

### **3 ERGEBNISSE:**

Wo nicht anders angegeben, wurde  $p < 0,05$  als Signifikanzniveau festgelegt.

#### **3.1 Körpergewicht:**

Es ließen sich keine signifikanten Unterschiede für das Körpergewicht zwischen den Tieren der verschiedenen Behandlungsgruppen nachweisen (siehe Tabelle 3-1).

<b>Diätgruppe</b>	<b>1M (g)</b>	<b>2M (g)</b>	<b>4M (g)</b>	<b>Co (g)</b>
<b>+P+A</b>	191 ± 11	186 ± 4	195 ± 11	191 ± 11
<b>+P++A</b>	194 ± 8	191 ± 13	217 ± 16	192 ± 12
<b>+P-A</b>	194 ± 5	189 ± 5	225 ± 17	197 ± 14
<b>-P+A</b>	200 ± 12	197 ± 10	243 ± 21	204 ± 8
<b>-P-A</b>	201 ± 5	206 ± 14	197 ± 16	204 ± 16

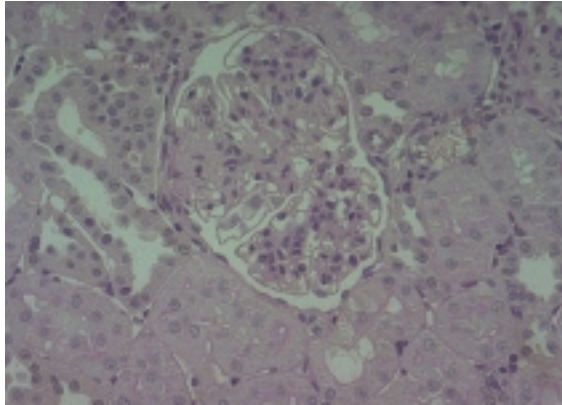
Tabelle 3-1: Körpergewicht der Tiere in Gramm

#### **3.2 Auswertung der PAS-Histologie:**

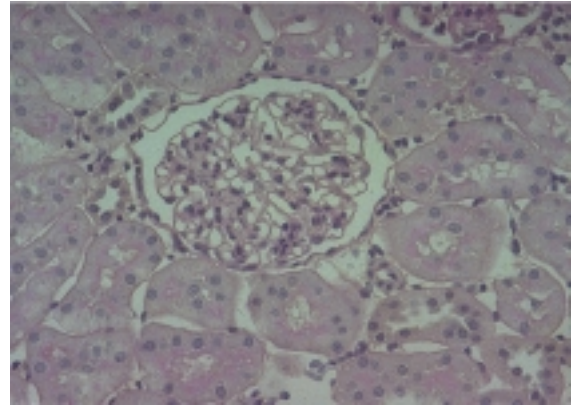
##### **3.2.1 Morphologische Beschreibung:**

Abb. 3-1 a-d zeigt Bildausschnitte von Glomeruli zu den Meßzeitpunkten 1M, 2M, 4M und Co. Da sich zwischen den verschiedenen Diätgruppen mit Hilfe des semiquantitativen Scores keine signifikanten Unterschiede der histologischen Veränderungen nachweisen ließen (siehe 3.2.2), wurden hier repräsentativ typische histologische Schnitte der Gruppe +P+A ausgewählt.

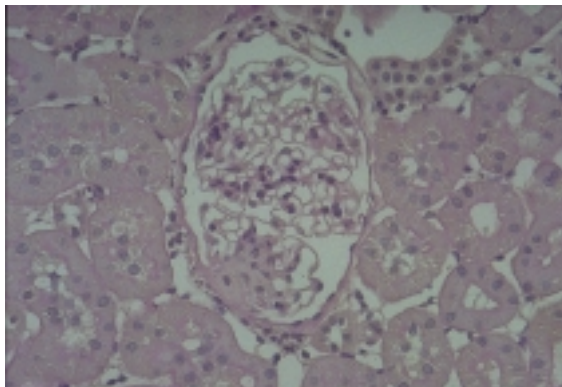
Schon zum Zeitpunkt 1M (Abb. 3-1 a) sind hier die akuten morphologischen Veränderungen (Abnahme der glomerulären Zellzahl durch Mesangialzellyse,



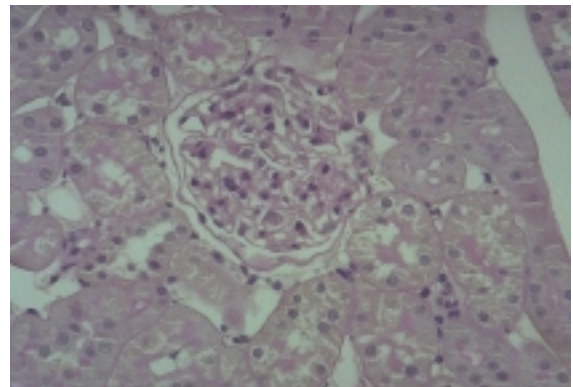
a: +P+A 1M



b: +P+A 2M



c: +P+A 4M



d: +P+A Co

Abb. 3-1 a-d: Repräsentative Glomeruli +P+A 1M, 2M, 4M, Co; PAS-Histologie

Bildung von Mikroaneurysmen glomerulärer Kapillaren, siehe 2.1.1) abgeklungen. Sichtbar sind aber die immer noch diffus erhöhte Matrixdeposition im Bereich des glomerulären Mesangium und teilweise noch nicht zurückgebildete kapilläre Mikroaneurysmen sowie eine erhöhte mesangiale Zelldichte.

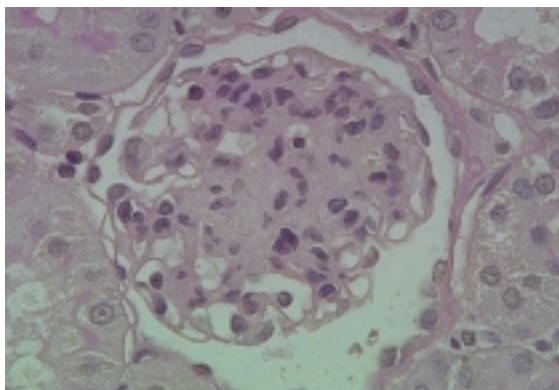
Zum Zeitpunkt 2M (Abb. 3-1 b) ist diese Mesangialproliferation bereits deutlich zurückgegangen, der Anteil der intakten glomerulären Kapillarschlingen hat hier zugenommen. Im Vergleich zu der Co-Gruppe ist das Mesangium aber immer noch deutlich verbreitert.

