

Aus der

Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen

Abteilung Innere Medizin IV

(Schwerpunkt: Diabetologie, Endokrinologie und Nephrologie)

Sektion Nieren- und Hochdruckerkrankungen

**Renale Effekte des Serinprotease-Inhibitors Aprotinin
bei gesunden Mäusen**

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

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

**vorgelegt von
Wörner, Stefan**

2023

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. F. Artunc
2. Berichterstatter: Professorin Dr. S. Beer-Hammer
3. Berichterstatter: Professor Dr. M. Bleich

Tag der Disputation: 14.11.2023

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Aprotinin.....	1
1.1.1	Pharmakologische Eigenschaften von Aprotinin.....	1
1.1.2	Klinische Anwendung und Stellenwert von Aprotinin	4
1.1.3	Sicherheitsbedenken von Aprotinin.....	5
1.2	Aprotinin und Interaktion mit dem epithelialen Natriumkanal (ENaC)....	6
1.2.1	Regulation des ENaC.....	8
1.2.2	Das nephrotische Syndrom.....	10
1.2.3	Aprotinin und experimentelles nephrotisches Syndrom	12
1.3	Fragestellung der Dissertation	14
2.	Material und Methoden	15
2.1	Material	15
2.2	Methoden.....	19
2.2.1	Tiermodell und Tierhaltung	19
2.2.2	Versuchsdurchführung.....	19
2.2.3	Versuchsablauf	23
2.2.4	Laborparameter.....	27
2.2.5	Gewebeanalysen der Nieren.....	39
2.2.6	Statistische Auswertung.....	40
3.	Ergebnisse	41
3.1	Versuch 1: Renale Effekte von Aprotinin unter dem Stressmodell Niedrigsalzdiät	41
3.1.1	Allgemeine Daten zum Versuchsablauf	41
3.1.2	Urin-Proteaseaktivität und ENaC bedingter Natriumtransport	44
3.1.3	Natriumhaushalt und Glomeruläre Filtrationsrate (GFR)	48
3.1.4	Proximaler Tubulus - Funktionsmarker	54

3.1.5	Nierenhistologie	56
3.2	Versuch 2: Renale Effekte von Aprotinin unter dem Stressmodell Triamteren-Therapie	61
3.2.1	Allgemeine Daten zum Versuchsablauf	61
3.2.2	Natriumhaushalt und Glomeruläre Filtrationsrate	64
3.2.3	Proximaler Tubulus - Funktionsmarker	65
3.3	Versuch 3: Dosisabhängigkeit von Aprotinin	67
3.3.1	Glomeruläre Filtrationsrate und proximaler Tubulus	68
3.3.2	Nierenhistologie	70
3.4	Versuch 4: Langzeiteffekte von Aprotinin	73
3.4.1	Nierenhistologie	73
4.	Diskussion.....	76
4.1	Effekte von Aprotinin auf den ENaC und den Salzhaushalt unter Niedrigsalzdiät	76
4.2	Effekte von Aprotinin auf den ENaC und den Salzhaushalt unter Triamteren-Therapie	78
4.3	Effekte von Aprotinin auf den proximalen Tubulus und die GFR.....	79
4.4	Dosisabhängigkeit und Langzeiteffekte von Aprotinin	81
4.5	Effekte von Aprotinin bei gesunden und nephrotischen Mäusen.....	82
4.6	Methoden.....	85
4.7	Ausblick	85
5.	Zusammenfassung.....	87
6.	Literaturverzeichnis	88
7.	Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift.....	98
8.	Veröffentlichungen	99

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Aprotinin: Fibrinolyse und Koagulationskaskade, modifiziert (mod.) nach [20].	2
Abb. 2: Schematischer Aufbau des ENaC.	7
Abb. 3: Proteolytische Aktivierung des ENaC, mod. nach [99].	9
Abb. 4: Nephrotisches Syndrom, Ödementstehung, mod. nach [110].	11
Abb. 5: Hemmung der proteolytischen ENaC-Aktivierung durch Aprotinin beim nephrotischen Syndrom, mod. nach [118].	13
Abb. 6: Metabolischer Käfig.	20
Abb. 7: Aprotinin- und Placebopelletimplantation.	22
Abb. 8: Versuch 1: Stressmodell Nidrigsalzdiät, publiziert in [35].	24
Abb. 9: Versuch 1.1: Amilorid-sensitive Natriurese, publiziert in [35].	25
Abb. 10: Versuch 2: Stressmodell Triamteren-Therapie.	26
Abb. 11: Versuch 3: Dosisabhängigkeit von Aprotinin, publiziert in [35].	26
Abb. 12: Versuch 4: Langzeiteffekte von Aprotinin.	27
Abb. 13: Test-Prinzip P-CHECK®, entnommen aus [143].	34
Abb. 14: Körpergewicht nach Pelletimplantation, publiziert in [35].	41
Abb. 15: Täglich erhobene Daten, publiziert in [35].	43
Abb. 16: Aprotininkonzentration im Urin, publiziert in [35].	44
Abb. 17: Proteaseaktivität im Urin, publiziert in [35].	45
Abb. 18: Amiloridkonzentration im Urin, publiziert in [35].	46
Abb. 19: Natriurese und Amilorid-sensitive Natriurese, publiziert in [35].	47
Abb. 20: Elektrolyte im Urin, publiziert in [35].	48
Abb. 21: Plasma-Cystatin C und Plasma-Harnstoff, publiziert in [35].	49
Abb. 22: Plasma-Aldosteron, publiziert in [35].	50
Abb. 23: Immunhistochemie γ -ENaC und γ -ENaC Score, publiziert in [35].	52
Abb. 24: Western Blot und Densitometrie: γ -ENaC, publiziert in [35].	53
Abb. 25: Proximaler Tubulus - Funktionsmarker, publiziert in [35].	54
Abb. 26: PAS-Färbung, TSI und GSI Score, publiziert in [35].	56
Abb. 27: KIM-1, publiziert in [35].	58
Abb. 28: Akkumulation Aprotinin, Immunhistochemie, publiziert in [35].	59
Abb. 29: Akkumulation Aprotinin, Elektronenmikroskopie, publiziert in [35].	60

Abb. 30: Aprotinin und Triamteren: Körpergewicht.	61
Abb. 31: Aprotinin und Triamteren: Täglich erhobene Daten.....	63
Abb. 32: Aprotinin und Triamteren: Natriurese, Cystatin C, Aldosteron.....	64
Abb. 33: Aprotinin und Triamteren: Proximaler Tubulus - Funktionsmarker.	65
Abb. 34: Dosisabhängigkeit Aprotinin: Aprotinin im Urin, publiziert in [35].	67
Abb. 35: Dosisabhängigkeit Aprotinin: Cystatin C, publiziert in [35].	68
Abb. 36: Dosisabhängigkeit Aprotinin: Korrelationen, publiziert in [35].	69
Abb. 37: Dosisabhängigkeit Aprotinin: PAS-Färbung, TSI und GSI Score, publiziert in [35].....	70
Abb. 38: Dosisabhängigkeit Aprotinin: KIM-1, publiziert in [35].	71
Abb. 39: Dosisabhängigkeit Aprotinin: Akkumulation, publiziert in [35].	72
Abb. 40: Langzeiteffekte Aprotinin: PAS-Färbung, TSI und GSI Score, publiziert in [35].....	73
Abb. 41: Langzeiteffekte Aprotinin: KIM-1, publiziert in [35].	74
Abb. 42: Langzeiteffekte Aprotinin: Akkumulation, publiziert in [35].	75

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Abkürzungsverzeichnis.	V
Tabelle 2: Material - Geräte und Computerprogramme.	15
Tabelle 3: Material - Verbrauchsmaterial.	16
Tabelle 4: Material - Kits und Reagenzien.	17
Tabelle 5: Material - Eingesetzte Medikamente.	18
Tabelle 6: Material - Eingesetzte Produkte für die Tierhaltung.	18
Tabelle 7: Zusammensetzung Diäten, mod. entnommen aus [123, 124].	21
Tabelle 8: Blutgasanalyse.....	51

Tabelle 1: Abkürzungsverzeichnis.

A+K; A+N	Aprotinin+Kontrolle; Aprotinin+Niedrigsalz
Abb.	Abbildung
Amil.	Amilorid
APR	Aprotinin
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
Arg	Arginin
ASDN	Aldosteron-sensitives distales Nephron
ATP	Adenosintriphosphat
BART	Blood conservation using Antifibrinolytics in a Randomized Trial
BGA	Blutgasanalyse
c	Konzentration
Ca ²⁺	Calcium
CD	Sammelrohr
CNT	Verbindungstubulus
DCT2	Spätdistales Konvolut
DF	Dilution Factor (Verdünnungsfaktor)
DMSO	Dimethylsulfoxid
Dnp	Dinitrophenyl
E	Extinktion
EACA	ε-Aminocapronsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMA	Europäische Arzneimittelbehörde
ENaC	Epithelialer Natriumkanal
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
G6P(-DH)	Glucose-6-Phosphat(-Dehydrogenase)
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GLDH	Glutamatdehydrogenase
GSI	Glomerulosklerose-Index
h	Stunde(n)
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
Hb	Hämoglobin
HCl	Salzsäure
HCO ₃ std.	Standardbikarbonat
HRP	Horseradish Peroxidase
IHC	Immunhistochemie
i.R.	Im Rahmen
Jew.	Jeweils, jeweilig(e)
K	Kontrolltag
K ⁺	Kalium
kDa	Kilodalton
KGW	Körpergewicht
KIM-1	Kidney Injury Molecule-1
KIU	Kallikrein-Inhibitor-Einheiten

Krea	Kreatinin
Lyoph.	lyophilisiert/gefriergetrocknet
m	Steigung einer Geraden
max.	maximal
Max.	Maximum
Mca	7-Methoxycoumarinyl-4-acetyl
Mg ²⁺	Magnesium
min	Minuten
Min.	Minimum
mod.	Modifiziert
MW	Mittelwert
n	Fallzahl
Na ⁺	Natrium
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid
NAPaR	Nordic Aprotinin Patient Registry
NaPi IIa	Natrium-Phosphat-Kotransporter
P+K; P+N	Placebo+Kontrolle, Placebo+Niedrigsalz
PAS	Periodic acid-Schiff
PBS	Phosphate Buffered Saline
PFA	Paraformaldehyd
p-NA	para-Nitroanilin
PNGase F	Peptide:N-Glycosidase F
R(F)U	Relative (Fluorescence) Units
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RFC	Relative Fluorescence Counts
ROMK-Kanal	Renal Outer Medullary Potassium channel
rpm	Revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde(n)
SEM	Standard error of the mean
SGLT 1/2	Natrium-Glukose-Kotransporter 1/2
SO ₂	Sauerstoffsättigung
SPF	Specific-Pathogen-Free/spezifiziert pathogenfrei
t	Zeit
TBS	Tris-Buffered Saline
TMB	Tetramethylbenzidin
Triam.	Triamteren
TSI	Tubulointerstitieller Schädigungsindex
TXA	Tranexamsäure
Veh.	Vehikel
Δ	Differenz
λ	Wellenlänge

1. Einleitung

1.1 Aprotinin

Aprotinin ist ein 58 Aminosäuren langes Polypeptid, das erstmals in den 1930er Jahren von Kraut *et al.* [1] und Kunitz *et al.* [2] in Lymphknoten, Ohr- und Bauchspeicheldrüsen von Rindern nachgewiesen wurde [3]. Als unspezifischer Inhibitor von einer Vielzahl von Serinproteasen wurde Aprotinin klinisch vor allem als Antifibrinolytikum zur Reduktion des Blutverlusts in der Herzchirurgie und in weiteren chirurgischen Disziplinen eingesetzt [4-6]. Wegen einer erhöhten Sterblichkeitsrate und einer erhöhten Inzidenz an akuten Nierenschädigungen wurde Aprotinin 2007 vom Markt genommen. Im Jahr 2012 wurde Aprotinin für Patienten mit hohem Blutungsrisiko bei einer isolierten herzchirurgischen Bypass-Operation unter Verwendung einer extrakorporalen Zirkulation in Europa und Kanada wieder zugelassen [7-9]. Die Mechanismen, die zu den renalen Nebenwirkungen unter Aprotinin führen, konnten bisher nicht eindeutig geklärt werden [10, 11].

1.1.1 Pharmakologische Eigenschaften von Aprotinin

1.1.1.1 Pharmakodynamische Eigenschaften

Aprotinin inhibiert unspezifisch Serinproteasen wie beispielsweise Plasmin, Plasma- und Gewebe-Kallikrein, Faktor XII, Trypsin, Chymotrypsin und Elastase [4, 7, 12]. Die Serinproteasen werden durch die Bildung reversibler Komplexe mit Aprotinin abhängig von der Dosis und der jeweiligen enzymatischen Affinität gehemmt [3, 13]. Aufgrund der breiten Wirksamkeit löst Aprotinin multiple Effekte sowohl im Tiermodell als auch im Menschen aus. Neben den antifibrinolytischen Eigenschaften vermittelt Aprotinin antiinflammatorische [14], thrombozytenprotektive [15], antioxidative [7] und teilweise auch neuroprotektive [16, 17] Prozesse. Diese Eigenschaften sind gerade bei der Anwendung einer Herz-Lungen-Maschine vorteilhaft, da eine extrakorporale Zirkulation mit einer Freisetzung von proteolytischen Enzymen und mit einer Dysbalance im Koagulationssystem und in der systemischen Entzündungsantwort einhergeht [14, 15, 18, 19].

Die Reduktion des Blutverlusts durch Aprotinin resultiert vor allem aus der direkten Inhibition von Plasmin, wodurch die Fibrinolyse unmittelbar gehemmt wird. Außerdem wird bei der Volldosisanwendung von Aprotinin zusätzlich Plasma-Kallikrein inhibiert, das bei der extrakorporalen Zirkulation beim Kontakt mit den negativ geladenen Oberflächen entsteht. Auf diese Weise wird sowohl der intrinsische Weg der Koagulationskaskade als auch die Fibrinolyse beeinflusst und pathophysiologische Veränderungen in beiden Systemen reduziert [4, 5, 7, 19, 20]. Die anderen etablierten Antifibrinolytika Tranexamsäure (TXA) und ϵ -Aminocaprinsäure (EACA) blockieren als Lysinanaloga bereits die Bildung von Plasmin, indem sie die Lysinbindungsstellen von Plasminogen besetzen und die Bindung an Fibrin verhindern (siehe Abbildung (Abb.) 1) [4, 13, 20, 21].

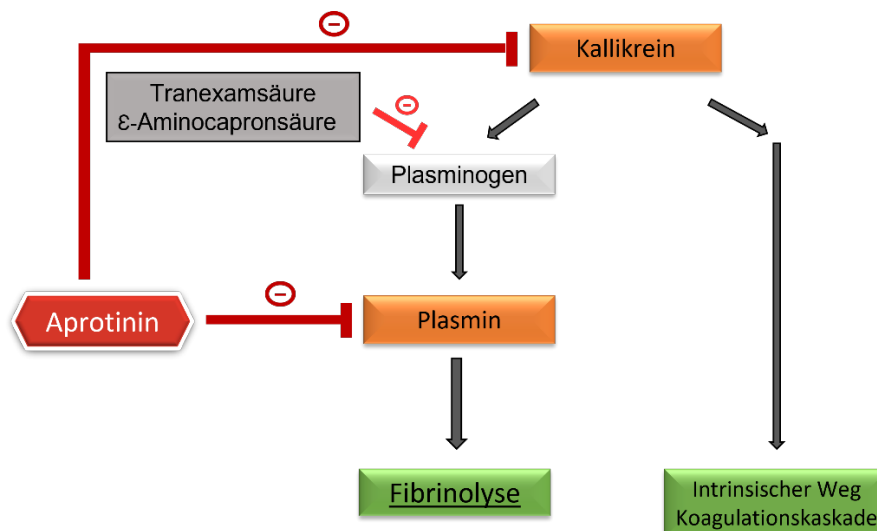


Abb. 1: Aprotinin: Fibrinolyse und Koagulationskaskade, modifiziert (mod.) nach [20].

Schematische Darstellung der inhibitorischen Effekte (dunkelrote Rechtecke mit Minus-Symbol) von Aprotinin auf Plasmin und Kallikrein (orange) und dementsprechend indirekt auf die Fibrinolyse und die Initiierung des intrinsischen Weges der Koagulationskaskade (hellgrün). Die Antifibrinolytika Tranexamsäure und ϵ -Aminocaprinsäure (grau) besetzen Lysinbindungsstellen von Plasminogen und hemmen auf diesem Weg die Fibrinolyse.

1.1.1.2 Pharmakokinetische Eigenschaften

Aprotinin muss als Polypeptid wegen der gastralen Inaktivierung parenteral verabreicht werden [22]. Nach der intravenösen Applikation fällt die Aprotininkonzentration im Plasma biphasisch ab. Unmittelbar nach der Gabe erfolgt eine rasche Distribution von Aprotinin im Extrazellularraum. Die weitere Abnahme der Plasma-Aprotininkonzentration ist durch die fast ausschließliche renale

Metabolisierung bedingt. Nach wenigen Stunden beginnt die terminale Eliminationsphase mit einer Halbwertszeit von 5-10 Stunden [3, 9, 19, 23].

Das kleine, 6512 Dalton schwere, positiv geladene Polypeptid Aprotinin wird frei durch die glomeruläre Basalmembran filtriert [10, 11]. Anschließend wird Aprotinin zum Großteil im S1 Segment des proximalen Tubulus nach der Bindung an die im tubulären Bürstensaum gelegenen Megalin/Cubulin-Rezeptoren [24] endozytiert [10, 11, 25]. Die daraus entstandenen Endosomen gelangen ins Zytoplasma und werden von Lysosomen phagozytiert. Ein kleinerer Anteil des Aprotinins gelangt in distale tubuläre Bereiche und wird in kortikal gelegenen Zellen des Verbindungsstücks und in Sammelrohrzellen metabolisiert. Bestandteile von Aprotinin sind 24 Stunden bis hin zu einigen Tagen nach der Anwendung intrazellulär nachweisbar [10, 11, 19]. Bei Patienten¹ mit einer intakten Nierenfunktion werden 48 Stunden nach einer einmaligen intravenösen Applikation etwa 25-40% des Aprotinins als Metabolite im Urin detektiert. Der Anteil des unverändert ausgeschiedenen Aprotinins beträgt 1,1-8,7% und kann dosisabhängig gesteigert werden [9, 19, 23, 26].

Proximaler Tubulus

Der proximale Tubulus spielt als Lokalisation von multiplen Transportmechanismen nicht nur beim Metabolismus von Aprotinin eine wichtige Rolle. Der bei der glomerulären Filtration gebildete Primärharn enthält für den Organismus essenzielle Bestandteile, wie beispielsweise Wasser, Elektrolyte und eine Vielzahl von organischen Stoffen. Im proximalen Tubulus existieren unterschiedliche trans- und parazelluläre Transportmechanismen, die eine tubuläre Rückresorption der Bestandteile ermöglichen [27]. Die Voraussetzung für viele tubuläre Transportprozesse stellt der nach intrazellulär gerichtete elektrochemische Gradient für Natrium dar, der durch die basal verortete Natrium-/Kalium-Pumpe und die Hydrolyse des energiereichen Mononukleotids Adenosintriphosphat (ATP) aufrechterhalten wird [27, 28]. Verschiedene sekundär-aktive Transportprozesse, wie die Resorption von Glukose durch die Natrium-Glukose-Kotransporter

¹ Die in der Arbeit gewählte männliche Form bezieht sich zugleich auf männliche, weibliche und diverse Personen. Auf Mehrfachbezeichnungen wird wegen der besseren Lesbarkeit verzichtet.

1/2 (SGLT 1/2) [29] oder von Phosphat durch den Natrium-Phosphat-Kotransporter (NaPi IIa) [30] sind an die tubuläre Natriumresorption gekoppelt [27, 31]. Polypeptide bzw. Proteine wie zum Beispiel Albumin, Cystatin C [32] und Aprotinin werden hingegen durch spezielle tubulär gelegene Megalin/Cubulin-Rezeptoren gebunden, proximal tubulär endozytiert und lysosomal abgebaut [24, 33-35]. Proximale tubuläre Schäden gehen aufgrund der Auswirkungen auf die Transportprozesse mit einer erhöhten renalen Ausscheidung der genannten Stoffe einher und werden diagnostisch bestimmt [35].

1.1.2 Klinische Anwendung und Stellenwert von Aprotinin

Seit den 1950er Jahren wurde Aprotinin bei klinischen Zuständen, die mit einer Freisetzung von Serinproteasen und dadurch mit einer Hyperfibrinolyse einhergehen (Pankreatitis, gynäkologische Erkrankungen, Schockzustände, urologische Eingriffe, etc.) eingesetzt [10, 19, 36]. Nachdem Royston *et al.* [37] im Jahr 1987 eine deutliche Reduktion des Blutverlusts durch Aprotinin feststellten, wurde Aprotinin vielfach bei herzchirurgischen Operationen angewendet und für die koronare Bypasschirurgie zugelassen [6, 38]. Aprotinin wurde zudem „off-label“ in weiteren chirurgischen Fachgebieten, wie beispielsweise in der Orthopädie [39], der hepatobiliären [40] und der pädiatrischen Chirurgie [41] zur Vermeidung von Blutungskomplikationen eingesetzt [6, 19, 42]. Nach einem vorübergehenden Zulassungsstopp (siehe 1.1.3) ist die systemische Gabe von Aprotinin in Kanada und Europa für folgende Indikation wieder zugelassen [8]:

„Aprotinin wird prophylaktisch zur Verringerung von Blutverlust und Bluttransfusionen eingesetzt bei erwachsenen Patienten mit hohem Blutungsrisiko im Verlauf einer isolierten Bypass-Operation mit extrakorporaler Zirkulation“ [9].

In den Leitlinien der europäischen Gesellschaft für Herz- und Thoraxchirurgie und der Kardioanästhesie wird grundsätzlich die Anwendung von Aprotinin zur Reduktion des Blutverlusts bei herzchirurgischen Eingriffen empfohlen (IA Empfehlung) [43]. Im Gegensatz dazu wurde in den Leitlinien der amerikanischen Gesellschaft für Herzchirurgie und Kardioanästhesie die IA Empfehlung für Aprotinin [44] aufgrund der Sicherheitsbedenken auf eine IIIA Empfehlung [45] abgestuft, sodass hier vom routinemäßigen Einsatz von Aprotinin abgeraten wird

[4, 38]. Aprotinin ist das am besten untersuchte Antifibrinolytikum [44, 46, 47]. Unzählige Untersuchungen zeigen, dass die Gabe von Aprotinin mit einer deutlichen Reduktion des Blutverlusts, der Anzahl von Transfusionen und mit einem geringeren Risiko für erneute Operationen wegen Blutungskomplikationen einhergeht [5, 8, 16, 48]. Zudem scheint die antifibrinolytische Wirkung von Aprotinin im Vergleich zu TXA und EACA deutlicher zu sein [5, 7, 44, 49].

1.1.3 Sicherheitsbedenken von Aprotinin

Nach jahrelanger Anwendung wurden Mitte der 2000er Jahre auf der Grundlage von hochrangig publizierten Beobachtungsstudien [25, 50-54] Sicherheitsbedenken gegenüber der Applikation von Aprotinin geäußert [6, 8]. Verglichen mit TXA bzw. EACA wurde neben einer erhöhten Mortalität [50, 52-54] von einer signifikant erhöhten Inzidenz an akuten Nierenschädigungen [25, 51, 52, 54] unter Aprotinin berichtet. Nachdem die randomisierte, kontrollierte Blood conservation using Antifibrinolytics in a Randomized Trial-Studie (BART-Studie) wegen einer erhöhten Mortalität unter Aprotinin im Vergleich zu TXA und EACA frühzeitig abgebrochen wurde [55], wurde Aprotinin Ende des Jahres 2007 in den USA und im Jahr 2008 in Kanada und Europa vom Markt genommen [4, 42].

Die BART-Studie [55] geriet wegen methodischer Mängel in die Kritik [4, 38, 56, 57]. Das Gesundheitsministerium von Kanada (Health Canada) und die Europäische Arzneimittelbehörde (EMA) kamen bei Untersuchungen zu dem Entschluss, dass die Vorteile von Aprotinin die möglichen Risiken in der zugelassenen Indikation überwiegen [8, 58]. Infolgedessen wurde Aprotinin in Kanada und Europa im Jahre 2011 bzw. 2012 unter strengen Auflagen wieder zugelassen [58-60]. Der jeweilige Rechteinhaber von Aprotinin ist seitdem zum Führen eines Registers zur frühzeitigen Detektion von Sicherheitsrisiken verpflichtet [7, 56]. Seit dem Jahr 2016 wird dieses Register (Nordic Aprotinin Patient Registry-NAPaR) von der Firma Nordic geführt [61].

Renale Sicherheitsbedenken

Aufgrund der fast vollständigen renalen Metabolisierung von Aprotinin konnten negative renale Effekte nie ausgeschlossen werden [62]. Seit der Anwendung von Aprotinin in der Herzchirurgie gab es eine Vielzahl an Studien, die den

Einfluss von Aprotinin auf die Nierenfunktion untersuchten [11]. Insbesondere Mitte der 2000er Jahre berichteten Studien von einer erhöhten Inzidenz an akuten Nierenschädigungen unter Aprotinin. Diese reichten von signifikanten Erhöhungen der Kreatininkonzentrationen im Plasma [49, 51, 52, 54, 63] bis hin zu einer erhöhten Inzidenz an dialysepflichtigen Nierenschädigungen [25, 64]. Im Gegensatz dazu zeigten weitere Studien wiederum keine negativen renalen Effekte bei der Anwendung von Aprotinin [16, 47, 65]. Dabei war die Vergleichbarkeit der Studien sowohl durch verschiedenste damalige Definitionen für Nierenschädigungen bzw. Kriterien für Dialyseindikationen [11, 66] als auch durch unterschiedlich berücksichtigte perioperative Risiken erschwert [11, 67, 68]. Nichtsdestotrotz wird derzeit ein signifikant erhöhtes Risiko für einen vorübergehenden postoperativen Anstieg der Plasma-Kreatininkonzentration um mindestens 0,5 mg/dl bei der Anwendung von Aprotinin in der zugelassenen Indikation angenommen. Dabei geht man aktuell von keinem erhöhten Risiko für dialysepflichtige Verläufe aus [8, 9, 11, 56].

1.2 Aprotinin und Interaktion mit dem epithelialen Natriumkanal (ENaC)

Der ENaC ist ein konstitutiv aktiver Ionenkanal, der die Natriumresorption an der Membran von Epithelzellen vermittelt und maßgeblich an der Regulation des Elektrolyt- und Wasserhaushalts beteiligt ist [69, 70]. Neben dem renalen distalen Tubulus ist der ENaC im Colon, in den Atemwegen, in Endothelzellen, in Schweiß- und Speicheldrüsen, in Geschmackssinneszellen, im Innenohr und teilweise im zentralen Nervensystem lokalisiert [71, 72]. In den Nieren befindet sich der ENaC zusammen mit Kaliumkanälen (Renal Outer Medullary Potassium Channel - ROMK Kanal) [27] an der tubulären Seite der Hauptzellen im sogenannten Aldosteron-sensitiven distalen Nephron (ASDN), das sich aus dem spät-distalen Konvolut (DCT2), dem Verbindungstubulus (CNT) und dem Sammelrohr (CD) zusammensetzt [70, 73, 74]. Der elektrochemische Gradient für die tubuläre Natriumresorption und somit auch für die gekoppelte Kaliumsekretion wird durch die basolateral gelegene Natrium-Kalium-ATPase aufrechterhalten [75]. Obwohl der ENaC nur mit weniger als 5 % an der tubulären Natriumresorption beteiligt

ist, nimmt dieser eine Schlüsselrolle in der Feinabstimmung der finalen Natriumexkretion ein [76, 77]. Seine entscheidende Rolle wird durch hereditäre aktivierende bzw. deaktivierende Mutationen des ENaC mit schweren pathophysiologischen Auswirkungen auf den Elektrolyt- und Wasserhaushalt, auf die Blutdruckregulation und auf den Säure-Basen-Haushalt deutlich [70, 74, 78].

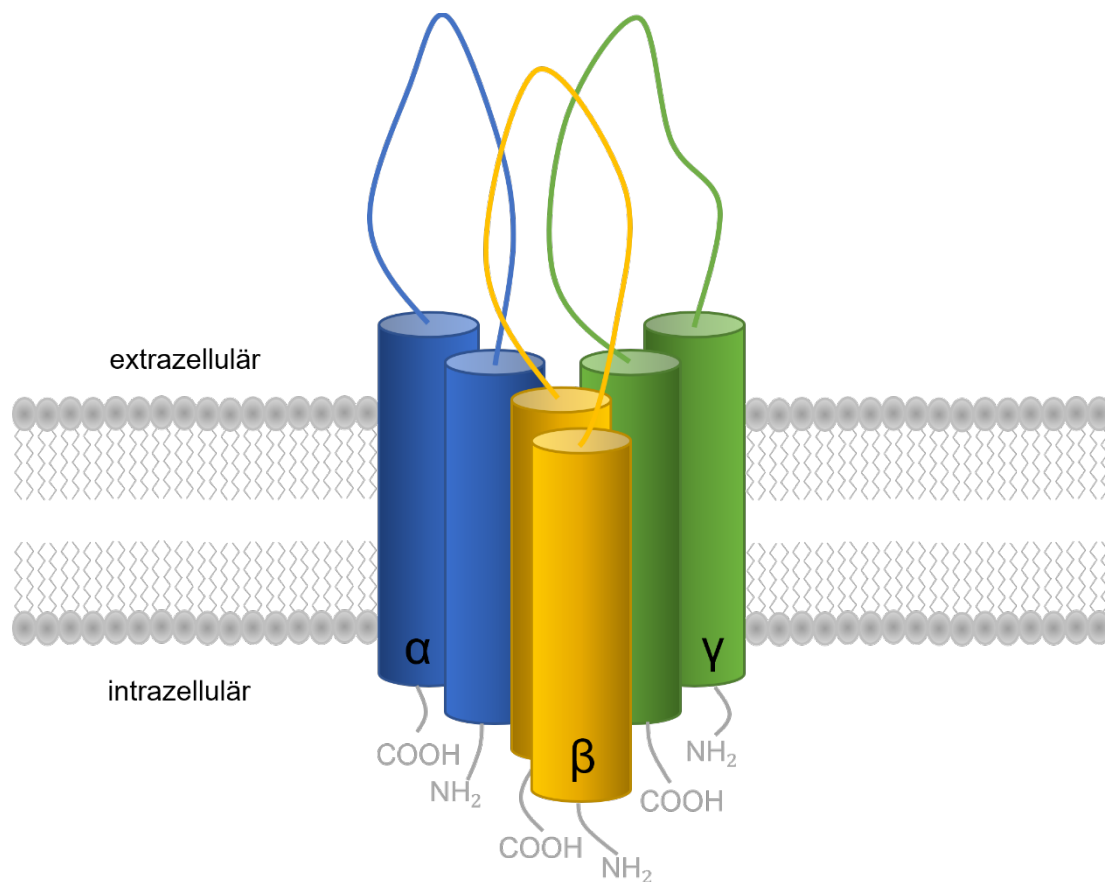


Abb. 2: Schematischer Aufbau des ENaC.

Der renale ENaC besteht aus drei Untereinheiten (α , β , γ), die jeweils zwei Transmembrandomänen aufweisen, über die sie in der Zellmembran (grau) verankert sind. Intrazellulär befinden sich die jeweiligen Amino (NH_2)- und Carboxylenden (COOH), extrazellulär befindet sich jeweils eine große Extrazellulärdomäne.

Der ENaC besteht aus je einer α -, β - und γ -Untereinheit, die jeweils von verschiedenen Genen kodiert werden [79, 80]. Jede Untereinheit besteht aus zwei in der Plasmamembran verankerten Transmembrandomänen, deren kurze Amino- und Carboxylenden intrazellulär gelegen sind. Auf der extrazellulären Seite werden die Transmembrandomänen von jeweils einer großen Extrazellulärdomäne verbunden [81, 82]. Bestimmte Abschnitte dieser Domänen werden durch eine Vielzahl von Proteasen geschnitten [77, 83, 84].

1.2.1 Regulation des ENaC

Die Funktion des ENaC wird durch diverse komplexe intra- und extrazelluläre Regulationsmechanismen beeinflusst [71, 72]. Dabei sind Faktoren, die zum einen die Anzahl der membranständigen Kanäle und zum anderen deren Offenwahrscheinlichkeit regulieren von großer Bedeutung [69, 85]. Das in der Nebennierenrinde produzierte Mineralokortikoid Aldosteron ist eines von vielen Hormonen, das die Anzahl der Kanäle in der Zellmembran reguliert. Aldosteron steigert die Proteinsynthese und die proteolytische Prozessierung der Kanaluntereinheiten durch Furin, beschleunigt deren Transport an die apikale Membran („Trafficking“) und hemmt den Abbau bzw. verstärkt Recyclingmechanismen der membranständigen Kanäle [85-87]. Die Offenwahrscheinlichkeit des ENaC wird zudem durch Veränderungen der intra- und extrazellulären Natriumkonzentrationen, durch mechanische Scherkräfte und durch Lipide modifiziert [71, 72]. Eine Besonderheit des ENaC stellt dessen posttranslationale Regulation durch Serinproteasen dar, wodurch ebenfalls die Offenwahrscheinlichkeit erhöht wird [83].

Proteolytische Aktivierung des ENaC durch Serinproteasen

Der durch Vallet *et al.* [88] beschriebene Mechanismus der proteolytischen ENaC-Aktivierung nimmt eine Schlüsselrolle bei der ENaC-Regulation ein [89, 90]. Dabei spalten bzw. hydrolysieren Serinproteasen bestimmte Peptidbindungen der Extrazellulardomänen der α - und γ -Untereinheiten. Die Spaltungen erfolgen schrittweise, was sich in der stufenweisen Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit des ENaC widerspiegelt [69, 77, 83, 90, 91]. Bevor der ENaC in die Zellmembran integriert wird, spaltet die intrazelluläre Serinprotease Furin zweimal die α -(Arginin-205 und Arginin-231) und einmal die γ -Untereinheit (Arginin-143) [71, 92, 93]. Dabei wird ein 26 Aminosäuren langes inhibitorisches Polypeptid aus der α -Untereinheit herausgeschnitten, woraus eine höhere Offenwahrscheinlichkeit des Kanals resultiert [94]. Die vollständige ENaC-Aktivierung wird durch eine weitere extrazelluläre Spaltung der γ -Untereinheit distal der Furin-Schnittstelle mit der folgenden Freisetzung eines weiteren inhibitorischen Peptids erreicht [84, 95, 96]. Diese Spaltung erfolgt an spezifischen Schnittstellen

durch diverse Proteasen, wie beispielsweise durch die membrangebundenen Serinproteasen Prostin [88], Transmembran Protease Serin 4, Matriptase [97] und auch durch die löslichen extrazellulären Serinproteasen Plasmin, Kallikrein, Trypsin, Chymotrypsin und neutrophile Elastase [77, 83, 98].

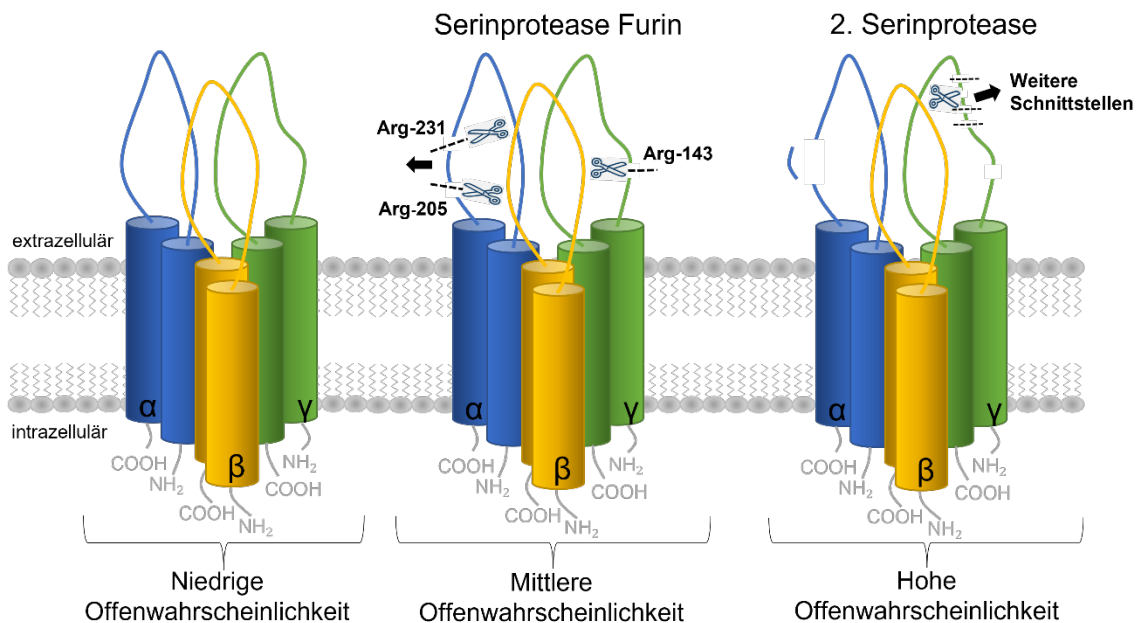


Abb. 3: Proteolytische Aktivierung des ENaC, mod. nach [99].

Links: Keine Spaltung der Extrazellulärdomänen durch Serinproteasen, niedrige Offenwahrscheinlichkeit, weitestgehend stillgelegter ENaC.

Mitte: Zweimalige Spaltung (Schnittstellen durch Scheren symbolisiert, Lokalisationen: Arg-205/Arg-231) der Extrazellulärdomäne der α -Untereinheit durch die Serinprotease Furin mit Freisetzung eines inhibitorischen Polypeptids (schwarzer Pfeil). Zusätzliche Spaltung (Scherensymbol) der Extrazellulärdomäne der γ -Untereinheit (Lokalisation: Arg-143). Dadurch resultiert eine mittlere Offenwahrscheinlichkeit des ENaC mit verstärkter Natriumresorption.

Rechts: Inhibitorisches Polypeptid im Bereich der α -Untereinheit bereits freigesetzt. Zusätzliche Spaltung (Scherensymbol) der Extrazellulärdomäne der γ -Untereinheit durch verschiedene mögliche Serinproteasen mit Freisetzung eines weiteren inhibitorischen Polypeptids (schwarzer Pfeil). Daraus resultiert eine hohe Offenwahrscheinlichkeit des ENaC mit gesteigerter Natriumresorption. Arg: Arginin.

Pharmakologische Inhibition des ENaC

Es existieren verschiedene Möglichkeiten den ENaC im Bereich des ASDN pharmakologisch zu hemmen, woraus eine erhöhte Natriumexkretion und eine diuretische Wirkung resultiert [100]. Die kaliumsparenden Diuretika Amilorid und Triamteren hemmen von der tubulären Seite aus direkt den ENaC, indem ein reversibler Verschluss der Kanalpore erfolgt [70, 100, 101]. Zudem inhibiert Amilorid im Tubulus die Serinprotease Urokinase [102, 103]. Die Mineralokortikoidrezeptorantagonisten Spironolacton, Eplerenon, Canrenon und Finerenon

hemmen den ENaC indirekt von der plasmatischen Seite aus. Dabei werden zytosolische und membrangebundene Mineralokortikoidrezeptoren kompetitiv blockiert, sodass die multiplen Effekte des Mineralokortikoids Aldosteron auf die ENaC-Expression und auf dessen Aktivität inhibiert werden [100, 104]. Da die Natriumresorption durch den ENaC mit einer tubulären Kaliumsekretion einhergeht, steigt durch diese Medikamente auch der Plasma-Kaliumspiegel an, was als typische Nebenwirkung beachtet werden muss. Bei schweren Nierenschädigungen sind diese Medikamente kontraindiziert [100].

