

Aus der Medizinischen Universitätsklinik  
und Poliklinik Tübingen  
Abteilung Innere Medizin IV  
(Schwerpunkt: Endokrinologie und Diabetologie, Angiologie,  
Nephrologie und Klinische Chemie)  
Sektion Nieren- und Hochdruckkrankheiten

**Bedeutung und pharmakologische Hemmung von  
Serinproteasen im Urin beim experimentellen  
nephrotischen Syndrom der Maus**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Menacher, Martina Brigitte**

**2017**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. F. Artunc

2. Berichterstatter: Professor Dr. L. Zender

3. Berichterstatter: Privatdozent Dr. E. Hoxha

Tag der Disputation: 10.10.2017

## **Inhaltsverzeichnis**

1	Einleitung.....	1
1.1	Nephrotisches Syndrom.....	1
1.1.1	Leitsymptome.....	1
1.1.2	Ursachen.....	2
1.1.3	Theorien zur Ödementstehung.....	4
1.1.4	Aktuelle Therapie.....	5
1.2	Bedeutung von Serinproteasen beim nephrotischen Syndrom.....	7
1.2.1	Plasmin.....	7
1.2.2	Prostasin.....	7
1.2.3	Kallikrein.....	8
1.3	Inhibition von Serinproteasen.....	8
1.3.1	Aprotinin.....	9
1.3.2	Camostat.....	9
1.3.3	Tranexamsäure.....	10
1.4	Epithelialer Natriumkanal.....	10
1.4.1	Aufbau.....	11
1.4.2	Regulation.....	11
1.5	Fragestellung der Dissertation.....	16
2	Material und Methoden.....	17
2.1	Material.....	17
2.2	Methoden.....	20
2.2.1	Versuchstiere und Tierhaltung.....	20
2.2.2	Studienaufbau.....	20
2.2.3	Versuchsablauf und Probengewinnung.....	21
2.2.4	Messungen.....	27
2.2.5	Statistische Auswertung.....	39
3	Ergebnisse.....	40
3.1	Verlauf des nephropathischen Mausmodells.....	40
3.1.1	Gewicht.....	40
3.1.2	Natriurese.....	42

3.1.3	Proteinurie und Plasma-Albumin.....	43
3.1.4	Aprotininempfindliche amidolytische Urinaktivität.....	44
3.1.5	Urin- und Plasma-Plasmin(ogen) .....	45
3.1.6	Lipämie .....	46
3.1.7	Plasma-Harnstoff .....	46
3.1.8	Überleben.....	47
3.1.9	Zusammenfassung.....	48
3.2	Inhibition der Serinproteaseaktivität <i>in vitro</i> .....	49
3.3	Interventionsstudien – Applikation von Serinproteaseinhibitoren .....	51
3.3.1	Subkutane Applikation von Serinproteaseinhibitoren .....	51
3.3.2	Intraperitoneale Applikation von emulgierten Serinproteaseinhibitoren .....	53
3.3.3	Subkutane Implantation von Pellets mit Serinproteaseinhibitoren .....	56
3.3.4	Zusammenfassung.....	64
3.4	Korrelationen.....	65
4	Diskussion .....	67
4.1	Nephropathisches Mausmodell.....	67
4.1.1	Zusammenfassung.....	67
4.1.2	Experimentelle Tiermodelle zur Induktion des nephrotischen Syndroms.....	69
4.1.3	Entstehung der Volumenretention beim nephrotischen Syndrom .....	70
4.1.4	Natriumretention und ENaC-Aktivierung .....	73
4.2	Inhibition von Serinproteasen.....	75
4.2.1	Inhibition der Serinproteaseaktivität <i>in vitro</i> .....	75
4.2.2	Subkutane Applikation von Serinproteaseinhibitoren .....	76
4.2.3	Intraperitoneale Applikation von emulgierten Serinproteaseinhibitoren .....	77
4.2.4	Subkutane Implantation von Pellets mit Serinproteaseinhibitoren .....	78
4.3	Ausblick.....	83

5	Zusammenfassung .....	85
6	Literaturverzeichnis.....	86
7	Erklärung zum Eigenanteil .....	96
8	Veröffentlichungen.....	97
9	Danksagung.....	98

## Abkürzungsverzeichnis

♂	Männchen
♀	Weibchen
ACE	angiotensin converting enzyme
ANP	atriales natriuretisches Peptid
ADH	antidiuretisches Hormon
APR	Aprotinin
AT <sub>1</sub> -Rezeptor	Angiotensin II-Rezeptor Typ 1
AUC	area under the curve
BSA	Bovine Serum Albumin Fraction V
ca.	circa
CAM	Camostat
CAP	channel activating protease
CKD	chronische Niereninsuffizienz
cpm	counts per minute
crea	Kreatinin
CSE	Cholesterin-Synthese-Enzym
DF	Verdünnungsfaktor
E	Extinktion
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ENaC	epithelialer Natriumkanal
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSGS	fokal-segmentale Glomerulosklerose
G	Gauge (Maßeinheit für Kanülengröße)
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
H-D-Val-Leu-Lys-pNA · 2HCl	H-D-Valyl-L-leuzyl-L-lysin-p-Nitroanilin dihydrochlorid
HIV	humanes Immundefizienzvirus
HRP	Meerrettichperoxidase
IC <sub>50</sub>	mittlere inhibitorische Konzentration
IgG	Immunglobulin G

kDa	Kilodalton
KI <sub>95</sub>	95% - Konfidenzintervall
KIU	Kallikrein Inhibitor Einheit
KG	Körpergewicht
λ	Wellenlänge
MCT	mittelkettige Triglyzeride
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mod.	modifiziert
MW	Molekulargewicht
NSAR	nicht-steroidale Antirheumatika
OD	optische Dichte
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PGPR	Polyglycerolpolyricinooleat
PLC	Placebo
RAAS	Renin-Angiotension-Aldosteron-System
rpm	Umdrehungen pro Minute
SEM	Standardfehler
siRNA	small interfering RNA
SLE	systemischer Lupus erythematoses
Span	Sorbitanmonooleat
THSD7A	Thrombospondin-type-1 domain-containing 7A
TMB	Tetramethylbenzidin
TMPRSS4	Transmembrane protease serine 4
t-PA	gewebsspezifischer Plasminogenaktivator
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TXS	Tranexamsäure
u-PA	Urokinase
w/o-Emulsion	Wasser-in-Öl-Emulsion

## **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Aufbau des epithelialen Natriumkanals .....	11
Abbildung 2: Proteolytische Aktivierung des epithelialen Natriumkanals.....	14
Abbildung 3: Lokalisation der Schnittstellen in der $\alpha$ - und $\gamma$ -Untereinheit des ENaC.....	14
Abbildung 4: Versuchsablauf Nephropathiemodell.....	22
Abbildung 5: Versuchsablauf Intervention – Emulsionsinjektion .....	25
Abbildung 6: Maus nach subkutaner Pelletimplantation .....	26
Abbildung 7: Versuchsablauf Intervention – Pelletimplantation.....	27
Abbildung 8: Keilstrichformel für das chromogene Substrat S-2251™.....	30
Abbildung 9: Prinzip eines nicht-kompetitiven ELISA.....	35
Abbildung 10: Vergleich von kompetitivem und nicht-kompetitivem/Sandwich-ELISA .....	36
Abbildung 11: Nephropathiemodell – Gewicht.....	40
Abbildung 12: Nephropathiemodell – Aszites .....	41
Abbildung 13: Nephropathiemodell – Natriurese .....	42
Abbildung 14: Nephropathiemodell – Proteinurie und Plasma-Albumin .....	43
Abbildung 15: Nephropathiemodell – amidolytische Urinaktivität .....	44
Abbildung 16: Nephropathiemodell – Urin-Plasmin(ogen) und Plasma-Plasmin(ogen) .....	45
Abbildung 17: Nephropathiemodell – Lipämie .....	46
Abbildung 18: Nephropathiemodell – Plasma-Harnstoff.....	46
Abbildung 19: Nephropathiemodell – Überlebensraten .....	47
Abbildung 20: <i>in vitro</i> -Inhibitionskurven mit Urin nephrotischer Tiere.....	49
Abbildung 21: <i>in vitro</i> -Inhibitionskurven mit aufgereinigtem Plasmin.....	50
Abbildung 22: Amidolytische Urinaktivität vor und nach subkutaner Injektion der Inhibitoren.....	52
Abbildung 23: Eliminationskinetik von FITC-Inulin.....	53
Abbildung 24: Intervention Emulsion – Gewicht und Aprotininkonzentration in Urin und Plasma.....	55
Abbildung 25: Intervention Pellet – Gewicht.....	57
Abbildung 26: Intervention Pellet – Natriurese .....	58



Abbildung 27: Intervention Pellet – amidolytische Urinaktivität.....	59
Abbildung 28: Intervention Pellet – Urin-Aprotinin- und Plasma- Aprotininkonzentration.....	61
Abbildung 29: Intervention Pellet – Abhängigkeit der Gewichtszunahme und der amidolytischen Urinaktivität von der Aprotininkonzentration im Urin .....	63

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Material – Verbrauchsmaterialien für Probenaufbereitung, Messungen und Tierexperimente .....	17
Tabelle 2: Material – Materialien für Tierhaltung .....	18
Tabelle 3: Material – Geräte und Computerprogramme .....	18
Tabelle 4: Material – Medikamente und andere Substanzen zur Applikation im Tierversuch.....	19
Tabelle 5: Material – Kits/Reagenzien.....	19
Tabelle 6: Subkutan injizierte Menge [ $\mu\text{g/g KG}$ ] der gelösten Inhibitoren .....	23
Tabelle 7: Substanzen, deren Massenanteil [%] und Funktion für die Herstellung einer Wasser-in-Öl-Emulsion.....	24
Tabelle 8: Zu emulgierende Substanzen und deren Konzentration in der wässrigen Phase [ $\text{mg/ml}$ ] .....	24
Tabelle 9: Substanzen in maßgefertigten Pellets und deren tägliche Freisetzungsmenge [ $\text{mg/d}$ ] über 14 Tage.....	26
Tabelle 10: $\text{IC}_{50}$ -Werte und 95 %-Konfidenzintervalle der ausgewählten Serinproteaseinhibitoren .....	50
Tabelle 11: Intervention Pellet – Plasmaparameter.....	60
Tabelle 12: Korrelationen – Intervention mit Placebo .....	100
Tabelle 13: Korrelationen – Intervention mit Aprotinin.....	101
Tabelle 14: Korrelationen – Intervention mit Camostat.....	102
Tabelle 15: Korrelationen – Intervention mit Tranexamsäure .....	103

# 1 Einleitung

## 1.1 Nephrotisches Syndrom

Das nephrotische Syndrom ist ein Symptomkomplex, der sich bei verschiedenen glomerulären Erkrankungen der Niere manifestieren kann und auf einem Defekt in der glomerulären Filtrationsbarriere beruht, sodass hochmolekulare Proteine ( $> 60$  kDa) filtriert werden [1, 2]. Ausgehend von dieser massiven Proteinurie, entwickeln sich die weiteren charakteristischen Zeichen des nephrotischen Syndroms: Ödeme, Hypoproteinämie, Hyperlipoproteinämie [3]. Eine chronische Proteinurie ist ein häufiges Erscheinungsbild bei chronischer Niereninsuffizienz und gilt als ein unabhängiger Marker für die Schwere des Nierenschadens und die Rasanz des Funktionsverlustes der Niere. Vermutlich trägt auch die Proteinurie selbst zur Progredienz der Niereninsuffizienz bei [4, 5].

### 1.1.1 Leitsymptome

Leitbefund des nephrotischen Syndroms ist eine ausgeprägte Proteinurie von über  $3 - 3,5$  g/d. Die Betroffenen entwickeln ausgeprägte Ödeme, die sich typischerweise an den Extremitäten, den Augenlidern, am Rücken (sog. Anasarka) oder in Form von Aszites oder Pleuraergüssen manifestieren [2, 3, 6].

Charakteristisch ist außerdem, dass die Leber kompensatorisch Lipoproteine (Hyperlipoproteinämie), insbesondere Cholesterin und Triglyzeride produziert, um den onkotischen Druck bei massiver Proteinurie aufrecht zu erhalten. Der Verlust von IgG und Antithrombin führt zu einer erhöhten Infekt- und Thromboseneigung [2, 7].

In der Serumelektrophorese findet man typischerweise eine Abnahme der Albumin- und  $\gamma$ -Globulinfraktion, während die  $\alpha_2$ - und  $\beta$ -Globuline durch die gesteigerte Lipoproteinproduktion relativ erhöht sind. In der Urinuntersuchung

ist durch den hohen Proteingehalt ein hohes spezifisches Gewicht messbar; im Sediment sind bei ausgeprägter Lipämie im Polarisationsmikroskop sogenannte Malteser-Kreuze sichtbar [2, 6]. Die Sonographie der Nieren kann die klinische Diagnose eines nephrotischen Syndroms erhärten. Man erkennt typischerweise erheblich vergrößerte Nieren und eine deutlich erhöhte Parenchymechogenität [8]. Eine Nierenbiopsie ist meist erforderlich und lässt eine histologische Klassifizierung zu [2].

### **1.1.2 Ursachen**

Die Hauptursache für eine nephrotische Proteinurie ist eine primäre glomeruläre Erkrankung wie die membranöse Glomerulonephritis, die Minimal-Change-Glomerulopathie oder die fokal-segmentale Glomerulosklerose. Diese können ebenso wie sekundär glomeruläre Erkrankungen, beispielsweise die diabetische Nephropathie, die Präeklampsie oder durch Medikamente sowie angeborene Defekte der Basalmembran verursachte glomeruläre Schäden, durch eine Schädigung der glomerulären Filtrationsbarriere zu einer ausgeprägten großmolekularen Proteinurie führen, die sich klinisch als nephrotisches Syndrom präsentieren kann. Die pathogenetische Gemeinsamkeit ist eine Schädigung der dreischichtigen glomerulären Filtrationsbarriere, die aus Endothel, Basalmembran und Podozyten gebildet wird [2, 7].

#### **1.1.2.1 Membranöse Glomerulonephritis**

Die membranöse Glomerulonephritis ist die häufigste Ursache des nephrotischen Syndroms im Erwachsenenalter. Sie kann primär als Autoimmunerkrankung oder sekundär durch Medikamente (z. B. NSAR, Penicillamin, Gold), Infektionen (z. B. HIV, Hepatitis B/C), im Rahmen anderer Autoimmunerkrankungen (z. B. SLE) oder paraneoplastisch auftreten. Pathogenetisch bilden sich diffuse zahnradförmige IgG-Immunkomplex- und Komplementdepots auf der Außenseite der glomerulären Basalmembran.

Neben den charakteristischen Befunden des nephrotischen Syndroms können auch Mikrohämaturie und arterielle Hypertonie auftreten [2]. Kürzlich wurde nachgewiesen, dass Autoantikörper gegen podozytäre Antigene wie z. B. den Phospholipase A2-Rezeptor [2, 9] oder THSD7A [10] der Entwicklung einer membranösen Glomerulonephritis zugrunde liegen.

#### 1.1.2.2 Minimal-Change-Glomerulopathie

Das nephrotische Syndrom bei Kindern wird überwiegend durch die Minimal-Change-Glomerulopathie hervorgerufen. Sie kann idiopathisch oder sekundär nach NSAR-Einnahme, paraneoplastisch oder im Rahmen von Nahrungsmittelallergien auftreten. Sie entspricht einer Podozytopathie, bei der es zu einer Verschmelzung von Podozytenfortsätzen kommt. Daraus resultiert ein Verlust der negativen Ladung der glomerulären Basalmembran mit der Folge einer hochselektiven Albuminurie. In den Tubuli abgelagerte Lipide und Proteine ergeben das histopathologische Bild einer sog. Lipoidnephrose. Klinisch zeigt sich ein ausgeprägtes nephrotisches Syndrom mit den typischen Komplikationen. Auf Grund des guten Ansprechens auf Glukokortikoide verläuft diese Form insbesondere für Kinder prognostisch sehr günstig. Bei Erwachsenen kann ein Übergang in die fokal-segmentale Glomerulosklerose erfolgen [2].

#### 1.1.2.3 Fokal-segmentale Glomerulosklerose

Die prognostisch ungünstigste Form der Podozytopathien ist die fokal-segmentale Glomerulosklerose. Sie ist gekennzeichnet von einer segmentalen Sklerosierung und Hyalinose glomerulärer Kapillaren. Diese Form kann idiopathisch, sekundär infektiös, paraneoplastisch oder familiär als genetische Podozytenerkrankung entstehen. Bei den sekundären Ursachen kommt es vermutlich durch eine glomeruläre Hyperfiltration zur fortschreitenden Sklerosierung. Die typischen Symptome des nephrotischen Syndroms können

ebenfalls von Hämaturie oder arterieller Hypertonie begleitet werden. Der Übergang in eine terminale Niereninsuffizienz ist häufig und verläuft rasch [2]. Durch die einmalige intravenöse Gabe des Zytostatikums Doxorubicin, ein Glykosidantibiotikum aus der Gruppe der Anthrazykline, die von Bakterien der Gattung *Streptomyces* gewonnen werden [11], kann im Mausmodell das nephrotische Syndrom ausgelöst werden. Es bewirkt eine podozytäre Schädigung, die in einem Zeitraum von wenigen Tagen zum Vollbild des nephrotischen Syndroms führt. Innerhalb von sechs bis acht Wochen geht die Erkrankung in eine chronische Niereninsuffizienz bis hin zur Urämie über [11-13]. Die histologisch sichtbare tubulointerstitielle Fibrose lässt dabei am ehesten die Zuordnung der Nierenschädigung als eine ausgeprägte Form der fokal-segmentalen Glomerulosklerose mit Anteilen einer Minimal-Change-Glomerulopathie zu [11, 13, 14].

### 1.1.3 Theorien zur Ödementstehung

Neben der Proteinurie ist die Entstehung von Ödemen ein führendes Symptom des nephrotischen Syndroms. Aktuell existieren zwei unterschiedliche Theorien für den genauen Zusammenhang zwischen Proteinurie und Ödementstehung: die Overfill- und die Underfill-Theorie.

Gemäß der Overfill-Theorie wird vermutet, dass im Rahmen der Proteinurie aberrant filtrierte Proteasen primär die Natriumrückresorption im Nierentubulus stimulieren, welche zur Volumenretention mit konsekutiver Ödembildung führt. Im Gegensatz dazu besagt die Underfill-Theorie, dass durch die im Rahmen der Proteinurie entstehende Hypoproteinämie der onkotische Druck im Plasmakompartiment abfällt, weshalb vermehrt Flüssigkeit aus den Gefäßen ins Interstitium gelangt. Durch die entstehende Hypovolämie wird das RAAS und die ADH-Ausschüttung stimuliert, die sekundär die Natrium- und Volumenretention in der Niere steigern [13, 15, 16].

Ein davon entkoppelter aber synergistischer Effekt ist eine ANP-Resistenz bzw. ein ANP-Mangel beim nephrotischen Syndrom. Extrazelluläre Volumenexpansion führt zu einer pro-ANP-Produktion in den atrialen Myozyten,

das durch die atriale membranständige Serinprotease Corin proteolysiert wird. Das entstandene aktive ANP führt über die Vasodilatation der Vasa afferentia des Glomerulums zu einer erhöhten GFR und zu einer verminderten tubulären Natriumrückresorption. Zwar sind beim nephrotischen Syndrom erhöhte ANP-Spiegel häufig, jedoch scheint deren Wirksamkeit an der Zielstruktur vermindert zu sein. Hinzu kommt, dass Corin physiologischerweise auch renal exprimiert wird [17] und dessen Produktion und damit die Konversion zum aktiven ANP beim nephrotischen Syndrom häufig herunterreguliert ist [16, 18]. Daraus resultiert eine abgeschwächte Wirksamkeit der körpereigenen Kompensationsmechanismen gegen die extrazelluläre Volumenüberladung beim nephrotischen Syndrom [16].

#### **1.1.4 Aktuelle Therapie**

Die Therapie des nephrotischen Syndroms beim Menschen ist abhängig von dessen Ursache und Begleiterkrankungen. Im Vordergrund steht die Therapie der Grunderkrankung (z. B. Verzicht auf auslösende Toxine, antivirale Therapie, Immunsuppression) [2]. Die kausale Therapie der Minimal-Change-Glomerulopathie erfolgt mit Glukokortikoiden, durch die in der Regel eine Krankheitsremission erreicht werden kann [2, 19]. Bei anderen idiopathischen Glomerulopathien kann ein Therapieversuch mit Glukokortikoiden oder anderen Immunsuppressiva (z. B. Ciclosporin A) eingeleitet werden [2, 3].

Parallel dazu erfolgt meist eine symptomatische Therapie. Hierbei wird versucht, die Ödeme durch eine protein- (ca. 0,8 g/kg KG) und kochsalzrestriktive (ca. 2 g/d) Diät sowie behutsame Diuretikagabe auszuschwemmen [3]. Die meisten Patienten sprechen relativ gut auf Schleifendiuretika an, obwohl sich im Vergleich zu Patienten mit normaler Nierenfunktion häufig eine Resistenz zeigt. Ursächlich könnte sein, dass Schleifendiuretika im Plasma zunächst hochaffin an Proteine gebunden sind, weshalb sie im Gefäßbett gehalten und zur Niere transportiert werden. Bei Hypoalbuminämie im Rahmen des nephrotischen Syndroms diffundiert das Diuretikum in den Extrazellulärraum und wird daher langsamer zur Niere

transportiert. Hinzu kommt, dass albumingebundenes Furosemid im Tubulus inaktiv ist, sodass bei starker Albuminausscheidung ein geringerer diuretischer Effekt eintritt. Deshalb werden Schleifendiuretika bei nephrotischen Patienten in der Regel höher dosiert eingesetzt als bei ödematösen Patienten mit Herzinsuffizienz oder Leberzirrhose [19]. Bei unzureichendem Ansprechen kann zusätzlich ein Thiaziddiuretikum im Sinne einer sequentiellen Nephronblockade appliziert werden. Insbesondere bei Kindern scheint die zusätzliche Gabe von Albumin eine verbesserte Diurese zu bewirken. Es ist erforderlich, bei den betroffenen Patienten auf klinische Zeichen einer Hypovolämie (z. B. Schwäche, kühle Extremitäten oder orthostatische Hypotension) zu achten, da sonst eine Therapie mit Diuretika, die zur Aggravierung der Hypovolämie führen würde, unterbrochen werden muss. In jedem Fall ist eine engmaschige Flüssigkeitsbilanzierung und Elektrolytkontrolle unter Diuretikatherapie indiziert [19].

Zur Reduktion der Proteinurie werden nahezu alle Patienten, insbesondere bei arterieller Hypertonie, zusätzlich mit einem ACE-Inhibitor oder AT<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten behandelt [2, 3, 19]. Dadurch verringern sich der glomeruläre Filtrationsdruck und damit die Albuminurie. Durch diese Behandlung steigt bei diuretikaresistenten Patienten wiederum das Ansprechen auf Diuretika [19]. Eine adäquate Thromboseprophylaxe sowie eine Infektprophylaxe durch Impfung gegen Pneumokokken und Influenzavirus sowie eine frühzeitige antibiotische Infekttherapie sollte in jedem Fall erwogen werden. CSE-Hemmer und cholesterinarme Ernährung sind bei ausgeprägter Hyperlipoproteinämie indiziert [2, 3].

Zusammenfassend stehen für die Therapie des nephrotischen Syndroms bislang nur wenige Optionen zur Verfügung. Problematisch sind insbesondere das unzureichende Ansprechen einiger Patienten auf Diuretika und die Gefahr von Elektrolytentgleisungen und Hypovolämie durch Diuretika, ACE-Hemmer und AT<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten. Die Unzulänglichkeiten in der aktuellen Therapie erfordern deshalb die Erforschung von innovativen Therapiekonzepten mit neuartigen Wirkmechanismen.



## 1.2 Bedeutung von Serinproteasen beim nephrotischen Syndrom

Im Rahmen der massiven Proteinurie beim nephrotischen Syndrom werden vermehrt hochmolekulare Proteine wie z. B. Serinproteasen aberrant in den Primärharn filtriert [20, 21]. Serinproteasen wie beispielsweise Plasmin, Kallikrein, Prostasin, Trypsin, Chymotrypsin, Thrombin und Elastase [20-22], sind proteolytische Enzyme, die die Aminosäure Serin im katalytischen Zentrum enthalten und physiologischerweise an der Regulation verschiedenster Prozesse, wie der Gerinnung, Verdauung oder Inflammation, beteiligt sind. Es wurde gezeigt, dass sie im Tubulussystem aktiviert werden können und dort die Aktivität von Ionenkanälen wie den epithelialen Natriumkanal durch proteolytische Spaltung erhöhen. Entsprechend der Overfill-Theorie wird dadurch die Natrium- und Wasserretention gesteigert [23].

### 1.2.1 Plasmin

Plasminogen (MW: 92 kDa) ist eine hepatisch synthetisierte Serinprotease, die durch den endothelialen t-PA proteolytisch zu Plasmin (MW: 83 kDa) aktiviert wird. Plasmin ist in erster Linie für seine Rolle bei der Induktion der Fibrinolyse im Blutplasma bekannt. Endogen wird Plasmin z. B. durch den hochselektiven Plasmininhibitor  $\alpha_2$ -Antiplasmin gehemmt [24, 25]. Beim nephrotischen Syndrom gelangt Plasminogen nun aberrant ins Tubuluslumen, wo es durch die membranständige Urokinase im distalen Tubulusabschnitt aktiviert wird [1, 21, 26-28]. Plasmin proteolysiert dort die  $\gamma$ -Untereinheit des ENaC und steigert die Natriumrückresorption aus dem Urin [27, 28].

### 1.2.2 Prostasin

Prostasin (MW: 40 kDa) ist eine Serinprotease, die vor allem in der Prostata, aber auch in den Sammelrohren der Niere vorkommt. Dort ist es über einen GPI-Anker an die Plasmamembran gebunden und vermittelt die Spaltung der  $\gamma$ -

Untereinheit des ENaC [29, 30]. Prostasin scheint dabei mit Plasmin zu interagieren. Bei niedrigen Plasminkonzentrationen im Urin ( $< 10 \mu\text{g/ml}$ ) wird die Spaltung wahrscheinlich über Prostasin an dessen spezifischer Schnittstelle vermittelt, während Plasmin in hohen Konzentrationen ( $> 30 \mu\text{g/ml}$ ) unabhängig von Prostasin proteolysiert [31-33].

### 1.2.3 Kallikrein

Kallikreine sind Serinproteasen, die in Gewebs- und Plasmakallikrein unterschieden werden. Gewebskallikrein (MW: 32 kDa) wird in großen Mengen im Kolon und in der Niere gebildet. Seine Aufgabe ist es, inaktive Vorstufen von Gewebshormonen in aktive Kinine umzuwandeln, die eine Rolle bei Inflammation, Schmerzempfindung, Gerinnung, Blutdruckregulation oder als Tumormarker spielen. Wird Gewebskallikrein im renalen Verbindungstubulus in den Urin sezerniert, bewirkt es eine erhöhte Natriumresorption durch Spaltung der  $\gamma$ -Untereinheit des ENaC [34-36].

Plasma-Kallikrein (MW: 88 kDa) entsteht im Blut durch Aktivierung von Plasma-Präkallikrein aus der Leber. Dort nimmt es Einfluss auf die Gerinnung, indem es beispielsweise Plasminogen in Plasmin umwandelt [36]. Auch Plasma-Präkallikrein und aktives Plasma-Kallikrein sind bei nephrotischen Patienten im Urin nachweisbar, jedoch ist bislang unklar, durch welche Protease Präkallikrein im Tubuluslumen aktiviert wird [37].

## 1.3 Inhibition von Serinproteasen

Ein neuartiger Therapieansatz für das nephrotische Syndrom könnte demnach die pharmakologische Hemmung von Serinproteasen im Urin sein. Dazu stehen die Substanzen Aprotinin und Camostat zur Verfügung, die das aktive Zentrum von Serinproteasen hemmen, während Tranexamsäure ein Inhibitor der Konversion von Plasminogen zu Plasmin ist [38, 39].

### 1.3.1 Aprotinin

Aprotinin ist ein kompetitiver Serinproteaseinhibitor, der unter anderem Plasmin, Plasminogenaktivatoren, Plasma- und Gewebekallikrein, Prostasin, Trypsin und Chymotrypsin im aktiven Zentrum blockiert. Das Polypeptid wurde 1930 entdeckt und wird seitdem aus Rinderlungen extrahiert. Aprotinin besteht aus 58 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 6512 Da. Es wird fast ausschließlich renal eliminiert. Über die Hemmung von Plasmin als Vermittler der Fibrinolyse wirkt Aprotinin rasch und führte bei Eingriffen mit Einsatz der Herz-Lungen-Maschine in hoher Dosierung zu einer Reduktion von intra- und postoperativen Blutungsereignissen mit deutlich vermindertem Transfusionsbedarf [40-42]. Es wurde außerdem zur Behandlung von akuten und schweren Pankreatitiden eingesetzt [43].

Aprotinin führt jedoch zu einer erhöhten arteriellen Thromboseneigung [38]. In der prospektiven randomisierten BART-Studie stellte sich eine erhöhte Morbidität und Mortalität unter Aprotinin im Vergleich zu anderen Antifibrinolytika heraus [44]. Mangano et al. [45, 46] zeigten, dass Patienten unter Aprotininbehandlung ein erhöhtes Risiko für Nierenfunktionsstörungen und kardiovaskuläre Ereignisse hatten. Im November 2007 wurde das Medikament wegen Nebenwirkungen vom Hersteller Bayer zurückgezogen, bevor die Zulassung entzogen wurde. Die genauen Mechanismen der Nierenschädigung durch Aprotinin sind bis heute nicht völlig geklärt [44, 47]. Jüngst erfolgte eine Neubewertung der Sicherheitsdaten und ein vorsichtiger Einsatz in selektiven Patientenkollektiven. Die Lizenz wurde schließlich von der Firma Nordic Pharma Group aufgekauft, die Aprotinin nun für eine Neuvermarktung vorbereiten.

### 1.3.2 Camostat

Camostat ist ein synthetischer Serinproteaseinhibitor mit einem Molekulargewicht von 495 Da, das z. B. Plasmin, Prostasin, Kallikrein, Thrombin und Trypsin im aktiven Zentrum hemmt [4]. Camostat wird hepatisch

metabolisiert und dessen Metabolite zu ca. 80 % renal eliminiert [48]. Derzeit kommt es in Japan zur Behandlung von chronischer Pankreatitis und Refluxösophagitis nach Gastrektomie zum Einsatz. Im Tierexperiment wirkte Camostat über eine Verminderung der Proteinurie und Verbesserung der Nierenfunktion nephroprotektiv und antihypertensiv. Inflammation sowie glomeruläre und tubulointerstitielle Schädigungen und eine weitere Progression der Niereninsuffizienz konnten durch Camostat signifikant unterdrückt werden [4, 49, 50]. Als Nebenwirkungen können insbesondere eine hepatische Dysfunktion bzw. Ikterus, Thrombozytopenie oder Hyperkaliämie auftreten [22, 51].

### **1.3.3 Tranexamsäure**

Tranexamsäure ist kein klassischer Serinproteaseinhibitor, da sie im Gegensatz zu den anderen Substanzen die Umwandlung von Plasminogen in aktives Plasmin hemmt. Sie hat ein Molekulargewicht von 157 Da und wirkt antifibrinolytisch, indem sie als Lysinanalogon die Bindungsstelle von Plasminogen an das aktivierende Fibrin reversibel blockiert. Außerdem werden die physiologischen Plasminogenaktivatoren t-PA und u-PA irreversibel gehemmt. Bei parenteraler Applikation wird Tranexamsäure zu ca. 99 %, insbesondere innerhalb der ersten 24 Stunden, renal eliminiert. Derzeit ist sie als Antidot zur Unterbrechung einer fibrinolytischen Therapie (z. B. bei lebensbedrohlichen Blutungen) und zur Prophylaxe und Therapie von Blutungen bei lokaler oder generalisierter Hyperfibrinolyse in Anwendung. Zu den unerwünschten Arzneimittelwirkungen zählen Thromboseneigung, gastrointestinale Beschwerden, Sehstörungen und epileptische Anfälle [24, 38, 52-54].

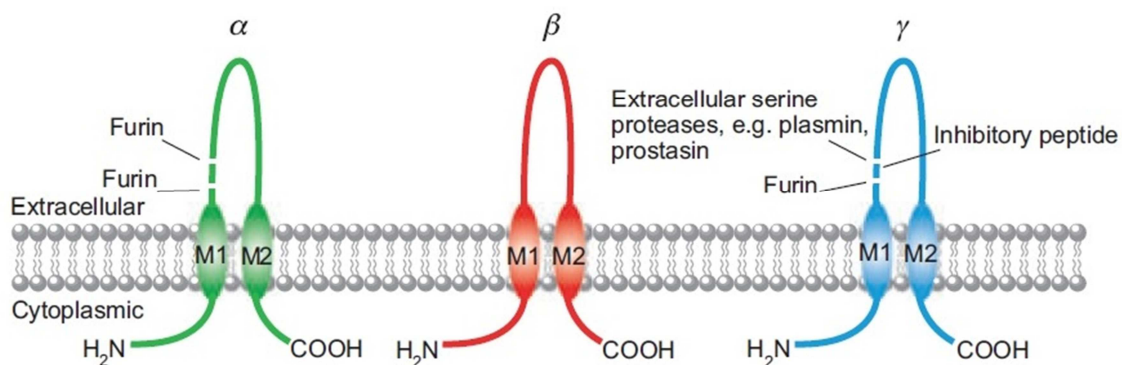
## **1.4 Epithelialer Natriumkanal**

Der im distalen Nephron lokalisierte epitheliale Natriumkanal (ENaC) ist physiologischerweise für die Regulation des Blutdrucks und der

Natriumhomöostase mitverantwortlich. Beim nephrotischen Syndrom wird er durch aberrant filtrierte Serinproteasen aktiviert und kann somit als Ort der Natriumretention angesehen werden [20].

### 1.4.1 Aufbau

Der heterotrimere ENaC setzt sich aus drei nahezu homologen Untereinheiten ( $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit) zusammen, die von drei unterschiedlichen Genloci kodiert werden. Diese Untereinheiten bestehen jeweils aus zwei Transmembrandomänen, die in der apikalen Plasmamembran der renalen Tubuluszellen verankert und durch eine große extrazelluläre Schleife aus ungefähr 450 Aminosäuren verbunden sind. Die kurzen carboxy- und aminoterminalen Enden sind jeweils zytoplasmatisch gelegen (s. Abbildung 1) [21, 55, 56].



**Abbildung 1: Aufbau des epithelialen Natriumkanals**

Die zwei Transmembrandomänen (M1, M2) der drei Untereinheiten ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) des ENaC sind in der apikalen Plasmamembran verankert und jeweils durch extrazelluläre Schleifen miteinander verbunden. Die C- und N-terminalen Enden liegen intrazellulär. Die extrazelluläre Schleife der  $\alpha$ -Untereinheit besitzt zwei Schnittstellen für Furin, die Schleife der  $\beta$ -Untereinheit besitzt keine Schnittstelle und die Schleife der  $\gamma$ -Untereinheit besitzt eine Schnittstelle für Furin und eine für extrazelluläre Serinproteasen [56].

### 1.4.2 Regulation

Grundsätzlich wird die ENaC-Aktivität auf mehreren Stufen reguliert: durch die Anzahl der exprimierten Kanäle an der apikalen Plasmamembran durch Modifikation der Genexpression, Kanalinsertion und -abbau und durch die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals z. B. durch Proteolyse [20, 21].