Diese Veränderungen haben sich nach 4M (Abb. 3-1 c) noch weiter zurückgebildet: Der Anteil von mesangialer Matrix und Kapillarschlingen ist hier bei etwa 50% der Glomeruli praktisch identisch mit dem in der Co-Gruppe. In der ausgewählten Abbildung ist lediglich eine fokal-sklerotische Läsion sichtbar, welche bei 40-50% der Glomeruli in diesem Zeitfenster nachweisbar blieben.

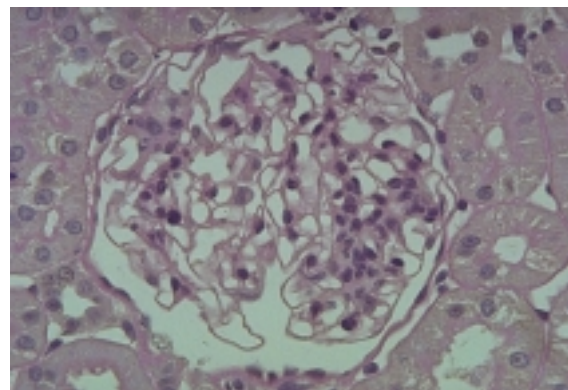
Zur besonderen Verdeutlichung zeigen die Abb. 3-2 a-b repräsentativ je ein

herausvergrößertes Glomerulum zu den Zeitpunkten 1M und 4M. Hier sind noch einmal die großen Unterschiede zwischen diesen Zeitpunkten darstellbar: Im Glomerulum in Abb. 3-2 a ist weit überwiegend die mesangiale Matrix sichtbar, die die Architektur des Glomerulums deutlich dominiert und nur noch Raum für wenige zurückgedrängte Kapillarschlingen läßt.

Nach 4M (Abb. 3-2 b) hat sich die glomeruläre Cytoarchitektur teilweise normalisiert: es finden sich nun wieder reichlich Kapillarschlingen, die von einer nur noch mäßig verbreiterten mesangialen Matrix und einer fokalen Läsion (im linken oberen Bildrand) eingefaßt werden.



a: +P+A 1M



b: +P+A 4M

Abb 3-2 a-b: Ausschnittsvergrößerungen Glomeruli +P+A 1M und 4M; PAS-Histologie

Letztere Veränderungen sind chronische Residuen, welche bei diesem Modell der aThy1-Glomerulonephritis der LEW/Maa-Ratten in typischer Weise beobachtet werden.

### **3.2.2 Semiquantitative Auswertung:**

Die histologische Analyse mit Hilfe des unter 2.2.2 beschriebenen semiquantitativen Score-Systems zeigte, daß die Sklerose-Scores für alle Tiere, die die Antikörper-Injektion erhalten hatten, signifikant über den Indizes der Kontrolltiere lag.

Die höchsten Scores zu den untersuchten Zeitpunkten waren nach 1 Monat zu finden, nach 2 Monaten waren die Sklerose-Indizes vermindert, zeigten aber immer noch eindeutige Zeichen der Glomerulosklerose. Nach 4 Monaten waren die glomerulären Veränderungen weiter rückläufig, aber immer noch deutlich sichtbar,

die Scores lagen auch hier weiterhin signifikant oberhalb derer der Kontrolltiere. Zu keinem Zeitpunkt waren signifikante Unterschiede zwischen den Sklerose-Indizes der verschiedenen Diätgruppen zu finden (zu den Meßwerten siehe Tabelle 3-2).

Diätgruppe	1M (Score)	2M (Score)	4M (Score)	Co (Score)
<b>+P+A</b>	2,14 ±0,35	1,96 ±0,35	1,82 ±0,10	1,53 ±0,31
<b>+P++A</b>	2,31 ±0,14	1,99 ±0,13	1,98 ±0,10	1,46 ±0,12
<b>+P-A</b>	2,12 ±0,45	1,91 ±0,08	1,83 ±0,17	1,33 ±0,12
<b>-P+A</b>	2,39 ±0,19	2,16 ±0,07	1,91 ±0,21	1,45 ±0,18
<b>-P-A</b>	2,30 ±0,16	2,18 ±0,08	1,93 ±0,13	1,67 ±0,11

Tabelle 3-2: Histo-Scores in absoluten Werten

Die Auswertung der prozentualen Anteile an ausgezählten Glomeruli, deren Sklerose-Scores  $\geq 2,5$  lagen, also eine schwere Sklerose aufwiesen, lieferte die in Abbildung 3-3 dargestellten Ergebnisse. Sie bestätigte die gleiche Tendenz wie die Absolutwerte.

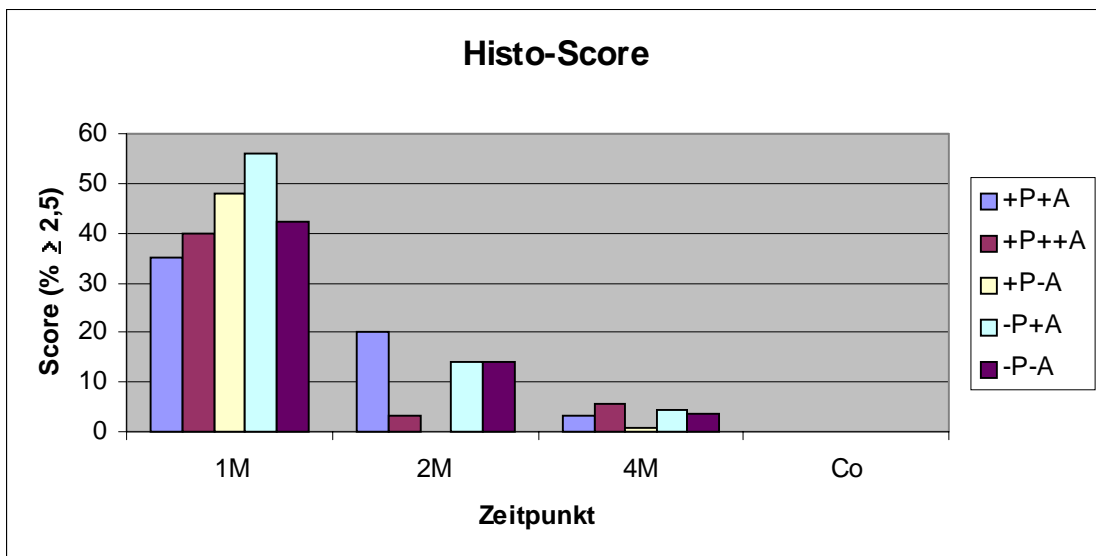


Abbildung 3-3: prozentualer Anteil der stark sklerotischen Glomeruli (Score  $\geq 2,5$ )

### 3.3 Urinausscheidung:

Es ließen sich keine signifikanten Unterschiede für die in 24 Stunden ausgeschiedenen Urinmengen zwischen den Tieren der verschiedenen Gruppen nachweisen (siehe Tabelle 3-3).

