

Aus dem Bereich Innere Medizin III
Klinische und Experimentelle Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
(Prof. Dr. med. Michael Böhm)



UKS
Universitätsklinikum
des Saarlandes

**Einfluss einer gesteigerten neurohumoralen Aktivierung
bei chronischer Niereninsuffizienz auf die Entstehung
eines atrialen arrhythmogenen Substrats**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Universität des Saarlandes

2021

vorgelegt von: Ulrike Maria Lehnert
geb. am 19.08.1997 in Saarlouis

Tag der Promotion: 01. Februar 2022

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Michael Böhm

Univ.-Prof. Dr. med. Veit Flockerzi

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	4
Tabellenverzeichnis.....	5
Abkürzungsverzeichnis	6
1. Zusammenfassung/Abstract	9
2. Einleitung	12
2.1 Chronische Nierenerkrankung (CKD).....	12
2.1.1 Definition.....	12
2.1.2 Stadieneinteilung	13
2.1.3 Epidemiologie	14
2.1.4 Ätiologie.....	14
2.1.5 Klinik und Komplikationen.....	14
2.1.6 Pathophysiologie	15
2.1.7 Neurohumorale Aktivierung bei CKD.....	17
2.1.8 Therapie.....	19
2.2 Vorhofflimmern.....	20
2.2.1 Pathophysiologie	21
2.2.2 Klinik	24
2.2.3 Therapie.....	25
2.2.4 CKD und VHF	26
2.3 Oxidativer Stress und anti-oxidative Abwehrmechanismen.....	27
2.4 Renale Denervation	31
2.5 Fragestellung und Ziele der Arbeit.....	33
3. Materialien und Methoden.....	35
3.1 Materialien	35
3.2 Methoden	38
3.2.1 Tiermodell.....	38
3.2.2 EKG	43
3.2.3 Western Blot	44
3.2.4 Histologie.....	52
3.2.4.1 Hämatoxylin-Eosin – Färbung (HE).....	53
3.2.4.2 Pikro-Siriusrot – Färbung.....	55
3.2.4.3 Tyrosinhydroxylase – Färbung	59
3.2.5 ELISA.....	60
3.2.6 Statistik	62

4. Ergebnisse	63
4.1 Interventionsgruppe	63
4.1.1 Tierdaten.....	63
4.1.2 Expression ROS-produzierender und anti-oxidativ wirkender Proteine in der Niere	68
4.1.3 Expression blutdruckregulierender Proteine in der Niere	74
4.1.4 Renales Remodeling	78
4.1.5 Strukturelles Remodeling des linken Vorhofs.....	79
4.1.6 Elektrophysiologisches Remodeling des linken Vorhofs	83
4.1.7 Remodeling des linken Ventrikels.....	84
4.2 Präventionsgruppe.....	87
4.2.1 Tierdaten.....	87
4.2.2 Expression ROS-produzierender und anti-oxidativ wirkender Proteine in der Niere	90
4.2.3 Expression blutdruckregulierender Proteine in der Niere	98
4.2.4 Strukturelles Remodeling des linken Vorhofs.....	101
4.2.5 Elektrophysiologisches Remodeling des linken Vorhofs	104
4.2.6 Remodeling des linken Ventrikels.....	106
5. Diskussion.....	108
5.1 Adenin-Modell der CKD	108
5.2 Renale Denervation	110
5.3 Blutdruckeffekte	111
5.4 Kardiales Remodeling.....	114
5.4.1 Ventrikuläres Remodeling.....	114
5.4.2 Atriales Remodeling.....	115
5.4.3 Reno-atriale Achse	117
5.5 Klinische Implikationen	118
Literaturverzeichnis	120
Publikationen.....	132
Poster/Vorträge	132
Danksagung	134
Lebenslauf.....	136

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Stadieneinteilung und Risikoabschätzung der CKD anhand der GFR und Albuminurie nach KDIGO	13
Abbildung 2: Beispiel Ratten-EKGs	22
Abbildung 3: Atriale Remodelingprozesse	24
Abbildung 4: Mechanismen der Entstehung und Abwehr oxidativen Stresses und deren Lokalisation im Organismus	28
Abbildung 5: Kathetergestützte renale Denervation.....	32
Abbildung 6: Ziele der Arbeit.....	34
Abbildung 7: Versuchsablauf Interventionsgruppe.....	40
Abbildung 8: Versuchsablauf Präventionsgruppe	41
Abbildung 9: Telemetrie-Implantat von Data Sciences International (DSI)	41
Abbildung 10: Telemetrie-Stationen.....	42
Abbildung 11: Renale Denervation im Rattenmodell	43
Abbildung 12: EKG-Ableitung	44
Abbildung 13: Beispiel-EKG eines Versuchstiers	44
Abbildung 14: Bestimmung der Myozyten-Querschnittsfläche mit Hilfe des Computerprogramms Image Scope	55
Abbildung 15: Linker Ventrikel (LV) Siriusrot A ungeschnitten B geschnitten	57
Abbildung 16: Linker Vorhof (LA) Siriusrot A ungeschnitten B geschnitten	58
Abbildung 17: Tierdaten	64
Abbildung 18: Nierenfunktionsparameter.....	66
Abbildung 19: Mittlerer arterieller Blutdruck (MAD).....	67
Abbildung 20: Renale Expression des purinabbauenden Enzyms Xanthin-Oxidase (XO)	69
Abbildung 21: Renale Expression des ROS-produzierenden Enzyms NADPH-Oxidase 2 (Nox 2).....	70
Abbildung 22: Renale Expression des ROS-produzierenden Enzyms NADPH-Oxidase 4 (Nox 4).....	70
Abbildung 23: Renale Expression anti-oxidativer Proteine	71
Abbildung 24: Renale Expression cytosolischer anti-oxidativer Proteine	72
Abbildung 25: Renale Expression mitochondrialer anti-oxidativer Proteine.....	73
Abbildung 26: Renale Expression von Markerproteinen oxidativen Stresses.....	74
Abbildung 27: Renale Expression Katecholamin-produzierender Proteine	75
Abbildung 28: Renale Expression blutdruckregulierender Proteine.....	76
Abbildung 29: Renale Expression des Natrium-glucose linked transporter 2 (SGLT-2).....	77
Abbildung 30: Interstitielle Fibrose in der Niere	78

Abbildung 31: Myozytenhypertrophie im linken Vorhof (LA)	79
Abbildung 32: Strukturelles Remodeling im linken Vorhof (LA)	81
Abbildung 33: Tyrosinhydroxylase-Gehalt im linken Vorhof (LA)	82
Abbildung 34: Elektrophysiologisches Remodeling im linken Vorhof (LA)	84
Abbildung 35: Interstitielle Fibrose im linken Ventrikel (LV)	85
Abbildung 36: Myozytenhypertrophie im linken Ventrikel (LV)	86
Abbildung 37: Tierdaten	89
Abbildung 38: Nierenfunktionsparameter	90
Abbildung 39: Renale Expression des purinabbauenden Proteins Xanthin-Oxidase (XO)	91
Abbildung 40: Renale Expression des ROS-produzierenden Proteins NADPH-Oxidase 2 (Nox 2)	92
Abbildung 41: Renale Expression des ROS-produzierenden Proteins NADPH-Oxidase 4 (Nox 4)	92
Abbildung 42: Renale Expression des anti-oxidativ wirkenden Proteins Catalase	93
Abbildung 43: Renale Expression des anti-oxidativ wirkenden Proteins SOD 1	94
Abbildung 44: Renale Expression des anti-oxidativ wirkenden Proteins SOD 2	95
Abbildung 45: Renale Expression der anti-oxidativ wirkenden Proteine Prx I und Prx II	96
Abbildung 46: Renale Expression des anti-oxidativ wirkenden Proteins Prx III	96
Abbildung 47: Renale Expression des oxidativen Stress-Markerproteins HO-1	97
Abbildung 48: Renale Expression des Katecholamin-synthetisierenden Proteins Tyrosinhydroxylase (TH)	98
Abbildung 49: Renale Expression des Katecholamin-abbauenden Proteins Renalase	99
Abbildung 50: Renale Expression des blutdruckregulierenden Proteins CD 10 (Neprilysin)	100
Abbildung 51: Renale Expression des Natrium-glucose linked transporters 2 (SGLT-2)	101
Abbildung 52: Interstitielle Fibrose im linken Vorhof (LA)	102
Abbildung 53: Myozytäre Hypertrophie im linken Vorhof (LA)	103
Abbildung 54: Tyrosinhydroxylasegehalt im linken Vorhof (LA)	104
Abbildung 55: Elektrophysiologisches Remodeling im linken Vorhof (LA)	105
Abbildung 56: Interstitielle Fibrose im linken Ventrikel (LV)	106
Abbildung 57: Myozytenhypertrophie im linken Ventrikel (LV)	107

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Primärantikörper Western Blot	52
Tabelle 2: Sekundärantikörper Western Blot	52

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A.	Arteria
ACE	Angiotensin-Converting-Enzym
Ad	Adenin
Ak	Antikörper
Ang	Angiotensin
ANP	Atrial natriuretic peptide (Atriales natriuretisches Peptid)
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AT ₁	Angiotensin II – Rezeptor – Subtyp 1
ATP	Adenosintriphosphat
BNP	Brain natriuretic peptide (B-Typ natriuretisches Peptid)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca ²⁺	Calcium-Ion
CKD	Chronic kidney disease (chronische Nierenerkrankung)
d	Tag
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FADH ₂	Flavinadenindinukleotid (reduzierte Form)
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde
H ⁺	Wasserstoff-Ion
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HE	Hämatoxylin-Eosin
HO	Hämoxygenase
HO·	Hydroxyl-Radikal

HRP	Horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
IOD	Integrated Optical Density
K ⁺	Kalium-Ion
KDIGO	Kidney Disease: Improving Global Outcomes
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
Ko	Kontrolle/n
l	Liter
LA	Linkes Atrium (linker Vorhof)
LV	Linker Ventrikel (linke Kammer)
m	Meter
M	Mol
m ²	Quadratmeter
mA	Milliampere
MAD	Mittlerer arterieller Druck
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
ms	Millisekunden
n	Anzahl
Na ⁺	Natrium-Ion
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid (oxidierte Form)
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (oxidierte Form)
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduzierte Form)
NaF	Natriumfluorid
Nox	NADPH-Oxidase
NT-proBNP	N-terminal pro-brain natriuretic peptide
O ₂	Sauerstoff
O ₂ ⁻	Superoxid-Anion
ox.	oxidiert
PBS-T	Phosphate-buffered Saline Tween
pg	Pikogramm
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Prx	Peroxiredoxin
PVI	Pulmonalvenenisolation
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

red.	reduziert
R-OH	Alkohol
R-OOH	Hydroperoxid
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)
SEM	Standard error of the mean (Standardfehler)
SGLT	Sodium dependent glucose transporter
SOD	Superoxid-Dismutase
sog.	sogenannte/-er/-es
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TH	Tyrosinhydroxylase
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
V	Volt
v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche
VHF	Vorhofflimmern
XO	Xanthin-Oxidase
z.B.	zum Beispiel
Z.n.	Zustand nach
ZNS	Zentrales Nervensystem
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

1. Zusammenfassung/Abstract

Bei Patient*innen mit einer chronischen Nierenerkrankung (CKD) ist neu auftretendes Vorhofflimmern (VHF) ein unabhängiger Risikofaktor für das Auftreten eines ischämischen Schlaganfalls und den Tod. Im Vorhof verursacht CKD ein strukturelles, biochemisches und elektrisches Remodeling des Myokards und erhöht die Anfälligkeit für atriale Arrhythmien. Eine erhöhte Aktivität des sympathischen Nervensystems, ein häufiges Kennzeichen der CKD, stellt bekanntlich einen Auslöser für VHF dar. Der Einfluss des sympathischen Nervensystems auf atriale Remodelingprozesse im Rahmen der CKD muss jedoch noch untersucht werden.

Methoden: Männliche Sprague Dawley Ratten wurden über 16 Wochen mit 0.25% Adenin-haltigem Futter zur Induktion einer chronischen Nierenerkrankung gefüttert. In der fünften Woche wurde die Hälfte der Adenin-gefütterten Tiere einer renalen Denervation (Ad+RDN) zur Modulation des sympathischen Nervensystems unterzogen, die andere Hälfte wurde sham-operiert (Ad). Als Kontrolltiere (Ko) dienten Ratten, die eine normale Haltungsdiät erhielten. Die Nierenfunktion wurde über die Zeit durch Messung der Plasmakonzentrationen von Kreatinin und Harnstoff erfasst. Der Blutdruck wurde über 16 Wochen mittels Katheterbasierter Telemetrie gemessen und zur Bestimmung der P-Wellen-Dauer wurden EKG-Aufzeichnungen verwendet. Strukturelle und biochemische Veränderungen von Niere und Herz wurden mittels Immunoblot und Gewebe-Histologie untersucht.

Ergebnisse: 0.25% Adenin-Futter über 16 Wochen induzierte einen ausgeprägten tubulären Nierenschaden mit signifikant erhöhten Plasmakonzentrationen von Kreatinin (Ko: 0.54 ± 0.27 mg/dl vs. Ad: 3.0 ± 0.22 mg/dl, $p=0.0002$) und Harnstoff (Ko: 52.8 ± 3.0 mg/dl vs. Ad: 396.2 ± 45.0 mg/dl, $p=0.0001$). RDN konnte die Nierenfunktion nicht verbessern (Ad+RDN Kreatinin: 2.8 ± 0.18 mg/dl, $p=0.81$ vs. Ad; Ad+RDN Harnstoff: 344.5 ± 13.7 mg/dl, $p=0.45$ vs. Ad). Verglichen mit den Kontrollen resultierte die Fütterung mit Adenin in einer zunehmenden Nierenfibrose mit gesteigerter Expression des oxidativen Stress-Markerproteins Hämoxygenase 1 (HO-1) und einer Reduktion von den an anti-oxidativen Abwehrmechanismen beteiligten Proteinen. RDN verbesserte die Nierenfunktion in keinem dieser Parameter. Nach 16 Wochen führte die Adenin-induzierte CKD zu einer Erhöhung des mittleren arteriellen Blutdrucks und löste die Bildung interstitieller Fibrose im linken Vorhof aus (Ko: 6.4 ± 0.51 %, Ad: 16.8 ± 1.3 %, $p<0.0001$) sowie eine prolongierte P-Wellen-Dauer (Ko: 22.6 ± 0.92 ms, Ad: 31.2 ± 1.3 ms, $p=0.0005$). RDN führte zu einer signifikant reduzierten Fibrosebildung im linken Vorhof (Ad+RDN: 8.8 ± 0.64 %, $p<0.0001$ vs. Ad) und verbesserter P-Wellen-Dauer im Vergleich zu Adenin-gefütterten Tieren (Ad+RDN: 24.1 ± 1.4 ms, $p=0.001$ vs. Ad).

Fazit: In einem Rattenmodell der CKD induzierte der renal-tubuläre Schaden einen moderaten Blutdruckanstieg und initiierte strukturelle Remodelingprozesse im linken Vorhof. RDN verhinderte den Progress des atrialen Remodelings ohne Beeinflussung des Blutdrucks und ohne Verbesserung der Nierenfunktion.

Abstract:

In patients with chronic kidney disease (CKD) new onset of atrial fibrillation (AF) is an independent risk factor for ischemic insult and death. In the atrium CKD causes structural, biochemical and electrical remodeling and increases susceptibility for atrial arrhythmias. An enhanced activation of the sympathetic nervous system, a hallmark of CKD, is a well known trigger for AF. However, the impact of the sympathetic nervous system on atrial remodeling processes in a setting of CKD needs to be elucidated.

Methods: Male Sprague Dawley rats were fed with 0.25% Adenine-containing chow for 16 weeks to induce chronic kidney disease. At week five half of the adenine-fed rats were subjected to renal denervation (Ad+RDN) to modulate the sympathetic nervous system, the other half were sham-operated (Ad). Rats on normal chow served as control (Ctr). Kidney function was followed over time by assessment of plasma creatinine and urea concentrations. Blood pressure was measured for 16 weeks using catheter-based telemetry devices and ECG recordings were used for assessment of p-wave duration. Structural and biochemical alterations of the kidney and the heart were analysed by immunoblotting and histology.

Results: 0.25% Adenine-chow for 16 weeks induced pronounced tubular kidney damage with significantly increased plasma concentrations of creatinine (Ctr: 0.54 ± 0.27 mg/dl vs. Ad: 3.0 ± 0.22 mg/dl, $p=0.0002$) and urea (Ctr: 52.8 ± 3.0 mg/dl vs. Ad: 396.2 ± 45.0 mg/dl, $p=0.0001$). RDN did not improve kidney function (Ad+RDN creatinine: 2.8 ± 0.18 mg/dl, $p=0.81$ vs. Ad; Ad+RDN urea 344.5 ± 13.7 mg/dl, $p=0.45$ vs. Ad). Compared to control, adenine-chow resulted in increased kidney fibrosis with enhanced expression of oxidative stress marker protein Hemoxygenase 1 (HO-1) and a reduction in proteins involved in anti-oxidative defence mechanisms. RDN did not improve kidney function of any of these parameters. After 16 weeks adenine-induced CKD resulted in elevated mean arterial blood pressure and triggered left atrial interstitial fibrosis formation (Ctr: 6.4 ± 0.51 %, Ad: 16.8 ± 1.3 %, $p<0.0001$) and a prolonged p-wave duration (Ctr: 22.6 ± 0.92 ms, Ad: 31.2 ± 1.3 ms, $p=0.0005$). RDN significantly attenuated structural remodeling of the left atrium (Ad+RDN: 8.8 ± 0.64 %, $p<0.0001$ vs. Ad) and improved p-wave duration compared to Adenine (Ad+RDN: 24.1 ± 1.4 ms, $p=0.001$ vs. Ad).

Conclusion: In a rat model of adenine-induced CKD, renal tubular damage induced a moderate increase in blood pressure and initiated structural remodeling processes in the left atrium. RDN inhibited progression of atrial remodeling without effecting blood pressure and without improving kidney function.

2. Einleitung

2.1 Chronische Nierenerkrankung (CKD)

Unter dem Begriff der chronischen Nierenerkrankung (chronische Niereninsuffizienz, CKD) werden all diejenigen Krankheitsbilder zusammengefasst, die durch eine langsame, über Monate bis Jahre progrediente, irreversible Verminderung der Nierenfunktion gekennzeichnet sind. Aufgrund der weltweit hohen und steigenden Prävalenz, der Auswirkungen auf nahezu alle Organsysteme und insbesondere auf das kardiovaskuläre System sowie der damit verbundenen hohen Komplikationsrate und Mortalität, kommt der CKD eine steigende Bedeutung zu.

2.1.1 Definition

Nach den Leitlinien der Kidney Disease: Improving Global Outcome (KDIGO) ist die chronische Nierenerkrankung durch eine über mindestens drei Monate persistierende Einschränkung der Nierenfunktion oder Auffälligkeiten der Nierenstruktur einhergehend mit gesundheitlichen Komplikationen definiert.⁵⁰

Als Indikator für die Nierenfunktion gilt die glomeruläre Filtrationsrate (GFR).^{95,102} Zur Abschätzung der GFR wird die Kreatinin-Clearance herangezogen. Kreatinin ist ein Produkt des Muskelstoffwechsels, das glomerulär filtriert wird, jedoch nur in geringem Maße tubulär sezerniert und nicht resorbiert wird. Daher ist das Verhältnis aus Urin- und Serum-Kreatininkonzentration multipliziert mit der Urinausscheidung pro Zeit ein geeigneter Marker für die Filtrationsleistung der Niere. Da die genaue Berechnung der Kreatinin-Clearance die Gewinnung von Sammelurin erfordert, was mitunter sehr zeitaufwändig und fehleranfällig ist, werden in der klinischen Praxis zur Bestimmung der geschätzten glomerulären Filtrationsrate (estimated GFR, eGFR) Näherungsformeln verwendet, die neben Serum-Kreatinin, dessen Konzentration von der Muskelmasse abhängig ist, auch Alter, Geschlecht und Hautfarbe (CKD-EPI-Formel) bzw. Alter und Körpergewicht (Cockcroft-Gault-Formel) berücksichtigen.¹⁰² Bei einer GFR kleiner als $60 \text{ ml/min/1.73 m}^2$ gilt die Nierenfunktion als eingeschränkt. Zu den weiteren Kriterien einer funktionellen oder strukturellen Nierenschädigung zählen gemäß KDIGO eine Albuminurie (gekennzeichnet durch eine Albuminausscheidung $\geq 30 \text{ mg/d}$ bzw. Albumin/Kreatinin-Quotient $\geq 30 \text{ mg/g}$), pathologische Defekte des Urinsediments, durch renal-tubuläre Funktionsstörung hervorgerufene Elektrolyt- oder sonstige metabolische Entgleisungen, in Histologie oder bildgebender Diagnostik detektierte Strukturauffälligkeiten

oder Z.n. Nierentransplantation.⁵⁰ Zur Diagnosestellung der CKD muss wenigstens eines der aufgeführten Kriterien über mindestens drei Monate bestehen.

2.1.2 Stadieneinteilung

Die CKD wird gemäß KDIGO nach dem Schweregrad der Einschränkung der GFR in fünf Stadien G1 bis G5 (G3 aus prognostischen Gründen nochmals unterteilt in G3a und G3b) eingeteilt (vgl. *Abbildung 1*). In den Stadien G1 (GFR > 90 ml/min) und G2 (GFR 60-89 ml/min) liegt die GFR noch im Norm- bzw. leicht verminderten Bereich, sodass definitionsgemäß nur bei Vorliegen weiterer funktioneller oder struktureller Nierenschäden eine chronische Nierenerkrankung besteht. Im Terminalstadium der CKD (Stadium G5, terminale Niereninsuffizienz) sinkt die Filtrationsleistung der Niere auf weniger als 15 ml/min ab und die Krankheit erreicht das Vollbild der medikamentös nicht mehr beherrschbaren Urämie, was unbehandelt zum Tod führt. In diesem Stadium ist die Einleitung eines Nierenersatzverfahrens (Hämodialyse, Nierentransplantation) zwingend erforderlich.⁵⁰

Je nach Höhe der Albuminurie werden zusätzlich die Stadien A1 bis A3 unterschieden. Im Stadium A1 ist die Albuminausscheidung noch normwertig bzw. leichtgradig erhöht (Albumin-Kreatinin-Ratio < 30 mg/g bzw. Albuminausscheidung < 30 mg/d). Bei einer Albuminausscheidung über 300 mg/d (Stadium A3) spricht man von einer Makroalbuminurie, die mit einer insgesamt schlechten Prognose und einem deutlich erhöhten Risiko für Komplikationen und schwere Verläufe assoziiert ist.⁵⁰

Risiko für schwere Verläufe und Komplikationen:  <ul style="list-style-type: none"> ■ geringes Risiko (sofern keine anderen Zeichen einer Nierenfunktionsstörung vorliegen), ■ moderates Risiko, ■ hohes Risiko, ■ sehr hohes Risiko 				Albuminurie-Kategorie (mg/g)		
				A1	A2	A3
				normal bis leicht erhöht	mäßig erhöht	stark erhöht
				< 30	30–300	> 300
GFR-Kategorie (ml/min/1,73 m ²)	G1	normal oder hoch	≥ 90			
	G2	leicht verringert	60–89			
	G3a	leicht bis mäßig verringert	45–59			
	G3b	mäßig bis stark verringert	30–44			
	G4	stark verringert	15–29			
	G5	Nierenversagen	< 15			

Abbildung 1: Stadieneinteilung und Risikoabschätzung der CKD anhand der GFR und Albuminurie nach KDIGO

Die Einteilung der CKD in fünf Stadien erfolgt nach dem Maß der GFR-Einschränkung und der Albuminurie. Beide Faktoren sind auch für die Prognoseabschätzung maßgeblich von Bedeutung. (Braun et al., 2018, S.861)

2.1.3 Epidemiologie

Die Prävalenz der CKD in der Bevölkerung variiert weltweit und wird durch Daten einer großen Metaanalyse mit insgesamt 13.4 % mit weiterhin steigender Tendenz angegeben.^{28,42} Dabei ist eine Altersabhängigkeit der Erkrankung erkennbar. Mit zunehmendem Alter steigt auch die Prävalenz der CKD.

2.1.4 Ätiologie

Als prävalenteste Risikofaktoren einer chronischen Nierenerkrankung sind die beiden Volkskrankheiten arterielle Hypertonie und Diabetes mellitus zu nennen, die beide, vaskuläre und diabetische Nephropathie getrennt oder oft auch gemeinsam, die beiden häufigsten Entitäten chronischer Nierenschädigung bedingen.^{117,54,105} Daneben sind laut Daten der German-Chronic-Kidney-Disease-Studie die primären Glomerulonephritiden als häufige Auslöser der CKD relevant, während auf seltenere Ursachen wie Systemerkrankungen, interstitielle Nephritiden oder hereditäre Nierenerkrankungen nur ein geringer Prozentsatz der Patient*innen entfällt. In 20 % der Fälle bleibt die Ursache der CKD jedoch unbekannt.¹⁰⁵

2.1.5 Klinik und Komplikationen

In den meisten Fällen verläuft die CKD für die Patient*innen zunächst asymptomatisch und wird in frühen Stadien meist nur als Zufallsbefund im Rahmen von Routine- oder Vorsorgeuntersuchungen (pathologischer Befund in Urinteststreifen, erhöhte Retentionsparameter im Labor) auffällig.¹¹⁷ Seltener klagen Patient*innen über Urinauffälligkeiten wie Makrohämaturie (Blut im Urin) oder schäumenden Urin, Polyurie (vermehrte Urinausscheidung) bzw. Nykturie (vermehrtes nächtliches Wasserlassen) oder Oligourie (verminderte Urinausscheidung). Bei fortgeschrittenem Verlauf können sich unspezifische Symptome wie Abgeschlagenheit/Antriebslosigkeit, Übelkeit und Erbrechen, Gewichtsverlust, Pruritus (Juckreiz), Bewusstseinsveränderungen, periphere Ödeme oder Dyspnoe (Luftnot) zeigen.¹⁸ Zu den häufigsten Komplikationen der CKD zählen arterielle Hypertonie, Anämie (Blutarmut) sowie Störungen des Knochen-, Mineral- und Elektrolythaushalts.⁵⁴ Aber auch durch den renalen Proteinverlust bedingte Symptome wie Infektanfälligkeit oder Gerinnungsstörungen können auftreten.

Die Prävalenz kardiovaskulärer Erkrankungen ist bei Patient*innen mit CKD drastisch erhöht gegenüber der Normalbevölkerung. So beschrieb eine US-amerikanische Datenerhebung eine Prävalenz von 65 % in CKD-Patient*innen mit GFR < 60 ml/min im Vergleich zu 32 % bei

Nierengesunden.^{99,88} Als kardiovaskuläre Komorbidität treten dabei verschiedene Krankheitsbilder wie koronare Herzkrankheit, Myokardinfarkt, Herzrhythmusstörungen oder Herzinsuffizienz auf.^{106,88,99} Auch die kardiovaskuläre Mortalität ist bei CKD-Patient*innen erhöht. So stellen kardiovaskuläre Erkrankungen die häufigste Todesursache bei Patient*innen mit terminaler Niereninsuffizienz dar.¹⁰⁶ Jedoch bereits in frühen Stadien der CKD mit nur leicht reduzierter Nierenfunktion ist das kardiovaskuläre Risiko erhöht.^{106,66} So ist für Patient*innen in weniger fortgeschrittenen Stadien das Risiko des Todes an kardiovaskulären Ereignissen größer als das Risiko des Progresses der CKD zur terminalen Niereninsuffizienz.^{106,69}

2.1.6 Pathophysiologie

Pathophysiologisch liegt dem klinischen Bild der chronischen Niereninsuffizienz eine progrediente Abnahme der Zahl funktionstüchtiger Nephrone zugrunde. In der Anfangsphase kann der Ausfall noch weitestgehend durch die intakten Nephrone kompensiert werden.⁶² Im weiteren Verlauf kommt es jedoch mit zunehmender Destruktion des gesunden Nierengewebes zum Ausfall der exkretorischen und inkretorischen Funktionen der Niere mit daraus resultierender klinischer Symptomatik und Komplikationen.

In den ca. 2 Millionen Glomeruli beider Nieren werden täglich etwa 180 l Primärharn als Ultrafiltrat des Blutes filtriert und durch Resorptions- und Sekretionsvorgänge im Tubulussystem auf ca. 1 bis 2 l ausscheidungsfähigen Endharn konzentriert.²⁹ Über den Endharn werden sowohl körpereigene, im Stoffwechsel anfallende harnpflichtige Substanzen (z.B. Kreatinin und Harnstoff), als auch exogene Metabolite (z.B. Medikamente) aus dem Körper eliminiert.⁶²

Mit abnehmender Zahl funktioneller Nephrone kommt es zunächst zu einer eingeschränkten Konzentrationsfähigkeit der Niere, der sog. Isosthenurie. Um der Ausscheidungsfunktion nachzukommen, müssen die harnpflichtigen Substanzen nun über die reduzierte Zahl noch funktionsfähiger Nephrone ausgeschieden werden, sodass auf jedes Nephron eine erhöhte Anzahl osmotisch wirksamer Teilchen entfällt. Dies führt zunächst zu einer osmotischen Diurese, die sich bei Patient*innen mit Polyurie und kompensatorischer Polydipsie sowie Nykturie äußert.⁶²

Bei zunehmendem Ausfall der Nephrone kann das noch intakte Nierengewebe die Ausscheidungsfunktion nicht mehr vollständig bewerkstelligen und es kommt zur Retention harnpflichtiger Substanzen und deren Akkumulation im Körper. Für eine Vielzahl der Stoffe dieser heterogenen Gruppe normalerweise renal eliminierten Metabolite wurde eine durch noch nicht vollständig geklärte Mechanismen direkt oder indirekt schädigende Wirkung auf

verschiedene Organsysteme und insbesondere auf das Herz-Kreislaufsystem nachgewiesen, sodass diese insgesamt als Urämietoxine bezeichnet werden.^{117,99}

Auch die Diuresemenge reduziert sich bei fortgeschrittenem Verlauf und führt zu Oligo- bzw. im Endstadium zu Anurie und durch die fehlende Wasserausscheidung zur Hyperhydratation des Körpers, die sich klinisch als periphere Ödeme, aber auch als Lungenödem mit Dyspnoe als Leitsymptom manifestieren kann.¹¹⁷ Im Herzen geht die Volumenüberladung mit erhöhter Wandspannung von Vorhöfen und Ventrikel einher.

Außerdem führt der Ausfall der Niere als Ausscheidungsorgan zu Entgleisungen des Elektrolythaushalts. Bei starker Reduktion der GFR hat dies die Retention insbesondere von Kalium- und Natriumionen zur Folge. Die Entstehung einer Hyperkaliämie wird durch kaliumreiche Ernährung, den Einsatz kaliumsparender Diuretika und eine metabolische Azidose begünstigt und birgt die Gefahr lebensgefährlicher Herzrhythmusstörungen. Die Natriumüberladung des Körpers geht aus osmotischen Gründen auch mit einer Wasserretention in der Niere einher, was zur Expansion des Extrazellularraums führt und an der Entstehung einer arteriellen Hypertonie bei CKD beteiligt ist.⁵⁴

Auch die Phosphatausscheidung über die Niere ist bei fortgeschrittenem Verlust der Filtrationsleistung beeinträchtigt. Die entstehende Hyperphosphatämie führt durch Stimulation der Parathormon-Ausschüttung in der Nebenschilddrüse zum sekundären Hyperparathyreoidismus und daraus resultierendem Knochenkatabolismus.⁵⁴

Da die Niere auch im Dienst der Regulation des Säure-Base-Haushalts steht, kann eine starke Funktionseinschränkung (GFR < 30 ml/min) zu pH-Entgleisungen führen. Durch verminderte Ausscheidung im Stoffwechsel anfallender Protonen und gleichzeitig eingeschränkter tubulärer Rückresorption von Bicarbonat kommt es häufig zur Ausbildung einer metabolischen Azidose.⁵⁴

Auch die inkretorischen Funktionen der Niere als hormonbildendes Organ sind im Rahmen der CKD beeinträchtigt. In den peritubulären Fibroblasten ist die Bildung des Peptidhormons Erythropoetin (EPO), ein Wachstumsfaktor, dessen Funktion die Stimulation der Erythropoese im Knochenmark darstellt, reduziert. Dies führt zur renalen Anämie, einer durch EPO-Mangel bedingten normochrom normozytären Anämie.¹¹⁷

Durch Beteiligung der Niere an der endogenen Vitamin D-Synthese durch 1- α -Hydroxylierung von 25-(OH)-Cholecalciferol zu 1,25-(OH)₂-Cholecalciferol (Calcitriol) führt eine Einschränkung der Nierenfunktion zu einem Mangel dieses den Kalzium- und Phosphathaushalt-regulierenden Hormons. Es resultieren eine Hypokalzämie bei gleichzeitiger Hyperphosphatämie und ein sekundärer Hyperparathyreoidismus und in Folge Störungen des Knochenstoffwechsels durch verstärkte Aktivierung der Osteoklasten. Dies

kann sich in Form von Knochenschmerzen, erhöhter Knochenbrüchigkeit bis hin zur Osteoporose und extraskelettalen Kalzifikationen äußern.¹¹⁷

2.1.7 Neurohumorale Aktivierung bei CKD

Durch ihre reichliche vegetative Innervation und ihre Funktion als Renin-bildendes Organ ist die Niere in das sympathische Nervensystem und in die Regulation damit verbundener Vitalfunktionen integriert, sodass einer veränderten Aktivität der neurohumoralen Achse eine nicht zu unterschätzende Bedeutung in der Pathogenese der CKD und der damit verbundenen kardiovaskulären Komplikationen zukommt.

Die Niere ist sowohl afferent als auch efferent durch zahlreiche in der Adventitia der Nierenarterie verlaufende Nervenfasern innerviert und steht über diese mit dem zentralen Nervensystem in Verbindung.⁹⁶ Über afferente Fasern werden Informationen von Mechano- und Chemorezeptoren des Nierenbeckens in die sympathische Steuerzentrale im Hypothalamus weitergeleitet.^{33,24} Als Neurotransmitter fungieren dabei v.a. Adenosintriphosphat (ATP), Substanz P sowie Calcitonin-gene-related peptide (CGRP).³³ Als mögliche Stimuli, die zur Aktivierung der mechano- und chemosensitiven Afferenzen führen, gelten pathophysiologische Bedingungen wie renale Ischämie, Hypoxie, oxidativer Stress oder intrinsischer Nierenschaden.^{96,23} Die Stimulation bewirkt eine Erhöhung des zentralen Sympathikotonus, was durch Aktivierung sympathischer Efferenzen nicht nur zu Anpassungsreaktionen in der Niere selbst, sondern in den verschiedenen sympathisch innervierten Organen wie dem kardiovaskulären System führt.⁹⁶

Über efferente Nervenfasern aus dem thorakalen und lumbalen sympathischen Grenzstrang erreichen Sympathoefferenzen aus den vegetativen hypothalamischen Regulationszentren die Niere, an deren Nervenendigungen v.a. die Neurotransmitter Noradrenalin, Neuropeptid Y (NPY) und ATP freigesetzt werden.³³ Vorwiegend werden dabei die glatten Muskelzellen im Gefäßsystem und Glomeruli, die juxtaglomerulären granulierten Zellen sowie die renalen Tubulusepithelzellen sympathisch innerviert.^{22,33,24} Eine sympathische Stimulation führt in der Niere hauptsächlich zu drei Anpassungsreaktionen: Durch Stimulation von β_1 -Adrenorezeptoren der granulierten Zellen des juxtaglomerulären Apparates wird die Renin-Sekretion gesteigert. In renalen Tubulusepithelzellen wird über α_{1B} -adrenerge Stimulation die Natrium-Resorption aus dem Primärharn erhöht. Über α_{1A} -Adrenorezeptor-vermittelte Vasokonstriktion wird der renale Blutfluss gesenkt.²⁴

Es ist bekannt, dass CKD mit einer Überaktivität des sympathischen Nervensystems assoziiert ist. So konnten in klinischen Studien erhöhte Plasmakonzentrationen von Noradrenalin sowie eine erhöhte Sensitivität dafür in niereninsuffizienten Patient*innen festgestellt werden.^{33,45}

Dies gilt nicht nur für die Endstadien der CKD, sondern bereits bei Patient*innen mit weniger stark eingeschränkter Nierenfunktion und adäquat eingestelltem Blutdruck konnte eine erhöhte Sympathikusaktivität nachgewiesen werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Stärke der sympathischen Aktivierung positiv mit dem Fortschritt der CKD korreliert und sich umgekehrt zur GFR verhält.^{33,37}

Die sympathische Überaktivität scheint ursächlich an der Genese und dem Progress pathologischer Veränderungen und Komplikationen von Herz und Niere im Rahmen der CKD beteiligt zu sein. Häufigste Folge ist die arterielle Hypertonie, die in 80 % der Patient*innen mit CKD nachweisbar ist. Die Hypertonie führt ihrerseits wiederum zu strukturellen Veränderungen von Herz und Gefäßen, darunter die linksventrikuläre Hypertrophie als häufige kardiale Komplikation bei CKD.⁴⁹ Jedoch auch unabhängig vom Blutdruckeffekt stellte sich die sympathische Aktivierung als möglicher Mediator pathologischer, mit erhöhtem kardiovaskulären Risiko einhergehender, Veränderungen bei CKD heraus. So konnte bei erhöhtem Sympathikotonus ohne Blutdruckanstieg beispielsweise eine erhöhte Rate von Arrhythmien¹¹¹ oder Arteriosklerose festgestellt werden.⁴⁹

Die Mechanismen, die zur gesteigerten Sympathikusaktivität bei CKD führen, sind noch nicht vollständig geklärt und vermutlich ein Zusammenspiel unterschiedlicher Faktoren, deren Identifikation als mögliche therapeutische Ansatzpunkte im Zentrum des Interesses steht.⁴⁹

Die Beteiligung einer Dysregulation des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems im Sinne einer verstärkten Aktivierung im Rahmen der CKD scheint als gesichert. Renin ist ein proteolytisches Hormon, das von den granulierten Zellen des juxtaglomerulären Apparats bei renaler Minderperfusion, durch tubuloglomeruläres Feedback bei verringertem NaCl-Gehalt an der Macula densa oder Stimulation von β_1 -Adrenorezeptoren sezerniert wird.⁹³ Die Protease Renin spaltet zirkulierendes Angiotensinogen zu Angiotensin I (Ang I), welches wiederum von Angiotensin-converting-enzyme (ACE) zu Angiotensin II (Ang II) umgesetzt wird, dessen Plasmaspiegel bei CKD merklich erhöht ist.^{49,93} Ang II erzielt über verschiedene Rezeptoren (Angiotensin II receptor typ 1 = AT₁; typ 2 = AT₂) eine Vielzahl an Wirkungen. Neben seiner blutdrucksteigernden Wirkung durch periphere Vasokonstriktion sowie direkte und, durch gesteigerte Aldosteronsynthese, indirekte Erhöhung der renalen Na⁺- und Wasserresorption, zeigt Ang II auch einen regulierenden Effekt auf das sympathische Nervensystem. An peripheren Nervenendigungen potenziert Ang II die Ausschüttung des sympathischen Neurotransmitters Noradrenalin. In den sympathischen Regulationszentren der Medulla oblongata wird durch Ang II die sympathische Efferenz gesteigert.⁴⁹

Darüber hinaus wurde im Rahmen der CKD eine schädigende Wirkung von Ang II auf Niere und Herz sowohl durch hämodynamische als auch durch nicht-hämodynamische Effekte beschrieben. Druckerhöhung in den glomerulären Kapillaren führt zu einem glomerulären Schaden durch mechanische Reizung der Endothel- und Mesangiumszellen.⁹³ Außerdem löst

Ang II durch Aktivierung des NFκB-Signalwegs inflammatorische Prozesse aus, die zur Induktion proinflammatorischer Cytokine, zur Hochregulation der Expression von Adhäsionsmolekülen und zur Rekrutierung inflammatorischer Zellen im Glomerulus sowie tubulointerstitiell beitragen.⁸⁶ Auch Remodelingprozesse werden durch Ang II vermittelt. So wurde profibrotische Effekte sowohl in der Niere als auch im Herzen beschrieben. Durch Stimulation der Proliferation von Fibroblasten kommt es zur verstärkten Synthese extrazellulärer Matrix und damit zum fibrotischen Umbau.^{86,83}

Daneben gilt Ang II als Auslöser verstärkten oxidativen Stresses durch erhöhte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Dieser Effekt wird durch Stimulation der ROS-produzierenden Enzyme der Familie der NADPH-Oxidasen vermittelt.^{93,38}

Neben der RAAS-Aktivierung als möglicher Mechanismus sympathischer Überaktivität wurde in letzter Zeit die potentielle Rolle des kürzlich entdeckten Enzyms Renalase diskutiert.⁴⁹ Die Renalase ist eine vorwiegend in der Niere, aber auch in Kardiomyozyten und Skelettmuskelzellen synthetisierte Monoaminoxidase, die ins Blut sezerniert wird und durch Abbau der Katecholamine Noradrenalin, Adrenalin und Dopamin möglicherweise eine blutdrucksenkende Wirkung erzielt.¹²⁴ Über die Rolle der Renalase in der Überaktivität des sympathischen Nervensystems bei CKD herrscht bislang Uneinigkeit. So berichten zahlreiche Studien von massiv erniedrigten Konzentrationen von Renalase in CKD-Patient*innen, was durch verminderten Katecholamin-Abbau zu einer gesteigerten sympathischen Aktivierung führen könnte.^{5,124,49} Im Gegensatz dazu wurden in anderen Studien erhöhte Konzentrationen von Renalase im Serum niereninsuffizienter Patient*innen gefunden.¹²¹ Die Rolle der Renalase als möglicher Mechanismus der sympathischen Überaktivität bei CKD und potentielles therapeutisches Target bleibt daher durch weitergehende Forschung zu klären.

2.1.8 Therapie

In der Behandlung der CKD stehen die Progressionshemmung, die Behandlung von Komplikationen sowie die Einstellung der kardiovaskulären Risikofaktoren im Fokus.⁵⁴

Dabei kommt der antihypertensiven Therapie aufgrund der Doppelrolle der arteriellen Hypertonie als Ursache und Komplikation der CKD zugleich eine zentrale Bedeutung zu. Über Blutdruckzielwerte für Patient*innen mit chronischer Nierenerkrankung herrscht bislang Uneinigkeit. Die KDIGO-Leitlinien empfehlen für alle Patient*innen mit CKD einen Zielwert < 140/90 mmHg, für Patient*innen mit Urin-Albuminausscheidung ≥ 30 mg/d eine Blutdrucksenkung $\leq 130/80$ mmHg.⁵⁰ In neueren Studien (Systolic Blood Pressure Intervention Trial, SPRINT) konnte jedoch ein Vorteil einer intensiveren Blutdruckeinstellung (< 120 mmHg systolisch) gegenüber einer moderaten (< 140 mmHg systolisch) mit Reduktion des Risikos kardiovaskulärer Ereignisse und Verringerung der Gesamtmortalität gezeigt werden^{18,99,122},

jedoch zu Ungunsten der GFR. So war in der Gruppe mit intensivierter Blutdrucktherapie ein erhöhtes Risiko eines GFR-Abfalls (um mindestens 30 % oder GFR < 60 ml/min) zu verzeichnen.^{18,122} Als Antihypertensiva sind vorzugsweise Hemmstoffe des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) einzusetzen. Für diese konnte in großen Studien nicht nur eine Reduktion des kardiovaskulären Risikos in CKD-Patient*innen gezeigt werden, sondern auch eine Verminderung des Risikos einer Progression der CKD.^{99,123} Mittel der ersten Wahl für CKD-Patient*innen mit Albuminurie sind laut KDIGO-Leitlinien ACE-Hemmer oder AT₁-Antagonisten.^{50,99} Eine Kombination beider ist jedoch aufgrund erhöhten Risikos von Hyperkaliämie und akutem Nierenversagen zu vermeiden.^{18,35}

Auch eine ausreichende glykämische Kontrolle und Einstellung des Diabetes mellitus ist von essenzieller Bedeutung. Als anzustrebender HbA_{1c}-Zielwert gilt gemäß KDIGO-Leitlinien 7 % für CKD-Patienten.⁵⁰ Bei der Verwendung oraler Antidiabetika müssen ggf. notwendige Dosisanpassungen oder Kontraindikationen bei eingeschränkter Nierenfunktion berücksichtigt werden.^{18,99} Als besonders vorteilhaft in der Therapie des Diabetes mellitus bei CKD durch zusätzliche kardiovaskuläre Effekte erwies sich die Substanzklasse der SGLT-2-Inhibitoren (Sodium-Glucose-linked Transporter 2). In Studien konnte für Vertreter dieser Substanzgruppe sowohl eine Progressionshemmung der Nierenerkrankung als auch eine verminderte kardiovaskuläre Mortalität gezeigt werden.^{99,74,116}

Darüber hinaus ist die Einstellung weiterer kardiovaskulärer Risikofaktoren durch Nikotinkarenz, körperliche Aktivität und ggf. lipidsenkender Therapie ein wesentlicher Bestandteil der Behandlung der CKD.^{50,18,99}

Zudem empfehlen die Leitlinien der KDIGO diätische Maßnahmen in Form von Reduktion der Natrium-Aufnahme (< 2 g/d) durch reduzierte Salzzufuhr (entsprechend < 5 g/d Natriumchlorid) zur Prävention von Hypertonie und Hyperhydratation. Für Patient*innen mit CKD-Stadium G4 oder G5 sollte zusätzlich die Proteinaufnahme auf < 0.8 g/kg/d bzw. für alle CKD-Patient*innen mit Risiko der Progression < 1.3 g/kg/d reduziert werden.^{50,18} Für die Behandlung CKD-spezifischer Komplikationen wie renale Anämie, Störungen des Elektrolyt- und Mineralstoffwechsels oder metabolische Azidose sollten entsprechende Therapieverfahren eingeleitet werden.

2.2 Vorhofflimmern

Vorhofflimmern (VHF) ist die häufigste anhaltende Herzrhythmusstörung mit einer geschätzten Prävalenz von 2-4 % und weiterhin steigender Tendenz.^{43,8} Durch schwerwiegende Komplikationen wie Schlaganfall, Herzinsuffizienz oder Myokardinfarkt geht die Erkrankung

mit hoher Morbidität und Mortalität einher.^{25,9,110} Neben einer klaren Altersabhängigkeit ist das Auftreten von VHF bzw. der Progress von paroxysmalem zu persistierendem bzw. permanentem VHF häufig mit Risikofaktoren wie arterieller Hypertonie, Diabetes mellitus oder kardialen Begleiterkrankungen wie Herzinsuffizienz und Klappenvitien assoziiert.⁷⁰ Auch eine chronische Nierenerkrankung ist mit einem erhöhten Risiko des Auftretens bzw. der Progression von VHF vergesellschaftet. Mit ca. 18 % ist die Prävalenz von VHF in Patient*innen mit CKD um das Zwei- bis Dreifache erhöht gegenüber der gleichaltrigen Normalbevölkerung.^{97,79} VHF stellt in terminal-niereninsuffizienten Dialyse-Patient*innen einen unabhängigen Risikofaktor für Schlaganfall und Tod dar.⁸⁷

2.2.1 Pathophysiologie

VHF ist gekennzeichnet durch eine schnelle und unkoordinierte arrhythmische Vorhofaktivität, wobei Vorhoffrequenzen von 400-600/min erreicht werden.^{118,73} Diese extrem schnellen elektrischen Entladungen werden durch die Frequenz-filternde Funktion des AV-Knotens nicht 1:1 sondern nur unregelmäßig auf den Ventrikel übergeleitet, wodurch eine unregelmäßige Herzaktion mit typischen Symptomen wie Palpitationen (Herzstolpern) oder Schwindel hervorgerufen werden kann.⁷³ Außerdem führt die schnelle atriale Aktivierung zum Verlust einer koordinierten und effektiven Vorhofkontraktion, was hämodynamisch mit einer verminderten Strömungsgeschwindigkeit im Vorhof bis hin zur Stase einhergeht. Diese hämodynamischen Veränderungen begünstigen die Thrombusbildung im Vorhof und stellen somit einen erheblichen Risikofaktor für thromboembolische Komplikationen wie den ischämischen Schlaganfall dar.⁷³

Elektrokardiographisch kennzeichnend für VHF sind das Fehlen einer sichtbaren P-Welle sowie unregelmäßige Abstände der R-Zacken⁶⁰ (vgl. *Abbildung 2: Beispiel Ratten-EKGs*).

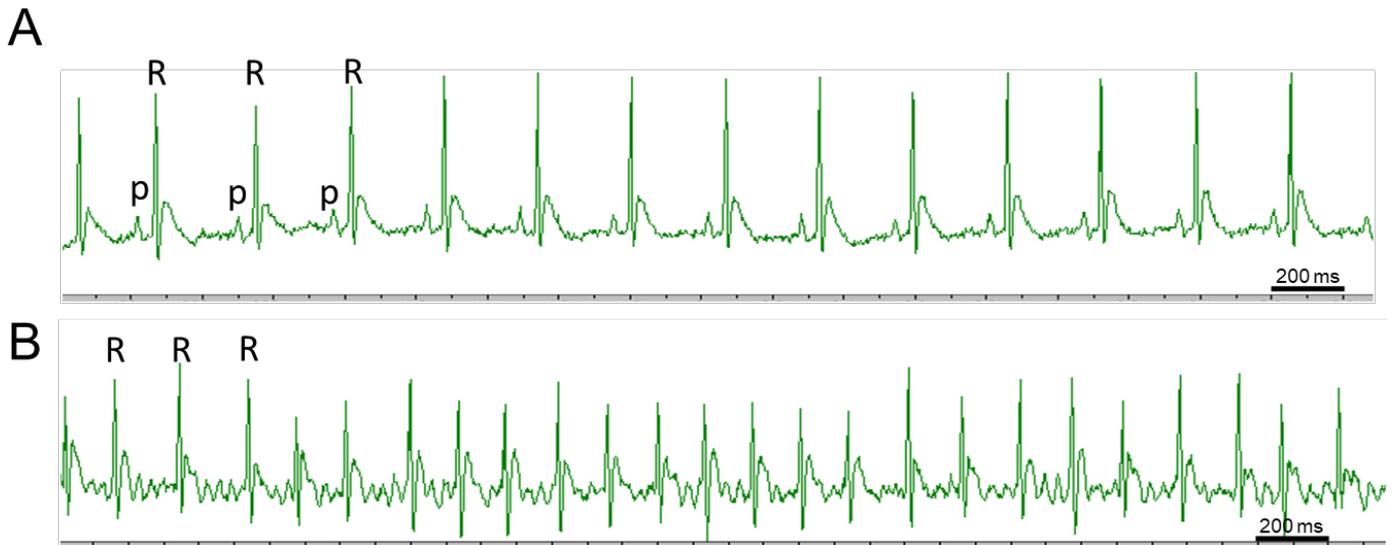


Abbildung 2: Beispiel Ratten-EKGs

A: Repräsentativer Ausschnitt eines physiologischen Ratten-EKGs mit sichtbaren P-Welle und regelmäßigen R-R-Abständen

B: Repräsentativer Ausschnitt einer Episode von VHF im EKG niereninsuffizienter Ratten nach transösophagealer Stimulation mit fehlenden P-Wellen und unregelmäßigen R-R-Abständen (unpublizierte Daten Wintrich/Hohl)

Pathophysiologisch an der Entstehung von VHF beteiligt sind sowohl ein sog. „Trigger“, der die Arrhythmie auslöst, als auch ein Substrat, das zur Aufrechterhaltung beiträgt.¹¹⁸

Trigger stellen dabei schnelle ektope elektrische Entladungen dar, die meist aus dem Bereich der Einmündung der Pulmonalvenen in den linken Vorhof stammen.³⁹ Als führende Mechanismen der Auslösung atrialer ektope Erregungen gelten Veränderungen des Calciumhaushalts der Kardiomyozyten mit vorzeitiger Freisetzung von Calciumionen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum, die in frühen oder späten Nachdepolarisationen resultieren können.¹¹³ Das Substrat ist das Ergebnis atrialer Remodelingprozesse, die das Vorhofmyokard vulnerabel für die Ausbildung von Re-Entry-Kreisläufen machen und somit die Entstehung von VHF begünstigen und unterhalten (vgl. *Abbildung 3: Atriale Remodelingprozesse*). Das Phänomen des Re-Entrys kann dann entstehen, wenn zuvor erregtes Herzmuskelgewebe bei erneutem Eintreffen der Erregungsfront bereits nicht mehr refraktär ist. Dieser Zustand wird durch eine kurze Refraktärperiode und eine langsame Erregungsleitungsgeschwindigkeit ermöglicht.⁹⁰

Elektrisches Remodeling zeigt sich bereits früh und schon nach kurzer Dauer des VHF (innerhalb von 24 h).¹¹⁹ Der führende Mechanismus ist dabei die Verkürzung der atrialen Refraktärzeit, wodurch das Vorhofmyokard nach vorausgegangenem elektrischen Impuls vorzeitig seine Erregbarkeit zurückerlangt und vulnerabel für die Entstehung von Re-Entry-Kreisläufen wird.⁹⁰

Als zentraler struktureller Remodelingprozess gilt neben der atrialen Dilatation durch Druck- oder Volumenbelastung die atriale Fibrose.⁹⁰ Ursächlich hierfür ist die verstärkte Stimulation

atrialer Fibroblasten zur Bildung extrazellulärer Matrix. Dies führt zu einer Vermehrung von zwischen den Kardiomyozyten gelegenen Kollagenfasern mit daraus folgender stärkerer Separation der Myozyten und Störung der Zell-Zell-Kontakte.⁹⁰ Der Stimulation zur vermehrten Fibrosebildung liegen dabei verschiedene Mechanismen zugrunde. Für die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteronsystems wurden sowohl durch Aldosteron als auch durch Angiotensin II (via AT₁-Rezeptor) profibrotische Effekte beschrieben.¹⁵ Auch inflammatorische Zustände und oxidativer Stress sind an der Entstehung atrialer Fibrose beteiligt.