1.2.2 Das nephrotische Syndrom

Als nephrotisches Syndrom bezeichnet man ein Krankheitsbild, das durch eine Proteinurie von $> 3,5$ g/Tag, eine Hypoproteinämie bzw. Hypalbuminämie, eine Hyperlipoproteinämie und eine Entwicklung von Ödemen charakterisiert ist [105, 106]. Ursächlich für die großmolekulare Proteinurie (> 60 Kilodalton (kDa)) sind Schäden an der glomerulären Filtrationsbarriere, die aus dem fenestrierten Endothel, aus der glomerulären Basalmembran und aus der Schlitzmembran zwischen den Podozyten zusammengesetzt ist [106, 107]. Die Schäden sind einerseits auf primäre glomeruläre Erkrankungen, wie die membranöse Glomerulonephritis, die fokal-segmentale Glomerulosklerose und die Minimal-Change-Glomerulopathie zurückzuführen. Andererseits können auch sekundäre glomeruläre Erkrankungen zum Beispiel in Folge eines Diabetes mellitus, eines Lupus erythematodes, einer Amyloidose, von Infektionen, hereditären Erkrankungen oder Neoplasien zu einem nephrotischen Syndrom führen [105, 106, 108, 109].

Pathomechanismus der Ödementstehung beim nephrotischen Syndrom

Beim nephrotischen Syndrom führt die Proteinurie zu einer gesteigerten Natriumresorption mit einer konsekutiven Volumenretention, die klinisch durch Ödeme sichtbar wird [106, 110]. Mit der Underfill- bzw. Overfill-Theorie existieren zwei Erklärungsansätze, die den Zusammenhang zwischen der nephrotischen Proteinurie und der Ödementstehung beschreiben. Bei beiden Theorien spielt der ENaC für die gesteigerte Natriumresorption eine entscheidende Rolle [110-113].

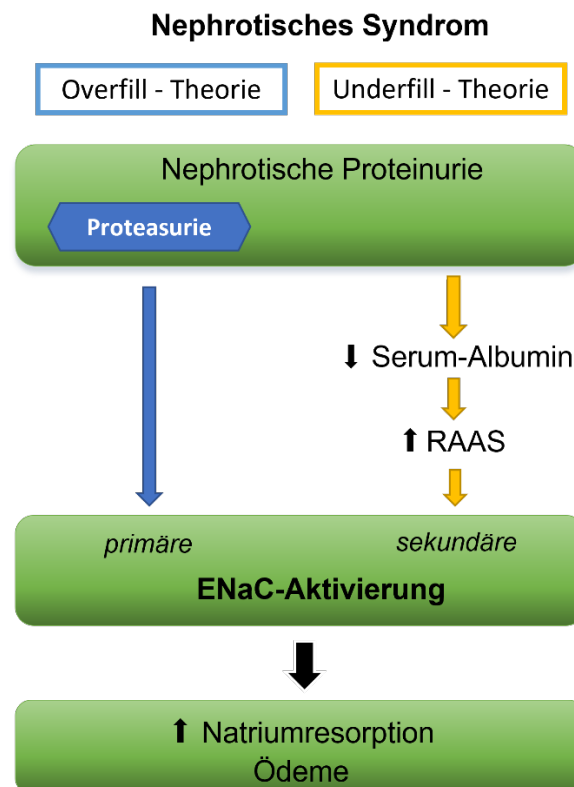


Abb. 4: Nephrotisches Syndrom, Ödementstehung, mod. nach [110].

Gemäß der Overfill-Theorie (links) führt die glomeruläre Schädigung zu einer Proteinurie bzw. Proteasurie und dadurch zu einer direkten, *primären* proteolytischen ENaC-Aktivierung. Die Underfill-Theorie (rechts) besagt, dass die Proteinurie zu einer Hypalbuminämie und hierdurch über ein Absinken des onkotischen Drucks zu einer intravasalen Volumendepletion führt, wodurch das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) aktiviert wird und zu einer indirekten, *sekundären* ENaC-Aktivierung beiträgt. Beide Ansätze resultieren in einer ENaC-Aktivierung, die schließlich zu einer starken Natriumresorption bzw. Ödementstehung führt. RAAS: Renin-Angiotensin-Aldosteron-System; ENaC: Epithelialer Natriumkanal.

Gemäß der Underfill-Theorie führt die Proteinurie zu einer Hypalbuminämie, wodurch der intravasale onkotische Druck abnimmt und der nach extravasal gerichtete hydrostatische Druck überwiegt [114, 115]. Aufgrund der daraus resultierenden intravasalen Hypovolämie wird das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) aktiviert, woraus *sekundär* eine gesteigerte Natrium- und Volumenresorption resultiert [110, 111]. Diverse Untersuchungen zeigen, dass die Underfill-Theorie die Ödementstehung beim nephrotischen Syndrom nicht vollständig erklärt [84, 110, 116]. Die Overfill-Theorie besagt hingegen, dass die geschädigte Niere direkt eine *primäre* verstärkte Natrium- und Volumenresorption auslöst. Der mit der Overfill-Theorie übereinstimmende Mechanismus der proteolytischen Aktivierung des ENaC durch aberrant filtrierte

Serinproteasen wurde im letzten Jahrzehnt eingehend untersucht und wird als bedeutender Mechanismus für die Ödementstehung angesehen. Experimentelle Studien zeigten, dass einige dieser Serinproteasen die α - und γ -Untereinheit des ENaC schneiden, sodass sich eine hohe Offenwahrscheinlichkeit des ENaC einstellt, was zu einer verstärkten Natriumresorption führt [69, 99, 112, 117]. Die vermehrte Ausscheidung der Serinproteasen wird in Anlehnung an den Terminus „Proteinurie“ auch als „Proteasurie“ bezeichnet [110, 112, 118]. Die Theorien schließen sich gegenseitig nicht aus, sondern stellen vielmehr die Eckpunkte eines Spektrums verschiedener pathophysiologischer Prozesse dar. Beispielsweise kann die Proteasurie gemäß der Overfill-Theorie zunächst durch die direkte ENaC-Aktivierung zu einer verstärkten Natriumresorption führen. Bei starker Proteinurie und einhergehender Hypalbuminämie kann zusätzlich das RAAS gemäß der Underfill-Theorie sekundär aktiviert werden. Je nach Genese und Ausprägung der Grunderkrankung spielen die Mechanismen eine unterschiedliche Rolle [110, 118].

1.2.3 Aprotinin und experimentelles nephrotisches Syndrom

Aprotinin inhibiert eine Vielzahl von Serinproteasen. Bohnert *et al.* [119] untersuchten die Auswirkungen einer systemischen Aprotinin-Applikation in einem Doxorubicin-induzierten nephrotischen Mausmodell [120, 121]. Die beim nephrotischen Syndrom bestehende hohe Serinproteaseaktivität im Urin wurde durch Aprotinin nahezu vollständig *in vivo* supprimiert. Dadurch wurde die proteolytische Aktivierung des ENaC gehemmt, sodass trotz der weiterhin bestehenden Proteinurie die vermehrte Natriumresorption und die Ödementstehung verhindert wurde [119, 122]. Damit wird deutlich, dass der Mechanismus der proteolytischen ENaC-Aktivierung für die Ödementstehung beim nephrotischen Syndrom eine entscheidende Rolle spielt [110, 119]. Die Inhibition der Serinproteaseaktivität könnte ein zukünftiger Therapieansatz zur Behandlung der Ödeme beim nephrotischen Syndrom darstellen [112, 118].

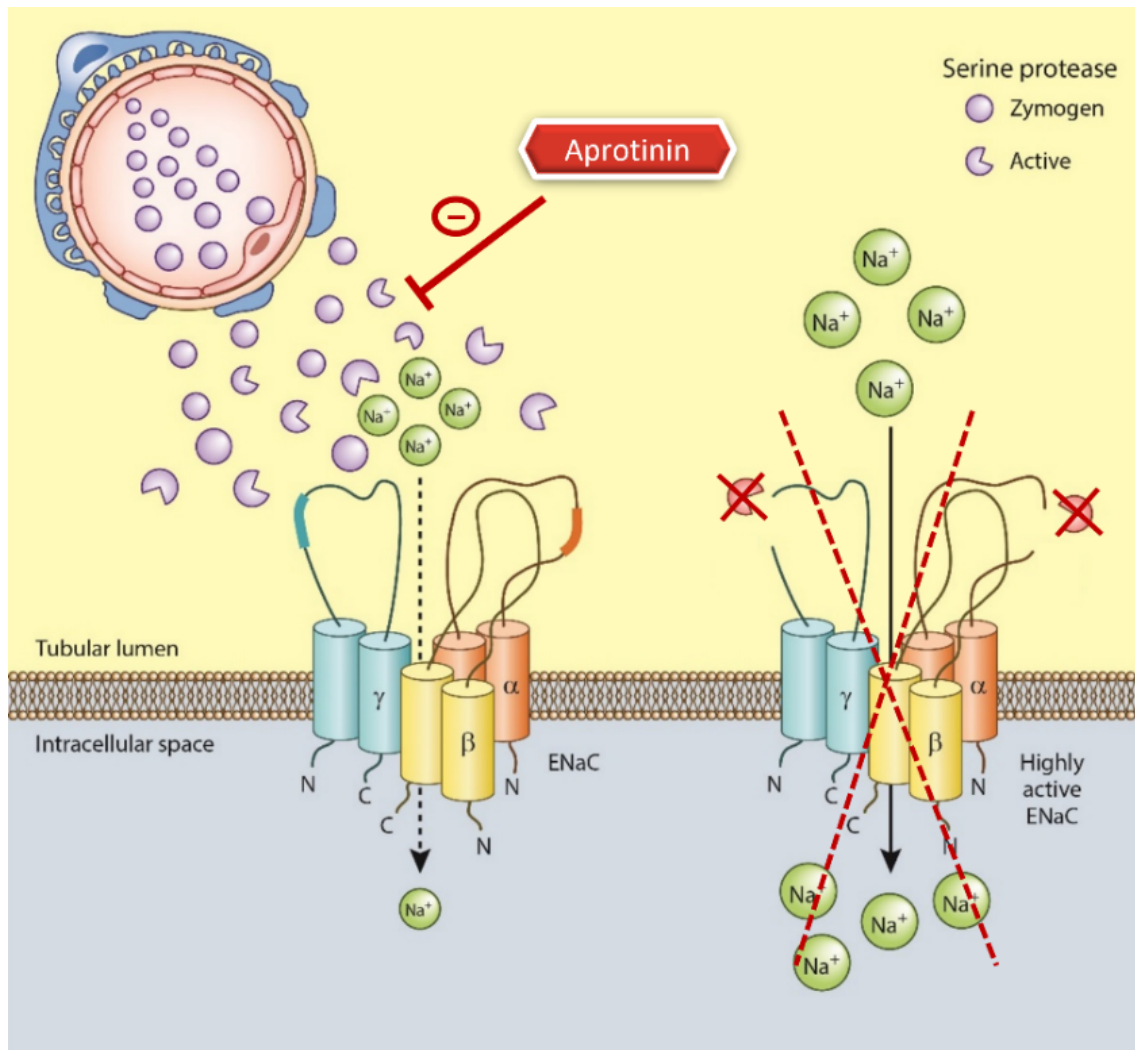


Abb. 5: Hemmung der proteolytischen ENaC-Aktivierung durch Aprotinin beim nephrotischen Syndrom, mod. nach [118].

Die glomeruläre Schädigung (Glomerulus: oben links, podozytäre Schädigung) führt beim nephrotischen Syndrom zu einer Proteinurie bzw. Proteasurie. Die Serinproteasen spalten proteolytisch die Extrazellulärdomänen des ENaC (blaue und orangefarbene Abschnitte) und führen zu einer erhöhten ENaC bedingten Natriumresorption und Ödementstehung (rechte Bildhälfte).

Im nephrotischen Mausmodell hemmt Aprotinin die Serinproteasen im Urin (siehe rotes Minus-Symbol, rote Kreuze), was die proteolytische ENaC-Aktivierung, die Natriumresorption und die Ödementstehung inhibiert (rotes, gestricheltes Kreuz).

Na⁺: Natrium; ENaC: Epithelialer Natriumkanal.

1.3 Fragestellung der Dissertation

Das Antifibrinolytikum Aprotinin wurde unter anderem wegen einer erhöhten Inzidenz an Nierenschädigungen zwischenzeitlich vom Markt genommen. Die jahrzehntelange Kontroverse bezüglich der klinischen Anwendung von Aprotinin und der damit einhergehenden Sicherheitsbedenken setzt sich bis heute fort. Die Mechanismen der renalen Nebenwirkungen von Aprotinin sind weitestgehend unklar und sollen in dieser Arbeit im Mausmodell näher untersucht werden.

Neben den antifibrinolytischen Eigenschaften hemmt Aprotinin als unspezifischer Serinproteaseinhibitor bei nephrotischen Mäusen zudem die proteolytische Aktivierung des ENaC und somit auch die Natriumresorption und die klinisch eindrückliche Ödementwicklung. Bevor Aprotinin als potenzielles Medikament im Rahmen des nephrotischen Syndroms eingesetzt werden kann, müssen die Mechanismen der renalen Nebenwirkungen unter Aprotinin verstanden werden.

In dieser Arbeit soll geklärt werden, ob auch bei gesunden Mäusen eine Aprotininbehandlung mit einer Inhibition der ENaC-Aktivität einhergeht. Dies könnte zu einem Salz- und Volumenverlust führen und ein Erklärungsansatz für die beschriebenen Nierenschädigungen unter Aprotinin darstellen. Darüber hinaus soll untersucht werden, ob die renale Metabolisierung von Aprotinin zu relevanten Schäden im proximalen Tubulus führt. Um diese Hypothesen beantworten zu können, untersuchten wir die renalen Effekte von Aprotinin an gesunden Wildtyp-Mäusen sowohl unter Kontrollbedingungen als auch im Rahmen von Stressmodellen unter einer bestehenden Nidrigsalzdiät bzw. einer diuretischen Therapie mit Triamteren. Zudem soll auch die Frage nach Dosisabhängigkeit und Langzeiteffekten von Aprotinin beantwortet werden. Dazu wurden neben den genannten Stressmodellen weitere Versuche durchgeführt.

2. Material und Methoden

2.1 Material

Tabelle 2: Material - Geräte und Computerprogramme.

Gerät	Hersteller
Acetylen (99,6 Vol.% C ₂ H ₂)	Westfalen AG
ALT 100 - 4M Analysenwaage	Kern & Sohn GmbH
Biofuge 13 (Zentrifuge)	Heraeus Holding GmbH
BioMate 3 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific GmbH
CENTRIFUGE & VORTEX	NeoLab®
Condair CP3mini, Elektroden - Dampfluftbefeuchter	Condair Group AG
Dewar - Transportgefäß Typ B für Stickstoff	KGW-Isotherm GmbH, Karlsruhe
Dräger Vapor® 2000 - Isoflurane	Dräger Medical GmbH
ELx800 Absorptions-Reader für Mikroplatten	BioTek®
EndNote X8.2	Clarivate Analytics
Eppendorf Research pro-300, Multichannel Pipette	Eppendorf AG
Eppendorf Research® plus Pipette (0,1 µl - 2,5 µl)	Eppendorf AG
Eppendorf Research® plus Pipette (0,5 µl - 10 µl)	Eppendorf AG
Eppendorf Research® plus Pipette (10 µl - 100 µl)	Eppendorf AG
Eppendorf Research® plus Pipette (100 µl - 1000 µl)	Eppendorf AG
Eppendorf Research® plus Pipette (2,0 µl - 20 µl)	Eppendorf AG
Eppendorf Research® plus Pipette (20 µl - 200 µl)	Eppendorf AG
Flammenphotometer EFUX 5057	Eppendorf AG
Fluoreszenzdetektor Spark® 10M (Augenklinik Tübingen)	Tecan Group AG
Fluoreszenzscanner (LI-COR Odyssey®)	LI-COR Biosciences GmbH
Gefrierschrank: -20°C	Liebherr
Gefrierschrank: -86°C, Sanyo VIP Series	Panasonic Corporation, Sanyo
GraphPad Prism 8.0	GraphPad Software, Inc.
Hybridization Oven/Shaker	Amersham Biosciences
IL GEM® Premier 3000	Instrumentation Laboratory GmbH
Kühlschrank: 2-8°C: Liebherr Comfort	Liebherr
Megafuge 2.0 R	Heraeus Holding GmbH
Microsoft Excel 2016, Microsoft Word 2016, Power-Point 2016	Microsoft Corporation
MR 3001 Magnetrührer mit Heizung	Heidolph Instruments GmbH
NeoAccupette 3-9905	MedWOW®
pH 211 – Microprocessor pH Meter	Hanna Instruments Deutschland GmbH
Pipettierhelfer, Powerpette Plus	VWR International GmbH

PRECISION Standard Waage	Sartorius Weighing Technology GmbH
Pyrex 15 Glasröhrchen	Sigma-Aldrich
SCHOTT DURAN Becherglas	SIM GmbH
SEIKO Precision SP-2400	SEIKO
Stickstoff-Tank	Messer Group GmbH
Vortex Mixer (S0100-230V)	Labnet
Vortex-Genie 2	Scientific Industries
VX100 Vortexmischer, ABIMED	Labnet

Tabelle 3: Material - Verbrauchsmaterial.

Verbrauchsmaterial	Hersteller
96-well Mikrotiterplatten BRANDplates® mit F-Boden	BRAND GmbH & Co
BD Micro-Fine™ 0,5 ml, U-100 Insulin (30G)	Becton Dickinson GmbH
Bepanthen Augen- und Nasensalbe	Bayer AG
Blutgaskapillaren Na-heparin 280 µl	Hirschmann® Laborgeräte
CELLSTAR® Tubes, 15 ml	Greiner Bio-One GmbH
CELLSTAR® Tubes, 50 ml	Greiner Bio-One GmbH
CryoTube™ Vials	Thermo Fisher Scientific GmbH
DESCOSEPT AF - alkoholisches Desinfektionsmittel	Dr. Schumacher GmbH
Einmal-Küvetten: UV-Küvette mikro (70 µl)	Brand GmbH & Co KG
Ethanol 70%	Universitätsapotheke Tübingen
Ethilon*II 5-0 Nahtmaterial (nicht resorbierbar)	Ethicon, Inc
FALCON ® 10 ml	Corning incorporated
FALCON ® 25 ml	Corning incorporated
FALCON ® 5 ml	Corning incorporated
Handtücher tapira® Plus	GVS-Grossverbraucherspezialisten eG
Kapillar-Adapter	Instrumentation Laboratory, Werfen
Minicaps® Einmal-Kapillarpipetten Na-hep 10 µl	Hirschmann® Laborgeräte
Nitrile, Powder-Free Handschuhe, Größe M (7-8)	Abena GmbH
Paraffinöl dünnflüssig	Carl Roth GmbH + Co.KG
Pipettenspitze farblos: 10 µl	Sarstedt AG&Co
Pipettenspitzen farblos: 1000 µl	Sarstedt AG&Co
Pipettenspitzen farblos: 200 µl	Sarstedt AG&Co
Pipettenspitzen farblos: 20 µl	Sarstedt AG&Co.
Pipettenspitzen Gelb: 200 µl	Ratiolab GmbH
Pipettenspitzen Standard MIKRO: 0,5 - 10 µl	Carl Roth GmbH + Co. KG
Probengefäß 1,3 ml LH	Sarstedt AG&Co

Reagiergefäß 0,5 ml, PP	Sarstedt AG&Co
Reagiergefäß 1,5 ml, PP	Greiner Bio-One GmbH
Reagiergefäß 2,0 ml, PP	Greiner Bio-One GmbH
Silikonspray-Pflegespray für Instrumente	Dr. Schumacher GmbH
Softasept® N	Braun GmbH
Surgical Disposable Scalpel	Braun GmbH
Tube 3,5 ml, 55x12 mm	Sarstedt AG&Co.
Wattestäbchen	NOBA Verbandmittel Danz GmbH

Tabelle 4: Material - Kits und Reagenzien.

Kit/Reagenz	Hersteller
Albumin Blue Fluorescent Assay Kit (Catalog No. 15002)	Active Motif
Albumin aus Mausserum, lyophilized powder, ≥96 % (agarose gel electrophoresis), A3139	Sigma-Aldrich
Aldosteron ELISA - Enzyme immunoassay for the direct quantitative determination of Aldosteron in human serum, plasma and urine (RE52301)	IBL International GmbH
Ampuwa®	Fresenius Kabi Deutschland GmbH
Anti-ENaC gamma Antibody	StressMarq Biosciences Inc., Art. Nr. SPC-405
Aqua Dest.	Stadtwerke Tübingen
Desinfektionskonzentrat	Biorapid GmbH
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Art-Nr. 4720.4
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS), 500 ml	Sigma-Aldrich
Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit For Aprotinin (AP) (CEA968Bo 96 Tests)	Cloud-Clone Corp
Ethylacetat	Carl Roth, Art. Nr. 4424.1
Glucose-Standard - 100 mg/dl (LT-ST 0018)	Labor + Technik EBERHARD LEHMANN GmbH
IRDye®800CW Donkey anti-Rabbit IgG Secondary Antibody	LI-COR Biosciences GmbH
Lithium Stammlösung 500 mmol/l	Biorapid GmbH
LT-SYS® Kreatinin, mod. nach Jaffé, kinetisch, ohne Enteiweißung (LT-CR 0121)	Labor + Technik EBERHARD LEHMANN GmbH
LT-SYS® Glucose, Hexokinase (LT-GLH 202)	Labor + Technik EBERHARD LEHMANN GmbH
LT-SYS® Harnstoff, kinetisch (LT-UR 0010)	Labor + Technik EBERHARD LEHMANN GmbH
LT-SYS® Phosphor, anorganisch (LT-PH 0100)	Labor + Technik EBERHARD LEHMANN GmbH

Natriumkarbonat (Na ₂ CO ₃)	Carl Roth GmbH + Co.KG, Art. Nr. 8563.1
Paraformaldehyde; powder, 95%	Sigma-Aldrich, Art. Nr. 158127-500G
P-CHECK®, Protease Detection Kit	Jena Bioscience/Panatecs
Peptide:N-glycosidase F (PNGase F)	New England BioLabs® GmbH
Quantikine® ELISA, Mouse/Rat Cystatin C Immunoassay (Catalog No. MSCTC0)	R&D Systems® - bio-technie® brand
Reiniger-D Flammenphotometer-Reinigungs-Lösung	Biorapid GmbH
Revert™700 Total Protein Stain for Western Blot Normalization	LI-COR Biosciences GmbH
Salzsäure (0,1 M HCl)	Merck, Art. Nr. 1.09060.1000
Salzsäure (32%, 1 Liter)	Carl Roth GmbH + Co.KG
Serum-Standard	Biorapid GmbH
System-Leerwertlösung	Biorapid GmbH
Tris-Buffered Saline (TBS)	Sigma-Aldrich
Urin-Standard	Biorapid GmbH

Tabelle 5: Material - Eingesetzte Medikamente.

Medikament	Hersteller
Amiloride hydrochloride hydrate	Sigma-Aldrich, Art. Nr. A7410-1G
Aprotinin Pellets 10-day release (Cat. No. X-999)	Innovative Research of America, Inc.
Aprotinin Powder, lyophilisiert, 1g (6000 KIU/mg)	DSM Nutritional Products GmbH
CONOXIA® GO2X – Medizinischer Sauerstoff	Linde Gas Therapeutics GmbH
Isofluran CP® 1 ml/ml	cp-pharma® BURGDORF
Placebo Pellets 10-day release (Cat. No. C-111)	Innovative Research of America, Inc.
Triamteren ≥ 99%	Sigma-Aldrich

Tabelle 6: Material - Eingesetzte Produkte für die Tierhaltung.

Material	Hersteller
C 1000 Kontrolldiät	Altromin Spezialfutter GmbH
C 1036 Natrium und Chlorarme Diät	Altromin Spezialfutter GmbH
Einstreu, LIGNOCEL®	J. Rettenmaier & Söhne (JRS)
Fein Zucker, 1000g	Südzucker AG
Käfige Typ-II bzw. Typ-II-long	Ehret GmbH
Leitungswasser	Stadtwerke Tübingen
Metabolische Käfige (12x) für einzelne Mäuse	Tecniplast
Rotes Maushaus	Ehret GmbH
ssniff®, (V1534-703) Futter für Haltung Ratte/Maus	ssniff® Spezialdiäten GmbH
Trinkflaschen	Ehret GmbH

2.2 Methoden

2.2.1 Tiermodell und Tierhaltung

Das Versuchsvorhaben genehmigte das Regierungspräsidium Tübingen unter der Versuchsnummer M5/16. Außerdem lag für meine Person nach Teilnahme am Versuchstierkundlichen Kurs der Universität Tübingen eine Ausnahmegenehmigung gemäß §16 Absatz 1 Satz 5 der Tierschutz-Versuchstierverordnung zur Durchführung der Tierversuche vor. Für die Versuche wurden männliche und weibliche Wildtyp-Mäuse des Stammes 129S1/SvImJ verwendet. Das Durchschnittsalter der Mäuse betrug bei Versuchsbeginn 180 Tage (± 6 Tage, 66 - 340 Tage). Die Zucht erfolgte unter spezifiziert pathogenfreien (SPF) Bedingungen in unserer Tierhaltung mit moderater Trockenbarriere. Die Versuchsdurchführung fand in der Medizinischen Klinik Tübingen statt. Die Haltung der Tiere erfolgte unter standardisierten Bedingungen. Dabei bestand eine Raumtemperatur zwischen 20-24°C, eine Luftfeuchtigkeit von 45-65% und ein per Zeitschaltuhr eingestellter Tag-Nacht-Rhythmus von jeweils zwölf Stunden. Die Mäuse wurden in Typ-II (maximal drei Mäuse) bzw. in Typ-II-long-Käfigen (maximal fünf Mäuse) mit freiem Zugang zu Leitungswasser und Futter gehalten.

2.2.2 Versuchsdurchführung

2.2.2.1 Metabolische Käfige

Die Teilversuche erfolgten in metabolischen Käfigen (siehe Abb. 6). Die Versuchstiere wurden einzeln in die Käfige auf integrierte, kreisrunde Gitter mit einem Durchmesser von etwa 20 cm gesetzt. Unter diesen durchlässigen Gittern befanden sich Trichtersysteme, die eine 24-Stunden-Urinsammlung ermöglichten. Die Käfige enthielten Vorrichtungen zur Anbringung von Trinkflaschen und die Futterpellets wurden auf das Gitter gelegt. Bei allen Teilversuchen hatten die Tiere einen unlimitierten Zugang zu Trinkwasser und Nahrung. Um die Versuchsbedingungen zu optimieren, fand vor der Versuchsdurchführung intermittierend für jeweils zwei Tage eine Eingewöhnungsphase der Tiere in den Käfigen statt. Außerdem wurden rote Maushäuser als Rückzugsort auf dem Gitter angebracht.

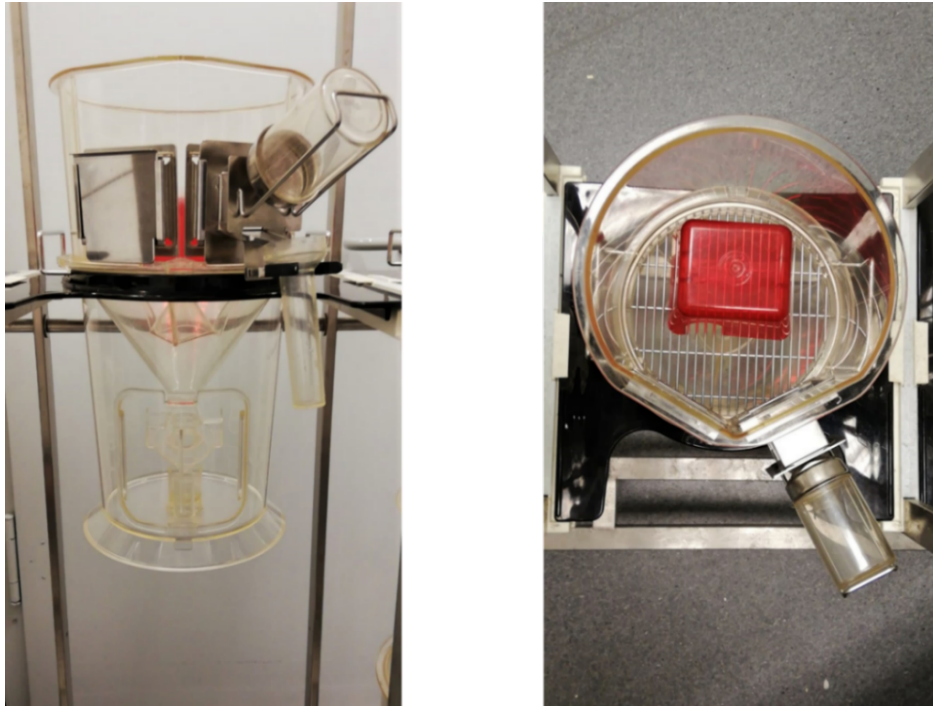


Abb. 6: Metabolischer Käfig.

Die beiden Bilder zeigen den Aufbau der metabolischen Käfige.

Linke Bildhälfte: Ansicht von vorne, im Bildbereich unten: Komponenten des Trichtersystems zur Sammlung und Quantifizierung des Urins und des Stuhls.

Rechte Bildhälfte: Ansicht von oben, Blick auf das Gitter und auf das rote Maushaus.

2.2.2.2 Probengewinnung und Datenerhebung

Täglich erhobene Daten

Die tägliche Erhebung der Flüssigkeitsbilanz (Trink- und Urinmenge), des Körpergewichts (KGW) und der Fressmenge erfolgte jeweils nach 24 Stunden morgens zu etwa der gleichen Uhrzeit. Zur Bestimmung der Trinkmenge wurden täglich die Trinkflaschen gewogen. Um die Vergleichbarkeit der 24-Stunden-Urinsammlung und des Körpergewichts zu gewährleisten, erfolgte vor der Urinsammlung bzw. der Erhebung des Körpergewichts eine abdominale Blasenmassage zur Gewinnung des Spontanurins. Der Spontanurin, der gesammelte 24-Stunden-Urin und die Urinreste in den Trichtersystemen wurden in zuvor abgewogene Glasröhrchen pipettiert und erneut gewogen. Die Gewichtsunterschiede ergaben die 24-Stunden-Urinmenge. Der gesammelte Urin wurde daraufhin für zehn Minuten bei 15°C mit einer Geschwindigkeit von 3400 Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute; rpm, ~ 930 g) zentrifugiert. Jeweils ca. 1500 µl des Überstandes wurden bei -20°C asserviert. Zur Vermeidung von

Verdunstungseffekten erfolgte eine tägliche Benetzung der Urinbehältnisse mit 150 µl Paraffinöl und alle zwei Tage eine Behandlung der Trichtersysteme mit Silikonspray. Abhängig vom Studiendesign erhielten die Mäuse verschiedene Diäten (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: Zusammensetzung Diäten, mod. entnommen aus [123, 124].

Na⁺: Natrium; K⁺: Kalium; Ca²⁺: Calcium; Mg²⁺: Magnesium; P_i: Phosphat.

Diät	Firma	Na⁺ [%]	K⁺ [%]	Ca²⁺ [%]	Mg²⁺ [%]	P_i [%]
V1534-703: Haltdungsdiät	ssniff Spezialdiäten GmbH	0,24	0,92	1,0	0,22	0,70
C1000: Kontrolldiät	Altromin Spezialfutter GmbH	0,2	0,7	0,9	0,07	0,8
C1036: Niedrigsalzdiät	Altromin Spezialfutter GmbH	0,01	0,7	0,9	0,06	0,8

Narkose und Blutentnahme

Am Ende der Serien erfolgte eine Blutentnahme. Dafür wurde mit Hilfe eines Verdampfers (Dräger Vapor® 2000-Isfluran) eine Narkose mit Isofluran durchgeführt. Nach Eintritt der erwünschten Narkosetiefe wurde mit einer Glaskapillare der retrobulbäre Venenplexus im Bereich des rechtsseitigen inneren Augenwinkels punktiert. Zunächst wurde ca. 150 µl Blut in eine spezielle Kapillare zur Durchführung einer Blutgasanalyse (BGA) übertragen. Das restliche Blut wurde in mit Lithium-Heparin ausgekleideten Probengefäßen gesammelt. Nach der Zentrifugation (3000 rpm, ~ 800 g, t = 10 min) erfolgte die Asservierung des Blutplasmas bei -20°C.

Tötung und Nierenentnahme

Die Mäuse wurden nach der Blutentnahme durch eine zervikale Dislokation unter Isoflurannarkose getötet. Danach erfolgte die beidseitige Nierenentnahme. Die Nieren wurden in Paraformaldehyd (PFA) 4 % zwischengelagert und nach zwölf Stunden in PFA 0,1 % bei Raumtemperatur für die histologischen Untersuchungen asserviert. In einer Subpopulation wurden Mäuse bereits an Tag zwei nach

der Pelletimplantation getötet, die entnommenen Nieren in flüssigem Stickstoff schockgefroren und für die Durchführung der Western Blots bei -80°C gelagert.

2.2.2.3 Medikamentenapplikation

Placebo- und Aprotininpelletimplantation

Bei den Teilversuchen erfolgte eine subkutane Implantation von Aprotinin- bzw. Placebopellets. Die Applikationsform ermöglichte eine kontinuierliche zehn Tage andauernde Medikamentenfreisetzung [119, 120]. Zur Implantation wurde eine Isoflurannarkose durchgeführt. Zum Schutz der Augen wurde eine Bepanthen Augen- und Nasensalbe aufgetragen. Nach der Haarentfernung und der Hautdesinfektion erfolgte im Rückenbereich mit einem Skalpell ein etwa 0,5-1 cm großer Längsschnitt. Von dort ausgehend wurde stumpf nach links lateral und ventral präpariert. In die Taschen wurden die Pellets (Durchmesser: 4 mm, Höhe: 1,5 mm) implantiert (siehe Abb. 7). Der Wundverschluss erfolgte mit nicht-resorbierbaren Ethilon*II 5-0 Fäden in Form von 3-4 Einzelknopfnähten. Nach der Desinfektion und Entfernung der Augensalbe wurde die Narkose beendet [120].

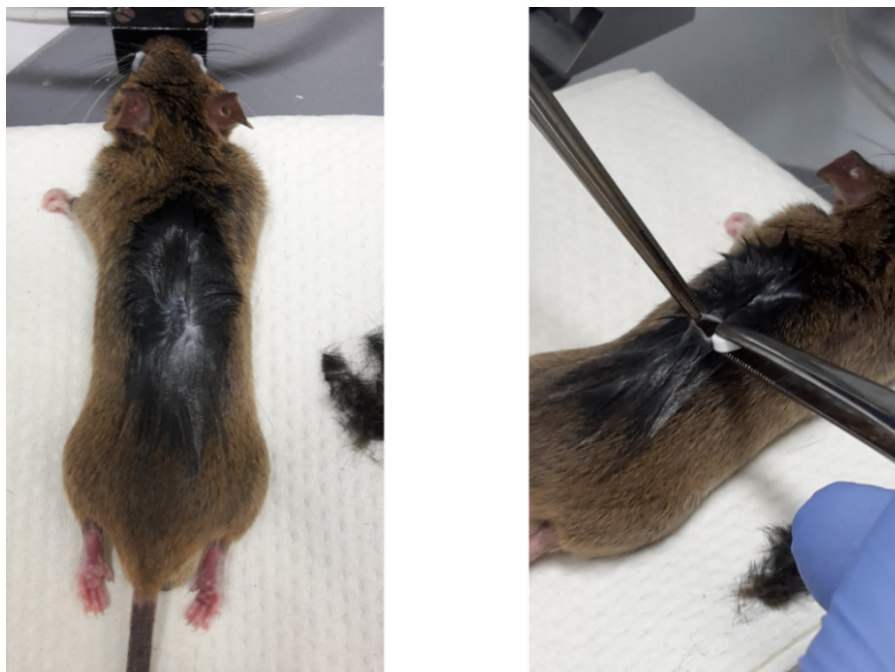


Abb. 7: Aprotinin- und Placebopelletimplantation.

Linke Bildhälfte: Zustand vor der Implantation: Maus in Isoflurannarkose, Augensalbe zum Augenschutz aufgetragen, Zustand nach Entfernung der Haare und nach Hautdesinfektion.

Rechte Bildhälfte: Pelletimplantation: Zustand nach Hautschnitt und Präparation einer subkutanen Hauttasche, das Pellet wird mit der Pinzette gehalten und nun in die Tasche implantiert. Danach erfolgt der Wundverschluss mit Einzelknopfnähten (nicht dargestellt).

Intraperitoneale Ampuwa- und Amiloridinjektion

Zur Bestimmung der Amilorid-sensitiven Natriurese erfolgten intraperitoneale Ampuwa (Vehikel)- und Amiloridinjektionen (siehe Abb. 9). Das Injektionsvolumen wurde jeweils an das Körpergewicht angepasst. Das Volumen der Injektionen lag bei 5 μ l/g Körpergewicht. Die Amiloriddosis betrug 10 μ g/g Körpergewicht. Die intraperitonealen Injektionen wurden abwechselnd im Bereich der beiden unteren Quadranten des Abdomens durchgeführt.

Triamterenapplikation

Zur Untersuchung der Auswirkungen von Aprotinin unter dem Stressmodell einer Triamteren-Therapie (siehe 2.2.3.2) erfolgte eine Applikation des Diuretikums im Trinkwasser. Triamteren wurde ins Leitungswasser hinzugegeben und die Löslichkeit durch eine Zugabe von Salzsäure (32%) bis zu einem pH-Wert von drei (pH-Meter) optimiert. Zudem wurde 50 g Saccharose pro 1000 ml Leitungswasser hinzugefügt.

2.2.3 Versuchsablauf

Vor den Untersuchungen wurden die Mäuse zufällig auf die Versuchsgruppen aufgeteilt. Insgesamt wurden vier Hauptversuche und ein Teilversuch durchgeführt. Dabei wurden zwei Stressmodelle etabliert, bei denen die renalen Effekte von Aprotinin unter Nidrigsalzdiät (siehe 2.2.3.1) bzw. einer diuretischen Therapie mit Triamteren (siehe 2.2.3.2) untersucht wurden. Außerdem wurde bei einem Teilversuch die Natriurese nach der Applikation von Amilorid erhoben (siehe 2.2.3.1). Zusätzlich wurden die Dosisabhängigkeit (siehe 2.2.3.3) und die Langzeiteffekte von Aprotinin (siehe 2.2.3.4) untersucht. In vorangegangenen Experimenten der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Artunc erfolgten bereits Aprotinindosisfindungen. Die in dieser Arbeit eingesetzten Aprotinindosen von 0,5 und 2,0 mg/Tag wurden von diesen Versuchen abgeleitet [119, 125].

2.2.3.1 Versuch 1: Stressmodell Nidrigsalzdiät

Bei diesem Stressmodell wurden die Effekte von Aprotinin unter einer Nidrigsalzdiät im Vergleich zu einer Placebobehandlung und einer Kontrolldiät untersucht. Nach zwei Kontrolltagen erfolgte die subkutane Implantation eines Placebo- bzw. Aprotininpellets (Tag 0). Danach erhielten die Mäuse bis zum Versuchsende eine Kontroll- bzw. Nidrigsalzdiät, sodass insgesamt vier Versuchsgruppen entstanden. Nach der täglichen Erhebung verschiedener Parameter (siehe 2.2.2.2) erfolgte vor Ende der zehntägigen Medikamentenfreisetzung an Tag neun eine Blutentnahme, die Tötung und die beidseitige Nierenentnahme.

