

Aus dem Institut für Tierpathologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

und

dem Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie
der medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

**Einfluss von Testosteron auf Proteinurie
und Nephropathie in Rattenmodellen
chronischer Nierenerkrankungen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Johannes Unland
Tierarzt aus Euskirchen

Berlin 2018
Journal-Nr.: 3868

Aus dem Institut für Tierpathologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

und

dem Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie
der medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

Einfluss von Testosteron auf Proteinurie und Nephropathie in Rattenmodellen chronischer Nierenerkrankungen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Johannes Unland
Tierarzt aus Euskirchen

Berlin 2018
Journal-Nr.: 3868

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Achim Gruber, PhD
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Reinhold Kreuz
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Jörg R. Aschenbach

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

rats, animal models, kidney diseases, proteinuria, nephropathia, albumins,
testosterone, castration, substitution, flutamide (MeSH)

Tag der Promotion: 12.12.2018

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <<https://dnb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-955-6

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2018

Dissertation, Freie Universität Berlin

D188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2019 Choriner Str. 85 - 10119 Berlin
verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	3
1.1	Geschlechtsdimorphismus bei Nierenerkrankungen	3
2	Literaturübersicht	5
2.1	Der Einfluss von Testosteron auf die Entwicklung von Nierenschäden	6
2.2	Tiermodelle.....	8
2.2.1	Die Munich-Wistar-Frömter-Ratte	8
2.2.2	Die Dahl/SS-Ratte.....	10
3	Material und Methoden	11
3.1	Material.....	11
3.1.1	Chemikalien	11
3.1.2	Puffer und Lösungen.....	12
3.1.3	Enzyme	12
3.1.4	Primer und Sonden für die TaqMan-PCR	12
3.1.5	Labormaterialien	13
3.1.6	Tierbedarf.....	13
3.1.7	Wirkstoffe/Arzneimittel	14
3.1.8	Geräte und Software	14
3.2	Methoden	15
3.2.1	Parentaltierstämme MWF, Dahl/SS und Wistar	15
3.2.2	Haltung	15
3.3	Studiendesigns und Versuchsdurchführung	16
3.3.1	Studiendesigns	16
4	Ergebnisse	31
4.1	Phänotypisierung der Parentalstämme.....	31
4.1.1	Vorstudie 1: Ergebnisse der Bestimmung der physiologischen Testosteronwerte.....	31

4.1.2	Vorstudie 2: Ergebnisse der altersabhängigen Kastration	32
4.1.3	Vorstudie 3: Substitution und Dosisfindung	33
4.1.4	Ergebnisse der Hauptstudie.....	36
4.1.5	Ergebnisse der Organpräparation.....	50
5	Diskussion	58
5.1	Vorstudie 1, Bestimmung der physiologischen Testosteronwerte	59
5.2	Vorstudie 2, altersabhängige Kastration.....	59
5.3	Vorstudie 3, Substitution und Dosisfindung	60
5.4	Hauptstudie	62
6	Zusammenfassung.....	68
7	Summary	70
8	Verzeichnisse	72
8.1	Abbildungen	72
8.2	Tabellen.....	75
8.3	Abkürzungen	76
9	Literaturverzeichnis	79
10	Vorabpublikationen.....	83
11	Danksagung.....	86
12	Selbständigkeitserklärung.....	87

1 Einleitung

1.1 Geschlechtsdimorphismus bei Nierenerkrankungen

In der Vergangenheit wurde auf Grund von experimentellen und klinischen Untersuchungen davon ausgegangen, dass Männer ein höheres Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen und Nierenerkrankungen aufweisen als prämenopausale Frauen im vergleichbaren Alter (Nielsen et al., 2003). Einzelne Studien und Meta-Analysen (Masi et al., 2009; Jafar et al., 2003) demonstrierten, dass Männer im Vergleich zu prämenopausalen Frauen einen höheren Blutdruck entwickeln und dass die Progression chronischer Nierenerkrankungen schneller abläuft.

Die Mechanismen, die für diesen Geschlechtsdimorphismus bei kardiovaskulären und renalen Erkrankungen verantwortlich sind, sind derzeit nicht ausreichend untersucht. Zur Klärung der Pathogenese müssen weiterführende Studien angeschlossen werden, um den Einfluss speziell von Androgenen auf die Progression von Nierenerkrankungen der Ratte zu untersuchen.

Das Forschungsvorhaben soll die Identifizierung verschiedener Faktoren ermöglichen, die in die geschlechtsspezifische Pathogenese der Albuminurie bzw. der Nierenerkrankung bei MWF-Ratten, die sich geschlechtsabhängig unter anderem durch die Entwicklung einer spontanen Albuminurie auszeichnen, involviert sind. Darüber hinaus sollen im direkten Vergleich zum MWF-Stamm die Untersuchungen klären, inwieweit auch ein geschlechtshormoneller Einfluss bei Dahl/SS-Ratten, die im Gegensatz zur MWF-Ratte bei der Ausprägung einer Albuminurie geschlechtsunabhängig sind, auf die Progression und Manifestation der kardiovaskulären und renalen Schädigungen einwirkt. Um diese Schädigungen genauer zuordnen zu können, soll der direkte oder indirekte Einfluss von Testosteron auf verschiedene phänotypische Merkmale untersucht werden. Inwieweit Androgene an der Progression von Nierenerkrankungen oder der Entwicklung einer Hypertonie beteiligt sind, soll durch die Aufteilung der phänotypisch kontrastierenden Rattenstämme MWF und Dahl/SS in verschiedene Versuchsgruppen ermöglicht werden. Neben einer Kontrollgruppe, die einem direkten Ergebnisvergleich der verschiedenen Therapien dienen soll, soll das Gruppensdesign um drei weitere Versuchsgruppen erweitert werden. Eine Orchiektomie-Gruppe (Ox) soll im Altersabschnitt der 10. Woche kastriert werden, eine weitere Gruppe soll nach einer Orchiektomie einer Testosteronersatztherapie

(OxT) unterzogen werden, und eine letzte Gruppe soll sowohl orchietomiert werden, eine Ersatztherapie mit Testosteron erhalten als auch einer Behandlung mit dem Anti-Androgen Flutamid unterzogen werden (OxTF). Die begleitende und abschließende Phänotypisierung soll dazu dienen, ausgewählte Parameter vergleichend zu analysieren. Hierfür sollen der Blutdruck, die Albuminausscheidung, die Serum-Testosteron-Konzentration sowie abschließend, nach erfolgter Präparation, diverse pathologische Parameter wie z.B. das absolute und relative links- und rechtsventrikuläre Herzgewicht und das absolute und relative Nierengewicht erfasst werden.

Weiterführende, auf dieser Studie aufbauende Analysen, könnten die komplexe Pathogenese chronischer Nierenerkrankungen und eine genaue Zuordnung des Einflusses von Sexualhormonen auf die Entwicklung von Nierenschäden klären.

2 Literaturübersicht

Das Ausmaß der Nierenschädigung, die z.B. durch Glomerulonephritis oder eine hypertensive glomeruläre Sklerose verursacht wird, ist bei Männern deutlich erhöht (Baylis et al., 2004). Bei männlichen Patienten mit membranöser Nephropathie, IgA-Nephropathie und polyzystischen Nierenerkrankungen konnte im Vergleich zu weiblichen Patienten eine früher einsetzende Entwicklung von Nierenschäden, eine größere Abnahme der Nierenfunktion sowie eine zunehmende glomeruläre Sklerose nachgewiesen werden (Silbiger et al., 2008). In einer von Jafar et al. publizierten Meta-Analyse (Jafar et al., 2003) wurde erstmalig ein neuer Ansatz zur Untersuchung geschlechtsspezifischer Unterschiede beim Menschen gewählt. In dieser Studie wurden Faktoren berücksichtigt, die eine schnellere Progression von Nierenerkrankungen verursachen und bei weiblichen Patienten oftmals zu einem weniger stark ausgeprägten Krankheitsbild führten als bei männlichen Patienten. Zu den genannten Faktoren gehören z.B. die arterielle Hypertonie und die Proteinurie bzw. Albuminurie. Werden diese basalen Unterschiede in der Bewertung der einzelnen klinischen und histologischen Daten berücksichtigt und entsprechend adjustiert, so konnte festgestellt werden, dass das Risiko für die Entwicklung von Nierenerkrankungen bei Frauen überraschenderweise höher ist als bei Männern. Auch die Progression dieser Erkrankungen ist bei Frauen dieser Meta-Analyse im Vergleich zu Männern beschleunigt. Da in dieser Studie hauptsächlich postmenopausale Frauen untersucht wurden, ist davon auszugehen, dass die Ergebnisse den Daten prämenopausaler Frauen der zuvor genannten Studien nicht zwangsläufig widersprechen müssen. Diese Ergebnisse konnten zum Teil durch Untersuchungen in verschiedenen Tiermodellen, die mit dem Menschen vergleichbare Geschlechtsunterschiede aufweisen, bestätigt werden.

In Tiermodellen für chronische Nierenerkrankungen wurde gezeigt, dass sowohl normotensive als auch hypertensive männliche Ratten im Vergleich zu weiblichen Tieren nicht nur ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Nierenerkrankungen aufweisen, sondern auch eine beschleunigte Progression von Nierenschäden (Reckelhoff et al., 1998; Silbiger et al., 2003; Sandberg et al., 2003; Silbiger et al., 2008). Mit Hilfe von Orchiektomie bei männlichen und der Ovariektomie bei weiblichen Tieren in Verbindung mit entsprechenden Hormonersatztherapien lassen sich geschlechtsspezifische physiologische Mechanismen im Tiermodell manipulieren

und analysieren. Die aus diesen Studien stammenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass bei männlichen Tieren vor allem Geschlechtshormone für die größere Suszeptibilität gegenüber progressiven Nierenschäden verantwortlich sind (Neugar-ten et al., 2002). In einer Studie von Yanes et al. wurden normotensive Ratten mit Dihydrotestosteron behandelt und anschließend die Reabsorption von Natrium über einen Angiotensin II-vermittelten Mechanismus und der Blutdruck gemessen. Beide Parameter zeigten einen Anstieg unter der beschriebenen Behandlung (Yanes et al., 2008). Kienitz et al. fassten die Ergebnisse verschiedener Studien zusammen und konnten keine einheitlichen Ergebnisse finden, die den Einfluss von Testosteron auf den Bluthochdruck beschrieben. Lediglich teilweise Übereinstimmung gab es beim Testosteron als Verursacher von Vasokonstriktion, Atherosklerose und als Stimulator des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems (Kienitz et al., 2008). Auch weitere Studien demonstrierten, dass Androgene, wie Testosteron, in die Pathogenese von Nierenerkrankungen entscheidend involviert sein können (Hayward et al., 2001; Sabolić et al., 2007). Es ist jedoch nicht ausreichend geklärt, ob Testosteron allein, der Mangel an Östrogenen oder die Kombination beider Geschlechtshormone für den sexuellen Dimorphismus, der bei der Progression von Nierenerkrankungen bei Ratten wie auch bei Menschen beobachtet wurde, beteiligt sind.

2.1 Der Einfluss von Testosteron auf die Entwicklung von Nierenschäden

Die Ergebnisse verschiedener Studien weisen darauf hin, dass Androgene, wie Testosteron, entscheidend in die Progression kardiovaskulärer Erkrankungen involviert sind. Untersuchungen der Blutdruckentwicklung beim Menschen zeigten bei Männern einen höheren mittleren Blutdruck als bei prämenopausalen Frauen des gleichen Alters und damit ein höheres Risiko für die Progression und Manifestation kardiovaskulärer Erkrankungen (Lopez-Ruiz et al., 2008). Dabei kommt es laut einer Studie von Raile et al. bei männlichen Patienten im Vergleich zu weiblichen Patienten zu einer stärkeren Abnahme der Nierenfunktion und damit zur beschleunigten Ausbildung einer Proteinurie und Albuminurie (Raile et al., 2007). Neben diesen Parametern wurden zusätzlich auch noch andere Faktoren, wie die Entwicklung eines Diabetes, der Blutdruck als Risikofaktor für die Entwicklung von Nierenschäden oder der Blut-Lipid-Spiegel, untersucht. Die Ausprägung einer Makroalbuminurie in dieser Studie war jedoch als einziges mit dem männlichen Geschlecht als Krankheitsfaktor in Zusam-

menhang zu bringen (Raile et al., 2007). Auch in anderen Studien kommt es bei männlichen Patienten im Vergleich zu weiblichen Patienten zu einer schnelleren Ausprägung von Nierenerkrankungen; vermehrt festgestellt werden konnte auch eine glomeruläre Sklerose (Esposito et al., 2007) oder eine chronische Glomerulonephritis (Douville et al., 2009). Silbiger et al. stellten in ihrer Studie fest, dass Männer schneller einem Nierenversagen mit deutlichen Anzeichen einer polyzystischen Nierenerkrankung, einer Immunglobulin-A Nephropathie und auch einer membranösen Nephropathie sowie einer chronischen Nierenerkrankung unklarer Ätiologie unterliegen als Frauen gleichen Alters (Silbiger et al., 2008). Es ist bislang nicht hinreichend geklärt, welche geschlechtshormonellen Mechanismen für einen sexuellen Dimorphismus bei Nierenerkrankungen des Menschen verantwortlich sind. Zurzeit gibt es Hinweise darauf, dass eine Interaktion zwischen Geschlechtshormonen und der Niere eine entscheidende Rolle spielen könnte. In einer Studie (Nielsen et al., 2003) konnte bei 13 Monate alten, weiblichen Wistar-Ratten nachgewiesen werden, dass eine Ovariectomie weiblicher Tiere zu einem starken Rückgang der Reservekapazität und der tubulären Exkretionsfunktion der Niere führt, die durch die Gabe von Östrogen verhindert werden konnte. Dieser Funktionsverlust wird möglicherweise durch ein erniedrigtes, intrarenales Stickstoffmonoxid/Angiotensin II-Verhältnis (NO/Ang II-Ratio) verursacht. Laut Nielsen et al. steigert Östrogen die Bioaktivität von Stickstoffmonoxid, welches in Endothelzellen vorhanden ist, durch eine vermehrte Bildung, eine gesteigerte Synthese-Expression oder einer Verminderung des Abbaus. Hinzu kommt, dass Östrogene mit dem Renin-Angiotensin-System interagieren und unter anderem das Angiotensin-Converting-Enzym in seiner Funktion beeinträchtigen (Nielsen et al., 2003).

Einige Tiermodelle, wie die Dahl S-Ratte (DS), die Imai- und die Munich Wistar-Ratte, weisen mit dem Menschen vergleichbare Geschlechtsunterschiede in Bezug auf Nierenerkrankungen auf (Sakemi et al., 1994; Reckelhoff et al., 2001; Yanes et al., 2008). In einer tierexperimentellen Studie mit der DS-Ratte konnte gezeigt werden, dass Androgene bei männlichen Tieren einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung von Nierenschäden und Hypertonie durch die Hochregulierung des intrarenalen Renin-Angiotensin-Systems (RAS) nehmen (Reckelhoff, 2001). Dabei entwickeln männliche, kastrierte Ratten gegenüber weiblichen Tieren nach Hochsalzgabe zu einem früheren Zeitpunkt eine ausgeprägte Proteinurie, glomeruläre Schäden, eine altersbedingte Glomerulosklerose und eine erniedrigte Glomeruläre

Filtrationsrate (GFR) (Sakemi et al., 1994; Reckelhoff et al., 2001; Yanes et al., 2008).

Untersuchungen an Munich Wistar-Ratten ergaben, dass eine Kastration männlicher Tiere vor der Entwicklung einer Albuminurie schützt, eine Ovariectomie weiblicher Tiere jedoch keinen Einfluss auf die Nierenerkrankungen nimmt (Reckelhoff et al., 1998). Bei weiblichen SHR-Ratten wurde nach Testosterongabe ebenfalls ein Albuminurieanstieg festgestellt (Sakemi et al., 1994). Aus diesen Ergebnissen ist abzuleiten, dass Östrogen keine protektive Funktion bei der Entwicklung altersabhängiger glomerulärer Schäden bei weiblichen Tieren einnimmt (Reckelhoff et al., 1998). Die Kastration männlicher Munich Wistar-Ratten lässt dagegen einen günstigen Einfluss auf die Entwicklung der Albuminurie erkennen (Yanes et al., 2008). Im Gegensatz dazu konnten andere Studien demonstrieren, dass nicht nur die Orchiektomie, sondern auch die Gabe von Östrogenen bei männlichen Otsuka-Long-Evans-Tokushima-Fatty-Ratten einen protektiven Effekt auf die Entwicklung der Glomerulosklerose hat und progressive Nierenschäden zu verbessern vermag (Tomiyoshi et al., 2002).

Insgesamt ist aus diesen Studien abzuleiten, dass sowohl Östrogene als auch Androgene, wie Testosteron, im Laufe des Lebens entscheidend in die Nierenfunktion eingreifen und eine wesentliche Rolle bei der Entwicklung von Nierenschäden zu spielen scheinen.

2.2 Tiermodelle

2.2.1 Die Munich-Wistar-Frömter-Ratte

Männliche Munich-Wistar-Frömter-Ratten (MWF-Ratten) sind charakterisiert durch eine progressiv verlaufende Albuminurie und eine moderate Hypertonie. Sie unterliegen dabei im direkten Vergleich zu den weiblichen Tieren einem sexuellen Dimorphismus (Schulz et al., 2008); sie zeigen eine deutlich beschleunigte Progression der Albuminurie mit nachfolgender Entwicklung einer chronischen Nierenschädigung wie Glomerulosklerose und interstitieller Fibrose (Schulz et al., 2008).

Es ist zurzeit nicht geklärt, warum bei männlichen MWF-Ratten im Vergleich zu weiblichen Tieren diese Progression signifikant forciert ist, obwohl bei beiden Geschlech-

tern eine ähnliche Nephronreduktion von 30-50 % vorliegt (Fassi et al., 1998; Schulz et al., 2008;).

Zur Klärung der Pathogenese der Albuminurie bei MWF-Ratten wurden in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Kartierungsuntersuchungen durchgeführt und Kandidatengeregionen für Albuminurie identifiziert. In zwei verschiedenen Kosegregations- und Kopplungsanalysen mit den beiden Referenzstämmen Lewis und Spontaneously Hypertensive Rat (SHR) konnten insgesamt 11 verschiedene Albuminurie-Loci detektiert werden (Schulz et al., 2002; Schulz et al., 2003). Die Ergebnisse belegen, dass die Albuminurie beim MWF-Stamm durch eine Vielzahl genetischer Loci beeinflusst wird. Von besonderer Bedeutung ist der Albuminurie-Locus auf Rattenchromosom 6 (RNO6). Die Ergebnisse zeigen, dass RNO6 die frühzeitige genetische Determinierung der Albuminurie-Manifestation bei jungen Tieren und die nachfolgende Nierenschädigung im Sinne einer Nierenfibrose bei adulten Tieren beeinflusst (Schulz et al., 2002; Schulz et al., 2003). Ein weiterer wichtiger Locus liegt auf Rattenchromosom 8 (RNO8), der eine hochsignifikante Kopplung zur Albuminurie bei adulten Tieren ab der 14. Woche aufweist (Schulz et al., 2003). Um die funktionelle Bedeutung von RNO6 und RNO8 näher zu untersuchen und die den Phänotypen zugrunde liegenden Gene zu identifizieren, wurden in der Arbeitsgruppe konsome Stämme gezüchtet. Dazu wurde RNO6 bzw. RNO8 des kontrastierenden Albuminurie-resistenten SHR-Stamms in den isogenetischen Hintergrund der MWF-Ratte transferiert. In den erfolgreich etablierten konsomen Stämmen MWF-6^{SHR} und MWF-8^{SHR} (Schulz et al., 2007; Schulz et al., 2008; Schulz et al., 2008) konnte dadurch der Einfluss der beiden Albuminurie-assoziierten Loci direkt analysiert werden. Die phänotypische Charakterisierung männlicher MWF-Tiere verglichen mit SHR-Tieren zeigt eine 55fach erhöhte Albuminausscheidung in der 8. Woche. Mit der Übertragung von SHR-RNO6 in den MWF-Stamm konnte dieser frühe Anstieg der Albuminurie vollständig eliminiert werden, wie durch Analysen des entsprechenden konsomen Stamms MWF-6^{SHR} belegt wurde. Durch Übertragung von SHR-RNO8 beim konsomen Stamm MWF-8^{SHR} kam es ebenfalls zu einer starken, hoch signifikanten Suppression der Albuminurie. Im Altersverlauf bis zur 24. Woche ließ sich bei männlichen Tieren beider konsomer Stämme nur ein moderater Anstieg der Albuminausscheidung feststellen, während es bei MWF-Tieren mit steigendem Alter zu einer starken Progression der Albuminurie kommt. Histologische Parameter wie Glomerulosklerose, tubulointerstitielle Schädigungen und renale interstitielle Fibrose ergaben eine signifi-

kante Verbesserung beim konsomen MWF-6^{SHR} im Vergleich zu MWF (Schulz et al., 2007; Schulz et al., 2008). Interessanterweise konnte bei weiblichen Tieren beider konsomer Stämme eine analoge Albuminurie-Reduktion beobachtet werden. Das lässt darauf schließen, dass gleiche genetische Mechanismen für die Albuminurie-Entstehung in beiden Geschlechtern verantwortlich sind (Schulz et al., 2008). Trotz ähnlicher genetischer Mechanismen bei beiden Geschlechtern der MWF-Ratte, ist der sexuelle Dimorphismus bei der Albuminurie-Entwicklung offensichtlich auf zusätzliche nicht-genetische Faktoren wie den vermeintlich schädlichen Einfluss von Geschlechtshormonen zurückzuführen.

2.2.2 Die Dahl/SS-Ratte

Die Dahl/SS-Ratte zeichnet sich, ähnlich der phänotypischen Ausprägung der MWF-Ratte, durch eine im frühen Entwicklungsstadium auftretende, salz-sensitive Hypertonie aus. Anders als bei der MWF-Ratte tritt die induzierte Hypertonie jedoch bereits ab einer Konzentration von 4 % NaCl auf. Eine deutlich ausgeprägte Albuminurie mit nachfolgender Nierenbeeinträchtigung durch vaskuläre, tubulointerstitielle und glomeruläre Schäden ist im Altersverlauf erkennbar (Siegel et al. 2003; Siegel et al. 2004; Schulz et al., 2012). Die auftretende Albuminurie ist bei beiden Geschlechtern gleich ausgeprägt und auch ohne erkennbare strukturelle Schädigungen und unabhängig von einer Salz-Diät bereits im Alter von 4 Wochen messbar.

Beide Rattenmodelle, die MWF und die Dahl/SS-Ratte, entwickeln eine spontane Albuminurie und Hypertonie. Bei der MWF-Ratte besteht ein sexueller Dimorphismus, durch den männliche Tiere einen schnelleren und progressiveren Albuminurie-Verlauf bei Hypertonie aufweisen als weibliche Tiere. Kontrastierend dazu ist der Dahl/SS-Stamm, bei dem beide Geschlechter einem ähnlichen Krankheitsverlauf unterliegen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Substanz	Firma
Aceton (>95%)	J.T. Baker
Chloroform (≥99%)	Sigma-Aldrich
Diethylpyrocarbonat (DEPC) (97%)	Sigma-Aldrich
dNTPs (2,5 mM)	Rapidozym
Essigsäure (100 %)	Merck
Ethanol (70%, 80%, 96%, 100 %)	J.T. Baker
Hämatoxylin	Meyers
Natrium-4-hydroxymercuriobenzoat (Best. Nr. 8.20308)	Sigma
Kaliumchlorid (≥99%)	Sigma
Methanol (>99,8%)	J.T. Baker
Natriumchlorid (0,9%)	Fresenius Kabi
Neo-Clear® (Best.Nr. 109843)	Merck
Pepstatin A (≥90%)	Sigma
1,10-Phenanthrolinmonohydrat (≥99,5%)	Sigma-Aldrich
Phenylmethansulfonylfluorid (≥98,5%)	Sigma
PAS, Perjodsäure, Schiffsreagenz (Best.Nr. 822288)	Merck
Sirius Rot F3BA	Chroma
Albumin, Rat; Polyclonal Antibody, Anti-Rat	ICN
Diethylmalonsäure (98 %)	Aldrich
Gelatine (75 bloom)	Sigma
Rattenserum-Albumin (RSA) (≥99%)	Sigma
5x Reaction buffer (Best.Nr. EP0442)	Fermentas
Taqman 2x Universal PCR Mastermix (Best.Nr. 444004.)	Applied Biosystems
3,3',5,5' Tetramethylbenzidin-Dihydrochlorid (TMB-)-Tabletten	Sigma
Tween 20 (100%)	BioRad
Wasserstoffperoxid (30 %)	Sigma
Di-Natrium-EDTA-Dihydrat (98,5-101,5%)	Sigma-Aldrich
Kaliumhydroxid	Sigma-Aldrich
Isofluran (Forene)	Abbott

3.1.2 Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Bestandteile	Zusammensetzung
Heparinlösung (50 U/ml)	Heparin (25000 I.E.) Natriumchlorid-Lösung 0,9 %	0,5 ml 49,5 ml
Methacarn	Methanol Chloroform Essigsäure	60 % 30 % 10 %
Coating solution	Rattenserum-Albumin Natriumhydrogencarbonat	0,2 mg/ml 0,1 M
Puffer A	Diethylmalonsäure Natriumchlorid Di-Natrium-EDTA-Dihydrat Tween 20 ad 800 ml Aqua bidest. pH 7,4 mit 1 M Kaliumhydroxid ad 1 l Aqua bidest. Gelatine	20,0 mM 150,0 mM 0,1 mM, pH 8,0 0,1 % 5 g
Rattenserum-Albumin-Stock-Lösung	Rattenserum-Albumin Natriumhydrogencarbonat	1,0 mg/ml 0,1 M
Substrat	3,3',5,5' TMB Aqua bidest. Puffer A Wasserstoffperoxid 30 %	2 Tabletten 10 ml 10 ml 4 µl

3.1.3 Enzyme

Enzym	Aktivität	Firma
Random Hexamer Primer	6 A ₂₆₀ U/ml	Fermentas Life Sciences
Reverse Transkriptase	20 U/µl	Fermentas Life Sciences
RNAse Inhibitor	20 U/µl	Fermentas Life Sciences

3.1.4 Primer und Sonden für die TaqMan-PCR

Genkürzel	Sequenz	Firma
Ngal	F-GCCCCTTGGTTCTTCCGTAC R-GGCCGACACTGACTACGACC	TIB ® Molbiol
18S	F-GGAGCCTGCGGCTTAATTT R-CAACTAAGAACGGCCATGCA	TIB ® Molbiol
Kim1	F-ATTGTTGCCGAGTGGAGAT R-TGTGGTTGTGGGTCTTGTAGT	TIB ® Molbiol

3.1.5 Labormaterialien

Artikel	Firma
Bepanthen Augensalbe	Bayer
Einwegspritzen aus Kunststoff (1-20 ml)	B. Braun
Histoacryl	B. Braun
Histosette II Fisherbrand	Scientific Fisher
Kanülen (21 Gauge, 23 Gauge)	B. Braun
Mikrohämatokrit Röhrchen	Brand
Nahtmaterial, resorbierbar, Vicryl	Ethicon
Plasmaröhrchen (Lithium-Heparin)	Kabe
Polyethylenschlauch, medizinisch	RCT, Smiths
Reaktionsgefäße Safe-Lock	Eppendorf
Restrainer	Ebeco
Scientific Paraffin Typ 6, Typ 9	Richard Allan
Schrumpfschlauch	Conrad
Sesamöl raffiniert	Spinnrad
Skalpell Gr. 20/21	Feather
Standardpipetten	Eppendorf
Szintillationsgefäße aus Glas	Packard
Szintillationsgefäße aus Kunststoff	Packard
Vacutainer K ₂ -EDTA	BD
Vacutainer SST™ II Advance	BD
Thermo-Fast 96-Mikrotiterplatten (ohne Rand)	ABgene
Präparationsbesteck	Aesculap
Wattestäbe	Heinz Herenz

3.1.6 Tierbedarf

Artikel	Firma
Alleinfuttermittel für Ratten	Ssniff
Lochzange für Labortiere	Esculap
Makrolonkäfig Typ III und Typ IV	Ebeco
Stoffwechselkäfige für Ratten bis 300 g	Tecniplast

3.1.7 Wirkstoffe/Arzneimittel

Wirkstoff/Produkt	Firma
Atipamezol (≥98%)	Pfizer
Carprofen (50mg/ml)	Pfizer
Flumazenil – hameln (0,5mg/ml)	Inresa
Fentanyl (0,1mg)	Janssen – Cilag
Flutamid (≥98%)	LKT Laboratories
Medetomidin (1mg/ml)	Pfizer
Midazolam (2mg/ml)	Ratiopharm
Naloxon (0,4mg)	Delta Select
S – Ketamin (KetanestS®) (5mg/ml)	Pfizer
Testosteron Propionat Pellet Cat.No. NA-211, 150mg, 90 d Wirkzeit	Innovative Research of America
Xylazin (Rompun®) 2 %	Bayer

3.1.8 Geräte und Software

Artikel	Firma
ABI prism 7000 Sequence Detection System	Applied Biosystems
Analytiksoftware PASW 18	SPSS
Brutschrank B12	Heraeus Instruments
Blutdrucktransducer invasiv	ADInstruments
Blutdrucktransducer Tail-Cuff, MLT125/R + ML125 NIBP Controller	ADInstruments
Bridge Amplifier, Scope Software v3.6.13	ADInstruments
Feinwaage AC210S	Sartorius
Kühlzentrifuge Varifuge 3.0R	Heraeus Sepatch
Lab-Chart v.7	ADInstruments
Magnetrührer mit Heizfunktion MR2002	Heidolph
UltraTurrax T25	Janke&Kunkel
Powerlab 4/26 4 Channel Recorder	ADInstruments
Photomikroskop Axiophot	Carl Zeiss
Rotlichtlampe	MLW
Rotationsmikrotom HM 355S	Thermo Fisher
Shandon Citadel™ 1000	Thermo Fisher
Tierwaage	Sauter

Wärmebox	Werkstatt CBF
Mikrotiterplattenschüttler, MS1 Minishaker	Roth
PCR-Maschine, PTC-100	MJ Research
Tischzentrifuge 5415 R	Eppendorf
ELISA-MRX-Plate-Reader	Dynex

3.2 Methoden

3.2.1 Parentaltierstämme MWF, Dahl/SS und Wistar

1996 übernahm die Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Reinhold Kreutz, Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Charité Mitte (CCM), Tiere der MWF/_{ztm}-Kolonie des Zentralen Tierlaboratoriums der Medizinischen Hochschule in Hannover. Nach der Etablierung der eigenen Inzuchtkolonie durch eine konsequente Bruder-Schwester-Verpaarung über mehrere Generationen, wurde die Bezeichnung der Tiere in der Folge zuerst in MWF/_{Rkb} und später in MWF/FubRkb (MWF) geändert (Laborcode Rkb, <http://dels.nas.edu/ilar/>). Der in dieser Studie verwendete Inzuchtstamm Dahl/SS wurde ursprünglich als Dahl/SS/Jr 1996 von Harlan Sprague-Dawley (Indianapolis, IN, USA) übernommen und in der Arbeitsgruppe als eigene Kolonie mit der Bezeichnung Dahl/SS/Rkb etabliert (Laborcode Rkb, <http://dels.nas.edu/ilar/>). In der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin der Charité – Universitätsmedizin Berlin (FEM) wurden Wistar-Ratten von Charles River (Charles River Laboratories International, Inc.) bezogen und als eigene Inzuchtkolonie weitergeführt. Die Erhaltungszuchten der jeweiligen Rattenstämme erfolgten in der FEM der Charité. Alle in der vorliegenden Arbeit durchgeführten tierexperimentellen Studien wurden vom zuständigen Landesamt für Gesundheit und Soziales (LaGeSo, Turmstraße 21, 10559 Berlin) unter den Versuchstiernummern G 0085/10, O 0052/03 und O 0189/02 registriert und genehmigt.

