

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

**Effekte blutdrucksenkender Medikamente nach
renaler Denervation in einem
chronischen Hypertonie-Modell der Ratte**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2024

vorgelegt von: Özlem Hatice Sevimli
geb. am 03.06.1997 in Dormagen

Tag der Promotion: 01.04.2025

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

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Felix Mahfoud

Prof. Dr. med. Hashim Abdul-Khaliq

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis.....	4
Abbildungsverzeichnis.....	5
Abkürzungsverzeichnis	7
1 Zusammenfassung/Abstract.....	9
1.1 Zusammenfassung.....	9
1.2 Abstract	11
2 Einleitung.....	13
2.1 Arterielle Hypertonie.....	13
2.1.1 Definition	13
2.1.2 Ätiologie.....	16
2.1.3 Pathophysiologie	16
2.1.4 Therapie	18
2.2 Therapieresistente Hypertonie	22
2.3 Renale Denervation.....	22
2.4 Kardiales Remodeling	23
2.5 Fragestellung und Ziele der Arbeit	25
3 Materialien und Methoden.....	27
3.1 Materialien.....	27
3.1.1 Geräte	27
3.1.2 Sonstige Materialien	27
3.1.3 Software	28
3.2 Methoden	28
3.2.1 Tiermodell.....	28
3.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	34
3.2.3 Western Blot.....	39
3.2.4 Histologie.....	47
3.2.5 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	53
3.2.6 Statistische Analyse	53
4 Ergebnisse	54

4.1 Versuchsaufbau	54
4.2 Auswirkungen auf die Hämodynamik	54
4.2.1 Auswirkungen auf den mittleren arteriellen Druck.....	54
4.2.2 Auswirkungen auf die Herzfrequenz	57
4.3 Physiologische Parameter (Gewichtsanalyse).....	59
4.4 Serumchemie und Gewebeanalyse zur Expression der renalen Tyrosinhydroxylase und des renalen Norepinephrin-Gehaltes	59
4.5 Proteinexpressionsanalyse	61
4.6 Auswirkung der Blutdrucksenkung auf die Plasma-Renin-Aktivität, die Plasma-Aldosteron-Konzentration und die linksventrikuläre Expression pro-hypertropher Markergene	67
4.7 Untersuchung des strukturellen kardialen Remodelings	68
4.7.1 Linksventrikuläre interstitielle Fibrose	68
4.7.2 Linksventrikuläre perivaskuläre Fibrose	68
4.7.3 Linksventrikuläre profibrotische Genexpression.....	76
4.7.4 Linksventrikuläre Kardiomyozytenhypertrophie.....	76
5 Diskussion.....	83
Literaturverzeichnis	88
Publikationen.....	94
Danksagung	95
Lebenslauf.....	96

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifikation des arteriellen Blutdrucks anhand der Praxismessung	14
Tabelle 2: Blutdruckgrenzwerte zur Therapieinitiation	14
Tabelle 3: Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen	15
Tabelle 4: Diagnosestellung des Bluthochdrucks bei verschiedenen Messungen.....	15
Tabelle 5: Western Blot Primärantikörper	46
Tabelle 6: Western Blot Sekundärantikörper.....	46
Tabelle 7: Physiologische Parameter, Serumchemie und Gewebeanalyse.....	60
Tabelle 8: Pro-hypertrophe Markergene	68
Tabelle 9: Linksventrikuläre profibrotische Genexpression.....	76

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Pathophysiologie der arteriellen Hypertonie	17
Abbildung 2: Schema des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS)	21
Abbildung 3: Medikamentenbehandlungsstrategie für unkomplizierte Hypertonie	22
Abbildung 4: Experimenteller Zeitplan.....	30
Abbildung 5: Telemetrie-Sender.....	31
Abbildung 6: Telemetriestationen.....	32
Abbildung 7: Renale Denervation.....	33
Abbildung 8: Versuchsaufbau	34
Abbildung 9: Kontrolle der Membran mit Ponceau Rot	44
Abbildung 10: Bestimmung der Querschnittsfläche der Kardiomyozyten	49
Abbildung 11: Histologischer Gewebeschnitt des linken Ventrikels in Picro-Siriusrot-Färbung	51
Abbildung 12: Mittlerer arterieller Blutdruck (MAB) bei SHR nach SHAM und RDN mit/ohne medikamentöse Behandlung.....	56
Abbildung 13: Herzfrequenz bei SHR nach SHAM und RDN mit/ohne medikamentöse Behandlung.....	58
Abbildung 14: Auswirkungen der RDN auf die Expression Blutdruck-regulierender Proteine der Niere in der Kontrollgruppe ohne medikamentöse Behandlung.....	62
Abbildung 15: Auswirkungen der RDN und Amlodipin auf die Expression Blutdruck- regulierender Proteine der Niere.....	63
Abbildung 16: Auswirkungen der RDN und Olmesartan auf die Expression Blutdruck- regulierender Proteine der Niere.....	64
Abbildung 17: Auswirkungen der RDN und HCT auf die Expression Blutdruck-regulierender Proteine der Niere	65
Abbildung 18: Auswirkungen der RDN und Eplerenon auf die Expression Blutdruck- regulierender Proteine der Niere.....	66
Abbildung 19: Auswirkung der RDN auf die (A) Plasma-Renin-Aktivität und (B) das Plasma- Aldosteron bei SHR nach SHAM und RDN mit/ohne medikamentöse Behandlung	67
Abbildung 20: Bestimmung der linksventrikulären (LV) interstitiellen und perivaskulären Fibrose bei medikamentös unbehandelten SHR nach SHAM und RDN.....	70
Abbildung 21: Bestimmung der linksventrikulären (LV) interstitiellen und perivaskulären Fibrose bei SHAM+Amlodipin und RDN+Amlodipin.....	71
Abbildung 22: Bestimmung der linksventrikulären (LV) interstitiellen und perivaskulären Fibrose bei SHAM+Olmesartan und RDN+Olmesartan	72

Abbildung 23: Bestimmung der linksventrikulären (LV) interstitiellen und perivaskulären Fibrose bei SHAM+HCT und RDN+HCT	73
Abbildung 24: Bestimmung der linksventrikulären (LV) interstitiellen und perivaskulären Fibrose bei SHAM+Eplerenon und RDN+Eplerenon	74
Abbildung 25: Intragruppenvergleich der linksventrikulären (LV) (A) interstitiellen Fibrose und (B) perivaskulären Fibrose bei SHR nach SHAM und RDN mit/ohne medikamentöse Behandlung	75
Abbildung 26: Bestimmung des linksventrikulären (LV) Kardiomyozytendurchmessers bei SHR nach SHAM und RDN ohne medikamentöse Behandlung.....	77
Abbildung 27: Bestimmung des linksventrikulären (LV) Kardiomyozytendurchmessers bei SHAM+Amlodipin und RDN+Amlodipin	78
Abbildung 28: Bestimmung des linksventrikulären (LV) Kardiomyozytendurchmessers bei SHAM+Olmesartan und RDN+Olmesartan.....	79
Abbildung 29: Bestimmung des linksventrikulären (LV) Kardiomyozytendurchmessers bei SHAM+HCT und RDN+HCT	80
Abbildung 30: Bestimmung des linksventrikulären (LV) Kardiomyozytendurchmessers bei SHAM+Eplerenon und RDN+Eplerenon	81
Abbildung 31: Intragruppenvergleich der linksventrikulären (LV) Kardiomyozytenhypertrophie bei SHR nach SHAM und RDN mit/ohne medikamentöse Behandlung	82

Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin-Converting Enzym
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
AT ₁	Angiotensin-II-Rezeptor Subtyp 1
BNP	B-Typ natriuretisches Peptid
bpm	Schläge pro Minute (beats per minute)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CD10	Nepriylsin, Membran-Metallo-Endopeptidase
CKD	chronische Nierenerkrankung (chronic kidney disease)
Col1a1	Alpha-1-Typ-I-Kollagen
Col1a2	Alpha-2-Typ-I-Kollagen
CTGF	Connective tissue growth factor
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DTT	Dithiothreitol
ESC	European Society of Cardiology
ESH	European Society of Hypertension
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
i.e.	das heißt (id est)
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KHK	Koronare Herzkrankheit
l	Liter
LV	linksventrikulär
MAB	mittlerer arterieller Blutdruck
MAP	mean arterial blood pressure
min	Minute
mg	Milligramm
mM	Millimolar
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
NET	Noradrenalintransporter

ng	Nanogramm
NT-proBNP	N-terminal pro-brain natriuretic peptide
PBS-T	Phosphate-buffered Saline Tween
PMSF	Phenylmethanesulfonylfluorid
pg	Pikogramm
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RT	Reverse Transkription
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodium dodecyl sulfate)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
TGF- β	Transforming growth factor beta
TH	Tyrosinhydroxylase
TIA	Transitorische ischämische Attacke
vs.	versus
U	Umdrehung
z.B.	zum Beispiel
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter

1 Zusammenfassung/Abstract

1.1 Zusammenfassung

Hintergrund und Ziele: Die katheterbasierte renale Denervation (RDN) ist eine Behandlungsmethode, die den Blutdruck bei Patienten mit unkontrollierter Hypertonie reduziert, unabhängig davon, ob sie blutdrucksenkende Medikamente einnehmen oder nicht. Allerdings gibt es bisher kaum Daten darüber, ob es nach dem Eingriff Unterschiede hinsichtlich der Effektivität von verschiedenen antihypertensiven Substanzen gibt. Wir untersuchten die Auswirkungen der RDN auf den Blutdruck und den kardialen Phänotyp in Kombination mit gängigen blutdrucksenkenden Mitteln bei spontan hypertensiven Ratten (SHR).

Methoden: Bei insgesamt 64 männlichen SHR wurde zu Beginn der Studie ein katheterbasierter Radiotelemetrie-Sender zur kontinuierlichen Aufzeichnung des Blutdrucks und der Herzfrequenz implantiert. Nach einer siebentägigen postoperativen Erholungsphase wurde mit der Aufzeichnung des Blutdrucks und der Herzfrequenz begonnen und die Baseline-Werte für 14 Tage aufgezeichnet. Im Anschluss wurden die SHR in zwei Gruppen aufgeteilt. 32 Ratten wurden einer Scheinoperation (SHAM) unterzogen, die verbliebenen 32 Ratten erhielten eine RDN. Nach einer zehntägigen Beobachtungszeit erhielten beide Versuchsgruppen antihypertensive Medikamente, wie zum Beispiel einen Kalziumkanalblocker (Amlodipin), einen AT₁-Antagonisten (Olmesartan), ein Thiaziddiuretikum (Hydrochlorothiazid) oder einen Mineralokortikoidrezeptorantagonisten (Eplerenon). Als jeweilige Kontrollen dienten SHAM (n=9) und RDN (n=9) Tiere, die keine blutdrucksenkenden Medikamente erhielten. Die Effekte der antihypertensiven Behandlung wurden über vier Wochen aufgezeichnet und miteinander verglichen. Am Studienende wurden die Tiere euthanasiert und das Herz auf kardiale strukturelle Umbauprozesse histologisch und biochemisch untersucht und zirkulierende neuroendokrine Marker gemessen.

Ergebnisse: Nach RDN wurde im Vergleich zur SHAM-Kontrolle der mittlere arterielle Blutdruck (MAB) signifikant reduziert (RDN: -11.6 ± 2.3 mmHg, SHAM: -0.1 ± 1.3 mmHg, $p < 0.05$). In der SHAM-Gruppe zeigten die antihypertensiven Behandlungen mit Amlodipin und Olmesartan eine signifikante Senkung des MAB im Vergleich zur SHAM-Kontrolle (SHAM+Amlodipin: -15.8 ± 2.1 mmHg, $p < 0.001$ vs. SHAM; SHAM+Olmesartan: -17.1 ± 3.0 mmHg, $p < 0.001$ vs. SHAM). Die Behandlung mit HCT oder Eplerenon zeigten keine signifikanten Veränderungen des MAB im Vergleich zur SHAM-Kontrolle (SHAM+HCT: -9.1 ± 1.5 mmHg, $p = 0.36$; SHAM+Eplerenon: 1.4 ± 1.0 mmHg, $p = 0.99$).

In Kombination mit RDN senkten alle Antihypertensiva, außer Eplerenon, den MAB signifikant im Vergleich zur SHAM-Kontrolle (RDN+Amlodipin: -26.9 ± 3.9 mmHg, $p < 0.0001$ vs. SHAM; RDN+Olmesartan: -32.8 ± 3.1 mmHg, $p < 0.0001$ vs. SHAM; RDN+HCT: -20.5 ± 2.7 mmHg, $p < 0.0001$ vs. SHAM; RDN+Eplerenon: -11.2 ± 2.8 mmHg, $p = 0.12$ vs. SHAM). Die Kombination von RDN und Olmesartan erwies sich als die wirksamste Kombination zur Reduktion des MAB. Nach RDN zeigte sich bei Tieren ohne begleitende medikamentöse Therapie eine Abnahme der Plasma-Renin-Aktivität im Vergleich zu SHAM (SHAM-Kontrolle: 9.17 ± 0.12 ng/ml; RDN-Kontrolle: 8.65 ± 0.15 ng/ml, $p < 0.05$) und der Aldosteron-Konzentration im Vergleich zu SHAM (SHAM-Kontrolle: 283.7 ± 43.9 pg/ml; RDN-Kontrolle: 133.2 ± 16.3 pg/ml, $p < 0.01$).

In der SHAM-Gruppe reduzierten alle Antihypertensiva den perivaskulären Fibrosegehalt im linken Ventrikel im Vergleich zur SHAM-Gruppe ohne medikamentöse Behandlung (SHAM+Amlodipin: 39.34 ± 1.9 %, $p = 0.0454$ vs. SHAM; SHAM+Olmesartan: 35.96 ± 1.0 %, $p = 0.0062$ vs. SHAM; SHAM+HCT: 29.90 ± 4.7 %, $p = 0.0002$ vs. SHAM; SHAM+Eplerenon: 39.34 ± 1.9 %, $p = 0.0454$ vs. SHAM). Diese Reduktion wurde in der Kombination von RDN und Olmesartan weiter verstärkt (-31.9 ± 1.2 %, $p < 0.05$ im Vergleich zu SHAM+Olmesartan).

Der Kollagengehalt im linksventrikulären Myokard war unter SHAM+Olmesartan signifikant reduziert (SHAM-Kontrolle: 6.5 ± 0.9 % vs. SHAM-Olmesartan: 2.8 ± 0.1 %, $p < 0.05$). Die Kombination von RDN und Olmesartan zeigte keine zusätzliche Wirkung auf den Kollagengehalt im linksventrikulären Myokard.

Schlussfolgerung: Die RDN in SHR führte zu einer signifikanten Senkung des Blutdrucks. Die antihypertensive medikamentöse Therapie nach RDN führte zu einer weiteren Blutdrucksenkung, wobei Olmesartan den stärksten additiven Effekt zeigte. Die Auswirkungen der RDN auf das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System und die maladaptiven kardialen Umbauprozesse variierten erheblich, abhängig vom spezifischen Wirkungsmechanismus der verwendeten Antihypertensiva.

1.2 Abstract

Background and objectives: Catheter-based renal denervation (RDN) effectively reduces blood pressure in patients with uncontrolled hypertension. Data regarding the most effective combination of antihypertensive drug to be used following RDN are lacking. We investigated the impact of RDN on blood pressure and cardiac phenotype when combined with commonly used antihypertensive agents in spontaneously hypertensive rats (SHR).