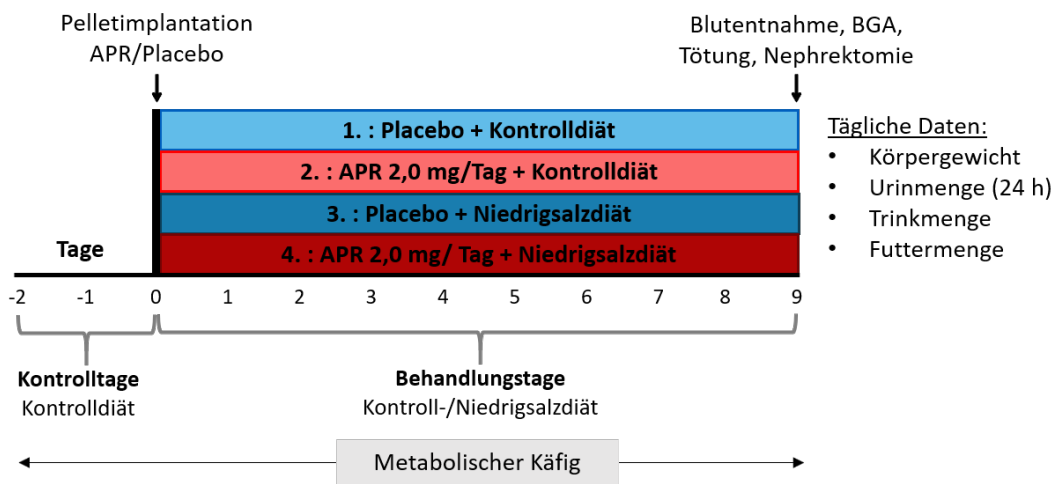


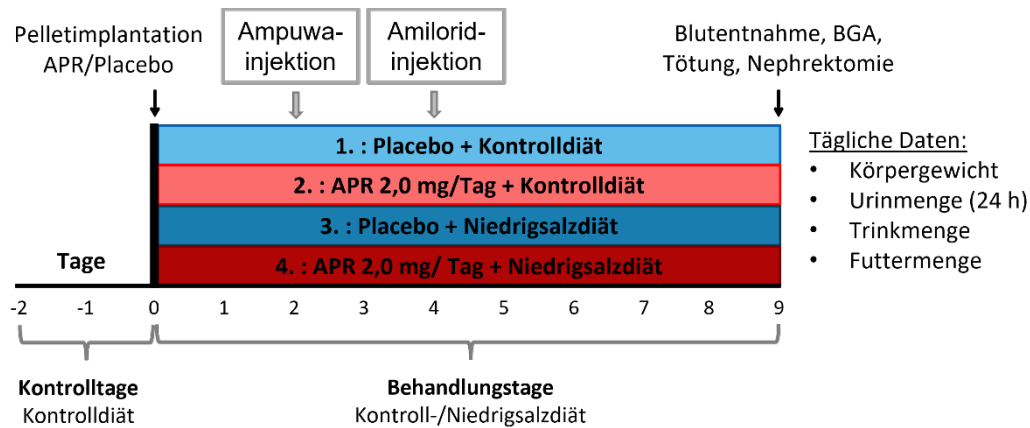
Abb. 8: Versuch 1: Stressmodell Nidrigsalzdiät, publiziert in [35].

Nach zwei Kontrolltagen erfolgte die Aprotinin- oder Placebopelletimplantation (Tag 0). Daraufhin wurde je nach Versuchsgruppe eine Kontroll- oder Nidrigsalzdiät etabliert. Es erfolgte eine tägliche Datenerhebung (Körpergewicht, Urinmenge, Trinkmenge, Futtermenge, etc.). An Tag neun erfolgte eine Blutentnahme, die Tötung der Versuchstiere und die beidseitige Nephrektomie. APR: Aprotinin, BGA: Blutgasanalyse, h: Stunde(n).

Teilversuch 1.1: Amilorid-sensitive Natriuresis

Um Rückschlüsse auf die ENaC-Aktivität bei aprotininbehandelten Mäusen zu ziehen, erfolgte bei diesem Teilversuch eine Bestimmung der Amilorid-sensitiven Natriuresis. Dabei erfolgte am zweiten Behandlungstag bei jeweils sechs Mäusen pro Versuchsgruppe eine intraperitoneale Injektion von Ampuwa (Vehikel, Volumen: 5µl/g KGW) und am vierten Behandlungstag eine Injektion von Amilorid (Volumen: 5 µl/g KGW; Dosis: 10 µg/g KGW). Nach den Injektionen wurden die Mäuse aus den metabolischen Käfigen genommen und für eine sechsstündige

Sammelperiode einzeln in Typ-II-Käfigen gehalten. Zur Vermeidung von Urinverlusten erfolgte eine stündliche Urinsammlung. Nach der Sammelperiode wurde wiederum Spontanurin gewonnen und zusammen mit dem anfänglichen Spontanurin und dem Sammelurin gewogen und asserviert. Nach dem Sammeln wurden die Versuchstiere wieder in den metabolischen Käfigen gehalten.



2.2.3.2 Versuch 2: Stressmodell Triamteren-Therapie

Bei diesem Stressmodell erfolgte eine ENaC-Blockade durch das Diuretikum Triamteren im Trinkwasser. Zur Findung der idealen Triamteren- und Aprotinin-dosis erfolgten verschiedene Teilversuche bis der Versuchsablauf in Abb. 10 übernommen wurde (*Teilversuche zur Dosisfindung: Triamteren-Applikation direkt nach der Implantation: Placebo/Aprotinin 2,0 mg/Tag + Triamteren 200 mg/l - Abbruch an Tag drei wegen der deutlichen KGW-Abnahme; Placebo/Aprotinin 1,0 mg/Tag + Triamteren 200 mg/l über fünf Tagen; Placebo/Aprotinin 2,0 mg/Tag + Triamteren 100 mg/l über fünf Tagen*).

Um die Mäuse an das gewählte Modell zu gewöhnen, erfolgte hier bereits vor der Pelletimplantation für vier Kontrolltage eine Applikation von Triamteren 200 mg/l. Nach der jeweiligen Pelletimplantation und nach fünf Behandlungstagen mit täglicher Datenerhebung erfolgte wiederum eine Blutentnahme, eine BGA und die Tötung der Versuchstiere.

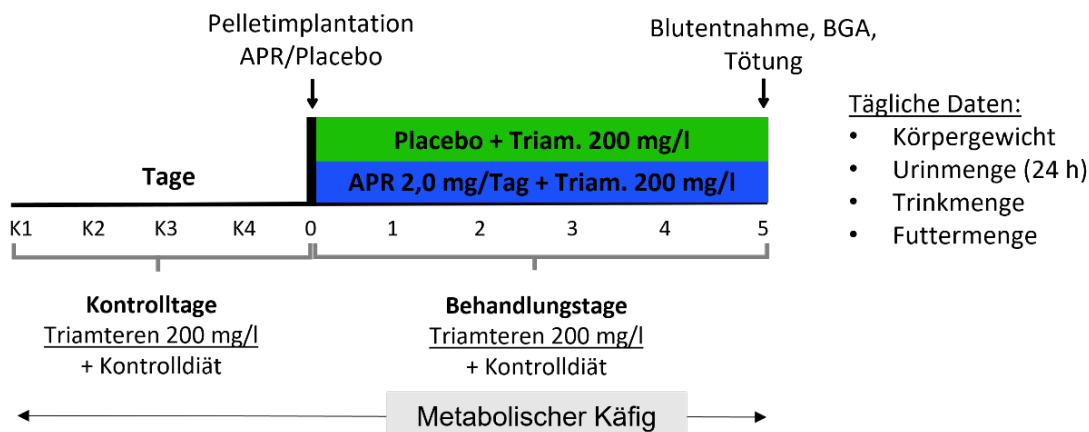


Abb. 10: Versuch 2: Stressmodell Triamteren-Therapie.

Nach vier Kontrolltagen mit der bereits etablierten Triamteren-Therapie erfolgte die Aprotinin- bzw. Placebopelletimplantation (Tag 0). Nach fünf Behandlungstagen erfolgte die Blutentnahme und die Tötung der Versuchstiere. Alle Versuchsgruppen erhielten eine Kontrolldiät.
 K: Kontrolltage, Triam.: Triamteren, APR: Aprotinin, BGA: Blutgasanalyse, h: Stunde(n).

2.2.3.3 Versuch 3: Dosisabhängigkeit von Aprotinin

Bei Versuch 3 wurde die Dosisabhängigkeit der renalen Effekte von Aprotinin untersucht. Eine Versuchsgruppe erhielt die niedrigere Aprotinindosis von 0,5 mg/Tag und die andere Versuchsgruppe die höhere Dosis von 2,0 mg/Tag. Als Kontrollgruppe dienten placebobehandelte Mäuse.

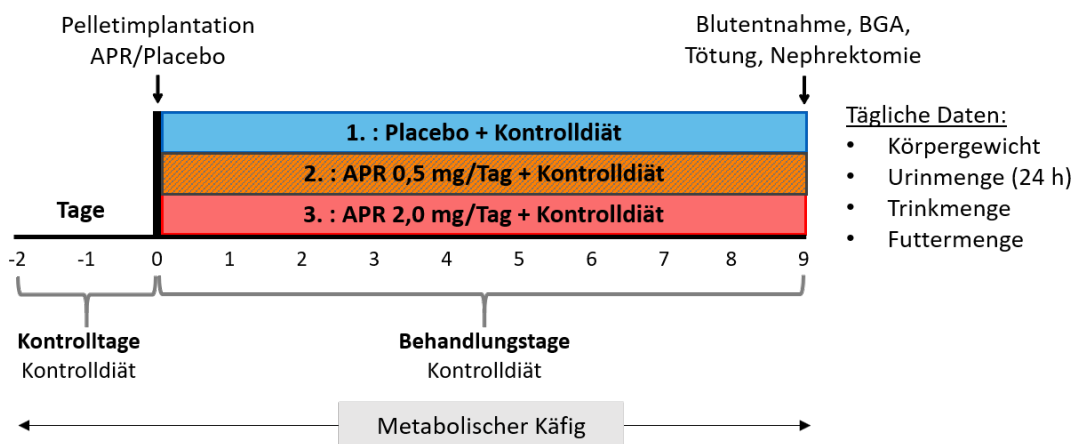


Abb. 11: Versuch 3: Dosisabhängigkeit von Aprotinin, publiziert in [35].

Der dargestellte Versuchsablauf entspricht dem des Versuchs 1. Zusätzlich wurde zur Beurteilung der Dosisabhängigkeit eine weitere Aprotinindosis von 0,5 mg/Tag gewählt.
 APR: Aprotinin, BGA: Blutgasanalyse, h: Stunde(n).

2.2.3.4 Versuch 4: Langzeiteffekte von Aprotinin

Um Langzeiteffekte von Aprotinin auf die Nieren zu untersuchen, erfolgte zehn Wochen (70 Tage) nach der Implantation der hochdosierten Aprotininpellets (2,0 mg/Tag) die Tötung der Mäuse und die beidseitige Nierenentnahme. Zehn Tage nach der Implantation setzten die Pellets keinen Wirkstoff mehr frei. Ab diesem Zeitpunkt wurden die Mäuse in normalen Käfigen gehalten.

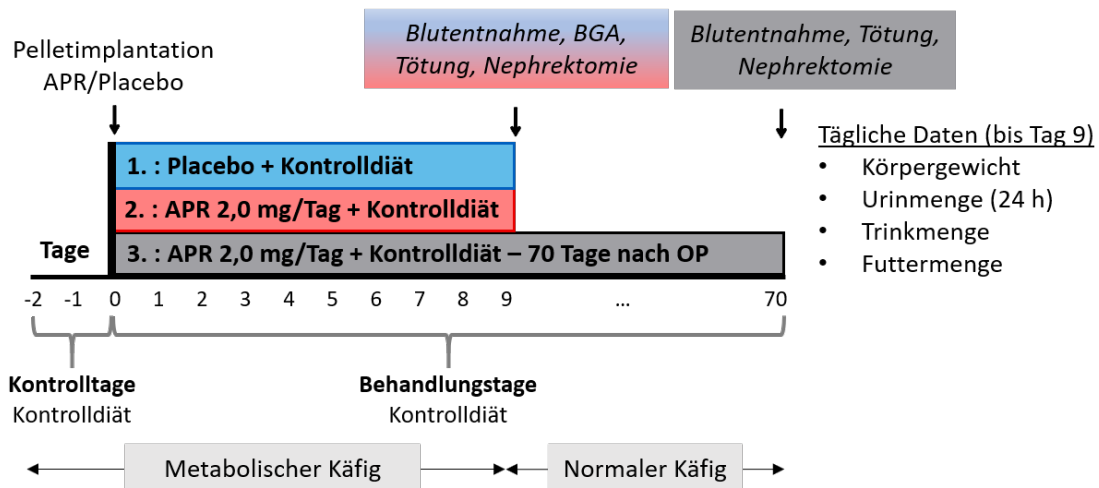


Abb. 12: Versuch 4: Langzeiteffekte von Aprotinin.

Zur Beurteilung der Langzeiteffekte von Aprotinin wurde nach dem Versuch 1 ein Bruchteil der Versuchstiere weiterhin für insgesamt 60 Tage nach der Aprotininbehandlung beobachtet und am Ende der Serie eine Blutentnahme, eine Tötung und eine Nierenentnahme durchgeführt. APR: Aprotinin, BGA: Blutgasanalyse, h: Stunde(n).

2.2.4 Laborparameter

2.2.4.1 Blutgasanalyse (BGA)

Bei der Blutabnahme wurde 150 µl Blut in Blutgaskapillaren gesammelt und mit dem Analyseautomaten IL GEM® Premier 3000 analysiert. Daraus ergaben sich folgende Parameter: pH; pCO₂, pO₂ [mmHg]; Na⁺, K⁺, Ca²⁺ [mmol/l]; Hämatokrit [%]; die weiteren Parameter Ca²⁺ (pH 7,4), Standardbikarbonat, Base Excess [mmol/l]; Sauerstoffsättigung (SO₂) [%]; Hämoglobin (Hb) [g/dl] wurden durch den Analyseautomaten aus den gemessenen Werten berechnet.

2.2.4.2 Klinische Chemie

Elektrolytkonzentrationen im Urin (Flammenphotometer)

Mit einem Flammenphotometer werden Elektrolytkonzentrationen im Urin bestimmt. Die Probe wird in einer Kammer mittels Druckluft zerstäubt und in eine durch Acetylgas gezündete Flamme eingebracht. Dabei verbrennen die im Urin vorliegenden Alkali- (Na^+ , K^+) und Erdalkalimetalle (Ca^{2+}) und emittieren dabei Licht in einer bestimmten Wellenlänge. Mittels Filter werden die spezifischen Wellenlängen isoliert und mit Hilfe von Photodioden detektiert. Dabei verhält sich das emittierte Licht proportional zu den in der Probe vorhandenen Ionen [126]. Als Referenzwert dient bei diesem Flammenphotometer (EFUX 5056) die alleinige Verbrennung von Lithium [127].

Vorbereitung:

Verdünnen der Urinproben mit Ampuwa (Dilution Factor 5 - DF5).

Versuchsablauf:

Nach dem Abgleich mit dem Urin-Standard erfolgt eine automatisierte Messung mit dem Flammenphotometer. Bei Messwerten außerhalb der jeweiligen (jew.) Referenzbereichen (Na^+ : 10,0 - 300 mmol/l, K^+ : 5,0 - 200 mmol/l, Ca^{2+} : 0,50 - 20,00 mmol/l) wird die Verdünnung mit Ampuwa angepasst und eine erneute Messung durchgeführt.

Kreatininkonzentration im Urin (modifizierte Methode nach Jaffé, LT-SYS®)

Bei der modifizierten Jaffé Methode bildet Kreatinin im alkalischen Milieu mit zugesetzter Pikrinsäure einen gelborangen Komplex. Dabei verhält sich die Farbintensität direkt proportional zu der vorliegenden Kreatininkonzentration. Diese Farbintensität wird mit Hilfe eines Photometers bestimmt [128, 129].

Inhalt:

Reagenz 1:	Natronlauge	400 mmol/l
	Natriumcarbonat	25 mmol/l
Reagenz 2:	Pikrinsäure	55 mmol/l
Standard:	Kreatinin	2 mg/dl

Vorbereitung:

Arbeitslösung: Reagenz 1 mit Reagenz 2 im Verhältnis 1:1 mischen.

Versuchsablauf:

Je 10 μl Urinprobe (DF 10 mit Ampuwa), Standard bzw. Ampuwa (Leerwert) in Küvetten pipettieren. Zu den Ansätzen jew. 200 μl Arbeitslösung einbringen, mischen und nach 15 Sekunden (s) die Extinktion im Photometer bei einer

Wellenlänge (λ) von 492 nm messen. Die erneute Extinktionsbestimmung erfolgt exakt nach 8 Minuten (min).

Berechnung der Kreatininkonzentrationen (c) unter Berücksichtigung der jew. Extinktionsdifferenzen (ΔE) ($t_1 = 15$ s, $t_2 = 8$ min):

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

Nachweisgrenzen: 0,03 - 300 mg/dl. Bei Konzentrationen außerhalb dieses Bereiches erfolgt eine Anpassung der Verdünnung der Urinproben mit Ampuwa.

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

Mit der vollenzymatischen Methode mit Urease und Glutamatdehydrogenase (GLDH) wird die Harnstoffkonzentration im Plasma bestimmt. Durch das beige-fügte Enzym Urease wird Harnstoff zu Ammoniak und Bikarbonat hydrolytisch gespalten. Das freigesetzte Ammoniak wird mit α -Ketoglutarat und Nicotinamid-adenindinukleotid (NADH) durch das Enzym GLDH zu L-Glutamat und NAD^+ katalysiert. Die Oxidation von NADH zu NAD^+ wird photometrisch durch eine Abnahme der Extinktionswerte bei $\lambda = 340$ nm detektiert. Diese Abnahme ist umgekehrt proportional zur Harnstoffkonzentration im Plasma [130, 131].

Inhalt:

Enzyme:	GLDH	≥ 9000 U/l
	Urease	≥ 4000 U/l
Puffer:	Tris-Salzsäure-Puffer	100 mmol/l
	α -Ketoglutarat	6 mmol/l
	NADH	0,20 mmol/l
	Adenosin-5-Diphosphat	2 mmol/l
	EDTA	4 mmol/l
	Stabilisatoren	
Standard:	Harnstoff	40 mg/dl

Vorbereitung:

Arbeitslösung: Reaktionsenzyme mit 16 ml Puffer bei Raumtemperatur mischen.

Versuchsablauf:

Je 3 μ l Plasmaprobe (DF1), Standard bzw. Ampuwa (Leerwert) in Küvetten pipettieren. Zu diesen Ansätzen jew. 300 μ l Arbeitslösung einbringen, mischen und nach jeweils 10 s die Extinktion im Photometer bei $\lambda = 340$ nm messen. Die erneute Extinktionsbestimmung erfolgt jew. nach 8 min.

Berechnung der Harnstoffkonzentrationen (c) unter Berücksichtigung der jew. Extinktionsdifferenzen ΔE ($t_1 = 10$ s, $t_2 = 8$ min):

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

Nachweisgrenzen: 2 mg/dl - 300 mg/dl. Bei Konzentrationen über der oberen Nachweisgrenze bzw. bei einem Extinktionsabfall von $\geq 0,8$ wird die Plasmaprobe mit Ampuwa verdünnt.

Phosphatkonzentration im Urin (LT-SYS® Phosphor, anorganisch)

Mit der Farbkomplexmethode wird die Phosphatkonzentration im Urin bestimmt. Dabei bildet Phosphat mit Ammoniummolybdat in saurem Milieu einen Phosphormolybdat-Komplex. Die resultierende Farbentwicklung ist direkt proportional zur Phosphatkonzentration im Urin. Die Farbintensität wird in Form von Extinktionswerten mit Hilfe eines Photometers angegeben [132, 133].

Inhalt:

Reagenz:	Ammoniummolybdat	12 mmol/l
	Schwefelsäure	2,2 mol/l
	Detergenzien	
	Stabilisatoren	
Standard:	Phosphat	1,29 mmol/l

Versuchsablauf:

Jew. 3 μ l Urinprobe (DF 20), Standard bzw. Ampuwa (Leerwert) in Küvetten pipettieren. Zu diesen Ansätzen jew. 300 μ l Reagenz einbringen, mischen und für ca. 10 min bei Raumtemperatur inkubieren. Danach Messung der Extinktionen bei $\lambda = 340$ nm.

Berechnung der Phosphatkonzentrationen (c) unter Berücksichtigung der jew. Mittelwerte (MW) der Extinktionswerte (E):

$$C_{\text{Phosphat}} \left[\frac{\text{mmol}}{\text{l}} \right] = \frac{E_{\text{Probe}} - \text{MW } E_{\text{Leerwert}}}{\text{MW } E_{\text{Standard}} - \text{MW } E_{\text{Leerwert}}} \times C_{\text{Standard}} \times DF$$

Nachweisgrenzen: 0,23 mmol/l - 4,84 mmol/l. Bei Konzentrationen über der oberen Nachweisgrenze, bzw. bei einer Extinktion von $\geq 0,6$ wird die Urinprobe nochmals mit Ampuwa verdünnt und die Probe erneut gemessen.

Glucosekonzentration im Urin (LT-SYS® Glucose, Hexokinase)

Bei dieser Methode wird durch Kopplung von zwei enzymatischen Reaktionen die Glucosekonzentration im Urin bestimmt. Bei der ersten Reaktion katalysiert das Enzym Hexokinase die Phosphorylierung von Glucose durch den Energieträger ATP. In der darauffolgenden Redoxreaktion wird das entstandene Glucose-6-Phosphat unter Einwirkung des Enzyms Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) oxidiert und NAD^+ zu $\text{NADH} + \text{H}^+$ reduziert. Dabei nimmt die

Extinktion am Photometer direkt proportional zu der ursprünglichen Glucosekonzentration zu [134, 135].

<u>Inhalt:</u>		
Reagenz 1:	TRIS Puffer pH 7,8	100 mmol/l
	Mg ²⁺	4 mmol/l
	ATP	2,1 mmol/l
	NAD	2,1 mmol/l
Reagenz 2:	Mg ²⁺	4 mmol/l
	Hexokinase	≥ 7500 U/l
	G6P-DH	≥ 7500 U/l
Standard:	Glucose	5,55 mmol/l / 100 mg/dl

Vorbereitung:
Arbeitslösung: Vier Teile von Reagenz 1 mit einem Teil von Reagenz 2 mischen.

Versuchsablauf:
Je 5 µl Urinprobe (DF 1), Standard bzw. Ampuwa (Leerwert) in Küvetten pipettieren. Zu diesen Ansätzen jew. 500 µl Arbeitslösung einbringen, mischen und für mindestens 10 min bzw. maximal 30 min bei Raumtemperatur inkubieren. Danach Messung der Extinktionen bei λ = 340 nm. Berechnung der Glucosekonzentrationen (c) unter Berücksichtigung der Mittelwerte (MW) der Extinktionswerte (E):

$$C_{Glucose} \left[\frac{mmol}{l} \right] = \frac{E_{Probe} - MW E_{Leerwert}}{MW E_{Standard} - MW E_{Leerwert}} \times C_{Standard} \times DF$$

Nachweisgrenzen: 0,1 - 27,5 mmol/l. Bei Konzentrationen über der oberen Nachweisgrenze bzw. bei einer Extinktion von ≥ 0,6 wird die Urinprobe mit Ampuwa verdünnt und die Probe erneut gemessen.

Albuminkonzentration im Urin (Active Motif® Albumin Blue Fluorescent Assay)

Mit dieser sensitiven Messmethode werden geringe Albuminkonzentrationen im Urin detektiert. Dabei bindet das Farbreagenz Albumin Blue (Farbstoffreagenz AM3) spezifisch an das in der Probe vorhandene Albumin, sodass ein fluoreszierender Farbkomplex entsteht. Mit Hilfe eines Fluoreszenzdetektors werden die Ansätze mit λ = 560 nm angeregt und die Emissionen bei λ = 620 nm detektiert. Dabei verhält sich die Intensität der Fluoreszenz direkt proportional zu den Albuminkonzentrationen in den Proben [136, 137].

<u>Inhalt:</u>		
Reagenz:	Farbstoffreagenz AM3	250 Reaktionen
	Puffer A	50 ml
	Puffer B	10 ml
Standard:	Albumin aus Mausserum	5 mg

Vorbereitung:

Stammlösung:	Farbstoffreagenz AM3 in 1 ml Isopropanol auflösen.
Arbeitslösung:	Stammlösung 1:50 mit Puffer A verdünnen.
Standard:	5 mg Albumin aus Mausserum in 1 ml Puffer B auflösen.
Standardreihe:	Standard mit Puffer B verdünnen, um die jew. Standardkonzentrationen zu erhalten.

Versuchsablauf:

Urinproben vor Gebrauch zentrifugieren (1 min, 1000 g,). Jew. 20 µl des Überstands der Urinprobe (DF 1), Standard (siehe Standardreihe) bzw. Puffer B (Leerwert) in Wells einer Mikrotiterplatte pipettieren. Jew. 100 µl Arbeitslösung hinzugeben, mischen, leicht schütteln und für ca. 5 min bei Raumtemperatur (20-25°C) inkubieren. Innerhalb von 30 min Messung der Intensität des Fluoreszenzsignals (Relative Fluorescence Counts) mit Hilfe eines Fluoreszenzdetektors (Tecan-Spark® 10M) (Einstellung des Detektors: Exzitation: $\lambda = 560$ nm, Emission: $\lambda = 620$ nm, Signalverstärkung: 120, Anzahl der Lichtblitze: 3, Zeitverzögerung: 0 µs, Integrationszeit: 40 µs).

Erstellung einer Standardkurve mit Bestimmung der Geradensteigung (m), um die Albuminkonzentrationen der jew. Urinproben ermitteln zu können (Funktion: $y = mx+b$, $R^2 \geq 0,95$).

Berechnung der Albuminkonzentrationen (c) unter Berücksichtigung der jew. Mittelwerte (MW) der Relativen Fluorescence Counts (RFC):

$$C_{Albumin} \left[\frac{\mu g}{ml} \right] = \frac{MW RFC_{Probe} - MW RFC_{Leerwert}}{m_{Standardkurve}} \times DF$$

Nachweisgrenzen: 0,5 µg/ml - ca. 200 µg/ml. Bei Konzentrationen oberhalb der oberen Nachweisgrenze wird die Probe entsprechend mit Puffer B verdünnt und erneut gemessen.

Amiloridkonzentration im Urin (Fluoreszenzmessung)

Die fluoreszierenden Eigenschaften von Amilorid ermöglichen die Bestimmung der Amiloridkonzentrationen im Urin. Zu Beginn wird Amilorid aus dem Urin extrahiert. Dafür wird die Urinprobe mit Natriumcarbonat (Na_2CO_3) und mit Ethylacetat versetzt. Nach Zentrifugation wird der Überstand in Salzsäure (HCl) gegeben und die Lösung erneut zentrifugiert. Die wässrige Phase mit dem gelösten Amilorid wird mit $\lambda = 360$ nm angeregt. Das enthaltene Amilorid fluoresziert blau. Die dabei entstehenden Emissionen werden bei $\lambda = 405$ nm gemessen [138].

Inhalt:

Reagenz:	Gesättigte Na_2CO_3 -Lösung	25 g
	Ethylacetat	600 µl/Ansatz
	0,1 M HCl	120 µl/Ansatz
Standard:	Amiloride hydrochloride hydrate	

Vorbereitung:

Gesättigte Na₂CO₃-Lösung: Löslichkeit 217 g/l Wasser (20°C). 25 g in 100 ml Wasser lösen. Überstand entspricht der gesättigten Lösung.

Standardreihe: Standard jew. mit Ampuwa verdünnen, um die jew. Standardkonzentrationen zu erhalten.

Versuchsablauf:

Jew. 24 µl der Urinprobe (Spontanurin, DF 1), Standard (siehe Standardreihe) und Ampuwa (Leerwert) mit 48 µl gesättigter Na₂CO₃-Lösung mischen. Zu den Ansätzen 600 µl Ethylacetat hinzufügen und für 10 s vortexen. Nach der Zentrifugation (t = 2 min, 3000 g) 480 µl des Überstandes abpipettieren und in ein mit 120 µl HCl (0,1 M) befülltes Gefäß überführen. Die Lösungen für 10 s vortexen und anschließend zentrifugieren (t = 2 min, 3000 g). Jew. 100 µl der unteren wässrigen Phase in die Wells einer Mikrotiterplatte pipettieren und eine Fluoreszenzmessung (Fluoreszenzdetektor Spark® 10M) durchführen: Exzitation: λ = 360 nm, Emission: λ = 405 nm.

Erstellung einer Standardkurve mit Bestimmung der Geradensteigung (m), um die Amiloridkonzentrationen (c) der Urinproben ermitteln zu können (Funktion: y = mx + b, R² ≥ 0,95).

Berechnung der Amiloridkonzentrationen (c) unter Berücksichtigung der Mittelwerte (MW) der Relativen Fluorescence Units (RFU):

$$C_{Amilorid} \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{l}} \right] = \frac{MW_{RFU_{Probe}} - MW_{RFU_{Leerwert}}}{m_{Standardkurve}} \times DF$$

Proteaseaktivitätsmessung im Urin (P-CHECK®)

Proteasen werden mit Hilfe des P-CHECK®-Verfahrens sensitiv detektiert. Dieses Verfahren beruht auf einem physikalischen Prozess, der als Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) bezeichnet wird [139]. Dabei wird ein fluoreszierender Donor und ein Akzeptor benötigt, welche einerseits in unmittelbarer Nähe liegen und andererseits Überschneidungen in den Emissionsspektren aufweisen müssen [140, 141]. Bei dem P-CHECK®-Verfahren fungiert 7-Methoxycoumarinyl-4-acetyl (Mca) als fluoreszierender Donor und Dinitrophenyl (Dnp) als Akzeptor. Zwischen diesem Paar kann „FRET“ stattfinden, sodass Energie vom Donor auf den Akzeptor übergeht, was zu einer Abnahme der Donor-Fluoreszenz führt. Zwischen Mca und Dnp befindet sich eine Peptidbibliothek, die aus fünf Aminosäuren besteht. Mit Ausnahme von Cystein können alle 19 proteinogenen Aminosäuren beliebig miteinander kombiniert werden, sodass das Verfahren 19⁵ mögliche Substrate beinhaltet. Bei der Anwesenheit von Proteasen wird das Substrat gespalten, sodass das Donor/Akzeptor-

Paar getrennt wird. Dabei nimmt die FRET-Effizienz vom Donor auf den Akzeptor ab und die Donor-Fluoreszenz nimmt zu. Die Intensität der Fluoreszenz korreliert direkt mit der Anwesenheit von Proteasen (siehe Abb. 13) [140, 142, 143].

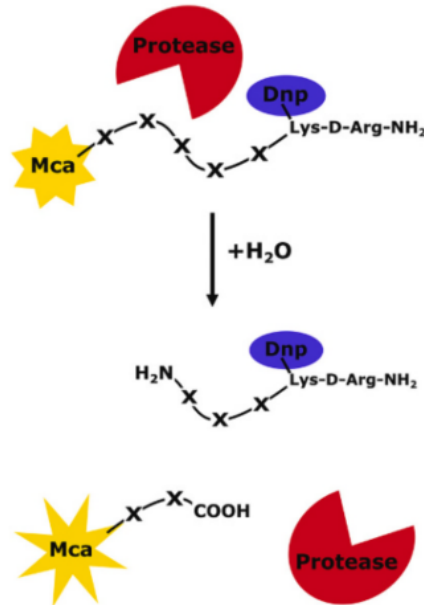


Abb. 13: Test-Prinzip P-CHECK®, entnommen aus [143].

Die Abb. zeigt die räumliche Nähe von dem fluoreszierenden Donor (Mca) und dem Akzeptor (Dnp). Zwischen Donor und Akzeptor befindet sich eine Peptidbibliothek, X steht für jeweils eine Aminosäure der insgesamt 19 möglichen proteinogenen Aminosäuren.

Oberer Bildausschnitt: Vor der Hydrolyse wird Energie vom Donor auf den Akzeptor übertragen (FRET), FRET-Effizienz hoch, Fluoreszenz des Donors gering.

Unterer Bildausschnitt: Die Protease hydrolysiert eine spezifische Peptidbindung, das Donor/Akzeptor-Paar wird räumlich getrennt, FRET-Effizienz verringert, Fluoreszenz des Donors verstärkt sich und wird photometrisch quantifizierbar [140, 142].

Mca: 7-Methoxycoumarinyl-4-acetyl; Dnp: Dinitrophenyl; Lys: Lysin; Arg: Arginin; H₂O: Wasser; NH₂: Aminogruppe; COOH: Carboxylgruppe.

Inhalt:

P-CHECK®-Substrat

FRET Paar: Mca und Dnp, integrierte Peptidbibliothek

Dimethylsulfoxid (DMSO)

Organisches Lösungsmittel

Tris-Buffered Saline (TBS)

25mM Tris (pH 7,2), 150 mM NaCl

Vorbereitung:

P-CHECK®-Substrat in 20% DMSO lösen.

Urinproben (Spontanurin) vor der Anwendung zentrifugieren (22°C/1000g/5 min)

Versuchsablauf:

Ansatz: Spontanurin (hier: Behandlungstag 3), jew. 102 µl TBS, 6 µl Spontanurin (DF 1) und 12 µl P-CHECK® Substrat in Reagiergefäße pipettieren und danach vortexen.

Leerwert: Jew. 108 μ l TBS und 12 μ l P-CHECK® Substrat in ReagiergefäÙe pipettieren und danach vortexen.

Nach dem Vortexen der Ansätze werden diese bei 37°C in einem Hybridization Oven mit Schüttelfunktion (70 Umdrehungen pro Minute) lichtgeschützt durch Aluminiumfolie für insgesamt 48 Stunden inkubiert. Nach zwei Tagen werden jew. 100 μ l aus den unterschiedlichen Ansätzen in eine Mikrotiterplatte pipettiert. Daraufhin wird umgehend die Fluoreszenz mit dem Fluoreszenzdetektor Spark® 10M-Tecan detektiert (Einstellungen: Anregungswellenlänge $\lambda = 320$ nm, Emissionswellenlänge $\lambda = 405$ nm, Helligkeit 80, Anzahl der Lichtblitze 30).

2.2.4.3 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die Konzentrationen von Aldosteron, Cystatin C und Aprotinin wurden mit der ELISA-Methode bestimmt. Diese Methode beruht auf Antigen-/Antikörperreaktionen, die durch enzymatische Farbreaktionen detektiert werden. Bei den Konzentrationsbestimmungen von Aldosteron und Aprotinin wurden kompetitive ELISAs angewandt. Bei dieser Methode befinden sich auf der Mikrotiterplatte gebundene spezifische Antikörper (capture antibody). Zu diesen Antikörpern werden sowohl die unmarkierten Analyten (Probe bzw. Standard) als auch eine bekannte Menge an markierten Analyten beigefügt. Diese Analyten konkurrieren um die begrenzten Bindungsstellen der Antikörper. Daraufhin werden Enzyme hinzugefügt, die mit Hilfe von Proteinen an die markierten Analyten binden. Spezielle beigefügte Substrate werden durch diese Enzyme katalysiert, wodurch ein Farbumschlag entsteht. Durch eine Stopp-Lösung werden diese Reaktionen angehalten und es entsteht ein photometrisch detektierbarer Farbumschlag. Die Signalintensität ist dabei umgekehrt proportional zu der ursprünglichen Analytenkonzentration in der Ausgangsprobe [144-146].

Bei der Cystatin C-Bestimmung kam ein sogenannter Sandwich-ELISA zur Anwendung. Wie auch bei der kompetitiven Methode befinden sich auf den Mikrotiterplatten gebundene polyklonale Antikörper, die jeweils an ein Epitop des zu bestimmenden Antigens binden (capture antibody). Im Gegensatz zu der kompetitiven ELISA-Methode werden nun erneut enzymgebundene polyklonale Antikörper beigefügt, sodass diese an ein anderes Epitop des Antigens binden (detection antibody). Dadurch befindet sich das Protein zwischen zwei polyklonalen Antikörpern („Sandwich-ELISA“). Nun wird ein Substrat beigefügt, das durch die an den detection Antikörper gebundenen Enzyme umgesetzt wird und

dabei einen Farbumschlag verursacht. Diese Reaktion wird durch eine Stopp-Lösung unterbunden. Die photometrisch detektierbare Signalintensität ist direkt proportional zur Antigenkonzentration in der Probe [147-149].

Aldosteronkonzentration im Plasma (IBL, Aldosterone ELISA)

Inhalt:

Mikrotiterplatte (96 Wells)	Wells mit Antikörper gegen Aldosteron beschichtet
Enzymkonjugat	Aldosteron-Horseradish Peroxidase (HRP) Konjugat, in Protein-Puffer
Standard A-F, lyophilisiert	Standard-Aldosteron (0; 20; 80; 200; 500; 1000 pg/ml)
Positivkontrolle, lyophilisiert	enthält Aldosteron in Protein-Puffer
Tetramethylbenzidin (TMB) Substratlösung	
TMB Stopplösung	0,5 M Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)
Waschpuffer	Waschpufferkonzentrat (40x)

Vorbereitung:

Standardreihe:	Standard A-F jeweils mit 1 ml destilliertes Wasser (Aqua dest.) ohne Schaumbildung mischen und auflösen.
Kontrollen:	Kontrollen mit 1 ml Aqua dest. ohne Schaumbildung mischen und auflösen.
Waschpuffer:	30 ml Waschpuffer (40x) mit 1170 ml Aqua dest. mischen (DF 40)

Versuchsablauf:

Jew. 25 µl Plasma, Standard und Kontrolle in die mit Antikörpern gegen Aldosteron beschichteten Wells der Mikrotiterplatte geben. Dazu jew. 100 µl Enzymkonjugat hinzufügen, für ca. 10 s mischen und ca. 60 min bei Raumtemperatur inkubieren. Danach Platte insgesamt 5x mit 400 µl Waschpuffer abwaschen und Flüssigkeitsreste auf Papiertüchern ausklopfen. Anschließend jew. 200 µl TMB Substratlösung in die Wells hinzugeben und Platte für ca. 30 min bei Raumtemperatur inkubieren. Anhalten der Reaktion durch Zugabe von je 100 µl TMB Stopplösung. Extinktion innerhalb von 10 min mit einem Photometer bei $\lambda = 450$ nm bestimmen.

Die Extinktionswerte der Standards gegen deren Konzentrationen auftragen. Mit Hilfe der Standardkurve Konzentrationen der jew. Plasmaproben berechnen. Nachweisgrenzen: 5,7 - 1000 pg/ml. Bei Konzentrationen oberhalb der oberen Nachweisgrenze wird die Probe mit Ampuwa verdünnt und erneut gemessen.

Aprotininkonzentration im Urin (Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit)

Inhalt:

Mikrotiterplatte (96 Wells)	Wells mit Antikörper gegen Aprotinin beschichtet
Detektionsreagenz A	Biotin-markiertes Aprotinin
Detektionsreagenz B	Avidin-konjugierte HRP
Probendiluent A/B	
TMB Substrat	
Stopplösung	
Waschpuffer	30-fach konzentriert
Standard:	Aprotinin Pulver, lyophilisiert (lyoph.) 1g (6000 Kallikrein-Inhibitor-Einheiten - KIU/mg)

Vorbereitung:

Standardreihe:	Standard (Aprotinin) abwiegen und mit Phosphate Buffered Saline (PBS) verdünnen, um unterschiedliche Konzentrationen für die Standardreihe zu erhalten.
Detektionsreagenz A:	Detektionsreagenz A mit Probendiluent A verdünnen (DF 75 bzw. DF 80).
Detektionsreagenz B:	Detektionsreagenz B mit Probendiluent B verdünnen (DF 80).
Waschpuffer:	20 ml Waschpuffer (30-fach konzentriert) mit 580 ml Aqua dest. verdünnen (DF 30).
Probenvorbereitung:	Verdünnung der Urinproben mit PBS abhängig von der ursprünglichen Konzentration der implantierten Aprotininpellets (Placebo: DF 5; Aprotinindosis 0,5 mg/Tag: DF 100; Aprotinindosis 2,0 mg/Tag: DF 500).

Versuchsablauf:

Jew. 50 µl Standard, Leerwert (PBS) bzw. vorverdünnte Proben in die mit Antikörper gegen Aprotinin beschichteten Wells pipettieren. Danach 50 µl vom Detektionsreagenz A hinzufügen, Mikrotiterplatte abdecken (Lichtschutz) und mit Hilfe eines Plattenschüttlers ca. eine Stunde bei 37°C inkubieren. Dann insgesamt 3x Wells mit jew. 350 µl Waschpuffer waschen und Flüssigkeitsreste auf Papiertüchern ausklopfen. Jew. 100 µl vom Detektionsreagenz B in die Wells geben und 30 min bei 37°C lichtgeschützt inkubieren. Die obengenannten Waschschriffe insgesamt 5x ausführen. Anschließend jew. 90 µl von der TMB-Substratlösung in die Wells hinzugeben und 10-20 min bei 37°C lichtgeschützt inkubieren. Nun je 50 µl der Stopplösung in die Wells pipettieren. Der Farbumschlag von blau zu gelb kann nun zügig mit einem Photometer bei $\lambda = 450$ nm detektiert und quantifiziert werden.