Darüber hinaus kommt auch der Hypertrophie atrialer Kardiomyozyten als Bestandteil des strukturellen Remodelings eine Rolle bei der Entstehung eines arrhythmogenen Substrats zu (vgl. *Abbildung 3: Atriale Remodelingprozesse*). Die Größenzunahme der Myozyten geht mit veränderten Leitungseigenschaften des Myokards im Sinne einer inhomogenen Erregungsleitung einher.⁹⁰

Auch Veränderungen in der Connexin-Expression und -Verteilung wurden als mögliche Mechanismen, die zu gestörter Erregungsweiterleitung bei VHF führen, beschrieben. Connexine stellen die molekularen Bausteine der Kommunikationskontakte (Gap junctions) zwischen Kardiomyozyten dar, die die Erregungsausbreitung im Vorhof ermöglichen. Während diese Transmembranproteine unter physiologischen Bedingungen vorwiegend an den Zellpolen exprimiert werden, könnte eine verstärkte Lateralisation der Connexine oder deren erhöhte Expression zu Erregungsleitungsstörungen bei VHF beitragen (vgl. *Abbildung 3: Atriale Remodelingprozesse*).⁹⁰

Weiterhin spielt auch die autonome Innervation eine Rolle in der Pathogenese von VHF und scheint sowohl an der Entstehung eines Triggers als auch eines atrialen arrhythmogenen Substrats beteiligt zu sein. Sympathische Aktivierung von β -Adrenorezeptoren der Kardiomyozyten führt durch Phosphorylierung von L-Typ-Ca²⁺-Kanälen zum verstärkten Calciumeinstrom in die Zelle und in Folge dessen zu vermehrter Calcium-getriggelter Calcium-Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum, was die Entstehung ektooper Entladungen durch späte Nachdepolarisationen begünstigt. Der Bereich der Mündung der Pulmonalvenen in den linken Vorhof zeigt eine reichliche autonome Innervation, was seine Bedeutung als häufiger Ursprungort ektooper Erregungen begründen könnte.⁵⁹ Darüber hinaus führt die sympathische Stimulation durch verstärkte neurohumorale Aktivierung zu strukturellen Remodelingprozessen im Vorhof, die zur Entstehung eines arrhythmogenen Substrats beitragen. So können durch Sympathikus-vermittelte Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteronsystems fibrotische Umbauprozesse im linken Vorhof ausgelöst werden.⁵⁵ Tierexperimentell konnte die Rolle der autonomen Innervation in der Entstehung atrialer Arrhythmien bestätigt werden. So wurde beispielsweise eine sympathische Überaktivität im Vorhof von Hunden mit durch atriales Pacing induziertem VHF beschrieben.⁴⁷

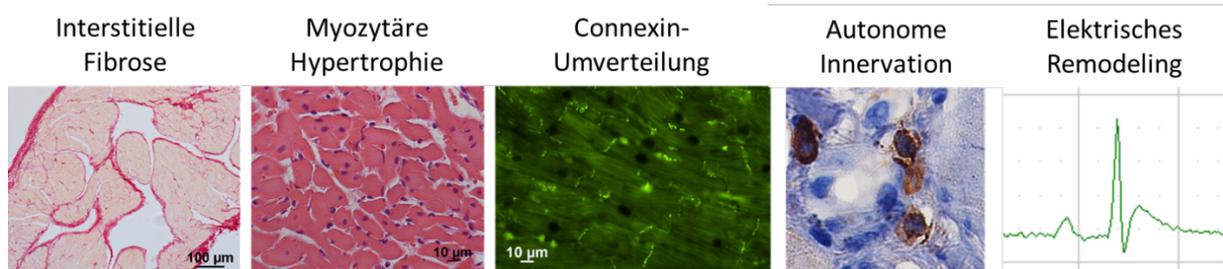


Abbildung 3: Atriale Remodelingprozesse

An der Entstehung eines arrhythmogenen Substrats beteiligte Mechanismen umfassen strukturelle Umbauprozesse wie die Bildung interstitieller Fibrose, Hypertrophie der Kardiomyozyten und Umverteilung der Connexin-Expression, elektrische Remodeling in Form veränderter Erregungsbildung/-leitung sowie verstärkte autonome Innervation des linken Vorhofs. (unpublizierte Daten Hohl/Lehnert; Linz et al.)

Durch Untersuchungen im Tiermodell konnte außerdem gezeigt werden, dass auch VHF selbst Auswirkungen auf die Entstehung eines Substrates hat und dessen Progress fördert.¹¹⁹ Während im strukturell unauffälligen Vorhof zunächst nur kurze Episoden paroxysmalen VHF auftreten, kommt es mit zunehmender Häufigkeit der Episoden zu strukturellen Veränderungen mit daraus resultierenden immer länger andauernden Flimmerepisoden. Daraus lässt sich die klinische Beobachtung des progressiven Verlaufs von paroxysmalem über persistierendem zu permanentem VHF erklären.⁹⁰

2.2.2 Klinik

Die klinische Präsentation des VHF ist variabel. Während einige Patient*innen über Beschwerden wie Palpitationen, Dyspnoe, Leistungsminderung, Schwindel, Angina pectoris oder Synkopen mit erheblicher Beeinträchtigung der Lebensqualität klagen, verläuft die Herzrhythmusstörung für einen Teil der Patient*innen völlig asymptomatisch.¹⁰⁰ So kann in manchen Fällen beispielsweise ein ischämischer Schlaganfall als Komplikation des VHF zur Erstdiagnose führen.⁶⁰

Nach Dauer der jeweiligen Episoden wird VHF klinisch in verschiedene Subtypen eingeteilt: Paroxysmales VHF verläuft selbstlimitierend und konvertiert spontan meist innerhalb von 48 Stunden (maximal 7 Tage) in den Sinusrhythmus. Dauert die Episode länger als 7 Tage an, liegt persistierendes VHF vor. Dabei erfolgt die Rückkehr in den Sinusrhythmus entweder spontan oder durch elektrische oder pharmakologische Kardioversion. Hält das VHF länger als ein Jahr an bis zur Entscheidung bzgl. einer Therapie zur Rhythmuskontrolle, spricht man von langanhaltendem persistierendem VHF. Unter permanentem VHF versteht man einen Zustand, bei dem keine erfolgreiche Konversion in Sinusrhythmus erzielt werden kann. Die

anhaltende Arrhythmie wird von Patient und Arzt akzeptiert und kein weiterer Versuch der Kardioversion unternommen.⁶⁰

2.2.3 Therapie

Die Therapie des VHF setzt sich aus den essenziellen Bestandteilen Antikoagulation, Behandlung der Symptome durch Frequenz- und Rhythmuskontrolle sowie Einstellung der kardiovaskulären Risikofaktoren und Behandlung von Komorbiditäten zusammen.⁴³

Aufgrund des erheblich erhöhten Risikos thromboembolischer Ereignisse mit dem ischämischen Schlaganfall als häufigste und schwerwiegendste Komplikation gilt es, durch Risikoabwägung zu prüfen, ob die Einleitung einer Antikoagulation indiziert ist. Zur Einschätzung des Risikos wird der CHA₂DS₂-VASc-Score herangezogen. Der Name des „Scores“ setzt sich als Akronym aus den Anfangsbuchstaben der in die Berechnung einfließenden Risikofaktoren **C**ongestive heart failure, **H**ypertension, **A**ge ≥75 years, **D**iabetes mellitus, **S**troke, **V**ascular disease, **A**ge 65-74 years, **S**ex category (female) zusammen. Dabei werden für jeden auf den*die Patient*in zutreffenden Faktor jeweils ein Punkt, für Alter ≥ 75 (Age ≥ 75) und Schlaganfall in der Vorgeschichte (Stroke) jeweils 2 Punkte vergeben. Die Punktzahlen der einzelnen Kategorien werden zu einem Score addiert. Bei einem errechneten Wert von 0 Punkten bei Männern bzw. 1 bei Frauen (kein Risikofaktor erfüllt außer Geschlecht) ist das Schlaganfallrisiko gering (< 1 %/Jahr) und es sollte keine Antikoagulation zur Schlaganfallprophylaxe durchgeführt werden. Bei Erfüllen eines nicht-geschlechtsspezifischen Risikofaktors (1 Punkt bei Männern, 2 Punkte bei Frauen) kann nach individueller Risiko-Nutzen-Abwägung eine Antikoagulation erwogen werden. Ab einer Punktzahl von ≥ 2 bei Männern bzw. ≥ 3 bei Frauen ist eine Antikoagulation zur Schlaganfallprophylaxe einzuleiten. Diese sollte unter Verwendung von Vitamin-K Antagonisten oder Nicht-Vitamin-K-Antagonist oralen Antikoagulation (NOAC) erfolgen.⁴³

Die Behandlung der Symptome des VHF umfasst die beiden Ansätze Frequenz- und Rhythmuskontrolle. Durch den Einsatz bradykardisierender Medikamente sollen die durch tachykarde ventrikuläre Frequenzen ausgelösten Symptome wie Palpitationen reduziert werden. Geeignete Medikamente sind β-Blocker, die Kalzium-Kanal-Blocker vom nicht-Dihydropyridin-Typ Verapamil und Diltiazem sowie Digoxin.⁴³ Über eine anzustrebende Zielfrequenz herrscht bislang Uneinigkeit. In verschiedenen Studien konnte kein Vorteil einer strikten Frequenzkontrolle (< 80/min) gegenüber einer moderateren (< 110/min) gezeigt werden.^{43,109,108}

Die Strategie der Rhythmuskontrolle dient der Wiederherstellung und Aufrechterhaltung des Sinusrhythmus zur Symptomreduktion und Verbesserung der Lebensqualität bei symptomatischen Patienten*innen. Sie umfasst elektrische bzw. pharmakologische

Kardioversion, antiarrhythmische Langzeitmedikation sowie die Katheterablation. Die Konversion in den Sinusrhythmus kann mittels elektrischer oder pharmakologischer Kardioversion erzielt werden. Bei hämodynamisch instabilen Patient*innen ist die elektrische Kardioversion aufgrund größerer Effektivität und unmittelbarer Wirkung der pharmakologischen vorzuziehen.^{60,43} Zur elektiven Kardioversion bei hämodynamisch stabilen Patienten*innen können beide Formen erwogen werden, wobei die Erfolgsrate bei länger bestehendem VHF für die pharmakologische Kardioversion geringer ist als für die elektrische.⁶⁰ Als antiarrhythmische Pharmaka werden z.B. Flecainid, Propafenon, Vernakalant oder Amiodaron eingesetzt.⁴³ Zwischen den beiden Therapiestrategien Frequenz- und Rhythmuskontrolle konnte in Studien kein Unterschied bzgl. der Endpunkte Morbidität, Mortalität und dem Auftreten von Schlaganfällen verzeichnet werden.^{60,17}

Zur Aufrechterhaltung des Sinusrhythmus und zur Prävention erneuter Episoden von VHF kann eine Katheterablation, mit der Pulmonalvenenisolation (PVI) als häufigste Form, durchgeführt werden. Dabei wird das Ursprungsareal der ektope hochfrequenten Erregung, meist ein um die Pulmonalvenen-Ostien gelegener Bereich des linken Vorhofs, durch Katheter-gestützte Verödung der umgebenden Muskelstränge mittels Radiofrequenz- oder Kryoablation elektrisch isoliert.^{43,60} In klinischen Studien konnte ein Vorteil der Katheterablation hinsichtlich Symptomreduktion, Aufrechterhaltung des Sinusrhythmus sowie Verbesserung der Lebensqualität verglichen mit der medikamentösen Therapie gezeigt werden,^{43,46} die Mortalität konnte jedoch durch Katheterablation nicht signifikant reduziert werden.^{43,78} Lediglich in einer Gruppe von Patient*innen mit Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion (HFrEF) ergab sich eine reduzierte Mortalität und Hospitalisierungsrate in der ablatierten Gruppe.^{43,67} Trotz der Überlegenheit der Katheterablation gegenüber den anderen Verfahren kann auch hiermit durch Reinnervation der Pulmonalvenen oftmals keine langfristige Aufrechterhaltung des Sinusrhythmus erzielt werden und es kommt zur Rekurrenz des VHF.^{43,59} So beträgt die Rekurrenzrate nach einmaliger Prozedur ca. 47 %.³⁶ Für Patient*innen mit persistierendem bzw. langanhaltendem persistierendem VHF ist diese dabei höher als für Patient*innen mit paroxysmalem VHF.¹⁶ Darüber hinaus ist die Reduktion kardiovaskulärer Risikofaktoren sowie die Behandlung von Komorbiditäten obligater Bestandteil der Therapie von VHF, da diese durch Unterstützung atrialer Remodelingprozesse maßgeblich an der Entstehung und Progression von VHF beteiligt sind.⁴³

2.2.4 CKD und VHF

Gemeinsame Risikofaktoren wie arterielle Hypertonie und Diabetes mellitus, die weltweit hohe und steigende Prävalenz beider Erkrankungen sowie das häufige Auftreten in Komorbidität

lassen erkennen, dass CKD und VHF zwei eng miteinander in Verbindung stehende pathophysiologische Zustände darstellen.²⁵

VHF ist bei CKD-Patient*innen zwei- bis dreimal so häufig wie in der Normalbevölkerung und führt zu einer drastischen Erhöhung der Mortalität in dieser Patientengruppe, was die Notwendigkeit adäquater Therapieverfahren deutlich macht.^{79,97} Durch nur begrenzten Erfolg, zahlreiche Nebenwirkungen und daraus resultierend fehlender Compliance bei der pharmakologischen Therapie sowie hohen Rezidivraten von VHF nach Katheterablation erweisen sich die bisherigen Therapiemöglichkeiten von VHF als unzureichend. Daher liegt das Ziel aktueller Bestrebungen darin, die pathophysiologischen Mechanismen, die zur erhöhten Vulnerabilität für VHF bei CKD-Patient*innen beitragen, aufzudecken, um dadurch neue, gezielte Therapieverfahren entwickeln zu können.

2.3 Oxidativer Stress und anti-oxidative Abwehrmechanismen

Oxidativer Stress ist definiert als Ungleichgewicht zwischen oxidativen Prozessen und den anti-oxidativen Mechanismen eines Organismus mit übermäßiger Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und unzureichenden körpereigenen Abwehrmechanismen.^{94,10}

Unter ROS werden Sauerstoffverbindungen zusammengefasst, die durch Reduktion aus molekularem Sauerstoff (O_2) entstehen und durch ihre hohe Reaktivität gekennzeichnet sind. Dazu zählen einerseits freie Radikale, d.h. Teilchen mit mindestens einem ungepaarten Valenzelektron (= Elektron der äußersten Schale), aber auch Nichtradikale, die leicht in radikalische Verbindungen umgewandelt werden können.⁹⁴ Zu den wichtigsten radikalischen Vertretern der ROS zählen Superoxid-Anionen ($O_2^{\cdot-}$) und Hydroxyl-Radikale (HO^{\cdot}), als nicht-radikalische Verbindung im Zellstoffwechsel ist besonders Wasserstoffperoxid (H_2O_2) von Bedeutung.¹⁰

Freie Radikale sind hochreaktiv und streben danach, mit ihrem ungepaarten Valenzelektron unter Bildung einer kovalenten Bindung mit einem weiteren Radikal zu reagieren. Durch die Reaktion beider ungepaarten Elektronen entsteht dabei eine nichtradikalische Verbindung. Durch die weitaus größere Anzahl nichtradikalischer gegenüber radikalischer Verbindungen in biologischen Organismen kommt es jedoch häufig zur Ausbildung einer Kettenreaktion, indem ein freies Radikal mit einem Nichtradikal unter Bildung eines neuen Radikals reagiert.²⁰ Mechanistisch liegt hier der Angriff des freien Elektrons des Radikals auf die kovalente Bindung eines Nichtradikals zugrunde, wobei die Bindung aufgebrochen wird und ein neues freies Radikal entsteht, das nun seinerseits weiterreagieren kann.

ROS sind nicht zwingend zellschädigend. Unter aeroben Bedingungen fallen physiologischerweise im Zellmetabolismus ROS in geringen Konzentrationen an und fungieren als sog. „second messenger“ - Moleküle in Signaltransduktionswegen. Kommt es jedoch zur übermäßigen Bildung dieser hochreaktiven Sauerstoffderivate oder sind die körpereigenen Abwehrmechanismen unzureichend, resultieren Zell- und Gewebeschäden durch Oxidation biologischer Moleküle wie Proteine, Lipide und der DNA.^{10, 20, 61}

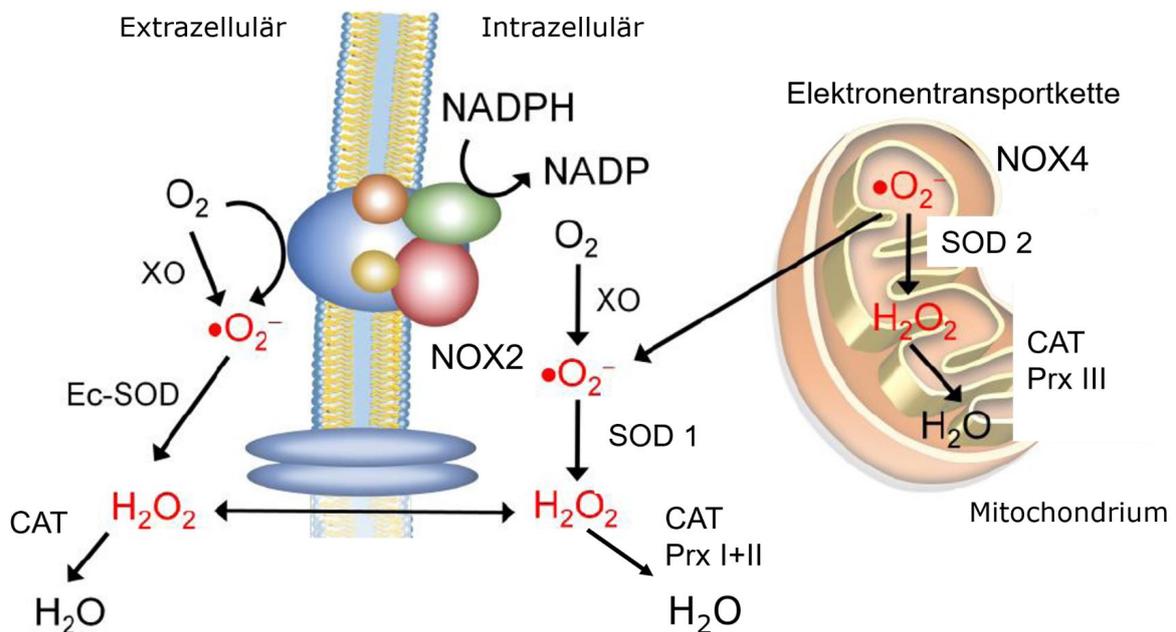


Abbildung 4: Mechanismen der Entstehung und Abwehr oxidativen Stresses und deren Lokalisation im Organismus

Die Hauptquellen reaktiver Sauerstoffspezies im Organismus sind die mitochondriale Atmungskette, das membranständige Enzym NADPH-Oxidase (Nox) und das die beiden letzten Schritte des Purin-Abbaus katalysierende Enzym Xanthin-Oxidase (XO). Dem gegenüber stehen endogene Abwehrmechanismen, die freie Radikale abfangen und zu unschädlichen Produkten umsetzen. Dazu zählen insbesondere die Enzyme Superoxid-Dismutase (verschiedene Isoformen je nach Lokalisation, SOD), Catalase (CAT) und Peroxiredoxine (Prx). (modifiziert nach: Fernando V et al., *Antioxidants* 2019,8,404)

Die wichtigsten endogenen Quellen reaktiver Sauerstoffspezies sind die mitochondriale Elektronentransportkette (Atmungskette) sowie die Enzyme NADPH-Oxidase (Nox) und Xanthin-Oxidase (XO) (vgl. *Abbildung 4*).^{10, 20}

Durch die in der inneren Mitochondrienmembran lokalisierte Atmungskette werden schrittweise Elektronen von den im Stoffwechsel anfallenden reduzierten Co-faktoren NAD(P)H und FADH₂ von Komplex zu Komplex und schließlich auf molekularen Sauerstoff übertragen, der unter Bildung von ATP zu Wasser reduziert wird. An Komplex I und III kann es jedoch durch unvollständige Elektronenübertragung und Leckagebildung zur direkten Reduktion von Sauerstoff kommen, wobei ROS, v.a. Superoxid-Anionen, entstehen.²⁰

Weitere wichtige Produzenten reaktiver Sauerstoffspezies im Körper sind die Isoenzyme der Familie der NADPH-Oxidasen. Alle Mitglieder dieser Enzymfamilie sind Transmembranproteine, die unter Verwendung von NADPH als Elektronendonator

molekularen Sauerstoff zu Superoxid-Anionen reduzieren.²⁰ Sie kommen in der Zellmembran, aber auch in den die intrazellulären Kompartimente umgebenden Membranen vor.¹¹⁴ Prototyp der NADPH-Oxidasen ist Nox 2, die besonders stark in Phagozyten exprimiert wird, wo sie die Bildung von ROS im Dienste des „respiratory burst“ zur Pathogenabwehr katalysiert. Sie kommt aber auch in vielen anderen Zellen wie z.B. in Kardiomyozyten und renalen Tubuluszellen vor.⁷ Die in der Niere und im Gefäßsystem vorherrschende Isoform ist Nox 4, die in renalen Tubuluszellen, Fibroblasten, glomerulären Mesangiumzellen und Podozyten sowie im Gefäßsystem in Endothelzellen und Fibroblasten nachgewiesen wurde.²⁰

Eine weitere endogene Quelle reaktiver Sauerstoffspezies ist der Purinstoffwechsel. Die letzten beiden Schritte des Abbaus der Purinbasen, die Oxidation von Hypoxanthin zu Xanthin sowie von Xanthin zu Harnsäure (Urat), werden von dem Enzym Xanthinoxidoreduktase katalysiert. Dieses Enzym kann in zwei Funktionszuständen arbeiten: Unter physiologischen Bedingungen funktioniert das Enzym vorwiegend als Xanthindehydrogenase unter Verwendung des Co-Faktors NAD^+ , der unter Bildung von Xanthin bzw. Urat zu $\text{NADH} + \text{H}^+$ reduziert wird. Im Zuge inflammatorischer Prozesse kommt es durch posttranslationale Modifikation zur Umwandlung des Enzyms in die Xanthin-Oxidase, die unter Bildung von Superoxid-Anionen molekularen Sauerstoff als primären Elektronenakzeptor verwendet.²⁰

Superoxid-Anionen sind die primären im Stoffwechsel entstehenden ROS. Durch Reaktion mit H^+ -Ionen entsteht H_2O_2 , das in Gegenwart von Metall-Ionen wie Fe^{2+} oder Cu^{2+} das hochreaktive Hydroxylradikal bilden kann. Hydroxylradikale sind die stärksten Oxidationsmittel und reaktivsten Vertreter der ROS und können durch Oxidation von Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren zu erheblichen Zellschäden führen.¹⁰

Zum Schutz vor oxidativem Stress verfügt der Körper über enzymatische Abwehrmechanismen. Diese unterbrechen die Kettenreaktion der Bildung von ROS, indem sie diese zu stabileren, unschädlicheren Produkten umsetzen und dabei selbst oxidiert werden.²⁰ Durch Reduktionsmittel wie z.B. NADPH werden die Enzyme wieder regeneriert und in ihren ursprünglichen Funktionszustand überführt.¹⁰

Dabei unterscheidet man zwischen konstitutionell aktiven Enzymen (z.B. SOD, CAT, Prx), die zur Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen oxidativen und anti-oxidativen Molekülen beitragen, und solchen, deren Expression zur Kompensation bei verstärktem oxidativen Stress und Inflammation durch Transkriptionsfaktoren induziert wird (z.B. HO-1).²⁰

Eine Schlüsselrolle und den ersten Reaktionsschritt in der Abwehr oxidativen Stresses bildet das Enzym Superoxid-Dismutase, das die primären im Stoffwechsel anfallenden freien Radikale, die Superoxid-Anionen, in einer Disproportionierungsreaktion (= Dismutation, Umwandlung in ein Teilchen höherer und eines niedrigerer Oxidationszahl) zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff umsetzt.^{20,114} Je nach metallischem Co-Faktor und

Lokalisation kommt das Enzym in Säugetieren in drei verschiedenen Isoformen vor: Cu/Zn-SODs werden als SOD 1 vorwiegend im Cytoplasma und als SOD 3 (Ec-SOD) extrazellulär exprimiert, in der mitochondrialen Matrix ist die Mn-SOD SOD 2 lokalisiert (vgl. *Abbildung 4*).¹¹⁴

Anfallendes Wasserstoffperoxid wird durch das Enzym Catalase entgiftet, das durch Redox-Disproportionierung Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff umsetzt.²⁰

Eine wichtige Rolle in der Elimination von Wasserstoffperoxid und organischen Hydroperoxiden (R-OOH) im Körper nehmen auch die ubiquitär vorkommenden Vertreter der Enzymfamilie der Peroxiredoxine ein.^{85,80,84} Allen Enzymen dieser Familie gemeinsam ist das Vorkommen der Aminosäure Cystein in ihrem aktiven Zentrum. An diesem Cystein-Rest werden die Enzyme während des katalytischen Zyklus durch Peroxide zu Sulfensäure oxidiert, wobei die organischen Peroxide zum betreffenden Alkohol (R-OH) bzw. Wasserstoffperoxid zu Wasser reduziert werden. Der oxidierte Cystein-Rest reagiert im nächsten Schritt mit einem weiteren intramolekularen Cystein-Rest unter Ausbildung einer Disulfidbrücke, wobei Wasser abgespalten wird. Um das Enzym wieder in die reduzierte Form zu überführen, wird die entstandene Disulfidbrücke durch ein Reduktionsmittel, meist Thioredoxin (Trx), gespalten.^{85,80,84} Die Isoformen Prx I und II werden hauptsächlich cytosolisch exprimiert, Prx III kommt ausschließlich mitochondrial vor.⁸⁵

Über diese das Redox-Gleichgewicht der Zelle aufrechterhaltenden Enzyme hinaus können im Falle erhöhten oxidativen Stresses oder Inflammation unter Wirkung bestimmter Transkriptionsfaktoren spezielle anti-oxidative sog. ARE- (= antioxidant response element) gesteuerte Enzyme induziert und deren Expression gesteigert werden.²⁰ Durch Bindung des Transkriptionsfaktors Nrf2 an AREs, d.h. DNA-Sequenzen im Bereich des Promotors für diese Enzyme kodierender Gene, wird die Transkription dieser Gene gesteigert und damit die Enzymexpression induziert.²⁰ Ein Vertreter dieser Gruppe ist die Hämoxxygenase 1 (HO-1). Hämoxxygenasen katalysieren den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des Abbaus von Häm zu Biliverdin, Kohlenstoffmonoxid (CO) und freien Eisen-Ionen (Fe^{2+}). Die Stress-induzierte Isoform dieses Enzyms ist HO-1. Seine anti-oxidative Wirkung vermittelt HO-1 einerseits durch den Abbau der Häm-Gruppe funktionsloser Häm-haltiger Enzyme^{1,72}, aber auch durch die anti-oxidative Wirkung der bei dieser Reaktion entstehenden Produkte. Biliverdin wird weiter zu Bilirubin abgebaut, das selbst ROS abfängt und die NADPH-Oxidasen als ROS-produzierende Enzyme hemmt. CO schützt vor ROS, indem es anti-oxidative Mechanismen, z.B. die Bereitstellung von Glutathion, durch Induktion der Expression betreffender Gene fördert.¹

2.4 Renale Denervation

Die renale Denervation (RDN) ist ein interventionelles Verfahren zur Modulation der afferenten und efferenten sympathischen Innervation der Niere und des systemischen Sympathikotonus. Viele chronische Erkrankungen wie arterielle Hypertonie, Herzinsuffizienz, Vorhofflimmern, CKD, obstruktive Schlafapnoe oder das metabolische Syndrom gehen mit einer erhöhten sympathischen Nervenaktivität einher. Daher kommt der RDN als mögliches zielgerichtetes Therapieverfahren zur Behandlung dieser pathophysiologischen Zustände zunehmende Bedeutung zu. Die RDN rückt damit mehr und mehr ins Interesse aktueller Forschung.⁵⁵

In der klinischen Praxis findet die RDN als katherterbasiertes minimal-invasives Verfahren Anwendung. Über einen Gefäßzugang in der Arteria femoralis wird in Analgosedierung ein Ablationskatheter über die Aorta abdominalis in die Nierenarterien vorgeschoben (vgl. *Abbildung 5: Kathetergestützte renale Denervation*). Durch zielgerichtete transmurale Abgabe kurzer Radiofrequenzenergieimpulse kommt es zu einer lokalen Wärmeentwicklung, die eine Verödung der in der Adventitia der Nierenarterie verlaufenden Nervenfasern bewirkt. Dabei werden von distal nach proximal pro Gefäß mehrere Ablationspunkte (mindestens 4) im Abstand einiger Millimeter gewählt.⁶⁵ Die zunehmende Weiterentwicklung der Kathetersysteme ermöglicht heute nicht nur die Ablation der um das Hauptgefäß befindlichen Nervenfasern, sondern auch solcher entlang der weiteren Verzweigung der Nierenarterie, was die Effektivität des Verfahrens erhöht.⁵⁵ Neben der Radiofrequenzablation stehen zur RDN auch Ultraschall-basierte Verfahren oder die chemische Ablation zur Verfügung.⁶³

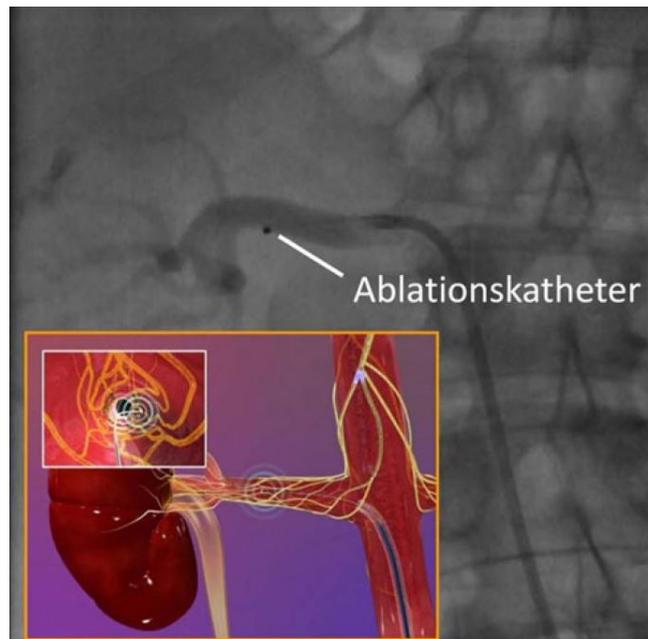


Abbildung 5: Kathetergestützte renale Denervation

Hintergrund: radiologisches Bild des Ablationskatheters in einer rechten Nierenarterie; Ausschnitt: Schematische Darstellung der Nierenarterie mit um sie befindlichem Geflecht sympathischer Nervenfasern; Kleiner Ausschnitt: Schematische Darstellung von intravasaler (Brandt MC et al., Renal sympathetic denervation, 2011, 36,10)

Aufgrund der zentralen Bedeutung der Niere und ihrer sympathischen Innervation für die Blutdruckregulation wird die RDN als Verfahren zur Behandlung der therapieresistenten Hypertonie eingesetzt. In klinischen Studien konnte eine signifikante Reduktion des systolischen und diastolischen Blutdrucks bei Patient*innen mit therapieresistenter Hypertonie gezeigt werden.^{53,31,11} Auch Hypertonie-assoziierte pathologische Folgezustände wie linksventrikuläre Hypertrophie oder diastolische Dysfunktion konnten erfolgreich auch blutdruckunabhängig verringert werden.⁸⁹ Auch im 3-Jahres-Follow-up zeigte sich das Verfahren als effektiv und sicher mit anhaltender Blutdruckreduktion und ohne Beeinträchtigung der Nierenfunktion.⁶⁴

Da das autonome Nervensystem auch eine bedeutende Rolle in der Entstehung und Aufrechterhaltung kardialer Arrhythmien wie Vorhofflimmern einnimmt, stellt sich zunehmend die Frage nach einer RDN als geeignetem zielgerichtetem Therapieverfahren dieser Erkrankungen, insbesondere VHF.^{55,59} Antiarrhythmische Effekte der RDN konnten bereits in verschiedenen Tiermodellen gezeigt werden^{56,58} und die Daten erster klinischer Studien berichten von einer verbesserten Aufrechterhaltung des Sinusrhythmus nach Pulmonalvenenisolation bei renal denervierten Patient*innen verglichen mit ausschließlich durch PVI-behandelten Patient*innen.⁸² Bei Patient*innen mit CKD konnte RDN das Wiederauftreten von paroxysmale VHF nach PVI reduzieren.⁵¹

2.5 Fragestellung und Ziele der Arbeit

Ziel der Arbeit war es, an einem Rattenmodell der Adenin-induzierten chronischen Nierenerkrankung (CKD) die pathophysiologischen Auswirkungen auf die Nierenfunktion zu charakterisieren, die daraus resultierenden atrialen Remodelingprozesse, die zu erhöhter Vulnerabilität für atriale Arrhythmien führen und die Rolle einer gesteigerten neurohumoralen Aktivierung dabei zu untersuchen. Im Einzelnen verfolgte diese Arbeit also drei wesentliche Ziele (vgl. *Abbildung 6: Ziele der Arbeit*):

- 1.) Charakterisierung der pathophysiologischen renalen Schädigungsmechanismen einer tubulären Nephropathie
- 2.) Untersuchung der Auswirkung einer chronischen Nierenerkrankung auf das kardiale Remodeling
- 3.) Untersuchung des Einflusses einer gesteigerten neurohumoralen Aktivierung auf die Nierenfunktion und die Progression des kardialen Remodelings durch Modulation des sympathischen Nervensystems mittels renaler Denervation (RDN)

Zu Ziel 1: Zunächst galt es, die Pathomechanismen der CKD näher zu charakterisieren. Hier lag der Fokus auf der Bedeutung von oxidativem Stress und der Frage, inwiefern eine chronische Nierenerkrankung mit Veränderungen in der Bildung und Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies einhergeht.

Zu Ziel 2: Im nächsten Schritt sollten CKD-bedingte Veränderungen des kardiovaskulären Systems aufgezeigt werden. Hier stellte sich in erster Linie die Frage nach Blutdruckveränderungen sowie elektrophysiologischen und strukturellen kardialen Remodelingprozessen, die die Entstehung von VHF begünstigen.

Zu Ziel 3: Um die Bedeutung einer gesteigerten neurohumoralen Aktivierung in der Pathogenese der CKD und der Bildung eines atrialen arrhythmogenen Substrats zu untersuchen, wurde der Fragestellung nachgegangen, inwiefern eine renale Denervation bei CKD durch Unterbrechung der afferenten und efferenten sympathischen Innervation der Niere einen protektiven Effekt auf Herz und Niere erzielen kann, d.h. ob durch renale Denervation einer progredienten Verschlechterung der Nierenfunktion vorgebeugt werden kann und kardiale Remodelingprozesse durch diese Intervention reversibel sind.

Zur Beantwortung dieser Fragestellung sollten im Rahmen dieser Arbeit zwei Tiermodelle zur Anwendung kommen:

In einer Interventionsgruppe erfolgte die renale Denervation als therapeutische Intervention nach bereits induzierter Nierenschädigung.

Um einen möglichen präventiven Effekt der renalen Denervation zu klären, wurde diese in einer Präventionsgruppe bereits vor Beginn der Induktion der Nephropathie durchgeführt.

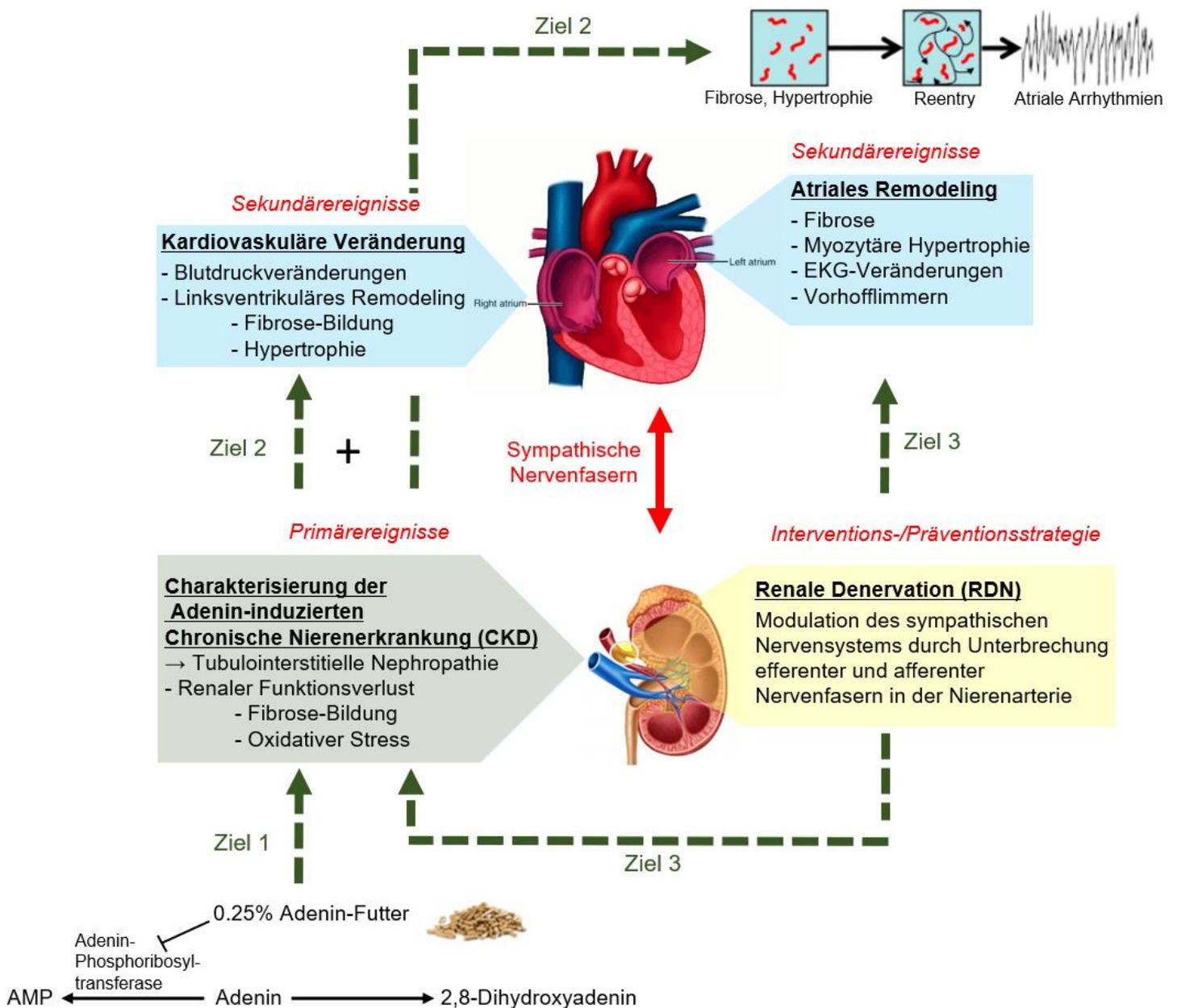


Abbildung 6: Ziele der Arbeit

3. Materialien und Methoden

3.1 Materialien

Geräte:

Abzug	ARGE Labor- und Objekteinrichtungen GmbH, Wathlingen, Deutschland
Chemilumineszenz-Imaging-System	peqlab Fusion SL, VILBER LOURMAT GmbH, Eberhardzell, Deutschland
Gewebeeinbettautomat	Excelsior, Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Heizblock	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Kühlzentrifuge	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mikroskop	Aperio Versa 8, Leica, Wetzlar, Deutschland
Mikrotom	RM 2255, Leica, Wetzlar, Deutschland
Photometer	DU 730 UV/Vis-Spectrophotometer, Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Schüttler	Polymax 1040, Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, Deutschland
Spannungsquelle	PowerPac HC, Biorad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, USA
Katheterbasierte Telemetrie	Data Sciences International (DSI), Saint Paul, MN, USA
Tischzentrifuge	VWR, Darmstadt, Deutschland
Überkopfschüttler	Tube rotator, VWR, Darmstadt, Deutschland
Ultraschallgerät	Branson Ultrasonics Sonifier, Danbury, Connecticut, USA

Vortex Mixer SN 41119030, Labnet international, Edison, USA

Waage CS, Ohaus GmbH, Gießen, Deutschland

Sonstiges Material:

Gelelektrophorese-Zubehör Mini PROTEAN Tetra Cell, Biorad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, USA

Pipetten Ergonomic High Performance Pipetten, VWR, Darmstadt, Deutschland

Tank Blot-System Mini Trans-Blot Cell, Biorad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, USA

Software:

Bildbearbeitung Gimp 2

Mikroskop Image Scope x64, Leica, Wetzlar, Deutschland

EKG Notocord hem evolution

Fibroseauswertung NIS Elements, Nikon Instruments Europe BV, Amsterdam, Niederlande

Katheterbasierte Telemetrie DSI Analyse Software, Data Sciences International (DSI), Saint Paul, MN, USA

Western Blot FusionCapt Advance peqlab, VWR, Darmstadt, Deutschland

Reaktionskits/Fertiglösungen

cOmplete Proteaseinhibitor Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland

ECL GE Healthcare, Freiburg, Deutschland

PhosStop Phosphataseinhibitor Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland

Picro-Siriusred	Morphisto, Frankfurt am Main, Deutschland
Ponceau rot	SERVA Elektrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Protein Assay Reagent A und B	Biorad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, USA
Proteinmarker III	VWR, Darmstadt, Deutschland
Rat NT-proBNP ELISA Kit MBS2509356	MyBioSource, San Diego, Kalifornien, USA

3.2 Methoden

3.2.1 Tiermodell

Um die pathophysiologischen Auswirkungen einer chronischen Niereninsuffizienz auf die neurohumorale Aktivierung und das kardiovaskuläre System zu modellieren, wurde ein Rattenmodell etabliert. Als Versuchstiere dienten insgesamt 53 acht Wochen alte männliche Sprague Dawley Ratten (SPRD, Charles River, Sulzfeld) mit einem Körpergewicht von ca. 250-300 g, die in zeitlich aufeinanderfolgenden Tiergruppen zu je vier pro Gruppe untersucht wurden. Während des Versuchsvorhabens wurden die Tiere je zu dritt bzw. viert in einem Käfig in den Räumlichkeiten der experimentellen Chirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes in Homburg gehalten. Futter und Trinkwasser wurde den Tieren im Überschuss zur Verfügung gestellt.

Zur Induktion der chronischen Nierenerkrankung wurde ein Spezialfutter bestehend aus 0.25% Adenin in normaler Haltungsdiät (Altromin #1324, Altromin Spezialfutter GmbH & Co.KG, Lage, Deutschland) herangezogen, das nachweislich zu einer Nierenschädigung in Form der sog. Adenin-Nephropathie führt.²⁷ Durch das Überangebot an Adenin kommt es dabei zur Substrathemmung des Enzyms Adenin-Phosphoribosyltransferase, das unter physiologischen Bedingungen im Rahmen des salvage pathways des Nukleotidstoffwechsels den Einbau der Purinbase Adenin in das entsprechende Nukleotid katalysiert. Stattdessen wird das überschüssige Adenin nun von dem Enzym Xanthin-Oxidase umgesetzt, das dessen Oxidation zu 2,8-Dihydroxyadenin katalysiert. 2,8-Dihydroxyadenin ist schwer löslich und bildet Präzipitate im Tubulussystem und im Nierenparenchym, wodurch Inflammations- und Fibrosierungsprozesse ausgelöst werden.^{30,32,12}

Das Tierversuchsvorhaben wurde vom saarländischen Landesamt für Verbraucherschutz genehmigt (Aktenzeichen: 35/2017). Alle Operationen wurden gemäß des Tierschutzgesetzes durch dafür qualifizierte medizinisch-technische Assistentinnen durchgeführt.

Versuchsablauf der verschiedenen Tiergruppen:

Interventionsgruppe

Die Ratten wurden im Alter von etwa 8 Wochen gekauft. Nach einer einwöchigen Akklimatisierungsphase in den Räumen der experimentellen Chirurgie erfolgte in sechs Tieren pro Gruppe die Implantation eines Telemetrie-Transmitters zur Blutdruck- und EKG-Messung.

Zwei Wochen nach Implantation des Telemetrie-Transmitters wurden die Versuchstiere in drei Gruppen aufgeteilt: eine Kontrollgruppe (Ko, n=10), die über 16 Wochen mit normalem Trockenfutter (Altromin Standard Haltungsdiät #1324) gefüttert wurde, eine Adenin-Gruppe (Ad, n=13), die ausschließlich das 0.25% Adenin-Futter erhielt und eine Adenin+RDN-Gruppe (Ad+RDN, n=15), bei der die Tiere ebenfalls mit 0.25% Adenin-Futter gefüttert wurden und die Tiere nach vier Wochen Adenin-Futter einer renalen Denervation unterzogen wurden. Um potentielle Verzerrungseffekte zu vermeiden und mögliche beobachtete Effekte der renalen Denervation tatsächlich auf die Intervention selbst und nicht etwa auf damit verbundene Manipulationen wie postoperative Inflammationsprozesse oder Infektionen nach dem Eröffnen des Bauchraumes zurückführen zu können, wurden die nicht-denervierten Tiere scheinoperiert. Diese Scheinprozedur verlief bis auf die Verödung der sympathischen Nervenfasern komplett analog zur Denervation. Es wurde ein Bauchschnitt durchgeführt, die Nierenarterien freigelegt, nach Reposition der Darmschlingen die Bauchdecke jedoch ohne jegliche Intervention wieder verschlossen (Sham-Operation).

Während der gesamten 16-wöchigen Versuchsdauer wurden die Tiere in regelmäßigen Abständen hinsichtlich verschiedener Parameter untersucht und überwacht: Wöchentlich erfolgte eine Blutdruckmessung mittels katheterbasierter Telemetrie über 22 h. Trink- und Futtermenge wurden dokumentiert und auch die Tiergewichte wurden wöchentlich bestimmt. Im 14-tägigen Rhythmus wurde den Tieren Blut entnommen und in Zusammenarbeit mit der Nephrologie Serum-Kreatinin und Harnstoff zur Überwachung der Nierenfunktion bestimmt. Zusätzlich wurde die Urinausscheidung der Tiere in sog. metabolischen Käfigen quantifiziert. Außerdem wurden die Tiere alle sechs Wochen echokardiographiert und die Nieren sonographisch untersucht. Nach 16 Wochen erfolgten die finalen Versuche, die elektrophysiologische Untersuchungen umfassten, und die Sektion. Post mortem wurden das Herz und beide Nieren für histologische und biochemische Untersuchungen entnommen und tiefgefroren (vgl. *Abbildung 7: Versuchsablauf Interventionsgruppe*).

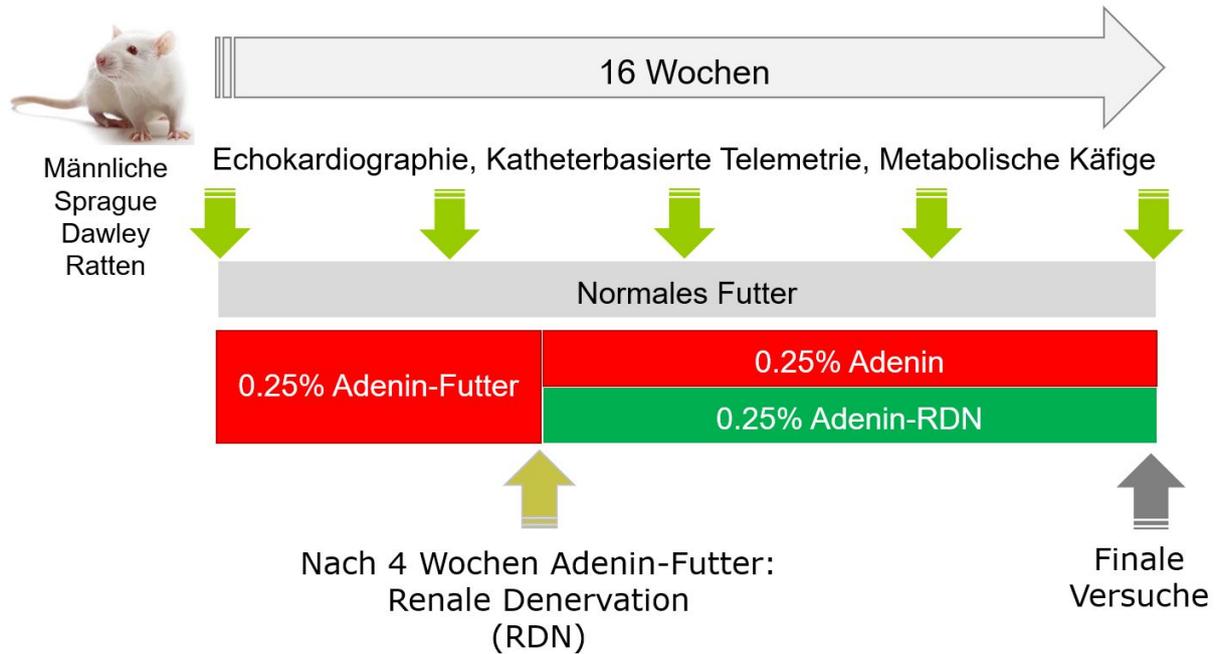


Abbildung 7: Versuchsablauf Interventionsgruppe

Präventionsgruppe

In einer zweiten Tiergruppe mit abgewandeltem Versuchsablauf sollte die Wirkung einer präventiv vor Induktion der Nierenschädigung durch Adenin-Futter durchgeführten renalen Denervation untersucht werden. Dazu wurden die Versuchstiere zwei Wochen nach Implantation des Telemetrie-Senders analog zum Versuchsaufbau der Interventionsgruppe ebenfalls in drei Gruppen aufgeteilt: eine Kontrollgruppe (Präv-Ko, n=4), eine Adenin-Gruppe (Präv-Ad, n=3) und eine Adenin+RDN-Gruppe (Präv-Ad+RDN, n=4). Nun erfolgte jedoch vor Beginn der Fütterung mit Adenin-haltiger Spezialnahrung bei den Tieren der Adenin+RDN-Gruppe zuerst die renale Denervation bzw. bei den Tieren der beiden anderen Gruppen eine Schein-Operation. Nach einer eineinhalb wöchigen postoperativen Erholungsphase wurde die Fütterung mit 0.25% Adenin-Futter für die Tiere der Adenin- und der Adenin+RDN-Gruppe begonnen. Die Kontrollgruppe erhielt weiterhin die normale Haltungsdiät. Futter-, Trinkmenge und Tiergewichte wurden wöchentlich dokumentiert und der Blutdruck mittels katheterbasierter Telemetrie gemessen. Auch in dieser Tiergruppe erfolgte alle 2 Wochen eine Blutentnahme zur Bestimmung der Nierenfunktionsparameter in Zusammenarbeit mit der Nephrologie und Urinuntersuchung mittels metabolischer Käfige sowie alle 6 Wochen eine Nierensonographie und Echokardiographie. Nach Ablauf der 16-wöchigen Versuchsdauer folgten die finalen elektrophysiologischen Untersuchungen und die Tiere wurden seziiert. Herz- und Nierengewebe wurden auch hier für histologische und biochemische Untersuchungen konserviert (vgl. *Abbildung 8: Versuchsablauf Präventionsgruppe*).

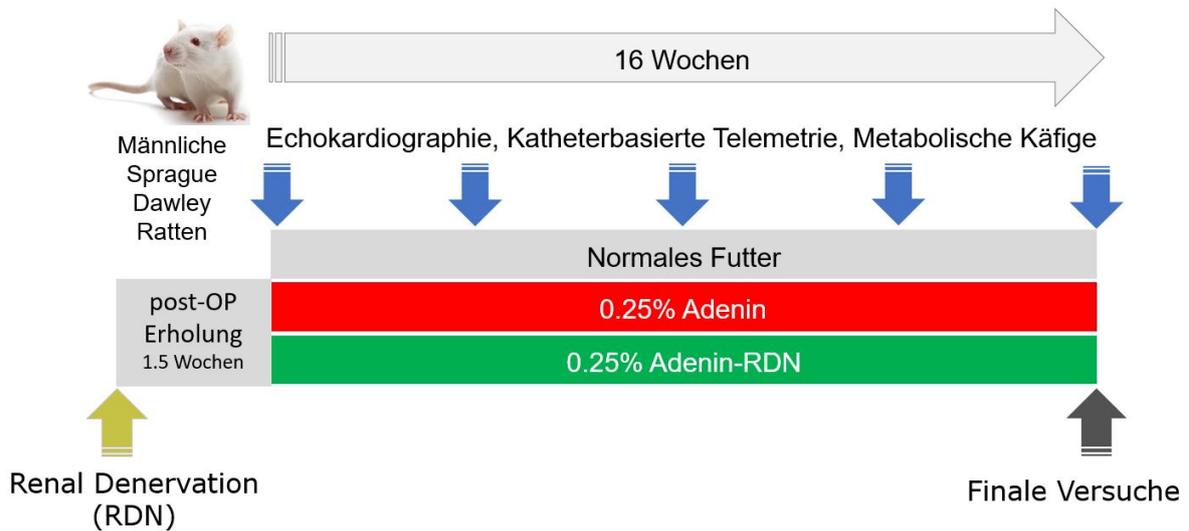


Abbildung 8: Versuchsablauf Präventionsgruppe

Katheterbasierte Telemetrie

Die katheterbasierte Telemetrie ist ein Verfahren, das eine kontinuierliche Blutdruckmessung mit drahtloser Datenübertragung und elektronischer Speicherung ermöglicht (Data Sciences International, DSI).

Zur Implantation des Telemetrie-Senders wurde über einen Bauchschnitt ein Katheter in die Aorta abdominalis eingebracht, mit dessen Hilfe der Systemdruck im Gefäß gemessen werden kann. Ein Plastikimplantat, welches die Batterie für den Sender enthielt, wurde subkutan im Bauchraum platziert. Die Operation erfolgte unter Isofluran-Narkose.



Abbildung 9: Telemetrie-Implantat von Data Sciences International (DSI)



Abbildung 10: Telemetrie-Stationen

Während der Blutdruckmessung wurden die Ratten in Käfigen auf den Empfängerstationen gehalten.

Renale Denervation

Die renale Denervation ist ein Verfahren zur Senkung des Sympathikotonus durch Verödung der im Bereich der Nierenarterien verlaufenden afferenten und efferenten sympathischen Nervenfasern. Da die Niere eine wichtige Rolle in der Kreislaufregulation einnimmt, steht sie über ein Nervengeflecht aus vegetativen Nervenfasern, dem sog. Plexus renalis, in Verbindung mit dem zentralen Nervensystem (ZNS). Dieser Plexus enthält sympathische postganglionäre Nervenfasern, die um die A. renalis in der Adventitia des Gefäßes verlaufen. Bei Stimulation des sympathischen Kreislaufzentrums im Hypothalamus und der Medulla oblongata werden an den sympathischen Nervenendigungen Katecholamine (v.a. Noradrenalin) freigesetzt, die in der Niere verschiedene Anpassungsreaktionen bewirken, die insgesamt das kardiovaskuläre System mit dem Ziel einer Blutdruckerhöhung verändern: Über eine Steigerung der Renin-Sekretion kommt es zu einer Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems und damit einhergehend zu einer gesteigerten Na^+ - und Wasserretention sowie Vasokonstriktion der Nierengefäße.^{22,24} Über afferente Nervenfasern werden gleichzeitig rückmeldend Informationen von Barorezeptoren des Nierenbeckens und der Gefäße über die Volumen- und Blutdrucksituation, aber auch von durch Urämietoxine oder oxidativen Stress stimulierten Chemorezeptoren ans ZNS weitergeleitet.^{23,96} Somit nimmt die Niere auch regulierend Einfluss auf den Sympathikotonus und die sympathische Innervation anderer Organsysteme.