Methods: A total of 64 male SHR underwent catheter-based radiotelemetry transmitter implantation at baseline for continuous recording of blood pressure and heart rate. After a seven-day postoperative recovery period, blood pressure and heart rate recordings were started and baseline values were recorded for 14 days. Subsequently, the SHR were randomly divided into two groups. Thirty-two rats underwent sham surgery (SHAM), and the remaining 32 rats received RDN, respectively. After a 10-day observation period, both experimental groups received one of the antihypertensive medication, i.e. the calcium channel blocker (amlodipine), angiotensin II receptor blocker (olmesartan), thiazide diuretic (hydrochlorothiazide) and mineralocorticoid receptor blocker (eplerenone). SHAM (n=9) and RDN (n=9) animals that did not receive antihypertensive medication served as respective controls. The effects of antihypertensive treatments were recorded and compared over four weeks. At the end of the study, the animals were sacrificed painlessly, and the hearts were examined histologically and biochemically for cardiac structural remodeling processes. Circulating neuroendocrine markers were also measured.

Results: The mean arterial blood pressure (MAP) was significantly decreased after RDN compared with the SHAM control group (-11.6 ± 2.3 versus -0.1 ± 1.3 mmHg, $p < 0.05$). In the SHAM group, treatment with amlodipine and olmesartan, but not HCT or eplerenone, significantly reduced MAP compared with SHAM (SHAM+amlodipine: -15.8 ± 2.1 mmHg, $p < 0.001$ vs. SHAM; SHAM+olmesartan: -17.1 ± 3.0 mmHg, $p < 0.001$ vs. SHAM; SHAM+HCT: -9.1 ± 1.5 mmHg, $p = 0.36$ vs. SHAM; SHAM+eplerenone: 1.4 ± 1.0 mmHg, $p = 0.99$ vs. SHAM). When combined with RDN, all antihypertensive drugs except eplerenone significantly lowered MAP compared with SHAM controls (RDN+amlodipine: -26.9 ± 3.9 mmHg, $p < 0.0001$ vs. SHAM; RDN+olmesartan: -32.8 ± 3.1 mmHg, $p < 0.0001$ vs. SHAM; RDN+HCT: -20.5 ± 2.7 mmHg, $p < 0.0001$ vs. SHAM; RDN+eplerenone: -11.2 ± 2.8 mmHg, $p = 0.12$ vs. SHAM). The combination of RDN and olmesartan was found to be the most effective in lowering blood pressure. After RDN, animals without concomitant medication showed a decrease in plasma renin activity compared with SHAM (SHAM control: 9.17 ± 0.12 ng/ml; RDN without drug treatment:

8.65±0.15 ng/ml, p<0.05) and a decrease in aldosterone concentration (SHAM control: 283.7±43.9 pg/ml; RDN without drug treatment: 133.2±16.3 pg/ml, p<0.01).

All hypertensive drugs reduced left ventricular perivascular fibrosis content in contrast with SHAM control (SHAM control: -52.6±4.6%; SHAM+amlodipine: -34.5±3.0%, p<0.05; SHAM+olmesartan: -36±1.0%, p<0.05; SHAM-HCT: -29.9±4.7%, p<0.001). This inhibition was further enhanced by the combination of RDN with olmesartan (-31.9±1.2 %, p<0.05 compared to SHAM+olmesartan).

Left ventricular collagen content was significantly reduced in the SHAM+olmesartan group (SHAM control: 6.5±0.9% vs. SHAM+olmesartan: 2.8±0.1%, p<0.05). However, the combination of RDN and olmesartan had no additional effect on left ventricular collagen content.

Conclusion: In SHR, RDN resulted in a significant reduction in blood pressure. When RDN was combined with antihypertensive drugs there was an additional reduction in blood pressure, with olmesartan demonstrating the most pronounced additive effect. The impact of RDN on the activity of the renin-angiotensin-aldosterone system and maladaptive cardiac remodeling varied significantly, contingent on the specific mechanism of action of the antihypertensive drugs employed.

2 Einleitung

2.1 Arterielle Hypertonie

Die arterielle Hypertonie ist der prävalenteste Risikofaktor für die Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen.^{1,2} Personen, die an arterieller Hypertonie leiden, haben ein erhöhtes Risiko für das Entstehen von verschiedenen Erkrankungen, darunter koronare Herzkrankheit (KHK), Niereninsuffizienz und Schlaganfall. Die Senkung des Blutdrucks durch blutdrucksenkende Medikamente reduziert das Risiko kardiovaskulärer Ereignisse.³ Obwohl die Verbindung zwischen Bluthochdruck und kardiovaskulären Erkrankungen sowie Todesfällen bekannt ist und es nachweislich wirksame blutdrucksenkende Behandlungsmöglichkeiten gibt,⁴ besteht oft eine unzureichende Kontrolle des Blutdrucks. Oft wird der Blutdruck nicht gemessen, die Behandlung ist suboptimal oder Medikamente werden falsch bzw. unregelmäßig eingenommen.⁵ Darüber hinaus leiden einige Patienten unter einer therapieresistenten Hypertonie, bei der der Blutdruck trotz regelmäßiger Einnahme der Medikamente nicht optimal eingestellt werden kann.⁵ Die renale Denervation (RDN) hat zum Ziel, die afferenten und efferenten sympathischen Nervenfasern, lokalisiert in der Adventitia und im perivaskulären Fett der Nierenarterien in ihrer Aktivität zu modulieren. In mehreren randomisierten, SHAM-kontrollierten Studien konnte eine RDN den Blutdruck bei Patienten mit und ohne blutdrucksenkende Medikamente wirksam senken.^{6,7,8} Da RDN in den meisten Fällen zusammen mit blutdrucksenkenden Medikamenten zur Blutdruckkontrolle verwendet wird, ist es wichtig zu verstehen, ob eine Medikamentenklasse einer anderen hinsichtlich ihrer Wirksamkeit nach einer RDN überlegen ist.

2.1.1 Definition

Gemäß den Leitlinien der European Society of Hypertension (ESH) und der European Society of Cardiology (ESC) von 2018 liegt ein Bluthochdruck dann vor, wenn an mindestens zwei verschiedenen Tagen bei einer Praxismessung der systolische Blutdruck ≥ 140 mmHg und/oder der diastolische Blutdruck ≥ 90 mmHg gemessen wird (s. Tabelle 1).⁹

Kategorie	Systolischer Blutdruck (mmHg)		Diastolischer Blutdruck (mmHg)
Optimal	<120	und	<80
Normal	120-129	und/oder	80-84
Hoch-normal	130-139	und/oder	85-89
Hypertonie Grad 1	140-159	und/oder	90-99
Hypertonie Grad 2	160-179	und/oder	100-109
Hypertonie Grad 3	≥180	und/oder	≥110
Isolierte systolische Hypertonie	≥140		<90

Tabelle 1: Klassifikation des arteriellen Blutdrucks anhand der Praxismessung⁹
 modifiziert nach Williams et al. (2018)

Ab einem Blutdruck von ≥140/≥90 mmHg besteht eine Behandlungsindikation. Eine Ausnahme bilden Patienten ab dem 80. Lebensjahr. Hier sollte gemäß Tabelle 2 eine Therapie initiiert werden, wenn der systolische Blutdruck über 160 mmHg und der diastolische Blutdruck über 90 mmHg liegt.⁹

Altersgruppe	Systolische Behandlungsschwelle bei einer Praxismessung (mmHg)					Diastolische Behandlungsschwelle (mmHg)
	Hypertonie	+ Diabetes	+ CKD	+ KHK	+ Schlaganfall/TIA	
18-65 Jahre	≥140	≥140	≥140	≥140	≥140	≥90
65-79 Jahre	≥140	≥140	≥140	≥140	≥140	≥90
≥ 80 Jahre	≥160	≥160	≥160	≥160	≥160	≥90
Diastolische Behandlungsschwelle (mmHg)	≥90	≥90	≥90	≥90	≥90	

Tabelle 2: Blutdruckgrenzwerte zur Therapieinitiierung⁹
 (CKD: chronische Nierenerkrankung, KHK: koronare Herkrankheit, TIA: transitorische ischämische Attacke)

modifiziert nach Williams et al. (2018)