Berechnung der Aprotininkonzentrationen anhand der Standardreihe.

Nachweisgrenzen: 0,53 ng/ml - 100 ng/ml. Bei Konzentrationen oberhalb der oberen Nachweisgrenze wird die Probe entsprechend mit PBS verdünnt und erneut gemessen.

Cystatin C-Konzentration im Urin und Plasma (Quantikine® ELISA - Mouse/Rat)

Inhalt:

Mikrotiterplatte (96 Wells)	Wells mit Antikörper gegen Cystatin-C beschichtet
Cystatin C-Konjugat	HRP-gebundene Antikörper gegen Cystatin C
Cystatin C-Standard, lyoph.	
Cystatin C-Kontrolle, lyoph.	
Assay Diluent RD1W	Gepufferte Protein-Lösung
Calibrator Diluent-Konzentrat RD5-26	
Waschpuffer-Konzentrat	25-fach konzentriert
Farbreagenz A	Wasserstoffperoxid
Farbreagenz B	TMB
Stopplösung	Salzsäure

Vorbereitung:

Cystatin C-Kontrolle:	Cystatin C-Kontrolle in 1,0 ml Aqua dest. auflösen.
Waschpuffer-Lösung:	20 ml Waschpuffer-Konzentrat (25-fach konzentriert) mit 480 ml Aqua dest. mischen (DF 25).
Substrat-Lösung:	Farbreagenz A und B miteinander mischen (1:1).
Calibrator Diluent (DF 4):	20 ml Calibrator Diluent-Konzentrat RD5-26 mit 60 ml Aqua dest. mischen (DF 4).
Standardreihe:	Cystatin C-Standard (8000 pg/ml) jew. mit unterschiedlichen Volumina von Calibrator Diluent (DF 4) verdünnen, um die Standardreihe herzustellen.
Probenvorbereitung:	Plasmaproben 200-fach (DF 200)/Urinproben je nach Versuchsgruppe 100/200-fach (DF 100 - 200) mit Calibrator Diluent (DF 4) verdünnen.

Versuchsablauf:

Jew. 50 µl Assay Diluent RD1W in die mit Antikörpern gegen Cystatin C beschichteten Wells pipettieren. Danach 50 µl Standard, Cystatin C-Kontrolle, Leerwert (Calibrator Diluent DF 4) und vorverdünnte Proben hinzufügen, Mikrotiterplatte mit Streifen abdecken und bei Raumtemperatur für 2 Stunden inkubieren. 400 µl Waschpuffer-Lösung in jedes Well geben, Waschvorgang insgesamt 5x wiederholen. Jew. 100 µl Cystatin C-Konjugat in die einzelnen Wells pipettieren, Mikrotiterplatte erneut mit Streifen abdecken und bei Raumtemperatur für 2 Stunden inkubieren. Waschvorgänge (siehe oben) 5x wiederholen. Jew. 100 µl Substrat-Lösung hinzufügen und lichtgeschützt für 30 min bei Raumtemperatur inkubieren. Anschließend Reaktion mit jew. 100 µl Stopplösung beenden und innerhalb 30 min die Extinktionswerte bei $\lambda = 450$ nm bestimmen. Mit Hilfe der Standardkurve können die jew. Extinktionswerte der Proben in Cystatin C-Konzentrationen umgerechnet werden. Nachweisgrenzen: 3,93 pg/ml - 8000 pg/ml. Bei Konzentrationen oberhalb der oberen Nachweisgrenze werden die Proben mit Calibrator Diluent (DF 4) verdünnt und erneut gemessen.

2.2.5 Gewebeanalysen der Nieren

2.2.5.1 Histologie

Die histologischen Untersuchungen erfolgten in der Nephropathologischen Abteilung von Frau Prof. Dr. K. Amann am Universitätsklinikum Erlangen durch Herrn Prof. Dr. C. Daniel. Dafür wurden Nieren verwendet, die zuvor in PFA gelagert wurden. Nach der Anfertigung von 2 µm dicken Paraffinschnitten erfolgte eine Färbung durch die Periodic Acid-Schiff (PAS)-Reaktion und eine Beurteilung der Nieren auf histopathologische Veränderungen. Zudem wurden die Nieren auf glomeruläre bzw. tubuläre Schäden untersucht. Zur Beurteilung von glomerulärer Schäden erfolgte die semiquantitative Bestimmung des Glomerulosklerose-Index (GSI Score) [150]. Entsprechend wurde zur Untersuchung tubulärer Schäden der Tubulointerstitielle Schädigungsindex (TSI Score) bestimmt [151]. Zur genaueren Lokalisation der tubulären Schäden erfolgte eine immunhistochemische Färbung auf Kidney Injury Molecules-1 (KIM-1), als spezifischer renaler Indikator für eine proximal tubuläre Schädigung [152]. Zudem erfolgte eine immunhistochemische Färbung zur Beurteilung der Expression der γ -ENaC Untereinheit des ENaC. Um eine mögliche Akkumulation von Aprotinin im Nierengewebe detektieren zu können, wurde sowohl eine immunhistochemische Färbung auf Aprotinin als auch eine elektronenmikroskopische Untersuchung der Nieren durchgeführt [35].

2.2.5.2 Western Blot

Die renale Expression der γ -ENaC Untereinheit und dessen proteolytische Aktivierung wurde mittels Western Blot untersucht [35]. Bei diesem Verfahren werden Proteine mit spezifischen Antikörpern identifiziert und abhängig von deren Molekulargewicht bzw. Ladungseigenschaften mit Hilfe einer Gelelektrophorese aufgetrennt und in Form von Banden detektiert. Dadurch ist eine qualitative und semiquantitative Bestimmung von Proteinen, wie beispielsweise der γ -ENaC Untereinheit und deren Schnittstellen möglich [153]. Für die Western Blots wurden die in Stickstoff schockgefrorenen und bei -80°C gelagerten Nieren verwendet. Diese wurden halbiert und der Nierenkortex mit einem Skalpell gewonnen. Nach der Homogenisierung in einem Lysepuffer wurden die Proben mit Peptide:N-glycosidase F (PNGase F) deglykosyliert [35, 122, 154, 155]. Zur

Detektion wurde als primärer Antikörper der polyklonale γ -ENaC Antikörper der Firma StressMarq (SPC-405D) verwendet. Nach der Applikation des fluoreszierenden sekundären Antikörpers „IRDye 800CW“ (LI-COR Biosciences GmbH) wurden die Banden mit einem Fluoreszenzscanner (LI-COR Odyssey®) detektiert. Als Kontrolle und zur Normalisierung wurde die gesamte Proteinmenge mit „Revert Total Protein Stain“ (LI-COR Biosciences GmbH) gemessen [35, 122].

2.2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Microsoft Office Excel 2016 und GraphPad Prism 8.0.2. Bei den statistischen Berechnungen wurde ein Signifikanzniveau von 5% ($p \leq 0,05$) festgelegt. Zuerst wurden folgende Tests auf Normalverteilung der Daten durchgeführt: Anderson-Darling Test, D'Agostino & Pearson Test, Shapiro-Wilk Test und Kolmogorov-Smirnov Test. Sofern mindestens ein Test keine Normalverteilung ergab, wurden die Datensätze als nicht normalverteilt gewertet [35].

Die Signifikanztestung zweier Versuchsgruppen erfolgte bei normalverteilten, ungepaarten Daten mit dem unpaired t-Test und bei nicht normalverteilten Daten mit dem Mann-Whitney Test. Entsprechend wurde bei gepaarten, normalverteilten Daten der paired t-Test und bei gepaarten, nicht normalverteilten Daten der Wilcoxon-Test angewandt. Die Signifikanztestung von mehr als zwei Versuchsgruppen wurde bei ungepaarten, normalverteilten Daten mit one-way ANOVA und den Post-hoc Dunnett's, Tukey's bzw. Sidak's multiple comparisons Tests durchgeführt. Bei nicht normalverteilten, ungepaarten Daten erfolgte die Signifikanztestung mit dem Kruskal-Wallis Test und dem Post-hoc Dunn's multiple comparisons Test. Bei gepaarten, normalverteilten Daten wurde der Repeated Measures (RM) one-way ANOVA oder mixed effects analysis mit jeweils dem Post-hoc Dunnett's multiple comparison Test durchgeführt. Dabei erfolgte stets die sogenannte Geisser-Greenhouse Korrektur. Gepaarte, nicht normalverteilte Daten wurden mit dem Friedmann Test und dem darauffolgenden Dunn's multiple comparison Test analysiert. Um den linearen Zusammenhang zwischen zwei Parametern bestimmen zu können, wurde der Korrelationskoeffizient r nach Pearson und der Determinationskoeffizient r^2 berechnet. Der Ausreißertest nach Grubbs ($\alpha = 0,01\%$) wurde einmalig durchgeführt (siehe Abb. 36 B) [35].

3. Ergebnisse

Von den in den Grafiken und im Text dargestellten Messwerten sind die Mittelwerte und der jeweilige Standardfehler des Mittelwerts (Standard error of the mean, SEM) angegeben (Mittelwert \pm SEM).

3.1 Versuch 1: Renale Effekte von Aprotinin unter dem Stressmodell Niedrigsalzdiät

Die folgenden Ergebnisse beziehen sich auf die in 2.2.3.1 beschriebenen Versuchsabläufe. Bei den Versuchen wurde zur möglichen Verstärkung der renalen Effekte von Aprotinin ein Stressmodell mit einer simultanen Niedrigsalzdiät zur Induktion eines Salz mangels etabliert. Durch die Placebo- bzw. Aprotininpelletimplantationen und die verschiedenen Diäten wurden vier Versuchsgruppen festgelegt, die im Verlauf stets dargestellt und in Relation gesetzt werden.

3.1.1 Allgemeine Daten zum Versuchsablauf

3.1.1.1 Körpergewicht

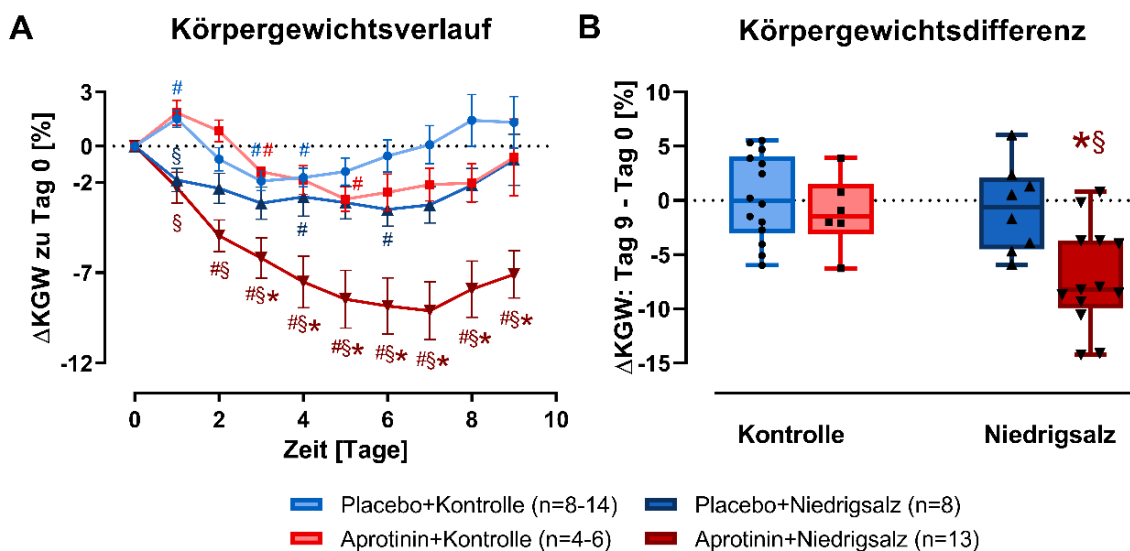


Abb. 14: Körpergewicht nach Pelletimplantation, publiziert in [35].

A: Körpergewichtsverlauf nach der Pelletimplantation (Tag 0), Darstellung der prozentualen Gewichtsänderung [%] in Bezug zum Ausgangsgewicht an Tag 0.

B: Körpergewichtsdifferenz zwischen Tag 9 und Tag 0 [%].

*: $p < 0,05$ zur jew. Placebogruppe; §: $p < 0,05$ zur Kontrolldiät; #: $p < 0,05$ zu Tag 0; horizontale, unterbrochene Linie: Ausgangsgewicht bei Pelletimplantation (Tag 0).

Δ KGW: Körpergewichtsdifferenz; n: Fallzahl.

Am Tag der Pelletimplantation (Tag 0) betrug das durchschnittliche absolute Körpergewicht der Mäuse aller Versuchsgruppen $27,2 \pm 0,6$ g. Einer zwischenzeitlichen leichten Gewichtszunahme der Kontrolldiätgruppen an Tag 1 nach der Pelletimplantation folgte eine Gewichtsabnahme. Dabei lag das Gewichtsminimum bei der Placebogruppe (Placebo+Kontrolle, P+K) an Tag 3 bei $-1,9 \pm 0,5$ % ($p = 0,06$) und bei der Aprotiningruppe (Aprotinin+Kontrolle, A+K) an Tag 5 bei $-2,9 \pm 0,7$ % ($p = 0,04$) des jeweiligen Ausgangsgewichts an Tag 0. Danach stieg das Körpergewicht wieder an, sodass bei beiden Versuchsgruppen das Ausgangsgewicht an Tag 0 (nahezu) wieder erreicht wurde. Unter Niedrigsalzdiät zeigte sich nach der Pelletimplantation eine deutliche Gewichtsabnahme mit einem Gewichtsminimum bei der Placebogruppe (Placebo+Niedrigsalz, P+N) an Tag 6 von $-3,5 \pm 0,9$ % ($p = 0,006$) und bei der Aprotiningruppe (Aprotinin+Niedrigsalz, A+N) an Tag 7 von $-9,1 \pm 1,6$ % ($p < 0,0001$) des Ausgangsgewichts an Tag 0. Danach stieg wie bei den Kontrolldiätgruppen das Körpergewicht bis Tag 9 wieder an, bei der Aprotiningruppe lag das mittlere Körpergewicht allerdings im Verlauf weiterhin deutlich unter den Ausgangswerten (Abb. 14 A).

In Abb. 14 B ist die prozentuale Körpergewichtsdifferenz zwischen Tag 9 und Tag 0 dargestellt. Unter Niedrigsalzdiät und Aprotininbehandlung lag das Körpergewicht bei $-7,1 \pm 1,3$ % des Gewichts an Tag 0 und war sowohl signifikant niedriger zur Placebogruppe (P+N, $p = 0,006$) als auch zu den aprotininbehandelten Tieren unter Kontrolldiät (A+K, $p = 0,02$). Das Körpergewicht der restlichen Versuchsgruppen lag an Tag 9 hingegen wieder im Bereich der Ausgangswerte an Tag 0.

3.1.1.2 Täglich erhobene Daten

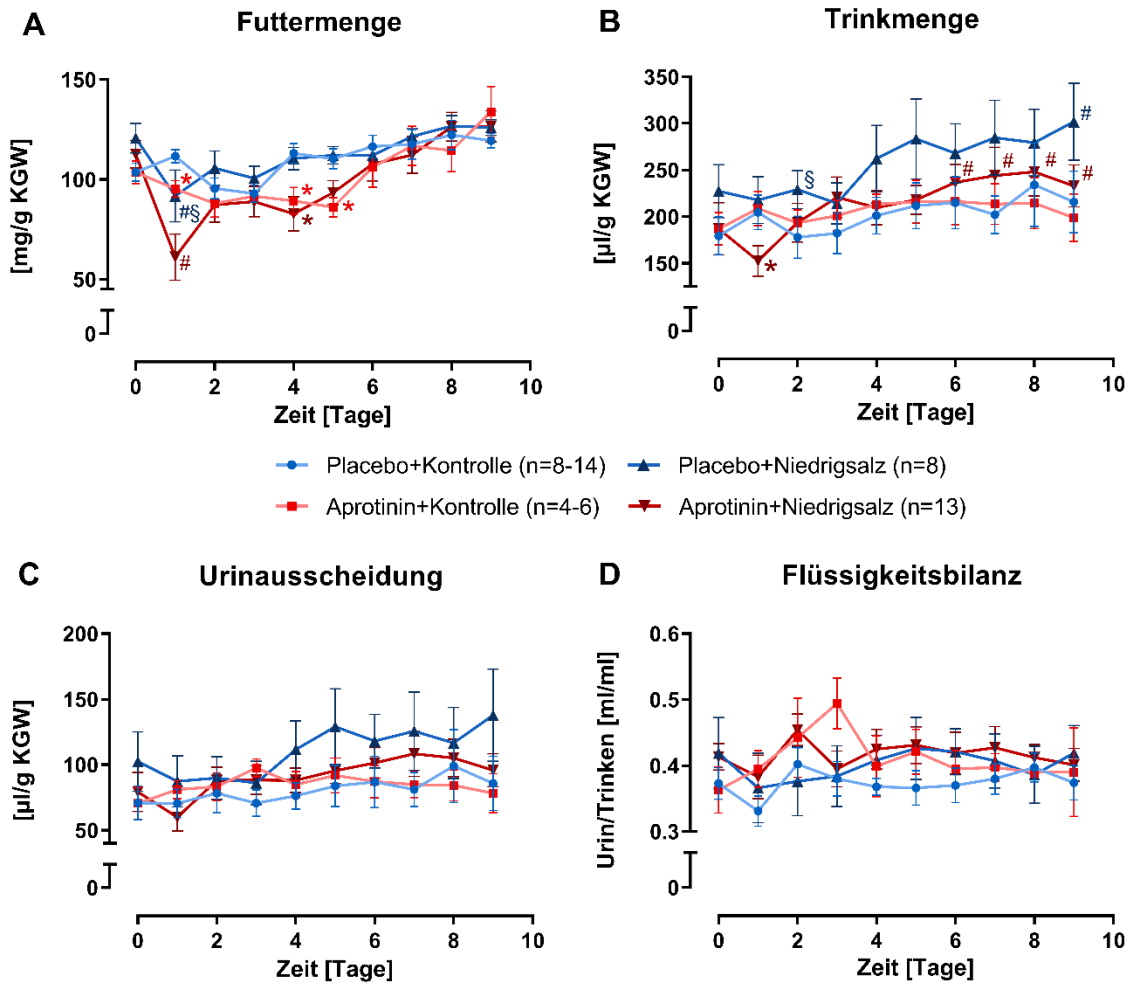


Abb. 15: Täglich erhobene Daten, publiziert in [35].

A: Zeitlicher Verlauf der Futtermenge in Bezug auf das jew. Körpergewicht [mg/g KGW].
 B: Zeitlicher Verlauf der Trinkmenge in Bezug auf das jew. Körpergewicht [µl/g KGW].
 C: Zeitlicher Verlauf der Urinausscheidung in Bezug auf das jew. Körpergewicht [µl/g KGW].
 D: Zeitlicher Verlauf der Flüssigkeitsbilanz (Urinausscheidung/Trinkmenge) [ml/ml].
 *: $p < 0,05$ zur jew. Placebogruppe; §: $p < 0,05$ zur Kontrolldiät; #: $p < 0,05$ zu Tag 0.
 KGW: Körpergewicht; n: Fallzahl.

Unter bestehender Niedrigsalzdiät nahm die Fressmenge am postoperativen Tag bei den placebo- und aprotininbehandelten Tieren auf ca. 76% (P+N, $p = 0,002$) bzw. 53% (A+N, $p = 0,04$) der Ausgangswerte am Tag der Pelletimplantation (Tag 0) ab. Zwischenzeitlich (Tag 4 bzw. Tag 5) lag die Fressmenge der beiden Aprotinigruppen signifikant unter der der Placebogruppen. Unter Niedrigsalzdiät tranken die aprotininbehandelten Mäuse an Tag 1 ($153 \pm 16 \mu\text{l/g KGW}$) etwa 30% weniger ($p = 0,046$) als die placebobehandelten Tiere ($218 \pm 25 \mu\text{l/g KGW}$).

Insgesamt betrachtet waren diese Veränderungen in der Fress- und Trinkmenge nur vorübergehend, sodass im Verlauf keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen mehr nachweisbar waren (Abb. 15 A, B). Die Urinausscheidung und die Flüssigkeitsbilanz blieb nach der Pelletimplantation und dem Diätwechsel relativ konstant (Abb. 15 C, D).

3.1.2 Urin-Proteaseaktivität und ENaC bedingter Natriumtransport

3.1.2.1 Aprotininkonzentration im Urin

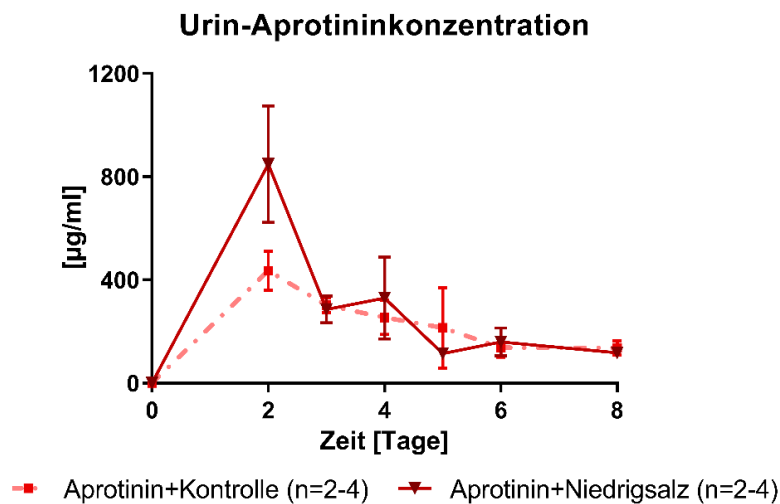


Abb. 16: Aprotininkonzentration im Urin, publiziert in [35].

Zeitlicher Verlauf der Aprotininkonzentration im Urin [µg/ml] nach der Aprotininpelletimplantation an Tag 0 (Aprotinindosis: 2,0 mg/Tag). Konzentrationen jew. getrennt nach Diät dargestellt. n: Fallzahl.

Nach der Aprotininimplantation (Tag 0) setzten die Pellets eine tägliche Aprotinindosis von 2,0 mg über zehn Tage frei. Unabhängig von der Diät betrug die mittlere Aprotininkonzentration im Urin zwischen Tag 2 und Tag 8 291 ± 45 µg/ml. Getrennt nach Diät lag die mittlere Urin-Aprotininkonzentration unter Niedrigsalzdiät mit 340 ± 85 µg/ml um etwa 39% höher als unter Kontrolldiät (244 ± 35 µg/ml), der Unterschied erreichte keine Signifikanz. An Tag 2 nach der Pelletimplantation wurde bei beiden Diäten ein Konzentrationsmaximum von 848 ± 227 µg/ml (Niedrigsalzdiät) bzw. 436 ± 76 µg/ml (Kontrolldiät) detektiert, auch hier war der Unterschied nicht signifikant. Nach diesem Peak fielen die Aprotininkonzentrationen im Urin ab, sodass die Konzentrationskurven einen ähnlichen

Verlauf zeigten. Am 8. Tag nach Beginn der Aprotininbehandlung wurde eine Urin-Aprotininkonzentration von $117 \pm 20 \mu\text{g/ml}$ unter Nidrigsalzdiät bzw. von $137 \pm 27 \mu\text{g/ml}$ unter Kontrolldiät gemessen.

3.1.2.2 Proteaseaktivität im Urin

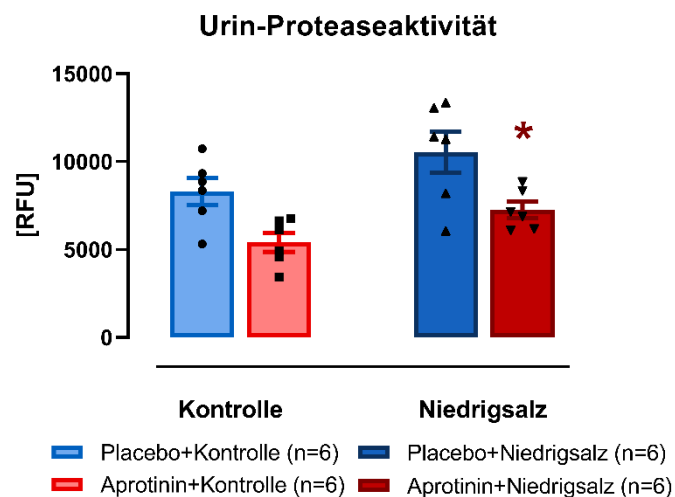


Abb. 17: Proteaseaktivität im Urin, publiziert in [35].

Proteaseaktivität im Urin [RFU]. Spontanurinproben an Tag 3.

*: $p < 0,05$ zur jew. Placebogruppe.

RFU: Relative Fluorescence Units; n: Fallzahl.

Um den Effekt des Serinprotease-Inhibitors Aprotinin auf die Gesamturinproteaseaktivität zu bestimmen, erfolgte eine Messung der Proteaseaktivität aus Spontanurinproben an Tag 3 nach der Pelletimplantation. Diätunabhängig nahm die Gesamtproteaseaktivität im Urin bei den Aprotinigruppen verglichen mit den Placebogruppen ab. Unter Salzrestriktion war diese Abnahme von etwa 31% (P+N: 10534 ± 1171 ; A+N: 7261 ± 461 RFU) signifikant ($p = 0,02$). Getrennt nach Diät fiel unter Nidrigsalzdiät im Vergleich zur Kontrolldiät eine um jeweils 27 % bzw. um 34 % höhere Gesamtproteaseaktivität im Urin auf.

3.1.2.3 Versuch 1.1: Amilorid-sensitive Natriurese

Der Versuchsablauf wird in Absatz 2.2.3.1 beschrieben. In diesem Teilversuch wurde mit Hilfe von intraperitonealen Ampuwa- bzw. Amiloridinjektionen die Amilorid-sensitive Natriurese bestimmt und dadurch die Effekte von Aprotinin auf den ENaC bedingten Natriumtransport untersucht.

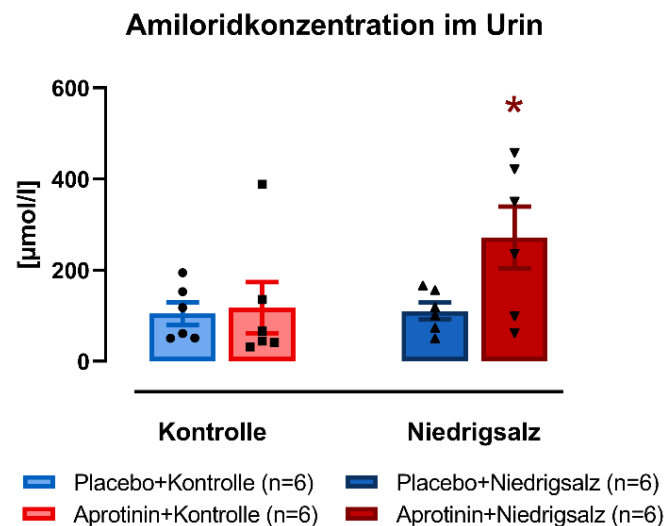


Abb. 18: Amiloridkonzentration im Urin, publiziert in [35].

Amiloridkonzentration im Urin [µmol/l]. Als Urinproben wurden jew. 6-Stunden-Sammelurine nach den Amiloridinjektionen (10 µg/g KGW) verwendet.

*: $p < 0,05$ zur jew. Placebogruppe.

n: Fallzahl.

Nach der Amiloridinjektion (10 µg/g KGW) wurde im 6-Stunden-Sammelurin die Amiloridkonzentration bestimmt. Unter Salzrestriktion und Aprotininbehandlung (A+N: 272 ± 68 µmol/l) lagen die Amiloridkonzentrationen verglichen mit der Placebogruppe (P+N: 111 ± 19 µmol/l) um das 2,5-fache höher ($p = 0,04$). Bei den restlichen Versuchsgruppen unterschieden sich die Amiloridkonzentrationen nicht wesentlich voneinander.

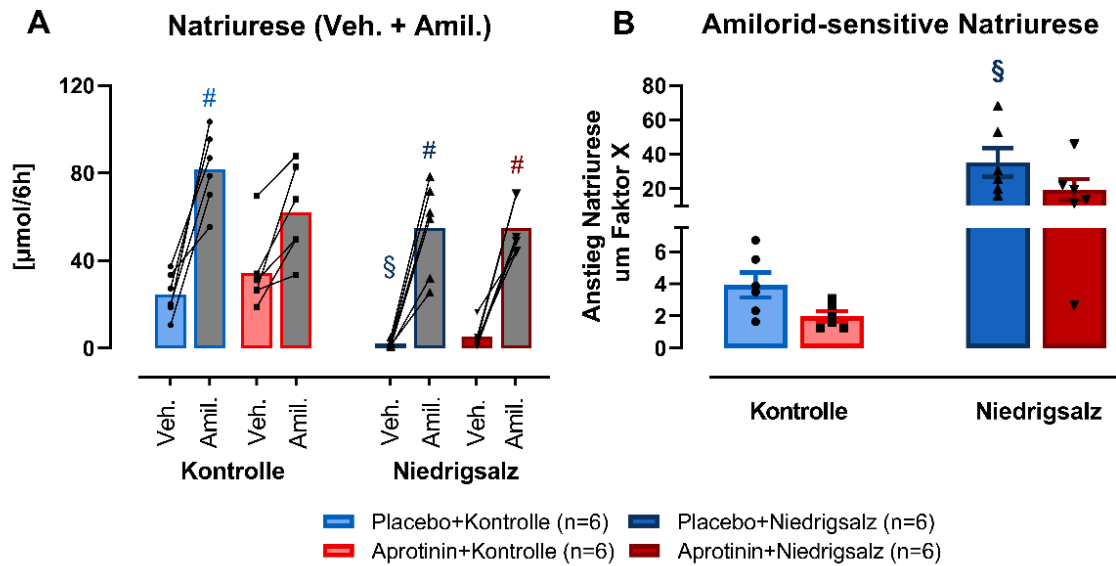


Abb. 19: Natriurese und Amilorid-sensitive Natriurese, publiziert in [35].

A: 6-Stunden-Natriurese [$\mu\text{mol}/6\text{h}$] nach Vehikel- (Ampuwa) bzw. Amiloridinjektion ($10 \mu\text{g}/\text{g}$ KGW, graue Balken).

B: Amilorid-sensitive Natriurese (Amil./Veh.: siehe A) [Faktor X].

§: $p < 0,05$ zur Kontrolldiät; #: $p < 0,05$ zu den jew. Ampuwainjektionen (Vehikel).

Veh.: Vehikel (Ampuwa); Amil.: Amilorid; n: Fallzahl; h: Stunde(n).

In Abb. 19 A ist die 6-Stunden-Natriurese nach den intraperitonealen Vehikel- (Ampuwa) bzw. Amiloridinjektionen ($10 \mu\text{g}/\text{g}$ KGW) dargestellt. Unabhängig von der Diät und der Behandlung stieg die 6-Stunden-Natriurese nach den Amiloridinjektionen um ein Vielfaches an, dabei war die Natriurese zwischen den Versuchsgruppen nicht signifikant verschieden. Nach den Vehikelinjektionen war die Natriurese bei Niedrigsalzdiät im Vergleich zur Kontrolldiät erwartungsgemäß deutlich geringer.

In Abb. 19 B ist die Amilorid-sensitive Natriurese dargestellt. Dabei wurde der Anstieg der Natriurese nach den Amilorid-Injektionen als Faktor entsprechend der Steigung in Abb. 19 A berechnet. Zwischen der Aprotinin- und der Placebogruppe gab es bezüglich der Amilorid-sensitiven Natriurese bei beiden Diäten keine wesentlichen Unterschiede. Unter Niedrigsalzdiät war die Amilorid-sensitive Natriurese verglichen mit der Kontrolldiät um das 9-fache (P+N; P+K, $p = 0,0008$) bzw. 9,8-fache (A+N; A+K, $p = 0,10$) deutlich gesteigert.

3.1.3 Natriumhaushalt und Glomeruläre Filtrationsrate (GFR)

3.1.3.1 Elektrolyte im Urin

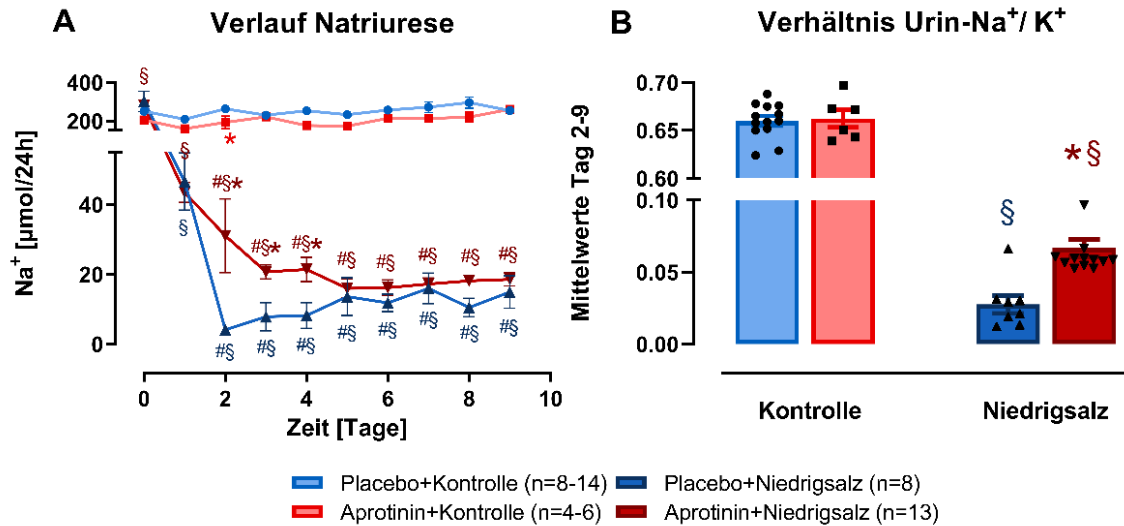


Abb. 20: Elektrolyte im Urin, publiziert in [35].

A: Zeitlicher Verlauf der 24-Stunden-Natriurese [$\mu\text{mol}/24\text{h}$].

B: Verhältnis Urin-Na⁺/K⁺, Mittelwerte zwischen Tag 2-9 nach der Pelletimplantation (Tag 0).

*: $p < 0,05$ zur jew. Placebogruppe; §: $p < 0,05$ zur Kontrolldiät; #: $p < 0,05$ zu Tag 0.

Na⁺: Natrium; K⁺: Kalium; h: Stunde(n); n: Fallzahl.

Um die Effekte der Aprotininbehandlung auf den Salz- und Elektrolythaushalt zu untersuchen, erfolgte eine Bestimmung der Elektrolyte im Urin.

Unter Kontrolldiät blieb die 24-Stunden-Natriurese bei beiden Versuchsgruppen im Verlauf konstant auf ähnlichem Niveau. Bereits am 1. Tag nach dem Futterwechsel auf die Niedrigsalzdiät (Tag 0) nahm die Natriurese bei beiden Versuchsgruppen deutlich ab und war während der gesamten Versuchsdauer in Bezug auf die Kontrolldiät signifikant niedriger. Unter Niedrigsalzdiät und Placebobehandlung lag das Minimum der Natriurese an Tag 2 mit $4,1 \pm 1,0 \mu\text{mol}/24\text{h}$ bei 1,4% des Ausgangswerts von $302 \pm 53 \mu\text{mol}/24\text{h}$ ($p < 0,0001$). Unter Niedrigsalzdiät fiel auch bei den aprotininbehandelten Mäusen die Natriurese an Tag 2 ($31,1 \pm 10,6 \mu\text{mol}/24\text{h}$) auf ca. 11% der Ausgangswerte an Tag 0 ($279 \pm 21 \mu\text{mol}/24\text{h}$) deutlich ab ($p < 0,0001$). Die Natriurese war hierbei jedoch im Vergleich zur Placebogruppe um das etwa 8-fache höher ($p = 0,007$). Signifikante Unterschiede der Natriurese zwischen den Behandlungsgruppen waren bis

einschließlich Tag 4 nach der Pelletimplantation (Tag 0) nachweisbar. Ab Tag 5 verlief die Natriurese parallel auf ähnlich niedrigem Niveau (Abb. 20 A).

In Abb. 20 B ist das Natrium/Kalium Verhältnis im Urin dargestellt. Dafür wurden die Mittelwerte zwischen Tag 2 und Tag 9 berechnet. Unter Kontrolldiät war das Verhältnis beider Versuchsgruppen identisch. Unter Niedrigsalzdiät lag das Verhältnis bei der Aprotinigruppe ($0,067 \pm 0,006$) im Vergleich zur Placebogruppe ($0,028 \pm 0,006$) um das etwa 2,4-fache höher ($p = 0,03$).

3.1.3.2 Glomeruläre Filtrationsrate

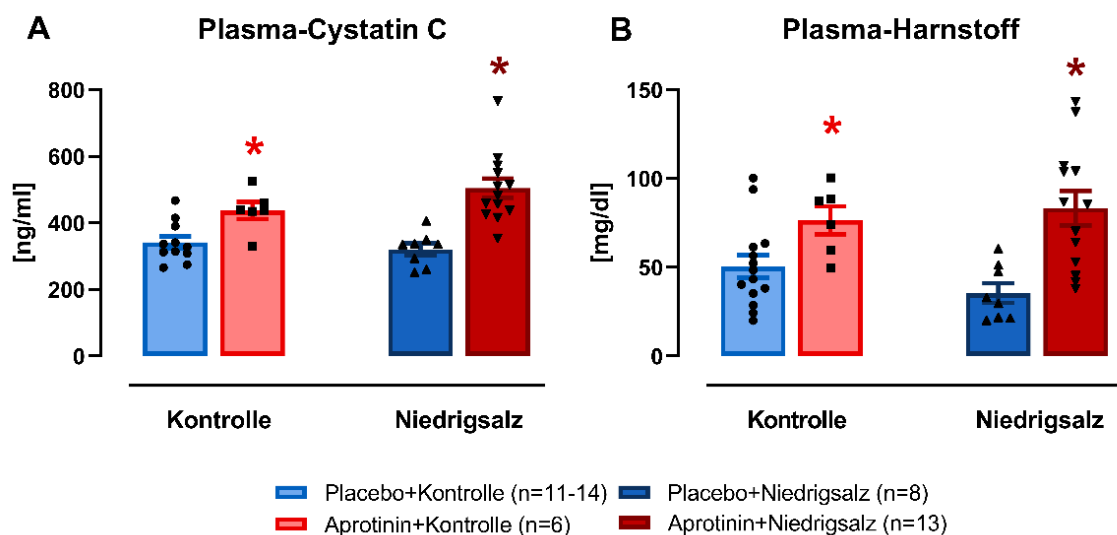


Abb. 21: Plasma-Cystatin C und Plasma-Harnstoff, publiziert in [35].

A: Cystatin C im Plasma [ng/ml] an Tag 9.

B: Harnstoff im Plasma [mg/dl] an Tag 9.

*: $p < 0,05$ zur jew. Placebogruppe.

n: Fallzahl.

Die Cystatin C-Konzentrationen im Plasma waren bei den Aprotinigruppen sowohl unter Kontroll- (438 ± 26 ng/ml) als auch unter Niedrigsalzdiät (505 ± 29 ng/ml) im Vergleich zu Placebobehandlung (P+K: 342 ± 18 ng/ml; P+N: 321 ± 18 ng/ml) um etwa 28% ($p = 0,007$) bzw. 57% ($p = 0,0002$) höher (Abb. 21 A). Die Harnstoffkonzentrationen im Plasma verhielten sich vergleichbar. Diese waren bei der Aprotininbehandlung unter Kontrolldiät (77 ± 8 mg/dl) um das 1,5-fache und unter Niedrigsalzdiät (83 ± 10 mg/dl) um das 2,3-fache im Vergleich zu der Placebobehandlung (P+K: 51 ± 6 mg/dl; P+N: 36 ± 5 mg/dl) erhöht ($p = 0,03$ bzw. $p = 0,002$) (Abb. 21 B).