#### 1.4.2.1 Regulation über die Proteinbiosynthese

Die Genexpression des Kanals wird durch das Steroidhormon Aldosteron stimuliert. Aldosteron wird als Antwort auf ein vermindertes Plasmavolumen, eine erhöhte Kaliumkonzentration oder eine erniedrigte Natriumkonzentration im Plasma in der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde produziert. Durch die Bindung von Aldosteron an den intrazellulären Mineralokortikoidrezeptor wird dieser aktiviert, der Komplex bindet an das nukleäre hormonresponsive Element (HRE) und initiiert die Transkription des  $\alpha$ ENaC-Gens [21, 57]. Diese findet physiologischerweise seltener statt als die Transkription des  $\beta$ ENaC- und  $\gamma$ ENaC-Gens und ist damit limitierend [58]. Auch die aldosteroninduzierbare Serum- und Glukokortikoid-regulierte Kinase (SGK-1) erhöht die Syntheserate des  $\alpha$ ENaC durch Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Af9. Das Hormon Vasopressin wird aus der Neurohypophyse bei Hyperosmolalität oder Hypovolämie ausgeschüttet und erhöht die Expressionsrate des  $\beta$ ENaC- und  $\gamma$ ENaC-Gens [59].

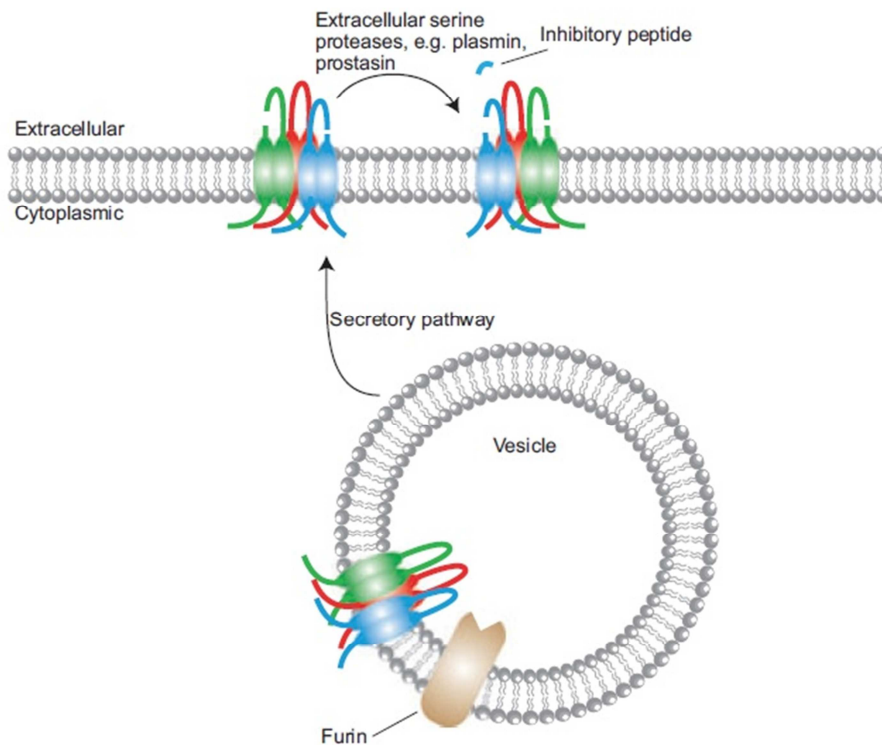
Der Kanalabbau aus der apikalen Plasmamembran wird über das Ubiquitin-Ligase-Protein Nedd4-2 vermittelt. Durch die Ubiquitinierung der N-terminalen Lysingruppen der  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Untereinheit wird die Internalisierung des ENaC gesteigert. Dieser Mechanismus wird über die Phosphorylierung von Nedd4-2 durch die SGK-1 herunterreguliert, was wiederum durch Aldosteron induziert wird [13, 21, 26, 60]. Vasopressin vermittelt über die Proteinkinase A ebenfalls eine hemmende Wirkung auf Nedd4-2 durch Phosphorylierung [59].

#### 1.4.2.2 Regulation über die Offenwahrscheinlichkeit

Die wirksamste Möglichkeit, die Kanalaktivität zu steigern, ist die Erhöhung seiner Offenwahrscheinlichkeit. Die Mehrzahl der eingebauten Kanäle liegt zunächst in einem nahezu geschlossenen bzw. inaktiven Zustand vor. Scherbewegungen durch erhöhte intratubuläre Flüssigkeitsbewegungen erhöhen mechanisch die Offenwahrscheinlichkeit des ENaC [21]. Es konnte beobachtet werden, dass Aldosteron und Vasopressin eine gesteigerte

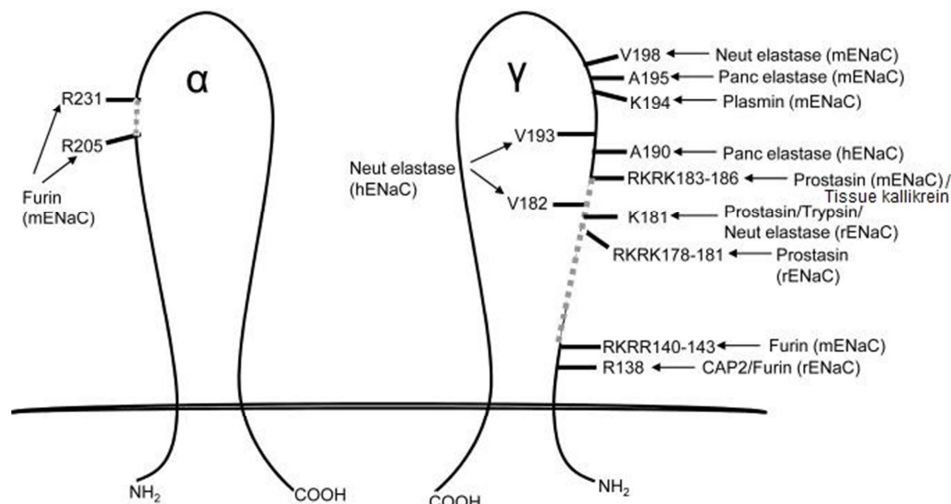
Proteolyse der  $\gamma$ -Untereinheit bewirken [59], während eine erhöhte intrazelluläre Natriumkonzentration die Proteolyse der  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Untereinheit hemmt [26]. Aber auch durch die proteolytische Spaltung des ENaC durch Serinproteasen erhöht sich dessen Offenwahrscheinlichkeit. Die zweifache Spaltung im proximalen Teil der späteren extrazellulären Domänen der  $\alpha$ - oder  $\gamma$ -Untereinheit erhöht die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals durch Wegfall eines inhibitorischen Peptids. Die  $\alpha$ -Untereinheit kann an zwei unterschiedlichen Schnittstellen (Aminosäure 205 und 231) durch die intrazelluläre Protease Furin im Sinne einer posttranslationalen Modifikation gespalten werden, wodurch der Kanal moderat aktiviert wird. Das wegfallende inhibitorische Peptid besteht dabei aus 26 Aminosäuren. Die maximale Kanalaktivierung wird durch die zusätzliche Spaltung der  $\gamma$ -Untereinheit durch Furin und durch eine extrazelluläre Protease an einer davon distal gelegenen Schnittstelle erreicht (s. Abbildung 1 & Abbildung 2). Das wegfallende inhibitorische Peptid besteht dabei je nach Protease aus mindestens 43 Aminosäuren [26-28, 55, 61].

Bisher konnten diverse Serinproteasen identifiziert werden, die die  $\gamma$ -Untereinheit distal der Furinschnittstelle proteolysieren (s. Abbildung 3): die membrangebundenen Proteasen Protsasin („CAP1“) [22], TMPRSS4 („CAP2“) und Matriptase („CAP3“), sowie die löslichen Proteasen Plasmin, Trypsin, Chymotrypsin [21], Kallikrein [35] und neutrophile/pankreatische Elastase [26, 27, 33, 62, 63].



**Abbildung 2: Proteolytische Aktivierung des epithelialen Natriumkanals**

Die Steigerung der Kanalaktivität erfolgt durch Proteolyse der extrazellulären Schleifen der  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Untereinheit. Die Proteolyse durch Furin erfolgt intrazellulär im Rahmen der posttranslationalen Proteinmodifikation. Die extrazelluläre Proteolyse der  $\gamma$ -Untereinheit erfolgt durch extrazelluläre Proteasen (z. B. Plasmin oder Prostatin) distal der Furinschnittstelle. Nach zweimaligem Schneiden der Schleife wird ein inhibitorisches Peptid freigesetzt, wodurch der Kanal maximal aktiviert wird [56].



**Abbildung 3: Lokalisation der Schnittstellen in der  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Untereinheit des ENaC**

links:  $\alpha$ -Untereinheit des ENaC, zwei Furinschnittstellen (Aminosäure 205 und 231); rechts:  $\gamma$ -Untereinheit des ENaC, eine Schnittstelle für Furin und mögliche Schnittstellen für neutrophile Elastase, Plasmin, Prostatin, Gewebekallikrein, Trypsin und CAP2 (TMPRSS4); Buchstaben: Buchstabencode für Aminosäuren, an denen sich die Schnittstelle befindet, Zahl: Stelle im Protein, an der proteolytisch geschnitten wird, mENaC: Nachweis im ENaC der Maus, hENaC: Nachweis im ENaC des Menschen, rENaC: Nachweis im ENaC der Ratte [36, 62]



### 1.4.2.3 Pharmakologische Angriffspunkte

Auch pharmakologisch kann direkter Einfluss auf die ENaC-Aktivität genommen werden. Kaliumsparende Diuretika, wie Amilorid, das strukturgleiche aber höherpotente Benzamil oder das strukturdifferente Triamteren wirken über eine reversible direkte ENaC-Blockade innerhalb der Kanalpore [64]. Amilorid bewirkt außerdem eine potente Hemmung der tubulusständigen Urokinase [27]. Bei nephrotischen Ratten konnte daher die gesteigerte Natriumretention und die Gewichtszunahme durch Amilorid normalisiert werden [15]. Im klinischen Alltag werden kaliumsparende Diuretika bei kardialen, hepatogenen und nephrogenen Ödemen oder bei arterieller Hypertonie eingesetzt [64]. Amilorid birgt dabei die Gefahr von Hyperkaliämie sowie gastrointestinalen Nebenwirkungen und ist bei schwerer Niereninsuffizienz (GFR < 30 ml/min) kontraindiziert [52].

Mineralokortikoidrezeptorantagonisten, wie Spironolacton, Eplerenon oder Kaliumcanrenoat, verhindern die hormonelle ENaC-Stimulation durch intrazelluläre Blockade des Mineralokortikoidrezeptors und werden deshalb bei arterieller Hypertonie, primärem Hyperaldosteronismus, therapierefraktären Ödemen oder Aszites eingesetzt [65]. Als Nebenwirkungen sind ebenfalls Hyperkaliämien und gastrointestinale Beschwerden bekannt. Bei schwerer Niereninsuffizienz dürfen sie nicht verabreicht werden. Die langfristige Therapie mit Spironolacton ist oft durch seine endokrinen Nebenwirkungen wie z. B. Gynäkomastie oder Hirsutismus limitiert [52].

## 1.5 Fragestellung der Dissertation

Für die Behandlung des nephrotischen Syndroms existieren derzeit nur wenige, vorwiegend symptomatische Optionen, die insbesondere auf die Ausschwemmung von bestehenden Ödemen durch Steigerung der Diurese abzielen und durch hohe Nebenwirkungs- und Resistenzraten gekennzeichnet sind.

Seit einigen Jahren verändert sich das Verständnis für die Entstehung der Volumenretention beim nephrotischen Syndrom, welche bei einem großen Patientenkollektiv wahrscheinlich durch die primäre Überaktivierung des epithelialen Natriumkanals der Niere vermittelt wird. Ursächlich für die pathologische Kanalaktivierung scheinen Serinproteasen zu sein, die beim nephrotischen Syndrom als Bestandteil der Proteinurie aberrant filtriert werden. Die Hemmung der Serinproteaseaktivität im Urin beim nephrotischen Syndrom könnte einen innovativen Therapieansatz darstellen. Dadurch wäre es möglich, das derzeitige schmale und nebenwirkungsreiche Therapiespektrum um eine bereits klinisch eingesetzte Medikamentengruppe mit neuartigem Wirkmechanismus zu erweitern.

Ziel dieser Arbeit war es, den Effekt einer pharmakologischen Hemmung der Serinproteaseaktivität im Urin beim nephrotischen Syndrom zu untersuchen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

Tabelle 1: Material – Verbrauchsmaterialien für Probenaufbereitung, Messungen und Tierexperimente

Verbrauchsmaterial	Hersteller
$\alpha_2$ -Antiplasmin, Human Plasma, 100 $\mu$ g	Calbiochem
Acetylen	Westfalen AG
Ampuwa, 100 ml	Fresenius Kabi Deutschland GmbH
Aqua dest.	Stadtwerke Tübingen
BD Micro-Fine™ + Demi Insulinspritzen U100 0,5 ml 0,3 x 8mm	Seidel Medipool GmbH
BD Microlance™ 3 (25 G 1")	Becton Dickinson
Bepanthen Augen- und Nasensalbe	Bepanthen
Blutgas-Kapillaren Na-hep 280 $\mu$ l	Hirschmann
BRANDplates® Strip Plate 12x8 puregrade	Brand
Cellstar® Tubes 15 ml	greiner bio-one
Cellstar® Tubes 50 ml	greiner bio-one
Chloroform reinst, 200 ml	Merck KGaA
Citra-Lock™ 4 %, 5 ml	Dirinco B. V.
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS), 500 ml	Sigma-Aldrich
Eppendorf Combitips® plus 2,5 ml	Eppendorf
epT.I.P.S.® Standard Pipettenspitzen (50 – 1000 $\mu$ l)	Eppendorf
Ethanol 70 %	Universitätsapotheker Tübingen
Ethilon*II 5-0 Nahtmaterial	Ethilon
Falcon® 10 ml Serological Pipet	Corning Incorporated
Falcon® 25 ml Serological Pipet	Corning Incorporated
Flüssigstickstoff	Westfalen AG
Hämatokrit-Kapillaren Na-hep 75 $\mu$ l	Hirschmann
Kompressen, steril (7,5 x 7,5 cm)	Hartmann AG
Lithium Stammlösung 500 mmol/l	biorep GmbH
minicaps® Einmal-Kapillarpipetten Na-hep 10 $\mu$ l	Hirschmann
Peha-soft® nitrile white puderfreie Untersuchungshandschuhe, Gr. S	Hartmann AG
Pipettenspitzen Standard MIKRO (0,5 – 10 $\mu$ l)	Carl Roth
Plasmin	Calbiochem
ratiolab® Pipettenspitzen gelb (1 – 200 $\mu$ l)	Ratiolab GmbH
Reaction tubes 1,5 ml	greiner bio-one

Reaction tubes 2 ml	greiner bio-one
Reagiergefäß 0,5 ml	Sarstedt
Reiniger D	biorapid GmbH
Sauerstoff	Linde AG
sensiva® skin care wash lotion	Schülke
Serum-Standard	biorapid GmbH
Softasept® N	Braun
Sterican® Einmal-Injektionskanülen (20 G 1½")	Braun
Sterillium® classic pure 500 ml	BODE Chemie GmbH
System-Leerwertlösung	biorapid GmbH
Urin-Standard	biorapid GmbH
UV-Küvetten 70 µl mikro, Zentrumshöhe 8,5 mm, Schichtdicke 1 cm	Brand
Wattestäbchen	dm

Tabelle 2: Material – Materialien für Tierhaltung

Material	Hersteller
Fein Zucker	Südzucker AG
Käfige Typ II (L)	Ehret GmbH
Leitungswasser	Stadtwerke Tübingen
LIGNOCEL® Einstreu	JRS
rotes Maushäuschen	Ehret GmbH
ssniff 9988, Standarddiät, Natriumgehalt: 0,24 % ≈ 104 µmol/g	ssniff Spezialdiäten GmbH

Tabelle 3: Material – Geräte und Computerprogramme

Gerät/Maschine	Hersteller
ALT 100-4M Analysenwaage	Kern
Biofuge 13	Heraeus Instruments
Biomate 3S Spectrophotometer	Thermo Scientific
Dräger Vapor® 2000 – Isoflurane	Dräger
Dual-Timer C5080	TFA
EFUX 5057 Flammenphotometer	Eppendorf
ELx800 Absorptionsreader für Mikrotiterplatten	BioTek
Eppendorf Multipette	Eppendorf
Eppendorf Research® plus (0,1 µl – 2,5 µl) Pipette	Eppendorf
Eppendorf Research® plus (0,5 µl – 10 µl) Pipette	Eppendorf
Eppendorf Research® plus (10 µl – 100 µl) Pipette	Eppendorf
Eppendorf Research® plus (100 µl – 1000 µl) Pipette	Eppendorf
Eppendorf Research® plus (2 µl – 20 µl) Pipette	Eppendorf
Eppendorf Research® plus (20 µl – 200 µl) Pipette	Eppendorf
Gefrierschrank -20 °C	
Gefrierschrank -80 °C	

GEM® Premier 3000	Instrumentation Laboratory
GeneQuant pro Spectrophotometer	Pharmacia
Hybridisation Oven/Shaker	Amersham Biosciences
Liebherr Comfort Kühlschrank 2-8 °C	Liebherr
neoAccupette 3-9905	neoLab Migge
Plattenschüttler	
Secuflow-Niedrigraum-Abzug	mc6 Das Laborsystem
SPECTRAFluor Fluoreszenz- und Absorptionsreader für Mikrotiterplatten	Tecan
Spritze GASTIGHT # 1001	Hamilton
VX100 Vortexmischer, ABiMED	Labnet

Tabelle 4: Material – Medikamente und andere Substanzen zur Applikation im Tierversuch

Medikament/Substanz	Hersteller
Aprotinin Powder, Lyoph., 1 g (6000 KIU/mg)	DSM
Camostat Mesilate (FOY-305), 4 g	Ono Pharmaceuticals Co., LTD.
Custom Pellets 14-day release (Cat. No. X-999)	Innovative Research of America
DOXO-cell® 10 mg Injektionslösung	cellpharm GmbH
FITC-Inulin	
Isofluran CP® 1ml/ml	cp-pharma
MCT-Öl (BergaBest 60/40 ®)	Sternchemie GmbH & Co. KG
Placebo Pellets 14-day release (Cat. No. C-111)	Innovative Research of America
Polyglycerol-polyricinoleate (PGPR 90)	Dansico
Span 80	Sigma-Aldrich
trans-4-(Aminomethyl)cyclohexanecarboxylic acid; tranexamic acid 97%, 50 g	Sigma-Aldrich

Tabelle 5: Material – Kits/Reagenzien

Kit/Reagenz	Hersteller
Albumin from mouse serum lyoph.	Sigma-Aldrich
Aldosteron ELISA – enzyme immunoassay for the direct quantitative determination of Aldosteron in human serum (Katalog-Nr. DB52001)	IBL INTERNATIONAL GMBH
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad Laboratories GmbH
Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit For Aprotinin (AP) (Product No. CEA968Po)	Cloud-Clone Corp.
LT-SYS® Creatinin, mod. nach Jaffé, kinetisch, ohne Enteiweißung (LT-CR 0121)	Labor + Technik EBERHARD LEHMANN GmbH

LT-SYS® Harnstoff, UV, kinetisch (LT-UR 0010)	Labor + Technik EBERHARD LEHMANN GmbH
MICROFLUORAL™ Mikroalbumin-Test, fluorometrisch (Katalog-Nr. PR2005)	PROGEN Biotechnik GmbH
Mouse Plasminogen Total Antigen ELISA Kit (Katalog-Nr. MPLGKT-TOT)	Molecular® Innovations
S-2251™, 25 mg	Chromogenix

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Versuchstiere und Tierhaltung

Die Tierexperimente wurden an Wildtypmäusen des Stammes 129 S1/SvImJ (Herkunft der Gründertiere: The Jackson Laboratory, USA) im Alter von circa acht Monaten durchgeführt. Die Mäuse wurden jederzeit unter Standardbedingungen bei einer Raumtemperatur von 22 – 24 °C, einer Luftfeuchtigkeit von 45 – 55 % und einem 12:12-Stunden Hell-Dunkel-Zyklus in Typ II- und Typ II L-Käfigen gehalten. Die Tiere hatten jederzeit uneingeschränkten Zugang zu Leitungswasser und Futter.

Die durchgeführten Versuche wurden vom Regierungspräsidium Tübingen unter der Versuchsnummer M5/13 genehmigt. Alle Versuche wurden gemäß dem deutschen Tierschutzgesetz vom 13. Juli 2013 sowie allen weiteren rechtlichen Vorgaben durchgeführt.

### 2.2.2 Studienaufbau

Der experimentelle Teil der Studie gliederte sich in vier Phasen. Zunächst wurden Induktion und Verlauf des verwendeten nephropathischen Mausmodells untersucht. Anschließend wurde die Serinproteaseaktivität im Urin nephrotischer Mäuse und die Möglichkeit ihrer pharmakologischen Inhibition *in vitro* getestet. In der dritten Phase wurde eine Dosisfindung zur *in vivo*-Inhibition der Serinproteaseaktivität im Urin durchgeführt und schlussendlich die

Auswirkungen einer *in vivo*-Inhibition auf die Entwicklung des nephrotischen Syndroms untersucht.

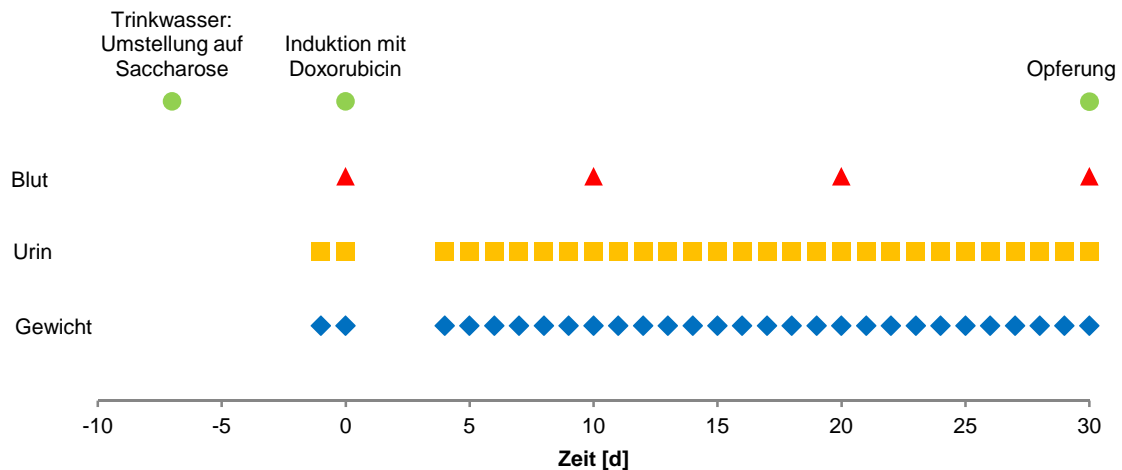
### 2.2.3 Versuchsablauf und Probengewinnung

Die Induktion der Nephropathie erfolgte durch einmalige intravenöse Injektion einer Doxorubicin-Lösung in einer gewichts- und geschlechtsadaptierten Dosierung (♂: 7,25 µl/g KG; ♀: 6,80 µl/g KG) mittels einer 30G-Kanüle in den linken retrobulbären Venenplexus unter tiefer Isofluran-Narkose.

Das Gewicht der Mäuse wurde täglich morgens bei entleerter Blase erhoben. Futter- und Trinkmenge der Mäuse wurden kontrolliert, um Gewichtsschwankungen in Folge einer möglichen Inappetenz zu überwachen. Der Urin der Mäuse wurde morgens als Spontanurin gewonnen. Als Kontrollurin diente dabei der Urin, der am Tag vor und am Tag der Doxorubicininjektion gewonnen wurde. Alle zehn Tage wurde eine Blutentnahme durchgeführt. Um die Trinkmenge und damit die Urinmenge für die Messungen ausreichend hoch zu halten, wurde das Trinkwasser ab dem siebten Tag vor Modellinduktion mit Saccharose (Massenanteil 5 %) versetzt. Nach Versuchsende wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet.

#### 2.2.3.1 Versuchsablauf Nephropathiemodell: Untersuchung des nephropathischen Mausmodells

Der zeitliche Ablauf der Versuchsserien zur Untersuchung des nephropathischen Mausmodells sah folgendermaßen aus:



**Abbildung 4: Versuchsablauf Nephropathiemodell**

grüner Kreis: Umstellung auf saccharosehaltiges Trinkwasser, Modellinduktion mit Doxorubicin, Opferrung; rotes Dreieck: Blutabnahme; gelbes Quadrat: Uringewinnung; blaue Raute: Gewichtserhebung

Zur Untersuchung des nephropathischen Mausmodells wurden die Tiere über 30 Tage hinweg beobachtet. Die Gewichtserhebung und Uringewinnung erfolgte täglich und die Blutabnahme alle zehn Tage. Am Ende der Serie wurden die Tiere geopfert.

#### 2.2.3.2 Versuchsablauf Intervention: subkutane Applikation von Serinproteaseinhibitoren

In diesen Versuchen wurden die Serinproteaseinhibitoren Aprotinin, Camostat und Tranexamsäure nephrotischen Tieren durch subkutane Injektion appliziert. Die drei Inhibitoren wurden jeweils in PBS gelöst. 5  $\mu$ l/g KG wurden an Tag 7 und 8 nach Modellinduktion morgens nach der ersten Uringewinnung mittels einer 30G-Kanüle in das subkutane Fettgewebe injiziert. Vier Stunden danach wurde erneut Spontanurin gesammelt. Zur Dosisfindung der Inhibitoren trugen die Erkenntnisse aus den erhobenen *in vitro*-Inhibitionskurven bei (s. Abbildung 20).



Tabelle 6: Subkutan injizierte Menge [ $\mu\text{g/g KG}$ ] der gelösten Inhibitoren

Inhibitor	injizierte Menge an Tag 7 [ $\mu\text{g/g KG}$ ]	injizierte Menge an Tag 8 [ $\mu\text{g/g KG}$ ]
Aprotinin	6	12
Camostat	60	120
Tranexamsäure	200	400

Diese Versuchsserien dienten der weiterführenden Dosisfindung für die verwendeten Inhibitoren. Hierzu wurde *in vivo* der Effekt der Inhibitoren auf die Serinproteaseaktivität im Urin bei nephrotischen Tieren untersucht.

#### 2.2.3.3 Versuchsablauf Intervention: intraperitoneale Applikation von emulgierten Serinproteaseinhibitoren

Um die Halbwertszeiten der einzelnen Inhibitoren zu verlängern und dadurch ein schnelles Abfallen der Wirkspiegel zu verhindern, wurden die drei Inhibitoren in Form von Emulsionen in die Peritonealhöhle injiziert. Das Herstellungsverfahren für die Wasser-in-Öl-Emulsion war für Aprotinin bereits beschrieben [66, 67]. Durch die Verabreichung der hydrophilen Medikamente über eine Wasser-in-Öl-Emulsion bilden die Öl- und Surfactantschicht eine Freisetzungsbarrriere. Dadurch werden die Medikamente nach einmaliger intraperitonealer Injektion über ein Zeitintervall von bis zu vier Tagen ins Blutplasma abgegeben. Die maximalen Plasmaspiegel wurden 10 min und 12 h nach der Injektion gemessen. Sie waren bis vier Tage nach Injektion hoch und fielen dann allmählich ab [66].

Gemäß dieser Vorlage dienten in dieser Studie MCT-Öl als ölige Phase und PGPR 90 und Span 80 als Emulgatoren. Die in PBS gelöste zu emulgierende Substanz (wässrige Phase) wurde unter ständigem Rühren der öligen Phase und Emulgatoren mittels Magnetrührer tropfenweise hinzugegeben. Es entstand eine milchige trübe Emulsion, die bei 4 °C gelagert wurde.

Tabelle 7: Substanzen, deren Massenanteil [%] und Funktion für die Herstellung einer Wasser-in-Öl-Emulsion

Substanz	Massenanteil [%]	Funktion
MCT-Öl	65,5	ölige Phase
PGPR 90	3,5	Emulgator
Span 80	1	Emulgator
PBS mit zu emulgierender Substanz	30	wässrige Phase

Zur Untersuchung der Freisetzungskinetik der Emulsion wurde zunächst eine Emulsion mit FITC-Inulin hergestellt, die gesunden Tieren einmalig intraperitoneal injiziert wurde. Durch die Markierung des Inulins mit FITC konnte das ausgeschiedene Inulin im Urin fluorometrisch detektiert werden.

FITC-Inulin ähnelt dem Aprotinin in seiner Molekulargröße ( $MW_{\text{Aprotinin}}$ : 6512 g/mol;  $MW_{\text{Inulin}}$ : 5000 g/mol) und insbesondere seiner *in vitro*-Freisetzungskinetik [68, 69]. So konnte die erstellte Eliminationskinetik für FITC-Inulin Aufschluss über die Kinetik der verwendeten Inhibitoren geben. Zur Dosisfindung der Inhibitoren trugen die Erkenntnisse aus den erhobenen *in vitro*-Inhibitionskurven (s. Abbildung 20) und den Versuchen mit FITC-Inulin-Injektionen (s. Abbildung 23) bei.

Für die Injektionen wurde die jeweilige Emulsion zunächst mit der Hand erwärmt und je 200  $\mu\text{l}$  bzw. 400  $\mu\text{l}$  davon mit einer Hamilton-Spritze (25G-Kanüle) intraperitoneal verabreicht.

Tabelle 8: Zu emulgierende Substanzen und deren Konzentration in der wässrigen Phase [mg/ml]

zu emulgierende Substanz	Konzentration in wässriger Phase [mg/ml]
Placebo (Vehikel)	0
FITC-Inulin	30; 60
Aprotinin	100
Camostat	50
Tranexamsäure	100

Die Mäuse der Interventionsserien wurden zufällig in vier Gruppen aufgeteilt. Die Applikation der Emulsionen erfolgte gemäß den Ergebnissen der FITC-Inulin-Vorversuche ab dem vierten Tag nach Modellinduktion alle fünf Tage. In der Kontrollgruppe wurden 400 µl Placeboemulsion injiziert. In den Inhibitorgruppen wurden jeweils 400 µl einer InhibitoremulSION – Aprotinin, Camostat oder Tranexamsäure – appliziert.

Der zeitliche Ablauf der Versuchsserien zur Behandlung Doxorubicin-induzierter Mäuse mit Serinproteaseinhibitoren durch intraperitoneale Injektion von Emulsionen sah folgendermaßen aus:

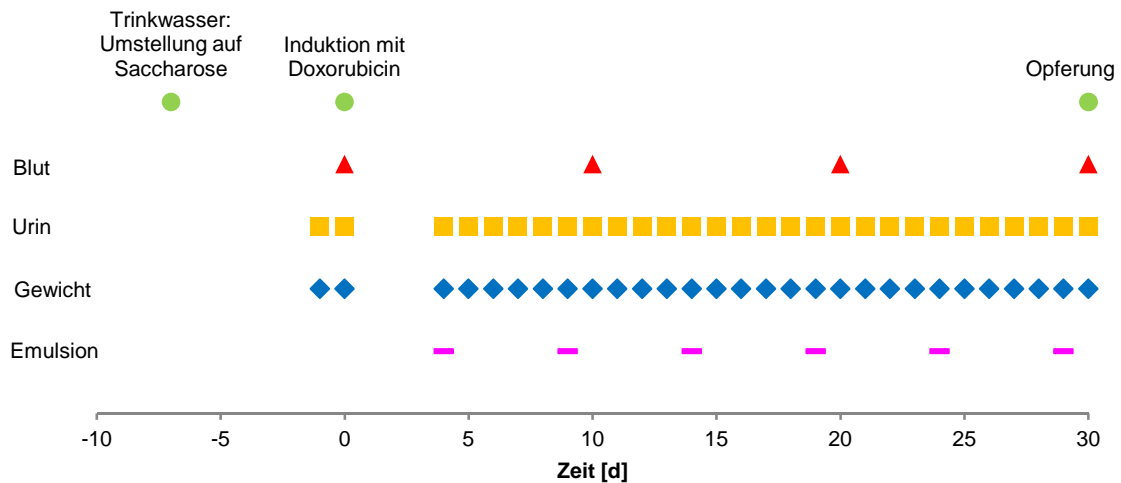


Abbildung 5: Versuchsablauf Intervention – Emulsionsinjektion

grüner Kreis: Umstellung auf saccharosehaltiges Trinkwasser, Modellinduktion mit Doxorubicin, Opferung; rotes Dreieck: Blutabnahme; gelbes Quadrat: Uringewinnung; blaue Raute: Gewichtserhebung; pinker Strich: Emulsionsinjektion

#### 2.2.3.4 Versuchsablauf Intervention: subkutane Implantation von Pellets mit Serinproteaseinhibitoren

Um eine konstantere Freisetzung der Inhibitoren aus ihrem Depot zu gewährleisten und wiederholte Injektionen zu vermeiden, wurden die Interventionsserien mit subkutan implantierten Pellets durchgeführt. Die Pellets enthielten jeweils einen Inhibitor, der an eine Matrix aus Cholesterin, Cellulose, Laktose, Phosphate, Stearate gebunden war. Die konstante Freisetzung der Inhibitoren (Kinetik nullter Ordnung) erfolgte über 14 Tage [70]. Zur

Dosisfindung trugen die Erkenntnisse aus den erhobenen *in vitro*-Inhibitionskurven (s. Abbildung 20) und den Versuchen mit Emulsionsinjektionen (s. Abbildung 24) bei.

**Tabelle 9: Substanzen in maßgefertigten Pellets und deren tägliche Freisetzungsmenge [mg/d] über 14 Tage**

Substanz	Freisetzungsmenge [mg/d]
Placebo (Vehikel)	0
Aprotinin	0,25; 0,5; 1; 2
Camostat	1,5
Tranexamsäure	2

Die subkutane Implantation der Pellets erfolgte am dritten Tag nach Modellinduktion. Dabei wurden unter tiefer Isofluran-Narkose zunächst die Haare medial am Rücken entfernt, die Hautstelle desinfiziert und ein Hautschnitt von ca. 1 cm gesetzt. Danach wurde eine Gewebstasche nach links ventral präpariert, in die das sterile Pellet eingebracht wurde. Der Hautschnitt wurde anschließend durch Einzelknopfnähte verschlossen [70, 71].



**Abbildung 6: Maus nach subkutaner Pelletimplantation**

Ansicht von dorsal; mit Einzelknopfnähten verschlossener Hautschnitt nach Pelletimplantation am dritten Tag nach Modellinduktion. Das Pellet liegt in einer Gewebstasche im Bereich der linken Flanke (Pfeil).

Die Mäuse der Interventionsserien wurden zufällig in vier Gruppen unterteilt. Die Versuche wurden als placebokontrollierte Versuchsserien mit Implantation

eines Placebo-, Aprotinin- (1 mg/d), Camostat- (1,5 mg/d) oder Tranexamsäurepellet (2 mg/d) durchgeführt.

Der zeitliche Ablauf der Versuchsserien zur Behandlung Doxorubicin-induzierter Mäuse mit Serinproteaseinhibitoren durch subkutane Implantation von Pellets sah folgendermaßen aus:

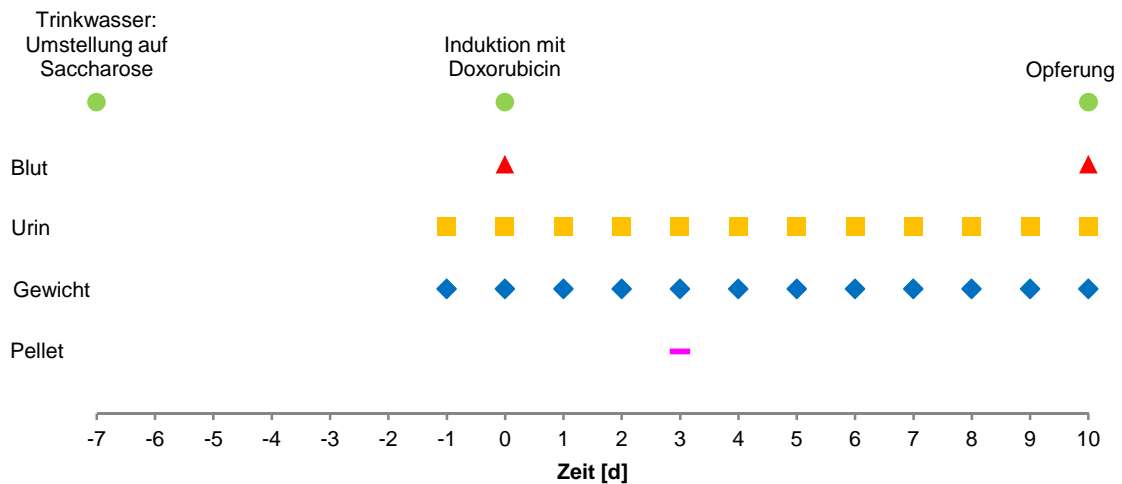


Abbildung 7: Versuchsablauf Intervention – Pelletimplantation

grüner Kreis: Umstellung auf saccharosehaltiges Trinkwasser, Modellinduktion mit Doxorubicin, Opferung; rotes Dreieck: Blutabnahme; gelbes Quadrat: Uringewinnung; blaue Raute: Gewichtserhebung; pinker Strich: Pelletimplantation

## 2.2.4 Messungen

### 2.2.4.1 Blutgasanalysen

Für die Blutgasanalysen wurden am Ende der Versuchsserie ca. 150 µl kapilläres Natrium-Heparin-Blut gewonnen und folgende Parameter direkt im Anschluss mittels BGA-Gerät bestimmt bzw. berechnet: pH; pCO<sub>2</sub>, pO<sub>2</sub> [mmHg]; Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> (pH 7,4), HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Standard-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Base Excess [mmol/l]; Hämatokrit [%]; cHbc (kalkulierte Hämoglobinkonzentration) [g/dl], SO<sub>2</sub>c (kalkulierte Sauerstoffsättigung) [%].