Durch Unterbrechung der sympathischen Nervenverbindungen soll die Rolle der gesteigerten neurohumoralen Aktivierung bei CKD untersucht werden.

In unserem Tiermodell erfolgte die Denervation durch chirurgische und chemische Verödung. Der Eingriff wurde unter Isofluran-Narkose durchgeführt. Die Bauchdecke wurde längs eröffnet und die Darmschlingen zur besseren Sicht auf die Nierenarterien nach extraabdominal verlagert. Die Nierenarterien wurden freigelegt und mittels eines Wattestäbchens von umgebendem Fett befreit und sichtbare Nerven durchtrennt. Zur chemischen Verödung der in der Adventitia des Gefäßes verlaufenden sympathischen Nervenfasern wurde mit Hilfe eines Pinsels eine Lösung aus 20 % Phenol und 80 % Ethanol aufgetragen (vgl. *Abbildung 11: Renale Denervation im Rattenmodell*).

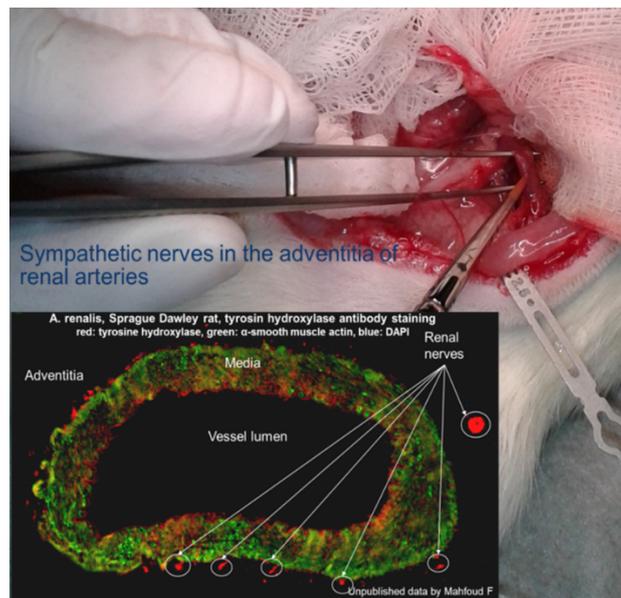


Abbildung 11: Renale Denervation im Rattenmodell

Großer Bildausschnitt: OP-Situs bei Denervation. Die A. renalis wird vom Abgang aus der Aorta bis zur Niere dargestellt und freipräpariert und die sympathischen Nervenfasern durch Aufträufeln von 20 % Phenol/Ethanol-Lösung verödet. Kleiner Bildausschnitt: Querschnitt der A. renalis und immunhistochemische Darstellung der sympathischen Nervenfasern durch Immunfärbung der TH (rot). Die sympathischen Nervenbahnen verlaufen als Geflecht in der Adventitia der Nierenarterie. (unpublizierte Daten Mahfoud; Linz et al.)

3.2.2 EKG

Im Rahmen der Terminalversuche wurde den Versuchstieren ein EKG abgeleitet und aufgezeichnet. Dazu wurde die Software Notocord hem evolution verwendet. Die EKG-Ableitung erfolgte unter Isofluran-Narkose. Zur Ableitung des Zweikanal-EKGs wurden zwei Elektroden subkutan an der Schulterregion einer Seite und am Hinterbein der kontralateralen Seite angebracht, wie in *Abbildung 12* dargestellt. Die Elektrodenposition wurde so gewählt, dass sich die P-Welle mit größtmöglicher Amplitude darstellte.

Die Auswertung der EKGs umfasste die Messung von P-Welle und PQ-Intervall (vgl. *Abbildung 13: Beispiel-EKG eines Versuchstiers*). Dazu wurden in jedem EKG 15 repräsentative Herzschläge ausgewählt und je die Dauer der P-Welle und des PQ-Intervalls in Millisekunden

ausgemessen. Aus den 15 Einzelmessungen wurde für jedes EKG der Mittelwert der P-Wellen-Dauer bzw. des PQ-Intervalls berechnet.

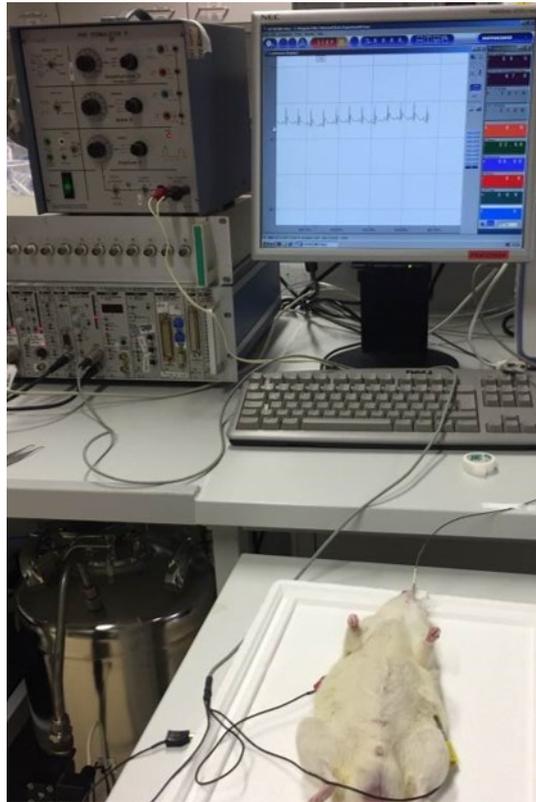


Abbildung 12: EKG-Ableitung

Über zwei subkutane Elektroden wird ein Zweikanal-EKG der narkotisierten Ratte abgeleitet.



Abbildung 13: Beispiel-EKG eines Versuchstiers
P-Welle und PQ-Intervall exemplarisch rot hinterlegt.

3.2.3 Western Blot

Der Western Blot ist ein Verfahren zum Nachweis und der Quantifizierung eines Proteins aus einem Proteingemisch. Dazu werden nacheinander verschiedene Arbeitsschritte durchlaufen: Zunächst werden die Proteine aus dem zu untersuchenden Gewebe isoliert und das

entstandene Proteingemisch elektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteinbanden werden dann im eigentlichen Blot auf eine Trägermembran transferiert. Mittels Antigen-Antikörperreaktion kann ein spezifisches Protein detektiert und analysiert werden.

Proteinisolation

Zur Gewebeauftrennung und Proteinisolation wurde für jede Probe ein 1.5 ml Eppendorfreagiergefäß mit 400 µl Homogenisierungspuffer befüllt. Vom tiefgefrorenen Nierengewebe der Ratten wurde mit Hilfe eines Skalpells ein einige Millimeter großes Gewebestück geschnitten, dieses in je eines der vorbereiteten Eppendorfreagiergefäße überführt und auf Eis gekühlt. Durch Ultraschallbehandlung wurden die Proben homogenisiert und bei 4 °C und 13000 Umdrehungen pro Minute für 30 min zentrifugiert.

Anschließend wurde der Überstand mit Hilfe einer Pipette in ein neues 1.5 ml Eppendorfreagiergefäß überführt und das Pellet, bestehend aus den lysierten Zellbestandteilen, verworfen.

Arbeitslösung:

10 ml Homogenisierungspuffer
100 µl PMSF
¼ Tablette cOmplete Proteaseinhibitor
1 Tablette PhosStop Phosphataseinhibitor

Homogenisierungspuffer (250 ml):

465.3 mg EDTA
262.4 mg NaF
25.67 g Sucrose
1.02 g KH₂PO₄

Proteinbestimmung

Um im folgenden Western Blot auch eine quantitative Aussage über ein zu untersuchendes Protein in den einzelnen Proben treffen zu können, müssen die Proben annähernd die gleiche Proteinkonzentration besitzen. Um dies zu gewährleisten, wird zunächst der Gesamtproteingehalt der einzelnen Proben bestimmt. Durch nachfolgende Verdünnung der Proben mit Aqua dest. kann dann die Proteinkonzentration vereinheitlicht werden.

Zur photometrischen Bestimmung des Proteingehalts wurde ein Protein Assay der Firma Biorad verwendet. Diese Methode beruht auf dem Verfahren nach Lowry.⁷⁷ Der erste Reaktionsschritt verläuft hierbei analog zur Biuret-Reaktion: In wässrig-alkalischer Lösung werden Cu²⁺-Ionen durch die Peptidbindungen der Proteine komplexiert und es entsteht ein

blau-violett gefärbter Cu^{2+} -Komplex. Das zentrale Cu^{2+} -Ion wird zu Cu^+ reduziert. Die dabei entstandene Komplexverbindung reduziert nun ihrerseits im nächsten Schritt das gelbe Folin-Ciocalteu Reagenz, bestehend aus Molybdän- und Wolframheteropolysäure. Dabei bildet sich aus dem in Heteromolybdänsäure enthaltenen sechswertigen Molybdän vierwertiges Molybdänblau, dessen intensive Färbung photometrisch gemessen werden kann. Im Vergleich zur klassischen Biuret-Reaktion sind bei diesem Verfahren bereits deutlich geringere Proteinkonzentrationen nachweisbar.⁷⁷

Zur Proteinbestimmung wurden 2 μl Probe in je ein 1.5 ml Eppendorfreagiergefäß mit 18 μl Aqua dest. gegeben. Als Leerwert wurde 2 μl Homogenisierungspuffer in 18 μl Aqua dest. verwendet. Es wurden nacheinander 100 μl Protein Assay Reagent A und 800 μl Protein Assay Reagent B zu jedem Ansatz hinzugefügt, im Vortex vermischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die photometrische Messung des Proteingehalts erfolgte durch Doppelbestimmung unter Bildung des Mittelwerts.

Aus der photometrisch bestimmten Proteinkonzentration in mg/ml wurde nun dasjenige Probenvolumen berechnet, in dem 100 μg Protein (ausreichend für zwei Western Blots zu je 50 μg Protein) enthalten sind. Das so errechnete Probenvolumen wurde in einem Eppendorfreagiergefäß mit Aqua dest. auf 20 μl aufgefüllt, um in allen Proben die gleiche Proteinkonzentration zu erreichen.

Zur Probenvorbereitung für die Elektrophorese wurden diese 20 μl -Probenansätze gleicher Proteinkonzentration mit 20 μl Ladepuffer versetzt. Nach kurzem Zentrifugieren wurden die Proben bei 95 °C für 7 min aufgekocht und anschließend auf Eis abgekühlt.

Ladepuffer:

950 μl Ladepuffer-Stammlösung + 50 μl 1 M DTT

Stammlösung:

2 ml Glycerol (100 %)

2 ml 10 % SDS

2.5 ml Tris pH 6.8 (0.625 M)

10 ml Aqua dest.

1 Spatelspitze Bromphenolblau

SDS-PAGE

Zur Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht dient die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

Bei der elektrophoretischen Auftrennung von Proteingemischen macht man sich zu Nutze, dass Proteine aufgrund ihres Aufbaus aus Aminosäuren elektrische Ladungen besitzen und

somit im elektrischen Feld wandern. Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt dabei von Größe, Ladung und räumlicher Gestalt der Proteine ab. Um die Proteine lediglich nach ihrer Molekülmasse aufzutrennen, müssen diese die gleiche Ladungsverteilung besitzen und in linearisierter Form vorliegen.

Dazu werden die Proben im Verhältnis 1:1 mit Ladepuffer versetzt und auf 95 °C erhitzt. Unter hoher Temperatur denaturieren die Proteine, d.h. Quartär-, Tertiär- und Sekundärstruktur werden zerstört. SDS (Natriumdodecylsulfat) ist ein negativ geladenes Detergens, das an hydrophobe Bereiche des Proteins bindet und dieses durch Unterbrechung nicht-kovalenter Wechselwirkungen somit entfaltet. Pro Gramm Protein wird eine konstante Menge SDS gebunden, sodass die Eigenladung der Proteine überdeckt wird und alle Proteine hinterher die gleiche Ladungsdichte aufweisen. DTT (Dithiothreitol) ist ein Reduktionsmittel, das strukturbildende Disulfidbrücken der Proteine spaltet und somit zur Linearisierung beiträgt.

Die linearen Polypeptidketten gleicher Ladungsdichte wandern nun nach Anlegen einer Spannung entsprechend ihrer Größe, die sich in dieser ungefalteten Form proportional zu ihrem Molekulargewicht verhält, unterschiedlich schnell durch ein als Trägermedium dienendes Polyacrylamidgel. Kleine Proteine wandern schneller durch das Gel und kommen nach Beendigung der Elektrophorese näher an der Anode zu liegen als große. Ein Gemisch aus gefärbten Standardproteinen bekannter Größe, das ebenfalls mitläuft, dient als Größenmarker.

Ein solches Polyacrylamidgel besteht aus zwei unterschiedlich stark vernetzten Anteilen: Im größeren Sammelgel befinden sich die mit Proben zu beladenden Taschen und im feineren Trenngel erfolgt die Separation der Proteingemische.

Gelherstellung:

Es wurde ein 5 % Sammelgel und ein 8 % bzw. 10 % Trenngel (je nach Molekulargewicht des zu untersuchenden Proteins) verwendet.

Zwischen zwei in einen Gießstand eingespannte Glasplatten (1.5 mm Abstand) wurde zunächst das Trenngel gegossen, dessen Inhaltsstoffe zuvor in einem 50 ml Reaktionsgefäß vermischt wurden. Nachdem das Trenngel an Härte gewonnen hat, wurde das ebenfalls zuvor in einem 50 ml Reaktionsgefäß angesetzte Sammelgel aufpipettiert. In das noch flüssige Sammelgel wurde sofort der Probenkamm (10 Wells mit 1.5 mm Dicke) eingesetzt und das Gel anschließend ausgehärtet. Während des Härtens polymerisieren die Acrylamid-Monomere und bilden das molekulare Maschenwerk zur Auftrennung der Proteine. Nachdem das Gel fest geworden ist, kann der Probenkamm entfernt werden.

Sammelgel (5 %):

- 2.7 ml H₂O
- 0.67 ml 30 % Acryl-bisacrylamid Mix
- 0.5 ml 1.5 M Tris (pH 6.8)
- 0.04 ml 10 % SDS
- 0.04 ml 10 % Ammoniumpersulfat
- 0.004 ml TEMED (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)

Trenngel (10 %):

- 7.9 ml H₂O
- 6.7 ml 30 % Acryl-bisacrylamid Mix
- 5.0 ml 1.5 M Tris (pH 8.8)
- 0.2 ml 10 % SDS
- 0.2 ml 10 % Ammoniumpersulfat
- 0.008 ml TEMED (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)

Trenngel (8 %):

- 9.3 ml H₂O
- 5.3 ml 30 % Acryl-bisacrylamid Mix
- 5.0 ml 1.5 M Tris (pH 8.8)
- 0.2 ml 10 % SDS
- 0.2 ml 10 % Ammoniumpersulfat
- 0.012 ml TEMED (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)

Elektrophorese

Zum Aufbau der Elektrophorese-Apparatur wurde das verfestigte Gel in eine Elektrodeneinheit eingespannt und in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Die Kammer wurde mit 1x Elektrophoresepuffer befüllt und der Probenkamm aus dem Gel entfernt. Die erste Geltasche wurde mit 5 µl eines Proteinmarkers (peqGOLD Protein Marker III, VWR life science, Leuven, Belgien) befüllt, der vorgefärbte Proteine bekannter Größe enthielt. In jede weitere Tasche wurden 18 µl der zuvor vorbereiteten Probenansätze pipettiert. Dies entspricht einer Beladung mit 50 µg Protein. Die Apparatur wurde mit einer Spannungsquelle verbunden und die Elektrophorese zunächst für ca. 20 min bei 80 V und anschließend für weitere 60 – 90 min bei 100 V laufen gelassen.

1x Elektrophoresepuffer: 1:10 Verdünnung des 10x Elektrophoresepuffers

10x Elektrophoresepuffer:

50 g SDS
720 g Glycin
151.5 g Tris Base
5 l Aqua dest.

Transferblot

Um die zuvor elektrophoretisch aufgetrennten Proteinbanden sichtbar machen zu können, werden diese beim sog. Western Blotting durch Anlegen einer Spannung vom Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen.

Das Blotting erfolgte als Nass-Transfer in einem sog. Tank-Blot-System. Dazu wurde das Gel mit zuvor in Transferpuffer angefeuchteten Schwämmen, Filterpapieren und der Nitrozellulose-Membran (mit einer Porengröße von 0.2 µm (Biorad Laboratories, Deutschland) in einer Gekassette nach folgendem Schema geschichtet: Auf einen Schwamm folgten drei Filterpapiere, darauf das Gel, auf das die Membran ohne Luftblasen zu lassen aufgelegt wurde. Den Abschluss bildeten drei weitere Filterpapiere und ein Schwamm.

Die Gekassette wurde mit der Membran anodenwärts gerichtet in die Elektrodeneinheit der Transferkammer eingesetzt und die Kammer mit Transferpuffer aufgefüllt. Außerdem wurde ein Kühlakku eingesetzt, um eine Überhitzung zu vermeiden. An eine Stromquelle angeschlossen wurde für 90 min bei 300 mA geblottet.

Transferpuffer (2 l):

160 ml 10x Towbin
1440 ml Aqua dest.
400 ml Methanol (VWR, Darmstadt, Deutschland)

10x Towbin:

60.56 g Tris-Base (250 mM)
288.26 g Glycin (1.92 M)
mit Aqua dest. auf 2 l aufgefüllt

Nach Abschluss des Transfers wurde die Membran kurz mit Aqua dest. abgespült, um diese von den Methanol-Resten des Transferpuffers zu reinigen. Anschließend wurde die Membran für ca. 1 min mit dem Farbstoff Ponceau rot (Serva) überschichtet. Dieser Farbstoff färbt Proteine durch Bindung an deren Aminogruppe reversibel an. Dies dient der Kontrolle, ob Auftrennung und Transfer erfolgreich waren und ermöglicht einen ersten Eindruck, ob die Proben gleichmäßig mit Protein beladen waren.

Anschließend wurde der Farbstoff durch kurzes Waschen mit 1x PBS-T entfernt und die Membran für 2 h in 5 % 1x PBS-T-Milch bei Raumtemperatur unter langsamem Schwenken geblockt. Dabei werden die freien Bindungsstellen der Membran durch Proteine der Milch besetzt und somit für eine unspezifische Antikörperbindung blockiert.

10x PBS-T:

80 g NaCl

2 g KCl

2.4 g KH_2PO_4

14.4 g Na_2HPO_4

mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen

pH = 7.4

Anschließend werden 10 ml Tween®-20 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) zugefügt.

1x PBST:

100 ml 10x PBS-T und 900 ml Aqua dest.

Immundetektion

Die Identifikation eines gesuchten Proteins erfolgt mittels Antigen-Antikörper-Reaktion. Dazu wird die Membran mit einem Primärantikörper inkubiert, der spezifisch gegen ein Epitop des gesuchten Proteins gerichtet ist. Der Primärantikörper kann in unterschiedlichen Wirtsorganismen hergestellt worden sein, z.B. in Maus (mouse), in Kaninchen (rabbit), oder in Ziege (goat). Der Primärantikörper bindet spezifisch und mit hoher Affinität an die jeweilige Proteinbande, unspezifisch gebundene Antikörper werden durch mehrere Waschschritte entfernt. Danach wird ein gegen den jeweiligen Primärantikörper gerichteter Sekundärantikörper (je nach verwendetem Primärantikörper anti-mouse, anti-rabbit bzw. anti-goat) hinzugegeben. Dieser Sekundärantikörper bindet spezifisch an den Fc-Teil des Primärantikörpers und ist an ein Enzym gekoppelt, das nach Zugabe der entsprechenden Substrate eine Farb- oder Chemilumineszenzreaktion zum Sichtbarmachen der jeweiligen Proteinbande katalysiert.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Detektion durch Chemilumineszenz mit Sekundärantikörpern, die an das Enzym Meerrettichperoxidase gekoppelt sind. Dieses Enzym katalysiert die Oxidation von Luminol durch Wasserstoffperoxid, wobei Licht emittiert wird, das mit einer Spezialkamera detektiert werden kann.

Die Inkubation mit dem Primärantikörper (vgl. *Tabelle 1*) erfolgte in 5 % 1x PBS-T- Milch in einem 50 ml Reaktionsgefäß (7 ml Milch + je nach Verdünnung entsprechende Antikörpermenge) bei 4 °C über Nacht auf dem Über-Kopf-Rotator (Neolab #D-6050). Um überschüssige, nicht gebundene Antikörper zu entfernen, wurde die Membran am nächsten Tag zweimal 5 min mit 1x PBS-T gewaschen. Anschließend folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper in 0.5 % 1x PBS-T-Milch 1:10000 verdünnt (50 ml 1x PBS-T-Milch + 0.5 µl Antikörper) für 1 h bei Raumtemperatur unter langsamem Schwenken auf dem Schüttler (Heidolph, Polymax). Nach zwei zehnmütigen Waschschrinen in 1x PBS-T wurde die Membran kurz mit Aqua dest. abgespült.

Die Detektion erfolgte unter Verwendung von ECL der Firma GE Healthcare. Dieses Detektionsreagenzkit besteht aus zwei verschiedenen Lösungen, die Luminol und Wasserstoffperoxid als Substrate für die Meerrettichperoxidase enthalten.

Um die Chemilumineszenzreaktion zu starten, wurden nacheinander je 1 ml ECL Reagenz 1 und Reagenz 2 hinzupipettiert, vermischt und die Membran gleichmäßig und flächig mit der Lösung benetzt. Nach Reaktionsstart ist die Lichtemission für ca. 1 h detektierbar. Unmittelbar danach wurde die Membran mittig auf dem Probenhalter der Detektionskamera Fusion SL der Firma peqlab/VWR platziert und auf der dafür vorgesehenen Schiene in die Reaktionskammer geschoben. Nach Verschluss der lichtdichten Kammer wurden die korrekte Lage der Membran und die optimale Einstellung der Kamera überprüft und eine Weißlicht-Aufnahme zur Abbildung des Proteinmarkers angefertigt. Anschließend wurde die Detektion gestartet. Nach Ablauf der berechneten Zeit wurde ein digitales Bild erzeugt, auf dem die detektierte Proteinbande schwarz erschien. Nach Fusion mit der Markeraufnahme wurden die Aufnahmen gespeichert und mit Hilfe der Computersoftware FusionCapt Advance der Firma peqlab/VWR ausgewertet. Dabei wurde zur Quantifizierung spezieller Proteine die Pixeldichte der entsprechenden Proteinbanden bestimmt und gegen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Housekeeping-Protein verrechnet. Die GAPDH ist ein Enzym der Glykolyse, das eine essenzielle Funktion im Energiehaushalt von Lebewesen einnimmt. Durch die Tatsache, dass es in allen Zellen eines Gewebes nahezu gleich stark exprimiert wird, ist dieses Enzym geeignet, um die gleiche Proteinbeladung der Proben zu überprüfen und mögliche quantitative Unterschiede der Proteinbanden zwischen den Proben mit deren Gesamtproteinbeladung ins Verhältnis zu setzen.

Verwendete Primärantikörper:

Antikörper	Verdünnung	Spezies	Hersteller/Nr.
anti-Catalase	1:1000	rabbit	Cell Signaling, #14097
anti-COL1A2	1:250	mouse	Santa Cruz, sc-393573
anti-GAPDH	1:5000	mouse	Millipore, MAB374
anti-HO-1	1:1000	rabbit	Cell Signaling, #82206
anti-Nox 2	1:1000	rabbit	Santa Cruz, sc-5827
anti-Nox 4	1:1000	rabbit	abcam, ab154244
anti-Prx I	1:1000	rabbit	Cell Signaling, #8499
anti-Prx II	1:2000	mouse	abcam, ab50862
anti-Prx III	1:1000	rabbit	AbFrontier, LF-PA0030
anti-Renalase	1:1000	rabbit	abcam, ab178700
anti-SGLT-2	1:500	mouse	Santa Cruz, sc-393350
anti-SOD-1	1:1000	rabbit	Santa Cruz, sc-11407
anti-SOD-2	1:1000	rabbit	Santa Cruz, sc-30080
anti-Tyrosinhydroxylase	1:1000	rabbit	Cell Signaling, #58844
anti-Xanthine Oxidase	1:1000	mouse	Santa Cruz, sc-398548
anti-β-Actin	1:1000	rabbit	Cell Signaling, #4970

Tabelle 1: Primärantikörper Western Blot

Verwendete Sekundärantikörper:

Antikörper	Hersteller/Nr.
anti-mouse-Antikörper	Biorad, Kat.Nr.: 170-6516
anti-rabbit-Antikörper	Biorad, Kat.Nr.: 172-1019

Tabelle 2: Sekundärantikörper Western Blot

3.2.4 Histologie

Histologische Methoden ermöglichen die genauere Untersuchung von Zellen eines Gewebes in ihrem Zellverband. Dabei werden mikrometerdicke Stücke zuvor fixierter und in Paraffin eingebetteter Gewebeproben unter dem Lichtmikroskop betrachtet. Mit Hilfe spezieller Färbungen lassen sich durch das unterschiedliche Bindungsverhalten der Farbstoffe für die verschiedenen Zellorganellen je nach Fragestellung unterschiedliche Zell- bzw. Gewebebestandteile darstellen und hervorheben. Zum spezifischen Nachweis spezieller

Proteine kommen immunhistologische Färbungen zum Einsatz, die auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion beruhen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Gewebeschnitte des linken Vorhofs und des linken Ventrikels bzw. der beiden Nieren der Versuchstiere zur Beurteilung der Hypertrophie mit Hämatoxylin-Eosin und zur Quantifizierung der interstitiellen Fibrose mit Pikro-Siriusrot gefärbt und digital ausgewertet. Zur Darstellung sympathischer Nervenfasern als Korrelat sympathischer Aktivität im linken Vorhof wurde eine immunhistologische Färbung für Tyrosinhydroxylase, ein an der Katecholamin-Synthese beteiligtes Enzym, verwendet.

Um das Herz- und Nierengewebe für die histologische Untersuchung vorzubereiten, wurden die Herzen der Ratten nach Entnahme zunächst für 24 h in vierprozentiger Formaldehydlösung (Fischer, Saarbrücken, Deutschland; #PZN 02653048) fixiert. Die Fixierung dient dem Schutz der Zellen vor Autolyse und ermöglicht, das Gewebe in einer Form festzuhalten, die dem vitalen Zustand möglichst ähnlich ist. Formaldehyd denaturiert Proteine durch Bildung von Methylenbrücken zwischen einzelnen Aminosäureseitenketten und führt so zur Quervernetzung der Proteine.

Anschließend erfolgte die Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe (70 %, 80 %, 96 %, 100 %) in einem Gewebeeinbettautomaten (Excelsior, Thermo Scientific) und die Einbettung in Paraffin (TissueTek®, Sakura, Staufen). Zur Herstellung der Gewebeschnitte für die histologische Auswertung wurden mit Hilfe eines Mikrotoms (Leica, RM 2255) 5 µm dicke Schnitte der Paraffinblöcke angefertigt. Nach Übertragung auf einen Objektträger wurden die Schnitte bei 56 °C über Nacht fixiert.

3.2.4.1 Hämatoxylin-Eosin – Färbung (HE)

Die HE-Färbung dient als Übersichtsfärbung der cytomorphologischen Beurteilung von Gewebeschnitten. Diese Färbemethode beruht auf der Anfärbbarkeit saurer (basophiler) Zellbestandteile mit dem basischen Farbstoff Hämatoxylin (blau), basische (azido- bzw. eosinophile) Strukturen lassen sich mit Hilfe des sauren Farbstoffs Eosin (rot) anfärben. So stellen sich die Zellkerne durch ihren hohen Gehalt an Nukleinsäuren durch Anfärbung mit Hämatoxylin blau dar, während das Cytoplasma durch die darin enthaltenen Cytoplasmaproteine rot erscheint.

Um die Gewebeschnitte mit der wässrigen Färbelösung anfärben zu können, wurden die Objektträger zunächst dreimal für je 10 min in Xylol entparaffiniert. Danach wurden die Schnitte für je 5 min in Färbeküvetten einer absteigenden Alkoholreihe (100 %, 90 %, 70 %) und anschließend für ebenfalls 5 min in Aqua dest. getaucht. Im Anschluss daran wurde für 12 min

mit Hämatoxylin gefärbt. Nach zweimaligem Waschen mit Aqua dest. wurden die Gewebeschnitte zur Differenzierung, um den überschüssigen Farbstoff zu entfernen, mit HCl-Alkohol behandelt und erneut mit Aqua dest. gespült. Es folgte 15-minütiges Bläuen unter fließendem Wasser und erneutes Spülen mit Aqua dest. Danach wurde für 15 sek mit Eosin gefärbt und in Aqua dest. gewaschen. Abschließend wurden die Objektträger zur Entwässerung für je 2 min in Färbeküvetten einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 90 %, 100 %) getaucht und danach drei Mal für je 3 min in Xylol gegeben. Nach kurzem Trocknen wurden die Gewebeschnitte mit einem Tropfen Entellan und einem Deckglas luftblasenfrei eingedeckt.

Um die Gewebeschnitte mittels einer speziellen Software auswerten zu können, müssen zunächst digitale Bilder der gefärbten Präparate angefertigt werden.

Dazu wurden die histologischen Präparate unter dem Mikroskop (Leica, Aperio Versa 8) betrachtet und mit Hilfe einer auf dem Mikroskop befindlichen Kamera abgescannt und gespeichert.

Die Hypertrophie-Auswertung im linken Vorhof und im linken Ventrikel erfolgte unter Verwendung des Computerprogramms Image Scope (Aperio). Um eine Aussage über die Myozytengröße der Versuchstiere treffen zu können, wurde der durchschnittliche Querschnitt der Kardiomyozyten jedes Präparats bestimmt sowie im linken Vorhof zusätzlich der Durchmesser. Dazu wurden in den Präparaten möglichst viele quer angeschnittene Myozyten mit runder Form und zentral gelegenem Zellkern aufgesucht und manuell umrandet (vgl. *Abbildung 14: Bestimmung der Myozyten-Querschnittsfläche mit Hilfe des Computerprogramms Image Scope*). Das Programm berechnet den Flächeninhalt der umrandeten Areale. Für jedes Tier wurde die mittlere Querschnittsfläche der Myozyten bestimmt.

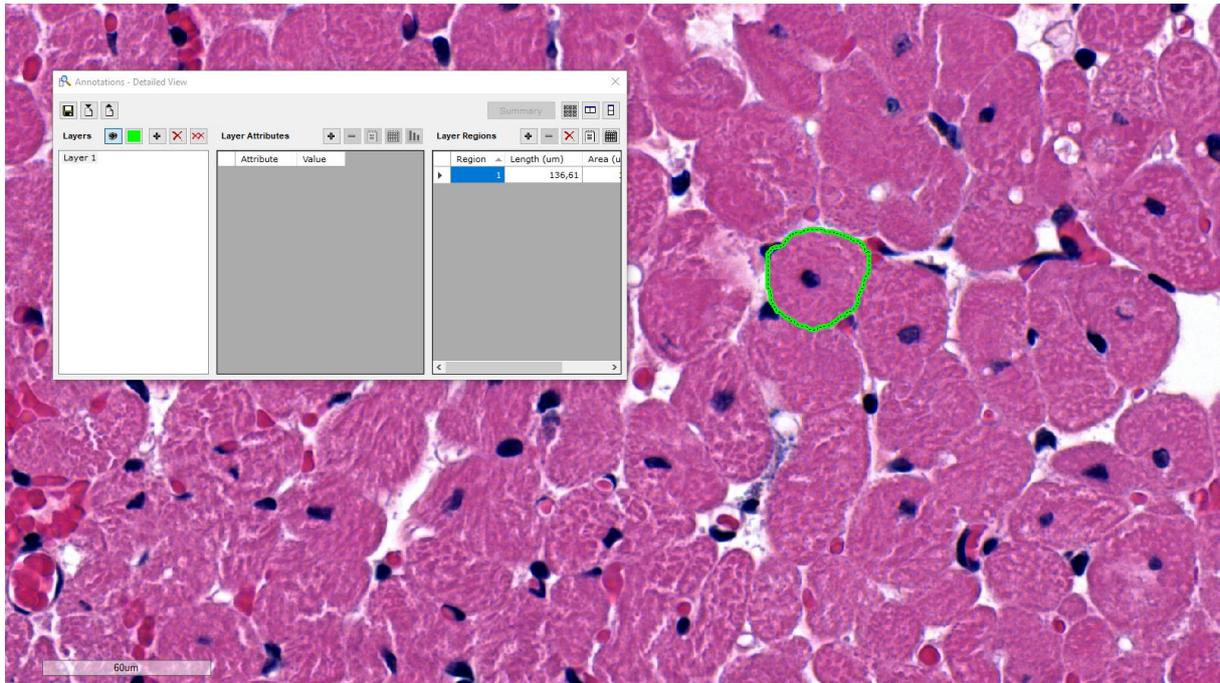


Abbildung 14: Bestimmung der Myozyten-Querschnittsfläche mit Hilfe des Computerprogramms Image Scope

3.2.4.2 Piko-Siriusrot – Färbung

Zur Darstellung der Fibrose im linken Vorhof, im linken Ventrikel und in den Nieren wurde die Piko-Siriusrot - Färbung verwendet. Diese Färbelösung enthält den Farbstoff Siriusrot in einer gesättigten Lösung von Pikrinsäure. Die Farbstoffmoleküle lagern sich an Kollagenfasern an und färben diese rot, wohingegen sich das Cytoplasma gelb darstellt.

Dazu wurden die Gewebeschnitte zunächst dreimal für je 10 min in Xylol entparaffiniert. Nach Durchlaufen der absteigenden Alkoholreihe (100 %, 90 %, 70 %) für je 5 min wurden die Objektträger für 5 min in Aqua dest. getaucht. Danach erfolgte die Färbung mit Piko-Siriusrot für 60 min. Nach zwei Waschschrinen mit Aqua dest. wurden die Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 90 %, 100 %) entwässert und abschließend dreimal je 3 min mit Xylol behandelt. Zur Eindeckung wurde ein Tropfen Entellan auf die Schnitte gegeben und zum Schutz mit einem Deckglas luftblasenfrei verschlossen.

Nach Abscannen und Digitalisieren der Schnitte mittels Mikroskop (Leica, Aperio Versa 8) wurden die Bilder vor der eigentlichen Auswertung mit Hilfe des Computerprogramms GIMP 2.10 (GNU Image Manipulation Program) bearbeitet. Dabei wurden all diejenigen Bildbereiche entfernt, die nicht vom Auswerteprogramm erfasst werden sollen, wie in *Abbildung 15* und *Abbildung 16* beispielhaft dargestellt. Da lediglich eine Untersuchung der interstitiellen Fibrose, d.h. der zwischen den Kardiomyozyten befindlichen Kollagenfasern, erfolgen sollte,

wurden alle endo- und epikardialen Anteile sowie die perivaskuläre Fibrose entfernt. Außerdem wurde bei den Abbildungen der ventrikulären Gewebeschnitte der rechte Ventrikel ausgeschnitten, da nur die linksventrikuläre Fibrose erfasst werden sollte (vgl. *Abbildung 15: Linker Ventrikel (LV) Siriusrot A ungeschnitten B geschnitten*).

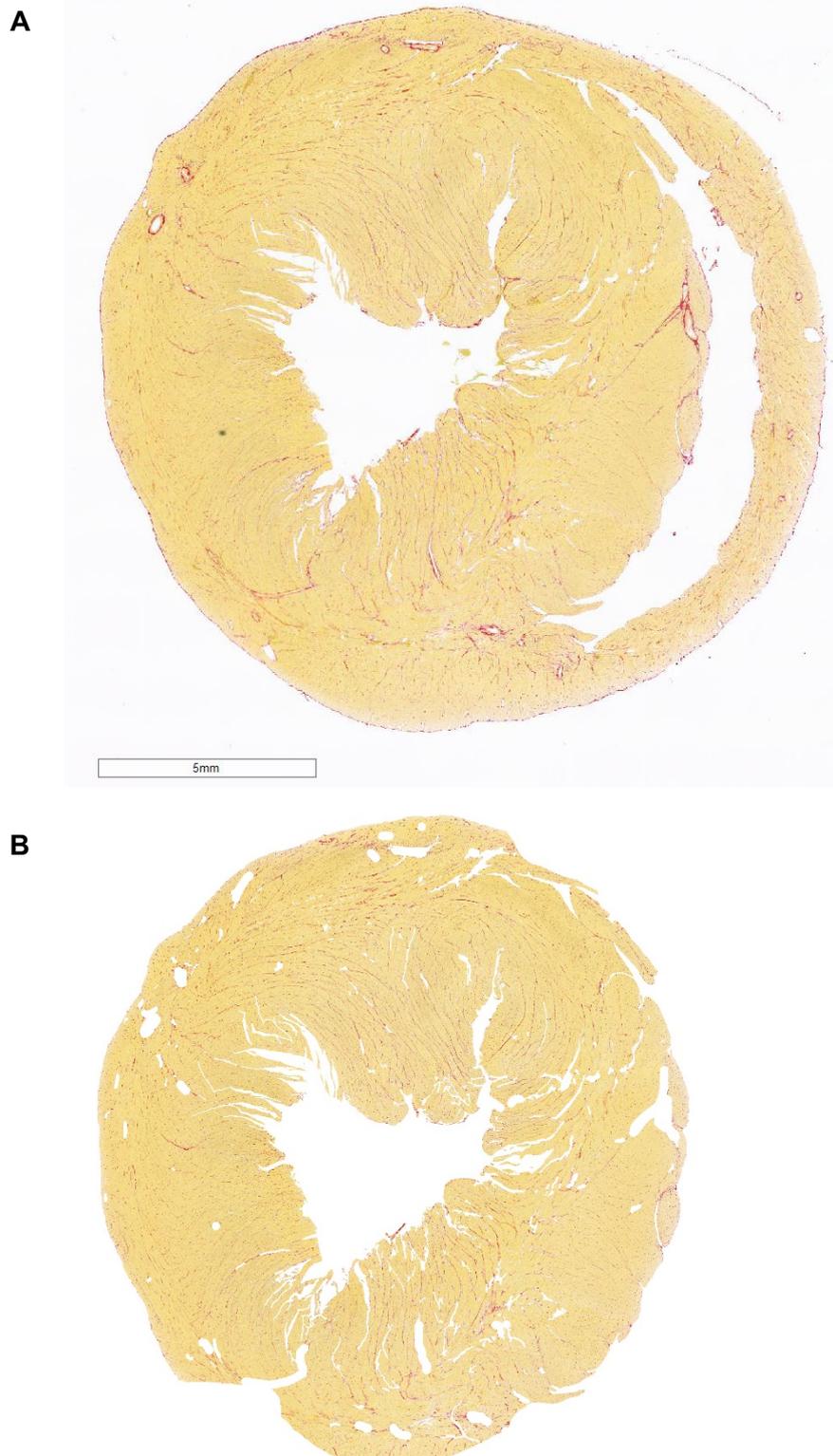


Abbildung 15: Linker Ventrikel (LV) Siriusrot A ungeschnitten B geschnitten
Pikro Siriusrot gefärbte histologische Gewebeschnitte der Ventrikel A vor und B nach Entfernung aller epi- und endokardialer bzw. rechtsventrikulärer Anteile sowie perivaskulärer Fibrose.

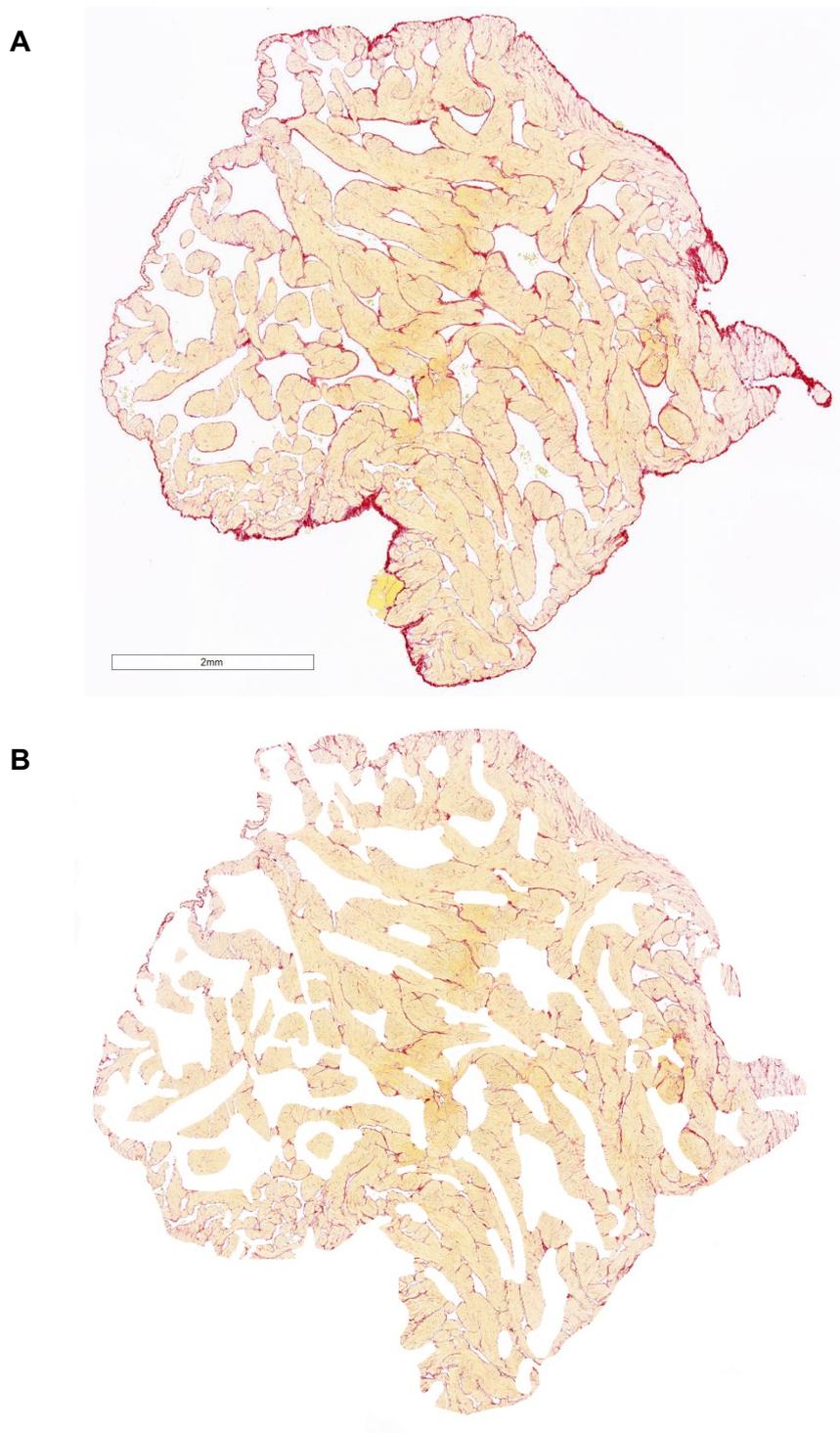


Abbildung 16: Linker Vorhof (LA) Siriusrot A ungeschnitten B geschnitten

Pikro Siriusrot gefärbte histologische Gewebeschnitte des linken Atriums A vor und B nach Entfernung aller epi- und endokardialer Anteile sowie perivaskulärer Fibrose.

Die Auswertung der interstitiellen Fibrose erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms NIS Elements (Nikon Instruments Europe BV), indem die Farbintensität einzelner Bildpixel verglichen wurde. Da die Kollagenfasern mittels Picro-Siriusrot-Färbung rot dargestellt

wurden, konnte die interstitielle Fibrose erfasst werden, indem alle rot gefärbten Pixel markiert wurden. Anschließend wurde der prozentuale Anteil der rot markierten Pixel an der Gesamtgewebefläche berechnet. Dies entspricht dem prozentualen Anteil der interstitiellen Fibrose am Gesamtgewebe.

3.2.4.3 Tyrosinhydroxylase – Färbung

Mit Hilfe der Tyrosinhydroxylase - Färbung können sympathische Nervenstrukturen dargestellt werden. Dabei werden die Gewebeschnitte mit spezifisch gegen das an der Synthese sympathischer Neurotransmitter beteiligte Enzym Tyrosinhydroxylase gerichteten Primärantikörpern inkubiert. Es werden nun gegen diese Primärantikörper gerichtete Sekundärantikörper hinzugegeben, die an einen Fluoreszenz-Farbstoff gekoppelt sind. Nach Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge emittiert dieser Farbstoff Licht einer anderen Wellenlänge, das unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden kann. So erscheinen unter dem Mikroskop betrachtet nur die mit Primär- und Sekundärantikörper gebundenen Areale farbig leuchtend, während alle anderen Stellen des Präparats dunkel bleiben.

Zur Vorbereitung wurden die Objektträger zunächst für 30 min auf eine Heizplatte gelegt, dreimal für je 10 min in Xylol entparaffiniert und anschließend in eine absteigende Alkoholreihe für zweimal 5 min in 100 % Ethanol, je einmal 5 min in 80 % und 70 % Ethanol getaucht und schließlich zweimal für 5 min in 1x PBS gewaschen. Danach wurden die Gewebeschnitte für 60 min bei 95 °C im Wasserbad in einem Citraconsäure-Puffer gekocht. Dieser Schritt dient der Renaturierung der Proteine, um diese für die Antikörperbindung wieder in ihre natürliche Konformation zu überführen. Nach 20-minütigem Abkühlen wurden die Objektträger zweimal für je 5 min in 1x PBS gewaschen. Nun erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (anti-Tyrosinhydroxylase, ab112) 1:100 in 1x PBS verdünnt bei 4 °C über Nacht in einer feuchten Kammer. Am Folgetag wurden die Präparate für zwei Stunden bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Es folgten zweimal je 5-minütiges Waschen mit 1x PBS-T und einmal 5-minütiges Waschen in 1x PBS bei Raumtemperatur. Nachdem die Schnitte abgetropft waren, wurde der Sekundärantikörper (anti-Rabbit FITC, Dianova) 1:50 verdünnt mit 1x PBS hinzugegeben und für 2 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Der Sekundärantikörper trägt den Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceinisothiocyanat gekoppelt, der bei Anregung mit Licht aus dem blauen Spektralbereich grünes Licht emittiert. Im Anschluss an die Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurde zweimal für je 5 min in 1x PBS-T und einmal für 5 min in 1x PBS gewaschen. Zur Anfärbung der Zellkerne erfolgte ein weiterer Färbeschritt mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) und die Eindeckung. DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich an die DNA anlagert und bei Anregung mit ultraviolettem Licht blau fluoresziert.

Zur Auswertung wurden die Präparate unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet, abgescannt und digital gespeichert. Die Quantifizierung des Tyrosinhydroxylasegehalts erfolgte unter Verwendung der Computersoftware Nis elements (Nikon Instruments Europe BV). Dabei wurden alle grün leuchtenden Gewebeareale markiert und deren Anteil an der Gesamtgewebefläche berechnet.

3.2.5 ELISA

Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) ist eine in der Laboriumsmedizin und Forschung weit verbreitete und auf Antigen-Antikörper-Interaktion basierende quantitative Nachweismethode für Peptide und Proteine. Dabei können je nach Art des Assays sowohl Antigene als auch Antikörper als Target dienen.

Zur Bestimmung der Konzentration von NT-proBNP im Plasma der Versuchstiere wurde ein Sandwich-ELISA (Rat NT-proBNP ELISA Kit, MyBioSource) verwendet. Beim Sandwich-ELISA ist die Mikrotiterplatte des Reaktionskits mit einem Antikörper beladen, der eine Bindungsstelle für ein spezifisches Epitop des nachzuweisenden Antigens besitzt. Nach Probenzugabe binden die darin enthaltenen Antigene an die an der Platte befindlichen Antikörper. Durch Waschschriffe werden ungebundene bzw. unspezifisch gebundene Antigene entfernt, sodass lediglich diejenigen Antigene haften bleiben, die das spezifisch zum Paratop des Antikörpers passende Epitop besitzen. Im nächsten Schritt wird ein zweiter, gegen ein anderes Epitop des nachzuweisenden Antigens gerichteter und enzymgekoppelter Antikörper hinzugefügt. Dieser bindet an den an der Mikrotiterplatte haftenden Antikörper-Antigenkomplex. Durch erneute Waschschriffe werden ungebundene Antikörper entfernt. Zur Detektion wird Substrat zugegeben, das von dem an den Sekundär-Antikörper gekoppelten Enzym in einer Farbreaktion umgesetzt wird. Die Signalstärke der Färbung kann als optische Dichte photometrisch gemessen werden und verhält sich proportional zur Antigen-Konzentration. Zur Quantifizierung und Kalibrierung wird mit Hilfe von den im Reaktionskit enthaltenen Lösungen bekannter Antigenkonzentration (Standardreihe) eine Standardkurve erstellt.

Enthaltene Lösungen:

- Reference Standard
- Concentrated Biotinylated Detection Ab (100x)
- Concentrated HRP Conjugate (100x)
- Reference Standard & Sample Diluent
- Biotinylated Detection Ab Diluent

HRP Conjugate Diluent
Concentrated Wash Buffer (25x)
Substrate Reagent
Stop Solution

Arbeitslösungen:

Wash Buffer: 30 ml Wash Buffer mit 720 ml Aqua dest. verdünnt

Standard working solution:

1000 pg/ml: Reference Standard für 1 min bei 10000x g zentrifugieren, 1 ml Reference Standard & Sample Diluent hinzufügen, für 10 min inkubieren lassen und mehrmals über Kopf mischen

→ daraus Verdünnungsreihe mit 2000 pg/ml, 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62.5 pg/ml, 31.25 pg/ml und 0 pg/ml durch Zugabe von je 500 µl der vorherigen Verdünnungsstufe zu 500 µl Reference Standard & Sample Diluent

Biotinylated Detection Ab working solution:

100x Concentrated Biotinylated Detection Ab 1:100 mit Biotinylated Detection Ab Diluent zu 1x working solution verdünnt

Concentrated HRP Conjugate working solution:

100x Concentrated HRP Conjugate 1:100 mit Concentrated HRP Conjugate Diluent zu 1x working solution verdünnen

Durchführung:

Zur Vorbereitung des Assays wurden zunächst die benötigten Reagenzien (Wash Buffer, Standard working solution, Biotinylated Detection AB working solution, Concentrated HRP working solution) nach der im Kit enthaltenen Anleitung aus den konzentrierten Lösungen durch entsprechende Verdünnung angesetzt.

Zur Durchführung des Assays wurden in jedes Well der Mikrotiterplatte 100 µl Probe bzw. zur Erstellung der Standardkurve 100 µl einer Standardlösung hinzugegeben und für 90 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Flüssigkeit der Wells abgegossen und im Anschluss daran 100 µl des biotinylierten Detektionsantikörpers in jedes Well pipettiert. Nach erneuter Inkubation für 60 min bei 37 °C wurde dekantiert und dreimalig gewaschen. Für die Waschschrte wurden je 350 µl Waschpuffer in jedes Well pipettiert, 1-2 min einwirken gelassen, danach abgegossen und durch Klopfen gegen saugfähiges Papier getrocknet. Nun wurden 100 µl HRP Konjugat in jedes Well hinzugefügt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Abgießen der Flüssigkeit folgten fünf Waschschrte. Im Anschluss daran wurden zum Reaktionsstart 90 µl Substrat Reagenz in jedes Well gegeben. Nach Inkubation für 15 min bei

37 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl Stop Solution beendet und unmittelbar danach die Extinktion photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

3.2.6 Statistik

Zur statistischen Analyse wurde das Computerprogramm GraphPad Prism (La Jolla, USA) verwendet. Allen Auswertungen wurde das Signifikanzniveau $p < 0.05$ zu Grunde gelegt.

Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM (standard error of the mean, Standardfehler) gezeigt. Der SEM berechnet sich als Quotient aus der Standardabweichung (SD) geteilt durch die Wurzel der Grundgesamtheit (n) ($SEM = \frac{SD}{\sqrt{n}}$).

Als statistischer Test zum Vergleich dreier Versuchsgruppen diente die „One-way ANOVA“-Analyse mit „Tukey´s multiple comparison“ als Post-hoc-Test.

4. Ergebnisse

4.1 Interventionsgruppe

Um die pathophysiologischen Mechanismen der Entstehung eines atrialen arrhythmogenen Substrates bei CKD und die mögliche Rolle einer gesteigerten neurohumoralen Aktivität zu untersuchen, wurde im Rattenmodell durch Verabreichung von 0.25%-Adenin-Futter über 16 Wochen eine chronische Niereninsuffizienz induziert (Adenin-Gruppe; Ad) und in einer Interventionsgruppe ein Teil der Versuchstiere vier Wochen nach Beginn der Fütterung mit der Adenin-haltigen Nahrung einer renalen Denervation unterzogen (Adenin+RDN-Gruppe; Ad+RDN) und mit der sham-operierten Kontroll (Ko)- bzw. Adenin-Gruppe verglichen (vgl. *Abbildung 17A: Versuchsablauf Interventionsgruppe*).

4.1.1 Tierdaten

Abbildung 17B zeigt die wöchentlich bestimmten Körpergewichte der Versuchstiere im Laufe der 16-wöchigen Versuchsdauer. Zu Versuchsbeginn nach Senderimplantation und vor Start der Fütterung mit 0.25%-Adenin lag das durchschnittliche Gewicht der Tiere der Kontroll-Gruppe bei 442.3 ± 21 g ($n=3$), das der Adenin-Gruppe bei 415.8 ± 11 g ($n=4$) und das der Adenin+RDN-Gruppe bei 408.3 ± 15 g ($n=4$). Somit zeigte sich zu Versuchsbeginn kein signifikanter Unterschied in den Körpergewichten zwischen allen Gruppen. Während des 16-wöchigen Versuchsablaufs nahm das Gewicht der Kontrollen um durchschnittlich 10.1 g pro Woche zu und die Tiere erreichten zum Endzeitpunkt nach 16 Wochen ein Gewicht von 605.3 ± 43 g. Bei den Adenin-gefütterten Tieren und den Adenin-gefütterten Tieren mit renaler Denervation fiel der Gewichtsanstieg im Versuchsverlauf deutlich geringer aus (0.54 g/Woche in Ad; 1.2 g/Woche in Ad+RDN) und das Körpergewicht der Tiere lag nach Versuchsabschluss bei 424.5 ± 11 g in der Adenin- und bei 427.8 ± 13 g in der Adenin+RDN-Gruppe. Damit zeigten die Adenin-gefütterten Tiere (Ad: $p=0.0015$ vs. Ko) und solche mit renaler Denervation (Ad+RDN: $p=0.0017$ vs. Ko) nach 16 Wochen im Vergleich zu Kontrollen ein signifikant reduziertes Körpergewicht (vgl. *Abbildung 17B: Tiergewichte*).