3.2.2 Haltung

Sämtliche in dieser Studie verwendeten Tiere wurden in der FEM unter standardisierten und kontrollierten Bedingungen gehalten und gezüchtet. Je nach Geschlecht getrennt wurden maximal 4 Ratten in Makrolon Typ IV-Käfige verbracht und unter konstanten Bedingungen gehalten. Diese Bedingungen waren durch eine gleichbleibende Raumtemperatur von 22 °C, eine Luftfeuchtigkeit von 60 %, einen freien Zugang zu Futter und Wasser und einen 12stündigen Tag/Nacht-Rhythmus, gesteuert durch eine automatische Lichtanlage, definiert.

Im Alter von 4 Wochen wurden die Jungtiere von den Elterntieren abgesetzt und systematisch fortlaufend markiert. Dazu wurde mittels einer Lochzange bei den Tieren eine Ohrmarkierung mit fortlaufender Tiernummer vorgenommen.

3.3 Studiendesigns und Versuchsdurchführung

3.3.1 Studiendesigns

3.3.1.1 Vorstudie 1: Evaluierung der Serum-Testosteronspiegel bei den Parentalstämmen

Für die Evaluierungsstudie wurde zunächst zu verschiedenen Zeitpunkten in der 4., 8., und 12. Woche der Testosteronspiegel im Serum bei männlichen Tieren der Stämme MWF und Dahl/SS analysiert (Abb. 1). Da die hierfür zu entnehmende Menge Blut für Tiere im Alter von 4 Wochen eine zu hohe physische Belastung darstellt, wurden die Versuchsgruppen der Stämme MWF und Dahl/SS vor dem Beginn der 4. Woche geteilt. Einer Teilgruppe je Stamm (n=5-6 Tiere/Stamm) wurde für die Testosteronspiegelbestimmung der 4. Woche Blut entnommen und zur Analyse an Synlab.vet Labor Berlin GmbH (Turmstraße 21, 10559 Berlin) versendet. Diese Gruppen wurden nach der Blutentnahme aus dem Versuch genommen. In der zweiten Gruppe (n=6-9 Tiere/Stamm) wurden die Testosteronbestimmungen in der 8. und 12. Woche vorgenommen.

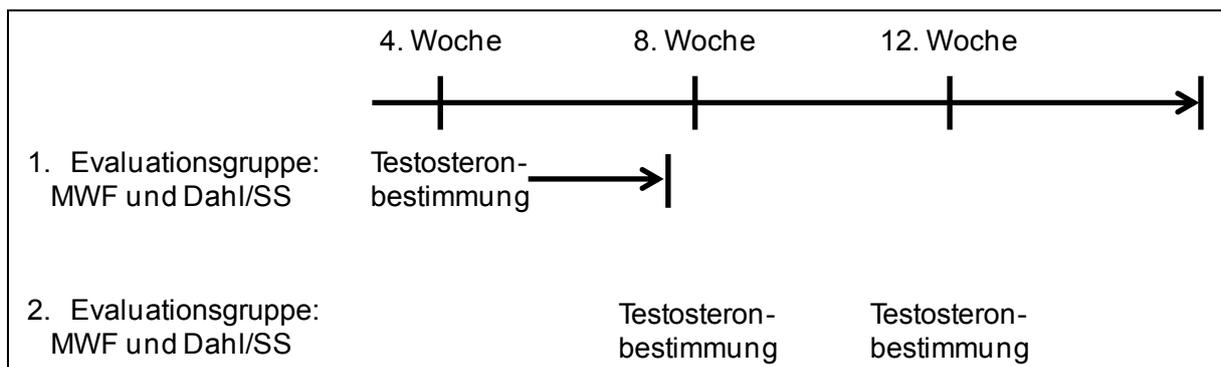


Abb. 1: Vorstudie 1: Phänotypisierungsprotokoll der Evaluierungsstudie für die Testosteronbestimmung in der 4., 8. und 12. Woche bei den Rattenstämmen Dahl/SS und MWF.

3.3.1.2 Vorstudie 2: Untersuchung der Einflussnahme altersabhängiger Kastrationen auf das Krankheitsbild der Albuminurie

In einer Vorstudie wurde der positive Effekt einer Kastration bei MWF- und Dahl/SS-Ratten zu zwei verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Dazu wurden junge MWF- und Dahl/SS-Tiere der 4. Woche und adulte Tiere der 14. Woche kastriert, um zum einen die Reduzierung der Albuminurie bei juvenilen Tieren zu untersuchen und zum anderen den Effekt einer späteren Kastration auf das Krankheitsbild der Albuminurie zu ermitteln, hierfür wurde anschließend bis zur 24. Woche die Albuminausscheidung über den Urin in zweiwöchigem Abstand gemessen (Abb. 2). Eine weitere Gruppe von 10 Dahl/SS-Tieren wurde zur Bestimmung der Albuminurie ab der 14. Woche ohne Behandlung herangezogen, um Vergleichswerte unbehandelter Tiere für eine spätere Beurteilung zu erhalten.

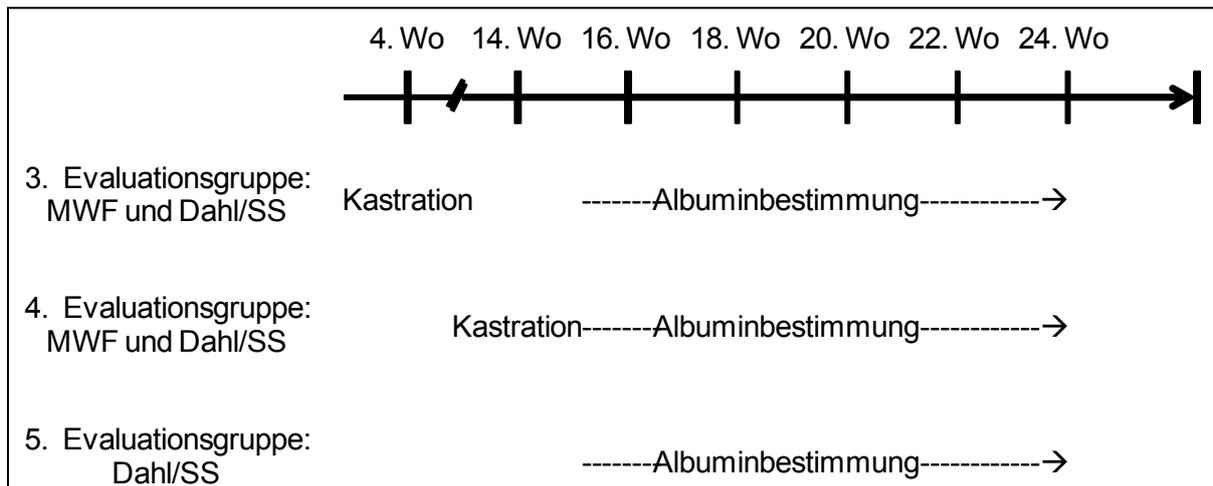


Abb. 2: Vorstudie 2: Untersuchung des altersabhängigen Effekts einer Kastration in der 4. und 14. Woche auf die Albuminausscheidung im 24h-Urin bei den Stämmen MWF und Dahl/SS.

3.3.1.3 Vorstudie 3: Wirksamkeitsprüfung der Testosteron-Pellet-Implantation bei den Parentalstämmen

Nachdem der Testosteron-Wert der Tierstämme MWF und Dahl/SS ermittelt war, wurde in einer dritten Vorstudie die Wirksamkeit der Testosteron-Pellets und der Implantationsmethode durch eine Hormon-Ersatz-Therapie getestet. Nach Kastration der Tiere in der 4. Woche wurden, wie unter Punkt 3.3.1.4.3 beschrieben wird, die Pellets in einer Versuchsgruppe subkutan und in einer weiteren Versuchsgruppe intraperitoneal, jeweils laut Herstellerangaben, implantiert. Die Pellets wurden hierfür in

der 6. Woche implantiert, um die Wirksamkeit der Kastration durch eine zeitgleiche Messung des Testosteron-Wertes kurz vor der Implantation überprüfen zu können. Die Gruppengröße betrug beim MWF-Stamm 9 Tiere für die intraperitoneale und 10 Tiere für die subkutane Implantation. Bei den Dahl/SS-Ratten kam lediglich die subkutane Implantation bei 12 Tieren zum Einsatz. Da es sich bei dieser Vorstudie lediglich um eine Wirksamkeitsprüfung handelte wurde auf eine zweite Gruppeneinheit bei den Dahl/SS-Tieren verzichtet. Zu verschiedenen Zeitpunkten (Abb. 3), im Intervall von jeweils zwei Wochen, wurden die Testosteron-Werte und damit die Wirksamkeit der Pellets bzw. der Implantationsmethoden von der 8. bis zur 18. Woche getestet. Parallel dazu wurde der Albuminurie-Wert im 24h-Urin gemessen.

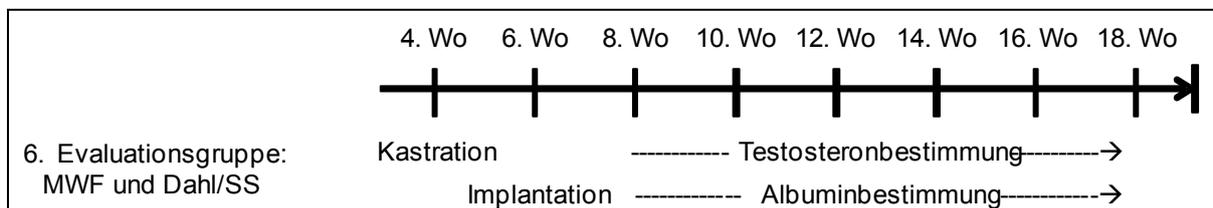


Abb. 3: Vorstudie 3: Wirksamkeitsprüfung der Hormon-Ersatz-Therapie nach Kastration in der 4. Woche bei MWF und Dahl/SS.

3.3.1.3.1 Untersuchung geschlechtshormoneller Einflüsse auf die Nierenschädigung der Parentalstämme MWF, Dahl/SS und Wistar

Die drei verschiedenen Stämme, Wistar als Referenzstamm, MWF und Dahl/SS als zu untersuchende Stämme, wurden in jeweils drei Gruppen aufgeteilt, eine Schein-Gruppe, eine Orchiectomie-Gruppe (Ox-Gruppe) und eine Orchiectomie+Testosteronpellet+ Flutamid- Gruppe (OxTF-Gruppe). Der Untersuchungs- bzw. Behandlungszeitraum erstreckte sich von der 10. bis zur 18. Woche mit einem Untersuchungsintervall von zwei Wochen. Auf Grund der Erkenntnisse aus der zweiten Vorstudie wurden die Tiere aller Versuchsgruppen in der 10. Woche kastriert bzw. einer Scheinkastration unterzogen, da adulte Tiere eine höhere Fitness/ Operationsfähigkeit aufweisen als Tiere im juvenilen Stadium. In den darauffolgenden zweiwöchigen Untersuchungsintervallen wurden der Testosteronwert im Serum und der Albuminwert im Urin, sowie der Blutdruck mittels der nicht-invasiven Tail-Cuff-Methode in allen Gruppen ermittelt. Die Tiere wurden mit der Beendigung der 18. Lebenswoche aus dem Versuch genommen und final präpariert. Die Tiere der OxTF-Gruppe wurden zusätzlich zur Implantation des Testosteron-Pellets während der

Kastration über den kompletten Versuchszeitraum von 8 Wochen täglich mit 30 mg/kg Flutamid, einem selektiven Androgenrezeptor-Antagonisten, s.c. behandelt.

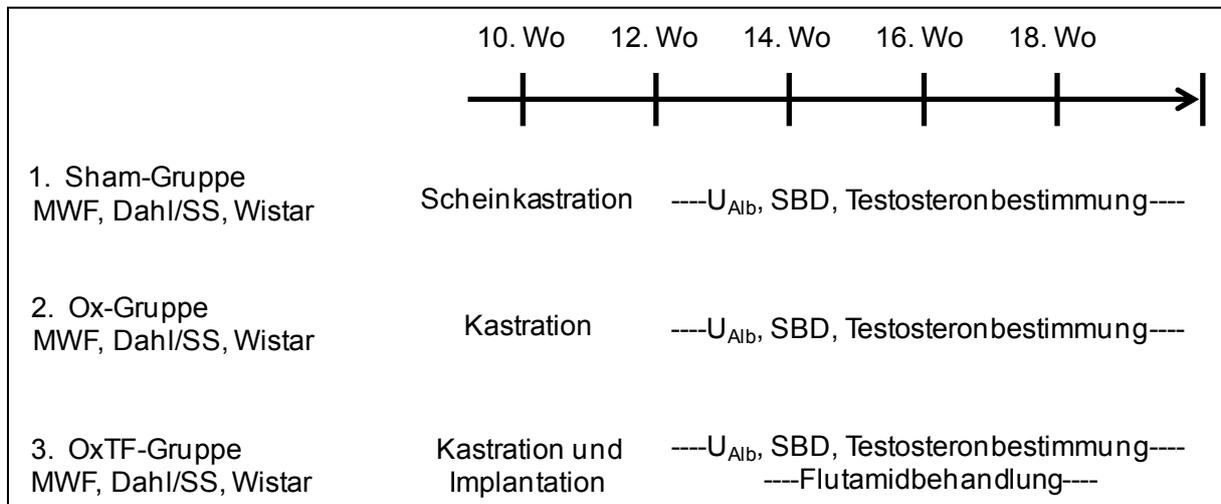


Abb. 4: Zeitprotokoll für die Versuchsdurchführung zur Untersuchung geschlechtshormoneller Einflüsse auf die Nierenschädigung von der 10.-18. Woche der Stämme MWF, Dahl/SS und Wistar in den Versuchsgruppen Sham, Ox und OxTF. U_{Alb}, Messung der Albuminausscheidung über den Urin; SBD, Messung des systolischen Blutdrucks

3.3.1.4 Versuchsdurchführung

3.3.1.4.1 Allgemeine OP-Vor- und Nachbereitung

In Vorbereitung auf eine Operation wurden die Tiere ca. 30 Minuten vorher mit 5 mg/kg Körpergewicht (KG) s.c. Carprofen behandelt. Das Schmerzmittel wurde hierbei in die Nackenfalte injiziert. Die Narkose wurde ebenfalls s.c. verabreicht und setzte sich wie folgt zusammen: 0,005 mg/kg Fentanyl, 2 mg/kg Midazolam und 0,15 mg/kg Medetomidin. Die Augen wurden mit einer Bepanthen Nasen- und Augensalbe gegen Austrocknung geschützt und die Zunge wurde, um ein Verschlucken zu verhindern, in den linken Mundwinkel gezogen. Das entsprechende Hautareal wurde mit Alkohol befeuchtet, mit einem Einmalrasierer rasiert und mit Jodseife gereinigt und desinfiziert. Mit sterilen Tüchern konnte auf diese Weise ein OP-Feld vorbereitet werden. Die Narkosetiefe wurde durch einen Zwischenzehenreflextest überprüft. Nach der Operation wurde die Narkose aktiv durch die Gabe einer Antagonisierung aufgehoben. Die Mischspritze enthielt eine Dreifachkombination aus Naloxon/Flumazenil/Atipamezol im Mischungsverhältnis 0,12 mg/kg Naloxon, 0,2 mg/kg Flumazenil und 0,75 mg/kg Atipamezol. Die Tiere wurden alle 24 Stunden an den

drei auf die OP folgenden Tagen mit Carprofen behandelt und das Operationsgebiet sowie das Gewicht wurden kontrolliert, um einen unphysiologischen Gewichtsverlust zu erkennen.

3.3.1.4.2 Testosteronbestimmung/Blutentnahme

Die Bestimmung der Testosteronwerte im Rattenserum wurde durch das Labor Synlab.vet (Synlab.vet Berlin, Turmstraße 21, 10559 Berlin) vorgenommen. Die Blutentnahme erfolgte retrobulbär während einer Inhalationsnarkose mit Isofluran. Mittels einer Glaskapillare (Mikrohämatokrit-Röhrchen) wurde im medialen Augenwinkel unter drehender Bewegung der hinter dem Bulbus liegende Venenplexus eröffnet und das dann in die Kapillare austretende Blut direkt in einen Vacutainer SSTTM II Advance überführt. Nach einer 30minütigen Wartezeit wurden die Vacutainer bei 2000 x g für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Das im Überstand befindliche Serum wurde in ein Eppendorf-Probengefäß überführt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert.

3.3.1.4.3 Implantation eines Testosteron-Propionat-Pellets

3.3.1.4.3.1 Intraperitoneale Implantation

Das Testosteron-Pellet mit einer Konzentration von 150 mg/Pellet und einer vom Hersteller angegebenen Wirkungsdauer von 90 Tagen wurde wie folgt implantiert. Die Ratten wurden wie in Kapitel 3.3.1.4.1. beschrieben auf die Operation vorbereitet. Bei dieser Operations-Vorgehensweise wurden die Ratten auf dem Rücken liegend fixiert. Auf einer Fläche von ca. 4 cm x 4 cm entlang der Linea alba fingerbreit caudal des Sternums wurde ein Op-Feld vorbereitet. Die Haut wurde auf einer Länge von ca. 2 cm mittels eines Skalpells durchtrennt. Nach dem Durchschneiden des Musculus rectus abdominis und des Peritoneums parietalis wurde das Testosteron-Pellet ohne Kontakt zur Operationsumgebung direkt in den Bauchraum eingebracht und bis ca. 3 cm caudal des caudalen Wundrandes eingeschoben. Hierfür wurde ein Wundspreizer verwendet. Nach dem Verschließen der Wunde entlang der Linea alba durch eine fortlaufende Muskelnäht nach REVERDIN mit einem resorbierbaren Faden wurde die Haut intracutan vernäht. Die Operation wurde wie unter Punkt 3.3.1.4.1. beschrieben durch Injektion der Antagonisierung beendet.

Die zu dieser Operation gehörige Scheingruppe wurde mit Ausnahme der eigentlichen Implantation der gleichen Behandlung unterzogen. Nach dem Eröffnen der

Bauchhöhle wurde diese wieder verschlossen und die Narkose beendet. Die Tiere erhielten ebenfalls die Schmerzbehandlung wie unter Punkt 3.3.1.4.1. beschrieben.

3.3.1.4.3.2 Subkutane Implantation

Der Hautschnitt erfolgte bei gleicher Vorbehandlung bzw. Vorbereitung (3.3.1.4.1.) an der rechtslateralen Seite des Halses der Ratten. Es wurde mit einer stumpfen Knopfkanüle eine Hauttasche gebildet und das Testosteron-Pellet dort abgelegt. Die Wunde wurde nach dem gleichen Prinzip verschlossen wie bei intraperitonealer Implantation.

Auch hier wurde äquivalent eine Scheinoperation durchgeführt. Dazu wurde die entsprechende Gruppe in Narkose gelegt, die rechte Halsseite rasiert, zur Operation vorbereitet und nach dem Hautschnitt und der subcutanen Taschenbildung mittels einer stumpfen Pinzette die Wunde wieder verschlossen sowie die Narkose beendet.

3.3.1.4.4 Flutamidinjektion

Die subkutane Injektion des Wirkstoffes Flutamid wurde im Versuchszeitraum alle 24 Stunden wiederholt. 500 mg Flutamid wurden in 10 ml Ethanol gelöst und die Lösung wiederum mit 90 ml Sesamöl als Trägerstoff gemischt. Zur besseren Verträglichkeit wurde täglich an wechselnden Körperstellen jedem Tier subkutan 30 mg/kg/d Flutamid verabreicht. Auf Grund der hohen Viskosität der Lösung wurde zur besseren Applikation eine großlumige Kanüle (21 Gauge) verwendet.

3.3.1.4.5 Orchiektomie

Die Orchiektomie der Ratten wurde je nach Versuchsgruppe in der 4., 10. bzw. 14. Woche durchgeführt. Die Tiere wurden wie unter Punkt 3.3.1.4.1. beschrieben vorbereitet. Nach dem Wirkungseintritt der Narkose und dem Verbringen des Tieres in Rückenlage wurde das Scrotum rasiert und mit Jodseife gereinigt. Der Hautschnitt wurde so gewählt, dass er leicht cranial des Skrotums lag. Die Länge des Schnittes richtete sich dabei nach der Größe der Hoden, sodass die Testes aus der Wunde herausgedrückt werden konnten. Die Fascia spermatica externa wurde mit einem Skalpellschnitt durchtrennt und auf diese Weise die Tunica vaginalis freigelegt. In diesen Versuchen wurde eine unbedeckte Kastrationsmethode gewählt. Der Processus Vaginalis wurde mit dem Skalpell scharf durchtrennt sowie die distalen Anteile des Samenstranges inklusive des Musculus Cremasters ligiert und anschließend amputiert. Durch Anwendung der Drei-Klemmen-Technik wurden anschließend

die Testes entfernt. Dazu wurde für einen sicheren Knotensitz und gute Knotenfestigkeit polyfilamentes Nahtmaterial gewählt. Die präskrotale Hautwunde wurde mit einem einfachen U-Heft verschlossen.

Die zur Orchiektomie gehörige Scheinoperation wurde äquivalent der oben beschriebenen Vorgehensweise ausgeführt. Der präscrotale Hautschnitt wurde nach kurzer manueller Manipulation an der Wunde wieder verschlossen und die Antagonisierung subcutan in die Nackenfalte injiziert.

3.3.1.4.6 Nicht-invasive Blutdruckmessung

Entsprechend der humanen indirekten Blutdruckmessung nach Riva Rocci wurde bei den Ratten der Blutdruck mittels eines Tail-Cuff-Systems ermittelt. Die Ratten wurden ein- bis zweimal zum Training ohne Messung auf die Methode vorbereitet. Dazu wurden die Tiere zur Immobilisation in einen an die Körpergröße angepassten Restrainer verbracht und zur Dilatation der Schwanzarterien in einer Wärmebox mit automatischer Wärmeregulation zwischen 37 °C und 39 °C für ca. 10 Minuten aufgewärmt. Den Messungen an einem Messtag ging jeweils eine Eichung bei entsprechendem Erwartungswert voraus. Hierzu konnte das Powerlab-System in zwei Messbereiche eingestellt werden, 0-200 mmHg und 0-280 mmHg. Die Eichung wurde auf Grundlage einer Zwei-Punkt-Kalibration ermittelt, wobei die Punkte 0 mmHg und 200 bzw. 280 mmHg definiert wurden. Bei der eigentlichen Messung wurde eine Schwanzmanschette an der Schwanzwurzel angebracht und direkt distal der Manschette ein piezoelektronisches Element mit einer Feinklemme befestigt. Über das Powerlab wurde die Pulswelle im Millivoltbereich erfasst und nach dem Eintritt einer konstanten Amplitude die Messung gestartet. Das Powerlab pumpte nach Startbefehl die Manschette auf den eingestellten Druck auf und nach Wiedererscheinen der Pulswelle konnte der Blutdruck durch Parallelverschiebung einer Messgeraden an der Druckkurve der Manschette ermittelt werden. Eine Tagesmessung dauerte mindestens 3 Minuten (reine Messzeit ohne Aufwärmphase) und beinhaltete mindestens 5-7 Einzelmessungen, von denen die letzten 3 bis 4 Messungen zur Ermittlung des Blutdruckes herangezogen wurden. Diese Messmethode wurde an drei aufeinanderfolgenden Tagen wiederholt und die jeweiligen Ergebnisse gemittelt.

3.3.1.4.7 Katheterisierung der Arteria femoralis und invasive Blutdruckmessung

Der invasiven Blutdruckmessung ging eine Operation zur Katheterisierung der Arteria femoralis voraus. Die Operations- bzw. Narkosevorbereitungen entsprachen der unter Punkt 3.3.1.4.1 beschriebenen Techniken. Bei dieser Operation wurde die Region um den Leistenspalt sowie eine etwa 2x2 cm große Fläche im Nacken als spätere Austrittsstelle für den Katheter als weiteres OP-Feld vorbereitet (Abb. 5). Der Blick auf die Vena und Arteria femoralis sowie dazugehörigem Nervus femoralis wurde durch einen 2 cm langen Hautschnitt im Leistenspalt und anschließender stumpfer Präparation ermöglicht.

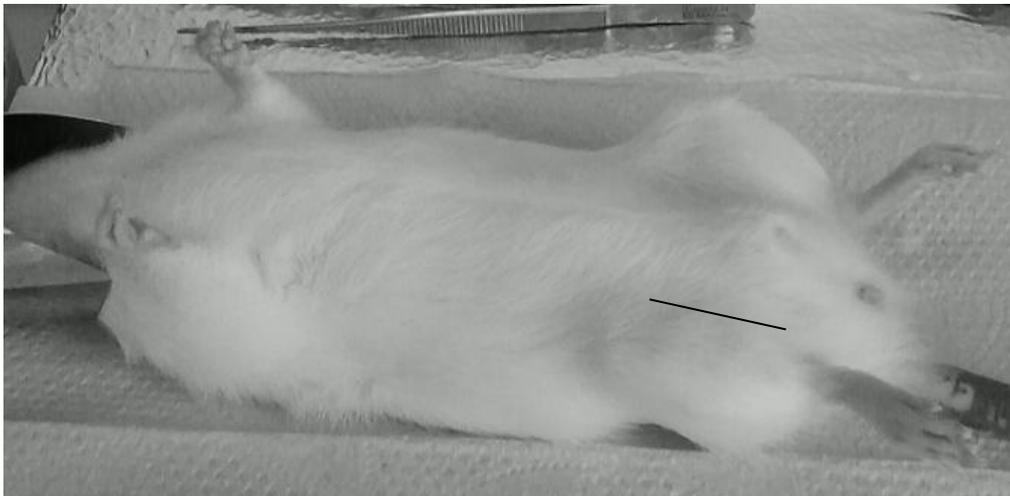


Abb. 5: Für die invasive Blutdruckmessung unter Isofluran-Narkose liegende Ratte. Die Schnittführung für die spätere Präparation der Arteria femoralis nach erfolgter Vorbereitung des Operationsfeldes ist schematisch dargestellt.