## 2.2.4.2 klinische Chemie – Parameter im Urin

Der Spontanurin wurde durch leichte Massage der Harnblase gewonnen und anschließend bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Wegen diuresebedingter Konzentrationsschwankungen wurden die Konzentrationen der Urinparameter auf die Kreatininkonzentration der Probe normiert.

Kreatininkonzentration im Urin (LT-SYS® Creatinin, mod. nach Jaffé, kinetisch)

Die Kreatininkonzentration im Urin wurde photometrisch gemäß der modifizierten Jaffé-Methode gemessen. Es handelt sich dabei um einen kinetischen Farbttest, bei dem Pikrinsäure im alkalischen Milieu an Kreatinin bindet und einen gelb-orangen Farbkomplex bildet. Die Farbintensität wird photometrisch bestimmt und verhält sich direkt proportional zur Kreatininkonzentration [72, 73].

Vorbereitung:

*Arbeitslösung: 1 Teil Natronlauge (c = 400 mM)/Natriumcarbonat (c = 50 mM), 1 Teil Pikrinsäure (c = 55 mM; DF 4 mit Ampuwa)*

Durchführung:

*Je 10  $\mu\text{l}$  Urin (DF 20 mit Ampuwa), Ampuwa (Leerwert) oder Standard (c = 2,0 mg/dl) mit 200  $\mu\text{l}$  Arbeitslösung in einer Küvette mischen, Extinktion bei  $\lambda = 492\text{ nm}$  nach  $t = 10\text{ sek}$  und  $t = 8\text{ min}$  messen.*

*Berechnung der Kreatininkonzentration:*

$$c_{\text{Kreatinin}} \left[ \frac{\text{mg}}{\text{dl}} \right] = \frac{\Delta E_{\text{Probe}} - \Delta E_{\text{Leerwert}}}{\Delta E_{\text{Standard}} - \Delta E_{\text{Leerwert}}} \times c_{\text{Standard}} \times DF$$

$\Delta E$ : Differenz zwischen Extinktion bei  $t = 8\text{ min}$  und Extinktion bei  $t = 10\text{ sek}$

*untere Nachweisgrenze: 0,03 mg/dl, obere Nachweisgrenze: 300 mg/dl  
Liegt der bestimmte Wert über der oberen Nachweisgrenze, wird die Urinprobe entsprechend mit Ampuwa verdünnt.*

Proteinkonzentration im Urin (Bio-Rad Protein Assay)

Die Proteinkonzentration im Urin wurde photometrisch nach Bradford bestimmt. In saurem Milieu reagiert der braune Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau des Reagenzes (Dye Reagent Concentrate, 450 ml) mit Eiweiß, was einen Umschlag in den blauen Farbbereich bewirkt. Die Farbintensität kann photometrisch bestimmt werden und verhält sich direkt proportional zur Proteinkonzentration [74, 75].

Durchführung:

Je 2 µl Urin oder Aqua dest. (Leerwert) mit 1 ml Reagenz (DF 5 mit Aqua dest.) in einer Küvette mischen, 15 min bei Raumtemperatur inkubieren, Extinktion bei  $\lambda = 595 \text{ nm}$  messen.

Berechnung der Proteinkonzentration anhand einer Standardkurve:

$$C_{\text{Protein}} \left[ \frac{\text{mg}}{\text{mg crea}} \right] = \frac{C_{\text{Protein}} \left[ \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right]}{C_{\text{Kreatinin}} \left[ \frac{\text{mg}}{\text{dl}} \right]} \times 100$$

obere Nachweisgrenze: 10 mg/ml

Liegt der bestimmte Wert über der oberen Nachweisgrenze, wird die Urinprobe entsprechend mit Ampuwa verdünnt.

Es gibt keine relevanten Interferenzen mit anderen Verbindungen.

Amidolytische Aktivität im Urin (Chromogenix S-2251™)

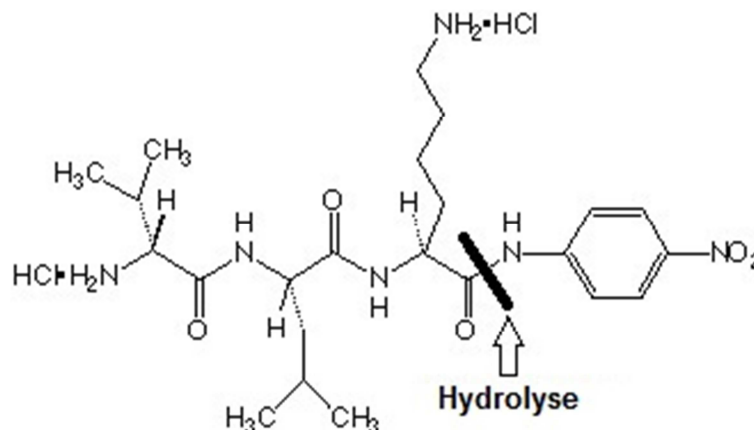
Die amidolytische Aktivität im Urin wurde photometrisch mit Hilfe des chromogenen Substrats S-2251™ (chemische Formel: H-D-Val-Leu-Lys-pNA · 2HCl; MW: 551,6 Da) bestimmt, welches das Vorhandensein von Plasmin und Streptokinase-aktiviertem Plasminogen nachweist [76, 77].

Chromogene Substrate im Allgemeinen sind zumeist synthetisch hergestellte Oligopeptide aus drei bis fünf Aminosäuren. Die Aminosäuresequenz ist über eine Amidbindung am C-terminalen Ende mit einer chromogenen Gruppe verbunden. Diese Bindung kann von Proteasen hydrolysiert und das entstehende Chromophor mit hoher Reproduzierbarkeit photometrisch nachgewiesen werden. Die Aminosäuresequenz bestimmt die Spezifität und Selektivität bezüglich der verschiedenen Substrate. Die Spezifität eines Enzyms

gibt an, wie viele unterschiedliche Substrate es spaltet, während die Selektivität eine Substrateigenschaft ist und angibt, wie gut es durch verschiedene Enzyme gespalten wird. S-2251™ besitzt die größte Selektivität für Plasmin.

Chromogene Substrate dienen nicht nur dazu, die Höhe der Enzymaktivität einer Probe zu messen. Es können dadurch auch die Aktivitäten von Proenzymen (z. B. Plasminogen) oder die Wirkstärken von Inhibitoren (z. B. Antiplasmin) anhand ihrer  $IC_{50}$ -Werte bestimmt und verglichen werden. Die  $IC_{50}$  ist definiert als die Konzentration eines Inhibitors, bei der eine halbmaximale Inhibition erreicht wird [77-79].

Bei der Messung der amidolytischen Aktivität mit S-2251™ macht man sich zu Nutze, dass die Proteasen im Urin die para-Nitroanilin-Gruppe (Chromophor), einen gelben Farbstoff, vom Tripeptid des Substrates abspalten (s. Abbildung 8), der photometrisch quantifiziert werden kann. Die Höhe der Absorptionzunahme ist direkt proportional zur amidolytischen Aktivität der Enzyme [76, 77].



**Abbildung 8: Keilstrichformel für das chromogene Substrat S-2251™**

Konstitutionsformel: H-D-Val-Lys-pNA · 2HCl; markiert ist die Hydrolysestelle zwischen der Aminosäure Lysin und der para-Nitroanilingruppe, die als Chromophor fungiert [80]

**Durchführung in vitro-Inhibitionskurven:**

Je 3  $\mu$ l Urin von nephrotischen Mäusen mit 3  $\mu$ l Ampuwa oder Aprotinin, Camostat, Tranexamsäure bzw. Antiplasmin in aufsteigender Konzentration in eine Mikrotiterplatte pipettieren.

**Durchführung aprotininempfindliche amidolytische Urinaktivität:**

3  $\mu$ l Urin in zweifacher Ausführung in eine Mikrotiterplatte pipettieren, pro Urinprobe 3  $\mu$ l Aprotinin ( $c = 1$  mg/ml) oder Ampuwa hinzupipettieren.



bei beiden Versuchen:

Leerwert: 6 µl Ampuwa, 50 µl chromogenes Substrat S-2251™ (c = 3,022 mM in PBS) in alle Wells hinzugeben, Mikrotiterplatte für t = 60 min bei 37 °C unter sanftem Schütteln inkubieren, Extinktion bei λ = 405 nm messen.

Berechnung der amidolytischen Urinaktivität:

$$\text{amidolytische Aktivität} \left[ \frac{OD \times 1000}{60 \text{ min}} \right] = \frac{(E_{\text{ohne Inhibitor}} - E_{\text{Leerwert}}) - (E_{\text{mit Inhibitor}} - E_{\text{Leerwert}})}{60 \text{ min}} \times 1000$$

Die amidolytische Aktivität der Probe wird nicht auf Kreatinin normiert, da die tatsächliche Aktivität im Tubulus von Interesse ist.

Elektrolytkonzentrationen im Urin

Die Elektrolytkonzentrationen im Urin wurden mit Hilfe eines Flammenphotometers gemessen. Das Prinzip beruht darauf, dass bei der Verbrennung der (Erd-)Alkalimetallionen Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> und Ca<sup>2+</sup> Licht einer jeweils für das Metall spezifischen Wellenlänge emittiert wird und sich dadurch die Flamme, die durch Zündung von Acetylgas entsteht, charakteristisch verfärbt. Die relative Farbsignaländerung verglichen mit der alleinigen Verbrennung von Lithium als Referenz wird photometrisch mit Hilfe von Filtern detektiert und daraus die jeweilige Urinkonzentration berechnet. Sie verhält sich direkt proportional zur Farbsignalintensität der Flamme [81].

Durchführung:

Standardabgleich mit Urinstandard (c<sub>Na</sub> = 143,5 mmol/l, c<sub>K</sub> = 100,0 mmol/l, c<sub>Ca</sub> = 5,00 mmol/l) durchführen, unverdünnte Proben messen.

Bei zu geringer Urinmenge (< 150 µl) oder bei Messwerten außerhalb des Referenzbereiches (Referenzbereich Na<sup>+</sup>: 10,0 – 300,0 mmol/l, K<sup>+</sup>: 5,0 – 200,0 mmol/l, Ca<sup>2+</sup>: 0,50 – 20,00 mmol/l) manuelle Messung durchführen: entsprechende Urinmenge mit Ampuwa auf insgesamt 20 µl verdünnen, mit 1 ml Lithium-Verdünnungslösung mischen, vorlegen.

Berechnung der Elektrolytkonzentrationen:

$$c_{\text{Elektrolyt}} \left[ \frac{\mu\text{mol}}{\text{mg Kreatinin}} \right] = \frac{c_{\text{Elektrolyt}} \left[ \frac{\text{mmol}}{\text{l}} \right]}{c_{\text{Kreatinin}} \left[ \frac{\text{mg}}{\text{dl}} \right]} \times 100 (\times DF)$$

Fluoreszenzintensität von FITC-Inulin in Urin und Plasma

Die fluoreszierende Aktivität von FITC-Inulin in Urin und Citrat-Plasma wurde fluorometrisch bestimmt [82].

Durchführung:

Je 100 µl Probe (DF 33 mit PBS) oder Ampuwa (Leerwert) in eine Mikrotiterplatte pipettieren, Mikrotiterplatte für  $t = 5$  sek im Fluorometer schütteln, Fluoreszenzaktivität mit  $\lambda_{\text{Exzitation}} = 485$  nm bei  $\lambda_{\text{Emission}} = 535$  nm und gain (manuell) = 65 bestimmen.

Berechnung der Fluoreszenzintensität:

$$\begin{aligned} \text{Fluoreszenzintensität}_{\text{FITC-Inulin}} [\text{cpm}] \\ = \text{Fluoreszenzintensität}_{\text{Probe}} - \text{Fluoreszenzintensität}_{\text{Leerwert}} \end{aligned}$$

Die Fluoreszenzintensität von FITC-Inulin wird nicht auf Kreatinin normiert, da die tatsächliche Konzentration im Tubulus von Interesse ist.

## 2.2.4.3 klinische Chemie – Parameter im Plasma

Die Blutabnahme erfolgte durch Punktion des rechten retrobulbären Venenplexus mit einer dünnen Glaskapillare unter kurzer Isofluran-Narkose. Es wurden jeweils 63 µl Vollblut gewonnen und mit 7 µl Citrat versetzt, weshalb die bestimmten Plasmakonzentrationen mit dem Faktor  $\frac{10}{9}$  multipliziert wurden. Bei einer sichtbaren Lipämie wurden die Plasmaproben mit 100 µl Chloroform delipidiert. Alle Plasmaproben wurden anschließend bei -20 °C gelagert.

Albuminkonzentration im Plasma (MICROFLUORAL™ Mikroalbumin-Test, fluorometrisch)

Da Albumin den größten Beitrag zur Aufrechterhaltung des onkotischen Druckes im Gefäß und somit zur Ödementstehung beiträgt [83], wurden die Albuminkonzentrationen anstelle der Gesamtproteinkonzentrationen im Plasma bestimmt. Albumin wurde fluorometrisch im Citrat-Plasma bestimmt. Das Reagenz Albumin Blue 580 (DYE 50x) fluoresziert im ungebundenen Zustand

sehr gering, während es nach Bindung von Albumin stark fluoresziert. Die Signalstärke verhält sich direkt proportional zur Albuminkonzentration [84, 85].

Durchführung:

Standardreihe aus murinem Albumin erstellen, je 25 µl Plasma (DF 100 mit Ampuwa), Standard oder Ampuwa (Leerwert) in eine Mikrotiterplatte pipettieren, mit 150 µl des Albumin Blue 580-Reagenzes (DF 50 mit Verdünnungspuffer) mischen, Mikrotiterplatte für  $t = 5$  sek im Fluorometer kräftig schütteln, relative Fluoreszenz Counts (RFC) mit  $\lambda_{\text{Exzitation}} = 590$  nm bei  $\lambda_{\text{Emission}} = 635$  nm messen. Berechnung der Albuminkonzentration:

$$c_{\text{Albumin}} \left[ \frac{\text{g}}{\text{l}} \right] = \frac{\text{RFC}_{\text{Probe}} - \text{RFC}_{\text{Leerwert}}}{m_{\text{Standardkurve}} \times 1000} \times \text{DF} \times \frac{10}{9}$$

untere Nachweisgrenze: 2 mg/l, obere Nachweisgrenze: 200 mg/l

Liegt der bestimmte Wert über der oberen Nachweisgrenze, wird die Urinprobe entsprechend mit Ampuwa verdünnt.

Es sind keine Interferenzen mit anderen Proteinen oder Medikamenten bekannt.

Harnstoffkonzentration im Plasma (LT-SYS® Harnstoff, UV, kinetisch)

Die Messung der Harnstoffkonzentration erfolgte photometrisch im Citrat-Plasma. Harnstoff wird durch Urease zu Ammoniak und Bikarbonat hydrolysiert. Die Glutamatdehydrogenase (GLDH) katalysiert die nachfolgende Reaktion von Ammoniak,  $\alpha$ -Ketoglutarat und NADH zu L-Glutamat und  $\text{NAD}^+$ . Die Höhe des NADH-Abfalles entspricht der Höhe des Absorptionsabfalls und ist direkt proportional zur Harnstoffkonzentration [86, 87].

Vorbereitung:

Arbeitslösung: Reaktionsenzyme (lyophilisierte Urease und GLDH) in 16 ml Puffer (TRIS-Puffer 100 mM, pH 7,8, Ketoglutarat 6 mM, NADH 0,2 mM, ADP 2 mM, EDTA 4 mM, Stabilisatoren) auflösen.

Durchführung:

Je 3 µl Plasma, Standard ( $c = 40$  mg/dl) oder Ampuwa (Leerwert) mit 300 µl Arbeitslösung in einer Küvette mischen, Extinktion bei  $\lambda = 340$  nm nach  $t = 10$  sek und  $t = 8$  min messen.

Berechnung der Harnstoffkonzentration:

$$c_{\text{Harnstoff}} \left[ \frac{\text{mg}}{\text{dl}} \right] = \frac{\Delta E_{\text{Probe}} - \Delta E_{\text{Leerwert}}}{\Delta E_{\text{Standard}} - \Delta E_{\text{Leerwert}}} \times c_{\text{Standard}} \times DF \times \frac{10}{9}$$

$\Delta E$ : Differenz zwischen Extinktion bei  $t = 8 \text{ min}$  und Extinktion bei  $t = 10 \text{ sek}$

untere Nachweisgrenze: 2 mg/dl, obere Nachweisgrenze: 300 mg/dl.

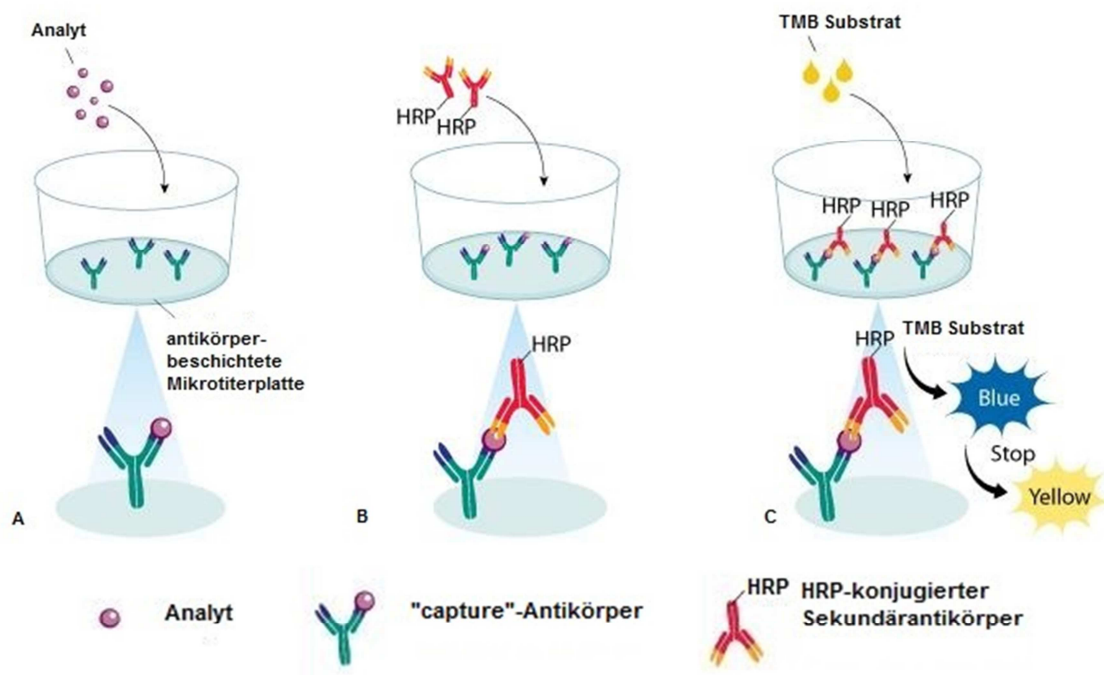
Liegt der bestimmte Wert über der oberen Nachweisgrenze oder bei einem Extinktionsabfall von mehr als 0,800, wird die Plasmaprobe entsprechend mit Ampuwa verdünnt.

Relevante Störfaktoren sind Hämolyse und Lipämie (falsch niedrige Werte).

#### 2.2.4.4 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die Bestimmung der Plasmin(ogen)-, Aldosteron- und Aprotininkonzentrationen erfolgte mittels ELISA. Dabei handelt es sich um ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren auf Grundlage einer enzymatisch katalysierten Farbreaktion. Man unterscheidet dabei nicht-kompetitive von kompetitiven ELISA.

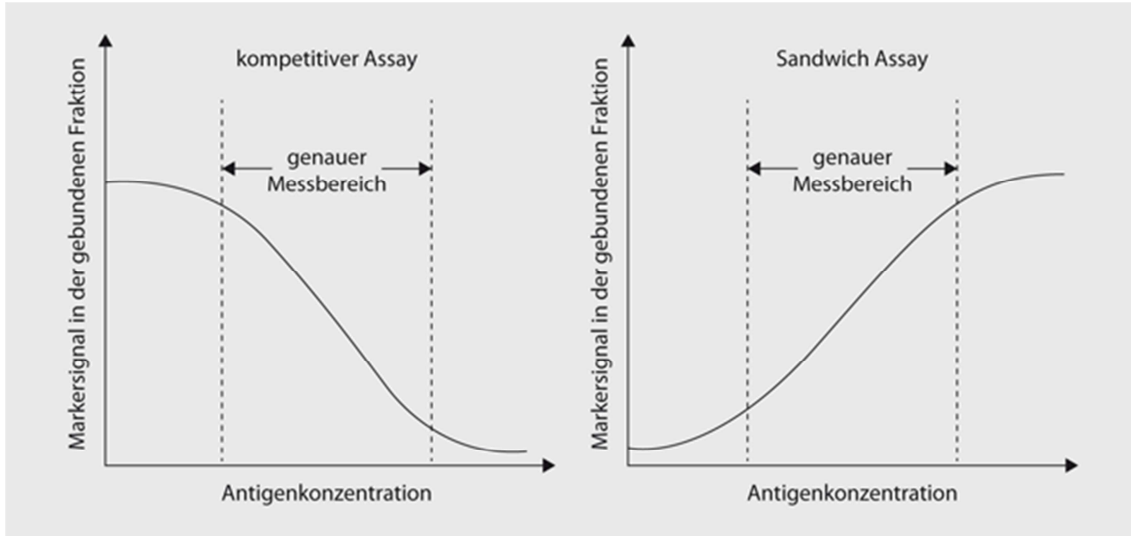
Beim nicht-kompetitiven ELISA bindet der Analyt an einen spezifischen „capture“-Antikörper, mit dem die Mikrotiterplatte beschichtet ist. An diesen Komplex bindet ein Sekundärantikörper, der mit einem Enzym (z. B. HRP) konjugiert ist. Dieses katalysiert die Umsetzung eines hinzugegebenen Substrates (z. B. TMB), wodurch ein Farbumschlag z. B. in den blauen Farbbereich stattfindet. Zwischen den einzelnen Schritten werden die ungebundenen Komponenten jeweils mehrmals ausgewaschen. Durch Zugabe einer Stop-Lösung (z. B. HCl) findet erneut ein Farbumschlag z. B. in den gelben Farbbereich statt und die Reaktion wird angehalten. Die Höhe der Absorption wird photometrisch bestimmt. Diese ist direkt proportional zur Höhe der Analytkonzentration in der Probe [88-90].



**Abbildung 9: Prinzip eines nicht-kompetitiven ELISA**

A: Der Analyt bindet an den „capture“-Antikörper, mit dem die Mikrotiterplatte beschichtet ist. B: An den Analyten bindet der Sekundäntikörper, der mit HRP konjugiert ist. C: TMB-Substrat wird durch die HRP umgesetzt, wodurch es zu einer Blaufärbung kommt. Die Zugabe der Stop-Lösung bewirkt einen Umschlag in den gelben Farbbereich, dessen Absorptionshöhe photometrisch gemessen wird [91].

Beim kompetitiven ELISA soll die Konzentration eines unmarkierten Analyten der Probe gemessen werden. Dieser konkurriert mit einem markierten Analyten (z. B. mit Biotin) um die limitierten Bindungsstellen der spezifischen „capture“-Antikörper, mit denen die Mikrotiterplatte beschichtet ist. Nur an den markierten Analyt bindet ein Enzym (z. B. HRP) über seine konjugierte Markierung (z. B. Avidin). Das Enzym katalysiert die Umsetzung eines hinzugegebenen Substrates (z. B. TMB), wodurch ein Farbumschlag z. B. in den blauen Farbbereich stattfindet. Zwischen den einzelnen Schritten werden die ungebundenen Komponenten jeweils mehrmals ausgewaschen. Durch Zugabe einer Stop-Lösung (z. B. HCl) findet erneut ein Farbumschlag z. B. in den gelben Farbbereich statt und die Reaktion wird angehalten. Die Höhe der Absorption wird photometrisch bestimmt. Diese ist indirekt proportional zur Höhe der Konzentration in der Probe [88, 90, 92].



**Abbildung 10: Vergleich von kompetitivem und nicht-kompetitivem/Sandwich-ELISA**

links: beim kompetitiven ELISA konkurrieren markierte und unmarkierte Antigene (Analyt) um eine begrenzte Anzahl an Antikörpern der Beschichtung. Nur die Konzentration der markierten Antigene kann photometrisch bestimmt werden. Somit verhält sich die Konzentration der unmarkierten Antigene indirekt proportional zur Signalstärke; die Steigung der Standardkurve ist negativ. rechts: beim nicht-kompetitiven ELISA wird das zu bestimmende Antigen direkt gebunden und photometrisch nachgewiesen. Die Signalstärke verhält sich direkt proportional zur Antigenkonzentration; die Steigung der Standardkurve ist positiv. beide: wenn sich das Signal im linearen Bereich der Standardkurven befindet, kann die Antigenkonzentration mit Hilfe der Geradengleichung genau bestimmt werden [93].

### Plasmin(ogen)konzentration in Urin und Plasma (Mouse Plasminogen Total Antigen ELISA Kit)

Die Plasminogen- und Plasminkonzentration in Urin und Plasma wurde mit Hilfe eines nicht-kompetitiven Plasmin(ogen)-ELISA gemessen. Dabei werden Plasminogen, Plasmin und Plasmin-Antiplasmin-Komplexe nachgewiesen [89].

#### Anmerkung:

Bei diesem ELISA wird ein zusätzlicher Primärantikörper zwischen „capture“-Antikörper und Sekundärantikörper gebunden.

#### Vorbereitung:

**Blockpuffer:** TBS-Puffer (0,1 M TRIS, 0,15 M NaCl, pH 7,4) mit 3 % BSA w/v mischen.

**Standardreihe:** Maus-Plasminogen Standard in 1 ml Blockpuffer auflösen ( $C_{\text{Standard}} = 500 \text{ ng/ml}$ ) und daraus Standardreihe durch Zugabe von Blockpuffer herstellen.

**Waschpuffer:** 10 x Waschpuffer mit Aqua dest. verdünnen (DF 10).

**Primärantikörper:** Kaninchen anti-Maus-Plasminogen Primärantikörper in 10 ml Blockpuffer auflösen.

Sekundärantikörper: 2  $\mu$ l anti-Kaninchen-HRP Sekundärantikörper mit 10 ml Blockpuffer mischen.

Durchführung:

Je 100  $\mu$ l Urin (Kontrollurin: DF 50, danach DF 1000 – 100.000 in Blockpuffer), Citrat-Plasma (DF 50.000 in Blockpuffer), Standard oder Ampuwa (Leerwert) in die mit Antikörper (anti-Maus-Plasminogen Antikörper) beschichtete Mikrotiterplatte pipettieren, Mikrotiterplatte bei 300 rpm für  $t = 30$  min bei Raumtemperatur schütteln, Wells dreimal mit je 300  $\mu$ l Waschpuffer waschen, je 100  $\mu$ l Primärantikörper hinzupipettieren, Mikrotiterplatte schütteln und dreimal waschen, je 100  $\mu$ l Sekundärantikörper hinzupipettieren, Mikrotiterplatte schütteln und waschen, je 100  $\mu$ l TMB-Substrat hinzupipettieren, Mikrotiterplatte für etwa eine Minute schütteln bis die Proben ähnlich intensiv blau wie die Standardreihe gefärbt sind, Reaktion sofort durch Zugabe von je 50  $\mu$ l Stop-Lösung (HCl;  $c = 1$  M) anhalten, wodurch ein Umschlag vom blauen in den gelben Farbbereich erfolgt, Extinktion bei  $\lambda = 405$  nm messen.

Berechnung der Plasmin(ogen)konzentrationen in Urin und Plasma anhand der Standardkurve.

Die Plasmin(ogen)konzentration im Urin wird nicht auf Kreatinin normiert, da die tatsächliche Plasmin(ogen)konzentration im Tubulus von Interesse ist.

untere Nachweisgrenze: 0,49 ng/ml, obere Nachweisgrenze: 500 ng/ml

Liegt der bestimmte Wert über der oberen Nachweisgrenze, wird die Probe entsprechend mit Ampuwa verdünnt.

Aldosteronkonzentration im Plasma (Aldosteron ELISA – enzyme immunoassay for the direkt quantitative determination of Aldosteron in human serum)

Die Aldosteronkonzentration im Plasma wurde mit Hilfe eines kompetitiven Aldosteron-ELISA gemessen [94].

Vorbereitung:

Standardreihe: Standard A-F in je 1 ml Aqua dest. auflösen.

Waschpuffer: 40 x Waschpuffer mit 1170 ml Aqua dest. verdünnen (DF 40).

Durchführung:

Je 50  $\mu$ l Lithium-Heparin-Plasma, Standard oder Ampuwa (Leerwert) in die mit Antikörper (anti-Aldosteron Antikörper) beschichtete Mikrotiterplatte pipettieren, je 150  $\mu$ l Enzymkonjugat (Aldosteron-HRP-Konjugat) hinzugegeben und mischen, Mikrotiterplatte für  $t = 60$  min bei Raumtemperatur inkubieren, Wells fünfmal mit je 300  $\mu$ l Waschpuffer waschen, je 200  $\mu$ l TMB-Substrat hinzupipettieren, Mikrotiterplatte für  $t = 30$  min bei Raumtemperatur inkubieren, Reaktion durch Zugabe von je 100  $\mu$ l Stop-Lösung ( $H_2SO_4$ ;  $c = 0,5$  M) anhalten, wodurch ein Umschlag vom blauen in den gelben Farbbereich erfolgt, Extinktion bei  $\lambda = 450$  nm messen.

*Berechnung der Aldosteronkonzentration im Plasma anhand der Standardkurve.*

*untere Nachweisgrenze: 5,7 pg/ml, obere Nachweisgrenze: 1000 pg/ml*

*Liegt der bestimmte Wert über der oberen Nachweisgrenze, wird die Probe entsprechend mit Ampuwa verdünnt.*

*Es besteht eine Kreuzreaktivität mit Tetrahydroaldosteron von 17,3 %.*

*Aprotininkonzentration in Urin und Plasma (Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit For Aprotinin)*

Die Aprotininkonzentration in Urin und Plasma wurde mit Hilfe eines kompetitiven Aprotinin-ELISA gemessen [92].

*Vorbereitung:*

*Standardreihe: Standard in 0,5 ml Standarddiluent auflösen ( $c_{\text{Standard}} = 100$  ng/ml) und daraus Standardreihe durch Zugabe von Standarddiluent herstellen.*

*Detektionsreagenz A (biotin-markiertes Aprotinin): Detektionsreagenz A in 150  $\mu$ l Reagenzienverdünner auflösen und mit Probendiluent A verdünnen (DF 75).*

*Detektionsreagenz B (avidin-konjugierte HRP): Detektionsreagenz B mit Probendiluent B verdünnen (DF 80).*

*Waschpuffer: 30 x Waschpuffer mit Aqua dest. verdünnen (DF 30).*

*Durchführung:*

*Je 50  $\mu$ l Urin (Kontrollurin: DF 5, dann DF 100 – 1000 mit PBS), Lithium-Heparin-Plasma (Kontrollplasma: DF 3, dann DF 30 mit PBS), Standard oder Ampuwa (Leerwert) in die mit Antikörper (anti-Aprotinin Antikörper) beschichtete Mikrotiterplatte pipettieren, je 50  $\mu$ l Detektionsreagenz A hinzugegeben, Mikrotiterplatte schütteln und für  $t = 60$  min bei 37 °C lichtgeschützt inkubieren, Wells dreimal mit je 300  $\mu$ l Waschpuffer waschen, je 100  $\mu$ l Detektionsreagenz B hinzupipettieren, Mikrotiterplatte für  $t = 30$  min bei 37 °C lichtgeschützt inkubieren, fünfmal waschen, je 90  $\mu$ l TMB-Substrat hinzupipettieren, Mikrotiterplatte wird für  $t = 10 - 20$  min bei 37 °C lichtgeschützt inkubieren, Reaktion durch Zugabe von je 50  $\mu$ l Stop-Lösung anhalten, wodurch ein Umschlag vom blauen in den gelben Farbbereich erfolgt, Extinktion bei  $\lambda = 450$  nm messen.*

*Berechnung der Aprotininkonzentration in Urin und Plasma anhand der Standardkurve.*

*Die Aprotininkonzentration im Urin wird nicht auf Kreatinin normiert, da die tatsächliche Aprotininkonzentration im Tubulus von Interesse ist.*

*untere Nachweisgrenze: 0,54 ng/ml, obere Nachweisgrenze: 100 ng/ml.*

*Liegt der bestimmte Wert über der oberen Nachweisgrenze, wird die Probe entsprechend mit Ampuwa verdünnt.*

*Der ELISA weist Aprotinin hochsensitiv und -spezifisch nach. Interferenzen oder Kreuzreaktivitäten mit anderen Substanzen sind nicht bekannt.*



### 2.2.5 Statistische Auswertung

Die Datenauswertung erfolgte mit Hilfe von Microsoft Office Excel 2010 und GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc.).

Bei der Auswertung der Ergebnisse der Interventionsstudien wurden nur die Daten derjenigen Versuchstiere inkludiert, die folgende Kriterien erfüllten: Proteinurie ab Tag 7 – 8 kontinuierlich über  $100 \pm 2$  mg/mg crea als Kontrolle für eine erfolgreiche Modellinduktion, Harnstoffkonzentration im Plasma bis Tag 14 unter 140 mg/dl zum Ausschluss von Tieren mit akutem Nierenversagen, kein okuläres Paravasat bei Doxorubicininjektion und kein verfrühter Todeseintritt durch sonstige Ursachen wie z. B. Harnverhalt.

Die gezeigten Daten werden in Form des arithmetischen Mittels  $\mu$  der Einzelwerte und der jeweiligen Standardfehler ( $\pm$  SEM) dargestellt. Die Anzahl  $n$  ist die Zahl der durchgeführten unabhängigen Experimente. Bezugspunkt aller Zeitangaben ist der Tag der Modellinduktion. Bei der Darstellung der Parameter Gewicht und Natriumkonzentration im Urin wurden die jeweiligen Gewichtsmaxima bzw. Minima der jeweiligen Natriumkonzentrationen im Urin der Einzelverläufe auf einen Tag synchronisiert.

Die Testung sämtlicher Werte auf Normalverteilung erfolgte durch den Kolmogorov-Smirnoff-, D'Adogostino-Pearson- und Shapiro-Wilk-Test.

Die Signifikanzanalyse erfolgte bei normalverteilten Werten mittels Student's t-Test bzw. bei nicht-normalverteilten Werten mittels Mann-Whitney-Test.

Die Varianzanalyse erfolgte bei normalverteilten Werten mittels one-way-ANOVA und Dunnett's multiple comparison test bzw. bei nicht-normalverteilten Werten mittels Kruskal-Wallis-Test und Dunn's multiple comparison test.