Auch die Futter- und Wasseraufnahme der Tiere wurden wöchentlich dokumentiert, wie *Abbildung 17C* und *Abbildung 17D* zeigen. Bei Start der Versuchsreihe unterschieden sich die durchschnittlichen Futter- und Trinkmengen der Versuchstiere aller drei Gruppen nicht signifikant (28 g Futter und 44.4 ml Wasser in Ko; 24.8 g und 53.3 ml in Ad; 23.5 g und 50.0 ml in Ad+RDN). Im Verlauf nahm die Futtermenge der Kontrolltiere geringfügig auf 32.6 g zum Endzeitpunkt zu. Bei den Adenin-gefütterten Tieren und solchen mit renaler Denervation nahm

die mittlere Futtermenge während der 16-wöchigen Versuchsdauer hingegen auf 18.7 g bei Ad und 20.6 g bei Ad+RDN ab. Während die Trinkmenge der Kontrolltiere im Versuchsverlauf nahezu konstant blieb, ließ sich in der Adenin- und Adenin+RDN-Gruppe eine deutliche Steigerung mit nahezu einer Verdopplung der Wasseraufnahme verzeichnen (Ad: 53.3 ml in Woche 1, 85.0 ml in Woche 16; Ad+RDN: 50.0 ml in Woche 1, 91.7 ml in Woche 16) (vgl. *Abbildung 17C: Futtermenge* und *Abbildung 17D: Trinkmenge*).

Somit zeigten Adenin-gefütterte Tiere nach 16 Wochen im Vergleich zu Kontrolltieren ein signifikant reduziertes Körpergewicht bei erheblich gesteigerter Trinkmenge und leicht reduzierter Nahrungsaufnahme. Unter renaler Denervation waren diese Veränderungen nicht reversibel, sodass renale Denervation diese Parameter unbeeinflusst lässt.

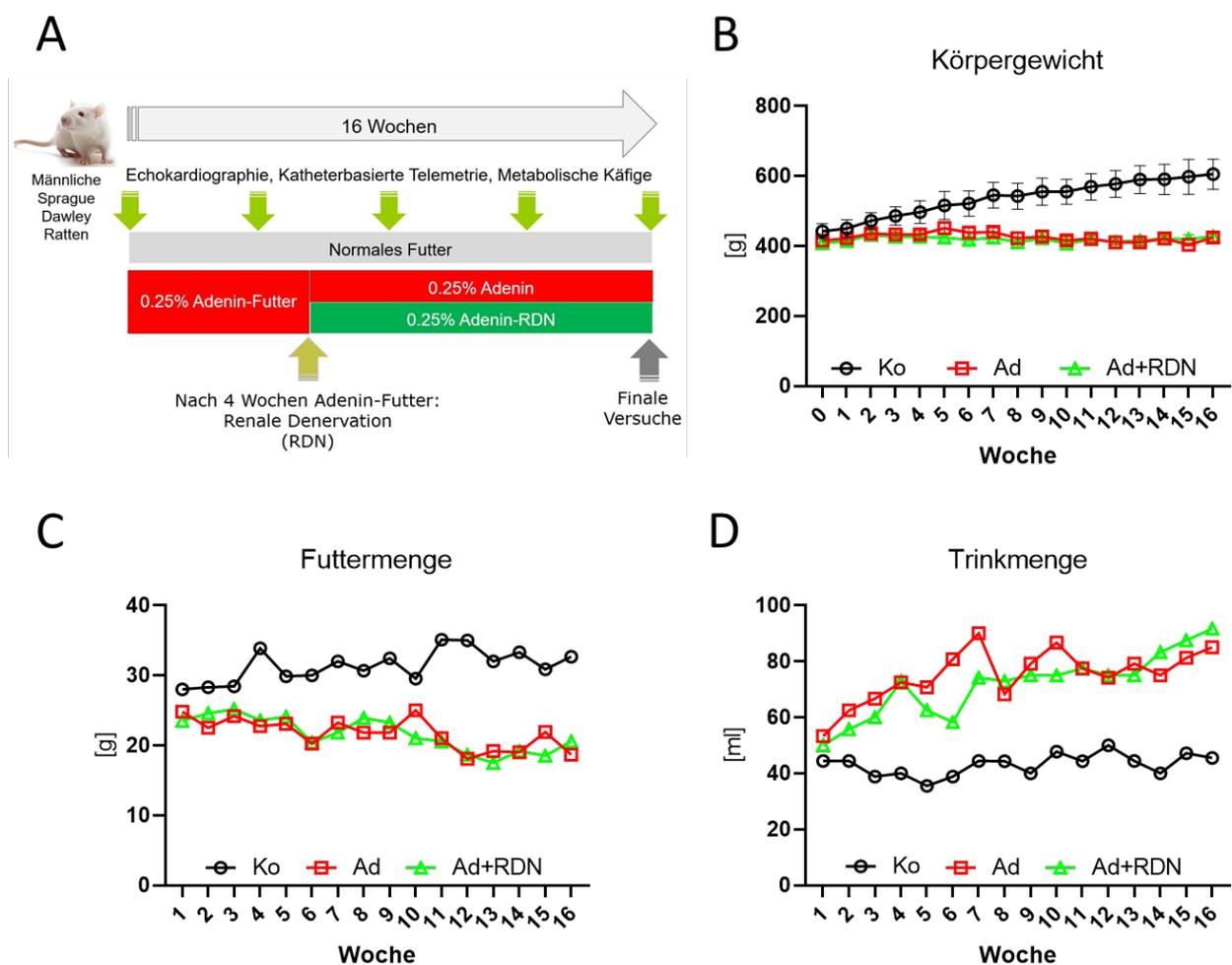


Abbildung 17: Tierdaten

A: Versuchsablauf Interventionsgruppe (siehe S.38f)

B: Tiergewichte. Entwicklung der Körpergewichte in Gramm (g) der Kontrollen (Ko, n=3), Adenin-gefütterten Ratten (Ad, n=4) und Adenin-gefütterten Ratten mit renaler Denervation (Ad+RDN, n=4) wöchentlich bestimmt von Beginn der Adenin-Fütterung (Woche 0) bis Versuchsende (Woche 16). Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM gezeigt.

C: Futtermenge. Durchschnittliche Futtermenge pro Tier und Tag in Gramm (g) im Versuchsverlauf von Kontrollen (Ko, n=3), Adenin-gefütterten Ratten (Ad, n=4) und Adenin-gefütterten Ratten mit renaler Denervation (Ad+RDN, n=4).

D: Trinkmenge. Durchschnittliche Wasseraufnahme pro Tier und Tag in Milliliter (ml) im Versuchsverlauf von Kontrollen (Ko, n=3), Adenin-gefütterten Ratten (Ad, n=4) und Adenin-gefütterten Ratten mit renaler Denervation (Ad+RDN, n=4).

Zur Erfassung der Nierenfunktion wurden die Plasma- und Urinkonzentrationen von Kreatinin und Harnstoff in regelmäßigen Abständen bestimmt. Kreatinin und Harnstoff sind Stoffwechselprodukte, die unter physiologischen Bedingungen renal eliminiert werden und deren Plasmakonzentration daher negativ mit der Filtrationsleistung der Niere korreliert, während hohe Urinkonzentrationen dieser Metabolite eine erhaltene Ausscheidungsfunktion der Niere anzeigen.

Die Baseline-Messung (Zeitpunkt 0) der Plasmakonzentrationen von Kreatinin (Crea) und Harnstoff (Urea) ergab keine Unterschiede zwischen allen drei Gruppen (in Ko: 0.45 ± 0.01 mg/dl Crea, 45.9 ± 3.0 mg/dl Urea; in Ad: 0.44 ± 0.01 mg/dl Crea, 53.4 ± 4.3 mg/dl Urea; in Ad+RDN: 0.51 ± 0.05 mg/dl Crea, 58.7 ± 4.4 mg/dl Urea). Während Plasma-Kreatinin und -Harnstoff in der Kontrollgruppe im Laufe der 16-wöchigen Versuchsdauer annähernd unverändert blieben, ließ sich in der Adenin- und der Adenin+RDN-Gruppe ein signifikanter Anstieg verzeichnen. Die Plasma-Kreatininkonzentration stieg bei Adenin-gefütterten Tieren auf 3.0 ± 0.22 mg/dl (Ko: 0.54 ± 0.27 mg/dl; $p=0.0002$ vs. Ad) und bei den Adenin-gefütterten Tieren mit renaler Denervation auf 2.8 ± 0.19 mg/dl ($p=0.0003$ vs. Ko) nach 16 Wochen an (Ad vs. Ad+RDN, $p=0.81$). Für die Plasma-Harnstoffkonzentration ließ sich ein Anstieg auf 396.2 ± 45.0 mg/dl in Ad (Ko: 52.8 ± 3.0 mg/dl; $p=0.0001$ vs. Ad) und 344.5 ± 13.7 mg/dl in Ad+RDN ($p=0.0004$ vs. Ko) verzeichnen (Ad vs. Ad+RDN, $p=0.45$). Somit waren Plasma-Kreatinin und Plasma-Harnstoff am Ende der Versuchsdauer in Adenin-gefütterten Tieren und solchen mit renaler Denervation signifikant erhöht gegenüber der Kontrollgruppe. Zwischen der Adenin- und der Adenin+RDN-Gruppe zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (vgl. *Abbildung 18A: Plasma Kreatinin* und *Abbildung 18C: Plasma Harnstoff*).

Gegenläufig verhielten sich die Urinkonzentrationen von Kreatinin und Harnstoff. Zum Endzeitpunkt der Versuchsreihe nach 16 Wochen war die renale Kreatinin- und Harnstoffausscheidung in Adenin-gefütterten Tieren und solchen mit renaler Denervation hoch signifikant reduziert ($p < 0.0001$) gegenüber den Kontrolltieren. Die Kontroll-Ratten schieden nach 16 Wochen im Mittel 91.6 ± 19.3 mg/dl Kreatinin und 3554.0 ± 552.9 mg/dl Harnstoff über den Urin aus verglichen mit 17.0 ± 4.1 mg/dl Crea, 925.4 ± 138.2 mg/dl Urea bei Adenin-Tieren und 21.2 ± 3.3 mg/dl Crea, 1312.0 ± 140.1 mg/dl Urea bei renal denervierten Adenin-gefütterten Ratten (vgl. *Abbildung 18B: Urin Kreatinin-Gehalt* und *Abbildung 18D: Urin Harnstoff-Gehalt*). Zwischen der Adenin- und der Adenin+RDN-Gruppe ergaben sich keine Unterschiede.

Die Ergebnisse der Untersuchung der Nierenfunktionsparameter Kreatinin und Harnstoff in Plasma und Urin sprechen für eine durch die Adenin-Nephropathie massiv eingeschränkte Nierenfunktion der Adenin-gefütterten Tiere im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren. Renale Denervation ließ die Nierenfunktionsparameter unbeeinflusst und in der Denervationsgruppe konnte verglichen mit den sham-operierten Adenin-gefütterten Tieren keine Verbesserung der

Nierenfunktion beobachtet werden. Dies lässt schließen, dass renale Denervation keinen Einfluss auf die Nierenfunktion hat.

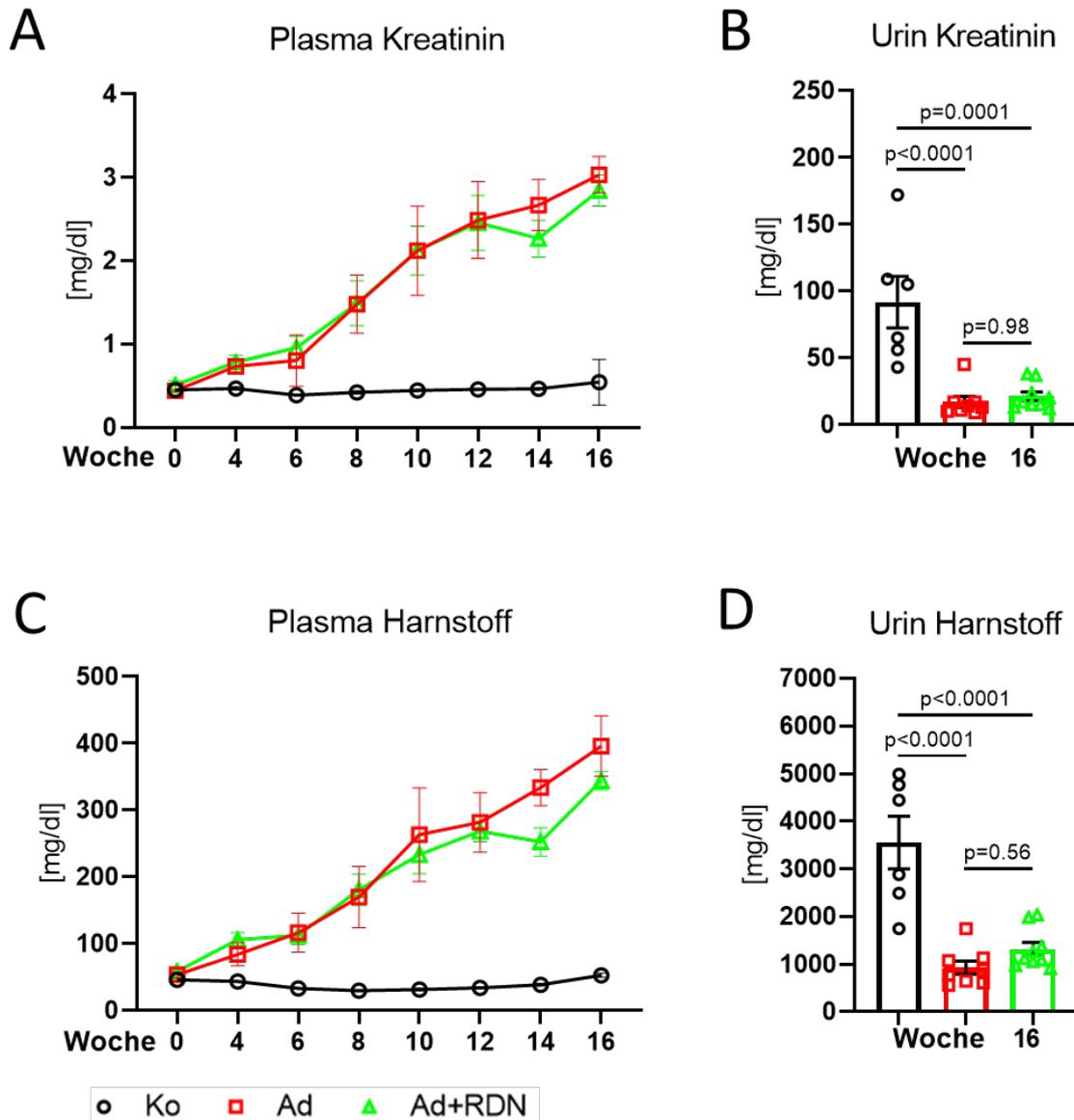


Abbildung 18: Nierenfunktionsparameter

A: Plasma-Kreatininkonzentration in Milligramm pro Deziliter (mg/dl) von Kontrollen (Ko, n=3), Adenin-gefütterten Tieren (n=4) und Adenin-gefütterten Tieren mit renaler Denervation (n=4).

B: Urin-Kreatininkonzentration in Milligramm pro Deziliter (mg/dl) von Kontrollen (Ko, n=6), Adenin-gefütterten Tieren (n=8) und Adenin-gefütterten Tieren mit renaler Denervation (n=8) in Woche 16.

C: Plasma-Harnstoffkonzentration in Milligramm pro Deziliter (mg/dl) von Kontrollen (Ko, n=3), Adenin-gefütterten Tieren (n=4) und Adenin-gefütterten Tieren mit renaler Denervation (n=4).

D: Urin-Harnstoffkonzentration in Milligramm pro Deziliter (mg/dl) von Kontrollen (Ko, n=6), Adenin-gefütterten Tieren (n=8) und Adenin-gefütterten Tieren mit renaler Denervation (n=8) in Woche 16.

One-way ANOVA mit Tukey's multiple comparison Test wurde zur statistischen Analyse verwendet. Alle Daten sind als Mittelwert±SEM gezeigt.

Abbildung 19 zeigt die telemetrisch gemessenen mittleren arteriellen Blutdrücke (MAD, Arterieller Mitteldruck) der Versuchstiere aller drei Gruppen während der 16-wöchigen Versuchsdauer. Zu Versuchsbeginn unterschieden sich die Ratten aller drei Gruppen hinsichtlich des Blutdrucks nicht wesentlich (mit MAD von 97.7 ± 1.0 mmHg in Ko, 100.7 ± 2.3 mmHg in Ad und 100.3 ± 1.3 mmHg in Ad+RDN). Nach 16 Wochen lag der MAD der Kontrolltiere bei 103.3 ± 1.4 mmHg und zeigte sich somit nahezu unverändert zum Ausgangswert. In der Adenin- und der Adenin+RDN-Gruppe konnte im Verlauf nur ein moderater Blutdruckanstieg auf 123.9 ± 4.6 mmHg in Ad ($p=0.0007$ vs. Ko) bzw. 114.8 ± 3.2 mmHg in Ad+RDN ($p=0.043$ vs. Ko) nach 16 Wochen verzeichnet werden. Zwischen der Adenin- und der Adenin+RDN-Gruppe ergab sich nach 16 Wochen kein signifikanter Blutdruckunterschied.

Die Adenin-Nephropathie führte im Rattenmodell somit lediglich zu einem geringfügigen Blutdruckanstieg nach 16 Wochen, sodass alle weiteren beobachteten und im Folgenden beschriebenen Effekte weitestgehend blutdruckunabhängig sind.

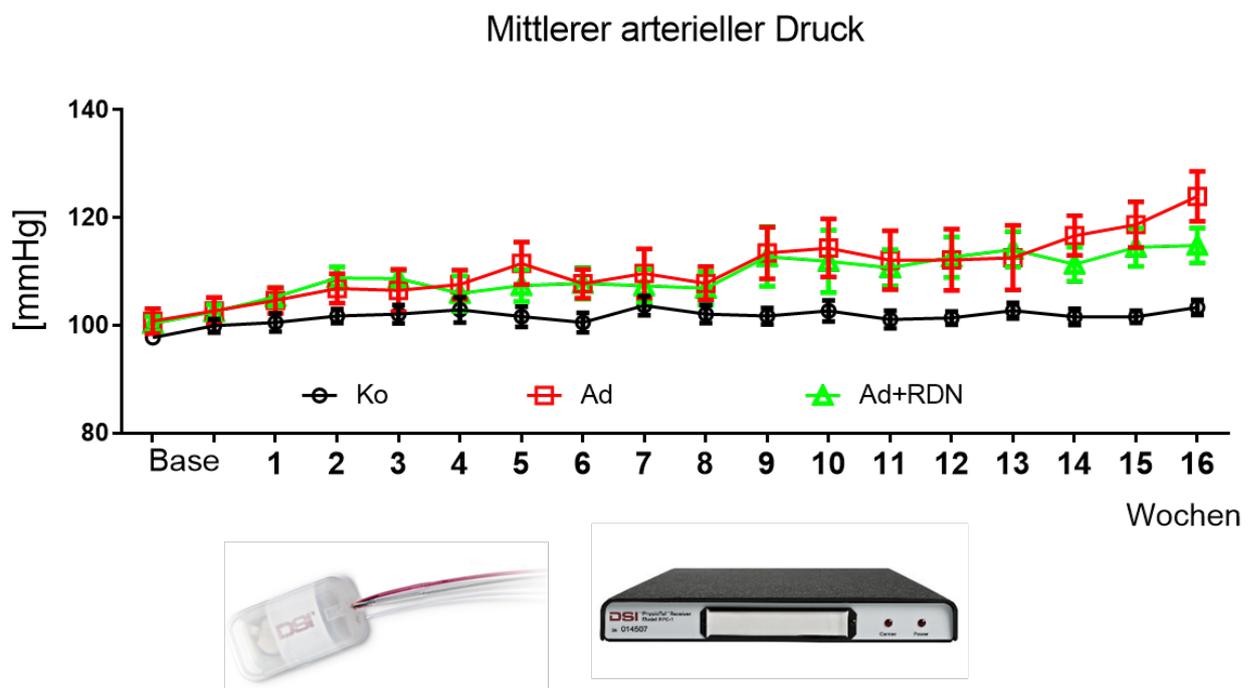


Abbildung 19: Mittlerer arterieller Blutdruck (MAD)

Telemetrisch gemessene mittlere arterielle Blutdruckwerte in mmHg von Kontrollen (Ko, $n=6$ Tiere), Adenin-gefütterten Ratten (Ad, $n=5-6$ Tiere) und Adenin-gefütterten Ratten mit renaler Denervation (Ad+RDN, $n=5-6$ Tiere) während des Versuchsverlaufs.

Base=Baseline

4.1.2 Expression ROS-produzierender und anti-oxidativ wirkender Proteine in der Niere

Eine eingeschränkte Nierenfunktion ist oft mit strukturellen und biochemischen Veränderungen der Niere assoziiert, die unter anderem mit einer erhöhten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) bzw. verminderten anti-oxidativen Abwehrmechanismen verbunden sind. Daher wurde die Expression oxidativ- und anti-oxidativ wirkender Proteine im Rattenmodell der CKD mittels Western Blot-Analyse aus Nierenhomogenat der rechten und linken Niere untersucht. Durch den Vergleich der Adenin-Gruppe mit der Adenin+RDN-Gruppe sollte untersucht werden, ob die Denervation der Nierenarterien eine Auswirkung auf die Expression ROS-produzierender oder anti-oxidativ wirkender Proteine hat.

Ein wichtiges ROS-produzierendes Enzym ist das die beiden letzten Schritte des Purinabbaus katalysierende Enzym Xanthin-Oxidase, das unter Verwendung von molekularem Sauerstoff als primären Elektronenakzeptor Superoxid-Anionen generiert.²⁰

In der Western Blot-Analyse ergab sich für XO in der Kontrollgruppe ein mittlerer IOD-Wert von 0.06 ± 0.01 , in der Adenin-Gruppe 0.45 ± 0.07 und in der Adenin+RDN-Gruppe 0.44 ± 0.07 . Damit zeigte sich eine signifikante Steigerung der renalen Expression von XO sowohl in Adenin-gefütterten Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren ($p=0.0002$ vs. Ko), als auch in den Adenin+RDN-Tieren ($p=0.0002$ vs. Ko). Zwischen Adenin-gefütterten Tieren und solchen mit renaler Denervation ergab sich kein Unterschied ($p=0.99$) (vgl. *Abbildung 20: Renale Expression des purinabbauenden Enzyms Xanthin-Oxidase (XO)*). Die gesteigerte XO-Expression in Adenin-gefütterten Tieren könnte hier als Korrelat der futterbedingten Adenin-Nephropathie im Sinne einer verstärkten Umsetzung von Adenin durch die XO zu 2,8-Dihydroxyadenin zu werten sein.^{30,32,12}

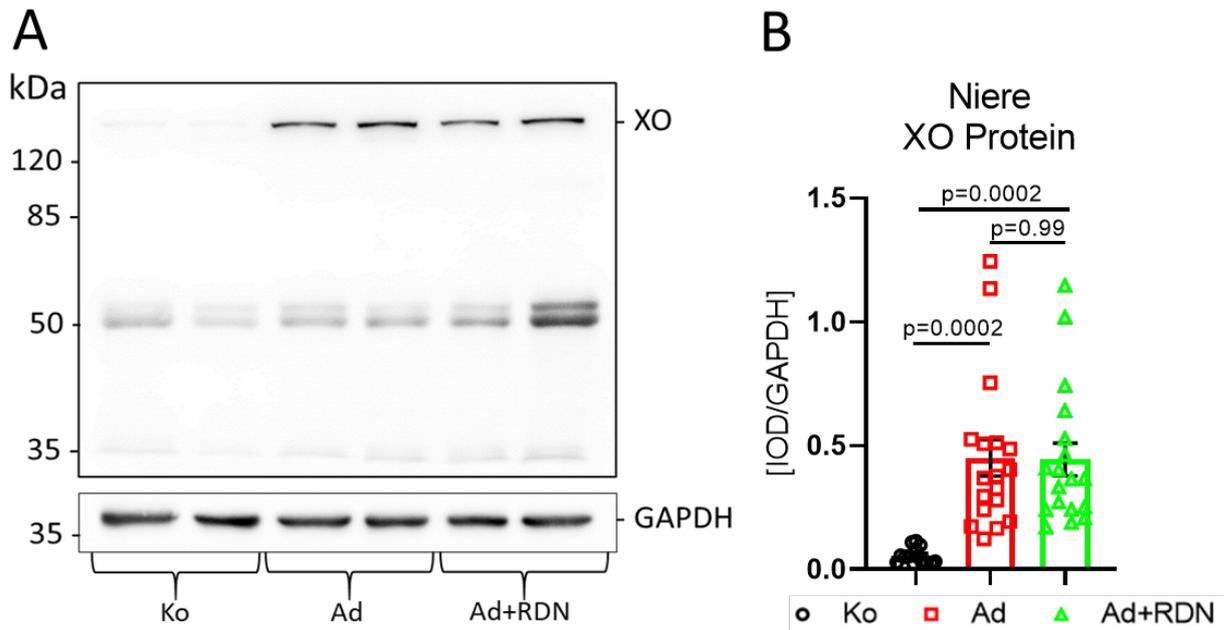


Abbildung 20: Renale Expression des purinabbauenden Enzyms Xanthin-Oxidase (XO)

A: Repräsentativer Immunoblot zur renalen Proteinexpression von XO (150kDa) in Kontrollen (Ko), Adenin-gefütterten Ratten (Ad) und Adenin-gefütterten Ratten mit renaler Denervation (Ad+RDN). Das „house-keeping Gen“ GAPDH diente als Ladekontrolle. (Unspezifische Bande bei 50kDa)

B: Immunchemische Quantifizierung der Proteinexpression von XO in Nierenhomogenat der linken und rechten Niere in Ko (n=7 Tiere), Ad (n=9 Tiere) und Ad+RDN (n=9 Tiere). One-way ANOVA mit Tukey's multiple comparison Test wurde zur statistischen Analyse verwendet. Alle Daten sind als Mittelwert±SEM gezeigt.

GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; IOD: Integrated Optical Density; XO: Xanthin-Oxidase

Die Isoenzyme der Familie der NADPH-Oxidasen (Nox) katalysieren die Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Superoxid-Anion und sind somit primär ROS-produzierende Enzyme und eine wichtige endogene Quelle reaktiver Sauerstoffspezies.²⁰

Die renale Nox 2-Expression zeigte sich in der Auswertung bei niereninsuffizienten Ratten mit 1.0 ± 0.06 verglichen mit Kontrolltieren (0.84 ± 0.04 in Ko) signifikant erhöht ($p=0.018$). Durch renale Denervation wurde keine signifikante Reduktion der Nox 2-Expression im Vergleich zu ausschließlich Adenin-gefütterten Tieren erzielt (0.93 ± 0.05 , $p=0.16$) (vgl. *Abbildung 21: Renale Expression des ROS-produzierenden Enzyms NADPH-Oxidase 2 (Nox 2)*).

Als vorwiegend renal und vaskulär exprimierte Isoform wurde die Expression von Nox 4 untersucht.²⁰ Hierbei ergaben sich mit Werten von 0.30 ± 0.06 in Kontrollen, 0.40 ± 0.06 in Adenin-Tieren und 0.36 ± 0.05 in Adenin-Tieren mit renaler Denervation keine signifikanten Unterschiede zwischen allen Gruppen (vgl. *Abbildung 22: Renale Expression des ROS-produzierenden Enzyms NADPH-Oxidase 4 (Nox 4)*).

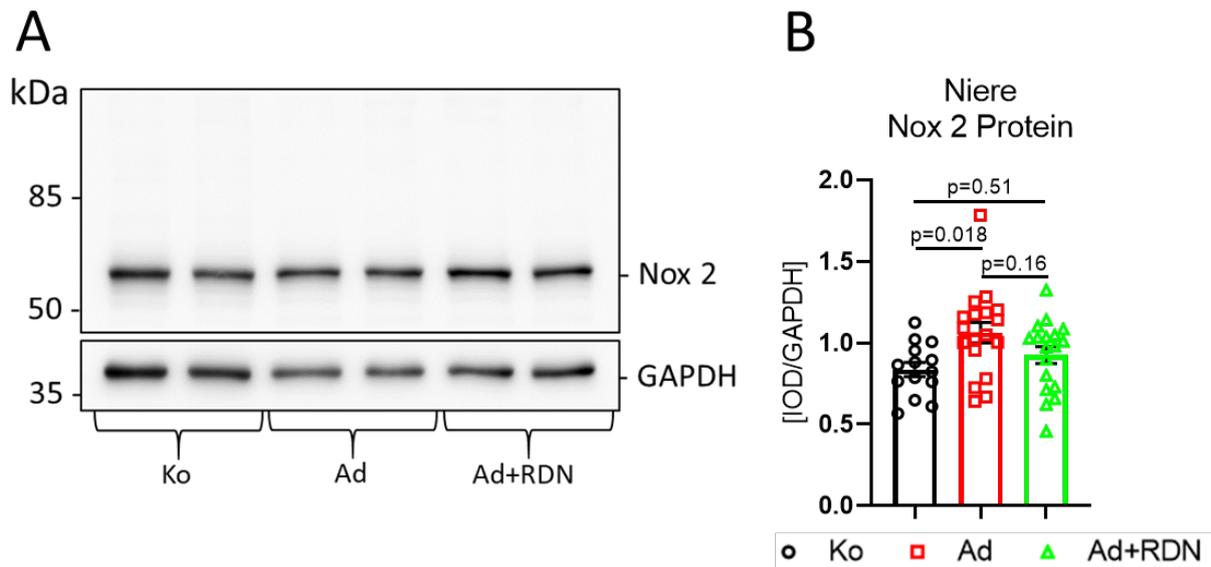


Abbildung 21: Renale Expression des ROS-produzierenden Enzyms NADPH-Oxidase 2 (Nox 2)

A: Repräsentativer Immunoblot zur renalen Proteinexpression von Nox 2 (65kDa) in Kontrollen (Ko), Adenin-gefütterten Ratten (Ad) und Adenin-gefütterten Ratten mit renaler Denervation (Ad+RDN). Das „house-keeping Gen“ GAPDH diente als Ladekontrolle.

B: Immunchemische Quantifizierung der Proteinexpression von Nox 2 in Nierenhomogenat der linken und rechten Niere in Ko (n=7 Tiere), Ad (n=9 Tiere) und Ad+RDN (n=9 Tiere). One-way ANOVA mit Tukey's multiple comparison Test wurde zur statistischen Analyse verwendet. Alle Daten sind als Mittelwert±SEM gezeigt.

GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; IOD: Integrated Optical Density; Nox: NADPH-Oxidase

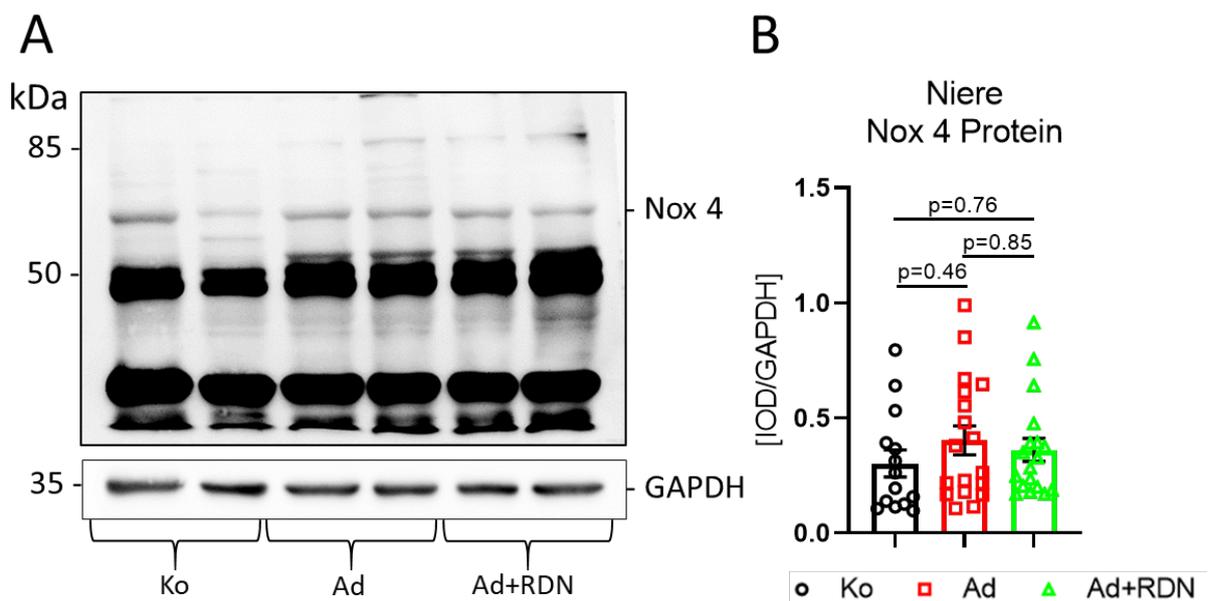


Abbildung 22: Renale Expression des ROS-produzierenden Enzyms NADPH-Oxidase 4 (Nox 4)

A: Repräsentativer Immunoblot zur renalen Proteinexpression von Nox 4 (65kDa) in Kontrollen (Ko), Adenin-gefütterten Ratten (Ad) und Adenin-gefütterten Ratten mit renaler Denervation (Ad+RDN). Das „house-keeping Gen“ GAPDH diente als Ladekontrolle.

B: Immunchemische Quantifizierung der Proteinexpression von Nox 4 in Nierenhomogenat der linken und rechten Niere in Ko (n=7 Tiere), Ad (n=9 Tiere) und Ad+RDN (n=9 Tiere). One-way ANOVA mit Tukey's multiple comparison Test wurde zur statistischen Analyse verwendet. Alle Daten sind als Mittelwert±SEM gezeigt.

GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; IOD: Integrated Optical Density; Nox: NADPH-Oxidase

Zur Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies stehen dem Organismus verschiedene enzymatische Abwehrmechanismen zur Verfügung, deren Expression als Maß der antioxidativen Kapazität mittels Western Blot analysiert wurde. Der erste Schritt ist dabei die Umsetzung von Superoxid-Anionen durch die Isoenzyme der Familie der Superoxid-Dismutasen (SOD) zu Wasserstoffperoxid, welches im nächsten Schritt durch Catalase zu Wasser und molekularem Sauerstoff entgiftet wird.^{20,114}

Die Expression von Catalase zeigte sich in Adenin-gefütterten Tieren hoch signifikant reduziert gegenüber den Kontrollen (2.5 ± 0.52 in Ko vs. 0.88 ± 0.22 in Ad, $p=0.001$). Zwischen der Adenin- und der Adenin+RDN-Gruppe ergab sich kein signifikanter Unterschied (0.74 ± 0.15 in Ad+RDN, vs. Ad $p=0.93$) (vgl. *Abbildung 23: Renale Expression anti-oxidativer Proteine*).

Weniger deutlich fiel die Reduktion der Expression der Isoformen der SODs in nierengeschädigten Tieren im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren aus. Hier konnte lediglich für die cytosolische Isoform SOD 1 eine Abnahme in der Proteinexpression zwischen Kontrollen und Adenin-gefütterten Tieren festgestellt werden. Diese Abnahme war jedoch nur zwischen Kontroll- und Adenin+RDN-Gruppe signifikant (1.1 ± 0.13 in Ko vs. 0.69 ± 0.07 in Ad+RDN, $p=0.030$), zwischen Kontroll- und Adenin-Gruppe wurde das Signifikanzniveau nicht erreicht (0.76 ± 0.12 in Ad, vs. Ko $p=0.089$). Für die Expression der mitochondrialen Isoform SOD 2 ließ sich keine signifikante Abnahme verzeichnen (1.1 ± 0.10 in Ko, 0.93 ± 0.11 in Ad, 0.86 ± 0.09 in Ad+RDN).

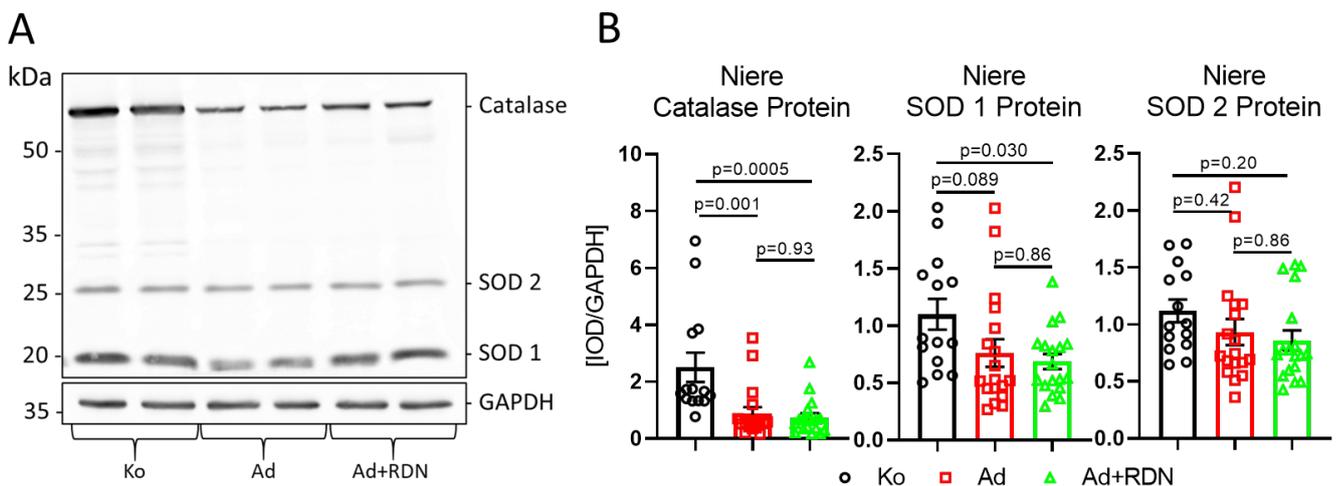


Abbildung 23: Renale Expression anti-oxidativer Proteine

A: Repräsentative Immunoblots zur renalen Proteinexpression von Catalase (60kDa), SOD 1 (20kDa) und SOD 2 (25kDa) in Kontrollen (Ko), Adenin-gefütterten Ratten (Ad) und Adenin-gefütterten Ratten mit renaler Denervation (Ad+RDN). Das „house-keeping Gen“ GAPDH diente als Ladekontrolle.

B: Immunchemische Quantifizierung der Proteinexpression von Catalase (links), SOD 1 (Mitte) und SOD 2 (rechts) in Nierenhomogenat der linken und rechten Niere in Ko ($n=7$ Tiere), Ad ($n=9$ Tiere) und Ad+RDN ($n=9$ Tiere). One-way ANOVA mit Tukey's multiple comparison Test wurde zur statistischen Analyse verwendet. Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM gezeigt.

GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; IOD: Integrated Optical Density; SOD: Superoxid-Dismutase

Auch die Isoenzyme der Familie der Peroxiredoxine (Prx) sind als Enzyme der anti-oxidativen Abwehr an der Entgiftung von Wasserstoffperoxid und organischen Hyperoxiden beteiligt.^{80,84}

Die Expression der cytosolischen Vertreter Prx I und II stellte sich in der Western Blot-Analyse im Rattenmodell zwischen allen drei Gruppen nahezu unverändert dar (Prx I: 0.30 ± 0.05 in Ko, 0.33 ± 0.06 in Ad, 0.35 ± 0.05 in Ad+RDN, Prx II: 0.62 ± 0.08 in Ko, 0.60 ± 0.06 in Ad, 0.59 ± 0.60 in Ad+RDN, vgl. *Abbildung 24: Renale Expression cytosolischer anti-oxidativer Proteine*), während die Expression der mitochondrialen Isoform Prx III sowohl in den Adenin-gefütterten Ratten (0.29 ± 0.03 in Ad) als auch in den Adenin-gefütterten renal denervierten Ratten (0.33 ± 0.05 in Ad+RDN) verglichen mit Kontroll-Ratten (0.84 ± 0.11 in Ko) hoch signifikant herabreguliert erschien ($p < 0.0001$ Ko vs. Ad und Ko vs. Ad+RDN, vgl. *Abbildung 25: Renale Expression mitochondrialer anti-oxidativer Proteine*). Durch renale Denervation konnte kein erneuter Anstieg in der Prx III-Expression beobachtet werden (Ad+RDN vs. Ad $p = 0.90$).

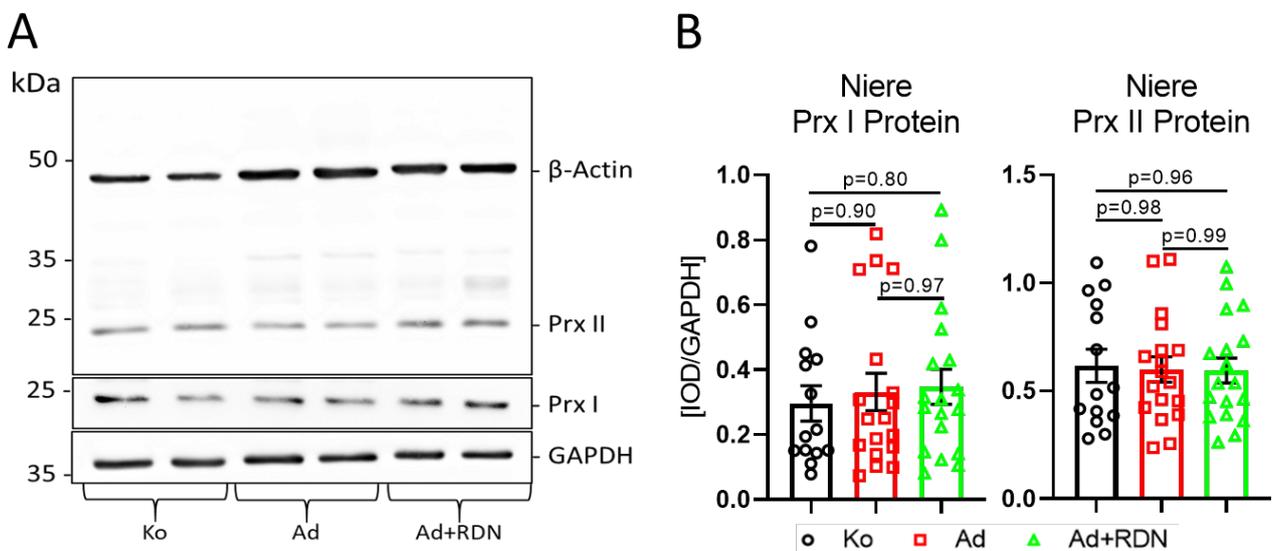


Abbildung 24: Renale Expression cytosolischer anti-oxidativer Proteine

A: Repräsentative Immunoblots zur renalen Proteinexpression von Prx I (20-25kDa) und Prx II (25kDa) in Kontrollen (Ko), Adenin-gefütterten Ratten (Ad) und Adenin-gefütterten Ratten mit renaler Denervation (Ad+RDN). Das „house-keeping Gen“ GAPDH diente als Ladekontrolle.

B: Immunchemische Quantifizierung der Proteinexpression von Prx I (links) und Prx II (rechts) in Nierenhomogenat der linken und rechten Niere in Ko ($n = 7$ Tiere), Ad ($n = 9$ Tiere) und Ad+RDN ($n = 9$ Tiere). One-way ANOVA mit Tukey's multiple comparison Test wurde zur statistischen Analyse verwendet. Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM gezeigt.

GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; IOD: Integrated Optical Density; Prx: Peroxiredoxin

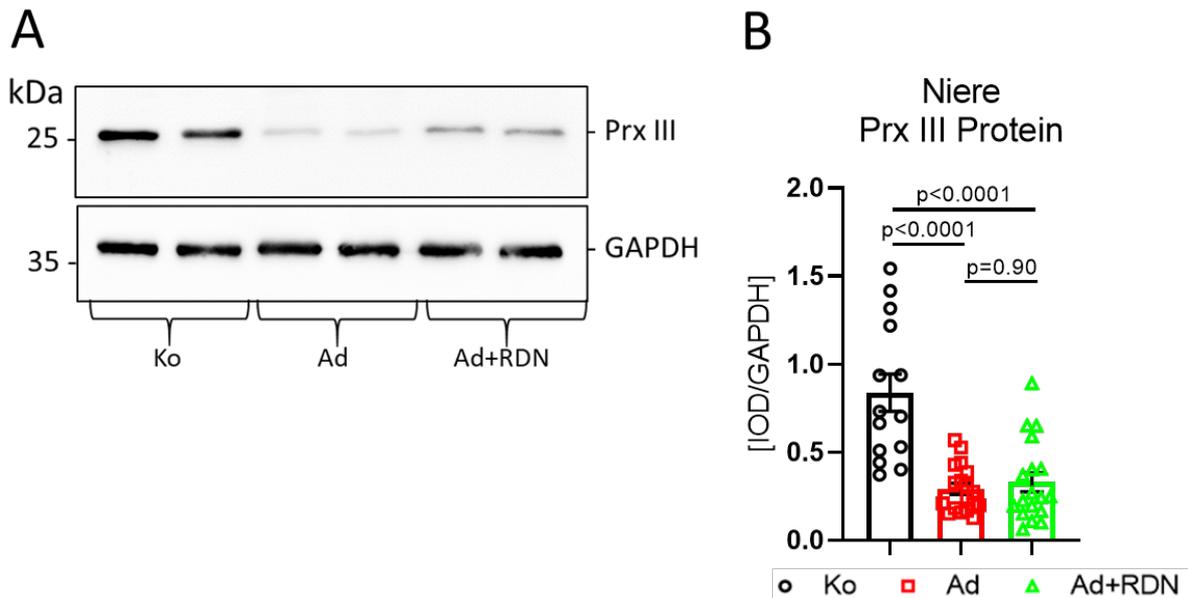


Abbildung 25: Renale Expression mitochondrialer anti-oxidativer Proteine

A: Repräsentativer Immunoblot zur renalen Proteinexpression von Prx III (25kDa) in Kontrollen (Ko), Adenin-gefütterten Ratten (Ad) und Adenin-gefütterten Ratten mit renaler Denervation (Ad+RDN). Das „house-keeping Gen“ GAPDH diente als Ladekontrolle.

B: Immunchemische Quantifizierung der Proteinexpression von Prx III in Nierenhomogenat der linken und rechten Niere in Ko (n=7 Tiere), Ad (n=9 Tiere) und Ad+RDN (n=9 Tiere). One-way ANOVA mit Tukey's multiple comparison Test wurde zur statistischen Analyse verwendet. Alle Daten sind als Mittelwert±SEM gezeigt.

GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; IOD: Integrated Optical Density; Prx: Peroxiredoxin

Als Markerprotein oxidativen Stresses fungiert das Enzym Hämoxxygenase 1 (HO-1), das unter physiologischen Bedingungen bei ausgeglichenem Redox-Verhältnis nur in geringem Maße exprimiert wird. Seine Expression wird erst als Mechanismus zur Abwehr bei verstärktem oxidativen Stress kompensatorisch induziert.^{1,72}

In der Western Blot-Analyse ergab sich eine signifikant erhöhte Proteinexpression von HO-1 in Adenin-gefütterten Ratten (0.36 ± 0.07 in Ad) im Vergleich zu Kontrollen (0.07 ± 0.02 in Ko, $p=0.004$ vs. Ad). Durch renale Denervation ließ sich keine Reduktion von HO-1 gegenüber den ausschließlich Adenin-gefütterten Tieren erzielen (0.31 ± 0.05 in Ad+RDN, $p=0.93$ vs. Ad) (vgl. *Abbildung 26: Renale Expression von Markerproteinen oxidativen Stresses*).

Der erhöhte HO-1-Gehalt in der Adenin- bzw. Adenin+RDN-Gruppe stellt einen Indikator für verstärkten oxidativen Stress der Nierenzellen dieser Tiere im Verhältnis zur Kontroll-Gruppe dar. Dies lässt vermuten, dass die Adenin-Nephropathie im Nierengewebe oxidativen Stress induziert, der durch renale Denervation nicht beeinflusst wird.

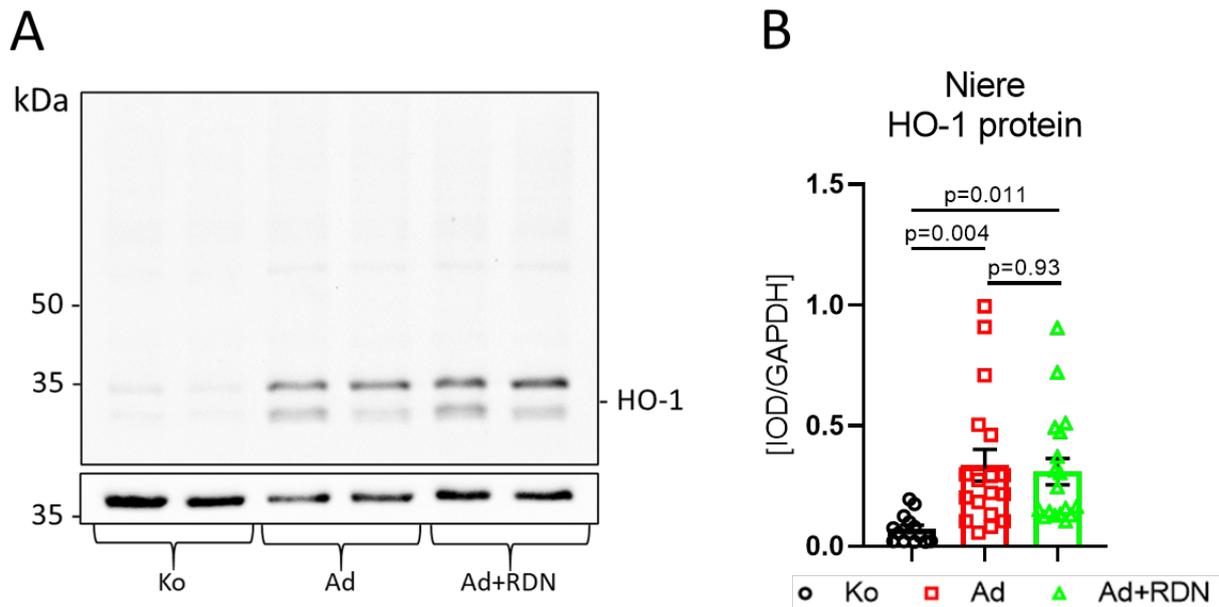


Abbildung 26: Renale Expression von Markerproteinen oxidativen Stresses

A: Repräsentativer Immunoblot zur renalen Proteinexpression von HO-1 (28kDa) in Kontrollen (Ko), Adenin-gefütterten Ratten (Ad) und Adenin-gefütterten Ratten mit renaler Denervation (Ad+RDN). Das „house-keeping Gen“ GAPDH diente als Ladekontrolle.

B: Immunchemische Quantifizierung der Proteinexpression von HO-1 in Nierenhomogenat der linken und rechten Niere in Ko (n=7 Tiere), Ad (n=9 Tiere) und Ad+RDN (n=9 Tiere). One-way ANOVA mit Tukey's multiple comparison Test wurde zur statistischen Analyse verwendet. Alle Daten sind als Mittelwert±SEM gezeigt.

GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; HO: Hämoxigenase; IOD: Integrated Optical Density

Insgesamt lässt sich durch die Ergebnisse der Western Blot-Analyse vermuten, dass eine chronische Nierenerkrankung mit verstärktem oxidativen Stress durch erhöhte endogene ROS-Produktion und erniedrigte enzymatische Abwehrmechanismen assoziiert ist. Eine renale Denervation scheint keinen protektiven Einfluss auf die Entstehung des oxidativen Stresses zu haben.

4.1.3 Expression blutdruckregulierender Proteine in der Niere

Um die Rolle einer gesteigerten neurohumoralen Aktivierung im Sinne einer erhöhten Sympathikusaktivität als möglichen Mechanismus der kardiovaskulären Schädigung bei CKD zu untersuchen, wurde die renale Expression von Proteinen, die an der Regulation der Aktivität des sympathischen Nervensystems und des Blutdrucks beteiligt sind, mit Hilfe der Western Blot-Analyse quantifiziert.

Durch Oxidation der Aminosäure Tyrosin zu L-Dopa ist das Enzym Tyrosinhydroxylase (TH) als Schlüsselenzym an der Synthese der als Neurotransmitter im sympathischen Nervensystem fungierenden Katecholamine Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin beteiligt.¹⁰³

Die Western Blot-Analyse ließ keine wesentliche Regulation der TH-Expression zwischen den Gruppen erkennen. Es ergab sich in Kontrollen ein mittlerer Wert von 0.22 ± 0.05 , in Adenin-gefütterten Ratten 0.29 ± 0.05 und in Adenin-gefütterten Ratten mit renaler Denervation 0.26 ± 0.05 . Die Zunahme der TH-Expression in der Adenin-Gruppe gegenüber den Kontrolltieren war somit nicht signifikant ($p=0.62$). Ebenso konnte bei renal denervierten Tieren keine signifikante Abnahme der Proteinexpression verglichen mit Adenin-gefütterten Tieren festgestellt werden ($p=0.91$ Ad vs. Ad+RDN) (vgl. *Abbildung 27: Renale Expression Katecholamin-produzierender Proteine*).

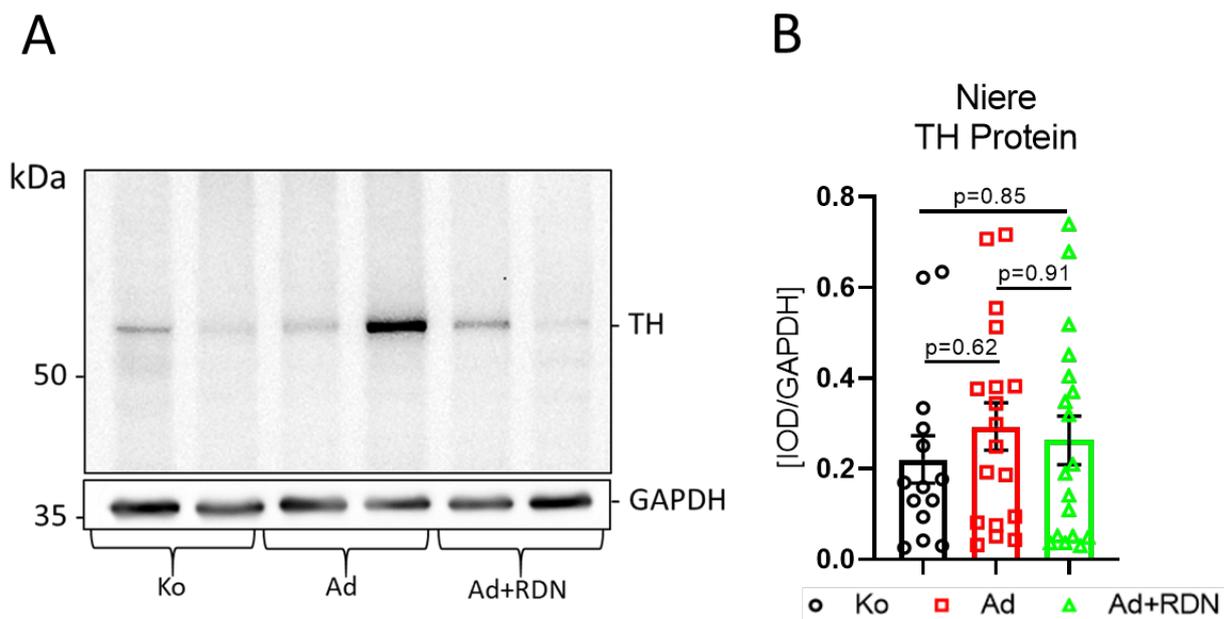


Abbildung 27: Renale Expression Katecholamin-produzierender Proteine

A: Repräsentativer Immunoblot zur renalen Proteinexpression von TH (60kDa) in Kontrollen (Ko), Adenin-gefütterten Ratten (Ad) und Adenin-gefütterten Ratten mit renaler Denervation (Ad+RDN). Das „house-keeping Gen“ GAPDH diente als Ladekontrolle.