Für die stumpfe und verletzungsfreie Präparation wurden Wattestäbe mit 5 mm Kopf genutzt. Nachdem die Strukturen freigelegt waren, wurde der Nervus femoralis von der ihm anliegenden Arterie getrennt und anschließend die Verbindung zwischen Vene und Arterie mittels einer stumpfen, gebogenen Pinzette gelöst. Die hierdurch isolierte Arteria femoralis wurde gesondert distal und proximal mit einem langen chirurgischen Faden unterlegt und die Enden zur Fixation an der Tischplatte befestigt. Die auf diese Weise aufgespannte A. femoralis wurde mit einer Irisschere im distalen Drittel in einem Winkel von 45° zu einem Drittel des Querschnitts aufgeschnitten. Ein Schenkel einer Mikro-Pinzette (Uhrmachertyp) wurde als Platzhalter in die eröffnete Arterie verbracht und bei gleichzeitigem Einschieben des mit Heparin (50I.E./ml) ge-

füllten Katheters mit Hilfe einer zweiten Mikro-Pinzette wieder entfernt. Der Katheter wurde durch drei Knoten in der Arterie positioniert und fixiert. Um eine Verschiebung zusätzlich zu verhindern, wurde der Katheter mittels eines Einzelheftes am Musculus graciles befestigt. Um Automanipulation durch die Ratte und damit einhergehende Beschädigungen am Katheter zu verhindern wurde das noch freie distale Ende des Katheters mit einer Knopfsonde verbunden und subkutan in craniodorsaler Richtung bis zum Nacken vorgeschoben. Ein ca. 1 cm langer Schnitt diente als Austrittsöffnung für den Katheter. Die subkutane Befestigung des Katheters konnte an einer dafür an dem Katheter angebrachten Lasche erfolgen. Der Hautschnitt im Nacken wurde mit Histoacryl-Gewebekleber geschlossen. Nach einer optischen Längenmessung wurde der Katheter gekürzt und luftdicht verschweißt, um einen Blutaustritt zu unterbinden. Die Wunde in der Leistengegend wurde ebenfalls mit Gewebekleber geschlossen. Die Narkose wurde wie unter Punkt 3.3.1.4.1 beschrieben beendet und das Tier in einen Makrolonkäfig Typ 3 verbracht. Die Tiere wurden in der gesamten Messperiode von drei Tagen einzeln gehalten, um eine Manipulation durch die Artgenossen zu verhindern.

Die sich an die Operation anschließende Blutdruckmessung wurde ebenfalls über das Powerlab von ADInstruments geleitet. Zwischengeschaltet war hier lediglich ein zusätzlicher Bridge-Amplifier, um das Signal der invasiven Messung auslesen zu können. Ein flüssigkeitsgefüllter Pulsaufnehmer wurde an den implantierten Katheter angeschlossen. Über die in elektrische Signale umgewandelten Pulsamplituden konnte der mittlere arterielle Druck als Integration des Druckpulses über die Zeit ausgelesen werden. Die Tiere wurden final in der 18. Woche an drei aufeinanderfolgenden Tagen für je 90 Sekunden gemessen. Die hierbei erhaltenen Ergebnisse wurden gemittelt.

3.3.1.4.8 Präparation der Versuchstiere

Die Tiere wurden zum Versuchsende mit 87 mg/kg KG Ketamin und 13 mg/kg KG Xylazin i.p. in eine tiefe Narkose gelegt. Nach dem Erreichen eines schmerzfreien bzw. Reflextest-negativen Stadiums wurden die Tiere auf einer Tierwaage gewogen. Blut wurde wie unter Punkt 3.3.1.4.2 beschrieben aus dem retrobulbären Venenplexus gewonnen, um verschiedene klinisch-chemische Parameter zu ermitteln. Hierzu wurden mehrere Blutröhrchen, Lithium-Heparin, SST Vacutainer und EDTA Vacutainer gefüllt. Die Organpräparation begann mit dem Eröffnen der Bauchhöhle

und des Brustkorbes. Vom Umbilikalbereich bis zum Sternum wurden das Fell und die Haut mit einer Präparierschere mittels eines Ventralschnittes entfernt. In gleicher Vorgehensweise wurde die Bauchhöhle eröffnet. Konnte bei der vorangegangenen retrobulbären Blutung nicht genug Blut gewonnen werden, wurde mittels einer Monovette vor der Herzexzision Blut aus der Vena cava caudalis entnommen. Die sich hieran anschließende Eröffnung des Brustkorbes mit der Präparierschere stellte eine kraniale Verlängerung des ersten Schnittes dar. Die letzten 2-3 Rippen wurden am Übergang von Knochen zu Knorpel durchgeschnitten und das Zwerchfell am Rippenbogen durchtrennt. Das Herz wurde mit einem Schnitt am Gefäßstamm aus der Brusthöhle entnommen und direkt in 1 M, 4 °C gekühltes Kalium gegeben, um eine maximale Relaxation der Herzmuskelzellen zu gewährleisten. Anschließend wurden die Nieren entfernt, die Capsula fibrosa von der restlichen Niere getrennt und die Nieren danach weiter verarbeitet. Die linke Niere wurde durch einen Transversalschnitt in zwei Teile geteilt. Eine Hälfte wurde in Methacarn zur späteren histologischen Untersuchung fixiert, die andere Hälfte wurde wiederum durch einen Sagittalschnitt in zwei Teile geteilt. Mit einer feinen, gebogenen Schere konnte die Medulla renalis vom Cortex getrennt werden. Die Medulla und der Cortex der linken Niere, die rechte Niere, die in drei Teile geteilt wurde, ein etwa 100 mg schweres Stück Leber vom Lobus caudatus und die Milz wurden in jeweils ein Eppendorf-Probengefäß überführt. Die Aorta thoracica wurde auf einer Länge von 20-30 mm herausgeschnitten, gereinigt und ebenfalls in ein Eppendorf-Probengefäß überführt. Bei der weiterführenden Präparation des Herzens wurden zunächst die restlichen Gefäßstrukturen sowie die Atria entfernt und verworfen. Anschließend konnte der rechte Ventrikel abgetrennt und asserviert werden, vom linken Ventrikel wurde die Herzspitze abgeschnitten und eine ca. 4-5 mm dicke Scheibe in Methacarn fixiert. Die übriggebliebenen Strukturen der linken Kammer wurden wiederum in Eppendorf-Probengefäßen gesammelt. Alle Organproben wurden auf einer Feinwaage gewogen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die in Methacarn zur Fixierung gelagerten Proben wurden lichtgeschützt für 24 Stunden kühl gelagert. Die Proben wurden anschließend in 80 %iges Ethanol zur dauerhaften Lagerung bei Raumtemperatur überführt. Die Asservierung der schockgefrorenen Proben erfolgte bei -80 °C.

3.3.1.4.9 Uringewinnung für klinisch-chemische Analysen

Die Uringewinnung über 24 Stunden fand in Stoffwechselläufigen statt. Die Tiere wurden zur Eingewöhnung 24 Stunden vor der eigentlichen Messung in die Stoffwech-

selkäfige verbracht, in den darauffolgenden 24 Stunden wurde der Urin gesammelt. Der freie Zugang zu Futter und Wasser war in den 48 Stunden jederzeit gegeben. Der gesammelte Urin wurde zur Vermeidung von Albuminadhäsionen in Szintillationsgefäße aus Kunststoff überführt und das Volumen bestimmt, wobei 1 ml Urin ca. dem Gewicht von 1 g entspricht. Nach dem Durchmischen wurde der Urin bei Raumtemperatur für 10 Minuten bei 900 x g zentrifugiert, der saubere Überstand wiederum in 2 ml-Eppendorfggefäße dekantiert und zur Bestimmung des Albumingehaltes verwendet. Der restliche Urin wurde bei -20°C für spätere Analysen bzw. als Rückstellprobe aufbewahrt.

3.3.1.4.10 Albuminbestimmung im Urin

Im Vorfeld wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Kreuz ein direkter, kompetitiver Albumin-ELISA etabliert, um die Albuminausscheidung im 24 Stunden-Urin bestimmen zu können (Kreuz et al., 2000). Hierzu dient gereinigtes Rattenalbumin als feste Phase auf einer Mikrotiterplatte als Antigen. Wurde das im gewonnenen Urin enthaltene Rattenalbumin hinzugegeben, konkurrierte dieses mit dem auf der Platte befindlichen Antigen um die Bindung an einem hinzugefügten enzymgekoppelten Albumin-Antikörper. Das Produkt der Enzymumsetzung durch ein zugeführtes Substrat wurde anschließend mittels eines ELISA-MRX-Plate-Readers bei 450 nm photometrisch gemessen. Mittels einer Eichgeraden erfolgte die Bestimmung des Albuminwertes.

3.3.1.4.11 Konzentrationsbestimmung von Cystatin C, Cholesterin und Triglyceriden

Die Bestimmung der biochemischen Parameter Cystatin C, Cholesterin und Triglyceride wurden mittels Standardverfahren im Labor 28 (Mecklenburgische Straße 28, 14197 Berlin) vorgenommen.

3.3.1.4.12 Herstellung der histologischen Schnitte

Die Methacarn-fixierten und halbierten Nieren wurden von Peter Kossmehl aus der Arbeitsgruppe in Histosetten fixiert und gegen Austrocknung bzw. zur Entfernung des Fixiermittels kurz in destilliertem Wasser gelagert. In einem automatisierten Gewebeeinbettautomat wurden die Nierenpräparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe von 70 %igem, 80 %igem, 96 %igem und abschließend dreimal 100 %igem Ethanol jeweils für eine Stunde entwässert. Nach einem Durchfluss von Aceton folgten anschließend für jeweils 30 Minuten zwei weitere Entwässerungen in Neo-Clear® als Xylol-Ersatz und abschließend die Einbettung zuerst in Richard-Allan Scientific Paraf-

fin Typ 6 und dann in Richard-Allan Scientific Paraffin Typ 9. Zur Analyse wurden mit einem Rotationsmikrotom standardisierte 3 µm dicke transversale Schnitte angefertigt und anschließend jeweils 8 Schnitte auf einem Objektträger aufgebracht und bei 37 °C im Brutschrank getrocknet. Im Färbeautomaten wurden die Schnitte mittels Standardprotokollen nach Hämatoxylin-Eosin (HE), Periodic Acid Schiff (PAS) und Sirius Red gefärbt.

3.3.1.4.13 Bestimmung des Glomerulosklerose-Indexes (GSI)

Die im Lichtmikroskop bei 200 facher Vergrößerung sichtbaren Vernarbungen von Kapillarschlingen und Glomerulum wurden semiquantitativ in zwei Schritten von Herrn Peter Kossmehl erfasst, wobei der erste Schritt eine Blindbeurteilung der zufällig ausgewählten, nach Anfärbung mit Sirius Rot pathologisch abweichenden, betroffenen Areale und der zweite Schritt die Befunderhebung beinhaltete. Die von Raji et al. 1984 eingeführte Einteilung des GSI von Grad 0-4 wurde zur einfacheren Beurteilung herangezogen (Tab. 1)

Tab. 1: Bewertungsschema nach Raji für die Einteilung der Glomerulosklerose

Schweregradeinteilung der Glomerulosklerose	Ausmaß der morphologischen Veränderungen
Grad 0	Keine
Grad 0,5	<12 %
Grad 1	12 bis 24 %
Grad 1,5	25 bis 36 %
Grad 2	37 bis 49 %
Grad 2,5	50 bis 61 %
Grad 3	62 bis 74 %
Grad 3,5	75 bis 90 %
Grad 4	>90 %

3.3.1.4.14 Bestimmung des Tubulointerstitiellen Schädigungsindexes (TSI)

Für die Einteilung des TSI steht ähnlich wie beim GSI eine Bewertungstabelle von Raji et al. 1984 zur Verfügung. Die Schnitte wurden dafür unter einem Photomikroskop eingesehen und mit einem 20 Quadranten-Raster (0,2mm je Quadrant) belegt. Der Schweregrad der vorhandenen Veränderungen in den Nierentubuli, wie z.B. Atrophie, Dilatation oder vorhandenen Zylindern innerhalb der Tubuli sowie Verände-

rungen im Mark- und Rindenbereich, wurden mit einem Score von 0-3 belegt (Tab. 2).

Tab. 2: Bewertungsschema für die Einteilung des TSI

Schweregrad der tubulointerstitiellen Schädigung	Ausmaß der morphologischen Veränderung
Grad 0	Keine
Grad 1	<30 %
Grad 2	30 bis 60 %
Grad 3	>60 %

3.3.1.4.15 RNA-Isolierung

Um Gesamt-RNA aus dem bei -80 °C asservierten Nierengewebe zu isolieren, wurde die Trizol-Methode angewendet. Mit einem Skalpell wurde von einer Gewebeprobe ein etwa 100 mg großes Stück abgeschnitten und in 1 ml eisgekühltem Trizol in einem Greinerröhrchen dreimal 30 Sekunden mit einem Ultra-Turrax homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenat 10 Minuten bei 5.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Für die komplette Dissoziation der Nucleoprotein-Komplexe wurde der Proteinenthaltene Überstand abpipettiert, in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und bei Raumtemperatur für 45 Minuten inkubiert. Eine anschließende Beimengung von 200 µl Chloroform führte zu einer Phasenseparation. Nach weiteren 2-3 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde die Probe für 15 Minuten bei 12.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die erkennbaren drei Phasen enthielten in der oberen Phase die RNA, in einer weißen Interphase die DNA und in der unteren roten Phase DNA und Proteine. Für die weitere Isolierung wurde nur die obere RNA-haltige Phase genutzt. Die Phase wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und mit 500 µl Isopropanol pro 1 ml Trizol zur Fällung gebracht. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Probe 10 Minuten bei 12.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet zur weiteren Verarbeitung mit 1 ml, -20 °C kaltem 75 %igem Ethanol gewaschen und anschließend 10 Minuten bei 4.900 x g und 4 °C zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde verworfen und das RNA-haltige Pellet für ca. 15-20 Minuten luftgetrocknet, um das Pellet wieder zu lösen wurden 50 µl DEPC-Wasser hinzugegeben.

Eine Konzentrationsbestimmung der gewonnenen RNA erfolgte mittels eines Nanodrops der Firma PeqLab. Hierbei wurde die Konzentration und mögliche Verunreinigung der Probe mittels einer photometrischen Messung bei 260 nm/280 nm gemessen. Darüber hinaus wurde die RNA gelelektrophoretisch evaluiert.

3.3.1.4.16 cDNA-Synthese

4 µg RNA wurden für die cDNA-Synthese mit DEPC-Wasser mit einer Konzentration von 0,1 % auf 10 µl ergänzt und nach dem Zusatz von 1 µl Hexamer Primer für 5 min auf 70 °C erhitzt und anschließend für 5 min auf 4 °C abgekühlt. 4 µl 5x Reaction Buffer, 1 µl RNase Inhibitor, 2 µl 10 mM dNTP-Mix und 2 µl reverser Transkriptase (M-MULV) wurden auf Eis zugegeben. In der PCR-Maschine wurde die Probe 10 min bei 25 °C, 60 min bei 37 °C, 10 min bei 70 °C und 10 min bei 4 °C inkubiert. Abschließend wurden die Proben mit einem 2 %igen Agarosegel bei ungefähr 40 min, 75 V und 200 mA aufgetrennt und auf ihre Integrität geprüft.

3.3.1.4.17 Quantitative *Realtime* PCR von Ngal und Kim1

Neutrophiles Gelatinase assoziiertes Lipocalin (Ngal) ist ein Marker, der zur Früherkennung von Nierenschädigung herangezogen werden kann. Vor allem im dicken aufsteigenden Teil der Henle'schen Schleife und dem Sammelrohr wird das Protein bei akuter und chronischer Schädigung der Niere vermehrt exprimiert (Chaudhary et al., 2010). Ein weiterer Biomarker, der zur Anzeige chronischer Nierenerkrankungen sowie akuter krankhafter Veränderungen herangezogen werden kann, ist das Kidney Injury Molecule 1 (Kim1) (Ko et al., 2010). Liegt eine Erkrankung zu Grunde, auf die Kim1 bzw. Ngal mit einer vermehrten mRNA-Expression reagiert, kann dieser Anstieg mit Hilfe einer quantitativen *Realtime* PCR (TaqMan) gemessen werden. Die quantitative Genexpressionsanalyse von Ngal (GenBank accession number NM_130741) und Kim1 (GenBank accession number: NM_173149) in der Gesamtniere wurde nach dem Sybr-Green-Prinzip durchgeführt, bei dem die Fluoreszenz proportional zum gebildeten PCR-Produkt ansteigt. Die Fluoreszenz wurde mit dem ABI Prism 7000 Sequence Detection System erfasst.

Jede Probe wurde dabei als Triplett pipettiert und jeweils 3 µl cDNA, 12,5 µl Sybr Green Mastermix Puffer, 11,4 µl Aqua bidestillata und je 0,05 µl Forward und Reverse Primer (Endkonzentration je 300 nM) zugegeben. Aus den Triplikaten wurde nachfolgend ein Gesamtwert gemittelt. Als Housekeeping Gen wurde Hmbs

(hydroxymethylbilane synthase, GenBank Accession-Nr. X06827) (Schulz et al., 2007) verwendet.

Die relative mRNA-Genexpression wurde folgendermaßen berechnet:

$$DC_T = C_T (\text{Zielgen}) - C_T (\text{Housekeeping Gen})$$
$$DDC_T = DC_T (\text{Bezugsgruppe}) - DC_T (\text{Testgruppe})$$

Unterschied der Expression der Testgruppen bzgl. der Bezugsgruppe = 2^{DDC_T}

Hierbei fungierte Wistar Sham als Bezugsgruppe und die einzelnen Behandlungsgruppen der Rattenstämme Wistar, MWF und Dahl/SS jeweils als Testgruppe. Sowohl für Ngal als auch für Kim1 wurde der nierengesunde Referenzstamm Wistar in der unbehandelten Gruppe als 100 % festgelegt und die übrigen Gruppen bzw. Stämme dazu ins Verhältnis gesetzt.

3.3.1.4.18 Statistische Analyse und Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurde auf die Software SPSS/PASW Statistics 18 zurückgegriffen. Durch den Gebrauch einer einfaktoriellen ANOVA gekoppelt mit einem Bonferroni Post-Hoc-Test wurde die statistische Auswertung im Drei- und Mehrgruppenvergleich durchgeführt. Bei einem Zweigruppenvergleich wurde ein t-Test oder ein Mann-Whitney-U-Test vorgenommen. Da die Werte der analysierenden Faktoren normalverteilt vorliegen mussten, wurden die Ergebnisse der Albuminurie vor der statistischen Auswertung logarithmiert. Des Weiteren wurden der Mittelwert, die Standardabweichung und der Standardfehler des Mittelwertes berechnet. Der Schwellenwert für Signifikanz lag bei $p < 0,05$. In dieser Arbeit ist für die Mittelwerte jeweils nur der Standardfehler (SEM) angegeben.

4 Ergebnisse

4.1 Phänotypisierung der Parentalstämme

4.1.1 Vorstudie 1: Ergebnisse der Bestimmung der physiologischen Testosteronwerte

Um die Auswirkung des Geschlechtshormons Testosteron auf die Entwicklung progressiver Nierenschäden zu untersuchen und eine mögliche Assoziation zwischen Testosteron und der erhöhten Ausscheidung von Albumin über den Urin erkennen zu können, wurden die drei Rattenstämme Wistar, MWF und Dahl/SS mittels unterschiedlicher Behandlungsgruppen phänotypisch untersucht. Hierzu wurden vor der Hauptstudie in eigener Vorarbeit zu verschiedenen Zeitpunkten die Albuminausscheidung im 24h-Urin, der systolische Blutdruck sowie die Serum-Testosteron-Konzentration bestimmt.

In einem zweiten Abschnitt der Vorstudie wurden orchietomierten Tieren Testosteron-Pellets implantiert und im Zeitverlauf die Serum-Testosteron-Werte kontrolliert, um einerseits die Wirksamkeit der Pellets selber und andererseits der Implantationsmethode zu ermitteln.

4.1.1.1 Testosteron-Spiegel-Bestimmung

Um die Effizienz der später eingesetzten Testosteron-Pellets zu gewährleisten bzw. zu definieren musste zunächst die physiologische Serum-Testosteron-Konzentration der in dieser Studie verwendeten Rattenstämme bestimmt werden.

In der 4., 8. und 12. Woche wurde männlichen MWF- und Dahl/SS-Tieren Blut entnommen und der Testosterongehalt im Serum bestimmt (Abb. 6). Im Verlauf zeigte sich von der 4. bis zur 12. Woche eine signifikante Steigerung der Konzentration bei MWF von $0,13 \pm 0,04$ nmol/l auf $7,64 \pm 1,46$ nmol/l ($p=0,01$) und bei Dahl/SS von $0,06 \pm 0,06$ nmol/l auf $6,52 \pm 1,78$ nmol/l ($p<0,01$). Da die MWF-Tiere von der 8. bis zur 12. Woche noch eine deutliche Steigerung in der Konzentration um $2,94$ nmol/l zeigten, wurde in diesem Stamm zusätzlich in der 17. Woche als willkürlich gewählter Zeitpunkt bei den Tieren die Konzentration im Serum ermittelt. Der Anstieg von der 12. Woche bis zur 17. Woche fiel mit $0,94$ nmol/l deutlich geringer und nicht signifikant aus und der so ermittelte Wert wurde als maximale physiologische Testosteronkonzentration festgelegt. Bei der Dahl/SS-Gruppe konnte bereits von der

8. bis zur 12. Woche kein weiterer signifikanter Anstieg der Testosteronkonzentration ermittelt werden. Hier wurde ein Maximum von $6,52 \pm 1,18$ nmol/l erreicht und es wurde keine weitere Bestimmung in der 17. Woche vorgenommen.

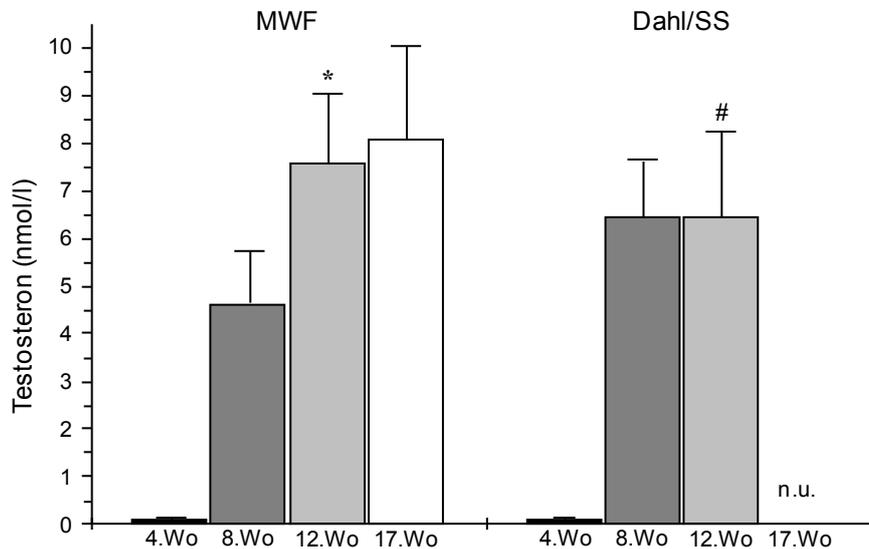


Abb. 6: Vergleichende Testosteronbestimmung bei MWF- und Dahl/SS-Ratten der 4. Woche (n=5, schwarz), 8. Woche (n=9, dunkelgrau), 12. Woche (n=9, hellgrau) und 17. Woche (n=7, weiß). n.u., nicht untersucht. *p=0,01 vs. MWF 4. Woche, #p<0,01 vs. Dahl/SS 4. Woche.

4.1.2 Vorstudie 2: Ergebnisse der altersabhängigen Kastration

4.1.2.1 Späte Kastration in der 14. Woche und Auswirkung auf die Albuminurie

Inwieweit die Albuminurie sowohl testosteronabhängig als auch im adulten Tier durch die Reduktion von Testosteron noch reversibel war, sollte durch eine zu einem späteren Zeitpunkt vorgenommene Kastration ermittelt werden. Hierzu wurden Tiere der 13. Woche einer Orchiectomie unterzogen (Ox13) und im späteren Zeitverlauf wurde über den 24h-Urin die Albuminausscheidung bestimmt.

Die MWF-Tiere der Ox13-Gruppe zeigten zu jedem gewählten Zeitpunkt ein signifikantes Absinken der Albuminexkretion über den Urin im Vergleich zur Shamoperierten-Gruppe ($28,99 \pm 2,84$ mg/24h vs. $11,65 \pm 2,08$ mg/24h, 14. Woche, $p=0,001$). Im weiteren Zeitverlauf der 16. Woche konnte eine Reduktion der Albuminurie um einen Gesamtwert von $28,56$ mg/24h ($p=0,001$) und in der 18. Woche von einem Wert von $48,3$ mg/24h auf $26,28 \pm 8,05$ mg/24h ermittelt werden ($p=0,05$).

Bei den Dahl/SS-Ratten konnte zu einem kastrationsnahen Zeitpunkt analog zu MWF eine signifikante Senkung der Albuminurie beobachtet werden. Die in der 14. Woche gemessenen Albuminwerte ergaben im Vergleich zwischen der Sham- und der Ox13-Gruppe $99,15 \pm 5,63$ mg/24h zu $49,26 \pm 7,16$ mg/24h ($p=0,001$), in der 16. Woche einen weiterhin signifikanten Unterschied von $112,18 \pm 8,01$ mg/24h zu $73,37 \pm 12,36$ mg/24h ($p=0,01$) und in der 18. Woche eine nicht mehr signifikante Differenz von $13,77$ mg/24h ($116,99 \pm 9,32$ mg/24h zu $103,22 \pm 19,79$ mg/24h; Abb. 7).

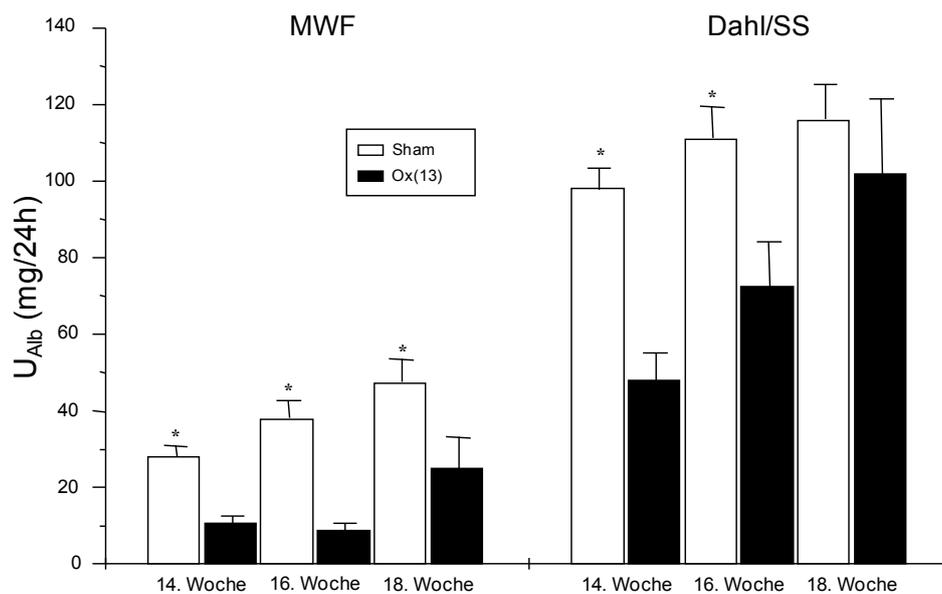


Abb. 7: Albuminmenge im 24h-Urin nach Sham-Operation (Sham, weiß) und nach Kastration in der 13. Woche (Ox13, schwarz) von der 14. bis zur 18. Woche der Versuchsgruppen MWF (links, n=6-12) und Dahl/SS (rechts, n=8-12). * $p \leq 0,01$ vs. Ox13, gleiches Alter, gleiches Genotyp

4.1.3 Vorstudie 3: Substitution und Dosisfindung

In einer weiteren Vorstudie wurde die Wirksamkeit der eingesetzten Testosteron-Pellets getestet. Hierbei wurden zwei verschiedene Modelle zur Implantation genutzt, die subkutane und die intraperitoneale. Vor der Implantation in der 6. Woche wurden die Tiere in der 4. Woche orchiektomiert. Im Zeitverlauf wurde als Kontrolle die Serum-Testosteron-Konzentration bestimmt.

4.1.3.1 Subkutane Implantation eines Testosteron-Propionat-Pellets mit 90 Tagen Wirksamkeit

Nach erfolgter Kastration konnte im Plasma der Ratten kein Testosteron mehr nachgewiesen werden. Daraufhin wurde den Tieren der MWF-Gruppe in der 6. Woche

subkutan ein Testosteron-Propionat-Pellet mit einer Wirkzeit von 90 Tagen implantiert. In der 8. Woche, also zwei Wochen nach der subkutanen Implantation, zeigten die Tiere im Mittel einen deutlichen Anstieg des Testosteronwertes verglichen mit der Kontrollgruppe, der jedoch auf Grund der großen Streuung nicht signifikant im Vergleich zur Sham-Gruppe war. Der Testosteronwert der 8. Woche erreichte Werte von $42,52 \pm 17,83$ nmol/l und sank in der 10. und 12. Woche über $4,75 \pm 2,24$ nmol/l auf $2,23 \pm 1,80$ nmol/l signifikant ab ($p < 0,05$). In der 18. Woche war nur noch ein Wert von $0,54 \pm 0,25$ nmol/l messbar.