3.1.3.3 Plasma-Aldosteron und Blutgasanalyse

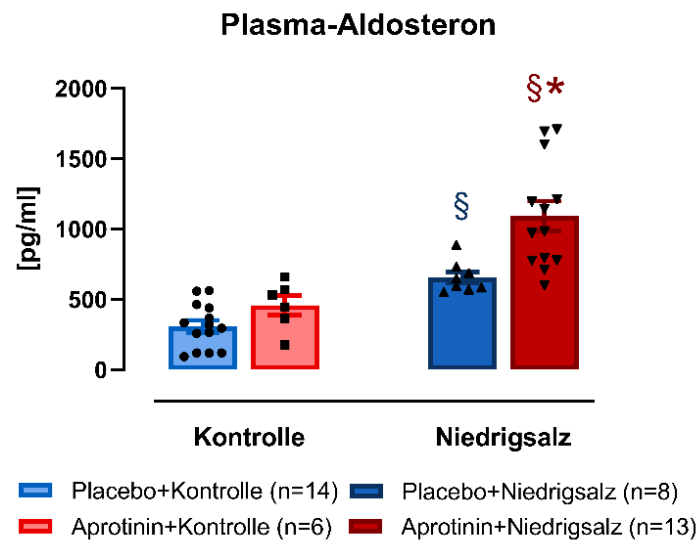


Abb. 22: Plasma-Aldosteron, publiziert in [35].

Aldosteronkonzentration im Plasma [pg/ml] an Tag 9.

*: $p < 0,05$ zur jew. Placebogruppe; §: $p < 0,05$ zur Kontrolldiät.

n: Fallzahl.

Das Hormon Aldosteron als wichtiger Regulator des Salzhaushalts bzw. der ENaC-Expression/Aktivität wurde ebenfalls im Plasma bestimmt. Unter Kontrolldiät lagen die Aldosteronkonzentrationen bei der Aprotinigruppe (458 ± 70 pg/ml) im Vergleich zur Placebogruppe (308 ± 43 pg/ml) im Mittel um das etwa 1,5-fache höher ($p = 0,096$). Unter Niedrigsalzdiät wurden in der Aprotinigruppe (1093 ± 105 pg/ml) etwa 1,7-fach signifikant höhere Aldosteronkonzentrationen als in der Placebogruppe (654 ± 39 pg/ml) ($p = 0,005$) gemessen. Unter Niedrigsalzdiät lagen die Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolldiät sowohl bei der Placebogruppe um etwa das 2,1-fache ($p < 0,0001$) als auch bei der Aprotinigruppe um das circa 2,4-fache ($p = 0,0003$) höher.

Tabelle 8: Blutgasanalyse.

BGA an Tag 9.

§: $p < 0,05$ zur jew. Kontrolldiät.HCO₃ std: Standardbikarbonat; Hb: Hämoglobin; n: Fallzahl.

Parameter	Placebo + Kontrolle (n=3-5)	Aprotinin + Kontrolle (n=5-6)	Placebo + Niedrigsalz (n=8)	Aprotinin + Niedrigsalz (n=13)
pH	7,27 ± 0,02	7,28 ± 0,02	7,28 ± 0,01	7,28 ± 0,01
Natrium [mM]	149 ± 1	151 ± 1	150 ± 1	152 ± 1
Kalium [mM]	4,8 ± 0,1	4,5 ± 0,2	4,2 ± 0,2 (§)	4,0 ± 0,1 (§)
HCO ₃ std [mM]	20,2 ± 1,4	19,9 ± 0,6	22,2 ± 0,5	22,3 ± 0,5 (§)
Hämatokrit [%]	46,7 ± 0,3	45,9 ± 1,5	48,1 ± 0,8	47,9 ± 0,9
Hb [g/dl]	15,4 ± 0,1	15,1 ± 0,5	15,9 ± 0,3	15,8 ± 0,3
Calcium [mM]	0,97 ± 0,02	0,97 ± 0,04	0,97 ± 0,03	0,94 ± 0,02

An Tag 9 erfolgte vor der Tötung eine venöse Blutgasanalyse. Unter Niedrigsalzdiät waren die Kaliumkonzentrationen sowohl bei der Placebogruppe ($4,2 \pm 0,2$ mM) als auch bei der Aprotinigruppe ($4,0 \pm 0,1$ mM) verglichen mit den Versuchsgruppen unter Kontrolldiät (P+K: $4,8 \pm 0,1$ mM; A+K: $4,5 \pm 0,2$ mM) erniedrigt ($p = 0,03$ bzw. $0,02$). Die Standardbikarbonatwerte lagen bei den aprotininbehandelten Mäusen unter Niedrigsalzdiät ($22,3 \pm 0,5$ mM) im Vergleich zur gleichen Behandlungsgruppe unter Kontrolldiät (A+K: $19,9 \pm 0,6$ mM) höher ($p = 0,01$). Die weiteren Parameter unterschieden sich nicht wesentlich voneinander.

3.1.3.4 Renale γ -ENaC Expression

Um die Effekte von Aprotinin auf die renale γ -ENaC Expression und seine proteolytische Aktivierung unter Natrium- bzw. Kontrolldiät zu untersuchen, wurden die entnommenen Nieren sowohl immunhistochemisch als auch im Western Blot analysiert.

Immunhistochemie

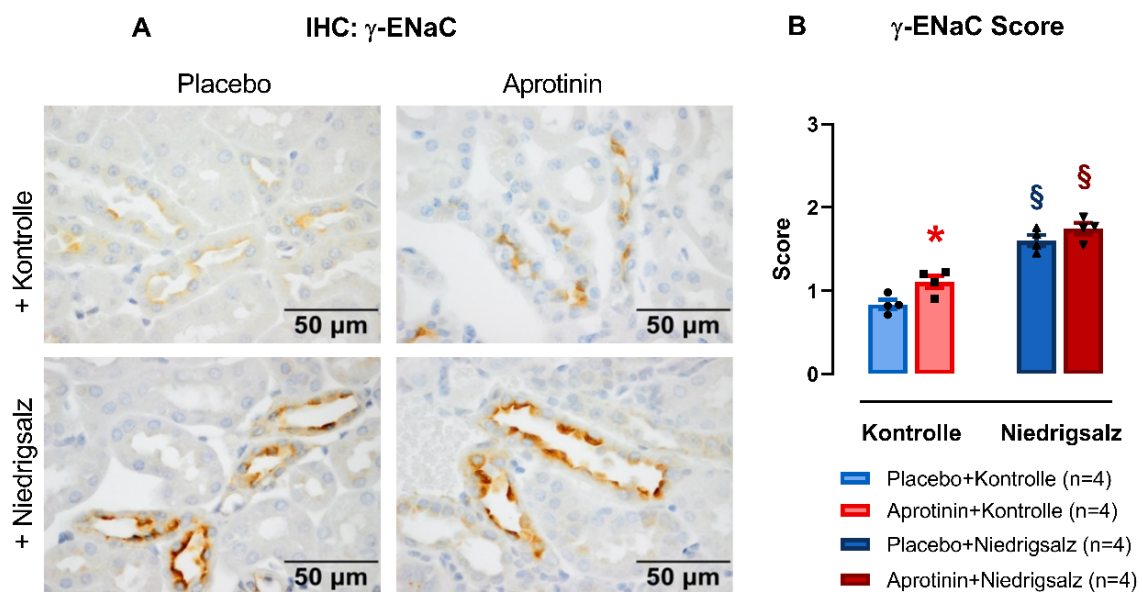


Abb. 23: Immunhistochemie γ -ENaC und γ -ENaC Score, publiziert in [35].

A: Repräsentative IHC-Schnitte mit γ -ENaC Färbung (braun).

B: γ -ENaC Score, erhoben gemäß der IHC Färbung (siehe A).

*: $p < 0,05$ zur jew. Placebogruppe; §: $p < 0,05$ zur Kontrolldiät.

IHC: Immunhistochemie; n: Fallzahl.

Die renale γ -ENaC Expression wurde mittels Immunhistochemie untersucht. Hierbei zeigte sich unter Natriumdiät im Vergleich zur Kontrolldiät eine deutlich stärkere Expression (Abb. 23 A).

Entsprechend ergab das Scoring der γ -ENaC Färbung (0-3) bei den Versuchsgruppen unter Natriumdiät im Vergleich zur Kontrolldiät um den Faktor 1,9 (Placebo, $p < 0,0001$) bzw. 1,6 (Aprotinin, $p = 0,0002$) höhere Werte. Zudem war das Scoring unter Kontrolldiät bei der Aprotinigruppe verglichen mit der Placebogruppe ebenfalls erhöht ($p = 0,03$) (Abb. 23 B).

Western Blot

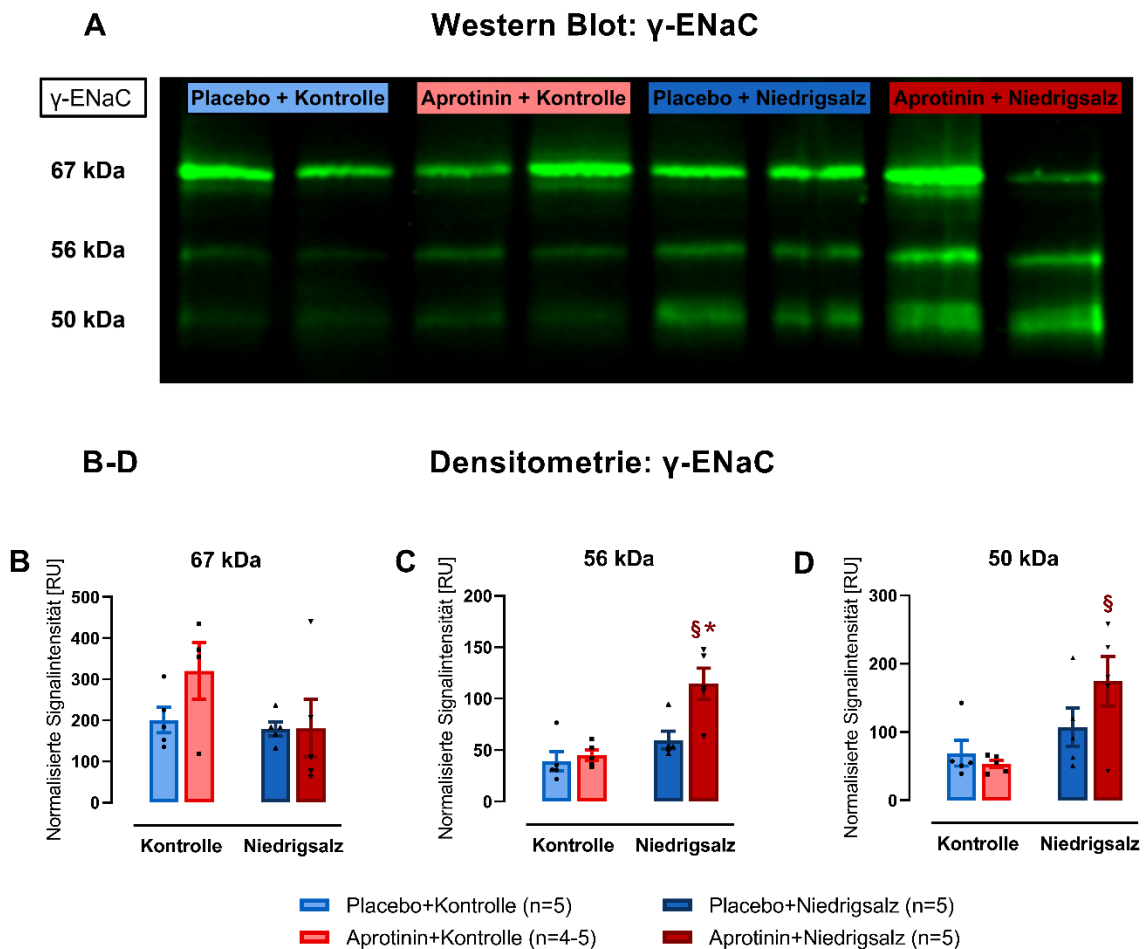


Abb. 24: Western Blot und Densitometrie: γ -ENaC, publiziert in [35].

A: Repräsentativer Western Blot zur Analyse der proteolytischen Aktivierung des γ -ENaC, nach der Deglykolyse (PNGase F) wurden die Fragmente des γ -ENaC bei 67, 56, und 50 kDa detektiert. Diese Banden (grün) entsprechen der jew. ungespaltenen (67 kDa), der Furin-gespaltenen (56 kDa) und der vollständig gespaltenen (50 kDa) Form.

B-D: Densitometrie der in A detektierten Banden bei 67, 56 und 50 kDa, die Signalintensität (RU) wurde auf das jew. detektierte Gesamtprotein normiert.

*: $p < 0,05$ zur Placebogruppe; §: $p < 0,05$ zur Kontrolldiät.

RU: Relative Units; kDa: Kilodalton; n: Fallzahl.

Die weitere Analyse der proteolytischen Aktivierung des γ -ENaC erfolgte mittels Western Blot. Nach der Behandlung mit PNGase F wurden die γ -ENaC Fragmente als Banden mit einer Größe von 67, 56 und 50 kDa entsprechend der ungespaltenen, Furin-gespaltenen und vollständig gespaltenen Form detektiert (siehe Abb. 24 A). Mittels Densitometrie wurde die Signalintensität der Banden ermittelt und mit den anderen Versuchsgruppen in Relation gesetzt. Bei der ungespaltenen Form (67 kDa) gab es zwischen den Versuchsgruppen keine signifikanten Unterschiede. In der Placebogruppe unter Kontrolldiät war die

Expression des vollständig geschnittenen γ -ENaC (50 kDa) niedrig und stieg unter Niedrigsalzdiät tendenziell an. Unter Kontrolldiät hatte die Aprotininbehandlung keine wesentlichen Effekte auf die γ -ENaC Expression. Unter Niedrigsalzdiät stieg die Expression der proteolytisch gespaltenen Formen (56, 50 kDa) bei der Aprotinigruppe im Vergleich zur Kontrolldiät bzw. zur Placebogruppe signifikant an (siehe Abb. 24 B-D).

3.1.4 Proximaler Tubulus - Funktionsmarker

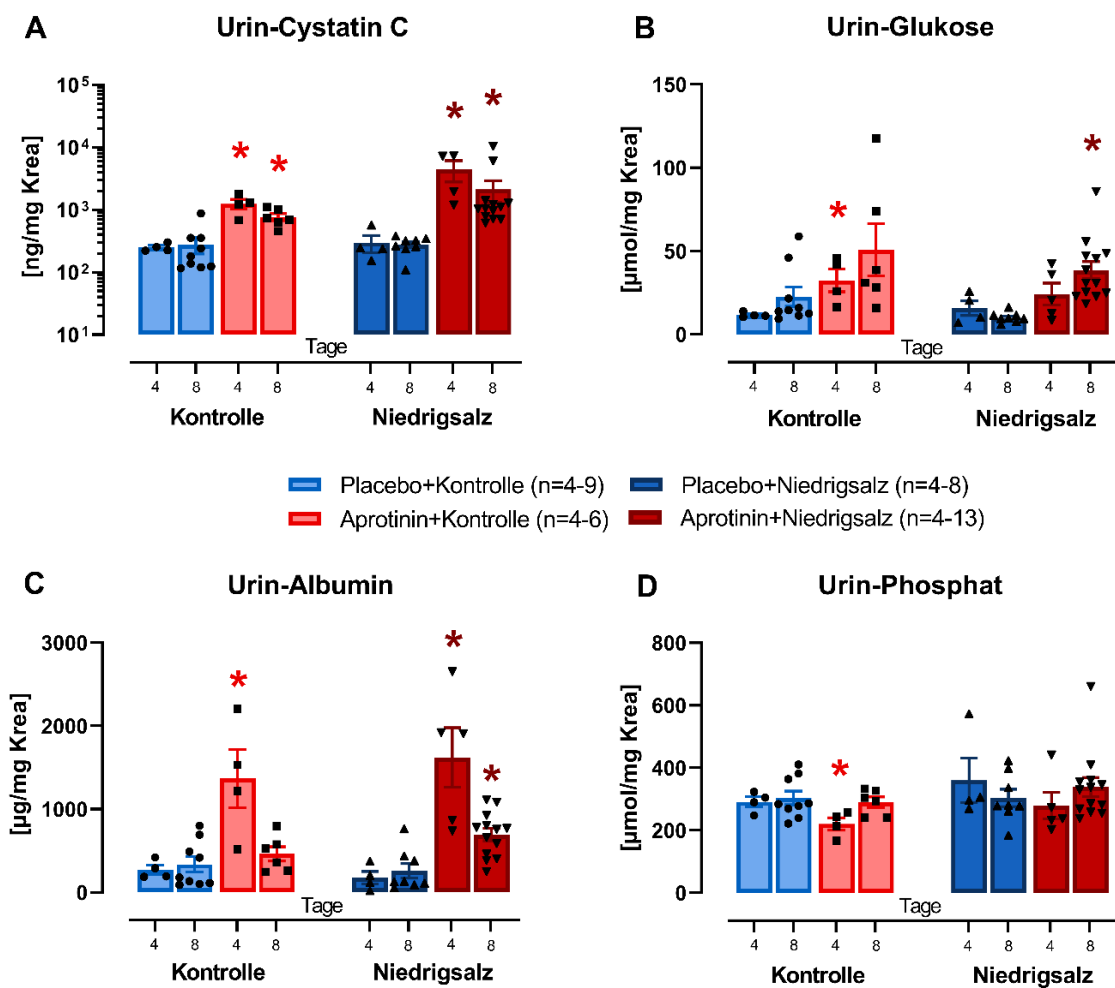


Abb. 25: Proximaler Tubulus - Funktionsmarker, publiziert in [35].

A: Cystatin C im Urin an Tag 4 und Tag 8 [ng/mg Krea].
 B: Glukose im Urin an Tag 4 und Tag 8 [μ mol/mg Krea].
 C: Albumin im Urin an Tag 4 und Tag 8 [μ g/mg Krea].
 D: Phosphat im Urin an Tag 4 und Tag 8 [mmol/mg Krea].
 *: $p < 0,05$ zur jew. Placebogruppe.
 Krea: Kreatinin; n: Fallzahl.

Um die Effekte von Aprotinin auf den proximalen Tubulus zu untersuchen, wurden die tubulären Funktionsmarker Cystatin C, Glukose, Albumin und Phosphat im Urin bestimmt. Die Cystatin C-Urinausscheidung (Abb. 25 A), die Glucosurie (Abb. 25 B) und die Albuminurie (Abb. 25 C) waren bei den aprotinin-behandelten Mäusen verglichen mit der Placebobehandlung diätunabhängig an Tag 4 und an Tag 8 erhöht. Die Phosphatausscheidung (Abb. 25 D) unterschied sich hingegen nicht wesentlich zwischen den Versuchsgruppen.

3.1.5 Nierenhistologie

3.1.5.1 PAS-Färbung, TSI und GSI Score

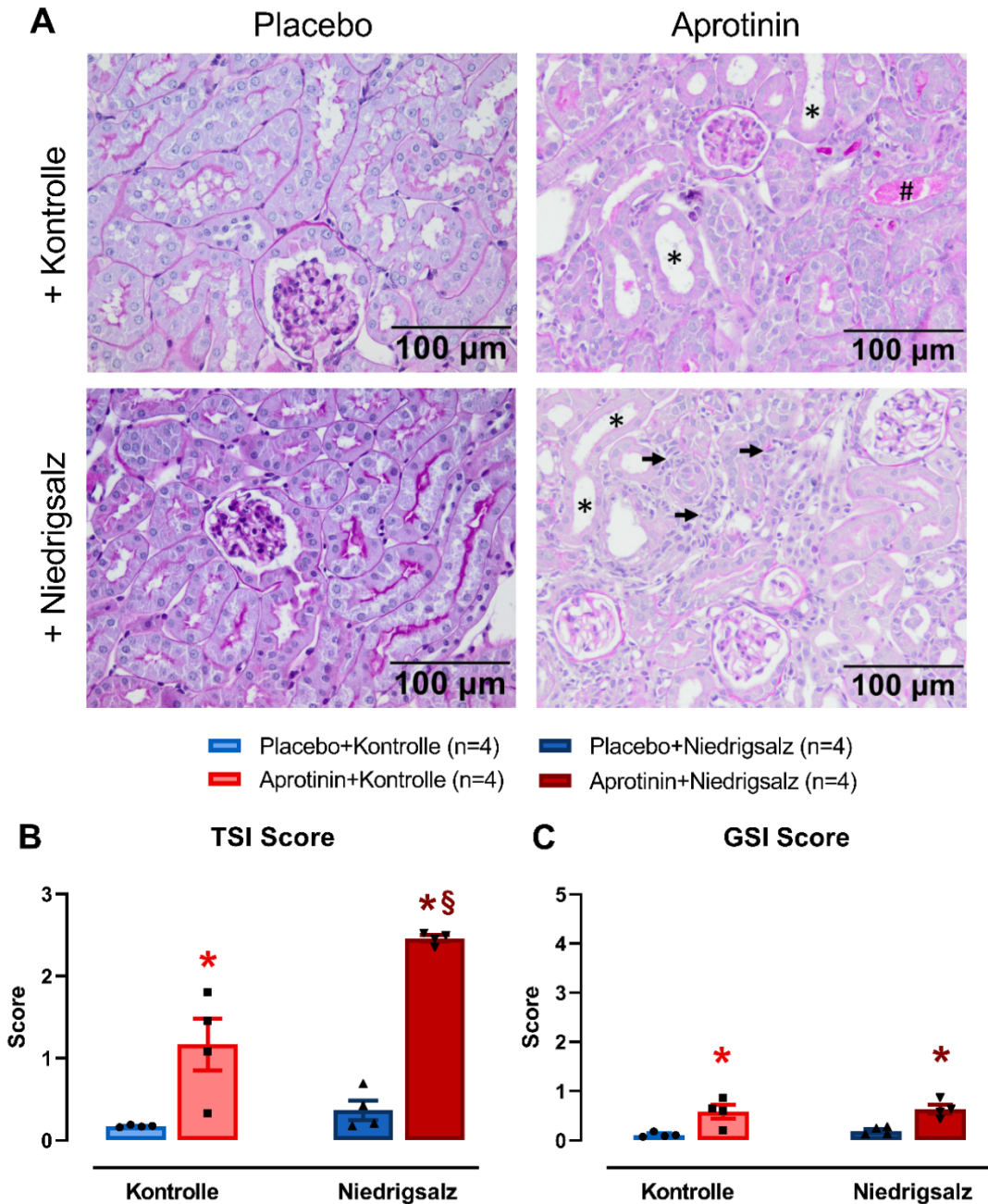


Abb. 26: PAS-Färbung, TSI und GSI Score, publiziert in [35].

A: Repräsentative PAS (Periodic acid-Schiff)-Färbungen der an Tag 9 entnommenen Nieren. Rechte Bildhälfte: Schädigungszeichen bei der Aprotininbehandlung.

*: Tubuläre Dilatation und tubuläre Atrophie; #: Tubuläre Zylinder; ➔ Zunahme interstitieller Zellen (inflammatorische Zellen und Fibroblasten).

B: TSI Score (Tubulointerstitieller Schädigungsindex).

C: GSI Score (Glomerulosklerose-Index).

*: $p < 0,05$ zur jew. Placebogruppe; §: $p < 0,05$ zur Kontrolldiät; n: Fallzahl.

Histologisch (PAS-Färbungen) zeigten sich bei der Placebogruppe erwartungsgemäß keine pathologischen renalen Veränderungen (Abb. 26 A, linke Bildseite). Unter Kontrolldiät wiesen die Nieren der Aprotiningruppe moderate tubulointerstitielle Schäden in Form von tubulärer Dilatation, atrophen tubulären Bereichen und tubulären Zylindern auf. Unter Nidrigsalzdiät zeigten die Nieren der Aprotiningruppe hingegen deutliche, schwerwiegende tubulointerstitielle Schäden mit einer signifikanten Zunahme interstitieller Zellen, bei denen es sich um inflammatorische Zellen und Fibroblasten handelte (Abb. 26 A, rechte Bildseite).

Zur Beurteilung und Quantifizierung tubulärer und glomerulärer Schäden wurden TSI und GSI Scores bestimmt (siehe 2.2.5.1). Entsprechend der festgestellten tubulointerstitiellen Schäden (Abb. 26 A) waren die TSI Scores bei den aprotininbehandelten Mäusen unter Kontroll- ($1,2 \pm 0,3$) bzw. Nidrigsalzdiät ($2,5 \pm 0,04$) verglichen mit der Placebobehandlung (P+K: $0,2 \pm 0,01$; P+N: $0,4 \pm 0,1$) um das etwa 6-fache erhöht ($p = 0,01$ bzw. $p < 0,0001$). Innerhalb der Aprotiningruppe lag zudem der Score bei Salzrestriktion im Vergleich zur Kontrolldiät höher ($p = 0,002$) (Abb. 26 B). Zur Beurteilung potenzieller glomerulärer Schäden wurde der GSI Score erhoben. Dieser lag bei den placebo- und aprotininbehandelten Mäusen auf einem niedrigen Niveau. Zwischen der Aprotinin- und der Placebobehandlung ergaben sich diätunabhängige Unterschiede ($p = 0,006$ bzw. $p = 0,02$) (Abb. 26 C).

3.1.5.2 Expression des Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1)

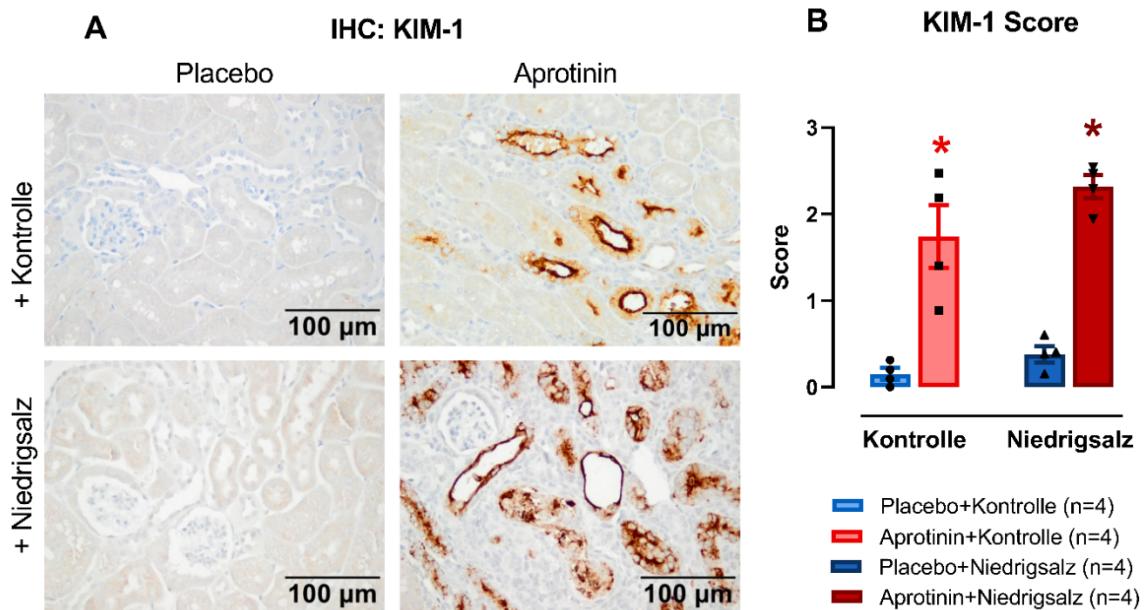


Abb. 27: KIM-1, publiziert in [35].

A: Repräsentative IHC-Schnitte mit Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1) Färbung (braun).

B: KIM-1 Score erhoben gemäß der KIM-1 Färbung in A.

*: $p < 0,05$ zur jew. Placebogruppe.

IHC: Immunhistochemie; n: Fallzahl.

Zur Bestimmung der Lokalisation der festgestellten tubulären Schäden erfolgte eine immunhistochemische KIM-1 Färbung. Die KIM-1 Färbung war bei der Aprotinigruppe sowohl unter Kontroll- als auch noch deutlicher unter Niedrigsalzdiät im Vergleich zur Placebogruppe ausgeprägt (Abb. 27 A). Der daraus bestimmte KIM-1 Score war bei den aprotininbehandelten Mäusen unter Kontroll- ($1,7 \pm 0,4$) bzw. Niedrigsalzdiät ($2,3 \pm 0,1$) im Vergleich zur Placebobehandlung (P+K: $0,2 \pm 0,1$; P+N: $0,4 \pm 0,1$) um das etwa 8,5-fache ($p = 0,001$) bzw. 5,8-fache ($p = 0,0004$) signifikant erhöht (Abb. 27 B).

3.1.5.3 Akkumulation von Aprotinin im Nierengewebe

Zur Beurteilung der Ablagerungen von Aprotinin im Nierengewebe erfolgten immunhistochemische Färbungen auf Aprotinin und elektronenmikroskopische Untersuchungen der proximal tubulären Zellen.

Immunhistochemie

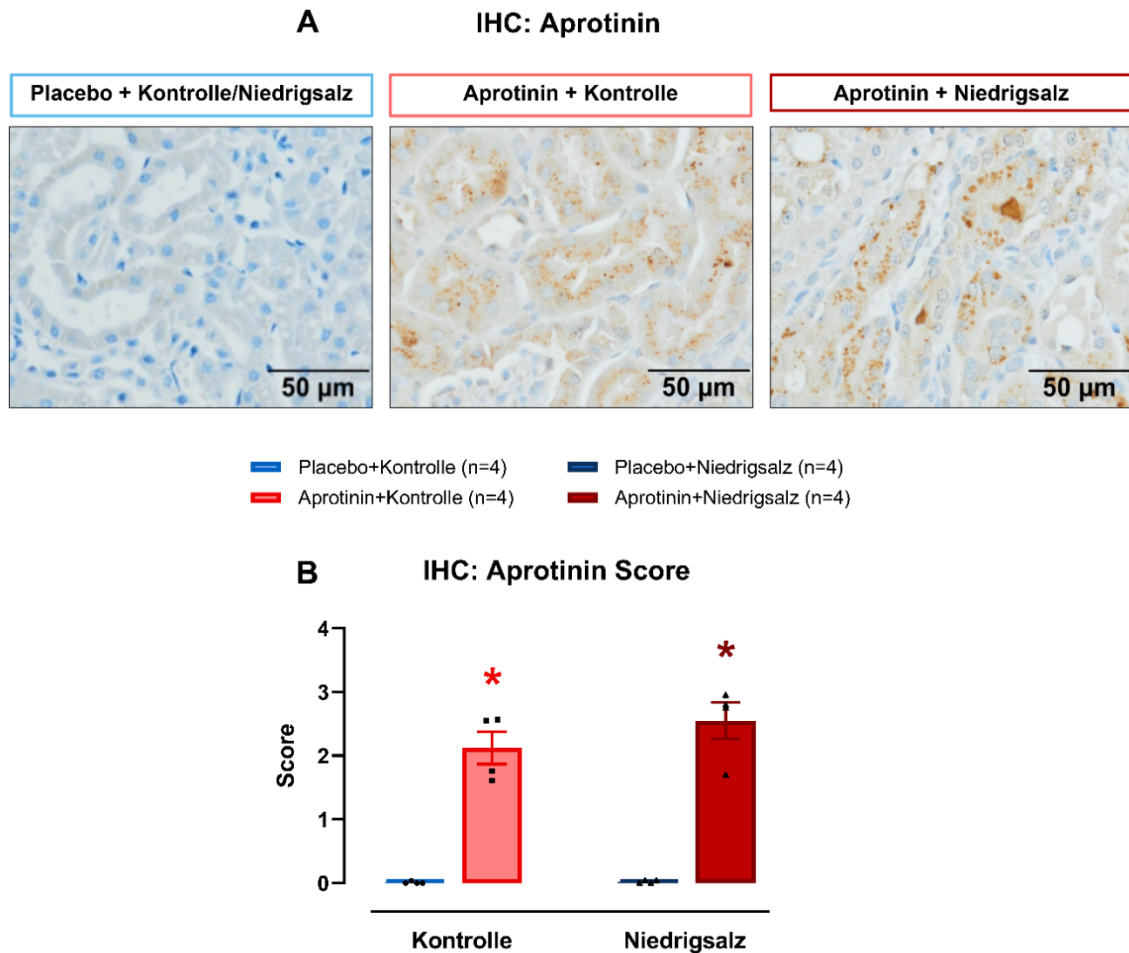


Abb. 28: Akkumulation Aprotinin, Immunhistochemie, publiziert in [35].

A: Repräsentative IHC-Schnitte mit Aprotininfärbung (braun).

B: Aprotinin Score, erhoben gemäß der Aprotininfärbung in A.

*: $p < 0,05$ zur jew. Placebogruppe.

IHC: Immunhistochemie; n: Fallzahl.

Bei der Placebobehandlung konnte erwartungsgemäß immunhistochemisch kein Aprotinin im Nierengewebe nachgewiesen werden. Bei den Aprotinigruppen hingegen wurde Aprotinin unter Kontroll- und in ausgeprägterer Form unter Niedrigsalzdiät immunhistochemisch im proximalen Tubulus nachgewiesen. Hierbei lag eine heterogene Aprotininverteilung in den Nierentubuli vor (Abb. 28 A). Der auf der Grundlage der Färbung bestimmte Aprotinin Score war dementsprechend bei den Aprotinigruppen diätunabhängig im Vergleich zu der Placebobehandlung signifikant erhöht (Abb. 28 B).

Elektronenmikroskopie

Elektronenmikroskopie

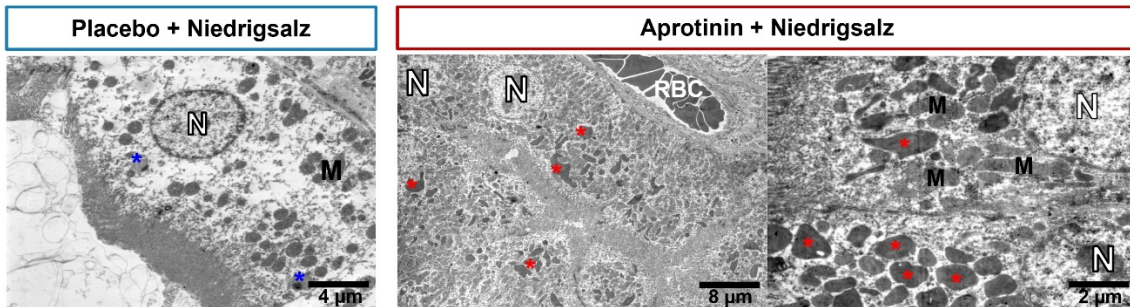


Abb. 29: Akkumulation Aprotinin, Elektronenmikroskopie, publiziert in [35].

Repräsentative elektronenmikroskopische Bilder in verschiedenen Vergrößerungen von renalen proximalen tubulären Zellen von Mäusen, die zusätzlich zu einer Placebo- bzw. Aprotininbehandlung eine salzarme Diät erhielten.

Blaue Sternchen (*): Lysosomen in regelrechter Anzahl und Größe; rote Sternchen (*): Lysosomen deutlich vergrößert und mit elektronendichtem Material gefüllt; N: Nucleus; M: Mitochondrien; RBC: Rote Blutkörperchen.

Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung proximal tubulärer Zellen wiesen letztere in der Placebogruppe (P+N) keine pathologischen Veränderungen auf. Die Lysosomen zeigten sich dabei in regelrechter Anzahl und Größe (Abb. 29, linke Bildseite). Im Gegensatz dazu wiesen die Nieren der Aprotiningruppe (A+N) deutlich vergrößerte und mit elektronendichtem Material gefüllte Lysosomen auf (Abb. 29, rechte Bildseite). Entsprechend zur immunhistochemischen Aprotininfärbung (Abb. 28 A) zeigte die Elektronenmikroskopie ebenfalls eine heterogene Verteilung der pathologischen tubulären Veränderungen.

3.2 Versuch 2: Renale Effekte von Aprotinin unter dem Stressmodell Triamteren-Therapie

Als weiteres Stressmodell wurde bei diesem Studiendesign zusätzlich zur Aprotinin- bzw. Placebobehandlung eine kontinuierliche ENaC-Blockade durch das Verabreichen des Diuretikums Triamteren über das Trinkwasser zur Induktion einer negativen Salzbilanz durchgeführt (siehe 2.2.3.2).

3.2.1 Allgemeine Daten zum Versuchsablauf

3.2.1.1 Körpergewicht

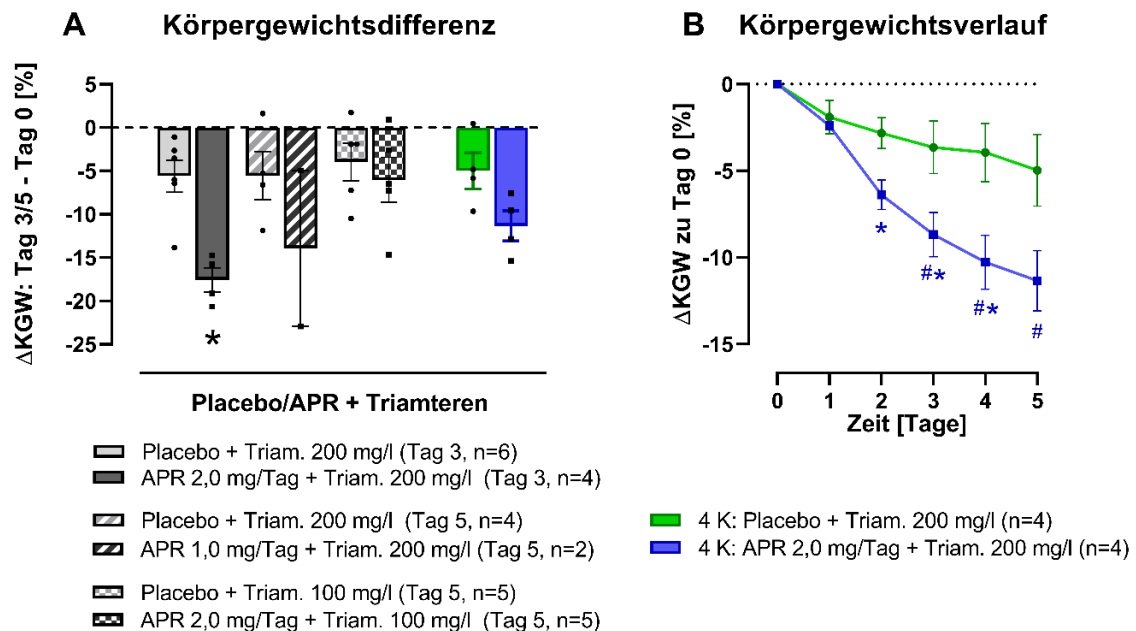


Abb. 30: Aprotinin und Triamteren: Körpergewicht.

A: Dosisfindung: Darstellung der prozentualen Gewichtsänderung [%] an Tag 3/5 (Ende der Serien) jew. in Bezug auf das Ausgangsgewicht an Tag 0.

B: Körpergewichtsverlauf der Mäuse nach der Pelletimplantation (Tag 0), Darstellung der prozentualen Gewichtsänderung [%] jew. in Bezug zum Ausgangsgewicht an Tag 0; Körpergewichtsverlauf in B entspricht der gleichfarbigen Körpergewichtsdifferenz in A.

*: $p < 0,05$ zur jew. Placebogruppe; #: $p < 0,05$ zum Ausgangsgewicht.

Triam.: Triamteren; K: Kontrolltage; Δ KGW: Körpergewichtsdifferenz; APR: Aprotinin; n: Fallzahl; grüne und blaue Balken siehe entsprechender Versuchsablauf im Abschnitt 2.2.3.2.

In Abb. 30 A ist die prozentuale Körpergewichtsdifferenz zwischen dem Ende der jeweiligen Serien (Tag 3/5) und den Ausgangswerten am Tag der Pelletimplantation (Tag 0) dargestellt. Die grauen Balken stehen für die Versuchsgruppen bei der Dosisfindung. Dabei wurden die Aprotinin- und die Triamterendosen gemäß

den Angaben variiert. Insgesamt zeigte sich, dass die Gewichtsabnahme in den Aprotiningruppen stärker ausfiel. Das letztendlich für die Versuchsdurchführung übernommene Studiendesign sah eine viertägige Vorbehandlung der Tiere mit Triamteren 200 mg/l im Trinkwasser vor (siehe 2.2.3.2). Am Ende des Versuchs lag das Körpergewicht der Aprotiningruppe ($-11,3 \pm 1,7 \%$) unter dem mittleren Körpergewicht der Placebogruppe ($-5,0 \pm 2,1 \%$) ($p = 0,057$).

