

Aus der Klinik für Innere Medizin III
(Kardiologie, Angiologie und internistische Intensivmedizin)
Direktor Prof. Dr. med. M. Böhm Fachbereich Klinische Medizin
Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Regulation von IL-17A durch das sympathoadrenerge System
in einem Modell der chronischen Niereninsuffizienz**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES 2024

Vorgelegt von: Jakob Blaumer,
geb. am 01.04.1995 in Bergisch-Gladbach (Deutschland)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abbildungsverzeichnis	6
Tabellenverzeichnis	8
Abkürzungen	9
1 Zusammenfassung	13
1.1 Summary	14
2 Einleitung	17
2.1 Arterielle Hypertonie	17
2.1.1 Definition und Prävalenz der arteriellen Hypertonie	17
2.1.2 Arterielle Hypertonie als kardiovaskulärer Risikofaktor	18
2.1.3 Therapieresistente arterielle Hypertonie	18
2.1.3.1 Definiton, Prävalenz und Ätiologie	18
2.2 Chronische Niereninsuffizienz	19
2.2.1 Prävalenz, Definition und Klassifikation	19
2.3 Kardioresnale Endorganschäden bei Chronischer Niereninsuffizienz	20
2.3.1 CKD und Fibrose	21
2.3.1.1 Renale Fibrose	21
2.3.1.2 Kardiale Fibrose	23
2.3.1.3 Die Rolle von Kollagen	24
2.3.2 CKD und linksventrikuläres Remodeling	25
2.4 Rolle des sympathischen Nervensystems in Pathologien der kardioresnalen Achse	26
2.5 Renale Denervation (RDN)	28
2.5.1 Rationale für RDN bei arterieller Hypertonie	28

2.5.2	Theoretische Grundlage für RDN bei arterieller Hypertonie . . .	29
2.5.2.1	Efferente sympathische Nervenfasern	29
2.5.2.2	Afferente sympathische Nervenfasern	30
2.5.3	Chronische Niereninsuffizienz und RDN	31
2.6	T _H 17-Zellen und IL-17	32
2.6.1	Die Differenzierung von T _H 17 Zellen	33
2.6.2	Das immunologische Netzwerk um IL-17A und IL-17-Rezeptoren	34
2.6.2.1	IL-17A als Bindeglied zwischen angeborener und erworbenener Immunabwehr	34
2.6.2.2	IL-17-Rezeptoren und IL-17A-Signalling	35
2.6.3	IL-17A in Pathologien der kardio-renalen Achse	38
2.7	Fragestellung	42
3	Material und Methoden	44
3.1	Material	44
3.1.1	CKD-Rattenmodell mit Adenin-induzierter Nephropathie	44
3.1.1.1	Studienprotokoll	44
3.1.1.2	Versuchstiere und Tierhaltung	44
3.1.1.3	Induktion der Nephropathie durch Adenin-Fütterung	45
3.1.1.4	Renale Denervation	46
3.1.2	Geräte, Software und Material (inkl. Substanzen und Lösungen)	47
3.1.3	Biochemisches Material	50
3.1.3.1	Antikörper	50
3.1.3.2	Lösungen für die Zellkultur	50
3.1.3.3	Lösungen und Puffer für die Westernblot-Analyse	51
3.2	Methoden	52
3.2.1	Echokardiographie	52
3.2.1.1	E/A-Verhältnis (E/A-Ratio)	53
3.2.2	Blutdruckmessung: Tail-Cuff-Methode	54
3.2.3	Histologische Analysen	55
3.2.3.1	Probeneinbettung zur histologischen Untersuchung	55
3.2.3.2	Pikrosiriusrot-Färbung	55
3.2.3.2.1	Theoretische Grundlagen	55
3.2.3.2.2	Durchführung	55
3.2.3.2.3	Auswertung	56

3.2.3.3	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	57
3.2.3.3.1	Theoretische Grundlagen	57
3.2.3.3.2	Durchführung	58
3.2.4	Western-Blot-Analyse	59
3.2.4.1	Probengewinnung & Präparation des Gesamthomogenats	59
3.2.4.1.1	Gewebe	59
3.2.4.2	Proteinbestimmung nach Lowry	59
3.2.4.3	SDS-Gelelektrophorese	60
3.2.4.4	Immunoblotting	61
3.2.4.5	Auswertung	62
3.2.5	Zellkultur	64
3.2.5.1	Isolation von mononukleären Zellen aus Milzen der Ratte	64
3.2.5.2	Zellzahlbestimmung	65
3.2.5.3	Einfrieren und Auftauen von mononukleären Zellen .	65
3.2.5.4	Allgemeine Bedingungen der Zellkultur für Splenozy- ten und H9c2-Zellen	66
3.2.5.5	Stimulation von mononukleären Zellen aus Rattenmil- zen (Splenozyten) und Kardiomyoblasten der H9c2- Zelllinie	66
3.2.5.5.1	Theoretische Grundlagen	66
3.2.5.5.2	H9c2-Zelllinie (Kardiomyoblasten)	66
3.2.5.5.3	Durchführung	67
3.2.6	IL-17A/CD3-Co-Immunofluoreszenzfärbung	68
3.2.6.1	Theoretische Grundlagen	68
3.2.6.1.1	Färbung von CD3 und der T-Zell-Rezeptor- CD3-Komplex	69
3.2.6.1.2	Färbung von IL-17A	69
3.2.6.2	Durchführung	69
3.2.6.2.1	Immunofärbung von CD3	69
3.2.6.2.2	Immunofärbung von IL-17A	70
3.2.6.3	Auswertung (Zählung der IL-17A ⁺ CD3 ⁺ -T-Lymphozyten)	72
3.3	Statistische Auswertung	72

4	Ergebnisse	74
4.1	Endorganschäden	75
4.1.1	Blutdruckmessung via Tail-Cuff-Methode	75
4.1.2	Echokardiographie	76
4.1.2.1	Linksventrikuläre Masse (LVM)	76
4.1.2.2	E/A-Verhältnis (E/A-Ratio)	78
4.1.3	Fibrose	80
4.1.3.1	Kardiale Fibrose	80
4.1.3.2	Kollagen Typ I im LV	80
4.1.3.3	Renale Fibrose	81
4.1.3.4	Kollagen Typ I in der Niere	82
4.2	Interleukin-17A (IL-17A)	83
4.2.1	IL-17A Western-Blot von Überständen der Splenozyten- und Kardiomyoblastenkultur	83
4.2.1.1	IL-17A im Überstand der Splenozytenkultur	83
4.2.1.2	IL-17A im Überstand der Kardiomyoblastenkultur (H9c2- Linie)	84
4.2.2	IL-17A Western-Blots in Geweben, Urin und Plasma	85
4.2.2.1	IL-17A-Gehalt im linken Ventrikel	86
4.2.2.2	IL-17A-Gehalt in Niere und Urin & Anzahl von CD3 ⁺ IL- 17A ⁺ -Zellen in der Niere	86
4.2.2.3	IL-17A-Gehalt im Plasma	88
4.2.3	IL-17A/CD3-Co-Immunofärbung	89
4.2.3.1	IL-17A/CD3-Co-Immunofärbung der Niere	90
5	Diskussion	91
5.1	Kardiorenale Endorganschäden bei CKD: Interpretation und Limitierungen	91
5.2	Einfluss der RDN auf die kardiorenaln Endorganschäden bei CKD . .	93
5.3	Blutdruckunabhängige, sympathoadrenerg vermittelte Pathomechanis- men des CKD-Phänotyps	96
5.4	Pathogenetischer Synergismus von Sympathikus und IL-17A im CKD- Phänotyp	99
5.4.1	Renale und kardiale Quellen von sympathisch reguliertem IL- 17A im CKD-Ratten-Modell	100
5.4.1.1	Renale Quellen von IL-17A	100
5.4.1.2	Kardiale Quellen von IL-17A	101

5.4.2 Einfluss des sympathoadrenergen Systems auf die renale Ausscheidung von IL-17A	102
5.5 Ausblick	103
Literaturverzeichnis	104
6 Publikationsliste	118
6.1 Poster und Vorträge	118
6.2 Originalarbeiten	119
7 Danksagungen	120

Abbildungsverzeichnis

1	Risikofaktoren für das Entstehen einer therapieresistenten arteriellen Hypertonie	19
2	Klassifikation der chronischen Niereninsuffizienz	20
3	Renale Fibrose bei Chronische Niereninsuffizienz (CKD)	23
4	Kardiale Fibrose und Linksventrikuläres Remodeling bei Chronische Niereninsuffizienz (CKD)	26
5	Effekte des sympathischen Nervensystems auf die kardiorenale Achse .	28
6	Efferente und afferente Bahnen die durch RDN supprimiert werden . . .	31
7	Die Differenzierung von T _H 17-Zellen und das Netzwerk um IL-17A . .	37
8	Die Beziehung von IL-17A zu kardiorenenalen Pathologien	41
9	Studienprotokoll und RDN	47
10	Western-Blot-Analyse von der Probengewinnung bis zur Auswertung . .	63
11	Isolation von mononukleären Zellen aus Milzen der Rattenpopulation .	65
12	Stimulation von Splenozyten aus Rattenmilzen und H9c2-Zellen	68
13	Messung des systolischen Blutdrucks während der letzten drei Tage mittels Tail-Cuff-Methode	75
14	Echokardiographisch ermittelte LVM der Ratten	77
15	Methodik zur Bestimmung der linksventrikulären Masse	77
16	Echokardiographisch ermittelte E/A-Ratio der Ratten	79
17	Flussprofil, das mittels PW-Doppler über der Mitralklappe im 4-Kammer-Blick abgeleitet wurde	79
18	Auswertung der Gesamtfibrose des LV	80
19	Col1 im LV	81
20	Auswertung der interstitiellen renalen Fibrose	82
21	Col1 in der linken Niere	82
22	IL-17A-Gehalt im Überstand der Kultur von Splenozyten (MNCs, mononukleäre Zellen	84

23	IL-17A-Gehalt im Zellkulturüberstand von Kardiomyoblasten (H9c2) . . .	85
24	IL-17A Gehalt im LV (Apex)	86
25	IL-17A Gehalt in der Niere	87
26	IL-17A Gehalt im Urin	87
27	Anzahl von CD3 ⁺ IL-17A ⁺ -Zellen pro 0,01 mm ² in der Niere	88
28	IL-17-Gehalt im Plasma	89
29	IL-17A/CD3-Co-Immunofärbung der Niere und des LV-Myokards . . .	90
30	Beziehung von E/A-Ratio und diastolischer Funktion	93
31	Blutdruckunabhängige, sympathoadrenerge Pathomechanismen des CKD- Phänotyps	99

Tabellenverzeichnis

1	Geräte, Software und Material (inkl. Substanzen und Lösungen)	50
2	Liste der in den Versuchen verwendeten Antikörper	50
3	Lösungen für die Zellkultur	51
4	Lösungen und Puffer für die Western-Blot-Analyse	52
5	Protokoll der Pikrosiriusrot-Färbung	56
6	Protokoll der Hämatoxylin-Eosin-Färbung	59
7	Protokoll für die IL-17A/CD3-Co-Immunofluoreszenzfärbung	72

Abkürzungen

α_2 -AR α_2 -Adrenorezeptor

α -SMA α -smooth muscle actin

A4C apikaler 4-Kammer-Blick

ACE Angiotensin Converting Enzyme

AGT Angiotensinogen

Aqua dest. Aqua destillata

ATII Angiotensin II

B-Mode Brightness-Mode

BUN Blut-Harnstoff-Stickstoff

bzw. beziehungsweise

°C Grad Celsius

CD3⁺-TLs CD3⁺-T-Lymphozyten

CD Cluster of Differentiation

CGP CGP-20712A (β -1-Adrenozeptor-Blocker)

ca. circa

CKD Chronische Niereninsuffizienz

cm Zentimeter

Col1 Kollagen vom Typ I

Col3 Kollagen vom Typ III

DALYs verlorene gesunde Lebensjahre (>disability adjusted life years<)

DAPI 4'6-Diamidin-2-phenylindol

DBP diastolischer Blutdruck

DMSO Dimethylsulfoxid

E/A-Ratio E/A-Verhältnis

ECL Western-Blot-Detektions-Reagens (>enhanced chemiluminescence reagent<)

ECM extrazelluläre Matrix

EMT epithelial-to-mesenchymal transition

FITC Fluorescein

SSC saline sodium citrate

GAPDH Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase

GFR glomeruläre Filtrationsrate

g gramm

h Stunde(n)

ICI ICI 118551

IL Interleukin

IL17A⁺CD3⁺-TLs IL-17A-produzierende CD3⁺-T-Lymphozyten

IOD integrierte optische Dichte (>integrated optical density<)

IQR Interquartilbereich (>interquartile range<)

ISO Isoproterenol / Isoprenalin

LV Linker Ventrikel / linksventrikulär

LVH linksventrikuläre Hypertrophie

LVM linksventrikuläre Masse

M molar

M-Mode Motion-Mode

mA Milliampere

Md Median

µg Mikrogramm

µl Mikroliter

mg Milligramm

min Minuten

ml Milliliter

mm Millimeter

mmHg Millimeter Quecksilbersäule

MMPs Matrix-Metalloproteinasen

MNC Mononukleäre Zellen (>mononuclear cells <)

mRNA messenger-RNA

MW arithmetischer Mittelwert

n Anzahl der Experimente

NaCl Natriumchlorid

NF-κB nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells

NK-Zellen natürliche Killerzellen

Nr. Nummer

p p-Wert

PBS phosphate buffered saline

PDGF Platelet Derived Growth Factor

pH-Wert Gegenzahl des dekadischen Logarithmus der Protonenkonzentration

PLAX parasternale lange Achse

PSAX parasternale kurze Achse

PW-Doppler Pulsed-wave Doppler

R Rezeptor

RAAS Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

RANTES Regulated on Activation Normal T Cell Expressed and Secreted / CCL5

RAS Renin-Angiotensin-System

RDN Renale Denervation

ROR- γ t Retinoic Acid-related Orphan Receptor- γ t

ROR-c Retinoic Acid-related Orphan Receptor-c

rpm Umdrehungen pro Minute (>rotations per minute<)

RT Raumtemperatur

s Sekunden

SBP systolischer Blutdruck

SDS-PAGE Natrium (Natrium)-dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

SEM Standardfehler des Mittelwertes (>standard error of the mean<)

TCR T-Zell-Antigen-Rezeptor

TGF- β 1 Transforming Growth Factor- β 1

T_H17-Zellen IL-17 produzierende T-Helfer-Zellen

T_H-Zellen T-Helfer-Zellen

T_{REGs} Regulatorische T-Zellen

TRITC 5(6)-Tetramethylrhodaminisothiocyanat

Tween Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat

u. a. unter anderem

UUO unilaterale ureterale Obstruktion

V Volt

Siehe Vergleich

Vol.-% Volumenprozent

z. B. zum Beispiel

1 Zusammenfassung

Die Genese und Organmanifestation der chronischen Niereninsuffizienz (CKD) wird maßgeblich durch das sympathische Nervensystem geprägt, das wiederum stark von der renalen sympathischen Aktivität abhängig ist. Außerdem sind das Zytokin IL-17A und sein prominentester Produzent, die T_H17 -Zellen, ebenfalls ein wesentlicher Treiber dieser Pathologien. Ob und inwieweit sympathische Aktivität die IL-17A-Produktion (bzw. Ausscheidung) im CKD-Phänotyp reguliert, ist nicht bekannt. Die vorliegende Arbeit beleuchtet die Effekte einer Modulation des sympathoadrenergen Systems auf die Produktion und Ausscheidung von IL-17A sowie auf die kardioresenalen Endorganschäden bei chronischer Nierenschädigung. Hierfür dienen Ratten als Modell, die durch eine spezielle Adenin-Diät eine langsam progrediente, sekundäre Niereninsuffizienz entwickeln. Sie weisen durch herabgesetzte Nierenfunktion, kardioresenalen Gewebeumbau und gesteigerte Inflammation einen Phänotyp auf, der jenem einer humanen CKD sehr nahekommt. Das Tiermodell eignet sich folglich, um unterliegende Mechanismen dieser Erkrankung zu untersuchen.

Es werden drei Gruppen von Ratten untersucht: eine Gruppe mit CKD (Adenin), eine Gruppe mit CKD und renaler Denervation (Adenin+RDN) nach 4 Wochen und eine Kontrollgruppe (Control). Die Analyse der Endorganschäden umfasst wiederholte Blutdruckmessungen, eine viermalige Echokardiographie (nach 0, 4, 10 und 16 Wochen), inklusive Evaluation der linksventrikulären Masse und diastolischen Funktion, sowie eine histologische Auswertung der kardioresenalen Fibrose. Weiterhin werden Proteinanalysen (Western-Blots) von adrenerg stimulierten Splenozyten und Kardiomyoblasten sowie verschiedenen Geweben (LV, Niere), Blutplasma und Urin durchgeführt, um den jeweiligen IL-17A-Gehalt zu ermitteln. Schließlich dient eine IL-17A/CD3-Co-Immunofluoreszenzfärbung (von LV und Niere) dazu, weiterführende Informationen über die Herkunft und Verteilung von IL-17A im Gewebe zu sammeln. Der Vergleich dieser Parameter unter Tieren mit und ohne CKD sowie nierenkranken Tieren mit und ohne sympathikolytische Intervention (RDN) lässt Rückschlüsse auf die Wechselwirkungen im

Trigonum von sympathischer Aktivität, IL-17A und Endorganschäden der CKD zu.

Die Endorganschäden im untersuchten Rattenmodell sind ausgeprägt und umfassen nach 16 Wochen eine signifikante linksventrikuläre Hypertrophie (LVH) und diastolische Dysfunktion sowie eine partiell signifikante kardiorenale Fibrose. Durch den Eingriff der renalen Denervation werden die LVH, die diastolische Dysfunktion und die kardiale Fibrose signifikant reduziert. Im Gegensatz dazu erwirkt die Sympathikolyse lediglich rückläufige Trends für die Parameter der renalen interstitiellen Fibrose und der kardiorenalen Kollagenexpression (Typ I (Col1)). Unsere in-vitro-Daten offenbaren, dass sowohl Splenozyten als auch Kardiomyoblasten der H9c2-Linie auf β -adrenerge Stimulation (Isoproterenol) mit einer gesteigerten Produktion von IL-17A reagieren. Dieser Effekt ist vorrangig über den β -2-Adrenozeptor vermittelt. Weiterhin zeigen die nierenkranken Tiere erhöhte IL-17A-Level in LV und Nierenparenchym, die durch RDN linksventrikulär signifikant und renal tendenziell gesenkt werden. Das urinaire IL-17A ist in der Adenin-RDN-Gruppe deutlich erhöht. Die IL-17A/CD3-Co-Immunofluoreszenzfärbung (inklusive CD3⁺IL-17A⁺-Zellzählung) zeigt ausgeprägte renale IL-17A-Signale und Zellinfiltrate, deren Zahl nach RDN tendenziell zurückgeht. Im LV liegen keine relevanten T_H17-Zellinfiltrate vor.

In Zusammenschau konnte die vorliegende Arbeit zeigen, dass die Produktion und Ausscheidung von IL-17A teilweise einer sympathischen Regulation unterliegt und im Rahmen eines CKD-Modells erste Erkenntnisse darüber generieren, welche Mechanismen diesem pathogenetischen Synergismus zugrunde liegen. Diese Erkenntnisse könnten zukünftig wichtige Bausteine für die Entwicklung spezifischer und kausaler Behandlungsmöglichkeiten für die CKD und ihre mannigfaltigen Endorganschäden bedeuten.

1.1 Summary

The pathogenesis and organ manifestation of chronic kidney disease (CKD) are largely shaped by the sympathetic nervous system, which in turn is strongly dependent on renal sympathetic activity. In addition, the cytokine IL-17A and its main producer, TH17 cells, are also a major driver of these pathologies. Whether and to what extent sympathetic activity regulates IL-17A production (or excretion) in the CKD phenotype is not known. The present study elucidates the effects of modulation of the sympathoadrenergic system on IL-17A production and excretion as well as on cardiorenal end-organ damage in

chronic kidney injury. For this purpose, rats serve as animal model, which develops a slowly progressive, secondary renal insufficiency due to a special adenine diet. Due to reduced renal function, cardiorenal tissue remodeling and increased inflammation, they exhibit a phenotype that resembles that of human CKD and is therefore suitable for investigating the underlying mechanisms of this disease.

Three groups of rats are studied: one group with CKD (Adenin), one group with CKD and renal denervation (Adenin+RDN) after 4 weeks and a control group (Control). Analysis of end-organ damage includes sequential blood pressure measurement (in the last 3 days before sacrifice), echocardiography (after 0, 4, 10 and 16 weeks), including evaluation of left ventricular mass and diastolic function, and histological evaluation of cardiorenal fibrosis. Furthermore, protein analyses (Western blots) of adrenergically stimulated splenocytes, cardiomyoblasts, various tissues (LV, kidney), plasma and urine are performed to determine the respective IL-17A content. Finally, IL-17A/CD3 co-immunofluorescence staining (of LV and kidney) is used to gather further information on the origin and distribution of IL-17A in the tissues. Comparison of these parameters among animals with and without CKD as well as kidney diseased animals with and without antisympathetic intervention (RDN) allows conclusions to be drawn about the interactions in the trigonum of sympathetic activity, IL-17A and end-organ damage of CKD.

End-organ damage in the studied rat model includes left ventricular hypertrophy (LVH), diastolic dysfunction and marked cardiorenal fibrosis at 10 weeks. Renal denervation significantly reduces LVH, diastolic dysfunction and cardiac fibrosis. In contrast, RDN produces merely decreasing trends in the parameters of renal interstitial fibrosis and cardiorenal collagen levels (type I (Col1)). Our in vitro data reveal that both splenocytes and cardiomyoblasts of the H9C2 lineage respond to β -adrenergic stimulation (isoproterenol) with increased production of IL-17A. This effect is primarily mediated via the β -2-adrenoceptor. Furthermore, the CKD animals show increased IL-17A levels in LV and renal tissue. RDN significantly reduces IL-17A in the LV and trends to lower renal IL-17A. Urinary IL-17A is significantly increased in the RDN group. IL-17A/CD3-Co-Immunofluorescence staining (including CD3⁺IL-17A⁺-cell count) shows pronounced renal IL-17A signals and cell infiltrates, the number of which decreases after RDN. No relevant T_H17 cell infiltrates were seen in the LV.

In summary, the present study was able to show that the production and excretion of

1.1. SUMMARY

IL-17A is partly subject to sympathetic regulation and, within the scope of a CKD model, to generate initial insights into the mechanisms underlying this pathogenetic synergism. In the future, these findings could be important building blocks for the development of specific and causal treatment options for CKD and its manifold end-organ damages.

2 Einleitung

2.1 Arterielle Hypertonie

2.1.1 Definition und Prävalenz der arteriellen Hypertonie

Bluthochdruck ist die weltweit führende Ursache für Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Tod sowie ein bedeutender Risikofaktor für die Entstehung chronischer Niereninsuffizienz (CKD) [28]. Die Gesamtzahl der Erwachsenen mit erhöhtem Blutdruck wurde im Jahr 2015 auf 1,13 Milliarden geschätzt, mit einer Prävalenz von > 150 Millionen in Zentral- und Osteuropa [31]. Im gleichen Jahr lag die Gesamtprävalenz unter Erwachsenen bei 30 - 45 % [28] samt einer globalen altersstandardisierten Prävalenz von 24 bzw. 20 % bei Männern und Frauen [31]. Weiterhin häuft sich das Vorkommen arterieller Hypertonie mit zunehmendem Alter, wobei unter den > 60 -Jährigen eine Prävalenz von > 60 % besteht [28]. Mit zunehmender Alterung der Bevölkerung, einer sitzenden Lebensweise und einer Zunahme des Körpergewichts wird die Prävalenz der Hypertonie weltweit weiter ansteigen. Schätzungen zufolge wird die Zahl der Menschen mit Bluthochdruck bis zum Jahr 2025 um 15-20 %, auf über 1,5 Milliarden, steigen [78].

Arterielle Hypertonie ist definiert als ein, unter Praxisbedingungen ermittelter, systolischer Blutdruck (SBP) von ≥ 140 mmHg und/oder ein diastolischer Blutdruck (DBP) von ≥ 90 mmHg. Diese Definition gründet sich auf dem von mehreren randomisierten, kontrollierten Studien belegten Umstand, dass die Behandlung von Patienten mit diesen Blutdruckwerten von Vorteil ist [181].

Wenn nicht anders angegeben, werden die Begriffe ›Arterielle Hypertonie‹, ›Bluthochdruck‹ und ›Hypertension‹ in dieser Arbeit als Synonym der ›Essenziellen (Primären) Hypertonie‹ verwendet. Die durch sekundäre Ursachen bedingten Formen der arteriellen Hypertonie sind jeweils ausgeschlossen.

2.1.2 Arterielle Hypertonie als kardiovaskulärer Risikofaktor

Erhöhter Blutdruck ist ein zentraler Risikofaktor für vorzeitige Mortalität und Morbidität. Allein im Jahr 2015 ließen sich weltweit nahezu 10 Millionen Todesfälle und über 200 Millionen verlorene gesunde Lebensjahre (DALYs) auf Bluthochdruck (jeglicher Art) zurückführen [52]. Bemerkenswerterweise ist die Anzahl der DALYs seit 1990, trotz der Fortschritte in der hypertensiologischen Diagnostik und Therapie um 40 % gestiegen. Für diese negativen Effekte sind größtenteils SPB-Werte von ≥ 140 mmHg verantwortlich. Die verwandten Haupttodesursachen sind, in absteigender Häufigkeit, die koronare Herzkrankheit, der hämorrhagische Schlaganfall und der ischämische Schlaganfall [52].

2.1.3 Therapieresistente arterielle Hypertonie

2.1.3.1 Definiton, Prävalenz und Ätiologie

Die arterielle Hypertonie wird als therapieresistent definiert, wenn trotz empfohlener Therapie, unter Praxisbedingungen oder in der Häuslichkeit, ein SBP von ≥ 140 mmHg und/oder ein DBP von ≥ 90 mmHg festgestellt wird und die Therapieadhärenz der betreffenden Patientin gegeben ist [181]. Die empfohlene Behandlungsstrategie sollte geeignete Lebensstilanpassungen und die optimal dosierte Gabe von drei oder mehr Medikamenten der folgenden Klassen umfassen: Diuretika, ACE-Inhibitoren oder Angiotensin-1-Rezeptor-Antagonisten und Kalzium-Kanal-Blocker. Weiterhin sollte zur Diagnosestellung eine pseudoresistente sowie eine sekundär bedingte arterielle Hypertonie ausgeschlossen werden [21, 181].

Die Literaturangaben zur Prävalenz der therapieresistenten arteriellen Hypertonie weisen, aufgrund von uneinheitlichen Definitionen, ein breites Spektrum von Werten zwischen 5 und 30 % auf. Unter Verwendung der engeren, oben beschriebenen Definition ist allerdings eine wahre Prävalenz von deutlich unter 10 % anzunehmen [37, 181].

Die Genese von therapieresistentem Bluthochdruck ist multifaktoriell und mit einer Vielzahl von Risikofaktoren und Komorbiditäten vergesellschaftet [116]. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass es im Allgemeinen schwieriger ist den SBP-Zielwert von ≤ 140 mmHg zu erreichen, verglichen mit dem DBP-Zielwert von ≤ 90 mmHg [21]. Hierbei konnte gezeigt werden, dass hohes Alter den größten Risikofaktor für das Versagen der SBP-Kontrolle darstellt, gefolgt von den Komorbiditäten einer linksventrikulären Hypertrophie und Adipositas [21]. Die wichtigsten Risikofaktoren sind in **Abb. 1**

zusammengefasst.

- Hohes Alter
- Hoher prätherapeutischer Blutdruck
- Adipositas
- Bewegungsmangel
- Hoher Salzkonsum
- Chronische Niereninsuffizienz
- Diabetes Mellitus
- Linksventrikuläre Hypertrophie
- Weibliches Geschlecht
- Mangelnde Therapieadhärenz

Abbildung 1: Risikofaktoren für das Entstehen einer therapieresistenten arteriellen Hypertonie (modifiziert nach [21])

2.2 Chronische Niereninsuffizienz

2.2.1 Prävalenz, Definition und Klassifikation

Die chronische Niereninsuffizienz (CKD) gehört zu den führenden Gesundheitsproblemen weltweit. Ihre globale Prävalenz wird auf 13,4 % geschätzt, während die vermutete Zahl der Patienten im Endstadium der Erkrankung (**Siehe: Abb. 2: »Nierenversagen«**), die ein Nierenersatzverfahren benötigen, auf rund 5 - 7 Millionen beziffert wird [111]. Die Effekte, die CKD auf die Zahl der Menschen mit Nierenversagen sowie auf das globale kardiovaskuläre Risiko hat, begründen außerdem ihren großen Einfluss auf die weltweite Morbidität und Mortalität [111]. In den meisten Ländern, insbesondere jenen mit hohem und mittlerem Einkommensniveau, stellen Diabetes und Hypertension (jeglicher Form) die häufigsten Ursachen der CKD dar [178].

Unter dem Begriff der CKD wird desweiteren eine heterogene Gruppe von strukturellen und funktionellen Störungen der Niere zusammengefasst [94]. Die National Kidney Foundation definiert die CKD als über 3 Monate bestehende Nierenschädigung aufgrund struktureller oder funktioneller Anomalien der Niere mit oder ohne verringerte glomeruläre Filtrationsrate (GFR), oder eine GFR von $< 60 \text{ mL/min/1,73 m}^2$ über 3 Monate mit oder ohne Nierenschädigung. Diese Definition ist unabhängig von den Ursachen der Nierenschädigung [96]. Festgestellt wird die Nierenschädigung anhand von Biopsien,

2.3. KARDIORENALE ENDORGANSCHÄDEN BEI CHRONISCHER NIERENINSUFFIZIENZ

Anomalien der Blut- und Urinzusammensetzung, insbesondere einer Proteinurie (> 300 mg Proteinausscheidung im Urin/24h), eines abnormen Urinsediments oder Anomalien in der Bildgebung [96].

Die Klassifikation der CKD (**Abb. 2**) nach den internationalen Leitlinien der National Kidney Foundation [95] gliedert die Erkrankung in 5 Stadien und orientiert sich an der Schwere der Erkrankung, gemessen anhand der GFR, der Befunde sowie der Notwendigkeit eines Nierenersatzverfahrens.

Chronische Niereninsuffizienz (CKD)				
Stadium	Beschreibung	GFR mL/min/1.73m ²	Verwandte Begriffe	Klassifizierung nach Behandlung
1	Nierenschädigung mit normaler oder ↑ GFR	≥90	Albuminurie, Proteinurie, Hämaturie	T = Empfänger von Nierentransplantat
2	Nierenschädigung mit geringer ↓ GFR	60-89	Albuminurie, Proteinurie, Hämaturie	
3a	Nierenschädigung mit geringer/mittelschwerer ↓ GFR	45-59	Chronische Niereninsuffizienz, beginnende Niereninsuffizienz	
3b	Nierenschädigung mit mittelschwerer/schwerer ↓ GFR	30-45	Chronische Niereninsuffizienz, beginnende Niereninsuffizienz	
4	Nierenschädigung mit schwerer ↓ GFR	15-29	Chronische Niereninsuffizienz, fortgeschrittene Niereninsuffizienz	
5	Nierenversagen	<15 (o. Dialyse)	Nierenversagen, Urämie, terminale Niereninsuffizienz	D = Dialyse (Hämodialyse, Peritonealdialyse)

Abbildung 2: Klassifikation der chronischen Niereninsuffizienz [164] (modifiziert nach [96])

2.3 Kardiorenale Endorganschäden bei Chronischer Niereninsuffizienz

Das Vorhandensein von CKD ist ein Risikofaktor, Auslöser und Katalysator einer ganzen Reihe von pathologischen Veränderungen im Körper. Zu diesen Veränderungen gehören u. a. Anämien, Störungen des Knochenstoffwechsels, kardiovaskuläre Erkrankungen und Krebserkrankungen [178]. Die CKD wiegt als Risikofaktor für vorzeitige Mortalität so schwer, dass es für einen Patienten mit CKD fünf- bis zehnmals wahrscheinlicher ist zu versterben, als das Stadium 5 der Erkrankung (Nierenversagen) zu erreichen [178]. Weiterhin nimmt das Mortalitätsrisiko mit abnehmender Nierenfunktion (GFR) exponentiell zu, wobei die meisten Todesfälle auf kardiovaskuläre Erkrankungen zurückzuführen sind [170, 172].

Im Folgenden soll der Fokus auf die Beziehung von CKD mit linksventrikulärem Remodeling sowie kardiorenal fibrotischen Veränderungen eingegrenzt werden.

2.3.1 CKD und Fibrose

2.3.1.1 Renale Fibrose

Nahezu alle chronischen Nierenerkrankungen führen in ihrer Endstrecke zu ausgeprägter renaler Fibrose (**Abb. 3**), der pathophysiologisch und prognostisch eine Schlüsselrolle zukommt [104]. Die renale Fibrose stellt die erfolglose Wundheilung des Nierengewebes nach einer chronischen, anhaltenden Verletzung dar und ist durch Glomerulosklerose, Tubulusatrophie und interstitielle Fibrose gekennzeichnet [178].

Diese drei pathologischen Veränderungen lassen sich auch in dem in dieser Arbeit verwendeten Rattenmodell mit Adenin-nephropathie feststellen (**Siehe: 3.1.1.3**). Der fibrotische Umbau ist weiterhin als Resultat eines gestörten Gleichgewichts zwischen pro- und antifibrotischen Mechanismen zu verstehen [51, 178].

Definitionsgemäß stellt die Glomerulosklerose (**Abb. 3: A**) eine gesteigerte Akkumulation von Mesangialmatrix sowie eine Obliteration der glomerulären Kapillaren dar [51]. Ein erster profibrotischer Mechanismus wird über einen, durch Hypertension verursachten, Schaden des glomerulären Endothels vermittelt, der zur Mikroinflammation führt. Es folgt eine über Entzündungszellen getriggerte Proliferation von Mesangiumzellen [73, 178]. Diese Zellen des Mesangiums reagieren auf eine Reihe von Wachstumsfaktoren (u. a. Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1), Platelet Derived Growth Factor (PDGF), Angiotensin II (ATII)), die sowohl von endogenen als auch infiltrierenden Zellen produziert werden [51], indem sie ihren Phänotyp ändern und als Mesangioblasten exzessiv extrazelluläre Matrix (ECM) produzieren [73, 178]. Die daraus resultierende Expansion des Mesangiums führt zu Lücken in der, durch Podozyten gebildeten, Schlitzmembran, die eine Verschmelzung von glomerulärer Basalmembran und Bowmanscher Kapsel hervorrufen und somit zur Glomerulosklerose beitragen [178].

Ein weiterer Mechanismus ergibt sich aus der Störung der Blut-Harn-Schranke (**Abb. 3: B**): Tubulusepithelzellen, die fehlgefilterten Harnproteinen wie Zytokinen, Albumin oder Komplementfaktoren ausgesetzt sind, produzieren ihrerseits proinflammatorische Stoffe, die zur entzündlichen Infiltration des Interstitiums führen [178]. Weiterhin können die Tubuluszellen im Verlauf ihren Phänotyp zu Myofibroblasten ändern (epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)), die über die Synthese von extrazellulärer Matrix eine wichtige Rolle in der Fibrogenese spielen und deren Genese vielfältige Mechanismen hat (**Abb. 3: D**) [104, 106]. Mit Progress der fibrotischen Veränderungen verlieren die Tubulusepithelzellen ihre regenerativen Fähigkeiten und werden apoptotisch, was letztlich zur Tubulusatrophie führt [104, 178].

2.3. KARDIORENALE ENDORGANSCHÄDEN BEI CHRONISCHER NIERENINSUFFIZIENZ

Die Basis eines dritten Mechanismus ist die erhöhte Permeabilität von interstitiellen Kapillaren (**Abb. 3: C**), die es gewebefremden Plasmaproteinen erlaubt ins Interstitium überzutreten und Entzündungsreaktionen hervorzurufen [158]. Dieser Prozess fördert im Verlauf eine Rarefizierung der interstitiellen Gefäße, was zu renalen Hypoxien führt. Dieses hypoxische Milieu beeinträchtigt u. a. antifibrotische Zellfunktionen (vermittelt durch z. B. Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), Serinproteasen (SPs), die Adamalysin-Familie (ADAMTS) und lysosomale Enzyme (LEs)), die physiologischerweise am Abbau von Kollagen beteiligt sind [178]. Insbesondere Kollagen vom Typ I, II und III, aber auch Basalmembranproteine, Glykoproteine und Proteoglykane sammeln sich konsekutiv in der geschädigten Niere an [104, 178]. In diesem Zusammenhang gilt es zu erinnern, dass die Fläche des fibrotischen Interstitiums in engem Bezug zur Nierenfunktion und langfristigen Prognose der CKD steht. [178].

Unter den verschiedenen Entzündungszellen, die an der renalen Fibrogenese beteiligt sind, sind insbesondere die CD4⁺-T-Lymphozyten hervorzuheben, die eine entscheidende Rolle in der Entstehung renaler Fibrose spielen (**Siehe: Abschnitt 2.6.3**) [104, 131, 168].

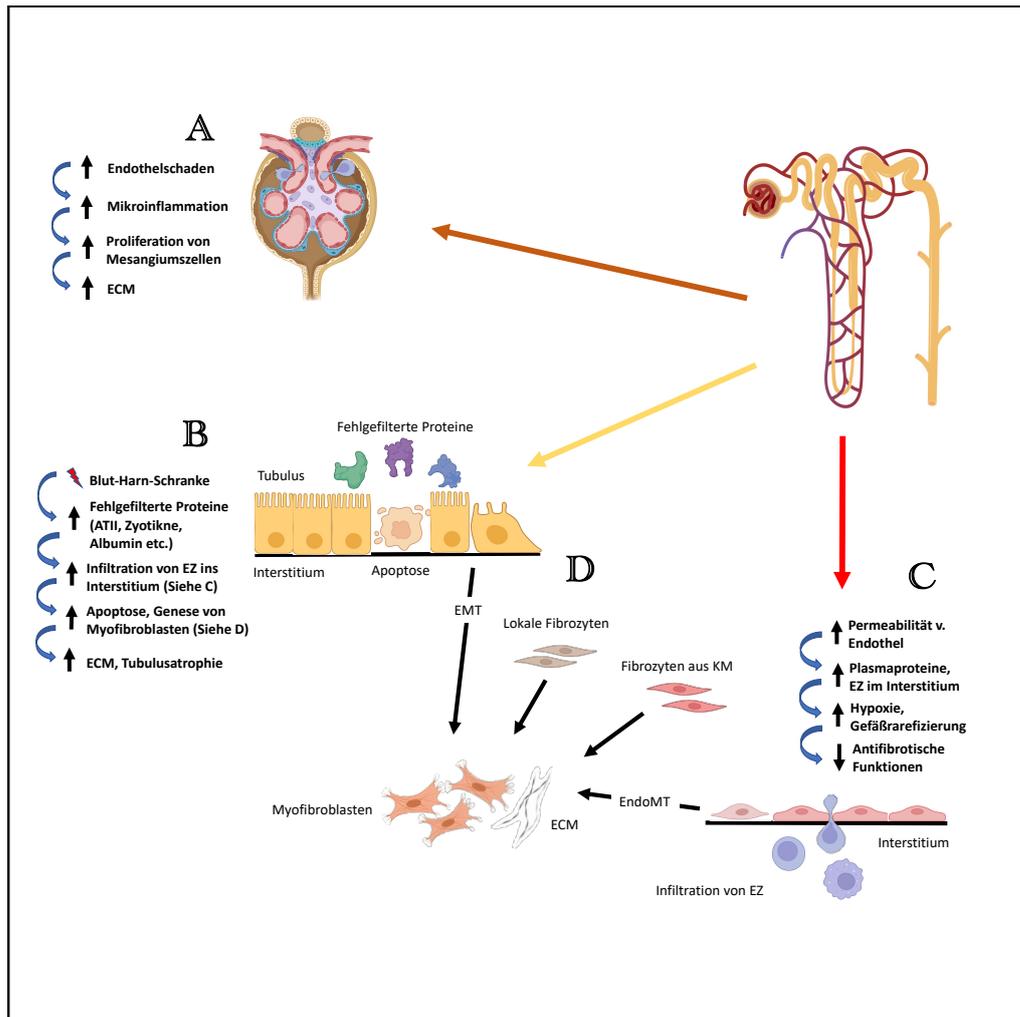


Abbildung 3: Renale Fibrose bei CKD (Modifiziert nach [104, 106]; Erzeugt mit BioRender.com).