B: Immunchemische Quantifizierung der Proteinexpression von TH in Nierenhomogenat der linken und rechten Niere in Ko (n=7 Tiere), Ad (n=9 Tiere) und Ad+RDN (n=9 Tiere). One-way ANOVA mit Tukey's multiple comparison Test wurde zur statistischen Analyse verwendet. Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM gezeigt.

GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; IOD: Integrated Optical Density; TH: Tyrosinhydroxylase

CD 10 (Cluster of differentiation 10), auch als Nephilysin bezeichnet, ist eine membranständige Metalloendoprotease, die besonders stark in Niere und Lunge exprimiert wird und durch ihre enzymatische Aktivität eine Vielzahl von Peptidhormonen spaltet und abbaut. Zu den Substraten des Enzyms zählen u.a. Peptide, die auf unterschiedliche Weise an der Blutdruckregulation beteiligt sind. So werden beispielsweise AT I und II, die natriuretischen Peptide ANP und BNP sowie Bradykinine durch Nephilysin abgebaut.⁶

Die renale Nephilysin-Expression zeigte in der Western Blot Analyse nur geringgradige Veränderungen zwischen den Gruppen. Zwischen Kontrollen und Adenin-gefütterten Tieren nahm die Proteinexpression von 0.36 ± 0.06 in Ko auf 0.48 ± 0.05 in Ad nicht signifikant zu

($p=0.23$). Auch durch renale Denervation ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede zu den sham-operierten Adenin-gefütterten Tieren (0.41 ± 0.04 in Ad+RDN, $p=0.54$ vs. Ad) (vgl. *Abbildung 28: Renale Expression blutdruckregulierender Proteine*).

Die Renalase ist eine kürzlich entdeckte, vorwiegend in der Niere gebildete und ins Blut sezernierte Monoaminoxidase, deren mögliche Rolle in der Blutdruckregulation durch Abbau zirkulierender Katecholamine sowie deren Bedeutung für die Pathogenese kardiovaskulärer Komorbiditäten bei CKD in der Literatur kontrovers diskutiert werden.^{124,5} Während in einigen Studien ein deutlicher Mangel dieses Enzyms bei Patient*innen mit chronischer Nierenerkrankung beschrieben wird^{124,5,21}, berichten andere hingegen von erhöhten Plasmaspiegeln in CKD-Patient*innen¹²¹. Daher bleibt die Bedeutung der Renalase in der Pathogenese kardiovaskulärer Komorbiditäten bei CKD weiterhin zu klären und im Fokus aktueller Forschung.

In der Western Blot-Analyse konnte eine hoch signifikante Abnahme der renalen Expression von Renalase in Adenin-gefütterten Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren gezeigt werden. Gesunde Kontrollen erzielten einen durchschnittlichen Wert von 0.82 ± 0.08 , während dieser bei Adenin-gefütterten Ratten auf 0.31 ± 0.03 sank ($p<0.0001$). Bei renal denervierten Ratten zeigte sich kein signifikanter Unterschied gegenüber ausschließlich Adenin-gefütterten Ratten (0.26 ± 0.02 in Ad+RDN, $p=0.64$ vs. Ad) (vgl. *Abbildung 28: Renale Expression blutdruckregulierender Proteine*).

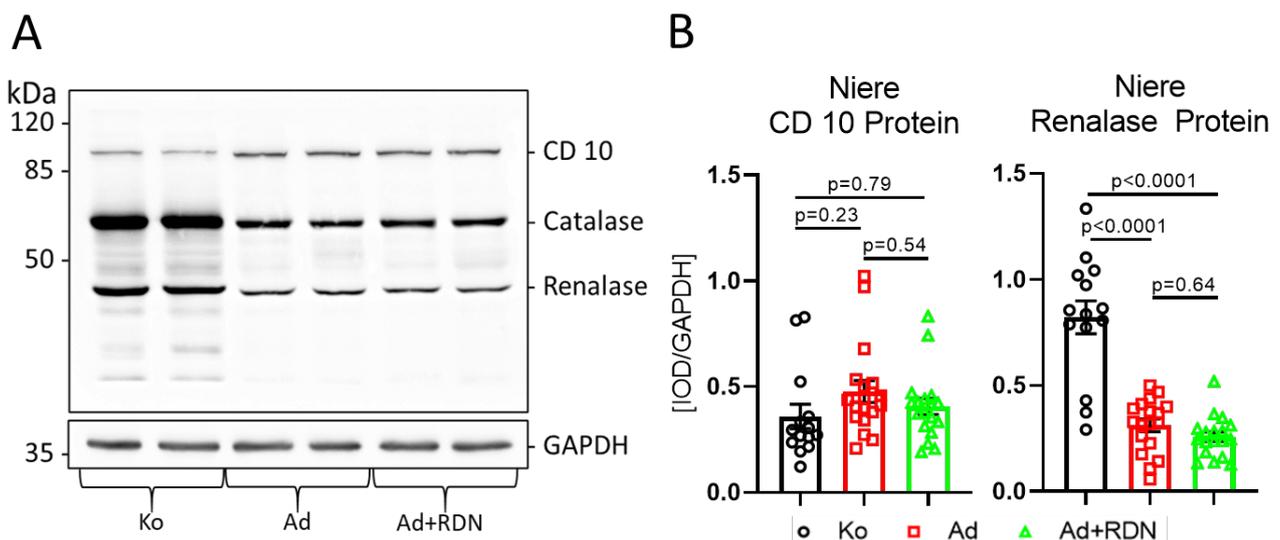


Abbildung 28: Renale Expression blutdruckregulierender Proteine

A: Repräsentative Immunoblots zur renalen Proteinexpression von CD 10 (100kDa) und Renalase (42kDa) in Kontrollen (Ko), Adenin-gefütterten Ratten (Ad) und Adenin-gefütterten Ratten mit renaler Denervation (Ad+RDN). Das „house-keeping Gen“ GAPDH diente als Ladekontrolle. Ebenfalls aufgetragen Catalase (vgl. *Abbildung 23*).

B: Immunchemische Quantifizierung der Proteinexpression von CD 10 (links) und Renalase (rechts) in Nierenhomogenat der linken und rechten Niere in Ko ($n=7$ Tiere), Ad ($n=9$ Tiere) und Ad+RDN ($n=9$ Tiere). One-way ANOVA mit Tukey's multiple comparison Test wurde zur statistischen Analyse verwendet. Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM gezeigt.

CD: Cluster of differentiation; GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; IOD: Integrated Optical Density

Der Natrium-glucose linked transporter 2 (SGLT-2) ist ein in proximalen Tubuluszellen der Niere exprimiertes Transportprotein, dessen primäre Funktion die Rückresorption von Glucose aus dem Primärharn darstellt.^{68,107} Die Glucose-Resorption erfolgt dabei im Co-Transport mit einem Na⁺-Ion, wobei der durch die Na⁺-K⁺-ATPase aufgebaute Konzentrationsgradient für Na⁺ als Triebkraft für den Resorptionsvorgang dient. Folglich wurden Inhibitoren dieses Transportproteins als neue Strategie in der Therapie des Diabetes mellitus entwickelt. Neben der Senkung des Blutglucosespiegels durch verstärkte Glucosurie konnten eine Reduktion des systolischen Blutdrucks⁴, ein verringertes Risiko für den Tod durch kardiovaskuläre Ereignisse¹²⁵ sowie eine renoprotektive Wirkung der SGLT-2-Inhibitoren mit verzögerter Progression der CKD¹¹⁵ in Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 beobachtet werden. Darüber hinaus scheint das sympathische Nervensystem die SGLT-2-Expression zu beeinflussen.

In niereninsuffizienten Ratten stellte sich die SGLT-2-Expression in der Western Blot-Analyse signifikant gesteigert im Vergleich zu gesunden Kontroll-Ratten dar ($p=0.047$). Die Kontrolltiere erreichten mittlere Werte von 0.14 ± 0.02 , Adenin-Tiere ebenso wie Adenin+RDN-Tiere 0.26 ± 0.04 . Durch renale Denervation konnte kein Unterschied der SGLT-2-Expression verglichen mit sham-operierten Adenin-gefütterten Tieren beobachtet werden (vgl. *Abbildung 29: Renale Expression des Natrium-glucose linked transporter 2 (SGLT-2)*).

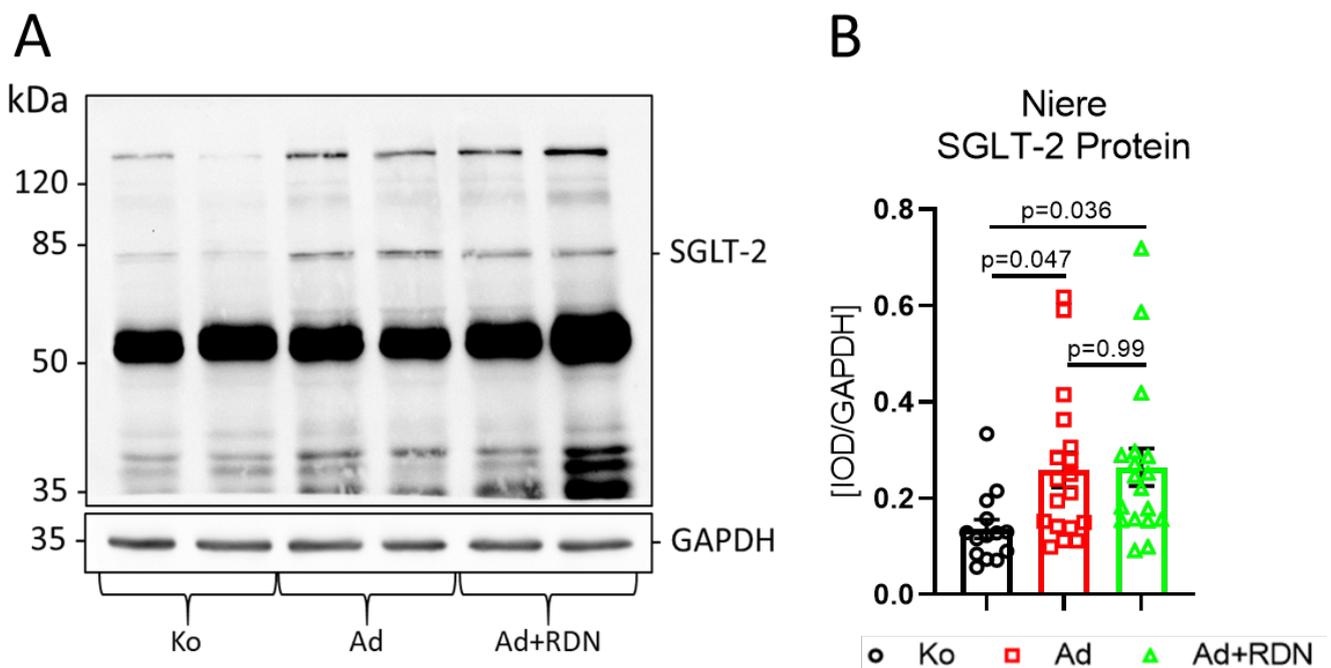


Abbildung 29: Renale Expression des Natrium-glucose linked transporter 2 (SGLT-2)

A: Repräsentativer Immunoblot zur renalen Proteinexpression von SGLT-2 (77kDa) in Kontrollen (Ko), Adenin-gefütterten Ratten (Ad) und Adenin-gefütterten Ratten mit renaler Denervation (Ad+RDN). Das „house-keeping Gen“ GAPDH diente als Ladekontrolle.

B: Immunchemische Quantifizierung der Proteinexpression von SGLT-2 in Nierenhomogenat der linken und rechten Niere in Ko ($n=7$ Tiere), Ad ($n=9$ Tiere) und Ad+RDN ($n=9$ Tiere). One-way ANOVA mit Tukey's multiple comparison Test wurde zur statistischen Analyse verwendet. Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM gezeigt.

GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; IOD: Integrated Optical Density; SGLT: Natrium-glucose linked transporter

4.1.4 Renales Remodeling

Eine chronische Nierenerkrankung geht mit strukturellen Veränderungen in der Niere im Sinne einer tubulären Atrophie und einer tubulointerstitiellen Fibrose einher, die letztlich in einen fibrotischen Umbau des Nierenparenchyms mit Destruktion von Rinde und Mark münden.¹¹⁷ Zur Charakterisierung der Auswirkungen der CKD auf strukturelle Umbauprozesse der Niere wurden Gewebeschnitte der linken und rechten Nieren der Versuchstiere pikro-siriusrot gefärbt und der prozentuale Anteil der Fibrosefläche an der Gesamtgewebefläche der Niere bestimmt.

In Adenin-gefütterten Ratten zeigte sich der Gehalt interstitieller Fibrose an der Gesamtgewebefläche hoch signifikant erhöht gegenüber gesunden Kontrolltieren. So ergab sich in der Adenin-Gruppe ein mittlerer Anteil von 50.3 ± 2.4 % interstitieller Fibrose an der Gesamtgewebefläche im Vergleich zu 13.5 ± 1.2 % in der Kontroll-Gruppe (Ko vs. Ad $p < 0.0001$). Zwischen renal denervierten und sham-operierten Adenin-gefütterten Ratten konnte kein Unterschied festgestellt werden (Ad+RDN: 51.6 ± 1.9 %, vs. Ad $p = 0.89$) (vgl. *Abbildung 30: Interstitielle Fibrose in der Niere*).

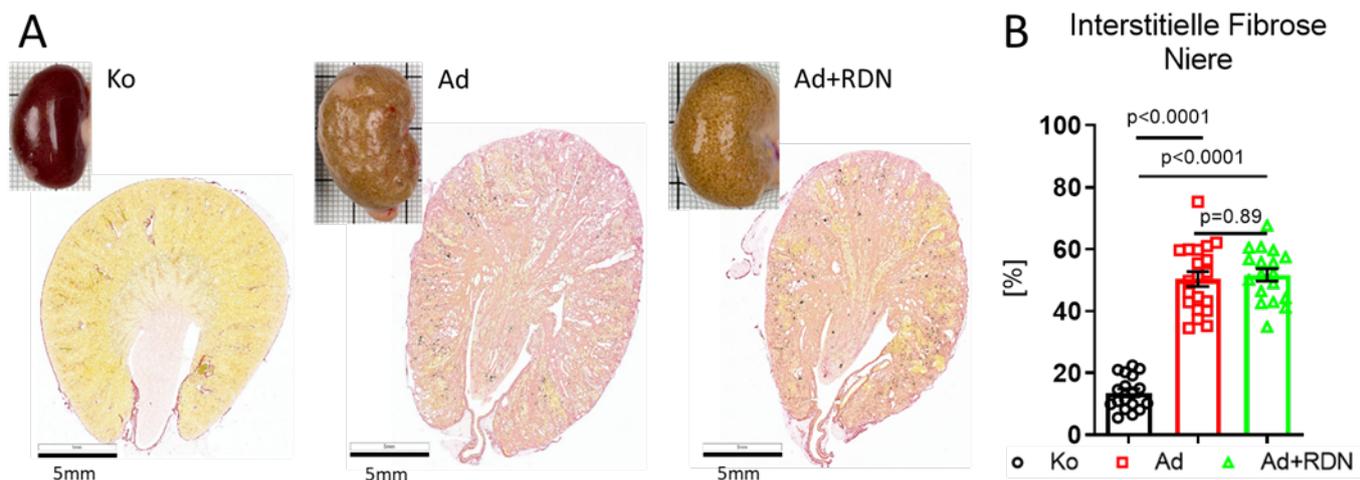


Abbildung 30: Interstitielle Fibrose in der Niere

A: Piko-siriusrot gefärbte Gewebeschnitte der linken Niere von Kontrollen (Ko), Adenin-gefütterten Ratten (Ad) und Adenin-gefütterten Ratten mit renaler Denervation (Ad+RDN). Oben: Makroskopisches Bild; unten: Übersichtsaufnahme des histologischen Präparats

B: Quantifizierung des interstitiellen Fibrosegehalts als prozentualer Anteil der Gesamtgewebefläche in Ko (n=7 Tiere), Ad (n=9 Tiere) und Ad+RDN (n=9 Tiere). One-way ANOVA mit Tukey's multiple comparison Test wurde zur statistischen Analyse verwendet. Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM gezeigt.

4.1.5 Strukturelles Remodeling des linken Vorhofs

Als mögliche Pathomechanismen der Entstehung atrialer Arrhythmien sind Remodelingvorgänge des linken Vorhofs von Bedeutung, die die Erregungsweiterleitung beeinflussen und die Entstehung von Reentry-Kreisläufen begünstigen. Neben einer Zunahme der linksatrialen Größe spielen strukturelle Umbauprozesse des Vorhofs eine bedeutende Rolle. Dazu gehören neben der Hypertrophie atrialer Kardiomyozyten auch eine gesteigerte interstitielle Fibrosebildung und die Zunahme der extrazellulären Matrix.⁹⁰

Zur Beurteilung des strukturellen Remodelings im Rattenmodell wurden Gewebeschnitte des linken Vorhofs der Versuchstiere hinsichtlich myozytärer Hypertrophie, des interstitiellen Fibrosegehalts sowie des Gehalts sympathischer Nervenfasern untersucht.

Die Untersuchung der Hypertrophie erfolgte an HE-gefärbten Gewebeschnitten durch Ausmessung des Durchmessers und der Querschnittsfläche der Kardiomyozyten des linken Vorhofs. Wie *Abbildung 31B* zeigt, ergaben sich keine relevanten Unterschiede in der Größe linksatrialer Kardiomyozyten zwischen den drei Gruppen. In Kontrolltieren maßen die Kardiomyozyten des linken Vorhofs durchschnittlich $21.8 \pm 0.32 \mu\text{m}$ im Diameter bei einer Querschnittsfläche von $485.8 \pm 30.6 \mu\text{m}^2$, in Adenin-Tieren betrug der Diameter $21.7 \pm 0.47 \mu\text{m}$ und die Querschnittsfläche $419.1 \pm 28.7 \mu\text{m}^2$. In den Ad+RDN-Tieren wurden ein Diameter von $21.1 \pm 0.75 \mu\text{m}$ und eine Fläche von $439.3 \pm 38.3 \mu\text{m}^2$ gemessen. Die histologische Auswertung der linksatrialen Kardiomyozyten ließ also keine Hypertrophie in Adenin-gefütterten Ratten erkennen.

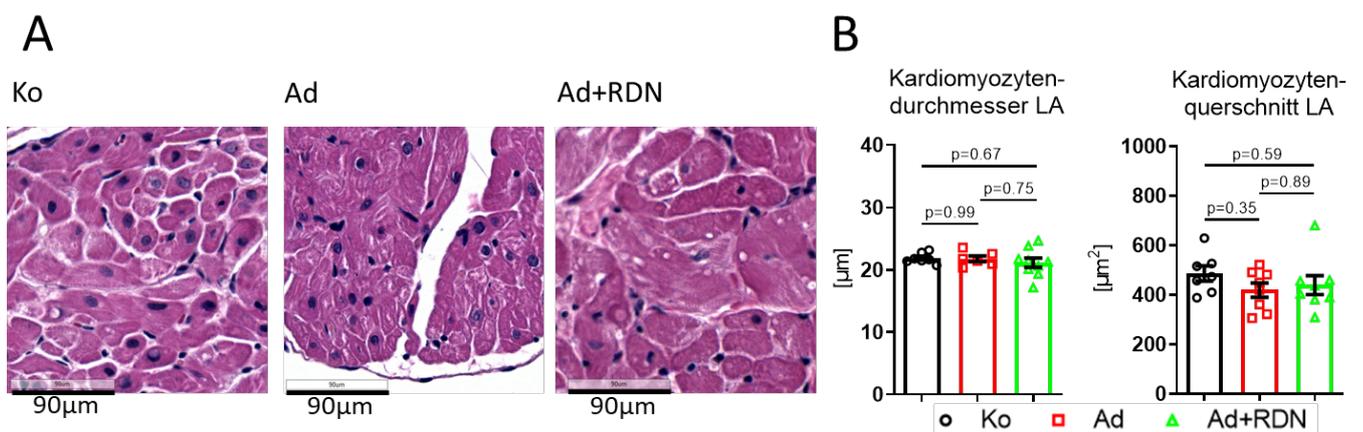


Abbildung 31: Myozytenhypertrophie im linken Vorhof (LA)

A: Repräsentative Ausschnitte Hämatoxylin-eosin-gefärbter Gewebeschnitte des linken Vorhofs von Kontrollen (Ko, n=7), Adenin-gefütterten Ratten (Ad, n=8) und Adenin-gefütterten Ratten mit renaler Denervation (Ad+RDN, n=8)

B: Ausgemessene Größe der Kardiomyozyten im linken Vorhof als Durchmesser in μm (links) und Querschnittsfläche in μm^2 (rechts).

Zur Fibrose-Auswertung wurden histologische Gewebeschnitte Piko-Siriusrot gefärbt und der interstitielle Fibrosegehalt mit Hilfe spezieller Computersoftware (NIS elements, Nikon) quantifiziert. Darüber hinaus wurde die Expression von Collagen 1A2 im linken Vorhof mittels Western Blot-Analyse untersucht.

Die Quantifizierung der interstitiellen Fibrose des linken Vorhofs ergab für Kontrollen einen mittleren prozentualen Gehalt von 6.4 ± 0.51 %, für Adenin-gefütterte Tiere 16.8 ± 1.3 % und für Adenin-gefütterte Ratten mit renaler Denervation 8.8 ± 0.64 % der Gesamtgewebefläche. Damit zeigte sich die interstitielle Fibrose in der Adenin-Gruppe hoch signifikant erhöht gegenüber der Kontroll-Gruppe ($p < 0.0001$). Durch die renale Denervation konnte die Bildung interstitieller Fibrose verhindert werden ($p < 0.0001$ Ad vs. Ad+RDN) (vgl. *Abbildung 32: Strukturelles Remodeling im linken Vorhof (LA). A, B*).

Zudem sollte der Vorhof auch biochemisch auf die Expression von Collagen 1A2 (Col1A2) untersucht werden.

In der Western Blot-Analyse konnte keine Regulation der Proteinexpression von Col1A2 im linken Vorhof festgestellt werden. Bei den Tieren der Adenin-Gruppe war die Col1A2-Expression mit 0.51 ± 0.18 statistisch nicht signifikant erhöht gegenüber den Kontrollen mit 0.42 ± 0.06 ($p = 0.88$). Auch die Abnahme des Collagen 1A2-Gehalts zwischen Adenin- und Adenin+RDN-Gruppe war statistisch nicht signifikant (0.21 ± 0.01 in Ad+RDN, $p = 0.29$ Ad vs. Ad+RDN) (vgl. *Abbildung 32: Strukturelles Remodeling im linken Vorhof (LA) C, D*).

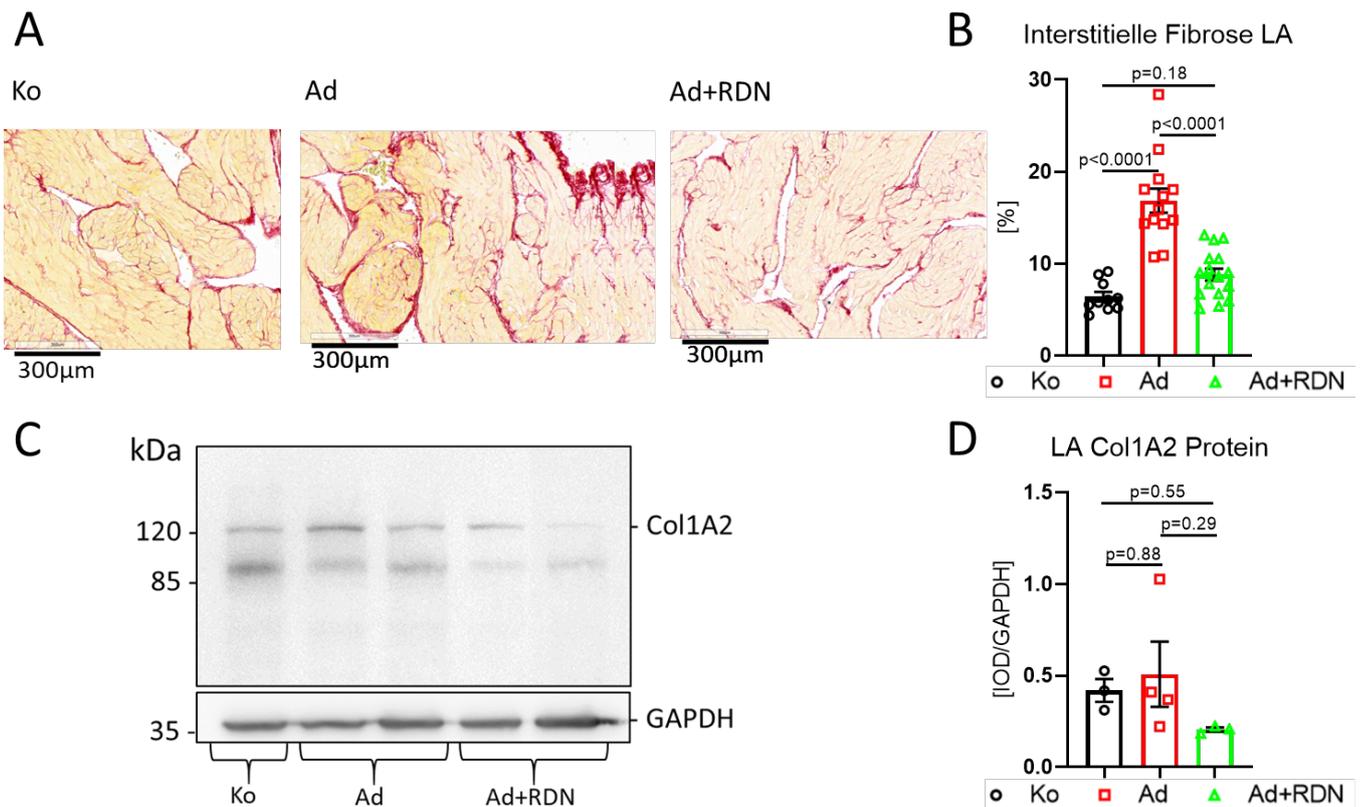


Abbildung 32: Strukturelles Remodeling im linken Vorhof (LA)

A: Picro-Siriusrot gefärbte Gewebeschnitte des linken Vorhofs von Kontrollen (Ko), Adenin-gefütterten Ratten (Ad) und Adenin-gefütterten Ratten mit renaler Denervation (Ad+RDN).

B: Quantifizierung des interstitiellen Fibrosegehalts als prozentualer Anteil der Gesamtgewebefläche in Ko (n=10 Tiere), Ad (n=13 Tiere) und Ad+RDN (n=16 Tiere). One-way ANOVA mit Tukey's multiple comparison Test wurde zur statistischen Analyse verwendet. Alle Daten sind als Mittelwert±SEM gezeigt.

C: Repräsentativer Immunoblot zur linksatrialen Proteinexpression von Collagen 1A2 (Col1A2, 130kDa) in Kontrollen (Ko), Adenin-gefütterten Ratten (Ad) und Adenin-gefütterten Ratten mit renaler Denervation (Ad+RDN). Das „house-keeping Gen“ GAPDH diente als Ladekontrolle.

D: Immunchemische Quantifizierung der Proteinexpression von Col1A2 in Homogenat des linken Vorhofs in Ko (n=3 Tiere), Ad (n=4 Tiere) und Ad+RDN (n=4 Tiere). One-way ANOVA mit Tukey's multiple comparison Test wurde zur statistischen Analyse verwendet. Alle Daten sind als Mittelwert±SEM gezeigt.

Col: Collagen; GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; IOD: Integrated Optical Density

Zur Darstellung der sympathischen Innervation des linken Vorhofs wurden Gewebeschnitte der Versuchstiere immunhistologisch gegen Tyrosinhydroxylase gefärbt und der Anteil des gefärbten Gewebes an der Gesamtgewebefläche des linken Vorhofs mit Hilfe spezieller Computersoftware (NIS elements, Nikon) ermittelt. Zusätzlich wurde die linksatriale Proteinexpression von Tyrosinhydroxylase immunchemisch mittels Western Blot-Analyse quantifiziert.

In der immunhistologischen Untersuchung ergab sich für Kontrolltiere im Mittel ein Anteil von 0.25 ± 0.05 %, für Adenin-gefütterte Tiere 0.32 ± 0.07 % und für Adenin-gefütterte Tiere mit renaler Denervation 0.39 ± 0.11 % der Tyrosinhydroxylase-gefärbten Areale an der Gesamtgewebefläche des linken Vorhofs. Die Änderungen des Tyrosinhydroxylasegehalts

waren somit zwischen allen drei Gruppen nicht signifikant (vgl. *Abbildung 33: Tyrosinhydroxylase-Gehalt im linken Vorhof (LA)*).

Auch die immunchemische Quantifizierung der Tyrosinhydroxylase ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Für die Kontroll-Gruppe ergab sich in der Western Blot-Analyse ein mittlerer Wert von 0.06 ± 0.02 , für die Adenin-Gruppe 0.07 ± 0.02 und für die Adenin+RDN-Gruppe 0.15 ± 0.03 (vgl. *Abbildung 33: Tyrosinhydroxylase-Gehalt im linken Vorhof (LA)*).

Es konnte somit sowohl immunhistologisch als auch immunchemisch keine relevante Regulation der sympathischen Innervation des linken Vorhofs zwischen den drei Gruppen festgestellt werden.

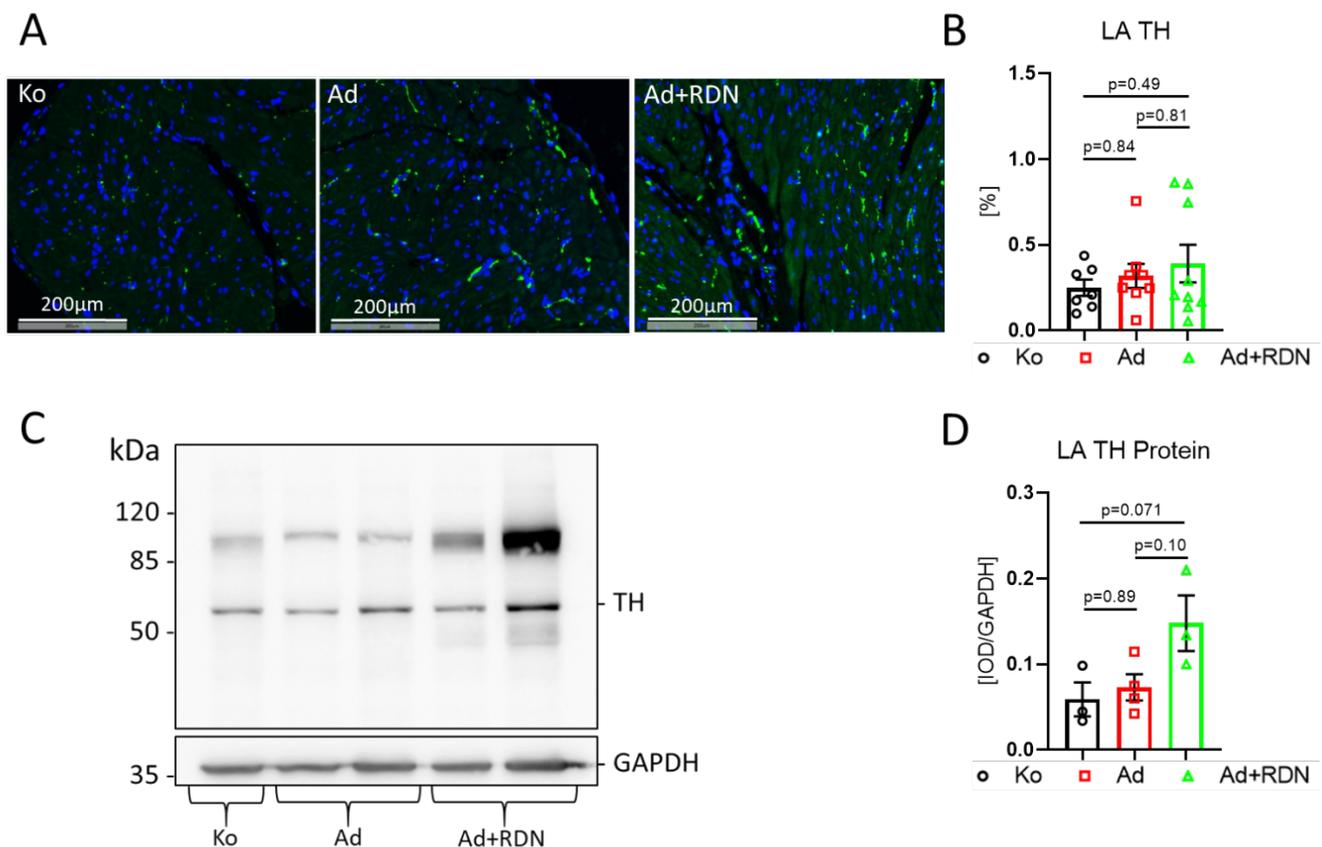


Abbildung 33: Tyrosinhydroxylase-Gehalt im linken Vorhof (LA)

A: Repräsentative Ausschnitte immunhistochemisch gefärbter Gewebeschnitte des linken Vorhofs von Kontrollen (Ko), Adenin-gefütterten Ratten (Ad) und Adenin-gefütterten Ratten mit renaler Denervation (Ad+RDN). Grün: Tyrosinhydroxylase (TH), blau: DAPI

B: Quantifizierung des Tyrosinhydroxylasegehalts als prozentualer Anteil der Gesamtgewebefläche in Ko (n=7 Tiere), Ad (n=9 Tiere) und Ad+RDN (n=9 Tiere). One-way ANOVA mit Tukey's multiple comparison Test wurde zur statistischen Analyse verwendet. Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM gezeigt.

C: Repräsentativer Immunoblot zur linksatrialen Proteinexpression von TH (60kDa) in Ko (n=3 Tiere), Ad (n=4 Tiere) und Ad+RDN (n=4 Tiere). Das „house-keeping Gen“ GAPDH diente als Ladekontrolle.

D: Immunchemische Quantifizierung der Proteinexpression von TH in Homogenat des linken Vorhofs in Ko (n=3 Tiere), Ad (n=4 Tiere) und Ad+RDN (n=4 Tiere). One-way ANOVA mit Tukey's multiple comparison Test wurde zur statistischen Analyse verwendet. Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM gezeigt.

DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol; GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; IOD: Integrated Optical Density

In der Zusammenschau der Ergebnisse konnte in unserem Rattenmodell somit als vorwiegender proarrhythmischer Remodelingprozess im linken Vorhof niereninsuffizienter Tiere eine Zunahme des interstitiellen Fibrosegehalts festgestellt werden. Durch renale Denervation war dieser Prozess reversibel und es konnte eine Reduktion der interstitiellen Fibrose erzielt werden. Für eine Hypertrophie sowie eine verstärkte sympathische Innervation ergab sich kein Anhalt.

4.1.6 Elektrophysiologisches Remodeling des linken Vorhofs

Um mögliche elektrophysiologische Auffälligkeiten aufzudecken, wurden den Versuchstieren im Rahmen der Terminalversuche jeweils ein Zwei-Kanal-EKG abgeleitet und P-Welle sowie PQ-Intervall als Korrelat der atriale Erregungsausbreitung ausgemessen.

Bei Kontrolltieren betrug die P-Wellen-Dauer im Mittel 22.62 ± 0.92 ms. In Adenin-gefütterten Tieren stellte sich die P-Welle mit einer durchschnittlichen Dauer von 31.28 ± 1.30 ms signifikant prolongiert gegenüber den Kontrollen ($p=0.0005$) dar, während diese bei Adenin-gefütterten renal denervierten Tieren mit 24.12 ± 1.40 ms wieder signifikant (Ad vs. Ad+RDN $p=0.001$) auf Werte vergleichbar derer der Kontroll-Gruppe sank (vgl. *Abbildung 34: Elektrophysiologisches Remodeling im linken Vorhof (LA)*). Dies lässt schließen, dass eine chronische Nierenerkrankung zu einer signifikanten Verlängerung der P-Welle als Ausdruck einer verlangsamten atrialen Erregungsausbreitung führt, die durch renale Denervation potentiell reversibel ist.

Für die Dauer des PQ-Intervalls ergab sich eine signifikante Verlängerung von 51.04 ± 0.85 ms in Kontrollen zu 62.88 ± 1.93 ms in Adenin-gefütterten Tieren ($p=0.001$). Die renale Denervation führte hingegen zu keiner Normalisierung der PQ-Intervalls-Dauer (Ad+RDN: 58.94 ± 2.34 ms; $p=0.26$ vs. Ad) (vgl. *Abbildung 34: Elektrophysiologisches Remodeling im linken Vorhof*).

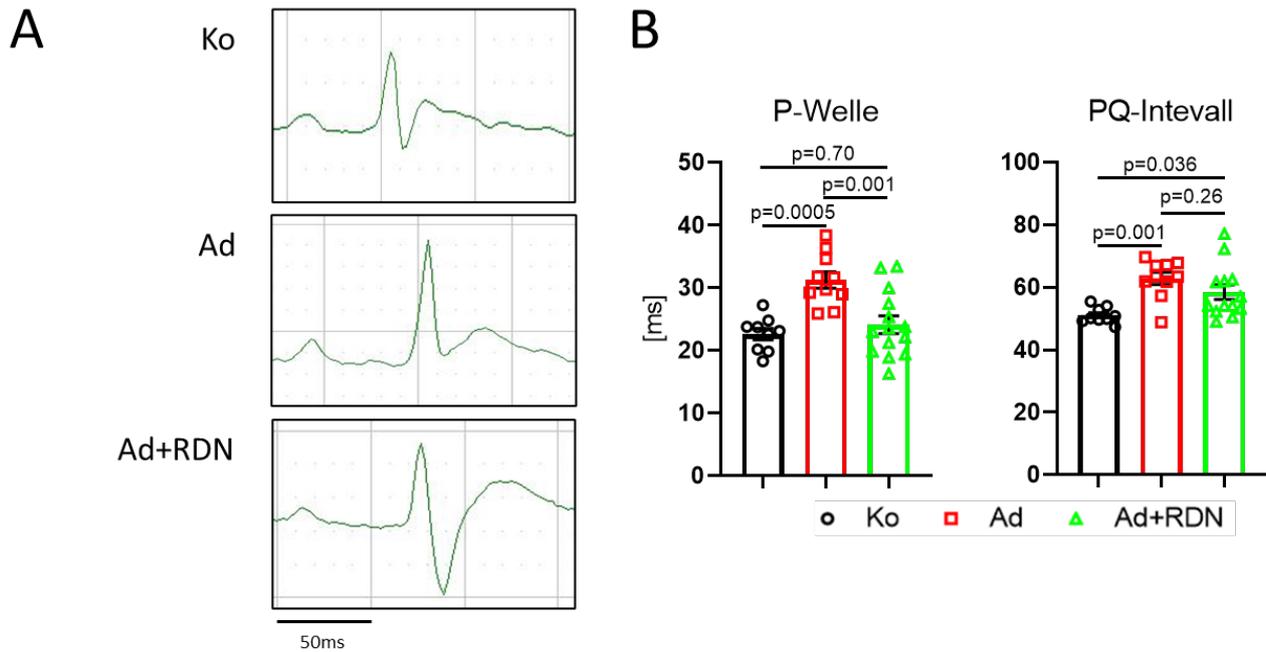


Abbildung 34: Elektrophysiologisches Remodeling im linken Vorhof (LA)

A: Repräsentativer Herzschlag aus dem EKG von Kontrollen (Ko), Adenin-gefütterten Ratten (Ad) und Adenin-gefütterten Ratten mit renaler Denervation (Ad+RDN).

B: Gemessene Dauer von P-Welle und PQ-Intervall in Millisekunden (ms) in Ko (n=9 Tiere), Ad (n=10 Tiere) und Ad+RDN (n=13 Tiere). One-way ANOVA mit Tukey's multiple comparison Test wurde zur statistischen Analyse verwendet. Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM gezeigt.

4.1.7 Remodeling des linken Ventrikels

Um der Fragestellung nachzugehen, inwiefern kardiale Remodelingvorgänge im Rahmen der CKD auch den linken Ventrikel betreffen, wurden histologische Gewebeschnitte der Versuchstiere hinsichtlich linksventrikulärer Fibrose sowie Hypertrophie untersucht.

Die Fibroseauswertung erfolgte an Piko-Siriusrot gefärbten Präparaten. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede des Gehalts interstitieller Fibrose im linken Ventrikel der Tiere aller drei Gruppen. Für Kontrolltiere ergab sich ein mittlerer prozentualer Anteil von 4.5 ± 0.50 % Fibrose an der Gesamtgewebefläche, für Adenin-gefütterte Tiere 4.9 ± 0.35 % und für Adenin-gefütterte Tiere mit renaler Denervation 4.9 ± 0.56 % (vgl. *Abbildung 35: Interstitielle Fibrose im linken Ventrikel (LV)*).

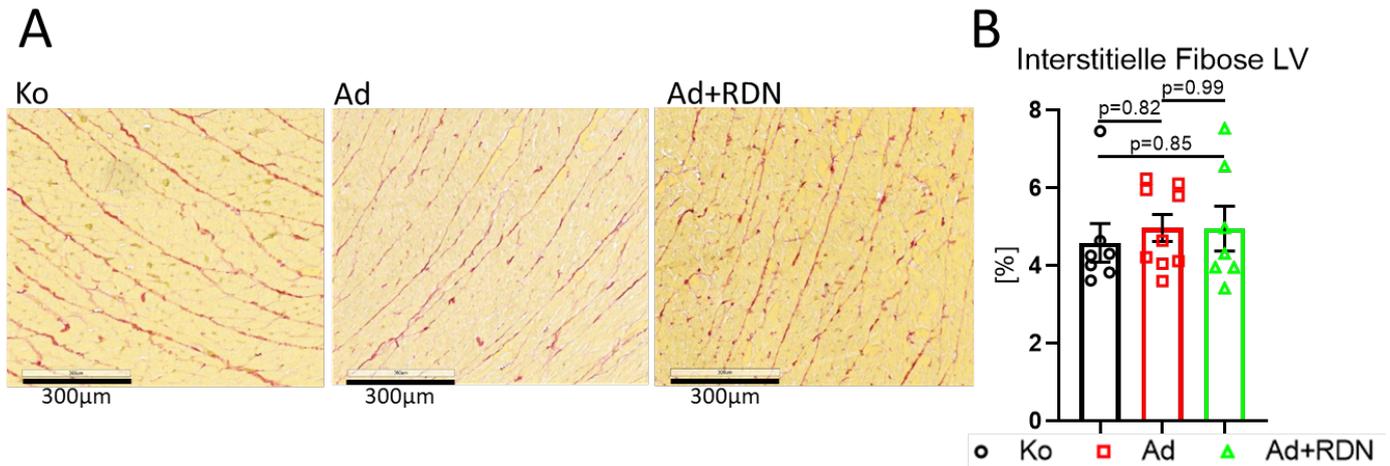


Abbildung 35: Interstitielle Fibrose im linken Ventrikel (LV)

A: Repräsentative Ausschnitte Picro-Siriusrot gefärbter Gewebeschnitte der linken Ventrikel von Kontrollen (Ko), Adenin-gefütterten Ratten (Ad) und Adenin-gefütterten Ratten mit renaler Denervation (Ad+RDN).

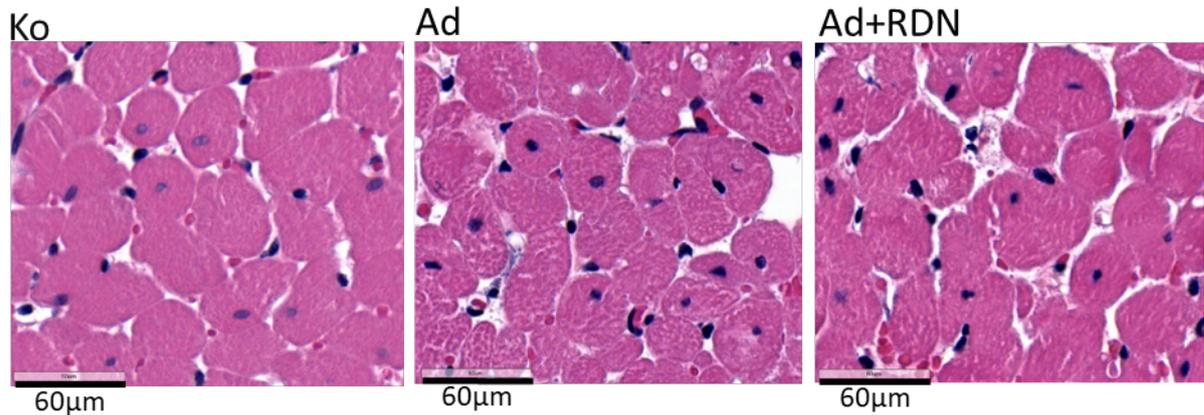
B: Quantifizierung des interstitiellen Fibrosegehalts des linken Ventrikels als prozentualer Anteil der Gesamtgewebefläche in Ko (n=7 Tiere), Ad (n=9 Tiere) und Ad+RDN (n=7 Tiere).

One-way ANOVA mit Tukey's multiple comparison Test wurde zur statistischen Analyse verwendet. Alle Daten sind als Mittelwert±SEM gezeigt.

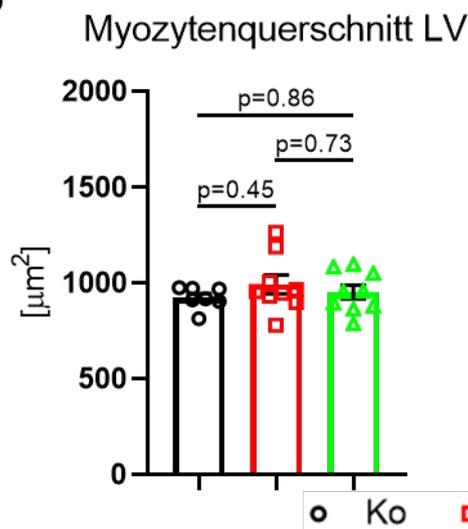
Zur Bestimmung der Größe linksventrikulärer Kardiomyozyten wurde deren Querschnittsfläche in Hämatoxylin-eosin gefärbten histologischen Präparaten ausgemessen. Auch hinsichtlich der Myozytengröße konnten mit einer mittleren Querschnittsfläche von $924.3 \pm 21.6 \mu\text{m}^2$ in Kontrollen, $994.4 \pm 49.1 \mu\text{m}^2$ in Adenin-gefütterten Tieren und $953.6 \pm 35.5 \mu\text{m}^2$ in Adenin-gefütterten Tieren mit renaler Denervation keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tiergruppen festgestellt werden (vgl. *Abbildung 36: Myozytenhypertrophie im linken Ventrikel (LV) A,B*).

Neben der histologischen Analyse struktureller Veränderungen des linken Ventrikels wurde als biochemisches Markerprotein für ventrikuläre Hypertrophie das Hormon Brain natriuretic peptide (BNP) herangezogen. Dabei wurde die Plasma-Konzentration seines Vorläuferspaltprodukts N-terminal pro brain natriuretic peptide (NT-proBNP) als klinischen Signalpeptid mittels ELISA-Technik bestimmt. Die Plasmakonzentration des inaktiven Spaltprodukts NT-proBNP war mit $1200.0 \pm 47.0 \text{ pg/ml}$ in Ad und $1088.0 \pm 36.1 \text{ pg/ml}$ in Ad+RDN in niereninsuffizienten Ratten geringgradig vermindert gegenüber $1338.0 \pm 85.4 \text{ pg/ml}$ in Kontrollen (vgl. *Abbildung 36: Myozytenhypertrophie im linken Ventrikel (LV) C*).

A



B



C

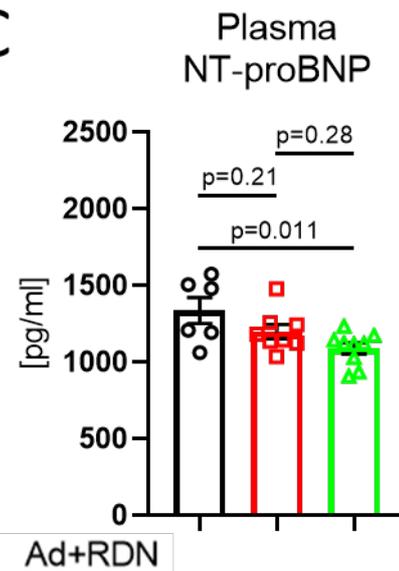


Abbildung 36: Myozytenhypertrophie im linken Ventrikel (LV)

A: Repräsentative Ausschnitte Hämatoxylin-eosin-gefärbter Gewebeschnitte des linken Ventrikels von Kontrollen (Ko, n=7), Adenin-gefütterten Ratten (Ad, n=9) und Adenin-gefütterten Ratten mit renaler Denervation (Ad+RDN, n=9)

B: Gemessene Querschnittsfläche der Kardiomyozyten im linken Ventrikel in μm^2 . Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM gezeigt.

C: Mittels ELISA-Technik bestimmte Plasmakonzentration des inaktiven Spaltprodukts des Hypertrophiemarkers Brain natriuretic peptide (NT-proBNP) von Ko (n=6), Ad (n=8) und Ad+RDN (n=9).

One-way ANOVA mit Tukey's multiple comparison Test wurde zur statistischen Analyse verwendet. Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM gezeigt.

BNP=Brain natriuretic peptide; LV=linker Ventrikel; NT-proBNP=N-terminal pro BNP; RV=rechter Ventrikel

Insgesamt konnten in der Untersuchung des linken Ventrikels keine Remodelingprozesse auf Ventrikel Ebene festgestellt werden.

4.2 Präventionsgruppe

Nachdem in den bisherigen Versuchen charakteristische durch die chronische Nierenerkrankung induzierte pathophysiologische Veränderungen von Herz und Niere im Rattenmodell gezeigt werden konnten und die renale Denervation als mögliche therapeutische Intervention untersucht wurde, sollte nun in einem weiteren Versuch geklärt werden, inwiefern eine renale Denervation als präventiv durchgeführte Maßnahme die Nierenfunktion verbessern bzw. die Entstehung einer chronischen Nierenerkrankung hinauszögern kann.

Dazu diente eine neue Tiergruppe, bei der die Versuchstiere erneut analog zur Interventionsgruppe in eine Kontroll- (Ko), eine Adenin- (Ad) sowie eine Adenin+RDN- (Ad+RDN) Gruppe eingeteilt wurden. In diesem Versuchsaufbau wurde die Behandlung durch renale Denervation in der Ad+RDN-Gruppe bzw. Sham-Operation in der Kontroll- und der Adenin-Gruppe jedoch bereits eineinhalb Wochen vor Start der 16-wöchigen Fütterung mit 0.25% Adenin durchgeführt (vgl. *Abbildung 37A: Versuchsablauf Präventionsgruppe*).

4.2.1 Tierdaten

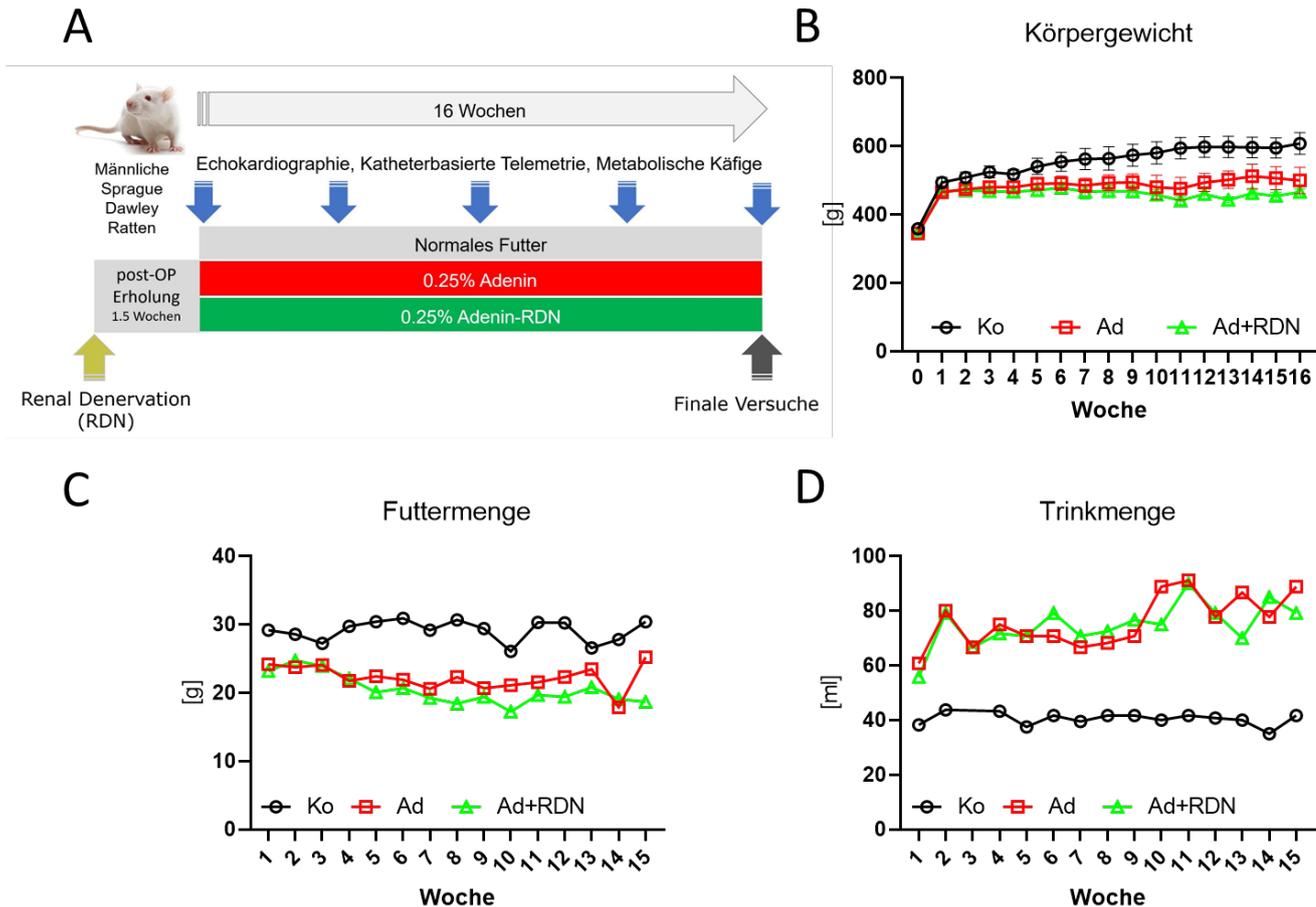
Bei diesem Versuchsvorhaben wurden eineinhalb Wochen vor Versuchsbeginn die Hälfte der für die Adenin-Gruppe bestimmten Tiere einer bilateralen renalen Denervation, alle anderen Tiere einer Sham-Operation unterzogen. Nach einer post-operativen Erholungsphase von eineinhalb Wochen wurde mit der 16 Wochen anhaltenden Fütterung mit 0.25%igem Adenin-Futter begonnen. Als Kontrollen dienten Ratten, die für 16 Wochen mit normaler Haltungsdiät gefüttert wurden.