Ab Tag 1 nach Pelletimplantation zeigten sich die Gewichtsverläufe zwischen der Placebo- und Aprotiningruppe divergent. In der Aprotiningruppe kam es zu einer weiteren stetigen Gewichtsabnahme, wobei diese bei der Placebogruppe deutlich geringer ausfiel. Das Gewichtsminimum der placebo- und aprotininbehandelten Tieren lag beide Male am Ende der Serie an Tag 5 (Abb. 30 B).

3.2.1.2 Täglich erhobene Daten

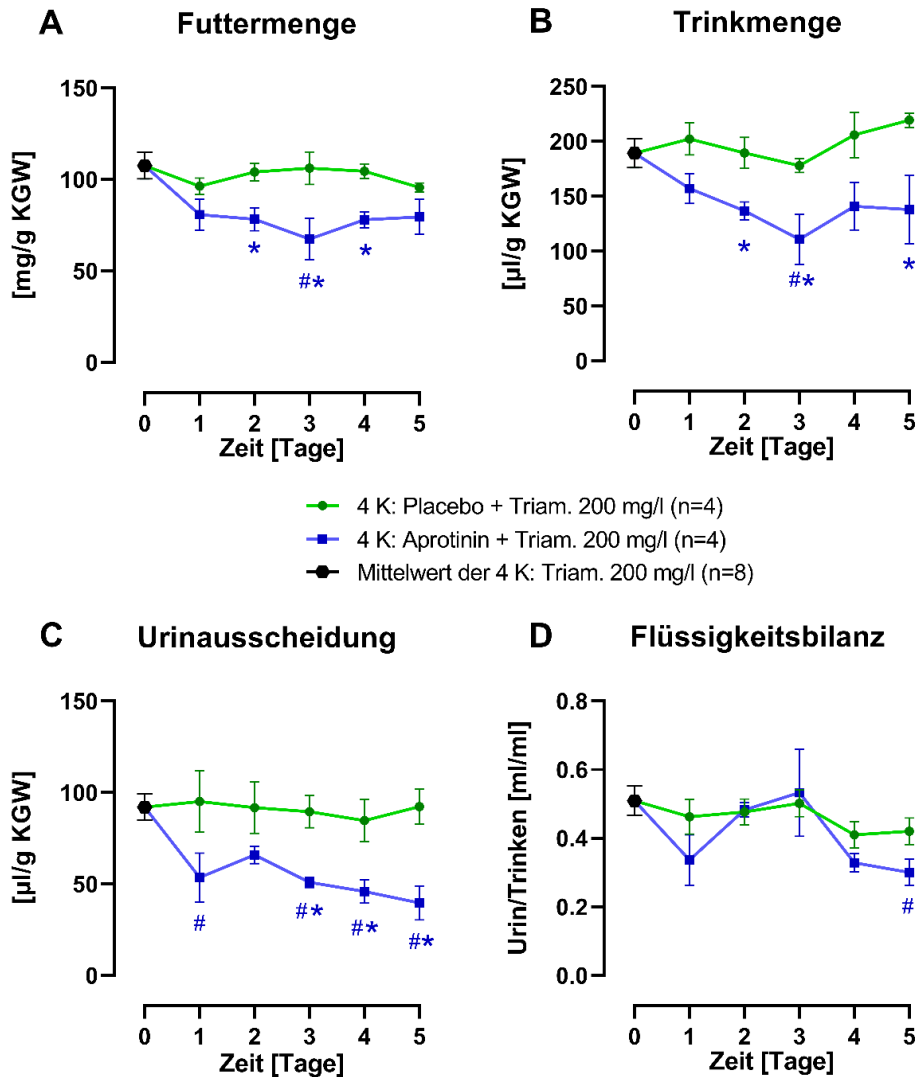


Abb. 31: Aprotinin und Triamteren: Täglich erhobene Daten.

A: Zeitlicher Verlauf der Fressmenge in Bezug auf das jew. Körperschaft [mg/g KGW].
 B: Zeitlicher Verlauf der Trinkmenge in Bezug auf das jew. Körperschaft [µl/g KGW].
 C: Zeitlicher Verlauf der Urinmenge in Bezug auf das jew. Körperschaft [µl/g KGW].
 D: Zeitlicher Verlauf der Flüssigkeitsbilanz. Quotient aus der Urin- und Trinkmenge [ml/ml].
 *: p < 0,05 zur jew. Placebogruppe; #: p < 0,05 zu den jew. Ausgangswerten (Tag 0).
 KGW: Körperschaft; K: Kontrolltage; Triam.: Triamteren; n: Fallzahl.

Die Fressmenge (Abb. 31 A), die Trinkmenge (Abb. 31 B) und die Urinausscheidung (Abb. 31 C) nahm nach der Pelletimplantation bei der Aprotinigruppe ab, wohingegen diese Parameter bei der Placebogruppe über die gesamte Versuchsdauer konstant auf dem Niveau der Ausgangswerte verblieben. Im Gegensatz dazu blieb die Flüssigkeitsbilanz (Abb. 31 D) bei beiden Versuchsgruppen weitgehend unverändert.

3.2.2 Natriumhaushalt und Glomeruläre Filtrationsrate

3.2.2.1 Elektrolyte im Urin, GFR, Aldosteron

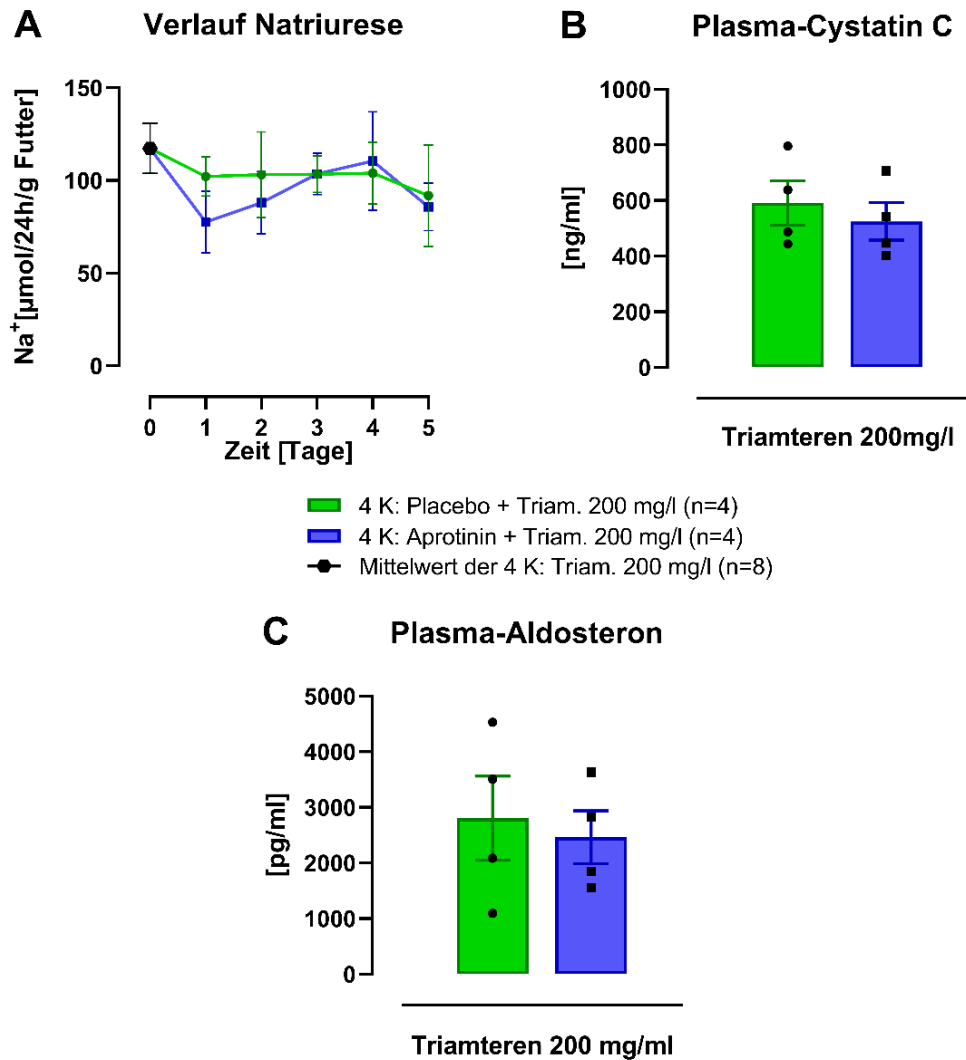


Abb. 32: Aprotinin und Triamteren: Natriuresis, Cystatin C, Aldosteron.

A: Zeitlicher Verlauf der 24-Stunden-Natriuresis bezogen auf die Futtermenge [$\mu\text{mol}/24\text{h}/\text{g}$ Futter].

B: Cystatin C im Plasma [ng/ml] an Tag 5.

C: Aldosteron im Plasma [pg/ml] an Tag 5.

K: Kontrolltage, Na⁺: Natrium, Triam.: Triamteren, h: Stunde(n); n: Fallzahl.

Die 24-Stunden-Natriuresis wurde auf die Fressmenge normiert, um die geringere Futteraufnahme im Rahmen der Triamteren-Therapie zu berücksichtigen. Zwischen den Versuchsgruppen gab es bezüglich der Natriuresis keine wesentlichen Unterschiede (Abb. 32 A). Cystatin C und Harnstoff im Plasma als Surrogatparameter für die GFR unterschieden sich nicht signifikant zwischen den beiden Versuchsgruppen. Die mittleren Cystatin C-Konzentration lag bei der

Placebogruppe bei 591 ± 80 ng/ml und bei der Aprotiningruppe bei 525 ± 67 ng/ml (Abb. 32 B). Dieses Verhältnis zwischen den beiden Versuchsgruppen war mit den Harnstoffkonzentrationen im Plasma vergleichbar (Placebo + Triamteren: 97 ± 36 mg/dl; Aprotinin + Triamteren: 92 ± 28 mg/dl). Die Aldosteronkonzentrationen lagen bei der Placebogruppe (2805 ± 758 pg/ml) und bei der Aprotiningruppe (2465 ± 475 pg/ml) auf ähnlich hohem Niveau (Abb. 32 C).

3.2.3 Proximaler Tubulus - Funktionsmarker

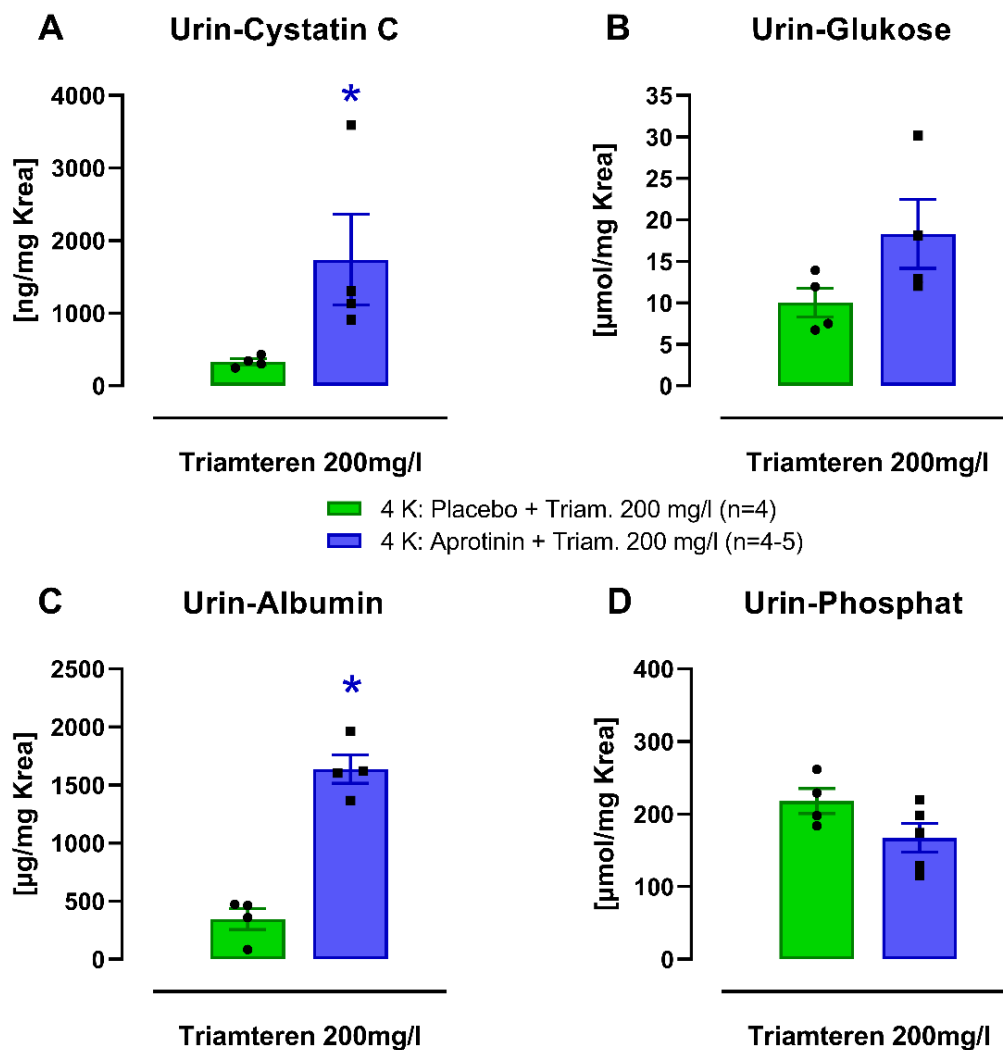


Abb. 33: Aprotinin und Triamteren: Proximaler Tubulus - Funktionsmarker.

A: Cystatin C im Urin an Tag 5 [ng/mg Krea].

B: Glukose im Urin an Tag 5 [µmol/mg Krea].

C: Albumin im Urin an Tag 5 [µg/mg Krea].

D: Phosphat im Urin an Tag 5 [µmol/mg Krea].

*: $p < 0,05$ zur jew. Placebogruppe

K: Kontrolltage, Krea: Kreatinin, Triam.: Triamteren; n: Fallzahl.

Um die Effekte von Aprotinin auch unter der Triamteren-Therapie auf den proximalen Tubulus zu untersuchen, erfolgte auch hier die Bestimmung von proximal tubulären Funktionsmarkern. Entsprechend zu den Messergebnissen bei Versuch 1 war die Cystatin C-Urinausscheidung (Abb. 33 A), die Glukosurie (Abb. 33 B) und die Albuminurie (Abb. 33 C) bei der Aprotinigruppe im Vergleich zur Placebogruppe erhöht. Die Phosphaturie (Abb. 33 D) war wiederum zwischen den Versuchsgruppen nicht wesentlich different.

3.3 Versuch 3: Dosisabhängigkeit von Aprotinin

Die folgenden Ergebnisse beziehen sich auf den in 2.2.3.3 dargestellten Versuchsablauf. Bei diesem Studiendesign wurden den Versuchstieren Aprotininpellets implantiert, die täglich 0,5 mg bzw. 2,0 mg Aprotinin über insgesamt 10 Tagen freisetzen. Als Vergleichsgruppe dienten placebobehandelte Mäuse.

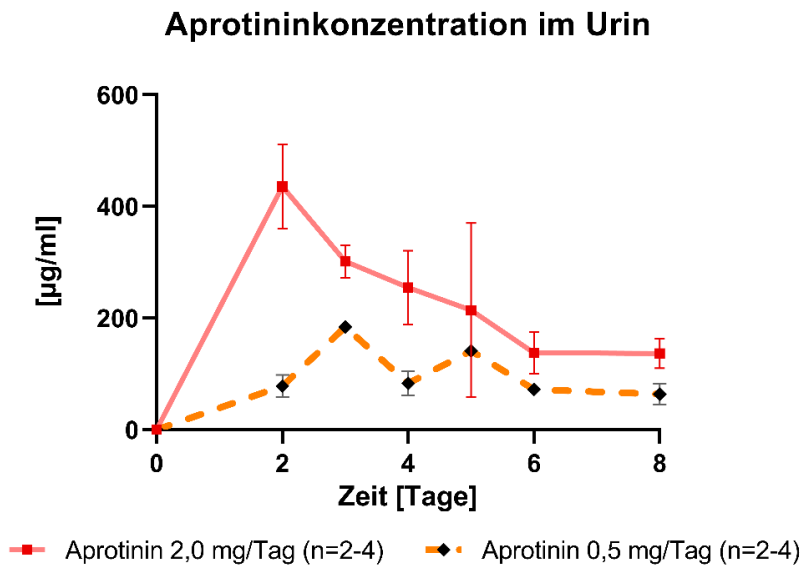


Abb. 34: Dosisabhängigkeit Aprotinin: Aprotinin im Urin, publiziert in [35].

Zeitlicher Verlauf der Aprotininkonzentrationen im Urin [µg/ml] in Abhängigkeit von den zwei verwendeten Aprotinindosierungen (0,5 mg/Tag und 2,0 mg/Tag).
n: Fallzahl.

Die mittlere Aprotininkonzentration (zwischen Tag 2-8) im 24-Stunden-Sammelurin lag bei der Versuchsgruppe mit der Aprotininfreisetzung von 2,0 mg/Tag (244 ± 35 µg/ml) im Vergleich zur Versuchsgruppe mit der Freisetzung von 0,5 mg/Tag (92 ± 11 µg/ml) um das etwa 2,7-fache höher ($p = 0,0001$). Die Konzentrationskurven der beiden Versuchsgruppe schnitten sich dabei nicht (Abb. 34).

3.3.1 Glomeruläre Filtrationsrate und proximaler Tubulus

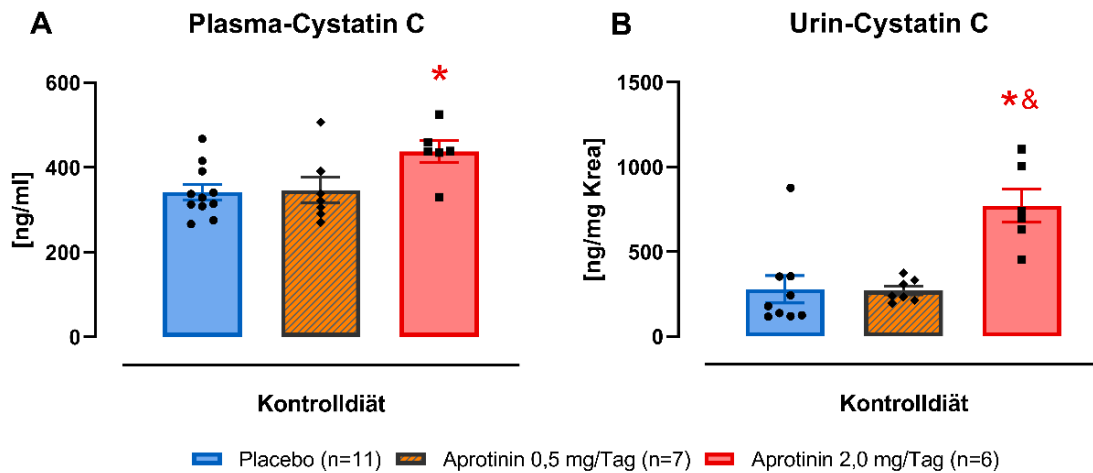


Abb. 35: Dosisabhängigkeit Aprotinin: Cystatin C, publiziert in [35].

A: Plasma-Cystatin C [ng/ml].

B: Urin-Cystatin C bezogen auf Urin-Kreatinin [ng/mg Krea].

*: $p < 0,05$ zur Placebogruppe; &: $p < 0,05$ zur Aprotininbehandlung mit 0,5 mg/Tag.

Krea: Kreatinin; n: Fallzahl.

Die Cystatin C-Werte im Plasma als Surrogatparameter für die GFR lagen bei der Aprotinigruppe mit der Aprotininfreisetzung von 0,5 mg/Tag (346 ± 30 ng/ml) auf dem gleichen Niveau der Werte der Placebogruppe (342 ± 18 ng/ml). Die Plasma-Cystatin C-Konzentrationen der Aprotinigruppe mit der Freisetzung von 2,0 mg/Tag (438 ± 26 ng/ml) waren im Vergleich zur Placebogruppe jedoch signifikant erhöht ($p = 0,03$) (Abb. 35 A).

Die Cystatin C-Konzentrationen im Urin als Funktionsmarker des proximalen Tubulus waren auch hier zwischen der Aprotinigruppe mit der Dosisfreisetzung von 0,5 mg/Tag (271 ± 25 ng/mg Krea) und der Placebogruppe (278 ± 81 ng/mg Krea) nicht different. Im Gegensatz dazu lagen die Werte bei der Versuchsgruppe mit der Aprotininfreisetzung von 2,0 mg/Tag (771 ± 99 ng/mg Krea) sowohl im Vergleich zur Aprotinigruppe mit der Freisetzung von 0,5 mg/Tag als auch zur Placebogruppe um das etwa 2,8-fache höher ($p = 0,0003$ bzw. $p = 0,003$) (Abb. 35 B). Bei den weiteren Funktionsmarkern des proximalen Tubulus (Glukosurie und Albuminurie, nicht dargestellt) gab es ebenfalls zwischen der Gruppe mit der Aprotininfreisetzung von 0,5 mg/Tag und der Placebogruppe keine wesentlichen Unterschiede, wohingegen die Konzentrationen der Aprotinigruppe mit der Freisetzung von 2,0 mg/Tag verglichen mit den beiden anderen Versuchsgruppen

(Aprotinin 0,5 mg/Tag, Placebo) um ein Vielfaches höher lagen. Entsprechend der Ergebnisse bei Versuch 1 und Versuch 2 waren auch bei diesem Versuch die Urin-Phosphatkonzentrationen bei beiden Aprotinigruppen im Vergleich zur Placebogruppe nicht erhöht.

3.3.1.1 Korrelationen

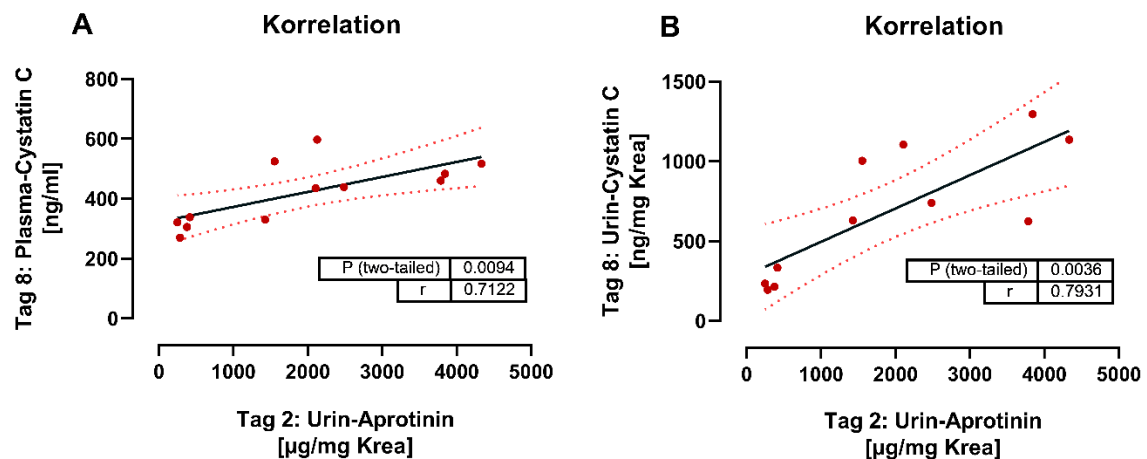


Abb. 36: Dosisabhängigkeit Aprotinin: Korrelationen, publiziert in [35].

A: Korrelation zwischen Plasma-Cystatin C [ng/ml] und Urin-Aprotinin [µg/mg Krea].

B: Korrelation zwischen Urin-Cystatin C [µg/mg Krea] und Urin-Aprotinin [µg/mg Krea].

Korrelationsanalyse: p (two-tailed), r (Pearson); B: Anwendung Ausreißertest nach Grubbs - ein Ausreißer ausgeschlossen ($\alpha = 0,01\%$).

Krea: Kreatinin.

Die Cystatin C-Konzentrationen im Plasma (Tag 8) ($r = 0,71$; $r^2 = 0,51$; $p = 0,009$) und im Urin (Tag 8) ($r = 0,79$; $r^2 = 0,63$; $p = 0,004$) zeigten jeweils signifikante positive Korrelationen mit den Aprotininkonzentrationen im Urin (Tag 2).

3.3.2 Nierenhistologie

3.3.2.1 PAS-Färbung, TSI und GSI Score

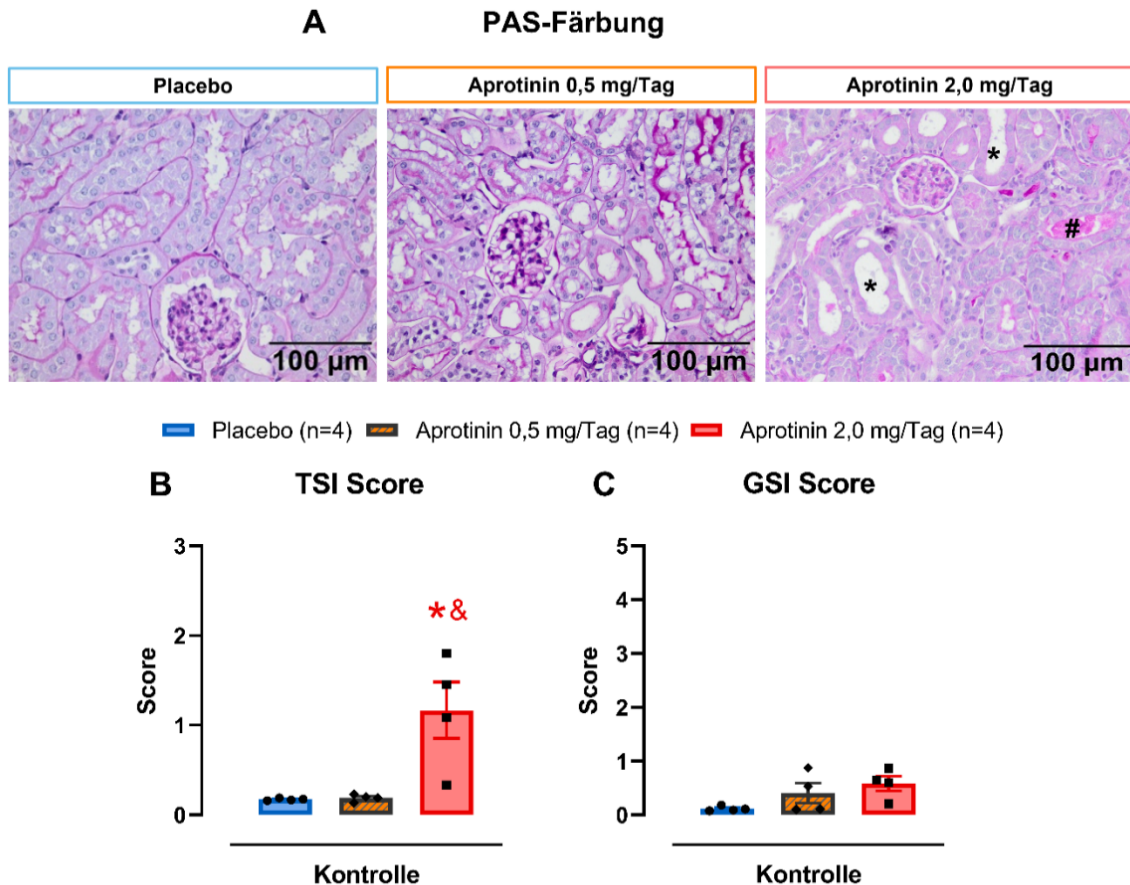


Abb. 37: Dosisabhängigkeit Aprotinin: PAS-Färbung, TSI und GSI Score, publiziert in [35].

A: Repräsentative PAS-Färbungen der an Tag 9 entnommenen Nieren. PAS-Färbungen der Placebo- und Aprotinigruppe mit der Aprotininfreisetzung von 2,0 mg/Tag bereits in Abb. 26 dargestellt.

*: Tubuläre Dilatation und tubuläre Atrophie; #: Tubuläre Zylinder.

B: TSI Score (Tubulointerstitieller Schädigungsindex).

C: GSI Score (Glomerulosklerose-Index).

*: $p < 0,05$ zur Placebogruppe; &: $p < 0,05$ zur Aprotininbehandlung 0,5 mg/Tag.

PAS: Periodic Acid-Schiff; n: Fallzahl.

In der Lichtmikroskopie (PAS-Färbung) wiesen die Nieren der Aprotinigruppe mit der Freisetzung von 0,5 mg/Tag und der Placebogruppe keine renalen histopathologischen Veränderungen auf (Abb. 37 A). Bei der Aprotinigruppe mit der Freisetzung von 2,0 mg/Tag lagen dagegen moderate renale tubulointerstitielle Schäden vor (siehe 3.1.5.1, Abb. 26).

Der TSI Score war bei der Aprotinigruppe mit der Freisetzung von 0,5 mg/Tag wie auch bei der Placebogruppe (siehe 3.1.5.1, Abb. 26), aufgrund der niedrigen Werte kaum bestimmbar. Der Score bei der Aprotinigruppe mit der Freisetzung

von 2,0 mg/Tag war in Bezug auf die beiden anderen Versuchsgruppen jedoch signifikant erhöht (jeweils $p = 0,01$) (Abb. 37 B). Der GSI Score lag bei allen Versuchsgruppen auf einem niedrigen Niveau und war zwischen den Gruppen nicht wesentlich different (Abb. 37 C).

3.3.2.2 Expression des Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1)

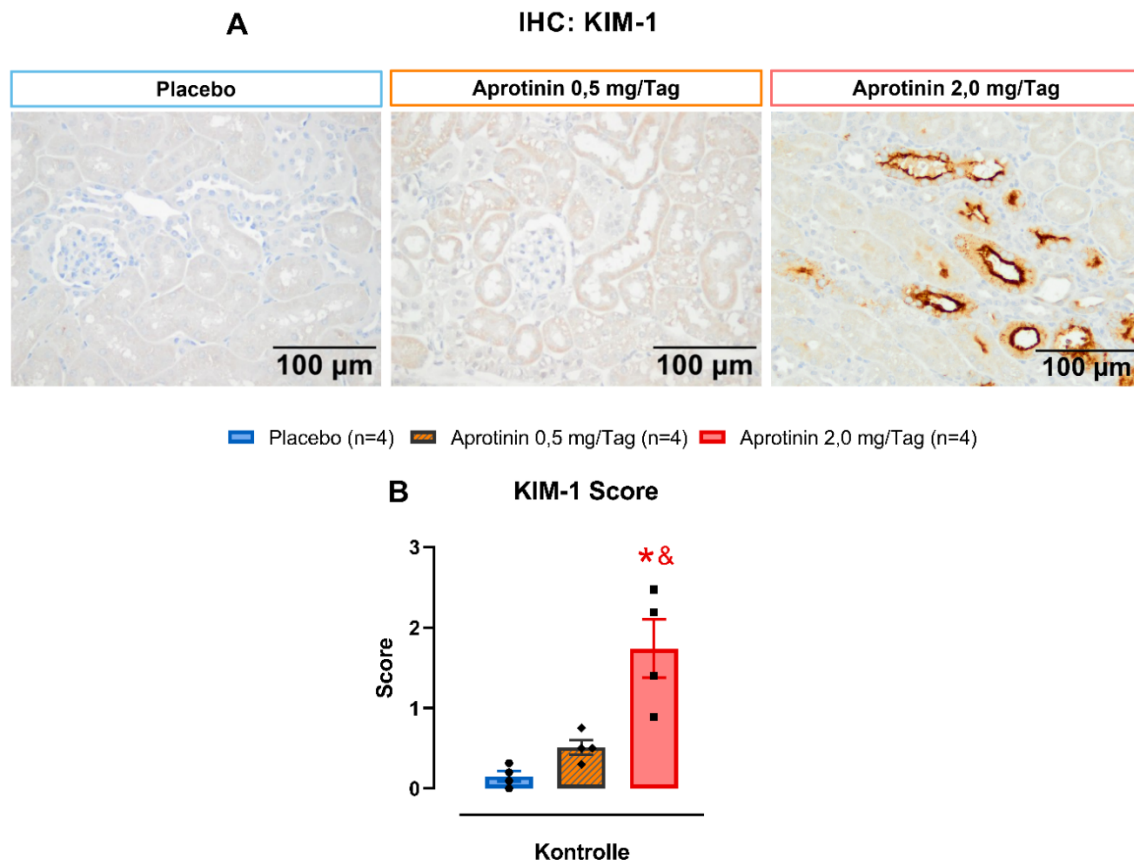


Abb. 38: Dosisabhängigkeit Aprotinin: KIM-1, publiziert in [35].

A: Repräsentative IHC-Schnitte mit Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1) Färbung (braun). IHC-Schnitte der Placebo- und Aprotinigruppe mit der Aprotininfreisetzung von 2,0 mg/Tag bereits in Abb. 27 dargestellt.

B: KIM-1 Score erhoben gemäß der KIM-1 Färbung in A.

*: $p < 0,05$ zur Placebogruppe; &: $p < 0,05$ zur Aprotininbehandlung 0,5 mg/Tag.

IHC: Immunhistochemie; KIM-1: Kidney Injury Molecule-1; n: Fallzahl.

Die immunhistochemische KIM-1 Färbung war bei der Aprotinigruppe mit der Freisetzung von 2,0 mg/Tag im Vergleich zur Gruppe mit der Aprotininfreisetzung von 0,5 mg/Tag bzw. zur Placebogruppe deutlich ausgeprägter (Abb. 38 A). Der daraus bestimmte KIM-1 Score lag bei der Aprotinigruppe mit der niedrigeren Aprotininfreisetzung von 0,5 mg/Tag ($0,5 \pm 0,1$) verglichen mit der Placebogruppe ($0,2 \pm 0,1$) leicht höher. Der KIM-1 Score der Aprotinigruppe mit der Freisetzung

von 2,0 mg/Tag ($1,7 \pm 0,4$) war jedoch in Relation zu der Gruppe mit der Freisetzung von 0,5 mg/Tag und zur Placebogruppe signifikant erhöht ($p = 0,009$ und $p = 0,002$, siehe 3.1.5.2, Abb. 27) (Abb. 38 B).

3.3.2.3 Akkumulation von Aprotinin im Nierengewebe

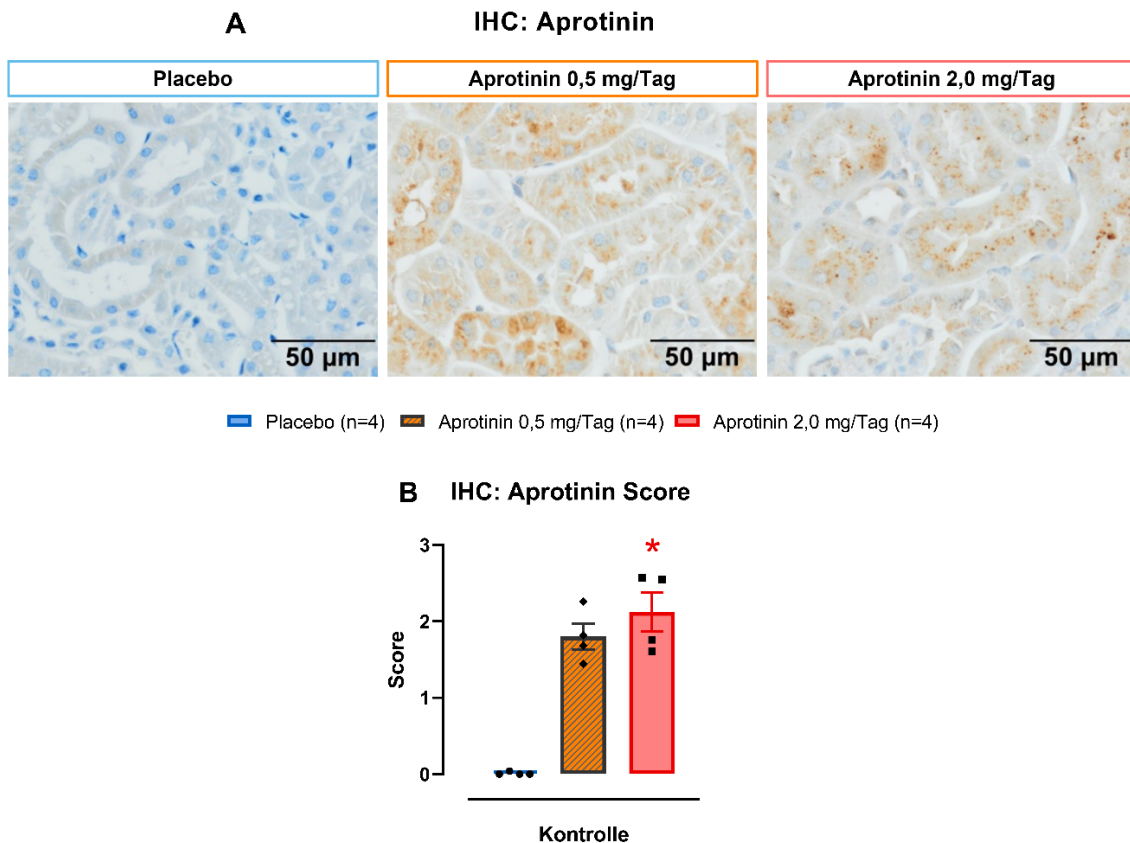


Abb. 39: Dosisabhängigkeit Aprotinin: Akkumulation, publiziert in [35].

A: Repräsentative IHC-Schnitte mit Aprotininfärbung (braun). IHC-Schnitte der Placebo- und Aprotinigruppe mit der Aprotininfreisetzung von 2,0 mg/Tag bereits in Abb. 28 dargestellt.

B: Aprotinin Score, erhoben gemäß der Aprotininfärbung in A.

*: $p < 0,05$ zur Placebogruppe.

IHC: Immunhistochemie; n: Fallzahl.

Immunhistochemisch färbte sich Aprotinin bereits bei der Aprotinigruppe mit der niedrigeren Freisetzung von 0,5 mg/Tag deutlich an (Abb. 39 A). Der anhand der Färbung bestimmte Aprotinin Score lag hierbei ($1,8 \pm 0,2$) verglichen mit der Aprotinigruppe mit der Freisetzung von 2,0 mg/Tag ($2,1 \pm 0,3$) auf ähnlichem Niveau (Abb. 39 B). Elektronenmikroskopische Bilder lagen nur bei der Aprotinigruppe mit der Aprotininfreisetzung von 2,0 mg/Tag (siehe 3.1.5.3, Abb. 29) vor.

3.4 Versuch 4: Langzeiteffekte von Aprotinin

Die folgenden Ergebnisse beziehen sich auf den in 2.2.3.4 dargestellten Versuchsablauf. Um die Langzeiteffekte von Aprotinin auf das Nierengewebe zu untersuchen, wurden zehn Wochen (70 Tage) nach der Aprotininpelletimplantation (60 Tage nach Ende der Aprotininfreisetzung von 2,0 mg/Tag) die Nieren entnommen und auf Schädigungszeichen untersucht.