A: Profibrotischer Mechanismus der Glomerulosklerose bei CKD.

B: Profibrotischer Mechanismus der gestörten Blut-Harn-Schranke bei CKD.

C: Profibrotischer Mechanismus der erhöhten Gefäßpermeabilität bei CKD.

D: verschiedene Mechanismen der Genese von interstitiellen ECM-produzierenden Myofibroblasten.

Abkürzungen: ECM = Extrazelluläre Matrix; ATII = Angiotensin II; EZ = Entzündungszellen; EMT = »epithelial-to-mesenchymal transition«; EndoMT = »endothelial-to-mesenchymal transition«; KM = Knochenmark.

2.3.1.2 Kardiale Fibrose

Eine kardiale Fibrose ist ein häufiger Befund bei Patienten mit CKD (**Abb. 4: B**) und stellt neben der linksventrikulären Hypertrophie (LVH) (**Siehe: 2.3.2**) eines der Hauptmerkmale der urämischen Kardiomyopathie dar. Sie tritt weiterhin unabhängig von LVH auf und ist gekennzeichnet durch diffuse interkapilläre und interkardiozytäre Kollagenablagerungen [5, 72]. Die komplexen zugrundeliegenden Mechanismen, die die kardiale Fibrose via Zelltypaktivierung antreiben sind noch nicht vollständig geklärt [75]. Jedoch lassen sich eine Reihe von systemischen Faktoren benennen, die eine urämische Kardiomyopathie bei CKD begünstigen: eine gestörte Phosphathomöostase, urämische Toxine, Wachstumsfaktoren, metabolischer Stress und Entzündung [75].

Auf makroskopischer Ebene tragen die fibrotischen Veränderungen zu einer diastolischen

2.3. KARDIORENALE ENDORGANSCHÄDEN BEI CHRONISCHER NIERENINSUFFIZIENZ

Dysfunktion bei, indem sie die kardiale Compliance herabsetzen [5]. Möglicherweise wird zusätzlich die systolische Funktion eingeschränkt, da funktionelle Kardiomyozyten durch fibrotisches Gewebe ersetzt werden [75, 77].

Ein Hauptgrund für die Entstehung von kardialer Fibrose bei CKD ist eine veränderte Hämodynamik (**Abb. 4: A**), insbesondere in Form von arterieller Hypertonie, die die Fibrogenese vorrangig über eine Druckbelastung des Herzens provoziert [75]. Diese Druckbelastung kann ferner durch CKD-typische Veränderungen wie eine akzelerierte Gefäßversteifung, vaskuläre Kalzifikationen und den Verlust von elastischen Fasern gesteigert sein [25].

Allerdings gibt es Hinweise, dass auch hämodynamikunabhängige Mechanismen (**Abb. 4: A**) in der Entstehung von CKD-assoziiierter kardialer Fibrose von Bedeutung sein könnten. So ist etwa die myokardiale Fibrose bei CKD-Patienten im Endstadium ausgeprägter, als bei Patienten mit Diabetes oder essentieller arterieller Hypertonie, die die gleiche linksventrikuläre Masse (LVM) aufweisen [107]. Zu diesen Mechanismen zählen die folgenden, mit urämischem Milieu assoziierten, Faktoren: ATII, Aldosteron, Parathormon, Endothelin, erhöhte sympathische Aktivität (**Siehe: 2.5.2**) und erhöhte Katecholaminplasmalevel [107].

2.3.1.3 Die Rolle von Kollagen

Kollagen vom Typ I (Col1) stellt neben Kollagen vom Typ III (Col3) die wichtigste Komponente des kardialen interstitiellen Gerüsts dar und trägt in gesunden Individuen u. a. maßgeblich zur Stabilisierung von myokardialen Zellen und Gefäßen sowie zur regelrechten systolischen und diastolischen Funktion des Myokards bei [77]. Im Gegensatz dazu gibt es Hinweise, dass die Funktion von Col1 in gesunden Nieren weniger eminent ist [18]. Entsteht jedoch ein parenchymatöser Schaden der Niere, so kommt es zur Ausbildung einer interstitiellen Fibrose (**Siehe: 2.3.1.1**), die, abhängig von der Natur des zugrundeliegenden Schadens, positive oder negative Auswirkung auf die Nierenfunktion haben kann [18]. Wie in **2.3.1.2** beschrieben stellt die kardiale Fibrose eine der Hauptkomponenten kardiovaskulärer Erkrankungen im Rahmen von CKD dar. Col1 repräsentiert hierbei den Hauptbestandteil der kardialen fibrotischen Ablagerungen [187] und verdient somit besondere Aufmerksamkeit.

2.3.2 CKD und linksventrikuläres Remodeling

Linksventrikuläres Remodeling beschreibt einen Vorgang, in welchem das Myokard des linken Ventrikels seine Funktion und Geometrie als Reaktion auf pathologische Stimuli

verändert. Üblicherweise schließt der Begriff ›Remodeling‹ den in **Abschnitt 2.3.1.2** beschriebenen Vorgang der Fibrosierung ein. Zugunsten der Anschaulichkeit sollen der Aspekt der kardialen Fibrose und die übrigen linksventrikulären Umbauvorgänge, im Kontext dieser Arbeit, separat betrachtet werden.

Im Rahmen der CKD stellt die LVH die zentrale pathologische Veränderung des linken Ventrikels dar (**Abb. 4: B**). Sie tritt bei einem Drittel der CKD-Patienten auf, im Endstadium der Erkrankung sogar bei 70 - 80 % [72]. Die zugrundeliegenden Mechanismen der CKD-assoziierten LVH lassen sich in drei Kategorien einteilen: Nachlastbezogene Mechanismen, vorlastbezogene Mechanismen und Mechanismen die weder nach- noch vorlastbezogen sind [59].

Zu den nachlastbezogenen Mechanismen zählen erhöhter systemischer arterieller Widerstand, systemischer Bluthochdruck sowie eine erhöhte Steifigkeit der großen Gefäße. Sie vermitteln eine Verdickung myokardialer Zellen und eine initiale konzentrische Hypertrophie [59, 72, 110]. Unter anhaltender linksventrikulärer Überlastung entwickelt sich im Verlauf eine exzentrische LVH mit eingeschränkter systolischer Funktion [72].

Die Vorlaststeigerung wird über eine Erhöhung des intravasalen Volumens via Salz- und Wasserretention vermittelt, welche zu einer Längsausdehnung der Herzmuskelzellen sowie exzentrischen und asymmetrischen Anpassungen der linksventrikulären Geometrie führt [59]. Nachlast- und vorlastbezogene Mechanismen wirken hierbei simultan und produzieren additive und synergistische Effekte [59, 72, 110]. Es gibt weiterhin eine Reihe von Mechanismen, die unabhängig von Nach- und Vorlast Einfluss auf das linksventrikuläre Remodeling bei CKD nehmen. So gibt es Hinweise, dass Hyperphosphatämie, ein häufiger Befund bei CKD, zur Entstehung von LVH beitragen könnte [152]. Überdies sind auch gesteigerte kardiale Level von ATII [145] sowie erhöhte sympathische Aktivität [62] mit einer LVH assoziiert.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die zahlreichen durch CKD hervorgerufenen systemischen Veränderungen, hämodynamische wie auch hämodynamikunabhängige, die zur Entstehung einer kardialen Fibrose (**Siehe: 2.3.1.2**) und zur pathologischen Veränderung der linksventrikulären Funktion und Geometrie führen, große Schnittmengen und Interdependenzen aufweisen (**Abb. 4**). Eine dieser Schnittmengen stellt die durch CKD induzierte chronisch-systemische Inflammation dar [197], in deren Rahmen diverse inflammatorische Zytokine [197] ausgeschüttet werden, die ihrerseits ein linksventrikuläres Remodeling [63] inklusive kardialer Fibrose [140] fördern. Ein grundlegender Vermittler dieser Veränderungen ist außerdem das im folgenden Abschnitt (**Abschnitt 2.4**)

2.4. ROLLE DES SYMPATHISCHEN NERVENSYSTEMS IN PATHOLOGIEEN DER KARDIORENALEN ACHSE

behandelte sympathische Nervensystem.

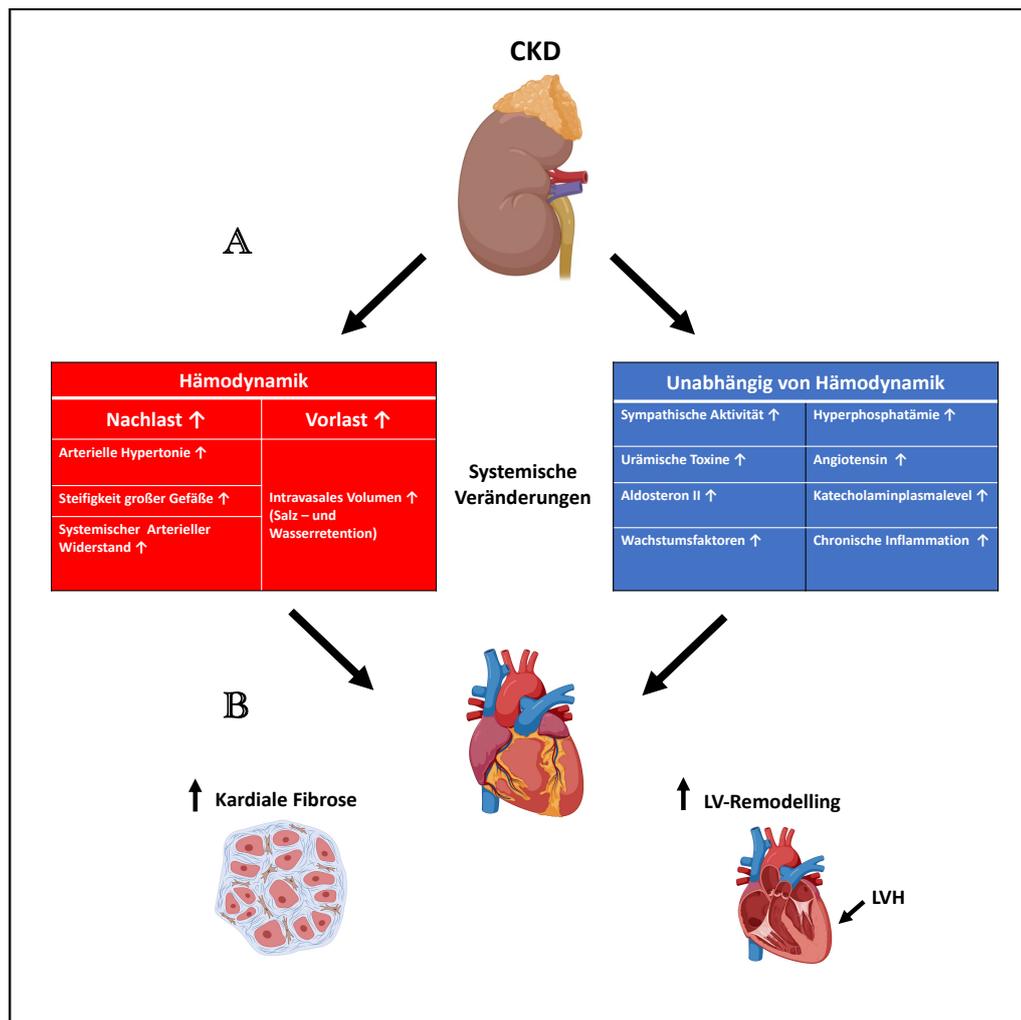


Abbildung 4: Kardiale Fibrose und Linksventrikuläres Remodeling bei CKD

(Erzeugt mit BioRender.com)

A: Systemische Veränderungen bei CKD

B: Effekte von CKD auf das Herz

2.4 Rolle des sympathischen Nervensystems in Pathologien der kardiorenalnen Achse

Das sympathische Nervensystem (Sympathikus) ist Teil des peripheren vegetativen Nervensystems, das zusätzlich den Parasympathikus und das Darmnervensystem beinhaltet [14]. Der Sympathikus hat seinen Ursprung im Brustmark sowie in den oberen zwei bis drei Segmenten des Lendenmarks und umfasst präganglionäre Neurone, die vom Rückenmark zu den bilateralen paravertebralen Ganglien des Grenzstrangs oder den unpaaren prävertebralen Bauchganglien projizieren, sowie postganglionäre Neurone, welche die Zielorgane innervieren [14]. Funktionell nimmt das sympathische Nervensystem hauptsächlich über den Transmitter Noradrenalin Einfluss auf die Effektorzellen, an denen das

Katecholamin mit adrenergen Rezeptoren (α -1/2, β -1/2/3) interagiert. Effektorzellen des Sympathikus sind u. a. die glatten Muskelzellen aller Organe, das Myokard, ein Teil der exokrinen Drüsen, die Nierentubuli und diverse lymphatische Gewebe [14].

Es gibt einen großen Forschungskörper, der die Relevanz des sympathischen Nervensystems in der Entstehung und Progression von arterieller Hypertonie (**Siehe: Abschnitt 2.1**) und CKD (**Siehe: Abschnitt 2.2**) unterstreicht [61, 151, 160, 196]. Der Sympathikus spielt zudem eine Rolle in einer ganzen Reihe von kardialen Pathologien, wie Arrhythmien [156] und Herzinsuffizienz [92], sowie in aggravierenden Komorbiditäten, beispielsweise dem Schlafapnoe- [161] oder metabolischen Syndrom [60].

Die kardioresnale Achse (**Abb. 5: B**) umfasst drei Organsysteme, die durch sympathischen Einfluss zu Pathologien beitragen: das Herz, die Nieren und das Gefäßsystem. Hierbei nimmt die Niere eine Sonderstellung ein, da die renalen sympathischen Afferenzen (**Abb. 5: A**) über die zentralnervöse Aktivierung einen bedeutenden Einfluss auf die Gesamtaktivität des sympathischen Nervensystems nehmen [113, 151]. Während die renalen Afferenzen in **Abschnitt 2.5.2** behandelt werden, soll hier eine kurze Übersicht über die Auswirkungen efferenter sympathischer Aktivität auf die drei Effektorsysteme erfolgen (**Abb. 5: B**):

Der Herzmuskel reagiert auf sympathische Reize mit einer Steigerung der Herzfrequenz und Kontraktionskraft. Beide Effekte werden über β -1-Adrenozeptoren vermittelt. Ferner gehört das Herz zu den Effektororganen, die sowohl auf Reize des Sympathikus als auch des Parasympathikus reagieren [14]. Eine sympathische Überaktivität am Herzen kann zu LVH, Herzinsuffizienz und Ischämien führen [113, 150].

An der Niere provozieren sympathische Efferenzen, über β -1-Adrenozeptoren, die Reninfreisetzung im juxtaglomerulären Apparat [113, 159]. Weiterhin wird über α -1B-Adrenozeptoren die tubuläre Natriumrückresorption [11, 113] und über α -1A-Adrenozeptoren (ehemals auch klassifiziert als α -1C-Adrenozeptoren [143]) eine renale Vasokonstriktion mit Minderdurchblutung der Nieren induziert [42, 113].

Das Gefäßsystem reagiert zum Großteil exklusiv auf Reize des sympathischen Nervensystems, mit Ausnahmen von Gefäßen der erektilen Gewebe, des Gehirns und der Speicheldrüsen, die sympathisch und parasympathisch reguliert sind [14]. Der Sympathikus stimuliert an den Gefäßen eine Vasokonstriktion, via α -1-Adrenozeptoren [14] und in geringerer Ausprägung via Aktivierung von sowohl prä- als auch postsynaptischen α -2A-Adrenozeptoren [58], und ist an der Pathogenese von Atherosklerose beteiligt

[113, 128].

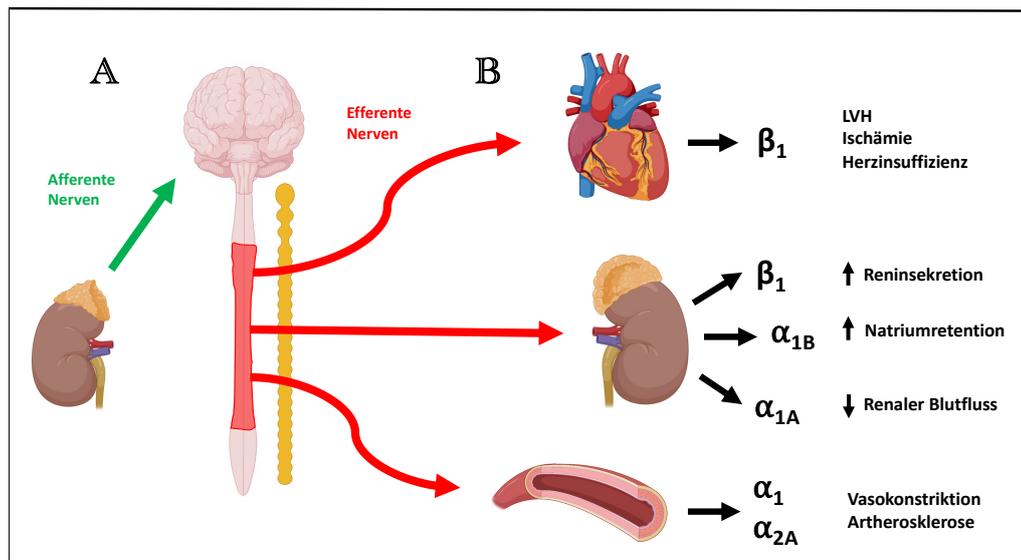


Abbildung 5: Effekte des sympathischen Nervensystems auf die kardiorenale Achse (Modifiziert nach [113]; Erzeugt mit BioRender.com)

A: Sympathische renale Afferenzen

B: Das efferente sympathische Nervensystem und seine Effekte auf die kardiorenale Achse (Herz, Niere, Gefäße)

2.5 Renale Denervation (RDN)

2.5.1 Rationale für RDN bei arterieller Hypertonie

Das enorme Ausmaß der durch arterielle Hypertonie verursachten Gesundheitsschäden (**Siehe: 2.1.1, 2.1.2**) begründet die Notwendigkeit, die Bandbreite und Verfügbarkeit blutdrucksenkender Interventionen zu erweitern. In diesem Rahmen ist zu beachten, dass die Rate kardiovaskulärer Ereignisse schon durch eine moderate Blutdrucksenkung deutlich verringert werden kann [49, 177].

Medikamente stellen hierbei die mit Abstand wichtigste Säule moderner antihypertensiver Therapien dar. Allerdings kann die medikamentöse Behandlung zwei bedeutende Limitierungen aufweisen:

Zum einen können Patienten, aufgrund ihrer Disposition und Komorbiditäten, zunehmend Nebenwirkungen und Unverträglichkeiten gegenüber therapeutischen Dosen der medikamentösen Blutdrucksenker entwickeln. Weiterhin ist davon auszugehen, dass ein großer Anteil der Patienten eine mangelnde oder fehlende Therapieadhärenz aufweist. So stellen nach Schätzungen bis zu 50 % der Patienten ihre Medikamenteneinnahme im ersten Jahr nach Verschreibung teilweise oder vollständig ein [12, 176, 177].

Die RDN ist ein katheterbasiertes, sympatholytisches Verfahren, das ursprünglich zur Behandlung der therapieresistenten arteriellen Hypertonie (**Siehe: 2.1.3**) entwickelt wur-

de [65]. Sie könnte, insbesondere angesichts mangelnder Therapieadhärenz bei rein medikamentöser Therapie, eine wertvolle Ergänzung bzw. Alternative [20, 173] zur medikamentösen Behandlung darstellen [19, 177].

2.5.2 Theoretische Grundlage für RDN bei arterieller Hypertonie

Obwohl die arterielle Hypertonie eine multifaktorielle Pathogenese hat (**Siehe: 2.1.3**), gibt es überzeugende Belege für eine wichtige Rolle des sympathischen Nervensystems bei ihrer Entstehung [61, 177]. Die Mechanismen über die das sympathische Nervensystem die Genese von Bluthochdruck begünstigt sind vielfältig, komplex und teilweise noch unzureichend untersucht. Neben Adipositas-assoziierten Mechanismen stellen renale Mechanismen eine der zunehmend prävalenten und relevanten Ursachen für sympathisch vermittelten bzw. modulierten Bluthochdruck dar [61]. Die renalen Mechanismen werden durch die renalen sympathischen Nervenfasern vermittelt, die Einfluss auf Natriumhaushalt, Reninsekretion und renalen Gefäßwiderstand nehmen und eine besondere Bedeutung im Spektrum der Hypertonieursachen haben [41, 61, 137]. Die negativen Effekte auf den Blutdruck und zahlreiche andere Parameter (**Siehe: Abschnitt 2.4**) werden zudem sowohl durch efferente als auch afferente sympathische Nervenfasern provoziert (**Abb. 6**).

2.5.2.1 Efferente sympathische Nervenfasern

Es wird angenommen, dass die renale sympathische efferente Aktivität (**Abb. 6: B**) eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der arteriellen Hypertonie spielt [43, 61]. Dies wird im Wesentlichen auf drei Mechanismen zurückgeführt: Erstens verringert die renale sympathische efferente Aktivität die Drucknatriurese unter erhöhten renalen Perfusionsdrücken, was gleichbedeutend mit einer gesteigerten tubulären Natriumrückresorption ist, einem treibenden Faktor von Hypertension [148]. Zweitens führen höhere Level von renaler sympathischer efferenter Aktivität zu einer verminderten renalen Perfusion und konsekutiv zu einer verringerten glomerulären Filtrationsrate [43]. Überdies bewirkt die renale sympathische efferente Aktivität eine gesteigerte Reninausschüttung und somit eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) [137, 177].

2.5.2.2 Afferente sympathische Nervenfasern

Es werden im Allgemeinen zwei Typen von renalen sympathischen afferenten Nerven unterschieden (**Abb. 6: A**). Der erste Typ gehört zum Nierenparenchym, besitzt Nozizeptoren und reagiert auf Signale einer Nierenschädigung, indem er in den Hypothalamus projiziert und so zur Steigerung der zentralnervösen sympathischen Aktivität führt

2.5. RENALE DENERVATION (RDN)

[23, 44, 61, 159]. Diese zentralnervöse Aktivitätssteigerung führt zu einer Blutdruck-erhöhung, mittels peripherer Vasokonstriktion, gesteigertem Herzzeitvolumen, renaler Vasokonstriktion sowie erhöhter Reninausschüttung und Natriumrückresorption (**Abb. 6: B, C**) [23, 65]. Der zweite Typ besitzt drucksensitive Rezeptoren (Barozeptoren) und ist u. a. im Nierenbecken lokalisiert [61]. Die über Barozeptoren vermittelte Steigerung der renalen sympathischen afferenten Aktivität kann sowohl über einen erhöhten renalvenösen Druck als auch einen erhöhten Druck im Nierenbecken ausgelöst werden [44]. Im Gegensatz zu den nozizeptiven, durch Nierenschädigung vermittelten Afferenzen, haben die barozeptiv ausgelösten Afferenzen einen sympathoinhibitorischen Effekt, der über erleichterte Diurese und Natriuresis eine Blutdrucksenkung provoziert. Dieser Zusammenhang wird zu den sog. reno-renalen Reflexen gezählt [44, 65]. Eine Beeinträchtigung dieses reno-renalen Reflexes im Rahmen von Nierenschädigungen könnte zur Entwicklung von Hypertension beitragen [65].

Es gilt jedoch zu beachten, dass die exakten afferenten Bahnen, die die systemische sympathische Aktivierung vermitteln, sowie die präzisen Mechanismen, die diese Afferenzen auslösen, noch unbekannt sind [84, 177].

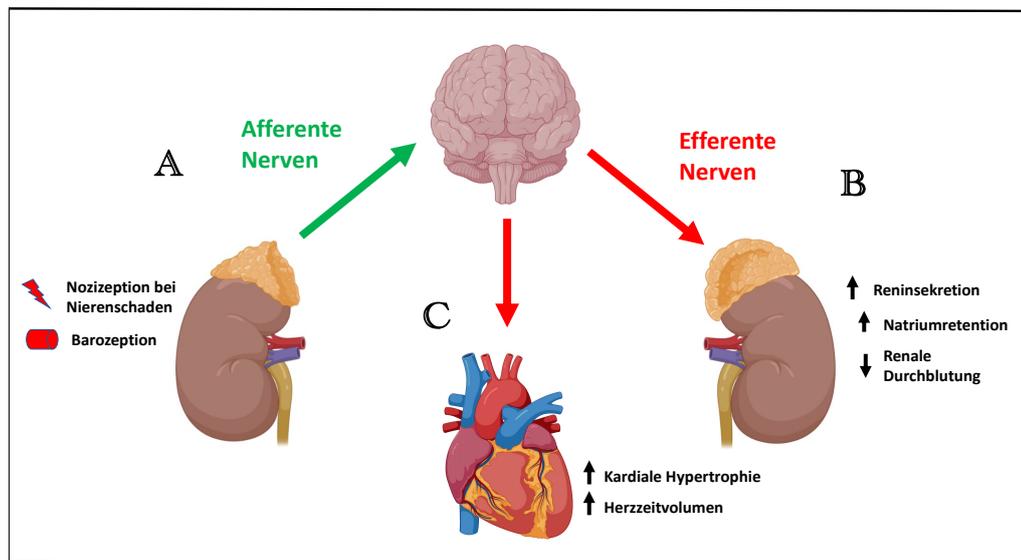


Abbildung 6: Efferente und afferente Bahnen die durch RDN supprimiert werden (Modifiziert nach [177])

2.5.3 Chronische Niereninsuffizienz und RDN

Eine Überaktivität des sympathischen Nervensystems ist in allen Stadien der CKD präsent. Sie lässt sich bereits bei Patienten mit nephrotischem Syndrom oder polyzystischer Nierenerkrankung detektieren, die normale Nierenfunktion aufweisen [61]. Außerdem steigen die Level sympathischer Aktivität mit Progression der CKD zunehmend an, was auf die renale sympathische afferente Aktivität und möglicherweise auch auf weitere

Mechanismen zurückzuführen ist (**Siehe: Abschnitt 2.5.2**) [23, 61]. Die höchsten Level sympathischer Aktivität lassen sich bei Patienten im Endstadium der Erkrankung, dem Nierenversagen, beobachten. Anhand klinischer Studien wurde die sympathische Überaktivität bei diesen Patienten auf die afferenten nervalen Signale der Niere zurückgeführt. So ließ sich die sympathische Überaktivität durch eine bilaterale Nephrektomie, mit Entfernung beider renaler Afferenzen, nicht jedoch über eine einseitige Nierentransplantation, normalisieren [32, 61, 67]. Ähnliche Beobachtungen konnten auch in einem CKD-Mausmodell mit 5/6-Nephrektomie gemacht werden, in welchem eine dorsale Rhizotomie (selektive Zerstörung von Nervenfasern des Rückenmarks) sowohl den Blutdruck als auch die sympathische Aktivität auf physiologische Level senkte [23]. Weiterhin ist davon auszugehen, dass die sympathische Überaktivität nicht nur das Ergebnis sondern auch eine Ursache der Krankheitsprogression bei CKD darstellt. Sie begünstigt eine Hypertension und führt zu Proteinurie, Glomerulosklerose und zur renalen interstitiellen Fibrose (**Siehe: Abschnitt 2.3.1.1**), unabhängig von blutdruckabhängigen Effekten [1]. Ergänzend konnte eine Abschwächung der CKD-Progression in unterschiedlichen CKD-Tiermodellen, sowohl durch pharmakologische als auch durch RDN erzielte Sympathikolyse, gezeigt werden [1]. Insbesondere wurde in einem CKD-Rattenmodell mit subtotaler Nephrektomie beobachtet, dass RDN einen durch ein Kondensat aus Zigarettenrauch induzierten Anstieg von Glomerulosklerose und tubulointerstitiellem Schaden verhindert. Auch dieser Effekt erwies sich als unabhängig von Blutdruckveränderungen [134].

In Zusammenschau wird deutlich, dass die theoretischen Grundlagen sowie zahlreiche vielversprechende Ergebnisse aus CKD-Tiermodellen eine stabile Basis für RDN als therapeutische Option bei chronischen Nierenerkrankungen liefern. Zudem konnten zwei kleine klinische Studien, die Effektivität und Sicherheit von RDN als antihypertensive Therapie bei bestehender CKD untersuchten, bereits erste positive Ergebnisse zeigen [68, 149].

2.6 T_H17-Zellen und IL-17

Vor 33 Jahren wurde erstmals durch Mosmann & Coffman [127] das T_H1/T_H2-Paradigma der Differenzierung von T-Helfer-Zellen (T_H-Zellen) eingeführt. Es liefert Erklärungen für zahlreiche Phänomene der erworbenen Immunität und beschreibt wie sich naive CD4⁺-T-Zellen (= T_H-Zellen), initial durch Zytokine antigenbindender Zellen des an-

geborenen Immunsystems und später durch eigens produzierte Lymphokine, in T_H1- bzw. T_H2-Zellen differenzieren [86]. Mit dem Fortschreiten der Forschung zu organspezifischer Autoimmunität ergaben sich Erkenntnisse, die eine vorrangig von T_H1-Zellen getriebene Genese autoimmuner Erkrankungen, wie der experimentellen autoimmunen Enzephalitis oder der kollageninduzierten Arthritis, infrage stellten [35, 86]. Diese und die Entdeckung und Charakterisierung von IL-23 führten schließlich zur Distinktion einer neuen Untergruppe IL-17 produzierender T-Helfer-Zellen (T_H17-Zellen), wodurch das T_H1/T_H2-Paradigma um die T_H17-Zellen erweitert wurde [66, 86, 141]. Seitdem wurde eine Vielzahl von Arbeiten veröffentlicht, die die Beteiligung dieser Untergruppe an der Pathophysiologie der arteriellen Hypertonie [124, 147, 189], der CKD [33, 34, 80, 88] und mehrerer weiterer, mit erhöhten Katecholaminspiegeln assoziierten Konditionen beschreiben, darunter z. B. Diabetes [184] und der kardiogene Schock [38].

Im Jahre 1993, deutlich vor der Entdeckung der T_H17-Zellen, wurde ihr namensgebendes Hauptsekretionsprodukt identifiziert, das IL-17.[33] IL-17 steht für eine Zytokinfamilie mit sechs Mitgliedern, den Botenstoffen IL-17A bis IL-17F. Die beiden Zytokine IL-17A (häufig auch synonym mit IL-17 genannt) und IL-17F dominieren in der Sekretion durch T_H17-Zellen und weisen die größte Sequenzhomologie auf, jedoch ist IL-17A das deutlich potentere Signalmolekül [33, 55].

IL-17A stellt das Gründungsmitglied der IL-17-Familie dar und ist neben IL-17F das am besten untersuchte Zytokin der Gruppe [55]. Außerdem gibt es Hinweise für seine dominante Rolle in Inflammation und organspezifischer Autoimmunität [36, 55]. Am wichtigsten ist im gegenwärtigen Kontext jedoch seine nachweisliche Beteiligung an einer ganzen Palette von Erkrankungen der kardioresalen Achse [33].

Es gilt zu beachten, dass T_H17-Zellen neben IL-17A eine Reihe weiterer Botenstoffe produzieren (z. B. IL-6, IL-21, IL-22, ›granulocyte macrophage colony-stimulating factor‹ (GM-CSF), Tumornekrosefaktor (TNF), Interferon- γ) und IL-17A wird seinerseits von mehreren anderen Zelltypen (z. B. $\alpha\beta$ - und $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten, CD8⁺-T-Lymphozyten (Tc17), natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), ›invariant natural killer T cells‹ (iNKT), ›type 3 innate lymphoid cells‹ (ILC3s) und myeloiden Zellen) (**Abb. 7: C**) produziert [6, 36, 86].

2.6.1 Die Differenzierung von T_H17 Zellen

Die Etablierung von T_H17-Zellen als eigene Untergruppe fußte maßgeblich auf ihrem einzigartigen Differenzierungsweg (**Abb. 7: A**), das heißt den Differenzierungs- und Transkriptionsfaktoren, die für die Entwicklung einer naiven T-Zelle (T_H0 = ohne stattgehabten Kontakt zu einem spezifischen Antigen) zu einer T_H17-Zelle notwendig sind [86]. Dieser Differenzierungsweg wurde erstmalig in Mäusen und später in Menschen untersucht, wobei sich neben großen Überschneidungen auch leichte Unterschiede zwischen den Spezies ergaben [86, 132]. Der T_H17-Differenzierungsweg steht außerhalb des T_H1/T_H2-Systems und kann in drei Phasen unterteilt werden: Die Initiierungsphase, die Amplifikationsphase und die Stabilisierungsphase [132].

Während der Initiierungsphase wird die Differenzierung der naiven Zellen angestoßen, wofür in Mäusen die Präsenz von Transforming Growth Factor- β (TGF- β) und IL-6 oder, mit geringerem Effekt, IL-21 [85] unabdingbar ist [132]. Die Kombination von TGF- β und IL-6 führt in den Zellen zur Induktion des Transkriptionsfaktors ›acid-related orphan receptor- γ t‹ (ROR- γ t via Aktivierung des ›signal transducer and activator of transcription 3‹ (STAT3) [86, 120, 132]. Auch bei der Initiierung des T_H17-Differenzierungsweges im Menschen ist TGF- β unverzichtbar. Ebenso führen Kombinationen von IL-21 oder IL-21 und IL-6 oder IL-23 und IL-6 zur Aktivierung von ROR-c, dem menschlichen Homolog des ROR- γ t [119, 132].

Die Amplifikationsphase basiert auf einer autokrinen Schleife, das heißt der Differenzierung noch naiver Zellen (T_H0) durch Produkte der bereits differenzierten Zellen (T_H17). Im Gegensatz zu den autokrinen Schleifen der T_H1- und T_H2-Zellen, deren Hauptsekretionsprodukte (Interferon- γ und respektive IL-4) eine Triggerwirkung auf die Differenzierung ihrer Vorläuferzellen haben, verfügt IL-17 über keine solche Triggerfunktion. Stattdessen ist es in Mäusen das Nebensekretionsprodukt IL-21, welches die Differenzierung der T_H17-Zellen in Kombination mit TGF- β vorantreibt [85, 132]. Im Menschen sind als amplifizierende Faktoren IL-6 und IL-1 β identifiziert worden [191]. Da menschliche naive T-Zellen keine IL-1-R [90] oder IL-23-R [119] exprimieren und diese erst durch Stimulation mit TGF- β und IL-6/IL-21 ausgebildet werden, ist anzunehmen, dass die Bedingungen an das Zytokin-Milieu der T_H17-Differenzierung in Mensch und Maus sehr ähnlich sind [132].

Die Stabilisierungsphase wird in Menschen, wie auch in Mäusen, durch das IL-23 bestimmt, das die differenzierten T_H17-Zellen in ihrem Phänotyp stabilisiert und somit zur Expansion der T_H17-Population beiträgt [2, 35, 132].

2.6.2 Das immunologische Netzwerk um IL-17A und IL-17-Rezeptoren

Das Zytokin IL-17A ist von pleiotropem Charakter und entscheidender Bedeutung in der Wirtsabwehr gegenüber einer bakteriellen oder mykotischen Invasion [98]. Außerdem ist es unverzichtbar für die Wundheilung und begünstigt die Pathogenese allergischer und autoimmuner Erkrankungen [33, 118, 163].

2.6.2.1 IL-17A als Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunabwehr

Um die außerordentlich vielfältigen Quellen, Funktionen und pathophysiologischen Einflüsse von IL-17A zu erfassen muss an dieser Stelle auf seine Rolle in gesunden Individuen sowie seine Beziehung zu den Domänen des angeborenen und erworbenen Immunsystems eingegangen werden:

Das angeborene Immunsystem wird vorrangig durch Monozyten bzw. Makrophagen, dendritische Zellen und Granulozyten repräsentiert, die auf ›pathogen-associated molecular patterns‹ (PAMPs) reagieren, indem sie körperfremdes Material eliminieren und Antigene prozessieren, transportieren und den Lymphozyten präsentieren. Die Hauptakteure des erworbenen Immunsystems, B- und T-Lymphozyten, reagieren ihrerseits auf hochspezifische Antigene mit klonaler Expansion [192]. Die hauptsächlichen Produzenten von IL-17A sind die in **Abschnitt 2.6.1** beschriebenen T_H17-Zellen, die zur erworbenen Abwehr zählen. Jedoch konnte gezeigt werden, dass IL-17A zusätzlich von einer Reihe von Immunzellen des angeborenen Systems (z. B. $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten, natürlichen Killerzellen (NK cell), ›invariant natural killer T cells‹ (iNKT) und ›type 3 innate lymphoid cells‹ (ILC3s)) [36] (**Abb. 7: B**) produziert wird, die vorrangig in der Haut, der Darmmukosa und der Lunge zu finden sind und wichtige Funktionen der schnellen unspezifischen Abwehr von infektiösen Erregern vermitteln [36]. Das Zytokin ist außerdem an der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und weiteren inflammatorischen Reaktionen der angeborenen schnellen Abwehrreaktion beteiligt [36, 192]. Somit bildet IL-17A eine Brücke zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem [192].

2.6.2.2 IL-17-Rezeptoren und IL-17A-Signalling

Die vielseitigen Effekte des IL-17A sind weiterhin von Struktur, Funktion und Verteilung seiner Rezeptoren abhängig (**Abb. 7: C**):

Die Familie der IL-17-Rezeptoren (IL-17R) hat fünf Mitglieder (IL-17RA, IL-17RB,

IL-17RC, IL-17RD und IL-17RE). IL-17RA bildet Heterodimere mit den anderen Untereinheiten, um die Signaltransduktion durch IL-17-Zytokine zu ermöglichen [98]. Im Folgenden werden lediglich IL-17RA und IL-17RC besprochen, da sie mit IL-17A (und IL-17F) interagieren und somit die größte Relevanz für diese Arbeit haben. IL-17RA wird ubiquitär exprimiert, während IL-17RC hauptsächlich auf nicht-hämatopoetischen Zellen zu finden ist [55]. Da die Zytokine IL-17A und IL-17F ihre Signale obligat durch Kontakt mit dem IL-17RA/IL-17RC-Heterodimer vermitteln, ist davon auszugehen, dass sie vorrangig an nicht-hämatopoetischen Zellen wirken (**Abb. 7: C**) [6, 55]. Per definitionem enthalten die IL-17R den zytoplasmatischen Anteil SEFIR (>similar expression of fibroblast growth factor and IL-17R<). Zudem benötigen alle IL-17-abhängigen Signalwege die Präsenz von Act1, einem membrannahen Adapter-Protein, das mit dem IL-17RA/IL-17RC-Komplex interagiert, um proinflammatorische Genexpressionen zu ermöglichen [6, 154].

Die so durch IL-17A provozierte proinflammatorische Genexpression wird konsekutiv über eine de novo Transkription oder über die Stabilisierung von schon bestehenden mRNA-Transkripten der Zielproteine erzielt [6]. Erstmals wurde der entzündungsfördernde Charakter von IL-17A in Fibroblasten identifiziert, in welchen der Botenstoff den Transkriptionsfaktor NF- κ B (>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells<) und NF- κ B-abhängige Zytokine aktivierte [6, 53, 146]. Weiterhin induziert die Präsenz von IL-17A in Fibroblasten eine Reihe von profibrotischen Vorgängen [118]. In jüngeren Arbeiten konnte schließlich ein genetisches Kernprofil von IL-17 (**Abb. 7: D**) herausgearbeitet werden, das die Expression proinflammatorischer Zytokine (IL-6, IL-1, G-CSF, GM-CSF und TNF), Chemokine (CXCL1, CXCL2, CXCL5, CCL2, CCL7, CCL20 und IL-8), Kollagene, antimikrobieller Peptide (β -Defensine, S100 Proteine und lipocalin 2 (24p3)) und Matrix-Metalloproteinasen (MMPs: MMP1, MMP3, MMP9 und MMP13) umfasst [6, 135].

Zu den wichtigsten Zielzellen von IL-17A, das heißt solchen, die das IL-17RA/IL-17RC-Heterodimer exprimieren, zählen Endothelzellen, Fibroblasten, Epithelzellen, Keratinozyten und Makrophagen (**Abb. 7: C**) [98].