Bei der entsprechenden Dahl/SS-Gruppe war in der 12. Woche ein signifikant niedrigerer Wert von $0,04 \pm 0,03$ nmol/l ($p < 0,001$ vs. Dahl/SS Sham) nachweisbar. Die Messungen in der 8. Woche ergaben einen deutlich und signifikant höheren Wert von $30,15 \pm 6,13$ nmol/l ($p < 0,01$ vs. Dahl/SS Sham), die Messungen in der 10. Woche $2,39 \pm 1,77$ nmol/l (Abb. 8). In der Folge der Ergebnisse wurde aufgrund des starken Testosteronabfalls eine zweite Implantationsmethode getestet.

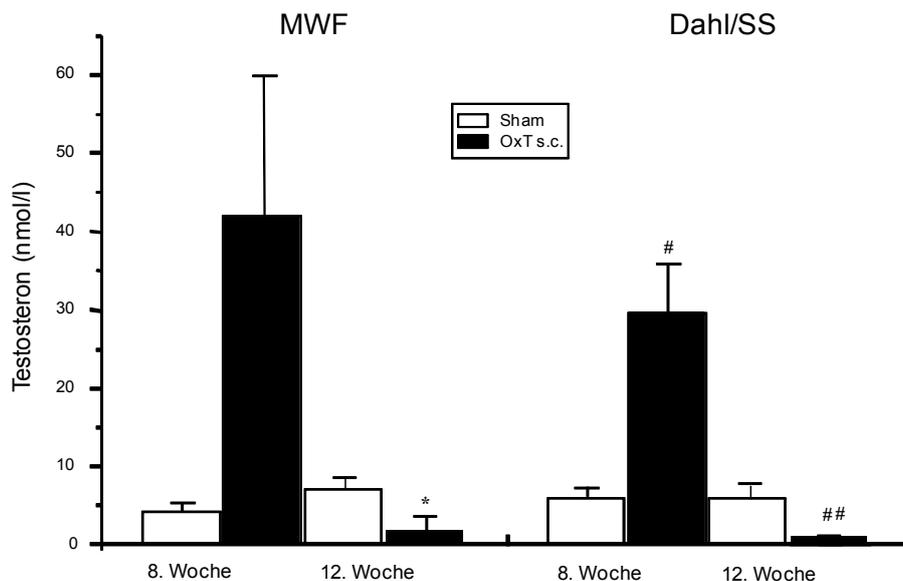


Abb. 8: Testosteronkonzentration im Blutserum nach subkutaner Implantation eines Testosteron-Pellets (OxT s.c., schwarz) bei den Stämmen MWF (links, $n=9-10$) und Dahl/SS (rechts, $n=6-8$) im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe (Sham, weiß) in der 8. und 12. Woche. * $p < 0,05$ vs. MWF Sham gleiches Alter, # $p < 0,01$ vs. Dahl/SS Sham gleiches Alter, ## $p < 0,001$ vs. Dahl/SS Sham gleiches Alter.

4.1.3.2 Intraperitoneale Implantation eines Testosteron-Propionat-Pellets mit 90 Tagen Wirksamkeit

Um eine möglichst gleichmäßige, langanhaltende und dabei nahezu physiologische Serum-Konzentration (s. 3.1.1.1) zu erhalten, wurde in einer weiteren Studie eine zweite Implantationsmethode getestet. Der Versuchsablauf war ähnlich dem der subkutanen Methode (s. 3.1.2.3). Die Tiere der MWF OxT i.p.-Gruppe (Orchiektomiert + intraperitonealer Testosteronsupplementierung) zeigten in der 8. Woche einen signifikant höheren Serum-Wert von $94,68 \pm 39,61$ nmol/l ($p < 0,001$ vs. MWF Sham), der sich in der 14. Woche nicht signifikant höher als in der Kontrollgruppe mit $8,27 \pm 5,07$ nmol/l in einem dauerhaft physiologischen Bereich bewegte und auch in der 18. Woche noch $5,75 \pm 2,85$ nmol/l aufwies ($p = 0,05$ vs. MWF Sham; Abb. 9).

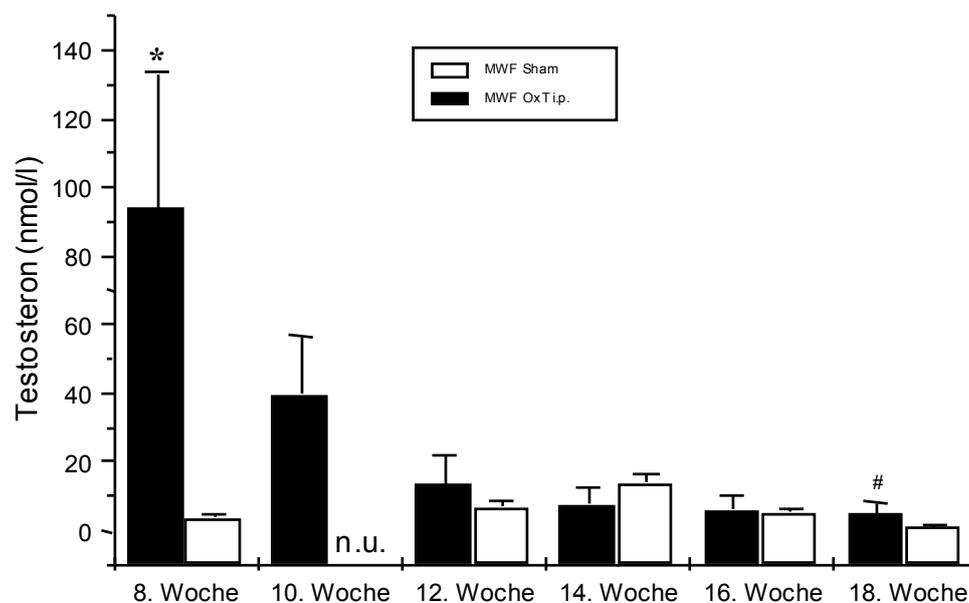


Abb. 9: Testosteronkonzentration nach intraperitonealer Implantation eines Testosteronpellets (OxT i.p.). Die Kastration erfolgte in der 4. Woche, die Implantation in der 6. Woche. Dargestellt sind die Testosteronwerte von der 8. bis zur 18. Woche bei MWF OxT i.p. ($n=5$, schwarz) im Vergleich zur Kontrollgruppe MWF Sham ($n=9-12$, weiß); n.u., nicht untersucht. * $p < 0,001$ vs. MWF Sham gleiches Alter, # $p = 0,05$ vs. MWF gleiches Alter.

Die Albuminurie-Messungen der orchiektomierten und mit Testosteron behandelten Gruppen MWF OxT und Dahl/SS OxT ergaben, dass durch die Hormonsubstitution eine Albuminurie-Ausscheidung ähnlich die der Sham-Gruppe erreicht werden konnte. Bei MWF OxT war sowohl in der 12. als auch in der 18. Woche keine signifikante

Abweichung gegenüber der Sham-Gruppe zu erkennen. Die Tiere zeigten in diesem Alter eine Albuminausscheidung über den Urin von $32,27 \pm 8,08$ mg/24h (MWF Sham $25,97 \pm 3,06$ mg/24h) und in der 18. Woche ein Wert von $75,60 \pm 8,98$ mg/24h (MWF Sham $48,30 \pm 6,16$ mg/24h). Bei den entsprechenden Dahl/SS-Tieren der OxT-Gruppe war in der 12. Woche ein signifikant niedrigerer Albuminwert von $67,14 \pm 8,25$ mg/24h (Sham $91,50 \pm 3,79$ mg/24h) zu messen, der sich jedoch in der 18. Woche nicht mehr signifikant von dem der Sham-Tiere unterschied, hier wurde ein Wert von $121,75 \pm 11,29$ mg/24h (Sham $116,99 \pm 9,32$ mg/24h) erreicht.

4.1.4 Ergebnisse der Hauptstudie

4.1.4.1 Albuminurie-Verlauf der Stämme MWF und Wistar in der 12. und 18. Woche aller Versuchsgruppen

Bei der MWF-Ratte konnte unter basalen Sham-Bedingungen ein deutlich signifikanter und progressiver Anstieg der Albuminkonzentration im Urin im Vergleich zur nie-
rengesunden Wistar-Ratte in der 12. und 18. Woche nachgewiesen werden ($25,97 \pm 3,06$ vs. $0,39 \pm 0,06$ mg/24h und $48,3 \pm 6,16$ vs. $0,42 \pm 0,08$ mg/24h, $p < 0,001$; Abb. 10).

Nach erfolgter Orchiektomie in der 10. Lebenswoche konnte ein signifikantes Absinken der Albuminurie im 24h-Urin bei den MWF-Ratten beobachtet werden. Die MWF-Ox-Gruppe zeigte im Verlauf von der 12. bis zur 18. Woche einen signifikant geringeren Albuminurie-Wert als die Vergleichsgruppe MWF-Sham ($25,97 \pm 3,06$ vs. $5,38 \pm 0,86$ mg/24h, $p < 0,01$ und $48,3 \pm 6,16$ vs. $21,83 \pm 3,29$ mg/24h, $p < 0,01$; Abb. 10). Die Kontroll-Gruppe Wistar-Ox ließ zu allen gemessenen Zeitpunkten keine Anzeichen einer Albuminurie erkennen.

Um die Ursache der unter Ox deutlich gesenkten Albuminurie auf das Fehlen von Testosteron zu spezifizieren, wurde in einer weiteren Gruppe zusätzlich zur Testosteron-Supplementierung der selektive Androgen-Rezeptor-Antagonist Flutamid verwendet. Die MWF-OxTF-Gruppe zeigte ähnlich wie die bereits beschriebene MWF-Ox-Gruppe einen deutlich signifikanten Abfall der Albuminurie im Vergleich zur Sham-Gruppe im Zeitverlauf von der 12. bis zur 18. Woche an ($25,97 \pm 3,06$ vs. $2,5 \pm 0,52$ mg/24h, $p < 0,01$ und $48,3 \pm 6,16$ vs. $6,4 \pm 1,19$ mg/24h, $p < 0,01$; Abb. 10).

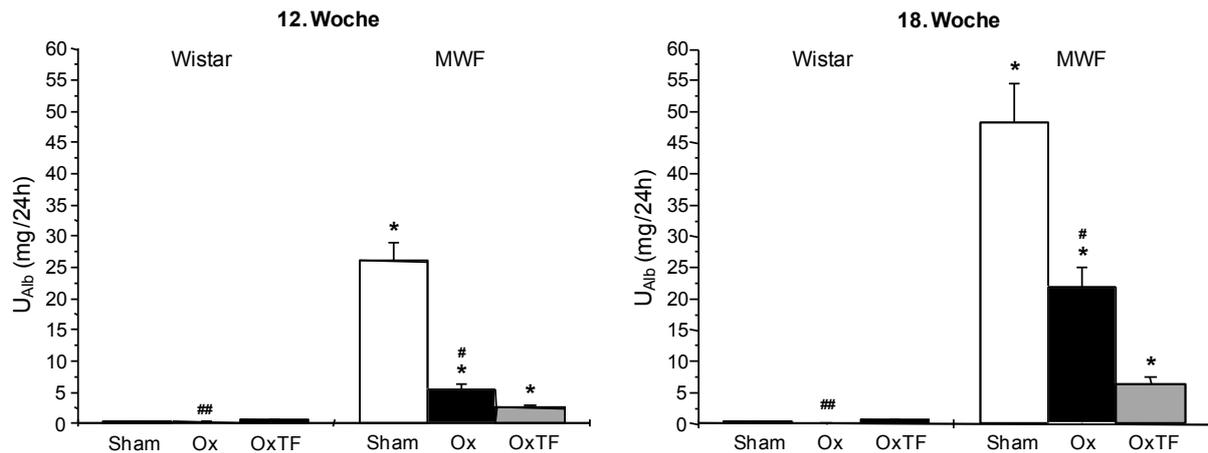


Abb. 10: Vergleichende Albuminausscheidung im Urin (U_{Alb}) bei Wistar und MWF der 12. (linke Abbildung) und 18. Woche (rechte Abbildung) der Versuchsgruppen Sham (weiß), Ox (schwarz) und OxTF (grau) mit $n=7-11$ für alle Gruppen. Linke Abbildung: * $p<0,001$ vs. Wistar gleiche Gruppe; # $p<0,01$ vs. MWF Sham und OxTF; ## $p<0,05$ vs. Wistar Sham und OxTF. Rechte Abbildung: * $p<0,001$ vs. Wistar gleiche Gruppe; # $p<0,05$ vs. MWF Sham und OxTF; ## $p<0,01$ vs. Wistar Sham und OxTF.

4.1.4.2 Albuminurie-Verlauf der Stämme Dahl/SS und Wistar in der 12. und 18. Woche aller Versuchsgruppen

Eine ebenfalls signifikante Albuminausscheidung über den Urin zeigten die Dahl/SS Tiere in den vorher beschriebenen Untersuchungszeiträumen. Die Sham-Tiere entwickelten von der 12. bis zur 18. Woche eine kontinuierlich ansteigende Albuminurie im Vergleich zur Wistar Sham-Gruppe mit Werten von $91,50 \pm 3,79$ vs. $0,39 \pm 0,06$ mg/24h und $116,99 \pm 9,32$ vs. $0,42 \pm 0,08$ mg/24h ($p<0,001$; Abb. 11).

Nach der Orchiektomie in der 10. Woche ließen die Tiere eine signifikant geringere Albuminausscheidung über den Urin erkennen. Die Reduktion in der 12. Woche betrug $45,27$ mg/24h ($91,5 \pm 3,79$ vs. $46,23 \pm 2,22$ mg/24h) und somit $50,5$ %; in der 18. Woche war sogar eine Verminderung um $54,9$ % messbar, von $116,99 \pm 9,32$ auf $64,22 \pm 4,0$ mg/24h ($p<0,001$).

Bei den orchiektomierten und gleichzeitig mit Testosteron und Flutamid behandelten Tieren des Dahl/SS-Stammes, ergab ein ähnliches Bild wie bereits bei den MWF-Tieren beschrieben; die Reduktion des albuminurischen Phänotyps konnte hier marginal, jedoch nicht signifikant verstärkt werden. In der 12. Woche sank die Albuminausscheidung signifikant von $91,5 \pm 3,79$ auf $39,89 \pm 4,34$ mg/24h, in der 18. Woche von $116,99 \pm 9,32$ auf $57,20 \pm 4,37$ mg/24h ($p<0,001$).

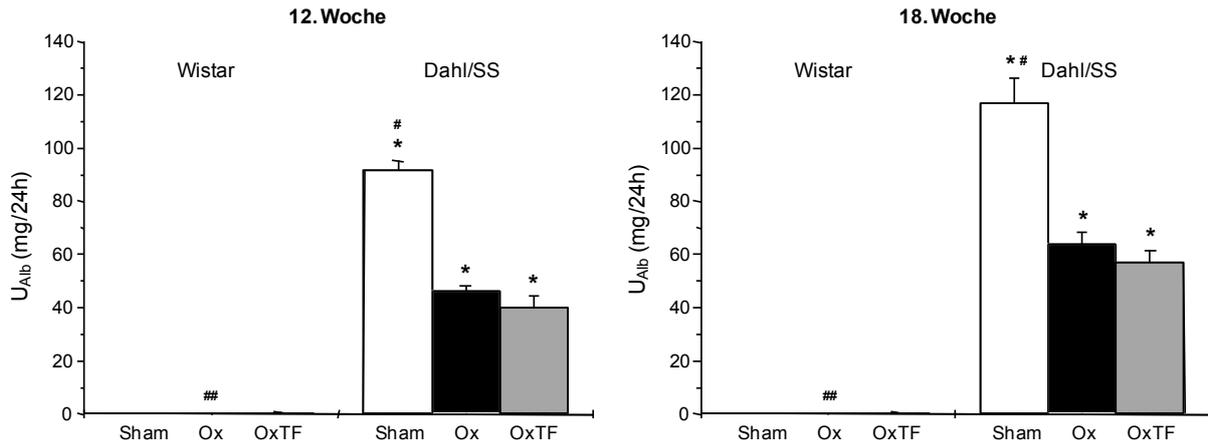


Abb. 11: Vergleichende Albuminausscheidung im Urin (U_{Alb}) bei Wistar und Dahl/SS der 12. (linke Abbildung) und 18. Woche (rechte Abbildung) der Versuchsgruppen Sham (weiß), Ox (schwarz) und OxTF (grau) mit $n=7-10$ für alle Gruppen. Linke Abbildung: * $p<0,001$ vs. Wistar gleiche Gruppe; # $p<0,01$ vs. Dahl/SS Ox und OxTF; ## $p<0,05$ vs. Wistar Sham und OxTF. Rechte Abbildung: * $p<0,001$ vs. Wistar gleiche Gruppe; # $p<0,05$ vs. Dahl/SS Ox und OxTF; ## $p<0,05$ vs. Wistar Sham und OxTF.

4.1.4.3 Indirekte und direkt invasive Blutdruckmessungen in der 18. Woche der Stämme MWF, Dahl/SS und Wistar

4.1.4.3.1 Indirekte Blutdruckmessung der Stämme MWF und Wistar aller Versuchsgruppen

Exemplarisch dargestellt ist hier nur der Blutdruck der 18. Woche (Abb. 12), da sich im Zeitverlauf keine charakteristischen Unterschiede innerhalb eines Stammes ergaben.

Die Tiere der MWF-Sham-Gruppe ließen in der 18. Woche einen im Vergleich zur Kontrollgruppe Wistar signifikant höheren Blutdruck erkennen. Der leicht hypertensive Stamm lag mit systolischen Blutdruckwerten von $139,2 \pm 5,6$ mmHg über den Werten des Referenzstammes Wistar mit $123,3 \pm 2,0$ mmHg ($p<0,01$).

Nach erfolgter Kastration fiel der Blutdruck bei beiden Stämmen leicht, jedoch bei den MWF-Ratten nicht signifikant ab. Die MWF-Ox-Tiere zeigten Blutdruckwerte von $127,7 \pm 5,3$ mmHg, die Wistar-Ox-Gruppe ließ Blutdruckwerte von $112,9 \pm 4,3$ mmHg erkennen.

Die dritte Behandlungsgruppe OxTF war wiederum nicht signifikant unterschiedlich zur Sham-Gruppe innerhalb der einzelnen Stämme. Bei MWF lag der Blutdruck bei $137,7 \pm 3,4$ mmHg, die Wistar-Tiere hatten einen systolischen Blutdruck von $117,7 \pm$

3,4 mmHg. Im Gruppenvergleich zwischen MWF und Wistar blieb auch hier wieder der signifikante Unterschied erhalten ($p < 0,01$; Abb. 12).

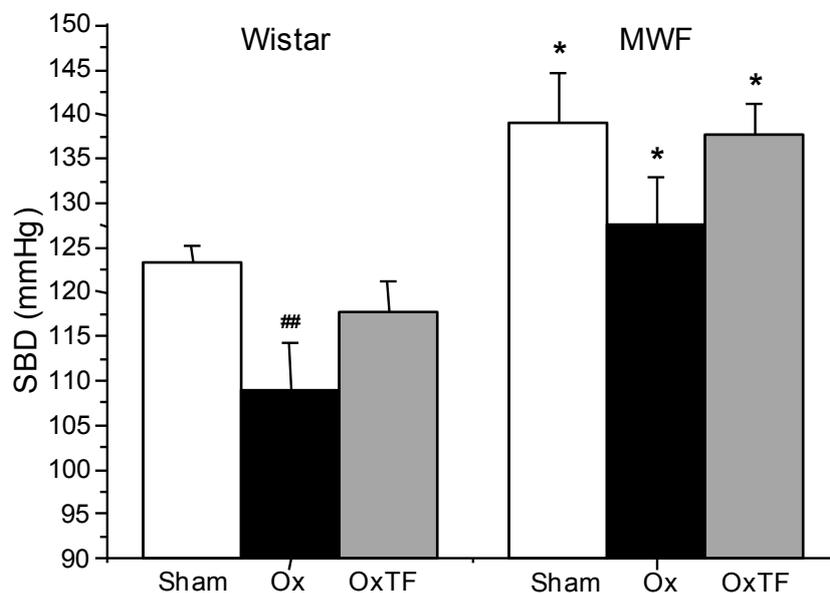


Abb. 12: Vergleichender systolischer Blutdruck (SBD) bei Wistar und MWF der 18. Woche der Versuchsgruppen Sham (weiß), Ox (schwarz) und OxTF (grau) mit $n=6-9$ für alle Gruppen. * $p < 0,01$ vs. Wistar gleiche Gruppe; ## $p < 0,01$ vs. Wistar Sham.

4.1.4.3.2 Indirekte Blutdruckmessung der Stämme Dahl/SS und Wistar aller Versuchsgruppen

Dahl/SS-Ratten zeigten einen signifikant höheren Blutdruck im Vergleich zum Referenzstamm Wistar in allen drei Gruppenvergleichen ($p < 0,01$). Unter Sham-Bedingungen war bei den Dahl/SS-Ratten ein Blutdruck von $169,5 \pm 5,8$ mmHg messbar, dagegen zeigte der Referenzstamm Wistar, wie schon beschrieben einen Blutdruck von $123,3 \pm 2,0$ mmHg ($p < 0,001$, Abb. 13).

Die orchiektomierten Dahl/SS-Tiere ließen keinen signifikanten Abfall des Blutdruckes innerhalb des Stammes erkennen. Mit Werten von $155,0 \pm 4,5$ mmHg waren diese jedoch dezent niedriger als noch unter Sham-Bedingungen. Vergleichend zu diesen Ergebnissen war auch bei den Wistar-Ox-Tieren der Blutdruck mit einem Mittelwert von $112,9 \pm 4,3$ mmHg niedriger als unter Sham-Bedingungen.

Die Gruppe OxTF zeigte einen potenzierten Effekt auf den Phänotypen im Vergleich zur reinen Ox-Gruppe. Ein wiederum signifikanter Abfall des Blutdruckes war bei den Dahl/SS-OxTF-Tieren der 18. Woche im Vergleich zu Ox-Tieren zu erkennen, hier

waren Werte von $155,0 \pm 4,5$ mmHg in der Ox-Gruppe und $141,9 \pm 3,9$ mmHg in der OxTF-Gruppe zu messen ($p < 0,05$; Abb. 13). Der mittlere Blutdruckabfall zwischen den Dahl/SS-Sham-Tieren und den Dahl/SS-OxTF-Tieren betrug 16,3 %.

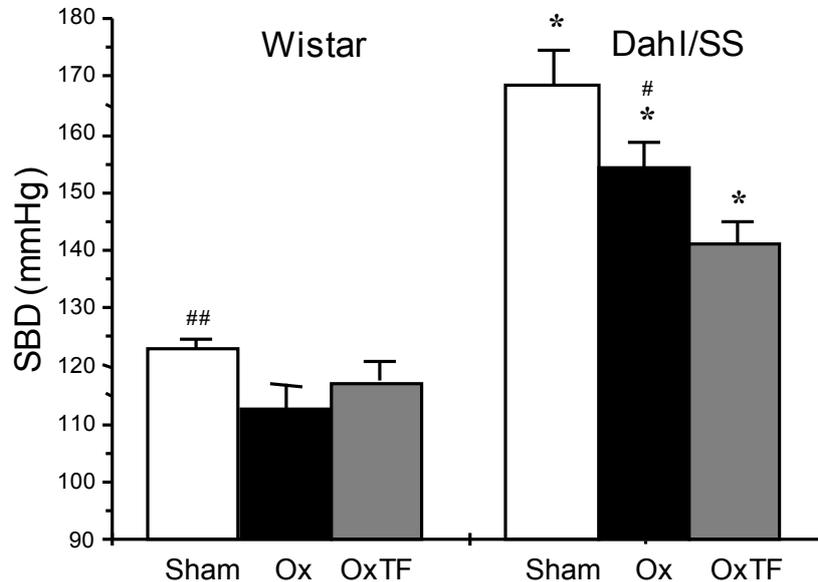


Abb. 13: Vergleichender systolischer Blutdruck (SBD) bei Wistar und Dahl/SS der 18. Woche der Versuchsgruppen Sham (weiß), Ox (schwarz) und OxTF (grau) mit n=6-8 für alle Gruppen. * $p < 0,01$ vs. Wistar gleiche Gruppe; # $p < 0,05$ vs. Dahl/SS OxTF; ## $p = 0,01$ vs. Wistar Ox.

4.1.4.3.3 Direkte invasive Blutdruckmessung der Stämme MWF und Wistar aller Versuchsgruppen

Die MWF-Tiere der Versuchsgruppen Sham und Ox zeigten keinen signifikant höheren mittleren Druck (MAD) an als die Kontrollgruppe Wistar der gleichen Versuchsgruppen. Es wurden Werte von $122,5 \pm 4,8$ mmHg bei MWF Sham und $123,1 \pm 3,4$ mmHg bei Wistar Sham ermittelt, sowie $120,9 \pm 4,2$ mmHg in der MWF Ox-Gruppe und $115,8 \pm 2,4$ mmHg in der Wistar Ox-Gruppe. Auch zwischen den einzelnen Gruppen des gleichen Stammes gab es keinen signifikanten Unterschied. Lediglich zwischen der mit Testosteron behandelten Gruppe MWF OxTF und der entsprechenden Wistar OxTF-Gruppe war ein signifikanter Unterschied des MAD von $128,9 \pm 3,9$ mmHg bei MWF zu $114,3 \pm 3,2$ mmHg bei Wistar zu messen ($p < 0,05$; Abb. 14).

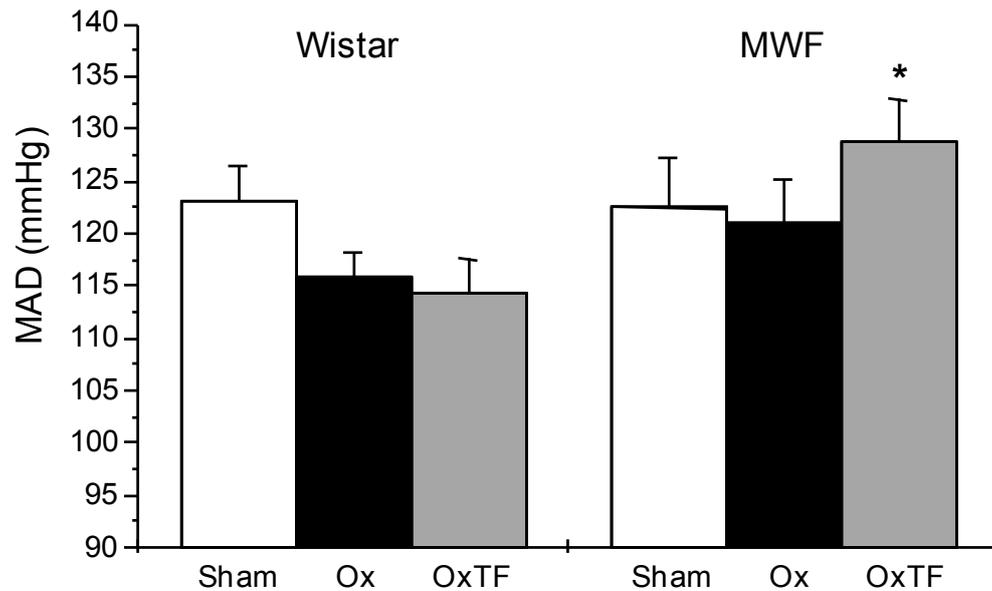


Abb. 14: Vergleichender mittlerer arterieller Blutdruck (MAD) bei Wistar und MWF der 18. Woche der Versuchsgruppen Sham (weiß), Ox (grau) und OxTF (schwarz) mit n=6-9 für alle Gruppen. *p<0,05 vs. Wistar gleiche Gruppe.

4.1.4.3.4 Direkte invasive Blutdruckmessung der Stämme Dahl/SS und Wistar aller Versuchsgruppen

Bei den Dahl/SS-Ratten konnte innerhalb eines Stammes zwischen den drei Versuchsgruppen keine signifikante Änderung des Blutdruckes gemessen werden, lediglich zwischen Dahl/SS und Wistar aller Gruppen bestand ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$; Abb. 15).