3.4.1 Nierenhistologie

3.4.1.1 PAS-Färbung, TSI und GSI Score

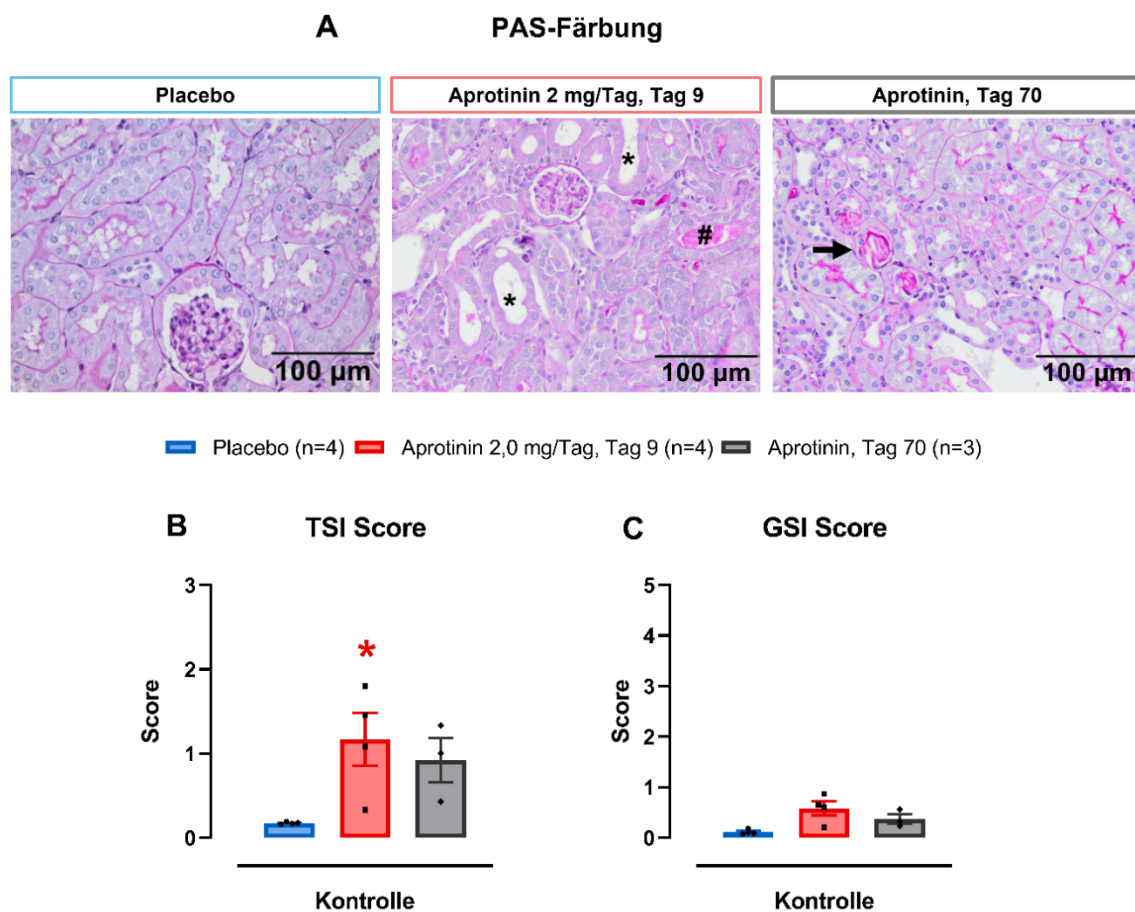


Abb. 40: Langzeiteffekte Aprotinin: PAS-Färbung, TSI und GSI Score, publiziert in [35].

Nierenentnahme an Tag 9 und 70 nach der Pelletimplantation.

A: Repräsentative PAS-Färbungen. PAS-Färbungen der Placebo- und Aprotiniringruppe mit der Aprotininfreisetzung von 2,0 mg/Tag (Tag 9) bereits in Abb. 26 dargestellt.

*: Tubuläre Dilatation und tubuläre Atrophie; #: Tubuläre Zylinder

➔ Fokale tubuläre Schäden mit PAS-positiven Zylindern.

B: TSI Score (Tubulointerstitieller Schädigungsindex).

C: GSI Score (Glomerulosklerose-Index)

*: $p < 0,05$ zur jew. Placebogruppe.

PAS: Periodic Acid-Schiff; n: Fallzahl.

Im Vergleich zu den PAS-Färbungen der an Tag 9 entnommenen Nieren (siehe 3.1.5.1, Abb. 26) fielen an Tag 70 geringere tubulointerstitielle Schäden auf. Allerdings wiesen letztere (Tag 70) nun vereinzelte, heterogen verteilte, schwere fokale tubuläre Schäden mit PAS-positiven luminalen Zylindern auf (Abb. 40 A). Der TSI und der GSI Score waren an Tag 70 (TSI Score: $0,9 \pm 0,3$; GSI Score: $0,4 \pm 0,1$) im Vergleich zu Tag 9 (TSI Score: $1,2 \pm 0,3$; GSI Score: $0,6 \pm 0,1$) auf etwa dem gleichen Niveau. Verglichen mit der Placebogruppe (TSI-Score: $0,17 \pm 0,01$; GSI Score: $0,12 \pm 0,02$) waren die Scores der Aprotinigruppe 70 Tage nach der Pelletimplantation nicht signifikant erhöht (Abb. 40 B, C).

3.4.1.2 Expression des Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1)

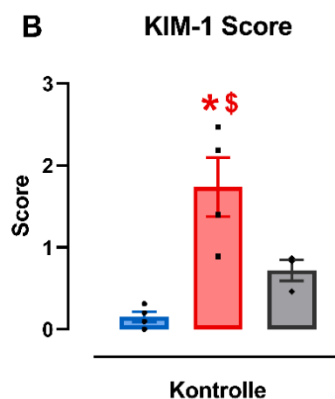
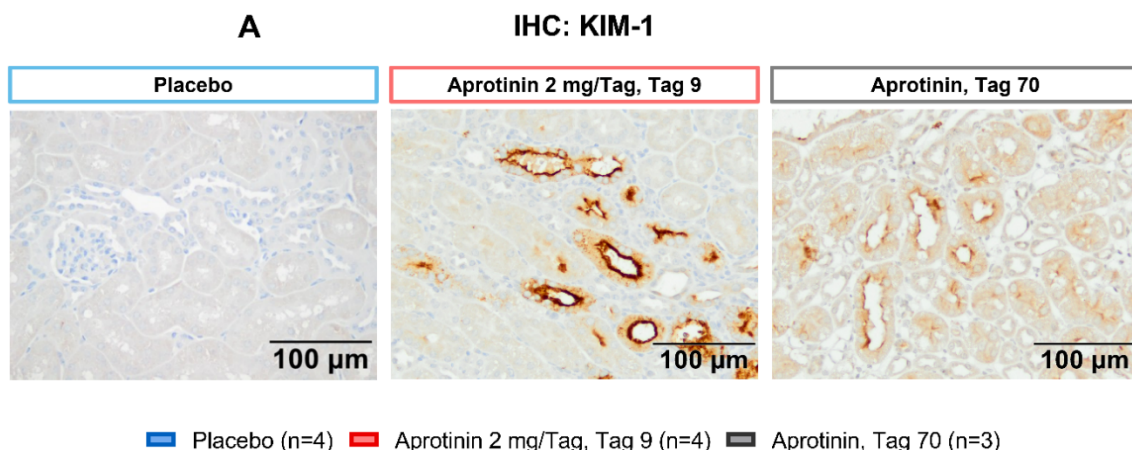


Abb. 41: Langzeiteffekte Aprotinin: KIM-1, publiziert in [35].

Nierenentnahme an Tag 9 und Tag 70 nach der Pelletimplantation.

A: Repräsentative IHC-Schnitte mit Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1) Färbung (braun). IHC-Schnitte der Placebo- und Aprotinigruppe mit der Aprotininfreisetzung von 2,0 mg/Tag (Tag 9) bereits in Abb. 27 dargestellt.

B: KIM-1 Score erhoben gemäß der KIM-1 Färbung in A.

*: $p < 0,05$ zur Placebogruppe; § $p < 0,05$ zur Aprotinigruppe, Tag 70.

IHC: Immunhistochemie; KIM-1: Kidney Injury Molecule-1; n: Fallzahl.

Die immunhistochemische KIM-1 Färbung war bei der Aprotiningruppe an Tag 70 (KIM-1 Score: $0,7 \pm 0,1$) im Vergleich zu Tag 9 (KIM-1 Score: $1,7 \pm 0,4$) geringer ausgeprägt ($p = 0,0497$) (Abb. 41 A, B).

3.4.1.3 Akkumulation von Aprotinin im Nierengewebe

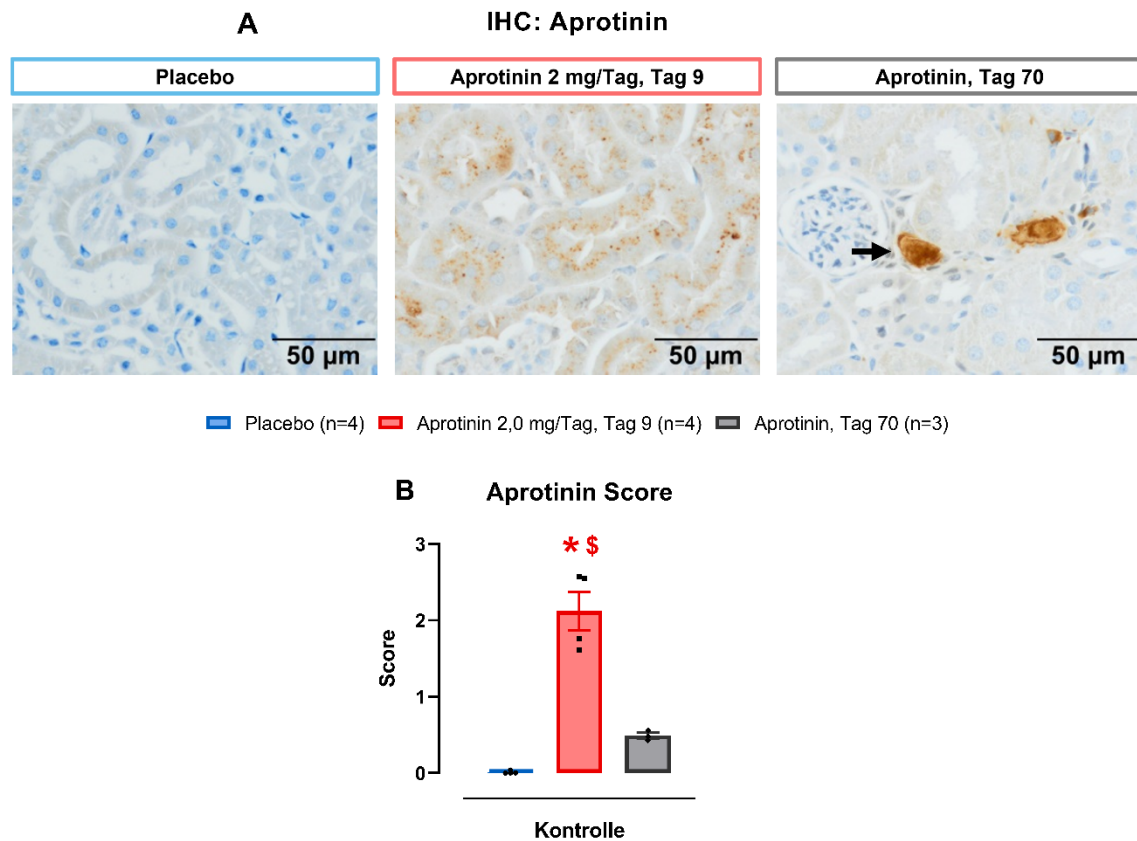


Abb. 42: Langzeiteffekte Aprotinin: Akkumulation, publiziert in [35].

Nierenentnahme an Tag 9 und Tag 70 nach der Pelletimplantation.

A: Repräsentative IHC-Schnitte mit Aprotininfärbung (braun). IHC-Schnitte der Placebo- und Aprotiningruppe mit der Aprotininfreisetzung von 2,0 mg/Tag (Tag 9) bereits in Abb. 28 dargestellt.

➔ Vereinzelt, große fokale Aprotininaggregate.

B: Aprotinin Score, erhoben gemäß der Aprotininfärbung in A.

*: $p < 0,05$ zur Placebogruppe; \$ $p < 0,05$ zur Aprotiningruppe, Tag 70.

IHC: Immunhistochemie; n: Fallzahl.

Die immunhistochemische Färbung auf Aprotinin war bei der Aprotiningruppe an Tag 70 (Aprotinin Score: $0,5 \pm 0,04$) im Vergleich zu Tag 9 (Aprotinin Score: $2,1 \pm 0,3$) geringer ausgeprägt ($p = 0,003$) (Abb. 42 A, B). An Tag 70 zeigten sich dabei allerdings vereinzelt, große fokale, interstitiell gelegene Aprotininaggregate (Abb. 42 A). Die in Abb. 40 nachgewiesenen fokalen tubulären Schäden und die PAS-positiven Zylinder färbten sich ebenfalls positiv auf Aprotinin.

4. Diskussion

Die Studie zu den renalen Effekten von Aprotinin zeigt mehrere und zum Teil auch unerwartete Ergebnisse. Zum einen führt Aprotinin in hohen Dosen am ehesten durch dessen renalen Akkumulation zu deutlichen proximal tubulären Schäden, was mit einer Einschränkung der Nierenfunktion und der GFR einhergeht. Zum anderen führt eine Gabe von Aprotinin wider Erwarten bei gesunden im Gegensatz zu nephrotischen Mäusen zu keiner unmittelbaren ENaC-Inhibition. Vielmehr führen die proximal tubulären Schäden voraussichtlich zu erhöhten intratubulären Natriumkonzentrationen und dadurch zu einer verstärkten ENaC vermittelten Natriumresorption. Daneben sind die Effekte von Aprotinin dosisabhängig und die renalen Schäden zudem auch längerfristig nachweisbar [35].

4.1 Effekte von Aprotinin auf den ENaC und den Salzhaushalt unter Niedrigsalzdiät

Die Prozesse der proteolytischen ENaC-Aktivierung durch Serinproteasen nehmen bereits bei physiologischen Bedingungen eine bedeutende Rolle in der ENaC-Regulation ein [77, 83, 89, 90]. Beispielsweise findet im Rahmen einer Niedrigsalzdiät (siehe Versuch 1) oder einer diuretischen Therapie mit Triamteren (siehe Versuch 2) eine verstärkte proteolytische ENaC Prozessierung statt, sodass von einer gesteigerten Suszeptibilität gegenüber Aprotinin ausgegangen wird [122, 155, 156]. Proteomische Untersuchungen von Urinproben von gesunden Menschen und Mäusen weisen aktive Serinproteasen im Urin nach, wovon ca. 10-25% der Serinproteasen sensitiv auf Aprotinin sind [143, 157]. Entsprechend dazu zeigte sich eine verringerte Gesamt-Proteaseaktivität im Urin unter der Aprotininbehandlung (siehe Abb. 17). Insgesamt war die Proteaseaktivität unter Salzrestriktion tendenziell erhöht, was zu der verstärkten proteolytischen Aktivierung des ENaC bei der Niedrigsalzdiät beitragen könnte (siehe Abb. 24). Passend dazu wird beispielsweise die Serinprotease Proctasin bei Salzrestriktion vermehrt im Urin nachgewiesen [154, 158]. Trotz der geringeren Urin-Proteaseaktivität bei den aprotininbehandelten Mäusen (siehe Abb. 17) zeigen die Ergebnisse, dass eine Aprotininapplikation bei gesunden im Gegensatz zu

nephrotischen Mäusen [119] nicht zu einer Inhibition der proteolytischen ENaC-Aktivierung führt [35].

Die Studie zeigt, dass die Applikation von Aprotinin bei gesunden Mäusen am ehesten in Folge einer proximalen tubulären Schädigung (siehe 4.3) indirekt mit einer kompensatorisch gesteigerten proteolytischen Aktivierung des ENaC einhergeht [35]. Frindt *et al.* [156] zeigten, dass eine Salzrestriktion zu einer verstärkten proximal tubulären Natriumresorption führt. Die aprotinininduzierten proximal tubulären Schäden schränken möglicherweise diese Natriumresorption ein, was voraussichtlich zu einer zwischenzeitlich signifikant erhöhten Natriurese (siehe Abb. 20) und zu einer Körpergewichtsabnahme (siehe Abb. 14) bei Salzrestriktion führte. Die Ergebnisse der Studie legen nahe, dass zum Ausgleich der negativen Salzbilanz Gegenregulationsmechanismen entscheidend sind [35]. Deutlich erhöhte Aldosteronkonzentrationen (siehe Abb. 22) stimulierten dabei die Expression der α - und γ -ENaC Untereinheiten [122, 159, 160]. Zudem wurde gegenregulatorisch die proteolytische Aktivierung der γ -ENaC Untereinheiten verstärkt (siehe Immunhistochemie und Western Blot γ -ENaC, Abb. 23 und Abb. 24) [35]. Die resultierende erhöhte ENaC-Aktivität (siehe Abb. 19) mit gesteigerter Natriumresorption führte mutmaßlich dazu, dass sich die Natriurese bei beiden Versuchsgruppen im Verlauf anglich (siehe Abb. 20) und entsprechend auch das Körpergewicht (siehe Abb. 14) bei der Aprotinigruppe wieder anstieg. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die bei Patienten festgestellten renalen Nebenwirkungen von Aprotinin somit aller Voraussicht nach nicht auf eine aprotininbedingte Inhibition der proteolytischen ENaC-Aktivierung zurückzuführen sind [35].

Die Auswirkungen einer Nidrigsalzdiät bzw. des Mineralokortikoids Aldosteron auf die renale ENaC-Aktivität lassen sich zu zwei unabhängigen Mechanismen mit verschiedenen zeitlichen Verläufen zuordnen [156]:

Einerseits führt eine salzarme Diät und die damit einhergehende Aldosteronausschüttung innerhalb von 24 Stunden neben einer erhöhten Expression der ENaC Untereinheiten und deren verstärkten Transport an die apikale Zellmembran zu einer deutlich zunehmenden proteolytischen Prozessierung der α - und γ -ENaC

Untereinheiten [159-164]. Diese durch Serinproteasen bedingte proteolytische ENaC-Aktivierung korreliert dabei mit einer verstärkten tubulären Natriumrückresorption. Entsprechend dazu war die Natriumexkretion im Urin bei der Placebogruppe am zweiten postoperativen Tag deutlich reduziert (siehe Abb. 20) [35, 159, 161, 162]. Die Analyse der ebenfalls am zweiten postoperativen Tag entnommenen Nieren ergab passend dazu eine deutlich erhöhte Proteolyse der γ -ENaC Untereinheiten, insbesondere bei der Aprotiningruppe unter bestehender Salzrestriktion (Western Blot, siehe Abb. 24) [35]. Diese Ergebnisse stimmen mit Studien von Frindt [155] und Bohnert *et al.* [122] überein, bei denen die γ -ENaC Untereinheiten bei einer Nidrigsalzdiät nahezu vollständig doppelt geschnitten vorlagen, was mit einer hohen ENaC-Offenwahrscheinlichkeit korreliert [83, 96, 165]. Diese dargelegten schnellen Adaptationsmechanismen sind aldosteronabhängig und werden durch Aldosteronantagonisten aufgehoben [122, 155]. Andererseits existieren weitere Mechanismen, die nach etwa 5-7 Tagen bestehender Salzrestriktion relevant werden und ebenfalls eine erhöhte Amiloridsensitive Natriuresis bedingen. Diese weitgehend unklaren Mechanismen scheinen ebenfalls durch Aldosteron vermittelt zu sein, zeigen sich allerdings refraktär im Hinblick auf eine Applikation von Aldosteronantagonisten [155].

4.2 Effekte von Aprotinin auf den ENaC und den Salzhaushalt unter Triamteren-Therapie

Das Stressmodell der pharmakologischen ENaC-Blockade durch eine Triamteren-Applikation (siehe Versuch 2) führte bei den Aprotiningruppen postoperativ zu einer deutlichen Körpergewichtsabnahme (siehe Abb. 30), was durch eine negative Salzbilanz induziert sein könnte. Allerdings wurden in diesem Fall keine relevanten Unterschiede in der Natriuresis zwischen den Versuchsgruppen detektiert (siehe Abb. 32 A). Bohnert *et al.* [122] zeigten, dass eine Triamteren-Therapie mit einer verstärkten Proteolyse der ENaC Untereinheiten als Folge der RAAS-Aktivierung einhergeht [154]. Die stark erhöhten Plasma-Aldosteronkonzentrationen (siehe Abb. 32 C) könnten die diuretische Wirkung bei diesem gewählten Versuchsablauf mit vier Triamteren-Kontrolltagen (siehe Abb. 10) im Verlauf abgeschwächt haben und die fehlenden Differenzen bei der

Natriurese zwischen der Aprotinin- und Placebogruppe erklären. Der initial durchgeführte Versuchsablauf mit dem postoperativen Beginn der Triamteren-Therapie ohne die einleitenden Kontrolltage führte zu einem massiven Körpergewichtsabfall (siehe Abb. 30) mit stark reduzierter Futter- und Flüssigkeitsaufnahme, sodass die Versuche abgebrochen werden mussten. Daraufhin wurde der in Abb. 10 dargestellte Versuchsablauf mit den einleitenden Kontrolltagen gewählt. Hierbei ging die Triamteren-Applikation bei der Aprotinigruppe ebenfalls mit einer reduzierten Futter- und Flüssigkeitsaufnahme (siehe Abb. 31) einher, sodass die Effekte von Aprotinin auf den Salz- und Volumenhaushalt nur eingeschränkt beurteilbar waren. Allerdings scheint die Induktion einer relevanten Hypovolämie bei ausgeglichener Flüssigkeitsbilanz unwahrscheinlich zu sein (siehe Abb. 31 D).

4.3 Effekte von Aprotinin auf den proximalen Tubulus und die GFR

Neben den Untersuchungen der Interaktion von Aprotinin mit dem ENaC lag ein weiterer Fokus auf dem proximalen Tubulus als hauptsächliche Lokalisation der renalen Metabolisierung von Aprotinin [10, 11, 35]. Bei der Studie traten bei den aprotininbehandelten Mäusen unabhängig von der Diät bzw. der Triamteren-Therapie sowohl eine erhöhte Albuminurie, Glucosurie als auch erhöhte Cystatin C-Konzentrationen im Urin am ehesten als Zeichen einer proximal tubulären Schädigung auf. Eine erhöhte Phosphaturie wurde allerdings nicht nachgewiesen (siehe Abb. 25, Abb. 33) [35]. Die überwiegend durch den NaPi IIa Transporter bedingte renale tubuläre Phosphatresorption wird von multiplen zellulären und hormonellen Prozessen reguliert, die eine rasche Anpassung der renalen Phosphatexkretion ermöglichen. Dies stellt einen Gegensatz zu der eher langsamen Anpassung der intestinalen Phosphatresorption dar und könnte die fehlenden Unterschiede in der renalen Phosphatexkretion erklären [30].

Die Zeichen einer proximal tubulären Schädigung im Urin wurden durch histopathologische Untersuchungen der Nieren bestätigt. Die Nieren der Aprotinigruppe zeigten verstärkt bei Salzrestriktion schwerwiegende tubulointerstitielle Schäden (siehe Abb. 26) und eine deutlich erhöhte KIM-1 Expression als

spezifischer Marker einer proximalen tubulären Schädigung (siehe Abb. 27) [35]. Hingegen zeigten sich keine relevanten Schädigungen an glomerulären Strukturen (siehe Abb. 26), sodass die detektierte Proteinurie voraussichtlich auf die histologisch nachgewiesene tubuläre Schädigung zurückzuführen ist. Die freie glomeruläre Filtration einer großen Menge Aprotinin führt am ehesten zur Überlastung der durch Megalin und Cubulin-Rezeptoren bedingten tubulären Resorption von Proteinen, woraus deren vermehrte Ausscheidung resultiert [11, 35, 166, 167]. Einige nephrotoxische Medikamente wie Aminoglykoside [168] werden wie Aprotinin über diese Rezeptoren proximal tubulär endozytiert und lösen renale Schäden aus [21, 24]. Interessanterweise zeigen Studien, dass die Kombination beider Medikamente mit einer Einschränkung der GFR einhergeht, wohingegen die alleinige Anwendung geringere renale Auswirkungen zeigen, was ebenfalls durch die Überlastung der tubulären Resorption erklärt wird [169, 170]. Bei der vorliegenden Studie führte die Aprotininapplikation bei Salzrestriktion im Vergleich zur Kontrolldiät zu einem verstärkten proximal tubulären Schädigungsmuster [35]. Die gesteigerte Toxizität wird bei vergleichbaren nephrotoxischen Substanzen bei Salzrestriktion ebenfalls nachgewiesen [171].

Bisherige Arbeiten weisen leichte, größtenteils reversible Auswirkungen von Aprotinin auf die Nieren nach [11]. Im klaren Gegensatz dazu traten bei der aktuellen Studie schwerwiegende histopathologische Veränderungen auf. Zudem zeigte sich in der Immunhistochemie (siehe Abb. 28) und in der Elektronenmikroskopie (siehe Abb. 29) eine starke Akkumulation von Aprotinin in den pathologisch veränderten Lysosomen im proximalen Tubulus. Proteasen spielen bei diesen Organellen im enzymatischen Abbau von Polypeptiden und Proteinen eine bedeutende Rolle. Es ist naheliegend, dass die Akkumulation des Serinprotease-Inhibitors Aprotinin zu einer Hemmung dieser Proteasen und dementsprechend zu einem lysosomalen Funktionsverlust mit intrazellulärer Akkumulation und Schädigung des proximalen Tubulus führt [35].

Derzeit wird in der klinischen Anwendung von Aprotinin von einem vorübergehenden, signifikanten Anstieg der postoperativen Serum-Kreatininwerte um mehr als $> 0,5$ mg/dl und somit von einer relevanten Reduktion der GFR ausgegangen

[8, 9, 56]. Bei dieser Studie waren die Cystatin C bzw. Harnstoffkonzentrationen im Serum bei den Aprotinigruppen unabhängig von der Diät signifikant erhöht (siehe Abb. 21), was ebenfalls auf Einschränkungen der GFR zurückzuführen ist [35]. Die Ursachen der fehlenden Unterschiede der Nierenretentionsparameter zwischen den placebo- und aprotininbehandelten Mäusen im Rahmen der Triamteren-Therapie bleiben unklar.

Neben den nachgewiesenen proximal tubulären Schäden kann Aprotinin zudem durch die Beeinflussung von multiplen hämodynamischen Prozessen die GFR einschränken. Aprotinin hemmt beispielsweise als Serinprotease-Inhibitor Kallikrein und entsprechend auch die Produkte des Kallikrein-Kinin-Systems. Durch die verringerte Bildung von vasoaktiven Substanzen wie Bradykinine oder Prostaglandine resultiert eine afferente Vasokonstriktion und dadurch eine Reduktion der GFR [10, 11, 172, 173].

Die Studie zeigt, dass die Applikation einer hohen Aprotinindosis bei gesunden Mäusen zu deutlichen proximalen tubulären Schäden und zur Reduktion der GFR führt. Diese induzierten Schäden könnten ursächlich für die erhöhte Inzidenz an Nierenschädigungen in der klinischen Anwendung von Aprotinin sein [35].

4.4 Dosisabhängigkeit und Langzeiteffekte von Aprotinin

Die Surrogatparameter für die GFR und die Schädigung des proximalen Tubulus korrelierten stark positiv mit den Aprotininkonzentrationen im Urin (siehe Abb. 36), was auf eine dosisabhängige Schädigung hinweist [35]. Bemerkenswerterweise akkumulierte Aprotinin bereits bei der niedrigeren Aprotinindosis von 0,5 mg/Tag deutlich im Nierengewebe, was ein nephrotoxisches Potenzial von Aprotinin auch bei geringen Dosen andeutet (siehe Abb. 39). Allerdings wurden bei dieser Dosis keine renalen histopathologischen Schäden und keine erhöhten Nierenretentionsparameter festgestellt (siehe Abb. 37, Abb. 35) [35].

Andere Studien kommen bezüglich der dosisabhängigen renalen Effekte von Aprotinin zu keinem einheitlichen Ergebnis. Einerseits zeigen Studien, dass Aprotinin dosisabhängig zu einem Anstieg der Kreatininkonzentrationen im

Serum führt [25, 174, 175]. Andererseits werden diese dosisabhängigen Effekte bei anderen Studien nicht nachgewiesen [66, 167].

Die Ergebnisse in dieser Studie zeigen hingegen klare dosisabhängige renale Schäden von Aprotinin. Die deutlichen Ergebnisse sind am ehesten auf den Versuchsablauf mit der Aprotininapplikation über mehrere Tage zurückzuführen [35].

60 Tage nach der Aprotininbehandlung (2 mg/Tag) zeigten sich weiterhin deutliche tubuläre Schäden (siehe Abb. 40), die mit fokalen Aprotininablagerungen einhergingen (siehe Abb. 42). Es liegt nahe, dass die lysosomalen Aprotininablagerungen auch langanhaltende proximal tubuläre Schäden bedingen [35]. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die langsame Metabolisierung von Aprotinin zu einem erhöhten Risiko für längerfristige renale Schäden führt und in der klinischen Anwendung von Aprotinin berücksichtigt werden muss. Dabei erhöhen Risikofaktoren die Wahrscheinlichkeit von postoperativen Nierenschädigungen nach der Aprotininapplikation [35]. Studien zeigen, dass vorbestehende Nierenschädigungen mit einer reduzierten Aprotinin-Clearance [6, 26] und dadurch mit einer verlängerten Eliminationshalbwertszeit von Aprotinin einhergehen [56, 176], wodurch Aprotinin verstärkt im Nierengewebe akkumuliert [11, 177]. Dennoch ist in der klinischen Anwendung keine Dosisanpassung von Aprotinin vorgeschrieben [9, 42]. Dies beruhte auf der bisherigen Annahme, dass mögliche aprotininbedingte, postoperative Nierenschädigungen als reversibel und dadurch nicht schwerwiegend galten [9, 11]. Allerdings sollte spätestens nach diesen Studienergebnissen die Anwendung von Aprotinin bei bestehenden Nierenschädigungen kritisch geprüft und ggf. die Dosis angepasst werden [7, 35, 42, 176].

4.5 Effekte von Aprotinin bei gesunden und nephrotischen Mäusen

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass sich die renalen Effekte von Aprotinin bei gesunden und nephrotischen Mäusen unterscheiden [35]. Bohnert *et al.* [119, 122, 125] zeigten, dass Aprotinin beim experimentellen nephrotischen Syndrom die Natriumresorption und die Ödementwicklung durch die Inhibition der Serinproteasen und der proteolytischen Aktivierung des ENaC hemmt. In der

vorliegenden Studie an gesunden Mäusen führt hingegen die Aprotininbehandlung zu keiner ENaC-Inhibition [35].

Die Unterschiede beruhen auf der beim nephrotischen Syndrom vorliegenden großmolekularen Proteinurie bzw. Proteasurie [35, 110, 120]. Analog zu der verstärkten Proteasurie nimmt auch der Anteil aprotininsensitiver Serinproteasen im nephrotischen Urin im Vergleich zum Kontrollurin um ein Vielfaches zu [119, 143]. Allerdings spielt hierbei nicht nur die Quantität, sondern auch die qualitative Zusammensetzung der Proteasurie eine entscheidende Rolle [35, 143, 157, 178]. Beim nephrotischen Syndrom sind die filtrierte löslichen, aprotininsensitiven Serinproteasen vorwiegend dem plasmatischen Koagulations- und Komplementsystem zuzuordnen, wohingegen bei gesunden Mäusen überwiegend niedermolekulare und lokal exprimierte bzw. membrangebundene Serinproteasen vorliegen [35, 110, 143, 179]. Aufgrund der unterschiedlichen Qualität der Serinproteasen ist es naheliegend, dass die proteolytische ENaC-Regulation unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen durch verschiedene Proteasen oder Proteasenkaskaden vermittelt wird. Dies könnte auch die unterschiedlichen Effekte von Aprotinin auf die ENaC-Aktivität bei gesunden und nephrotischen Mäusen erklären [35, 110, 143]. Beispielsweise könnten bei gesunden Mäusen intrazelluläre bzw. membrangebundene Serinproteasen, wie Protsasin [95, 154] oder Matriptase [97] für die ENaC-Regulation entscheidend sein, die entweder aufgrund ihrer Lage oder der zu niedrigen lokalen Aprotininkonzentrationen nicht inhibiert werden [35].

Um die renalen Effekte von Aprotinin bei gesunden und nephrotischen Mäusen in Relation setzen zu können, müssen außerdem die Einflüsse der Proteinurie auf die tubulären Funktionen berücksichtigt werden [35]. Zahlreiche Studien zeigen, dass eine großmolekulare Proteinurie zu einer Überladung der Transportmechanismen der proximal tubulären Polypeptid- bzw. Proteinresorption führt. Die im Primärharn befindlichen großmolekularen Proteine konkurrieren zudem mit niedermolekularen Proteinen wie Aprotinin um die tubuläre Resorption [180-182]. In dieser Konkurrenzsituation und durch die Überladung der Transportmechanismen gelangt vermehrt inhibitorisch wirksames Aprotinin in den

distalen Tubulus in den Bereich des ENaC und wird auch vermehrt im Urin ausgeschieden [35, 181, 183]. Passend dazu war bei der vorliegenden Studie an gesunden Mäusen verglichen mit Studien im Rahmen eines experimentellen nephrotischen Syndroms eine mehr als doppelt so hohe Aprotinindosis notwendig, um vergleichbare Aprotininkonzentrationen im Urin zu erreichen [35, 119, 125]. Beim experimentellen nephrotischen Syndrom führt am ehesten die erhöhte lokale tubuläre Aprotininkonzentration zu einer vermehrten Bindung von Aprotinin an pathologisch filtrierte Serinproteasen und entsprechend zu einer Inhibition der proteolytischen ENaC-Aktivierung [35, 119, 122].

In dieser Arbeit lässt sich eine ENaC-Inhibition bei der Aprotininbehandlung bei gesunden Mäusen nicht feststellen, das nephrotoxische Potenzial von Aprotinin ist jedoch deutlich ersichtlich (siehe 4.3) [35]. Eine mögliche Schlussfolgerung wäre, dass Aprotinin auch beim nephrotischen Syndrom durch induzierte proximal tubuläre Schäden die Natriumresorption und die Ödementwicklung abmildern oder verhindern könnte [35]. Dagegen spricht zum einen, dass Aprotinin und die Proteinurie um die tubuläre Rückresorption konkurrieren, sodass Aprotinin im proximalen Tubulus voraussichtlich im geringeren Umfang resorbiert wird, woraus ein geringeres nephrotoxisches Potenzial resultiert. Zum anderen wurde durch Bohnert *et al.* [122] kürzlich mit Hilfe von Western Blot Untersuchungen die bisherige Annahme bestätigt, dass Aprotinin beim experimentellen nephrotischen Syndrom zu einer Inhibition der proteolytischen ENaC-Aktivierung führt [119, 122]. Dementsprechend können die renalen Effekte von Aprotinin beim experimentellen nephrotischen Syndrom aller Voraussicht nach nicht auf eine alleinige tubuläre Schädigung zurückgeführt werden. Die Differenzierung der Genese tubulärer Schäden im Rahmen des nephrotischen Syndroms ist allerdings nicht trivial, da sowohl Aprotinin als auch bereits die alleinige Proteinurie zu tubulointerstitiellen Schäden führen [35, 178, 184-187].

4.6 Methoden

Die Haltung der Mäuse in metabolischen Käfigen (siehe Abb. 6) während der Versuche stellt das beste zur Verfügung stehende Verfahren zur Flüssigkeitsbilanzierung dar und wurde bereits mehrfach in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Artunc durchgeführt [154, 188-191]. Wegen der gastralen Inaktivierung und der kurzen Halbwertszeit von Aprotinin ist eine parenterale Applikation mit kontinuierlicher Freisetzungskinetik notwendig, was beim Menschen durch eine dauerhafte intravenöse Perfusorapplikation erreicht wird [9, 19, 22, 23, 35]. Im Gegensatz zu Tierstudien, die eine solche Medikamentenapplikation nur mit einer dauerhaften Narkose als relevante Störvariable erreichten [35, 173], wurden die Mäuse bei dieser Studie durch die kleinen operativen Eingriffe im Rahmen der Pelletimplantationen (siehe Abb. 7) nicht stark beeinträchtigt [35]. Dies spiegelte sich in der konstanten Trink- und Futtermenge der Placebogruppen am postoperativen Tag als auch im Verlauf wider (Abb. 15, Abb. 31). Der Verlauf der Aprotininkonzentrationen im Urin in dieser Studie (siehe Abb. 16) war mit denen der bisherigen Studien im Rahmen des experimentellen nephrotischen Syndroms vergleichbar [35, 119, 120, 125, 192]. Eine Stärke dieser Studie stellt die kontinuierliche Aprotininfreisetzung über mehrere Tage dar, wodurch eine dezidierte Untersuchung der renalen Effekte von Aprotinin möglich wird [35].

4.7 Ausblick

Die Sicherheitsbedenken von Aprotinin führten zu einer jahrzehntelangen Kontroverse, die sich aufgrund des nun eindeutig nachgewiesenen nephrotoxischen Potenzials fortsetzen und gegebenenfalls neu entfachen wird. Sofern Aprotinin dennoch weiterhin therapeutisch eingesetzt wird, sollte in Zukunft der Fokus auf der Bestimmung von renalen Risikofaktoren und von Kontraindikationen liegen, um durch Dosisreduktionen und prophylaktischen Maßnahmen das Risiko für renale Nebenwirkungen zu verringern. Zur Bestimmung dieser Risikofaktoren, wie beispielsweise vorbestehende Nierenschädigungen oder Komedikationen mit Diuretika, RAAS-Inhibitoren oder nephrotoxischen Substanzen sollten weitere *in vivo* Untersuchungen durchgeführt werden.

Aufgrund der nephrotoxischen Nebenwirkungen ist die klinische Anwendung von Aprotinin beim nephrotischen Syndrom, trotz des eindrücklichen Nachweises der ENaC-Inhibition und der Verhinderung der Ödementstehung beim nephrotischen Mausmodell, schwierig umzusetzen. Um mögliche aprotininbedingte tubuläre Schäden auch beim nephrotischen Syndrom und Auswirkungen der Proteinurie auf die pharmakokinetischen Eigenschaften von Aprotinin beurteilen zu können, sind weitere Untersuchungen an nephrotischen Mäusen notwendig.

Darüber hinaus sollte das Hauptaugenmerk auf der Identifizierung der essenziellen Proteasen bzw. Proteasenkaskaden für die proteolytische ENaC-Aktivierung sowohl unter physiologischen als auch pathophysiologischen Bedingungen liegen. Durch Knock-out Mausmodelle werden bestimmte ausgewählte Proteasen nicht exprimiert, sodass deren Einfluss auf die ENaC-Aktivierung *in vivo* beurteilt werden kann. Auf diese Weise könnten zukünftig maßgeschneiderte, spezifische Inhibitoren von einzelnen essenziellen Serinproteasen entwickelt werden. Der große Vorteil hierbei wäre eine Reduktion von Nebenwirkungen, die bei unspezifischen Serinprotease-Inhibitoren wie beispielsweise Aprotinin auftreten. Diese Beeinflussung der Proteasurie könnte in Zukunft eine wichtige therapeutische Strategie nicht nur beim nephrotischen Syndrom, sondern auch bei weiteren Erkrankungen, die mit einer erhöhten Proteasurie einhergehen, darstellen.

5. Zusammenfassung

Der Serinprotease-Inhibitor Aprotinin wird in der Herzchirurgie als Antifibrinolytikum eingesetzt und wurde zwischenzeitlich unter anderem wegen renalen Nebenwirkungen vom Markt genommen. Im nephrotischen Mausmodell wurde gezeigt, dass Aprotinin die proteolytische Aktivierung des ENaC und dadurch die Natriumresorption und die Ödementstehung hemmt.

In dieser Studie wurde untersucht, ob die renalen Nebenwirkungen von Aprotinin auch bei gesunden Mäusen auf die ENaC-Inhibition zurückzuführen sind. Außerdem sollte geklärt werden, ob die fast vollständige renale Metabolisierung von Aprotinin zu relevanten Schäden im proximalen Tubulus führt. Die Versuchstiere wurden nach den subkutanen Aprotinin- und Placebopelletimplantationen in metabolischen Käfigen gehalten. Dies ermöglichte die Untersuchung der renalen Effekte von Aprotinin unter den Stressmodellen der Niedrigsalzdiät und der medikamentösen ENaC-Blockade mit Triamteren.

Diese Arbeit zeigt, dass eine hochdosierte Therapie mit Aprotinin bei gesunden Mäusen mit deutlichen proximal tubulären Schäden und Nierenfunktionsstörungen einhergeht. Es liegt nahe, dass die Schädigungsmuster durch die nachgewiesene proximal tubuläre Akkumulation von Aprotinin induziert werden. Aprotinin führt bei gesunden Mäusen im Gegensatz zu der initialen Hypothese nicht zu einer ENaC-Inhibition, sondern am ehesten bedingt durch die proximal tubulären Schäden zu einer verstärkten ENaC vermittelten Natriumresorption. Die nephrotoxischen Effekte von Aprotinin sind dabei dosisabhängig und werden noch 60 Tage nach Ende der Aprotininfreisetzung nachgewiesen.