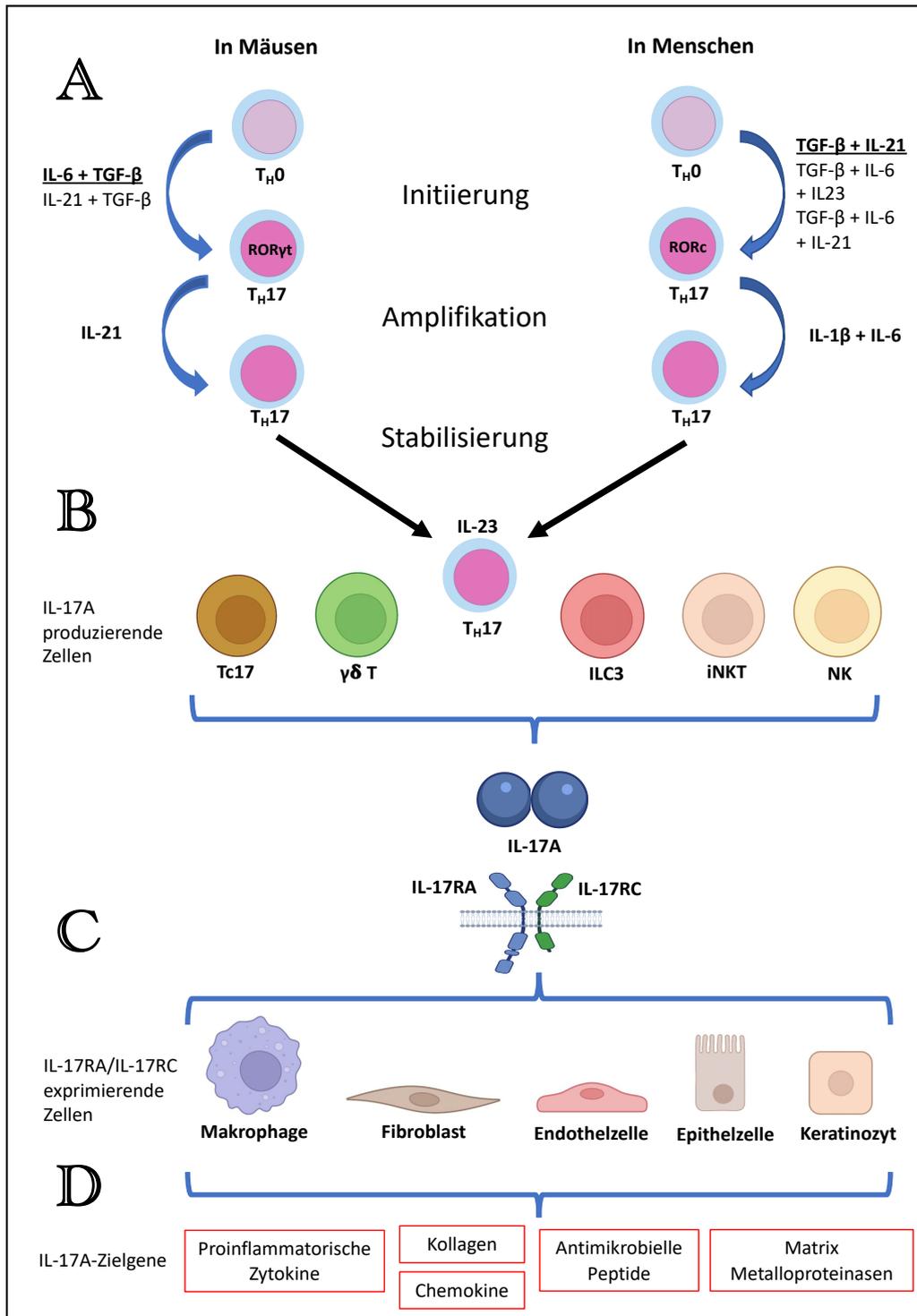


Abbildung 7: Die Differenzierung von T_H17-Zellen und das Netzwerk um IL-17A (Modifiziert nach [98, 132]; Erzeugt mit BioRender.com)

A: Differenzierung naiver CD4⁺ Zellen in T_H17-Zellen.

B: Die wichtigsten IL-17A-produzierenden Zellen.

C: Zellen, die das IL-17RA/IL-17RC-Heterodimer exprimieren und mit IL-17A interagieren.

D: Gruppen von Zielgenen, die durch den Einfluss von IL-17A vermehrt exprimiert werden.

Abkürzungen: IL = Interleukin; IL-17R = IL-17-Rezeptor (A/C); T_H0 = naive T-Helfer-Zelle; T_H17 = IL-17 produzierende T-Helfer-Zelle; TGF- β = Transforming Growth Factor- β .

2.6.3 IL-17A in Pathologien der kardioresalen Achse

Wie bereits in **Abschnitt 2.6** angedeutet, ist der Botenstoff IL-17A auf mannigfaltige Weise an der Genese und Progression von kardioresalen Pathologien beteiligt (**Abb. 8**) [33, 124]. Im Hinblick auf den thematischen Rahmen dieser Arbeit soll im Folgenden auf die Beziehung von IL-17A zu den Konditionen der arteriellen Hypertonie (**Abschnitt 2.1**) und CKD (**Abschnitt 2.2**) sowie auf die, mit letzterer einhergehenden renalen und kardialen Endorganschäden (**Abschnitt 2.3**), eingegangen werden:

In den vergangenen Jahren erschien eine Fülle von Forschungsarbeiten, die eine Schlüsselrolle des Immunsystems für die Regulation des Blutdrucks und die Modulation hypertensiver Zustände attestieren [124]. In diesem Zusammenhang war IL-17A eines der ersten Zytokine, dessen Beziehung zu Bluthochdruck identifiziert und beforscht wurde [112, 124]. Unterdessen konnten einige Mechanismen identifiziert werden, die Erklärungsansätze für den Einfluss von IL-17A auf die Entstehung bzw. Persistenz der arteriellen Hypertonie (**Abb. 8: A**) liefern:

In einem Mausmodell konnte gezeigt werden, dass IL-17A den Blutdruck über die Aktivierung des RhoA/Rho-Kinase-Pathways erhöht, der letztlich zu einer verringerten Freisetzung von Kohlenstoffmonoxid (NO) und somit zu endothelialer Dysfunktion führt [124, 130]. Außerdem reguliert IL-17A die Menge und Aktivität renaler Natriumtransporter, und wirkt auf diese Weise einer funktionierenden Drucknatriurese (**Siehe: »Efferente sympathische Aktivität«, Abschnitt 2.5.2**) entgegen [124, 133]. Interessanterweise scheint die Hypertension außerdem in einem reziproken Verhältnis zu IL-17A zu stehen, wodurch sich ein Teufelskreis ergibt: Sowohl erhöhte ATII-Spiegel [199] als auch gesteigertes Natriumchlorid (NaCl) im Serum [83] (beides häufige Bedingungen der arteriellen Hypertonie und CKD) erhöhen das Vorkommen von IL-17A bzw. T_H17-Zellen [123], die ihrerseits zur Aufrechterhaltung des Bluthochdrucks beitragen (**Abb. 8: A**) [133].

Zugleich konnten zahlreiche experimentelle und klinische Studien das enge Verhältnis von IL-17A und Nierenschädigung (**Abb. 8: B**) aufzeigen. So konnte eine Studie an Mäusen die wichtige, wennauch von T_H17-Zellen unabhängige, Rolle von IL-17A in akuter, durch Cisplatin provozierte, Nierenschädigung zeigen [24]. Ebenso erwies sich IL-17A im murinen Modell als Vermittler einer glomerulären Schädigung (**Siehe: Abb. 3: A**) durch Calcineurin-Inhibitoren (Cyclosporin A, Tacrolimus) [26]. Eine Arbeit an männlichen Sprague-Dawley-Ratten (**Siehe: Abschnitt 3.1.1**) ermittelte zudem, dass T_H17-Zellen und IL-17A die, durch salzintensive Diät induzierte, Progression einer akuten Nierenschädigung zu einer CKD förderten [123]. Die gleiche Studie konnte außerdem einen

Zusammenhang zwischen erhöhter Aktivität des Angiotensin-II-R vom Typ 1 (AT1-R) durch Angiotensin-II-Bindung und gesteigerter IL-17A-Produktion durch T-Zellen demonstrieren [123]. Im klinischen Bereich ließ sich im Rahmen von CKD insbesondere ein dysreguliertes immunologisches Profil von T-Lymphozyten beobachten. So nahm bei Patienten im Nierenversagen die Zahl der T_H17-Zellen deutlich zu, während die Zahl der naiven T-Zellen [29] sowie der regulatorischen T-Zellen (T_{REGs}) [194] signifikant abnahm.

T_{REGs} erfüllen antiinflammatorische Funktionen und wirken autoimmuner Entwicklungen durch die Sekretion von IL-10 und TGF- β entgegen. Sie fungieren somit gewissermaßen als Gegenspieler der T_H17-Zellen und machen das T_H17/T_{REGs}-Gleichgewicht zu einer entscheidenden Variable in inflammatorischen Prozessen der erworbenen Immunität [88, 132].

In **Abschnitt 2.3** wurden einzelne Charakteristika des Phänotyps der CKD en detail besprochen, namentlich die renale und kardiale Fibrose sowie das linksventrikuläre Remodeling. Was ist nun also über den Einfluss von IL-17A auf diese pathologischen Veränderungen bekannt?

In experimentellen Tiermodellen konnte vielfach und konkordant gezeigt werden, dass IL-17A profibrotische Eigenschaften aufweist. Das Zytokin fördert z. B. eine durch Bleomycin induzierte, pulmonale Fibrose [182] sowie eine hepatische Fibrose, via Aktivierung von hepatischen Sternzellen [165]. Auch in der Genese der renalen Fibrose kommt IL-17A eine Schlüsselrolle zu (**Abb. 8: C**). In einem Mausmodell mit obstruktiver Nephropathie wurde nachgewiesen, dass IL-17A-produzierende Zellen (hauptsächlich $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten, aber auch T_H17-Zellen) die Fibrogenese vorantreiben, indem sie mittels IL-17A die Produktion des Chemokins RANTES (\rightarrow regulated on activation, normal T cell expressed and secreted/CCL5 \leftarrow) in CD3⁺-T-Zellen provozieren, durch dessen Einfluss Makrophagen und weitere T-Zellen die Niere infiltrieren [136, 142]. Diese angelockten Zellen produzieren wiederum Zytokine (z. B. TGF- β , galectin-3 und IL-36) [142, 162], welche die Aktivierung und Proliferation von Myofibroblasten sowie die Produktion von ECM induzieren (**Siehe: Abschnitt 2.3.1.1**) [142]. Desweiteren ist IL-17A in der Lage Fibrose über Interaktionen mit nicht-hämatopoetischen Zellen, wie Fibroblasten und Epithelzellen (**Siehe: Abb. 7: C**), zu promovieren [118]:

Beispielsweise konnte eine Studie zu kardialer Fibrose (**Abb. 8: D**) zeigen, dass IL-17A über einen PKC β /Erk1/2/NF- κ B-abhängigen Signalweg (\rightarrow protein kinase C/extracellular signal-regulated kinase1/2/NF- κ B \leftarrow) die Produktion der Kollagene vom Typ III und I (**Siehe: Abschnitt 4.1.3**), in murinen neonatalen kardialen Fibroblasten (CFs), induzierte

[105]. In einem Rattenmodell von Isoproterenol-induzierter Herzinsuffizienz wurde weiterhin gezeigt, dass IL-17A eine kardiale Fibrose mit Col1- und Col3-Ablagerungen über Modulierung des MMP/TIMP-Systems (MMPs/ tissue inhibitors of metalloproteinases) fördert [7, 50].

Neben den profibrotischen Einflüssen die IL-17A auf das Myokard nimmt, konnte die Beteiligung von IL-17A an strukturellen und funktionellen Veränderungen des linken Ventrikels (**Abb. 8: E**), sowohl nach Myokardinfarkt [190, 195] als auch im Rahmen der inflammatorischen dilatativen Kardiomyopathie [188] nachgewiesen werden. Die beobachteten Veränderungen umfassten jeweils eine durch IL-17A unterstützte Dilatation des linken Ventrikels, die durch ein Zusammenspiel proapoptotischer und inflammatorischer Effekte des Botenstoffs hervorgerufen wurde [190, 195]. Der Zusammenhang von IL-17A und der, vorrangig durch linksventrikuläre Hypertrophie geprägten, urämischen Kardiomyopathie im Rahmen der CKD (**Siehe: Abschnitt 2.3.2**) ist bislang nicht untersucht.

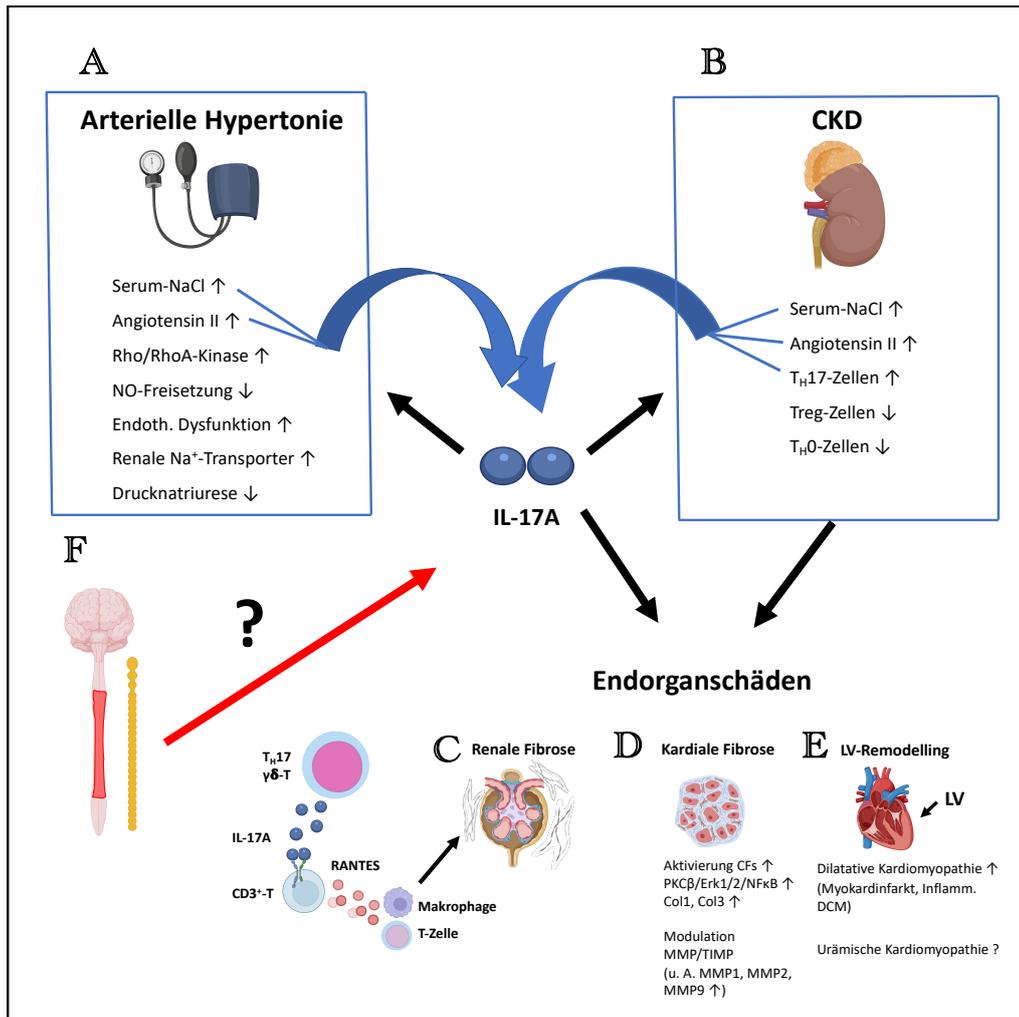


Abbildung 8: Die Beziehung von IL-17 zu kardirenenalen Pathologien (Erzeugt mit BioRender.com)

A: Beziehung von IL-17A zur arteriellen Hypertonie.

B: Beziehung von IL-17A zur CKD.

C: Einfluss von IL-17A auf die renale Fibrogenese. (Modifiziert nach [142])

D: Einfluss von IL-17A auf die kardiale Fibrogenese.

E: Einfluss von IL-17A auf das LV-Remodeling.

F: Inwiefern unterliegt IL-17A einer Regulation durch das sympathische Nervensystem?

Abkürzungen: CFs = Kardiale Fibroblasten; DCM = Dilatative Kardiomyopathie; IL = Interleukin; MMP/TIMP = Matrix-Metalloproteinasen/tissue Inhibitors of metalloproteinases; PKCβ/Erk1/2/NF-κB = >protein kinase C/extracellular signal-regulated kinase 1/2/NF-κB<-Signalweg; RANTES = >Regulated on Activation Normal T Cell Expressed and Secreted< / CCL5; T_H0 = naive T-Helfer-Zelle; T_H17 = IL-17 produzierende T-Helfer-Zelle; γδ-T = γδ-T-Lymphozyt.

2.7 Fragestellung

Das sympathische Nervensystem, insbesondere die renale sympathische Aktivität, nimmt eine zentrale Rolle in der Genese und in der kardioresalen Organmanifestation der CKD ein. Es gibt zunehmende Evidenz dafür, dass IL-17A und T_H17-Zellen ebenfalls wichtige Vermittler dieser Pathologien darstellen. Jedoch ist wenig darüber bekannt, ob und inwiefern eine sympathische Überaktivität Einfluss auf die IL-17A-Produktion und den IL-17A-Haushalt bzw. die T_H17-Differenzierung und die daraus resultierenden Endorganschäden im Rahmen der CKD nimmt (**Abb. 8: F**).

Die vorliegende Arbeit beleuchtet die Effekte einer Modulation des sympathoadrenergen Systems mittels RDN auf die Produktion und die renale Ausscheidung von IL-17A sowie auf die kardioresalen Endorganschäden bei chronischer Niereninsuffizienz. Hierfür dienen Ratten als Modell, die durch eine spezielle Adenin-Diät eine langsam progrediente, sekundäre Niereninsuffizienz entwickeln. Sie weisen durch herabgesetzte Nierenfunktion, kardioresalen Gewebeumbau und eine gesteigerte renale Inflammation einen Phänotyp auf, der jenem einer humanen CKD sehr nahekommt und sich demgemäß eignet, um zugrundeliegende Mechanismen dieser Erkrankung zu untersuchen.

Konkret werden drei Gruppen von Ratten untersucht: eine Gruppe mit CKD (Adenin-Gruppe), eine Gruppe mit CKD und RDN nach 4 Wochen (Adenin-RDN-Gruppe) und die gesunden Ratten (Kontrollgruppe). Die Analyse der Endorganschäden umfasst eine wiederholte Blutdruckmessungen, eine viermalige Echokardiographie (nach 0, 4, 10 und 16 Wochen), inklusive Evaluation der linksventrikulären Masse und diastolischen Funktion, sowie eine histologische Auswertung der kardioresalen Fibrose. Weiterhin werden Proteinanalysen (Western-Blots) von adrenerg stimulierten Splenozyten, Kardiomyoblasten, verschiedenen Geweben (LV, Niere), Blutplasma und Urin durchgeführt, um den jeweiligen IL-17A-Gehalt zu ermitteln. Schließlich dient eine IL-17A/CD3-Co-Immunofluoreszenzfärbung (von LV und Niere) dazu, weiterführende Informationen über die Herkunft und Verteilung von IL-17A und T_H17-Zellen im Gewebe zu sammeln.

Der Vergleich dieser Parameter unter Tieren mit und ohne CKD sowie nierenkranken Tieren mit und ohne sympathikolytische Intervention (RDN) lässt Rückschlüsse auf die Wechselwirkungen im Trigonum von sympathischer Aktivität, IL-17A und Endorganschäden der CKD zu.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 CKD-Rattenmodell mit Adenin-induzierter Nephropathie

3.1.1.1 Studienprotokoll

Über einen Zeitraum von 16 Wochen erhielten 10 männliche Ratten ein mit 0,25 % Adenin angereichertes Futter. Die 4 Ratten der Kontrollgruppe (ebenfalls männlich) wurden mit Standardfutter (standard diet No. 1320; Altonium, Lage, Deutschland) ernährt. Nach 4 Wochen wurde die Hälfte der mit Adenin gefütterten Tiere (n = 5) in operativer Technik beidseitig renal denerviert (Adenin-RDN-Gruppe). Die restliche Rattenpopulation wurde einer Scheinoperation unterzogen (Adenin-Gruppe und Kontrollgruppe) (**Abb. 9: A**). Vor Beginn der Adenin-Fütterung, nach 4 Wochen, direkt vor RDN, sowie nach 10 und 16 Wochen wurden alle Ratten echokardiographisch evaluiert. Schließlich wurden die Tiere nach Ablauf der 16 Wochen geopfert. Hierbei wurden für histologische und laborchemische Methoden u. a. Milzen, Herzen und Nieren sowie eine finale kardiale Blutprobe und Urinprobe der Tiere gewonnen. Da ein Tier in jeder Gruppe bereits vor Ablauf der 16 Wochen verstarb, weisen die auf Gewebe basierenden Daten in **Kapitel 4** mitunter eine geringere n-Zahl auf als das Studienprotokoll vorsah.

3.1.1.2 Versuchstiere und Tierhaltung

Die Population der verwendeten Versuchstiere schloss 14 männliche Sprague-Dawley-Ratten (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) im Alter von 10 Wochen ein. Gehalten wurden diese während des 16-wöchigen Untersuchungszeitraums im Versuchstierstall des Instituts für klinisch-experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes. Die Haltung erfolgte unter kontrollierten, pathogenfreien Bedingungen in Standardkäfigen mit 12-stündlich wechselndem Hell-Dunkel-Rhythmus. Die Zuführung von Nahrung und Leitungswasser erfolgte ad libitum. Weiterhin wurden die Luftfeuchtigkeit und Temperatur konstant bei 60 % bzw. $21\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ gehalten. Die versuchsgruppenspezifische Fütterung der Ratten mit 0,25 % Adeninfutter erfolgte durch Teammitglieder

des kardiologischen Forschungslabors des Universitätsklinikums des Saarlandes. Die durchgeführten Experimente waren stets kongruent mit dem deutschen Tierschutzgesetz und den Bestimmungen der Nationalen Leitlinien für Pflege und Nutzung von Labortieren. Jedem Experiment ging die Genehmigung durch das saarländische Landesamt für Verbraucherschutz (Aktenzeichen: 35/2017) voraus.

3.1.1.3 Induktion der Nephropathie durch Adenin-Fütterung

Adenin ist eine Purinbase, die in ausreichender Dosierung als Induktor einer sekundären CKD im Tiermodell dienen kann. Eine Gabe von Futter mit einem Adenin-Anteil von 0,25 % für 16 Wochen bedingt eine chronische Einschränkung der Nierenfunktion [46]. Untersuchungen legen nahe, dass folgende zwei Mechanismen ursächlich an diesem Effekt beteiligt sind:

Zum einen reagiert Adenin mit 5-Phosphoribosyl-1 α -pyrophosphat zu Adenosin-5'-monophosphat und Pyrophosphat. Dieser ›Salvage-Pathway‹ dient der erneuten Nutzung von Purinbasen und wird durch das Enzym Adenin-Phosphoribosyltransferase katalysiert [13]. Im Falle einer übermäßigen Adeninzufuhr wie in der vorliegenden Studie kommt es zur Substratsättigung dieses Enzyms und überschüssiges Adenin wird von der Xanthindehydrogenase oxidiert. Das hierbei entstehende 2,8-Dihydroxyadenin ist ein gering löslicher Metabolit, der renal eliminiert wird. Bei der Eliminierung entstehen Präzipitate im renalen Tubulointerstitium, die eine Nierenschädigung bedingen.

Zum anderen metabolisiert das Enzym Xanthinoxidase Adenin und andere Purinbasen zu Harnsäure [198]. Bei Adenin-gefütterten Ratten konnte ein Anstieg des plasmatischen Harnsäurespiegels nachgewiesen werden [46]. Erhöhte plasmatische Harnsäurespiegel stellen im menschlichen Organismus einen Risikofaktor für Niereninsuffizienz [22] und kardiovaskuläre Erkrankungen [56] dar, was gesteigerte Harnsäureproduktion als einen Induktor renaler und kardialer Pathologien im Tiermodell wahrscheinlich macht. Dieser Verdacht wird dadurch gestützt, dass Diwan et al. [46] die renalen und kardialen Folgen der Adenin-Diät mit Allopurinol, einem Xanthinoxidase-Inhibitor, teilweise rückgängig machen konnten.

Histologisch nachweisliche, renale Veränderungen in beschriebenem Modell der renalen Kristallopathie umfassen tubuläre Dilatation und Atrophie, milde Glomerulosklerose, glomeruläre Hypertrophie, interstitielle Fibrose und eine vermehrte, chronische Infiltration mit inflammatorischen Zellen [46]. Laborchemisch imponieren ein Anstieg von Blut-Harnstoff-Stickstoff (BUN) und Plasma-Kreatinin [157] sowie eine Abnahme der Clearance beider Stoffe [183].

Über den gesamten 16-wöchigen Untersuchungszeitraum wurde keine CKD-bedingte Mortalität beobachtet. Weiterhin zeigte sich trotz Progression der Nephropathie eine Gewichtszunahme, eine Steigerung der Trinkmenge und eine nur langsam abnehmende Nahrungsaufnahme. Außerdem wurden die strukturellen renalen Veränderungen langsamer und milder apparent als bei einem 0,75 % Adeninanteil des Futters [46], was vereinbarer mit der Imitation einer Genese der CKD im Menschen ist. Zeitlich entspricht die Dauer der Adenindiät (16 Wochen) 8 menschlichen Lebensjahren [153], was der Nachahmung der langsam progredienten CKD im Menschen entspricht [45].

3.1.1.4 Renale Denervation

Die renale sympathische Denervation (**Abb. 9: B**) als operativer Eingriff wurde an den 5 Tieren der Adenin-RDN-Gruppe durchgeführt. Zeitpunkt des Eingriffs war das Ende der vierten Woche der 0,25 % Adenin-Diät. Die Narkoseeinleitung- und Aufrechterhaltung wurde mit dem Inhalationsanästhetikum Isofluran durchgeführt. Mithilfe des Isofluranverneblers »Fluovac System Harvard Apparatus« (Harvard Apparatus, Holliston, USA) lässt sich ein Gemisch aus den Gasen Sauerstoff und Isofluran produzieren. Hierbei erlaubt das System eine manuelle Einstellung des Isofluran-Anteils sowie die Neutralisierung des, durch Leakagen der Versuchstiermasken entweichenden, Isoflurans mithilfe von Aktivkohlefiltern. Zur Narkoseeinleitung wurden die Tiere in eine verschließbare Kunststoffbox gesetzt, in welcher sie mit 5 Vol.-% Isofluran betäubt wurden. Intraoperativ erhielten die Tiere dann über eine Versuchstiermaske kontinuierlich Isofluranlevel zwischen 1,5 Vol.-% und 2,5 Vol.-%. Um die Augen der Ratten vor Sicca-Schäden zu schützen, wurde jeweils eine Schicht »Bepanthen®« Augen- und Nasensalbe (Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) aufgetragen.

Als operativer Zugang wurde eine mediane Laparotomie durchgeführt, die eine beidseitige Darstellung der renalen Hilusgefäße ermöglicht. Die Destruktion der perivaskulär gelegenen sympathischen Nervenfasern erfolgte mechanisch und chemisch durch Freilegung der Tunica Advaentitia und Benetzung der freigelegten Nierenarterie, zum Zweck der chemischen Destruktion, für 10-15 min mit einer 20 % Phenol/Ethanol-Lösung [101]. Die beschriebene Technik führt bei Ratten im Experiment regelmäßig zu einer deutlichen Reduktion der renalen sympathischen Aktivität.

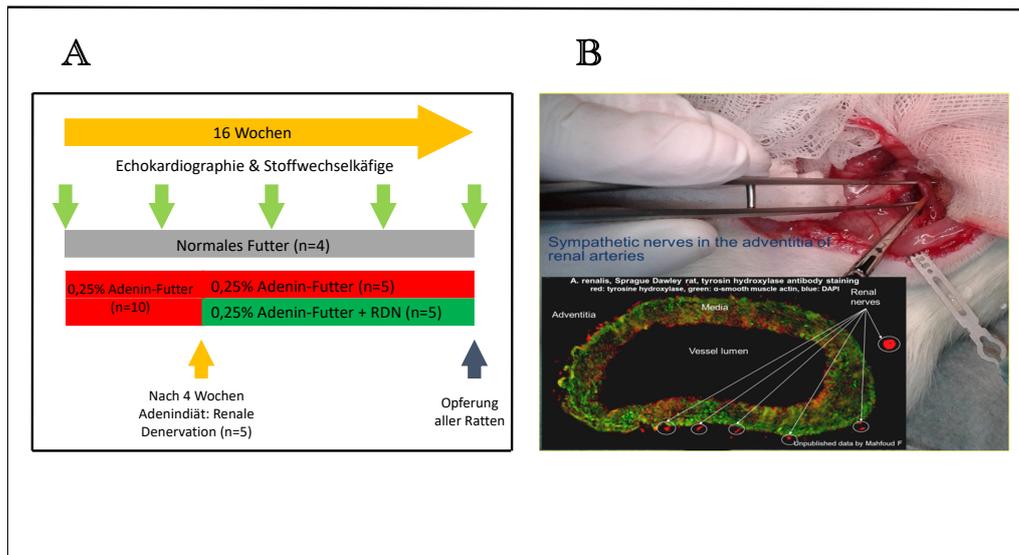


Abbildung 9: Studienprotokoll und RDN.

A: Schematische Darstellung des Studienprotokolls.

B: Bild einer RDN bei der Ratte mit immunhistochemischer Markierung sympathischer renaler Nervenfasern [91].

3.1.2 Geräte, Software und Material (inkl. Substanzen und Lösungen)

Gerät/Software/Material	Hersteller
Acrylamid/Bis Solution, 30 %	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules
Ammoniumpersulfat(APS)	SERVA Electrophoresis
Aprotinin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Aqua Ad iniectabilia	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Ampuva	Fresenius
Aqua destillata (Aqua dest.)	
Bepanthen® Augen- und Nasensalbe	Bayer AG, Leverkusen, Deutschland, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
CGP-20712A	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Dimethylarsinsäure (C ₂ H ₇ AsO ₂)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Dithioerthiol (DTT)	Qiagen, Hilden
Dulbecco's Modified Eagle Medium	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
ECL Prime Western Blotting Nachweisreagenz	GE Healthcare GmbH, Solingen
Entellan	Merck, Darmstadt
Entwickler G 153 A	Agfa, Mortsel, Belgien
Entwickler G 153 B	Agfa, Mortsel, Belgien
Essigsäure (Eisessig), 100 %	Merck, Darmstadt
Ethanol	VWR International GmbH, Darmstadt
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Fetal Bovine Serum (FKS)	Gibco-Life Technologies GmbH, Karlsruhe
Glycerin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Glycin	Fluka
ICI-118551	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Isoproterenol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

3.1. MATERIAL

Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (H ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid (KOH)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Leupeptin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Magermilchpulver	TSI GmbH und Co. KG, Zeven
Methanol	VWR International GmbH, Darmstadt
Mounting Medium Vectaschild©	Vector Laboratories, San Francisco
N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin (TE-MED)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Natriumacetat (C ₂ H ₃ NaO ₂)	Merck, Darmstadt
Natriumazid (NaN ₃)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Natriumbicarbonat (Na ₂ CO ₃)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS), 10 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Paraffin	
Penicillin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), 0,1 mM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Picrosiriusrot	Morphisto GmbH, Frankfurt am Main
Ponceau S Solution for Electrophoresis, 0,2 %	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat (Tween 20)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Protein Assay Reagent A	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules (USA)
Protein Assay Reagent B	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules (USA)
Salzsäure (HCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Streptomycin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Thiomersal	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS), 1 M pH 8,8	VWR International GmbH, Darmstadt
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS), 1 M pH 6,8	VWR International GmbH, Darmstadt
Triton X-100 Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Trypsin, 2,5 %	Gibco-Life Technologies GmbH, Darmstadt
Western Blocking Solution	Roche, Mannheim
Xylol	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde
Zinkchlorid (ZnCl ₂)	Merck, Darmstadt
Amersham Hyperfilm ECL (Größe 12.7 × 17.8 cm)	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Analysenwaage ABS 120-4	Kern und Sohn GmbH, Balingen
Aprotinin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
BP-2000 Series II Blood Pressure Analysis System	Visitech Systems
CanoScan LIDE 90	Canon Deutschland GmbH, Krefeld
CK2 inverted Microscope	Olympus, Hamburg
Deckgläser	VWR International GmbH, Darmstadt
DU 730 UV/Vis Spectrophotometer	Beckman Coulter GmbH, Krefeld

Elektrophoresekammer Mini PROTEAN® Tetra cell	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules (USA)
Entwicklungsmaschine Curix 60	Agfa, Mortsel, Belgien
Extra Thick Blot Filter Paper, vorgeschritten, 7.5 x 10 cm	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules (USA)
Falcon® Conical Centrifuge Tubes, 15 ml, 50 ml	Becton Dickinson, N.J., USA
Tiefkühlschrank	Liebherr, Bulle, Schweiz
Gel Casting Module Mini-Protean Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules (USA)
Glass Plates	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules (USA)
Heracell™ 150i CO ₂ -Inkubator	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Image Studio Light 4. 0 Software	LI-COR Biotechnology, Lincoln USA
Isofluranvernebler „Fluovac System Harvard Apparatus“	Harvard Apparatus, Holliston, USA
4F-Katheter „HSE Stimulator P Typ 201“	Hugo Sachs Elektronik, March
Kühlzentrifuge Centri Napco 2019R	Thermo Fisher Scientific, Waltham Massachusetts USA
Magnetrührer M 6.1	Ingenieurbüro CAT, M. Zipperer GmbH, Staufen
Lucia G Software	Nikon GmbH, Düsseldorf
Mikroskopsystem Eclipse Ti-S/L100	Nikon GmbH, Düsseldorf
Objektträger	Gerhard Menzel B.V. & Co. KG, Braunschweig
pH-Elektrode SenTix 22	WTW, Weilheim
pH-Meter, Eutech Instruments, pH 510 Centrifuge Galaxy 16DH	VWR, Darmstadt
UV-Küvetten	Sarstedt AG und Co., Nümbrecht
Pipettierhilfe pipetus®	Hirschmann Laborgeräte GmbH und Co. KG, Eberstadt
Pipettenspitzen, 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Plattformschüttler Polymax 1040, 10° Neigungswinkel	Heidolph Instruments GmbH und Co.KG, Schwabach
PowerPac HC power supply	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules (USA)
Reagiergefäß, 0,5 ml, 1,0 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	Sarstedt AG und Co., Nümbrecht
SevenCompact S220-Basic, pH/Ionen-Tischmessgerät	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Sonifier Modell 250 CE	Branson Ultrasonics, Danbury, USA
Pipetten, 5 ml, 10 ml, 15 ml, 25 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Sicherheitswerkbank Safe 2020 (Klasse II)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts USA
Thermomixer R	Eppendorf AG, Hamburg
Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer cell	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules (USA)
Transferpipetten, 6 ml	Sarstedt AG und Co., Nümbrecht
Vortex Mixer VV3	VWR International GmbH, Darmstadt
Zellkulturschalen (87 mm Innendurchmesser)	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturtestplatten, 6 Wells	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz

Tabelle 1: Geräte, Software und Material (inkl. Substanzen und Lösungen)

3.1. MATERIAL

3.1.3 Biochemisches Material

3.1.3.1 Antikörper

Spezifität	Spezies/Isotyp	Verdünnung	Hersteller
Primärantikörper für Western-Blot			
IL-17A	Rabbit/polyklonal	1:1000	Abcam (ab9565)
GAPDH	Mouse/monoklonal	1:1000	Merck-KGaA (G8795)
Col1	Goat/polyklonal	1:1000	Southern Biotech (1310-01)
Primärantikörper für IL-17/CD3-Co-Immunofärbung			
CD3	Mouse/IgM	1:500 (BSA+PBS)	Invitrogen (MA1-80469)
IL-17A	Rabbit/IgG	1:100 (BSA+SSC)	Abcam
Sekundärantikörper			
Maus-IgM	Donkey/IgG	1:50 (PBS+Tween)	Dianova (715-025-140)
Rabbit-IgG	Donkey/polyklonal	1:50 (SSC+Tween)	Dianova (711-095-152)

Tabelle 2: Liste der in den Versuchen verwendeten Antikörper

3.1.3.2 Lösungen für die Zellkultur

Lösung	Zusammensetzung	Hinweise
Hypotonic Buffer	0,25 M EDTA 0,5 ml, 0,1 M MgCl ₂ 0,625 ml, 0,25 M Tris base 2,5 ml	Auf 125 ml mit Aqua dest. auffüllen. Für Gebrauch: Aprotinin 2,9 µl; Leupeptin 1 µl; PMSF 10 µl in 1 ml Hypotonic Buffer geben
RPMI-Hungermedium	RPMI 1640 Medium, Penicillin (100 µg/ml), Streptomycin (100 µg/ml)	Vor Gebrauch im Wasserbad auf 37 °C erwärmen
RPMI-Nährmedium	RPMI 1640 Medium, Penicillin (100 µg/ml), Streptomycin (100 µg/ml) Fetales Kälberserum (10 %)	Vor Gebrauch im Wasserbad auf 37 °C erwärmen
Extraktionspuffer	Aqua dest. 500 ml, 20 mM CaCl ₂ ·2H ₂ O 1,47 g, 10 mM Cacodylic acid 0,8 g, 150 mM NaCl 4,4 g, 1,5 mM NaN ₃ 48,8 mg, 0,01 % Triton X-100 50 µl, 1 µM ZnCl ₂ 68,2 µg	pH auf 5,0 einstellen

Tabelle 3: Lösungen für die Zellkultur

3.1.3.3 Lösungen und Puffer für die Westernblot-Analyse

Lösung	Zusammensetzung	Hinweise
Trenngel für SDS-PAGE: 10 %	30 % Acrylamid/Bis Solution 3,3 ml, 10 % Ammoniumpersulfat 100 µl, Aqua dest. 4 ml, 10 % SDS 100 µl, TEMED 4 µl, 1,5 M Tris (pH 8.8) 2,5 ml	
Trenngel für SDS-PAGE: 12 %	Acrylamid/Bis Solution (30 %) 4 ml, Aqua dest. 3,3 ml, 1,5 M Tris (pH 8.8) 2,5 ml, 10 % SDS 100 µl 10 % Ammoniumpersulfat 100 µl, TEMED 4 µl	
Sammelgel für SDS-PAGE: 5 %	Acrylamid/Bis Solution (30 %) 330 µl, Ammoniumpersulfat (10 %) 20 µl, Aqua dest. 1,4 ml, SDS (10 %) 20 µl, TEMED 2 µl, 1,5 M Tris (pH 6.8) 0,13 ml	
10 x Elektrophoresepuffer	Aqua dest. 5000 ml, Glycin 720 g, SDS 50 g, TRIS 151,5 g	Auf 5000 ml mit Aqua dest. auffüllen, für Elektrophorese mit Aqua dest. im Verhältnis 1:10 verdünnen
Transferpuffer für Westernblot	Aqua dest. 1000 ml, Glycin 14,5 g, Methanol 200 ml, TRIS 2,9 g,	Aqua dest. vorlegen, Substanzen hinzufügen, Methanol hinzugeben, pH einstellen auf 8,3, Auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen
10 x PBS	Aqua dest. 1000 ml, KCl 2 g, KH ₂ PO ₄ 2,4 g, NaCl 80 g, Na ₂ HPO ₄ 14,4 g	Aqua dest. vorlegen, Substanzen hinzufügen pH auf 7,4 einstellen, Auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen
10 x PBS	Aqua dest. Nr. 2	10 min
10 x PBS-T	Aqua dest. 1000 ml, KCl 2 g, KH ₂ PO ₄ 2,4 g, NaCl 80 g, Na ₂ HPO ₄ 14,4 g, Tween® 20 10 ml	Aqua dest. vorlegen, Substanzen hinzufügen, pH mit KOH auf 7,4 einstellen, Auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen.
Stripping-Puffer	Aqua dest. 67,5 ml, 0,7 % β-Mercaptoethanol 800 µl, 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8) 12,5ml, SDS (10 %) 20 ml	

Ammoniumpersulfat (10 %)	Ammoniumpersulfat 1 g, Aqua dest. 10 ml	Auf 10 ml mit Aqua dest. auffüllen, Lagern bei 4 °C
Hypotonic Buffer für Wes- ternblot	Aqua dest. 125 ml, 0,25 M EDTA (pH 8) 500 µl, MgCl ₂ (0,1 M) 625 µl, TRIS (0,25 M) 2,5 ml	pH auf 7,6 einstellen, Auf 125 ml mit Aqua dest. auffüllen
Lysepuffer für Westernblot	Aprotinin 0,29 µl, Hypotonic Buffer 1 ml, Leupeptin 1 µl, PMSF 1 µl	
Milch (2 %)	Magermilchpulver 500 mg, 1 x PBS-T 25 ml	
Milch (5 %)	Magermilchpulver 2,5 g, 1 x PBS-T 50 ml	
PMSF (1 M)	Ethanol (100 %) 10 ml, PMSF 1,742 g	Lagern bei 4 °C
SDS (10 %)	Aqua dest. 250 ml, SDS 25 mg	
TRIS (1,5 M)	Aqua dest. 500 ml, TRIS 90,85 g	pH auf 6,8 einstellen

Tabelle 4: Lösungen und Puffer für die Western-Blot-Analyse

3.2 Methoden

3.2.1 Echokardiographie

Die echokardiographische Evaluation aller 14 Versuchstiere erfolgte zu Beginn des Untersuchungszeitraums (>Baseline<), nach 4 Wochen vor den Eingriffen (>pre-RDN<) nach 10 und nach 16 Wochen. Mindestens 1 h vor Beginn der Untersuchung wurden die Ratten in sachgerechten Transportboxen in das kardiologische Forschungslabor der Inneren Medizin III des Universitätsklinikums des Saarlandes überführt. Um eine Gewöhnung an die Umgebung zu gewährleisten, wurden die Tiere dort in Käfige umgesetzt. Nach verstreichen der Akklimatisierungszeit wurde das Gewicht der Ratten bestimmt und eine Isofluran-Narkose nach beschriebener Technik durchgeführt. Hierunter zeigte sich stets eine uneingeschränkte Spontanatmung. Im nächsten Schritt wurde das Bauch- und Brustfell der Ratten mit einer veterinären Langhaarschneidemaschine (Aesculap, GT416) entfernt und Resthaarstoppen mit Epilierungscreme entfernt. Zur Gewährleistung einer stabilen Rückenlage wurden die Tiere auf einer kippbaren Unterlage mit Klebestreifen an den Extremitäten fixiert. Nach Aufbringen des Ultraschallgels wurde folgender Untersuchungsalgorithmus, mithilfe eines GE-Ultraschallgerätes (General Electrics, Logic S6) und zugehörigem Linearschallkopf (11 Megahertz), angewandt: Zunächst wurde eine lan-

ge parasternale Achse (PLAX) des Rattenherzens eingestellt. In dieser Achse wurde ein bewegtes Bild zur visuellen Beurteilung der linkskardialen Funktion aufgenommen. Dazu wurden in Enddiastole und Endsystole Bilder im B-Mode (brightness-mode) festgehalten. Die Bilder dienten zur Messung des Diameters der anteroseptalen- und Hinterwand des linken Ventrikels (endsystolisch und enddiastolisch im M-Mode (motion-mode)), des linksventrikulären Durchmessers in der parasternalen langen Herzachse, der endokardialen und epikardialen linksventrikulären Fläche sowie des links- und rechtsatrialen Durchmessers. Als Nächstes wurde in der kurzen parasternalen Achse (PSAX) ein bewegtes Bild und ein B-Mode-Bild in der Aortenklappenebene aufgenommen. In dieser Einstellung wurde die maximale Geschwindigkeit über der Pulmonalklappe der Tiere mit dem PW-Doppler ($\text{Pulsed-Wave-Doppler}$) ermittelt. Konsekutiv erfolgte ein Wechsel in die Papillarmuskelebene, in welcher, erneut in Endsystole und Enddiastole, die endokardiale und epikardiale Fläche des linken Ventrikels gemessen wurde. Schließlich wurde der apikale 4-Kammer-Blick (A4C) eingestellt. In dieser Achse wurde, neben bewegten Bildern, das E/A-Verhältnis (E/A-Ratio) mithilfe des PW-Doppler über der Mitralklappe ermittelt.