<b>Diätgruppe</b>	<b>1M (ml)</b>	<b>2M (ml)</b>	<b>4M (ml)</b>	<b>Co (ml)</b>
<b>+P+A</b>	16 ± 1	17 ± 2	15 ± 2	17 ± 2
<b>+P++A</b>	21 ± 3	16 ± 3	14 ± 2	16 ± 3
<b>+P-A</b>	15 ± 1	13 ± 1	14 ± 2	14 ± 2
<b>-P+A</b>	10 ± 1	11 ± 3	13 ± 1	13 ± 3
<b>-P-A</b>	12 ± 2	16 ± 3	14 ± 2	15 ± 1

Tabelle 3-3: Urinausscheidung der Tiere in 24 Stunden in ml

### 3.4 Albuminurie:

Die Werte für die Albuminausscheidung im Urin variierten nicht signifikant über den Zeitverlauf und lagen im Mittel bei den kranken Tieren bei  $0,90 \pm 0,35\text{mg}/24\text{h}$ .

Die nierengesunden Tiere der Kontrollgruppe schieden im Mittel  $0,40 \pm 0,18\text{mg}/24\text{h}$  und damit um mehr als die Hälfte weniger Albumin mit dem Urin aus.

Im Vergleich der verschiedenen Diätgruppen zu den unterschiedlichen Zeitpunkten zeigte sich, daß nach 1 Monat Krankheitsverlauf die Tiere der Diätgruppe -P-A ( $1,68 \pm 0,42\text{mg}/24\text{h}$ ) die höchsten Albuminwerte ausschieden, dabei waren die Werte der Gruppen +P++A ( $0,64 \pm 0,50\text{mg}/24\text{h}$ ) und -P+A ( $0,78 \pm 0,43\text{mg}/24\text{h}$ ) signifikant niedriger als diese, die Unterschiede zu den anderen beiden Gruppen waren nicht signifikant (siehe Abbildung 3-4).

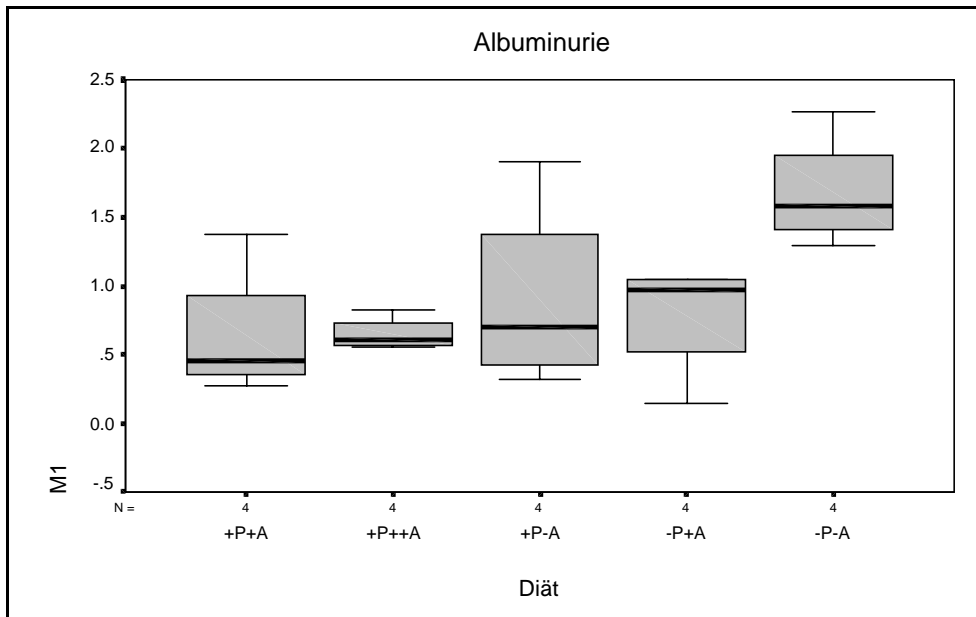


Abbildung 3-4: Albuminurie (mg/24h), 1M-Tiere

Nach 2 Monaten schieden die Tiere der Gruppe +P+A die höchsten Mengen an Albumin aus ( $1,62 \pm 0,50\text{mg}/24\text{h}$ ) dabei waren die Unterschiede zu +P-A ( $0,53 \pm 0,31\text{mg}/24\text{h}$ ) und -P-A ( $0,63 \pm 0,22\text{mg}/24\text{h}$ ) statistisch signifikant (siehe Abbildung 3-5).