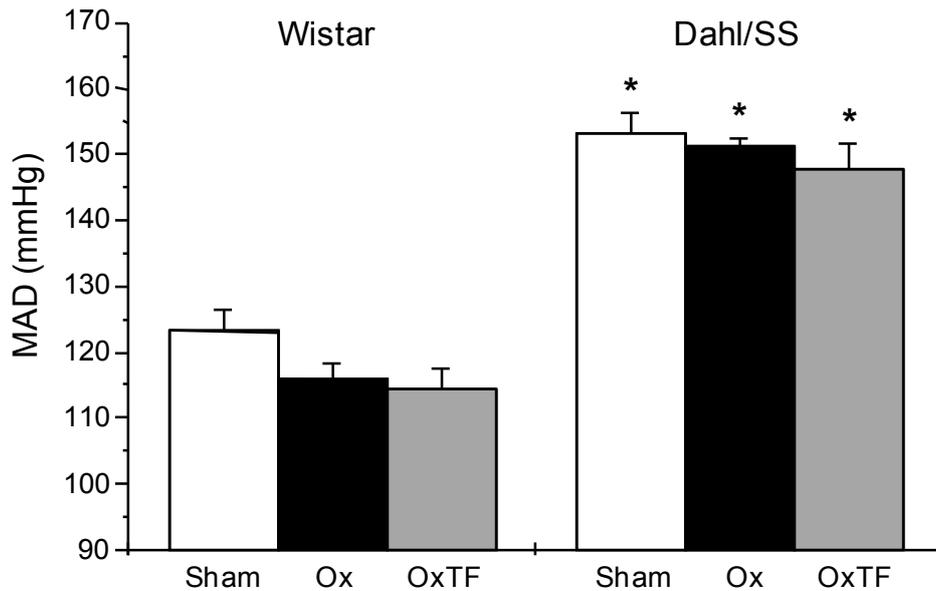


Abb. 15: Vergleichender mittlerer arterieller Blutdruck (MAP) bei Wistar und Dahl/SS der 18. Woche der Versuchsgruppen Sham (weiß), Ox (schwarz) und OxTF (grau) mit n=6-8 für alle Gruppen. *p<0,001 vs. Wistar gleiche Gruppe.

4.1.4.4 Testosteronbestimmung im Zeitverlauf

4.1.4.4.1 Testosteronbestimmung des Wistar-Stammes aller Versuchsgruppen in Zusammenhang mit der Albuminausscheidung im Urin

Die Darstellung der Signifikanzen der Albuminausscheidungen wurde in Kapitel 4.1.4.1 behandelt. Die Testosteronkonzentrationen der nicht behandelten Wistar-Sham-Gruppe, die von der 12. Woche bis zur 18. Woche gemessen wurden, ließen im Zeitverlauf Werte von $6,40 \pm 0,79$, $9,96 \pm 2,05$, $8,62 \pm 1,35$ und $2,92 \pm 0,50$ nmol/l erkennen ($p < 0,05$ 18. Woche vs. 14. und 16. Woche; Abb.11). In den Abbildungen 16 bis 18 sind die Ergebnisse der Albuminausscheidung und der zum Zeitpunkt gemessenen Testosteronkonzentration im Zeitverlauf jeweils in einer Abbildung zusammengefasst.

Nach der Orchiektomie in der 10. Woche sanken die Testosteronwerte in der Wistar-Ox-Gruppe bei fast allen Tieren unter die Nachweisgrenze von $0,0347$ nmol/l ab. Die Werte erreichten im Zeitverlauf von der 12. bis zur 18. Woche im Mittel $0,01 \pm 0,01$, $0,00 \pm 0,00$, $0,02 \pm 0,02$ und $0,08 \pm 0,03$ nmol/l ($p < 0,05$ 14. Woche vs. 18. Woche). Die Albuminausscheidung im Urin änderte sich nicht und lag bei allen Tieren zu jedem Zeitpunkt unter einem Wert von $0,24$ mg/24h (Abb. 16).

In der letzten Behandlungsgruppe OxTF ließ sich ein deutlich erhöhter Testosteronspiegel messbar nachweisen, der in der 12. Woche $51,65 \pm 11,03$ nmol/l betrug und im weiteren Verlauf auf $43,58 \pm 8,58$, $28,04 \pm 3,52$ und letztlich auf $15,33 \pm 2,68$ nmol/l in der 18. Woche abfiel ($p < 0,05$, 18. Woche vs. 12. Woche). Die Albuminausscheidung im Urin im Zeitverlauf zeigte keinen Wert über $0,55 \pm 0,10$ mg/24h (Abb. 16).

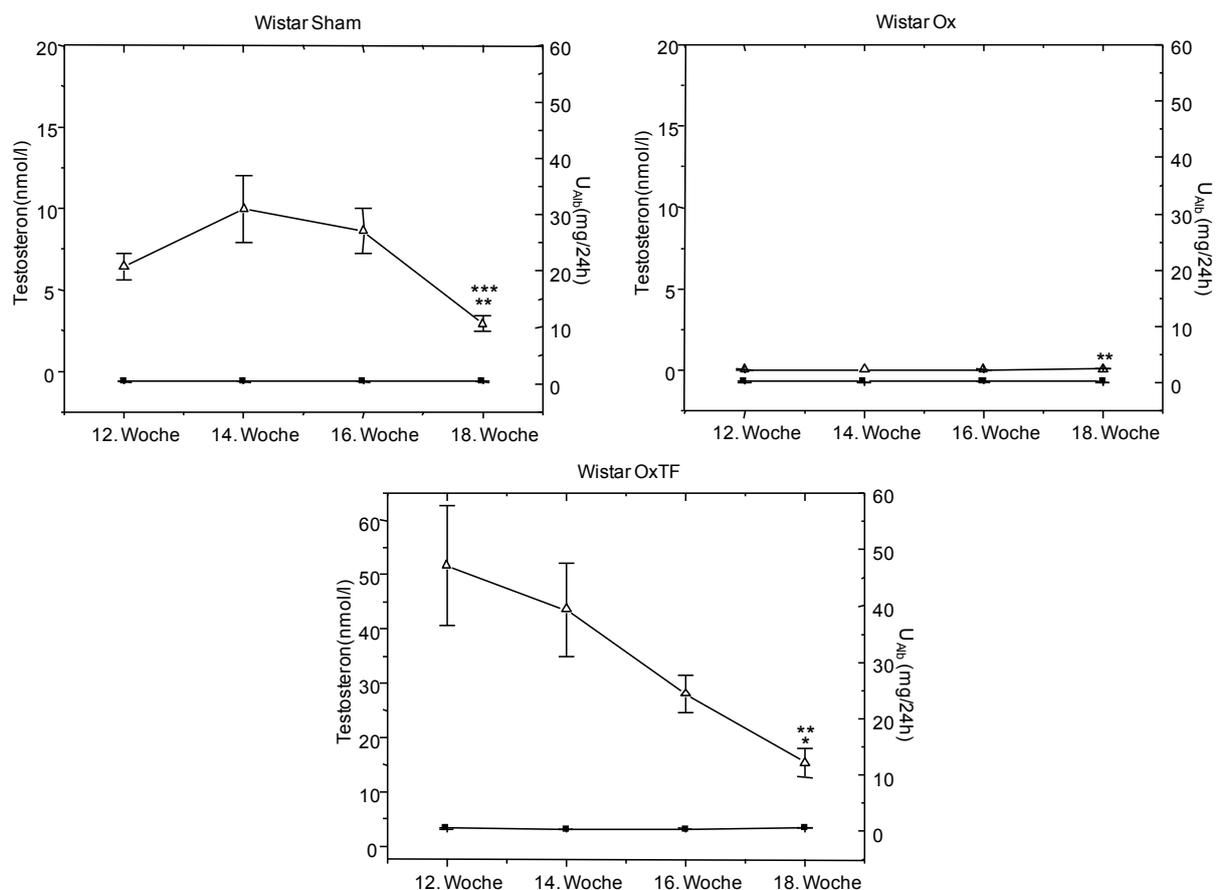


Abb. 16: Zusammenhang zwischen Albuminausscheidung im Urin (U_{Alb} , -■-, rechte y-Achsen) und Testosteronkonzentration (-△-, linke y-Achsen, $n=9-12$) von der 12. bis zur 18. Woche bei Wistar-Sham (links oben), Wistar-Ox (rechts oben) und Wistar-OxTF (mitte unten); * $p < 0,05$ vs. 12. Woche, ** $p < 0,05$ vs. 14. Woche, *** $p < 0,05$ vs. 16. Woche

4.1.4.4.2 Testosteronbestimmung des MWF-Stammes aller Versuchsgruppen in Zusammenhang mit der Albuminausscheidung im Urin

Die MWF-Ratte zeigte unter Sham-Bedingungen ähnliche Testosteron-Werte wie der Referenzstamm Wistar. In der 12. Woche waren Werte von $9,17 \pm 1,11$ nmol/l zu messen, die in der 14. Woche auf eine mittlere Konzentration von $14,76 \pm 2,44$ nmol/l

anstiegen und über $6,03 \pm 1,23$ in der 16. Woche auf $1,73 \pm 0,37$ nmol/l in der 18. Woche abfielen ($p < 0,05$ 18. Woche vs. 12. Woche, $p < 0,001$ 14. Woche vs. 16. und 18. Woche; Abb. 17).

Nach der Orchiektomie fiel die Konzentration des Serum-Testosterons ab. Werte über 0,13 nmol/l wurden im Verlauf nicht erreicht und es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Messwerten im Zeitverlauf (Abb. 17). Die im Urin nachgewiesene Albuminkonzentration betrug im Vergleich zur Sham-Gruppe mit $21,83 \pm 3,29$ mg/24h in der 18. Woche nur etwa 45 % des Wertes des unbehandelten Stammes ($p < 0,05$).

Die in der OxTF-Gruppe gemessene Testosteronkonzentration war im Vergleich zur Sham-Gruppe deutlich signifikant erhöht mit $39,21 \pm 8,03$ nmol/l in der 12. Woche ($p < 0,001$). Die Konzentration sank im Zeitverlauf bis zur 18. Woche auf einen Wert von $21,43 \pm 2,44$ nmol/l ab, und war damit gegenüber der 14. Woche signifikant erniedrigt ($p < 0,05$). Die Albuminkonzentration im 24h-Urin wurde durch die Behandlung marginal abgemildert (Abb. 17).

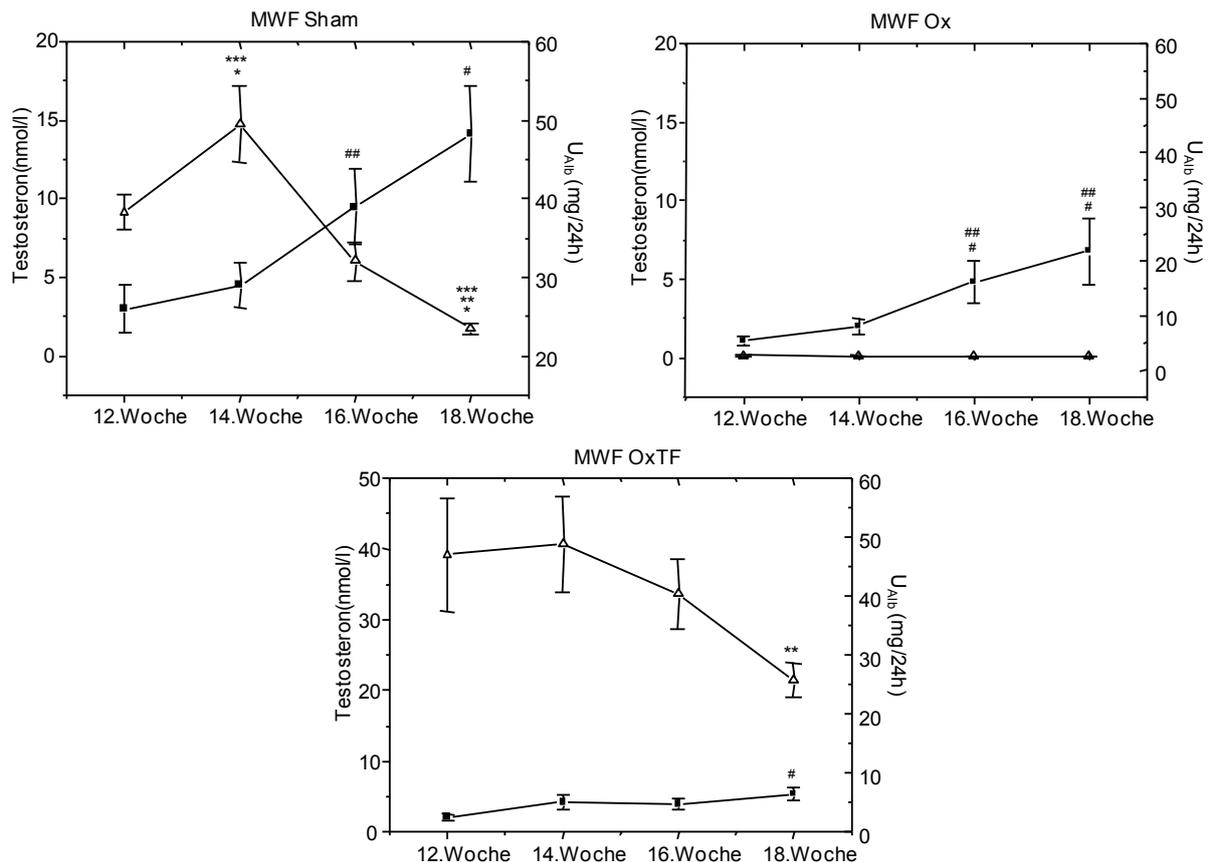


Abb. 17: Zusammenhang zwischen Albuminausscheidung im Urin (U_{Alb} , -■-, rechte y-Achsen) und Testosteronkonzentration (-△-, linke y-Achsen, n=8-15) von der 12. bis zur 18. Woche bei MWF-Sham (links oben), MWF-Ox (rechts oben) und MWF-OxTF (mitte unten); * $p < 0,05$ vs. 12. Woche, ** $p < 0,05$ vs. 14. Woche, * $p < 0,05$ vs. 16. Woche, # $p < 0,05$ vs. 12. Woche, ## $p < 0,05$ vs. 14. Woche**

4.1.4.4.3 Testosteronbestimmung des Dahl/SS-Stammes aller Versuchsgruppen in Zusammenhang mit der Albuminausscheidung im Urin

Bei den Dahl/SS-Sham-Tieren konnte im Zeitverlauf eine maximale Testosteronkonzentration von $13,62 \pm 3,48$ nmol/l in der 14. Woche nachgewiesen werden ($12,26 \pm 2,38$ nmol/l in der 12. Woche, $12,87 \pm 4,77$ nmol/l in der 16. Woche, $0,97 \pm 0,28$ nmol/l in der 18. Woche; $p < 0,05$ 14. Woche vs. 18. Woche; Abb. 18).

Nach der Kastration der Tiere konnte noch ein maximaler Wert von $0,21 \pm 0,07$ nmol/l Testosteron in der 18. Woche ermittelt werden (Abb. 18).

Äquivalent zu den bisherigen Ergebnissen der Testosteron-Messung konnte bei der OxTF-Gruppe in der 12. Woche ein erhöhter Wert von $59,68 \pm 7,11$ nmol/l gemessen werden, der bis zur 18. Woche auf eine Konzentration von $8,22 \pm 2,93$ nmol/l signifikant unterschiedlich zu den übrigen Zeitpunkten absank ($p < 0,01$) (Abb. 18).

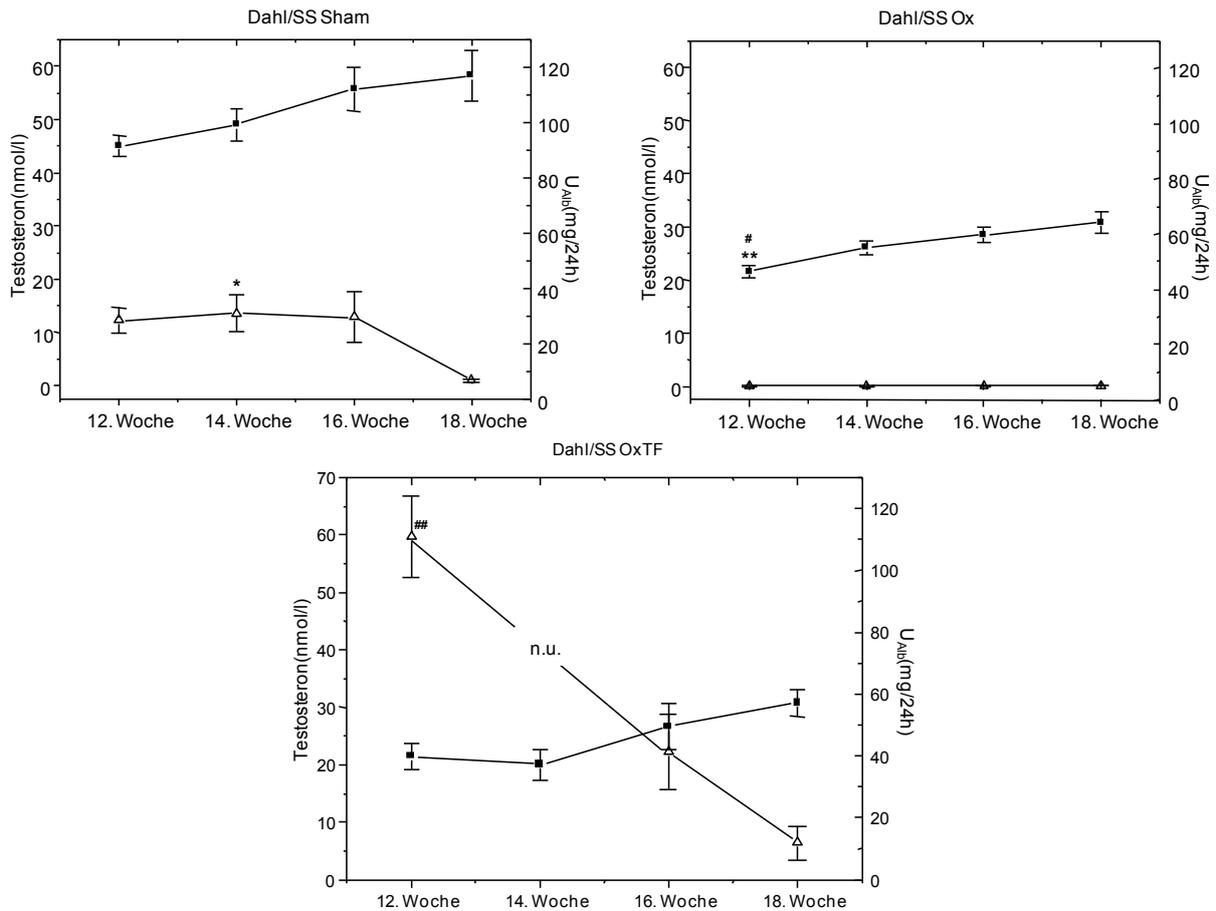


Abb. 18: Zusammenhang zwischen Albuminausscheidung im Urin (U_{Alb}, -■-, rechte y-Achsen) und Testosteronkonzentration (-△-, linke y-Achsen, n=4-10) von der 12. bis zur 18. Woche bei Dahl/SS-Sham (links oben), Dahl/SS-Ox (rechts oben) und Dahl/SS-OxTF (mitte unten); n.u., nicht untersucht. *p<0,05 vs. 18. Woche, **p<0,05 vs. 16. Woche, #p<0,01 vs. 18. Woche, ##p<0,01 vs. 16. und 18. Woche

4.1.4.5 Ergebnisse der Cystatin C-Messung der Sham- und Ox-Gruppe aller Stämme

Das körpereigene, im Serum vorkommende Protein Cystatin C erreichte beim unbehandelten Referenzstamm Wistar-Sham einen durchschnittlichen Wert von $0,1 \pm 0,01$ mg/l (Abb. 19). Nach der Kastration war ein leichter, nicht signifikanter Rückgang der Proteinkonzentration auf einen messbaren Wert von $0,09 \pm 0,005$ mg/l festzustellen. Der MWF-Stamm wies mit Werten von $0,11 \pm 0,01$ mg/l in der Sham-Gruppe und $0,10 \pm 0,004$ mg/l in der Ox-Gruppe eine um jeweils 0,01 mg/l tendenziell, aber nicht signifikant höhere Konzentration von Cystatin C auf. Wiederum eine nicht signifikante Erhöhung um jeweils 0,01 mg/l war in beiden Dahl/SS-Gruppen zu erkennen. Unter Sham-Bedingungen erreichte die Konzentration im Serum durch-

schnittliche Werte von $0,12 \pm 0,01$ mg/l, die kastrierten Tiere waren mit einer Konzentration von $0,11 \pm 0,01$ mg/l wiederum leicht, jedoch nicht signifikant niedriger.

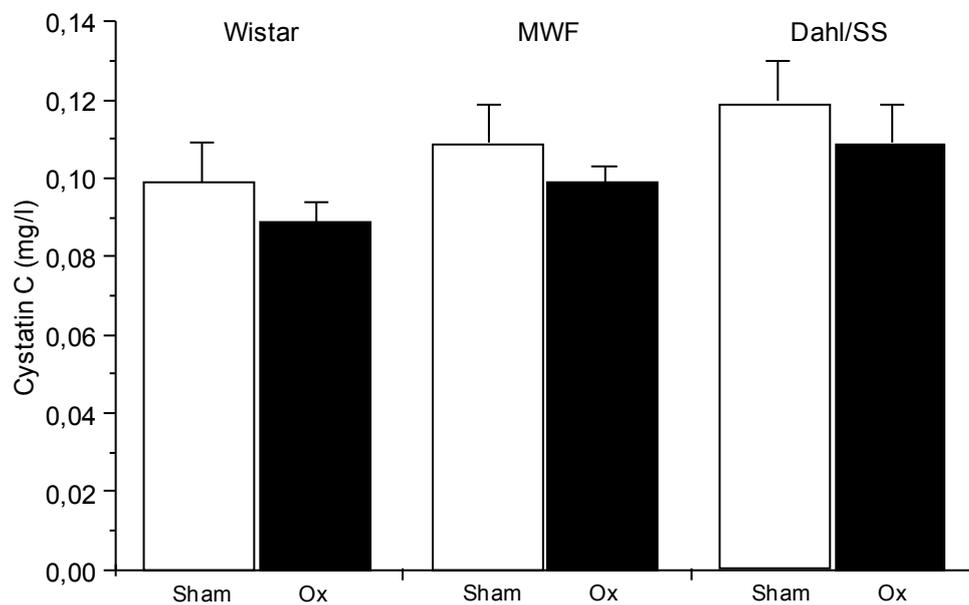


Abb. 19: Vergleichende Cystatin C-Konzentration bei Wistar, MWF und Dahl/SS der 18. Woche der Versuchsgruppen Sham (weiß) und Ox (schwarz) mit n=7-8 für alle Gruppen.

4.1.4.6 Ergebnisse der Cholesterin-Messung der Sham- und Ox-Gruppe aller Stämme

Eine ähnliche Verteilungskurve wie bei Cystatin C ließ sich beim Cholesterin beobachten. Lediglich der unbehandelte und nicht kastrierte Referenzstamm Wistar lag mit einem Mittelwert von $88,13 \pm 4,4$ mg/dl genauso hoch wie die kastrierte Gruppe ($88,13 \pm 7,24$ mg/dl) (Abb. 20). Bei den Stämmen MWF und Dahl/SS ist eine deutliche, bei MWF nicht signifikante Absenkung des Cholesterinspiegels im Plasma nach der Kastration zu erkennen; bei MWF von $120,75 \pm 3,13$ mg/dl auf $113,88 \pm 4,46$ mg/dl und bei Dahl/SS signifikant von $151,75 \pm 4,25$ mg/dl auf einen mittleren Wert von $109,38 \pm 4,71$ mg/dl ($p < 0,001$). Im Vergleich zwischen dem Referenzstamm Wistar und den entsprechenden Gruppen der MWF-, und Dahl/SS-Ratten liegt ein signifikant höherer Cholesterinspiegel vor ($p < 0,05$; Abb. 20).

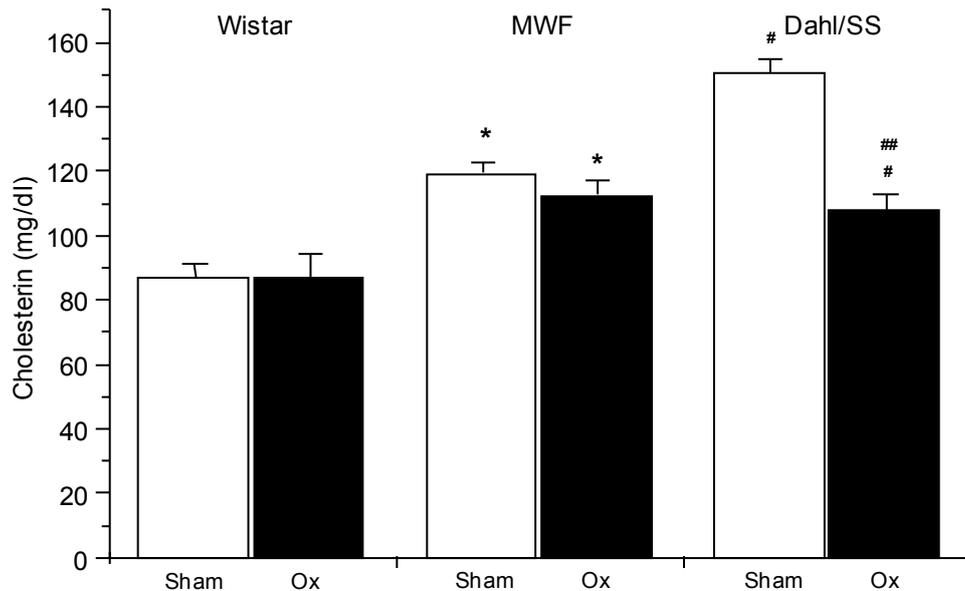


Abb. 20: Vergleichende Cholesterin-Konzentration bei Wistar, MWF und Dahl/SS der 18. Woche der Versuchsgruppen Sham (weiß) und Ox (schwarz) mit n=7-8 für alle Gruppen. *p<0,01 vs. Wistar gleiche Gruppe; #p<0,05 vs. Wistar gleiche Gruppe; ##p<0,001 vs. Dahl/SS-Sham.

4.1.4.7 Ergebnisse der Triglyzerid-Messung der Sham- und Ox-Gruppe aller Stämme

Die Triglyzerid-Messung ließ beim unbehandelten Referenzstamm Wistar Werte von $0,71 \pm 0,10$ mmol/l erkennen, die unter Kastration signifikant auf einen mittleren Wert von $0,41 \pm 0,02$ mmol/l absanken ($p=0,001$). Beim MWF-Stamm war keine signifikante Abnahme nach erfolgter Kastration zu messen, Werte von $0,59 \pm 0,03$ mmol/l bei der Sham-Gruppe und $0,56 \pm 0,02$ mmol/l bei der Ox-Gruppe ließen nur eine dezente Abnahme erkennen. Signifikant erhöht jedoch war der Mittelwert der MWF-Ox-Gruppe im Vergleich zur Wistar-Ox-Gruppe ($p<0,05$). Bei den Tieren des Dahl/SS-Stammes wurde eine Triglyzerid-Konzentration von $1,29 \pm 0,15$ mmol/l unter Sham-Bedingungen und $1,55 \pm 0,25$ mmol/l unter Ox-Bedingungen ermittelt. Beide Behandlungsgruppen waren gegenüber den jeweiligen Wistar-Gruppen signifikant erhöht ($p<0,05$; Abb. 21).

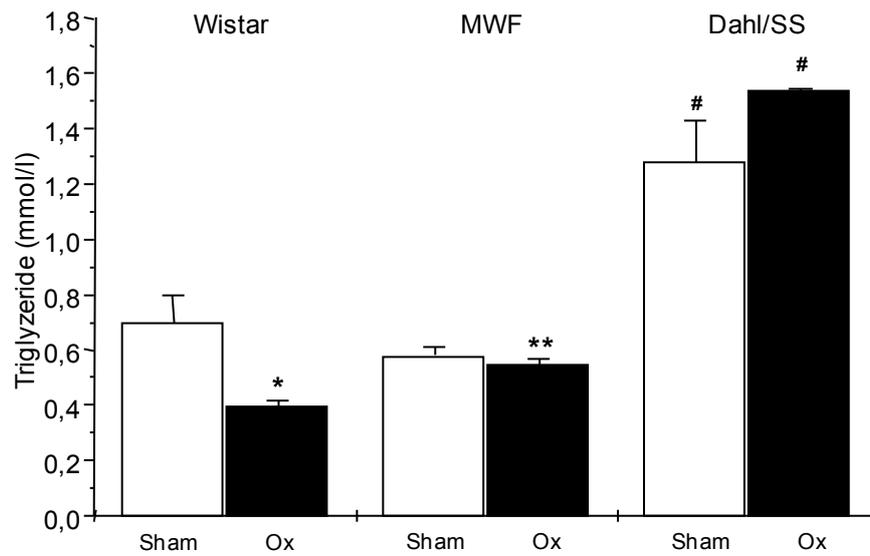


Abb. 21: Vergleichende Triglyzerid-Konzentration bei Wistar, MWF und Dahl/SS der 18. Woche der Versuchsgruppen Sham (weiß) und Ox (schwarz) mit n=7-8 für alle Gruppen. *p=0,001 vs. Wistar-Sham; **p<0,05 vs. Wistar gleiche Gruppe; #p<0,05 vs. Wistar gleiche Gruppe.