3.2.1.1 E/A-Verhältnis (E/A-Ratio)

Die E/A-Ratio ist ein echokardiographisch ermittelter Wert, der das Verhältnis der maximalen frühdiastolischen transmitralen Blutflussgeschwindigkeit (E oder höchster Punkt der E-Welle) zu derjenigen der späten Diastole (A oder höchster Punkt der A-Welle) anzeigt (**Siehe: Abb. 17**). Sie ist, nach aktuellen Leitlinien, ein wichtiger Bestandteil der Evaluation linksventrikulärer diastolischer Funktion [125, 129]. Die Bedeutung dieses transmitralen Flussprofils ergibt sich u. a. aus der Annahme, dass es Hinweise auf Relaxation und Compliance des linken Ventrikels liefert [169]. Die untersuchten Komponenten (E und A) ergeben sich wie folgt aus der Physiologie des Herzzyklus: Nach dem Schluss der Aortenklappe beginnt die isovolumetrische Entspannungsphase, in welcher der Druck im linken Ventrikel ab dem Punkt des schnellsten Druckabfalls in einer exponentielle Kurve in Richtung Null-Asymptote abnimmt [125, 179]. Die Mitralklappe öffnet sich sobald der linksventrikuläre Druck unter den linksatrialen Druck fällt und es folgt die frühe passive Füllung des linken Ventrikels (E-Welle). E korreliert hierbei signifikant mit dem linksatrialen Druck und dem systolischen linksventrikulären Druck [27]. Die aktive späte Füllung des linken Ventrikels (A-Welle) wird schließlich durch die Kontraktion des linken Vorhofs bedingt [125].

3.2.2 Blutdruckmessung: Tail-Cuff-Methode

Die Tail-Cuff-Methode ist eine Methode zur Blutdruckmessung von Mäusen und Ratten. Das für diese Arbeit verwendete Gerät (BP-2000 Blood Pressure Analysis System Series II) macht sich die Technik der Transmissionsbodyplethysmographie zunutze. Bei besagter Technik wird rotes Licht auf eine Seite des Rattenschwanzes ausgestrahlt, während auf der gegenüberliegenden Seite der nicht vom Gewebe absorbierte Anteil des Lichts detektiert wird. Dieser Anteil dient schließlich als Variable zur Bestimmung von Herzfrequenz und Blutdruck. Um eine exakte Messung zu gewährleisten, werden die Versuchstiere für den Zeitraum der Messung in eine enge Kammer platziert, die an der Rückseite eine Auslassung für den Schwanz bietet (**Abb. 13: C**). Der Schwanz wird in die Messvorrichtung gelegt und mit einem Streifen medizinischen Klebebands gesichert. Sobald die Tiere sich in korrekter Position befinden werden multiple Messungen vorgenommen, bis die Analysesoftware (BP-2000 Analysis Software) das Vorliegen valider Werte anzeigt. Schließlich lassen sich die Werte des DBP und SBP sowie der Herzfrequenz zur Auswertung digital in Microsoft Excel übertragen.

Da diese Prozedur für die Tiere mit Stress verbunden ist, sind vor und nach der Messung mehrere Minuten zur Akklimatisierung an die Raumbedingungen vorgesehen. Für die Endzeitpunkt-Auswertung wurden die Messwerte der letzten 3 Termine herangezogen. Die Tail-Cuff-Messung wurde über die ganze Projektdauer von 16 Wochen durchgeführt 2 mal wöchentlich und sogar 2 Wochen vor Beginn der Adenin-Fütterung gestartet, um die Tiere an die Prozedur zu gewöhnen und artifiziell hohe Blutdruck- und Herzfrequenz-Werte zu vermeiden.

3.2.3 Histologische Analysen

3.2.3.1 Probeneinbettung zur histologischen Untersuchung

Die für die histologische Analyse vorgesehenen Nierenparenchym- und Myokard- und Milzproben wurden in 0,4 % Formalin gelagert, bevor sie in Paraffin eingegossen wurden. Daraufhin wurde der Paraffinblock bei -20 °C gekühlt und in das Mikrotom eingespannt (LEICA, RM2255). Um die histologischen Schnitte zu fertigen, wurden zunächst das überständige Paraffin sowie die ersten 2 mm des jeweiligen Organs abgetragen. Nun wurden pro Organ 5 Präparate mit einer Dicke von 5 µm geschnitten und zum Ausglätten in ein Wasserbad gelegt. Schließlich wurden die Proben auf Objektträger überführt und auf einem Heizblock getrocknet.

3.2.3.2 Pikrosiriusrot-Färbung

3.2.3.2.1 Theoretische Grundlagen

Die Pikrosiriusrot-Färbung ist eine Methode, mit der sich Kollagenfibrillen der Typen I, II und III im Gewebe anfärben lassen [74]. Der stark saure Farbstoff besteht aus 6 Sulfonsäuregruppen und 4 chromophoren Azofarbstoffgruppen, und weist eine lineare Struktur auf [74, 93]. Mit Pikrosiriusrot lassen sich, aufgrund seines hohen Extinktionskoeffizienten, schon kleine fibrotische Areale erkennen und somit eine genaue Quantifizierung von Fibrose in Geweben erzielen [74, 93]. Dabei gehen die sauren Sulfonsäure-Gruppen der Farbstoffmoleküle in Bindung mit den basischen Aminosäuren des Kollagens [74]. Hierdurch kommt es zur parallelen Anlagerung des Farbstoffs zur Längsachse der Kollagenmoleküle, was zur Verstärkung der natürlichen Doppelbrechung des Kollagens führt [74]. Durch ein Lichtmikroskop betrachtet erscheinen fibrotische Areale rot und das fibrosefreie Gewebe gelb [180].

3.2.3.2.2 Durchführung

Zunächst wurden die Gewebeschnitte von Myokard des linken und rechten Ventrikels und der Nieren entparaffiniert und mit einer absteigenden Alkoholreihe hydriert. Im nächsten Schritt wurde die Färbung mittels 60-minütiger Inkubation in 0,1 % »Sirius-Red-Picric-Acid« (Picro-Sirius-Red F3BA in Picric Acid saturated 100 ml) durchgeführt. Schließlich wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und mit Entellan (Schnell-Eindeckmittel, Merck/Darmstadt) eingedeckt, um mechanischen Schutz und optimale Mikroskopierbedingungen zu schaffen.

Protokoll der Pikrosiriusrot-Färbung

Entparaffinierung	Xylol Nr. 1	10 min
	Xylol Nr. 2	10 min
	Xylol Nr. 3	10 min
Hydratation	100 % Isopropanol	5 min
	90 % Isopropanol	5 min
	70 % Isopropanol	5 min
Waschen	Aqua dest. Nr. 1	5 min
	Aqua dest. Nr. 2	10 min
Färbung	0,1 % Picrosiriusrot-Lösung	60 min

Waschen	Aqua dest. Nr. 1	Kurz spülen
	Aqua dest. Nr. 2	Kurz spülen
	70 % Isopropanol	Kurz spülen
Dehydration	90 % Isopropanol	2 min
	100 % Isopropanol	2 min
Klären	Xylol Nr. 1	3 min
	Xylol Nr. 2	3 min
	Xylol Nr. 3	3 min
Eindecken	Entellan	

Tabelle 5: Protokoll der Pikrosiriusrot-Färbung

3.2.3.2.3 Auswertung

Für die Auswertung wurden die mit Pikrosiriusrot gefärbten Schnitte bei 10-facher Vergrößerung lichtmikroskopisch (Nikon ECLIPSE E600) betrachtet und fotografiert (Nikon DS-Ri 1). Zur Analyse und Quantifizierung der interstitiellen Kollagenfibrillen wurde die Digital Software Lucia G (Nikon, Düsseldorf, Germany) verwendet. Pro Versuchstier wurden jeweils 40 repräsentative Bilder des renalen Gewebes und 30 repräsentative Bilder des LV-Myokards aufgenommen. Die Auswertung des Kollagengehaltes im Gewebe erfolgte kolorimetrisch, wobei ein ein Unterschied von 12 µg Kollagen einer 1,2-fachen Zunahme der erfassten Farbintensität entspricht. Damit aussagekräftige Ergebnisse zu den organ-spezifischen Fibrose-Leveln ermittelt werden konnten, wurden die Nieren (**Abb. 20**) ohne Berücksichtigung der vaskulären Fibrose, das heißt der Fibrose des arteriellen Systems, und der Fibrose der Nierenkapsel ausgewertet (Interstitielle Fibrose). Hierfür wurden die renale Kapsel und die Arterien, inklusive perivaskulärem Gewebe (Intima, Media und Advaentitia), digital aus den Bildern entfernt. Um eine korrekte Quantifizierung zu gewährleisten, wurde die Intensität des Hintergrunds vom IOD-Wert (integrated optical density) subtrahiert. Die Daten wurden schließlich als fraktioneller kollagenhaltiger Bereich in % von myokardialem bzw. renalem Gewebe dargestellt.

3.2.3.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

3.2.3.3.1 Theoretische Grundlagen

Bei der Hämatoxylin-Eosin-Färbung handelt es sich um eine weit verbreitete histologische Standardfärbung, die in erster Linie als Übersichtsfärbung dient. Sie erlaubt die

Differenzierung verschiedener Gewebe und kann erste Hinweise auf Pathologien im untersuchten Gewebe liefern [185]. Die beiden namensgebenden Farbstoffe Hämatoxylin und Eosin werden hierzu in folgender Weise eingesetzt: Die Methode beginnt mit der Verarbeitung von Hämatoxylin, einem aus dem Blauholzbaum gewonnenen Farbstoff. Vor der Anwendung muss dieser zu Hämatein oxidiert werden [171]. Anschließend werden Aluminiumionen hinzugefügt, wodurch Hämalaunlösung entsteht. In der Hämalaunlösung präzipitieren in saurem Milieu Metall-Hämatein-Komplexe [185], die an basophile Strukturen im Gewebe binden und diese rot färben. Die nun rot angefärbten Präparate werden daraufhin beim sogenannten ›Bläuen‹ mit Leitungswasser oder speziellen Puffern gespült, um den pH-Wert auf einen Zielwert > 3 zu erhöhen. Hierdurch ergibt sich eine Farbumschlag zu Blauviolett. Ferner lässt sich die Löslichkeit der Hämalaunlösung durch ein Anheben des pH-Wert verringern, mit dem Ergebnis einer Farbfixierung. Die vergleichsweise basophilen Zellkerne und endoplasmatischen Retikula erscheinen nun blau [24]. Der zweite Farbstoff ist das Eosin (0,5 % wässrige Eosin-G-Lösung), eine synthetische, negativ geladene, saure Substanz. Seines sauren Charakters entsprechend färbt Eosin alle azidophilen Strukturen im Gewebe rötlich, beispielsweise Proteine des Zytoplasmas, glatte endoplasmatische Retikula und Mitochondrien [24]. Die Begriffe ›azidophil‹ und ›eosinophil‹ werden in diesem Zusammenhang häufig synonym verwendet.

3.2.3.3.2 Durchführung

Die Milz-Gewebeschnitte wurden entparaffiniert. Konsekutiv wurde zunächst eine Rehydratation mittels aufsteigender Alkoholreihe durchgeführt. Es folgten die erste Färbung mit Hämatoxylin nach Ehrlich und das Bläuen unter fließendem Leitungswasser. Der zweite Teil der Färbung umfasste die Behandlung der Schnitte mit wässriger Eosin-Lösung und eine Dehydrierung in absteigender Alkoholreihe. Abschließend wurden die Präparate mit einer Xylolreihe geklärt und mit Entellan eingedeckt.

Protokoll der Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Entparaffinierung	Xylol Nr. 1	10 min
	Xylol Nr. 2	10 min
	Xylol Nr. 3	10 min
Rehydrierung	100 % Isopropanol	5 min
	90 % Isopropanol	5 min
	70 % Isopropanol	5 min

Waschen	Aqua dest.	5 min
Färbung	Hämatoxylin nach Ehrlich	10 min
	Unter fließendem Aqua dest. spülen	2min
	Mikroskopieren zur Kontrolle	
	HCL-Alkohol	
	Mikroskopieren zur Kontrolle	
	Aqua dest.	
Bläuen	Fließendes Leitungswasser	15 min
	Aqua dest.	
Gegenfärbung	Eosin	15 s
	Aqua dest.	
Dehydrierung	90 % Isopropanol	2 min
	100 % Isopropanol	2 min
Klären	Xylol Nr. 1	3 min
	Xylol Nr. 2	3 min
	Xylol Nr. 3	3 min
Eindecken	Entellan	

Tabelle 6: Protokoll der Hämatoxylin-Eosin-Färbung

3.2.4 Western-Blot-Analyse

3.2.4.1 Probengewinnung & Präparation des Gesamthomogenats

3.2.4.1.1 Gewebe

Unmittelbar nach der Organentnahme aus den Ratten der Versuchspopulation wurden die für die Western-Blot-Analyse vorgesehenen Gewebe-, Plasma- und Urinproben in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C konserviert. Zur Herstellung des Gesamthomogenats wurden repräsentative Teile der entnommenen Organe mit einem Skalpell abgetrennt (**Abb. 10: A1**). Die etwa kichererbsengroßen Organanteile wurden in diesem Zuge sowohl für die Herstellung der histologischen Schnitte wie auch für die Western-Blot-Analyse gewonnen, wobei stets auf Eis gearbeitet wurde. Weiterhin wurden die Proben in Reagiergefäße gegeben, indes die für die Western-Blot-Analyse bestimmten Gewebeanteile mit Extraktionspuffer versetzt und auf Eis gepottert wurden (**Abb. 10: A2**). Das Verhältnis von Probenmasse zu Extraktionspuffer folgte hierbei der

folgenden Formel: Masse der Probe in g x 5 = benötigte Menge Extraktionspuffer in ml. Schließlich wurde eine weitere Homogenisierung der Gewebe mittels Ultraschall durchgeführt (**Abb. 10: A3**).

3.2.4.2 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Proteinbestimmung nach Lowry et al. (1951) [109] (**Abb. 10: B**) ist eine Methode, mit welcher kolorimetrisch die Proteinkonzentration in Gesamthomogenaten bestimmt werden kann. In einem ersten Schritt wird hierbei in alkalischer Lösung ein Komplex zwischen Kupfer(II)-Ionen und den Peptidbindungen der Proteine gebildet. Anschließend wird ein Phosphomolybdat-Phosphowolfram-Reagens (Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagens) hinzugefügt, welches von dem Kupfer-Protein-Komplex reduziert wird. Dieser Prozess führt zu einer Blaufärbung, die in ihrer Intensität von der in der Probe enthaltenen Proteinkonzentration abhängt [109].

Um mithilfe dieser Blaufärbung die Kolometrie durchzuführen, wurde das »Detergent Compatible Kit« (DC protein assay, Bio-Rad, München) in folgender Weise verwendet: 18 µl Extraktionspuffer, 100 µl BioRad Reagent A (1 ml A + 20 µl S-Lösung) und 800 µl BioRad Reagent B wurden mit 2 µl des zu analysierenden Homogenats gemischt (**Abb. 10: B1**). 20 µl Extraktionspuffer fungierten als Blankoprobe. Es schloss sich eine 15-minütige Inkubation der Lösung bei Raumtemperatur (RT) an.

Die Lösung wurde schließlich in einer Plastikkuvette im Photometer platziert. Es folgte eine zweifache Messung der Absorption bei 750 nm (**Abb. 10: B2**). Als Referenz im Konzentrationsbereich zwischen 100-1000 µg diente eine Lösung aus Rinderserumalbumin.

3.2.4.3 SDS-Gelelektrophorese

Im Rahmen der Natrium(Natrium)-dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (**Abb. 10: C**) werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Hierfür wurden zunächst die Gesamthomogenate bzw. Urin-, Plasmaproben und Zellkulturüberstände (**Siehe: Abschnitte 4.2.1 und 4.2.2**), gemäß der Proteinbestimmung, mit »Hypotonic Buffer« und Ladepuffer versetzt und gegebenenfalls für 5 min bei 95 °C erhitzt (**Siehe Abschnitt 3.1.3.3**). Für die Untersuchung der Homogenate der Nierenparenchym- und Myokardproben wurde eine ausgewählte Probe als interne Ladekontrolle verwendet. Vorbereitend wurden ein Trenngel und ein Sammelgel nach dem Protokoll in **Abschnitt 3.1.3.3** angesetzt. Das Trenngel wurde zwischen die Glasscheiben gegeben, wo es nach ca. 25 Minuten in eine polymerisierte, feste Form überging. Weiterhin wurde das Sammelgel darüber geschichtet und ein Plastikamm eingesteckt, der die Proben-

schen präformierte (**Abb. 10: C1**). Das fertige Polyacrylamid-Gel wurde schließlich in die Elektrophorese-Apparatur eingespannt, die mit Elektrophoresepuffer befüllt wurde (**Abb. 10: C3**). Schließlich wurde das Trenngel gemeinsam mit Dithiothreitol (DTT), einem stark reduzierendes Reagens, was die Bildung von Disulfidbrücken zwischen den Proteinen verhindert, für 5 min bei 95 °C erhitzt.

Es folgte das Pipettieren der Proben (25-50 µg/Slot) in die präformierten Geltaschen (**Abb. 10: C2**), wobei der erste Slot mit einem Molekulargewichtsstandard versehen wurde. Sukzessive wurden die Proteine, durch Anlegen einer Spannung von 80 Volt (V) während der Sammelphase und 100 V während der Trennphase, nach ihrem Molekulargewicht separiert (**Abb. 10: C3**). Die gesamte SDS-PAGE dauerte zwischen 90 und 120 min.

3.2.4.4 Immunoblotting

Nach Abschluss der Gelelektrophorese folgte die Übertragung der Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran (PROTAN Nitrocellulose Transfer Membrane Pore size 0,2 µm, Schleicher & Schuell GmbH, Dassel). Dies wurde mithilfe der ›semi-dry electrophoretic blotting‹-Technik (0,8 Milliampere (mA)/cm²) erzielt, die auf der Wanderung negativ geladener Proteine zur Anode basiert (**Abb. 10: D1**).

Zunächst wurden die Nitrocellulose-Membran, das Gel und ein Filterpapier mit Transferpuffer versehen und nach dem Sandwich-Prinzip in die Blotting-Apparatur (BIO-RAD Trans-Blot Semi-DRY Transfer Cell) geschichtet, wobei die Membran proximal zur Anode lag. Der 45-minütige Transfer erfolgt unter einem Gleichstrom von 200 mA.

Um den Erfolg der Übertragung zu kontrollieren und den jeweiligen Proteingehalt abzuschätzen, wurde die Membran für 1 min mit Ponceau-Rot inkubiert und mit Aqua dest. abgespült.

Zur Vermeidung von Bindungen der Primäntikörper an unspezifische Proteinbindungsstellen wurde die Membran für mindestens 1 h auf einem Schüttler mit Blocker-Lösung (1 % Western Blocking Reagent, angesetzt mit PBS-T) überschichtet.

Die Nitrocellulose-Membran wurde über Nacht mit dem mit PBS-T verdünnten Primäntikörper (siehe **Abschnitt 3.1.3.1**) bei 4 °C unter kontinuierlicher Rotationsbewegung inkubiert (**Abb. 10: D2**). Am nächsten Tag wurde die Membran durch vierfaches Waschen in 1 x PBS-T (2 x 5 min, 2 x 10 min) von ungebundenen Antikörpern befreit.

Danach wurde der Sekundäntikörper mit 5 % Magermilch in PBS-T verdünnt und auf die Membran appliziert (**Abb. 10: D2**). Nach einer einstündigen Inkubation bei RT wurde

die Membran erneut gewaschen (2 x 5 min, 2 x 10 min in 1 x PBS-T, 1 x 10 min in PBS). Um die jeweiligen Zielproteine sichtbar zu machen, wurde das ›enhanced chemiluminescence reagent‹ (ECL) (Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg) für 1 min dünn auf die Membran aufgebracht (**Abb. 10: D3**).

Die Acridinium-Ester des ECL reagieren mit der an den Sekundärantikörper gebundenen Peroxidase, wobei eine detektierbare Chemilumineszenz entsteht. Diese Lumineszenz schwärzt schließlich einen Röntgenfilm (Hyperfilm MP, Amersham Pharmacia Europe GmbH, Freiburg) im Bereich der mit Antikörper beladenen Banden und erlaubt eine quantitative Auswertung.

Da die Proteinbeladung anfällig für Abweichungen ist, muss für jedes Gel zusätzlich das Enzym Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Ladekontrolle ausgewertet werden. Zu diesem Zweck werden die Membranen von den Primär- und Sekundärantikörpern befreit (›Stripping‹) (bei 57 °C Inkubation in Stripping Buffer für 27 min, 2 x 5 min 2 x 10 min waschen in PBS-T, 2 x 5 min, 2 x 10 min waschen in PBS, 1 h blocken in Milch) und über Nacht mit einem GAPDH-Antikörper (siehe **Abschnitt 3.1.3.1**) inkubiert (**Abb. 10: D3**). Auf diese Weise lassen sich die zuvor bestimmten Werte relativ zur GAPDH-Menge normieren. Im Falle des Western-Blots zum IL-17A-Gehalt im Urin wurde stattdessen Kreatinin (Gerät zur Auswertung: Beckman Coulter, AU480) verwendet und im Falle des IL-17A-Plasmagehalts die Plasmaproteinkonzentration.

3.2.4.5 Auswertung

Die Quantifizierung der betreffenden Proteine erfolgte durch die Messung der jeweiligen Banden im Autoradiographen (**Abb. 10: D4**), mithilfe des Programms ›Image Quant Personal Densitometer‹ (Molecular Dynamics, Krefeld). In derselben Weise wurde die Normierung der Banden auf das Signal von GAPDH bzw. Kreatinin durchgeführt. Die Daten wurden als optische Dichtewerte (›integrated optical density‹ (IOD)) in Prozent einer Kontroll-Probe präsentiert.

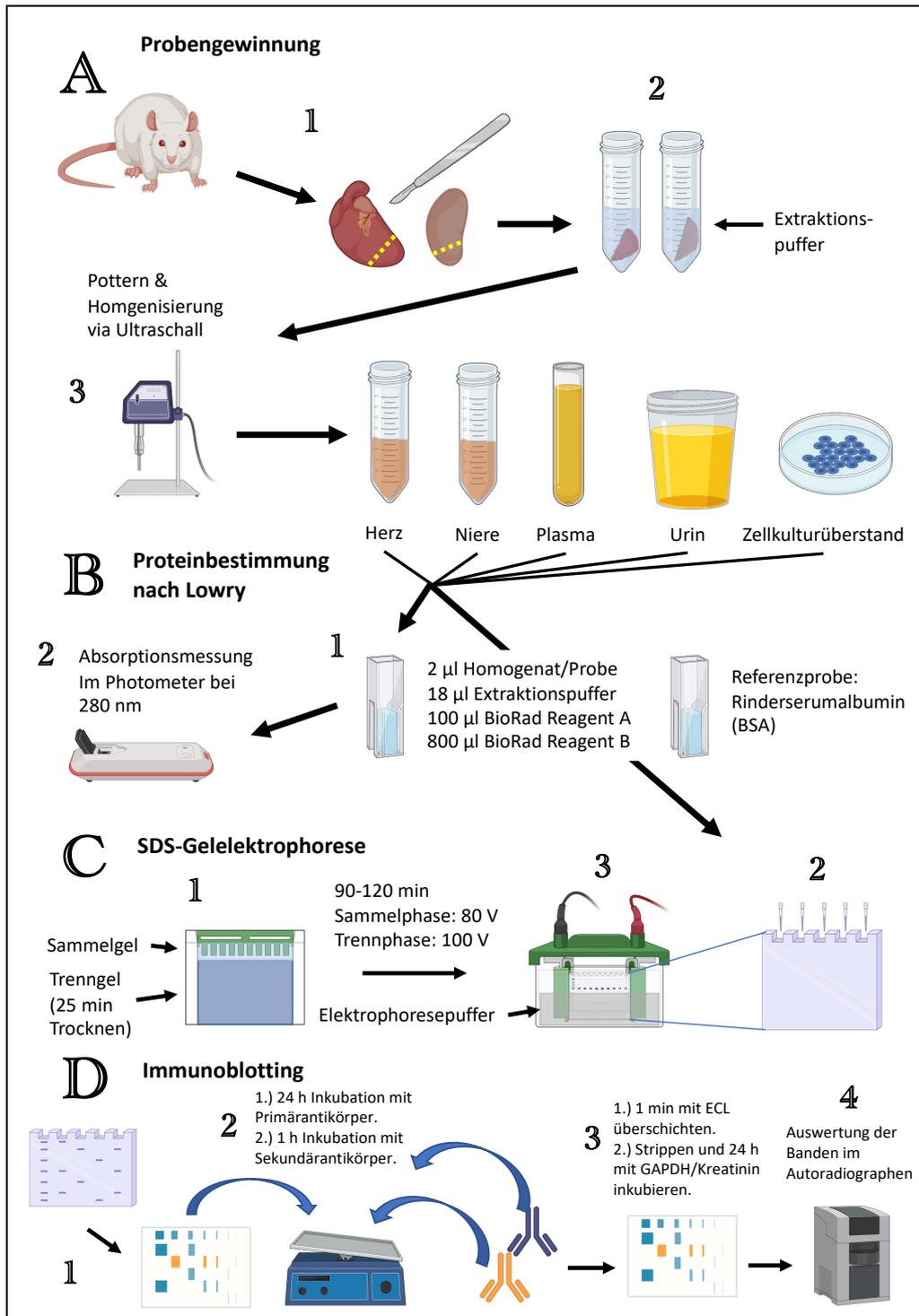


Abbildung 10: Western-Blot-Analyse von der Probengewinnung bis zur Auswertung. (Erzeugt mit BioRender.com)

A: Probengewinnung mit Präparation von kardialen und renalen Proben

B: Kolorimetrische Proteinbestimmung nach Lowry mittels Absorptionsmessung.

C: SDS-Gelelektrophorese mit (1) Einbringen von Trenngel und Sammelgel, (2) Pipettieren der jeweiligen Proben in die präformierten Geltaschen, (3) Auftrennen der Proteine nach Molekulargewicht durch Applikation elektrischer Spannung.

D: Prozess des Immunoblottings mit (1) Semi-dry electrophoretic blotting, (2) Inkubation der Nitrocellulose-Membran mit Primär- und Sekundärantikörper, (3) Chemilumineszenz-Markierung mit ECL und Normierung durch Inkubation mit GAPDH, (4) Darstellung der Banden im Autoradiographen.

3.2.5 Zellkultur

3.2.5.1 Isolation von mononukleären Zellen aus Milzen der Ratte

Die mononukleären Zellen (MNC = >mononuclear cells<) der 14 Ratten wurden aus den Milzen der Tiere gewonnen. Zu diesem Zweck wurden die Milzen wenige Sekunden nach der Organentnahme in ein mit 15 ml PBS-Lösung befülltes Falcon überführt. Das Organ wurde anschließend in eine Petrischale mit 5 ml Milzpuffer (Lücke: Hier bitte Zusammensetzung eintragen) gelegt und mit chirurgischem Werkzeug zerkleinert (**Abb. 11: A**). Daraufhin wurden die so gelösten Milzbestandteile durch einen Filter in ein mit 10 ml PBS und 15 ml Milzpuffer befülltes Falcon pipettiert. Die so entstandene Lösung wurde mittels Stabpipette sorgfältig durchmischt. Schließlich wurden 15 ml Ficolllösung in einem zweiten Falcon mit der soeben hergestellten Milz-Lösung überschichtet (**Abb. 11: B**). Es folgte eine 20 minütige Zentrifugation (**Abb. 11: C**) (Gerät: Megafuge 1.0 R, Heraeus Group, Hanau Germany) des 2-phasigen Inhalts bei 2400 rpm (>rotations per minute<). Hiernach wurde die nunmehr visuell abgrenzbare MNC-Schicht mittels Pipette abgesaugt und in einem weiteren Zentrifugationsschritt (10 min, 2400 rpm) mit 50 ml PBS-Lösung gewaschen. Es entstand ein Zellpellet am Boden des Falcons, was mit 5 ml PBS-Lösung resuspendiert wurde, bevor die beschriebene Waschung ein drittes Mal durchgeführt wurde. Schließlich wurde der PBS-Überstand entfernt und das Zell-Pellet konnte zur späteren Weiterverwendung eingefroren werden (**Abb. 11: D**).

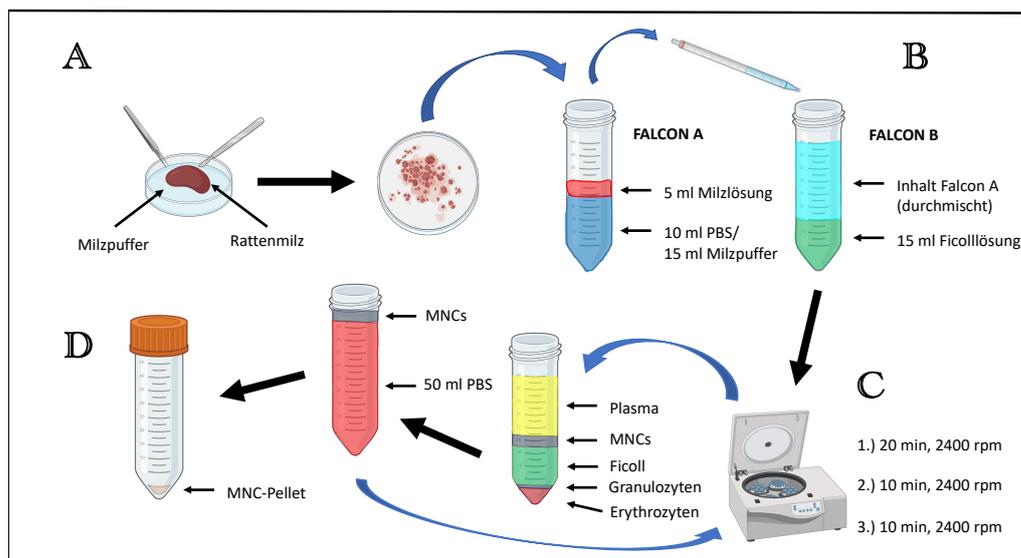


Abbildung 11: Isolation von mononukleären Zellen aus Milzen der Rattenpopulation.

A: Präparieren der Rattenmilz für die MNC/Splenozyten-Isolation.

B: Überschichten der Ficolllösung mit der Probenlösung mittels Stabpipette.

C: Zentrifugieren der Probe: 1.) Auftrennen der Milz-/Blutbestandteile 2.+3.) Waschen der MNC mit PBS.

D: MNC-Pellet bereit zum Einfrieren/Verarbeiten.

3.2.5.2 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mikroskopisch mittels Neubauer-Zählkammer. Hierfür wurden 5 µl der Zellsuspension (mononukleäres Zellpellet + 1 ml RPMI-Medium) mit 95 µl Türks-Solution (3,0 ml Eisessig + 1 ml 1 % Gentianaviolettlösung + 100 ml destilliertes Wasser) in einem Eppendorf-Gefäß gemischt. Diese Färbung ermöglicht es Leukozytenkerne blau anzufärben, während Erythrozyten und Thrombozyten lysiert werden.

3.2.5.3 Einfrieren und Auftauen von mononukleären Zellen

Zu den zuvor mit 1 ml RPMI-Medium resuspendierten Zellen wurden in einem zweiten Schritt mit einer Pipette weitere 800 µl des Mediums sowie 200 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) hinzugefügt. DMSO ist stark hygroskopisch, wodurch die Bildung von Eiskristallen während des Einfrierens unterbunden wird. Konsekutiv wurde die Zellsuspension in markierte Kryoröhrchen pipettiert und für 24 h bei -70 °C deponiert. Anschließend wurden die Röhrchen in einen Tank mit flüssigem Stickstoff (-196 °C) überführt. Eine Aufbewahrung bei dieser Temperatur ermöglicht eine längerfristige Lagerung und die Zellkultivierung nach dem Auftauen.

Zum Auftauen wurde das DMSO durch Mehrfachwaschung mit Vollmedium entfernt. Schließlich wurden die Zellen in Kultur genommen.

3.2.5.4 Allgemeine Bedingungen der Zellkultur für Splenozyten und H9c2-Zellen

Jegliche die Zellkultur betreffenden Tätigkeiten wurden stets unter einer Sterilbank durchgeführt. Zwischen den Anwendungen wurden die Kulturen in CO₂-Brutschränken bei 37 °C und 95 % O₂ / 5 % CO₂ inkubiert.

3.2.5.5 Stimulation von mononukleären Zellen aus Rattenmilzen (Splenozyten) und Kardiomyoblasten der H9c2-Zelllinie

3.2.5.5.1 Theoretische Grundlagen

Bei dem vorliegenden Versuch handelt es sich um ein in-vitro-Modell mit Western-Blot-Analyse (**Siehe: Abschnitt 3.2.4**), das zwei Fragen klären soll: (1) Führt eine sympathomimetische Stimulation von mononukleären Zellen bzw. H9c2-Kardiomyoblasten zum Effekt einer gesteigerten Freisetzung von IL-17A? (2) Ist dieser Effekt vermehrt durch β₁-Adrenozeptoren, β₂-Adrenozeptoren oder unselektiv vermittelt?

Die sympathomimetische Stimulation wurde mit dem β -adrenergen Agonisten Isoproterenol (ISO) durchgeführt. ISO, auch Isoprenalin genannt, ist ein synthetisches Katecholamin, welches erstmals in den späten 30er Jahren untersucht wurde und seine erste klinische Anwendung in der Behandlung von Asthma Bronchiale fand [3]. Es wirkt fast ausschließlich auf β -Adrenozeptoren, wobei seine Wirkung auf β 1- und β 2-Adrenozeptoren äquivalent ist. Durch seinen β 1-Agonismus hat Isoproterenol positiv chronotrope, dromotrope, inotrope und lusitrope Effekte auf das Herz, während sein β 2-Agonismus u. a. zur Relaxation von glatter Muskulatur in Arteriolen, Bronchien und Uterus führt [4].

Weiterhin exprimieren alle mononukleären Zellen des Blutes sowohl β 1- als auch β 2-Adrenozeptoren, was sie empfänglich für sympathoadrenerge Stimulation macht [121]. Um die Selektivität der untersuchten Effekte zu überprüfen, kamen zwei Adrenozeptor-Antagonisten zum Einsatz: Der hochspezifische β 2-Adrenozeptor-Antagonist ICI 118551 (ICI) [144] und der ebenfalls hochspezifische β 1-Adrenozeptor-Antagonist CGP-20712A (CGP) [47].

3.2.5.5.2 H9c2-Zelllinie (Kardiomyoblasten)

Die Kardiomyoblasten der H9c2-Zelllinie teilen zahlreiche Eigenschaften mit adulten Kardiomyozyten und erlauben somit die Untersuchung dieser Zellentität unter Kulturbedingungen. In der vorliegenden Arbeit dienen sie als Modell zur Erforschung des Zusammenhangs von sympathoadrenergen Stimuli und der Produktion von IL-17A durch Herzmuskelzellen. Die H9c2-Zelllinie wurde 1976 erstmalig von Kimes und Brandt kultiviert und beschrieben, die sie aus ventrikulärem Gewebe 13 Tage alter Rattenembryonen isolierten [81]. Es konnte nachgewiesen werden, dass die H9c2-Zellen moyokardtypische Eigenschaften der hormonellen und elektrischen Signaltransduktion besitzen. Insbesondere exprimieren sie einen an der Oberflächenmembran lokalisierten spannungsabhängigen L-Typ-Calciumkanal, der auf β -adrenerge Stimulation via Isoproterenol mit einer deutlichen Steigerung des Calciumeinstroms reagiert [69]. Weiterhin wurde festgestellt, dass sowohl der β 1- als auch β 2-Adrenozeptor auf der äußeren Plasmamembran der H9c2-Zellen verteilt ist [10], wodurch sie sich für den hier durchgeführten Versuch mit sympathoadrenerge Stimulation und Spezifitätsprüfung des für die resultierenden Effekte auf die IL-17A Produktion verantwortlichen Signalwegs (durch β 1 oder β 2-Adrenozeptor induziert) eignen.

3.2.5.5.3 Durchführung

Zur in-vitro-Stimulation wurden zunächst Splenozyten aus 12 Wochen alten, gesunden Sprague-Dawley-Ratten isoliert (**Siehe: Abschnitt 3.2.5.1**), eingefroren und am ersten Versuchstag, parallel zu den H9c2-Zellen, wieder aufgetaut (**Siehe: Abschnitt 3.2.5.3**). Die Kryoröhrchen mit den isolierten Zellen wurden in einem Wärmebad in Ethanol leicht angetaut und anschließend in ein Falcon mit 10 ml Nährmedium (RPMI 1640 + 10 % FKS) fallen gelassen (**Abb. 12: A**). Daraufhin wurde die Zellsuspension zentrifugiert (3 min, 900 rpm), sodass sich am Boden eine Zellpellet bildete. Der Mediumüberstand wurde in der Folge abgesaugt, bevor das Zellpellet mit weiteren 10 ml desselben Mediums resuspendiert und schließlich auf 6-Well-Platten ausgesät wurde (**Abb. 12: B**). Jedes Well wurde mit 1 ml Nährmedium befüllt. Nach 24 h Adhärenzzeit wurde das Nährmedium für 24 h mit Hungermedium ausgetauscht, bevor die Stimulationsexperimente in wiederum frischen Hungermedium begannen. In einem nächsten Schritt wurden jeweils 6 der insgesamt 25 Wells mit ICI bzw. CGP versetzt, bevor nach einer Latenz von 30 Minuten alle Wells, ausgenommen 7 Kontrollen, mit 1 µmol/l Isoproterenol versehen wurden (**Abb. 12: C**). Da Isoproterenol lichtempfindlich ist, wurde es stets bei relativer Dunkelheit angewandt. Die Gesamtstimulationsdauer betrug 72 h, wobei das Hungermedium alle 24 h ausgewechselt wurde und neu stimuliert wurde. Die Betablocker wurden stets 30 min vor der Isoproterenolzugabe verabreicht.