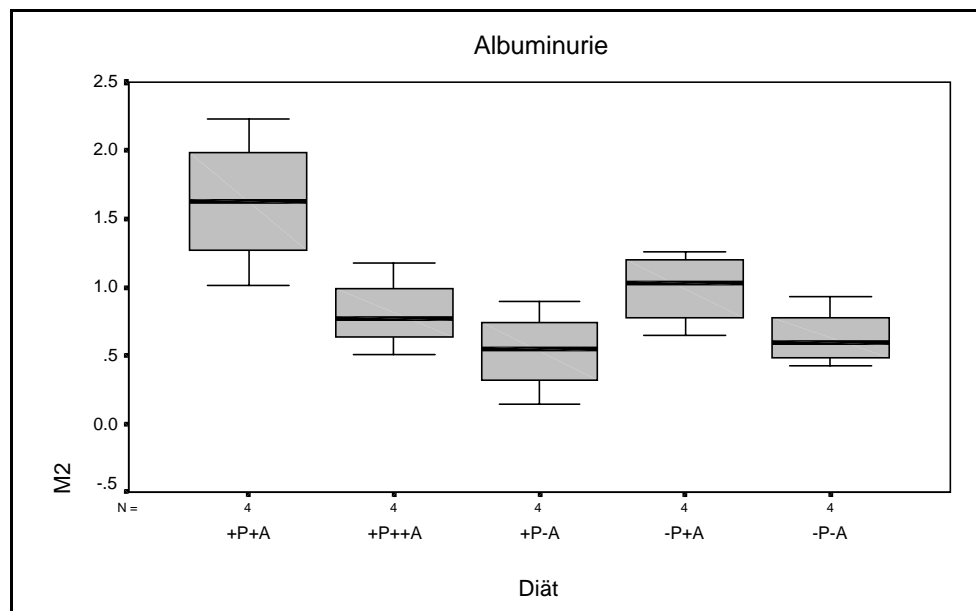


Abbildung 3-5: Albuminurie (mg/24h), 2M-Tiere

Nach 4 Monaten zeigten die Tiere der Gruppe +P++A ( $1,18 \pm 0,17\text{mg}/24\text{h}$ ) eine höhere Albuminurie als die der Gruppe -P-A ( $0,86 \pm 0,07\text{mg}/24\text{h}$ ), die kranken Tiere der Gruppen +P++A, -P+A und -P-A schieden dabei signifikant mehr Albumin aus als die Tiere der entsprechenden gesunden Kontrollgruppen, bei den Gruppen +P+A und +P-A waren die Unterschiede zu den Kontrollen nicht signifikant (siehe Abbildung 3-6).

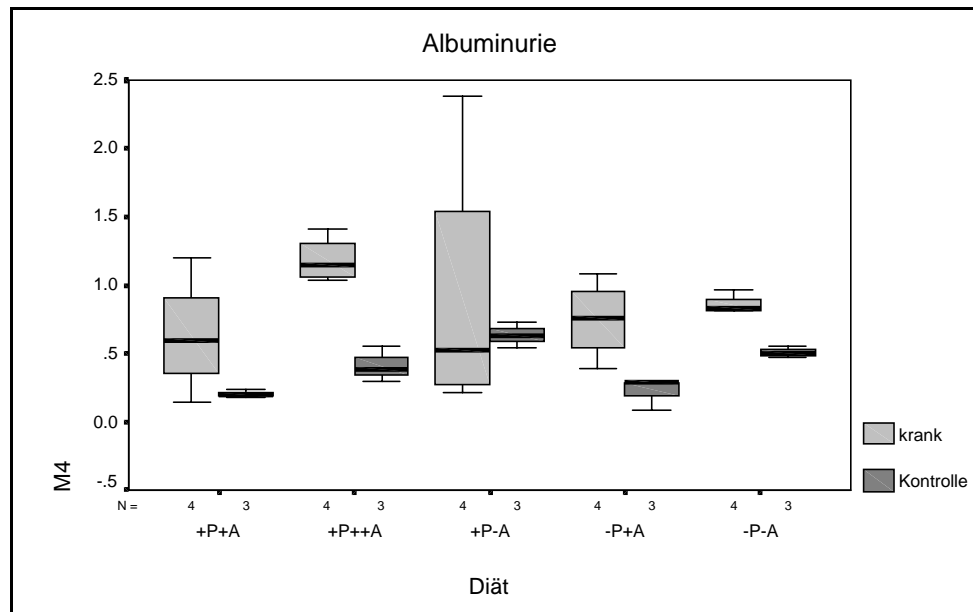


Abbildung 3-6: Albuminurie (mg/24h), 4M- und Kontrolltiere im Vergleich

Zwischen den Werten der gesunden Kontrolltiere der verschiedenen Diätgruppen fanden sich keine signifikanten Abweichungen.

### **3.5 Glomeruläre $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ -Produktion:**

Die Kultur der Glomeruli der 1M-Tiere zeigte eine signifikant erhöhte  $\text{NO}_x$ -Produktion der Gruppe +P-A ( $13,8 \pm 1,5\mu\text{mol/l}$ ) gegenüber +P+A ( $9,9 \pm 1,2\mu\text{mol/l}$ ), +P++A ( $9,4 \pm 0,9$ ) und -P-A ( $8,9 \pm 1,9\mu\text{mol/l}$ ). Andere Unterschiede waren nicht signifikant (siehe Abbildung 3-7).

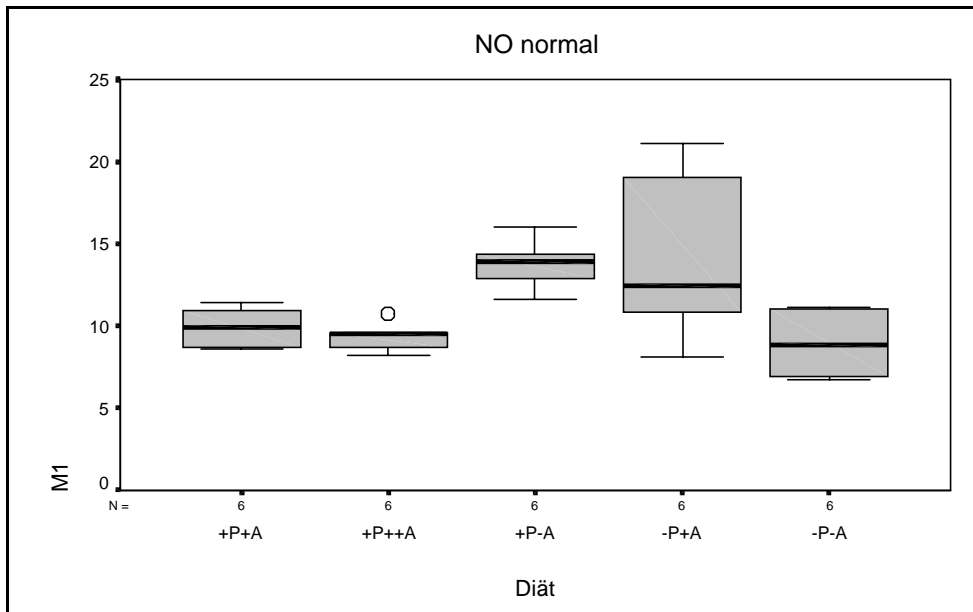


Abbildung 3-7: NO<sub>x</sub>-Produktion (µmol/l), 1M-Tiere

Bei den 2M-Tieren produzierten die Glomeruli der +P-A-Gruppe signifikant mehr NO<sub>x</sub> ( $13,1 \pm 2,6 \mu\text{mol/l}$ ) als die der Gruppen +P+A und -P-A ( $9,8 \pm 1,9$  bzw.  $9,4 \pm 1,8 \mu\text{mol/l}$ ) (siehe Abbildung 3-8).