Die Signifikanztestung der Kaplan-Meier-Kurven wurde mit dem Log-rank- (Mantel-Cox)-Test durchgeführt.

Zur Berechnung der Korrelation zwischen zwei Parametern wurden der jeweilige Korrelationskoeffizient  $r$  nach Pearson sowie das Bestimmtheitsmaß  $r^2$  herangezogen. Ein  $p$ -Wert  $< 0,05$  wurde als statistisch signifikant definiert.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Verlauf des nephropathischen Mausmodells

Durch eine einmalige Injektion von Doxorubicin wurde bei den Versuchstieren eine Proteinurie ausgelöst. Überschritt die Proteinurie eine Grenze von 120 mg/mg crea an zwei Tagen zwischen Tag 8 und 11 entwickelte sich das Vollbild des nephrotischen Syndroms. Somit konnte die Gruppe mit nicht-nephrotischer Proteinurie (im Folgenden „nicht-nephrotisch“) von der mit nephrotischer Proteinurie (im Folgenden „nephrotisch“) unterschieden werden.

##### 3.1.1 Gewicht

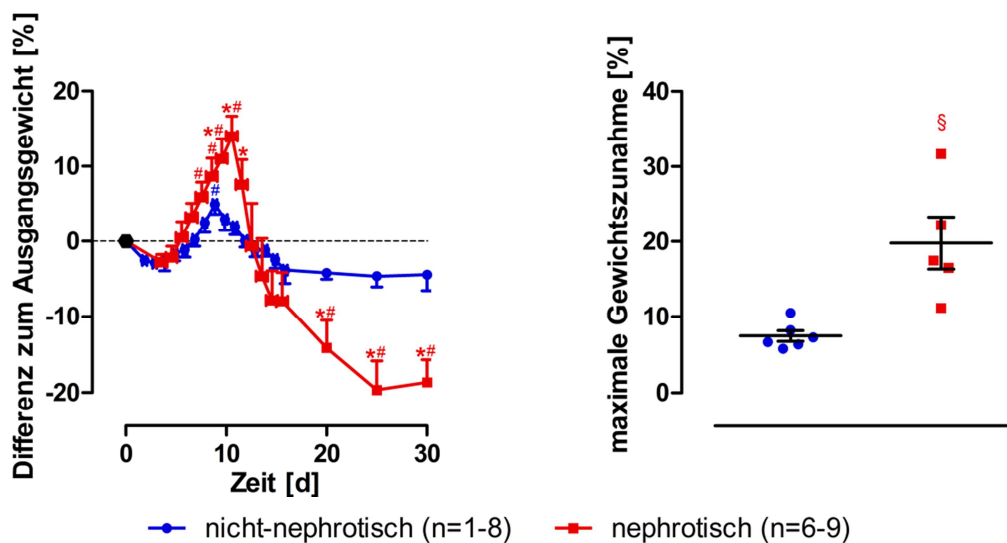
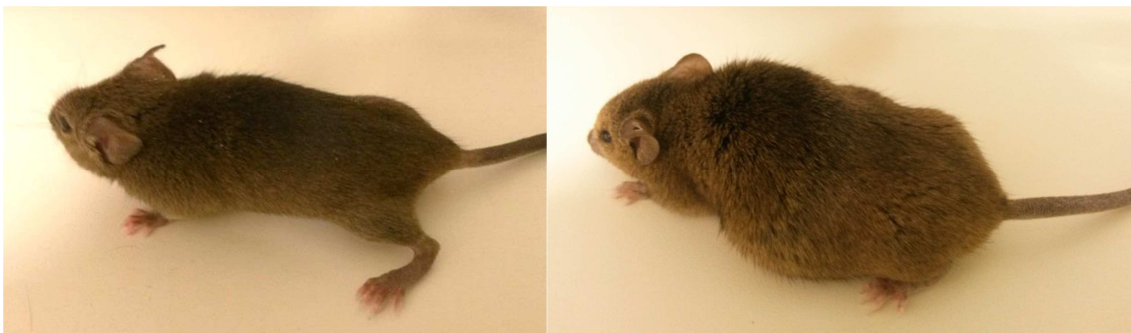


Abbildung 11: Nephropathiemodell – Gewicht

links: zeitlicher Gewichtsverlauf als Differenz zum Ausgangsgewicht (Tag 0) [%]; rechts: maximale Gewichtszunahme zwischen Maximum und vorausgehendem Minimum [%]; \*  $p < 0,05$  zu nicht-nephrotisch desselben Tages; #  $p < 0,05$  zur Kontrolle; §  $p < 0,05$  zu nicht-nephrotisch [95]

Das absolute Gewicht an Tag 0 betrug  $30,2 \pm 1,1$  g. Nach einem anfänglichen Gewichtsabfall von  $2,7 \pm 0,8$  % bis Tag 4 entwickelten beide Gruppen eine Gewichtszunahme. Das Gewichtmaximum wurde in der nephrotischen Gruppe mit Zunahme von  $14,0 \pm 2,6$  % des Ausgangsgewichts an Tag 11 und in der nicht-nephrotischen Gruppe mit Zunahme von  $5,0 \pm 1,3$  % des Ausgangsgewichts an Tag 9 erreicht (s. Abbildung 11, links). Die nephrotische Gruppe zeigte im Studienverlauf eine maximale Gewichtszunahme von  $19,8 \pm 3,5$  %, die nicht-nephrotische Gruppe von  $7,5 \pm 0,7$  %. Somit war der Unterschied in der maximalen Gewichtszunahme signifikant ( $p = 0,004$ ) (s. Abbildung 11, rechts). Anschließend fiel das Gewicht in beiden Gruppen rasch ab, sodass an Tag 13 das Ausgangsgewicht wieder erreicht wurde. Die Tiere verloren bis Tag 30 langsamer aber kontinuierlich weiter an Gewicht, sodass die nephrotische Gruppe bis dahin  $18,7 \pm 3,0$  % und die nicht-nephrotische Gruppe  $4,4 \pm 2,1$  % vom ursprünglichen Ausgangsgewicht verloren hatte (s. Abbildung 11, links).



**Abbildung 12: Nephropathiemodell – Aszites**

links: nicht-nephrotische Maus; rechts: nephrotische Maus mit ausgeprägter Aszitesbildung, insbesondere sichtbar am ausladenden Abdomen

Klinisch imponierten die nephrotischen Mäuse mit einer massiven Einlagerung von Flüssigkeit in Form von Ödemen und Aszites mit ihrem Höhepunkt an Tag 10 und 11. Parallel zum Gewichtsverlauf waren Ödeme und Aszites anschließend komplett rückläufig. Klinische Zeichen einer Volumenretention traten bei den nicht-nephrotischen Mäusen hingegen nicht auf.

## 3.1.2 Natriurese

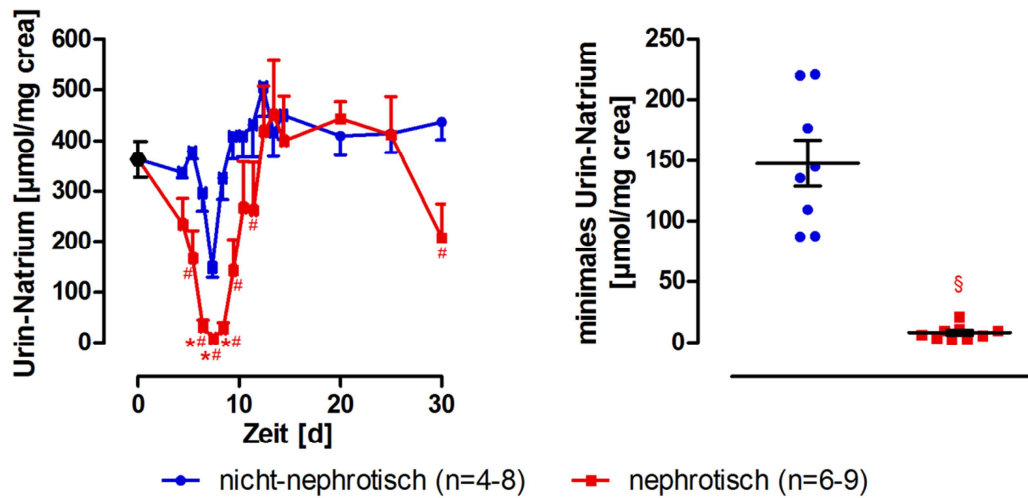


Abbildung 13: Nephropathiemodell – Natriurese

links: zeitlicher Verlauf der Natriumkonzentration im Urin [µmol/mg crea]; rechts: minimale Natriumkonzentration im Urin [µmol/mg crea]; \*  $p < 0,05$  zu nicht-nephrotisch desselben Tages; #  $p < 0,05$  zur Kontrolle; §  $p < 0,05$  zu nicht-nephrotisch [95]

Die Urinnatriumkonzentration an Tag 0 betrug  $362 \pm 36$  µmol/mg crea. Innerhalb von sieben Tagen fiel sie bei den nephrotischen Mäusen auf  $9 \pm 2$  µmol/mg crea ab, während sie bei den nicht-nephrotischen Tieren auf  $148 \pm 19$  µmol/mg crea abfiel (s. Abbildung 13, links). Der Unterschied in der minimalen Natriumkonzentration war signifikant ( $p < 0,0001$ ) (s. Abbildung 13, rechts). In beiden Gruppen folgte auf die Natriumretention eine Phase der gesteigerten Natriurese (s. Abbildung 13, links).

### 3.1.3 Proteinurie und Plasma-Albumin

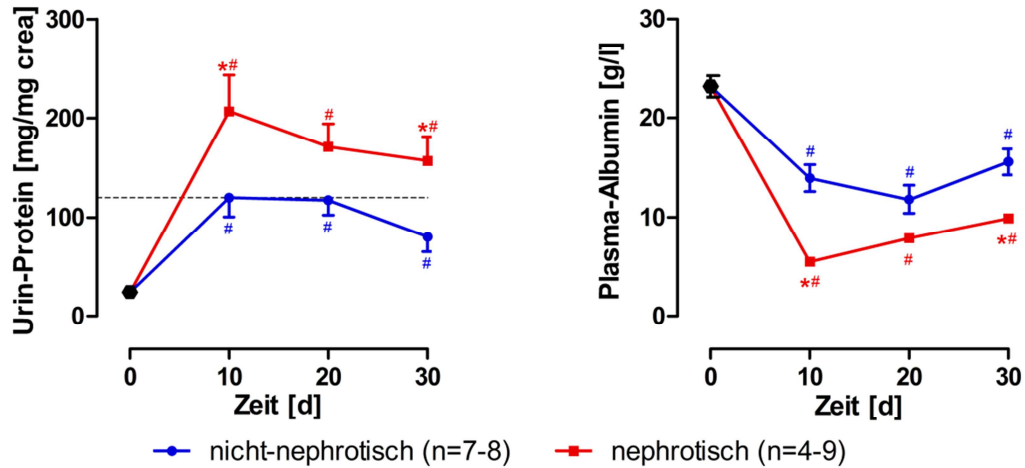


Abbildung 14: Nephropathiemodell – Proteinurie und Plasma-Albumin

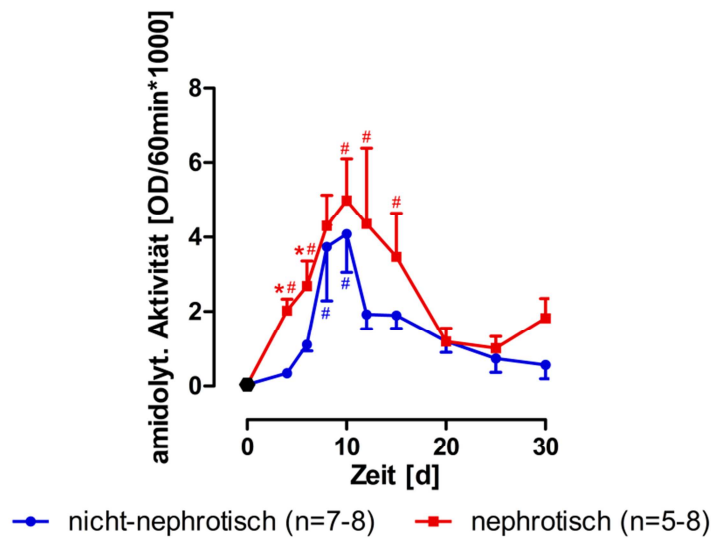
links: zeitlicher Verlauf der Proteinkonzentration im Urin [mg/mg crea], horizontale Linie: Proteinuriewelle von 120 mg/mg crea; rechts: zeitlicher Verlauf der Albuminkonzentration im Plasma [g/l]; \*  $p < 0,05$  zu nicht-nephrotisch desselben Tages; #  $p < 0,05$  zur Kontrolle [95]

Vom Kontrollwert ( $24 \pm 2$  mg/mg crea) ausgehend stieg die Urin-Proteinkonzentration in der nephrotischen Gruppe in den ersten zehn Tagen auf  $207 \pm 37$  mg/mg crea deutlich an, wohingegen bei der nicht-nephrotischen Gruppe an Tag 10 ein Wert von  $120 \pm 19$  mg/mg crea gemessen wurde. Ab Tag 15 (nicht-nephrotisch:  $101 \pm 9$  mg/mg crea; nephrotisch:  $155 \pm 15$  mg/mg crea) wurde ein relativ konstantes Niveau in beiden Gruppen erreicht. In der nephrotischen Gruppe lag die Proteinurie ab Tag 8 stets bei über 120 mg/mg crea, während sie in der nicht-nephrotischen Gruppe über 30 Tage hinweg unter dieser Schwelle verlief.

Der Verlauf der Albuminkonzentration im Plasma stellte sich dazu invers dar. Vom Ausgangswert ( $23,2 \pm 1,1$  g/l) fiel die Konzentration bei den nephrotischen Tieren bis auf 23 % des Ausgangswertes ( $5,5 \pm 0,4$  g/l) an Tag 10 und bei den nicht-nephrotischen Tieren bis auf 51 % des Ausgangswertes ( $11,8 \pm 1,4$  g/l) an Tag 20 ab. Bis Tag 30 stiegen die Konzentrationen in beiden Gruppen wieder

an; der Ausgangswert wurde dabei jeweils nicht erreicht (nicht-nephrotisch: 65 %; nephrotisch: 45 % des Ausgangswertes).

### 3.1.4 Aprotininempfindliche amidolytische Urinaktivität

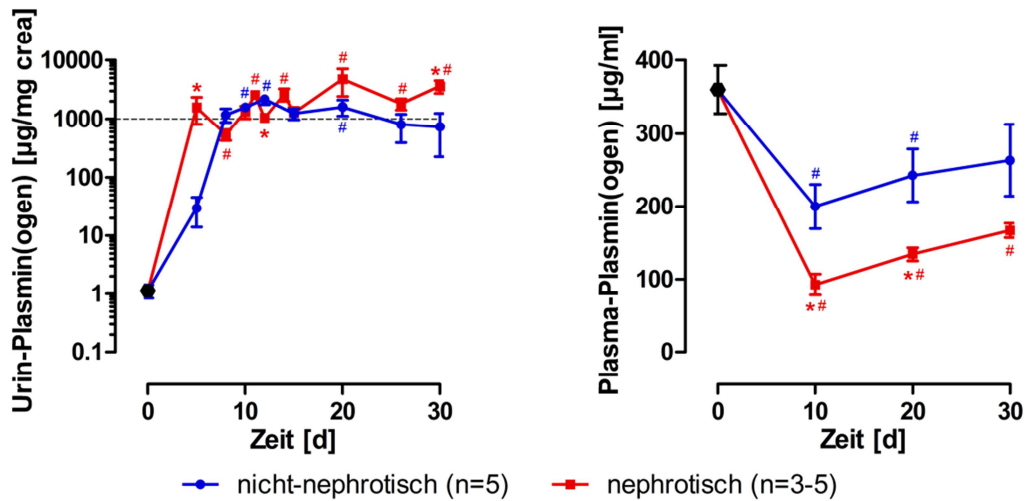


**Abbildung 15: Nephropathiemodell – amidolytische Urinaktivität**

zeitlicher Verlauf der aprotininempfindlichen amidolytischen Aktivität gegen S-2251™ im Urin [OD/60min\*1000]; \* p < 0,05 zu nicht-nephrotisch desselben Tages; # p < 0,05 zur Kontrolle [95]

Vor Modellinduktion war keine aprotininempfindliche amidolytische Aktivität im Urin nachweisbar, während sie ihr Maximum in beiden Gruppen an Tag 10 erreichte. Dabei stieg die Aktivität bei den nicht-nephrotischen Mäusen auf  $4,1 \pm 1,0$  OD/60min\*1000 und bei den nephrotischen Mäusen auf  $5,0 \pm 1,1$  OD/60min\*1000. Anschließend fiel sie in beiden Gruppen wieder ab. Die Berechnung der AUC zeigte, dass über 30 Tage hinweg bei den nicht-nephrotischen Tieren in etwa 60 % der amidolytischen Aktivität der nephrotischen Tiere messbar war.

### 3.1.5 Urin- und Plasma-Plasmin(ogen)



**Abbildung 16: Nephropathiemodell – Urin-Plasmin(ogen) und Plasma-Plasmin(ogen)**

links: zeitlicher Verlauf der Urin-Plasmin(ogen)konzentration [ $\mu\text{g}/\text{mg}$  crea]; rechts: zeitlicher Verlauf der Plasma-Plasmin(ogen)konzentration [ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ]; \*  $p < 0,05$  zu nicht-nephrotisch desselben Tages; #  $p < 0,05$  zur Kontrolle [95]

Die Plasmin(ogen)konzentration im Urin stieg in beiden Gruppen innerhalb der ersten acht Tage auf mehr als das 1000-Fache an. Sie hielt sich in der nephrotischen Gruppe über die gesamte Dauer und in der nicht-nephrotischen Gruppe über 12 Tage hinweg. In dieser Gruppe wurden auch im gesamten Verlauf geringere Konzentrationen als in der nephrotischen Gruppe gemessen. Die AUC betrug in etwa 48 % der AUC der nephrotischen Gruppe.

Der Verlauf der Plasmin(ogen)konzentration im Plasma verhielt sich invers dazu. Vom Kontrollwert ( $360 \pm 33 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) ausgehend fiel die Plasmakonzentration an Tag 10 auf 26 % ( $93 \pm 15 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) des Ausgangswertes in der nephrotischen Gruppe und auf 56 % ( $200 \pm 30 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) des Ausgangswertes in der nicht-nephrotischen Gruppe. In beiden Gruppen stiegen anschließend die Plasmakonzentrationen bis Tag 30 auf 37 % (nephrotisch) bzw. 67 % (nicht-nephrotisch) des Ausgangswertes an. Die Plasmin(ogen)konzentration und die Albuminkonzentration im Plasma verliefen somit parallel zueinander.

### 3.1.6 Lipämie

Bei den nephrotischen Tieren trat eine Lipämie auf, die mit bloßem Auge sichtbar war. Die milchig-weiße Trübung des zentrifugierten Plasmas trat bei den nicht-nephrotischen Tieren nicht oder nur sehr schwach auf.

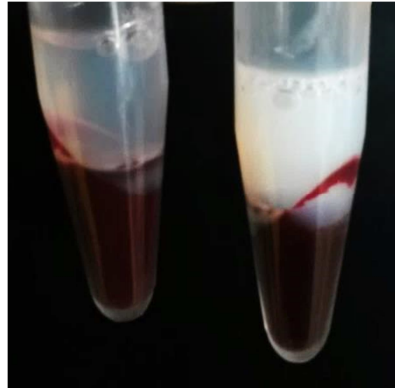


Abbildung 17: Nephropathiemodell – Lipämie

links: Plasma einer nicht-nephrotischen Maus ohne Lipämie; rechts: Plasma einer nephrotischen Maus mit Lipämie

### 3.1.7 Plasma-Harnstoff

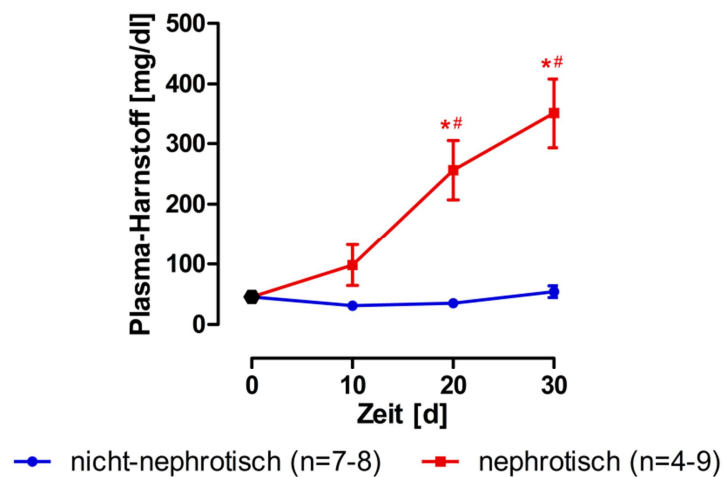


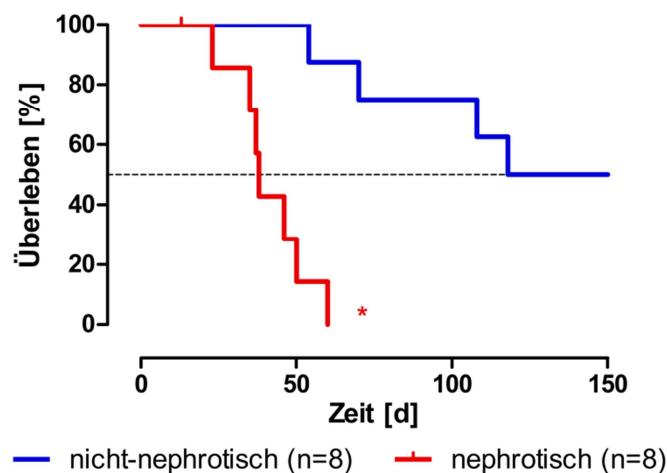
Abbildung 18: Nephropathiemodell – Plasma-Harnstoff

zeitlicher Verlauf der Harnstoffkonzentration im Plasma [mg/dl]; \*  $p < 0,05$  zu nicht-nephrotisch desselben Tages; #  $p < 0,05$  zur Kontrolle



Die Plasma-Harnstoffkonzentration diente als Marker für die Nierenfunktion. An Tag 0 betrug sie  $46 \pm 6$  mg/dl. In der nicht-nephrotischen Gruppe blieb die Harnstoffkonzentration über 30 Tage hinweg stabil (maximal  $54 \pm 10$  mg/dl an Tag 30), während sie in der nephrotischen Gruppe kontinuierlich auf das 7,7-Fache anstieg ( $351 \pm 57$  mg/dl an Tag 30).

### 3.1.8 Überleben



**Abbildung 19: Nephropathiemodell – Überlebensraten**

Kaplan-Meier-Kurven zur Veranschaulichung der Überlebensraten [%]; vertikaler Abfall der Kurve: Eintritt des Todes; † zensiertes Ereignis z. B. bei geplanter Beendigung der Versuchsserie oder Tod, der nicht direkt durch Modellinduktion verursacht ist; \*  $p < 0,05$  zu nicht-nephrotisch

Zur Veranschaulichung der Überlebensraten in beiden Gruppen im Langzeitverlauf dienten Kaplan-Meier-Kurven. Dabei ergab sich ein signifikanter Unterschied im Kurvenverlauf der beiden Gruppen ( $p = 0,0001$ ). Das mediane Überleben lag in der nicht-nephrotischen Gruppe bei 135 Tagen und in der nephrotischen Gruppe bei 38 Tagen. Alle Mäuse der nephrotischen Gruppe verstarben innerhalb von 60 Tagen, während die Hälfte der Tiere in der nicht-nephrotischen Gruppe an Tag 150 noch am Leben war.

### 3.1.9 Zusammenfassung

Durch eine einmalige intravenöse Injektion von Doxorubicin konnten zwei unterschiedliche nephropathische Verlaufsformen induziert werden. Überschritt die Proteinurie eine Schwelle von 120 mg/mg crea an mindestens zwei Tagen zwischen Tag 8 und 11, entwickelten die Tiere das Vollbild des nephrotischen Syndroms mit ausgeprägten Ödemen, Hypalbuminämie, Hyperlipidämie sowie progredienter Verschlechterung der Nierenfunktion. Unterhalb dieses Schwellenwertes waren die typischen Veränderungen dieser Parameter nur leicht ausgeprägt und die Nierenfunktion blieb langfristig intakt.

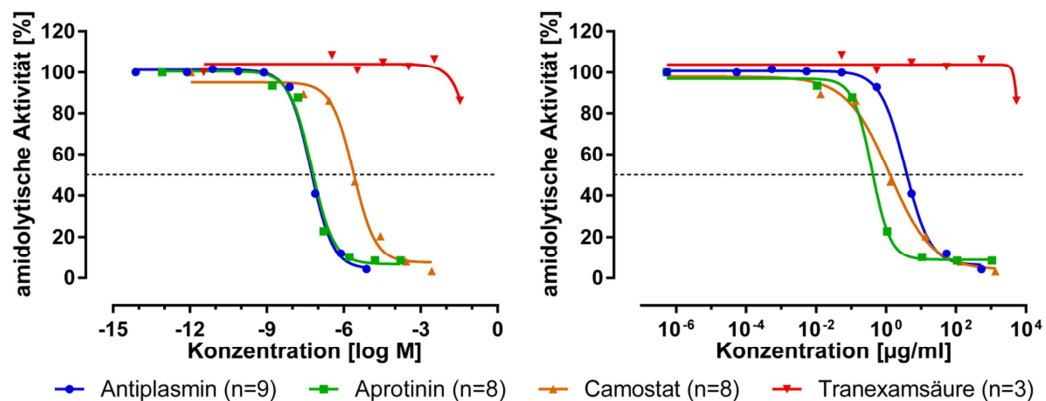
Die maximale Gewichtszunahme war in der nephrotischen Gruppe signifikant höher als in der nicht-nephrotischen Gruppe. Nur die Tiere der nephrotischen Gruppe entwickelten klinische Zeichen der Volumenretention in Form von Aszites und Ödemen sowie eine Lipämie. Die anfängliche Natriumretention war bei den nephrotischen Tieren signifikant höher als bei den nicht-nephrotischen Tieren. Passend zum divergenten Verlauf der Proteinurie fiel die Albuminkonzentration in der nephrotischen Gruppe signifikant stärker als in der nicht-nephrotischen Gruppe ab.

Die Ausscheidung von Proteasen mit aprotininempfindlicher amidolytischer Aktivität war im Vergleich zur Kontrolle in beiden Gruppen deutlich erhöht. Über einen Zeitraum von 30 Tagen war sie in der nephrotischen Gruppe deutlich höher als in der nicht-nephrotischen Gruppe. Die Plasmin(ogen)konzentration im Urin stieg in beiden Gruppen auf das über 1000-Fache an. Über einen Zeitraum von 30 Tagen schieden die nicht-nephrotischen Tiere deutlich weniger Plasmin(ogen) als die nephrotischen Tiere aus. Entsprechend dem Verlauf des Albumins fielen die Plasmin(ogen)-Spiegel im Plasma deutlich ab und unterschieden sich signifikant zwischen den beiden Gruppen.

Die Harnstoffkonzentration im Plasma stieg in der nephrotischen Gruppe bis Tag 30 signifikant an und blieb in der nicht-nephrotischen Gruppe auf dem Ausgangsniveau. Das mediane Überleben betrug in der nephrotischen Gruppe 38 Tage und in der nicht-nephrotischen Gruppe 135 Tage und unterschied sich damit ebenfalls signifikant.

### 3.2 Inhibition der Serinproteaseaktivität *in vitro*

Zur Bestimmung der Wirkstärke der ausgewählten Serinproteaseinhibitoren wurde deren Inhibitionskinetik untersucht. Dazu wurde die Hemmbarkeit der amidolytischen Aktivität im Urin nephrotischer Mäuse und von aufgereinigtem Plasmin unter aufsteigenden Inhibitorkonzentrationen gemessen. Anhand dieser Kurven wurde die jeweilige halbmaximale Hemmkonzentration ( $IC_{50}$ ) des Inhibitors bestimmt.



**Abbildung 20:** *in vitro*-Inhibitionskurven mit Urin nephrotischer Tiere

Hemmung der amidolytischen Aktivität im Urin nephrotischer Mäuse durch aufsteigende Inhibitorkonzentrationen [log M] (links) bzw. [ $\mu\text{g/ml}$ ] (rechts) [95]

Mit Antiplasmin, Aprotinin und Camostat konnte die amidolytische Aktivität im Urin gehemmt werden. Mit Tranexamsäure fand keine *in vitro*-Inhibition der amidolytischen Aktivität im Urin statt.

Vergleichbare Kurvenverläufe ergaben sich bei den Versuchen mit aufgereinigtem Plasmin anstelle des Urins nephrotischer Mäuse. Die Plasminkonzentration betrug im Urin wie auch beim aufgereinigten Plasmin in etwa  $500 \mu\text{g/ml}$ .

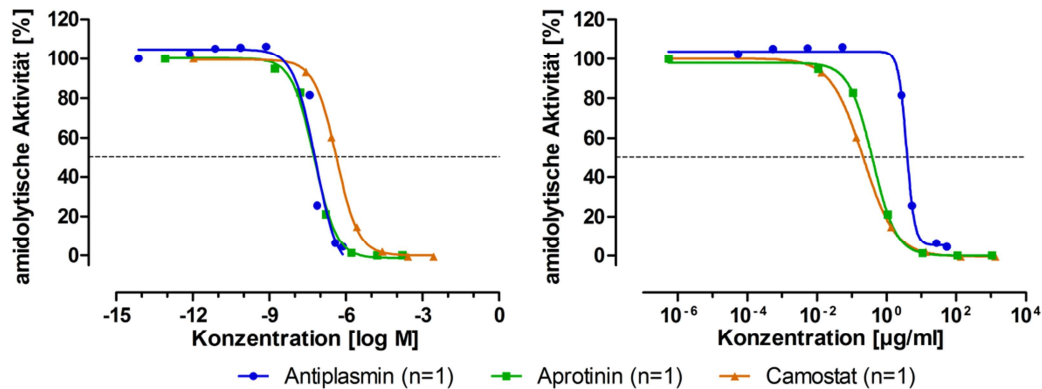


Abbildung 21: *in vitro*-Inhibitionskurven mit aufgereinigtem Plasmin

Hemmung der amidolytischen Aktivität von aufgereinigtem Plasmin durch aufsteigende Inhibitorkonzentrationen in [log M] (links) bzw. [ $\mu\text{g/ml}$ ] (rechts) [95]

Anhand der Kurven konnten die jeweiligen  $\text{IC}_{50}$ -Werte bestimmt und die Wirkstärke der Inhibitoren verglichen werden.

Tabelle 10:  $\text{IC}_{50}$ -Werte und 95 %-Konfidenzintervalle der ausgewählten Serinproteaseinhibitoren

berechnete Werte aus den Aktivitätsmessungen mit nephrotischem Urin (links) und aufgereinigtem Plasmin (Mitte) sowie Signifikanztestung zwischen den beiden Kurven (Urin; aufgereinigtes Plasmin) des jeweiligen Inhibitors (rechts) [95]

Inhibitor	Einheit	$\text{IC}_{50}$ [ $\text{KI}_{95}$ ] (Urin)	$\text{IC}_{50}$ [ $\text{KI}_{95}$ ] (aufg. Plasmin)	p-Wert
Aprotinin	[nM]	56 [23; 137]	58 [36; 94]	0,8896
	[ $\mu\text{g/ml}$ ]	0,36 [0,15; 0,89]	0,38 [0,23; 0,61]	
Camostat	[nM]	2355 [1138; 4875]	428 [380; 481]	0,0003
	[ $\mu\text{g/ml}$ ]	1,16 [0,56; 2,41]	0,21 [0,19; 0,24]	
Antiplasmin	[nM]	51 [40; 66]	66 [24; 181]	0,5967
	[ $\mu\text{g/ml}$ ]	3,59 [2,78; 4,65]	4,59 [1,66; 12,68]	

Mit Antiplasmin ( $\text{IC}_{50} = 51 \text{ nM}$ ) und Aprotinin ( $\text{IC}_{50} = 56 \text{ nM}$ ) konnte die Aktivität im Urin in nahezu identischer Ausprägung gehemmt werden, während sie mit Camostat ( $\text{IC}_{50} = 2355 \text{ nM}$ ) erst bei höheren Konzentrationen gehemmt wurde. Zur Hemmung der Aktivität von Plasmin waren ebenfalls ähnliche Konzentrationen von Antiplasmin ( $\text{IC}_{50} = 66 \text{ nM}$ ) und Aprotinin ( $\text{IC}_{50} = 58 \text{ nM}$ ) und weitaus höhere Camostatkonzentrationen ( $\text{IC}_{50} = 428 \text{ nM}$ ) erforderlich. Bei

Camostat zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Hemmung der Aktivität im Urin und von Plasmin. Die Hemmbarkeit der Aktivitäten mit Aprotinin oder Antiplasmin unterschied sich nicht signifikant.

Auf Grund der Ähnlichkeit der Ergebnisse bei den Versuchen mit Urin und Plasmin kann davon ausgegangen werden, dass der Großteil der amidolytischen Aktivität im Urin der Plasminaktivität entspricht. Diese Aussage wurde dadurch bestätigt, dass die amidolytische Urinaktivität mit Antiplasmin auf 4,3 % der Ausgangsaktivität gehemmt werden konnte.

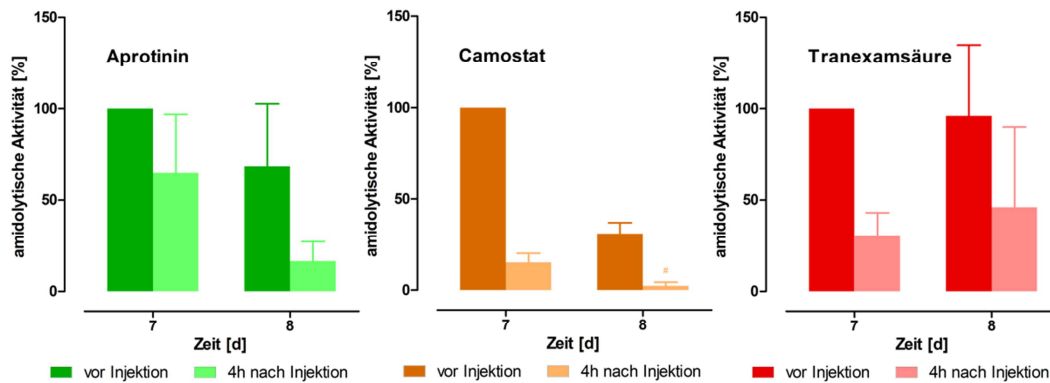
Die *in vitro*-Inhibitionsuntersuchungen lieferten entscheidende Erkenntnisse zur Dosisfindung für die darauffolgenden *in vivo*-Experimente. Die Darstellung der Inhibitorkonzentration in [ $\mu\text{g/ml}$ ] erleichterte die Bestimmung der erforderlichen Dosis für die darauffolgenden Interventionsstudien. Die optimale Dosis sollte die amidolytische Urinaktivität maximal hemmen und gleichzeitig niedrig genug sein, um mögliche Nebenwirkungen zu vermeiden. Die Dosisabschätzung erfolgt in den folgenden Interventionsstudien für Aprotinin und Camostat. Für Aprotinin wurde *in vitro* eine maximale Hemmung der Urinaktivität bei 10 – 100  $\mu\text{g/ml}$  erreicht (s. Abbildung 20, rechts). Bei einer täglichen Urinausscheidung von etwa 3 ml wäre theoretisch eine Applikationsdosis von mindestens 30 – 300  $\mu\text{g/d}$  für eine suffiziente Proteasehemmung nötig. Für Camostat wurde *in vitro* eine maximale Hemmung der Urinaktivität bei 1000  $\mu\text{g/ml}$  erreicht (s. Abbildung 20, rechts). Theoretisch wäre somit eine Applikationsdosis von mindestens 3000  $\mu\text{g/d}$  erforderlich.