In *Abbildung 37B* sind die wöchentlich bestimmten Körpergewichte der Versuchstiere aller drei Gruppen im Versuchsverlauf dargestellt. Das Körpergewicht der Adenin-gefütterten Tiere und der Adenin-gefütterten Tiere mit renaler Denervation zeigte sich nach Ablauf der 16-wöchigen Versuchsdauer signifikant reduziert gegenüber den Kontrolltieren (Ko: 608.2 ± 32.0 g, Ad: 500.0 ± 38.0 g, Ad+RDN: 466.2 ± 10.2 g in Woche 16) bei zu Versuchsbeginn nicht signifikanten Gewichtsunterschieden (Ko: 359.0 ± 4.5 g, Ad: 345.7 ± 1.6 g, Ad+RDN: 346.2 ± 8.3 g in Woche 0). In beiden Gruppen war eine deutlich geringere Gewichtszunahme im Versuchsverlauf verglichen mit der Kontroll-Gruppe zu verzeichnen. Zwischen der Adenin- und der Adenin+RDN-Gruppe ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (vgl. *Abbildung 37B: Tiergewicht*).

Die durchschnittlichen täglichen Futter- und Trinkmengen pro Tier sind in *Abbildung 37* zu sehen. Zu Versuchsbeginn (Woche 1) nahmen die Kontrolltiere täglich im Mittel 29.1 g Futter und 38.3 ml Wasser auf, Adenin-gefütterte Tiere 24.1 g und 60.8 ml und denervierte Adenin-

gefütterte Tiere 23.1 g und 55.8 ml. Während die Trinkmenge der Kontrolltiere im Verlauf nahezu konstant blieb, nahm die Wasseraufnahme sowohl in der Adenin- als auch in der Adenin+RDN-Gruppe zu (Ko: 41.6 ml Wasser, Ad: 88.8 ml, Ad+RDN: 79.1 ml in Woche 15) (vgl. *Abbildung 37D: Trinkmenge*). Die durchschnittliche Futtermenge pro Tier in der Adenin- und der Adenin+RDN-Gruppe lag während der 16-wöchigen Versuchsdauer stets unterhalb derer der Kontrollgruppe (durchschnittliche Futtermenge Ko: 29.1 g Futter, Ad: 22.2 g, Ad+RDN: 20.4 g) (vgl. *Abbildung 37C: Futtermenge*).

Insgesamt zeigten die niereninsuffizienten Adenin-gefütterten Ratten nach 16 Wochen ein reduziertes Körpergewicht bei erheblich gesteigerter Trinkmenge und verringerter Futtermenge im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren. Die präventive renale Denervation führte zu keinen Veränderungen von Körpergewicht, Futter- und Trinkmenge gegenüber den sham-operierten Adenin-gefütterten Tieren.

**Abbildung 37: Tierdaten**

A: Versuchsablauf Präventionsgruppe (siehe S.40f)

B: Tiergewichte. Entwicklung der Körpergewichte in Gramm (g) der Kontrollen (Ko, n=4), Adenin-gefütterten Ratten (Ad, n=3) und Adenin-gefütterten Ratten mit renaler Denervation (Ad+RDN, n=4) wöchentlich bestimmt von Beginn der Adenin-Fütterung (Woche 0) bis Versuchsende (Woche 16). Alle Daten sind als Mittelwert±SEM gezeigt.

C: Futtermenge. Durchschnittliche Futteraufnahme pro Tier und Tag in Gramm (g) im Versuchsverlauf von Kontrollen (Ko, n=4), Adenin-gefütterten Ratten (Ad, n=3) und Adenin-gefütterten Ratten mit renaler Denervation (Ad+RDN, n=4).

D: Trinkmenge. Durchschnittliche Wasseraufnahme pro Tier und Tag in Milliliter (ml) im Versuchsverlauf von Kontrollen (Ko, n=4), Adenin-gefütterten Ratten (Ad, n=3) und Adenin-gefütterten Ratten mit renaler Denervation (Ad+RDN, n=4).

Abbildung 38A und Abbildung 38B zeigen die Plasmakonzentrationen der Nierenfunktionsparameter Kreatinin und Harnstoff im Versuchsverlauf. In der Baseline-Messung (Woche 0) ergaben sich keine Unterschiede hinsichtlich der Nierenfunktionsparameter zwischen allen drei Gruppen (in Ko: 0.34 ± 0.01 mg/dl Crea 28.1 ± 2.6 mg/dl Urea, in Ad: 0.32 ± 0.01 mg/dl Crea 26.2 ± 1.0 mg/dl Urea, in Ad+RDN: 0.32 ± 0.02 mg/dl Crea 28.2 ± 1.6 mg/dl Urea). Im Verlauf ließ sich in der Adenin- und in der Adenin+RDN-Gruppe ein signifikanter Anstieg der Plasmakonzentrationen von Kreatinin und Harnstoff verzeichnen, während diese in der Kontrollgruppe nahezu unverändert blieben. So ergaben sich nach 16 Wochen Plasmakonzentrationen von 2.4 ± 0.83 mg/dl Crea und 316.4 ± 127.8 mg/dl Urea in Adenin-gefütterten Tieren, 2.8 ± 0.61 mg/dl Crea und 379.6 ± 89.6 mg/dl Urea in renal

denervierten Adenin-gefütterten Tieren gegenüber 0.78 ± 0.04 mg/dl Crea und 61.9 ± 3.1 mg/dl Urea in Kontrolltieren (vgl. *Abbildung 38A Plasma Kreatinin* und *Abbildung 38B Plasma Harnstoff*).

Diese Erhöhung der Nierenfunktionsparameter ist als Ausdruck einer eingeschränkten Filtrationsleistung der Niere zu werten, ausgelöst durch die futterbedingte Adenin-Nephropathie. Die präventiv durchgeführte renale Denervation zeigte keine protektive Wirkung und konnte der Abnahme der Nierenfunktion nicht vorbeugen.

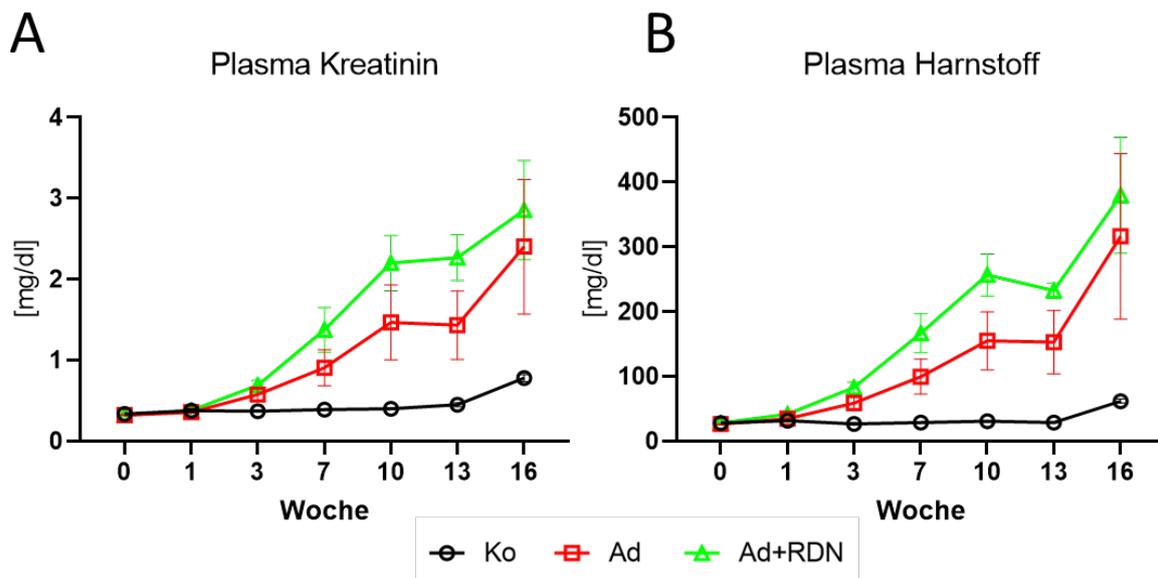


Abbildung 38: Nierenfunktionsparameter

A: Plasma-Kreatininkonzentration in Milligramm pro Deziliter (mg/dl) von Kontrollen (Ko, n=4), Adenin-gefütterten Tieren (n=3) und Adenin-gefütterten Tieren mit renaler Denervation (n=4).

B: Plasma-Harnstoffkonzentration in Milligramm pro Deziliter (mg/dl) von Kontrollen (Ko, n=4), Adenin-gefütterten Tieren (n=3) und Adenin-gefütterten Tieren mit renaler Denervation (n=4).

4.2.2 Expression ROS-produzierender und anti-oxidativ wirkender Proteine in der Niere

Um eine Aussage über das Vorhandensein von oxidativem Stress treffen zu können, wurde die Expression von Proteinen untersucht, die entweder an der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) oder an deren Entgiftung beteiligt sind. Dazu wurden Proteine aus der linken und rechten Niere der Versuchstiere aller vier Gruppen isoliert und mittels Western Blot analysiert.

Die Ergebnisse zeigten eine signifikant hochregulierte Expression des Adenin-metabolisierenden und ROS-generierenden Enzyms Xanthin-Oxidase in den Adenin-gefütterten wie auch in den renal denervierten Adenin-gefütterten Ratten verglichen mit den Kontrollen bzw. denervierten Kontrollen (Ko+RDN: 0.05 ± 0.01 , Ko: 0.05 ± 0.01 , Ad: 0.40 ± 0.06 ,

Ad+RDN: 0.54 ± 0.09 ; $p=0.001$ Ko vs. Ad, $p<0.0001$ Ko vs. Ad+RDN). Zwischen renal denervierten und sham-operierten Tieren konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede beobachtet werden (vgl. *Abbildung 39: Renale Expression des purinabbauenden Proteins Xanthin-Oxidase (XO)*). Auch hier ist die gesteigerte XO-Expression in Adenin-gefütterten Tieren als Korrelat der futterbedingten Adenin-Nephropathie im Sinne einer verstärkten Umsetzung von Adenin durch die XO zu 2,8-Dihydroxyadenin zu werten.

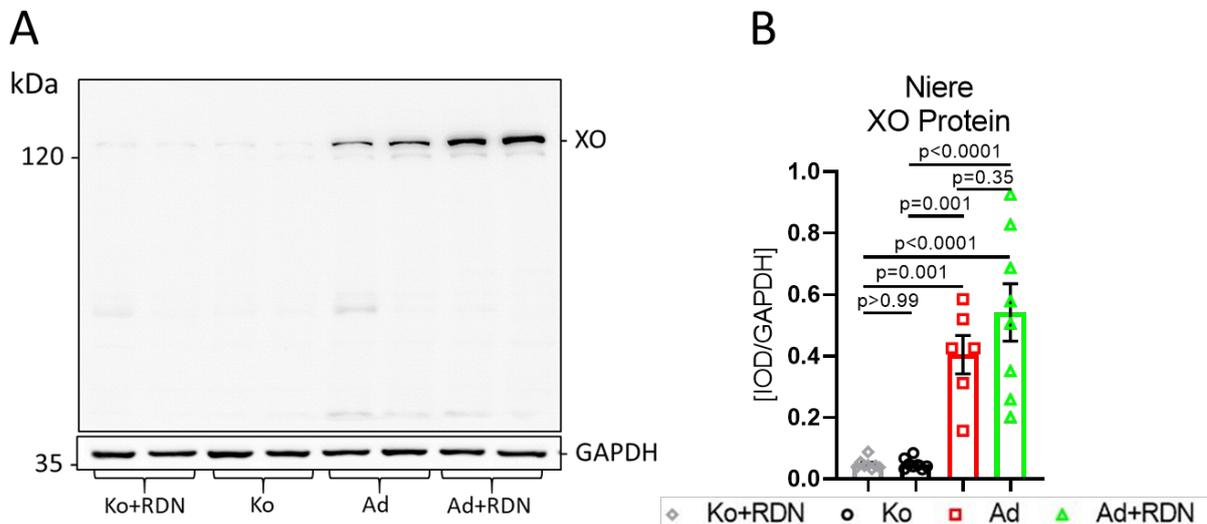


Abbildung 39: Renale Expression des purinabbauenden Proteins Xanthin-Oxidase (XO)

A: Repräsentativer Immunoblot zur renalen Proteinexpression von XO (130kDa) in Kontrollen mit renaler Denervation (Ko+RDN), Kontrollen (Ko), Adenin-gefütterten Ratten (Ad) und Adenin-gefütterten Ratten mit renaler Denervation (Ad+RDN). Das „house-keeping Gen“ GAPDH diente als Ladekontrolle.

B: Immunchemische Quantifizierung der Proteinexpression von XO in Nierenhomogenat der linken und rechten Niere in Ko+RDN (n=4 Tiere), Ko (n=4 Tiere), Ad (n=3 Tiere) und Ad+RDN (n=4 Tiere). One-way ANOVA mit Tukey's multiple comparison Test wurde zur statistischen Analyse verwendet. Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM gezeigt.

GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; IOD: Integrated Optical Density; XO: Xanthin-Oxidase

Abbildung 40 und *Abbildung 41* zeigen die Ergebnisse der Western Blot-Analyse zur Expression der ROS-produzierenden Enzyme NADPH-Oxidase 2 (Nox 2) und Nox 4. Für beide Enzyme ließen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Expression zwischen allen Gruppen feststellen (Nox 2: 1.5 ± 0.24 in Ko+RDN, 1.5 ± 0.26 in Ko, 2.1 ± 0.32 in Ad, 1.8 ± 0.21 in Ad+RDN; Nox 4: 0.21 ± 0.05 in Ko+RDN, 0.24 ± 0.07 in Ko, 0.30 ± 0.10 in Ad, 0.29 ± 0.08 in Ad+RDN). Somit schien die Expression ROS-bildender Enzyme in Adenin-Tieren nicht signifikant gesteigert gegenüber Kontrollen. Durch die präventiv durchgeführte renale Denervation ergab sich keine Beeinflussung der Expression.

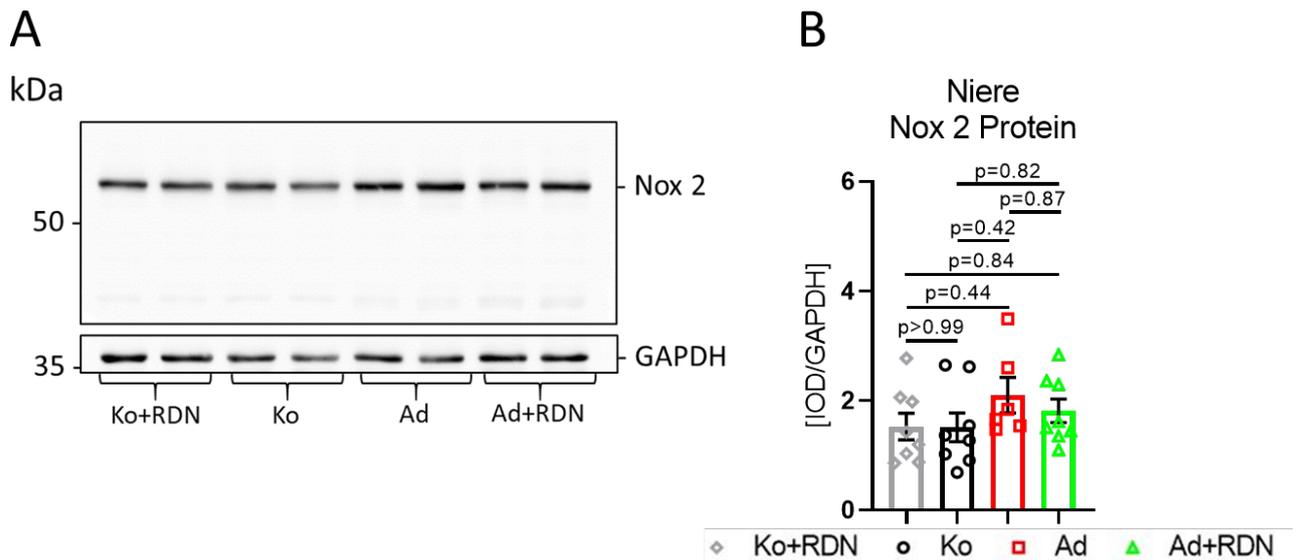


Abbildung 40: Renale Expression des ROS-produzierenden Proteins NADPH-Oxidase 2 (Nox 2)

A: Repräsentativer Immunoblot zur renalen Proteinexpression von Nox 2 (65kDa) in Kontrollen mit renaler Denervation (Ko+RDN), Kontrollen (Ko), Adenin-gefütterten Ratten (Ad) und Adenin-gefütterten Ratten mit renaler Denervation (Ad+RDN). Das „house-keeping Gen“ GAPDH diente als Ladekontrolle.

B: Immunchemische Quantifizierung der Proteinexpression von Nox 2 in Nierenhomogenat der linken und rechten Niere in Ko+RDN (n=4 Tiere), Ko (n=4 Tiere), Ad (n=3 Tiere) und Ad+RDN (n=4 Tiere). One-way ANOVA mit Tukey's multiple comparison Test wurde zur statistischen Analyse verwendet. Alle Daten sind als Mittelwert±SEM gezeigt.

GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; IOD: Integrated Optical Density; Nox: NADPH-Oxidase

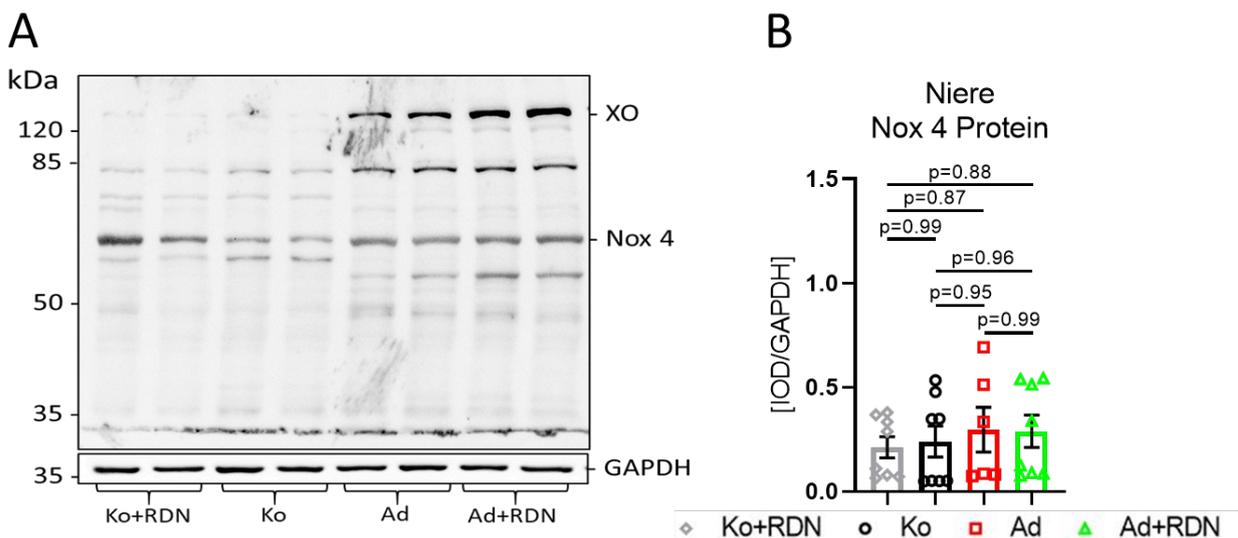


Abbildung 41: Renale Expression des ROS-produzierenden Proteins NADPH-Oxidase 4 (Nox 4)

A: Repräsentativer Immunoblot zur renalen Proteinexpression von Nox 4 (63kDa) in Kontrollen mit renaler Denervation (Ko+RDN), Kontrollen (Ko), Adenin-gefütterten Ratten (Ad) und Adenin-gefütterten Ratten mit renaler Denervation (Ad+RDN). Das „house-keeping Gen“ GAPDH diente als Ladekontrolle. Ebenfalls aufgetragen XO (vgl. Abbildung 39).

B: Immunchemische Quantifizierung der Proteinexpression von Nox 4 in Nierenhomogenat der linken und rechten Niere in Ko+RDN (n=4 Tiere), Ko (n=4 Tiere), Ad (n=3 Tiere) und Ad+RDN (n=4 Tiere). One-way ANOVA mit Tukey's multiple comparison Test wurde zur statistischen Analyse verwendet. Alle Daten sind als Mittelwert±SEM gezeigt.

GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; IOD: Integrated Optical Density; Nox: NADPH-Oxidase

Im Rahmen der Untersuchung anti-oxidativer Abwehrmechanismen stellte sich die Expression des Enzyms Catalase hoch signifikant vermindert in Adenin-gefütterten Ratten verglichen mit den Kontrolltieren dar (2.0 ± 0.32 in Ko vs. 0.67 ± 0.1 in Ad, $p=0.002$). Durch die renale Denervation konnte weder bei den Kontrolltieren noch bei den Adenin-gefütterten Tieren ein relevanter Unterschied zur sham-operierten Gruppe beobachtet werden. So ließ sich für denervierte Adenin-gefütterte Tiere kein signifikanter Anstieg der Expression im Vergleich zu sham-operierten Adenin-Tieren feststellen (0.72 ± 0.13 in Ad+RDN, $p=0.99$ vs. Ad). Für denervierte Kontrollen lagen die Werte auf vergleichbarem Niveau wie für die sham-operierten Kontrollen (1.9 ± 0.24 in Ko+RDN, $p=0.96$ vs. Ko) (vgl. *Abbildung 42: Renale Expression des anti-oxidativ wirkenden Proteins Catalase*).

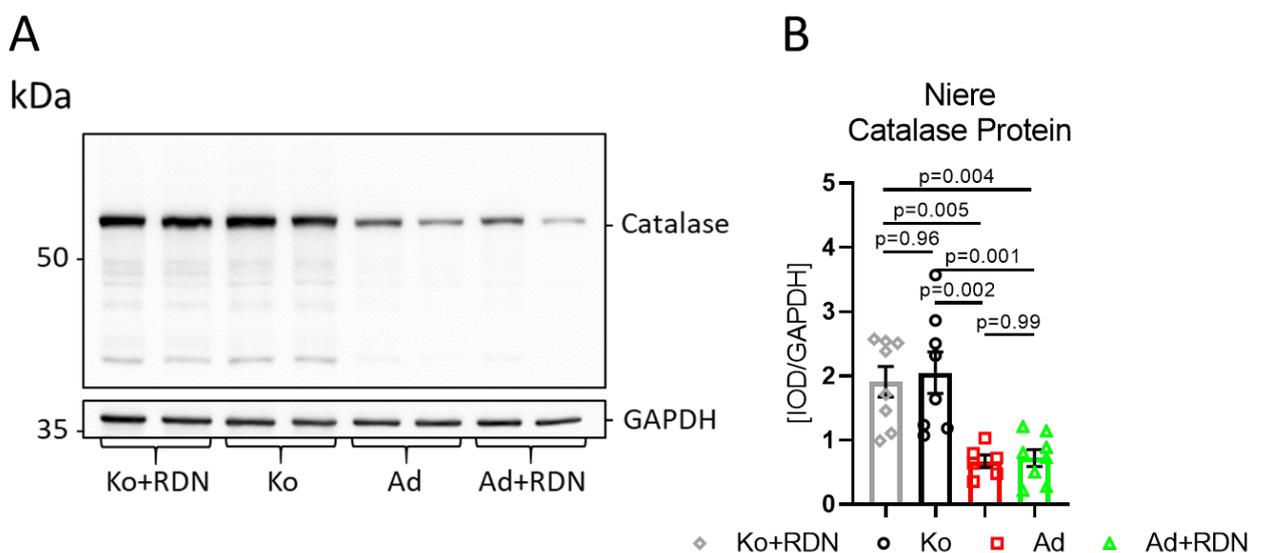


Abbildung 42: Renale Expression des anti-oxidativ wirkenden Proteins Catalase

A: Repräsentativer Immunoblot zur renalen Proteinexpression von Catalase (60kDa) in Kontrollen mit renaler Denervation (Ko+RDN), Kontrollen (Ko), Adenin-gefütterten Ratten (Ad) und Adenin-gefütterten Ratten mit renaler Denervation (Ad+RDN). Das „house-keeping Gen“ GAPDH diente als Ladekontrolle.

B: Immunchemische Quantifizierung der Proteinexpression von Catalase in Nierenhomogenat der linken und rechten Niere in Ko+RDN (n=4 Tiere), Ko (n=4 Tiere), Ad (n=3 Tiere) und Ad+RDN (n=4 Tiere). One-way ANOVA mit Tukey's multiple comparison Test wurde zur statistischen Analyse verwendet. Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM gezeigt.

GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; IOD: Integrated Optical Density

Die der anti-oxidativen Abwehr dienenden Isoenzyme der Familie der Superoxid-Dismutasen SOD 1 und SOD 2 zeigten in der Western Blot-Analyse keine wesentliche Regulation ihrer Expression zwischen den Gruppen. Für die cytosolische Isoform SOD 1 ließ sich lediglich zwischen denervierten Kontrollen und denervierten Adenin-gefütterten Ratten eine signifikante Abnahme verzeichnen ($p=0.025$ Ko+RDN vs. Ad+RDN), während sich zwischen allen anderen Gruppen keine signifikanten Unterschiede ergaben (1.7 ± 0.23 in Ko+RDN, 1.3 ± 0.21 in Ko, 1.1 ± 0.11 in Ad, 1.0 ± 0.13 in Ad+RDN) (vgl. *Abbildung 43: Renale Expression des anti-oxidativ wirkenden Proteins SOD 1*).

Die Expression der mitochondrialen Isoform SOD 2 war zwischen allen Gruppen nicht signifikant verschieden (1.4 ± 0.16 in Ko+RDN, 1.4 ± 0.24 in Ko, 1.0 ± 0.14 in Ad, 1.0 ± 0.12 in Ad+RDN) (vgl. *Abbildung 44: Renale Expression des anti-oxidativ wirkenden Proteins SOD 2*). Die anti-oxidative Abwehr durch Superoxid-Dismutasen stellte sich in der Auswertung in den niereninsuffizienten Ratten demnach nicht reduziert dar gegenüber der in gesunden Kontrolltieren. Die renale Denervation in der Prävention ließ die Expression dieser Enzyme unverändert.

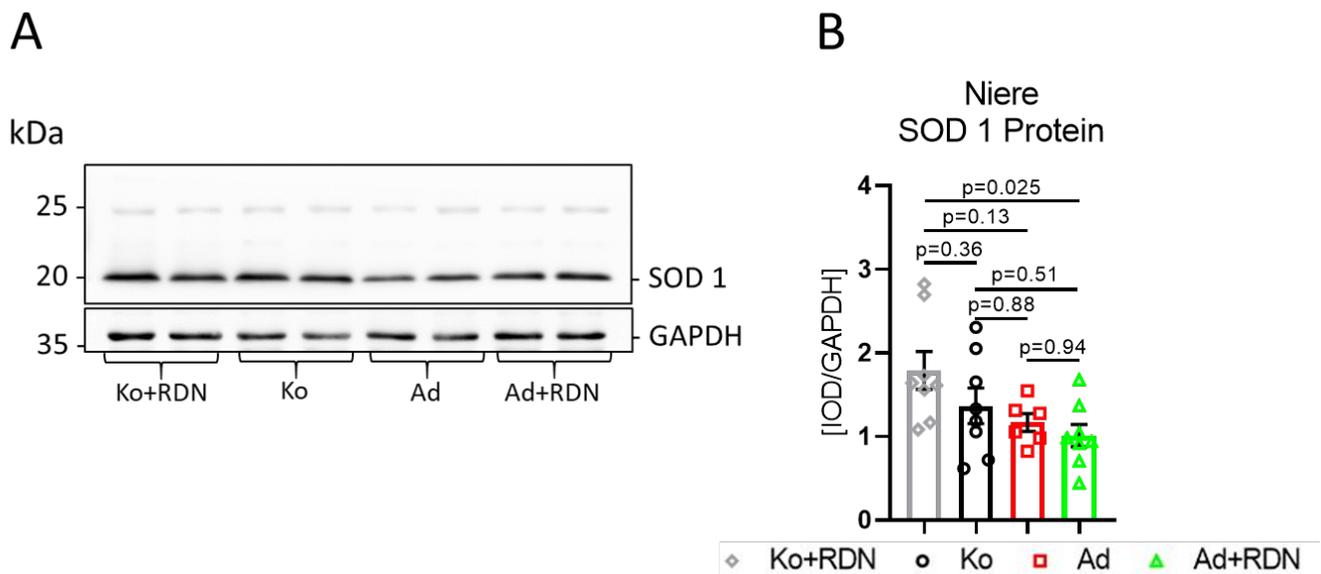


Abbildung 43: Renale Expression des anti-oxidativ wirkenden Proteins SOD 1

A: Repräsentativer Immunoblot zur renalen Proteinexpression von SOD 1 (20kDa) in Kontrollen mit renaler Denervation (Ko+RDN), Kontrollen (Ko), Adenin-gefütterten Ratten (Ad) und Adenin-gefütterten Ratten mit renaler Denervation (Ad+RDN). Das „house-keeping Gen“ GAPDH diente als Ladekontrolle.

B: Immunchemische Quantifizierung der Proteinexpression von SOD 1 in Nierenhomogenat der linken und rechten Niere in Ko+RDN (n=4 Tiere), Ko (n=4 Tiere), Ad (n=3 Tiere) und Ad+RDN (n=4 Tiere). One-way ANOVA mit Tukey's multiple comparison Test wurde zur statistischen Analyse verwendet. Alle Daten sind als Mittelwert±SEM gezeigt.

GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; IOD: Integrated Optical Density; SOD: Superoxid-Dismutase

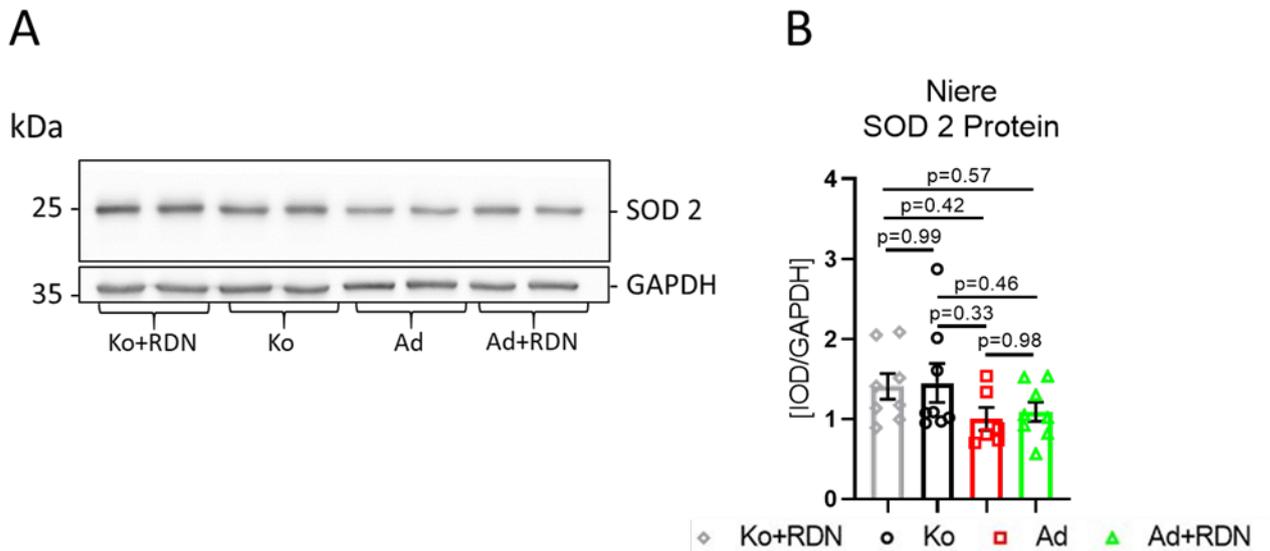


Abbildung 44: Renale Expression des anti-oxidativ wirkenden Proteins SOD 2

A: Repräsentativer Immunoblot zur renalen Proteinexpression von SOD 2 (25kDa) in Kontrollen mit renaler Denervation (Ko+RDN), Kontrollen (Ko), Adenin-gefütterten Ratten (Ad) und Adenin-gefütterten Ratten mit renaler Denervation (Ad+RDN). Das „house-keeping Gen“ GAPDH diente als Ladekontrolle.

B: Immunchemische Quantifizierung der Proteinexpression von SOD 2 in Nierenhomogenat der linken und rechten Niere in Ko+RDN (n=4 Tiere), Ko (n=4 Tiere), Ad (n=3 Tiere) und Ad+RDN (n=4 Tiere). One-way ANOVA mit Tukey's multiple comparison Test wurde zur statistischen Analyse verwendet. Alle Daten sind als Mittelwert±SEM gezeigt.

GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; IOD: Integrated Optical Density; SOD: Superoxid-Dismutase

Auch die Expression der ROS-entgiftenden cytosolischen Proteine Peroxiredoxin I (Prx I) und Prx II erschien in der Western Blot-Analyse in den Adenin-gefütterten Tieren nicht verringert im Vergleich zu Kontrollen, während sich die Expression der mitochondrialen Isoform Prx III in diesen hoch signifikant reduziert gegenüber den Kontrollen bzw. den denervierten Kontrollen darstellte. Die Isoformen Prx I und II erschienen in allen Gruppen vergleichbar exprimiert (Prx I: 0.92 ± 0.13 in Ko+RDN, 0.87 ± 0.17 in Ko, 0.95 ± 0.20 in Ad, 0.81 ± 0.12 in Ad+RDN; Prx II: 0.93 ± 0.19 in Ko+RDN, 0.90 ± 0.16 in Ko, 0.80 ± 0.08 in Ad, 0.80 ± 0.09 in Ad+RDN) (vgl. *Abbildung 45: Renale Expression der anti-oxidativ wirkenden Proteine Prx I und Prx II*). Für Prx III zeigte sich eine signifikante Herabregulation der Expression sowohl in Adenin-gefütterten Tieren ($p=0.002$ vs. Ko) als auch solchen mit renaler Denervation ($p=0.0008$ vs. Ko) verglichen mit der Kontroll- bzw. der denervierten Kontroll-Gruppe (0.88 ± 0.11 in Ko+RDN, 0.86 ± 0.11 in Ko, 0.32 ± 0.10 in Ad, 0.29 ± 0.04 in Ad+RDN) (vgl. *Abbildung 46: Renale Expression des anti-oxidativ wirkenden Proteins Prx III*). Auch hier konnte demnach kein protektiver Effekt der renalen Denervation im Vergleich zu den sham-operierten Tieren beobachtet werden.

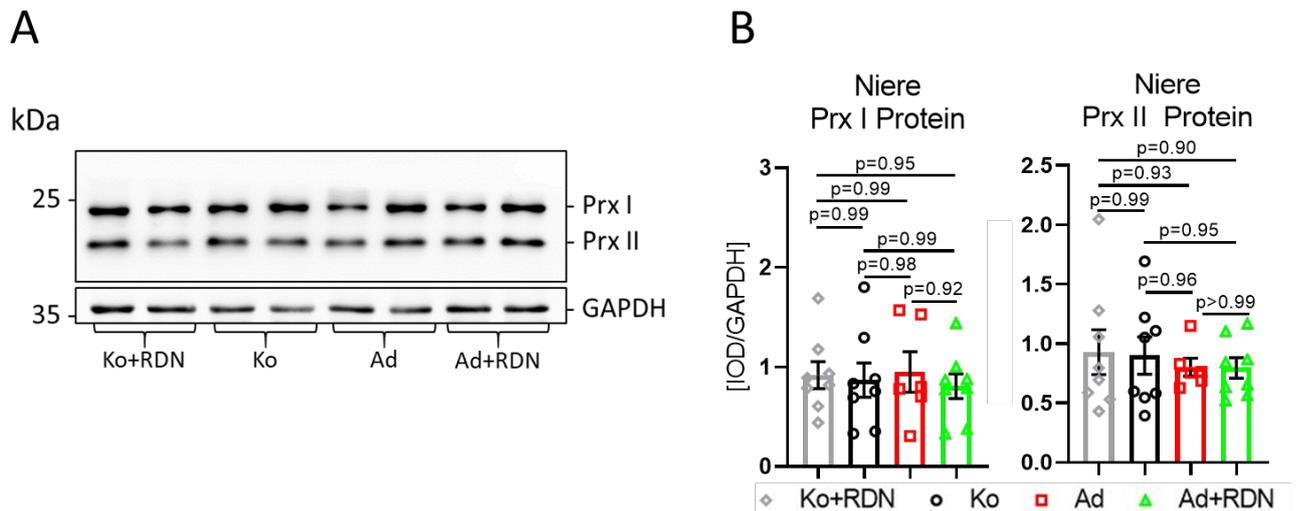


Abbildung 45: Renale Expression der anti-oxidativ wirkenden Proteine Prx I und Prx II

A: Repräsentativer Immunoblot zur renalen Proteinexpression von Prx I und Prx II (20-25kDa) in Kontrollen mit renaler Denervation (Ko+RDN), Kontrollen (Ko), Adenin-gefütterten Ratten (Ad) und Adenin-gefütterten Ratten mit renaler Denervation (Ad+RDN). Das „house-keeping Gen“ GAPDH diente als Ladekontrolle.

B: Immunchemische Quantifizierung der Proteinexpression von Prx I (links) und Prx II (rechts) in Nierenhomogenat der linken und rechten Niere in Ko+RDN (n=4 Tiere), Ko (n=4 Tiere), Ad (n=3 Tiere) und Ad+RDN (n=4 Tiere). One-way ANOVA mit Tukey's multiple comparison Test wurde zur statistischen Analyse verwendet. Alle Daten sind als Mittelwert±SEM gezeigt.

GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; IOD: Integrated Optical Density; Prx: Peroxiredoxin

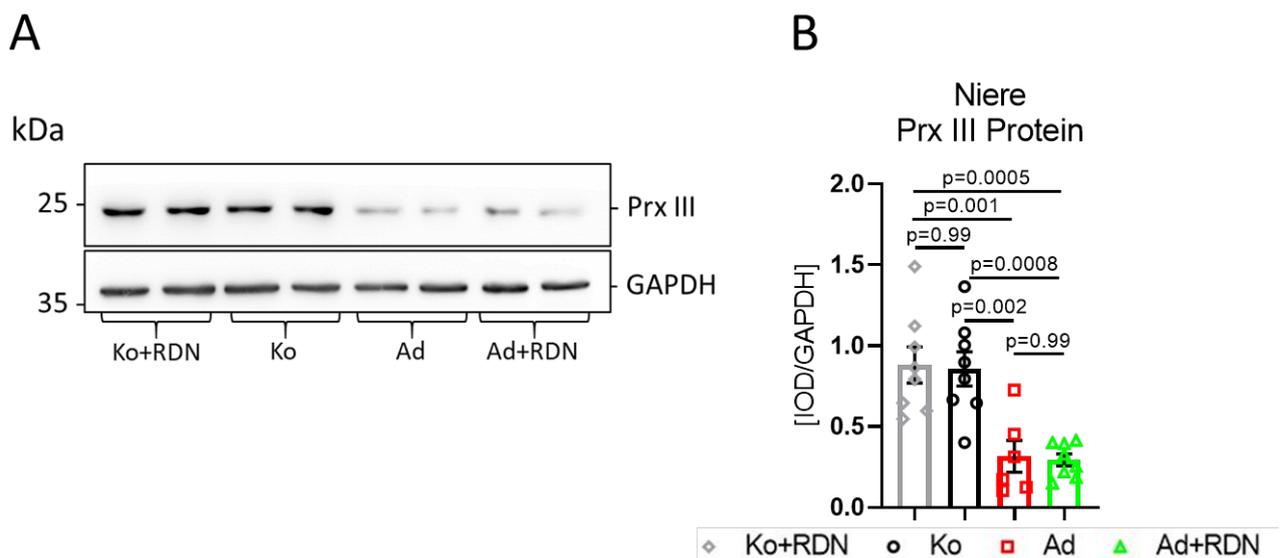


Abbildung 46: Renale Expression des anti-oxidativ wirkenden Proteins Prx III

A: Repräsentativer Immunoblot zur renalen Proteinexpression von Prx III (25kDa) in Kontrollen mit renaler Denervation (Ko+RDN), Kontrollen (Ko), Adenin-gefütterten Ratten (Ad) und Adenin-gefütterten Ratten mit renaler Denervation (Ad+RDN). Das „house-keeping Gen“ GAPDH diente als Ladekontrolle.

B: Immunchemische Quantifizierung der Proteinexpression von Prx III in Nierenhomogenat der linken und rechten Niere in Ko+RDN (n=4 Tiere), Ko (n=4 Tiere), Ad (n=3 Tiere) und Ad+RDN (n=4 Tiere). One-way ANOVA mit Tukey's multiple comparison Test wurde zur statistischen Analyse verwendet. Alle Daten sind als Mittelwert±SEM gezeigt.

GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; IOD: Integrated Optical Density; Prx: Peroxiredoxin

Die Ergebnisse der Western Blot-Analyse des oxidativen Stress-Markerproteins Hämoxigenase 1 (HO-1) zeigten eine hoch signifikante Hochregulation der Expression in nierengeschädigten Ratten verglichen mit gesunden Kontrolltieren (0.11 ± 0.02 in Ko vs. 1.1 ± 0.19 in Ad, $p < 0.0001$). Eine präventiv durchgeführte renale Denervation schien darauf jedoch keinen Einfluss zu haben. So stellte sich die HO-1-Expression in der Adenin+RDN-Gruppe nicht signifikant verringert dar verglichen mit der sham-operierten Adenin-Gruppe (0.97 ± 0.19 in Ad+RDN, $p = 0.86$ vs. Ad). Auch zwischen Kontrollen und solchen mit renaler Denervation konnte kein Unterschied beobachtet werden (0.13 ± 0.05 in Ko+RDN, $p = 0.99$ vs. Ko) (vgl. *Abbildung 47: Renale Expression des oxidativen Stress-Markerproteins HO-1*).

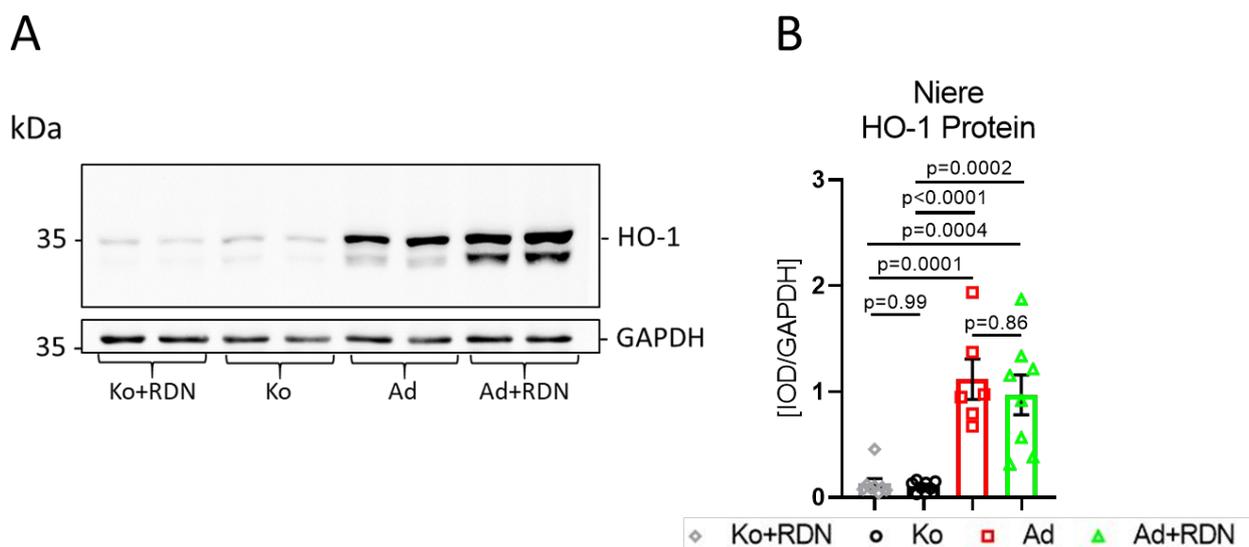


Abbildung 47: Renale Expression des oxidativen Stress-Markerproteins HO-1

A: Repräsentativer Immunoblot zur renalen Proteinexpression von HO-1 (28kDa) in Kontrollen mit renaler Denervation (Ko+RDN), Kontrollen (Ko), Adenin-gefütterten Ratten (Ad) und Adenin-gefütterten Ratten mit renaler Denervation (Ad+RDN). Das „house-keeping Gen“ GAPDH diente als Ladekontrolle.

B: Immunchemische Quantifizierung der Proteinexpression von HO-1 in Nierenhomogenat der linken und rechten Niere in Ko+RDN ($n = 4$ Tiere), Ko ($n = 4$ Tiere), Ad ($n = 3$ Tiere) und Ad+RDN ($n = 4$ Tiere). One-way ANOVA mit Tukey's multiple comparison Test wurde zur statistischen Analyse verwendet. Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM gezeigt.

GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; HO: Hämoxigenase; IOD: Integrated Optical Density

Zusammenfassend sprechen die Ergebnisse der Western Blot-Analyse für verstärkten oxidativen Stress im Nierengewebe Adenin-gefütterter niereninsuffizienter Ratten im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren. Auch durch eine präventiv vor Induktion der chronischen Nierenerkrankung durchgeführte renale Denervation ließ sich der Entstehung des oxidativen Stresses nicht vorbeugen.

4.2.3 Expression blutdruckregulierender Proteine in der Niere

Abbildung 48 zeigt, dass die Western Blot-Analysen zwar keine signifikante Regulation der Expression des Katecholamin-synthetisierenden Enzyms Tyrosinhydroxylase (TH) in der Niere erkennen ließen, jedoch schien zwischen Kontrolltieren und Adenin-gefütterten Ratten der Tyrosinhydroxylasegehalt deutlich zuzunehmen. Diese Zunahme erreichte jedoch nicht das Signifikanzniveau (0.06 ± 0.01 in Ko vs. 0.13 ± 0.03 in Ad, $p=0.18$, vgl. *Abbildung 48: Renale Expression des Katecholamin-synthetisierenden Proteins Tyrosinhydroxylase (TH)*).

Die renale Denervation zeigte weder in den Kontrollen noch in den Adenin-gefütterten Ratten einen Einfluss auf die Expression von TH (0.05 ± 0.01 in Ko+RDN, $p=0.99$ vs. Ko; 0.12 ± 0.03 in Ad+RDN, $p=0.99$ vs. Ad).

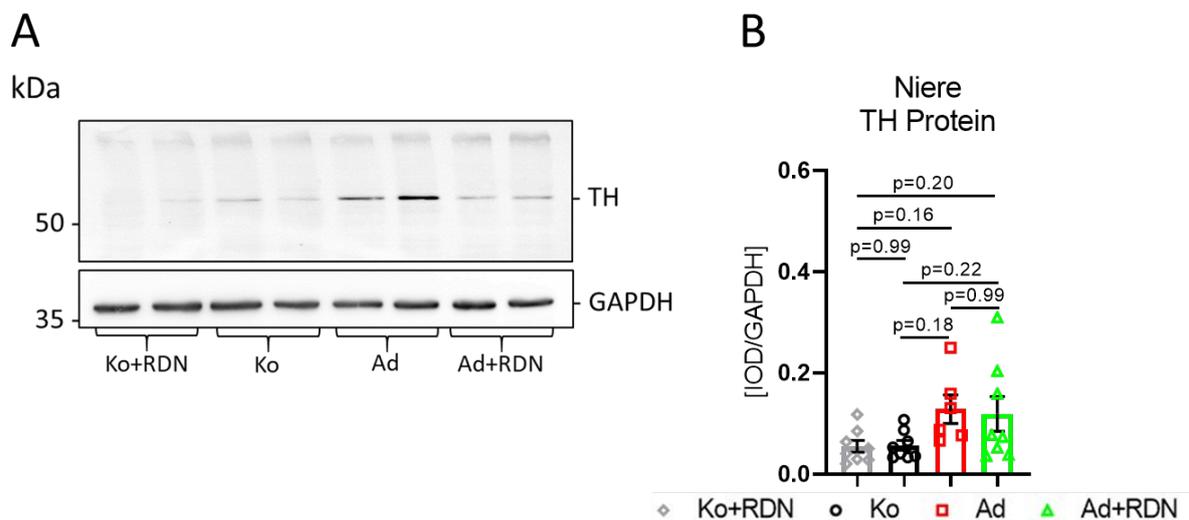


Abbildung 48: Renale Expression des Katecholamin-synthetisierenden Proteins Tyrosinhydroxylase (TH)
A: Repräsentativer Immunoblot zur renalen Proteinexpression von TH (60kDa) in Kontrollen mit renaler Denervation (Ko+RDN), Kontrollen (Ko), Adenin-gefütterten Ratten (Ad) und Adenin-gefütterten Ratten mit renaler Denervation (Ad+RDN). Das „house-keeping Gen“ GAPDH diente als Ladekontrolle.

B: Immunchemische Quantifizierung der Proteinexpression von TH in Nierenhomogenat der linken und rechten Niere in Ko+RDN ($n=4$ Tiere), Ko ($n=4$ Tiere), Ad ($n=3$ Tiere) und Ad+RDN ($n=4$ Tiere). One-way ANOVA mit Tukey's multiple comparison Test wurde zur statistischen Analyse verwendet. Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM gezeigt.

GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; IOD: Integrated Optical Density; TH: Tyrosinhydroxylase

Für das Katecholamin-abbauende Enzym Renalase konnte eine signifikante Herabregulation der Expression in den Adenin-gefütterten niereninsuffizienten Ratten im Vergleich zu den Kontrolltieren verzeichnet werden (1.4 ± 0.24 in Ko vs. 0.37 ± 0.06 in Ad, $p=0.006$). Die präventiv durchgeführte renale Denervation zeigte jedoch keinen Effekt. Renalase wurde in Adenin+RDN-Tieren auf vergleichbar niedrigem Niveau wie in sham-operierten Adenin-behandelten Tieren exprimiert (0.42 ± 0.09 in Ad+RDN, $p=0.99$ vs. Ad). Auch zwischen

Kontrollen und renal denervierten Kontrollen ergab sich kein signifikanter Unterschied (1.7 ± 0.26 in Ko+RDN, $p=0.65$ vs. Ko) (vgl. *Abbildung 49: Renale Expression des Katecholamin-abbauenden Proteins Renalase*).

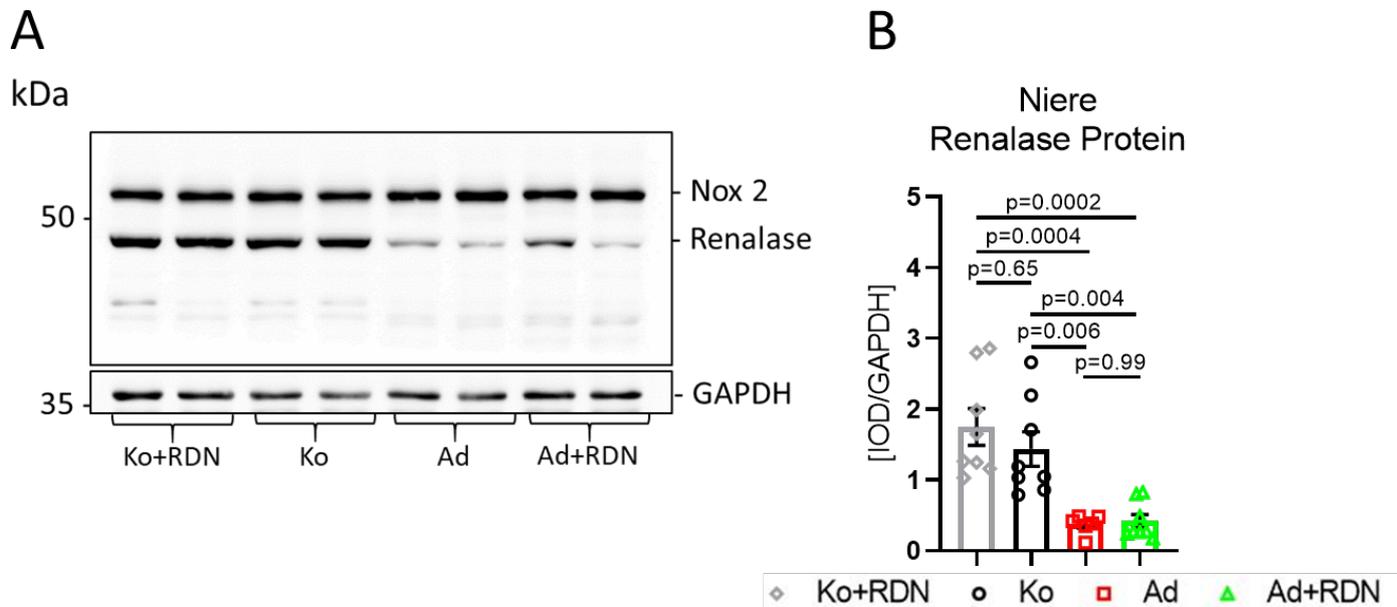


Abbildung 49: Renale Expression des Katecholamin-abbauenden Proteins Renalase

A: Repräsentativer Immunoblot zur renalen Proteinexpression von Renalase (42kDa) in Kontrollen mit renaler Denervation (Ko+RDN), Kontrollen (Ko), Adenin-gefütterten Ratten (Ad) und Adenin-gefütterten Ratten mit renaler Denervation (Ad+RDN). Das „house-keeping Gen“ GAPDH diente als Ladekontrolle. Ebenfalls aufgetragen Nox 2 (vgl. *Abbildung 40*).

B: Immunchemische Quantifizierung der Proteinexpression von Renalase in Nierenhomogenat der linken und rechten Niere in Ko+RDN ($n=4$ Tiere), Ko ($n=4$ Tiere), Ad ($n=3$ Tiere) und Ad+RDN ($n=4$ Tiere). One-way ANOVA mit Tukey's multiple comparison Test wurde zur statistischen Analyse verwendet. Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM gezeigt.

GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; IOD: Integrated Optical Density

Die Expression der blutdruckregulierenden Protease Nephrylysin (CD 10) zeigte zwischen allen Gruppen keine signifikanten Unterschiede (0.76 ± 0.18 in Ko+RDN, 0.74 ± 0.19 in Ko, 1.4 ± 0.31 in Ad, 1.3 ± 0.39 in Ad+RDN) (vgl. *Abbildung 50: Renale Expression des blutdruckregulierenden Proteins CD 10 (Nephrylysin)*). In Adenin-gefütterten Tieren sowie in renal denervierten Adenin-gefütterten Tieren erschien die Expression geringfügig, jedoch statistisch nicht signifikant erhöht ($p=0.38$ Ko vs. Ad, $p=0.35$ Ko vs. Ad+RDN) gegenüber den Kontrollen. Die präventiv denervierten Tiere zeigten keinerlei Unterschiede zu den sham-operierten (Ad vs. Ad+RDN $p=0.99$).