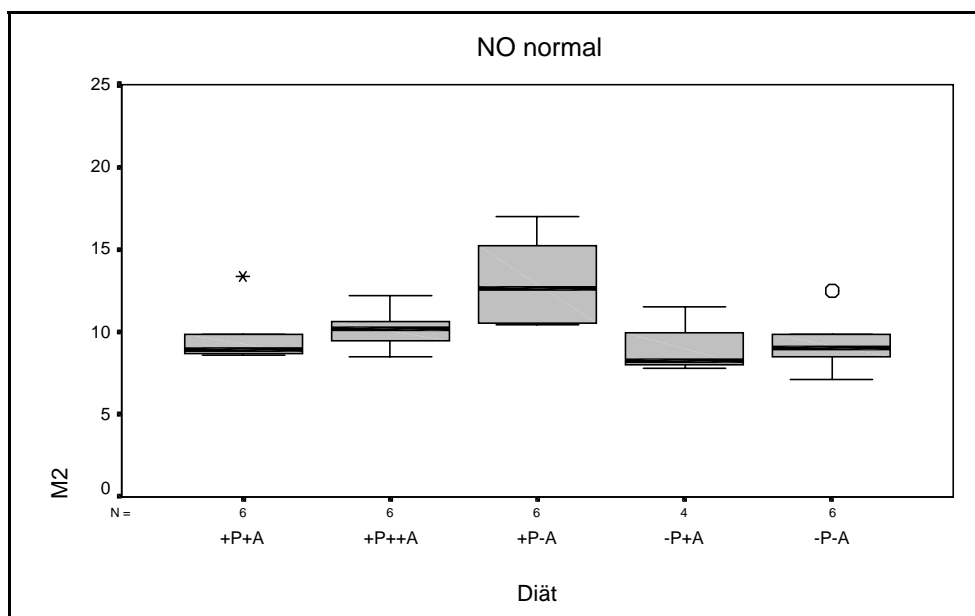


Abbildung 3-8: NO<sub>x</sub>-Produktion (µmol/l), 2M-Tiere

Zwischen den verschiedenen Diätgruppen zeigten sich sowohl für die kranken 4M-



Tiere als auch für die gesunde Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede, in allen Diätgruppen war aber die NO<sub>x</sub>-Produktion der kranken Tiere gegenüber den Werten der Kontrollen, bei denen die Glomerulonephritis nicht induziert worden war, signifikant erhöht (siehe Abbildung 3-9).

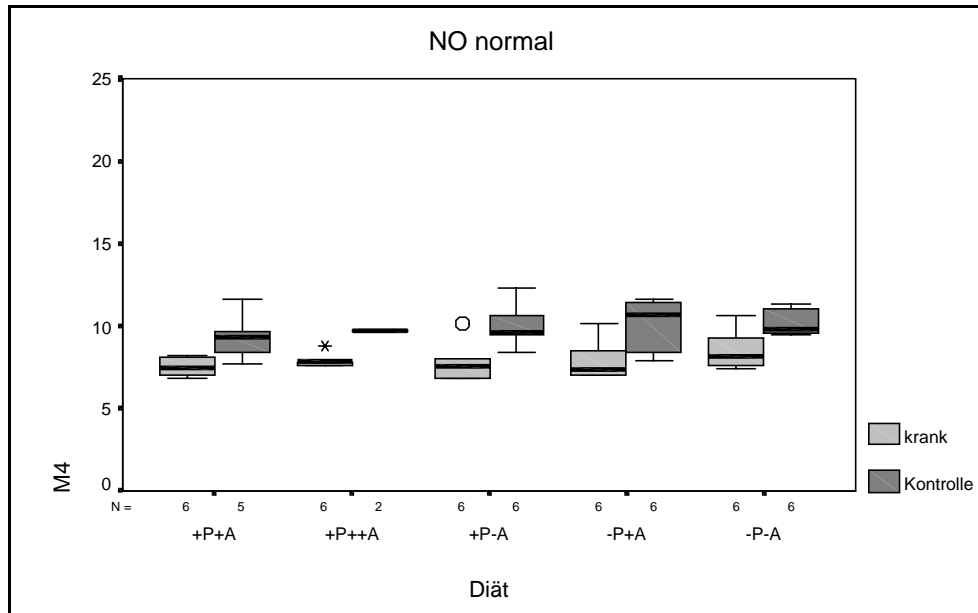


Abbildung 3-9: NO<sub>x</sub>-Produktion (µmol/l), 4M- und Kontrolltiere im Vergleich

### 3.6 Arginase-Aktivität:

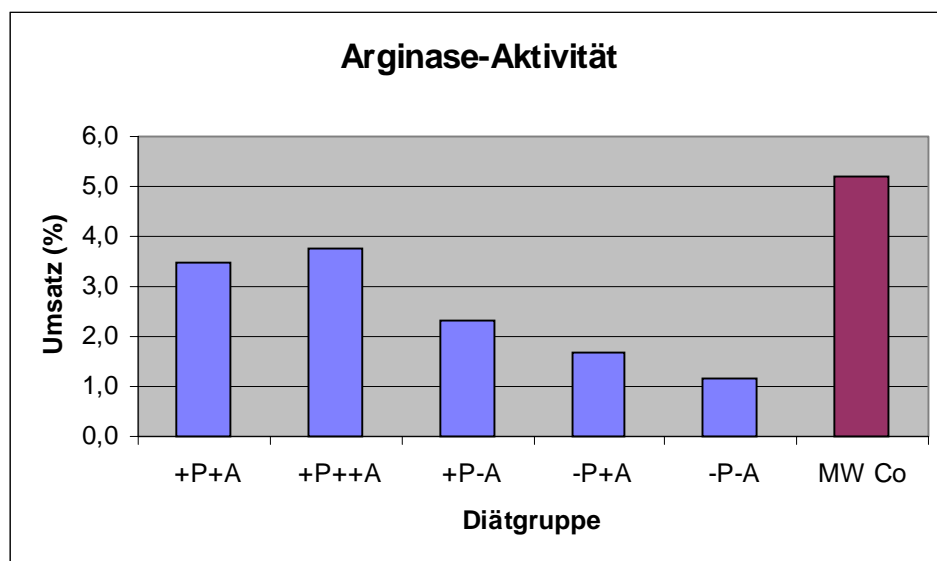


Abbildung 3-10: Arginase-Aktivität (%), 1M-Tiere

In der Gruppe der 1M-Tiere fand sich eine mittlere Arginase-Aktivität von 2,5%, der höchste Umsatz war mit 3,7% bei +P++A zu verzeichnen, der niedrigste Wert fand sich bei -P-A mit 1,2%. Bei den Kontrolltieren lag die mittlere Aktivität mit 5,2% deutlich oberhalb den Werten der 1M-Gruppe; es waren kaum Schwankungen zwischen den verschiedenen Diätgruppen meßbar (siehe Abb. 3-10).