Nach 72 h wurde der Zellüberstand asserviert und zentrifugiert (3 min, 900 rpm), um verbliebene Splenozyten oder Kardiomyoblasten zu entfernen. Der so entstandene Überstand wurde schließlich in 1,5 ml Eppendorfer Reaktionsgefäße überführt (**Abb. 12: D**). In der Folge wurde der jeweilige Gehalt von IL-17A wie in **Abschnitt 3.2.4** beschrieben via Western-Blot-Verfahren ermittelt.

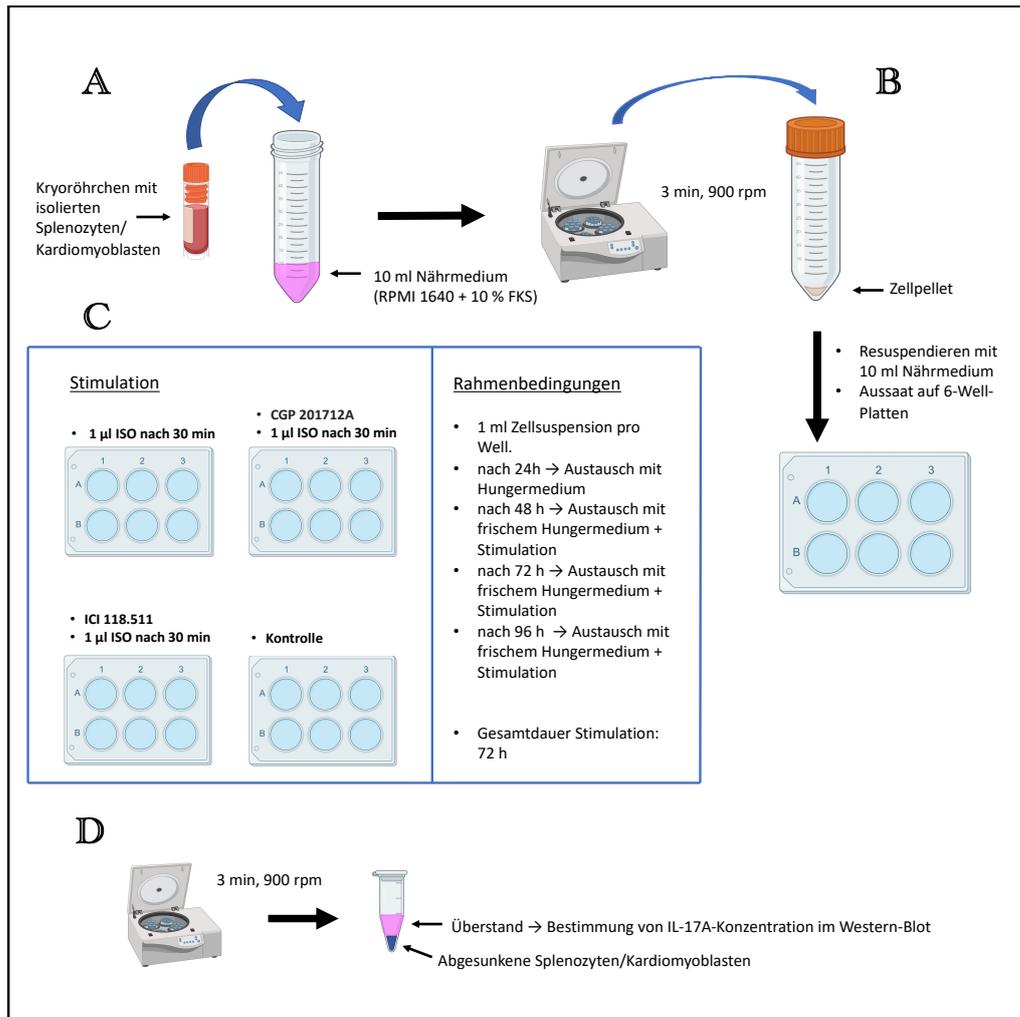


Abbildung 12: Stimulation von Splenozyten aus Rattenmilzen und H9c2-Zellen (Erzeugt mit BioRender.com)
A: Auftauen der Splenozyten und Gabe in Nährmedium.
B: Zentrifugation und Resuspendierung der Zellen.
C: Stimulation der Splenozyten mit dem sympathomimetischen β -Adrenorezeptor-Agonisten Isoproterenol und den β -Adrenorezeptorblockern ICI 115.881 (β 2-Adrenorezeptor-Blocker) und CGP-20712A (β 1-Adrenorezeptor-Blocker).
D: 24 h Inkubation und Zentrifugation, um den im Western-Blot-Verfahren auszuwertenden Zellkulturüberstand zu erzeugen.

3.2.6 IL-17A/CD3-Co-Immunofluoreszenzfärbung

3.2.6.1 Theoretische Grundlagen

Die IL-17A/CD3-Co-Immunofluoreszenzfärbung ermöglicht die Identifikation von freiem IL-17A, CD3⁺-T-Lymphozyten (CD3⁺-TLs) sowie IL-17A produzierenden CD3⁺-TLs (IL17A⁺CD3⁺-TLs) im Gewebe.

3.2.6.1.1 Färbung von CD3 und der T-Zell-Rezeptor-CD3-Komplex

CD3 ist ein spezifischer Oberflächenmarker von T-Lymphozyten, der nie auf B-Lymphozyten oder NK-Zellen exprimiert wird. In gesunden Erwachsenen exprimieren 65 - 88 % aller Lymphozyten des peripheren Blutes das CD3 [174]. Im Folgenden werden die Morphologie sowie die Beziehung des CD3 zum T-Zell-Antigen-Rezeptor (TCR) beschrieben:

Der TCR setzt sich aus mindestens 6 Proteinen zusammen. Dazu gehören die α - und β -Kette des $\alpha\beta$ -Heterodimers sowie die assoziierten γ -, δ -, ϵ -, ζ - und/oder η -Ketten des CD3 [16, 30]. Während die antigenbindende TCR-Einheit ($\alpha\beta$ -Heterodimer) keine signifikanten intrazellulären Domänen aufweist, enthält das CD3 intrazelluläre Signaleinheiten, die den TCR/CD3-Komplex mit dem nachgeschalteten intrazellulären Signaltransduktionsweg verbinden [16, 87]. Somit muss die früheste Signalaktivität des TCR die Informationsweitergabe von der antigenbindenden TCR-Einheit zu den CD3-Untereinheiten beinhalten [87].

In der IL-17A/CD3-Co-Immunofluoreszenzfärbung dient die Färbung von CD3 der Abgrenzung von T-Lymphozyten zu anderen, histomorphologisch ähnlichen, mononukleären Zellen. Hierfür bindet der Primärantikörper das CD3 und wird seinerseits durch den Sekundärantikörper gebunden, der aufgrund seiner Kopplung an TRITC (5(6)-Tetramethylrhodaminisothiocyanat) rot erscheint.

3.2.6.1.2 Färbung von IL-17A

Das Zytokin IL-17A wird im **Abschnitt 2.6** ausführlich charakterisiert. In der hier beschriebenen Färbung wird der Botenstoff IL-17A vom Primärantikörper gebunden, der wiederum Zielmolekül des Sekundärantikörpers ist. Letzterer erscheint in der Färbung grün, da er an FITC (Fluorescein) gekoppelt ist.

3.2.6.2 Durchführung

3.2.6.2.1 Immunofärbung von CD3

Die Gewebeschnitte wurden (LV-Myokard und Nierenparenchym) entparaffiniert und mit einer absteigenden Alkoholreihe hydriert. Es folgte eine 40-minütige Inkubation in 0,05 % Citraconsäure Anhydrid Puffer bei +98 °C und einem pH von 7,4. Daraufhin wurden die Schnitte bei RT 30 Minuten lang abgekühlt und anschließend für 10 Minuten in 1 x PBS + Tween gelagert. Als Nächstes wurden die Schnitte für 30 Minuten bei +37 °C in einer feuchten Kammer mit 1 x PBS + 4 % Rinderserumalbumin (Blocklösung) inkubiert. Schließlich wurde die Blocklösung entfernt und der Primärantikörper (Maus Monoklonal IgM anti CD3, Invitrogen), im Verhältnis 1:500 mit Blocklösung gemischt, auf die Schnitte gegeben, die daraufhin für 2 Nächte (48 h) bei +4 °C inkubiert wurden. Am dritten Tag wurden die Schnitte initial für 3 h in der feuchten Kammer bei +37 °C inkubiert. Es folgte ein 3 x 5-minütiges Waschen mit 1 x PBS + Tween bei RT. Konsekutiv wurden die Präparate mit dem Sekundärantikörper (Anti-Maus-IgM μ Chain Specific-TRITC (rot), Dianova) und 1 x PBS + Tween im Verhältnis 1:50 für 2 h bei

+37 °C in der feuchten Kammer inkubiert. Das initiale Waschen mit 1 x PBS + Tween wurde daraufhin wiederholt. In der Folge wurden die Schnitte für 5 Minuten bei RT mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) und Aqua destillata im Verhältnis 1:100 behandelt. Die Objektträger mit den Präparaten wurden anschließend getrocknet, mit Mounting Medium (>Vectaschild©<) eingedeckt und abermals getrocknet. Abschließend wurden die Präparate bei RT für 10 Minuten in 4 x SSC (>saline sodium citrate<) + Tween gewaschen und getrocknet. An diesem Punkt konnte zu der Immunfärbung für IL-17A übergegangen werden.

3.2.6.2.2 Immunofärbung von IL-17A

Am selben Tag (Tag 3) wurden die schon für CD3 gefärbten Präparate für 30 Minuten in der feuchten Kammer (+37 °C) mit 4 % Rinderserumalbumin + 4 x SSC (Blocklösung) inkubiert, danach wurde die Blocklösung entfernt. Im nächsten Schritt wurden die Präparate mit dem, 100fach mit Blocklösung verdünnten, Primärantikörper (Rabbit Polyklonal IgG anti IL-17A) behandelt und für 2 Nächte (48 h) bei +4 °C in der feuchten Kammer inkubiert.

Der fünfte Tag begann mit einer 3-stündigen Inkubation in der feuchten Kammer (+37 °C), wonach die Schnitte 3 x 5 Minuten mit 4 x SSC + Tween gewaschen wurden (RT). Daraufhin wurden die Präparate mit dem Sekundärantikörper (Anti-Rabbit-IgG-FITC) behandelt, der zuvor im Verhältnis 1:50 mit 4 x SSC + Tween verdünnt wurde. Die Inkubationszeit für den Sekundärantikörper betrug 2 h und erfolgte in der feuchten Kammer (+37 °C). Anschließend erfolgte eine weitere Waschung von 3 x 5 Minuten mit 4 x SSC + Tween, bevor die Präparate mit DAPI und Aqua dest. im Verhältnis 1:100 behandelt wurden. Abschließend wurden die Schnitte für 5 Minuten mit Aqua dest. gewaschen und mit Mounting Medium (>Vectaschild©<) eingedeckt.

Protokoll für die IL-17A/CD3-Co-Immunofluoreszenzfärbung

Tag 1		
Entparaffinierung	Heizplatte +70 °C	30 min
	100 % Ethanol	5 min
	100 % Ethanol	5 min
	85 % Ethanol	5 min
	70 % Ethanol	5 min
Waschen	Aqua. Dest.	2 x 5 min

3.2. METHODEN

Inkubation	0,05 % Citraconsäure Anhydrid Puffer (pH 7,4)	1 h
	Abkühlen bei RT	30 min
Waschen	1 x PBS + Tween (RT)	10 min
Trocknen		kurz
Blocken	4 % BSA + 1 x PBS in feuchter Kammer (+37 °C)	30 min
	Blocklösung entfernen	
Primärantikörper (CD3)	1:500 in Blocklösung	
Inkubation	Feuchte Kammer (+4 °C)	48 h
Tag 3		
Inkubation	Feuchte Kammer (+37 °C)	3 h
Waschen	1 x PBS + Tween (RT)	3 x 5 min
Sekundärantikörper (CD3)	1:50 in 1 x PBS + Tween in feuch- ter Kammer (+37 °C)	2 h
Waschen	1 x PBS + Tween (RT)	3 x 5 min
DAPI	1:100 in Aqua. Dest. (RT)	5 min
Waschen	Aqua. Dest. (RT)	5 min
Eindecken	Mounting Medium Vectashield©	
Trocknen		kurz
Prüfen	Immunfärbung (Mikroskop), 100x Vergrößerung	Nikon DS-Ri2-Mikroskop / Nikon-Eclipse-Ni-Kamera
Waschen	4 x SSC + Tween (RT)	10 min
Trocknen		kurz
Blocken	4 % BSA + 4 x SSC in feuchter Kammer (+37 °C)	30 min
	Blocklösung entfernen	
Primärantikörper (IL-17A)	1:100 in Blocklösung	
Inkubation	Feuchte Kammer (+4 °C)	48 h
Tag 5		
Inkubation	Feuchte Kammer (+37 °C)	3 h
Waschen	4 x SSC + Tween (RT)	3 x 5 min

Sekundärantikörper (IL-17A)	1:50 in 4 x SSC + Tween in feuchter Kammer (+37 °C)	2 h
Waschen	4 x SSC + Tween (RT)	3 x 5 min
DAPI	1:100 in Aqua. Dest. (RT)	5 min
Waschen	Aqua. Dest. (RT)	5 min
Eindecken	Mounting Medium Vectashield©	
Prüfen	Immunfärbung (Mikroskop), 100x Vergrößerung	Nikon DS-Ri2-Mikroskop / Nikon-Eclipse-Ni-Kamera

Tabelle 7: Protokoll für die IL-17A/CD3-Co-Immunofluoreszenzfärbung

3.2.6.3 Auswertung (Zählung der IL-17A⁺CD3⁺-T-Lymphozyten)

Für die Zählung der renalen IL-17A⁺CD3⁺-T-Lymphozyten wurden in dem immunhistochemisch gefärbten Nieren-Präparat eines jeden Versuchstieres 15 zufällige mikroskopische Felder von 0,01 mm² Größe ausgewählt und die darin enthaltenen CD3⁺IL-17A⁺-Zellen gezählt. Die Bilder in 100-facher Vergrößerung wurden mittels einem Nikon DS-Ri2-Mikroskop und einer Nikon-Eclipse-Ni-Kamera angefertigt.

3.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der präsentierten Ergebnisse erfolgte entweder mittels einer einfachen einfaktoriellen Varianzanalyse (>ordinary one-way-analysis of variance< (ANOVA)) in Kombination mit dem Mehrfachvergleichstest (>multiple-comparisons-test<) nach Tukey oder dem Kruskal-Wallis-Test in Kombination mit dem Mehrfachvergleichstest nach Dunn. Die Ergebnisse werden stets als Mittelwert (MW) ± Standardfehler des Mittelwertes (>standard error of the mean< (SEM)) angegeben, bei Verwendung des Kruskal-Wallis-Test wird außerdem der Median (Md) sowie der Interquartilbereich (>interquartile range< (IQR)) angegeben. Statistische Signifikanz ist als $p < 0,05$ festgelegt. Alle statistischen Analysen wurden mit GraphPad Prism (Version 9.3.1) durchgeführt.

4 Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit fußt auf der Beobachtung, dass sich die renale sympathoadrenerge Aktivität durch den Eingriff der RDN verringern lässt. Aus dieser Prämisse ergeben sich zwei Hypothesen, die es durch die präsentierten Ergebnisse zu überprüfen gilt:

1.) Durch erhöhte renale sympathoadrenerge Aktivität entstehen im untersuchten CKD-Ratten-Modell messbare Endorganschäden an LV und den Nieren. Die Ausprägung dieser Endorganschäden wird, gemäß der vorgenannten Prämisse, durch RDN in ihrem Progress verlangsamt, gestoppt oder rückgängig gemacht.

2.) Durch erhöhte renale sympathoadrenerge Aktivität im CKD-Ratten-Modell wird der Gehalt von IL-17A in Niere und LV gesteigert. Dieser Anstieg wird, gemäß der vorgenannten Prämisse, durch RDN verringert, verhindert oder sogar durch eine Abnahme unter physiologische Level (Kontrollgruppe) ersetzt.

IL-17A könnte somit eine Rolle im sympathoadrenergen Pathomechanismus zukommen.

Die hier besprochenen Ergebnisse werden, entsprechend dieser beiden Hypothesen, in zwei Gruppen aufgeteilt. In der ersten Gruppe (**Abschnitt 4.1**) werden Daten gezeigt, die den Endorganschaden betreffen, während in der zweiten Gruppe (**Abschnitt 4.2**) Ergebnisse zur Modulation von IL-17A-Leveln präsentiert werden.

4.1 Endorganschäden

4.1.1 Blutdruckmessung via Tail-Cuff-Methode

Der Blutdruck der Sprague-Dawley-Ratten wurden während des gesamten Untersuchungszeitraums mindestens 2 mal wöchentlich mittels Tail-Cuff-Transmissionsphotoplethysmographie gemessen. Zur Auswertung haben wir

die Werte der letzten 3 Messungen vor Opfung herangezogen (**Abb. 13: B, C**). Hierbei wurden in der Adenin-Gruppe die höchsten SBP-Werte ermittelt (MW = $144 \pm 6,076$; Md = 141,2; IQR = 25,51). Im Mittel zeigte sich in der Kontrollgruppe (MW = $124,8 \pm 7,408$; Md = 121,8; IQR = 25,13) ein niedrigerer SBP als bei der Adenin-Gruppe ($p = 0,3430$). Die SBP-Werte der Adenin-RDN-Gruppe (MW = $132,9 \pm 6,497$; Md = 135,5; IQR = 30,65) fielen ebenfalls niedriger als die der Adenin-Gruppe aus ($p = 0,8593$) und geringfügig niedriger als die der Kontrollgruppe ($p = >0,9999$). Die Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen waren nicht signifikant.

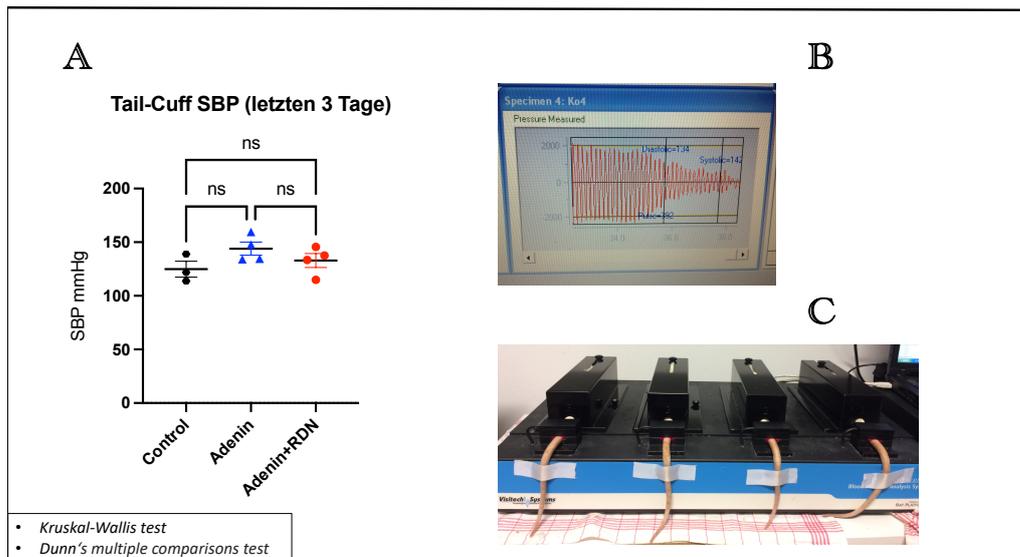


Abbildung 13: Messung des systolischen Blutdrucks während der letzten drei Tage mittels Tail-Cuff-Methode.

A: SBP in den letzten drei Tagen vor Opfung; Werte sind dargestellt als MW \pm Standardfehler des Mittelwertes (\pm standard error of the mean (SEM)); ns = $p > 0,05$.

B: Screenshot der BP-2000 Analysis Software.

C: Darstellung einer Tail-Cuff-Blutdruckmessung.

Im vorliegenden Modell hatte weder die durch Adenin induzierte CKD noch die Intervention der RDN signifikanten Einfluss auf die systolischen Blutdruckwerte der Versuchstiere.

4.1.2 Echokardiographie

Die 14 Versuchstiere wurden initial (Baseline), nach 4 Wochen (pre-RDN) sowie nach 10 und 16 Wochen echokardiographisch untersucht. Ziel war es, die linksventrikuläre Masse (LVM) (**Abb. 14, Abb. 15**) sowie die E/A-Ratio (**Abb. 16, Abb. 17**), als Indikatoren der myokardialen Hypertrophie bzw. diastolischen Funktion, zu den jeweiligen Zeitpunkten zu evaluieren. Die Variablen zur Berechnung der LVM wurden jeweils im M-Mode in der PLAX ermittelt, während die E/A-Ratio im A4C, mittels PW-Doppler, über der Mitral-klappe abgeleitet wurde. Im Folgenden sind die Daten zu diesen Parametern dargestellt.

4.1. ENDORGANSCHÄDEN

4.1.2.1 Linksventrikuläre Masse (LVM)

Zwischen den 3 untersuchten Gruppen waren sowohl zur Baseline als auch nach 4 Wochen keine signifikanten Unterschiede in der LVM festzustellen. Nach 10 Wochen zeigte die Adenin-Gruppe (MW = $0,999 \pm 0,027$; Md = 0,965; IQR = 0,117) eine signifikant höhere LVM als die Kontrollgruppe (MW = $0,804 \pm 0,019$; Md = 0,816; IQR = 0,083; $p = 0,0264$) und eine tendenziell höhere LVM als die Adenin-RDN-Gruppe (MW = $0,836 \pm 0,05$; Md = 0,886; IQR = 0,271; $p = 0,1029$). Nach 16 Wochen wies die Adeningruppe (MW = $1,097 \pm 0,043$; Md = 1,066; IQR = 0,219) schließlich eine signifikant größere LVM als die Adenin-RDN-Gruppe (MW = $0,831 \pm 0,019$; Md = 0,817; IQR = 0,105) auf ($p = 0,0155$), während der Unterschied zur Kontrollgruppe (MW = $0,84 \pm 0,041$; Md = 0,84; IQR = 0,202) tendenziell bestehen blieb ($p = 0,0616$). Zwischen der Kontrollgruppe und der Adenin-RDN-Gruppe ergaben sich nach 10 und nach 16 Wochen jeweils keine signifikanten Unterschiede.

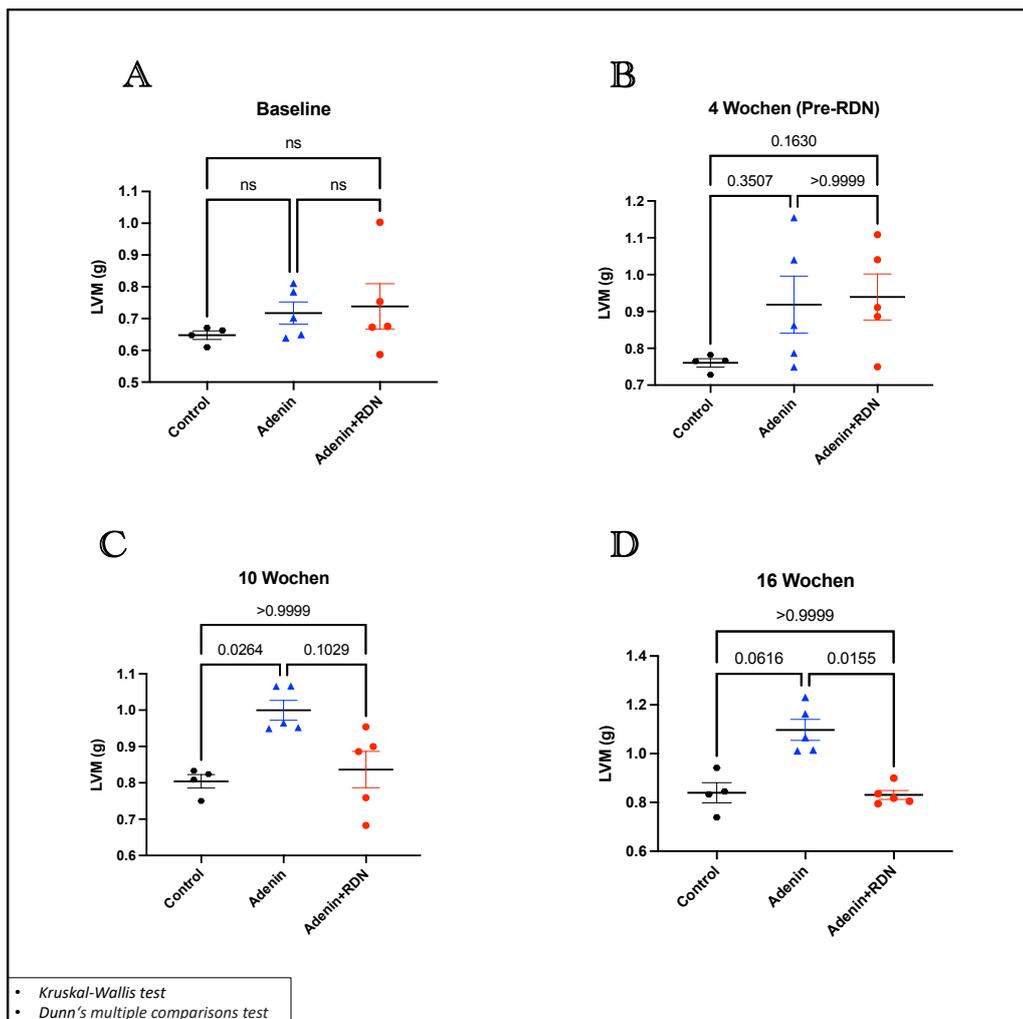


Abbildung 14: Echokardiographisch ermittelte LVM der Ratten.

A,B,C,D: LVM in g nach 0, 4, 10 und 16 Wochen; Werte sind dargestellt als MW \pm SEM; ns = $p > 0,05$.

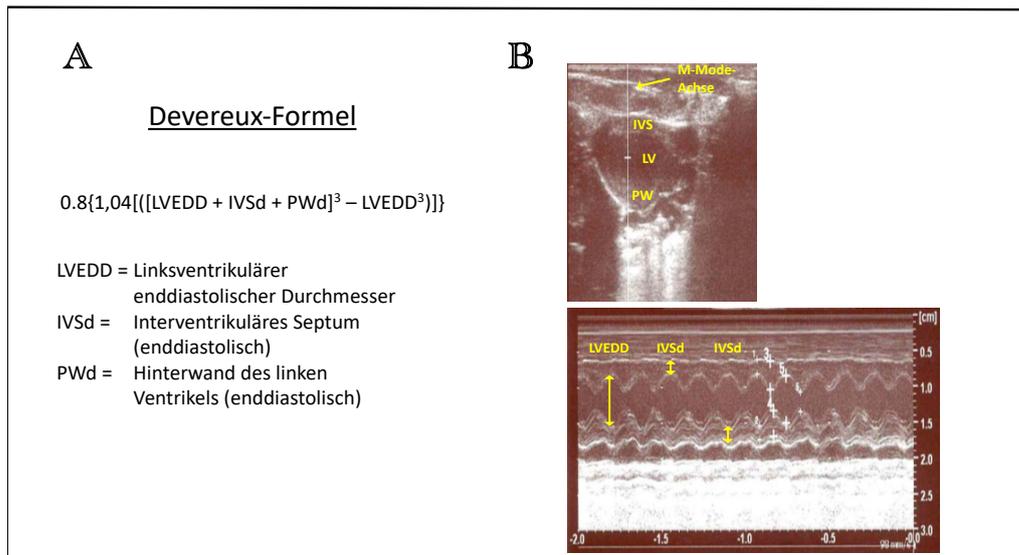


Abbildung 15: Methodik zur Bestimmung der linksventrikulären Masse.

A: Die Devereux Formel dient der Berechnung der LVM anhand der aufgeführten Parameter, die im M-Mode, in der PLAX ermittelt werden [39, 40].

B: Messung von LVEDD, IVSd, PWd in der PLAX mittels M-Mode.

4.1.2.2 E/A-Verhältnis (E/A-Ratio)

Initial ergaben sich zwischen den untersuchten Gruppen keine signifikanten Unterschiede in der E/A-Ratio. Nach 4 Wochen wies die Adenin-Gruppe (MW = 1,644 ± 0,086; Md = 1,67; IQR = 0,48) bereits eine signifikant höhere E/A-Ratio als die Kontrollgruppe auf (MW = 1,007 ± 0,128; Md = 0,098; IQR = 0,44; p = 0,0174). Nach 10 Wochen blieb dieser signifikante Unterschied der Adeningruppe (MW = 1,804 ± 0,079; Md = 1,8; IQR = 0,48) gegenüber der Kontrollgruppe (MW = 1,048 ± 0,084; Md = 1,040; IQR = 0,37; p = 0,0111) bestehen und die Adenin-RDN-Gruppe (MW = 1,176 ± 0,045; Md = 1,140; IQR = 0,25) zeigte einen Trend zu einer niedrigeren E/A-Ratio gegenüber der Adeningruppe (p = 0,0626). Nach 16 Wochen lag die E/A-Ratio der Adeningruppe (MW = 2,180 ± 0,118; Md = 2,09; IQR = 0,67) dann signifikant über den Werten der Kontrollgruppe (MW = 1,085 ± 0,042; Md = 1,125; IQR = 0,17; p = 0,0267) und der Adenin-RDN-Gruppe (MW = 1,104 ± 0,062; Md = 1,13; IQR = 0,38; p = 0,0278). Die Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und der Adenin-RDN-Gruppe waren zu allen Untersuchungszeitpunkten geringfügig und nicht signifikant.

4.1. ENDORGANSCHÄDEN

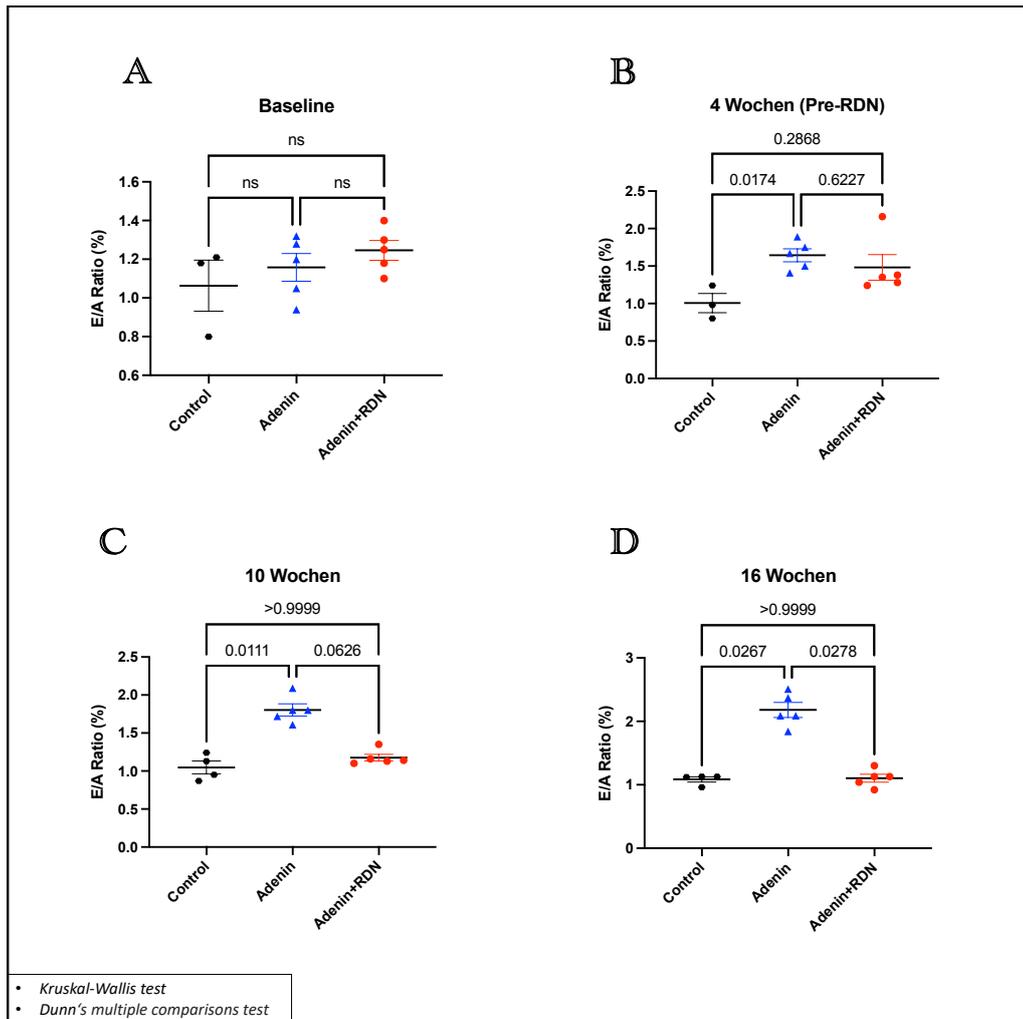


Abbildung 16: Echokardiographisch ermittelte E/A-Ratio der Ratten.
A,B,C,D: E/A-Ratio nach 0, 4, 10 und 16 Wochen; Werte sind dargestellt als MW \pm SEM;
 ns = $p > 0,05$.

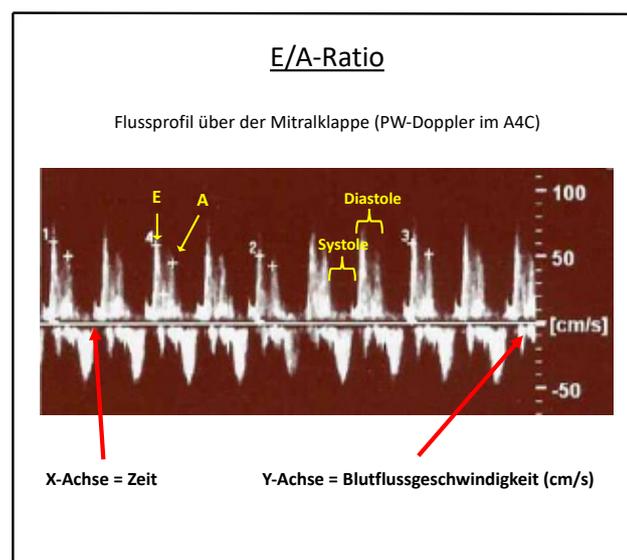


Abbildung 17: Flussprofil, das mittels PW-Doppler über der Mitralklappe im 4-Kammer-Blick abgeleitet wurde (Beispielbild stammt von einem Tier aus der Kontrollgruppe).

Zusammenfassend wird deutlich, dass die Adeningruppe nach 16 Wochen sowohl eine deutlich höhere LVM als auch eine signifikant eingeschränkte diastolische Funktion gegenüber den renal denervierten Tieren sowie den gesunden Kontrollen aufweist.

4.1.3 Fibrose

Um eine umfassende Evaluation des Endorganschadens zu ermöglichen, wurden Daten zum myokardialen (**Abb. 18: A**) und renalen (**Abb. 20: A**) Fibrosierungsgrad der Tiere generiert.

4.1.3.1 Kardiale Fibrose

Die Adenin-Gruppe (MW = $15,15 \pm 2,651$; Md = 13,42; IQR = 11,58) zeigte myokardial die meisten fibrotischen Anteile. Im Vergleich dazu zeigte die Adenin-RDN-Gruppe (MW = $6,680 \pm 0,506$; Md = 6,46; IQR = 2,399) eine deutlich weniger ausgeprägte myokardiale Fibrose ($p = 0,0231$). Die Kontrollgruppe (MW = $10,12 \pm 1,508$; Md = 10,87; IQR = 5,059) wies keine signifikanten Unterschiede gegenüber der Adenin-Gruppe und der Adenin-RDN-Gruppe auf.

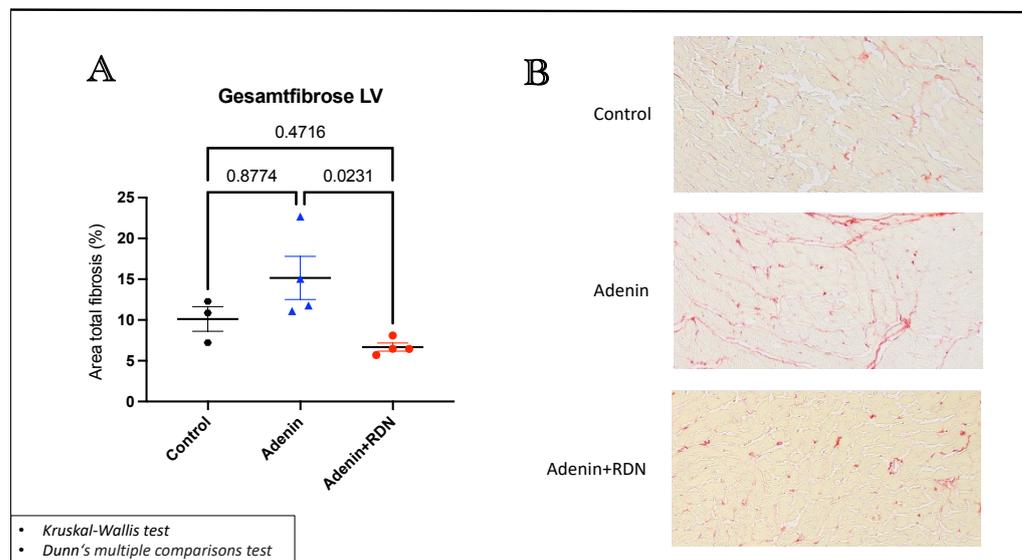


Abbildung 18: Auswertung der Gesamtfibrose des LV.

A: Gesamtfibrose des LV als prozentualer Anteil der fibrotischen Areale am Gesamtgewebe; Werte sind dargestellt als MW \pm SEM.

B: Pikrosiriusrotfärbung des LV-Myokards.

4.1.3.2 Kollagen Typ I im LV

Der Gehalt von Col1 in den Myokardproben des linken Ventrikels zeigte sich in der Adenin-Gruppe (MW = $0,383 \pm 0,085$; Md = 0,34; IQR = 0,364) im Durchschnitt am größten. Die Col1-Level in der Kontrollgruppe (MW = $0,154 \pm 0,048$; Md = 0,108; IQR =

4.1. ENDORGANSCHÄDEN

0,144) sowie in der Adenin-RDN-Gruppe (MW = $0,187 \pm 0,028$; Md = 0,2; IQR = 0,134) fielen numerisch geringer aus, wobei sich allerdings keine signifikanten Unterschiede ergaben.

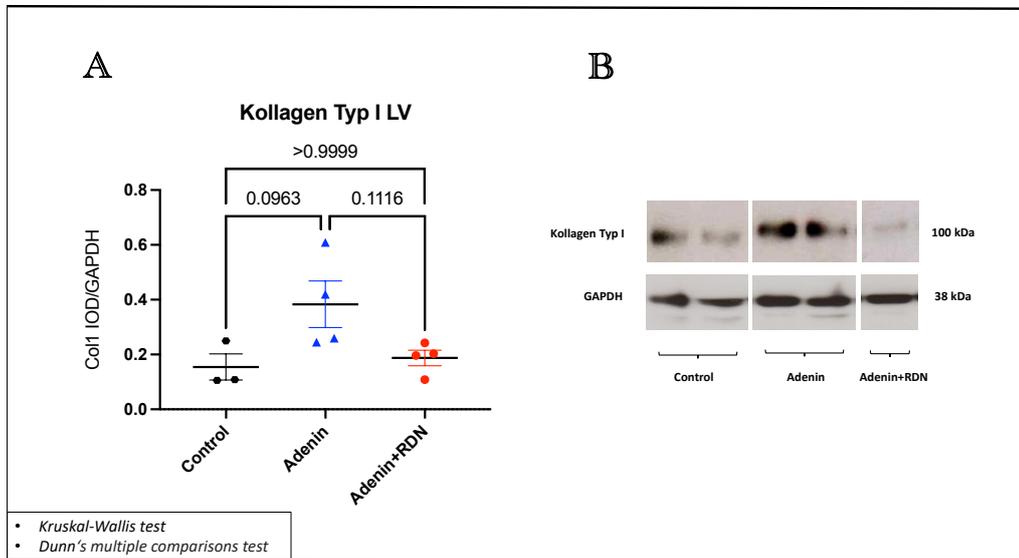


Abbildung 19: Col1 im LV.