Dies gilt insbesondere bei Vorliegen anderer kardiovaskulärer Risikofaktoren, blutdruckbedingter Organschäden und anderer Komorbiditäten (s. Tabelle 3).⁹ Therapiebeginn und Zielblutdruck hängen von der Gesamtrisikokonstellation ab.⁹

Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen
Arterielle Hypertonie
Geschlecht (Männer>Frauen)
Hohes Alter
Rauchen
Hyperlipidämie
Diabetes mellitus
Adipositas
Familienanamnese
Psychosoziale Situation

Tabelle 3: Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen⁹
modifiziert nach Williams et al. (2018)

Wenn bei wiederholter Praxismessung der Blutdruckwert 140/90 mmHg beträgt, sollte die Diagnose mittels ambulanter 24-h-Langzeitmessung und der häuslichen Messung bestätigt werden (s. Tabelle 4).⁵

Kategorie	Systolischer Blutdruck (mmHg)		Diastolischer Blutdruck (mmHg)
Praxisblutdruck	≥140	und/oder	≥90
Langzeitblutdruck			
Tagsüber Mittelwert	≥135	und/oder	≥85
Nachts Mittelwert	≥120	und/oder	≥70
24-h-Mittelwert	≥130	und/oder	≥80
Häuslicher Blutdruck Mittelwert	≥135	und/oder	≥85

Tabelle 4: Diagnosestellung des Bluthochdrucks bei verschiedenen Messungen⁹
modifiziert nach Williams et al. (2018)

2.1.2 Ätiologie

Im Allgemeinen wird zwischen zwei Formen der Hypertonie unterschieden: die primäre (essenzielle) Hypertonie und die sekundäre Hypertonie.¹⁰ Bei der primären Hypertonie kann keine klar definierbare zugrundeliegende Ursache identifiziert werden. Im Gegensatz dazu wird die sekundäre Hypertonie durch eine Grunderkrankung verursacht.¹⁰

Die primäre Hypertonie macht 90 % aller Bluthochdruckpatienten aus.¹⁰ Sie ist definiert als essenzielle Hypertonie ohne sekundäre Ursache.¹⁰ Etwa 10 % der Bluthochdruckpatienten haben eine sekundäre Hypertonie.¹⁰ Sekundärer Bluthochdruck wird zumeist durch obstruktives Schlafapnoe-Syndrom, chronische Nierenerkrankung, primären Hyperaldosteronismus und Nierenarterienstenose verursacht und muss insbesondere bei schwer einstellbaren und jüngeren Patienten berücksichtigt werden.¹⁰

2.1.3 Pathophysiologie

Die arterielle Hypertonie lässt sich pathophysiologisch als Störung der Regelkreise definieren, die den Blutdruck unter normalen Bedingungen konstant halten.¹⁰ Nach dem Ohmschen Gesetz leitet sich der Blutdruck aus dem Herzminutenvolumen und dem systemischen Gefäßwiderstand ab.¹⁰ Die Entwicklung einer arterieller Hypertonie kann durch eine Steigerung des Herzzeitvolumens, einen erhöhten peripheren Widerstand oder eine Kombination beider Faktoren verursacht werden.⁵ Diese Mechanismen werden unterschiedlich über hämodynamische, neurohumorale und renale Prozesse reguliert.⁵ Bei der Regulation des kardiovaskulären Systems spielt das autonome Nervensystem eine zentrale Rolle. Eine sympathische Überaktivität ist eine wesentliche Ursache für die arterielle Hypertonie. Stoffwechselveränderungen im Rahmen des metabolischen Syndroms stehen im Zusammenhang mit einer erhöhten sympathischen Nervenaktivität (s. Abbildung 1).⁵ Zusätzlich spielt das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) eine bedeutende Rolle bei der Regulation des Blutdrucks sowie des Elektrolyt- und Flüssigkeitshaushalts.¹¹ Ein Abfall des Blutdrucks kann zu einer verminderten Nierendurchblutung führen. Sinkt der Druck in den Nierenarterien um mehr als 10-15 mmHg, gibt der juxtaglomeruläre Apparat der Niere reflektorisch das proteolytisch aktive Renin ab. Renin ist ein Enzym, das den Prozess der Umwandlung von Angiotensinogen in Angiotensin I katalysiert. Nachfolgend wird Angiotensin I in das Hormon Angiotensin II durch das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) konvertiert.¹¹ Angiotensin II verursacht eine Vasokonstriktion und stimuliert die Ausschüttung von Aldosteron, was zu einer erhöhten Rückhaltung von Wasser und Natrium in den Nieren führt.¹¹ Dies führt zu einer Zunahme des Blutvolumens, was wiederum zu einem Anstieg des

Blutdrucks führt.¹¹ Obwohl die Aktivierung des RAAS in den frühen Stadien von Herz-Kreislauf- und Nierenerkrankungen kompensatorisch wirken kann, ist eine langfristige Aktivierung maladaptiv. Bei Patienten mit Herzinsuffizienz gelten relative Erhöhungen der Plasmareninaktivität und der Blutaldosteronkonzentration als Marker und Mitwirkende dieses Systems.¹¹

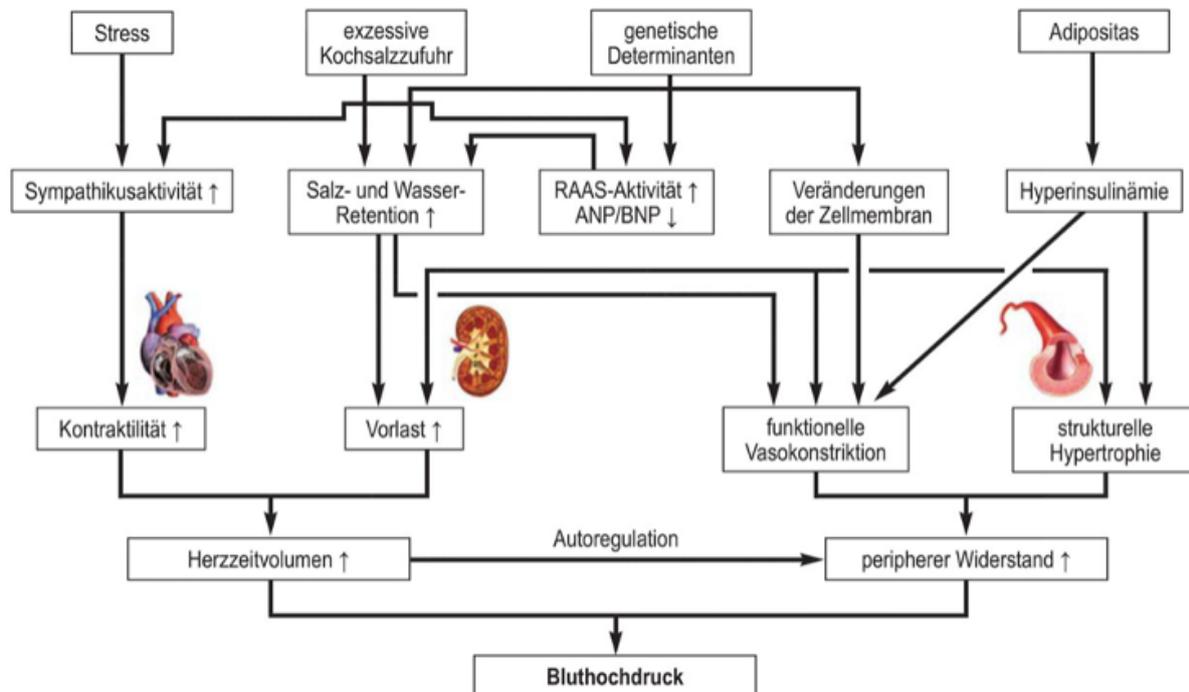


Abbildung 1: Pathophysiologie der arteriellen Hypertonie⁵

(ANP: atriales natriuretisches Peptid, BNP: B-Typ natriuretisches Peptid, RAAS: Renin-Angiotensin-Aldosteron-System)

Verschiedene hämodynamische, nervale, humorale und renale Mechanismen führen zu einer Steigerung von Herzzeitvolumen und/oder peripherem Widerstand. Das Produkt dieser beiden hämodynamischen Variablen bestimmt die Höhe des Blutdrucks. Sympathisches Nervensystem: Ein überaktives sympathisches Nervensystem kann den Blutdruck erhöhen. Stress, Angst und andere Faktoren können zu einer übermäßigen Freisetzung von Katecholaminen führen, die die Blutgefäße verengen und den Herzschlag bzw. die Kontraktilität beschleunigen.