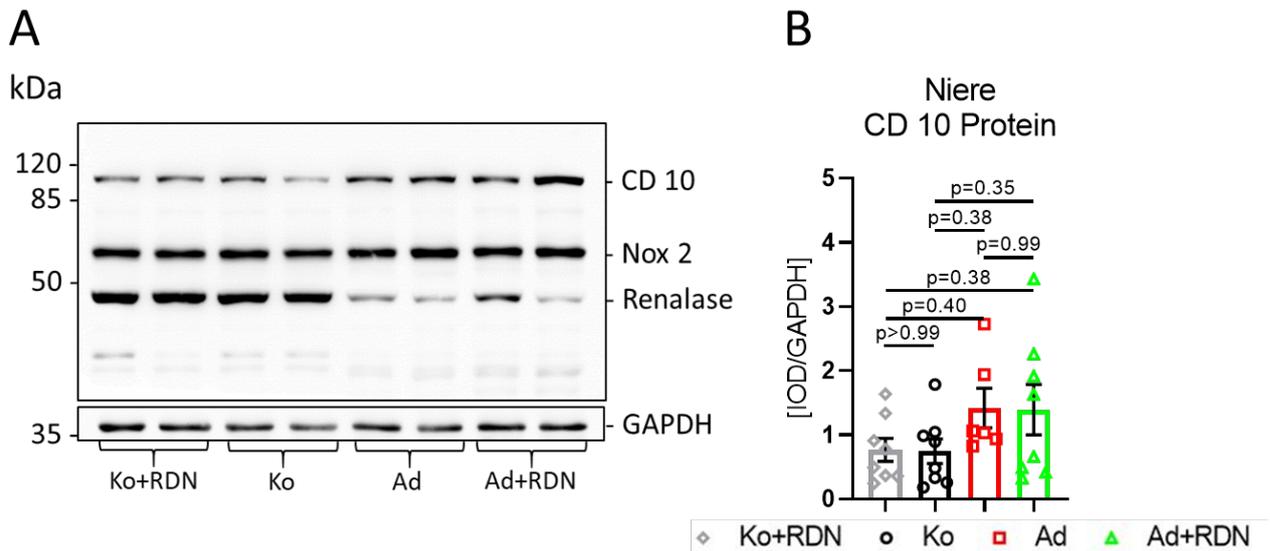


Abbildung 50: Renale Expression des blutdruckregulierenden Proteins CD 10 (Neprilysin)

A: Repräsentativer Immunoblot zur renalen Proteinexpression von CD 10 (100kDa) in Kontrollen mit renaler Denervation (Ko+RDN), Kontrollen (Ko), Adenin-gefütterten Ratten (Ad) und Adenin-gefütterten Ratten mit renaler Denervation (Ad+RDN). Das „house-keeping Gen“ GAPDH diente als Ladekontrolle. Ebenfalls aufgetragen Nox 2 (vgl. Abbildung 40) und Renalase (vgl. Abbildung 49).

B: Immunchemische Quantifizierung der Proteinexpression von CD 10 in Nierenhomogenat der linken und rechten Niere in Ko+RDN (n=4 Tiere), Ko (n=4 Tiere), Ad (n=3 Tiere) und Ad+RDN (n=4 Tiere). One-way ANOVA mit Tukey's multiple comparison Test wurde zur statistischen Analyse verwendet. Alle Daten sind als Mittelwert±SEM gezeigt.

CD: Cluster of differentiation; GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; IOD: Integrated Optical Density

Das in proximalen Tubuluszellen lokalisierte Transportprotein SGLT-2 zeigte in der Western Blot-Analyse eine Tendenz zur Hochregulation der Expression in nierengeschädigten Adenin-behandelten Ratten gegenüber gesunden Kontrolltieren (0.06 ± 0.01 in Ko, 0.12 ± 0.02 in Ad; vgl. Abbildung 51: Renale Expression des Sodium-glucose linked transporters 2 (SGLT-2)). Die Zunahme der Expression zwischen Kontrollen und Adenin-Tieren war mit $p=0.075$ jedoch knapp nicht signifikant. Für präventiv denervierte Adenin-gefütterte Ratten lag die Expression auf vergleichbar hohem Niveau wie für die sham-operierten Adenin-gefütterten Tiere (0.11 ± 0.02 in Ad+RDN, vs. Ad $p=0.99$). Die präventiv durchgeführte renale Denervation ließ die Expression des Transportproteins demnach unbeeinflusst.

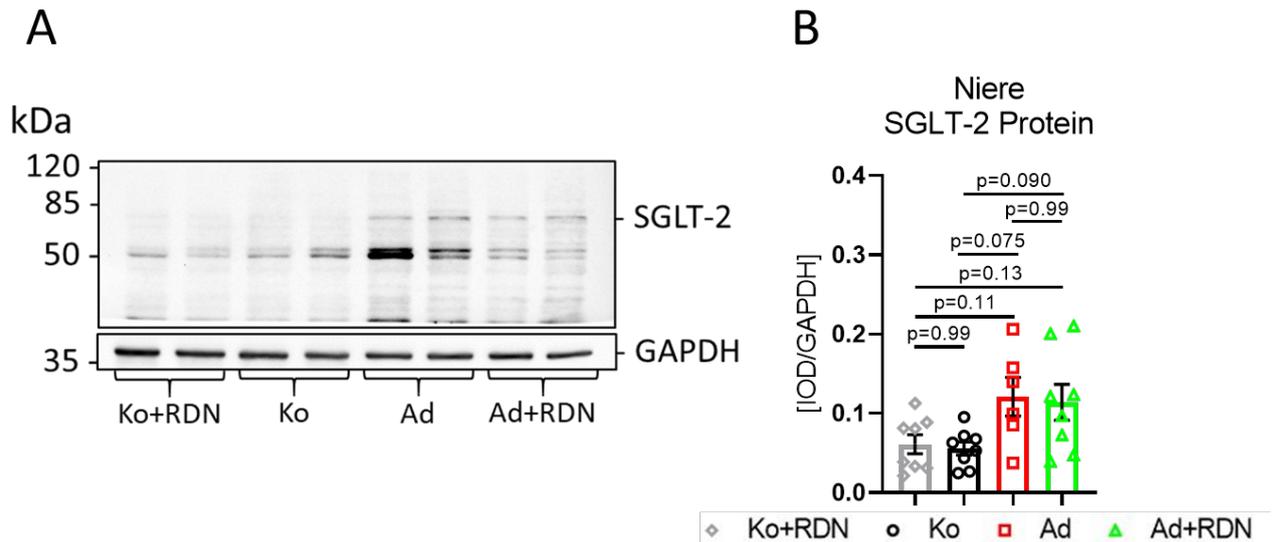


Abbildung 51: Renale Expression des Sodium-glucose linked transporters 2 (SGLT-2)

A: Repräsentativer Immunoblot zur renalen Proteinexpression von SGLT-2 (77kDa) in Kontrollen mit renaler Denervation (Ko+RDN), Kontrollen (Ko), Adenin-gefütterten Ratten (Ad) und Adenin-gefütterten Ratten mit renaler Denervation (Ad+RDN). Das „house-keeping Gen“ GAPDH diente als Ladekontrolle.

B: Immunchemische Quantifizierung der Proteinexpression von SGLT-2 in Nierenhomogenat der linken und rechten Niere in Ko+RDN (n=4 Tiere), Ko (n=4 Tiere), Ad (n=3 Tiere) und Ad+RDN (n=4 Tiere). One-way ANOVA mit Tukey's multiple comparison Test wurde zur statistischen Analyse verwendet. Alle Daten sind als Mittelwert±SEM gezeigt.

GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; IOD: Integrated Optical Density; SGLT: Sodium-glucose linked transporter

4.2.4 Strukturelles Remodeling des linken Vorhofs

Zu den sog. Remodelingprozessen im Vorhof zählen neben den elektrophysiologischen und biochemischen Veränderungen auch strukturelle Umbauprozesse, wie beispielsweise die Zunahme des interstitiellen Fibrosegehalts sowie die Hypertrophie der atrialen Kardiomyozyten.⁹⁰

Die Fibroseauswertung im linken Vorhof der Ratten zeigte einen hoch signifikanten Anstieg des Gehalts interstitieller Fibrose in der Adenin-Gruppe im Vergleich zur Kontroll-Gruppe, der durch renale Denervation wieder signifikant reduziert werden konnte. Während sich für Kontrolltiere ein mittlerer Anteil von 7.6 ± 1.31 % interstitieller Fibrose an der Gesamtgewebefläche des linken Vorhofs ergab, stellten sich die Vorhöfe der Adenin-Tiere mit durchschnittlich 19.5 ± 0.66 % interstitieller Fibrose signifikant fibrosiert gegenüber den Kontrollen dar ($p < 0.0001$ Ko vs. Ad). In der Adenin+RDN Gruppe war der Gehalt interstitieller Fibrose mit einem mittleren Wert von 10.4 ± 0.97 % signifikant reduziert gegenüber den sham-operierten Adenin-gefütterten Tieren ($p = 0.002$ Ad vs. Ad+RDN). Zwischen sham-behandelten und renal denervierten Kontroll-Ratten zeigte sich kein signifikanter Unterschied (5.2 ± 0.51 % in Ko+RDN, $p = 0.31$ vs. Ko) (vgl. *Abbildung 52: Interstitielle Fibrose im linken Vorhof (LA)*).

Die bereits in der Interventionsgruppe beobachtete verstärkte Fibrose-Bildung im linken Vorhof in durch Adenin-Nephropathie niereninsuffizienten Ratten, die durch renale Denervation verhindert werden konnte, (vgl. 4.1.5, *Abbildung 32A* und *Abbildung 32B*) konnte also auch in dieser Tiergruppe beobachtet werden.

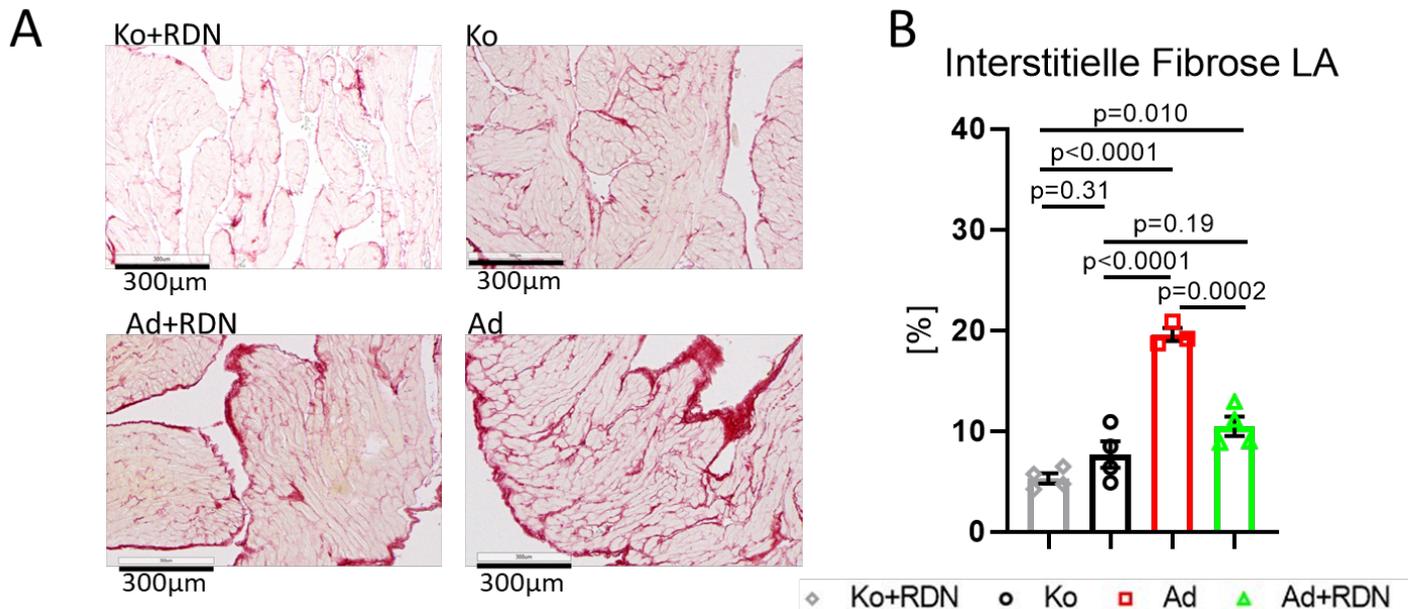


Abbildung 52: Interstitielle Fibrose im linken Vorhof (LA)

A: Picro-siriusrot gefärbte Gewebeschnitte des linken Vorhofs von Kontrollen mit renaler Denervation (Ko+RDN), Kontrollen (Ko), Adenin-gefütterten Ratten (Ad) und Adenin-gefütterten Ratten mit renaler Denervation (Ad+RDN). **B:** Quantifizierung des interstitiellen Fibrosegehalts als prozentualer Anteil der Gesamtgewebefläche in Ko+RDN ($n=4$ Tiere), Ko ($n=4$ Tiere), Ad ($n=3$ Tiere) und Ad+RDN ($n=4$ Tiere). One-way ANOVA mit Tukey's multiple comparison Test wurde zur statistischen Analyse verwendet. Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM gezeigt.

Die Ausmessung der Querschnittsfläche linksatrialer Kardiomyozyten ergab keine signifikanten Größenunterschiede zwischen den Gruppen. So maßen die Myozyten des linken Vorhofs der renal denervierten Kontrolltiere im Mittel $617.8 \pm 26.3 \mu\text{m}^2$, die der Kontrolltiere $571.9 \pm 36.5 \mu\text{m}^2$, die der Adenin-gefütterten Ratten $528.4 \pm 35.1 \mu\text{m}^2$ und die der renal denervierten Adenin-gefütterten Ratten $644.1 \pm 21.4 \mu\text{m}^2$ (vgl. *Abbildung 53: Myozytäre Hypertrophie im linken Vorhof (LA)*). Es ergab sich histologisch demnach kein Anhalt für linksatriale Hypertrophie der Kardiomyozyten.

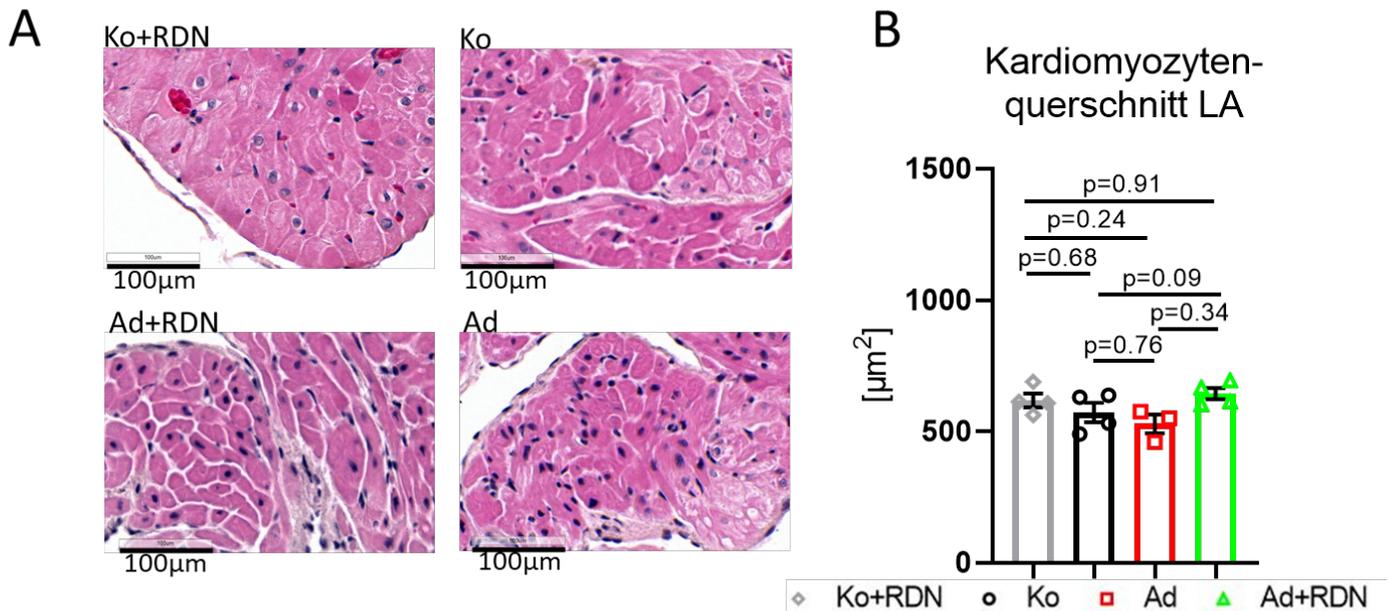


Abbildung 53: Myozytäre Hypertrophie im linken Vorhof (LA)

A: Repräsentative Ausschnitte Hämatoxylin-eosin-gefärbter Gewebeschnitte des linken Vorhofs von Kontrollen mit renaler Denervation, Kontrollen (Ko), Adenin-gefütterten Ratten (Ad) und Adenin-gefütterten Ratten mit renaler Denervation (Ad+RDN).

B: Ausgemessene Größe der Kardiomyozyten im linken Vorhof als Querschnittsfläche in μm^2 in Ko+RDN (n=4 Tiere), Ko (n=4 Tiere), Ad (n=3 Tiere) und Ad+RDN (n=4 Tiere). One-way ANOVA mit Tukey's multiple comparison Test wurde zur statistischen Analyse verwendet. Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM gezeigt.

In der Quantifizierung der immunhistologischen Färbungen stellte sich der Gehalt des Katecholamin-synthetisierenden Enzyms Tyrosinhydroxylase im linken Vorhof der Versuchstiere zwischen allen Gruppen nicht signifikant verschieden dar. So lag der Anteil der Tyrosinhydroxylase des linken Vorhofs für die Kontroll+RDN-Gruppe im Mittel bei 0.27 ± 0.04 %, für die Kontroll-Gruppe bei 0.38 ± 0.11 %, für die Adenin-Gruppe bei 0.39 ± 0.08 % und für die Adenin+RDN-Gruppe bei 0.52 ± 0.08 % (vgl. *Abbildung 54: Tyrosinhydroxylasegehalt im linken Vorhof (LA)*). Immunhistologisch konnte somit keine Regulation der sympathischen Innervation im linken Vorhof festgestellt werden.

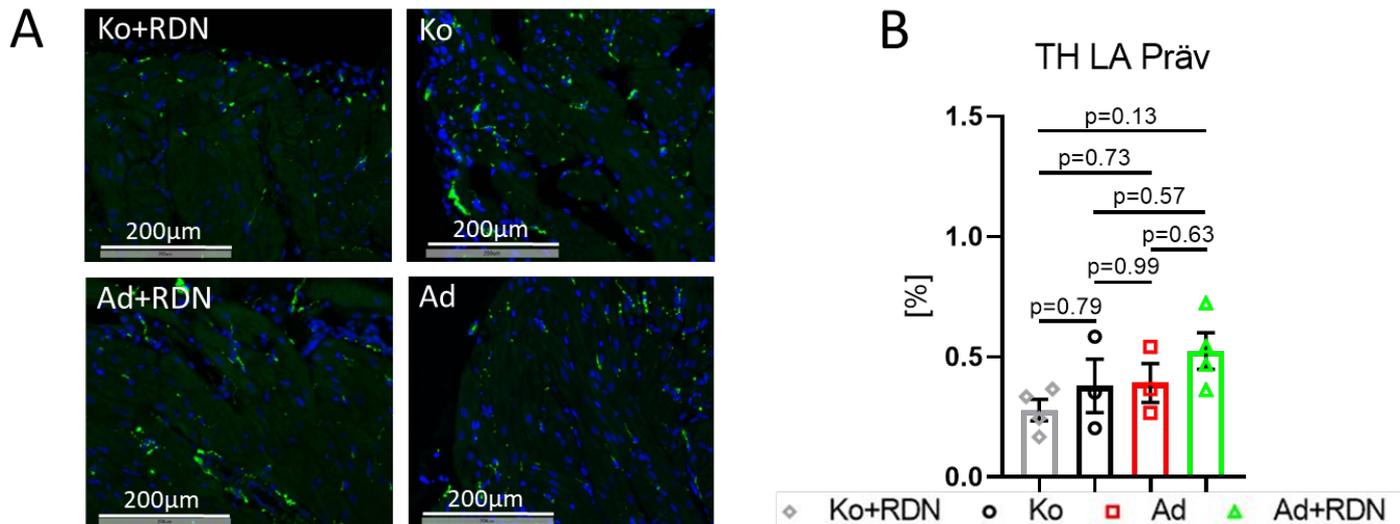


Abbildung 54: Tyrosinhydroxylasegehalt im linken Vorhof (LA)

A: Repräsentative Ausschnitte immunhistochemisch gefärbter Gewebeschnitte des linken Vorhofs von Kontrollen mit renaler Denervation, Kontrollen (Ko), Adenin-gefütterten Ratten (Ad) und Adenin-gefütterten Ratten mit renaler Denervation (Ad+RDN). Grün: Tyrosinhydroxylase (TH), blau: DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)

B: Quantifizierung des Tyrosinhydroxylasegehalts als prozentualer Anteil der Gesamtgewebefläche in Ko+RDN (n=4 Tiere), Ko (n=4 Tiere), Ad (n=3 Tiere) und Ad+RDN (n=4 Tiere). One-way ANOVA mit Tukey's multiple comparison Test wurde zur statistischen Analyse verwendet. Alle Daten sind als Mittelwert±SEM gezeigt.

4.2.5 Elektrophysiologisches Remodeling des linken Vorhofs

Unter elektrophysiologischem Remodeling des Vorhofs versteht man Veränderungen in der atrialen Erregungsbildung und -weiterleitung. Im Rahmen der Entstehung von Vorhofflimmern sind v.a. solche Veränderungen von Bedeutung, die in einer verkürzten atrialen Refraktärzeit resultieren und somit die Ausbildung kreisender Erregungen begünstigen. Zur Beurteilung der atrialen Erregungsleitung wurde den Versuchstieren ein Zwei-Kanal-EKG abgeleitet und P-Welle sowie PQ-Intervall ausgemessen.

Die Auswertung der Ratten-EKGs im Rahmen der Terminalversuche nach 16 Wochen ließ eine Verbreiterung der P-Welle in den Adenin-gefütterten niereninsuffizienten Ratten im Vergleich zur Kontroll-Gruppe erkennen, die durch renale Denervation verhindert werden konnte. Die mittlere P-Wellen-Dauer betrug in der Adenin-Gruppe 25.8 ± 2.9 ms gegenüber 21.7 ± 0.53 ms in der Kontroll-Gruppe bzw. 18.6 ± 0.98 ms in der Kontroll+RDN-Gruppe. Diese Prolongation erreichte jedoch nur zwischen der Kontrolle+RDN-Gruppe und der Adenin-Gruppe das Signifikanzniveau ($p=0.017$), zwischen Kontroll- und Adenin-Gruppe war diese mit $p=0.22$ nicht signifikant. Durch renale Denervation ließ sich eine signifikante Verkürzung der P-Wellen-Dauer gegenüber der Adenin-Gruppe auf durchschnittlich 18.1 ± 0.68 ms in Ad+RDN ($p=0.011$ vs. Ad) erzielen. Die mittleren P-Wellen-Dauern zwischen sham-operierten und renal

denervierten Kontrollen unterschieden sich nicht signifikant ($p=0.35$) (vgl. *Abbildung 55: Elektrophysiologisches Remodeling im linken Vorhof (LA)*).

Auch die Dauer des PQ-Intervalls stellte sich in Adenin-gefütterten Tieren prolongiert gegenüber Kontrolltieren dar (45.4 ± 0.56 ms in Ko vs. 57.1 ± 4.5 ms in Ad). Mit $p=0.074$ wurde das Signifikanzniveau jedoch knapp verfehlt. Die renale Denervation zeigte keinen Effekt, sodass sich die Längen des PQ-Intervalls in renal denervierten Adenin-Tieren und sham-operierten Adenin-Tieren nicht wesentlich unterschieden ($p=0.96$). Auch zwischen Kontrollen und renal denervierten Kontrollen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede ($p=0.79$) (vgl. *Abbildung 55: Elektrophysiologisches Remodeling im linken Vorhof (LA)*).

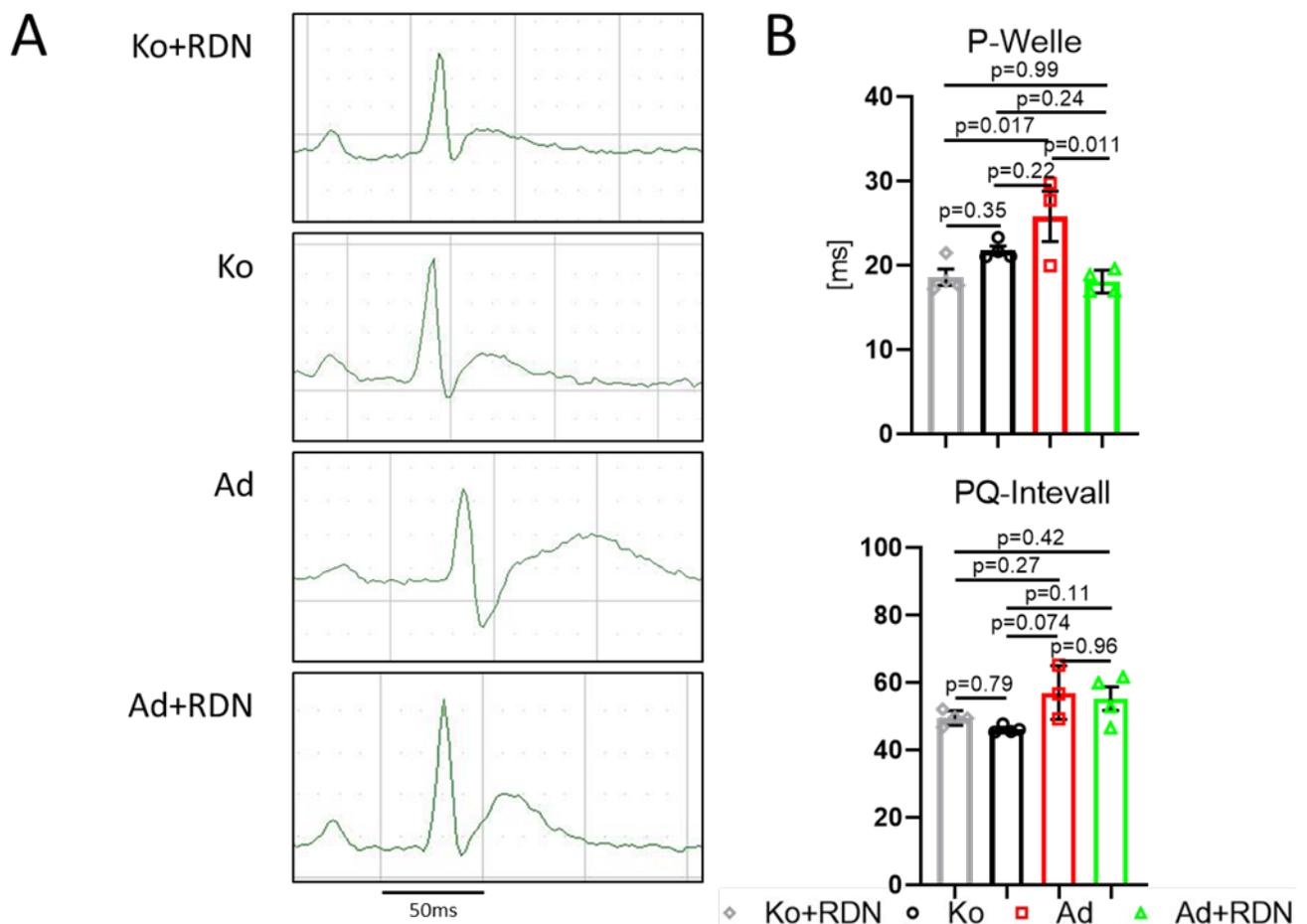


Abbildung 55: Elektrophysiologisches Remodeling im linken Vorhof (LA)

A: Repräsentativer Herzschlag aus dem EKG von Kontrollen mit renaler Denervation (Ko+RDN), Kontrollen (Ko), Adenin-gefütterten Ratten (Ad) und Adenin-gefütterten Ratten mit renaler Denervation (Ad+RDN).

B: Gemessene Dauer von P-Welle und PQ-Intervall in Millisekunden (ms) in Ko+RDN ($n=4$ Tiere), Ko ($n=4$ Tiere), Ad ($n=3$ Tiere) und Ad+RDN ($n=4$ Tiere). One-way ANOVA mit Tukey's multiple comparison Test wurde zur statistischen Analyse verwendet. Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM gezeigt.

4.2.6 Remodeling des linken Ventrikels

Die histologische Auswertung der interstitiellen Fibrose im linken Ventrikel zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen allen Gruppen. Der mittlere Anteil interstitieller Fibrose an der Gesamtgewebefläche lag bei 3.6 ± 0.27 % in denervierten Kontrollen, 4.7 ± 0.57 % in Kontrollen, 5.1 ± 0.48 % in Adenin-gefütterten Tieren und 4.9 ± 0.36 % in Adenin-gefütterten Tieren mit renaler Denervation (vgl. *Abbildung 56: Interstitielle Fibrose im linken Ventrikel (LV)*).

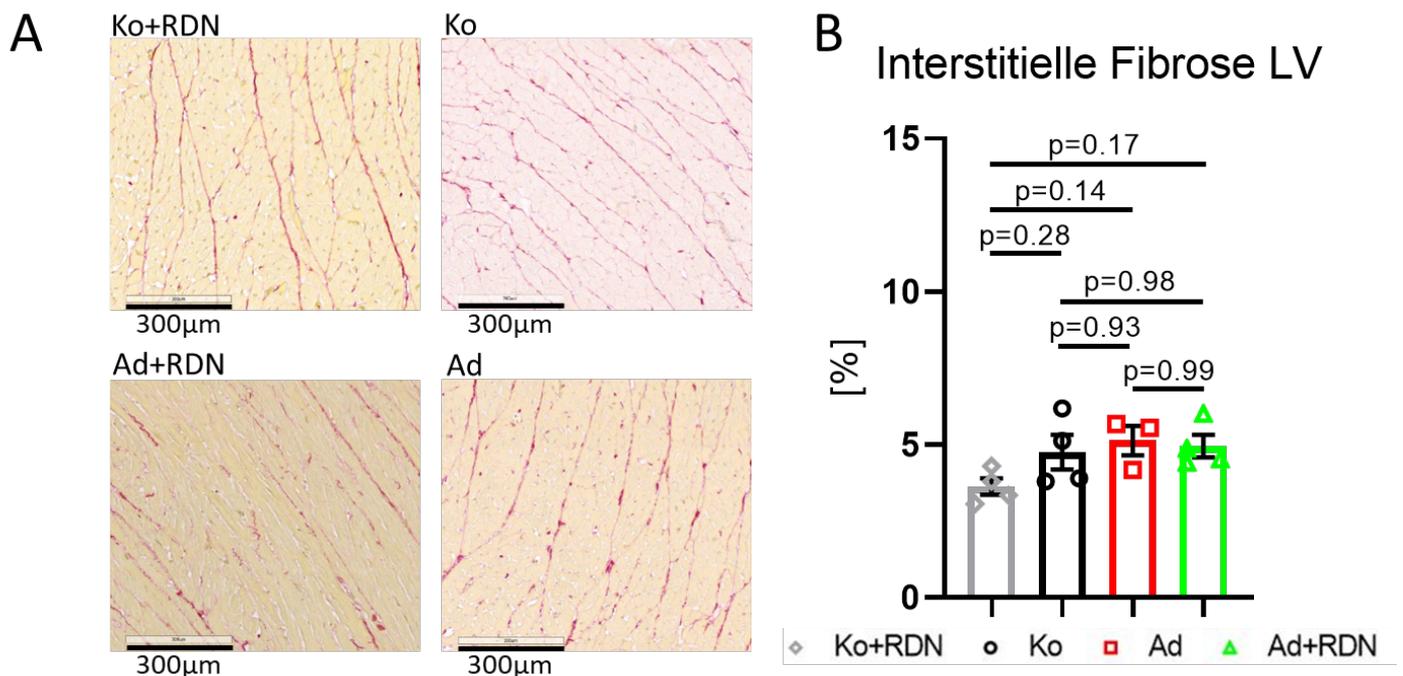


Abbildung 56: Interstitielle Fibrose im linken Ventrikel (LV)

A: Repräsentative Ausschnitte Picro-Siriusrot gefärbter Gewebeschnitte des linken Ventrikels von Kontrollen mit renaler Denervation (Ko+RDN), Kontrollen (Ko), Adenin-gefütterten Ratten (Ad) und Adenin-gefütterten Ratten mit renaler Denervation (Ad+RDN).

B: Quantifizierung des interstitiellen Fibrosegehalts als prozentualer Anteil der Gesamtgewebefläche in Ko+RDN (n=4 Tiere), Ko (n=4 Tiere), Ad (n=3 Tiere) und Ad+RDN (n=4 Tiere). One-way ANOVA mit Tukey's multiple comparison Test wurde zur statistischen Analyse verwendet. Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM gezeigt.

Auch bezüglich der Myozytengröße im linken Ventrikel ließen sich keine relevanten Unterschiede zwischen den Gruppen feststellen ($1279.0 \pm 74.1 \mu\text{m}^2$ in Ko+RDN, $1260.0 \pm 63.6 \mu\text{m}^2$ in Ko, $1370.0 \pm 43.3 \mu\text{m}^2$ in Ad, $1281.0 \pm 47.2 \mu\text{m}^2$ in Ad+RDN; vgl. *Abbildung 57: Myozytenhypertrophie im linken Ventrikel (LV)*).

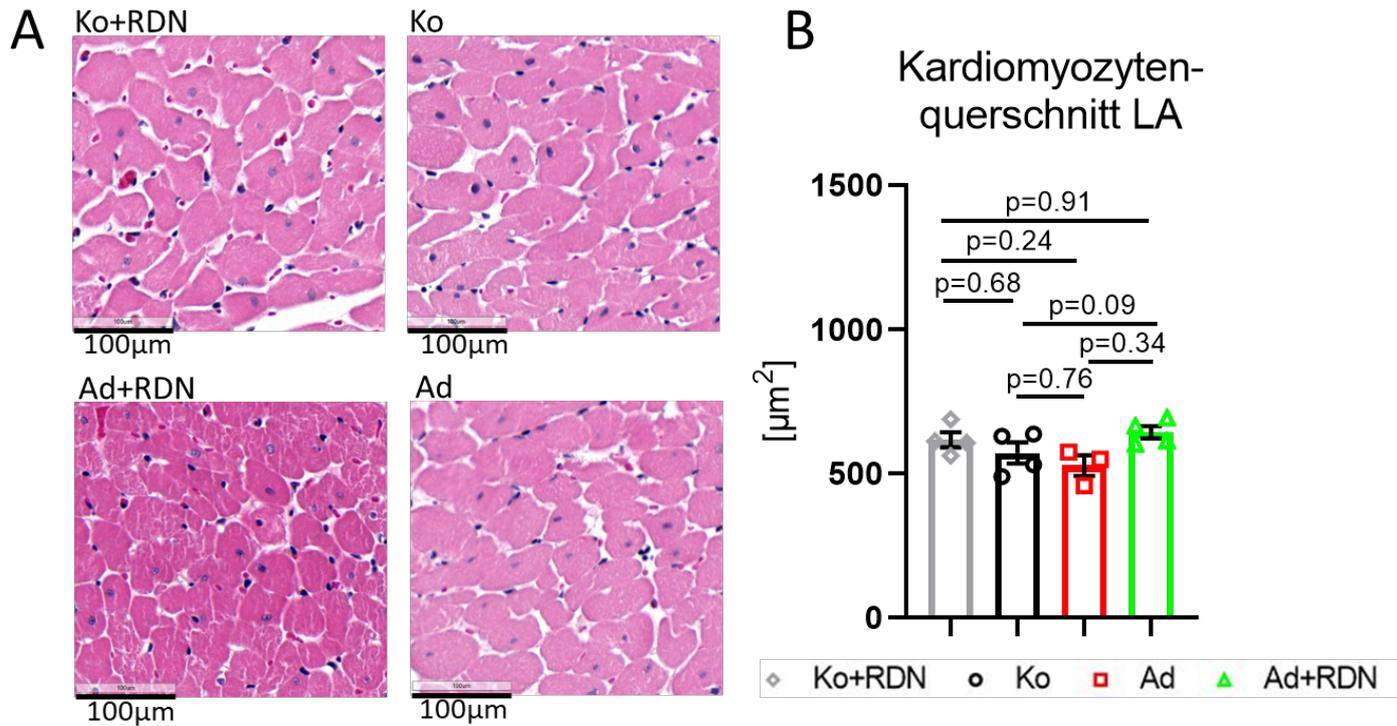


Abbildung 57: Myozytenhypertrophie im linken Ventrikel (LV)

A: Repräsentative Ausschnitte Hämatoxylin-eosin-gefärbter Gewebeschnitte des linken Ventrikels von Kontrollen mit renaler Denervation, Kontrollen (Ko), Adenin-gefütterten Ratten (Ad) und Adenin-gefütterten Ratten mit renaler Denervation (Ad+RDN).

B: Ausgemessene Größe der Kardiomyozyten im linken Ventrikel als Querschnittsfläche in μm^2 in Ko+RDN ($n=4$ Tiere), Ko ($n=4$ Tiere), Ad ($n=3$ Tiere) und Ad+RDN ($n=4$ Tiere). One-way ANOVA mit Tukey's multiple comparison Test wurde zur statistischen Analyse verwendet. Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM gezeigt.

Insgesamt ergab sich also histologisch bei nierengeschädigten Ratten kein Anhalt für Remodelingprozesse in Form von zunehmender Fibrosierung oder Hypertrophie im linken Ventrikel im Vergleich zu Kontrolltieren.

5. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Adenin-Modell der CKD in 8 bis 10 Wochen alten Sprague Dawley Ratten verwendet, um die pathophysiologischen Zustände einer chronischen Nierenerkrankung und der resultierenden kardiovaskulären Komplikationen wie kardiale Remodelingprozesse möglichst ähnlich derer, wie sie bei der CKD des Menschen vorkommen, zu simulieren. Zur Untersuchung der Bedeutung einer gesteigerten neurohumoralen Aktivierung wurde zur Unterbrechung der afferenten und efferenten sympathischen Innervation der Niere ein Teil der Versuchstiere bilateral renal denerviert.

Die Adenin-gefütterten Versuchstiere zeigten eine renale Dysfunktion mit erhöhten Plasmakonzentrationen von Kreatinin und Harnstoff als Zeichen der eingeschränkten Filtrationsleistung der Niere. Außerdem wiesen die Versuchstiere einen erhöhten oxidativen Stress und eine verminderte anti-oxidative Abwehrkapazität sowie eine starke Fibrosierung der Nieren auf. Dies war assoziiert mit einem verstärkten Anstieg des mittleren arteriellen Blutdrucks in den letzten zwei Wochen des Experiments. Am linken Vorhof ließ sich eine vermehrte Fibrose, hinweisend auf ein arrhythmogenes Substrat, nachweisen. Elektrophysiologisch zeigte sich eine verzögerte atriale Erregungsweiterleitung mit einer Verlängerung der P-Wellen-Dauer.

Durch renale Denervation konnte kein protektiver Effekt an der Niere erzielt werden und der progredienten Abnahme der Nierenfunktion nicht entgegengewirkt werden. Die detektierten atrialen Remodelingprozesse wie atriale Fibrose und verlängerte P-Wellen-Dauer waren hingegen durch renale Denervation reversibel, jedoch unabhängig von einer Blutdruckreduktion. In dem hier verwendeten CKD-Modell der Ratte erwies sich die renale Denervation als effektive Intervention in der Reduktion der Entstehung eines atrialen arrhythmogenen Substrats.

5.1 Adenin-Modell der CKD

Zur Simulation der CKD wurden in der Vergangenheit verschiedene Tiermodelle entwickelt, die zum Ziel hatten, die Charakteristika der menschlichen CKD und ihrer kardiovaskulären Komplikationen abzubilden. Dazu zählen insbesondere eine Abnahme der GFR, angezeigt durch steigende Plasmakonzentrationen der Retentionsparameter Kreatinin und Harnstoff, eine Proteinurie, eine Blutdruckerhöhung sowie eine verstärkte Kalzifizierung der Gefäße. In dem Modell der Niereninsuffizienz durch Adeninfütterung zeigte die geschädigte Niere

Charakteristika einer tubulointerstitiellen Nephropathie mit tubulärer Atrophie, tubulointerstitieller Fibrose sowie Glomerulosklerose.²⁶ Die häufigsten Veränderungen des kardiovaskulären Systems im Rahmen der CKD umfassen arterielle Hypertonie und kardiale Hypertrophie.⁶²

Im Gegensatz zu operativen Modellen der chronischen Niereninsuffizienz wie der 5/6-Nephrektomie, bei der eine Niere vollständig sowie entweder die beiden Pole der kontralateralen Niere entfernt werden oder eine Niere vollständig entfernt und die kontralaterale Niere zu 2/3 infarziert werden, wurden weniger invasive Modelle gesucht, die eine geringere perioperative Sterblichkeit aufweisen.^{26,27} Um die hohe intraprozedurale Mortalitätsrate zu umgehen, wurde das Adenin-Modell der CKD entwickelt, das eine Nierenschädigung ohne invasive Eingriffe durch Fütterung Adenin-haltiger Nahrung auslösen kann.²⁶ Dabei wurden unterschiedliche Konzentrationen an Adenin getestet, um die Dosierung herauszufinden, die die pathophysiologischen Veränderungen und den Verlauf der menschlichen CKD bestmöglich imitiert. Während sich 0.075% Adenin als unzureichend zur Induktion der für die CKD typischen renalen Schädigungen herausstellte, führte 0.75% Adenin zum rasch progredienten renalen Funktionsverlust, eher einer akuten Nierenschädigung entsprechend, als dem langsamen über Jahre andauernden chronischen Verlauf der CKD beim Menschen.²⁷ Diwan et al. beschrieben, dass eine Fütterung mit 0.25% Adenin über bis zu 16 Wochen den typischen Verlauf der menschlichen CKD am besten widerspiegelt, entsprechend einem ca. 8-jährigen Krankheitsverlauf beim Menschen.²⁶

Bei dem gewählten Adenin-Modell wird durch Verabreichung von Adenin-haltiger Nahrung eine Nephropathie mit primär tubulärer Schädigung als führendem Mechanismus induziert, die durch Kristallbildung und Ablagerung und in Folge dessen Inflammation und Fibrose gekennzeichnet ist.⁵² Durch Hemmung des „salvage pathways“ des Adenin-Abbaus wird dieses verstärkt durch Xanthinoxidase zu schwerlöslichem 2,8-Dihydroxyadenin umgesetzt, welches akkumuliert und Kristalle bildet, die nach luminal in die Tubuli sezerniert werden. Diese Kristalle werden z.T. über den Urin ausgeschwemmt, z.T. führen sie durch Interaktion mit Tubulusepithelzellen je nach Größe zu tubulären Schädigungsprozessen wie Inflammation. Während kleine Kristalle von den Tubuluszellen internalisiert und wahrscheinlich degradiert werden, werden Kristalle mittlerer Größe von Epithelzellen und Makrophagen „überwachsen“ und führen dadurch zur Obstruktion der Tubuli oder werden ins Interstitium verlagert, wo sie Inflamationsprozesse induzieren. Größere oder aggregierte Kristalle verbleiben im Tubuluslumen und führen zur Obstruktion.⁵² Die Glomeruli werden im Rahmen der Adenin-Nephropathie nicht oder nur sekundär durch tubuläre Obstruktion und daraus resultierenden Rückstau in die Bowman-Kapsel geschädigt. So sind am ehesten die in unmittelbarer Nähe

der atrophen und fibrotisch umgebauten Areale befindlichen Glomeruli betroffen, während es zu einer generellen Schädigung der Glomeruli erst in weit fortgeschrittenen Stadien kommt.⁵² Das Adenin-Modell der CKD simuliert demnach vorwiegend einen tubulären Nierenschaden.

Im Gegensatz dazu sind die beiden häufigsten Entitäten der menschlichen CKD, die diabetische und die hypertensive Nephropathie, durch primär glomeruläre Schädigungsmechanismen gekennzeichnet, tubuläre und interstitielle Schäden treten dabei meist erst im Verlauf auf.^{3,91} Im Rahmen der diabetischen Nephropathie kommt es durch Hyperglykämie zunächst zur Schädigung der glomerulären Endothelzellen, Mesangiumszellen und Podozyten,³ was sich histologisch mit zunehmendem Schweregrad zunächst als eine Verdickung der glomerulären Basalmembran über eine Expansion der glomerulären Mesangiumszellen bis hin zur nodulären Sklerose (Kimmelstiel-Wilson) und schließlich als fortgeschrittene globale glomeruläre Sklerose in > 50 % der Glomeruli zeigt.¹⁹ Auch bei der hypertensiven Nephropathie sind zunächst die renalen Blutgefäße betroffen. Es kommt zu charakteristischen Veränderungen der Gefäßwände im Sinne einer Arteriosklerose mit Intimaverdickung, Verdünnung der Media sowie Hyalinose, was die Gefäßpermeabilität erhöht und zur Einwanderung von Plasmabestandteilen in die Media führt und Inflammationsprozesse auslöst. Auch das Vas afferens der Glomeruli ist von diesen Veränderungen betroffen und wird durch diese Umbauprozesse zunehmend verengt mit resultierender Ischämie und Einschränkung der Filtrationsleistung in den Glomeruli.⁹¹

Bei beiden Formen, der diabetischen wie der hypertensiven Nephropathie, werden demnach initial zunächst die Glomeruli geschädigt, während tubulointerstitielle Veränderungen wie tubuläre Atrophie oder interstitielle Fibrose erst in Folge im Verlauf auftreten,^{19,91,62} sodass das Adenin-Modell einer tubulären Nephropathie in dieser Hinsicht von den natürlichen pathophysiologischen Mechanismen der CKD abweicht und sich hier Limitationen des Tiermodells ergeben. Andererseits war es das Ziel dieser Untersuchungen, den Effekt einer renalen Denervation unabhängig von der Niere auf die Veränderungen am Herzen bei Niereninsuffizienz zu untersuchen, was die Wahl des hier verwendeten Adenin-Modells begründet.

5.2 Renale Denervation

Durch renale sympathische Nervenfasern werden vorwiegend das renale Gefäßsystem, einschließlich des Vas afferens als Stellschraube der glomerulären Filtrationsleistung, die Renin-produzierenden juxtaglomerulären Mesangiumszellen und die für die Natrium- und

Wasserresorption verantwortlichen Transportmechanismen der Tubuli innerviert.^{22,24} Die sympathische Innervation greift hier im Sinne der Regulation von Blutdruck und Volumenhaushalt an hämodynamischen Parametern wie dem renalen Perfusionsdruck und der Na⁺- und Wasserresorption an.

Durch Unterbrechung der von den glomerulären Chemo- und Barorezeptoren entspringenden Afferenzen verhindert die renale Denervation den renalen Feedback-Mechanismus, der zur Aktivierung sympathischer Regulationszentren im Hirnstamm führt, und reduziert somit die zentrale Sympathikusaktivität. Darüber hinaus führt die renale Denervation durch Unterbrechung der sympathischen Efferenzen an der Niere selbst zu einer verminderten α 1-Adrenorezeptor-vermittelten Vasokonstriktion der Nierengefäße und damit zu einer Verbesserung der renalen Perfusion und zu einer Reduktion des renalen Filtrationsdrucks.⁵⁷ In diesem Sinne kann die renale Denervation zu einer Verbesserung der renalen Hämodynamik führen, wie Linz et al. in einem Tiermodell spontan hypertensiver adipöser Ratten zeigen konnten.⁵⁷

Daraus ergibt sich, dass der Schädigungsort und -mechanismus im Adenin-Modell und der primäre Wirkort der renalen Denervation voneinander abweichen. Da die Adenin-induzierte Nephropathie durch tubuläre Inflammationsprozesse, ausgelöst durch Interaktion der Tubulusepithelzellen mit 2,8-Dihydroxyadeninkristallen, zu Stande kommt und die Einschränkung der Filtrationsleistung hier sekundär aus der Obstruktion der Tubuli resultiert und nicht primär durch Störung der renalen Hämodynamik, könnte der Einfluss der renalen Denervation auf die daran beteiligten pathophysiologischen Mechanismen in unserem Tiermodell begrenzt sein. Daher liefern die pathophysiologischen Überlegungen der Genese des Nierenschadens, in unserem Tiermodell als primär tubulärer Schaden, eine mögliche Erklärung dafür, weshalb sich hier durch die renale Denervation kein protektiver Effekt auf die Nierenparameter wie Nierenfunktion bzw. die Entstehung von oxidativem Stress im Nierengewebe beobachten ließ. Dieses Modell erlaubt aber dadurch andererseits, die Effekte am Herzen ohne oder ohne wesentliche Änderung der Nierenfunktion zu untersuchen.

5.3 Blutdruckeffekte

Vorangehende Publikationen berichten von einem gesteigerten Blutdruck in Adeninfütterten Ratten.^{48,27} Dieser Blutdruckeffekt war in unseren Versuchen weniger stark ausgeprägt.

Kashioulis et al. fütterten männliche Sprague Dawley Ratten über 9-13 Wochen mit Adenin-Futter in abgestuften Konzentrationen (diskontinuierliches Modell). In den ersten 3 Wochen

enthielt das Futter 0.5% Adenin, gefolgt von 0.3% Adenin für 2 Wochen und 0.15% Adenin bis zum Versuchsende.^{75,48} Die Blutdrücke wurden telemetrisch über 24 h als Baseline eine Woche vor Versuchsbeginn und in den Wochen 1, 3, 5 und 7 gemessen. Bereits nach 3 Wochen (bei Gabe von 0.5% Adenin) konnte ein signifikanter Blutdruckanstieg in den Adenin-gefütterten Ratten beobachtet werden, während der Blutdruck in den Kontrollen konstant blieb (nach 7 Wochen: systolischer Blutdruck 141.0 ± 8.0 mmHg in Adenin-gefütterten Tieren vs. 121.0 ± 10.0 mmHg in Kontrollen).⁷⁵

Auch Diwan et al. berichten von einem Blutdruckanstieg im Adenin-Modell von männlichen Wistar Kyoto Ratten (WKY). Diese wurden in mehrere Gruppen aufgeteilt und für bis zu 16 Wochen mit Adenin-Futter verschiedener Konzentrationen (0.075%, 0.25%, 0.5%, 0.75%) bzw. normaler Haltungsdiät als Kontroll-Gruppe gefüttert. Die Blutdruckmessung erfolgte alle 4 Wochen mittels tail-cuff-Messung. Während für 0.075% Adenin-gefütterte Tiere nur ein leichter Blutdruckanstieg im Verlauf nachweisbar war, zeigten 0.25%-, 0.5%- und 0.75%-Adenin-gefütterte Ratten bereits nach 4 Wochen signifikant erhöhte Blutdruckwerte von bis zu 150.0 mmHg systolisch.²⁷

In unserem Tiermodell der CKD mit Fütterung von 0.25% Adenin und wöchentlicher telemetrischer Blutdruckmessung zeigte sich nach 16 Wochen eine moderate, aber signifikante Erhöhung des mittleren arteriellen Drucks (123.9 ± 4.6 mmHg in Ad vs. 103.3 ± 1.4 mmHg in Ko, $p=0.0007$ vs. Ko).

Als mögliche Erklärungen für den eher geringen Blutdruckanstieg in unseren Beobachtungen verglichen mit bisher publizierten Daten kommen verschiedene Aspekte des Versuchsaufbaus bzw. der Methodik in Betracht. So muss zunächst die Wahl der im Futter enthaltenen Adenin-Konzentration bedacht werden, die einen erheblichen Einfluss auf Geschwindigkeit und Schwere des Krankheitsverlaufs nimmt.

Kashioulis et al. verwendeten ein diskontinuierliches Adenin-Modell, bei dem mit hohen Adenin-Konzentrationen zu Versuchsbeginn gestartet wurde, die im Verlauf reduziert wurden. Anders als in unserem Modell, bei dem durch Applikation konstant niedriger Dosen Adenin langsam progredient über einige Wochen ein Nierenschaden induziert wird, kommt es im beschriebenen diskontinuierlichen Modell durch die initial hohe Dosis rasch zu einem renalen Funktionsverlust, was den schnellen Blutdruckanstieg erklären könnte. Durch Reduktion der initial hohen Dosis wird der Krankheitsverlauf verzögert, sodass dennoch der langsame Verlauf der CKD erhalten bleibt. Ein Aspekt, der nur zum geringen Blutdruckanstieg in unserem Modell geführt haben könnte, könnte demnach eine mit 0.25% Adenin initial zu niedriger Dosis gewesen sein, die zur Induktion eines frühen Blutdruckeffekts möglicherweise nicht ausreichend war. Jedoch diente in unseren Versuchen die niedrige Adenin-Konzentration

dazu, eine zu hohe Morbidität und Mortalität der Versuchstiere zu Versuchsbeginn und im Verlauf zu vermeiden und ermöglichte die lange Versuchsdauer von 16 Wochen.

Als wesentlicher Einflussfaktor müssen beim Vergleich tierexperimenteller Daten mögliche Unterschiede der Spezies bzw. Unterarten berücksichtigt werden. Auch zwischen den einzelnen Unterarten einer Spezies können sich durch geringfügige Unterschiede in der Physiologie bzw. dem Metabolismus beispielsweise Unterschiede in der Vulnerabilität für pathophysiologische Veränderungen wie z.B. der arteriellen Hypertonie ergeben. Sowohl Unterschiede zwischen den Spezies als auch interindividuelle Unterschiede der Tiere einer Spezies können zu abweichenden Ergebnissen beitragen. So könnten die beobachteten Abweichungen bzgl. des Blutdruckeffekts zwischen unserem Tiermodell und der Literatur bei Verwendung von Adenin-Futter gleicher Konzentration durch die Verwendung unterschiedlicher Rattenarten als Versuchstiere bedingt sein. Im Versuchsaufbau von Diwan et al. dienten Wistar Kyoto Ratten als Versuchstiere, während in unserem Experiment Sprague Dawley Ratten eingesetzt wurden. Eine eventuell größere Empfindlichkeit der Wistar Kyoto Ratten für die Entwicklung einer arteriellen Hypertonie könnte demnach für den beobachteten Blutdruckanstieg bereits nach 4 Wochen Adenin-Futter verantwortlich sein, während die bei uns verwendeten Sprague Dawley Ratten möglicherweise durch eine natürlich bedingte geringere Neigung zur Hypertonie erst nach langanhaltender Nierenschädigung nach 16 Wochen mit einer leichten Blutdruckerhöhung reagieren. Mögliche Unterschiede in der Vulnerabilität der verschiedenen Ratten-Spezies könnten in morphologischen Abweichungen der Nieren von Wistar und Sprague Dawley Ratten begründet liegen. Solomon beschrieb, dass die Nieren von Sprague Dawley Ratten im Vergleich zu Wistar Kyoto Ratten größere bzw. längere proximale Tunuli aufweisen⁹⁸, was möglicherweise eine erhöhte Anfälligkeit der Wistar Ratten für eine renale Schädigung erklärt.