Die Ergebnisse dieser Studie bieten eine mögliche Erklärung für die erhöhte Inzidenz an Nierenschädigungen im Rahmen der Therapie mit Aprotinin. Im Falle einer fortgesetzten klinischen Anwendung sollte das nachgewiesene nephrotoxische Potenzial von Aprotinin unbedingt beachtet und weitere renale Risikofaktoren und Kontraindikationen definiert werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Kraut, H., E.K. Frey, and E. Werle, Über die Inaktivierung des Kallikreins. (VI. Mitteilung über dieses Kreislaufhormon.). *Biological Chemistry*, 1930. **192**(1-3): p. 1-21.
2. Kunitz, M. and J.H. Northrop, ISOLATION FROM BEEF PANCREAS OF CRYSTALLINE TRYPSINOGEN, TRYPSIN, A TRYPSIN INHIBITOR, AND AN INHIBITOR-TRYPSIN COMPOUND. *The Journal of general physiology*, 1936. **19**(6): p. 991-1007.
3. Fritz, H. and G. Wunderer, Biochemistry and applications of Aprotinin, the kallikrein inhibitor from bovine organs. *Arzneimittel-Forschung*, 1985: p. 479-494.
4. Gerstein, N.S., et al., Antifibrinolytic Agents in Cardiac and Noncardiac Surgery: A Comprehensive Overview and Update. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 2017. **31**(6): p. 2183-2205.
5. Henry, D.A., et al., Anti-fibrinolytic use for minimising perioperative allogeneic blood transfusion. *Cochrane database of systematic reviews*, 2011(3).
6. Aggarwal, N.K. and A. Subramanian, Antifibrinolytics and cardiac surgery: The past, the present, and the future. *Annals of Cardiac Anaesthesia*, 2020. **23**(2): p. 193.
7. Lyseng-Williamson, K.A., Aprotinin in adults at high risk of major blood loss during isolated CABG with cardiopulmonary bypass: a profile of its use in the EU. *Drugs & Therapy Perspectives*, 2020. **36**(1): p. 1-11.
8. Agency, E.M. Assessment report: Antifibrinolytics containing aprotinin, aminocaproic acid and tranexamic acid. [PDF] 2013 [cited 2020 17.10.]; Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/assessment-report-antifibrinolytic-medicines-aprotinin_en.pdf.
9. Nordic, G.P. Fachinformation Trasylo^l. 2015 [cited 2020 17.11.]; Available from: <https://www.nordicpharma.de/wp-content/uploads/sites/8/2018/03/Trasylo-05-Fachinformation-DE.pdf>.
10. Vio, C.P., et al., Cellular Distribution of Exogenous Aprotinin in the Rat Kidney. *Biological Chemistry*, 1998. **379**(10): p. 1271.
11. Bosman, M. and D. Royston, Aprotinin and renal dysfunction. *Expert Opin Drug Saf*, 2008. **7**(6): p. 663-77.
12. MEROPS. Peptidases for inhibitor I02.001: aprotinin. 2020 Sept 25th, 2020]; Available from: <https://www.ebi.ac.uk/merops/cgi-bin/inhibitors.pl?id=I02.001>.
13. Mannucci, P.M., Hemostatic drugs. *New England Journal of Medicine*, 1998. **339**(4): p. 245-253.
14. Mojci^k, C.F. and J.H. Levy, Aprotinin and the systemic inflammatory response after cardiopulmonary bypass. *The Annals of thoracic surgery*, 2001. **71**(2): p. 745-754.
15. Landis, R.C., et al., The antithrombotic and antiinflammatory mechanisms of action of aprotinin. *The Annals of thoracic surgery*, 2001. **72**(6): p. 2169-2175.
16. Sedrakyan, A., T. Treasure, and J.A. Elefteriades, Effect of aprotinin on clinical outcomes in coronary artery bypass graft surgery: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, 2004. **128**(3): p. 442-448.
17. Frumento, R.J., C.M. O'Malley, and E. Bennett-Guerrero, Stroke after cardiac surgery: a retrospective analysis of the effect of aprotinin dosing regimens. *The Annals of thoracic surgery*, 2003. **75**(2): p. 479-483.
18. van Oeveren, W., et al., Effects of aprotinin on hemostatic mechanisms during cardiopulmonary bypass. *The Annals of thoracic surgery*, 1987. **44**(6): p. 640-645.
19. Davis, R. and R. Whittington, Aprotinin. *Drugs*, 1995. **49**(6): p. 954-983.

20. Singbartl, G., et al., Antifibrinolytika–Tranexamsäure und Aprotinin, in Transfusionsassoziierte Pharmakotherapie. 2016, Springer. p. 71-170.
21. Royston, D., The current place of aprotinin in the management of bleeding. *Anaesthesia*, 2015. **70**: p. 46-e17.
22. Peters, D.C. and S. Noble, Aprotinin. *Drugs*, 1999. **57**(2): p. 233-260.
23. Kaller, H., et al., Pharmacokinetic observations following intravenous administration of radioactive labelled aprotinin in volunteers. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 1978. **3**(2): p. 79-85.
24. Moestrup, S.K., et al., Evidence that epithelial glycoprotein 330/megalin mediates uptake of polybasic drugs. *The Journal of clinical investigation*, 1995. **96**(3): p. 1404-1413.
25. Mangano, D.T., I.C. Tudor, and C. Dietzel, The risk associated with aprotinin in cardiac surgery. *N Engl J Med*, 2006. **354**(4): p. 353-65.
26. Bianchi, C., et al., 99m Tc-aprotinin: A new tracer for kidney morphology and function. *European journal of nuclear medicine*, 1984. **9**(6): p. 257-260.
27. Bleich, M. and F. Lang, Tubulärer Transport, in *Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie*, R. Brandes, F. Lang, and R.F. Schmidt, Editors. 2019, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 406-419.
28. Silbernagl, S., Aktive Na⁺-Resorption und die Folgen, in *Physiologie*, H.-C. Pape, A. Kurtz, and S. Silbernagl, Editors. 2019, Georg Thieme Verlag KG.
29. Wood, I.S. and P. Trayhurn, Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *British Journal of Nutrition*, 2003. **89**(1): p. 3-9.
30. Murer, H., et al., Proximal tubular phosphate reabsorption: molecular mechanisms. *Physiological reviews*, 2000. **80**(4): p. 1373-1409.
31. Silbernagl, S., Tubulärer Transport organischer Stoffe, in *Physiologie*, H.-C. Pape, A. Kurtz, and S. Silbernagl, Editors. 2019, Georg Thieme Verlag KG.
32. Kaseda, R., et al., Megalin-mediated endocytosis of cystatin C in proximal tubule cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 2007. **357**(4): p. 1130-1134.
33. Christensen, E.I., et al., Endocytic receptors in the renal proximal tubule. *Physiology*, 2012. **27**(4): p. 223-236.
34. Christensen, E.I., P.J. Verroust, and R. Nielsen, Receptor-mediated endocytosis in renal proximal tubule. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 2009. **458**(6): p. 1039-1048.
35. Wörner, S., et al., Renal effects of the serine protease inhibitor aprotinin in healthy conscious mice. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2022. **43**(1): p. 111-120.
36. Verstraete, M., Clinical application of inhibitors of fibrinolysis. *Drugs*, 1985. **29**(3): p. 236-261.
37. Royston, D., et al., EFFECT OF APROTININ ON NEED FOR BLOOD TRANSFUSION AFTER REPEAT OPEN-HEART SURGERY. *The Lancet*, 1987. **330**(8571): p. 1289-1291.
38. McMullan, V. and R.P. Alston, III. Aprotinin and cardiac surgery: a sorry tale of evidence misused. *British Journal of Anaesthesia*, 2013. **110**(5): p. 675-678.
39. Samama, C.M., et al., Aprotinin versus placebo in major orthopedic surgery: a randomized, double-blinded, dose-ranging study. *Anesthesia & Analgesia*, 2002. **95**(2): p. 287-293.
40. Porte, R.J., et al., Aprotinin and transfusion requirements in orthotopic liver transplantation: a multicentre randomised double-blind study. *Lancet (London, England)*, 2000. **355**(9212): p. 1303-1309.
41. Mössinger, H., et al., High-dose aprotinin reduces activation of hemostasis, allogeneic blood requirement, and duration of postoperative ventilation in pediatric cardiac surgery. *The Annals of thoracic surgery*, 2003. **75**(2): p. 430-437.

42. De Hert, S., et al., Aprotinin: is it time to reconsider? *European journal of anaesthesiology*, 2015. **32**(9): p. 591-595.
43. Pagano, D., et al., 2017 EACTS/EACTA Guidelines on patient blood management for adult cardiac surgery. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 2017. **53**(1): p. 79-111.
44. Ferraris, V.A., et al., Perioperative Blood Transfusion and Blood Conservation in Cardiac Surgery: The Society of Thoracic Surgeons and The Society of Cardiovascular Anesthesiologists Clinical Practice Guideline. *The Annals of Thoracic Surgery*, 2007. **83**(5, Supplement): p. S27-S86.
45. Ferraris, V.A., et al., 2011 Update to The Society of Thoracic Surgeons and the Society of Cardiovascular Anesthesiologists Blood Conservation Clinical Practice Guidelines. *The Annals of Thoracic Surgery*, 2011. **91**(3): p. 944-982.
46. Benedetto, U., et al., Safety of perioperative aprotinin administration during isolated coronary artery bypass graft surgery: Insights from the ART (Arterial Revascularization Trial). *Journal of the American Heart Association*, 2018. **7**(5): p. e007570.
47. Howell, N., et al., Putting the record straight on aprotinin as safe and effective: Results from a mixed treatment meta-analysis of trials of aprotinin. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 2013. **145**(1): p. 234-240.
48. Fergusson, D., et al., Randomized controlled trials of aprotinin in cardiac surgery: could clinical equipoise have stopped the bleeding? *Clinical trials*, 2005. **2**(3): p. 218-232.
49. Brown, J.R., N. Birkmeyer, and G.T. O'Connor, Meta-analysis comparing the effectiveness and adverse outcomes of antifibrinolytic agents in cardiac surgery. *Circulation*, 2007. **115**(22): p. 2801-13.
50. Mangano, D.T., et al., Mortality associated with aprotinin during 5 years following coronary artery bypass graft surgery. *Jama*, 2007. **297**(5): p. 471-9.
51. Karkouti, K., et al., A propensity score case-control comparison of aprotinin and tranexamic acid in high-transfusion-risk cardiac surgery. *Transfusion*, 2006. **46**(3): p. 327-338.
52. Shaw, A.D., et al., The Effect of Aprotinin on Outcome after Coronary-Artery Bypass Grafting. *New England Journal of Medicine*, 2008. **358**(8): p. 784-793.
53. Schneeweiss, S., et al., Aprotinin during coronary-artery bypass grafting and risk of death. *New England Journal of Medicine*, 2008. **358**(8): p. 771-783.
54. Olenchock, S.A., Jr., et al., Impact of aprotinin on adverse clinical outcomes and mortality up to 12 years in a registry of 3,337 patients. *Ann Thorac Surg*, 2008. **86**(2): p. 560-6; discussion 566-7.
55. Fergusson, D.A., et al., A Comparison of Aprotinin and Lysine Analogues in High-Risk Cardiac Surgery. *New England Journal of Medicine*, 2008. **358**(22): p. 2319-2331.
56. Royston, D., et al., A special article following the reluctance of aprotinin injection in Europe. *Anaesthesia Critical Care & Pain Medicine*, 2017. **36**(2): p. 97-102.
57. DeAnda Jr, A. and B.D. Spiess, Aprotinin revisited. 2012, Elsevier.
58. Canada, H. Health Canada decision on Trasylol (aprotinin) 2011 03.04.2013 [cited 2020 17.11]; Available from: <https://www.healthycanadians.gc.ca/recall-alert-rappel-avis/hc-sc/2011/13544a-eng.php>.
59. Agency, E.M. European Medicines Agency recommends lifting suspension of aprotinin. 2012 06.11.2013 [cited 2020 18.11.]; Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/news/european-medicines-agency-recommends-lifting-suspension-aprotinin>.
60. Canada, H. Trasylol (aprotinin) – Important New Safety Information – For the Public 2011 03.04.2013 [cited 2020 17.11.]; Available from:

- <https://www.healthycanadians.gc.ca/recall-alert-rappel-avis/hc-sc/2011/14107a-eng.php>.
61. Pharmacovigilance, E.N.o.C.f.P.a. Nordic Aprotinin Patient Registry. 2015 04.08.2020 [cited 2020 07.12.]; Available from: <http://www.encepp.eu/encepp/viewResource.htm?id=27958>.
 62. Royston, D., High-dose aprotinin therapy: a review of the first five years' experience. *Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia*, 1992. **6**(1): p. 76-100.
 63. Coleman, C.I., et al., Evaluating the safety implications of aprotinin use: the Retrospective Evaluation of Aprotinin in Cardio Thoracic Surgery (REACTS). *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 2007. **133**(6): p. 1547-1552.
 64. Jakobsen, C.-J., et al., Use of aprotinin in cardiac surgery: effectiveness and safety in a population-based study. *European journal of cardio-thoracic surgery*, 2009. **36**(5): p. 863-868.
 65. Pagano, D., et al., Bleeding in cardiac surgery: the use of aprotinin does not affect survival. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, 2008. **135**(3): p. 495-502.
 66. Dietrich, W., R. Busley, and A.-L. Boulesteix, Effects of Aprotinin Dosage on Renal Function An Analysis of 8,548 Cardiac Surgical Patients Treated with Different Dosages of Aprotinin. *Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists*, 2008. **108**(2): p. 189-198.
 67. Mangano, C.M., et al., Renal dysfunction after myocardial revascularization: risk factors, adverse outcomes, and hospital resource utilization. *Annals of internal medicine*, 1998. **128**(3): p. 194-203.
 68. Chertow, G.M., et al., Preoperative renal risk stratification. *Circulation*, 1997. **95**(4): p. 878-884.
 69. Kleyman, T.R. and D.C. Eaton, Regulating ENaC's gate. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2020. **318**(1): p. C150-C162.
 70. Kellenberger, S. and L. Schild, International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCl. structure, function, and pharmacology of acid-sensing ion channels and the epithelial Na⁺ channel. *Pharmacological reviews*, 2015. **67**(1): p. 1-35.
 71. Kleyman, T.R., O.B. Kashlan, and R.P. Hughey, Epithelial Na⁺ channel regulation by extracellular and intracellular factors. *Annual review of physiology*, 2018. **80**: p. 263-281.
 72. Kashlan, O.B. and T.R. Kleyman, Epithelial Na⁺ channel regulation by cytoplasmic and extracellular factors. *Experimental cell research*, 2012. **318**(9): p. 1011-1019.
 73. Nesterov, V., et al., Aldosterone-dependent and-independent regulation of the epithelial sodium channel (ENaC) in mouse distal nephron. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 2012. **303**(9): p. F1289-F1299.
 74. Schild, L., The epithelial sodium channel and the control of sodium balance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 2010. **1802**(12): p. 1159-1165.
 75. Vinciguerra, M., et al. Hormonal and nonhormonal mechanisms of regulation of the NA, K-pump in collecting duct principal cells. in *Seminars in nephrology*. 2005. Elsevier.
 76. Palmer, L.G., A. Patel, and G. Frindt, Regulation and dysregulation of epithelial Na⁺ channels. *Clinical and experimental nephrology*, 2012. **16**(1): p. 35-43.
 77. Svenningsen, P., et al., Physiological regulation of epithelial sodium channel by proteolysis. *Current opinion in nephrology and hypertension*, 2011. **20**(5): p. 529-533.
 78. Rossier, B.C., O. Staub, and E. Hummler, Genetic dissection of sodium and potassium transport along the aldosterone-sensitive distal nephron: importance in

- the control of blood pressure and hypertension. *FEBS letters*, 2013. **587**(13): p. 1929-1941.
79. Noreng, S., et al., Structure of the human epithelial sodium channel by cryo-electron microscopy. *Elife*, 2018. **7**: p. e39340.
 80. Canessa, C.M., et al., Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits. *Nature*, 1994. **367**(6462): p. 463-467.
 81. Hanukoglu, I. and A. Hanukoglu, Epithelial sodium channel (ENaC) family: phylogeny, structure–function, tissue distribution, and associated inherited diseases. *Gene*, 2016. **579**(2): p. 95-132.
 82. Kashlan, O.B. and T.R. Kleyman, ENaC structure and function in the wake of a resolved structure of a family member. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 2011. **301**(4): p. F684-F696.
 83. Kleyman, T.R., M.D. Carattino, and R.P. Hughey, ENaC at the cutting edge: regulation of epithelial sodium channels by proteases. *Journal of Biological Chemistry*, 2009. **284**(31): p. 20447-20451.
 84. Svenningsen, P., et al., Mechanisms of renal NaCl retention in proteinuric disease. *Acta Physiologica*, 2013. **207**(3): p. 536-545.
 85. Butterworth, M.B., et al., Regulation of the epithelial sodium channel by membrane trafficking. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 2009. **296**(1): p. F10-F24.
 86. Palmer, L.G. and G. Frindt, Regulation of epithelial Na channels by aldosterone. change, 2016. **20**: p. 21.
 87. Snyder, P.M., Minireview: regulation of epithelial Na⁺ channel trafficking. *Endocrinology*, 2005. **146**(12): p. 5079-5085.
 88. Vallet, V., et al., An epithelial serine protease activates the amiloride-sensitive sodium channel. *Nature*, 1997. **389**(6651): p. 607-610.
 89. Svenningsen, P., et al., Urinary serine proteases and activation of ENaC in kidney implications for physiological renal salt handling and hypertensive disorders with albuminuria. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 2015. **467**(3): p. 531-542.
 90. Hughey, R.P., M.D. Carattino, and T.R. Kleyman, Role of proteolysis in the activation of epithelial sodium channels. *Current opinion in nephrology and hypertension*, 2007. **16**(5): p. 444-450.
 91. Hamm, L.L., Z. Feng, and K.S. Hering-Smith, Regulation of sodium transport by ENaC in the kidney. *Current opinion in nephrology and hypertension*, 2010. **19**(1): p. 98.
 92. Hughey, R., et al., Maturation of the epithelial Na⁺ channel involves proteolytic processing of the alpha-and gamma-subunits. *The Journal of biological chemistry*, 2003. **278**(39): p. 37073.
 93. Hughey, R.P., et al., Epithelial sodium channels are activated by furin-dependent proteolysis. *Journal of Biological Chemistry*, 2004. **279**(18): p. 18111-18114.
 94. Carattino, M.D., et al., The epithelial Na⁺ channel is inhibited by a peptide derived from proteolytic processing of its alpha subunit. *J Biol Chem*, 2006. **281**(27): p. 18901-7.
 95. Bruns, J.B., et al., Epithelial Na⁺ channels are fully activated by furin-and prostaticin-dependent release of an inhibitory peptide from the γ-subunit. *Journal of Biological Chemistry*, 2007. **282**(9): p. 6153-6160.
 96. Carattino, M.D., R.P. Hughey, and T.R. Kleyman, Proteolytic processing of the epithelial sodium channel γ subunit has a dominant role in channel activation. *Journal of Biological Chemistry*, 2008. **283**(37): p. 25290-25295.
 97. Vuagniaux, G., et al., Synergistic activation of ENaC by three membrane-bound channel-activating serine proteases (mCAP1, mCAP2, and mCAP3) and serum-

- and glucocorticoid-regulated kinase (Sgk1) in *Xenopus* oocytes. *The Journal of general physiology*, 2002. **120**(2): p. 191-201.
98. Jacquillet, G., I. Rubera, and R.J. Unwin, Potential role of serine proteases in modulating renal sodium transport in vivo. *Nephron Physiol*, 2011. **119**(2): p. p22-9.
 99. Passero, C.J., R.P. Hughey, and T.R. Kleyman, New role for plasmin in sodium homeostasis. *Current opinion in nephrology and hypertension*, 2010. **19**(1): p. 13.
 100. Lüllmann, H., et al., Diuretika, in *Pharmakologie und Toxikologie*, H. Lüllmann, et al., Editors. 2016, Georg Thieme Verlag.
 101. Kellenberger, S., I. Gautschi, and L. Schild, Mutations in the epithelial Na⁺ channel ENaC outer pore disrupt amiloride block by increasing its dissociation rate. *Molecular pharmacology*, 2003. **64**(4): p. 848-856.
 102. Vassalli, J.-D. and D. Belin, Amiloride selectively inhibits the urokinase-type plasminogen activator. *FEBS letters*, 1987. **214**(1): p. 187-191.
 103. Bohnert, B.N., et al., Urokinase-type plasminogen activator (uPA) is not essential for epithelial sodium channel (ENaC)-mediated sodium retention in experimental nephrotic syndrome. *Acta Physiol (Oxf)*, 2019. **227**(4): p. e13286.
 104. Epstein, M. and D.A. Calhoun, Aldosterone blockers (mineralocorticoid receptor antagonism) and potassium-sparing diuretics. *The Journal of Clinical Hypertension*, 2011. **13**(9): p. 644-648.
 105. Herold, G., *Innere Medizin* 2020. 2020: Walter de Gruyter GmbH & Co KG.
 106. Schorn, R. and J. Bleisch. *Das nephrotische Syndrom im Erwachsenenalter*. in *Swiss Medical Forum*. 2013. EMH Media.
 107. Tryggvason, K., J. Patrakka, and J. Wartiovaara, Hereditary proteinuria syndromes and mechanisms of proteinuria. *New England Journal of Medicine*, 2006. **354**(13): p. 1387-1401.
 108. Orth, S.R. and E. Ritz, The nephrotic syndrome. *New England Journal of Medicine*, 1998. **338**(17): p. 1202-1211.
 109. Mahalingasivam, V., et al., Nephrotic syndrome in adults. *Acute Med*, 2018. **17**(1): p. 36-43.
 110. Artunc, F., et al., Proteasuria-The impact of active urinary proteases on sodium retention in nephrotic syndrome. *Acta Physiol (Oxf)*, 2019. **225**(4): p. e13249.
 111. Bockenbauer, D., Over-or underfill: not all nephrotic states are created equal. *Pediatric nephrology*, 2013. **28**(8): p. 1153-1156.
 112. Hinrichs, G.R., B.L. Jensen, and P. Svenningsen, Mechanisms of sodium retention in nephrotic syndrome. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 2020. **29**(2): p. 207-212.
 113. Deschenes, G., et al., Collecting duct is a site of sodium retention in PAN nephrosis: a rationale for amiloride therapy. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2001. **12**(3): p. 598-601.
 114. Persson, P., *Wasser-und Elektrolyt-Haushalt*, in *Physiologie des Menschen*. 2019, Springer. p. 431-444.
 115. Siddall, E.C. and J. Radhakrishnan, The pathophysiology of edema formation in the nephrotic syndrome. *Kidney international*, 2012. **82**(6): p. 635-642.
 116. Svenningsen, P., O. Sktt, and B. Jensen, Proteinuric diseases with sodium retention: is plasmin the link? *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 2012. **39**(1): p. 117-124.
 117. Svenningsen, P., et al., Plasmin in nephrotic urine activates the epithelial sodium channel. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2009. **20**(2): p. 299-310.
 118. Artunc, F., Proteolytic Activation of the Epithelial Sodium Channel in Nephrotic Syndrome by Proteasuria: Concept and Therapeutic Potential. *Turkish Journal of Nephrology*, 2020. **29**: p. 59-65.

119. Bohnert, B.N., et al., Aprotinin prevents proteolytic epithelial sodium channel (ENaC) activation and volume retention in nephrotic syndrome. *Kidney Int*, 2018. **93**(1): p. 159-172.
120. Bohnert, B.N. and F. Artunc, Induction of Nephrotic Syndrome in Mice by Retrobulbar Injection of Doxorubicin and Prevention of Volume Retention by Sustained Release Aprotinin. *J Vis Exp*, 2018(135).
121. Xiao, M., et al., Rodent models to study sodium retention in experimental nephrotic syndrome. *Acta Physiologica*, 2022: p. e13844.
122. Bohnert, B.N., et al., Experimental nephrotic syndrome leads to proteolytic activation of the epithelial sodium channel (ENaC) in the mouse kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2021.
123. Herstellung und Vertrieb, s.S.G. Spezialdiäten. 2021 07/2021 [cited 2021 31.12.2021]; Available from: <https://www.ssniff.de/documents/01-5%20%20DE%20Spezialdiaeten.pdf>.
124. Spezialfutter, A. Sonderdiäten. 2021 [cited 2021 31.12.2021]; Available from: <https://altromin.de/produkte/sonderdiaeten>.
125. Menacher, M.B., Bedeutung und pharmakologische Hemmung von Serinproteasen im Urin beim experimentellen nephrotischen Syndrom der Maus. 2017, Eberhard Karls Universität Tübingen.
126. Herrmann, R. and C.T. Alkemade, *Flammenphotometrie*. 2013: Springer-Verlag. 10-45.
127. Eppendorf, Eppendorf - Netheler - Hinz GmbH: *Flammenphotometer EFUX 5057 - Instruction manual*. 1995.
128. Lehmann, E., Labor + Technik EBERHARD LEHMANN GmbH: *Creatinin, Jaffé, kinetisch, ohne Enteiweißung (LT-CR 0121) - Instruction manual*. 2015.
129. Blass, K.G., R.J. Thibert, and L.K. Lam, A study of the mechanism of the Jaffe reaction. *Z Klin Chem Klin Biochem*, 1974. **12**(7): p. 336-43.
130. Talke, H. and G.E. Schubert, [ENZYMATIC UREA DETERMINATION IN THE BLOOD AND SERUM IN THE WARBURG OPTICAL TEST]. *Klin Wochenschr*, 1965. **43**: p. 174-5.
131. Lehmann, E., Labor + Technik EBERHARD LEHMANN GmbH: *Harnstoff, UV, kinetisch (LT-UR 0010) - Instruction manual*. 2016.
132. Lehmann, E., Labor + Technik EBERHARD LEHMANN GmbH: *Phosphor, anorganisch (LT-PH 0100) - Instruction manual*. 2011.
133. Fiske, C.H. and Y. Subbarow, THE COLORIMETRIC DETERMINATION OF PHOSPHORUS. *Journal of Biological Chemistry*, 1925. **66**(2): p. 375-400.
134. Peterson, J.I. and D.S. Young, Evaluation of the hexokinase/glucose-6-phosphate dehydrogenase method of determination of glucose in urine. *Analytical Biochemistry*, 1968. **23**(2): p. 301-316.
135. Lehmann, E., Labor + Technik EBERHARD LEHMANN GmbH: *Glucose, Hexokinase (LT-GLH 202) - Instruction manual*. 2015.
136. Kessler, M.A., et al., Microalbuminuria and borderline-increased albumin excretion determined with a centrifugal analyzer and the Albumin Blue 580 fluorescence assay. *Clin Chem*, 1997. **43**(6 Pt 1): p. 996-1002.
137. ActiveMotif, *Albumin Blue Fluorescent Assay Kit (Version C-Catalog No. 15002) - Instruction manual*. 2007.
138. Baer, J.E., et al., The potassium-sparing and natriuretic activity of N-amidino-3,5-diamino-6-chloropyrazinecarboxamide hydrochloride dihydrate (amiloride hydrochloride). *J Pharmacol Exp Ther*, 1967. **157**(2): p. 472-85.
139. Förster, T., *Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz*. *Annalen der physik*, 1948. **437**(1-2): p. 55-75.
140. Kapprell, H.P., et al., Development of a fluorescence resonance energy transfer peptide library technology for detection of protease contaminants in protein-based

- raw materials used in diagnostic assays. *Assay Drug Dev Technol*, 2011. **9**(5): p. 549-53.
141. Carmona, A.K., M.A. Juliano, and L. Juliano, The use of Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) peptides for measurement of clinically important proteolytic enzymes. *An Acad Bras Cienc*, 2009. **81**(3): p. 381-92.
 142. Bioscience, J., Jena Bioscience/Panatecs: P-CHECK: Protease Detection Kit. Instruction manual. 2017.
 143. Wörn, M., et al., Proteasuria in nephrotic syndrome-quantification and proteomic profiling. *J Proteomics*, 2020. **230**: p. 103981.
 144. Yorde, D.E., et al., Competitive enzyme-linked immunoassay with use of soluble enzyme/antibody immune complexes for labeling. I. Measurement of human choriogonadotropin. *Clin Chem*, 1976. **22**(8): p. 1372-7.
 145. IBLInternational, IBL International GmbH: Aldosterone ELISA - Enzyme immunoassay for the quantitative determination of Aldosterone in human serum, plasma and urine - Instruction manual. 2015.
 146. Cloud-Clone, Cloud-Clone Corp.: Enzyme-linked immunosorbent Assay Kit for Aprotinin (AP) - Instruction manual. 2015.
 147. Maiolini, R. and R. Masseyeff, A sandwich method of enzyme immunoassay. I. Application to rat and human alpha-fetoprotein. *Journal of Immunological Methods*, 1975. **8**(3): p. 223-234.
 148. RnDSystems, R&D Systems a bio-technie brand: Quantikine ELISA, Mouse/Rat Cystatin C Immunoassay - Instruction manual. 2016.
 149. Aydin, S., A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*, 2015. **72**: p. 4-15.
 150. el Nahas, A.M., et al., Role of growth hormone in the development of experimental renal scarring. *Kidney Int*, 1991. **40**(1): p. 29-34.
 151. Veniant, M., et al., Calcium blockade versus ACE inhibition in clipped and unclipped kidneys of 2K-1C rats. *Kidney Int*, 1994. **46**(2): p. 421-9.
 152. Ichimura, T., et al., Kidney injury molecule-1: a tissue and urinary biomarker for nephrotoxicant-induced renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2004. **286**(3): p. F552-63.
 153. Mahmood, T. and P.-C. Yang, Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *North American journal of medical sciences*, 2012. **4**(9): p. 429-434.
 154. Essigke, D., et al., Zymogen-locked mutant prostaticin (Prss8) leads to incomplete proteolytic activation of the epithelial sodium channel (ENaC) and severely compromises triamterene tolerance in mice. *Acta Physiol (Oxf)*, 2021. **232**(1): p. e13640.
 155. Frindt, G., et al., Cleavage state of γ ENaC in mouse and rat kidneys. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2021. **320**(3): p. F485-f491.
 156. Frindt, G., et al., Na restriction activates epithelial Na channels in rat kidney through two mechanisms and decreases distal Na⁺ delivery. *The Journal of physiology*, 2018. **596**(16): p. 3585-3602.
 157. Navarrete, M., et al., Proteomic characterization of serine hydrolase activity and composition in normal urine. *Clinical proteomics*, 2013. **10**(1): p. 1-11.
 158. Zachar, R., B.L. Jensen, and P. Svenningsen, Dietary Na⁺ intake in healthy humans changes the urine extracellular vesicle prostaticin abundance while the vesicle excretion rate, NCC, and ENaC are not altered. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 2019. **317**(6): p. F1612-F1622.
 159. Masilamani, S., et al., Aldosterone-mediated regulation of ENaC α , β , and γ subunit proteins in rat kidney. *The Journal of clinical investigation*, 1999. **104**(7): p. R19-R23.

160. Frindt, G. and L.G. Palmer, Acute effects of aldosterone on the epithelial Na channel in rat kidney. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 2015. **308**(6): p. F572-F578.
161. Ergonul, Z., G. Frindt, and L.G. Palmer, Regulation of maturation and processing of ENaC subunits in the rat kidney. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 2006. **291**(3): p. F683-F693.
162. Frindt, G., Z. Ergonul, and L.G. Palmer, Surface expression of epithelial Na channel protein in rat kidney. *Journal of General Physiology*, 2008. **131**(6): p. 617-627.
163. Frindt, G., et al., Activation of epithelial Na channels during short-term Na deprivation. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 2001. **280**(1): p. F112-F118.
164. Pacha, J., et al., Regulation of Na channels of the rat cortical collecting tubule by aldosterone. *The Journal of general physiology*, 1993. **102**(1): p. 25-42.
165. Passero, C.J., et al., Defining an inhibitory domain in the gamma subunit of the epithelial sodium channel. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 2010. **299**(4): p. F854-F861.
166. Fauli, A., et al., Kidney-specific proteins in patients receiving aprotinin at high-and low-dose regimens during coronary artery bypass graft with cardiopulmonary bypass. *European journal of anaesthesiology*, 2005. **22**(9): p. 666-671.
167. Feindt, P.R., et al., Effects of high-dose aprotinin on renal function in aortocoronary bypass grafting. *The Annals of thoracic surgery*, 1995. **60**(4): p. 1076-1080.
168. Lopez-Novoa, J.M., et al., New insights into the mechanism of aminoglycoside nephrotoxicity: an integrative point of view. *Kidney International*, 2011. **79**(1): p. 33-45.
169. Mercieri, M., et al., High-dose aprotinin with gentamicin-vancomycin antibiotic prophylaxis increases blood concentrations of creatinine and cystatin C in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *British journal of anaesthesia*, 1999. **82**(4): p. 531-536.
170. Morin, N.J., et al., Potentiation of gentamicin nephrotoxicity in the rat by infusion of aprotinin. *Experimental and molecular pathology*, 1994. **60**(3): p. 197-213.
171. Bennett, W.M., Drug interactions and consequences of sodium restriction. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1997. **65**(2): p. 678S-681S.
172. Hörl, W.H., Aprotinin and renal function in patients undergoing cardiac surgery. *BJA: British Journal of Anaesthesia*, 2000. **84**(1): p. 3-5.
173. Seto, S., et al., The effect of aprotinin (a serine protease inhibitor) on renal function and renin release. *Hypertension*, 1983. **5**(6): p. 893-9.
174. Cosgrove, D.M., et al., Aprotinin therapy for reoperative myocardial revascularization: a placebo-controlled study. *The Annals of thoracic surgery*, 1992. **54**(6): p. 1031-1038.
175. D'Ambra, M.N., et al., Aprotinin in primary valve replacement and reconstruction: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, 1996. **112**(4): p. 1081-1089.
176. O'Connor, C.J., et al., The Impact of Renal Dysfunction on Aprotinin Pharmacokinetics During Cardiopulmonary Bypass. *Anesthesia & Analgesia*, 1999. **89**(5): p. 1101-1107.
177. Rustom, R., et al., A new method to measure renal tubular degradation of small filtered proteins in man using radiolabelled aprotinin (Trasylol). *Clinical Science*, 1992. **83**(3): p. 289-294.
178. Bohnert, B.N., Proteinurie. *Dialyse aktuell*, 2021. **25**(02): p. 68-75.
179. Pang, L., et al., Urine proteomics of primary membranous nephropathy using nanoscale liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis. *Clinical proteomics*, 2018. **15**(1): p. 1-15.

180. Thielemans, N., R. Lauwerys, and A. Bernard, Competition between albumin and low-molecular-weight proteins for renal tubular uptake in experimental nephropathies. *Nephron*, 1994. **66**(4): p. 453-458.
181. Bernard, A., et al., Competition between low-and high-molecular-weight proteins for renal tubular uptake. *Nephron*, 1987. **45**(2): p. 115-118.
182. Nielsen, R. and E.I. Christensen, Proteinuria and events beyond the slit. *Pediatric nephrology*, 2010. **25**(5): p. 813-822.
183. Rustom, R., et al., Effects of lysine infusion on the renal metabolism of aprotinin (Trasylol) in man. *Clinical Science*, 1992. **83**(3): p. 295-299.
184. Abbate, M., C. Zoja, and G. Remuzzi, How does proteinuria cause progressive renal damage? *Journal of the American Society of Nephrology*, 2006. **17**(11): p. 2974-2984.
185. Zoja, C., A. Benigni, and G. Remuzzi, Protein Overload Activates Proximal Tubular Cells to Release Vasoactive and Inflammatory Mediators. *Nephron Experimental Nephrology*, 1999. **7**(5-6): p. 420-428.
186. Zoja, C., M. Abbate, and G. Remuzzi, Progression of renal injury toward interstitial inflammation and glomerular sclerosis is dependent on abnormal protein filtration. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2015. **30**(5): p. 706-712.
187. Eddy, A.A., Proteinuria and interstitial injury. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2004. **19**(2): p. 277-281.
188. Ahmed, A., Die Rolle des mTOR2-Komplexes bei der Regulation der Natrium-und Kaliumausscheidung im distalen Tubulus der Niere. 2014, Universität Tübingen.
189. Khatib, H., Renaler Phänotyp von Mäusen mit induzierbarer Deletion von mTORC1 und mTORC2 im Tubulusepithel. 2016, Eberhard Karls Universität Tübingen.
190. Rörden, M.C., Phänotypisierung der tubulären Deletion von mTORC1 und mTORC2. 2016, Eberhard Karls Universität Tübingen.
191. Artunc, F., et al., Lack of the serum and glucocorticoid-inducible kinase SGK1 attenuates the volume retention after treatment with the PPAR γ agonist pioglitazone. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 2008. **456**(2): p. 425-436.
192. Xiao, M., et al., Plasminogen deficiency does not prevent sodium retention in a genetic mouse model of experimental nephrotic syndrome. *Acta Physiol (Oxf)*, 2020: p. e13512.

7. Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde am Universitätsklinikum Tübingen unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. F. Artunc durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit meinem Doktorvater und Betreuer Herrn Prof. Dr. F. Artunc und Herrn Dr. B. Bohnert.

Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch die Labormitglieder Herrn Dr. B. Bohnert, T. Dörffel und M. Wörn von mir durchgeführt. Die Bestimmung der Albumin- und Amiloridkonzentrationen und der Proteaseaktivität im Urin erfolgte durch mich in Zusammenarbeit mit Herrn M. Wörn. Bei den Aldosteron- und Cystatin C-Messungen erhielt ich technische Unterstützung von Frau A. Raiser. Die Western Blots wurden von Frau A. Janessa angefertigt. Die histopathologischen Untersuchungen der entnommenen Nieren erfolgten in der Nephropathologischen Abteilung von Frau Prof. Dr. K. Amann am Universitätsklinikum Erlangen durch Herrn Prof. Dr. C. Daniel.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Rücksprache mit Herrn Dr. B. Bohnert eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Stuttgart, den

8. Veröffentlichungen

Ergebnisse dieser Arbeit wurden unter folgenden Titeln veröffentlicht:

Poster:

„Renale Effekte des Serinprotease-Inhibitors Aprotinin bei gesunden Mäusen“

S. Wörner, B. Bohnert, C. Daniel, K. Amann, F. Artunc

Auf dem

Kongress für Nephrologie 2017, 9. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie; 14. - 17. September 2017, Mannheim

Paper:

„Renal effects of the serine protease inhibitor aprotinin in healthy conscious mice“

S. Wörner*, B. Bohnert*, M. Wörn, M. Xiao, A. Janessa, A. Birkenfeld, K. Amann, C. Daniel, F. Artunc

* geteilte Erstautorenschaft

in

Acta Pharmacologica Sinica, **43**, p. 111-120 (2022)

DOI: <https://doi.org/10.1038/s41401-021-00628-1>

ISSN 1745-7254 (online); ISSN 1671-4083 (print)

Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Artunc für die Überlassung dieser spannenden Promotionsarbeit bedanken.

Lieber Ferruh, vielen Dank für die umfassende Betreuung und die Unterstützung bei der Umsetzung der gesamten Arbeit. Durch den regen fachlichen Austausch, deine äußerst konstruktiven Ideen und deinen unermüdlichen Optimismus hast du die Promotionsarbeit erst möglich gemacht. Durch dich konnte ich wertvolle Erfahrungen in der wissenschaftlichen Arbeit sammeln.

Ganz herzlich bedanke ich mich zudem bei Herrn Dr. med. Bernhard Bohnert für die zahllosen Gespräche und die uneingeschränkte Unterstützung. Lieber Bernhard, auch gerade während vermeintlichen Durststrecken hattest du für mich jederzeit ein offenes Ohr. Ohne dich wäre ich sicherlich einige Male verzweifelt.

Darüber hinaus möchte ich mich bei der Nephropathologischen Abteilung in Erlangen in Person von Frau Prof. Dr. Amann und Herrn Prof. Dr. Daniel für die Durchführung der histopathologischen Untersuchungen der Nieren bedanken.

Des Weiteren bedanke ich mich herzlich bei meinen Kollegen und Kolleginnen der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Artunc. Insbesondere danke ich Frau Andrea Janessa, die mich geduldig bei Problemen des Laboralltags unterstützte. Meinen Mit-Doktoranden und Mit-Doktorandinnen danke ich vor allem für den regen Austausch und die Unterstützung bei der Tierhaltung.

Mein allergrößter Dank gilt jedoch meinen Eltern und meiner Freundin Elisabeth Reiter, die mich während der Promotion und des gesamten Studiums liebevoll unterstützt und mich stets motiviert haben.