### **3.3 Interventionsstudien – Applikation von Serinproteaseinhibitoren**

#### **3.3.1 Subkutane Applikation von Serinproteaseinhibitoren**

Die gelösten Serinproteaseinhibitoren Aprotinin, Camostat und Tranexamsäure wurden an Tag 7 und 8 nach Modellinduktion subkutan injiziert und deren Wirkung auf die amidolytische Urinaktivität nach vier Stunden untersucht. Bei

einem durchschnittlichen Gewicht von 30 g betrug die applizierte Aprotininosis ca. 180 µg an Tag 7 und 360 µg an Tag 8, die Camostatdosis ca. 1800 µg an Tag 7 und 3600 µg an Tag 8 und die Tranexamsäuredosis ca. 6000 µg an Tag 7 und 12000 µg an Tag 8. Die Dosen lagen damit im Bereich der errechneten täglichen Mindestdosis.



**Abbildung 22: Amidolytische Urinaktivität vor und nach subkutaner Injektion der Inhibitoren**

Amidolytische Urinaktivität [%] an Tag 7 und 8 jeweils vor (dunkel) und vier Stunden nach (hell) subkutaner Injektion von Aprotinin (links), Camostat (Mitte) und Tranexamsäure (rechts); # p < 0,05 zur Kontrolle vor Injektion an Tag 7

Die amidolytische Urinaktivität konnte mit allen drei Inhibitoren an beiden Tagen jeweils innerhalb von vier Stunden nach Applikation gehemmt werden. Aprotinin hemmte die Aktivität an Tag 7 von 100 % Ausgangsaktivität auf  $65 \pm 32$  %. An Tag 8 fiel die verbliebene Aktivität von  $68 \pm 35$  % nach Applikation der doppelten Dosis auf  $16 \pm 11$  % der Ausgangsaktivität ab. Bei Camostat konnte eine längerfristige und signifikante Hemmung über mindestens 24 Stunden erzielt werden. An Tag 7 fiel die Aktivität zunächst von 100 % auf  $15 \pm 5$  %. Nach Applikation der doppelten Dosis am Folgetag wurde die Aktivität von den verbliebenen  $31 \pm 6$  % auf  $2 \pm 2$  % der Ausgangsaktivität inhibiert. Bei Injektion von Tranexamsäure fiel die Aktivität nach vier Stunden von 100 % auf  $30 \pm 13$  % und erreichte nach 24 Stunden wieder nahezu den Ausgangswert. Nach Injektion der doppelten Dosis an Tag 8 konnte die Aktivität auf  $46 \pm 44$  % der Ausgangsaktivität inhibiert werden.

### 3.3.2 Intraperitoneale Applikation von emulgierten Serinproteaseinhibitoren

Um die amidolytische Urinaktivität länger und stabiler zu hemmen und auch andere Parameter, wie beispielsweise das Gewicht oder die Natriumausscheidung, medikamentös beeinflussen zu können, war eine kontinuierlichere Freisetzung der Inhibitoren erforderlich. Um eine Verlängerung der Halbwertszeiten zu erzielen, wurden die Inhibitoren in den darauffolgenden Versuchen in Form von Emulsionen appliziert.

#### 3.3.2.1 Eliminationskinetik von emulgiertem FITC-Inulin

Um die Pharmakokinetik der emulgierten Inhibitoren im murinen Organismus zu studieren, wurde zunächst die Eliminationskinetik von FITC-Inulin durch einmalige intraperitoneale Injektion der Emulsion bei gesunden Mäusen untersucht.

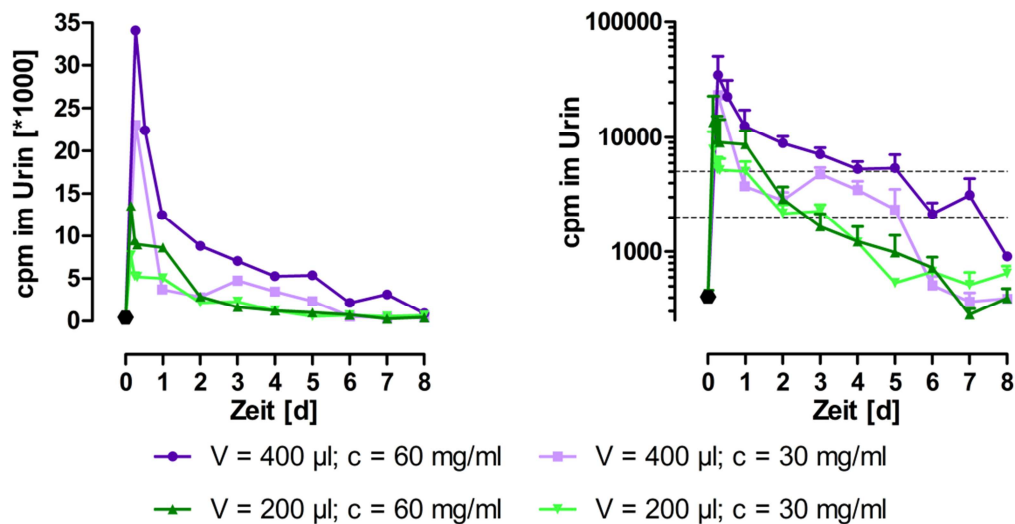


Abbildung 23: Eliminationskinetik von FITC-Inulin

zeitlicher Verlauf der Elimination von FITC-Inulin (cpm im Urin) in linearer (links) und halblogarithmierter Darstellung (rechts)

Innerhalb von 3 – 7 Stunden stieg das Fluoreszenzsignal im Urin bei Injektion von 400 µl Emulsion im Mittel auf 34117 cpm (60 mg/ml) bzw. 23102 cpm (30 mg/ml) und bei Injektion von 200 µl Emulsion im Mittel auf 13568 cpm (60 mg/ml) bzw. 7724 cpm (30 mg/ml) an. Innerhalb von 48 h fiel das Signal deutlich im Mittel auf 26 % (400 µl; 60 mg/ml), 12 % (400 µl; 30 mg/ml), 21 % (200 µl; 60 mg/ml) bzw. 28 % (200 µl; 30 mg/ml) des maximalen Signals ab.

Die weitere Elimination erfolgte langsamer, sodass bei Injektion von 400 µl Emulsion die Aktivität an Tag 6 – 8 und bei Injektion von 200 µl Emulsion an Tag 3 – 4 unter 2000 cpm fiel.

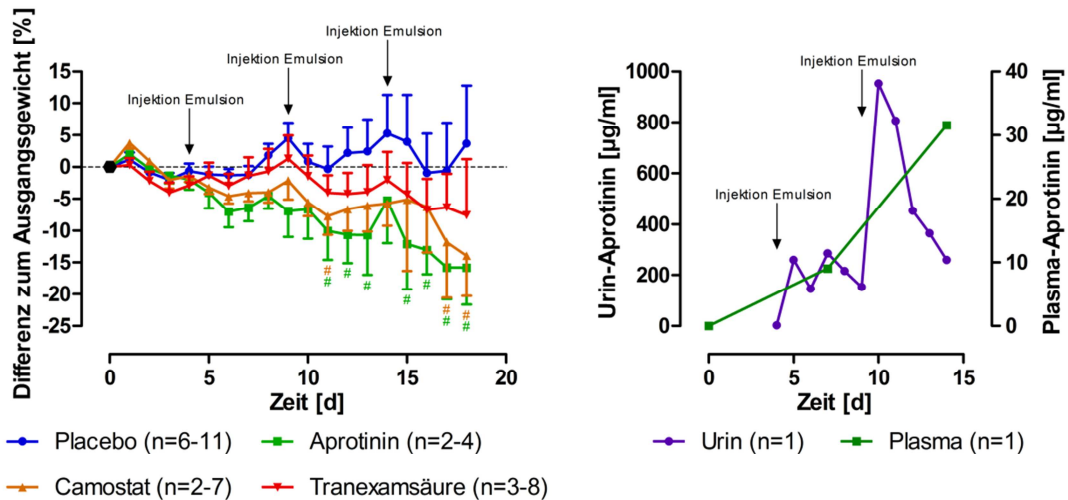
Durch Verdopplung des Injektionsvolumens von 200 auf 400 µl wurde die AUC in der Gruppe der niedrigkonzentrierten Emulsionen auf das 2,2-Fache und in der Gruppe der hochkonzentrierten Emulsionen auf das 3,1-Fache gesteigert. Im Plasmakompartiment war zu keiner Zeit ein Fluoreszenzsignal nachweisbar.

#### 3.3.2.2 Intraperitoneale Applikation von Serinproteaseinhibitoren

Die Ergebnisse aus den Versuchen mit FITC-Inulin zeigten, dass die emulgierte Substanz bei Injektion von 400 µl Emulsion über mehr als fünf Tage hinweg über den Urin ausgeschieden wird.

Zur Applikation der Serinproteaseinhibitoren wurden deshalb je 400 µl Emulsion im fünftägigen Intervall intraperitoneal injiziert. Pro Injektion wurden 12 mg Aprotinin, 6 mg Camostat, 12 mg Tranexamsäure oder Placebo appliziert.





**Abbildung 24: Intervention Emulsion – Gewicht und Aprotininkonzentration in Urin und Plasma**

links: zeitlicher Gewichtsverlauf als Differenz zum Ausgangsgewicht (Tag 0) [%]; rechts: beispielhafter Verlauf der Aprotininkonzentration im Urin (linke y-Achse) [ $\mu\text{g/ml}$ ] und im Plasma (rechte y-Achse) [ $\mu\text{g/ml}$ ]; #  $p < 0,05$  zur Kontrolle

Über einen Zeitraum von 18 Tagen zeigte sich bei einem Ausgangsgewicht von  $26,4 \pm 0,7$  g in der Placebogruppe eine diskrete Gewichtszunahme von  $3,7 \pm 9,1$  % bei schwankendem Gewichtsverlauf. In allen drei Inhibitorgruppen zeigte sich insgesamt eine Gewichtsabnahme. An Tag 18 lag die Gewichtsabnahme unter Tranexamsäure bei  $7,6 \pm 8,8$  %, unter Camostat bei  $13,9 \pm 6,3$  % und unter Aprotinin bei  $15,8 \pm 5,8$  % des Ausgangsgewichts. Die Kurvenverläufe der Inhibitorgruppen unterschieden sich nicht signifikant vom Kurvenverlauf der Placebogruppe.

Verglichen mit dem charakteristischen Gewichtsverlauf in der nephrotischen Gruppe (s. Abbildung 11, links) zeigten sich in allen vier Interventionsgruppen Unterbrechungen im Gewichtspeak. Die Tage mit passagerer Gewichtsabnahme folgten jeweils direkt auf die Tage, an denen die Emulsionen injiziert wurden. Simultan fiel auch die konsumierte Futtermenge pro Maus signifikant ( $p < 0,0004$ ) ab. Nach der ersten Injektion fraßen die Tiere passager durchschnittlich 38 %, nach der zweiten Injektion 45 % und nach der letzten Injektion 36 % weniger als am Vortag.

Hinsichtlich Urinnatriumkonzentration sowie amidolytischer Urinaktivität ergaben sich keine Auffälligkeiten in zeitlicher Assoziation zu den Injektionen. Nach der ersten Injektion an Tag 4 zeigte sich ein Anstieg der Aprotininkonzentration im Urin auf 260 µg/ml und eine anschließende Stabilisierung der Werte zwischen 147 und 286 µg/ml. Am Tag nach der zweiten Injektion stieg die Urinkonzentration erneut deutlich auf 952 µg/ml an und fiel abschließend an Tag 14 auf 260 µg/ml ab. Damit lagen die Aprotininkonzentrationen im Urin deutlich über den erforderlichen Konzentrationen für eine suffiziente *in vitro*-Inhibition der amidolytischen Urinaktivität. Im Plasmakompartiment lag die Aprotininkonzentration an Tag 7 bei 9 µg/ml; nach der zweiten Injektion stieg sie auf 32 µg/ml.

### **3.3.3 Subkutane Implantation von Pellets mit Serinproteaseinhibitoren**

Um eine konstantere Freisetzung der Inhibitoren zu gewährleisten und damit einen Effekt auf die amidolytische Urinaktivität, das Gewicht bzw. die Natriumausscheidung erzielen zu können, wurden die folgenden Interventionsserien mit subkutan implantierten Pellets durchgeführt, die die Serinproteaseinhibitoren enthielten oder Placebopellets waren.

## 3.3.3.1 Gewicht

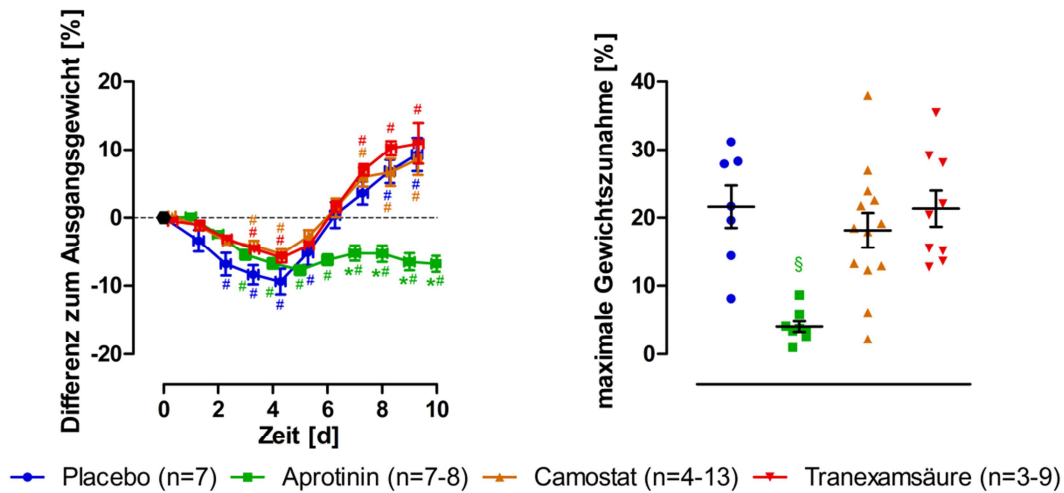


Abbildung 25: Intervention Pellet – Gewicht

links: zeitlicher Gewichtsverlauf als Differenz zum Ausgangsgewicht (Tag 0) [%]; rechts: maximale Gewichtszunahme zwischen Maximum an  $t > 5$  und vorausgehendem Minimum [%]; \*  $p < 0,05$  zu Placebo desselben Tages; #  $p < 0,05$  zur Kontrolle; §  $p < 0,05$  zu Placebo [95]

Ausgehend von  $26,3 \pm 0,4$  g an Tag 0 fiel das Gewicht zunächst in allen vier Interventionsgruppen gleichförmig ab. Ab Tag 5 nahmen die Tiere der Placebo-, Camostat- und Tranexamsäuregruppe wieder rasch an Gewicht zu und erreichten an Tag 10 schließlich eine Gewichtszunahme von  $9,3 \pm 2,5$  % (PLC),  $8,6 \pm 2,3$  % (CAM) und  $10,9 \pm 3,0$  % (TXS) ihres Ausgangsgewichts. In der Aprotinigruppe blieb das Gewicht hingegen nahezu konstant niedrig und erreichte  $-6,8 \pm 1,1$  % des Ausgangsgewichtes an Tag 10.

Über einen Zeitraum von zehn Tagen ergab sich somit eine maximale Gewichtszunahme von  $21,6 \pm 3,1$  % unter Placebo,  $18,1 \pm 2,6$  % unter Camostat und  $21,3 \pm 2,7$  % unter Tranexamsäure. Unter Aprotinin betrug die maximale Gewichtszunahme lediglich  $4,1 \pm 0,8$  % und war damit signifikant niedriger als in der Placebogruppe ( $p < 0,001$ ).

## 3.3.3.2 Natriurese

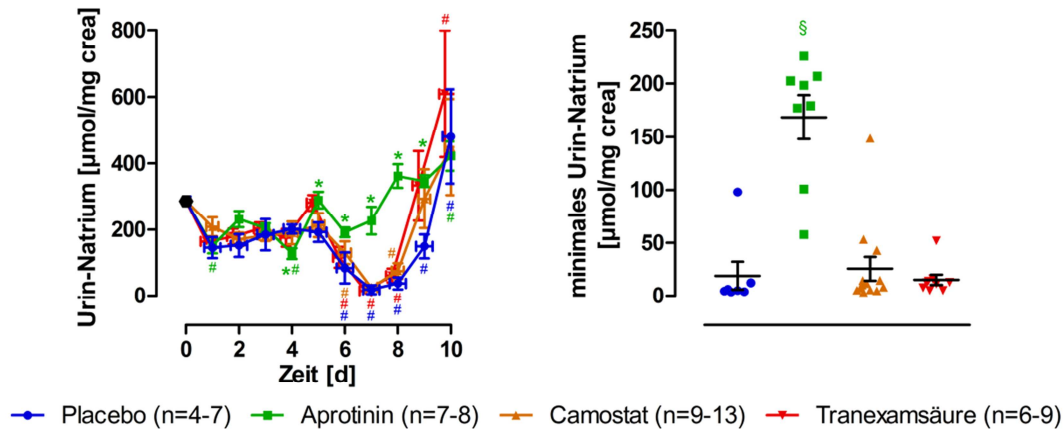


Abbildung 26: Intervention Pellet – Natriurese

links: zeitlicher Verlauf der Natriumkonzentration im Urin [µmol/mg crea]; rechts: minimale Natriumkonzentration im Urin für t ≥ 5 [µmol/mg crea]; \* p < 0,05 zu Placebo desselben Tages; # p < 0,05 zur Kontrolle; § p < 0,05 zu Placebo [95]

Ausgehend von  $287 \pm 14$  µmol/mg crea zeigte sich in allen vier Gruppen eine relativ konstante Natriurese über fünf Tage hinweg. Anschließend nahm die Urin-Natriumkonzentration in der Placebo-, Camostat- und Tranexamsäuregruppe deutlich ab, sodass der Urin an Tag 7 nahezu natriumfrei war. Die minimale Natriumkonzentration im Urin betrug unter Placebo lediglich  $19 \pm 13$  µmol/mg crea, unter Camostat  $26 \pm 11$  µmol/mg crea und unter Tranexamsäure  $15 \pm 5$  µmol/mg crea. In der Aprotinigruppe blieb diese Natriumretention jedoch weitestgehend aus und die Urin-Natriumkonzentration blieb stabil. Die minimale Natriumkonzentration unter Aprotinin betrug  $169 \pm 21$  µmol/mg crea und war damit signifikanterweise 8-fach höher als in der Placebogruppe (p < 0,001). Anschließend stieg die Urin-Natriumkonzentration bis Tag 10 in allen Gruppen über das Ausgangsniveau an, sodass sie unter Placebo  $481 \pm 142$  µmol/mg crea, unter Aprotinin  $423 \pm 44$  µmol/mg crea, unter Camostat  $449 \pm 145$  µmol/mg crea und unter Tranexamsäure  $609 \pm 190$  µmol/mg crea erreichte.

## 3.3.3.3 Aprotininempfindliche amidolytische Urinaktivität

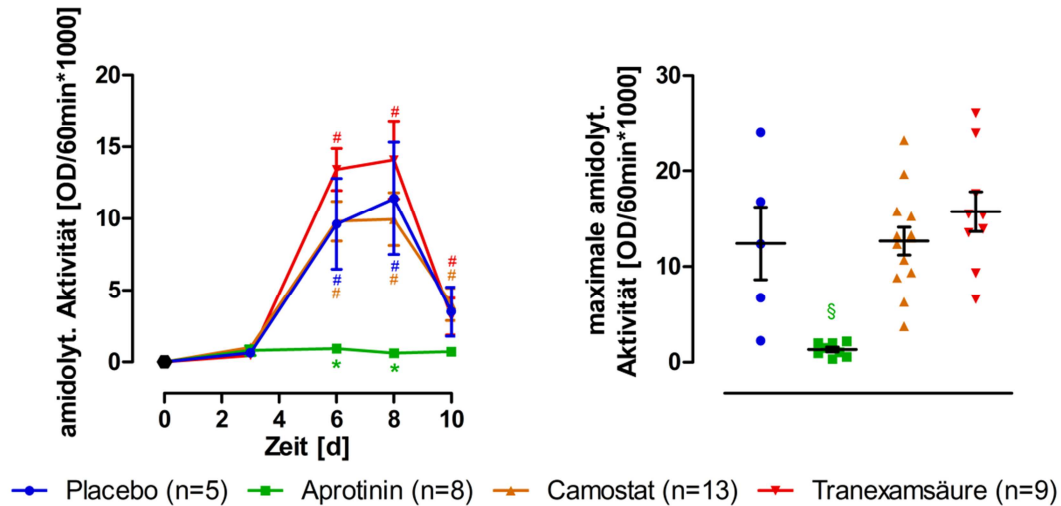


Abbildung 27: Intervention Pellet – amidolytische Urinaktivität

links: zeitlicher Verlauf der aprotininempfindlichen amidolytischen Aktivität gegen S-2251<sup>TM</sup> im Urin [OD/60min\*1000]; rechts: maximale amidolytische Aktivität im Verlauf [OD/60min\*1000]; \*  $p < 0,05$  zur Placebo desselben Tages; #  $p < 0,05$  zur Kontrolle; §  $p < 0,05$  zu Placebo [95]

Ab Tag 3 nach Modellinduktion stieg die amidolytische Urinaktivität in der Placebo-, Camostat- und Tranexamsäuregruppe deutlich an und erreichte an Tag 8 in der Placebogruppe  $11,4 \pm 3,9$  OD/60min\*1000, in der Camostatgruppe  $10,0 \pm 1,8$  OD/60min\*1000 und in der Tranexamsäuregruppe  $14,1 \pm 2,7$  OD/60min\*1000. In allen drei Gruppen fiel die Aktivität anschließend wieder ab, sodass an Tag 10 unter Placebo  $3,5 \pm 1,7$  OD/60min\*1000, unter Camostat  $4,0 \pm 1,1$  OD/60min\*1000 und unter Tranexamsäure  $3,2 \pm 1,3$  OD/60min\*1000 erreicht wurden. Über zehn Tage hinweg blieb die amidolytische Aktivität in der Aprotinigruppe konstant niedrig. Die maximale Aktivität war mit nur  $1,2 \pm 0,2$  OD/60min\*1000 signifikant niedriger als in der Placebogruppe ( $p < 0,001$ ).

## 3.3.3.4 Plasmaparameter

Tabelle 11: Intervention Pellet – Plasmaparameter

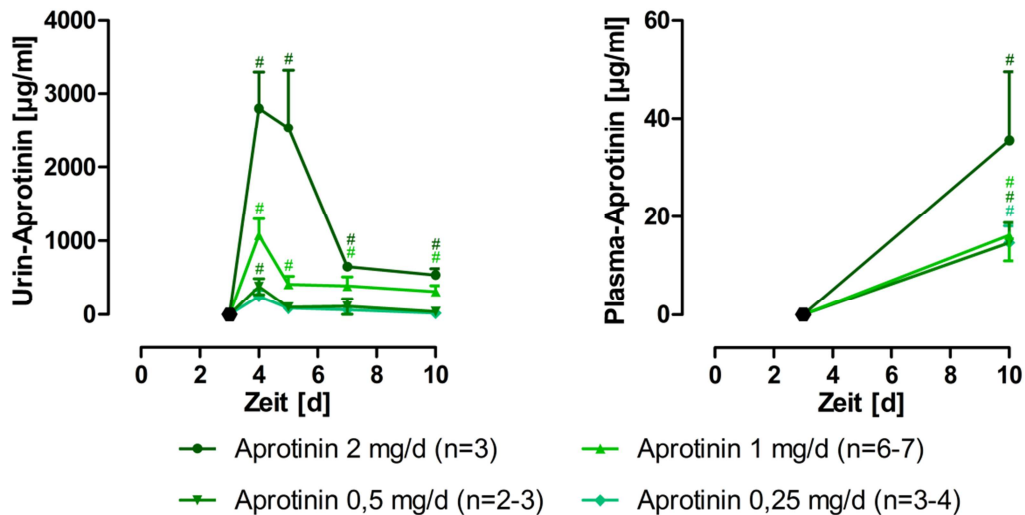
Plasmaparameter an Tag 10; # p &lt; 0,05 zu gesund; § p &lt; 0,05 zu Placebo [95]

Parameter/Behandlung	gesund (n=4)	Placebo (n=9)	Aprotinin (n=8)	Camostat (n=13)	Tranexamsäure (n=10)
Plasma-Natrium [mM]	152 ± 1	145 ± 1 (#)	148 ± 1	145 ± 1 (#)	145 ± 1 (#)
Plasma-Kalium [mM]	4,3 ± 0,1	4,7 ± 0,1	5,0 ± 0,2	4,9 ± 0,1 (#)	5,0 ± 0,1 (#)
Plasma-Bikarbonat [mM]	22 ± 1	27 ± 1 (#)	28 ± 1 (#)	28 ± 1 (#)	28 ± 1 (#)
Plasma-pH	7,31 ± 0,01	7,36 ± 0,01 (#)	7,37 ± 0,01 (#)	7,37 ± 0,01 (#)	7,36 ± 0,01 (#)
Plasma-Harnstoff [mg/dl]	34 ± 2	35 ± 12	63 ± 16	52 ± 13	31 ± 5
Plasma-Aldosteron [pg/ml]	297 ± 86	1056 ± 237 (#)	488 ± 88	382 ± 75 (§)	367 ± 61 (§)
Plasma-Albumin [g/l]	20,3 ± 0,2	6,7 ± 0,3 (#)	7,5 ± 0,7 (#)	7,0 ± 0,6 (#)	6,8 ± 0,4 (#)

Die Natriumkonzentration im Plasma war – verglichen mit den gesunden Kontrolltieren (152 ± 1 mM) – in der Placebo-, Camostat- und Tranexamsäuregruppe (alle 145 ± 1 mM) signifikant erniedrigt. Der leicht erniedrigte Wert in der Aprotinigruppe war dazu nicht signifikant verschieden. In allen vier Interventionsgruppen zeigte sich im Vergleich zu den Kontrolltieren (4,3 ± 0,1 mM) eine erhöhte Kaliumkonzentration im Plasma, die unter Camostat (4,9 ± 0,1 mM) und Tranexamsäure (5,0 ± 0,1 mM) signifikant erhöht war. Bezüglich der Bikarbonatkonzentration im Plasma konnte in allen Interventionsgruppen ein signifikant erhöhter Wert (PLC: 27 ± 1 mM; APR, CAM, TXS: 28 ± 1 mM) im Vergleich zu den gesunden Tieren (22 ± 1 mM) gemessen werden. In den vier Interventionsgruppen zeigte sich außerdem ein signifikant erhöhter pH-Wert (Kontrolle: 7,31 ± 0,01, Intervention: 7,36 bzw. 7,37 ± 0,01), während sich die Harnstoffkonzentration im Plasma nicht signifikant unterschied. Die Aldosteronkonzentration im Plasma war im Vergleich zu den Kontrolltieren (297 ± 86 pg/ml) in der Placebogruppe signifikant (1056 ± 237 pg/ml) und in den Inhibitorgruppen nicht signifikant erhöht (APR: 488 ± 88 pg/ml, CAM: 382 ± 75 pg/ml, TXS: 367 ± 61 pg/ml). Die Plasma-Albuminkonzentration war in allen Interventionsgruppen signifikant erniedrigt. Im Vergleich zu den Kontrolltieren (20,3 ± 0,2 g/l) lag sie unter Placebo bei

6,7 ± 0,3 g/l, unter Aprotinin bei 7,5 ± 0,7 g/l, unter Camostat bei 7,0 ± 0,6 g/l und unter Tranexamsäure bei 6,8 ± 0,4 g/l.

### 3.3.3.5 Aprotininkonzentration in Urin und Plasma



**Abbildung 28: Intervention Pellet – Urin-Aprotinin- und Plasma-Aprotininkonzentration**

zeitlicher Verlauf der Aprotininkonzentration im Urin [µg/ml] (links) und im Plasma [µg/ml] (rechts); # p < 0,05 zur Kontrolle [95]

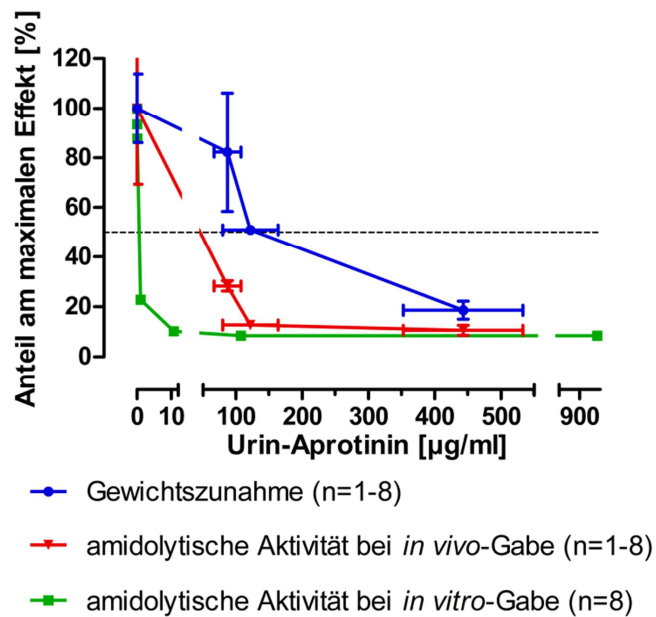
Zur Untersuchung der Aprotininspiegel im Urin und im Plasma wurden vier Behandlungsgruppen gebildet, denen unterschiedliche Aprotinindosierungen appliziert wurden. Dabei wurden Pellets mit einer täglichen Freisetzungsmenge von 0,25 mg/d, 0,5 mg/d, 1 mg/d und 2 mg/d an Tag 3 nach Modellinduktion implantiert. Die Aprotininkonzentration im Urin stieg am Folgetag in allen Gruppen merklich an. Bei einer Dosierung von 1 mg/d wurde eine Konzentration von 1080 ± 224 µg/ml im Urin erreicht. Darauf bezogen konnte die Urinkonzentration bei Verdopplung der täglichen Freisetzungsmenge (2 mg/d) durchschnittlich auf das 2,6-Fache (2802 ± 489 µg/ml) gesteigert werden. Bei Halbierung der täglichen Freisetzungsmenge (0,5 mg/d) wurden nur 35 % (382 ± 109 µg/ml) und bei Applikation der viertelten Dosis (0,25 mg/d) nur 23 % (248 ± 87 µg/ml) der Urinkonzentration wie bei Applikation von 1 mg/d erreicht.

Die Aprotininkonzentration fiel in den drei geringer dosierten Gruppen innerhalb von 24 Stunden und in der hochdosierten Gruppe innerhalb von 72 Stunden wieder deutlich ab, sodass an Tag 7 bei Freisetzung von 1 mg/d eine Urinkonzentration von  $390 \pm 125 \mu\text{g/ml}$  gemessen wurde. Darauf bezogen wurde bei Freisetzung von 2 mg/d das 1,7-Fache ( $653 \pm 46 \mu\text{g/ml}$ ), bei Freisetzung von 0,5 mg/d nur 29 % ( $112 \pm 106 \mu\text{g/ml}$ ) und bei Freisetzung von 0,25 mg/d nur 16 % ( $64 \pm 21 \mu\text{g/ml}$ ) der Urinkonzentration wie bei Applikation von 1 mg/d gemessen. Bei Applikation von 0,5, 1 und 2 mg/d konnten somit über mindestens sieben Tage hinweg Urinkonzentrationen von über  $100 \mu\text{g/ml}$  erreicht werden.

Im Plasma stieg die Aprotininkonzentration in allen Gruppen bis Tag 10 deutlich an. Bei Freisetzung von 1 mg/d wurde eine Konzentration von  $16 \pm 5 \mu\text{g/ml}$ , bei Freisetzung von 0,5 mg/d von  $15 \pm 4 \mu\text{g/ml}$  und bei Freisetzung von 0,25 mg/d von  $15 \pm 3 \mu\text{g/ml}$  erreicht. Bei Applikation von 2 mg/d zeigte sich hingegen eine Konzentration von  $35 \pm 14 \mu\text{g/ml}$ , dem 2,2-Fachen wie bei Freisetzung von 1 mg/d.



## 3.3.3.6 Dosisresponsivität auf Aprotinin



**Abbildung 29: Intervention Pellet – Abhängigkeit der Gewichtszunahme und der amidolytischen Urinaktivität von der Aprotininkonzentration im Urin**

Dosisabhängiger Effekt [%] der Aprotininkonzentration im Urin [ $\mu\text{g/ml}$ ] auf die maximale Gewichtszunahme sowie auf die maximale amidolytische Urinaktivität bei *in vitro*-Zugabe und *in vivo*-Applikation von Aprotinin [95]

Das Schaubild zeigt zusammenfassend die Responsivität verschiedener Parameter als prozentualen Anteil am maximalen Effekt auf steigende Aprotininkonzentrationen im Urin. Dabei wurde der dosisabhängige Effekt auf die amidolytische Aktivität im nephrotischen Urin bei Zugabe von steigenden Aprotininkonzentrationen *in vitro* sowie auf die amidolytische Urinaktivität und Gewichtszunahme im murinen Organismus bei Aprotininapplikation via Pellet (0,25 mg/d, 0,5 mg/d oder 1 mg/d) verglichen. Die stärkste Responsivität zeigte sich bezüglich der amidolytischen Aktivität bei *in vitro*-Zugabe von Aprotinin ( $\text{IC}_{50}$  [ $\text{KI}_{95}$ ]: 0,36 [0,15; 0,89]  $\mu\text{g/ml}$ ) gefolgt von der amidolytischen Urinaktivität unter Aprotininapplikation *in vivo* ( $\text{IC}_{50}$ : ca. 50  $\mu\text{g/ml}$ ). Zur Reduktion der maximalen Gewichtszunahme waren vergleichsweise höhere Urinkonzentrationen von Aprotinin nötig, sodass sich der halbmaximale Effekt bei ca. 122  $\mu\text{g/ml}$  einstellte.

Bei einer Aprotininapplikation von 0,25 mg/d ( $c_{\text{Urin}} = 87 \pm 20 \mu\text{g/ml}$ ) konnte eine deutliche Hemmung der amidolytischen Urinaktivität auf  $28 \pm 2 \%$  erreicht werden. Die maximale Gewichtszunahme im Rahmen des nephrotischen Syndroms wurde dabei auf ca.  $82 \pm 24 \%$  reduziert. Bei Steigerung der täglichen Dosis auf 0,5 mg ( $c_{\text{Urin}} = 122 \pm 42 \mu\text{g/ml}$ ) wurde die amidolytische Urinaktivität auf ca. 13 % und die Gewichtszunahme ebenfalls deutlich auf ca. 51 % gesenkt. Deren nahezu vollständige Hemmung auf  $19 \pm 4 \%$  bewirkte dann die Aprotinindosis von 1 mg/d ( $c_{\text{Urin}} = 443 \pm 90 \mu\text{g/ml}$ ). Die amidolytische Urinaktivität betrug darunter nur noch  $11 \pm 2 \%$ .

### 3.3.4 Zusammenfassung

Nach subkutaner Injektion von gelöstem Aprotinin, Camostat und Tranexamsäure konnte eine Hemmung der amidolytischen Urinaktivität *in vivo* erreicht werden. Unter Aprotinin und Tranexamsäure hielt diese Hemmung kürzer als 24 Stunden und unter Camostat mindestens 24 Stunden an. Eine Beeinflussung anderer Parameter (z. B. Natriurese) konnte unter keinem der drei Inhibitoren erreicht werden.

Zur Verlängerung der Halbwertszeiten wurden die Inhibitoren in emulgierter Form intraperitoneal injiziert. Darunter zeigten sich ein konstanter Gewichtsverlauf in der Placebogruppe und eine signifikante Gewichtsabnahme in der Camostat- und Aprotinigruppe im Vergleich zur Kontrolle. Die amidolytische Aktivität und Natriumausscheidung blieben von den Emulsionsinjektionen unbeeinflusst.