Darüber hinaus muss auch die Methode der Blutdruckmessung bedacht werden. Die Blutdruckmessung in der Ratte kann entweder invasiv mittels Telemetrie oder non-invasiv mittels tail-cuff erfolgen. Bei der telemetrischen Messung wird der Blutdruck über einen zuvor in die Aorta abdominalis eingebrachten Transmitter gemessen. Diese Methode erlaubt eine kontinuierliche Blutdruckmessung ohne Notwendigkeit des Handlings der Ratte oder äußerer Einwirkung sonstiger Stressoren und kann in gewohnter Umgebung und während das Tier im Käfig frei beweglich ist, durchgeführt werden. Die katheterbasierte Telemetrie gilt als „Goldstandard“ der Blutdruckmessung in Kleintieren.¹²⁰ Tail-cuff ist dagegen ein non-invasives Verfahren, das breite Anwendung findet. Die Blutdruckmessung erfolgt dabei durch Messung von Volumenänderungen in der Schwanzarterie. Dies erfordert jedoch eine enge Interaktion zwischen Untersucher*in und Versuchstier, da das Tier während der Messung in einer kleinen Kammer gehalten werden muss, um Bewegungsartefakte zu vermeiden. Das intensive

menschliche Handling und die räumliche Restriktion stellen stressauslösende Faktoren dar, die zu einer Stress-Reaktion im Versuchstier führen. Die physiologische Stressantwort umfasst dabei auch Veränderungen der Hämodynamik wie eine Steigerung der Herzfrequenz und eine Erhöhung des Blutdrucks.¹²⁰ Daher wird mit dieser Methode der Blutdruck systematisch zu hoch gemessen. Diese Überlegungen machen deutlich, dass erhöhte Blutdruckwerte in der tail-cuff-Messung, wie im Versuchsaufbau von Diwan et al. beschrieben, möglicherweise durch eine Stressreaktion der Versuchstiere im Rahmen der Messmethode beeinflusst wurden und sich so die Unterschiede zu den in unserem Modell erhobenen telemetrisch gemessenen Blutdruckdaten ergeben könnten.

Zusammenfassend zeigen die beschriebenen Beobachtungen, welchen entscheidenden Einfluss die Wahl des Futters, der genetische Background der verwendeten Versuchstiere und die Art der Messmethode auf die Ergebnisse der Versuche haben. Unsere Ergebnisse lassen außerdem erkennen, dass nicht der Blutdruck alleine ein Remodeling des Vorhofes bedingt, sondern weitere Faktoren einen entscheidenden Einfluss auf atriale maladaptive Umbauprozesse zu haben scheinen.

5.4 Kardiales Remodeling

5.4.1 Ventrikuläres Remodeling

Patient*innen mit CKD haben schon in frühen Stadien bei nur leichtgradig eingeschränkter Nierenfunktion ein merklich erhöhtes kardiovaskuläres Risiko und kardiovaskuläre Ereignisse stellen die häufigste Todesursache in Patient*innen im fortgeschrittenen Krankheitsstadium dar. Ursächlich hierfür sind kardiale Veränderungsprozesse, die Risikofaktoren für Krankheitsbilder wie koronare Herzkrankheit, Myokardinfarkt, Herzrhythmusstörungen oder Herzinsuffizienz darstellen.

Diwan et al. beschrieben im Rattenmodell der CKD mit 0.25% Adenin-Futter nach 16 Wochen neben erheblich gesteigertem Blutdruck eine linksventrikuläre Hypertrophie sowie einen gesteigerten Gehalt interstitieller Fibrose im linken Ventrikel.²⁷

Kashioulis et al. konnten im diskontinuierlichen Adenin-Modell der Niereninsuffizienz bei Ratten eine kardiomyozytäre Hypertrophie mit signifikant erhöhtem Zelldurchmesser im linken Ventrikel zeigen, während sich hinsichtlich des ventrikulären Fibrosegehalts kein Unterschied zu Kontrolltieren ergab.⁴⁸

In unserer Versuchsreihe ergab sich histologisch kein Anhalt für ventrikuläre Remodelingprozesse. Weder bzgl. kardiomyozytärer Hypertrophie noch des Gehalts interstitieller Fibrose konnte ein Unterschied zwischen Adenin-gefütterten und Kontrolltieren verzeichnet werden. Auch BNP bzw. NT-proBNP als Markerproteine für erhöhte ventrikuläre Wandspannung zeigten sich in Adenin-gefütterten Tieren nicht merklich erhöht, was ebenfalls gegen eine linksventrikuläre Hypertrophie in diesen Tieren spricht.

Der fehlende Nachweis einer Myozyten-Hypertrophie des linken Ventrikels im Gegensatz zu den publizierten Daten könnte in dem Fehlen eines drastischen Blutdruckanstiegs in unserem Tiermodell begründet liegen. So könnte die in der Literatur beschriebene beobachtete linksventrikuläre Hypertrophie bei CKD im Tiermodell Folge der beschriebenen Blutdrucksteigerung sein. Bei gesteigertem Blutdruck im Systemkreislauf kommt es im Sinne einer Nachlasterrhöhung zu vermehrter Druckbelastung, erhöhter Wandspannung und einer kompensatorischen Steigerung der Pumparbeit des Ventrikels, was eine konzentrische Hypertrophie des Ventrikels zur Folge hat.⁷¹

5.4.2 Atriales Remodeling

Zu den kardiovaskulären Komplikationen, deren Auftreten in CKD-Patient*innen erheblich erhöht ist und die zu einer hohen Mortalität dieser Patient*innen beitragen, zählt auch VHF, weshalb die Aufdeckung der Mechanismen, die an der Genese des VHF bei CKD beteiligt sind, von besonderem Interesse ist. Ursächlich an der Entstehung und Aufrechterhaltung von VHF beteiligt ist ein atriales Substrat, das durch strukturelle und elektrophysiologische Remodelingprozesse entsteht und die Ausbildung von Re-Entry-Kreisläufen begünstigt. Daher wurden in der Vergangenheit in verschiedenen Tiermodellen der CKD atriale Remodelingprozesse untersucht.

Elektrophysiologische Remodelingprozesse führen zu veränderten Erregungsbildungs- bzw. Leitungseigenschaften des atrialen Myokards, wobei eine reduzierte Erregungsleitungsgeschwindigkeit und eine Verkürzung der atrialen Refraktärzeit dabei als führende Mechanismen gelten.

In unserem Tiermodell der CKD konnten wir eine signifikante Verlängerung der P-Wellen-Dauer in Adenin-gefütterten Ratten gegenüber Kontrollen nachweisen. Zu einem vergleichbaren Ergebnis kamen auch Qiu et al., die im 5/6-Nephrektomie-Modell der CKD in Sprague Dawley Ratten eine prolongierte P-Wellen-Dauer der niereninsuffizienten Ratten im Vergleich zu den Kontrolltieren feststellen konnten.⁸³

Die P-Welle spiegelt elektrokardiographisch die Depolarisation des Vorhofmyokards wider und ist daher Korrelat der atrialen Erregungsleitung. Eine Verlängerung der P-Welle zeigt somit eine verzögerte atriale Erregungsleitung mit verringerter Leitungsgeschwindigkeit an. Eine prolongierte P-Wellen-Dauer gilt als ein an der Genese von VHF beteiligter Risikofaktor.⁸¹

Nielsen et al. konnten in einer großen Patienten-Studie eine Assoziation zwischen prolongierter P-Welle und erhöhtem Risiko für VHF bestätigen.⁷⁶ So kann also die verlängerte P-Welle in Adenin-gefütterten Ratten als Indikator elektrophysiologischer Remodelingprozesse im linken Vorhof gedeutet werden, die die Vulnerabilität zur Auslösung von VHF erhöhen. Dies konnte auch in unserem Tiermodell in den elektrophysiologischen Untersuchungen von Wintrich und Hohl durch epikardiales Mapping bestätigt werden. In niereninsuffizienten Adenin-gefütterten Ratten ließen sich durch transösophageale Stimulation signifikant häufiger Episoden von VHF induzieren im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren.

Auch strukturelle Remodelingprozesse stören die Erregungsweiterleitung im Vorhof und tragen zur Aufrechterhaltung von VHF bei. Dabei kommt v.a. der vermehrten Fibrosebildung sowie der kardiomyozytären Hypertrophie eine Bedeutung zu. Durch Vermehrung der zwischen den Myozyten befindlichen Kollagenfasern kommt es zu einer zunehmenden Separation mit gestörter Erregungsübertragung zwischen den Zellen und verzögerter intraatrialen Leitung. Eine zunehmende Größe der Herzmuskelzellen führt zur Inhomogenität der Erregungsausbreitung.⁹⁰

In unserem Adenin-Modell der CKD konnten wir eine signifikante Zunahme des Gehalts interstitieller Fibrose in den Vorhöfen niereninsuffizienter Ratten verglichen zu gesunden Kontroll-Ratten zeigen, während histologisch keine myozytäre Hypertrophie im linken Vorhof nachweisbar war. Ähnliche Befunde zeigten sich auch im 5/6-Nephrektomie-Modell der Ratte.⁸³

Mit der Rolle einer neurohumoralen Aktivierung für die Entstehung atrialer Arrhythmien und daraus abgeleitet mit der renalen Denervation als potenzielle therapeutische Intervention bei VHF beschäftigten sich auch Linz et al. in verschiedenen Tiermodellen. In einem Modell der obstruktiven Schlafapnoe bei Schweinen beobachteten Linz et al. eine gesteigerte Plasma-Renin-Aktivität und eine erhöhte Plasmakonzentration von Aldosteron sowie eine verlängerte Dauer spontaner Episoden von VHF, welche durch eine renale Denervation reduziert werden konnten.⁵⁶ In einem weiteren Versuch induzierten Linz et al. in Ziegen durch Burst-Stimulation ein persistierendes VHF. Durch renale Denervation konnte der Gehalt sympathischer Nervenfasern im Vorhof verringert und strukturelle Veränderungen des Vorhofs reduziert werden. Auch die Komplexität des VHF zeigte sich in renal denervierten Tieren reduziert.⁵⁸

Auch in unseren Versuchen zeigten sich die beobachteten elektrophysiologischen und strukturellen Remodelingprozesse im linken Vorhof niereninsuffizienter Ratten durch renale Denervation als Intervention im Sinne einer Unterbrechung der sympathischen Innervation der Niere rückläufig, sodass wir einen möglichen Einfluss einer gesteigerten sympathischen Nervenaktivität und neurohumoralen Aktivierung bei CKD auf die Entstehung eines atrialen arrhythmogenen Substrats nachweisen konnten. Über welche pathophysiologischen Mechanismen ein erhöhter Sympathikotonus bzw. eine gesteigerte neurohumorale Aktivierung atriale Remodelingprozesse auslöst, bleibt weiterhin zu klären.

5.4.3 Reno-atriale Achse

Unsere Beobachtungen, dass in unserem Tiermodell der CKD Remodelingvorgänge im linken Vorhof nachweisbar sind, der linke Ventrikel jedoch keinerlei Veränderung zeigt, legen nahe, dass kardiale Schädigungen im Rahmen der CKD einer gewissen zeitlichen Abfolge bzw. Hierarchie folgen. So scheint es, dass atriale Veränderungen bereits vor den ventrikulären auftreten, der Vorhof also vor dem Ventrikel geschädigt wird. Dies spricht für eine erhöhte Vulnerabilität des Vorhofmyokards für Schädigungsmechanismen, die in Remodelingprozessen resultieren. Ventrikuläre Umbauprozesse treten offenbar erst sekundär und bei fortbestehender Schädigungseinwirkung oder als Folge damit verbundener pathophysiologischer Zustände wie der arteriellen Hypertonie auf.

Der linke Vorhof ist sowohl anatomisch als auch funktionell dem linken Ventrikel vorgeschaltet und durch seinen kleineren Durchmesser und erheblich geringere Wandstärke deutlich muskelschwächer als der linke Ventrikel, was seine größere Vulnerabilität im Vergleich zum linken Ventrikel verständlich macht.⁴⁴ Bei Belastung unterliegt der Vorhof somit starken Veränderungen der Wandspannung.

Eine mögliche Verbindung zwischen der insuffizienten Niere und dem maladaptiven Remodeling des Vorhofs könnten Nephrotoxine darstellen. So zeigten Aoki et al., dass männliche Sprague Dawley Ratten, die einer 5/6 Nephrektomie unterzogen wurden, eine signifikant erhöhte Indoxylsulfat-Plasmakonzentration besitzen. Diese ging mit einer stark eingeschränkten Nierenfunktion und erhöhten systolischen Blutdrücken einher, die im Verlauf von 4 Wochen zu ausgeprägten atrialen Umbauprozessen und einer erhöhten Vulnerabilität für VHF führten. Eine orale Behandlung der Versuchstiere mit einem Absorber urämischer Toxine (AST-120) hatte zwar keinen Einfluss auf die geschädigte Nierenfunktion oder die Hypertonie, konnte aber durch Senkung der Indoxylsulfat-Plasmakonzentration die Progression pro-fibrotischer und pro-inflammatorischer Prozesse im Vorhof verhindern und somit die Auslösbarkeit von VHF signifikant reduzieren.²

Die genauen pathophysiologischen Zusammenhänge zwischen atrialen und ventrikulären Schädigungsmechanismen und die Auswirkung einer CKD auf das ventrikuläre Remodeling bleiben jedoch noch zu klären.

5.5 Klinische Implikationen

VHF ist eine häufige und durch das erhöhte Risiko für einen ischämischen Schlaganfall schwerwiegende Komplikation der CKD und führt zu einer erheblich gesteigerten Mortalität, wodurch der Behandlung des VHF bei CKD eine große Bedeutung zukommt. Sowohl die Prävalenz von CKD als auch von VHF zeigen weltweit steigende Tendenz, sodass auch das Auftreten beider Komorbiditäten weiterhin zunehmen wird und im Gesundheitssystem eine besondere Beachtung erfordert. Therapeutisch stellt das Auftreten von VHF als Komorbidität bei CKD eine Herausforderung dar. Besonders die Prophylaxe thromboembolischer Ereignisse bedarf besonderer Aufmerksamkeit, da durch veränderte Hämodynamik im linken Vorhof dieser Patient*innen einerseits prothrombotische Konditionen mit massiv erhöhtem Schlaganfall-Risiko herrschen, andererseits das Blutungsrisiko unter Antikoagulation durch urämisch bedingte Störung der Thrombozytenfunktion, endotheliale Dysfunktion oder durch Heparinisierung unter Dialyse deutlich erhöht ist.^{40,112}

Aber auch die bisherigen Therapieoptionen zur Symptomreduktion des VHF zeigen durch lediglich beschränkte dauerhafte Aufrechterhaltung des Sinusrhythmus und relativ hohe Rezidivraten nur begrenzten Erfolg. So konnte in einer Studie gezeigt werden, dass die Rezidivrate von VHF nach Pulmonalvenenisolation bei Patient*innen mit bestehender CKD gegenüber solchen ohne eingeschränkte Nierenfunktion erhöht ist.⁵¹ Der Erfolg der Pulmonalvenenisolation als Therapie der Wahl bei symptomatischen Patient*innen mit VHF wird neben einer nicht dauerhaften Aufrechterhaltung der elektrischen Isolation des betreffenden Areals auch dadurch begrenzt, dass diese Intervention die atrialen Remodelingprozesse, die die Auslösung von VHF begünstigen und zur Aufrechterhaltung und Progression beitragen, unbeeinflusst lässt.⁵⁹

Diese Überlegung macht deutlich, dass es v.a. neue Therapiestrategien zu erforschen gilt, die ursächlich an der Entstehung eines atrialen arrhythmogenen Substrats ansetzen. Durch neue Erkenntnisse bzgl. der Rolle einer gesteigerten Sympathikusaktivität und damit verbundener RAAS-Aktivierung im Rahmen der CKD und deren Bedeutung in der Pathogenese von VHF durch Induktion struktureller und elektrischer Remodelingprozesse im linken Vorhof rückt eine Unterbrechung der sympatho-renalen Achse durch renale Denervation als interventionelle Therapie ins Interesse. Durch hohe Effektivität und Sicherheit bei geringer Komplikationsrate

des Verfahrens⁶⁴ könnte die renale Denervation als neue interventionelle Therapieoption durch Unterdrückung atrialer Remodelingvorgänge einen Fortschritt in der Therapie von VHF bei Patient*innen mit CKD darstellen.

In der Behandlung einer therapierefraktären Hypertonie stellte sich die renale Denervation als sicheres und effektives Verfahren zur Reduktion des systolischen und diastolischen Blutdrucks und damit verbundener pathophysiologischer Folgezustände heraus.^{31,53,89} Eine kürzlich veröffentlichte Studie konnte zeigen, dass bei Patient*innen mit therapierefraktärer Hypertonie und paroxysmalem VHF durch Behandlung mit renaler Denervation zusätzlich zur PVI die Rezidivrate des VHF gegenüber einer ausschließlichen Behandlung mit PVI signifikant reduziert werden konnte.¹⁰¹ Erste Studien zur Wirksamkeit einer renalen Denervation zur Prävention von neu auftretendem VHF bei Patienten mit therapierefraktärer Hypertonie sind gegenwärtig bereits am laufen (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01990911).

Auch für Patient*innen mit paroxysmalem VHF und CKD, insbesondere in weiter fortgeschrittenen Stadien, konnten die Ergebnisse erster klinischer Studien eine Überlegenheit der Behandlung mit renaler Denervation zusätzlich zur PVI gegenüber einer ausschließlichen Behandlung mit PVI nachweisen.⁵¹ Die Rezidivrate des VHF im Follow-up nach ca. 2 Jahren war für renal denervierte Patient*innen nach PVI niedriger als für Patient*innen mit PVI aber ohne renale Denervation. Durch noch zu geringe Fallzahlen und relativ kurze Follow-up-Zeit sind diese Ergebnisse jedoch noch als vorläufig zu werten und müssen in klinischen Studien mit großer Fallzahl und längerer Follow-up-Periode validiert werden.⁵¹

Auch in der Pathogenese und Progression der CKD und der damit verbundenen erhöhten kardiovaskulären Mortalität kommt der sympathischen Überaktivität eine bedeutende Rolle zu. Daher ist die Anwendung der renalen Denervation als Intervention zur Unterbrechung der renalen Sympathikusaktivität auch in dieser kardiovaskulären Risikopopulation mit eingeschränkter Nierenfunktion von zunehmendem Interesse. In ersten kleineren Patientenstudien konnte bereits gezeigt werden, dass eine renale Denervation auch bei Patienten im CKD-Stadium 3 und 4 ein sicheres und effektives Verfahren zur Blutdrucksenkung darstellt und zu keiner Verschlechterung der Nierenfunktion führt. Auch über den Blutdruckeffekt hinaus ergab sich Anhalt für positive Auswirkungen der renalen Denervation in dieser Patientengruppe durch reduzierte Proteinurie, verringerte Plasma-BNP-Spiegel sowie erhöhte Hämoglobinkonzentrationen.⁴¹ Auch diese Beobachtungen gilt es, zukünftig in großen Studien zu bestätigen.

Literaturverzeichnis

1. Abraham NG, Kappas A. Heme oxygenase and the cardiovascular-renal system. *Free Radic Biol Med.* 2005;39(1):1-25. Epub 2005 Mar 30. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.03.010.
2. Aoki K, Teshima Y, Kondo H, Saito S, Fukui A, Fukunaga N, et al. Role of indoxyl sulfate as a predisposing factor for atrial fibrillation in renal dysfunction. *J Am Heart Assoc.* 2015;4(10):e002023. Doi: 10.1161/JAHA.115.002023.
3. Arora MK, Singh UK. Molecular mechanisms in the pathogenesis of diabetic nephropathy: an update. *Vascul Pharmacol.* 2013;58(4):259-71. doi: 10.1016/j.vph.2013.01.001. Epub 2013 Jan 11.
4. Baker WL, Smyth LR, Riche DM, Bourret EM, Chamberlin KW, White WB. Effects of sodium-glucose co-transporter 2 inhibitors on blood pressure: a systematic review and meta-analysis. *J Am Soc Hypertens* 2014; 8:e262–e275.e9.
5. Baraka A, El Ghotny S. Cardioprotective Effect of Renalase in 5/6 Nephrectomized Rats. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2012;17(4):412-6. doi: 10.1177/1074248412446977. Epub 2012 May 24.
6. Bayes-Genis A, Barallat J, Richards M. A Text in Context: Nephilysin: Function, Inhibition, and Biomarker. *J Am Coll Cardiol.* 2016;68(6):639-653. doi: 10.1016/j.jacc.2016.04.060.
7. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2007;87(1):245-313. doi: 10.1152/physrev.00044.2005.
8. Benjamin EJ, Muntner P, Alonso A, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP, et al. Heart disease and stroke statistics-2019 update: A report from the American Heart Association. *Circulation.* 2019;139(10):e56-e528. doi: 10.1161/CIR.0000000000000659.
9. Benjamin EJ, Wolf PA, D'Agostino RB, Silbershatz H, Kannel WB, Levy D. Impact of atrial fibrillation on the risk of death: the Framingham Heart Study. *Circulation.* 1998;98(10):946-52. doi: 10.1161/01.cir.98.10.946.
10. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J.* 2012;5:9–19. doi: 10.1097/WOX.0b013e3182439613

11. Böhm M, Linz D, Ukena C, Esler M, Mahfoud F. Renal denervation for the treatment of cardiovascular high risk-hypertension or beyond? *Circ Res*. 2014;115(3):400-9. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.302522.
12. Bollée G, Dollinger C, Boutaud L, Guillemot D, Bensman A, Harambat J, et al. Phenotype and genotype characterization of adenine phosphoribosyltransferase deficiency. *J Am Soc Nephrol*. 2010;21, 679-688. doi: 10.1681/ASN.2009080808
13. Brandt MC, Mahfoud F, Böhm M, Hoppe UC. Renal sympathetic denervation. A novel interventional treatment option for therapy-resistant arterial hypertension. *Herz*. 2011;36(1):8-11. doi: 10.1007/s00059-010-3413-4.
14. Braun J, Müller-Wieland D, Renz-Polster H, Krautzig S (2018). Basislehrbuch Innere Medizin. Elsevier, München. 6. Auflage.
15. Brilla CG. Renin-angiotensin-aldosterone system and myocardial fibrosis. *Cardiovasc Res*. 2000;47(1):1-3. doi: 10.1016/s0008-6363(00)00092-4.
16. Cappato R, Calkins H, Chen S-A, Davies W, Iesaka Y, Kalman Jonathan, et al. Updated worldwide survey on the methods, efficacy, and safety of catheter ablation for human atrial fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2013;3(1):32-8. doi: 10.1161/CIRCEP.109.859116. Epub 2009 Dec 7.
17. Carlsson J, Miketic S, Windeler J, Cuneo A, Haun S, Micus S, et al. Randomized trial of rate-control versus rhythm-control in persistent atrial fibrillation: the Strategies of treatment of atrial fibrillation (STAF) study. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41(10):1690-6. doi: 10.1016/s0735-1097(03)00332-2.
18. Chen TK, Knicely DH, Grams ME. Chronic kidney disease diagnosis and management: A review. *JAMA*. 2019;322(13):1294-1304. doi: 10.1001/jama.2019.14745.
19. Cohen Tervaert TW, Mooyaart AL, Amann K, Cohen AH, Terence Cook H, Drachenberg CB, et al. Pathologic classification of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2010;21(4):556-63. doi: 10.1681/ASN.2010010010. Epub 2010 Feb 18.
20. Daenen K, Andries A, Mekahli D, Van Schepdael A, Jouret F, Bammens B. Oxidative stress in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol*. 2019;34(6):975–991. doi: 10.1007/s00467-018-4005-4.
21. Desir GV, Peixoto AJ. Renalase in hypertension and kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2014;29(1):22-8. doi: 10.1093/ndt/gft083. Epub 2013 Oct 17.
22. DiBona GF, Kopp UC. Neural control of renal function. *Physiol Rev*. 1997;77(1):75-197. doi: 10.1152/physrev.1997.77.1.75.
23. DiBona GF. Neural control of the kidney: past, present, and future. *Hypertension*. 2003;41(3 Pt 2):621-4. doi: 10.1161/01.HYP.0000047205.52509.8A. Epub 2002 Dec 16.

24. DiBona GF. Physiology in perspective: The wisdom of the body. Neural control of the kidney. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005;289(3):R633-41. doi: 10.1152/ajpregu.00258.2005.
25. Ding WY, Gupta D, Wong CF, Lip GYH. Pathophysiology of atrial fibrillation and chronic kidney disease. *Cardiovasc Res*. 2020;cvaa258. doi: 10.1093/cvr/cvaa258.
26. Diwan V, Brown L, Gobe GC. Adenine-induced chronic kidney disease in rats. *Nephrology (Carlton)*. 2018;23(1):5-11. doi: 10.1111/nep.13180.
27. Diwan V, Mistry A, Gobe G, Brown L. Adenine-induced chronic kidney and cardiovascular damage in rats. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2013;68:197-207. doi: 10.1016/j.vascn.2013.05.006.
28. Eckardt KU, Coresh J, Devuyst O, Johnson RJ, Köttgen A, Levey AS, et al. Evolving importance of kidney disease: from subspecialty to global health burden. *Lancet*. 2013;382(9887):158–69. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60439-0
29. Eckardt KU. Chronic kidney disease (not) on the agenda. *Dtsch Arztebl Int*. 2016;113:83-4. doi: 10.3238/arztebl.2016.0083.
30. Engle SJ, Stockelman MG, Chen J, Boivin G, Yum MN, Davies PM, et al. Adenine phosphoribosyltransferase-deficient mice develop 2,8-dihydroxyadenine nephrolithiasis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93(11):5307-5312. doi: 10.1073/pnas.93.11.5307
31. Esler MD, Krum H, Sobotka PA, Schlaich MP, Schmieder RE, Böhm M. Renal sympathetic denervation in patients with treatment-resistant hypertension (The Symplicity HTN-2 Trial): a randomised controlled trial. *Lancet*. 2010;376(9756):1903-9. doi: 10.1016/S0140-6736(10)62039-9. Epub 2010 Nov 17.
32. Evan AP, Bledsoe SB, Connors BA, Deng L, Liang L, Shao C, et al. Sequential analysis of kidney stone formation in the Aprt knockout mouse. *Kidney Int*. 2001;60(3):910-923. doi: 10.1046/j.1523-1755.2001.060003910.x
33. Ewen S, Ukena C, Linz D, Schmieder RE, Böhm M, Mahfoud F. The sympathetic nervous system in chronic kidney disease. *Curr Hypertens Rep*. 2013;15(4):370-6. doi: 10.1007/s11906-013-0365-0.
34. Fernando V, Zheng X, Walia Y, Sharma V, Letson J, Furuta S. S-Nitrosylation: an emerging paradigm of redox signaling. *Antioxidants*. 2019;8(9):404. doi: 10.3390/antiox8090404.
35. Fried LF, Emanuele N, Zhang JH, Brophy M, Conner TA, Duckworth W, et al. Combined angiotensin inhibition for the treatment of diabetic nephropathy. *N Engl J Med*. 2013;369(20):1892-903. doi: 10.1056/NEJMoa1303154. Epub 2013 Nov 9.

36. Ganesan AN, Shipp NJ, Brooks AG, Kuklik P, Lau DH, Lim HS, et al. Long-term outcomes of catheter ablation of atrial fibrillation: a systematic review and meta-analysis. *J Am Heart Assoc.* 2013;2(2):e004549. doi: 10.1161/JAHA.112.004549.
37. Grassi G, Quart-Trevano F, Seravalle G, Arenare F, Volpe M, Furiani S, et al. Early sympathetic activation in the initial clinical stages of chronic renal failure. *Hypertension.* 2011;57(4):846-51. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.164780. Epub 2011 Feb 7.
38. Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1994;74(6):1141-8. doi: 10.1161/01.res.74.6.1141.
39. Haïssaguerre M, Jaïs P, Shah DC, Takahashi A, Hocini M, Quiniou G, et al. Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins. *N Engl J Med.* 1998;339(10):659-66. doi: 10.1056/NEJM199809033391003.
40. Heine GH, Brandenburg V, Schirmer SH. Oral anticoagulation in chronic kidney disease and atrial fibrillation – the use of non-vitamin K-dependent anticoagulants and vitamin K antagonists. *Dtsch Arztebl Int.* 2018;115:287-94. doi: 10.3238/arztebl.2018.0287.
41. Hering D, Mahfoud F, Walton AS, Krum H, Lambert EA, Sobotka PA, et al. Renal denervation in moderate to severe CKD. *J Am Soc Nephrol.* 2012;23(7):1250-7. doi: 10.1681/ASN.2011111062. Epub 2012 May 17.
42. Hill NR, Fatoba ST, Oke JL, Hirsr JA, O'Callaghan CA, Lasserson DS, et al. Global prevalence of chronic kidney disease – a systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One.* 2016;11(7):e0158765. doi: 10.1371/journal.pone.0158765. eCollection 2016.
43. Hindricks G, Potpara T, Dagres N, Arbelo E, Bax JJ, Blomström-Lundqvist C, et al. 2020 ESC Guidelines for the diagnosis and management of atrial fibrillation developed in collaboration with the European Association of Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). *Eur Heart J.* 2020;ehaa612. doi: 10.1093/eurheartj/ehaa612.
44. Ho SY, McCarthy KP. Anatomy of the left atrium for interventional electrophysiologists. *Pacing Clin Electrophysiol.* 2010;33(5):620-7. doi: 10.1111/j.1540-8159.2009.02659.x. Epub 2009 Dec 18.
45. Ishii M, Ikeda T, Takagi M, Sugimoto T, Atarashi K, Igari T, et al. Elevated plasma catecholamines in hypertensives with primary glomerular diseases. *Hypertension.* 1983;5(4):545-51. doi: 10.1161/01.hyp.5.4.545.
46. Jaïs P, Cauchemez B, Macle L, Daoud E, Khairy P, Subbiah R, et al. Catheter ablation versus antiarrhythmic drugs for atrial fibrillation: the A4 study. *Circulation.* 2008;118(24):2498-505. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.772582. Epub 2008 Nov 24.

47. Jayachandran JV, Sih HJ, Winkle W, Zipes DP, Hutchins GD, Olgin JE. Atrial fibrillation produced by prolonged rapid atrial pacing is associated with heterogeneous changes in atrial sympathetic innervation. *Circulation*. 2000;101(10):1185-91. doi: 10.1161/01.cir.101.10.1185.
48. Kashioulis P, Lundgren J, Shubbar E, Nguy L, Saeed A, Wallentin C, et al. Adenine-induced chronic renal failure in rats: A model of chronic renocardiac syndrome with left ventricular diastolic dysfunction but preserved ejection fraction. *Kidney Blood Press Res*. 2018;43(4):1053-1064. doi: 10.1159/000491056. Epub 2018 Jul 3.
49. Kaur J, Young BE, Fadel PJ. Sympathetic overactivity in chronic kidney disease: consequences and mechanisms. *Int J Mol Sci*. 2017;18(8):1682. doi: 10.3390/ijms18081682.
50. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney Int Suppl*. 2013;3:1-150
51. Kiuchi MG, Chen S, Silva GRE, Rodrigues Paz LM, Kiuchi T, et al. The addition of renal sympathetic denervation to pulmonary vein isolation reduces recurrence of paroxysmal atrial fibrillation in chronic kidney disease patients. *J Interv Card Electrophysiol*. 2017;48(2):215-222. doi: 10.1007/s10840-016-0186-6. Epub 2016 Oct 4.
52. Klinkhammer BM, Djudjaj S, Kunter U, Palsson R, Edvardsson VO, Wiech T, et al. Cellular and molecular mechanisms of kidney injury in 2,8-dihydroxyadenine nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2020;31(4):799-816. doi: 10.1681/ASN.2019080827.
53. Krum H, Schlaich MP, Sobotka PA, Böhm M, Mahfoud F, Rochna-Singh K, et al. Percutaneous renal denervation in patients with treatment-resistant hypertension: final 3-year report of the Symplicity HTN-1 study. *Lancet*. 2014;383(9917):622-9. doi: 10.1016/S0140-6736(13)62192-3. Epub 2013 Nov 7.
54. Levey AS, Coresh J. Chronic kidney disease. *Lancet*. 2012;379(9811):165-80. doi: 10.1016/S0140-6736(11)60178-5. Epub 2011 Aug 15.
55. Linz D, Hohl M, Elliott AD, Lau DH, Mahfoud F, Esler MD, et al. Modulation of renal sympathetic innervation: recent insights beyond blood pressure control. *Clin Auton Res*. 2018;28(4):375-384. doi: 10.1007/s10286-018-0508-0. Epub 2018 Feb 10.
56. Linz D, Hohl M, Nickel A, Mahfoud F, Wagner M, Ewen S, et al. Effect of renal denervation on neurohumoral activation triggering atrial fibrillation in obstructive sleep apnea. *Hypertension*. 2013;62(4):767-74. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01728. Epub 2013 Aug 19.
57. Linz D, Hohl M, Schütze J, Mahfoud F, Speer T, Linz B, et al. Progression of kidney injury and cardiac remodeling in obese spontaneously hypertensive rats: the role of

- renal sympathetic innervation. *Am J Hypertens.* 2015;28(2):256-65. doi: 10.1093/ajh/hpu123. Epub 2014 Jul 13.
58. Linz D, Van Hunnik A, Hohl M, Mahfoud F, Wolf M, Neuberger H-R, et al. Catheter-based renal denervation reduces atrial nerve sprouting and complexity of atrial fibrillation in goats. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2015;8(2):466-74. doi: 10.1161/CIRCEP.114.002453. Epub 2015 Feb 23.
59. Linz D, Van Hunnik A, Ukena C, Ewen S, Mahfoud F, Schirmer SH, et al. Renal denervation: effects on atrial electrophysiology and arrhythmias. *Clin Res Cardiol.* 2014;103(10):765-74. doi: 10.1007/s00392-014-0695-1. Epub 2014 Mar 29.
60. Lip GHY, Tse HF, Lane DA. Atrial fibrillation. *Lancet.* 2012;379:648-61. doi: 10.1016/S0140-6736(11)61514-6.
61. Locatelli F, Canaud B, Eckardt KU, Stenvinkel P, Wanner C, Zoccali C. Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome. *Nephrology Dialysis Transplantation.* 2003;272–1280. doi: 10.1093/ndt/gfg074
62. López-Novoa JM, Rodríguez-Peña AB, Ortiz A, Martínez-Salgado C, López Hernández FJ. Etiopathology of chronic tubular, glomerular and renovascular nephropathies: Clinical implications. *J Transl Med.* 2011;9:13. Doi: 10.1186/1479-5876-9-13.
63. Mahfoud F, Azizi M, Ewen S, Pathak A, Ukena C, Blankestijin PJ, et al. Proceedings from the 3rd European Clinical Consensus Conference for clinical trials in device-based hypertension therapies. *Eur Heart J.* 2020;41(16):1588-1599. doi: 10.1093/eurheartj/ehaa121.
64. Mahfoud F, Böhm M, Schmieder R, Narkiewicz K, Ewen S, Ruilope L, et al. Effects of renal denervation on kidney function and long-term outcomes: 3-year follow-up from the Global SYMPPLICITY Registry. *Eur Heart J.* 2019;40(42):3474-3482. doi: 10.1093/eurheartj/ehz118.
65. Mahfoud F, Linz D, Böhm M. Hearts and kidneys. Renal denervation as therapy for hypertension. *Herz.* 2013;38(1):67-75. doi: 10.1007/s00059-012-3752-4.
66. Manjunath G, Tighiouart H, Ibrahime H, MacLeod B, Salem DN, Griffith, JL et al. Level of kidney function as a risk factor for atherosclerotic cardiovascular outcomes in the community. *J Am Coll Cardiol.* 2003;41(1):47-55. doi: 10.1016/s0735-1097(02)02663-3.
67. Marrouche NF, Brachmann J, Andresen D, Siebels J, Boersma L, Jordaens L, et al. Catheter ablation for atrial fibrillation with heart failure. *N Engl J Med.* 2018;378(5):417-427. doi: 10.1056/NEJMoa1707855.

68. Matthews VB, Elliot RH, Rudnicka C, Hricova J, Herat L, Schlaich MP: Role of the sympathetic nervous system in regulation of the sodium glucose cotransporter 2. *J Hypertens*. 2017; 35(10):2059-2068. doi: 10.1097/HJH.0000000000001434.
69. Menon V, Gul A, Sarnak MJ. Cardiovascular risk factors in chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2005;68(4):1413-8. doi: 10.1111/j.1523-1755.2005.00551.x
70. Nabauer M, Gerth A, Limbourg T, Schneider S, Oeff M, Kirchhof P, et al. The registry of the German Competence Network on atrial fibrillation: patient characteristics and initial management. *Europace*. 2009;11(4):423-34. doi: 10.1093/europace/eun369. Epub 2009 Jan 18.
71. Nadruz W. Myocardial remodeling in hypertension. *J Hum Hypertens*. 2015;29(1):1-6. doi: 10.1038/jhh.2014.36.
72. Nath KA, Haggard JJ, Croatt AJ, Grande JP, Poss KD, Alam J. The indispensability of heme oxygenase-1 in protecting against acute heme protein-induced toxicity in vivo. *Am J Pathol*. 2000;156(5):1527-35. doi: 10.1016/S0002-9440(10)65024-9.
73. Nattel S. New ideas about atrial fibrillation 50 years on. *Nature*. 2002;415(6868):219-26. doi: 10.1038/415219a.
74. Neal B, Perkovic V, Mahaffey KW, De Zeeuw D, Fulcher G, Erondu N, et al. Canagliflozin and cardiovascular and renal events in type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2017;377(7):644-657. doi: 10.1056/NEJMoa1611925. Epub 2017 Jun 12.
75. Nguy L, Nilsson H, Lundgren J, Johansson ME, Teerlink T, Scheffer PG, et al. Vascular function in rats with adenine-induced chronic renal failure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2012;302(12):R1426-35. doi: 10.1152/ajpregu.00696.2011. Epub 2012 Apr 18.
76. Nielsen JB, Kühl JT, Pietersen A, Graff C, Lind B, Struijk JJ, et al. P-wave duration and the risk of atrial fibrillation: Results from the Copenhagen ECG study. *Heart Rhythm*. 2015;12(9):1887-95. doi: 10.1016/j.hrthm.2015.04.026. Epub 2015 Apr 23.
77. Olson BJSC. Assays for determination of protein concentration. *Curr Protoc Pharmacol*. 2016;73:A.3A.1-A.3A.32. doi: 10.1002/cpph.3.
78. Packer DL, Mark DB, Robb RA, Monahan KH, Bahnon TD, Poole JE, et al. Effect of catheter ablation vs antiarrhythmic drug therapy on mortality, stroke, bleeding and cardiac arrest among patients with atrial fibrillation: The CABANA randomized clinical trial. *JAMA*. 2019;321(13):1261-1274. doi: 10.1001/jama.2019.0693.
79. Patel NJ, Patel A, Agnihotri K, Pau D, Patel S, Thakkar B, et al. Prognostic impact of atrial fibrillation on clinical outcomes of acute coronary syndromes, heart failure and chronic kidney disease. *World J Cardiol*. 2015;7(7):397-403. doi: 10.4330/wjc.v7.i7.397.

80. Perkins A, Nelson KJ, Parsonage D, Poole LB, Karplus PA. Peroxiredoxins: Guardians against oxidative stress and modulators of peroxide signaling. *Trends Biochem Sci.* 2015;40(8):435–445. doi: 10.1016/j.tibs.2015.05.001.
81. Platonov PG. Atrial conduction and atrial fibrillation: What can we learn from surface ECG? *Cardiol J.* 2008;15(5):402-7. PMID: 18810714 <https://core.ac.uk/download/pdf/268438136.pdf>
82. Pokushalov E, Romanov A, Corbucci G, Artyomenko S, Baranova V, Turov A, et al. A randomized comparison of pulmonary vein isolation with versus without concomitant renal artery denervation in patients with refractory symptomatic atrial fibrillation and resistant hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 2012;60(13):1163-70. doi: 10.1016/j.jacc.2012.05.036. Epub 2012 Sep 5.
83. Qiu H, Ji C, Liu W, Wu Y, Lu Z, Lin Q. Chronic kidney disease increases atrial fibrillation inducibility: involvement of inflammation, atrial fibrosis, and connexins. *Front Physiol.* 2018;9:1726. doi: 10.3389/fphys.2018.01726. eCollection 2018.
84. Rhee SG, Woo HA, Kil IS, Bae SH. Peroxiredoxin functions as a peroxidase and a regulator and sensor of local peroxides. *J Biol Chem.* 2012;287(7):4403-10. doi: 10.1074/jbc.R111.283432
85. Rhee SG. Overview on Peroxiredoxin. *Mol Cells.* 2016;39(1):1–5. doi: 10.14348/molcells.2016.2368.
86. Ruster C, Wolf G. Renin-angiotensin-aldosterone system and progression of renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(11):2985-91. doi: 10.1681/ASN.2006040356. Epub 2006 Oct 11.
87. Sanchez-Perales C, Vazquez E, Gracia-Cortes MJ, Borrego J, Polaina M, Gutierrez CP, et al. Ischaemic stroke in incident dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2010;25:3343-8.
88. Saran R, Robinson B, Abbott KC, Agodoa LYC, Bragg-Gresham J, Balkrishnan R, et al. US Renal Data System 2018 Annual Data Report: Epidemiology of Kidney Disease in the United States. *Am J Kidney Dis.* 2019;73(3 Suppl 1): A7-A8. doi: 10.1053/j.ajkd.2019.01.001
89. Schirmer SH, Sayed MMY, Reil JC, Ukena C, Linz D, Kindermann M, et al. Improvements in left ventricular hypertrophy and diastolic function following renal denervation: effects beyond blood pressure and heart rate reduction. *J Am Coll Cardiol.* 2014;63(18):1916-23. doi: 10.1016/j.jacc.2013.10.073. Epub 2013 Dec 4.
90. Schotten U, Verheule S, Kirchhof P, Goette A. Pathophysiological mechanisms of atrial fibrillation: a translational appraisal. *Physiol Rev.* 2011;91(1):265-325. doi: 10.1152/physrev.00031.2009.

91. Seccia TM, Caroccia B, Calò LA. Hypertensive nephropathy. Moving from classic to emerging pathogenetic mechanisms. *J Hypertens*. 2017;35(2):205-212. doi: 10.1097/HJH.0000000000001170.
92. Singh RR, Denton KM. Renal Denervation. *Hypertension*. 2018;72(3):528-536. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.10265.
93. Siragy HM, Carey RM. Role of the intrarenal renin-angiotensin-aldosterone system in chronic kidney disease. *Am J Nephrol*. 2010;31(6):541-50. doi: 10.1159/000313363. Epub 2010 May 18.
94. Small DM, Coombes JS, Bennett N, Johnson DW, Gobe DC. Oxidative stress, antioxidant therapies and chronic kidney disease. *Nephrology*. 2012;17(4):311-21. doi: 10.1111/j.1440-1797.2012.01572.x.
95. Smith H. Comparative physiology of the kidney. In: Smith H, ed. *The kidney: structure and function in health and disease*. New York: Oxford University Press. 1951;520-74. doi.org/10.1002/ar.1091110210
96. Sobotka PA, Mahfoud F, Schlaich MP, Hoppe UC, Böhm M, Krum H. Sympatho-renal axis in chronic kidney disease. *Clin Res Cardiol*. 2011;100(12):1049-57. doi: 10.1007/s00392-011-0335-y. Epub 2011 Jun 19.
97. Soliman EZ, Prineas RJ, Go AS, Xie D, Lash JP, Rahman M, et al. Chronic kidney disease and prevalent atrial fibrillation: the Chronic Renal Insufficiency Cohort (CRIC). *Am Heart J*. 2010;159(6):1102-7. doi: 10.1016/j.ahj.2010.03.027.
98. Solomon S. Developmental changes in nephron number, proximal tubular length and superficial nephron glomerular filtration rate of rats. *J Physiol*. 1977;272(3):573-89. doi: 10.1113/jphysiol.1977.sp012061.
99. Speer T, Schunk SJ, Fliser D. Chronic kidney disease – a cardiovascular high-risk constellation. *Internist (Berl)*. 2020;61(4):340-348. doi: 10.1007/s00108-019-00686-y.
100. Steg PG, Alam S, Chiang CE, Gamra H, Goethals M, Inoue H, et al. Symptoms, functional status and quality of life in patients with controlled and uncontrolled atrial fibrillation: data from the RealiseAF cross-sectional international registry. *Heart*. 2012;98(3):195-201. doi: 10.1136/heartjnl-2011-300550. Epub 2011 Sep 22.
101. Steinberg JS, Shabanov V, Ponomarev D, Losik D, Ivanickiy E, Kropotkin E, et al. Effect of renal denervation and catheter ablation vs catheter ablation alone on atrial fibrillation recurrence among patients with paroxysmal atrial fibrillation and hypertension: The ERADICATE-AF randomized clinical trial. *JAMA*. 2020; 323(3):248-255. doi: 10.1001/jama.2019.21187.

102. Stevens LA, Coresh J, Greene T, Levey AS. Assessing kidney function--measured and estimated glomerular filtration rate. *N Engl J Med*. 2006;354(23):2473-83. doi: 10.1056/NEJMra054415.
103. Tekin I, Roskoski Jr R, Carkaci-Salli N, Vrana KE. Complex molecular regulation of tyrosine hydroxylase. *J Neural Transm*. 2014;121(12):1451-81. doi: 10.1007/s00702-014-1238-7. Epub 2014 May 28.
104. Thomas MC, Jandeleit-Dahm K, Bonnet F. Beyond glycosuria: exploring the intrarenal effects of SGLT-2 inhibition in diabetes. *Diabetes Metab*. 2014;40:17–S22.
105. Titze S, Schmid M, Köttgen A, Busch M, Floege J, Wanner C, et al. Disease burden and risk profile in referred patients with moderate chronic kidney disease: composition of the German Chronic Kidney Disease (GCKD) cohort. *Nephrol Dial Transplant*. 2015;30(3):441-51. doi: 10.1093/ndt/gfu294. Epub 2014 Sep 30.
106. Vallianou NG, Mitesh S, Gkogkou A, Geladari E. Chronic kidney disease and cardiovascular disease: Is there any relationship? *Curr Cardiol Rev*. 2019;15(1):55-63. doi: 10.2174/1573403X14666180711124825.
107. Vallon V, Platt KA, Cunard R, Schroth J, Whaley J, Thomson SC, et al. SGLT2 mediates glucose reabsorption in the early proximal tubule. *J Am Soc Nephrol*. 2011; 22:104–112.
108. Van Gelder IC, Groenveld HF, Crijns HJGM, Tuininga YS, Tijssen JGP, Alings AM, et al. Lient versus strict rate control in patients with atrial fibrillation. *N Engl J Med*. 2010;362(15):1363-73. doi: 0.1056/NEJMoa1001337. Epub 2010 Mar 15.
109. Van Gelder IC, Wyse DG, Chandler ML, Cooper HA, Olshansky B, Hagens VE, et al. Does intensity of rate-control influence outcome in atrial fibrillation? An analysis of pooled data from the RACE and AFFIRM studies. *Europace*. 2006;8(11):935-42. doi: 10.1093/europace/eul106. Epub 2006 Sep 14.
110. Vermond RA, Geelhoed B, Verweij N, Tieleman RG, Van der Harst P, Hillege HL, et al. Incidence of atrial fibrillation and relationship with cardiovascular events, heart failure, and mortality: A community-based study from the netherlands. *J Am Coll Cardiol*. 2015;66(9):1000-7. doi: 10.1016/j.jacc.2015.06.1314.
111. Volders PGA. Novel insights into the role of the sympathetic nervous system in cardiac arrhythmogenesis. *Heart Rhythm*. 2010;7(12):1900-6. doi: 10.1016/j.hrthm.2010.06.003. Epub 2010 Jun 4.
112. Voroneanu L, Ortiz A, Nistor I, Covic A. Atrial fibrillation on chronic kidney disease. *Eur J Intern Med*. 2016;33:3-13. doi: 10.1016/j.ejim.2016.04.007. Epub 2016 May 5.

113. Wakili R, Voigt N, Kääh S, Dobrev D, Nattel S. Recent advances in the molecular pathophysiology of atrial fibrillation. *J Clin Invest*. 2011;121(8):2955-68. doi: 10.1172/JCI46315. Epub 2011 Aug 1.
114. Wang Y, Branicky R, Noë A, Hekimi S. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *J Cell Biol*. 2018;217(6): 1915–1928. doi: 10.1083/jcb.201708007.
115. Wanner C, Inzucchi SE, Lachin JM, Fitchett D, von Eynatten M, Mattheus M, et al. Empagliflozin and progression of kidney disease in type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2016; 375:323–334.
116. Wanner C, Inzucchi SE, Zinman B. Empagliflozin and progression of kidney disease in typ 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2016;375(18):1801-2. doi: 10.1056/NEJMc1611290.
117. Webster AC, Nagler EV, Morton RL, Masson P. Chronic Kidney Disease. *Lancet*. 2017;389(10075):1238-1252. doi: 10.1016/S0140-6736(16)32064-5
118. Wijesurendra RS, Casadei B. Mechanisms of atrial fibrillation. *Heart*. 2019;105(24):1860-1867. doi: 10.1136/heartjnl-2018-314267. Epub 2019 Aug 23.
119. Wijffels MC, Kirchhof CJ, Dorland R, Allessie MA. Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats. *Circulation*. 1995;92(7):1954-68. doi: 10.1161/01.cir.92.7.1954.
120. Wilde E, Aubdool AA, Thakore P, Baldissera L, Alawi KM, Keeble J, et al. Tail-cuff technique and its influence on central blood pressure in the mouse. *J Am Heart Assoc*. 2017;6(6):e005204. doi: 10.1161/JAHA.116.005204.
121. Wiśniewska M, Serwin N, Dziedziejko V, Marchelek-Myśliwiec M, Dołęgowska B, Domański L, et al. Chronic kidney disease is associated with increased levels of renalase in serum and decreased in erythrocytes. *Pol Arch Intern Med*. 2019;129(11):790-797. doi: 10.20452/pamw.15049. Epub 2019 Nov 5.
122. Wright JT Jr, Williamson JD, Whelton PK, Snyder JK, Sink KM, Rocco MV, et al. SPRINT Research Group et al. A randomized trial of intensive versus standard blood-pressure control. *N Engl J Med*. 2015;373(22):2103-16. doi: 10.1056/NEJMoa1511939. Epub 2015 Nov 9.
123. Xie X, Liu Y, Perkovic V, Li X, Ninomiya T, Hou W, et al. Renin-Angiotensin system inhibitors and kidney and cardiovascular outcomes in patients with CKD: A Bayesian network meta-analysis of randomizes clinical trials. *Am J Kidney Dis*. 2016;67(5):728-41. doi: 10.1053/j.ajkd.2015.10.011. Epub 2015 Nov 18.
124. Xu J, Li G, Wang P, Velazquez H, Yao X, Li Y et al. Renalase is a novel, soluble monoamine oxidase that regulates cardiac function and blood pressure. *J Clin Invest*. 2005;115(5):1275-1280. doi: 10.1172/JCI24066.

125. Zinman B, Wanner C, Lachin JM, Fitchett D, Bluhmki E, Hantel S, et al. Empagliflozin, cardiovascular outcomes, and mortality in type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2015; 373:2117–2128.

Publikationen

- Hohl M, Selejan S, Wintrich J, **Lehnert U**, Speer T, Schneider C, Mauz M, Markwirth P, Wong D, Boor P, Mollenhauer M, Linz B, Klinkhammer BM, Hübner U, Schäfers H, Ukena C, Möllmann J, Lehrke M, Werner C, Linz D, Mahfoud F, Böhm M. (2021) Modulation of the sympathetic nervous system by renal denervation prevents the development of atrial arrhythmogenic substrates in CKD.
submitted Circulation Research
- **Lehnert U**, Hohl M, Sevimli Ö, Hübner U, Schneider C, Mahfoud F, Böhm M. Increased blood pressure after initial effective renal denervation is independent of RAAS activation and renal re-innervation.
in preparation
- Hohl M, Lauder L, Sevimli Ö, Tokcan M, Wagmann L, Schneider C, Hübner U, **Lehnert U**, Wolf M, Meyer MR, Böhm M, Mahfoud F. Efficacy of different antihypertensive drug classes after renal denervation in the spontaneous hypertensive rat model.
in preparation

Poster/Vorträge

- **Lehnert U**, Hohl M, Selejan S, Wintrich J, Wong D, Boor P, Speer T, Böhm M. (2021) Modulation of the sympathetic nervous system prevents the development of an atrial arrhythmogenic substrate in CKD. Virtual Cardiorenal Winter school. Joint event of the SFB/TRR219, EURLIPIDS and the EU-ITNs "INTRICARE", "CaReSyAn" and "Strategy-CKD" (01.02.-03.02.2021).
- Selejan S, Hohl M, Markwirth P, Blaumer J, Mauz M, **Lehnert U**, Triem S, Speer T, Boor P, Böhm M. Effects of renal denervation on atrial remodelling in a rat model of CKD. Aachen Conference on Cardiovascular Disease and Diabetes (Aachen from November 7- 9th 2019 with focus on translational research in cardiovascular disease).

Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank meinem Doktorvater Prof. Dr. Michael Böhm, der diese Arbeit ermöglicht und mein Interesse und meine Begeisterung für das schöne Fach der Kardiologie und die Forschung stets gefördert und mich motiviert hat.

Ein riesengroßes Dankeschön möchte ich meinem Betreuer Dr. Mathias Hohl aussprechen, der mich jederzeit tatkräftig unterstützt und sich Zeit genommen hat und mit seiner lockeren Art immer für ein angenehmes und fröhliches Arbeiten im Labor gesorgt hat. Vielen Dank für die erstklassige Betreuung!

Außerdem möchte ich mich bei dem einzigartigen Labor-Team, bestehend aus Jeannette Zimolong, Nina Rebmann und Julia Weber bedanken, die mir bei allen Fragen mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben, mich so nett ins Labor aufgenommen und immer für eine gute Stimmung gesorgt haben.

Darüber hinaus gilt mein Dank allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Kardiologie, insbesondere erwähnt sei Dr. Simina Selejan für die Unterstützung, sowie den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Nephrologie für die gute Zusammenarbeit.

Ein besonderes Dankeschön geht an meinen guten Freund und Kommilitonen Philipp Markwirth. Ganz lieben Dank für die gemeinsamen Wochenenden im Labor, die Hilfe und Unterstützung nicht nur während dieser Arbeit, sondern vom ersten Semester an durch alle Phasen des Studiums!

An dieser Stelle möchte ich mich außerdem ganz herzlich bei meiner lieben Familie bedanken: Bei meinen Eltern Vera und Thomas und meinen Geschwistern Julia und Christian, die immer für mich da waren, mich in jeglicher Hinsicht unterstützt und mir Kraft gegeben haben. Einen solchen Rückhalt hinter sich zu wissen, ist unbezahlbar!

Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.