### **3.7 Semiquantitative RT-PCR:**

#### **3.7.1 Glomeruläre bNOS-mRNA-Expression:**

Die Werte für die relative, auf  $\beta$ -Aktin bezogene glomeruläre Expression der mRNA für die bNOS rangierten bei den 1M-Tieren zwischen 0,28 (+P-A) und 0,64 (+P+A), letztere produzierten also um rund einen Faktor 2 mehr bNOS-mRNA als erstere. Der Mittelwert über alle Gruppen betrug nach 1 Monat 0,47.

Der Mittelwert bei den 4-Monats-Tieren lag mit 1,02 etwa doppelt so hoch wie der der 1-Monats-Tiere, die Werte streuten zwischen 0,74 (-P+A) und 1,30 (+P-A).

Die Werte bei den Tieren der Kontrollgruppe lagen zwischen 0,49 (+P++A) und 1,50 (+P+A) bei einem Mittelwert von 0,85. Die glomeruläre bNOS-Expression bei den gesunden Kontrolltieren der Diätgruppe +P++A war demnach etwa dreimal so hoch wie die von +P+A. Zusammenfassend siehe Abbildung 3-11.

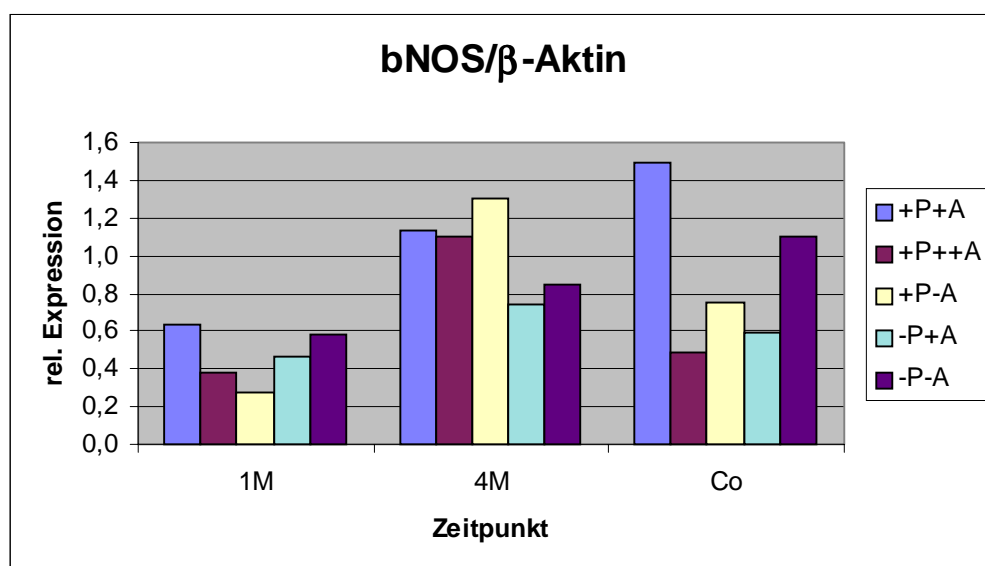


Abbildung 3-11: relative mRNA-Expression bNOS; 1M-, 4M-, Co-Tiere

Als Signifikanzniveau legten wir für diese Messungen aufgrund der methodenimmanenten Sensitivität der PCR einen Faktor 5 in den zu vergleichenden Gruppen fest; die gemessenen Unterschiede zwischen den Gruppen sind demnach zu keinem Zeitpunkt als signifikant einzustufen.

### **3.7.2 Glomeruläre Renin-mRNA-Expression:**

Bei den 1M-Tieren lag die mittlere relative mRNA-Expression für Renin bei 0,85, die niedrigste Expression war in der Gruppe +P+A (0,35), die höchste mit 1,82 bei -P-A zu finden. Hier fand sich also ein Unterschied in der Expression um das 5,2fache und damit ein signifikanter Unterschied.

Die Werte bei den 4M-Tieren streuten zwischen 0,62 (-P+A) und 0,92 (+P-A) um einen Mittelwert von 0,74.

In der Kontrollgruppe mit gesunden Tieren lag der Mittelwert bei 0,61 mit einem Höchstwert von 0,78 bei -P+A und einem Minimalwert von 0,38 (+P+A).

Die Unterschiede in den Gruppen 4M/Co waren als nicht signifikant einzustufen (siehe Abbildung 3-12).

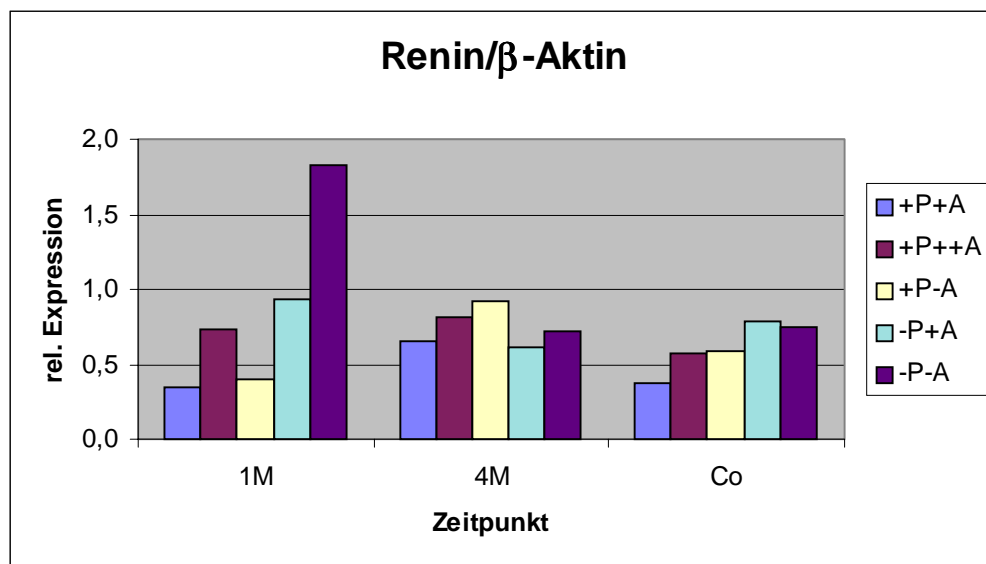


Abbildung 3-12: relative mRNA-Expression Renin; 1M-, 4M-, Co-Tiere

### 3.8 ODC-Aktivität:

Die über alle Zeitpunkte mittlere ODC-Aktivität der kranken Tiere lag bei  $0,51 \pm 0,31\mu\text{U}/\text{mg}$ . Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Werten der verschiedenen Zeitpunkte.