Um eine konstante Urinkonzentration der Inhibitoren zu gewährleisten und damit einen eindeutigen Effekt auf Gewicht, Natriurese oder amidolytische Urinaktivität erzielen zu können, wurden die Inhibitoren über subkutan implantierte Pellets mit konstanter täglicher Freisetzung appliziert. Während der Gewichtsverlauf in der Placebo-, Camostat- und Tranexamsäuregruppe dem charakteristischen Verlauf des nephropathischen Mausmodells entsprach, blieb die Gewichtszunahme in der Aprotinigruppe weitestgehend aus. Hier entfiel auch die ausgeprägte Natriumretention, die in den anderen drei Gruppen dem

typischen Modellverlauf entsprechend auftrat. Die amidolytische Urinaktivität, die unter Placebo, Camostat und Tranexamsäure deutlich erhöht war, wurde in der Aprotinigruppe nahezu vollständig supprimiert. Diverse Plasmaparameter, wie Natrium-, Kalium-, Bikarbonat-, Harnstoff-, Albuminkonzentration und pH-Wert, zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Inhibitorgruppen und der Placebogruppe. Die Aldosteronkonzentration im Plasma war in allen Inhibitorgruppen deutlich niedriger als in der Placebogruppe. Die Aprotininkonzentration im Urin stieg dosisabhängig innerhalb von 24 Stunden nach Pelletimplantation deutlich an. Sie fiel innerhalb der nächsten 1 – 3 Tage wieder ab und zeigte anschließend einen nahezu linearen Abfall. Die aus den *in vitro*-Inhibitionskurven abgeleitete geforderte Mindestkonzentration von Aprotinin für eine suffiziente Proteasehemmung wurde unter jeder Dosierung erreicht. Studien zur Dosisresponsivität zeigten, dass mit steigender Aprotininkonzentration im Urin zunächst eine *in vitro*-Inhibition der amidolytischen Aktivität, anschließend eine *in vivo*-Inhibition der amidolytischen Aktivität und erst bei höheren Konzentrationen eine Hemmung der Gewichtszunahme erfolgte.

### 3.4 Korrelationen

Zur Verdeutlichung der Zusammenhänge im Modellverlauf und in den Interventionsstudien mit Pellets wurden die Korrelationen zwischen den wichtigsten gemessenen Parametern berechnet. Die Korrelationen sind in Tabelle 12 – 15 im Anhang zu finden.

Bei den placebobehandelten Doxorubicin-induzierten Mäusen zeigte sich, dass das Ausmaß der Proteinurie signifikant positiv mit der maximalen Gewichtszunahme ( $r = 0,53$ ;  $r^2 = 0,28$ ;  $p = 0,004$ ) und der maximalen amidolytischen Urinaktivität ( $r = 0,58$ ;  $r^2 = 0,34$ ;  $p = 0,002$ ) korrelierte. Außerdem korrelierte die Proteinurie signifikant negativ mit der minimalen Urin-Natriumkonzentration ( $r = -0,48$ ;  $r^2 = 0,23$ ;  $p = 0,01$ ) und der Plasma-Albuminkonzentration ( $r = -0,71$ ;  $r^2 = 0,50$ ;  $p = 0,0003$ ). Eine negative Korrelation bestand auch zwischen dem Ausmaß der Proteinurie und der Höhe

der Hämoglobinkonzentration bzw. des Hämatokrits ( $r = -0,39$ ;  $r^2 = 0,15$ ;  $p = 0,31$ ).

Bei den Korrelationen zu den Interventionsstudien zeigte sich, dass das Ausmaß der maximalen Gewichtszunahme in allen vier Interventionsgruppen mit der minimalen Urin-Natriumkonzentration negativ korrelierte (PLC:  $r = -0,67$ ;  $r^2 = 0,45$ ;  $p = 0,0001$ ; APR:  $r = -0,78$ ;  $r^2 = 0,60$ ;  $p = 0,0007$ ; CAM:  $r = -0,69$ ;  $r^2 = 0,47$ ;  $p = 0,01$ ; TXS:  $r = -0,61$ ;  $r^2 = 0,37$ ;  $p = 0,06$ ). Außerdem korrelierte die maximale Gewichtszunahme positiv mit der maximalen amidolytischen Urinaktivität (PLC:  $r = 0,47$ ;  $r^2 = 0,22$ ;  $p = 0,02$ ; APR:  $r = 0,55$ ;  $r^2 = 0,30$ ;  $p = 0,034$ ; CAM:  $r = 0,009$ ;  $r^2 = 0,00007$ ;  $p = 0,98$ ; TXS:  $r = 0,65$ ;  $r^2 = 0,42$ ;  $p = 0,04$ ).

In der Aprotiningruppe korrelierte außerdem die Höhe der täglichen Freisetzungsmenge signifikant negativ mit der maximalen Gewichtszunahme ( $r = -0,80$ ;  $r^2 = 0,63$ ;  $p = 0,0004$ ) und der maximalen amidolytischen Urinaktivität ( $r = -0,69$ ;  $r^2 = 0,48$ ;  $p = 0,004$ ). Die tägliche Freisetzungsmenge von Aprotinin korrelierte positiv mit der minimalen Urin-Natriumkonzentration ( $r = 0,49$ ;  $r^2 = 0,24$ ;  $p = 0,06$ ), mit der Plasma-Harnstoffkonzentration ( $r = 0,50$ ;  $r^2 = 0,25$ ;  $p = 0,06$ ) und signifikant mit der Aprotininkonzentration im Urin ( $r = 0,70$ ;  $r^2 = 0,49$ ;  $p = 0,008$ ).

## 4 Diskussion

### 4.1 Nephropathisches Mausmodell

#### 4.1.1 Zusammenfassung

Durch einmalige Injektion von Doxorubicin konnte im murinen Organismus ein nephrotisches Syndrom induziert und dessen Verlauf über 30 Tage untersucht werden. Es zeigten sich zwei Verlaufsformen, die sich im Schweregrad der Symptomatik unterschieden: eine milde Form mit nicht-nephrotischer Proteinurie und eine ausgeprägte Form, bei der sich das Vollbild des nephrotischen Syndroms mit nephrotischer Proteinurie entwickelte. So konnte die gesamte Bandbreite an Symptomen und laborchemischen Veränderungen, wie sie beim nephrotischen Syndrom des Menschen auftreten [6], im Tiermodell studiert werden. In dieser Studie zeigte sich bei Überschreiten einer Proteinurieschwelle von 120 mg/mg crea das Vollbild des nephrotischen Syndroms mit massiver Gewichtszunahme um  $19,8 \pm 3,5$  % in Form von Ödemen und Aszites, Hypoproteinämie mit Abfall der Albuminkonzentration im Plasma um 76 % und sichtbarer Hyperlipidämie. Begleitet wurde dies von einer ausgeprägten Natriumretention, unter der der Urin zwischenzeitlich nahezu natriumfrei war. Die Plasmin(ogen)ausscheidung setzte zeitgleich mit der Proteinurie ein und stieg auf mehr als das 1000-Fache innerhalb von acht Tagen. Parallel zur Proteinurie entwickelte sich anschließend eine konstante Plasmin(ogen)urie. Im Plasma fiel die Plasmin(ogen)konzentration innerhalb von zehn Tagen auf 26 % ihres Ausgangswertes. Die Serinproteaseaktivität im Urin stieg innerhalb von zehn Tagen auf  $5,0 \pm 1,1$  OD/60min\*1000 an. Diese Veränderungen waren begleitet von einem kontinuierlichen Anstieg der Harnstoffkonzentration im Plasma über 30 Tage sowie einer signifikanten Reduktion der medianen Überlebensrate. Im Gegensatz dazu zeigten sich bei den Tieren mit nicht-nephrotischer Proteinurie durchweg signifikant geringere

Veränderungen der klinischen und laborchemischen Parameter. Passend dazu zeigte die Höhe der Proteinurie eine starke Korrelation mit der Ausprägung der für das nephrotische Syndrom charakteristischen Parameter.

Vergleichbare Ergebnisse zeigten sich auch in vorangegangenen Studien zu diesem Mausmodell [12, 13], wobei durch höhere Doxorubicin-Dosierungen (7,80 µg/g KG) zusätzlich ein akutes Nierenversagen mit rapidem Harnstoff- und Kaliumanstieg im Plasma ausgelöst werden konnte [12].

Im Gegensatz zu dieser Studie zeigte sich in Studien mit induzierten Ratten [11, 96] eine permanente Gewichtsabnahme ohne aufgelagerten Gewichtsspeak über mehrere Wochen hinweg. Die Ursache dafür könnte das fehlende Überschreiten einer Proteinurieschwelle als entscheidender Auslöser für eine transiente Gewichtszunahme durch Volumenretention sein. Die Proteinuriewerte lagen bei den Studien mit Ratten [11, 96] deutlich unterhalb des ermittelten Schwellenwertes von 120 mg/mg crea. Diese Beobachtungen passen dazu, dass auch beim Menschen erst das Überschreiten einer Proteinurieschwelle zur Auslösung des nephrotischen Syndroms führt [6].

Ungeklärt bleibt, weshalb im verwendeten Mausmodell auf die Phase der Natriumretention eine exzessive Natriumausscheidung mit spontaner und kompletter Rückbildung der Ödeme um Tag 14 trotz fortbestehender Proteinurie erfolgt. Dieser paradoxe Verlauf zeigte sich auch im toxischen Tiermodell anderer Studien [13, 97], während der Langzeitverlauf und die zugrundeliegenden Mechanismen in anderen Arbeiten [98, 99] nicht untersucht wurden. Dieses Phänomen scheint jedoch nur im experimentellen nephrotischen Syndrom bei Nagern vorzukommen [13] und könnte möglicherweise ein verspäteter endogener Kompensationsmechanismus sein, der beispielsweise durch eine Selbstinhibition des ENaC bei erhöhten intrazellulären Natriumkonzentrationen [26] oder durch Veränderungen in der Zusammensetzung der Proteinurie [28] ausgelöst wird.

#### 4.1.2 Experimentelle Tiermodelle zur Induktion des nephrotischen Syndroms

Vorteile des verwendeten Doxorubicin-vermittelten Mausmodells sind die einfache Handhabbarkeit durch die einmalige Injektion zur Induktion sowie dessen gute Reproduzierbarkeit. Zudem ist das Modell bei Mäusen sehr gut untersucht und könnte zukünftig – im Gegensatz zu Ratten – die Möglichkeit für Studien mit spezifischen Knockout-Mäusen bieten [11]. Als problematisch wurde die Gewebedestruktion durch toxisches Paravasat beschrieben, die bei Injektion in die Vena caudalis mediana im Schwanz der Maus technisch bedingt gehäuft vorkam [11] und in dieser Studie durch gezielte retrobulbäre Injektion extrem selten beobachtet wurde. Andere Nebenwirkungen durch Doxorubicin wie Kardiomyopathie und Herzinsuffizienz konnte bei Mäusen und Menschen erst bei deutlich höheren kumulativen Dosierungen beobachtet werden [11]. Zudem wurde eine geringe Wirkungsbreite von Doxorubicin ( $\pm 0,5 \mu\text{g/g KG}$ ) bei Mäusen beschrieben [11]. Schon bei geringgradiger Unterdosierung bleibt die Modellinduktion vollständig aus, während eine geringgradige Überdosierung ein akutes Nierenversagen auslösen kann. Das divergente Ansprechen auf Doxorubicin könnte durch eine genetisch bedingte variable Suszeptibilität bedingt sein, die durch einen Defekt auf dem DOXNPH-Gen auf Chromosom 16 entsteht. Die Expression des Enzyms Prmt 7 ist bei den Mäusen erhöht, die vor der Entwicklung der Nephropathie geschützt sind, und könnte so als molekularer Marker für die Empfindlichkeit auf Doxorubicin dienen [100]. Unter Berücksichtigung vorangegangener Studien [12, 13] und eigener Vorversuche erwiesen sich  $7,25 \mu\text{l/g KG}$  bei Männchen und  $6,80 \mu\text{l/g KG}$  bei Weibchen als verlässlichste Dosis zur Induktion des Mausmodells bei dem hier verwendeten Mausstamm.

Das nephrotische Syndrom durch toxische Podozytenschädigung ist darüber hinaus durch einmalige Injektion des Aminonukleosid-Antibiotikum Puromycin (sog. puromycin aminoglycosid nephrosis, PAN) induzierbar. Dabei entwickelten die induzierten Ratten innerhalb von sechs Tagen eine Proteinurie

von durchschnittlich 70 mg/mg crea und histologische Veränderungen im Sinne einer FSGS und Minimal-Change-Glomerulopathie [15, 101-103], während Mäuse eine Resistenz gegenüber der Modellinduktion mittels Puromycin zeigten [104]. Andere Mausmodelle, wie die 5/6-Nephrektomie mit kontralateraler totaler Nephrektomie [101], sind auf Grund des Mechanismus der Nierenschädigung und dem daraus resultierenden Charakter der Proteinurie äußerst artifiziell. Daher ist auch die Wirksamkeit neuer Therapieoptionen auf Grundlage dieser Modelle nur schwer auf den Menschen übertragbar.

#### **4.1.3 Entstehung der Volumenretention beim nephrotischen Syndrom**

Die Overfill- und die Underfill-Theorie sind die zwei aktuell vorherrschenden Hypothesen, die den Zusammenhang zwischen Proteinurie und Natrium- bzw. Volumenretention beim nephrotischen Syndrom erklären [16].

Die Ergebnisse dieser Studie aus dem Verlauf des nephropathischen Mausmodells unterstützen vorwiegend die Overfill-Hypothese. Die Natriumretention setzte bei beiden Verlaufsformen simultan mit dem Auftreten der Proteinurie ein. Demnach ist eine direkte Kanalaktivierung durch Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit durch bestimmte Bestandteile der Proteinurie wahrscheinlicher. Gemäß der Underfill-Hypothese wären längere Latenzen – teilweise über Tage hinweg – durch eine kompensatorische RAAS-Aktivierung zu erwarten. Dabei würde die Natriumretention vorwiegend über eine hormonell vermittelte Steigerung der tubulären ENaC-Expression stimuliert werden [21, 105].

Für die Overfill-Theorie spricht auch, dass sich das Vollbild des nephrotischen Syndroms erst bei Überschreiten der Proteinurieschwelle von 120 mg/mg crea ausbildete. Dies lässt vermuten, dass erst bei massiv erhöhter Permeabilität des glomerulären Filters auch bestimmte hochmolekulare Plasmabestandteile filtrierte werden, die eine hochgradige Natrium- und Volumenretention auslösen. Zu klären bleibt, warum bei den Mäusen mit nicht-nephrotischer Proteinurie



trotzdem eine – wenn auch geringgradige – Natrium- und Volumenretention zu beobachten war.

Als weiterer Hinweis für die Overfill-Hypothese gilt die negative Korrelation zwischen der Proteinurie und der Hämoglobinkonzentration bzw. dem Hämatokrit. Erniedrigte Hämoglobin- und Hämatokrit-Werte treten bei einer intravasalen Volumenexpansion auf [106] und deuten auf ein überfülltes Gefäßbett in Folge einer primären Volumenretention hin.

Dass der Serinproteaseinhibitor Aprotinin die Natrium- und Volumenretention nahezu vollständig verhindern konnte, gilt ebenfalls als wichtiges Indiz für die kausale Bedeutung der Serinproteasen im Urin bei der Entstehung des nephrotischen Syndroms.

Auch die Ergebnisse diverser klinischer Studien befürworteten die Overfill-Theorie. Eine Studie mit Kindern mit kongenitaler Analbuminämie zeigte, dass nur eine Minderheit der Betroffenen Ödeme entwickelte [16, 107]. In einer anderen Studie mit Kindern, die sich unter Kortison-Therapie in Remission vom nephrotischen Syndrom befanden, trat eine Natriuresis trotz anhaltender Hypoalbuminämie auf [16, 108]. Die Einleitung einer Therapie mit Albumininfusionen bei nephrotischen Patienten führte zu einer Steigerung des Plasmavolumens mit konsekutiver Supprimierung der Renin- und Aldosteronspiegel, jedoch ohne die Natriumausscheidung zu beeinflussen [16, 109]. Die mit radioaktivem Albumin gemessene Plasmavolumina waren bei 98 % der nephrotischen Patienten normal oder erhöht [16, 110]. Durch die Therapie nephrotischer Patienten mit Spironolacton [111] oder Captopril [112] konnte die renale Natriumelimination nicht beeinflusst werden [16]. In experimentellen Studien mit PAN-nephrotischen Ratten entwickelten die Tiere nach Adrenalectomie trotz Abwesenheit von Aldosteron im Plasma eine ausgeprägte Natriumretention [16, 98]. Durch eine unilaterale Puromycin-Injektion in die Arteria renalis entwickelte sich nur in der betroffenen Niere eine Proteinurie und eine gesteigerte distal-tubuläre Natriumretention, die folglich unabhängig von systemischen Faktoren wie der Albumin- oder Aldosteronkonzentration im Plasma war [16, 113]. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Volumenretention bei PAN-nephrotischen Ratten auf die

Applikation von Amilorid rückläufig war, während die Gabe von Kaliumcanrenoat keinen Einfluss auf Natriumretention oder Aszites hatte [15, 16]. Bei Laborwertveränderungen gemäß der Overfill-Hypothese zeigten sich insbesondere histologische Veränderungen im Sinne einer chronischen Glomerulonephritis [114] oder FSGS [115] mit Steroidresistenz, die auch zu den beschriebenen histologischen Veränderungen des verwendeten Mausmodells passen [12, 13].

Parallel dazu gibt es aber auch Ergebnisse dieser Studie, die für die Underfill-Hypothese sprechen. Die Albuminkonzentration im Plasma nahm bei den nephrotischen Tieren an Tag 10 um 76 % des Kontrollwertes ab. Die Höhe der Proteinurie korrelierte signifikant negativ mit der Albuminkonzentration im Plasma. Die Plasma-Aldosteronkonzentration war an Tag 10 bei den nephrotischen Tieren signifikant höher als bei gesunden Tieren, sodass zu diesem Zeitpunkt möglicherweise eine systemische Kompensation der Hypovolämie stattfindet. Dies wurde für das Doxorubicin-induzierte nephrotische Syndrom bereits nachgewiesen [13].

In klinischen Studien konnte ebenfalls eine verstärkte RAAS- [16, 116, 117], ADH- oder Sympathikusaktivierung [1] nachgewiesen werden. Bei nephrotischen Patienten zeigten sich bei ausgeprägter Natriumretention erniedrigte Blutvolumina, Albumin- und ANP-Konzentrationen im Plasma [118]. Unter natriumreicher Diät entwickelten nephrotische Patienten im Gegensatz zur Kontrollgruppe eine ausgeprägte Natriumrückresorption, die anschließend unter Spironolacton-Therapie komplett rückläufig war. Aldosteron scheint insbesondere bei nephrotischen Individuen mit schwerer Hypalbuminämie von unter 1,7 g/dl (Referenzbereich: 3,5 – 5,2 g/dl [119]) eine Rolle bei der Natriumretention zu spielen [118, 120]. Bei Laborwertveränderungen gemäß der Underfill-Hypothese zeigten sich vorwiegend histologische Auffälligkeiten im Sinne einer Minimal-Change-Glomerulopathie mit Steroidresponsivität [114].

Zusammenfassend scheinen sowohl die Mechanismen der Overfill- als auch der Underfill-Theorie zur Entwicklung der Natrium- und Volumenretention

beizutragen. Dabei spielen beide Mechanismen wahrscheinlich sogar parallel bzw. in unterschiedlichen Stadien einer Krankheitsentität eine Rolle. Zukünftig könnten deshalb im klinischen Kontext laborchemische Bestimmungen wie beispielsweise Albumin-, Renin- oder Aldosteronkonzentration im Plasma und histopathologische Untersuchungen Hinweise auf Therapieoptionen und Prognose des nephrotischen Syndroms geben [16, 19, 114, 115].

#### **4.1.4 Natriumretention und ENaC-Aktivierung**

Im verwendeten Mausmodell imponierte eine massive Natriumretention direkt nach Einsetzen der Proteinurie. Die Natriumkonzentration im Urin nephrotischer Mäuse fiel von  $362 \pm 36 \mu\text{mol/mg crea}$  am Kontrolltag auf  $9 \pm 2 \mu\text{mol/mg crea}$  an Tag 7. Die hochgradige Variabilität in der finalen Urinzusammensetzung macht eine distal-tubuläre Lage sowie eine ausgeprägte Regulierbarkeit der verantwortlichen Kanäle wahrscheinlich [21]. Die Natriumretention fand bei nephrotischen Ratten vorwiegend in den renalen Sammelrohren statt und dessen Ausmaß blieb durch chemische Medullektomie unbeeinflusst [15]. Somit scheinen die kortikalen Sammelrohre die Hauptlokalisation für die Regulation der Natriumausscheidung zu sein [1]. Bei Mikroperfusionsstudien mit isolierten kortikalen Sammelrohren konnte demonstriert werden, dass die transepitheliale Natriumreabsorption bei PAN-nephrotischen Ratten deutlich erhöht und amiloridsensitiv war [15]. Immunhistochemische und Patch-Clamp-Untersuchungen zeigten, dass der ENaC in den kortikalen Sammelrohren bei nephrotischen Tieren äußerst stark exprimiert [1] und hochaktiv [121] ist. So konnte nachgewiesen werden, dass eine übermäßige ENaC-Aktivität in den kortikalen Sammelrohren für die massive Natriumretention beim nephrotischen Syndrom verantwortlich ist.

Die Aktivierung dieser Kanäle ging jedoch nicht mit einer erhöhten Transkription der ENaC-kodierenden Genabschnitte einher [121]. Vielmehr wurde gezeigt, dass sich die ENaC-Ströme unter Exposition mit dem Urin nephrotischer Ratten und mit Chymotrypsin mehr als verfünffachten. Die Aktivierung konnte durch Zugabe von Amilorid oder Aprotinin unterbunden werden [27].

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass mit der Proteinurie auch eine 1000-fach erhöhte Plasmin(ogen)urie einsetzte und eine deutlich erhöhte Serinproteaseaktivität im Urin nachweisbar war.

Auch in anderen Studien war die Serinproteaseaktivität im Urin nephrotischer Ratten bei Einsetzen der Proteinurie im Vergleich zu Kontrolltieren zehnfach erhöht und Plasminogen und Plasmin im Western Blot detektierbar [27]. Der Urin enthielt 8-fach erhöhte Plasminogenkonzentrationen im Vergleich zu gesunden Ratten [122]. Bei Patienten konnten ebenfalls erhöhte Urin-Plasminogenkonzentration beim nephrotischen Syndrom [122-124] und anderen glomerulär-proteinurischen Erkrankungen [16] nachgewiesen werden. Untersuchungen bei nephrotischen Patienten zeigten eine um das 23-Fache erhöhte Plasmin(ogen)konzentration im Urin verglichen mit der Konzentration nach vollständiger Remission [16, 125].

Zusammenfassend lassen diese Ergebnisse vermuten, dass Plasminogen und Plasmin in einer intakten Niere nur in geringem Maße filtriert werden und erst als Komponenten der massiven Proteinurie bei geschädigter glomerulärer Filtrationsbarriere in relevanten Mengen im Tubulus erscheinen und mit dem Urin ausgeschieden werden.

Filtriertes Plasminogen kann dann durch die membranständige Urokinase im Tubuluslumen in seine aktive Form Plasmin umgewandelt werden [16, 27, 122] und die ENaC-Aktivität steigern. Durch Plasmin konnte der amilorid-sensitive Strom in ENaC-exprimierenden Oozyten über 30 Minuten hinweg um das 3,5-Fache erhöht werden [122]. Auch der Natriumeinstrom in isolierte ENaC-exprimierende murine Sammelrohrzellen wurde durch Plasmin erhöht und durch gezieltes Ausschalten der  $\gamma$ -Untereinheit durch siRNA wiederum gehemmt. Auch durch Zugabe von nephrotischem Urin wurde der Natriumeinstrom erhöht und durch die selektiven Plasmininhibitoren Pefabloc PL und  $\alpha_2$ -Antiplasmin gehemmt [27]. Plasmin scheint also die Schlüsselprotease zur tubulären ENaC-Aktivierung beim nephrotischen Syndrom zu sein, jedoch fehlen bisher weitere Studien, um die Erkenntnisse aus den *in vitro*-Untersuchungen auf die Tubuluszellen *in vivo* übertragen zu können. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen zwar, dass Plasmin(ogen)

zeitgleich mit der Proteinurie und Entwicklung des nephrotischen Syndroms in großem Ausmaß im Urin erscheint, jedoch bleibt weiterhin nicht geklärt, ob es *in vivo* wirklich einen Kausalzusammenhang zwischen Plasmin und der Natriumretention gibt.

Unter experimentellen Bedingungen konnte auch für diverse andere Serinproteasen, wie Prostasin [22], TMPRSS4, Matriptase, Trypsin, Chymotrypsin [21], Kallikrein [35] und neutrophile/pankreatische Elastase gezeigt werden, dass sie die  $\gamma$ -Untereinheit distal der Furinschnittstelle spalten und dadurch den ENaC aktivieren [16, 26, 27, 33, 62, 63, 122]. Es wäre aber auch möglich, dass Plasmin die ENaC-Aktivität *in vivo* über die Aktivierung anderer Serinproteasen im Sinne einer proteolytischen Kaskade mit multiplen Komponenten – analog zur Gerinnungskaskade – steigert [16]. Diesbezüglich konnte gezeigt werden, dass die Proteolyse der  $\gamma$ -Untereinheit durch Plasmin in niedriger Konzentration indirekt über Prostasin vermittelt wird [31-33]. Denkbar wäre auch, dass Prostasin die Plasminbindung an den ENaC erleichtert oder dass es durch Plasmin in seine aktive Form umgewandelt wird [16].

## 4.2 Inhibition von Serinproteasen

### 4.2.1 Inhibition der Serinproteaseaktivität *in vitro*

Ziel dieser Arbeit war es, die Entwicklung des nephrotischen Syndroms durch pharmakologische Hemmung der Serinproteasen im Urin zu beeinflussen. Dazu wurden zunächst die Wirkstärken der ausgewählten Inhibitoren bei der Hemmung der Proteaseaktivität *in vitro* untersucht. Aprotinin und Antiplasmin zeigten fast identisch hohe Wirkstärken, weshalb wahrscheinlich der Hauptanteil der gemessenen Proteaseaktivität der amidolytischen Aktivität von Plasmin entspricht. Eine vergleichbare Hemmung durch Camostat konnte erst bei weitaus höheren Konzentrationen erreicht werden, sodass Camostat eine niedrigere Affinität zu Plasmin zu haben scheint und somit niedrigpotenter ist.

Die signifikant verschiedenen Hemmkonzentrationen zwischen der Zugabe von nephrotischem Urin und aufgereinigtem Plasmin könnten daraus resultieren, dass Camostat eine veränderte Wirksamkeit im Urinmilieu besitzt oder dass es im nephrotischen Urin zusätzlich andere Proteasen inhibiert, die der Detektion durch S-2251<sup>TM</sup> entgehen. In der Literatur sind vergleichbare IC<sub>50</sub>-Werte für die Plasmininhibition (IC<sub>50</sub>-Aprotinin = 15 nM [126], IC<sub>50</sub>-Camostat = 2620 nM [127]) zu finden.

Mit Tranexamsäure erfolgte *in vitro* keine Hemmung der Serinproteaseaktivität. Dies beruht aller Wahrscheinlichkeit darauf, dass der Inhibitor seine Wirkung nicht über die Bindung an das aktive Zentrum von Plasmin vermittelt. Plasmin kann das chromogene Substrat dann trotzdem hydrolysieren und das photometrische Signal erzeugen [24, 128]. Die Wirkstärke von Tranexamsäure konnte deshalb nicht anhand der Serinproteaseaktivität beurteilt werden. Dies schließt theoretisch eine mögliche Wirksamkeit *in vivo* theoretisch nicht aus.

#### 4.2.2 Subkutane Applikation von Serinproteaseinhibitoren

Nach subkutaner Injektion von gelöstem Aprotinin, Camostat und Tranexamsäure konnte die Serinproteaseaktivität im Urin nephrotischer Tiere gehemmt werden. Unter Aprotinin und Tranexamsäure hielt diese Inhibition kürzer als 24 Stunden und unter Camostat mindestens 24 Stunden an.

Für alle drei Inhibitoren sind in der Literatur systemische Effekte bei subkutaner Injektion in gelöster Form vorbeschrieben [129-132], jedoch waren in allen Studien die wirksamen Medikamentenspiegel entweder durch höhere Dosierungen bei der Applikation oder durch mehrmals tägliche Injektionen vermutlich deutlich höher als in den hier durchgeführten Experimenten. Für Aprotinin ist beispielsweise bekannt, dass dessen kurze Halbwertszeit einen *in vivo*-Einsatz des Medikamentes erheblich erschwert [66].

### 4.2.3 Intraperitoneale Applikation von emulgierten Serinproteaseinhibitoren

Um die Halbwertszeiten der Inhibitoren zu verlängern, wurden sie in Form von Emulsionen intraperitoneal injiziert. Dadurch konnte eine einfache Applikationsweise beibehalten werden, ohne das Löslichkeitsprodukt der Inhibitoren zu überschreiten. Die simulierte Eliminationskinetik der Wasser-in-Öl-Emulsionen bei gesunden Mäusen zeigte, dass emulgiertes FITC-Inulin innerhalb weniger Stunden nach Injektion in hohem Ausmaß renal eliminiert wurde. Innerhalb von 24 Stunden fiel das Signal im Urin wieder deutlich ab und war anschließend mit verzögertem Abfall über mehrere Tage deutlich messbar. Mit der erhobenen Simulationskinetik vereinbar, beobachteten Bjerregaard et al. eine verzögerte Aprotininfreisetzung aus der Emulsion ins Plasma über 96 Stunden hinweg. Die maximale Plasmakonzentration von Aprotinin wurde nach zehn Minuten und erneut nach zwölf Stunden erreicht [66].

In dieser Studie imponierte bei der erhobenen Freisetzungskinetik der Emulsionen am ehesten ein biphasischer Signalabfall, der einer Eliminationskinetik zweiter Ordnung entspricht. Typischerweise folgt bei kugelförmigem Wirkstoffeinschluss auf eine initiale Substanzfreisetzung eine weitere Freisetzung aus dem Matrixsystem im Sinne des Quadratwurzelgesetzes [133]. Die initiale Freisetzung kann dadurch begründet sein, dass ein Teil des Wirkstoffes unzureichend eingeschlossen ist oder durch Lakunen im Peritoneum direkt in die Lymphbahn und somit in das venöse System gelangt [134]. Der Graph nimmt dabei einen hyperbolischen Verlauf, dessen Linearisierung durch Logarithmierung beider Koordinatenachsen erfolgt [133]. Passend dazu zeigten auch die Untersuchungen von Bjerregaard et al., dass der Verlauf der Aprotininfreisetzung in das umgebende Medium *in vitro* einer Quadratwurzelfunktion entspricht [66].

Aus den Vorversuchen mit FITC-Inulin abgeleitet, wurden Doxorubicin-induzierten Mäusen je 400 µl der Emulsion mit Placebo, Aprotinin, Camostat oder Tranexamsäure im fünftägigen Intervall intraperitoneal verabreicht. Dabei zeigte sich, dass die für das nephrotische Mausmodell charakteristische

Gewichtszunahme in allen Gruppen jeweils an den Tagen post injectionem passager unterbrochen wurde. Dies ging mit einer gleichzeitigen signifikanten Abnahme des Futterkonsums einher. Die intermittierende Gewichtsabnahme könnte demnach durch Inappetenz bedingt gewesen sein, die durch die intraperitoneale Ansammlung von Emulsion nach der Injektion ausgelöst wurde. Negative Auswirkungen dieser Emulsionen auf das Gewicht sind in der Literatur bisher nicht vorbeschrieben, jedoch besteht bei intraperitonealer Substanzapplikation generell eine erhöhte Gefahr für Peritonitis, Ileus und intraperitoneale Adhäsionen [134]. Unter diesem Therapieregime hatte die Intervention keinen Effekt auf die Ödementstehung oder Natriumretention. Die gemessenen Aprotininkonzentrationen im Urin einer behandelten Maus schienen ausreichend hoch, um die amidolytische Urinaktivität theoretisch zu hemmen. Diese Hemmung konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Ursächlich könnte eine über mehrere Tage zu niedrige Urinkonzentration der Inhibitoren bei initial peakförmiger Inhibitorausscheidung sein.

#### **4.2.4 Subkutane Implantation von Pellets mit Serinproteaseinhibitoren**

Um konstant hohe Urinkonzentrationen der Inhibitoren über den Studienzeitraum zu gewährleisten, wurden sie letztlich mittels subkutan implantierter Pellets der Firma „Innovative Research of America“ appliziert. Die Pellets garantieren eine konstante Substanzfreisetzung analog einer Kinetik nullter Ordnung [70].

#### *Wirkung der Serinproteaseinhibitoren auf das nephrotische Syndrom*

Während die Ödementwicklung in der Placebo-, Camostat- und Tranexamsäuregruppe entsprechend dem charakteristischen Gewichtsverlauf des nephrotischen Mausmodells erfolgte, blieb sie in der Aprotinigruppe nahezu komplett aus. In dieser Gruppe fehlte auch die charakteristische Natriumretention, die in den anderen drei Gruppen dem Modellverlauf



entsprechend auftrat. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass der Serinproteaseinhibitor Aprotinin trotz Induktion des nephrotischen Syndroms vor der renalen Natriumretention schützt und die massive Gewichtszunahme durch Volumenretention verhindert.

Die Serinproteaseaktivität im Urin, die im nephrotischen Mausmodell sowie unter Placebo-, Camostat- und Tranexamsäurebehandlung deutlich erhöht war, konnte durch Aprotinin nahezu vollständig inhibiert werden. Dadurch konnte jedoch nicht abschließend geklärt werden, ob diese Hemmung ein unabhängiger Nebeneffekt oder die Ursache für die ausbleibende ENaC-Aktivierung durch Plasmin ist.

Neben Plasmin hemmt Aprotinin auch andere endogene Serinproteasen, die entweder an der physiologischen proteolytischen ENaC-Aktivierung beteiligt sind oder bei proteinurischen Erkrankungen aberrant filtriert werden und den ENaC spalten können [135]. Mögliche Kandidaten der physiologischen ENaC-Regulation [20] sind das tubulusständige Gewebekallikrein [35] und Prostasin [22, 136]. Ähnlich wie Plasmin hemmt Aprotinin auch Kallikrein (MW: 86 kDa) und Prostasin (MW: 40 kDa,  $IC_{50} = 1,8 \text{ nM}$ ) hochaffin [29, 49]. In weiteren Studien sollte geklärt werden, über welche Serinprotease oder Proteasenkaskade die ENaC-Aktivierung vermittelt und durch Aprotinin inhibiert wird. Die Anwendung des nephrotischen Modells an Plasminogen-, Urokinase- oder Kallikrein-Knockout-Mäusen könnte zukünftig Aufschluss über die genauen Mechanismen und involvierten Proteasen geben.

In dieser Studie konnte mit den Inhibitoren Camostat und Tranexamsäure im Gegensatz zu Aprotinin kein Effekt auf die Natriumretention und die Ödementwicklung erzielt werden. Dafür könnten zu geringe Konzentrationen der beiden Inhibitoren im Urin verantwortlich sein.

Studien an Ratten haben gezeigt, dass intravenös appliziertes radioaktiv markiertes Camostat rasch durch esterasenvermittelte Hydrolyse hepatisch metabolisiert wird. Dabei entstehen 4-(4-Guanidinobenzoyloxy)-

phenylelessigsäure (GBPA), welches eine ähnliche Proteaseinhibitoraktivität wie Camostat hat, und das inaktive 4-Guanidinbenzoesäure (GBA). GBPA wird anschließend größtenteils zu GBA umgewandelt. Etwa 80 % der applizierten radioaktiven Camostatmenge wurden – hauptsächlich in Form des inaktiven GBA – innerhalb von 24 Stunden renal eliminiert. Im Urin entfiel nur ca. 10 % der Radioaktivität und ca. 12 % der Gesamtmenge in der Chromatographie auf den aktiven Metaboliten GBPA [48], sodass die fehlende Wirksamkeit von Camostat in dieser Studie am ehesten auf zu geringe Urinkonzentrationen aktiver Metabolite unter Pelletapplikation zurückzuführen ist. Im Gegensatz dazu zeigte sich in dieser Arbeit bei subkutaner Applikation von sehr hohen Camostatdosen ein hemmender Effekt auf die Serinproteaseaktivität im Urin. Einige Studien an Ratten zeigten außerdem systemische Effekte unter Camostat. Dabei war die tägliche Freisetzungsmenge aus den implantierten Pellets bezogen auf die Körperoberfläche stets höher als in dieser Studie. Camostat vermittelte eine antiproteinurische Wirkung [4, 20] und eine verzögerte Progression des chronischen Nierenversagens über eine Verminderung des glomerulären Schadens [4]. Bei Patienten verhinderte Camostat die Entwicklung eines Hypertonus unter hoher Natriumzufuhr und reduzierte die Volumenretention bei fortgeschrittener diabetischer Nephropathie [33]. Des Weiteren verhinderte Camostat bei Ratten die aldosteroninduzierte proteolytische Spaltung der  $\gamma$ ENaC-Untereinheit [137]. Auch die Kallikrein- [138] und Prostasinaktivität [49] im Urin konnte *in vitro* gehemmt werden, sodass eine Wirksamkeit des unspezifischen Serinproteaseinhibitors Camostat über diese beiden Proteasen nicht ausgeschlossen ist.