4.1.5 Ergebnisse der Organpräparation

Wird zunächst das relative Nierengewicht betrachtet, lässt sich in allen drei Stämmen eine signifikante Abnahme der OxTF-Gruppe gegenüber der unbehandelten Sham-Gruppe erkennen, bei Wistar von $5,64 \pm 0,16$ mg/g auf einen mittleren Wert von $5,08 \pm 0,19$ mg/g ($p=0,08$), bei MWF von $5,81 \pm 0,18$ mg/g auf $5,18 \pm 0,11$ mg/g ($p<0,05$) und bei Dahl/SS von $7,08 \pm 0,14$ mg/g auf $5,93 \pm 0,15$ mg/g ($p<0,001$). Beim MWF-Stamm und beim Dahl/SS-Stamm war zudem eine signifikante Reduktion des relativen Nierengewichtes unter der Ox-Behandlung messbar gewesen; hier sank das relative Gewicht bei MWF von $5,81 \pm 0,18$ mg/g auf $4,80 \pm 0,18$ mg/g ($p<0,001$) und bei Dahl/SS von $7,08 \pm 0,14$ mg/g auf $5,89 \pm 0,13$ mg/g ($p<0,001$; Tab. 3).

Bei den Messwerten des relativen Herzgewichtes war lediglich eine signifikante Reduktion beim Dahl/SS-Stamm zu erkennen. Die nicht behandelte Sham-Gruppe war mit einem mittleren Wert von $2,91 \pm 0,03$ mg/g signifikant höher als in der OxTF-Gruppe mit $2,44 \pm 0,05$ mg/g ($p<0,001$), und die Ox-Gruppe war mit einem Wert von $2,78 \pm 0,04$ mg/g wiederum signifikant höher als die OxTF-Gruppe ($p<0,001$; Tab. 3).

Ähnlich wie beim relativen Herzgewicht war auch beim relativen linksventrikulären Gewicht lediglich bei Dahl/SS eine signifikante Reduktion zu messen. Hier sank das Gewicht von $2,42 \pm 0,04$ mg/g in der Sham-Gruppe auf $2,36 \pm 0,04$ mg/g in der Ox-Gruppe ($p<0,001$). Eine weitere Reduktion ergaben die gemittelten Ergebnisse in der OxTF-Gruppe, hier war noch ein Gewicht von $2,01 \pm 0,05$ mg/g zu messen ($p<0,001$; Tab. 3).

Tab. 3: Phänotypische Charakterisierung der Stämme Wistar, MWF und Dahl/SS aller Behandlungsgruppen.

Phänotyp	Stamm	Behandlungsgruppe			Overall ANOVA	P-ANOVA		
		Sham	Ox	OxTF		Sham vs. Ox	Sham vs. OxTF	Ox vs. OxTF
rel. NG (mg/g)								
	Wistar	5,64 ± 0,16	5,40 ± 0,15	5,08 ± 0,19	0,09	0,85	0,08	0,59
	MWF	5,81 ± 0,16	4,80 ± 0,18 [#]	5,18 ± 0,11	0,0003	0,0003	0,02	0,31
	Dahl/SS	7,08 ± 0,14	5,89 ± 0,13	5,93 ± 0,15	<0,0001	<0,0001	<0,0001	1,00
rel. HG (mg/g)								
	Wistar	2,04 ± 0,05	2,10 ± 0,05	1,98 ± 0,07	0,30	1,00	1,00	0,38
	MWF	2,36 ± 0,03	2,34 ± 0,05	2,33 ± 0,04	0,90	1,00	1,00	1,00
	Dahl/SS	2,91 ± 0,03	2,78 ± 0,04	2,44 ± 0,05	<0,0001	0,14	<0,0001	<0,0001
rel. LV (mg/g)								
	Wistar	1,69 ± 0,05	1,65 ± 0,04	1,56 ± 0,07	0,24	1,00	0,30	0,68
	MWF	1,89 ± 0,03 [#]	1,91 ± 0,06 [#]	1,88 ± 0,03 [*]	0,91	1,00	1,00	1,00
	Dahl/SS	2,42 ± 0,04	2,36 ± 0,04	2,01 ± 0,05	<0,0001	1,00	<0,0001	<0,0001
KG (g)								
	Wistar	478,1 ± 14,8	479,6 ± 8,9	505,1 ± 7,8	0,23	1,00	0,36	0,42
	MWF	333,8 ± 4,1 [*]	338,9 ± 13,2 [*]	346,1 ± 4,9 [*]	0,49	1,00	0,71	1,00
	Dahl/SS	409,3 ± 7,5	388,4 ± 5,0	400,0 ± 5,8	0,11	0,12	0,94	0,76

rel. NG, relatives Nierengewicht; rel. HG, relatives Herzgewicht; rel. LV, relatives linksventrikuläres Herzgewicht; KG, Körpergewicht; *p<0,01 Gruppe, [#]p<0,05 vs. Wistar gleiche Gruppe

4.1.5.1 Ergebnisse der histologischen Untersuchungen

4.1.5.1.1 Glomerulosklerose-Index der Stämme Wistar, MWF und Dahl/SS aller Versuchsgruppen

Bei der Auswertung des GSI konnte bei allen drei untersuchten Stämmen eine tendenziell ähnliche und teils signifikante Abnahme zwischen den jeweiligen Gruppen eines Stammes festgestellt werden (Abb. 22). Bei Wistar sank der Index von $2,00 \pm 0,11$ unter Sham-Bedingungen nicht signifikant auf $1,83 \pm 0,15$ nach erfolgter Kastration. Die signifikante Abnahme in der OxTF-Gruppe im Vergleich zur Sham-Gruppe betrug 40,5 % ($p < 0,05$). Beim MWF-Stamm war kein signifikant höherer Index gegenüber den jeweiligen Gruppen des Wistar-Stammes zu erkennen. Innerhalb des MWF-Stammes kam es mit Werten in der Sham-Gruppe von $2,01 \pm 0,15$ und in der Ox-Gruppe von $1,99 \pm 0,10$ in der OxTF-Gruppe mit $1,51 \pm 0,13$ zu einer nicht signifikanten Abnahme. Bei den Dahl/SS-Ratten war eine signifikante Abnahme des Indexes von der Sham-Gruppe mit $2,31 \pm 0,11$ zur Ox-Gruppe mit $1,83 \pm 0,09$ und zur OxTF-Gruppe mit $1,65 \pm 0,12$ zu erkennen ($p < 0,05$ vs. Dahl/SS-Sham).

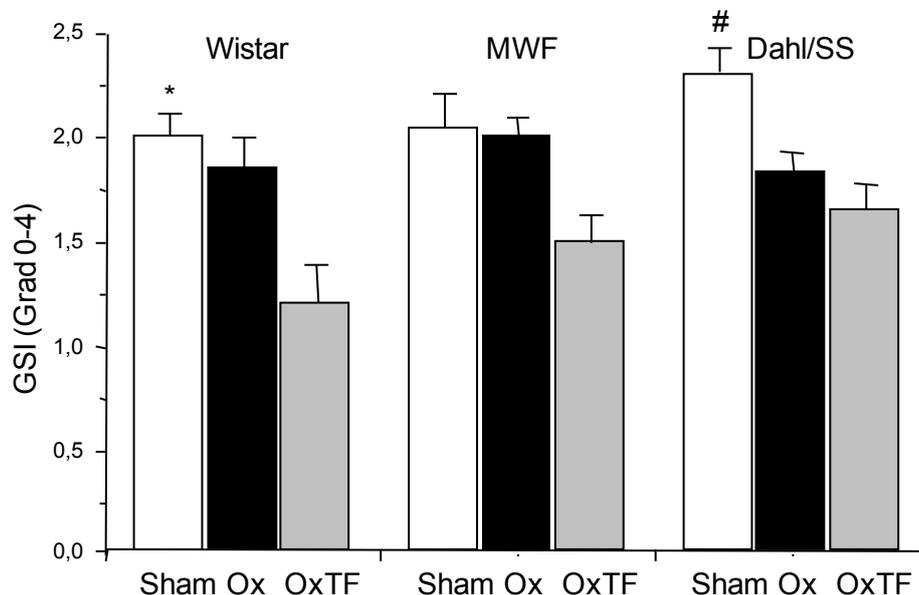


Abb. 22: Glomerulosklerose-Index (GSI) der Stämme Wistar, MWF und Dahl/SS der Sham-(weiß), Ox-(schwarz) und OxTF-Gruppen (grau) der 18. Woche mit n=8 für alle Gruppen. * $p < 0,05$ vs. OxTF gleicher Stamm. # $p < 0,05$ vs. Ox und OxTF gleicher Stamm.

4.1.5.1.2 Tubulointerstitieller Schädigungsindex

Die Beurteilung der histologischen Schnitte in Bezug auf den tubulointerstitiellen Schädigungsindex (TSI) ergab eine äquivalente Verteilung wie sie schon beim GSI zu erkennen war (Abb. 23). Beim Referenzstamm Wistar sank der Index von $0,28 \pm 0,06$ in der Sham-Gruppe auf $0,22 \pm 0,05$ in der Ox-Gruppe nicht signifikant ab. Im Vergleich zur Sham-Gruppe war die OxTF-Gruppe wiederum nicht signifikant niedriger mit Werten von $0,13 \pm 0,02$. Beim MWF-Stamm kam es zu keiner signifikanten Abnahme des Indexes. Hier sanken die Werte nach erfolgter Kastration in der Sham-Gruppe von $0,34 \pm 0,05$ auf $0,22 \pm 0,04$ in der Ox-Gruppe ab. In der Behandlungsgruppe OxTF kam es zu keiner weiteren messbaren Reduktion. Bei den Dahl/SS-Tieren konnte unter Sham-Bedingungen ein Index von $1,06 \pm 0,08$ festgestellt werden, der nach Kastration signifikant auf $0,78 \pm 0,08$ absank ($p < 0,05$) und in der OxTF-Gruppe mit $0,61 \pm 0,08$ wiederum signifikant niedriger war ($p < 0,001$). Alle Gruppen des Dahl/SS-Stammes waren signifikant höher als die entsprechenden Gruppen des Wistar-Stammes ($p < 0,001$).

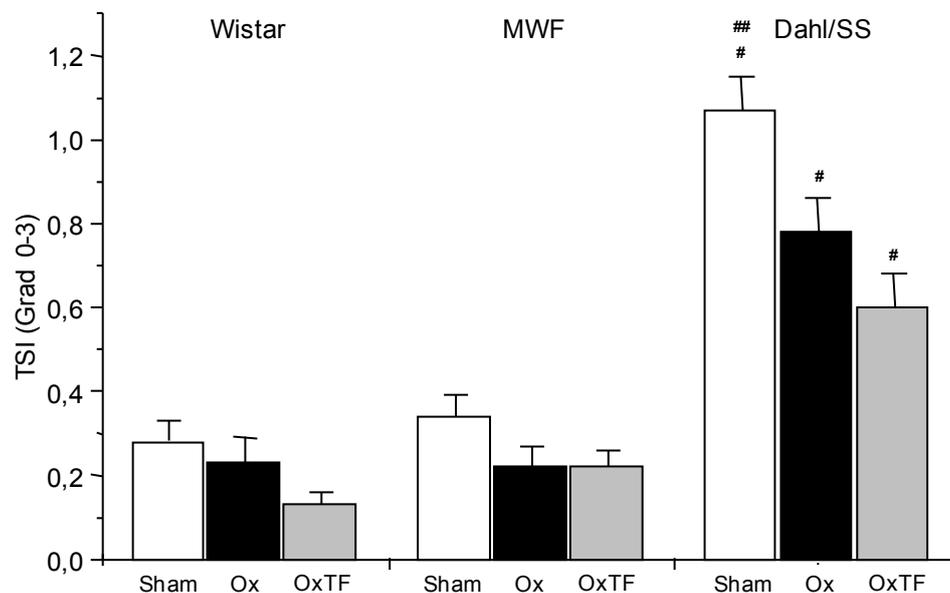


Abb. 23: Tubulointerstitieller Schädigungsindex (TSI) der Stämme Wistar, MWF und Dahl/SS der Sham-(weiß), Ox-(schwarz) und OxTF-Gruppen (grau) der 18. Woche mit n=8. #p<0,001 vs. Wistar gleiche Gruppe. ##p<0,05 vs. Dahl/SS Ox und OxTF.

4.1.5.2 Ergebnisse der mRNA-Genexpressionsanalysen der 18. Woche aller Stämme

4.1.5.2.1 Kim1

Betrachtet man zunächst den Wistar-Stamm war nach der Kastration ein nicht signifikantes Absinken der mRNA-Expression von Kim1 auf $57,9 \pm 6,9$ % zu erkennen (Abb. 24). Nach Supplementierung von Testosteron und Flutamid wurde nur noch ein Expressionswert von $53,8 \pm 4,0$ % erreicht. Der MWF-Stamm zeigte unter Sham-Bedingungen im Verhältnis zum Referenzstamm mit 6484 ± 1177 % eine signifikant höhere mRNA-Expression ($p < 0,001$). Die Ausprägung bei orchietomierten MWF-Tieren lag bei 3577 ± 664 % ($p < 0,001$ vs. Wistar gleiche Gruppe), in der OxTF-Gruppe nur noch bei 756 ± 64 %.

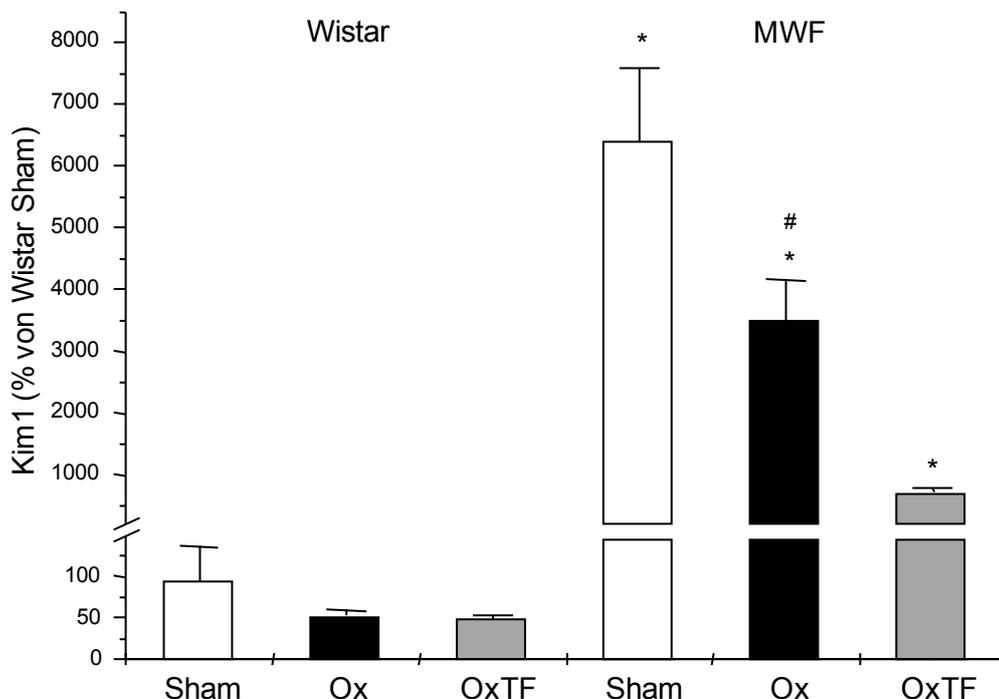


Abb. 24: Kidney Injury Molecule 1 (Kim-1)-mRNA-Expression von Wistar und MWF der Gruppen Sham (weiß), Ox (schwarz) und OxTF (grau) in der 18. Woche mit n=5-8. * $p < 0,001$ vs. Wistar gleiche Gruppe. # $p < 0,01$ vs. MWF Sham und OxTF.

Bei den verschiedenen Dahl/SS-Versuchsgruppen war die Ausprägung der mRNA-Expression im Vergleich zu Wistar signifikant erhöht (Abb. 25). Die Ergebnisse der Sham-Tiere erreichten einen prozentualen Wert von 12734 ± 1535 % im Vergleich zur Kontrollgruppe, die orchietomierten Tiere sanken in ihrer Expression auf 8930 ± 542 % signifikant ab ($p < 0,01$), und in der dritten Versuchsgruppe OxTF war ein wei-

terer signifikanter Rückgang der mRNA-Expression auf 7192 ± 1113 % zu erkennen ($p < 0,001$ vs. Wistar gleiche Gruppen, $p < 0,01$ Dahl/SS-OxTF vs. Dahl/SS-Sham).

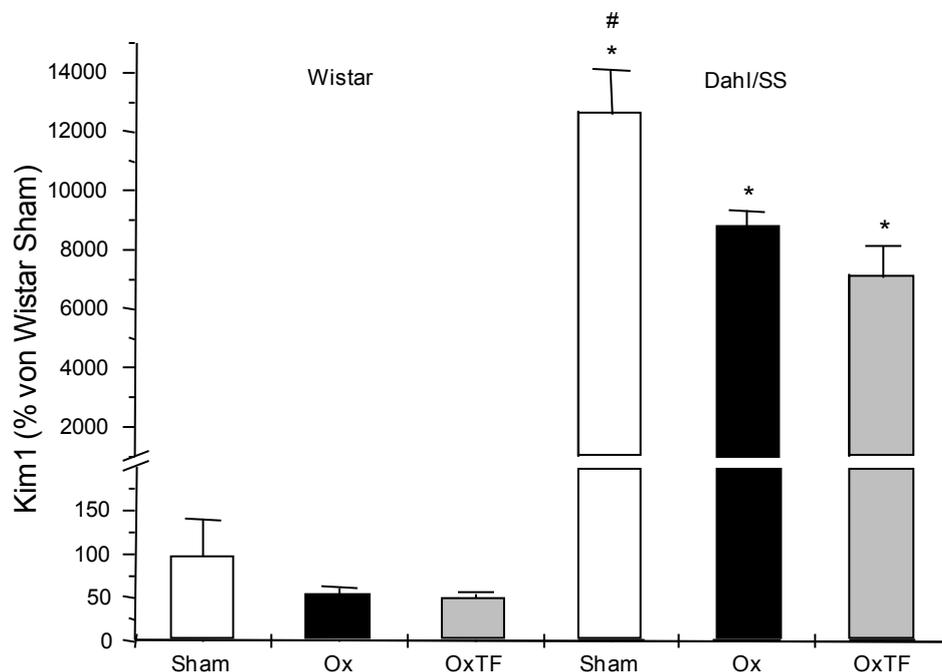


Abb. 25: Relative Kidney Injury Molecule 1 (Kim1)-mRNA-Expression von Wistar und Dahl/SS der Gruppen Sham (weiß), Ox (schwarz) und OxTF (grau) in der 18. Woche mit $n=5-7$. * $p < 0,001$ vs. Wistar gleiche Gruppe. # $p < 0,01$ vs. Dahl/SS Ox und OxTF.

4.1.5.2.2 NGAL

Die Tiere der Wistar-Ox- und der Wistar-OxTF-Gruppe zeigten beide eine leichte, jedoch nicht signifikant erhöhte mRNA-Expression von NGAL gegenüber der Sham-Gruppe (120 ± 16 % und 115 ± 18 %) (Abb. 26). Die unbehandelten MWF-Tiere waren mit einem Mittelwert von 310 ± 64 % in der Expression gegenüber dem Referenzstamm signifikant erhöht ($p < 0,01$). Nach erfolgter Kastration sank die mRNA-Expression auf einen Wert von 203 ± 26 ($p < 0,01$ vs. Wistar gleiche Gruppe). In der OxTF-Gruppe war eine signifikante Reduktion der Ausprägung von NGAL gegenüber dem unbehandelten MWF-Stamm zu erkennen. Hier konnte nur noch ein Wert von 107 ± 8 % gemessen werden ($p < 0,01$).

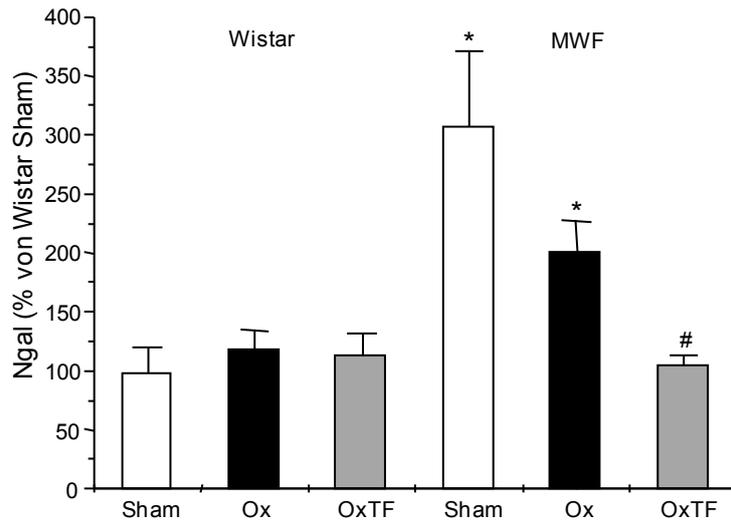


Abb. 26: Relative Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin (NGAL)-mRNA-Genexpression von Wistar und MWF der Gruppen Sham (weiß), Ox (schwarz) und OxTF (grau) in der 18. Woche mit n=5-8. *p<0,01 vs. Wistar gleiche Gruppe; #p<0,01 vs. MWF Sham.

Auch bei den drei Gruppen der Dahl/SS-Tiere war eine äquivalente Darstellung nach Auswertung der mRNA-Expressionsanalyse zu erkennen; eine Abnahme nach Kastration und eine forcierte Abnahme in der OxTF-Gruppe. Die Dahl/SS-Sham erreichten Werte von 1409 ± 184 %, die orchiektomierten Tiere waren nicht signifikant niedriger mit Werten von 1056 ± 134 % und die OxTF-Gruppe wies mit 622 ± 83 % ($p < 0,05$ vs. Wistar gleiche Gruppen, $p < 0,05$ Dahl/SS-Sham vs. Dahl/SS-OxTF; Abb. 27) einen signifikant niedrigeren Wert auf im Vergleich zur Sham-Gruppe.

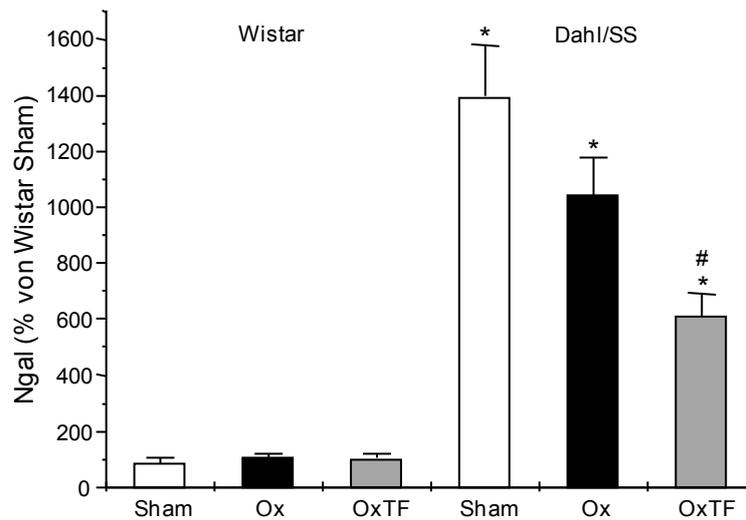


Abb. 27: Relative Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin (NGAL)-mRNA-Genexpression von Wistar und Dahl/SS der Gruppen Sham (weiß), Ox (schwarz) und OxTF (grau) in der 18. Woche mit n=5-8. *p<0,05 vs. Wistar gleiche Gruppe; #p<0,05 vs. Dahl/SS Sham und Ox.

5 Diskussion

In früheren Studien wurde belegt, dass in Tiermodellen für chronische Nierenerkrankungen, unabhängig von einer bestehenden Hypertonie, bei männlichen Ratten ein deutlich erhöhtes Risiko für die Entwicklung progressiver Nierenschädigung vorliegt als bei weiblichen Ratten. Dabei war nicht nur das Risiko der Erkrankung erhöht, sondern es konnte ebenfalls eine Beschleunigung der Progression festgestellt werden (Reckelhoff et al., 1998; Silbiger et al., 2003; Sandberg et al., 2003; Silbiger et al., 2008). Bestimmte Studien deuten darauf hin, dass speziell Geschlechtshormone wie Testosteron für die Ausprägung dieses Dimorphismus verantwortlich sind (Neugarten et al., 2002). Yanes zeigte 2008 einen Anstieg des Blutdrucks und eine erhöhte Reabsorption von Natrium unter einer Behandlung mit Dihydrotestosteron (Yanes et al., 2008). Die Ausbildung einer Albuminurie war laut Raile et al. als wichtiger Nierenfunktionsparameter mit dem männlichen Geschlecht in Zusammenhang zu bringen (Raile et al., 2007). In weiteren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die Ovariectomie keinen protektiven Effekt auf die Entstehung von Nierenerkrankungen hat (Reckelhoff et al., 1998), so dass Androgene wie Testosteron an der Entwicklung von Nierenerkrankungen entscheidend beteiligt sind (Hayward et al., 2001; Sabolić et al., 2007).

Um den Effekt von Testosteron auf die Entwicklung von Nierenschäden, z.B. auf die Progression einer Albuminurie weitergehend zu untersuchen, wurden für diese Studie drei verschiedene Tiermodelle verwendet. Die als nierengesund bekannte Wistar-Ratte diente als Referenzstamm zum Vergleich mit den nierenkranken Rattenstämmen MWF und Dahl/SS (Fassi et al., 1998). Die MWF-Ratte zeichnet sich durch eine leichte Hypertonie und eine progressiv verlaufende Albuminurie aus, die einem deutlichen sexuellen Dimorphismus unterliegt (Schulz et al., 2008). Die Dahl/SS-Ratte lässt ähnlich dem Phänotypen der MWF-Ratte eine deutliche Hypertonie sowie eine ausgeprägte Albuminurie erkennen, die jedoch kontrastierend zum MWF-Stamm keinem sexuellen Dimorphismus unterliegt (Siegel et al. 2003; Siegel et al. 2004; Schulz et al., 2012). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde in verschiedenen Vorstudien bei männlichen Tieren zunächst der physiologische Gehalt des sich im Plasma befindlichen Testosterons bestimmt. Anschließend wurde in einer weiteren angeschlossenen Studie untersucht, inwiefern eine zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführte Kastration die Ausprägung einer Albuminurie beeinflussen kann. In einer drit-

ten Vorstudie dieser Arbeit wurde eine Substitutionstherapie mit einer angegliederten Testosteron-Dosisfindung durchgeführt. In der Hauptstudie wurde dann in Abhängigkeit von den Ergebnissen der Vorstudien der Vergleich zwischen den Wistar-Ratten als Referenzstamm und den zu untersuchenden Stämmen MWF und Dahl/SS hergestellt und die verschiedenen Gruppen phänotypisch untersucht, z.B. durch die Bestimmung des Testosterongehaltes, der Albuminausscheidung über den Urin und des systolischen Blutdrucks.

5.1 Vorstudie 1, Bestimmung der physiologischen Testosteronwerte

Aufbauend auf bereits von der Arbeitsgruppe ermittelten Phänotypen der genutzten Rattenstämme sah der Hauptteil dieser Studie eine Supplementierung von Testosteron vor (Schulz et al., 2002; Schulz et al., 2003; Rothermund et al., 2006; Schulz et al., 2008). Hierfür musste zunächst der Soll-Wert, also der später im Mittel zu erreichende Serum-Wert unbehandelter Tiere bestimmt werden. Die Rattenstämme MWF und Dahl/SS ließen dabei im Zeitverlauf ähnlich hohe Serumspiegel erkennen, die im weiteren Altersverlauf nicht weiter anstiegen. Durch das Erreichen eines somit ermittelten physiologischen Testosteronspiegels konnte ein Testosteron-Propionat Pellet mit 150 mg Testosteron und einer Wirkzeit von 90 Tagen für weitere Studienteile dieser Arbeit verwendet werden.

5.2 Vorstudie 2, altersabhängige Kastration

Die Studienplanung beinhaltete auch die Fragestellung, inwieweit die Kastration eines adulten Tieres die Ausprägung der Albuminurie beeinflussen kann. Ratten treten ca. ab der 5. Lebenswoche in die Geschlechtsreife über und sind ab diesem Zeitpunkt fortpflanzungsfähig (Ewringmann et al., 2008). Dies deckt sich mit den Testosteronbestimmungen der ersten Vorstudie, bei denen in der 4. Woche ein noch verhältnismäßig geringer Testosterongehalt gemessen werden konnte, der in der 8. Woche bereits deutlich erhöht war. Eine früh einsetzende Albuminurie tritt bereits ab der 6. Lebenswoche auf wie in Studien der Arbeitsgruppe nachgewiesen werden konnte (Schulz et al., 2007, van Es et al., 2011). Der gewählte Zeitpunkt der 13. Woche als Kastrationszeit ergab sich aus der stagnierenden Steigung des Serumspiegels der vorangegangenen Vorstudie. Die Ergebnisse dieser Untersuchung lassen deutlich erkennen, dass eine bereits seit mehreren Wochen bestehende Nierenerkrankung wie die Albuminurie durch eine Kastration stark beeinflusst werden kann. Die signifikante Abnahme der Albuminausscheidung über den Urin bereits eine Wo-

che nach erfolgter Operation um teilweise mehr als 50 % ließ die Hypothese zu, dass Testosteron einen deutlichen Einfluss auf die Entwicklung einer Nierenschädigung bei MWF und Dahl/SS haben kann. Dieser Ansatz führte nachfolgend zu der Arbeitshypothese, dass eine Substitution von Testosteron bei kastrierten Tieren wiederum eine Albuminurie hervorrufen müsste. Um diesen Rückschluss zu überprüfen wurde eine weitere Vorstudie der Hauptstudie vorangestellt.