A: Auswertung des Western-Blots zur Bestimmung des Col1-Gehalts in einer Myokardprobe des LV, dargestellt als integrierte optische Dichte, relativ zur GAPDH; Werte sind präsentiert als MW \pm SEM.

B: Bild des zugehörigen Röntgenfilms mit den jeweiligen Banden.

4.1.3.3 Renale Fibrose

Die Adenin-Gruppe (MW = $25,26 \pm 2,239$; Md = 27,01; IQR = 9,575) wies die ausgeprägteste renale Fibrose auf. Zwar bestand ein hochsignifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (MW = $5,538 \pm 0,506$; Md = 6,023; IQR = 1,537), der Unterschied zur Adenin-RDN-Gruppe (MW = $20,08 \pm 1,874$; Md = 21,49; IQR = 8,012) erreichte jedoch kein Signifikanzniveau.

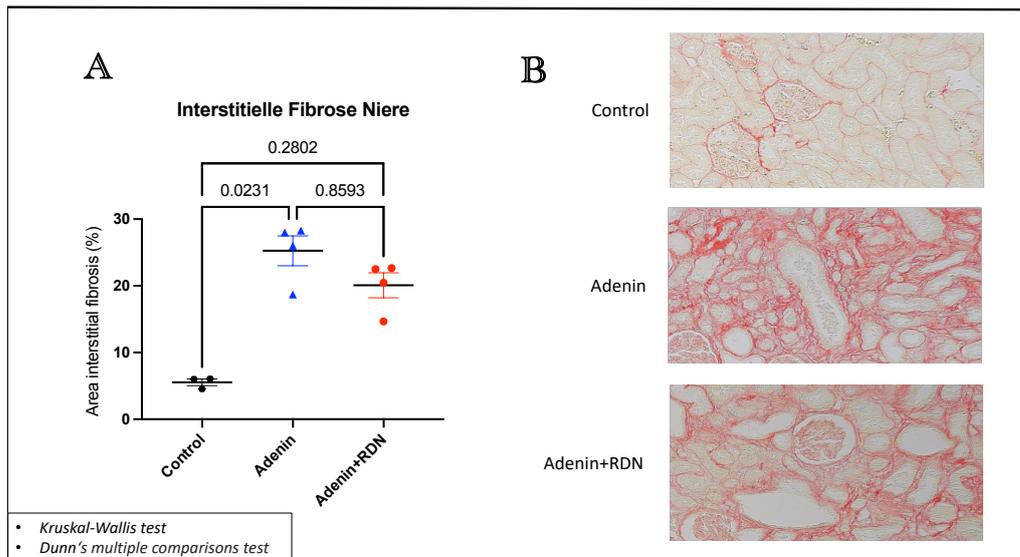


Abbildung 20: Auswertung der interstitiellen renalen Fibrose.

A: Interstitielle Fibrose der Niere als prozentualer Anteil der fibrotischen Areale am interstitiellen (ohne arterielle Gefäße und Kapsel) Gewebe; Werte sind dargestellt als MW \pm SEM.

B: Pikrosiriusrotfärbung der Niere.

4.1.3.4 Kollagen Typ I in der Niere

Auch in den renalen Gewebeproben zeigten sich die höchsten Col1-Werte in der Adenin-Gruppe (MW = 0,232 \pm 0,065; Md = 0,189; IQR = 0,291). Außerdem war der durchschnittliche Col1-Gehalt in der Kontrollgruppe (MW = 0,01 \pm 0,002; Md = 0,01; IQR = 0,007) signifikant geringer ($p = 0,0172$). Die Adenin-RDN-Gruppe (MW = 0,097 \pm 0,0306; Md = 0,087; IQR = 0,146) zeigte lediglich numerische Unterschiede zur Adeningruppe, sowie zur Kontrollgruppe.

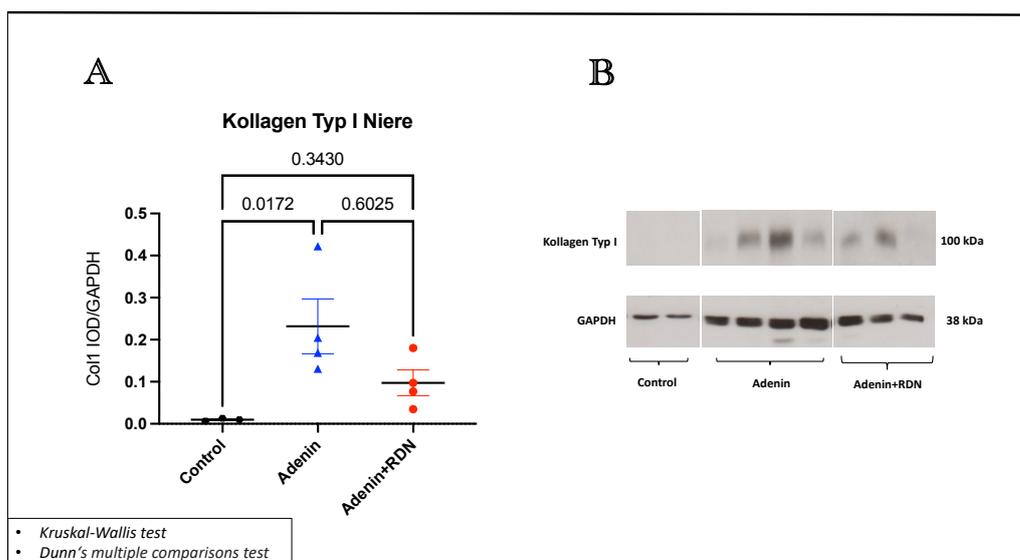


Abbildung 21: Col1 in der linken Niere.

A: Auswertung des Western-Blots zur Bestimmung des Col1-Gehalts in einer Myokardprobe der linken Niere, dargestellt als integrierte optische Dichte, relativ zur GAPDH; Werte sind präsentiert als MW \pm SEM.

B: Bild des zugehörigen Röntgenfilms mit den jeweiligen Banden.

In Zusammenschau demonstrieren die oben aufgeführten Ergebnisse, dass die CKD im vorliegenden Modell zu einer signifikant ausgeprägten renalen Fibrose und einem Trend zur kardialen Fibrose führt. Die RDN konnte diesen Schaden nur im Bezug auf die Gesamtfibrose des LV, nicht jedoch im Falle der Col1-Level und der interstitiellen renalen Fibrose, signifikant reduzieren.

4.2 Interleukin-17A (IL-17A)

4.2.1 IL-17A Western-Blot von Überständen der Splenozyten- und Kardiomyoblastenkultur

Um den Zusammenhang von sympathoadrenerger Aktivität und erhöhter IL-17A Produktion durch mononukleäre Zellen (**Abb. 22: A**) der Versuchstiere zu untersuchen, wurden in-vitro-Experimente (**Abb. 12**) durchgeführt, in welchen aus Rattenmilzen isolierte Zellen (**Abb. 11**) mit dem synthetischen Katecholamin Isoproterenol stimuliert wurden. Weiterhin wurde ein Teil der Zellen zuvor mit spezifischen β -Adrenozeptor-Antagonisten behandelt, um den vorrangig beteiligten Adrenozeptor zu identifizieren (**Siehe: Abschnitt 3.2.5.5**). Zu diesem Zweck wurden die Splenozyten mittels Milz-Ficoll (**Siehe: Abschnitt 3.2.5.1**) isoliert. Anschließend wurden die Proben teilweise mit einem der Adrenozeptor-Blocker vorbehandelt (30 Minuten Vorlauf) und schließlich mit Isoproterenol stimuliert. Nach 3-maliger 24 h Inkubation wurde der Überstand der Zellkulturen mittels Western-Blot-Verfahren auf den jeweiligen IL17A-Gehalt untersucht.

Unter Anwendung des gleichen Verfahrens wurde die Beziehung von sympathoadrenerger Aktivität und IL-17A Produktion durch isolierte Kardiomyoblasten der H9c2-Zelllinie (**Abb. 23**) untersucht.

4.2.1.1 IL-17A im Überstand der Splenozytenkultur

Der IL-17A-Gehalt im Überstand der mit Isoproterenol stimulierten Splenozyten (ISO; MW = 40087 ± 4001) zeigte sich deutlich größer als in jenem von Kontrollzellen (MW = 14841 ± 2984 ; $p = 0,0004$). Die Isoproterenol induzierte IL-17A-Ausschüttung konnte durch β 2-adrenerge Blockade signifikant gehemmt werden ($p = 0,0003$). Eine β 1-adrenerge Blockade konnte die IL-17A-Ausschüttung nach Isoproterenol nicht beeinflussen. Zwischen dem IL-17A-Gehalt im Überstand der Kontrollkultur und der ICI-Kultur bestand kein signifikanter Unterschied.

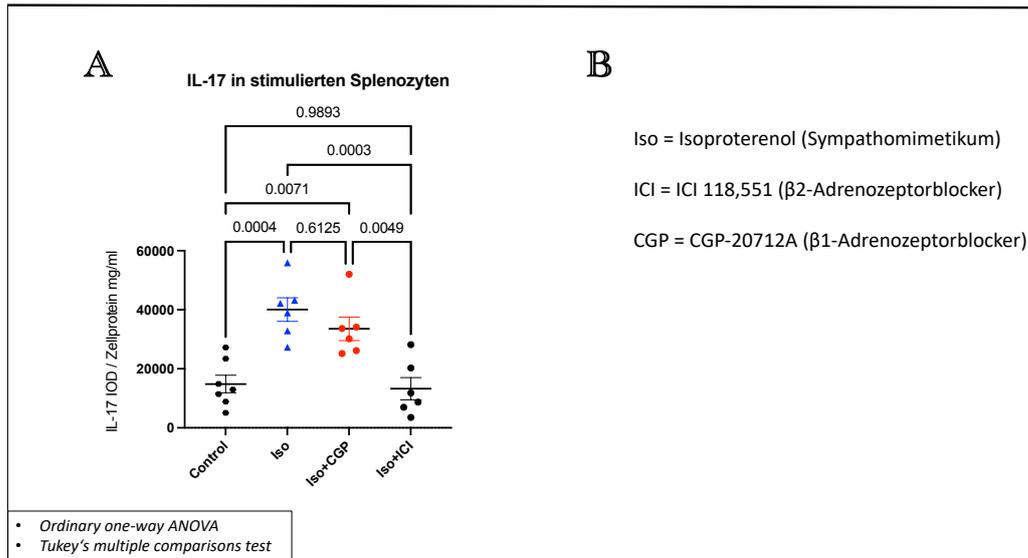


Abbildung 22: IL-17A-Gehalt im Überstand der Kultur von Splenozyten (MNCs, mononukleäre Zellen).
A: Auswertung des Western-Blots zur Bestimmung des IL-17A-Gehalts in Überständen des Zellkulturmediums von Splenozyten, dargestellt als integrierte optische Dichte, relativ zur Proteinkonzentration im Zellhomogenat; Werte sind präsentiert als MW \pm SEM.
B: Legende der zur Stimulierung bzw. Inhibition verwendeten Reagenzien.

4.2.1.2 IL-17A im Überstand der Kardiomyoblastenkultur (H9c2-Linie)

Der Überstand der mit Isoproterenol stimulierten Kardiomyoblasten (MW: 15293 \pm 2028) präsentierte einen signifikant höheren Gehalt an IL-17A als jener von Kontrollzellen (MW: 7227 \pm 881; $p = 0,0017$). Die Isoproterenol induzierte IL-17A-Ausschüttung konnte durch β 2-adrenerge Blockade signifikant gehemmt werden ($p = 0,0013$), wohingegen eine β 1-adrenerge Blockade die IL-17A-Ausschüttung nach Isoproterenol nicht beeinflussen konnte. Überdies produzierten die Kardiomyoblasten unter β 1-Blockade deutlich mehr IL-17A als unter β 2-Blockade ($p = 0,0468$), während der Unterschied zur Kontrollgruppe nicht signifikant ausfiel.

4.2. INTERLEUKIN-17A (IL-17A)

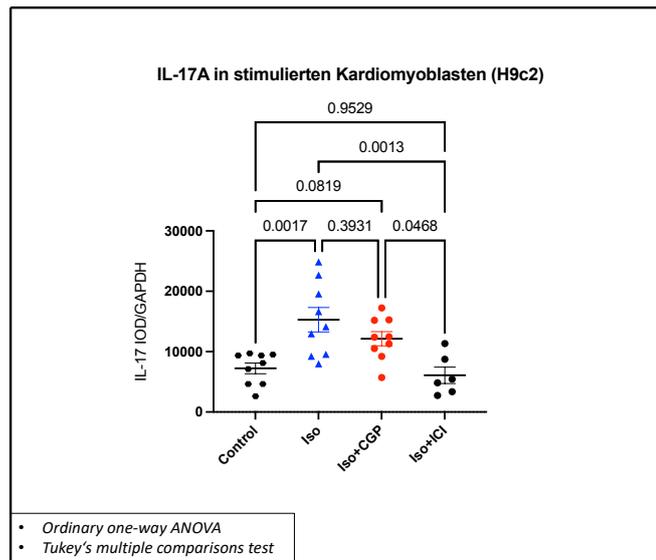


Abbildung 23: IL-17A-Gehalt im Zellkulturüberstand von Kardiomyoblasten (H9c2). Auswertung des Western-Blots zur Bestimmung des IL-17A-Gehalts in Überständen des Zellkulturmediums von Kardiomyoblasten (H9C2-Zelllinie), dargestellt als integrierte optische Dichte, relativ zur Proteinkonzentration im Zellhomogenat; Werte sind präsentiert als MW \pm SEM.

Die präsentierten Daten zeigen sowohl für die Splenozyten als auch für die Kardiomyoblasten, dass die mit Isoproterenol stimulierten Zellen weitaus höhere Level von IL-17A produzierten als nicht stimulierte Zellen. Dieser Effekt zeigte sich tendenziell auch in den CGP-behandelten Proben (wenn auch nicht signifikant im Falle der H9c2-Zellen), blieb jedoch aus, wenn die jeweilige Kultur zuvor mit dem β 2-Adrenozeptorblocker ICI behandelt wurde. Dies spricht in beiden Zelltypen für eine vorrangig über β 2-Adrenozeptoren vermittelte Steigerung der IL-17A-Ausschüttung unter sympathoadrenergem Stimulus.

4.2.2 IL-17A Western-Blots in Geweben, Urin und Plasma

Der IL-17A-Gehalt wurde zum Ende des Untersuchungszeitraums in LV (**Abb. 24**), Niere (**Abb. 25**), Urin (**Abb. 26**) und Plasma (**Abb. 28**) der Ratten mittels Western-Blot-Verfahren ermittelt.

Zusätzlich wurden mittels der in **Abschnitt 4.2.3** gezeigten IL-17A/CD3-Co-Immunofluoreszenzfärbung die CD3⁺IL-17A⁺-Zellen in der Niere identifiziert und gezählt (**Abb. 27**), um Rückschlüsse auf die Herkunft des IL-17A zu ermöglichen.

4.2.2.1 IL-17A-Gehalt im linken Ventrikel

In der Untersuchung des LV-Myokards wies die Adenin-Gruppe (MW = $0,54 \pm 0,066$; Md = $0,514$; IQR = $0,315$) den durchschnittlich höchsten IL-17A-Gehalt auf, wobei sich

allerdings kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (MW = $0,335 \pm 0,042$; Md = $0,306$; IQR = $0,135$) ergab. Der mittlere IL-17A-Gehalt der Adenin-RDN-Gruppe (MW = $0,081 \pm 0,046$; Md = $0,052$; IQR = $0,198$) fiel hingegen signifikant niedriger aus als jener der Adeningruppe ($p = 0,012$).

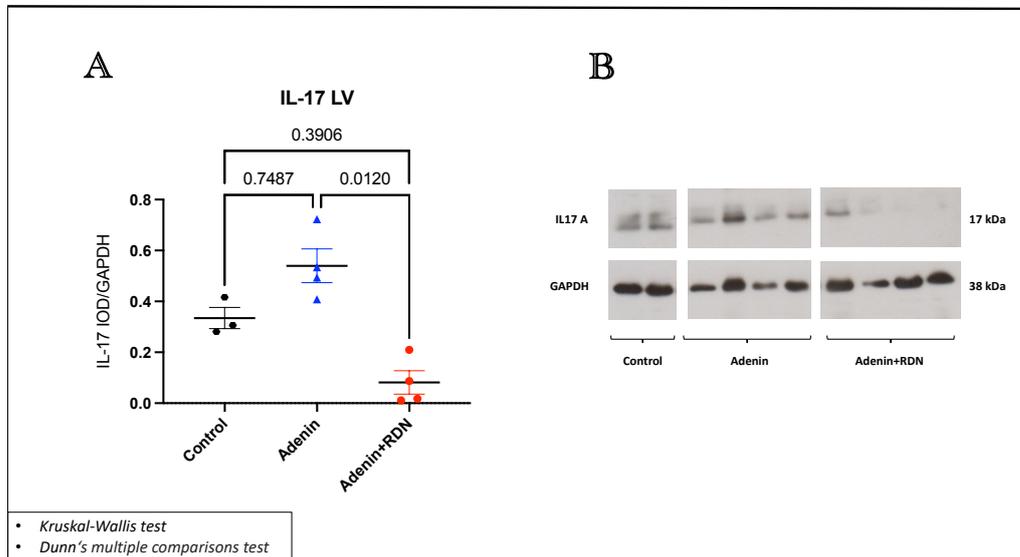


Abbildung 24: IL-17A Gehalt im LV (Apex).

A: Auswertung des Western-Blots zur Bestimmung des IL-17A-Gehalts in einer Myokardprobe des LV, dargestellt als integrierte optische Dichte, relativ zur GAPDH; Werte sind präsentiert als MW \pm SEM.

B: Bild des zugehörigen Röntgenfilms mit den jeweiligen Banden.

4.2.2.2 IL-17A-Gehalt in Niere und Urin & Anzahl von CD3⁺IL-17A⁺-Zellen in der Niere

Das durchschnittliche renale IL-17A-Level der Adenin-Gruppe (MW = $3,994 \pm 0,474$; Md = $3,901$; IQR = $2,286$) war signifikant höher als das der Kontrollgruppe (MW = $1,406 \pm 0,252$; Md = $1,507$; IQR = $0,854$; $p = 0,0092$). Auch die Adenin-RDN-Gruppe (MW = $2,368 \pm 0,146$; Md = $2,265$; IQR = $0,622$) zeigte gegenüber der Adenin-Gruppe tendenziell einen geringeres renales IL-17A-Level, wobei dieser Unterschied jedoch nicht signifikant war.

4.2. INTERLEUKIN-17A (IL-17A)

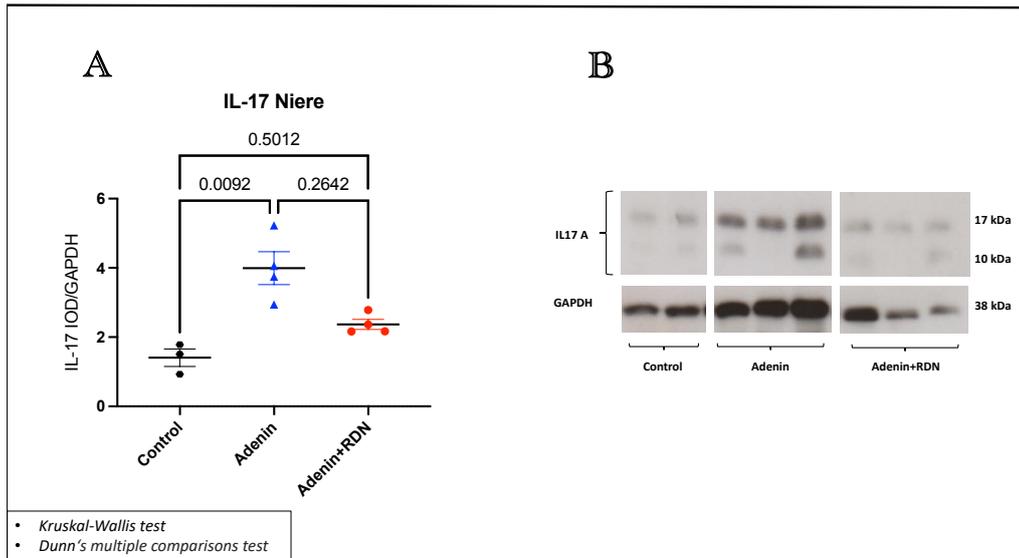


Abbildung 25: IL-17A Gehalt in der Niere.

A: Auswertung des Western-Blots zur Bestimmung des IL-17A-Gehalts in einer Parenchymprobe der rechten Niere, dargestellt als integrierte optische Dichte, relativ zur GAPDH; Werte sind präsentiert als MW \pm SEM.

B: Bild des zugehörigen Röntgenfilms mit den jeweiligen Banden.

Der im Urin gemessene IL-17A-Gehalt lag in der Adenin-RDN-Gruppe (MW = 19.455 \pm 6.224; Md = 21.947; IQR = 28.154) signifikant über dem Niveau der Kontrollgruppe (MW = 399,9 \pm 21,70; Md = 400,1; IQR = 75,18; $p = 0,0231$) und numerisch über dem Niveau der Adeningruppe (MW = 3.289 \pm 841; Md = 3.229; IQR = 4.105).

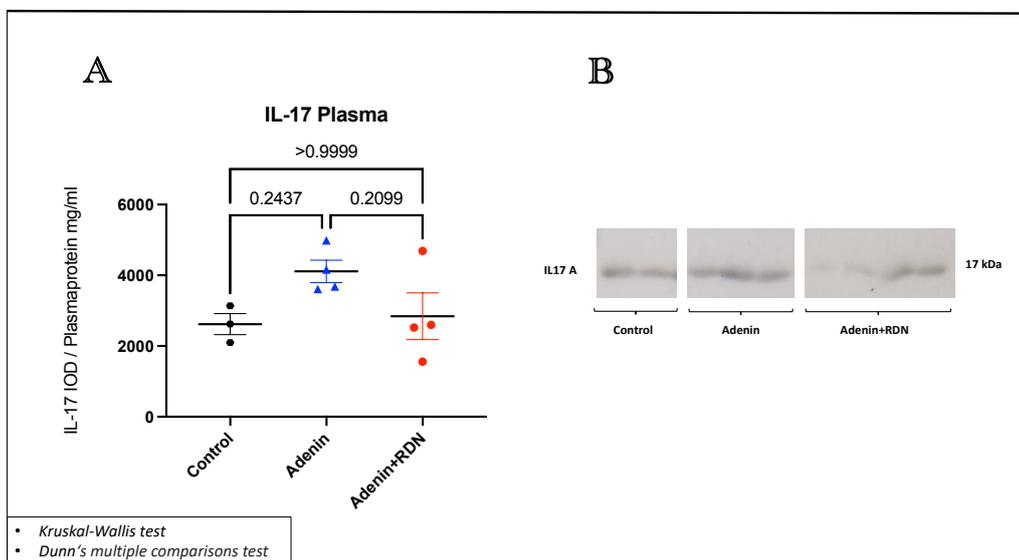


Abbildung 26: IL-17A Gehalt im Urin.

A: Auswertung des Western-Blots zur Bestimmung des IL-17A-Gehalts im Urin, dargestellt als integrierte optische Dichte, relativ zum Kreatiningehalt des Urins in mg /dl; Werte sind präsentiert als MW \pm SEM.

B: Bild des zugehörigen Röntgenfilms mit den jeweiligen Banden.

Die Zahl der CD3⁺IL-17A⁺-Zellen lag in den Nieren der Adeningruppe (MW = 59,28 \pm 8,520; Md = 57,97; IQR = 41,47) deutlich über der der Kontrollgruppe (MW = 3,046 \pm 0,646; Md = 2,8; IQR = 2,195; $p = 0,0092$). Weiterhin wiesen die Nieren der Adenin-RDN-

Gruppe (MW = $25,83 \pm 4,913$; Md = 23,8; IQR = 20,13) numerisch höhere Zellzahlen als die Kontrollgruppe und tendenziell niedrigere Zellzahlen als die Adeningruppe auf.

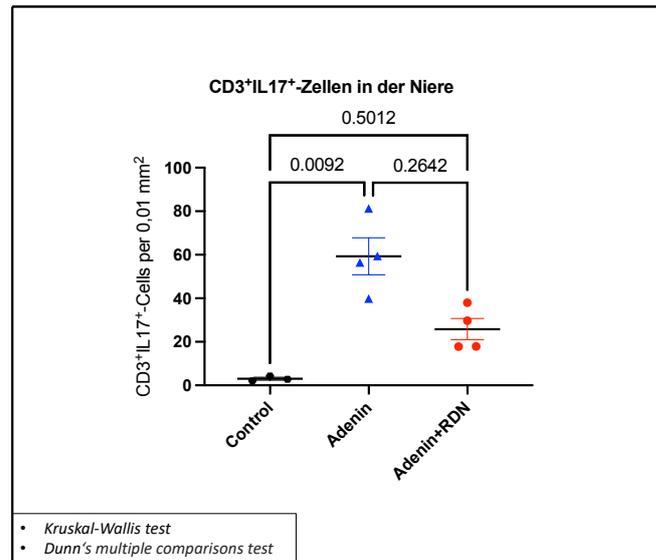


Abbildung 27: Anzahl von CD3⁺IL-17A⁺-Zellen pro 0,01 mm² in der Niere; Ausgewertet wurden jeweils 15 zufällige mikroskopische Felder von immunhistochemisch gefärbten Nierenpräparaten (Siehe: Abschnitt 4.2.3.1); Werte sind präsentiert als MW ± SEM.

Durch die vorliegenden Daten wird ersichtlich, dass sowohl der Gehalt von IL-17A als auch die Anzahl der CD3⁺IL-17A⁺-Zellen in den Nieren der Ratten mit unbehandelter CKD (Adenin-Gruppe) deutlich erhöht waren. Beide Parameter wurden durch den Eingriff der RDN tendenziell verringert (Adenin-RDN-Gruppe). Außerdem wiesen die renal denervierten Tiere weitaus höhere Level des Zytokins im Urin auf als die der beiden anderen Gruppen, wobei dieser Unterschied nur gegenüber der Kontrollgruppe statistisch signifikant ausfiel.

4.2.2.3 IL-17A-Gehalt im Plasma

Der durchschnittliche Plasmagehalt an IL-17A der Adenin-Gruppe (MW = $4.111 \pm 317,4$; Md = 3.923; IQR = 1.379) lag numerisch über dem der Adenin-RDN-Gruppe (MW = $2.841 \pm 659,8$; Md = 2.560; IQR = 3.132) sowie dem der Kontrollgruppe (MW = $3,046 \pm 0,646$; Md = 2,8; IQR = 2,195). Keiner der Unterschiede zwischen den Gruppen erwies sich als signifikant.

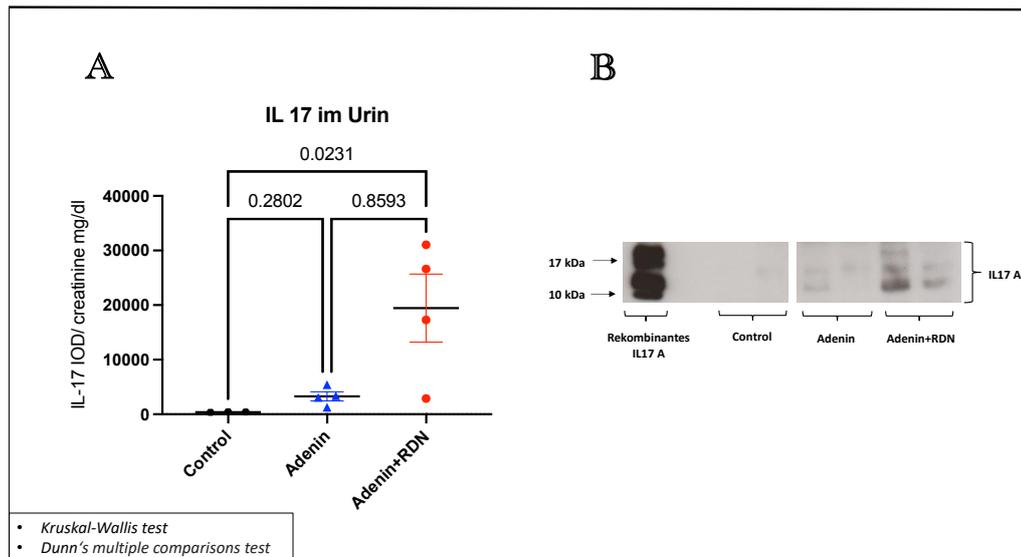


Abbildung 28: IL-17-Gehalt im Plasma.

A: Auswertung des Western-Blots zur Bestimmung des IL-17A-Gehalts im Plasma der Ratten, dargestellt als integrierte optische Dichte, relativ zur Plasma-Proteinkonzentration; Werte sind präsentiert als MW ± SEM.

B: Bild des zugehörigen Röntgenfilms mit den jeweiligen Banden.

Es lässt sich abschließend feststellen, dass der IL-17A-Gehalt durch die sympatholytische RDN in den CKD-geschädigten Endorganen (LV und Niere) gesenkt wurde. Im Plasma führte die RDN zu einer insignifikanten Abnahme der IL-17A-Level, während sie die Urinausscheidung des Zytokins maßgeblich erhöhte.

Ferner zeigen die Befunde, dass die Niere im vorliegenden CKD-Modell von Myriaden von CD3⁺IL-17A⁺-Zellen infiltriert wird, deren Anzahl nach RDN tendenziell abnimmt.

4.2.3 IL-17A/CD3-Co-Immunofärbung

Die IL-17A/CD3-Co-Immunofärbung von Nierenparenchym (**Abb. 29: A**) und LV-Myokard (**Abb. 29: B**) wurde durchgeführt, um immunhistochemische Informationen zu gewinnen. Diese Informationen sollen ein besseres Verständnis der Rolle von IL-17A sowie IL-17A-produzierenden T-Lymphozyten im sympathoadrenergen Pathomechanismus der in **Abschnitt 3.2** dokumentierten Endorganschäden ermöglichen. Zu diesem Zweck wurden Gewebeproben von LV-Myokard und Nierenparenchym jeweils mit Primärantikörpern gegen das CD3 und IL-17A der Ratten, sowie mit, an TRITC (CD3, rot) und an FITC (IL-17A, grün) gekoppelten, Sekundärantikörpern behandelt. Bilder in 100-facher Vergrößerung wurden mittels einem Nikon DS-Ri2-Mikroskop und einer Nikon-Eclipse-Ni-Kamera angefertigt.

4.2.3.1 IL-17A/CD3-Co-Immunofärbung der Niere

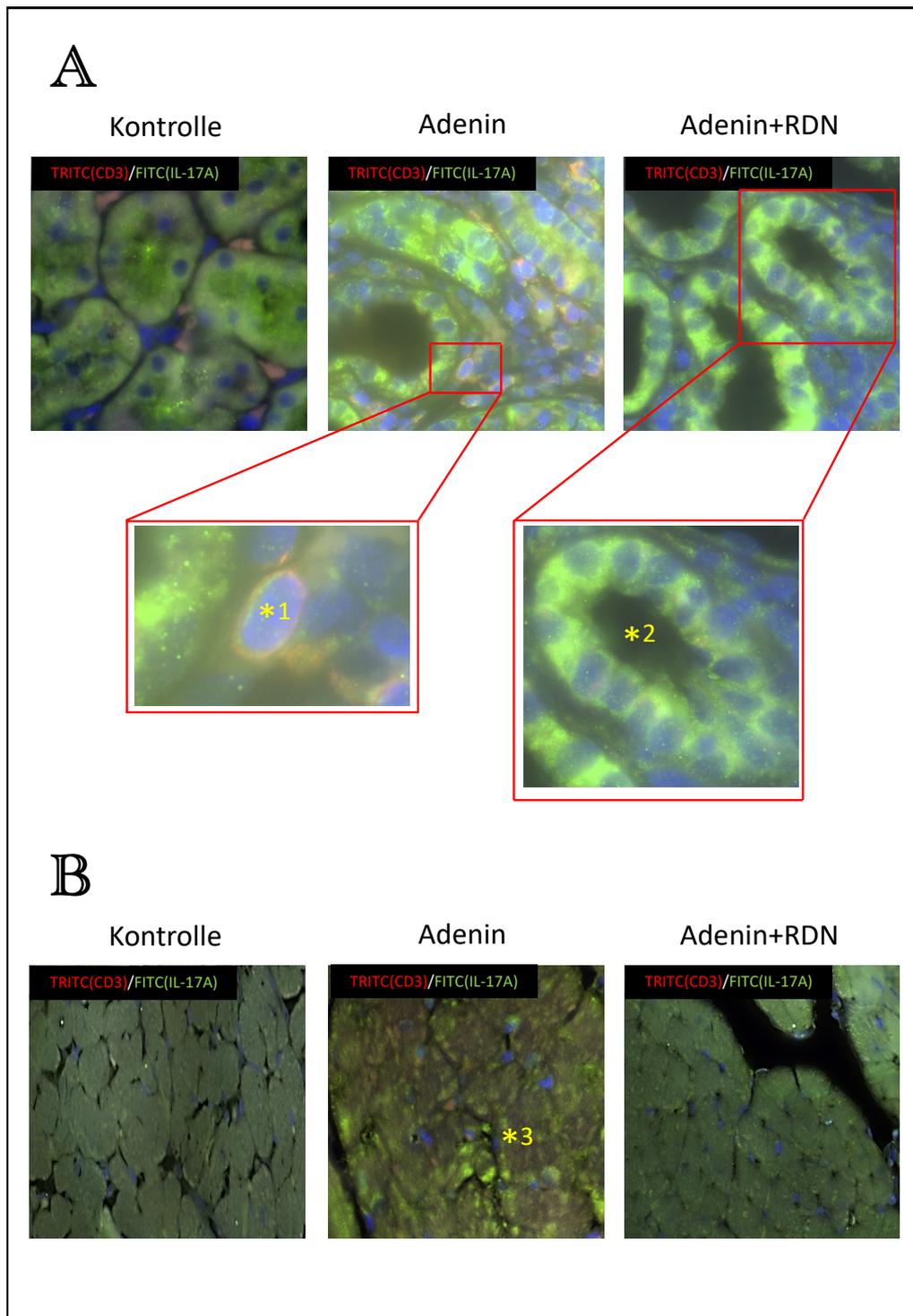


Abbildung 29: IL-17A/CD3-Co-Immunofärbung der Niere und des LV-Myokards

A: Exemplarische Bilder des Nierenparenchyms aus der Kontroll-, Adenin- und der Adenin-RDN-Gruppe (200x); *1: CD3⁺IL-17A⁺-T-Lymphozyten, erkennbar durch den orangenen (rot+grün) Saum.; *2: Nierentubulus im Querschnitt mit starkem zytosolischem IL-17A Signal in den Tubulusepithelzellen.

B: Exemplarische Bilder des LV-Myokards aus der Kontroll-, Adenin- und der Adenin-RDN-Gruppe.; *3: Verstärktes IL-17A Signal in den Kardiomyozyten der Adeningruppe.

5 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es, anhand eines CKD+RDN-Rattenmodells, die Art und Weise zu untersuchen, in welcher das sympathische Nervensystem und IL-17A in ihrem Einfluss auf die kardioresnalen Ausprägungen der CKD zusammenwirken.

Die Ergebnisse bestätigen den lindernden Einfluss der RDN auf die CKD-Endorganschäden (**Siehe: Abschnitt 4.1**) und offenbaren quantitative und qualitative Zusammenhänge zwischen sympathoadrenerger Tonus und IL-17A-Leveln (**Siehe: Abschnitt 4.2**). Sie unterstützen somit die Hypothese eines pathogenetischen Synergismus von Sympathikus und IL-17A im CKD-Phänotyp.

5.1 Kardioresnale Endorganschäden bei CKD:

Interpretation und Limitierungen

Aus den in **Abschnitt 4.1.2** gezeigten echokardiographischen Untersuchungen geht hervor, dass die Tiere der Adeningruppe nach 4 Wochen lediglich eine erhöhte E/A-Ratio zeigten, während sie nach 10 Wochen bzw. 16 Wochen die Kombination einer noch deutlicheren Zunahme der E/A-Ratio und einer ausgeprägten Steigerung der LVM aufwiesen. Hinzu kamen eine geringfügige linksventrikuläre Gesamtfibrose und eine signifikante interstitielle renale Fibrose nach 16 Wochen, die von kardial numerisch und renal signifikant erhöhten Coll-Werten begleitet wurden (**Vgl.: Abschnitt 4.1.3**).

Diese Daten sprechen für einen typischen CKD-Phänotyp, der sich durch ausgeprägte kardioresnale Fibrosierung, LVH und herabgesetzte diastolische LV-Funktion auszeichnet [5, 72, 178]. Interessanterweise traten diese Endorganschäden in dem hier untersuchten Modell partiell blutdruckunabhängig (**Vgl.: Abschnitt 4.1.1**) auf. Dies könnte durch die relativ geringe n-Zahl zu erklären sein ($n = 4$), zumal sich in der Adeningruppe bereits ein Trend zur Hypertonie abzeichnete und Hohl et al. im Rahmen des in dieser Arbeit verwendeten Rattenmodells eine signifikante Blutdruckerhöhung der Adenintiere gegenüber den Kontrolltieren via Radiotelemetrie nachweisen konnte [70]. Andererseits könnten

die Organmanifestationen tatsächlich partiell blutdruckunabhängig entstanden sein, was durch den Umstand bekräftigt wird, das in der zuvor genannten Studie von Hohl et al., wie auch in der vorliegenden Arbeit, keine signifikanten Blutdruckdifferenzen zwischen renal denervierten Tieren und Adenintieren bestanden, die CKD-Endorganschäden aber zumindest teilweise durch die RDN gemindert wurden. Dies würde die Relevanz alternativer Pathomechanismen (**Vgl.: Abschnitt 5.2**), wie dem IL-17A-Signalweg, unterstreichen. Im Folgenden sollen die echokardiographischen Untersuchungen zur Quantifizierung des Endorganschadens in den Kontext verwandter wissenschaftlicher Arbeiten eingeordnet werden.

Die Evaluierung der LVH erfolgte in der vorliegenden Arbeit mittels echokardiographischer Messungen und Anwendung der Formel nach Devereux [39, 40] mit einem Korrekturfaktor von 0,8 (**Vgl.: Abb. 15**). Unsere auf diese Weise ermittelten Befunde sind konsistent mit diversen klinischen und experimentellen Studien, die die LVM bei CKD untersuchten:

So stellte die Arbeitsgruppe um Bruch [17], ebenfalls mithilfe der Devereux-Formel, eine signifikant gesteigerte LVM in herzinsuffizienten Patienten mit CKD fest. Zudem beobachtete Bao et al. [8] echokardiographisch (die verwendete Formel wird nicht genannt) eine CKD-induzierte LVH bei Ratten mit subtotaler Nephrektomie, 5 Wochen nach dem Eingriff. Die Ergebnisse von Wolf et al. [186], dessen Arbeitsgruppe die LV von subtotal nephrektomierten Ratten nach 4-5 Wochen isolierte und wog, bestätigen eine Zunahme der LVM unter CKD. In der klinischen Studie von Bruch et al. [17] entwickelte sich die LVH außerdem blutdruckunabhängig, während die subtotal nephrektomierten Ratten jeweils eine signifikante arterielle Hypertonie aufwiesen.

Die Beziehung von diastolischer Funktion und E/A-Ratio wurde in übersichtlicher Weise von Garcia et al. [57] beschrieben, der ein normales Füllungsmuster des LV von drei Füllungsmustern diastolischer Dysfunktion unterschied, die in folgender Reihenfolge mit zunehmendem Schweregrad korrelieren: (1) verzögerte Relaxation, (2) pseudonormale Füllung, (3) restriktive Füllung.