Nach einem Krankheitsverlauf von 1 Monat war in den Nieren der Tiere der Gruppe -P+A die höchste ODC-Aktivität nachzuweisen ( $1,33 \pm 1,19\mu\text{U}/\text{mg}$ ), diese war signifikant höher als die der Gruppe -P-A ( $0,30 \pm 0,07\mu\text{U}/\text{mg}$ ), die sonstigen Unterschiede waren nicht signifikant (siehe Abbildung 3-13).

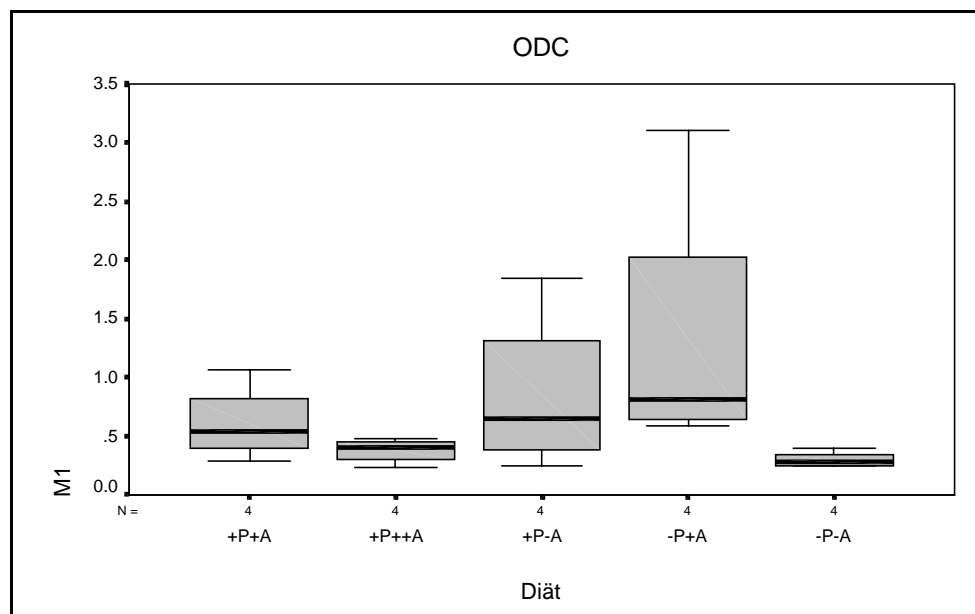


Abbildung 3-13: ODC-Aktivität ( $\mu\text{U}/\text{mg}$ ), 1M-Tiere

Nach 2 Monaten waren für die ODC-Aktivitäten der Nierenproben der verschiedenen Diätgruppen keine signifikanten Unterschiede zu ermitteln (siehe Abbildung 3-14). Nach 4 Monaten zeigte bei den kranken Tieren -P+A gegenüber -P-A einen signifikant niedrigeren Wert für den ODC-Umsatz ( $0,28 \pm 0,09$  bzw.  $0,74 \pm 0,20\mu\text{U}/\text{mg}$ ), zwischen den anderen Werten war kein signifikanter Unterschied zu ermitteln (siehe Abbildung 3-15).