5.3 Vorstudie 3, Substitution und Dosisfindung

Die Hypothese, dass die Substitution von Testosteron einen ähnlichen Krankheitsverlauf die Nierengesundheit betreffend hervorruft, wie bei einem nicht kastrierten, unbehandelten Tier, sollte durch die nach einer Kastration erfolgte Dauergabe von Testosteron geprüft werden. Zunächst stellte sich die Frage, auf welche Weise das Hormon dauerhaft appliziert werden konnte, ohne eine zu hohe Belastung für die Versuchsgruppe darzustellen. Die bestehende Möglichkeit der täglichen Injektion schied auf Grund eines zu hohen Stressfaktors für die Versuchstiere aus. Zudem hätte eine tägliche physische Manipulation die Ergebnisse der Gruppe verfälschen können. Eine weitere Möglichkeit bestand in der Verwendung von osmotischen Pumpen. Diese Art der Applikation ist jedoch zum einen sehr kostenintensiv, zum anderen ist die Chance, dass eine Manipulation durch Artgenossen die Pumpen beschädigen könnte wesentlich erhöht. Da eine Gruppenhaltung jedoch wiederum ein Faktor für eine möglichst artgerechte und somit physiologische Haltung darstellt, wurde auf die Verwendung von Pumpen verzichtet. Ein weiterer Grund, dass die Applikation per osmotischer Pumpe nicht gewählt wurde, ist die Tatsache, dass die Pumpen eine maximale Abgabezeit von 6 Wochen haben. Darüber hinaus stimmt die Größe dieser 6-Wochen-Pumpe nicht mit der gewünschten Leistung, also der langanhaltenden Abgabe von Testosteron überein, und eine Wiederbefüllung der Pumpen würde die Stressexposition für die Versuchstiere zusätzlich erhöhen (www.Alzet.com). Die Verwendung von Press-Pellets ermöglicht dagegen eine Abgabe von Substanzen über einen gewünschten Zeitraum nach Implantation in ein Versuchstier (www.innovsrch.com). Für diese Vorstudie wurde daher ein Pellet mit einer Wirkzeit von 90 Tagen und einem Testosterongehalt von 150 mg gewählt. Diese Konzentration sollte es ermöglichen, einen möglichst physiologischen Serumspiegel zu erreichen und diesen auch über einen Versuchszeitraum von mehreren Wochen zu halten. Die Art der Implantation wurde in zwei Teilschritten auf ihre Wirksamkeit und Effektivität geprüft. Zunächst wurden die Versuchstiere in der 4. Lebenswoche

orchiektomiert, um die körpereigene Testosteronproduktion zu stoppen. Zwei Wochen später, nachdem nachweislich keine messbare Testosteronkonzentration im Serum mehr erreicht wurde, wurden den Tieren in einer weiteren Operation zunächst an der rechten Halsseite subkutan ein Pellet implantiert. Die Überlegung war, dass eine subkutane Implantation eine für das Tier geringere Belastung bedeuten würde als eine alternative Implantationsmethode. Die Konzentrationsbestimmung bei den MWF- und Dahl/SS-Tieren in der 8. und 12. Woche ergab in beiden Gruppen, dass zunächst ein deutlich und teils signifikanter Anstieg im Vergleich zur Sham-Gruppe zu erkennen war, der 4 Wochen später jedoch bei beiden Stämmen signifikant erniedrigt war. Somit war diese Methode für die Studienplanung nicht brauchbar, da ein physiologischer und ein möglichst gleichbleibend anhaltender Spiegel nicht erreicht wurde. Hinzu kam das Problem, dass sich bei fast der Hälfte aller Tiere die Implantationsstelle, teils durch Automanipulation, teils durch unbekannte Ursachen infizierte und eine deutliche Beeinträchtigung der Tiere verursachte. Da die Ergebnisse nicht zufriedenstellend waren, wurde einer weiteren Versuchsgruppe das Pellet nicht mehr subkutan, sondern intraperitoneal implantiert. Dies sollte zum einem eine bessere und gleichmäßigere Testosteronabgabe gewährleisten und zum anderen eine Beeinträchtigung des Pellets und der Wirksamkeit durch eventuelle Infektionen minimieren. Auch bei der intraperitonealen Implantation konnte zunächst in der 8. Woche ein deutlich und signifikant erhöhter Testosteron-Spiegel gemessen werden, der sich jedoch von der 12. Woche bis zur 18. Woche in einem dauerhaft physiologischen Bereich bewegte. Der Grund für den wiederholten anfänglichen Anstieg ist bislang in der Literatur nicht ausreichend beschrieben worden. Eine mögliche Erklärung besteht eventuell in der technischen Herstellung der Pellets. Hier könnte es zu einer Art „Aktivierung“ kommen, die zunächst einen zu hohen Gehalt an Testosteron freisetzt. Neben der Testosteronkonzentration wurde die Albuminausscheidung über den Urin im Zeitverlauf gemessen. Die kastrierten und mit Testosteron behandelten Tiere ließen bis zur 18. Woche eine im Vergleich zu den Sham-Tieren nicht signifikant unterschiedliche Albuminausscheidung erkennen. Lediglich in der 12. Woche war bei den Dahl/SS-Tieren eine signifikant niedrigere Albuminausscheidung zu messen. Die Ergebnisse der intraperitonealen Implantation, also die Möglichkeit, einen physiologischen Testosteronwert und das Krankheitsbild der Albuminurie auf künstliche Weise wiederherzustellen, lieferte die Basis für die Hauptstudie.

5.4 Hauptstudie

Für die in der Hauptstudie untersuchten Rattenstämme Wistar, MWF und Dahl/SS wurde neben einer parallel geführten Kontrollgruppe eine reine Orchiektomie-Gruppe zur Bestimmung des durch das Fehlen von Testosteron veränderten Phänotyps herangezogen. Zusätzlich zu der bereits in einer Vorstudie kontrollierten Wirkung einer Kastration auf die Produktion von Testosteron wurde hier eine zweite Arbeitshypothese aus den Ergebnissen der ersten Versuchsgruppe erstellt. Wenn nach einer Kastration eine Nierenerkrankung positiv beeinflusst werden kann, und durch die Gabe von Testosteron diese Erkrankung wieder ausgelöst wird, dann müsste es möglich sein, durch gezielte Blockade von Rezeptoren diesen Effekt wiederum aufzuheben. Der selektive Rezeptorantagonist Flutamid blockiert spezifisch Testosteronrezeptoren und wurde in dieser Arbeit zusätzlich zu einer Testosteronsupplementierung in einer Dosierung von 30mg/kg/d subkutan verabreicht (Baltatu et al., 2002). Dadurch war gewährleistet, dass kein anderes Hormon, wie zum Beispiel das im Hoden produzierte nichtsteroidale Hormon Inhibin, den gemessenen Effekt verursachte. Exemplarisch wurde in der Darstellung der Ergebnisse die 12. und die 18. Lebenswoche für eine bessere graphische Übersicht gewählt. Wie in der Vorstudie bereits festgestellt wurde hat eine späte Kastration noch immer einen deutlichen Einfluss auf die Entwicklung von Nierenerkrankungen, somit wurde die Ox-Gruppe in der 10. Lebenswoche kastriert, da die körperliche Fitness der Ratten als wesentlich größer einzuschätzen war als es zum Beispiel bei einer Frühkastration der Fall wäre. Vergleicht man den nierengesunden Stamm Wistar, der zu keinem Zeitpunkt und unter keiner hier vorgenommenen Behandlung eine Albuminurie entwickelt mit dem nierenkranken Stamm MWF, so lässt sich eine deutliche und signifikante Reduktion der Albuminurie in der Ox-Gruppe des MWF-Stammes erkennen. Die Spezifizierung der Ursache auf das Fehlen von Testosteron wurde in der OxTF-Gruppe erbracht, in der eine noch stärkere Abnahme der Albuminurie als in der Ox-Gruppe gemessen werden konnte. Dieser potenzierte Effekt könnte darauf zurückgeführt werden, dass bei einer reinen Kastration die zwar sehr geringe aber dennoch vorhandene Produktion von Testosteron in der Nebennierenrinde nicht beeinflusst wird, diese jedoch bei der Blockung aller Testosteronrezeptoren durch Flutamid keinen Einfluss mehr hat. Ein gleiches Erscheinungsbild wie bei dem Vergleich zwischen MWF und Wistar ergab sich zwischen den Stämmen Dahl/SS und Wistar. Auch bei den Dahl/SS-Tieren wurde eine signifikante Reduktion der Albuminurie

nach erfolgter Kastration gemessen. Der Effekt wurde zwar durch eine Flutamidbehandlung ähnlich wie bei MWF noch potenziert, diese weitere Abnahme war jedoch nicht signifikant niedriger als unter der Ox-Behandlung. Bei der Betrachtung des systolischen Blutdrucks erkennt man, dass behandlungsunabhängig kein signifikanter Effekt zu erzielen war, dies gilt hier sowohl für die völlige Abwesenheit wie im Falle der Kastration, als auch auf die blockierte Wirkung des Hormons durch die Behandlung mit Flutamid, wobei hier eher ein Anstieg des Blutdrucks gegenüber der Kastrationsgruppe vorlag. Ob in einer Langzeitstudie ein anderer Effekt auf den systolischen Blutdruck abzusehen wäre, lässt sich in der Literatur bislang nicht erheben. Bei der invasiven Messung der MWF-Tiere war die gesteigerte Wirkung der Flutamidbehandlung noch deutlicher zu erkennen. Hier kam es bei dieser Versuchsgruppe zu einer deutlichen, wenn auch nicht signifikanten Steigerung des mittleren arteriellen Drucks. Wie auch schon beim systolischen Blutdruck war bei der Dahl/SS-Ratte jeweils eine leichte Abnahme von der Sham- zur Ox-Gruppe und von der Ox- zur OxTF-Gruppe zu verzeichnen. Auch hier ist wahrscheinlich die Tatsache, dass durch die geringe Produktion von Testosteron in der Nebennierenrinde in der Ox-Gruppe die Rezeptorantwort nicht vollständig unterbunden werden kann, ausschlaggebend. Die Hypothese dieser Studie, nämlich dass es einen direkten Zusammenhang zwischen Testosteron und der Ausprägung einer Albuminurie als Zeichen einer progressiven Nierenerkrankung gibt, konnte durch die Auswertung der Testosteronmessung mit paralleler Albuminmessung bekräftigt werden; die Reaktion der Albuminausscheidung auf die An- oder Abwesenheit von Testosteron konnte direkt abgeleitet werden. Auch in humanen Studien konnte bereits ein Zusammenhang zwischen einer chronischen Nierenerkrankung und der Veränderung von Serum-Testosteron-Werten nachgewiesen werden, jedoch sind die genauen Ursachen und die genauen Folgen bislang nicht ausreichend geklärt (Park et al., 2013). Beim Wistar-Stamm, der unter Sham-Bedingungen keine Albuminurie ausbildet, kann unabhängig von der Behandlungsart Ox oder OxTF keine Albuminurie ausgelöst werden. Selbst ein supraphysiologischer Testosteronspiegel in der 12. Woche, der fast das 10fache der Sham-Tiere betrug, ließ keinen Anstieg der Albuminausscheidung über den Urin erkennen, weder direkt in der 12. Woche noch zu einem späteren Zeitpunkt. Vergleicht man dazu im MWF-Stamm die Entwicklung der Albuminurie in Abhängigkeit zum Serum-Testosteron-Wert, erkennt man eine deutliche Relation zwischen diesen beiden Parametern. Sham-operierte Tiere entwickeln eine im Zeitver-

lauf deutlich und signifikante Steigerung der Albuminausscheidung (Schulz et al., 2002; Schulz et al. 2003). Bis zur 18. Woche wurden in diesem Versuch Werte von bis zu $48,30 \pm 6,16$ mg/24h nachgewiesen. Nach erfolgter Kastration konnte die Albuminausscheidung im direkten Vergleich zu den Sham-operierten Tieren um fast 50 % gesenkt werden, auch wenn der Anstieg bis zur 18. Woche im Vergleich zur 12. Woche signifikant erhöht war. Testosteronwerte von über 0,13 nmol/l wurden im gesamten Messzeitraum nicht erreicht. Die kastrierte und mit Testosteron und Flutamid behandelte Gruppe OxTF ließ ein stärkeres Absinken der Albuminausscheidung erkennen als die reine Ox-Gruppe. Hier wurden Werte von $6,40 \pm 1,19$ mg/24h nicht überschritten, während die Testosteronwerte zur 18. Woche hin ähnliche Werte wie in der Sham-Gruppe erkennen ließen. Die Abhängigkeit der Entwicklung einer Albuminurie von dem Vorhandensein von Testosteron lässt sich daher sowohl durch eine Kastration als auch durch alleinige Blockade der entsprechenden Rezeptoren erreichen. In beiden Fällen kommt es zu einem signifikanten Abfall der Albuminausscheidung im Urin. Die Spezifikation auf das Geschlechtshormon Testosteron wurde demzufolge in zweifacher Hinsicht hergeleitet und statistisch untermauert. Ein gleiches phänotypisches Erscheinungsbild ergab sich bei der Auswertung der entsprechenden Dahl/SS-Gruppen. Auch hier konnte die Albuminurie einmal durch Kastration und zum anderen durch die Gabe von Flutamid signifikant gesenkt werden. In beiden Tierstämmen konnte die Albuminausscheidung jedoch nicht komplett eliminiert werden, so dass die Vermutung nahe liegt, dass noch weitere Mechanismen in die Entwicklung der Nierenerkrankung involviert sind. Um diese Frage weiter zu klären, wurde der biochemische Parameter Cystatin C untersucht, welcher ein körpereigenes im Serum vorkommendes Protein darstellt und als Marker zur Überprüfung der Nierenfunktion dient. Im Unterschied zum häufig als Funktionsmarker herangezogenen Kreatinin ist Cystatin C nicht abhängig von der Muskelmasse, dem Nahrungsangebot oder der tubulären Sekretion, und kann somit als wesentlich sensiblerer Marker genutzt werden (Andersen et al., 2009). In der hier vorliegenden Arbeit konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Stämmen und zwischen den jeweiligen Behandlungsgruppen festgestellt werden. Von der Tendenz her ließ sich jedoch unter Ox-Bedingungen ein jeweils leichter Rückgang des Cystatin C-Gehalts messen. Typische und literaturbekannte Anzeichen einer Dyslipidämie bei hochgradiger Nierenfunktionsstörung ließen sich bei der Cholesterin-Messung in dieser Arbeit bestätigen (Varizi, 2006). Hier zeigten MWF und Dahl/SS-Tiere einen sig-

nifikant höheren Wert als die nierengesunden Wistar-Tiere. Unter einer Kastrationsbehandlung kam es bei den MWF-Ratten zwar lediglich zu einem dezenten, nicht signifikanten Rückgang des Cholesterin-Wertes, in der Dahl/SS-Ox-Gruppe jedoch konnte eine signifikante Senkung des Cholesterinspiegels beobachtet werden, so dass davon auszugehen ist, dass es auch hier eine direkte Abhängigkeit zwischen dem Geschlechtshormon Testosteron und einer Dyslipidämie geben kann. In dieser Studie wurden zur Erfassung der strukturellen Nierenschädigung sowohl der tubulointerstitielle Schädigungsindex sowie der Glomerulosklerose-Index (GSI) für eine genaue Auswertung herangezogen (Raij et al., 1984). Bei der Auswertung des GSI, die sichtbare Vernarbungen von Kapillarschlingen und Glomeruli beinhaltet, konnte bei allen drei Rattenstämmen eine Abnahme der Sklerose unter einer Kastrationsbehandlung und unter einer Flutamidbehandlung festgestellt werden. Im Wistar und Dahl/SS-Stamm waren diese zwischen Sham und OxTF signifikant. Ein gleiches Bild ergab sich bei der Betrachtung des tubulointerstitiellen Schädigungsindex. Dieser Index lässt einen Schweregrad vorhandener Veränderungen wie Atrophie, Dilatation, Vorhandensein von Zylindern sowie Veränderungen im Mark- und Rindbereich zur Auswertung zu. Hier war keine nennenswerte Veränderung zwischen MWF und Wistar zu erkennen, im Dahl/SS-Stamm jedoch war ein fast 5fach erhöhter Index unter Sham-Bedingungen zu beobachten. Dieser konnte nach Kastration und nach Implantation eines Pellets mit gleichzeitiger Flutamidbehandlung signifikant gesenkt werden. Wie auch bei vielen anderen Erkrankungen scheinen mehrere Gene an der Entstehung und Ausprägung einer Proteinurie beteiligt zu sein (Yagil et al., 2010). Der Nierenschädigungsmarker Kim1 kann zur Anzeige chronischer Nierenerkrankungen herangezogen werden (Ko et al., 2010). Die Expressionanalysen dieser Studie zeigten, dass im Vergleich zwischen dem Referenzstamm Wistar- und dem MWF-Stamm ein signifikanter Anstieg der mRNA-Expression von Kim1 messbar war. Die Werte bei MWF-Sham lagen dabei um das 6.500fache höher als beim Wistar-Stamm der gleichen Behandlung. Nach erfolgter Kastration konnte bei MWF ein deutlich signifikantes Absinken der mRNA-Expression gemessen werden. Unter der OxTF-Behandlung war wiederum eine forciertere Abnahme feststellbar als unter der reinen Kastrationsbehandlung. Im Vergleich zum Wistar-Stamm der gleichen Behandlung war hier keine signifikante Zunahme mehr messbar. Hier konnte nachgewiesen werden, dass durch die Blockierung der Testosteronrezeptoren mittels Flutamid die Expression des Nierenschädigungsmarkers Kim1 annähernd auf den

Wert reduziert werden konnte, wie er beim nierengesunden Stamm Wistar ermittelt werden konnte. Im Dahl/SS-Stamm war die Ausprägung der Expression von Kim1 noch deutlicher als bei MWF. Hier war eine Zunahme im Vergleich zu Wistar von über 12.000 % zu messen, die wiederum unter der Ox- und OxTF-Behandlung signifikant gesenkt werden konnte. Es scheint somit einen Mechanismus zu geben, der in der Abhängigkeit der Wirkungsweise von Testosteron über entsprechende Rezeptoren die Expression von Kim1 direkt oder indirekt beeinflusst, dieser Zusammenhang ist bislang in der Literatur jedoch nicht beschrieben. Ein weiterer genetischer Marker, der zur Anzeige von akuten und chronischen Nierenschädigungen herangezogen werden kann, ist NGAL, welches vor allem im dicken aufsteigenden Teil der Henle'schen Schleife und dem Sammelrohr vorkommt (Chaudhary et al., 2010). Literaturbekannt bei der Maus ist, dass NGAL nach einem vorangegangenen Niereninfarkt in seiner mRNA-Expression um mehr als das 10fache ansteigen kann (Mishra et al., 2003). Ähnlich den Ergebnissen der Expressionsanalyse von Kim1 konnte auch bei der Auswertung von NGAL zwischen dem Referenzstamm und MWF eine deutliche und signifikante Steigerung gemessen werden, die eine akute oder chronische Nierenschädigung anzeigt. Nach der Kastration konnte der prozentuale Wert in der MWF-Gruppe um ein Drittel gesenkt werden und war unter der OxTF-Behandlung auf einem nicht mehr erhöhten Wert verglichen mit der entsprechenden Gruppe des Wistar-Stammes. Hier war nur noch eine moderate Steigerung um 7,1 % messbar. Zum Vergleich, unter Sham-Bedingungen zeigte die MWF-Gruppe eine Steigerung von über 300 %. Auch bei den Dahl/SS-Tieren konnte eine Reduktion der mRNA-Expression durch eine Kastration und eine kombinierte Kastrations-Testosteron-Flutamid-Behandlung erreicht werden. Der Ausgangswert, jeweils verglichen mit der Wistar-Sham-Gruppe war hier jedoch mit über 1400 % wesentlich höher als bei den MWF-Ratten, konnte aber unter der OxTF-Behandlung um fast 800 % verringert werden. Die phänotypischen Parameter zur direkten Anzeige von Nierenerkrankungen wie die Albuminurie, die histologisch festgestellten signifikanten Reduktionen struktureller Schädigungen sowie die auf genetischer Ebene festgestellten Expressionsmuster lassen einen klaren Zusammenhang zwischen der Wirkung des männlichen Geschlechtshormons Testosteron und der Entwicklung von Nierenschäden erkennen.

Die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf humane Pathomechanismen ist eingeschränkt durchaus möglich. In aktuellen Studien konnten Gene bezüglich der Nie-

rengesundheit bei Ratte, Maus und Zebrafisch identifiziert werden, die erfolgreich beim Menschen bestätigt werden konnten (Ashworth et al., 2010; Khalili et al., 2016). Die glomeruläre Filtrationsbarriere ist bei Ratte, Maus und Zebrafisch genauso aufgebaut wie beim Menschen, und über einen Knockdown eines überlappenden quantitative trade loci zwischen Mensch und Ratte konnte die Barrierefunktion der Glomeruli beeinflusst werden (Kirsch et al., 2013).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen deutlich, welchen Einfluss das Geschlechtshormon Testosteron auf die Entwicklung von Nierenerkrankungen, insbesondere der Albuminurie, und der Expression von relevanten Genen hat. Mit der Reduktion des Androgens Testosteron durch Kastration oder Blockierung der Rezeptoren lässt sich die krankhafte Ausscheidung von Albumin über den Urin sowie die Expression einiger für die Nierenfunktion relevante Gene signifikant senken. Bereits bekannt ist die Wirkung von Testosteron auf die Wachstumsgeschwindigkeit von Prostatakrebs-Zellen, der genaue Mechanismus jedoch ist noch nicht abschließend untersucht worden (Tennakoon et al., 2013). Ebenfalls kontrovers diskutiert ist die Wirkung von Testosteron bei männlichen Patienten mit chronischer Nierenerkrankung, welches sowohl durch die Beeinflussung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems einen positiven Einfluss auf die Nierenerkrankung zeigt, gleichzeitig jedoch eine bei den Patienten erhöhte Morbidität und Mortalität hervorruft (Dousdampanis et al., 2013). Von großer klinischer Relevanz ist auf Grund der hohen Prävalenz der Erkrankung der Zusammenhang zwischen einer Nierenerkrankung ausgelöst durch Albuminurie und dem Geschlechtshormon Testosteron sowie dessen Beeinflussung bestimmter Gene. Hier könnten weiterführende Studien und Untersuchungen dazu führen, gezielte Therapiestrategien auch auf molekulargenetischer Basis zu entwickeln, um beim Menschen die Heilungschancen bei chronischen Nierenerkrankungen zu erhöhen oder frühzeitig bereits auf genetischer Ebene die Möglichkeit des Auftretens einer Erkrankung zu erkennen, um so präventiv vorgehen zu können.

6 Zusammenfassung

Das Krankheitsbild der chronischen Nierenerkrankung mit einhergehender Albuminurie dient als wichtiges polygenetisches Merkmal für die Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen. Viele Studien weisen darauf hin, dass Androgene wie Testosteron entscheidend in die Progression chronischer Nierenerkrankung involviert sind. Bei männlichen Patienten kommt es im Vergleich zu weiblichen Patienten zu einer stärkeren Abnahme der Nierenfunktion und damit zu einer beschleunigten Ausbildung einer Proteinurie und Albuminurie. Tiermodelle wie die MWF- und Dahl/SS-Ratte lassen auf Grund ihres genetisch determinierten Modells Studien zur Albuminurie in Abhängigkeit zum Hormonhaushalt zu.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu ermitteln, ob mittels Kastration, also der nahezu vollständigen Entfernung der Testosteronquelle, die Albuminurie sowie andere phänotypische Ausprägungen wie der Blutdruck bei MWF und Dahl/SS-Ratten im Vergleich zum gesunden Referenzstamm Wistar beeinflusst werden können. Weitergehend wurde die Auswirkung einer Blockierung aller Testosteronrezeptoren bei gleichzeitiger Kastration und Hormonersatztherapie untersucht. In verschiedenen in dieser Arbeit durchgeführten Vorstudien wurde zunächst der physiologische Testosteronwert der Rattenstämme ermittelt. Des Weiteren wurde in einer Vorstudie gezeigt, dass unabhängig vom Alter eine Kastration von MWF- und Dahl/SS-Ratten einen protektiven Effekt auf die Entstehung einer Albuminurie hat. Es konnte gezeigt werden, dass eine Kastration auch bei bereits bestehender und fortgeschrittener Nierenerkrankung eine signifikante Abnahme der Albuminurie bereits eine Woche nach Operation hervorruft. Eine dritte Vorstudie sollte der Feststellung dienen, ob eine Substitution von Testosteron einen für dieses Hormon physiologischen Serumwert erreicht, um die in der Hauptstudie aufgestellte These zu stützen. Mit Hilfe der Vorstudien konnte ein Gruppendesign in die Hauptstudie aufgenommen werden, das als doppelte Kontrolle diente – eine Hormonsubstitution nach Kastration und gleichzeitiger Blockierung der Testosteronrezeptoren mittels des selektiven Androgenrezeptor-Antagonisten Flutamid.

Eine deutliche und signifikante Abnahme der Albuminurie konnte in der orchietomierten Gruppe sowohl bei MWF als auch bei Dahl/SS festgestellt werden, die in der 10. Woche kastriert wurden. Die Behandlung mit Flutamid zeigte, dass

dieser Rückgang alleinig auf die Wirkung von Testosteron zurückzuführen war. Der Blutdruck unterlag zwischen den Versuchsgruppen keiner signifikanten Veränderung, somit war eine Beeinflussung von Testosteron auf den Blutdruck nicht nachweisbar. Der direkte Zusammenhang zwischen der An- und Abwesenheit von Testosteron und der Ausscheidung von Albumin über den Urin wurde in der vorliegenden Arbeit in direkten Zusammenhang zueinander gebracht. Nach erfolgter Kastration sank die Albuminurie teilweise um bis zu 50 %. Dieser Effekt konnte, teils sogar potenziert, auch bei einer Blockade der Testosteronrezeptoren erreicht werden. Bei der Cystatin C-Bestimmung, einem Nierenfunktionsmarker, ist kein signifikanter Unterschied zwischen den jeweiligen Stämmen ermittelt worden. Bei der Bestimmung histologischer Parameter wie dem Glomeruloskleroseindex und dem tubulointerstitiellen Schädigungsindex war ein signifikanter Rückgang der Schädigung in den orchiectomierten und mit Testosteron und Flutamid behandelten Gruppen des Wistar und Dahl/SS-Stammes erkennbar. Auf molekulargenetischer Ebene wurde in dieser Studie nachgewiesen, dass die Nierenschädigungsmarker Kim1 und Ngal nach Kastration und anschließender Testosteron- und Flutamidbehandlung auf einen dem nierengesunden Wistar-Stamm ähnlichen Wert signifikant absank. Bei Kim1 war auch nach der reinen Kastration bei Dahl/SS und MWF eine signifikante Abnahme zu messen.

Die vielfältigen Ergebnisse der vorliegenden Studie belegen, dass nach nahezu vollständiger Elimination der Testosteronproduktion bzw. nach Blockade der Testosteron-Rezeptoren die Albuminurie im Tiermodell der MWF- und Dahl/SS-Ratte deutlich gesenkt werden konnte. Des Weiteren ließ sich über eine histologische Evaluierung als auch auf molekularer Ebene mittels der Schädigungsmarker Ngal und Kim1 eine signifikant reduzierte Nierenschädigung nachweisen.

Für die Humanmedizin könnte sich durch diese Ergebnisse nachfolgend individuelle oder standardisierte therapeutische Möglichkeiten zur Behandlung oder Prävention chronischer Nierenerkrankungen eröffnen.