5.2. EINFLUSS DER RDN AUF DIE KARDIORENALEN ENDORGANSCHÄDEN BEI CKD

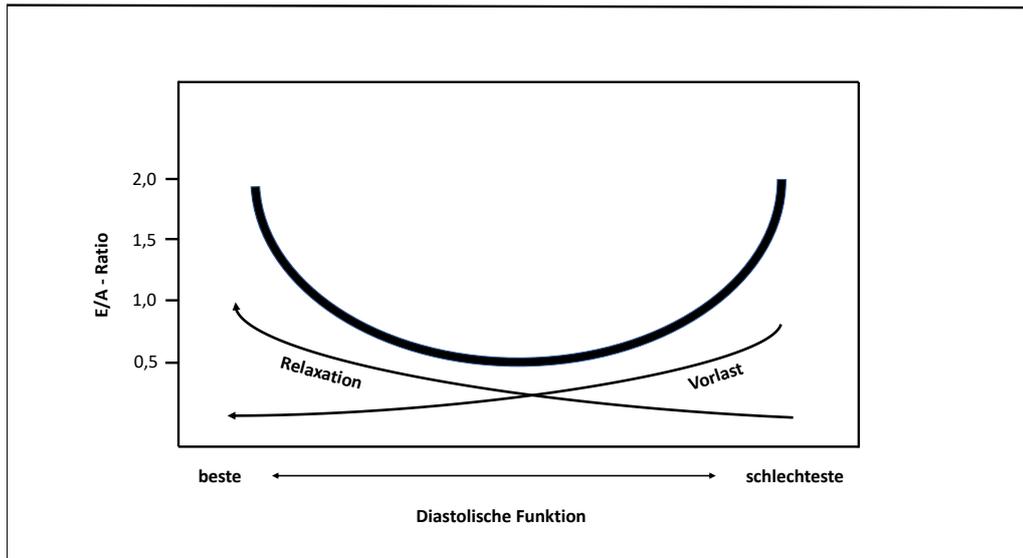


Abbildung 30: Beziehung von E/A-Ratio und diastolischer Funktion (modifiziert nach [57])

Die nach 10 bzw. 16 Wochen deutlich erhöhte E/A-Ratio der Adeninratten lässt sich, angesichts ihrer kardialen Fibrose und Hypertrophie, am ehesten als restriktives Füllungsmuster einordnen, was eine deutlich herabgesetzte diastolische Funktion mit gestörter Relaxation und gesteigerter Vorlast wahrscheinlich macht. Obschon die E/A-Ratio wichtige Informationen über die diastolische Funktion des LV liefern kann, ist sie stark abhängig von Herzfrequenz und Volumenstatus [9, 193] und eine Vielzahl von Arbeiten weist in diesem Kontext auf die diagnostische und prognostische Überlegenheit des E/e' -Verhältnis hin (e' = frühdiastolische Geschwindigkeit des Mitralklappenrings) [155, 193]. Jüngst nannte die Arbeitsgruppe Myokardinfarkt der European Society of Cardiology um Zacchigna die Parameter der linksatrialen Dimension und das E/e' -Verhältnis als verlässlichste Größen in der Evaluation diastolischer LV-Dysfunktion bei Nagetieren [193]. Diese Schwächen der E/A-Ratio könnten auch erklären, warum ihre Erhebung im Rahmen von CKD mitunter zu widersprüchlichen Ergebnissen führte [17, 54, 138].

5.2 Einfluss der RDN auf die kardioresnalen Endorganschäden bei CKD

Wir konnten in der oben besprochenen Echokardiographie nach 16 Wochen zeigen, dass der Eingriff der RDN zu einer signifikanten Abnahme der LVM und E/A-Ratio der nie-rengeschädigten Tiere führte, sodass jeweils nur noch sehr geringfügige Unterschiede zur gesunden Kontrollgruppe bestand. Außerdem verringerte die RDN die kardiale Fibrose. Die interstitielle renale Fibrose und die renalen Coll-Level zeigten keine signifikanten Unterschiede der RDN-Gruppe gegenüber der Adenin-Sham-Gruppe.

Um eine stabile Grundlage für die Diskussion unserer Befunde sowie der Natur ihrer ursächlichen Mechanismen zu schaffen, ist eine Analyse der relevanten klinischen und präklinischen Studien zu den Effekten der RDN im Rahmen von CKD geboten.

Die belastbarsten Daten zu den Effekten der RDN stammen aus dem Global SIMPLICITY Register, der aktuell größten Datensammlung von RDN-Patienten. In einem 2019 erschienenen Artikel zu den 3-Jahres-Follow-Up-Daten des Registers weist Mahfoud et al. [114] auf einen möglichen nephroprotektiven Effekt der RDN bei CKD-Patienten ($n = 93$; $eGFR < 60 \text{ mL/min/1.73 m}^2$) hin, die binnen 24 Monaten nach dem Eingriff lediglich annähernd die Hälfte an eGFR einbüßten ($\Delta = -3.7 \pm 16.2 \text{ mL/min/1.73 m}^2$), relativ zu den Patienten ohne CKD ($n = 289$; $eGFR > 60 \text{ mL/min/1.73 m}^2$; $\Delta = -7.1 \pm 16.2 \text{ mL/min/1.73 m}^2$). Interessanterweise unterschieden sich die Blutdruckveränderungen der beiden Gruppen zu keinem Zeitpunkt nach der RDN signifikant, was vermuten lässt, dass die RDN blutdruckunabhängige nephroprotektive Prozesse fördert. Diese Erkenntnisse stehen im Einklang mit einer früheren Arbeit von Mahfoud et al., in der bei 88 Patienten ($eGFR \geq 45 \text{ mL/min/1.73 m}^2$) mit therapieresistenter Hypertonie 3 bzw. 6 Monate nach RDN eine blutdruckunabhängige, signifikante Verbesserung der renalen Hämodynamik (Reduktion des renalen Resistenz-Index) und eine Abnahme von Mikro- und Makroalbuminurie beobachtet wurde [115]. Die in den vorgenannten Studien beschriebenen günstigen Effekte der RDN auf die Nierenfunktion konnten in kleineren Proof-Of-Concept-Studien von Hering et al. [68] und Kiuchi et al. [82] für Patienten mit höhergradiger CKD ($eGFR < 45 \text{ mL/min/1.73 m}^2$) bestätigt werden.

Die oben genannten Arbeiten attestieren der RDN bei CKD ein günstiges Sicherheitsprofil und positive Auswirkungen auf die Nierenfunktion. Im Folgenden soll der Stand der Wissenschaft zur Wirkung der RDN auf die von uns evaluierten Parameter (LVM, diastolische Funktion, Fibrose, Col1-Gehalt) zusammengefasst werden.

Der von unserer Arbeitsgruppe beobachtete antihypertrophe Effekt der RDN auf den LV (**Siehe: Abschnitt 4.1.2.1**) wurde bereits in mehreren klinischen Studien gezeigt. Erstmals 2012 durch Brandt et al. [15], der bei therapierefraktären Hypertoniepatienten mittels Echokardiographie eine kontinuierliche Abnahme der LVM nach interventioneller RDN (1 bzw. 6 Monate post-RDN) feststellte. Dieselben Patienten offenbarten außerdem, bereits einen Monat nach RDN, signifikante Verbesserungen der diastolischen Funktion, gemessen anhand des E/e' -Verhältnis und der linksatrialen Größe. Später konnte Mahfoud et al. eine Reduktion der LVM durch RDN unter Anwendung von Ma-

5.2. EINFLUSS DER RDN AUF DIE KARDIORENALEN ENDORGANSCHÄDEN BEI CKD

gnetresonanztomographie, dem Goldstandard zur LVM-Bestimmung, bestätigen [117]. Schließlich untersuchte Kiuchi et al. in zwei unkontrollierten Studien die LVM von therapierefraktären Hypertoniepatienten mit CKD (Stadium 2-4), vor und 6 Monate nach RDN. In beiden Erhebungen ließ sich nach dem Eingriff eine signifikante Abnahme der LVM feststellen. In Zusammenschau wird deutlich, dass die Linderung der LVH durch RDN, über verschiedene Patientenkollektive und Studiendesigns hinweg, ein stabiler Befund ist.

Bezüglich kardialer Fibrose konnte die Arbeitsgruppe um Liu S. et al., übereinstimmend mit unseren Befunden (**Siehe: Abschnitt 4.1.3.1**), zeigen, dass RDN in einem CKD-Kaninchenmodell (5/6-Nephrektomie) zu einer substantiellen Reduktion der LV-Fibrose führt [103]. Ergänzend ist die Studie von Liu Q. et al. [102] zu nennen, in welcher Ratten mit Isoproterenol-induzierter Kardiomyopathie und RDN auf kardiale Fibrose untersucht wurden. 5 Wochen nach der Operation wiesen die Tiere im Vergleich zur scheinoperierten Gruppe sowohl eine signifikant verringerte Kollagenfraktion am LV-Gesamtgewebe (Masson-Trichrom-Färbung) als auch einen verringerten Col1-Gehalt im LV auf. Im Übrigen sind diese Ergebnisse insofern bedeutsam, als sie den positiven Effekt der RDN auf wichtige Triebfedern kardialer Arrhythmogenität, namentlich LVH [64, 97] bzw. linksatriale Größenzunahme und kardiale Fibrose, hervorheben. So gelang es Liu S. et al. eine signifikante positive Assoziation zwischen LV-Fibrose und der Induzierbarkeit ventrikulärer Arrhythmien zu demonstrieren [103]. Ferner zeigte Tang et al. in einem Hundemodell mit subtotaler Nephrektomie und RDN, dass durch den Eingriff die Reizschwelle für Kammerflimmern angehoben wurde [167]. Eine jüngst veröffentlichte Arbeit unseres Forschungslabors offenbart außerdem, dass die RDN im CKD-Rattenmodell mit Adenin-induzierter Nephropathie, unabhängig von Blutdruck und renaler Funktion, antiarrhythmische Effekte auf den Vorhof ausübt, die eng mit der Reduktion atrialer Fibrose assoziiert sind [70].

Wie in **Abb. 20** gezeigt, präsentierte sich in unserem CKD-Modell der Adenin-induzierten Nephropathie nur eine tendenzielle Abnahme der interstitiellen renalen Fibrose nach RDN. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zum Gros der verwandten experimentellen Arbeiten. So fand Kim et al. in einem Mausmodell mit unilateraler ureteraler Obstruktion (UUO), dass die Tiere mit RDN signifikant weniger fibrotische Areale aufwiesen als die scheinoperierten Mäuse [79]. Dieser Befund wird durch die Untersuchung von Li et al. unterstützt, der in renalen Proben von RDN-Mäusen mit UUO oder unilateraler Ischämie-Reperfusionsschädigung jeweils eine deutliche Abnahme profibrotischer Bio-

marker (Col1, Fibronectin, α -SMA) feststellte [99]. Weiterhin zeigte sich ebenfalls in der bereits genannten Arbeit von Liu Q et al. eine Reduktion der interstitiellen renalen Fibrose nach RDN [102]. Für die Diskrepanz zwischen unseren und den externen Ergebnissen bieten sich mehrere Erklärungsansätze: Grund könnte die geringe n-Zahl der in dieser Arbeit evaluierten Versuchspopulation sein. Zudem gibt es Hinweise darauf, dass sich die RDN in gesteigertem Maße auf die perivaskuläre und glomeruläre Fibrose auswirkt [102], welche in der gegenwärtigen Untersuchung zugunsten der tubulo-interstitiellen Fibrose vernachlässigt wurde.

Außerdem kann die RDN die Adenin-induzierten Kristallablagerungen mit Tubulusdilatation und konsekutiver Inflammation nicht direkt behindern, sondern nur humoral bedingte Folgeschäden abmildern.

Der folgende Abschnitt liefert einen Überblick über die bestehenden Alternativhypothesen zu blutdruckunabhängigen, sympathoadrenerg vermittelten Pathomechanismen des CKD-Phänotyps.

5.3 Blutdruckunabhängige, sympathoadrenerg vermittelte Pathomechanismen des CKD-Phänotyps

Unsere Ergebnisse implizieren, dass die nephro- und kardioprotektiven Wirkungen der RDN nicht allein durch eine Blutdrucksenkung zu erklären sind. Unter der Annahme, dass die RDN ihre Effekte in erster Linie durch die Senkung der systemischen sympathoadrenergen Aktivität vermittelt (**Vgl.: Abschnitt 2.5**), deuten diese Befunde auf einen oder mehrere direkte, sympathisch regulierte Pathomechanismen der CKD-Endorganschäden hin. Ferner bietet sich diese Erklärungslücke für jeden der von uns untersuchten Parameter. So stellte die Arbeitsgruppe um Schirmer et al. fest, dass die RDN bei therapierefraktären Hypertoniepatienten unabhängig von Blutdruck- und Herzfrequenzänderungen zur signifikanten Abnahme von LVH und diastolischer Dysfunktion führte. Die bereits genannte translationale Untersuchung von Hohl et al. [70] sowie die experimentelle Arbeit von Eriguchi et al. [48] bestätigen diese Befunde im Bezug auf kardiorenale Fibrose. Wie eingangs erwähnt, dient diese Arbeit der Prüfung unserer Hypothese, dass die sympathoadrenerge Regulation von IL-17A einen relevanten Teil des betreffenden Pathomechanismus ausmachen könnte. Die im Folgenden beschriebenen Mechanismen lassen sich in zwei Gruppen einteilen: Die erste umfasst Effekte, die über den α_2 -Adrenorezeptor (α_2 -AR) vermittelt werden (**Abb. 31: A**). Die zweite beinhaltet solche, die über das lokale RAS reguliert sind (**Abb. 31: B**). Beide Gruppen stellen im Wesentlichen Alternativen zum

5.3. BLUTDRUCKUNABHÄNGIGE, SYMPATHOADRENERG VERMITTELTE PATHOMECHANISMEN DES CKD-PHÄNOTYPS

IL-17A-Pathway dar und stehen somit in Konkurrenz mit unserer Hypothese. Interessanterweise bietet sie jedoch an mehreren Stellen Grund zur Annahme, dass sie synergistisch mit IL-17A verwoben sein könnten.

Die Arbeitsgruppe um Li et al. konnte zeigen, dass der sympathische Neurotransmitter Noradrenalin (NA) über einen α_2 -AR / β -arrestin2 / NF- κ B-Pathway wesentlich zur Seneszenz von renalen Tubulusepithelzellen beiträgt (**Abb. 31: A1**) [99]. Dieser Prozess zeichnet sich durch eine vermehrte Sekretion des seneszenzassoziierten sekretorischen Phänotyps (SASP) aus, der u. a. IL-6, IL-8, TGF- β 1 und IL-1 β umfasst. Aufgrund der profibrotischen und proinflammatorischen Eigenschaften dieser Stoffe sehen die Autoren den beschriebenen Seneszenzmechanismus als zentral für die sympathoadrenerge Genese von renaler Fibrose an [99]. Es ist aber erwähnenswert, dass der seneszenzassoziierten sekretorische Phänotyp seine Wirkung nicht notwendigerweise unabhängig von IL-17A vermittelt. So stört IL-6 bspw. das T_H17/T_{REGS}-Gleichgewicht [166]. Zudem spielen IL-6, IL-1 β und TGF- β 1 eine wichtige Rolle in der Differenzierung von T_H17-Zellen (**Vgl.: Abb. 7**) [126, 132]. Ein weiterer α_2 -AR-vermittelter Mechanismus, der renale Fibrose fördert, ist die >epithelial-to-mesenchymal transition<, die Tubuluszellen unter Stimulierung mit TGF- β durchlaufen (**Abb. 31: A2**) [71, 79]. Überdies führt NA via dem α_2 -AR zur Apoptose von Tubulusepithelzellen. Der resultierende Zelldebris wird von Makrophagen phagozytiert, was zur Sekretion proinflammatorischer Zytokine und Aktivierung lokaler Fibrozyten führt (**Abb. 31: A3**) [71, 175].

In einer Studie von 2014 untersuchte Eriguchi et al. die Rolle des lokalen RAS im Zwischenspiel mit sympathoadrenergen Pathomechanismen des kardioresnalen Syndroms [48]. Die Erkrankung wurde in einer Rattenpopulation über die Administration eines NO-Synthase-Hemmers (N^ω-Nitro-L-Arginin-Methyl-Ester; L-NAME) induziert, wobei eine Gruppe eine Scheinoperation erhielt, eine Gruppe bilateral denerviert wurde und eine dritte Gruppe mit Hydralazin zur reinen Blutdrucksenkung behandelt wurde. Es zeigte sich, dass die placebobehandelten L-NAME-Tiere nach 10 Wochen eine ausgeprägte LVH, sowie eine kardioresnale Fibrose aufwiesen. Zudem kam es in beiden Organen zu einer signifikanten Zunahme des lokalen RAS, gemessen an den Proteinleveln von Angiotensinogen (AGT) und Angiotensin II (ATII). Durch RDN, nicht aber durch eine reine Hydralazingabe, konnten sowohl die kardioresnalen Schäden als auch die Level des lokalen RAS signifikant verringert werden. Diese Ergebnisse weisen auf einen blutdruckunabhängigen sympathoadrenergen Pathomechanismus hin, der über das lokale

RAS vermittelt wird (**Abb. 31: B**). Weiterhin konnte Eriguchi et al. über ein zusätzliches Protokoll mit einseitiger RDN zeigen, dass das intrarenale RAS direkt durch den renalen sympathischen Nerv reguliert ist. Wie in **Abschnitt 2.6.3** beschrieben fand Zubcevic et al., dass ATII zu einer Zunahme von T_H17-Zellen und IL-17A führt, wennauch unklar ist, ob dieser Effekt auch blutdruckunabhängig auftritt [199]. Auch in diesem Fall könnte eine synergistische Beziehung zwischen dem lokalen RAS und IL-17A bestehen, die weiterer Untersuchungen bedarf.

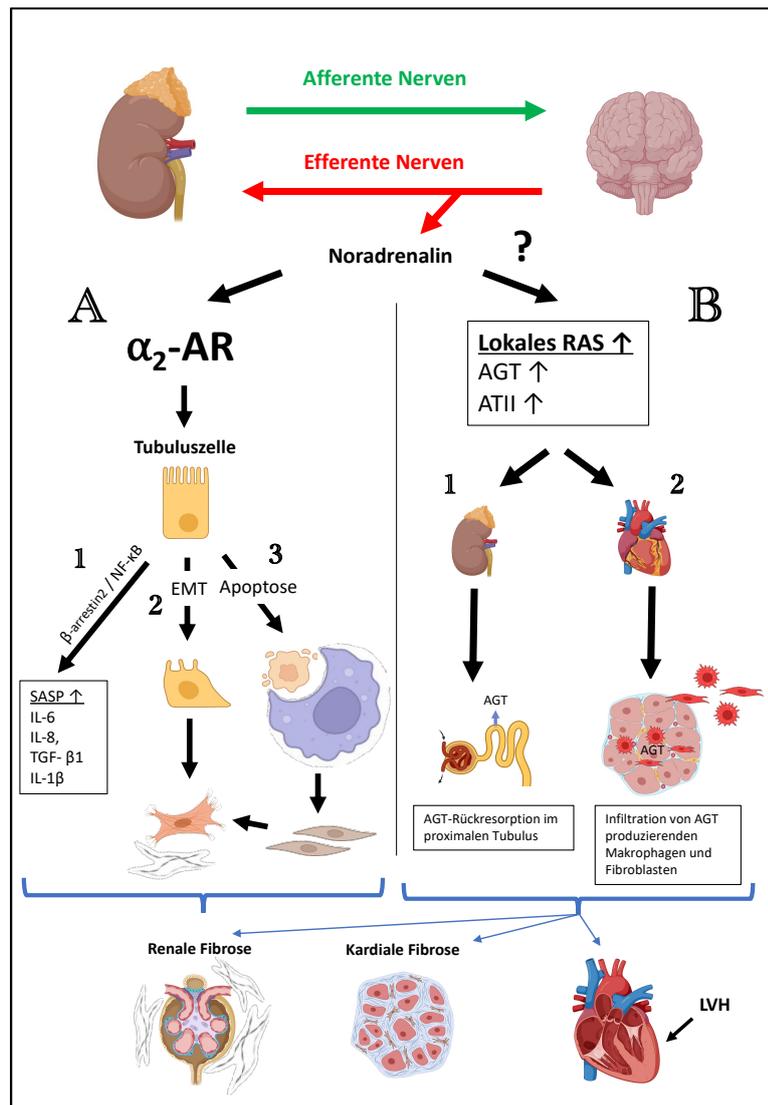


Abbildung 31: Blutdruckunabhängige, sympathoadrenerge Pathomechanismen des CKD-Phänotyps. (Erzeugt mit BioRender.com)

A: Mechanismen die über den α_2 -AR zu renaler Fibrose führen. (1) α_2 -AR / β -arrestin2 / NF- κ B-Pathway (2) EMT von Tubulusepithelzellen (3) Apoptose von Tubulusepithelzellen mit Phagozytose und profibrotischer Sekretion durch Makrophagen.

B: Mechanismus des lokalen RAS, der zu LVH und kardialer Fibrose beiträgt. (1) intrarenales RAS (Rückresorption von zirkulierendem AGT) (2) intrakardiales RAS (Infiltration von AGT produzierenden Makrophagen und Fibroblasten) [48].

Abkürzungen: α_2 -AR = α_2 -Adrenorezeptor; ATII = Angiotensin II; AGT = Angiotensinogen; EMT = »epithelial-to-mesenchymal transition«; IL = Interleukin; NF- κ B = »nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells«; RAS = Renin-Angiotensin-System; SASP = Seneszenzassoziierter sekretorischer Phänotyp; TGF- β 1 = Transforming Growth Factor- β 1.

5.4 Pathogenetischer Synergismus von Sympathikus und IL-17A im CKD-Phänotyp

Die in **Abschnitt 4.2.1** präsentierten in-vitro-Daten zeigen, dass ein sympathoadrenerger Stimulus über einen β_2 -vermittelten Mechanismus zu Steigerung der IL-17A-Produktion in mononukleären Zellen und Kardiomyoblasten führt. Außerdem konnten wir feststellen, dass die Tiere der Adeningruppe nach 16 Wochen signifikant erhöhte IL-17A-Level im Nierenparenchym aufwiesen, während sich ein ähnlicher, wenngleich nicht signifikanter, Trend für das LV-Myokard abzeichnete (**Vgl.: Abschnitt 4.2.2**). Die RDN konnte den intrarenalen Anstieg der IL-17A-Spiegel verhindern. Den linksventrikulären IL-17A-Gehalt senkte sie sogar signifikant unter das Niveau der Kontrolltiere. Interessanterweise zeigten die plasmatischen IL-17A-Spiegel nur tendenzielle Unterschiede zwischen den Gruppen, jedoch wies die Adenin-RDN-Gruppe einen markanten Anstieg von urinärem IL-17A auf. Ferner liefert die IL-17A/CD3-Co-Immunofärbung (**Vgl.: Abschnitt 4.2.3**) sowie die Zählung der CD3⁺IL-17A⁺-Zellen die Information, dass sympathoadrenerge Aktivität das renale IL-17A in Anwesenheit von CD3⁺IL-17A⁺-Zellen steigert, während dieser Anstieg im LV weitestgehend in Abwesenheit dieser Zellen stattfindet und am ehesten auf eine myozytäre Produktion zurückzuführen ist.

Aus diesen Befunden ergeben sich zwei wesentliche Fragen: (1) Was sind die Quellen, des überschüssigen IL-17A in den jeweiligen Endorganen der CKD-Tiere und über welchen Mechanismen steigert das sympathoadrenerge System das Vorkommen und die Aktivität dieser Quellen? (2) Welchen Einfluss nimmt das sympathoadrenerge System auf die renale Ausscheidung von IL-17A?

5.4.1 Renale und kardiale Quellen von sympathisch reguliertem IL-17A im CKD-Ratten-Modell

5.4.1.1 Renale Quellen von IL-17A

Die Kombination der in **Abschnitt 4.2.3** gezeigten Bilder und der zugehörigen Zellzählung (**Vgl.: Abb. 27**) zeigen, dass CD3⁺IL-17A⁺-Zellen eine der sympathisch regulierten renalen Quellen von IL-17A darstellen. Ferner ist ersichtlich, dass die Tubulusepithelzellen der CKD-Ratten große Mengen an zytosolischem IL-17A aufweisen. Eine wichtige Frage, die unsere Untersuchungen nicht adressieren konnten, bezieht sich auf die spezifischen Subgruppen von CD3⁺IL-17A⁺-Zellen und deren jeweiligen Anteil an der IL-17A-Produktion. Während die T_H17-Zellen im Allgemeinen als Hauptproduzent des

Zytokins gelten, gibt es Hinweise darauf, dass unkonventionelle T-Zell-Subgruppen im IL-17A-vermittelten Pathomechanismus der CKD eine entscheidende Rolle spielen könnten. So stellte Peng et al. in einem murinen UUO-Modell fest, dass sowohl T_H17-Zellen als auch $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten an renaler Fibrogenese via RANTES beteiligt sind (**Vgl.: Abb. 8**) [142]. Auch in der Progression von humaner renaler Fibrose und CKD wurde die Rolle der $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten hervorgehoben, die weiterhin, wie die von uns angefärbten CD3⁺IL-17A⁺-Zellen, häufig in Nachbarschaft von Tubulusepithelzellen zu finden sind [76, 89]. Es bedarf daher weiterer Arbeiten, die die Anteile dieser beiden und ggf. anderer Zellgruppen an der IL-17A-Last aufklären und zeigen, welche spezifischen Zellen durch sympathoadrenerge Signale zur renalen Infiltration bzw. IL-17A-Produktion getriggert werden.

Eine weitere mögliche Quelle des renalen IL-17A sind parenchymatöse Zellen. Orejudo et al. postulierte in einer Arbeit von 2019, dass es bislang keine Belege für die Produktion von IL-17A durch parenchymatöse Nierenzellen gebe, obwohl einige dieser Zellen IL-17R besitzen (u. a. Tubulusepithelzellen, Endothelzellen, Fibroblasten) und auf das Zytokin mit der Produktion zahlreicher proinflammatorischer Stoffe (u. a. MCP-1, RANTES, CXCL1, CXCL8) reagieren [136]. Dieser Aussage widersprechen die Befunde von Loverre et al., dessen Arbeitsgruppe 2011 in einem in-vitro-Experiment zeigen konnte, dass Tubulusepithelzellen auf Stimulation mit dem Komplementfaktor C3a mit der Produktion von IL-17A reagieren, ein über die Phosphorylierung von JAK2 vermittelter Mechanismus. Daraus ergibt sich die Frage, ob das starke IL-17A-Signal, das wir in Tubulusepithelzellen beobachten konnten, eine inhärente IL-17A-Produktion dieser Zellen oder lediglich eine Bindung des Zytokins an den IL-17R repräsentiert [108] und ob das starke IL-17A-Signal auch gleichzeitig bedeutet, dass mehr IL-17A filtriert wird.

5.4.1.2 Kardiale Quellen von IL-17A

Im Jahre 2014 konnte die Arbeitsgruppe um Li et al. zeigen, dass eine durch ATII-Infusion provozierte arterielle Hypertonie zu erhöhten kardialen IL-17A-Leveln in Mäusen führte. Zudem konnte Li et al. infiltrierende $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten als Hauptquelle des überschüssigen IL-17A identifizieren [100]. Im Gegensatz dazu wiesen unsere CKD-Ratten weder eine signifikante Hypertension noch relevante kardiale CD3⁺IL-17A⁺-Zellinfiltrate auf. Dies legt nahe, dass das von uns angefärbte IL-17A aus einer intrakardialen Quelle stammt oder aber die Bindung von extrakardial generiertem IL-17A an kardiale Rezeptoren repräsentiert.

5.4. PATHOGENETISCHER SYNERGISMUS VON SYMPATHIKUS UND IL-17A IM CKD-PHÄNOTYP

Unsere in-vitro-Daten zeigen, dass Kardiomyoblasten (H9C2) unter sympathoadrenerger Stimulation IL-17A produzieren und dieser Prozess über den β 2-Adrenozeptor vermittelt wird. Folglich könnte das von uns beobachtete IL-17A in der Adenin-Gruppe plausiblerweise aus Kardiomyozyten stammen. Hierbei gilt es jedoch zu beachten, dass die Kardiomyoblasten der H9C2-Linie relevante strukturelle Unterschiede zu adulten Kardiomyozyten aufweisen. So stellte Bathe-Peters et al. fest, dass sich durch die Formierung eines Systems von Transversaltubuli (T-Tubuli), die mit der Reifung zu adulten Kardiomyozyten einhergeht, die Verteilung von β 2-Adrenozeptoren von der äußeren Plasmamembran der Zellen vollständig hin zu den T-Tubuli verschiebt [10]. Dieser Effekt wird aufgehoben, sobald es zu einer Überexpression von β 2-Adrenozeptoren kommt. Inwiefern sich eine CKD auf die kardiale Expression des β 2-Adrenozeptors auswirkt, ist bislang nicht bekannt. Unklar ist auch, inwiefern die Verschiebung der Rezeptoren ins T-Tubuli-System Einfluss auf die Rezeptorfunktion nimmt [10].

Kardiale Fibroblasten könnten eine weitere intrakardiale IL-17A-Quelle darstellen. In einem in-vitro-Modell der diabetischen Kardiomyopathie zeigte Qi et al., dass sowohl primäre Kardiomyozyten, als auch – in signifikant höherem Maße – Kardiofibroblasten auf hohe Glukosekonzentrationen mit der Produktion von IL-17A reagieren. Zukünftige Studien könnten untersuchen, ob Kardiofibroblasten auch auf eine urämische Kardiomyopathie mit gesteigerter IL-17-Produktion reagieren könnten. Eine dritte Erklärung ist, dass die immunhistochemischen Färbungen extrakardial generiertes, rezeptorgebundenes IL-17A zeigen. Beispielsweise bestätigte Liu et al. in einer Studie von 2012, dass kardiale Fibroblasten IL-17RA/IL-17RC aufweisen und somit eine mögliche Bindungsstelle für IL-17A bieten [105].

5.4.2 Einfluss des sympathoadrenergen Systems auf die renale Ausscheidung von IL-17A

Interessanterweise zeigten unsere Untersuchungen, dass die Adenin-RDN-Gruppe deutlich erhöhte IL-17A-Level im Urin aufwies (**Vgl.: Abb. 26**), während sich der urinäere IL-17A-Spiegel von Adenin- und Kontrollgruppe kaum unterschied und sehr niedrig war. Dieser Umstand könnte teilweise die verringerte systemische IL-17A-Last nach RDN und die damit assoziierte Linderung der CKD-Endorganschäden erklären. Hinsichtlich des Mechanismus, durch den das sympathische Nervensystem die renale IL-17A-Ausscheidung modulieren könnte, kommen mehrere Hypothesen in Frage:

Einerseits wäre es denkbar, dass die CKD mit einer stark eingeschränkten Nierenfunktion einhergeht, die durch die RDN teilweise wiederhergestellt würde, sodass überschüssiges

IL-17A nach dem Eingriff vermehrt ausgeschieden wird. Allerdings konnte Hohl et al. im gleichen CKD-Rattenmodell zeigen, dass sich die Retentionsparameter der beiden Gruppen nach 16 Wochen nicht signifikant unterschieden [70], was die Nierenfunktion als ursächlichen Mechanismus unwahrscheinlich macht. Alternativ könnte ein renaler Rückresorptionsmechanismus für IL-17A existieren, der durch den Eingriff der RDN aufgehoben wird. Diese Theorie wäre kompatibel mit unserer Beobachtung eines starken IL-17A-Signals in den Zytosolen der Tubulusepithelzellen (**Vgl.: Abb. 29: A*2**). So könnte die Sympathikolyse zur Folge haben, dass die Tubulusepithelzellen ihre Fähigkeit verlieren, IL-17A aus dem Tubuluslumen rückzuresorbieren und in die Kapillaren zu transportieren. Gleichwohl wäre in diesem Fall eine größere Differenz in den Plasmaspiegeln von IL-17A, vor und nach RDN zu erwarten (**Vgl.: Abb. 28**). Eine dritte Hypothese stützt sich auf die Ergebnisse von Matsumoto et al., der feststellte, dass nephrotische Patienten mit IgA-Nephropathie oder Minimal-Change-Glomerulonephritis deutlich erhöhte urinaire IL-17-Level aufweisen [122]. Es gibt jedoch weder Berichte noch einen Anhalt für ein durch RDN ausgelöstes nephrotisches Syndrom mit assoziierter IL-17A-Ausscheidung. Im Gegenteil, Ott et al. konnten zeigen, dass der Eingriff der RDN einer Albuminurie sogar entgegenwirkt [139].

Unsere Beobachtungen machen deutlich, dass es weiterer Studien bedarf, um zu klären, auf welche Weise RDN den Anstieg von IL-17A im Urin verursachen könnte und ob dies in einem kausalen Zusammenhang mit der Linderung von CKD-Endorganschäden steht.

5.5 Ausblick

Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse unterstreichen die zentrale Bedeutung der Schnittstelle zwischen dem sympathischen Nervensystem und dem pleiotropen und pathogenetisch bedeutsamen IL-17A im Kontext der CKD.

Unsere Beobachtungen tragen zur Aufdeckung kausaler Zusammenhänge und Synergien zwischen diesen relevanten Einflussgrößen bei CKD bei, was das Verständnis der Erkrankung vertiefen und hypothesengenerierend zukünftige Untersuchungen anstoßen und unterstützen könnte, um letztendlich gezielte und kausal wirksame Behandlungsmöglichkeiten für die CKD und ihre mannigfaltigen Endorganschäden zu entwickeln.

Literaturverzeichnis

- [1] Adamczak M, Zeier M, Dikow R, Ritz E (2002) Kidney and hypertension. *Kidney Int* 61:62–67
- [2] Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, Sauvage FJD, Gurney AL (2003) Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem* 278:1910–1914
- [3] Ahlquist RP, Augusta F (1973) Isoproterenol in cardiology. *Am Heart J* 86:149–151
- [4] Aktories K, Förstermann U, Starke K, Hofmann FB, et al. (2017) *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie: Begründet von W. Forth, D. Henschler, W. Rummel. Elsevier Health Sciences*
- [5] Alhaj E, Alhaj N, Rahman I, Niazi TO, Berkowitz R, Klapholz M (2013) Uremic cardiomyopathy: An underdiagnosed disease. *Congest Heart Fail* 19:E40–5
- [6] Amatya N, Garg AV, Gaffen SL (2017) IL-17 Signaling: The Yin and the Yang. *Trends Immunol* 38:310–322
- [7] Baldeviano GC, Barin JG, Talor MV, Srinivasan S, Bedja D, Zheng D, Gabrielson K, Iwakura Y, Rose NR, Cihakova D (2010) Interleukin-17A is dispensable for myocarditis but essential for the progression to dilated cardiomyopathy. *Circ Res* 106:1646–1655
- [8] Bao J, Lu Y, She Q, Dou W, Tang R, Xu X, Zhang M, Zhu L, Zhou Q, Li H, et al. (2021) MicroRNA-30 regulates left ventricular hypertrophy in chronic kidney disease. *JCI Insight* 6:e138027
- [9] Barberato SH, Mantilla DE, Misocami M, Gonçalves SM, Bignelli AT, Riella MC, Pecoits-Filho R (2004) Effect of preload reduction by hemodialysis on left atrial volume and echocardiographic Doppler parameters in patients with end-stage renal disease. *American Journal of Cardiology* 94:1208–1210
- [10] Bathe-Peters M, Gmach P, Boltz HH, Einsiedel J, Gotthardt M, Hübner H, Gmeiner P, Lohse MJ, Annibale P (2021) Visualization of β -adrenergic receptor dynamics and differential localization in cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118:e2101119118
- [11] Bell-Reuss E, Trevino DL, Gottschalk CW (1976) Effect of renal sympathetic nerve stimulation on proximal water and sodium reabsorption. *J Clin Invest* 57:1104–1107
- [12] Blaschke TF, Osterberg L, Vrijens B, Urquhart J (2012) Adherence to medications: Insights arising from studies on the unreliable link between prescribed and actual drug dosing histories. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 52:275–301
- [13] Bolle G, Dollinger CC, Boutaud L, Guillemot D, Bensman A, Harambat JRM, Deteix P, Daudon M, Knebelmann B, Ceballos-Picot IN (2010) Phenotype and Genotype Characterization of Adenine Phosphoribosyltransferase Deficiency. *J Am Soc Nephrol* 21:679–688

- [14] Brandes R, Lang F, Schmidt RF (2019) *Physiologie des Menschen : mit Pathophysiologie*. 32. Auflage edition Springer, Berlin
- [15] Brandt MC, Mahfoud F, Reda S, Schirmer SH, Erdmann E, Böhm M, Hoppe UC (2012) Renal sympathetic denervation reduces left ventricular hypertrophy and improves cardiac function in patients with resistant hypertension. *J Am Coll Cardiol* 59:901–909
- [16] Brocker T, Peter A, Traunecker A, Karjalainen K (1993) New simplified molecular design for functional T cell receptor. *Eur J Immunol* 23:1435–1439
- [17] Bruch C, Rothenburger M, Gotzmann M, Wichter T, Scheld HH, Breithardt G, Gradaus R (2007) Chronic kidney disease in patients with chronic heart failure - Impact on intracardiac conduction, diastolic function and prognosis. *Int J Cardiol* 118:375–380
- [18] Buchtler S, Grill A, Hofmarksrichter S, Stöckert P, Schiechl-Brachner G, Gomez MR, Neumayer S, Schmidbauer K, Talke Y, Klinkhammer BM, et al. (2018) Cellular Origin and Functional Relevance of Collagen I Production in the Kidney. *J Am Soc Nephrol* 29:1859–1873
- [19] Böhm M, Kario K, Kandzari DE, Mahfoud F, Weber MA, Schmieder RE, Tsioufis K, Pocock S, Konstantinidis D, Choi JW, et al. (2020) Efficacy of catheter-based renal denervation in the absence of antihypertensive medications (SPYRAL HTN-OFF MED Pivotal): a multicentre, randomised, sham-controlled trial. *The Lancet* 395:1444–1451
- [20] Böhm M, Lauder L (2021) Blood pressure and renal denervation with ultrasound: another step forward. *The Lancet* 397:2441–2443
- [21] Calhoun DA, Jones D, Textor S, Goff DC, Murphy TP, Toto RD, White A, Cushman WC, White W, Sica D, et al. (2008) Resistant Hypertension: Diagnosis, Evaluation, and Treatment: A Scientific Statement From the American Heart Association Professional Education Committee of the Council for High Blood Pressure Research. *Circulation* 117:e510–526
- [22] Cameron JS (2006) Uric Acid and Renal Disease. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 25:1055–1064
- [23] Campese VM, Kogosov E, Koss M (1995) Renal Afferent Denervation Prevents the Progression of Renal Disease in the Renal Ablation Model of Chronic Renal Failure in the Rat. *Am J Kidney Dis* 26:861–865
- [24] Chan JKC (2014) The Wonderful Colors of the Hematoxylin-Eosin Stain in Diagnostic Surgical Pathology. *Int J Surg Pathol* 22:12–32
- [25] Chen M, Arcari L, Engel J, Freiwald T, Platschek S, Zhou H, Zainal H, Buettner S, Zeiher AM, Geiger H, et al. (2019) Aortic stiffness is independently associated with interstitial myocardial fibrosis by native T1 and accelerated in the presence of chronic kidney disease. *Int J Cardiol Heart Vasc* 24:100389
- [26] Chiasson VL, Pakanati AR, Hernandez M, Young KJ, Bounds KR, Mitchell BM (2017) Regulatory T-Cell Augmentation or Interleukin-17 Inhibition Prevents Calcineurin Inhibitor-Induced Hypertension in Mice. *Hypertension* 70:183–191
- [27] Choong CY, Abascal VM, Thomas JD, Guerrero JL, Mcglew S, Weyman AE (1988) Combined Influence of Ventricular Loading and Relaxation on the Transmitral