Natriumretention: Eine unangemessene Natriumretention in den Nieren kann zu einem erhöhten Blutvolumen führen, was den Blutdruck erhöht. Dies kann durch gestörte Nierenfunktion oder durch genetische Veranlagungen beeinflusst werden.

Genetische Veranlagung: Es gibt eine genetische Komponente bei der essenziellen Hypertonie, und Personen mit einer Familienanamnese von Bluthochdruck haben ein erhöhtes Risiko, ebenfalls daran zu erkranken.

Endotheldysfunktion: Die Endothelzellen, die die innerste Schicht der Blutgefäße auskleiden, spielen eine entscheidende Rolle bei der Regulierung des Blutdrucks. Bei Hypertonie kann es zu einer Beeinträchtigung der Endothelfunktion kommen, was zu Gefäßverengung und erhöhtem Widerstand führt.

Dysregulation des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS): Das RAAS ist ein Hormonsystem, das den Blutdruck reguliert. Bei Hypertonie kann es zu einer gesteigerten Aktivität des RAAS kommen, was zu erhöhten Angiotensin-II-Spiegeln führt. Angiotensin II verengt die Blutgefäße und erhöht den Blutdruck.

Lebensstilfaktoren: Faktoren wie eine unausgewogene Ernährung, Bewegungsmangel, Übergewicht, übermäßiger Alkoholkonsum und Rauchen können das Risiko für Hypertonie erhöhen.

Familiäre Häufung von Bluthochdruck ist auf genetische Veranlagung zurückzuführen.⁵ Wechselwirkungen mit Umweltfaktoren wie Salz- und Kalorienaufnahme und körperlicher Aktivität bestimmen letztendlich, wie stark ein Blutdruckanstieg ist.⁵ Erhöhter Stress führt zu einer Erhöhung der Sympathikusaktivität, welche wiederum die Kontraktilität des Herzens steigert, wodurch das Herzzeitvolumen steigt. Autoregulatorisch entwickelt sich dadurch ein erhöhter peripherer Widerstand und schließlich führen diese Mechanismen zum Bluthochdruck.⁵ Auch eine exzessive Kochsalzzufuhr führt durch eine erhöhte Salz- und Wasserretention zur Erhöhung der Vorlast und somit zum Bluthochdruck (s. Abbildung 1 links). Adipositas dagegen führt durch die Hyperinsulinämie einerseits über die funktionelle Vasokonstriktion und andererseits durch die strukturelle Hypertrophie zur Erhöhung des peripheren Widerstands. Durch die autoregulatorische Erhöhung des Herzzeitvolumens kommt es auch über diesen Weg zum Bluthochdruck (s. Abbildung 1 rechts).⁵

2.1.4 Therapie

Laut den Leitlinien der European Society of Hypertension (ESH) und der European Society of Cardiology (ESC) von 2018 werden für alle Patienten Blutdruckziele von weniger als 140/90 mmHg in der Praxis empfohlen.⁹ Der Mehrheit der Patienten, bei denen die Therapie gut verträglich ist, wird geraten, den Blutdruck weiter zu senken. Dabei wird ein bestimmter unterer Grenzwert für den Blutdruck festgelegt, der nicht unterschritten werden sollte.⁹ Es wird empfohlen, dass der systolische Zielblutdruck für Patienten im Alter von 18 bis 65 Jahren <130 mmHg, jedoch nicht weniger als 120 mmHg beträgt.⁵ Dies gilt auch für Diabetiker.⁵ Für Patienten mit Niereninsuffizienz wird ein höherer Zielbereich des systolischen Blutdrucks <130-140 mmHg vorgegeben. Älteren Patienten über 80 Jahren wird im Allgemeinen ein Zielbereich des systolischen Blutdrucks von <130-140 mmHg empfohlen.⁵ Unabhängig von der Altersgruppe liegt der diastolische Zielblutdruckbereich bei >70-<80 mmHg.⁵

Es wird nicht empfohlen, dass der systolische Blutdruck <120 mmHg gesenkt wird.⁵ Der angestrebte Zielwert für den diastolischen Blutdruck liegt bei einem Wert unter 85 mmHg. Allerdings wird kardiovaskulären Risikopatienten mit unklarem Koronarstatus empfohlen, den diastolischen Blutdruck nicht unter 70 mmHg zu reduzieren.¹² Das American College of Cardiology hat in seinen aktualisierten Leitlinien einen Blutdruckwert von 130-139/85-89 mmHg als Hypertonie Grad I eingestuft, der zunächst nichtmedikamentös behandelt werden sollte.¹³ Basierend auf den aktuellen Europäischen Leitlinien sollte bei Patienten mit einem Blutdruck im hochnormalen Bereich eine mögliche medikamentöse Behandlung in Betracht gezogen werden, wenn diese Patienten ein sehr hohes kardiovaskuläres Risiko aufweisen.⁹

Nichtmedikamentöse Therapie

Die Behandlung von arterieller Hypertonie beinhaltet zwei Hauptansätze: nicht-medikamentöse Maßnahmen und medikamentöse Therapie.⁵ Zunächst sollten Änderungen des Lebensstils vorgenommen werden, um den Blutdruck zu senken.⁹ Diese Veränderungen sollten auch während der medikamentösen Therapie fortgesetzt werden. Zu den maßgeblichen Schritten der Lebensstiländerung gehören die Reduzierung der Salzaufnahme, die ausreichende Zufuhr von Kalium, die Beschränkung des Alkoholkonsums, der Verzicht auf das Rauchen, eine ausgewogene und gesunde Ernährung, regelmäßige körperliche Aktivität sowie gegebenenfalls die Förderung des Gewichtsverlusts.⁹ Laut Empfehlungen der ESH/ESC-Leitlinie sollte die Natriumzufuhr 5 g/Tag nicht überschreiten.⁹ Randomisierte kontrollierte Studien zeigten, dass durch regelmäßiges Ausdauertraining der Blutdruck im Mittel um 11/5 mmHg gesenkt werden konnte.¹⁴ Dabei zeigt eine Dauer des Trainings von 50-60 Minuten mindestens zwei- bis dreimal wöchentlich blutdrucksenkende Effekte.¹⁵

Antihypertensive Pharmakotherapie

Als Erstlinientherapie werden hauptsächlich vier Gruppen von Medikamenten empfohlen: ACE-Hemmer, AT₁-Rezeptorantagonisten (Sartane), langwirksame Kalziumkanalblocker vom Dihydropyridin-Typ und Thiazid/Thiazid-ähnliche Diuretika. Diese Medikamente haben sich als wirksam in der Behandlung der arteriellen Hypertonie erwiesen und werden oft als Erstlinientherapie empfohlen.^{9,17} Die ESH/ESC-Leitlinie empfiehlt schon zu Beginn ein Kombinationspräparat aus zwei Antihypertensiva in einer Tablette.⁹ Patienten, die an Angina pectoris, einem vorherigen Myokardinfarkt, Herzinsuffizienz oder der Notwendigkeit einer Herzfrequenzkontrolle leiden, erhalten β -Adrenozeptorblocker als Teil ihrer Behandlung,⁹ jedoch sind sie in der blutdrucksenkenden Wirkung anderen Antihypertensiva unterlegen.¹⁶ Es wird davon abgeraten, Betablocker zusammen mit Verapamil oder Diltiazem einzunehmen, da beide Medikamente ein mögliches Herabsetzen des Sinusrhythmus oder der atrioventrikulären Überleitung verursachen können. Dennoch werden Betablocker aufgrund ihrer nachgewiesenen positiven Auswirkungen auf die Prognose weiterhin bei Patienten, die unter einem akuten Myokardinfarkt und chronischer Herzinsuffizienz leiden, unabhängig von ihrer blutdrucksenkenden Wirkung eingesetzt.⁹