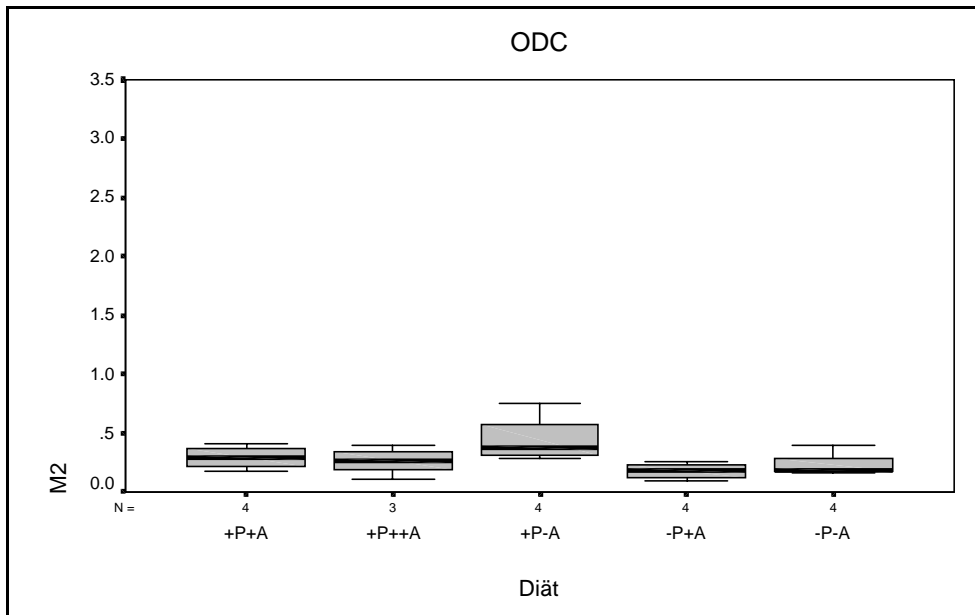


Abbildung 3-14: ODC-Aktivität (µU/mg), 2M-Tiere

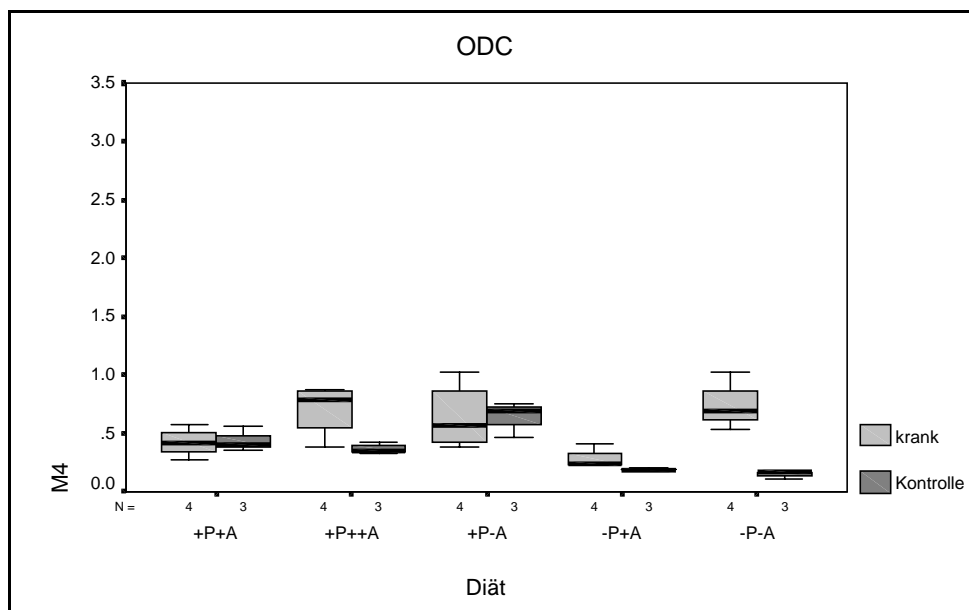


Abbildung 3-15: ODC-Aktivität (µU/mg), 4M- und Kontrolltiere im Vergleich

Zwischen den Kontrolltieren fanden sich keine signifikanten Abweichungen der ODC-Aktivität, in den Gruppen -P+A und -P-A war die ODC-Aktivität der kranken 4-Monats-Tiere höher als die der gesunden Kontrollen.

### **3.9 Serum-Aminosäuren:**

Die Auswertung der Meßwerte für die Serumspiegel der Aminosäuren Arginin, Ornithin, Citrullin und Prolin zeigte, daß zu den Zeitpunkten 1M und 2M die Serumspiegel aller 4 Aminosäuren in den Diätgruppen -P+A und -P-A jeweils signifikant höher lagen als die Spiegel der entsprechenden Aminosäuren in den Diätgruppen mit gleichem Arginin-, aber höherem Proteingehalt (d.h. +P+A bzw. +P-A).

Zum Zeitpunkt 4M waren diese Unterschiede nicht mehr eindeutig nachweisbar: So fand sich die beschriebene Konstellation nur für die Aminosäuren Ornithin und Citrullin. In der Co-Gruppe ließ sich dieses Phänomen, außer für die Aminosäure Citrullin, nicht mehr nachweisen.

Für die zusammenfassende Darstellung der Meßwerte der Serum-Aminosäuren in  $\mu\text{mol/l}$  siehe Tabelle 3-4 auf Seite 54.

<b>Aminosäure</b>	<b>Diätgruppe</b>	<b>1M</b>	<b>2M</b>	<b>4M</b>	<b>Co</b>
<b>Arginin</b> ( $\mu\text{mol/l}$ )	<b>+P+A</b>	47,5 $\pm 6,14$	52,8 $\pm 0,96$	48,3 $\pm 4,86$	45,5 $\pm 2,12$
	<b>+P++A</b>	63,0 $\pm 5,29$	54,3 $\pm 0,96$	58,0 $\pm 6,68$	48,7 $\pm 3,21$
	<b>+P-A</b>	17,3 $\pm 1,26$	30,5 $\pm 10,6$	38,0 $\pm 8,91$	32,7 $\pm 14,2$
	<b>-P+A</b>	77,3* $\pm 26,9$	44,0* $\pm 6,53$	45,8 $\pm 3,5$	58,0 $\pm 5,2$
	<b>-P-A</b>	49,3* $\pm 4,9$	44,8* $\pm 8,7$	43,5 $\pm 5,3$	49,7 $\pm 1,5$
<b>Ornithin</b> ( $\mu\text{mol/l}$ )	<b>+P+A</b>	9,5 $\pm 3,9$	8,5 $\pm 2,4$	6,3 $\pm 1,0$	6,5 $\pm 0,7$
	<b>+P++A</b>	13,3 $\pm 5,1$	8,8 $\pm 5,0$	9,3 $\pm 5,3$	5,7 $\pm 0,6$
	<b>+P-A</b>	6,8 $\pm 1,5$	12,0 $\pm 4,8$	6,8 $\pm 1,5$	11,0 $\pm 4,4$
	<b>-P+A</b>	49,5* $\pm 17,6$	14,5* $\pm 1,0$	19,3* $\pm 3,8$	16,3 $\pm 8,5$
	<b>-P-A</b>	17,8* $\pm 2,2$	17,5* $\pm 3,1$	15,3* $\pm 3,2$	16,7 $\pm 0,6$
<b>Citrullin</b> ( $\mu\text{mol/l}$ )	<b>+P+A</b>	15,5 $\pm 1,3$	13,5 $\pm 0,6$	16,5 $\pm 1,3$	15,5 $\pm 2,1$
	<b>+P++A</b>	13,5 $\pm 4,5$	13,5 $\pm 1,9$	16,5 $\pm 3,1$	15,0 $\pm 1,0$
	<b>+P-A</b>	11,8 $\pm 1,0$	16,0 $\pm 5,8$	16,8 $\pm 2,4$	14,7 $\pm 8,1$
	<b>-P+A</b>	25,0* $\pm 2,2$	19,5* $\pm 2,1$	23,5* $\pm 2,7$	26,0* $\pm 1,0$
	<b>-P-A</b>	26,8* $\pm 2,2$	22,0* $\pm 2,9$	22,5* $\pm 1,7$	24,3* $\pm 1,5$
<b>Prolin</b> ( $\mu\text{mol/l}$ )	<b>+P+A</b>	49,8 $\pm 3,0$	53,0 $\pm 2,9$	90,8 $\pm 19,2$	61,0 $\pm 15,6$
	<b>+P++A</b>	47,0 $\pm 10,4$	49,3 $\pm 5,9$	54,3 $\pm 8,3$	52,7 $\pm 9,0$
	<b>+P-A</b>	23,8 $\pm 1,3$	39,0 $\pm 15,6$	51,5 $\pm 9,6$	58,3 $\pm 21,4$
	<b>-P+A</b>	64,8* $\pm 14,4$	43,3* $\pm 1,9$	52,5 $\pm 5,5$	62,0 $\pm 3,5$
	<b>-P-A</b>	64,8* $\pm 5,1$	58,3* $\pm 4,8$	70,8* $\pm 7,7$	66,3 $\pm 1,5$

\* $p < 0,05$  gegenüber der Gruppe mit gleichem Arginin-, aber höherem Proteingehalt

Tabelle 3-4: Serumspiegel der gemessenen Aminosäuren