7 Summary

Influence of testosterone on proteinuria and nephropathy in the rat models of chronic renal disease

Johannes Unland

Albuminuria associated with chronic renal disease is the most important poly-genetic characteristic for the origin of cardiovascular as well as renal diseases. Many studies have revealed that androgens such as testosterone are of paramount importance for the progression of chronic renal disorders. For example, there is an enhanced decline of renal functions in male compared to female patients leading to an accelerated formation of proteinuria as well as albuminuria. Due to their genetically determined mode animal models such as MWF as well as Dahl/SS-rats can be employed to show the correlation between albuminuria and their hormonal balance. The aim of this work was to verify whether it is possible to influence albuminuria in combination with different accompanying phenotypic characteristics such as blood pressure by castration. By this procedure testosterone should have been eliminated nearly completely. The studies were performed in MWF and Dahl/SS-rats using Wistar rats as control group. Further the inhibition of all testosterone receptors in combination with castration and hormone replacement therapy was investigated. In preliminary studies to this work, three different aspects were covered. Firstly, physiological values of testosterone in every rat strain were evaluated. Secondly, it could be shown that castration of MWF as well as Dahl/SS-rats has independent from its timing a protective effect towards the origin of an albuminuria. Already one week after castration a significant decline of an albuminuria could be detected even in rats with a progressed renal disorder. Thirdly, it was evaluated whether physiological values of testosterone could be achieved by its substitution to be able to perform the hormone replacement therapy. On the basis of the preliminary studies a group design could be elaborated and used within this work. As a double controlled study a hormone substitution after castration in parallel with the inhibition of testosterone receptors by flutamide - a selective antagonist against androgens receptor - was performed. A clear and significant decline of an albuminuria could be shown within the castrated groups in both rat populations - namely MWF and Dahl/SS. Castration was performed at 10 weeks of

age. The treatment with flutamide revealed that this decline was solely due to effect of testosterone. An effect on blood pressure in all examined study groups did not show a significant change concluding that testosterone does not have a detectable effect on blood pressure. Nevertheless, a direct correlation of presence and absence of testosterone and renal clearance of albumin could be impressively demonstrated within this work. After castration, the degree of albuminuria decreased about 50%. This effect could further be dramatically increased by additional inhibition of testosterone receptors. In addition, different other phenotypic characteristics were evaluated. The determination of a biomarker for renal function called cystatin C did not reveal a significant difference between the different study populations. The histologically determined parameters showed a regression of renal impairment in castrated as well as testosterone and flutamide medicated study groups. Renal impairment markers Kim1 and Ngal were determined molecular genetically. Results here also showed that values significantly decreased after castration and subsequent medication with testosterone as well as flutamide. The values obtained were comparable to values of the control Wistar group. Interestingly, Kim1 also showed decreasing values after pure castration. The obtained results of the performed study provide significant evidence that albuminuria in MWF as well as Dahl/SS-rats could be decreased after nearly complete elimination of testosterone production and inhibition of testosterone receptors. In addition, histological markers as well as molecular markers such as Ngal and Kim1 support these findings by testifying a decline in renal impairment. The results of this set the stage for potential translations of these findings into individual and standardized therapeutic strategies for treatment or prevention of renal diseases in humans.

8 Verzeichnisse

8.1 Abbildungen

Abb. 1:

Vorstudie 1: Phänotypisierungsprotokoll der Evaluationsstudie für die Testosteronbestimmung in der 4., 8. und 12. Woche bei den Rattenstämmen Dahl/SS und MWF 16

Abb. 2:

Vorstudie 2: Untersuchung des altersabhängigen Effekts einer Kastration in der 4. und 14. Woche auf die Albuminausscheidung im 24h-Urin bei den Stämmen MWF und Dahl/SS. 17

Abb. 3:

Vorstudie 3: Wirksamkeitsprüfung der Hormon-Ersatz-Therapie nach Kastration in der 4. Woche bei MWF und Dahl/SS. 18

Abb. 4:

Zeitprotokoll für die Versuchsdurchführung zur Untersuchung geschlechtshormoneller Einflüsse auf die Nierenschädigung von der 10.-18. Woche der Stämme MWF, Dahl/SS und Wistar 19

Abb. 5:

Für die invasive Blutdruckmessung unter Isofluran-Narkose liegende Ratte mit Schnittführung für die spätere Präparation der Arteria femoralis 23

Abb. 6:

Vergleichende Testosteronbestimmung bei MWF- und Dahl/SS-Ratten der 4. Woche, 8. Woche, 12. Woche und 17. Woche. 32

Abb. 7:

Albuminkonzentration im 24h-Urin nach Sham-Operation und nach Kastration in der 13. Woche von der 14. bis zur 18. Woche der Versuchsgruppen MWF und Dahl/SS. 33

Abb. 8:

Testosteronkonzentration nach subkutaner Implantation eines Testosteron-Pellets bei den Stämmen MWF und Dahl/SS im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe in der 8. und 12. Woche. 34

Abb. 9:

Testosteronkonzentration nach intraperitonealer Implantation eines Testosteron-pellets der 8. bis zur 18. Woche bei MWF OxT i.p. im Vergleich zur Kontrollgruppe MWF Sham..... 35

Abb. 10:

Vergleichende Albuminausscheidung im Urin (U_{Alb}) bei Wistar und MWF der 12. und 18. Woche der Versuchsgruppen Sham, Ox und OxTF..... 37

Abb. 11:

Vergleichende Albuminausscheidung im Urin (U_{Alb}) bei Wistar und Dahl/SS der 12. und 18. Woche der Versuchsgruppen Sham, Ox und OxTF..... 38

Abb. 12:

Vergleichender systolischer Blutdruck (SBD) bei Wistar und MWF der 18. Woche der Versuchsgruppen Sham, Ox und OxTF..... 39

Abb. 13:

Vergleichender systolischer Blutdruck (SBD) bei Wistar und Dahl/SS der 18. Woche der Versuchsgruppen Sham, Ox und OxTF..... 40

Abb. 14:

Vergleichender mittlerer arterieller Blutdruck (MAD) bei Wistar und MWF der 18. Woche der Versuchsgruppen Sham, Ox und OxTF 41

Abb. 15:

Vergleichender mittlerer arterieller Blutdruck (MAP) bei Wistar und Dahl/SS der 18. Woche der Versuchsgruppen Sham, Ox und OxTF 42

Abb. 16:

Zusammenhang zwischen Albuminausscheidung im Urin und Testosteronkonzentration von der 12. bis zur 18. Woche bei Wistar-Sham, Wistar-Ox und Wistar-OxTF..... 43

Abb. 17:

Zusammenhang zwischen Albuminausscheidung im Urin und Testosteronkonzentration von der 12. bis zur 18. Woche bei MWF-Sham, MWF-Ox und MWF-OxTF..... 45

Abb. 18:

Zusammenhang zwischen Albuminausscheidung im Urin und Testosteronkonzentration von der 12. bis zur 18. Woche bei Dahl/SS-Sham, Dahl/SS-Ox und Dahl/SS-OxTF 46

Abb. 19:

Vergleichende Cystatin C-Konzentration bei Wistar, MWF und Dahl/SS der 18. Woche der Versuchsgruppen Sham und Ox 47

Abb. 20:

Vergleichende Cholesterin-Konzentration bei Wistar, MWF und Dahl/SS der 18. Woche der Versuchsgruppen Sham und Ox.. 48

Abb. 21:

Vergleichende Triglyzerid-Konzentration bei Wistar, MWF und Dahl/SS der 18. Woche der Versuchsgruppen Sham und Ox. 49

Abb. 22:

Glomerulosklerose-Index (GSI) der Stämme Wistar, MWF und Dahl/SS der Sham-, Ox- und OxTF-Gruppen der 18. Woche..... 52

Abb. 23:	
Tubulointerstitieller Schädigungsindex (TSI) der Stämme Wistar, MWF und Dahl/SS der Sham-, Ox- und OxTF-Gruppen der 18. Woche.....	53
Abb. 24:	
Kidney Injury Molecule 1 (Kim-1)-mRNA-Expression von Wistar und MWF der Gruppen Sham, Ox und OxTF in der 18. Woche.....	54
Abb. 25:	
Kidney Injury Molecule 1 (Kim1)-mRNA-Expression von Wistar und Dahl/SS der Gruppen Sham, Ox und OxTF in der 18. Woche.....	55
Abb. 26:	
Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin (NGAL)-mRNA-Genexpression von Wistar und MWF der Gruppen Sham, Ox und OxTF in der 18. Woche.....	56
Abb. 27:	
Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin (NGAL)-mRNA-Genexpression von Wistar und Dahl/SS der Gruppen Sham, Ox und OxTF in der 18. Woche.	57
8.2 Tabellen	
Tab. 1: Bewertungsschema für die Einteilung des GSI.....	27
Tab. 2: Bewertungsschema für die Einteilung des TSI.....	28
Tab. 3: Phänotypische Charakterisierung der Stämme Wistar, MWF und Dahl/SS aller Behandlungsgruppen.....	51

8.3 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
CCM	Charité Centrum Mitte
d	Tag
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dNTP	Deoxynukleotide
DS	Dahl S
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
et al.	et alia
FEM	Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin
x g	Erdbeschleunigung
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GSI	Glomerulosklerose-Index
h	Stunde
HE	Hämatoxylin-Eosin
Hg	Quecksilbersäule
HG	Herzgewicht
Hmbs	Hydroxymethylbilane synthase
I.E.	internationale Einheiten
i.p.	intraperitoneal
KG	Körpergewicht
Kim1	Kidney Injury Molecule 1

LV	linksventrikulär
M	Molar
MAD	mittlerer arterieller Druck
mM	Millimolar
mRNA	messanger RNA
MWF	Munich Wistar Frömter
n	Anzahl
n.u.	nicht untersucht
NG	Nierengewicht
Ngal	Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin
NO/Ang II-Ratio	Stickstoffmonoxid/Angiotensin II-Verhältnis
OP	Operation
Ox	Orchiektomie
OxT	Orchiektomie und Testosteron-Ersatz-Therapie
OxTF	Orchiektomie, Testosteron-Ersatz-Therapie und Flutamid-Behandlung
p	Wahrscheinlichkeit
PAS	Periodic Acid Schiff
PCR	Polymerase Chain Reaction
RAS	Renin-Angiotensin-System
rel.	relativ
RNA	Ribonukleinsäure
RNO6	Rattenchromosom 6
RNO8	Rattenchromosom 8
s.c.	subcutan
SBD	systolischer Blutdruck
SEM	Standardfehler
SHR	Spontaneously Hypertensive Rat

Verzeichnisse

Tab.	Tabelle
TSI	Tubulointerstitieller Schädigungsindex
U _{alb}	Albumin gemessen im Urin
Upm	Umdrehung pro Minute
vs.	versus
Wo	Woche

9 Literaturverzeichnis

Andersen TB, Eskild-Jensen A, Frøkiaer J, Brøchner-Mortensen J. (2009): Measuring glomerular filtration rate in children; can cystatin C replace established methods? A review. *Pediatr Nephrol.* 24:929-41.

Ashworth S, Teng B, Kaufeld J, Miller E, Tossidou I, Englert C, Bollig F, Staggs L, Roberts I, Park J-K, Haller H, Schiffer M. (2010): Cofilin-1 Inactivation Leads to Proteinuria - Studies in Zebrafish, Mice and Humans. *Humans. PLoS ONE* 5(9): e12626.

Baltatu O, Cayla C, Iliescu R, Andreev D, Jordan C, Bader M. (2002): Abolition of hypertension-induced end-organ damage by androgen receptor blockade in transgenic rats harboring the mouse ren-2 gene. *J Am Soc Nephrol.* 13:2681-7.

Baylis C. (2004): Changes in renal hemodynamics and structure in the aging kidney; sexual dimorphism and the nitric oxide system. *Exp Gerontol.* 40:271-8.

Chaudhary K, Phadke G, Nistala R, Weidmeyer CE, McFarlane SI, Whaley-Connell A. (2010): The emerging role of biomarkers in diabetic and hypertensive chronic kidney disease. *Curr Diab Rep.* 10:37-42.

Dousdampanis P, Trigka K, Fourtounas C, Bargman JM. (2013): Role of Testosterone in the Pathogenesis, Progression, Prognosis and Comorbidity of Men With Chronic Kidney Disease. *Ther Apher Dial.* PMID: 24119223 Epub ahead of print

Douville P, Martel AR, Talbot J, Desmeules S, Langlois S, Agharazii M. (2009): Impact of age on glomerular filtration estimates. *Nephrol Dial Transplant.* 24:97-103.

Ewringmann A, Glöckner B. (2008): Leitsymptome bei Hamster, Ratte, Maus und Rennmaus. Enke Verlag, S. 17.

Esposito C, Plati A, Mazzullo T, Fasoli G, De Mauri A, Grosjean F, Mangione F, Castoldi F, Serpieri N, Cornacchia F, Dal Canton A. (2007): Renal function and functional reserve in healthy elderly individuals. *J Nephrol.* 20:617-25.

Fassi A, Sangalli F, Maffi R, Colombi F, Mohamed EI, Brenner BM, Remuzzi G, Remuzzi A. (1998): Progressive Glomerular Injury in the MWF Rat Is Predicted by Inborn Nephron Defizit. *J Am Soc Nephrol.* 9:1399-1406.

Hayward CS, Webb CM, Collins P. (2001): Effect of sex hormones on cardiac mass. *Lancet.* 357:1354-6. Review.

http://www.alzet.com/products/ALZET_Pumps/specifications.html (Stand:01.04.2017)

<http://www.innovrsrch.com/pellets.asp> (Stand:01.04.2017)

Jafar TH, Schmid CH, Stark PC, Toto R, Remuzzi G, Ruggenenti P, Marcantoni C, Becker G, Shahinfar S, De Jong PE, De Zeeuw D, Kamper AL, Strangard S, Levey AS. (2003): The rate of progression of renal disease may not be slower in women compared with men: a patient-level meta-analysis. *Nephrol Dial Transplant.* 18:2047-53.

Khalili H, Sull A, Sarin S, Boivin F.J, Halabi R, Svajger B, Li A, Cui V.W, Drysdale T, Bridgewater D. (2016): Developmental Origins for Kidney Disease Due to Shroom3 Deficiency. *J Am Soc Nephrol* 27: 2965-2973

Kienitz T, Quinkler M. (2008): Testosterone and blood pressure regulation. *Kidney Blood Press Res.* 31:71-9.

Kirsch T, Kaufeld J, Korstanje R, Hentschel DM, Staggs L, Bollig F, Beese M, Schroder P, Boehme L, Haller H, Schiffer M. (2013): Knockdown of the hypertension-associated gene NOSTRIN alters glomerular barrier function in zebrafish (*Danio rerio*). *Hypertension.* 62 :726-30.

Ko GJ, Grigoryev DN, Linfert D, Jang HR, Watkins T, Cheadle C, Racusen L, Rabb H. (2010): Transcriptional analysis of kidneys during repair from AKI reveals possible roles for NGAL and KIM-1 as biomarkers of AKI-to-CKD transition. *Am J Physiol Renal Physiol.* 298:F1472-83.

Kreutz R, Kovacevic L, Schulz A, Rothermund L, Ketteler M, Paul M. (2000): Effect of high NaCl diet on spontaneous hypertension in a genetic rat model with reduced nephron number. *J Hypertens.* 18, 777-82.

Lopez-Ruiz A, Sartori-Valinotti J, Yanes LL, Iliescu R, Reckelhoff JF. (2008): Sex differences in control of blood pressure: role of oxidative stress in hypertension in females. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 295:H466-74.

Masi C, Hawkey L, Xu X, Veenstra T, Cacioppo J (2009): Serum Estrogen Metabolites and Systolic Blood Pressure Among Middle-Aged and Older Women and Men. *Am J Hypertens.* 22:1148-53.

Mishra J, Ma Q, Prada A, Mitsnefes M, Zahedi K, Yang J, Barasch J, Devarajan P. (2003): Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *J Am Soc Nephrol.* 14:2534-43.

Neugarten J (2002): Gender and the progression of renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 13:2807-9. Review.

Nielsen CB, Flyvbjerg A, Bruun JM, Forman A, Wogensen L, Thomsen K (2003): Decreases in renal functional reserve and proximal tubular fluid output in conscious oophorectomized rats: normalization with sex hormone substitution. *J Am Soc Nephrol.* 14:3102-10.

Park MG, Koo HS, Lee B. (2013): Characteristics of testosterone deficiency syndrome in men with chronic kidney disease and male renal transplant recipients: a cross-sectional study. *Transplant Proc.* 45:2970-4.

Raij L, Azar S, Keane W. (1984): Mesangial immune injury, hypertension, and progressive glomerular damage in Dahl rats. *Kidney Int.* 26:137-143.

Raile K, Galler A, Hofer S, Herbst A, Dunstheimer D, Busch P, Holl RW. (2007): Diabetic nephropathy in 27,805 children, adolescents, and adults with type 1 diabetes:

effect of diabetes duration, A1C, hypertension, dyslipidemia, diabetes onset, and sex. *Diabetes Care*. 30:2523-8.

Reckelhoff JF, Zhang H, Granger JP (1998): Testosterone exacerbates hypertension and reduces pressure-natriuresis in male spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 31 [part 2]:435-439.

Reckelhoff JF (2001): Gender differences in the regulation of blood pressure. *Hypertension* 37(5):1199-208. Review.

Rothermund L, Nierhaus M, Fialkowski O, Freese F, Ibscher R, Mieschel S, Kossmehl P, Grimm D, Wehland M, Kreutz R. (2006): Genetic low nephron number hypertension is associated with dysregulation of the hepatic and renal insulin-like growth factor system during nephrogenesis. *J Hypertens*. 24:1857-64.

Sabolić I, Asif AR, Budach WE, Wanke C, Bahn A, Burckhardt G. (2007): Gender differences in kidney function. *Pflugers Arch*. 455:397-429.

Sakemi T, Toyoshima H, Morito F (1994). Testosterone eliminates the attenuating effect of castration on the progressive glomerular injury in hypercholesterolemic male Imai rats. *Nephron*. 67:469-76.

Sandberg K, Ji H. (2003): Sex and the renin angiotensin system: implications for gender differences in the progression of kidney disease. *Adv Ren Replace Ther*. 10:15-23.

Schulz A, Litfin A, Kossmehl P, Kreutz R. (2002): Genetic dissection of increased urinary albumin excretion in the munich wistar frömter rat. *J Am Soc Nephrol*. 13:2706-14.

Schulz A, Standke D, Kovacevic L, Mostler M, Kossmehl P, Stoll M, Kreutz R. (2003): A major gene locus links early onset albuminuria with renal interstitial fibrosis in the MWF rat with polygenetic albuminuria. *J Am Soc Nephrol*. 14:3081-9.

Schulz A, Weiss J, Schlesener M, Hänsch J, Wehland M, Wendt N, Kossmehl P, Sietmann A, Grimm D, Stoll M, Nyengaard JR, Kreutz R. (2007): Development of overt proteinuria in the Munich Wistar Frömter rat is suppressed by replacement of chromosome 6 in a consomic rat strain. *J Am Soc Nephrol*. 18:113-21.

Schulz A, Schlesener M, Weiss J, Hänsch J, Wendt N, Kossmehl P, Grimm D, Vetter R, Kreutz R. (2008): Protective effect of female gender on the development of albuminuria in a polygenetic rat model is enhanced further by replacement of a major autosomal QTL. *Clin Sci (Lond)*. 114:305-11.

Schulz A, Hänsch J, Kuhn K, Schlesener M, Kossmehl P, Nyengaard JR, Wendt N, Huber M, Kreutz R. (2008): Nephron deficit is not required for progressive proteinuria development in the Munich Wistar Frömter rat. *Physiol Genomics*. 35:30-5.

Schulz A, Kreutz R. (2012): Mapping genetic determinants of kidney damage in rat models. *Hypertens Res*. 35:675-94.

Siegel AK, Planert M, Rademacher S, Mehr AP, Kossmehl P, Wehland M, Stoll M, Kreutz R. (2003): Genetic loci contribute to the progression of vascular and cardiac hypertrophy in salt-sensitive spontaneous hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23:1211-7.

Siegel AK, Kossmehl P, Planert M, Schulz A, Wehland M, Stoll M, Bruijn JA, de Heer E, Kreutz R. (2004): Genetic linkage of albuminuria and renal injury in Dahl salt-sensitive rats on a high-salt diet: comparison with spontaneously hypertensive rats. *Physiol Genomics.* 18:218-25.

Silbiger SR, Neugarten J. (2003): The role of gender in the progression of renal disease. *Adv Ren Replace Ther.* 10:3-14. Review.

Silbiger S, Neugarten J. (2008): Gender and human chronic renal disease. *Gend Med.* 5 Suppl A:S3-S10. Review.

Tennakoon B, Shi Y, Han JJ, Tsouko E, White MA, Burns AR, Zhang A, Xia X, Ilkayeva OR, Xin L, Ittmann MM, Rick FG, Schally AV, Frigo DE. (2013): Androgens regulate prostate cancer cell growth via an AMPK-PGC-1 α -mediated metabolic switch. *Oncogene.* PMID: 24186207

Tomiyoshi Y, Sakemi T, Aoki S, Miyazono M. (2002): Different effects of castration and estrogen administration on glomerular injury in spontaneously hyperglycemic Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats. *Nephron.* 92:860-7.

van Es N, Schulz A, Ijpelaar D, van der Wal A, Kuhn K, Schütten S, Kossmehl P, Nyengaard JR, de Heer E, Kreutz R. (2011): Elimination of severe albuminuria in aging hypertensive rats by exchange of 2 chromosomes in double-consomic rats. *Hypertension.* 58:219-24.

Varizi ND. (2006): Dyslipidemia of chronic renal failure: the nature, mechanisms, and potential consequences. *Am J Physiol Renal Physiol.* 290:262-272.

Yagil Y, Hessner MJ, Schulz H, Gosele C, Lebdev L, Barkalifa R, Sapojnikov M, Hubner N, Yagil C. (2010): Geno-transcriptomic dissection of proteinuria in the uninephrectomized rat uncovers a molecular complexity with sexual dimorphism. *Physiol Genomics.* 42A:301-16.

Yanes LL, Sartori-Valinotti JC, Iliescu R, Romero DG, Racusen LC, Zhang H, Reckelhoff JF. (2008): Testosterone-dependent hypertension and upregulation of intrarenal angiotensinogen in Dahl salt-sensitive rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* 296:F771-9.

10 Vorabpublikationen

Schulz A, Schütten-Faber S, van Es N, **Unland J**, Schulte L, Kossmehl P, van der Wal A, de Heer E, Kreutz R. Induction of spontaneous albuminuria and kidney damage in SHR rats by transfer of chromosome 8 from MWF. *Physiol Genomics* 2012; 44:110-116.

Eigene Leistung: Gewinnung von Probenmaterial im Rahmen der Durchführung der Tierversuche.

Schulte L, Schulz A, **Unland J**, Schmidt-Ott K, Kreutz R. MWF rats with spontaneous albuminuria inherit a reduced efficiency of nephron induction during early nephrogenesis in comparison to SHR rats. *J Hypertens* 2012; 30:2031-3038.

Eigene Leistung: Gewinnung von Probenmaterial im Rahmen der Durchführung der Tierversuche.

Schulz A, Schütten-Faber S, Schulte L, **Unland J**, Kossmehl P, Kreutz R. Genetic variants on rat chromosome 8 exhibit profound effects on hypertension severity and survival during NO inhibition in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 2014; 27:294-298.

Eigene Leistung: Gewinnung von Probenmaterial im Rahmen der Durchführung der Tierversuche. Mithilfe bei der Blutdruckmessung

Herlan L, **Unland J**, Langer S, Schulte L, Schütten S, García-Prieto CF, Kossmehl P, Fernández-Alfonso MS, Schulz A, Kreutz R. Development of progressive albuminuria in male Munich Wistar Frömter rats is androgen dependent. *Physiol Genomics* 2015; 47:281-289.

Eigene Leistung: Lieferung von Daten und Grafiken im Rahmen meiner Dissertation, „Fig. 1.“, „Fig. 2.“, „Fig. 3.“, Fig. 5.“, „Fig. 6.“, „Table 2.“, Auswertung von Versuchsergebnissen, Durchführung der Versuche, Interpretation der Daten

Abstracts/Poster:

2009

Schulz A, Schütten S, Schulte L, **Unland J**, Bublath B, Kreutz R (2009): Deprivation of androgens protects against albuminuria in the Munich Wistar Frömter rat. (4th

Congress International Society of Gender Medicine: Sex and Gender in Medicine; Berlin, Deutschland 2009)

Eigene Leistung: Laborarbeiten, Lieferung von Basisdaten

Schulte L, Schütten S, **Unland J**, Bublath B, Kreutz R, Schulz A (2009): Androgenverlust schützt vor progressiver Albuminurie bei der Munich Wistar Frömter-Ratte. (Hochdruckliga; Lübeck, Deutschland 2009)

Eigene Leistung: Laborarbeiten im Bereich der Tierversuche, Lieferung von Basisdaten

2010

Schütten S, Schulte L, **Unland J**, Vetter R, Bublath B, Kreutz R, Schulz A (2010): Ein Albuminurie-QTL der Munich Wistar Frömter-Ratte vermag bei Albuminurie-resistenten SHR Ratten eine Albuminurie zu induzieren. (Hochdruckliga; Berlin, Deutschland 2010)

Eigene Leistung: Laborarbeiten im Bereich der Tierversuche, Gewinnung von Probenmaterial

Unland J, Schütten S, Schulte L, Kreutz R, Schulz A (2010): Die progressive Albuminurieentwicklung bei männlichen MWF-Ratten beruht auf einer Interaktion zwischen Testosteron und genetischen Faktoren. DMW 135, S154 Supplement 4 (Abstractband). (Hochdruckliga; Berlin, Deutschland 2010)

Eigene Leistung: Laborarbeiten, Basisdaten und deren Auswertung im Rahmen der Dissertation

Unland J, Schütten S, Schulte L, Kreutz R, Schulz A (2010): Interaktionen zwischen Testosteron und Genloci auf Chromosom 6 und 8 sind für die Entwicklung einer progressiven Albuminurie bei Munich Wistar Frömter-Ratten verantwortlich. (Hochdruckliga; Berlin, Deutschland 2010)

Eigene Leistung: Laborarbeiten im Bereich der Tierversuche, Basisdaten

Schulte L, Schulz A, Sietmann A, Schütten S, **Unland J**, Stoll M, Kreutz R (2010):
Neue Transkriptionssignaturen und Kandidatengene für Linksherzhypertrophie bei
der SHRSP-Ratte. DMW 135, S165 Supplement 4 (Abstractband).
(Hochdruckliga; Berlin, Deutschland 2010)

Eigene Leistung: Laborarbeiten im Bereich der Tierversuche

Schulte L, **Unland J**, Schütten S, Bublath B, Schmidt-Ott K, Werth M, Kreutz R,
Schulz A (2010): Untersuchung der embryonalen Nephronentwicklung bei Munich
Wistar Frömter-Ratten mit angeborenem Nephrondefizit und genetischer
Nephropathie. DMW 135, S142 Supplement 4 (Abstractband).
(Hochdruckliga; Berlin, Deutschland 2010)

Eigene Leistung: Laborarbeiten im Bereich der Tierversuche

11 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Reinhold Kreutz für die Bereitstellung des interessanten Themas und die exzellente Betreuung während der Durchführung der Arbeit sowie für die Gestaltungsfreiheit meiner Arbeit und Herrn Prof. Dr. Achim Gruber, der mich bei meiner externen Dissertation an der Charité betreut hat.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Angela Schulz, die stets mit ihrer fachlichen Meinung den Werdegang meiner Arbeit begleitet hat. Ihre konstruktive Kritik, ihre unglaublich zügigen Korrekturen und ihre Kompetenz als Mentorin haben es mir erst ermöglicht, die Arbeit in dieser Weise fertigzustellen.

Ich möchte mich herzlich bei Sabine Wunderlich und Claudia Plum bedanken, die geduldvoll geholfen haben meine Proben zu bearbeiten, und mir stets mit großer Offenherzigkeit und guter Laune im Labor zur Seite standen.

Bettina und Gerd-Jürgen Bublath sowie Christiane Priebisch möchte ich für ihre fachmännische Kompetenz und Hilfe in der Tierzucht und -haltung danken. In allen Fragen die Tierhaltung betreffend konnte ich mich jederzeit an sie wenden. Es ist immer ein besonderes Zeichen, wenn aus Arbeitskollegen Freunde werden.

Meinen Kollegen Sabrina Schütten-Faber, Leonard Schulte und Johannes Fredrich möchte ich für ihre tatkräftige Unterstützung danken. Es war mir immer eine Freude, mit ihnen zusammen arbeiten zu dürfen. Wir haben uns gegenseitig jederzeit verlässlich unterstützt.

Vielen Dank an alle Mitarbeiter des Instituts, die für eine freundliche und gute Atmosphäre gesorgt haben und mir mit ihren kleinen und großen Unterstützungen geholfen haben.

Meinen Eltern und meiner Ehefrau Vera möchte ich herzlich für ihre Geduld danken und dafür, dass ich mich auf sie jederzeit bedingungslos verlassen kann. Ohne ihre Unterstützung wäre all dies nicht möglich gewesen.

12 Selbständigkeitserklärung

Ich, Johannes Unland, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

Einfluss von Testosteron auf Proteinurie und Nephropathie in Rattenmodellen chronischer Nierenerkrankungen

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, 12.12.2018

Johannes Unland



9 783863 879556

mbvberlin mensch und buch verlag

49,90 Euro | ISBN: 978-3-86387-955-6