Kalziumkanalblocker vom Dihydropyridintyp sind effektive Mittel zur Senkung des Blutdrucks und können in Kombination mit den oben genannten Erstlinien-Medikamenten eingesetzt werden. Eine häufige Nebenwirkung dieser Medikamente sind periphere Ödeme, die durch eine Erweiterung der peripheren Blutgefäße verursacht werden.¹⁸

Kalziumantagonisten (beispielsweise Amlodipin):

Kalziumantagonisten können in drei Gruppen unterteilt werden: Nifedipin-Typ (Dihydropyridine), Verapamil-Typ und Diltiazem-Typ.¹⁸ In der Bluthochdruck-Therapie werden Kalziumantagonisten vom Nifedipin-Typ (beispielsweise Amlodipin) eingesetzt.¹⁰ Sie wirken vorwiegend durch periphere Vasodilatation. In der Gefäßmuskelzelle kommt es durch den verminderten Ca^{2+} -Einstrom zur Relaxation und damit zur Verringerung des Gefäßtonus.¹⁸

AT₁-Rezeptorantagonisten (beispielsweise Olmesartan):

Angiotensin II spielt eine entscheidende Rolle als Hormon im RAAS. Angiotensin II wird durch die enzymatische Spaltung von Angiotensin I unter Einwirkung des Angiotensin-Converting-Enzyms gebildet.¹¹ Angiotensin II bindet an die AT₁-Rezeptoren und entfaltet diverse Wirkungen, wie beispielsweise Vasokonstriktion, gesteigertes Durstempfinden sowie die Rückresorption von Natrium und Wasser in den Nieren.¹¹ Dies führt zu einer Zunahme des Blutvolumens und damit zu einem Anstieg des Blutdrucks (s. Abbildung 2).¹¹ Zudem fördert Angiotensin II die Produktion von Aldosteron, einem Hormon, das ebenfalls zur Wasserretention beiträgt und den Blutdruck erhöht.¹¹ Durch die Antagonisierung des Angiotensin-II-Rezeptor Subtyps 1 hemmen AT₁-Rezeptor-Antagonisten die Angiotensin-II-Vasokonstriktion und die Aldosteronsekretion wird ebenfalls reduziert.¹⁸

Thiaziddiuretika (beispielsweise Hydrochlorothiazid, HCT):

Diuretika der Thiazidgruppe werden hauptsächlich zur Behandlung von arterieller Hypertonie und chronischer Herzinsuffizienz eingesetzt.¹⁸ Die blutdrucksenkende Wirkung ist mit einer Abnahme des Natriumchloridspiegels im Körper verbunden. Diese Effekte werden durch die Hemmung des Na^+ -Cl⁻-Kotransporters in den distalen Nierentubuli erzielt. Eine erhöhte Natriumchloridausscheidung erhöht wiederum die Kalium- und Wasserausscheidung.¹⁸

Mineralokortikoidrezeptorantagonisten (beispielsweise Eplerenon):

Aldosteron ist das vorherrschende Mineralokortikoid im menschlichen Körper und beeinflusst spezifische Kanäle in der Niere. Angiotensin II bewirkt eine verstärkte Aufnahme von Natrium und Wasser in den Nieren, während dies gleichzeitig zu einer gesteigerten Ausscheidung von

Kalium führt. Die Wirkung von Angiotensin II trägt dazu bei, den Wasser- und Elektrolythaushalt im Körper aufrechtzuerhalten und ist entscheidend bei der Regulation des Blutdrucks.¹⁸

Aldosteron-Antagonisten hemmen die Expression epithelialer Natriumkanäle (ENaC) und der basolateralen Na⁺-K⁺-ATPase durch Bindung an Aldosteron-Rezeptoren. Dies führt zu einer verringerten Natriumabsorption, einer verringerten Kaliumsekretion und einer geringen diuretischen Wirkung.¹⁸

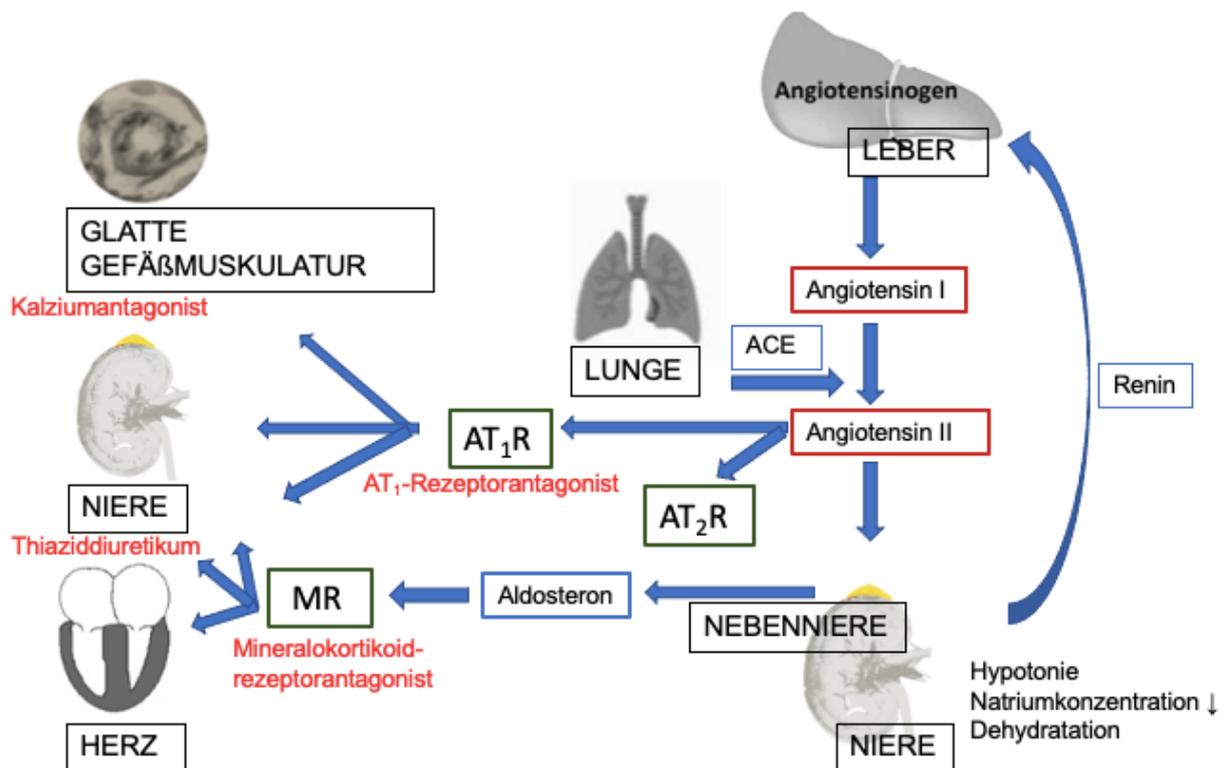


Abbildung 2: Schema des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS)¹¹
 (ACE: Angiotensin-Converting-Enzym, AT₁R: Angiotensin-II-Rezeptor Subtyp 1, AT₂R: Angiotensin-II-Rezeptor Subtyp 2, MR: Mineralokortikoidrezeptor)

modifiziert nach Ames et al. (2019)

In roter Schrift sind die oben aufgelisteten Antihypertensiva an ihrem jeweiligen Wirkort.

