufig verändert waren (LIG-N3PUFA vs. LIG-CONTR). Sub-Analysen entschlüsselten, dass dies 11 Proteinexpressionsveränderungen umfasst, die der Komplement- und Gerinnungskaskaden zugeordnet werden können. Darüber hinaus wurden 13 weitere gegenregulierte Proteine als Core-Matrisom und Matrisom-assoziiert identifiziert. In weiteren Untersuchungen zum Phänotyp nach IUGR zeigten renale Interlobarterien (RIA) der LIG-Ratten eine vaskuläre Dysfunktion, welche einen Verlust der Stretch-Aktivierung sowie eine verstärkte endothelabhängige Relaxation im frühen Erwachsenenalter mit einschloss. Dieser Befund in Kombination mit leicht erhöhtem systemischen Blutdruck könnte zu einer Anfälligkeit für eine blutdruckvermittelte glomerulärer Schädigungen beitragen. Die Untersuchungen zu den Auswirkungen eines „Second Hits“ zeigten an PND67, dass die Scores für Glomerulosklerose und tubulointerstitiale (TI) Schädigung sich in IUGR-Ratten nicht signifikant von C-Ratten unterschieden. Die Transformation und Proliferation von Mesangialzellen, anhand derer eine glomeruläre

Schädigung bestimmt werden kann, war bei LIG-Nachkommen sogar reduziert. Beispielsweise war α -SMA als Marker für die Entdifferenzierung von Mesangialzellen in Glomeruli nach Thy1-Nephritis höher exprimiert (C-CONTR vs. CC-CONTR), nicht jedoch in LIG-CONTR. Analysen des PDGFR- β -Signalwegs und die Ki67-Färbung bestätigten ebenfalls diese Ergebnisse. Des Weiteren waren weder Mikroaneurysmen noch entzündungsbedingte Veränderungen von Parietalepithelzellen noch TI-Entzündung bei Ratten der LIG-CONTR Gruppe nachweisbar. Interessanterweise konnten diese pathologischen Veränderungen jedoch bei einigen LIG-Ratten nachgewiesen werden, die früher eine n-3 PUFA Nahrung erhalten hatten. Im Gegensatz dazu zeigten einige Nachkommen der Gruppen C-CONTR und IUS-CONTR Microaneurysmen, die in den entsprechenden Gruppen mit vorausgegangener n-3 PUFA Ernährungsintervention nicht mehr aufgetreten sind. Wir konnten somit einen gegensätzlichen Effekt der frühen Ernährungsintervention auf glomeruläre Pathologien in den verschiedenen Versuchsgruppen zeigen. Darüber hinaus waren an PND67 im glomerulären Proteom bei LIG-CONTR vs. C-CONTR hauptsächlich Proteine verändert, die dem Lipidstoffwechsel, dem Peroxisom und dem Abbau von verzweigt-kettigen Aminosäuren zugeordnet werden konnten. Zu den am stärksten veränderten Proteinen gehörte CYP4A12, das als ein podozytär-exprimiertes Enzym identifiziert wurde und die Synthese des Arachidonsäure-Metaboliten 20-HETE fördert. Neben CYP4A12 und CBS wurden auch EHHADH und EPHX2 als potenzielle Zielmoleküle für Ernährungsinterventionen identifiziert. Zusammenfassend ist die Menge an AA und DHA in PL der Zellmembranen stark von der Nahrungszusammensetzung abhängig und kann somit die Eicosanoid-Synthese und dadurch Entzündungsmuster sowie die Hämodynamik beeinflussen. Im frühen Erwachsenenalter (PND39) war das kortikale Proteom vor allem in der LIG-Gruppe verändert, bei der eine IUGR durch Plazentainsuffizienz induziert worden war. Bei diesen Tieren waren Proteine der Komplementaktivierungs- und Gerinnungskaskade sowie Matrisom-assoziierte Proteine verändert exprimiert. Wir konnten darüber hinaus zeigen, dass die n-3 PUFA Nahrung diese Proteine bei LIG-Ratten gegenreguliert. Phänotypisch zeigten LIG-Ratten im frühen Erwachsenenalter einen leicht erhöhten Blutdruck sowie eine vaskuläre Dysfunktion mit einem Verlust des myogenen Tonus sowie einer erhöhten endothel-abhängigen Relaxation in renalen Interlobararterien (RIA). Diese Befunde könnten auf eine erhöhte Anfälligkeit für blutdruckbedingte glomeruläre Schädigungen hinweisen. Die morphologischen Untersuchungen nach Thy1-Nephritis bestätigten nicht die Hypothese, dass die Thy1-Nephritis bei LIG-Ratten schwerer verläuft. Allerdings zeigten unsere Ratten im Gegensatz zu den in der Literatur beschriebenen Ratten kein postnatales Aufholwachstum. Wir spekulieren daher, dass

nicht die IUGR allein, sondern nur die Kombination aus IUGR und postnatalem Aufholwachstum für einen schwereren Verlauf der Glomerulonephritis prädisponiert. Auf molekularer Ebene waren bei LIG-Ratten nach Thy1-Nephritis Proteine verändert, die dem Lipidstoffwechsel, der β -Oxidation in Peroxisomen und dem Abbau von verzweigtkettigen Aminosäuren zugeordnet werden konnten. Darin inbegriffen war das Enzym CYP4A12, das den Arachidonsäure-Metaboliten 20-HETE bildet. Unsere Studie zeigte molekulare Auswirkungen von ungünstigen perinatalen Bedingungen auf die langfristige Gesundheit der Niere. Darüber hinaus konnten wir Hinweise zum Potential einer n-3 PUFA Nahrung zur Prävention von Nierenschäden anhand unserer Daten zeigen. Diese Ergebnisse verdeutlichen die Notwendigkeit weiterer Studien zur Wirkung von Ernährungsintervention mit Lipiden auf die Nierengesundheit.