- Flow Velocity Profile in Dogs Measured by Doppler echocardiography. *Circulation* 78:672–683
- [28] Chow CK, Teo KK, Rangarajan S, Islam S, Gupta R, Avezum A, Bahonar A, Chifamba J, Dagenais G, Diaz R, et al. (2013) Prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension in rural and urban communities in high-, middle-, and low-income countries. *JAMA* 310:959–968
- [29] Chung BH, Kim KW, Sun IO, Choi SR, Park HS, Jeon EJ, Kim BM, Choi BS, Park CW, Kim YS, et al. (2012) Increased interleukin-17 producing effector memory T cells in the end-stage renal disease patients. *Immunol Lett* 141:181–189
- [30] Clevers H, Alarcon B, Wileman T, Terhorst C (1988) THE T CELL RECEPTOR/CD3 COMPLEX: A DYNAMIC PROTEIN ENSEMBLE. *Annu Rev Immunol* 6:629–662
- [31] Collaboration NRF (2017) Worldwide trends in blood pressure from 1975 to 2015: a pooled analysis of 1479 population-based measurement studies with 19.1 million participants. *The Lancet* 389:37–55
- [32] Converse RJ, Jacobsen T, Toto R, Jost C, Cosentino F, Fouat-Tarazi F, Victor R (1992) Sympathetic Overactivity in Patients with Chronic Renal Failure. *N Engl J Med* 327:1912–1918
- [33] Cortvrindt C, Speeckaert R, Moerman A, Delanghe JR, Speeckaert MM (2017) The role of interleukin-17A in the pathogenesis of kidney diseases. *Pathology* 49:247–258
- [34] Coto E, Gómez J, Suárez B, Tranche S, Díaz-Corte C, Ortiz A, Ruiz-Ortega M, Coto-Segura P, Batalla A, López-Larrea C (2015) Association between the IL17RA rs4819554 polymorphism and reduced renal filtration rate in the Spanish RENASTUR cohort. *Hum Immunol* 76:75–78
- [35] Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B, Lucian L, To W, Kwan S, Churakova T, et al. (2003) Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 421:744–748
- [36] Cua DJ, Tato CM (2010) Innate IL-17-producing cells: The sentinels of the immune system. *Nat Rev Immunol* 10:479–489
- [37] Daugherty SL, Powers JD, Magid DJ, Tavel HM, Masoudi FA, Margolis KL, O’connor PJ, Selby JV, Ho PM (2012) Incidence and Prognosis of Resistant Hypertension in Hypertensive Patients. *Circulation* 125:1635–1642
- [38] del Rosario Espinoza Mora M, Böhm M, Link A (2014) The Th17/Treg imbalance in patients with cardiogenic shock. *Clin Res Cardiol* 103:301–313
- [39] Devereux RB, Alonso DR, Lutas EM, Gottlieb GJ, Sachs I, Reichek N (1986) Echocardiographic Assessment of Left Ventricular Hypertrophy: Comparison to Necropsy Findings. *Am J Cardiol* 57:450–458
- [40] Devereux RB, Reichek N, Klunder J (1977) Echocardiographic Determination of Left Ventricular Mass in Man: Anatomic Validation of the Method. With the technical assistance of Patricia J. Klunder. *Circulation* 55:613–618
- [41] Dibona GF (2000) Nervous Kidney Interaction Between Renal Sympathetic Nerves and the Renin-Angiotensin System in the Control of Renal Function Colin Johnston-A Celebration. *Hypertension* 36:1083–1088

- [42] DiBona GF (2005) Physiology in perspective: The Wisdom of the Body. Neural control of the kidney. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289:R633–641
- [43] DiBona GF, Esler M (2010) Translational medicine: The antihypertensive effect of renal denervation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 298:R245–253
- [44] DiBona GF, Kopp UC (1997) Neural Control of Renal Function. *Physiol Rev* 77:75–197
- [45] Diwan V, Brown L, Gobe GC (2018) Adenine-induced chronic kidney disease in rats. *Nephrology (Carlton)* 23:5–11
- [46] Diwan V, Mistry A, Glenda G, Brown L (2013) Adenine-induced chronic kidney and cardiovascular damage in rats. *J Pharmacol Toxicol Methods* 68:197–207
- [47] Elsinga PH, Waarde AV, Visser GM, Vaalburg W (1994) Adrenoceptor Ligand for PET. *Nucl Med Biol* 21:211–217
- [48] Eriguchi M, Tsuruya K, Haruyama N, Yamada S, Tanaka S, Suehiro T, Noguchi H, Masutani K, Torisu K, Kitazono T (2015) Renal denervation has blood pressure-independent protective effects on kidney and heart in a rat model of chronic kidney disease. *Kidney Int* 87:116–127
- [49] Etehad D, Emdin CA, Kiran A, Anderson SG, Callender T, Emberson J, Chalmers J, Rodgers A, Rahimi K (2016) Blood pressure lowering for prevention of cardiovascular disease and death: A systematic review and meta-analysis. *Lancet* 387:957–967
- [50] Feng W, Li W, Liu W, Wang F, Li Y, Yan W (2009) IL-17 induces myocardial fibrosis and enhances RANKL/OPG and MMP/TIMP signaling in isoproterenol-induced heart failure. *Exp Mol Pathol* 87:212–218
- [51] Fogo AB (1999) Mesangial Matrix Modulation and Glomerulosclerosis. *Exp Nephrol* 7:147–159
- [52] Forouzanfar MH, Liu P, Roth GA, Ng M, Biryukov S, Marczak L, Alexander L, Estep K, Abate KH, Akinyemiju TF, et al. (2017) Global Burden of Hypertension and Systolic Blood Pressure of at Least 110 to 115 mm Hg, 1990-2015. *JAMA* 317:165–182
- [53] Fossiez F (1996) T Cell Interleukin-17 Induces Stromal Cells to Produce Proinflammatory and Hematopoietic Cytokines. *J Exp Med* 183:2593–2603
- [54] Franczyk-Skora B, Gluba A, Olszewski R, Banach M, Rysz J (2014) Heart function disturbances in chronic kidney disease - Echocardiographic indices. *Archives of Medical Science* 10:1109–1116
- [55] Gaffen SL (2009) Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nat Rev Immunol* 9:556–567
- [56] Gagliardi AC, Miname MH, Santos RD (2009) Uric acid: A marker of increased cardiovascular risk. *Atherosclerosis* 202:11–17
- [57] Garcia MJ, Thomas JD, Klein AL, Cleveland F (1998) New Doppler Echocardiographic Applications for the Study of Diastolic Function. *JACC* 32:865–75
- [58] Gavras I, Gavras H (2001) Role of α 2-adrenergic receptors in hypertension *American journal of hypertension* 14(S3):171S–177S

- [59] Glasscock RJ, Pecoits-Filho R, Barberato SH (2009) Left ventricular mass in chronic kidney disease and ESRD. *Clin J Am Soc Nephrol* 4:79–91
- [60] Grassi G, Dell’Oro R, Quarti-Trevano F, Scopelliti F, Seravalle G, Paleari F, Gamba PL, Mancia G (2005) Neuroadrenergic and reflex abnormalities in patients with metabolic syndrome. *Diabetologia* 48:1359–1365
- [61] Grassi G, Mark A, Esler M (2015) The Sympathetic Nervous System Alterations in Human Hypertension. *Circ Res* 116:976–990
- [62] Grassi G, Seravalle G, Ghiadoni L, Tripepi G, Bruno RM, Mancia G, Zoccali C (2011) Sympathetic nerve traffic and asymmetric dimethylarginine in chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 6:2620–2627
- [63] Gupta J, Dominic EA, Fink JC, Ojo AO, Barrows IR, Reilly MP, Townsend RR, Joffe MM, Rosas SE, Wolman M, et al. (2015) Association between inflammation and cardiac geometry in chronic kidney disease: Findings from the CRIC study. *PLoS ONE* 10:e0124772
- [64] Haider AW, Larson MG, Benjamin EJ, Levy D (1998) Increased Left Ventricular Mass and Hypertrophy Are Associated With Increased Risk for Sudden Death. *J Am Coll Cardiol* 32:1454–1459
- [65] Hameed MA, Dasgupta I (2017) Renal denervation. *Adv Exp Med Biol* 956:261–277
- [66] Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT (2005) Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 6:1123–1132
- [67] Hausberg M, Kosch M, Harmelink P, Barenbrock M, Hohage H, Kisters K, Dietl KH, Rahn KH (2002) Sympathetic nerve activity in end-stage renal disease. *Circulation* 106:1974–1979
- [68] Hering D, Mahfoud F, Walton AS, Krum H, Lambert GW, Lambert EA, Sobotka PA, Böhm M, Cremers B, Esler MD, et al. (2012) Renal denervation in moderate to severe CKD. *J Am Soc Nephrol* 23:1250–1257
- [69] Hescheler J, Meyer R, Plant S, Krautwurst D, Rosenthal W, Schultz G (1991) Morphological, Biochemical, and Electrophysiological Characterization of a Clonal Cell (H9c2) Line From Rat Heart. *Circ Res* 69:1476–1486
- [70] Hohl M, Selejan SR, Wintrich J, Lehnert U, Speer T, Schneider C, Mauz M, Markwirth P, Wong DW, Boor P, et al. (2022) Renal Denervation Prevents Atrial Arrhythmogenic Substrate Development in CKD. *Circ Res* 130:814–828
- [71] Jang HS, Kim J, Padanilam BJ (2019) Renal sympathetic nerve activation via α 2-adrenergic receptors in chronic kidney disease progression. *Kidney Res Clin Pract* 38:6–14
- [72] Jankowski J, Floege J, Fliser D, Böhm M, Marx N (2021) Cardiovascular Disease in Chronic Kidney Disease: Pathophysiological Insights and Therapeutic Options. *Circulation* 143:1157–1172
- [73] Johnson RJ, Floege J, Yoshimura A, Iida H, Couser WG, Alpers CE (1992) The Activated Mesangial Cell: A Glomerular "Myofibroblast"?. *J Am Soc Nephrol* 2:190–197

- [74] Junqueira LCU, Bignolas G, Brentani RR (1979) Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J* 11:447–455
- [75] Kaesler N, Babler A, Floege J, Kramann R (2020) Cardiac remodeling in chronic kidney disease. *Toxins (Basel)* 12:161
- [76] Kaminski H, Couzi L, Eberl M (2021) Unconventional T cells and kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 17:795–813
- [77] Katz AM, Editor G, Weber KT, Chicago F (1989) Cardiac Interstitium in Health and Disease: The Fibrillar Collagen Network. *J Am Coll Cardiol* 13:1637–52
- [78] Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK, He J (2005) Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet* 365:217–223
- [79] Kim J, Padanilam BJ (2013) Renal nerves drive interstitial fibrogenesis in obstructive nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 24:229–242
- [80] Kim YG, Kim EY, Ihm CG, Lee TW, Lee SH, Jeong KH, Moon JY, Chung JH, Kim YH (2012) Gene polymorphisms of interleukin-17 and interleukin-17 receptor are associated with end-stage kidney disease. *Am J Nephrol* 36:472–477
- [81] Kimes BW, Brandt BL (1976) Properties of a clonal muscle cell line from rat heart. *Exp Cell Res* 98:367–381
- [82] Kiuchi MG, Maia GLM, Carreira MAMDQ, Kiuchi T, Chen S, Andrea BR, Graciano ML, Lugon JR (2013) Effects of renal denervation with a standard irrigated cardiac ablation catheter on blood pressure and renal function in patients with chronic kidney disease and resistant hypertension. *Eur Heart J* 34:2114–2121
- [83] Kleinewietfeld M, Manzel A, Titze J, Kvakan H, Yosef N, Linker RA, Muller DN, Hafler DA (2013) Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic TH 17 cells. *Nature* 496:518–522
- [84] Kopp UC (2015) Role of renal sensory nerves in physiological and pathophysiological conditions. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 308:79–95
- [85] Korn T, Bettelli E, Gao W, Awasthi A, Jäger A, Strom TB, Oukka M, Kuchroo VK (2007) IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T H17 cells. *Nature* 448:484–487
- [86] Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK (2009) IL-17 and Th17 cells. *Annu Rev Immunol* 27:485–517
- [87] Kuhns MS, Davis MM, Garcia KC (2006) Deconstructing the form and function of the TCR/CD3 complex. *Immunity* 24:133–139
- [88] Lang CL, Wang MH, Hung KY, Hsu SH, Chiang CK, Lu KC (2014) Clinical Study Correlation of Interleukin-17-Producing Effector Memory T Cells and CD4⁺CD25⁺Foxp3 Regulatory T Cells with the Phosphate Levels in Chronic Hemodialysis Patients. *ScientificWorldJournal* 2014:593170
- [89] Law BMP, Wilkinson R, Wang X, Kilday K, Lindner M, Beagley K, Healy H, Kassianos AJ (2019) Effector $\gamma\delta$ T cells in human renal fibrosis and chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 34:40–48

- [90] Lee WW, Kang SW, Choi J, Lee SH, Shah K, Eynon EE, Flavell RA, Kang I (2010) Regulating human Th17 cells via differential expression of IL-1 receptor. *Blood* 115:530–540
- [91] Lehnert UM (2021) Einfluss einer gesteigerten neurohumoralen Aktivierung bei chronischer Niereninsuffizienz auf die Entstehung eines atrialen arrhythmogenen Substrats. Homburg/Saar
- [92] Leimbach WN, Wallin BG, Victor RG, Aylward PE, Sundlof G, Mark AL (1986) Direct evidence from intraneural recordings for increased central sympathetic outflow in patients with heart failure. *Circulation* 73:913–919
- [93] Leon ALD, Rojkind M (1985) A Simple Micromethod for Collagen and Total Protein Determination in Formalin-fixed Paraffin-embedded Sections¹. *J Histochem Cytochem* 33:737–743
- [94] Levey AS, Coresh J (2012) Chronic kidney disease. *Lancet* 379:165–180
- [95] Levey AS, Coresh J, Bolton K, Culleton B, Harvey KS, Ikizler TA, Johnson CA, Kausz A, Kimmel PL, Kusek J, et al. (2002) K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis* 39:1–266
- [96] Levey AS, Eckardt KU, Tsukamoto Y, Levin A, Coresh J, Rossert J, Zeeuw DD, Hostetter TH, Lameire N, Eknoyan G (2005) Definition and classification of chronic kidney disease: A position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int* 67:2089–2100
- [97] Levy D, Anderson KM, Savage DD, Balkus SA, Kannel WB, Castelli WP (1987) Risk of Ventricular Arrhythmias in left Ventricular Hypertrophy: The Framingham Heart Study. *Am J Cardiol* 60:560–565
- [98] Li J, Casanova JL, Puel A (2018) Mucocutaneous IL-17 immunity in mice and humans: Host defense vs. excessive inflammation. *Mucosal Immunol* 11:581–589
- [99] Li Q, Deng Y, Liu L, Zhang C, Cai Y, Zhang T, Han M, Xu G (2022) Sympathetic Denervation Ameliorates Renal Fibrosis via Inhibition of Cellular Senescence. *Front Immunol* 12:823935
- [100] Li Y, Wu Y, Zhang C, Li P, Cui W, Hao J, Ma X, Yin Z, Du J (2014) $\gamma\delta$ T Cell-Derived Interleukin-17A via an Interleukin-1 β -Dependent Mechanism Mediates Cardiac Injury and Fibrosis in Hypertension Heart. *Hypertension* 64:305–314
- [101] Linz D, Mahfoud F, Schotten U, Ukena C, Neuberger HR, Wirth K, Böhm M (2012) Renal Sympathetic Denervation Suppresses Postapneic Blood Pressure Rises and Atrial Fibrillation in a Model for Sleep Apnea. *Hypertension* 60:172–178
- [102] Liu Q, Zhang Q, Wang K, Wang S, Lu D, Li Z, Geng J, Fang P, Wang Y, Shan Q (2015) Renal Denervation Findings on Cardiac and Renal Fibrosis in Rats with Isoproterenol Induced Cardiomyopathy *Sci Rep* 5
- [103] Liu SH, Lo LW, Chou YH, Lin WL, Tsai TY, Cheng WH, Yamada S, Chen SA (2021) Renal denervation prevents myocardial structural remodeling and arrhythmogenicity in a chronic kidney disease rabbit model. *Heart Rhythm* 18:1596–1604
- [104] Liu Y (2011) Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis. *Nat Rev Nephrol* 7:684–696

- [105] Liu Y, Zhu H, Su Z, Sun C, Yin J, Yuan H, Sandoghchian S, Jiao Z, Wang S, Xu H (2012) Il-17 contributes to cardiac fibrosis following experimental autoimmune myocarditis by a PKC β /Erk1/2/NF- κ B-dependent signaling pathway. *Int Immuno* 24:605–612
- [106] Loeffler I, Wolf G (2015) Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Diabetic Nephropathy: Fact or Fiction?. *Cells* 4:631–652
- [107] London GM (2002) Left ventricular alterations and end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 17:29–36
- [108] Loverre A, Tataranni T, Castellano G, Divella C, Battaglia M, Ditonno P, Corcelli M, Mangino M, Gesualdo L, Schena FP, et al. (2011) IL-17 expression by tubular epithelial cells in renal transplant recipients with acute antibody-mediated rejection *Am J Transplant* 11:1248–1259
- [109] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT*. *J Biol Chem* 193:265–275
- [110] Lullo LD, Gorini A, Russo D, Santoboni A, Ronco C (2015) Left Ventricular Hypertrophy in Chronic Kidney Disease Patients: From Pathophysiology to Treatment. *Cardiorenal Med* 5:254–266
- [111] Lv JC, Zhang LX (2019) Prevalence and Disease Burden of Chronic Kidney Disease. *Adv Exp Med Biol* 1165:3–15
- [112] Madhur MS, Lob HE, McCann LA, Iwakura Y, Blinder Y, Guzik TJ, Harrison DG (2010) Interleukin 17 promotes angiotensin II-induced hypertension and vascular dysfunction. *Hypertension* 55:500–507
- [113] Mahfoud F, Böhm M (2010) Interventionelle renale Sympathikusdenervation - Eine Behandlungsoption für Patienten mit therapieresistenter Hypertonie. *Dtsch Med Wochenschr* 135:2422–2425
- [114] Mahfoud F, Böhm M, Schmieder R, Narkiewicz K, Ewen S, Ruilope L, Schlaich M, Williams B, Fahy M, Mancia G (2019) Renal denervation for hypertension: What is needed, and what is next *Eur Heart J* 40:3483–3485
- [115] Mahfoud F, Cremers B, Janker J, Link B, Vonend O, Ukena C, Linz D, Schmieder R, Rump LC, Kindermann I, et al. (2012) Renal hemodynamics and renal function after catheter-based renal sympathetic denervation in patients with resistant hypertension. *Hypertension* 60:419–424
- [116] Mahfoud F, Himmel F, Ukena C, Schunkert H, Böhm M, Weil J (2011) Treatment Strategies for Resistant Arterial Hypertension. *Dtsch Arztebl Int* 108:725–731
- [117] Mahfoud F, Urban D, Teller D, Linz D, Stawowy P, Hassel JH, Fries P, Dreyse S, Wellnhofer E, Böhm M, et al. (2014) Effect of renal denervation on left ventricular mass and function in patients with resistant hypertension: data from a multi-centre cardiovascular magnetic resonance imaging trial. *Eur Heart J* 35:2205–2207
- [118] Majumder S, Mcgeachy MJ (2021) IL-17 in the Pathogenesis of Disease: Good Intentions Gone Awry. *Annu Rev Immunol* 39:537–556
- [119] Manel N, Unutmaz D, Littman DR (2008) The differentiation of human TH-17 cells requires transforming growth factor- β and induction of the nuclear receptor ROR γ t. *Nat Immunol* 9:641–649

- [120] Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, Hatton RD, Wahl SM, Schoeb TR, Weaver CT (2006) Transforming growth factor- β induces development of the T H17 lineage. *Nature* 441:231–234
- [121] Marino F, Cosentino M (2013) Adrenergic modulation of immune cells: An update. *Amino Acids* 45:55–71
- [122] Matsumoto K, Kanmatsutse K (2002) Increased Urinary Excretion of Interleukin-17 in Nephrotic Patients. *Nephron* 91:243–249
- [123] Mehrotra P, Patel JB, Ivancic CM, Collett JA, Basile DP (2015) Th-17 cell activation in response to high salt following acute kidney injury is associated with progressive fibrosis and attenuated by AT-1R antagonism. *Kidney Int* 88:776–784
- [124] Mikolajczyk TP, Guzik TJ (2019) Adaptive Immunity in Hypertension. *Curr Hypertens Rep* 21:68
- [125] Mitter SS, Shah SJ, Thomas JD (2017) A Test in Context E/A and E/e' to Assess Diastolic Dysfunction and LV Filling Pressure. *J Am Coll Cardiol* 69:1451–1464
- [126] Moreau JM, Velegraki M, Bolyard C, Rosenblum MD, Li Z (2022) Transforming growth factor- β 1 in regulatory T cell biology. *Sci Immunol* 7:4613
- [127] Mosmann TR, Coffman RL (1989) TH1 AND TH2 CELLS: Different Patterns of Lymphokine Secretion Lead to Different Functional Properties. *Ann Rev Immunol* 7:145–173
- [128] Murphy AJ, Al-Sharea A, Lee MKS, Whillas A, Michell DL, Shihata WA, Nicholls AJ, Cooney OD, Kraakman MJ, Veiga CB, et al. (2019) Chronic sympathetic driven hypertension promotes atherosclerosis by enhancing hematopoiesis. *Haematologica* 104:456–467
- [129] Nagueh SF, Smiseth OA, Appleton CP, Byrd BF, Dokainish H, Edvardsen T, Flachskampf FA, Gillebert TC, Klein AL, Lancellotti P, et al. (2016) Recommendations for the Evaluation of Left Ventricular Diastolic Function by Echocardiography: An Update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *J Am Soc Echocardiogr* 29:277–314
- [130] Nguyen H, Chiasson VL, Chatterjee P, Kopriva SE, Young KJ, Mitchell BM (2013) Interleukin-17 causes Rho-kinase-mediated endothelial dysfunction and hypertension. *Cardiovasc Res* 97:696–704
- [131] Niedermeier M, Reich B, Gomez MR, Denzel A, Schmidbauer K, Gö N, Talke Y, Schweda F, Mack M CD4⁺ T cells control the differentiation of Gr1⁺ monocytes into fibrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:17892–17897
- [132] Noack M, Miossec P (2014) Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases. *Autoimmun Rev* 13:668–677
- [133] Norlander AE, Saleh MA, Kamat NV, Ko B, Gnecco J, Zhu L, Dale BL, Iwakura Y, Hoover RS, McDonough AA, et al. (2016) Interleukin-17A Regulates Renal Sodium Transporters and Renal Injury in Angiotensin II-Induced Hypertension. *Hypertension* 68:167–174
- [134] Odoni G, Ogata H, Viedt C, Amann K, Ritz E, Orth SR (2002) Cigarette smoke condensate aggravates renal injury in the renal ablation model. *Kidney Int* 61:2090–2098

- [135] Onishi RM, Gaffen SL (2010) Interleukin-17 and its target genes: Mechanisms of interleukin-17 function in disease. *Immunology* 129:311–321
- [136] Orejudo M, Rodrigues-Diez RR, Rodrigues-Diez R, Garcia-Redondo A, Santos-Sánchez L, Rández-Garbayo J, Cannata-Ortiz P, Ramos AM, Ortiz A, Selgas R, et al. (2019) Interleukin 17A participates in renal inflammation associated to experimental and human hypertension. *Front Pharmacol* 10
- [137] Osborn JW, Foss JD (2011) Renal nerves and long-term control of arterial pressure. *Compr Physiol* 7:263–320
- [138] Otsuka T, Suzuki M, Yoshikawa H, Sugi K (2009) Left ventricular diastolic dysfunction in the early stage of chronic kidney disease. *Journal of Cardiology* 54:199–204
- [139] Ott C, Mahfoud F, Schmid A, Ditting T, Veelken R, Ewen S, Ukena C, Uder M, Böhm M, Schmieder RE (2014) Improvement of albuminuria after renal denervation. *Int J Cardiol* 173:311–315
- [140] Panizo S, Martínez-Arias L, Alonso-Montes C, Cannata P, Martín-Carro B, Fernández-Martín JL, Naves-Díaz M, Carrillo-López N, Cannata-Andía JB (2021) Fibrosis in chronic kidney disease: Pathogenesis and consequences. *Int J Mol Sci* 22:1–19
- [141] Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q, et al. (2005) A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 6:1133–1141
- [142] Peng X, Xiao Z, Zhang J, Li Y, Dong Y, Du J (2015) IL-17A produced by both $\gamma\delta$ T and Th17 cells promotes renal fibrosis via RANTES-mediated leukocyte infiltration after renal obstruction. *J Pathol* 235:79–89
- [143] Perez DM (2023) α 1-Adrenergic Receptors: Insights into Potential Therapeutic Opportunities for COVID-19, Heart Failure, and Alzheimer’s Disease *International journal of molecular sciences* 24(4):4188
- [144] Quaglia MG, Farina A, Bossu E (1992) Analysis of ICI 118551, a new β 2 blocking drug, and related compounds by RP-HPLC-DAD*. *J Pharm Biomed Anal* 10:1081–1084
- [145] Raizada V, Hillerson D, Amaram JS, Skipper B (2012) Angiotensin II-mediated left ventricular abnormalities in chronic kidney disease. *J Investig Med* 60:785–791
- [146] Reinecker HC, Awane M, Andres PG, Li DJ (1999) NF-kappaB-Inducing Kinase Is a Common Mediator of IL-17-, TNF-alpha, and IL-1beta-Induced Chemokine Promoter Activation in Intestinal Epithelial Cells. *J Immunol* 126:5337–5344
- [147] Ren J, Crowley SD (2019) Role of T-cell activation in salt-sensitive hypertension. *J Physiol Heart Circ Physiol* 316:1345–1353
- [148] Roman RJ, Cowley AW (1985) Characterization of a new model for the study of pressure-natriuresis in the rat. 248:190–198
- [149] Schlaich MP, Bart B, Hering D, Walton A, Marusic P, Mahfoud F, Böhm M, Lambert EA, Krum H, Sobotka PA, et al. (2013) Feasibility of catheter-based renal nerve ablation and effects on sympathetic nerve activity and blood pressure in patients with end-stage renal disease. *Int J Cardiol* 168:2214–2220

- [150] Schlaich MP, Sobotka PA, Krum H, Whitbourn R, Walton A, Esler MD (2009) Renal denervation as a therapeutic approach for hypertension: Novel implications for an old concept. *Hypertension* 54:1195–1201
- [151] Schlaich MP, Socratous F, Hennebry S, Eikelis N, Lambert EA, Straznicky N, Esler MD, Lambert GW (2009) Sympathetic activation in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 20:933–939
- [152] Segall L, Nistor I, Covic A (2014) Heart failure in patients with chronic kidney disease: A systematic integrative review. *Biomed Res Int* 2014:937398
- [153] Sengupta P (2013) The Laboratory Rat: Relating Its Age with Human's. *Int J Prev Med* 4:624–630
- [154] Seon HC, Park H, Dong C (2006) Act1 adaptor protein is an immediate and essential signaling component of interleukin-17 receptor. *J Biol Chem* 281:35603–35607
- [155] Sharma R, Pellerin D, Gaze DC, Mehta RL, Gregson H, Streather CP, Collinson PO, Brecker SJ (2006) Mitral peak Doppler E-wave to peak mitral annulus velocity ratio is an accurate estimate of left ventricular filling pressure and predicts mortality in end-stage renal disease. *Journal of the American Society of Echocardiography* 19:266–273
- [156] Shen MJ, Zipes DP (2014) Role of the autonomic nervous system in modulating cardiac arrhythmias. *Circ Res* 114:1004–1021
- [157] Shuvy M, Nyska A, Beerl R, Abedat S, Gal-Moscovici A, Rajamannan NM, Lotan C (2011) Histopathology and apoptosis in an animal model of reversible renal injury. *Exp Toxicol Pathol* 63:303–306
- [158] Siddall E, Khatri M, Radhakrishnan J (2017) Capillary leak syndrome: etiologies, pathophysiology, and management *Kidney International* 92(1):37–46
- [159] Simplicity-HTN-2-Investigators, Esler MD, Krum H, Sobotka PA, Schlaich MP, Schmieder RE, Böhm M (2010) Renal sympathetic denervation in patients with treatment-resistant hypertension (The Simplicity HTN-2 Trial): a randomised controlled trial. *Lancet* 376:1903–1909
- [160] Smith PA, Graham LN, Mackintosh AF, Stoker JB, Mary DA (2004) Relationship between central sympathetic activity and stages of human hypertension. *Am J Hypertens* 17:217–222
- [161] Somers VK, Dyken ME, Clary MP, Abboud FM (1995) Sympathetic neural mechanisms in obstructive sleep apnea. *J Clin Invest* 96:1897–1904
- [162] Sommerfeld SD, Cherry C, Schwab RM, Chung L, Maestas DR, Laffont P, Stein JE, Tam A, Ganguly S, Housseau F, et al. (2019) Interleukin-36-producing macrophages drive IL-17-mediated fibrosis. *Sci Immunol* 4:eaax4783
- [163] Song X, Qian Y (2013) The activation and regulation of IL-17 receptor mediated signaling. *Cytokine* 62:175–182
- [164] Stevens PE, Levin A (2013) Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease: Synopsis of the *Kidney Disease: Improving Global Outcomes 2012 Clinical Practice Guideline*. *Ann Intern Med* 158:825–830

- [165] Tan Z, Qian X, Jiang R, Liu Q, Wang Y, Chen C, Wang X, Ryffel B, Sun B (2013) IL-17A Plays a Critical Role in the Pathogenesis of Liver Fibrosis through Hepatic Stellate Cell Activation. *J Immunol* 191:1835–1844
- [166] Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T (2014) Il-6 in inflammation, Immunity, And disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6
- [167] Tang X, Shi L, Cui X, Yu Y, Qi T, Chen C, Tang X (2017) Renal denervation decreases susceptibility of the heart to ventricular fibrillation in a canine model of chronic kidney disease. *Exp Physiol* 102:1414–1423
- [168] Tapmeier TT, Fearn A, Brown K, Chowdhury P, Sacks SH, Sheerin NS, Wong W (2010) Pivotal role of CD4⁺ T cells in renal fibrosis following ureteric obstruction. *Kidney Int* 78:351–362
- [169] Thomas JD, Weyman AE (1991) Echocardiographic Doppler Evaluation of Left Ventricular Diastolic Function. *Circulation* 84:977–990
- [170] Thompson S, James M, Wiebe N, Hemmelgarn B, Manns B, Klarenbach S, Tonelli M (2015) Cause of death in patients with reduced kidney function. *J Am Soc Nephrol* 26:2504–2511
- [171] Titford M (2005) The long history of hematoxylin. *Biotechnic & Histochemistry* 80:73–78
- [172] Tonelli M, Wiebe N, Culeton B, House A, Rabbat C, Fok M, McAlister F, Garg AX (2006) Chronic kidney disease and mortality risk: A systematic review. *J Am Soc Nephrol* 17:2034–2047
- [173] Townsend RR, Mahfoud F, Kandzari DE, Kario K, Pocock S, Weber MA, Ewen S, Tsioufis K, Tousoulis D, Böhm M, et al. (2017) Catheter-based renal denervation in patients with uncontrolled hypertension in the absence of antihypertensive medications (SPYRAL HTN-OFF MED): a randomised, sham-controlled, proof-of-concept trial. *The Lancet* 390:2160–2170
- [174] Valiathan R, Deeb K, Diamante M, Ashman M, Sachdeva N, Asthana D (2014) Reference ranges of lymphocyte subsets in healthy adults and adolescents with special mention of T cell maturation subsets in adults of South Florida. *Immunobiology* 219:487–496
- [175] Vannella KM, Wynn TA (2017) Mechanisms of Organ Injury and Repair by Macrophages. *Annu Rev Physiol* 79:593–617
- [176] Vrijens B, Vincze G, Kristanto P, Urquhart J, Burnier M (2008) Adherence to prescribed antihypertensive drug treatments: Longitudinal study of electronically compiled dosing histories. *BMJ* 336:1114–1117
- [177] Weber MA, Mahfoud F, Schmieder RE, Kandzari DE, Tsioufis KP, Townsend RR, Kario K, Böhm M, Sharp AS, Davies JE, et al. (2019) Renal Denervation for Treating Hypertension: Current Scientific and Clinical Evidence. *JACC Cardiovasc Interv* 12:1095–1105
- [178] Webster AC, Nagler EV, Morton RL, Masson P (2017) Chronic Kidney Disease. *Lancet* 389:1238–1252
- [179] Weiss JL, Frederiksen JW, Weisfeldt ML (1976) Hemodynamic determinants of the time course of fall in canine left ventricular pressure. *J Clin Invest* 58:751–760

- [180] Whittaker P, Kloner RA, Boughner DR, Pickering JG (1994) Quantitative assessment of myocardial collagen with picosirius red staining and circularly polarized light*. *Basic Res Cardiol* 89:397–410
- [181] Williams B, Mancia G, Spiering W, Rosei EA, Azizi M, Burnier M, Clement DL, Coca A, de Simone G, Dominiczak A, et al. (2018) 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. *Eur Heart J* 39:3021–3104
- [182] Wilson MS, Madala SK, Ramalingam TR, Gochuico BR, Rosas IO, Cheever AW, Wynn TA (2010) Bleomycin and IL-1 β -mediated pulmonary fibrosis is IL-17A dependent. *J Exp Med* 207:535–552
- [183] Winearls CG (2009) Chronic kidney disease: definition and staging—an orthodox view. *Clin Med (Lond)* 9:563–564
- [184] Winer S, Chan Y, Paltser G, Truong D, Tsui H, Bahrami J, Dorfman R, Wang Y, Zielenski J, Mastronardi F, et al. (2009) Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. *Nat Med* 15:921–929
- [185] Wittekind D (2003) Traditional staining for routine diagnostic pathology including the role of tannic acid. 1. Value and limitations of the hematoxylin-eosin stain. *Biotech Histochem* 78:261–270
- [186] Wolf WC, Yoshida H, Agata J, Chao L, Chao J (2000) Human tissue kallikrein gene delivery attenuates hypertension, renal injury, and cardiac remodeling in chronic renal failure. *Kidney International* 58:730–739
- [187] Worke LJ, Barthold JE, Seelbinder B, Novak T, Main RP, Harbin SL, Neu CP (2017) Densification of Type I Collagen Matrices as a Model for Cardiac Fibrosis. *Adv Healthc Mater* 6:1700114
- [188] Wu L, Ong SF, Talor MV, Barin JG, Baldeviano GC, Kass DA, Bedja D, Zhang H, Sheikh A, Margolick JB, et al. (2014) Cardiac fibroblasts mediate IL-17A-driven inflammatory dilated cardiomyopathy. *Journal of Experimental Medicine* 211:1449–1464
- [189] Wu Q, Mi Y, Cheng W, Xia C, Zhu D, Du D (2019) Infiltrating T helper 17 cells in the paraventricular nucleus are pathogenic for stress-induced hypertension. *Biochem Biophys Res Commun* 515:169–175
- [190] Yan X, Shichita T, Katsumata Y, Matsuhashi T, Ito H, Ito K, Anzai A, Endo J, Tamura Y, Kimura K, et al. (2012) Deleterious effect of the IL-23/IL-17A axis and $\gamma\delta$ T cells on left ventricular remodeling after myocardial infarction. *J Am Heart Assoc* 1:e004408
- [191] Yang L, Anderson DE, Baecher-Allan C, Hastings WD, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK, Hafler DA (2008) IL-21 and TGF- β are required for differentiation of human T H17 cells. *Nature* 454:350–352
- [192] Yu JJ, Gaffen SL (2008) Interleukin-17: A novel inflammatory cytokine that bridges innate and adaptive immunity. *Front Biosci* 13:170–177
- [193] Zacchigna S, Paldino A, Falcão-Pires I, Daskalopoulos EP, Ferro MD, Vodret S, Lesizza P, Cannatà A, Miranda-Silva D, Lourenço AP, et al. (2021) Towards standardization of echocardiography for the evaluation of left ventricular function in adult rodents: A position paper of the ESC Working Group on Myocardial Function. *Cardiovascular Research* 117:43–59

- [194] Zhang J, Hua G, Zhang X, Tong R, Du X, Li Z (2010) Regulatory T cells/T-helper cell 17 functional imbalance in uraemic patients on maintenance haemodialysis: A pivotal link between microinflammation and adverse cardiovascular events. *Nephrology* 15:33–41
- [195] Zhou SF, Yuan J, Liao MY, Xia N, Tang TT, Li JJ, Jiao J, Dong WY, Nie SF, Zhu ZF, et al. (2014) IL-17A promotes ventricular remodeling after myocardial infarction. *J Mol Med (Berl)* 92:1105–1116
- [196] Zoccali C, Mallamaci F, Parlongo S, Cutrupi S, Benedetto FA, Tripepi G, Bonanno G, Rapisarda F, Fatuzzo P, Seminara G, et al. (2002) Plasma norepinephrine predicts survival and incident cardiovascular events in patients with end-stage renal disease. *Circulation* 105:1354–1359
- [197] Zoccali C, Vanholder R, Massy ZA, Ortiz A, Sarafidis P, Dekker FW, Fliser D, Fouque D, Heine GH, Jager KJ, et al. (2017) The systemic nature of CKD. *Nat Rev Nephrol* 13:344–358
- [198] Zöllner N (1982) Purine and pyrimidine metabolism. *Proc Nutri Soc* 41:329–342
- [199] Zubcevic J, Santisteban MM, Perez PD, Arocha R, Hiller H, Malphurs WL, Colon-Perez LM, Sharma RK, de Kloet A, Krause EG, et al. (2017) A single angiotensin II hypertensive stimulus is associated with prolonged neuronal and immune system activation in Wistar-Kyoto rats. *Front Physiol* 8:592

6 Publikationsliste

6.1 Poster und Vorträge

Blaumer J, Selejan S, Hohl M, Markwirth P, Speer T, Mahfoud F, Boor P, Böhm M (2019)
Modulation of renal sympathetic activity and its effects on LV and renal remodeling in
adenine induced nephropathy – potential role of IL-17A.
Aachen Conference on Cardiovascular Disease and Diabetes, Aachen, 07. November - 09.
November

Markwirth P, Selejan S, Hohl M, Blaumer j, Speer T, Mahfoud F, Böhm M (2023)
Renale Denervation reduziert die Indoxylsulfat-Plasmakonzentration und verhindert eine
linksventrikuläre Hypertrophie in einem Rattenmodell der chronischen Niereninsuffizi-
enz.
129. Kongress der deutschen Gesellschaft für Innere Medizin, Wiesbaden, 22. April - 25.
April

Mauz M, Selejan S, Hohl M, Markwirth P, Blaumer J, Bettink S, Speer T, Kazakov A,
Wintrich J, Mahfoud F, Böhm M.
Linksatriales metabolisches und interstitielles Remodeling bei chronischer Niereninsuffi-
zienz – Rolle von sympathoadrenerger Aktivität und RAGE.
Clin Res Cardiol (2022), P 2005.

Selejan S, Hohl M, Linz D, Blaumer J, Speer T, Ewen S, Mahfoud F, Böhm M (2019)
Sympathoadrenergic regulation of IL-17 expression in heart and kidney.
Symposium “Heart Failure Interfaces“ Würzburg, 2019

Selejan S, Hohl M, Markwirth P, Blaumer J, Mauz M, Lehnert U, Triem S, Speer T, Boor
P, Böhm M (2019)
Effects of renal denervation on atrial remodelling in a rat model of CKD.
Aachen Conference on Cardiovascular Disease and Diabetes, Aachen, 07. November - 09.
November

6.2 Originalarbeiten

Selejan S, Mauz M, Hohl M, Markwirth P, Blaumer J, Bettink S, Speer T, Wintrich J, Kazakov A, Wagenpfeil S, Mahfoud F, Böhm M

Atrial arrhythmogenic substrate in chronic kidney disease – the role of sympathoadrenergic innervation and “Receptor for Advanced Glycation End products (RAGE)”. Submitted.

Mauz M, Selejan S, Hohl M, Markwirth P, Blaumer J, Slawik J, Speer T, Jankowski J, Noels H, Mahfoud F, Böhm M.

Renal denervation reverses left atrial fibrosis in chronic kidney disease - role of collagenase activity. In Revision.

7 Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. M. Böhm für das Überlassen des Themas dieser Arbeit und die Möglichkeit, die präsentierten Untersuchungen im Forschungslabor der Klinik für Innere Medizin III der Universität des Saarlandes durchführen zu können.

Frau Dr. S. Selejan möchte ich für ihre Unterstützung bei der Konzeption, Durchführung und Interpretation der vorgelegten Experimente und ihre ständige Bereitschaft zur Sichtung und Besprechung meiner Manuskripte danken.

Mein Dank gilt außerdem Laura Frisch für ihre umfassende Einarbeitung im Labor und ihre tatkräftige Hilfe bei der Durchführung der Experimente, Andrey Kazakov für seine ausgezeichnete Beratung in histologischen Fragen und Matthias Hohl, der stets ein offenes Ohr für meine Anliegen hatte.

Überdies möchte ich mich bei meinen Mitdoktoranden und Mitdoktorandinnen und dem gesamten Team des Forschungslabors der Klinik für Innere Medizin III für ihre herzliche und kollegiale Zusammenarbeit bedanken.

Schließlich danke ich von Herzen meinen Eltern, Stephan und Ute Blaumer.

Tag der Promotion: 28.02.2025

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Matthias Hannig

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Michael Böhm

Prof. Dr. Ulrich Boehm