Die Behandlung wird mit wenigen Ausnahmen zur Initialbehandlung durch eine Zweifachkombination begonnen, die in einem zweiten Schritt zu einer Dreifachkombination erweitert wird (s. Abbildung 3).⁹ In einer dritten Stufe kommen dann Antihypertensiva hinzu, wobei Mineralokortikoidrezeptorantagonisten oder andere Diuretika bevorzugt werden sollten.¹⁶ Die Zweifach- und Dreifachkombinationen sollten nach Möglichkeit als Fixkombination gegeben werden, um sowohl die Tablettenlast der Patienten zu reduzieren als auch die Adhärenz mit der medikamentösen Therapie zu verbessern.⁹ Es wird darauf

hingewiesen, dass die gleichzeitige Verwendung von zwei Antagonisten des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems nicht empfohlen wird.⁹

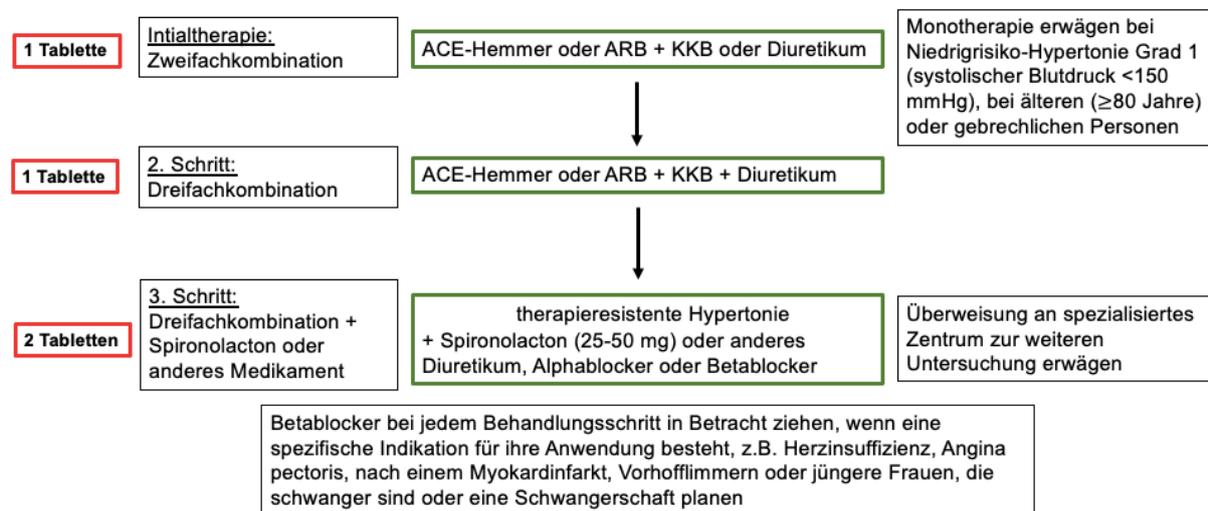


Abbildung 3: Medikamentenbehandlungsstrategie für unkomplizierte Hypertonie⁹
 (ARB: Angiotensinrezeptorblocker, KKB: Kalziumkanalblocker)
 modifiziert nach Williams et al. (2018)

Die angewandte Grundstrategie ist auch für die Mehrheit der Patienten mit zerebrovaskulären Erkrankungen, Diabetes oder peripherer arterieller Verschlusskrankheit geeignet.⁹

2.2 Therapieresistente Hypertonie

Wenn trotz einer Behandlung mit drei antihypertensiven Medikamenten in optimaler Dosierung, darunter auch ein Diuretikum, der Blutdruck die Zielwerte von 140/90 mmHg nicht erreicht, wird dies als therapieresistente Hypertonie bezeichnet.⁵ Bei ca. 10 % der Hypertoniker lässt sich auch unter diesen Maßnahmen der Blutdruck nicht einstellen.¹⁹ Vor der Diagnose einer therapieresistenten Hypertonie muss eine sekundäre Hypertonie ausgeschlossen werden. Dabei spielen die Überaktivität des Sympathikus und auch der Volumenüberschuss durch eine Niereninsuffizienz, ein Hyperaldosteronismus und eine übermäßige Natriumretention eine entscheidene Rolle bei den wesentlichen Pathomechanismen.⁵

2.3 Renale Denervation

Die renale Denervation zielt darauf ab, die periarteriellen afferenten und efferenten sympathischen Nervenfasern, die die Nierenarterien umgeben, in ihrer Aktivität zu modulieren.²⁰ Da die sympathische Innervation der Niere eine wesentliche Rolle bei der Blutdruckregulation spielt, ist die RDN unter anderem bei therapieresistenter Hypertonie

entwickelt worden.^{1,20} Studien haben gezeigt, dass RDN insbesondere bei Patienten mit schwer kontrollierbarem Bluthochdruck sicher und wirksam ist.²¹

Die kathetergestützte RDN wurde in den letzten 15 Jahren intensiv erforscht und hat sich als vielversprechende Option zur Behandlung von Hypertonie etabliert. Fortschritte in der Technologie und die Entwicklung neuer Kathetersysteme haben zu verbesserten Behandlungsoptionen geführt. Das Radiofrequenz-Verfahren, insbesondere mit dem Symplicity Spyril-System von Medtronic, hat vielversprechende Ergebnisse in der Behandlung von Hypertonie gezeigt.²² In der SPYRAL HTN-OFF MED Pivotal-Studie wurde die Wirksamkeit von RDN bei Patienten ohne antihypertensive Medikation untersucht. Die Ergebnisse zeigten eine signifikante Reduktion des Blutdrucks im Vergleich zur Scheinbehandlung, wobei nach drei Monaten eine Senkung des 24-Stunden-Blutdrucks um 3,9 mmHg und des systolischen ambulanten Blutdrucks um 6,5 mmHg festgestellt wurde.⁶

Die SPYRAL HTN-ON MED-Studie untersuchte die Wirkung von RDN bei Patienten, die bereits antihypertensive Medikamente einnahmen. Auch hier wurde insbesondere nach sechs Monaten eine signifikante Blutdrucksenkung beobachtet.^{22,23} Die RADIANCE HTN-TRIO-Studie zeigte ebenfalls, dass die ultraschallbasierte RDN den Blutdruck bei Patienten mit unkontrollierter resistenter Hypertonie unter einer standardisierten Dreifach-Kombinationstherapie senkt.²⁴ Nach zwei Monaten betrug die mittlere Senkung des systolischen ambulanten Tagesblutdrucks -8 mmHg in der Interventionsgruppe im Vergleich zu -3 mmHg in der Scheinbehandlungsgruppe.²⁴

Die Langzeiteffekte von RDN wurden in Studien wie der SPYRAL HTN-OFF MED Pivotal-Studie und der SPYRAL HTN-ON MED-Studie untersucht, die eine blutdrucksenkende Wirkung von bis zu drei Jahren zeigten.^{25,26} Langfristige Nachbeobachtungsdaten deuteten ebenfalls auf eine anhaltende Blutdrucksenkung von bis zu zehn Jahren hin.^{27,28}

2.4 Kardiales Remodeling

Kardiales Remodeling bezieht sich auf strukturelle und funktionelle Veränderungen des Herzens als Reaktion auf verschiedene Stimuli, wie zum Beispiel auf die arterielle Hypertonie. Die Folgen sind Myokardschäden, insbesondere eine Vergrößerung des Herzmuskels (Hypertrophie), fibrotische Veränderungen an der Wand der Herzkammern und diastolische und systolische Dysfunktionen. Durch die andauernde Belastung der Herzkammer kommt es trotz anfänglicher Anpassungsprozesse zu einer chronischen Überlastung der Vorhöfe. Dies äußert sich in einer Vergrößerung und Dilatation der Vorhöfe.²⁹ Sowohl der linke als auch der rechte Vorhof können eine Vorhofvergrößerung erfahren.³⁰