Ein wirksamer Konzentrationsbereich für Tranexamsäure im Urin war in dieser Studie bei fehlender Inhibition der Serinproteaseaktivität *in vitro* nur schwer abzuschätzen. Auch bei Tranexamsäure könnte eine zu geringe Urinkonzentration die fehlende Wirksamkeit auf Natriumretention und Gewichtszunahme erklären.

In einer deutlich höheren Dosierung hemmte Tranexamsäure die fibrinolytische Aktivität der Urokinase und reduzierte damit die Inzidenz von postoperativen Blutungen im Harnsystem [139]. Paradoxe Weise wurde in einer anderen Studie gezeigt, dass Tranexamsäure in hoher Konzentration die Aktivierung von Plasminogen sogar deutlich steigert [140]. Die Eingrenzung der optimalen Tranexamsäuredosis im verwendeten Mausmodell fiel dadurch schwer. Da Tranexamsäure kein Inhibitor des aktiven Zentrums von Plasmin ist, könnte Plasmin trotz Hemmung seiner fibrinolytischen Aktivität noch seine proteolytische Wirkung auf den ENaC entfalten. Die fehlende Beeinflussung des charakteristischen Modellverlaufs durch die plasminspezifische Tranexamsäure könnte jedoch auch ein weiterer Hinweis darauf sein, dass die ENaC-Aktivierung durch eine andere Serinprotease als Plasmin vermittelt wird.

#### Führende unerwünschte Arzneimittelwirkungen der Serinproteaseinhibitoren

Zur Überwachung eventuell auftretender Nebenwirkungen der Inhibitoren wurden unter Therapie diverse Plasmaparameter, wie die Natrium-, Kalium-, Bikarbonat-, Harnstoffkonzentration und der pH-Wert überwacht. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Placebogruppe und den Inhibitorgruppen. Für Aprotinin lagen die Plasmakonzentrationen in allen Versuchen maximal im Bereich der Plasmakonzentrationen von aprotininbehandelten Patienten [141], was thrombogene Ereignisse bei den verwendeten Dosierungen eher unwahrscheinlich macht. Ebenso zeigte sich in dieser Studie klinisch kein Anhalt für Thrombosen, Krampfanfälle oder gastrointestinale Nebenwirkungen. Die mögliche thrombogene Wirkung der Inhibitoren im experimentellen Mausmodell könnte zukünftig mit Hilfe von Ex Vivo Clot Lysis-Messungen [142-144] überwacht werden.

Die für Aprotinin vorbeschriebenen renalen Komplikationen beim Menschen [45, 46] konnten bei Applikation von 2 mg/d nachvollzogen werden. Hierunter entwickelten die Mäuse innerhalb weniger Tage ein akutes Nierenversagen mit Anstieg der Harnstoffwerte im Plasma und massivem Gewichtsverlust. Ursache könnte eine übermäßige ENaC-Inhibition und ein daraus resultierender

ausgeprägter Natrium- und Volumenverlust sein, der zu einem Nierenversagen prärenal Genese führt.

### Dosisresponsivität auf Aprotinin

Die Aprotininkonzentration im Urin stieg innerhalb von 24 Stunden nach Pelletimplantation auf die maximale Urinkonzentration an, die mit der applizierten Aprotinindosis signifikant korrelierte. Anschließend fiel sie innerhalb von 1 – 3 Tagen wieder deutlich ab.

Unter aufsteigenden Aprotininkonzentrationen im Urin konnte zunächst eine dosisabhängige Inhibition der Serinproteaseaktivität *in vitro* erreicht werden. Unter höheren Aprotininkonzentrationen gelang dann auch eine Inhibition der Serinproteaseaktivität im Urin *in vitro* und anschließend eine Hemmung der Gewichtszunahme. Die Rechtsverschiebung der *in vivo*- zur *in vitro*-Inhibitionskurve ist einerseits dadurch zu erklären, dass *in vivo* eine tubuläre Urinkonzentrierung stattfindet. Andererseits bestehen *in vivo* optimale Bedingungen für Proteasen, beispielsweise hinsichtlich Temperatur und pH-Wert, weshalb *in vivo* höhere Aprotininhemmkonzentrationen erforderlich sind. Offen bleibt, weshalb bei Applikation von 0,5 mg/d zwar eine nahezu komplette *in vivo*-Hemmung der Serinproteaseaktivität erreicht wurde, der Effekt auf die Gewichtszunahme jedoch nur halbmaximal war. Bei Applikation von 0,25 mg/d wurden mehr als zwei Drittel der Aktivität und nur durchschnittlich 18 % der Gewichtszunahme gehemmt. Möglich wäre, dass erst bei fast vollständiger Plasminhemmung (> 85 %) die ENaC-Aktivierung und Volumenretention merklich gedrosselt wird. Es könnte aber auch ein weiterer Hinweis darauf sein, dass der Effekt auf die Gewichtszunahme durch eine andere Serinprotease oder Proteasekaskade als Plasmin vermittelt wird.

### 4.3 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass Aprotinin in der Lage ist, aberrant filtrierte Serinproteasen im Urin zu inhibieren und vor der charakteristischen Natrium- und Volumenretention beim nephrotischen Syndrom der Maus zu schützen.

Zukünftig könnte Aprotinin deshalb auch beim Patienten zur Therapie des nephrotischen Syndroms eingesetzt werden. Die bisherigen Therapieoptionen beruhen vor allem darauf, bereits vorhandene Ödeme auszuschwemmen oder – im Falle von Amilorid – auf einer direkten Blockierung des ENaC. Im Gegensatz dazu wirkt Aprotinin durch die Hemmung der Serinproteasen im Urin gezielt auf weit vorgeschaltete Prozesse in der Kausalkette zur Entstehung der Volumenretention. Durch den Einsatz von Aprotinin könnte eine unerwünschte Wirkung auf die basale ENaC-Aktivität verhindert werden, worauf beispielsweise die Entwicklung einer Hyperkaliämie als eine häufige Nebenwirkung von Amilorid im klinischen Alltag begründet ist.

Für einen sicheren klinischen Einsatz von Aprotinin wären noch weitere Untersuchungen zu den bekannten renalen Nebenwirkungen essentiell. Ebenso sollten zukünftig genaue Untersuchungen zur thrombogenen Potenz von Aprotinin bei nephrotischen Patienten erfolgen.

Im Falle von Camostat als unspezifischer Serinproteaseinhibitor ist unklar, warum die hemmende Wirkung auf die Serinproteaseaktivität im Urin und auf die Natrium- und Volumenretention ausbleibt. Weitere Untersuchungen zur genauen Pharmakokinetik mit Konzentrationsbestimmungen der Metaboliten im Urin könnten Aufschluss darüber geben. Eventuell könnte Camostat hierdurch künftig als ein weiterer wirkungsvoller Inhibitor zur Therapie des nephrotischen Syndroms akquiriert werden.

Es wäre äußerst erstrebenswert einen hochspezifischen Inhibitor der proteolytischen ENaC-Aktivierung zu entwickeln. Dadurch könnten Nebenwirkungen vermieden werden, die durch den Einsatz unspezifischer

Inhibitoren in Kauf genommen werden müssten. Dafür ist eine weitere Aufklärung der genauen Mechanismen der ENaC-Aktivierung durch Proteasen erforderlich. Ein besonderer Fokus wäre dabei auf die aktivierende Protease bzw. Proteasekaskade zu legen.

Um ein besseres Verständnis für die ENaC-Aktivierung durch Proteasen zu erlangen, sollte die ENaC-Expression mittels PCR, Western Blot und Immunhistochemie sowie die Funktionalität des Kanals mittels elektrophysiologischer Untersuchungen wie Patch-Clamp-Experimente analysiert werden.

Darüber hinaus könnten durch die Proteasehemmung im Tubulussystem möglicherweise tubulotoxische Effekte beseitigt werden, die das Fortschreiten einer proteinurischer Nierenerkrankung begünstigen. Hierzu wären Untersuchungen zur Proteasehemmung im Langzeitverlauf notwendig.

Zukünftig könnte auf Grundlage dieser Arbeit eine gezielte, nebenwirkungsarme Therapie der ENaC-Aktivierung entwickelt werden, die den aktuell verfügbaren Therapieoptionen überlegen ist und möglicherweise langfristig nephroprotektiv wirkt.

## 5 Zusammenfassung

Gemäß der Overfill-Hypothese wird die Volumenretention beim nephrotischen Syndrom durch die proteolytische Aktivierung des epithelialen Natriumkanals ausgelöst. Dabei scheinen aberrant filtrierte Serinproteasen, wie beispielsweise Plasmin, eine entscheidende Rolle zu spielen. Ziel dieser Arbeit war es, die Serinproteasen im Urin nephrotischer Mäuse zu hemmen und die Tiere dadurch vor einer Natrium- und Wasserretention zu schützen. Dazu wurde zunächst die Entwicklung charakteristischer klinischer und laborchemischer Veränderungen im proteinurischen Mausmodell untersucht und die Tiere anschließend mit den Serinproteaseinhibitoren Aprotinin, Camostat und Tranexamsäure behandelt.

Auf die einmalige Injektion von Doxorubicin entwickelten sich zwei unterschiedliche nephropathische Verlaufsformen. Bei der Form mit nephrotischer Proteinurie ( $> 120$  mg/mg crea) präsentierte sich das Vollbild des nephrotischen Syndroms mit massiver Gewichtszunahme, Hypoproteinämie, Hyperlipidämie und ausgeprägter Natriumretention. Bei Entwicklung einer nicht-nephrotischen Proteinurie ( $< 120$  mg/mg crea) waren diese charakteristischen Parameter deutlich milder ausgeprägt. Die Serinproteaseaktivität im Urin stieg bei beiden Formen innerhalb der ersten zehn Tage massiv an.

Die Behandlung der Mäuse erfolgte durch die subkutane Implantation von Inhibitor-Pellets. Durch Aprotinin konnte die Gewichtszunahme verhindert, die Natriumausscheidung normalisiert und die Serinproteaseaktivität im Urin nahezu vollständig inhibiert werden. Die Applikation von Camostat und Tranexamsäure hatten keinen Effekt auf diese Parameter.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Volumenretention im experimentellen nephrotischen Syndrom der Maus mit einer übermäßigen Plasminausscheidung und Natriumretention einhergeht. Durch die Behandlung mit dem Serinproteaseinhibitor Aprotinin konnten Natriumretention und Gewichtszunahme effektiv verhindert werden. Diese Ergebnisse implizieren, dass aberrant filtrierte Serinproteasen im Urin eine kausale Bedeutung für die Entwicklung der Natrium- und Volumenretention beim nephrotischen Syndrom haben.

## 6 Literaturverzeichnis

- 1 Svenningsen P., Skott O., Jensen B. L.: Proteinuric diseases with sodium retention: Is plasmin the link? *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2012; 39:117-124.
- 2 Ackermann H., Aden K., Aurich M., Becker G.: *AllEx - Alles fürs Examen: Das Kompendium für die 2. ÄP.* Stuttgart, Thieme, 2014.
- 3 Herold G.: *Innere Medizin 2013.* Köln, Herold, 2013.
- 4 Hayata M., Kakizoe Y., Uchimura K., Morinaga J., Yamazoe R., Mizumoto T., Onoue T., Ueda M., Shiraishi N., Adachi M., Miyoshi T., Sakai Y., Tomita K., Kitamura K.: Effect of a serine protease inhibitor on the progression of chronic renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol* 2012; 303:F1126-1135.
- 5 Zandi-Nejad K., Eddy A. A., Glassock R. J., Brenner B. M.: Why is proteinuria an ominous biomarker of progressive kidney disease? *Kidney Int Suppl* 2004:S76-89.
- 6 Mace C., Chugh S. S.: Nephrotic syndrome: components, connections, and angiopoietin-like 4-related therapeutics. *J Am Soc Nephrol* 2014; 25:2393-2398.
- 7 Gerok W.: *Die Innere Medizin: Referenzwerk für den Facharzt.* Stuttgart, Schattauer, 2007.
- 8 Hofmann V.: *Ultraschall Diagnostik in Pädiatrie und Kinderchirurgie: Lehrbuch und Atlas.* Stuttgart, Thieme, 2005.
- 9 Beck L. H., Jr., Bonegio R. G., Lambeau G., Beck D. M., Powell D. W., Cummins T. D., Klein J. B., Salant D. J.: M-type phospholipase A2 receptor as target antigen in idiopathic membranous nephropathy. *N Engl J Med* 2009; 361:11-21.
- 10 Tomas N. M., Beck L. H., Jr., Meyer-Schwesinger C., Seitz-Polski B., Ma H., Zahner G., Dolla G., Hoxha E., Helmchen U., Dabert-Gay A. S., Debayle D., Merchant M., Klein J., Salant D. J., Stahl R. A., Lambeau G.: Thrombospondin type-1 domain-containing 7A in idiopathic membranous nephropathy. *N Engl J Med* 2014; 371:2277-2287.
- 11 Pereira Wde F., Brito-Melo G. E., de Almeida C. A., Moreira L. L., Cordeiro C. W., Carvalho T. G., Mateo E. C., Simoes E. S. A. C.: The experimental model of nephrotic syndrome induced by Doxorubicin in rodents: an update. *Inflamm Res* 2015; 64:287-301.
- 12 Bohnert B. N., Daniel C., Amann K., Voelkl J., Alesutan I., Lang F., Heyne N., Haering H. U., Artunc F.: Impact of phosphorus restriction and vitamin D-substitution on secondary hyperparathyroidism in a proteinuric mouse model. *Kidney Blood Press Res* 2015; 40:153-165.
- 13 Artunc F., Nasir O., Amann K., Boini K. M., Haring H. U., Risler T., Lang F.: Serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 in doxorubicin-induced nephrotic syndrome. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; 295:F1624-1634.
- 14 Bertani T., Poggi A., Pozzoni R., Delaini F., Sacchi G., Thoua Y., Mecca G., Remuzzi G., Donati M. B.: Adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats: sequence of pathologic events. *Lab Invest* 1982; 46:16-23.



- 15 Deschenes G., Wittner M., Stefano A., Jounier S., Doucet A.: Collecting duct is a site of sodium retention in PAN nephrosis: a rationale for amiloride therapy. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12:598-601.
- 16 Ray E. C., Rondon-Berrios H., Boyd C. R., Kleyman T. R.: Sodium retention and volume expansion in nephrotic syndrome: implications for hypertension. *Adv Chronic Kidney Dis* 2015; 22:179-184.
- 17 Dong L., Wang H., Dong N., Zhang C., Xue B., Wu Q.: Localization of corin and atrial natriuretic peptide expression in human renal segments. *Clin Sci (Lond)* 2016; 130:1655-1664.
- 18 Polzin D., Kaminski H. J., Kastner C., Wang W., Kramer S., Gambaryan S., Russwurm M., Peters H., Wu Q., Vandewalle A., Bachmann S., Theilig F.: Decreased renal corin expression contributes to sodium retention in proteinuric kidney diseases. *Kidney Int* 2010; 78:650-659.
- 19 Radhakrishnan J., Glassock R., Fervenza F., A. L.: Pathophysiology and treatment of edema in patients with the nephrotic syndrome. <http://www.uptodate.com/contents/pathophysiology-and-treatment-of-edema-in-patients-with-the-nephrotic-syndrome#H1038562>; [Zugriff 18.01.2017].
- 20 Svenningsen P., Andersen H., Nielsen L. H., Jensen B. L.: Urinary serine proteases and activation of ENaC in kidney--implications for physiological renal salt handling and hypertensive disorders with albuminuria. *Pflugers Arch* 2015; 467:531-542.
- 21 Palmer L. G., Patel A., Frindt G.: Regulation and dysregulation of epithelial Na<sup>+</sup> channels. *Clin Exp Nephrol* 2012; 16:35-43.
- 22 Iwashita K., Kitamura K., Narikiyo T., Adachi M., Shiraishi N., Miyoshi T., Nagano J., Tuyen D. G., Nonoguchi H., Tomita K.: Inhibition of prostatic secretion by serine protease inhibitors in the kidney. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14:11-16.
- 23 Jacquillet G., Rubera I., Unwin R. J.: Potential role of serine proteases in modulating renal sodium transport in vivo. *Nephron Physiol* 2011; 119:p22-29.
- 24 Draxler D. F., Medcalf R. L.: The Fibrinolytic System-More Than Fibrinolysis? *Transfus Med Rev* 2014;
- 25 Offermanns S., Rosenthal W.: *Encyclopedia of Molecular Pharmacology*. Berlin/Heidelberg, Springer, 2008.
- 26 Warnock D. G., Kusche-Vihrog K., Tarjus A., Sheng S., Oberleithner H., Kleyman T. R., Jaisser F.: Blood pressure and amiloride-sensitive sodium channels in vascular and renal cells. *Nat Rev Nephrol* 2014; 10:146-157.
- 27 Svenningsen P., Bistrup C., Friis U. G., Bertog M., Haerteis S., Krueger B., Stubbe J., Jensen O. N., Thiesson H. C., Uhrenholt T. R., Jespersen B., Jensen B. L., Korbmayer C., Skott O.: Plasmin in nephrotic urine activates the epithelial sodium channel. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20:299-310.
- 28 Passero C. J., Hughey R. P., Kleyman T. R.: New role for plasmin in sodium homeostasis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2010; 19:13-19.
- 29 Yu J. X., Chao L., Chao J.: Prostatic is a novel human serine proteinase from seminal fluid. Purification, tissue distribution, and localization in prostate gland. *J Biol Chem* 1994; 269:18843-18848.

- 30 Aggarwal S., Dabla P. K., Arora S.: Prostatin: An Epithelial Sodium Channel Regulator. *Journal of Biomarkers* 2013; 2013:9.
- 31 Svenningsen P., Uhrenholt T. R., Palarasah Y., Skjodt K., Jensen B. L., Skott O.: Prostatin-dependent activation of epithelial Na<sup>+</sup> channels by low plasmin concentrations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009; 297:R1733-1741.
- 32 Haerteis S., Krappitz M., Diakov A., Krappitz A., Rauh R., Korbmacher C.: Plasmin and chymotrypsin have distinct preferences for channel activating cleavage sites in the gamma subunit of the human epithelial sodium channel. *J Gen Physiol* 2012; 140:375-389.
- 33 Svenningsen P., Friis U. G., Bistrup C., Buhl K. B., Jensen B. L., Skott O.: Physiological regulation of epithelial sodium channel by proteolysis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2011; 20:529-533.
- 34 Picard N., Eladari D., El Moghrabi S., Planes C., Bourgeois S., Houillier P., Wang Q., Burnier M., Deschenes G., Knepper M. A., Meneton P., Chambrey R.: Defective ENaC processing and function in tissue kallikrein-deficient mice. *J Biol Chem* 2008; 283:4602-4611.
- 35 Patel A. B., Chao J., Palmer L. G.: Tissue kallikrein activation of the epithelial Na channel. *Am J Physiol Renal Physiol* 2012; 303:F540-550.
- 36 Bönner G.: *Das renale Kallikrein-Kinin-System*. Berlin/Heidelberg, Springer, 2013.
- 37 Schork A.: *Erfassung des Volumenstatus bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz mittels Bioimpedanzspektroskopie und Identifikation von Prädiktoren der Überwässerung*. Tübingen, Univ., Diss., 2016, <http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:bsz:21-dspace-717460>
- 38 Ortmann E., Besser M. W., Klein A. A.: Antifibrinolytic agents in current anaesthetic practice. *Br J Anaesth* 2013; 111:549-563.
- 39 Spraggon G., Hornsby M., Shipway A., Tully D. C., Bursulaya B., Danahay H., Harris J. L., Lesley S. A.: Active site conformational changes of prostatin provide a new mechanism of protease regulation by divalent cations. *Protein Sci* 2009; 18:1081-1094.
- 40 Frömke J.: *Standardoperationen in der Herzchirurgie*. Darmstadt, Steinkopff, 2013.
- 41 Chen L. M., Skinner M. L., Kauffman S. W., Chao J., Chao L., Thaler C. D., Chai K. X.: Prostatin is a glycosylphosphatidylinositol-anchored active serine protease. *J Biol Chem* 2001; 276:21434-21442.
- 42 Fritz H., Wunderer, G.: *Biochemistry and Applications of Aprotinin, the Kallikrein Inhibitor from Bovine Organs* 1983;
- 43 Berling R., Genell S., Ohlsson K.: High-Dose intraperitoneal aprotinin treatment of acute severe pancreatitis: A double-blind randomized multi-center trial. *Journal of Gastroenterology* 1994; 29:479-485.
- 44 Larsen R.: *Anästhesie und Intensivmedizin in Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie*. Berlin/Heidelberg, Springer, 2009.
- 45 Mangano D. T., Miao Y., Vuylsteke A., Tudor I. C., Juneja R., Filipescu D., Hoeft A., Fontes M. L., Hillel Z., Ott E., Titov T., Dietzel C., Levin J.: Mortality associated with aprotinin during 5 years following coronary artery bypass graft surgery. *JAMA* 2007; 297:471-479.

- 46 Mangano D. T., Tudor I. C., Dietzel C., Multicenter Study of Perioperative Ischemia Research G., Ischemia R., Education F.: The risk associated with aprotinin in cardiac surgery. *N Engl J Med* 2006; 354:353-365.
- 47 Hiatt W. R.: Observational studies of drug safety--aprotinin and the absence of transparency. *N Engl J Med* 2006; 355:2171-2173.
- 48 Midgley I., Hood A. J., Proctor P., Chasseaud L. F., Irons S. R., Cheng K. N., Brindley C. J., Bonn R.: Metabolic fate of <sup>14</sup>C-camostat mesylate in man, rat and dog after intravenous administration. *Xenobiotica* 1994; 24:79-92.
- 49 Maekawa A., Kakizoe Y., Miyoshi T., Wakida N., Ko T., Shiraishi N., Adachi M., Tomita K., Kitamura K.: Camostat mesilate inhibits prostasin activity and reduces blood pressure and renal injury in salt-sensitive hypertension. *J Hypertens* 2009; 27:181-189.
- 50 Makino H., Onbe T., Kumagai I., Murakami K., Ota Z.: A proteinase inhibitor reduces proteinuria in nephrotic syndrome. *Am J Nephrol* 1991; 11:164-165.
- 51 Ono Pharmaceutical Co. Ltd.: FOIPAN® < Camostat mesilate > 2009.
- 52 Karow T., Lang-Roth R.: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Hamburg, Karow, 2014.
- 53 Nilsson I. M.: Clinical pharmacology of aminocaproic and tranexamic acids. *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)* 1980; 14:41-47.
- 54 Graefe K. H., Lutz W., Bönisch H.: Duale Reihe: Pharmakologie und Toxikologie. Stuttgart, Thieme, 2011.
- 55 Kleyman T. R., Carattino M. D., Hughey R. P.: ENaC at the cutting edge: regulation of epithelial sodium channels by proteases. *J Biol Chem* 2009; 284:20447-20451.
- 56 Svenningsen P., Friis U. G., Versland J. B., Buhl K. B., Moller Frederiksen B., Andersen H., Zachar R. M., Bistrup C., Skott O., Jorgensen J. S., Andersen R. F., Jensen B. L.: Mechanisms of renal NaCl retention in proteinuric disease. *Acta Physiol (Oxf)* 2013; 207:536-545.
- 57 Funder J. W.: Glucocorticoid and mineralocorticoid receptors: biology and clinical relevance. *Annu Rev Med* 1997; 48:231-240.
- 58 Snyder P. M.: Minireview: regulation of epithelial Na<sup>+</sup> channel trafficking. *Endocrinology* 2005; 146:5079-5085.
- 59 Kortenoeven M. L., Pedersen N. B., Rosenbaek L. L., Fenton R. A.: Vasopressin regulation of sodium transport in the distal nephron and collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol* 2015; 309:F280-299.
- 60 Alvarez de la Rosa D., Zhang P., Naray-Fejes-Toth A., Fejes-Toth G., Canessa C. M.: The serum and glucocorticoid kinase sgk increases the abundance of epithelial sodium channels in the plasma membrane of *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 1999; 274:37834-37839.
- 61 Passero C. J., Mueller G. M., Myerburg M. M., Carattino M. D., Hughey R. P., Kleyman T. R.: TMPRSS4-dependent activation of the epithelial sodium channel requires cleavage of the gamma-subunit distal to the furin cleavage site. *Am J Physiol Renal Physiol* 2012; 302:F1-8.
- 62 Hamm L. L., Feng Z., Hering-Smith K. S.: Regulation of sodium transport by ENaC in the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2010; 19:98-105.

- 63 Haerteis S., Krappitz A., Krappitz M., Murphy J. E., Bertog M., Krueger B., Nacken R., Chung H., Hollenberg M. D., Knecht W., Bunnett N. W., Korbmacher C.: Proteolytic activation of the human epithelial sodium channel by trypsin IV and trypsin I involves distinct cleavage sites. *J Biol Chem* 2014; 289:19067-19078.
- 64 Kellenberger S., Gautschi I., Schild L.: Mutations in the epithelial Na<sup>+</sup> channel ENaC outer pore disrupt amiloride block by increasing its dissociation rate. *Mol Pharmacol* 2003; 64:848-856.
- 65 Epstein M., Calhoun D. A.: Aldosterone blockers (mineralocorticoid receptor antagonism) and potassium-sparing diuretics. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 2011; 13:644-648.
- 66 Bjerregaard S., Wulf-Andersen L., Stephens R. W., Roge Lund L., Vermehren C., Soderberg I., Frokjaer S.: Sustained elevated plasma aprotinin concentration in mice following intraperitoneal injections of w/o emulsions incorporating aprotinin. *J Control Release* 2001; 71:87-98.
- 67 Balldin G., Lasson A., Ohlsson K.: Aprotinin turn-over studies in dog and in man with severe acute pancreatitis. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 1984; 365:1417-1423.
- 68 Bjerregaard S., Pedersen H., Vedstesen H., Vermehren C., Söderberg I., Frokjaer S.: Parenteral water/oil emulsions containing hydrophilic compounds with enhanced in vivo retention: formulation, rheological characterisation and study of in vivo fate using whole body gamma-scintigraphy. *International Journal of Pharmaceutics* 2001; 215:13-27.
- 69 Bjerregaard S., Söderberg I., Vermehren C., Frokjaer S.: Formulation and evaluation of release and swelling mechanism of a water-in-oil emulsion using factorial design. *International Journal of Pharmaceutics* 1999; 193:1-11.
- 70 Innovative Research of America: <http://www.innovrsrch.com/index.asp>; [Zugriff 17.02.2016].
- 71 Theodorsson A., Hilke S., Rugarn O., Linghammar D., Theodorsson E.: Serum concentrations of 17beta-estradiol in ovariectomized rats during two times six weeks crossover treatment by daily injections in comparison with slow-release pellets. *Scand J Clin Lab Invest* 2005; 65:699-705.
- 72 Hervey G. R.: Determination of creatinine by the Jaffe reaction. *Nature* 1953; 171:1125.
- 73 Labor + Technik EBERHARD LEHMANN GmbH: Creatinin, Jaffé, kinetisch, ohne Enteiweißung (LT-CR 0121) - instruction manual, 2006.
- 74 Bio-Rad Laboratories GmbH: Bio-Rad Protein Assay LIT33 - instruction manual.
- 75 Bradford M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-254.
- 76 Friberger P., Knos M., Gustavsson S., Aurell L., Claeson G.: Methods for determination of plasmin, antiplasmin and plasminogen by means of substrate S-2251. *Haemostasis* 1978; 7:138-145.
- 77 Chromogenix: S-2251™ - instruction manual, 2008.
- 78 Witt I.: Test systems with synthetic peptide substrates in haemostaseology. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1991; 29:355-374.

- 79 Haemochrom Diagnostica GmbH: <http://www.haemochrom.de/produkte/chromogene-substrate.html>; [Zugriff 24.01.2017].
- 80 DiaPharma Group: [http://chromogenicsubstrates.com/substrates/chromogenic\\_substrates\\_products\\_s-2251.htm](http://chromogenicsubstrates.com/substrates/chromogenic_substrates_products_s-2251.htm); [Zugriff 23.01.2017].
- 81 MacIntyre I.: *Advances in Clinical Chemistry - Flame Photometry*. Amsterdam, Elsevier, 1961.
- 82 Qi Z., Whitt I., Mehta A., Jin J., Zhao M., Harris R. C., Fogo A. B., Breyer M. D.: Serial determination of glomerular filtration rate in conscious mice using FITC-inulin clearance. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 286:F590-596.
- 83 Ellis D.: Pathophysiology, Evaluation, and Management of Edema in Childhood Nephrotic Syndrome. *Front Pediatr* 2015; 3:111.
- 84 Kessler M. A., Meinitzer A., Petek W., Wolfbeis O. S.: Microalbuminuria and borderline-increased albumin excretion determined with a centrifugal analyzer and the Albumin Blue 580 fluorescence assay. *Clin Chem* 1997; 43:996-1002.
- 85 PROGEN Biotechnik GmbH: MICROFLUORAL™ Mikroalbumin-Test - instruction manual, 2015.
- 86 Labor + Technik EBERHARD LEHMANN GmbH: Harnstoff, UV, kinetisch (LT-UR 0010) - instruction manual.
- 87 Weber J. A.: The enzymatic determination of urea using the Greiner G 300. *J Clin Chem Clin Biochem* 1984; 22:195-197.
- 88 Voller A., Bartlett A., Bidwell D. E.: Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. *J Clin Pathol* 1978; 31:507-520.
- 89 Molecular® Innovations: Mouse Plasminogen Total Antigen ELISA Kit - instruction manual, 2014.
- 90 Cox K. L., Devanarayan V., Kriauciunas A., Manetta J., Montrose C., Sittampalam S.: *Assay Guidance Manual - Immunoassay Methods*. Bethesda, 2004.
- 91 R&D SYSTEMS®: Quantikine® Colorimetric Sandwich ELISA Assay Principle. <https://www.rndsystems.com/products/quantikine-colorimetric-sandwich-elisa-assay-principle>; [Zugriff 25.01.2016].
- 92 Cloud-Clone Corp.: Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit For Aprotinin (AP) - instruction manual, 2013.
- 93 Luttmann W., Bratke K., Küpper M., Myrtek D.: *Quantitative Immunoassays, Der Experimentator: Immunologie*. Berlin/Heidelberg, Springer, 2014, pp 103-131.
- 94 IBL International: Aldosterone ELISA: Enzymimmunoassay für die quantitative Bestimmung von Aldosteron in humanem Serum, Plasma und Urin, 2015.
- 95 Bohnert B. N., Menacher M., (shared first authorship), Janessa A., Schork A., Woern M., Daiminger S., Kalbacher H., Haering H. U., Daniel C., Amann K., Sure F., Bertog M., Haerteis S., Korbmacher C., Artunc F.: Aprotinin prevents proteolytic epithelial sodium channel (ENaC) activation and volume retention in nephrotic syndrome. *Kidney Int* 2017: zur Publikation angenommen.

- 96 Okuda S., Oh Y., Tsuruda H., Onoyama K., Fujimi S., Fujishima M.: Adriamycin-induced nephropathy as a model of chronic progressive glomerular disease. *Kidney Int* 1986; 29:502-510.
- 97 Deschenes G., Doucet A.: Collecting duct (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPase activity is correlated with urinary sodium excretion in rat nephrotic syndromes. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11:604-615.
- 98 de Seigneux S., Kim S. W., Hemmingsen S. C., Frokiaer J., Nielsen S.: Increased expression but not targeting of ENaC in adrenalectomized rats with PAN-induced nephrotic syndrome. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; 291:F208-217.
- 99 Kim S. W., Wang W., Nielsen J., Praetorius J., Kwon T. H., Knepper M. A., Frokiaer J., Nielsen S.: Increased expression and apical targeting of renal ENaC subunits in puromycin aminonucleoside-induced nephrotic syndrome in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 286:F922-935.
- 100 Zheng Z., Schmidt-Ott K. M., Chua S., Foster K. A., Frankel R. Z., Pavlidis P., Barasch J., D'Agati V. D., Gharavi A. G.: A Mendelian locus on chromosome 16 determines susceptibility to doxorubicin nephropathy in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102:2502-2507.
- 101 Simic I., Tabatabaeifar M., Schaefer F.: Animal models of nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 2013; 28:2079-2088.
- 102 Vogt B., Dick B., Marti H. P., Frey F. J., Frey B. M.: Reduced 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in experimental nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17:753-758.
- 103 Kim S. W.: Dysregulation of ENaC in Animal Models of Nephrotic Syndrome and Liver Cirrhosis. *Electrolyte Blood Press* 2006; 4:23-34.
- 104 Brideau G., Doucet A.: Over-expression of adenosine deaminase in mouse podocytes does not reverse puromycin aminonucleoside resistance. *BMC Nephrol* 2010; 11:15.
- 105 Butterworth M. B.: Regulation of the epithelial sodium channel (ENaC) by membrane trafficking. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1802:1166-1177.
- 106 Kapur G., Valentini R. P., Imam A. A., Mattoo T. K.: Treatment of severe edema in children with nephrotic syndrome with diuretics alone--a prospective study. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009; 4:907-913.
- 107 Koot B. G., Houwen R., Pot D. J., Nauta J.: Congenital analbuminaemia: biochemical and clinical implications. A case report and literature review. *Eur J Pediatr* 2004; 163:664-670.
- 108 Oliver W. J.: Physiologic Responses Associated with Steroid-Induced Diuresis in the Nephrotic Syndrome. *J Lab Clin Med* 1963; 62:449-464.
- 109 Koomans H. A., Geers A. B., vd Meiracker A. H., Roos J. C., Boer P., Dorhout Mees E. J.: Effects of plasma volume expansion on renal salt handling in patients with the nephrotic syndrome. *Am J Nephrol* 1984; 4:227-234.
- 110 Geers A. B., Koomans H. A., Boer P., Dorhout Mees E. J.: Plasma and blood volumes in patients with the nephrotic syndrome. *Nephron* 1984; 38:170-173.
- 111 Usberti M., Gazzotti R. M.: Hyporeninemic hypoaldosteronism in patients with nephrotic syndrome. *Am J Nephrol* 1998; 18:251-255.

- 112 Brown E. A., Markandu N. D., Sagnella G. A., Jones B. E., MacGregor G. A.: Lack of effect of captopril on the sodium retention of the nephrotic syndrome. *Nephron* 1984; 37:43-48.
- 113 Ichikawa I., Rennke H. G., Hoyer J. R., Badr K. F., Schor N., Troy J. L., Lechene C. P., Brenner B. M.: Role for intrarenal mechanisms in the impaired salt excretion of experimental nephrotic syndrome. *J Clin Invest* 1983; 71:91-103.
- 114 Meltzer J. I., Keim H. J., Laragh J. H., Sealey J. E., Jan K. M., Chien S.: Nephrotic syndrome: vasoconstriction and hypervolemic types indicated by renin-sodium profiling. *Ann Intern Med* 1979; 91:688-696.
- 115 Gupta K., Iskandar S. S., Daeihagh P., Ratliff H. L., Bleyer A. J.: Distribution of pathologic findings in individuals with nephrotic proteinuria according to serum albumin. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23:1595-1599.
- 116 Cumming A. D., Jeffrey S., Lambie A. T., Robson J. S.: The kallikrein-kinin and renin-angiotensin systems in nephrotic syndrome. *Nephron* 1989; 51:185-191.
- 117 Brown E. A., Markandu N. D., Sagnella G. A., Squires M., Jones B. E., MacGregor G. A.: Evidence that some mechanism other than the renin system causes sodium retention in nephrotic syndrome. *Lancet* 1982; 2:1237-1240.
- 118 Usberti M., Gazzotti R. M., Poiesi C., D'Avanzo L., Ghielmi S.: Considerations on the sodium retention in nephrotic syndrome. *Am J Nephrol* 1995; 15:38-47.
- 119 Doweiko J. P., Nompleggi D. J.: Role of albumin in human physiology and pathophysiology. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1991; 15:207-211.
- 120 Shapiro M. D., Hasbargen J., Hensen J., Schrier R. W.: Role of aldosterone in the sodium retention of patients with nephrotic syndrome. *Am J Nephrol* 1990; 10:44-48.
- 121 Deschenes G., Feraille E., Doucet A.: Mechanisms of oedema in nephrotic syndrome: old theories and new ideas. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18:454-456.
- 122 Passero C. J., Mueller G. M., Rondon-Berrios H., Tofovic S. P., Hughey R. P., Kleyman T. R.: Plasmin activates epithelial Na<sup>+</sup> channels by cleaving the gamma subunit. *J Biol Chem* 2008; 283:36586-36591.
- 123 Vaziri N. D., Gonzales E. C., Shayestehfar B., Barton C. H.: Plasma levels and urinary excretion of fibrinolytic and protease inhibitory proteins in nephrotic syndrome. *J Lab Clin Med* 1994; 124:118-124.
- 124 Schork A., Woern M., Kalbacher H., Voelter W., Nacken R., Bertog M., Haerteis S., Korbmacher C., Heyne N., Peter A., Haring H. U., Artunc F.: Association of Plasminuria with Overhydration in Patients with CKD. *Clin J Am Soc Nephrol* 2016; 11:761-769.
- 125 Andersen R. F., Buhl K. B., Jensen B. L., Svenningsen P., Friis U. G., Jespersen B., Rittig S.: Remission of nephrotic syndrome diminishes urinary plasmin content and abolishes activation of ENaC. *Pediatr Nephrol* 2013; 28:1227-1234.
- 126 BioVision: Aprotinin, Active, Bovine Recombinant (AOF) - data sheet, 2015.

- 127 Santa Cruz Biotechnology: Camostat mesylate (CAS 59721-29-8). <https://www.scbt.com/scbt/product/camostat-mesylate-59721-29-8>; [Zugriff 06.10.2016].
- 128 Anonick P. K., Vasudevan J., Gonias S. L.: Antifibrinolytic activities of alpha-N-acetyl-L-lysine methyl ester, epsilon-aminocaproic acid, and tranexamic acid. Importance of kringle interactions and active site inhibition. *Arterioscler Thromb* 1992; 12:708-716.
- 129 Majima M., Katori M., Hanazuka M., Mizogami S., Nakano T., Nakao Y., Mikami R., Uryu H., Okamura R., Mohsin S. S., et al.: Suppression of rat deoxycorticosterone-salt hypertension by kallikrein-kinin system. *Hypertension* 1991; 17:806-813.
- 130 Wang C., Chao L., Chao J.: Direct gene delivery of human tissue kallikrein reduces blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *J Clin Invest* 1995; 95:1710-1716.
- 131 Wereszczynska-Siemiatkowska U., Pohl U., Otto J., Lankisch P. G.: Subcutaneous administration of the synthetic trypsin inhibitor Foy-305 induces hypertrophy of the exocrine pancreas. *Digestion* 1987; 37:144-148.
- 132 Wanaka K., Okamoto S., Horie N., Hijikata-Okunomiya A., Okamoto U., Naito T., Ohno N., Bohgaki M., Tsuda Y., Okada Y.: Use of an active center-directed plasmin inhibitor elucidates the multiplicity of plasmin actions. *Thromb Res* 1996; 82:79-86.
- 133 Sernetz M.: Pharmakokinetik und Wachstumskinetik. <http://www.staff.uni-giessen.de/~gj38/publica/pharma/kapitel6.html>, 2000; [Zugriff 27.07.2016].
- 134 Turner P. V., Brabb T., Pekow C., Vasbinder M. A.: Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2011; 50:600-613.
- 135 Callas D., Bacher P., Iqbal O., Hoppensteadt D., Fareed J.: Fibrinolytic compromise by simultaneous administration of site-directed inhibitors of thrombin. *Thromb Res* 1994; 74:193-205.
- 136 Carattino M. D., Mueller G. M., Palmer L. G., Frindt G., Rued A. C., Hughey R. P., Kleyman T. R.: Prostatin interacts with the epithelial Na<sup>+</sup> channel and facilitates cleavage of the gamma-subunit by a second protease. *Am J Physiol Renal Physiol* 2014; 307:F1080-1087.
- 137 Uchimura K., Kakizoe Y., Onoue T., Hayata M., Morinaga J., Yamazoe R., Ueda M., Mizumoto T., Adachi M., Miyoshi T., Shiraishi N., Sakai Y., Tomita K., Kitamura K.: In vivo contribution of serine proteases to the proteolytic activation of gammaENaC in aldosterone-infused rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2012; 303:F939-943.
- 138 Bonner G., Babst H., Kaufmann W.: In vivo effects of camostat mesilate on plasma kallikrein, plasma kininase II and renal kallikrein of man. *Arzneimittelforschung* 1987; 37:535-537.
- 139 Andersson L., Nilsoon I. M., Colleen S., Granstrand B., Melander B.: Role of urokinase and tissue activator in sustaining bleeding and the management thereof with EACA and AMCA. *Ann N Y Acad Sci* 1968; 146:642-658.
- 140 Silva M. M., Thelwell C., Williams S. C., Longstaff C.: Regulation of fibrinolysis by C-terminal lysines operates through plasminogen and



- plasmin but not tissue-type plasminogen activator. *J Thromb Haemost* 2012; 10:2354-2360.
- 141 Beath S. M., Nuttall G. A., Fass D. N., Oliver W. C., Jr., Ereth M. H., Oyen L. J.: Plasma aprotinin concentrations during cardiac surgery: full- versus half-dose regimens. *Anesth Analg* 2000; 91:257-264.
- 142 Schultz G., Tedesco M. M., Sho E., Nishimura T., Sharif S., Du X., Myles T., Morser J., Dalman R. L., Leung L. L.: Enhanced abdominal aortic aneurysm formation in thrombin-activatable procarboxypeptidase B-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30:1363-1370.
- 143 Nagashima M., Yin Z. F., Zhao L., White K., Zhu Y., Lasky N., Halks-Miller M., Broze G. J., Jr., Fay W. P., Morser J.: Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) deficiency is compatible with murine life. *J Clin Invest* 2002; 109:101-110.
- 144 Sperzel M., Huetter J.: Evaluation of aprotinin and tranexamic acid in different in vitro and in vivo models of fibrinolysis, coagulation and thrombus formation. *J Thromb Haemost* 2007; 5:2113-2118.

## **7 Erklärung zum Eigenanteil**

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit meinem Doktorvater und Betreuer Herrn Professor F. Artunc.

Die Literaturrecherche, die Versuche sowie die statistische Auswertung der Daten wurden von mir persönlich durchgeführt.

Die retrobulbäre Injektion von Doxorubicin zur Modellinduktion sowie die subkutane Implantation der Pellets erfolgten durch Herrn Dr. med. B. Bohnert.

Die Emulsionen zur intraperitonealen Injektion wurden von Herrn Professor R. Daniels aus der Abteilung „Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie“ der Eberhard Karls Universität Tübingen hergestellt.

Ich versichere, dass ich diese Dissertationsschrift eigenständig verfasst und keine weiteren als die im Literaturverzeichnis angegebenen Quellen verwendet habe.

Tübingen,

## 8 Veröffentlichungen

Ergebnisse dieser Arbeit wurden bereits unter folgenden Titeln veröffentlicht:

### Vortrag:

„Der Serinproteaseinhibitor Aprotinin verhindert die Volumenretention beim experimentellen nephrotischen Syndrom der Maus“

B. Bohnert\*; M. Menacher\*; A. Janessa; S. Daiminger; H. Kalbacher; H.-U. Häring; C. Daniel; K. Amann; F. Artunc

\*geteilte Erstautorenschaft

auf dem

8. Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie vom 10. – 13. September 2016 in Berlin

### Paper (zur Publikation angenommen):

„Aprotinin prevents proteolytic epithelial sodium channel (ENaC) activation and volume retention in nephrotic syndrome“

B. Bohnert\*; M. Menacher\*; A. Janessa; A. Schork; M. Wörn; S. Daiminger; H. Kalbacher; H.-U. Häring; C. Daniel; K. Amann; F. Sure; M. Bertog; S. Haerteis; C. Korbmacher; F. Artunc

\* geteilte Erstautorenschaft

in

Kidney International

2017

## **9 Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater und Betreuer Herrn Professor Artunc für die Überlassung dieser äußerst interessanten Promotionsarbeit.

Lieber Ferruh, ich danke dir für dein unvergleichliches Engagement, deine konstruktiven Ideen, deine Geduld und die wertvolle Unterstützung während der gesamten Promotionsdauer.

Herzlicher Dank gilt Herrn Dr. med. B. Bohnert, der mir mit seinem außerordentlichen Kompetenz und unermüdlichem Engagement stets zur Seite stand. Ich danke auch allen anderen Doktoranden dieser Arbeitsgruppe für Ihre Kollegialität und Unterstützung bei der Betreuung der Mäuse.

Außerdem möchte ich mich bei Frau Andrea Janessa für die fachliche Unterstützung bei der Durchführung von Laborarbeiten bedanken. Vielen Dank auch an Herrn Dr. rer. nat. H. Kalbacher für die Bereitstellung von Gerätschaften. Herrn Professor Daniels aus der Abteilung „Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie“ danke ich herzlich für die Herstellung der Emulsionen.

Meinen Eltern, meiner Schwester und meinem Freund Max Baumann danke ich von ganzem Herzen für ihre unermüdliche und liebevolle Unterstützung, Geduld und Motivation während meiner Promotion und meines gesamten Studiums.

# Anhang

Tabelle 12: Korrelationen – Intervention mit Placebo

r/r²/p	Aldosteron	Albumin	Harnstoff	Hämoglobin	BE	Bikarbonat	Kalzium	Hämatokrit	Kalium	Natrium	pCO2	pH	Urin-Natrium	amidolyt. Akt.	Gewicht
mittl. Urin-Protein Tag 7-10 [mg/mg crea]	-0,5489 0,3013 0,2593	-0,7106 0,5049 0,000307	0,03118 0,000972 0,8798	-0,3854 0,1485 0,3057	0,06660 0,004436 0,8648	0,03138 0,000985 0,9361	0,4320 0,1866 0,2456	-0,3850 0,1482 0,3062	0,6424 0,4127 0,06207	0,1727 0,02982 0,6569	0,1607 0,02584 0,6795	-0,1316 0,01733 0,7357	-0,4804 0,2308 ** 0,009666	0,5832 0,3401 ** 0,001767	0,5304 0,2813 ** 0,003689
max. Gewichtszu- nahme [%]	-0,2496 0,06230 0,6334	-0,5308 0,2817 * 0,01330	0,3120 0,09733 0,1208	-0,04630 0,002144 0,9058	0,4218 0,1779 0,2581	0,4053 0,1642 0,2792	-0,5063 0,2563 0,1643	-0,04684 0,002194 0,9048	-0,2870 0,08236 0,4540	0,4351 0,1893 0,2419	0,3938 0,1551 0,2944	0,1279 0,01636 0,7430	-0,6682 0,4465 *** 0,000102	0,4696 0,2205 * 0,01550	
max. amidolyt. Urinaktivität [OD/60min*1000]	-0,6022 0,3626 0,2059	-0,3822 0,1461 0,08725	-0,1832 0,03356 0,3704	0,07739 0,005989 0,8431	0,04457 0,001987 0,9094	0,04700 0,002209 0,9044	-0,2998 0,08991 0,4331	0,08072 0,006516 0,8364	-0,4941 0,2442 0,1763	0,1640 0,02690 0,6733	0,2802 0,07852 0,4652	-0,3190 0,1018 0,4027	-0,3035 0,09211 0,1317		
min. Urin-Natrium ab Tag 5 [µmol/mg crea]	0,7649 0,5851 0,07642	0,5456 0,2977 * 0,01052	-0,2569 0,06598 0,2053	0,09978 0,009956 0,7984	-0,2374 0,05634 0,5386	-0,2217 0,04916 0,5664	0,2857 0,08163 0,4561	0,1052 0,01106 0,7877	-0,1258 0,01583 0,7471	-0,4842 0,2345 0,1866	-0,02159 0,000466 0,9560	-0,3764 0,1417 0,3180			
pH-Wert	-0,1017 0,01034 0,8480	-0,2718 0,07390 0,4792	-0,7682 0,5902 * 0,01560	0,1810 0,03277 0,6412	0,4536 0,2057 0,2201	0,4593 0,2110 0,2136	-0,4870 0,2372 0,1836	0,1727 0,02983 0,6568	-0,1393 0,01942 0,7207	0,1299 0,01687 0,7391	-0,1596 0,02548 0,6817				
pCO2 [mmHg]	0,06617 0,004379 0,9009	-0,4854 0,2356 0,1854	-0,1726 0,02978 0,6570	-0,07946 0,006314 0,8390	0,8062 0,6500 ** 0,008677	0,8018 0,6430 ** 0,009338	0,2245 0,05039 0,5615	-0,06398 0,004094 0,8701	-0,4104 0,1684 0,2726	0,1303 0,01699 0,7382					
Plasma- Natrium [mM]	-0,1625 0,02639 0,7585	-0,06250 0,003907 0,8731	-0,05249 0,002755 0,8933	-0,6355 0,4039 0,06587	0,2277 0,05182 0,5558	0,2135 0,04560 0,5812	-0,02543 0,000647 0,9482	-0,6368 0,4055 0,06513	0,2927 0,08568 0,4447						
Plasma- Kalium [mM]	0,1454 0,02115 0,7834	-0,03598 0,001295 0,9268	0,3711 0,1377 0,3254	-0,6001 0,3602 0,08753	-0,4296 0,1845 0,2485	-0,4558 0,2078 0,2176	0,5592 0,3127 0,1175	-0,6058 0,3671 0,08377							
Hämatokrit [%]	-0,4198 0,1762 0,4073	-0,01232 0,000152 0,9749	-0,2644 0,06991 0,4918	0,9998 0,9997 *** <0,000001	0,009003 0,000081 0,9817	0,02504 0,000627 0,9490	-0,4777 0,2282 0,1934								
Plasma- Kalzium [mM]	0,4550 0,2070 0,3646	-0,1190 0,01416 0,7605	0,5445 0,2964 0,1296	-0,4871 0,2372 0,1836	-0,07043 0,004960 0,8571	-0,08280 0,006855 0,8323									
Standard- Bikarbonat [mM]	0,003413 0,000012 0,9949	-0,5880 0,3458 0,09583	-0,6168 0,3805 0,07684	0,01600 0,000256 0,9674	0,9992 0,9983 *** <0,000001										
Basen- überschuss (BE) [mM]	0,007492 0,000056 0,9888	-0,5951 0,3541 0,09096	-0,6058 0,3669 0,08383	<0,000001 <0,000001 0,9999											
Plasma- Hämoglobin [g/dl]	-0,4206 0,1769 0,4063	-0,007259 0,000053 0,9852	-0,2675 0,07158 0,4864												
Plasma- Harnstoff [mg/dl]	0,3600 0,1296 0,4833	-0,08974 0,008054 0,6989													
Plasma- Albumin [g/l]	0,5401 0,2918 0,2686														

r > |0,7|  
 |0,5| < r ≤ |0,7|  
 |0,3| < r ≤ |0,5|  
 r < |0,3|

\* p < 0,05  
 \*\* p < 0,01  
 \*\*\* p < 0,001

Tabelle 13: Korrelationen – Intervention mit Aprotinin

r/r²/p	Aldosteron	Albumin	Harnstoff	Hämoglobin	BE	Bikarbonat	Kalzium	Hämatokrit	Kalium	Natrium	pCO2	pH	Urin-Natrium	amidolyt. Akt.	Gewicht	Protein	Pl.-Aprot.	Urin-Aprot.	
Freisetzungsmenge [mg/d]		0,3799 0,1443 0,1625	0,4976 0,2476 0,05913	0,2747 0,07547 0,3217	-0,1077 0,01161 0,7023	-0,1154 0,01332 0,6821	0,3825 0,1463 0,1594	0,2777 0,07711 0,3163	0,3460 0,1197 0,2064	0,2489 0,06194 0,3711	-0,1316 0,01732 0,6401	0,003474 0,000012 0,9902	0,4892 0,2393 0,06424	-0,6929 0,4801 ** 0,004186	-0,7961 0,6338 *** 0,000384	0,5855 0,3428 * 0,02184	-0,3579 0,1281 0,2090	0,7011 0,4915 ** 0,007587	
mittl. Urin-Aprotinin Tag 4-14 [µg/ml]	-0,5727 0,3279 0,4273	0,2807 0,07880 0,3529	0,3151 0,09929 0,2943	0,1186 0,01406 0,6996	-0,4496 0,2021 0,1232	-0,4672 0,2182 0,1075	0,5659 0,3203 * 0,04379	0,1138 0,01296 0,7112	0,6963 0,4848 ** 0,008197	0,1798 0,03233 0,5566	-0,2630 0,06915 0,3854	-0,2856 0,08157 0,3442	0,2714 0,07364 0,3698	-0,2681 0,07188 0,3758	-0,6087 0,3705 * 0,02725	0,4849 0,2351 0,09306	-0,07104 0,005047 0,8176		
Plasma-Aprotinin Tag 10 [µg/ml]	0,2137 0,04567 0,7863	-0,03438 0,001182 0,9071	0,04398 0,001934 0,8813	-0,1207 0,01456 0,6811	-0,5438 0,2957 * 0,04441	-0,5465 0,2986 * 0,04318	-0,02026 0,000411 0,9452	-0,1169 0,01366 0,6907	-0,1197 0,01433 0,6835	-0,4209 0,1772 0,1339	-0,2190 0,04798 0,4518	-0,3976 0,1581 0,1592	0,1076 0,01158 0,7143	0,2122 0,04501 0,4665	-0,01110 0,000123 0,9700	-0,2589 0,06704 0,3714			
mittl. Urin-Protein Tag 7-10 [mg/mg crea]	-0,3712 0,1378 0,6288	0,3062 0,09379 0,2669	0,4749 0,2256 0,07362	-0,02784 0,000775 0,9215	0,03919 0,001536 0,8897	0,03703 0,001371 0,8958	0,3109 0,09669 0,2593	-0,02976 0,000886 0,9162	0,3188 0,1017 0,2468	0,2841 0,08073 0,3047	0,1311 0,007110 0,6414	-0,08432 0,006195 0,7651	-0,07871 0,03329 0,7804	-0,1825 0,03329 0,5152	-0,3866 0,1495 0,1546				
max. Gewichtszunahme [%]	0,3958 0,1567 0,6042	-0,2406 0,05790 0,3877	-0,4964 0,2464 0,05984	-0,2295 0,05266 0,4107	0,4275 0,1828 0,1119	0,4314 0,1861 0,1084	-0,08817 0,007773 0,7547	-0,2275 0,05174 0,4149	-0,4451 0,1981 0,09643	-0,07110 0,005056 0,8012	0,3327 0,1107 0,2256	0,1549 0,02401 0,5814	-0,7770 0,6038 *** 0,000654	0,5464 0,2985 * 0,03508					
max. amidolyt. Urinaktivität [OD/60min*1000]	0,06023 0,003628 0,9398	-0,2595 0,06732 0,3504	-0,5378 0,2892 * 0,03868	-0,2918 0,08512 0,2914	0,1903 0,03623 0,4968	0,1940 0,03764 0,4884	-0,3211 0,1031 0,2432	-0,2935 0,08611 0,2885	-0,2915 0,08497 0,2918	-0,02129 0,000453 0,9400	0,2730 0,07456 0,3248	-0,04886 0,002387 0,8627	-0,4813 0,2316 0,06933						
min. Urin-Natrium ab Tag 5 [µmol/mg crea]	0,6824 0,4657 0,3176	0,2161 0,04668 0,4393	0,3410 0,1163 0,2136	0,3069 0,09422 0,2658	-0,3930 0,1545 0,1473	-0,4001 0,1601 0,1395	-0,07102 0,00504 0,8014	0,3026 0,09158 0,2729	0,2923 0,08545 0,2904	0,004392 0,000019 0,9876	-0,5698 0,3247 * 0,02658	0,09822 0,00965 0,7277							
pH-Wert	-0,7042 0,4959 0,2958	0,4345 0,1888 0,1056	-0,07094 0,005033 0,8016	0,2961 0,08766 0,2840	0,6573 0,4320 ** 0,007755	0,6463 0,4177 ** 0,009229	0,07220 0,005213 0,7982	0,2948 0,08692 0,2861	-0,2323 0,05397 0,4048	0,2948 0,07843 0,3120	-0,2778 0,07716 0,3162								
pCO2 [mmHg]	0,6013 0,3616 0,3987	-0,2252 0,05072 0,4196	-0,1635 0,02674 0,5604	0,1953 0,03814 0,4855	0,5384 0,2899 * 0,03840	0,5492 0,3016 * 0,03397	-0,2495 0,06225 0,3698	0,2028 0,04113 0,4685	-0,4861 0,2363 0,06618	0,4153 0,1725 0,1237									
Plasma-Natrium [mM]	0,02500 0,000625 0,9750	0,2103 0,04422 0,4519	0,3965 0,1572 0,1434	0,6340 0,4019 * 0,01115	0,5570 0,3102 * 0,03102	0,5459 0,2980 * 0,03530	-0,1008 0,01016 0,7208	0,6285 0,3950 * 0,01209	0,02215 0,000490 0,9376										
Plasma-Kalium [mM]	-0,7853 0,6167 0,2147	-0,2150 0,04621 0,4417	0,5270 0,2777 * 0,04354	-0,2285 0,05219 0,4128	-0,5718 0,3270 * 0,02595	-0,5711 0,3262 * 0,02616	0,2863 0,08196 0,3009	-0,2432 0,05914 0,3825											
Hämatokrit [%]	0,06149 0,003781 0,9385	0,4381 0,1919 0,1024	0,2232 0,04984 0,4238	0,9998 0,9995 ** <0,000001	0,3798 0,1443 0,1626	0,3618 0,1309 0,1851	-0,04630 0,002143 0,8699												
Plasma-Kalzium [mM]	-0,6338 0,4017 0,3662	0,4478 0,2005 0,09417	0,1553 0,02412 0,5805	-0,05099 0,002600 0,8568	-0,1198 0,01436 0,6705	-0,1380 0,01905 0,6237													
Standard-Bikarbonat [mM]	0,1209 0,01462 0,8791	0,1541 0,02376 0,5833	-0,2160 0,04665 0,4394	0,3572 0,1276 0,1912	0,9993 0,9987 ** <0,000001														
Basenüberschuss (BE) [mM]	-0,1460 0,02133 0,8540	0,1845 0,03404 0,5104	-0,2125 0,04518 0,4469	0,3752 0,1408 0,1682															
Plasma-Hämoglobin [g/dl]	0,05197 0,002701 0,9480	0,4330 0,1875 0,1069	0,2296 0,05271 0,4104																
Plasma-Harnstoff [mg/dl]	-0,4111 0,1690 0,5889	0,1757 0,03086 0,5312																	
Plasma-Albumin [g/l]	-0,7811 0,6100 0,2189																		

r > |0,7|  
 |0,5| < r ≤ |0,7|  
 |0,3| < r ≤ |0,5|  
 r < |0,3|  
  
 \* p < 0,05  
 \*\* p < 0,01  
 \*\*\* p < 0,001

Tabelle 14: Korrelationen – Intervention mit Camostat

r/rz/p	Aldosteron	Albumin	Harnstoff	Hämoglobin	BE	Bikarbonat	Kalzium	Hämatokrit	Kalium	Natrium	pCO2	pH	Urin-Natrium	amidolyt. Akt.	Gew icht	Protein
Freisetzungsmenge [mg/d]	-0,8158 0,6655 * 0,04778	0,1985 0,03940 0,5157	0,2456 0,06032 0,4416	-0,2381 0,05668 0,4335	-0,2747 0,07544 0,3638	-0,2547 0,06488 0,4010	-0,04564 0,002083 0,8823	-0,2377 0,05648 0,4343	0,3319 0,1102 0,2679	-0,2375 0,05641 0,4346	0,08671 0,007518 0,7782	-0,3346 0,1120 0,2637	0,2029 0,04115 0,5062	0,1764 0,03113 0,5642	-0,01110 0,000123 0,9713	-0,1166 0,01359 0,7045
mittl. Urin-Protein Tag 7-10 [mg/mg crea]	-0,1531 0,02344 0,7722	-0,4350 0,1892 0,1374	0,5574 0,3106 0,05974	-0,2069 0,04280 0,4977	0,3488 0,1216 0,2428	0,3453 0,1192 0,2478	-0,2084 0,04342 0,4945	-0,2126 0,04520 0,4856	0,2494 0,06222 0,4111	0,07934 0,006295 0,7967	-0,07258 0,005268 0,8137	0,3667 0,1345 0,2177	-0,6793 0,4614 * 0,01066	-0,06531 0,004265 0,8321	0,6707 0,4499 * 0,01209	
max. Gew ichtszunahme [%]	0,3715 0,1380 0,4684	-0,5628 0,3167 * 0,04524	0,7852 0,6165 ** 0,002479	-0,4068 0,1655 0,1677	0,6128 0,3755 * 0,02597	0,6181 0,3820 * 0,02436	-0,1349 0,01819 0,6604	-0,4142 0,1716 0,1594	0,2959 0,08757 0,3263	0,05877 0,003454 0,8487	0,06575 0,004324 0,8310	0,5009 0,2509 0,08126	-0,6854 0,4698 ** 0,009713	0,008595 0,000074 0,9778		
max. amidolyt. Urinaktivität [OD/60min*1000]	-0,2978 0,08866 0,5666	0,1681 0,02827 0,5829	-0,08464 0,007163 0,7937	0,2092 0,04377 0,4928	0,02441 0,000596 0,9369	0,01564 0,000245 0,9596	-0,02997 0,000898 0,9226	0,2087 0,04354 0,4939	-0,1124 0,01263 0,7147	0,2384 0,05685 0,4328	-0,000761 0,000001 0,9980	0,01793 0,000322 0,9536	-0,01367 0,000187 0,9647			
min. Urin-Natrium ab Tag 5 [µmol/mg crea]	-0,3810 0,1452 0,4561	0,8805 0,7753 *** 0,000071	-0,3075 0,09455 0,3309	0,2408 0,05797 0,4281	-0,5167 0,2670 0,07062	-0,5088 0,2589 0,07577	0,2870 0,08237 0,3417	0,2434 0,05926 0,4229	-0,3343 0,1118 0,2642	0,07518 0,005653 0,8071	0,09020 0,008136 0,7695	-0,5209 0,2714 0,06793				
pH-Wert	0,6474 0,4191 0,1646	-0,4609 0,2125 0,1129	0,1078 0,01162 0,7388	-0,2650 0,07022 0,3816	0,7889 0,6223 ** 0,001349	0,7762 0,6026 ** 0,001809	0,2746 0,07538 0,3640	-0,2730 0,07455 0,3668	0,2495 0,06223 0,4111	-0,4133 0,1708 0,1604	-0,4750 0,2256 0,1010					
pCO2 [mmHg]	-0,1395 0,01947 0,7921	-0,1651 0,02726 0,5899	0,3117 0,09718 0,3239	-0,2801 0,07845 0,3540	0,1634 0,02669 0,5938	0,1798 0,03234 0,5566	0,1546 0,02390 0,6141	-0,2733 0,07470 0,3663	-0,4484 0,2011 0,1243	0,08236 0,006784 0,7891						
Plasma-Natrium [mM]	-0,1581 0,02498 0,7649	0,3418 0,1168 0,2531	0,3817 0,1457 0,2209	0,6286 0,3951 * 0,02139	-0,4382 0,1920 0,1342	-0,4517 0,2040 0,1213	-0,3040 0,09239 0,3127	0,6264 0,3924 * 0,02197	-0,2683 0,07199 0,3754							
Plasma-Kalium [mM]	0,3280 0,1076 0,5256	-0,1465 0,02145 0,6330	0,1036 0,01074 0,7486	-0,2540 0,06453 0,4023	-0,01278 0,000163 0,9670	-0,004279 0,000018 0,9889	-0,5451 0,2971 0,05405	-0,2564 0,06573 0,3978								
Hämatokrit [%]	-0,3288 0,1081 0,5246	0,4555 0,2075 0,1177	-0,1986 0,03943 0,5361	0,9999 0,9998 *** <0,000001	-0,5384 0,2899 * 0,04445	-0,5645 0,3187 * 0,04445	0,09221 0,008502 0,7645									
Plasma-Kalzium [mM]	-0,04174 0,001742 0,9374	0,08876 0,007878 0,7731	-0,06858 0,004703 0,8323	0,09402 0,008840 0,7600	0,4063 0,1651 0,1683	0,4033 0,1627 0,1718										
Standard-Bikarbonat [mM]	0,5877 0,3454 0,2200	-0,6350 0,4032 * 0,01971	0,2420 0,05858 0,4485	-0,5604 0,3140 * 0,04637	0,9990 0,9980 *** <0,000001											
Basenüberschuss (BE) [mM]	0,5673 0,3219 0,2403	-0,6345 0,4025 * 0,01985	0,2346 0,05506 0,4629	0,2853 0,06005												
Plasma-Hämoglobin [g/dl]	-0,3266 0,1067 0,5275	0,4561 0,2081 0,1172	-0,1907 0,03635 0,5528													
Plasma-Harnstoff [mg/dl]	0,01906 0,000363 0,9714	-0,1674 0,02804 0,6030														
Plasma-Albumin [g/l]	-0,4891 0,2393 0,3248															

r > |0,7|  
 |0,5| < r ≤ |0,7|  
 |0,3| < r ≤ |0,5|  
 r < |0,3|

\* p < 0,05  
 \*\* p < 0,01  
 \*\*\* p < 0,001



Tabelle 15: Korrelationen – Intervention mit Tranexamsäure

r/r²/p	Aldosteron	Albumin	Harnstoff	Hämoglobin	BE	Bikarbonat	Kalzium	Hämatokrit	Kalium	Natrium	pCO2	pH	Urin-Natrium	amidolyt. Akt.	Gewicht
mittl. Urin-Protein Tag 7-10 [mg/mg crea]	0,2287 0,05229 0,7114	-0,4960 0,2461 0,1448	0,3996 0,1597 0,2526	-0,4525 0,2047 0,1892	-0,04441 0,001972 0,9030	-0,04084 0,001668 0,9108	0,04371 0,001911 0,9046	-0,4579 0,2097 0,1833	-0,04764 0,002269 0,8960	0,6180 0,3819 0,05688	-0,1159 0,01343 0,7499	-0,002115 0,000004 0,9954	-0,8780 0,7708 *** 0,000835	0,4416 0,1950 0,2014	0,5145 0,2647 0,1281
max. Gewichtszu- nahme [%]	0,2521 0,06357 0,6824	-0,005421 0,000029 0,9881	0,08968 0,008043 0,8054	-0,1733 0,03004 0,6320	0,001456 0,000002 0,9968	-0,01842 0,000339 0,9597	-0,1473 0,02171 0,6846	-0,1667 0,02779 0,6453	0,4109 0,1689 0,2381	0,7363 0,5421 * 0,01518	-0,4358 0,1899 0,2080	0,3390 0,1149 0,3379	-0,6084 0,3701 0,06200	0,6476 0,4194 * 0,04292	
max. amidolyt. Urinaktivität [OD/60min*1000]	-0,8052 0,6484 0,1001	0,04418 0,001952 0,9035	-0,2501 0,06256 0,4858	0,2345 0,05497 0,5144	-0,3544 0,1256 0,3150	-0,3689 0,1361 0,2941	-0,005612 0,000031 0,9877	0,2341 0,05483 0,5150	0,5738 0,3293 0,08283	0,8639 0,7463 ** 0,001270	-0,5360 0,2873 0,1103	-0,01403 0,000197 0,9693	-0,4761 0,2267 0,1642		
min. Urin-Natrium ab Tag 5 [µmol/mg crea]	-0,4835 0,2338 0,4093	0,4259 0,1814 0,2197	-0,03019 0,000911 0,9340	0,4150 0,1722 0,2331	-0,02300 0,000529 0,9497	-0,02069 0,000428 0,9548	-0,1828 0,03340 0,6133	0,4197 0,1762 0,2272	-0,1603 0,02571 0,6581	-0,7236 0,5237 * 0,01799	0,1908 0,03639 0,5975	-0,1464 0,02144 0,6865			
pH-Wert	0,9649 0,9311 ** 0,007846	-0,3906 0,1526 0,2644	-0,07339 0,005387 0,8403	-0,5447 0,2967 0,1035	0,7816 0,6109 ** 0,007579	0,7703 0,5933 ** 0,009135	0,3747 0,1404 0,2860	-0,5368 0,2881 0,1097	0,3335 0,1112 0,3464	0,08397 0,007051 0,8176	-0,06857 0,004702 0,8507				
pCO2 [mmHg]	0,4442 0,1973 0,4536	0,04733 0,002240 0,8967	0,2393 0,05725 0,5055	-0,03592 0,001290 0,9215	0,5665 0,3210 0,08772	0,5800 0,3364 0,07882	-0,06081 0,003698 0,8675	-0,03882 0,001507 0,9152	-0,2293 0,05260 0,5239	-0,3914 0,1532 0,2633					
Plasma- Natrium [mM]	-0,2927 0,08568 0,6327	-0,08043 0,006469 0,8252	-0,2277 0,05184 0,5269	0,1297 0,01681 0,7211	-0,1806 0,03260 0,6177	-0,1934 0,03741 0,5924	-0,01846 0,000341 0,9596	0,1268 0,01607 0,7271	0,4712 0,2220 0,1692						
Plasma- Kalium [mM]	-0,2154 0,04641 0,7278	0,4179 0,1747 0,2294	-0,6650 0,4423 * 0,03588	-0,02295 0,000527 0,9498	0,1270 0,01612 0,7267	0,1020 0,01040 0,7792	0,5450 0,2971 0,1033	-0,02275 0,000517 0,9503							
Hämatokrit [%]	-0,6982 0,4875 0,1898	0,5109 0,2610 0,1313	-0,3048 0,09290 0,3918	0,9999 0,9997 *** <0,000001	-0,5081 0,2581 0,1338	-0,5093 0,2594 0,1327	-0,5072 0,2572 0,1346								
Plasma- Kalzium [mM]	0,3599 0,1295 0,5519	0,01274 0,000162 0,9721	-0,4722 0,2230 0,1682	-0,5024 0,2524 0,1389	0,3000 0,09003 0,3996	0,2903 0,08425 0,4159									
Standard- Bikarbonat [mM]	0,9500 0,9024 * 0,01334	-0,3303 0,1091 0,3512	0,1154 0,01332 0,7509	0,1154 0,2636 0,1291	-0,5134 0,9990 *** <0,000001	0,9995 0,9990									
Basen- überschuss (BE) [mM]	0,9489 0,9004 * 0,01376	-0,3122 0,09750 0,3798	0,1026 0,01052 0,7780	-0,5124 0,2625 0,1300											
Plasma- Hämoglobin [g/dl]	-0,7011 0,4916 0,1871	0,5090 0,2591 0,1329	-0,3093 0,09564 0,3846												
Plasma- Harnstoff [mg/dl]	0,6462 0,4176 0,2388	-0,3537 0,1251 0,3160													
Plasma- Albumin [g/l]	-0,8431 0,7108 0,07284														

r > |0,7|  
 |0,5| < r ≤ |0,7|  
 |0,3| < r ≤ |0,5|  
 r < |0,3|

\* p < 0,05  
 \*\* p < 0,01  
 \*\*\* p < 0,001