Neben der Vorhofvergrößerung spielt auch der Prozess des atrialen Umbaus eine bedeutende Rolle. Dazu zählen die Vergrößerung der atrialen Herzmuskelzellen (Kardiomyozytenhypertrophie) sowie eine erhöhte Bildung von interstitieller Fibrose und extrazellulärer Matrix.³¹ Während dieses Prozesses werden genetische Programme, die während der fetalen Entwicklung aktiv und im adulten Herzen abgeschaltet sind, reaktiviert.³¹ Die bedeutendsten natriuretischen Peptide umfassen das atriale natriuretische Peptid (ANP) und das natriuretische Peptid vom Typ B (BNP). Diese Hormone werden hauptsächlich von den Kardiomyozyten als Reaktion auf Dehnungsreize produziert und ausgeschieden. NT-proBNP ist ein biologisch inaktives Spaltprodukt. Die Spiegel dieser Hormone können Rückschlüsse auf die Schwere der Herzinsuffizienz ziehen.³²

Während der Myokardfibrose reichert sich Kollagen in der extrazellulären Matrix an, die den interstitiellen Raum im Herzgewebe bildet. Die resultierenden pathophysiologischen Zustände verursachen eine beeinträchtigte Funktion der linken Herzkammer und tragen zur Entwicklung einer Herzinsuffizienz bei.^{33,34} Eine Störung dieses sorgfältig regulierten Gleichgewichts kann zu schwerwiegenden strukturellen und funktionellen Anomalien im Herzen führen, indem die myokardiale Erregung und Kontraktion beeinträchtigt werden. Dies kann zu einer schweren systolischen und diastolischen Dysfunktion führen, bei der sich eine Versteifung der Herzkammern entwickelt. Chronischer Stress oder eine Volumenüberladung können sich als Gewebefibrose manifestieren und eine Dehnung der Kardiomyozyten und Herzfibroblasten verursachen, wodurch letztere direkt aktiviert werden. Die kardialen Fibroblasten sind die Hauptzellen, die extrazelluläre Matrix-Proteine wie Kollagen produzieren und somit zur Entstehung der Fibrose beitragen.²⁹

Einige sogenannte profibrotische Proteine spielen eine bedeutende Rolle bei der Bildung von fibrotischem Gewebe in der extrazellulären Matrix. Dazu gehört der „Transforming Growth Factor Beta“ (TGF-Beta, TGF- β), der eine Vielzahl biologischer Aktivitäten, einschließlich Zellwachstum, Zelltod, Zelldifferenzierung und Synthese der extrazellulären Matrix reguliert.³⁵ Dieser Faktor wird sowohl von Kardiomyozyten als auch von Fibroblasten produziert. Eine übermäßige Expression von aktivem TGF- β im Herzen führt zu Vorhoffibrose und begünstigt das Auftreten von Vorhofflimmern.³⁰ Ein weiterer bedeutender Faktor, der an der Entwicklung von Fibrose beteiligt ist, nennt sich „Connective Tissue Growth Factor“ (CTGF). TGF- β regt Fibroblasten zur Produktion von extrazellulären Matrix-Proteinen an. CTGF aktiviert TGF- β und trägt zur Stimulierung der extrazellulären Matrix-Synthese durch TGF- β bei.³⁵ Kollagen ist ein weiteres bedeutendes Protein. Die Chordae tendineae und die Kollagenmatrix im Myokard bestehen aus den Kollagentypen I und III und bilden ein strukturelles Kontinuum. Der Großteil des Herzkollagens besteht aus Typ I (Col1a2), das hauptsächlich mit groben

Fasern assoziiert ist und für die Zugfestigkeit verantwortlich ist.³⁶ Diese fibrillären Kollagene werden von Herzfibroblasten synthetisiert und unterstützen und verbinden die Muskelzellen.³⁶ Im Verlauf des hypertrophen Prozesses, der mit einer Drucküberlastung einhergeht, sind Fibroblastenproliferation, gesteigerte Kollagensynthese, sowie strukturelle und biochemische Veränderungen der Matrix zu beobachten.³⁶ Diese charakteristischen Muster reparativer und reaktiver Myokardfibrose führen jeweils zu einer erhöhten Steifigkeit des Herzmuskels während der Entspannungsphase (diastolische Myokardsteifigkeit) und der Pumpphase (systolische Myokardsteifigkeit) sowie zu einer pathologischen Hypertrophie des Herzmuskels.³⁶

2.5 Fragestellung und Ziele der Arbeit

Am Tiermodell der SHR soll der Einfluss der antihypertensiven Medikamente nach einer RDN auf den Blutdruck, die sich daraus ergebenden kardialen Remodelingprozesse und die Aktivität des RAAS untersucht werden. Bisher ungeklärt ist die Frage, ob eine Modulation des vegetativen Nervensystems mittels RDN und eine parallel verordnete antihypertensive Medikation synergistisch oder antagonistisch wirken. Ebenfalls unbekannt ist, ob bestimmte antihypertensive Substanzklassen bei Patienten nach RDN aufgrund ihres Wirkmechanismus besonders zu bevorzugen sind bzw. ob bestimmte Substanzen nach einer renalen Denervation möglicherweise aufgrund einer fehlenden blutdrucksenkenden Wirkung abgesetzt werden können. Daher handelt es sich bei dieser Studie um klinisch relevante Fragestellungen, welche als Grundlage zur Optimierung der medikamentösen Therapie nach RDN dienen könnten. Die vorliegende Arbeit verfolgte unter anderem folgende Ziele:

- 1.) Untersuchung der Wirksamkeit von Kalziumantagonisten, Angiotensinrezeptorblockern, Thiaziddiuretika und Mineralokortikoidrezeptorantagonisten nach einer Scheinoperation (SHAM) bzw. RDN.
- 2.) Untersuchung der unterschiedlichen Effekte der RDN mit medikamentöser Behandlung auf den Prozess des kardialen Remodelings.

In dieser Studie wurde die Wirkung mehrerer blutdrucksenkender Medikamente, die von Leitlinien empfohlen werden, in Verbindung mit RDN auf den Blutdruck und das kardiale Remodeling bei SHR untersucht. SHR ist ein etabliertes Tiermodell für essenzielle Hypertonie und bluthochdruckbedingte Herzschäden.^{37,38}

Es wurden zwei Gruppen untersucht, um die oben genannte Fragestellungen zu klären: Die Kontrollgruppe bestand aus SHR, bei denen die eine Hälfte einer Scheinoperation unterzogen wurde, während bei der anderen Hälfte die RDN durchgeführt wurde. Die Versuchsgruppen wurden ebenso in zwei Untergruppen aufgeteilt. In der einen Untergruppe wurde bei der Hälfte der Tiere eine Scheinoperation durchgeführt, gefolgt von einer antihypertensiven medikamentösen Behandlung. Die Auswirkung der RDN auf den Blutdruck wurde über einen Zeitraum von 28 Tagen verfolgt und die histologischen und biochemischen Analysen nach Abschluss der Studie durchgeführt (s. auch 3.2.1 Tiermodell).

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Geräte

Abzug	Firma Arge Labore
Chemilumineszenz-Imaging-System	peqlab Fusion SL VILBER LOURMAT
Gewebeeinbettautomat	Excelsior, Thermo Scientific, Schwerte
Heizblock	Eppendorf
Katheterbasierte Telemetrie	Data Sciences International (DSI), Saint Paul, MN, USA
Kühlzentrifuge	Eppendorf
Mikroskop	Leica, Aperio Versa 8
Photometer	DU 730 UV/Vis-Spectrophotometer Beckmann Coulter
Schüttler	Heidolph Polymax
Tischzentrifuge	VWR
Überkopfschüttler	Tube rotator, VWR
Vortex Mixer	SN 41119030, Labnet international
Waage	Ohaus, CS

3.1.2 Sonstige Materialien

Filterpapier	Whatman 3MM CHR (CAT No. 3030-917)
Gelelektrophorese-Zubehör	Biorad Mini PROTEAN Tetra Cell
Pipetten	Ergonomic High Performance Pipetten VWR
Tank Blot-System	Biorad Mini Trans-Blot Cell

3.1.3 Software

Bildbearbeitung	Gimp 2.0 (GNU Image Manipulation Program)
Fibroseauswertung	NIS Elements Nikon Instruments Europe BV
Katheterbasierte Telemetrie	DSI Analyse Software
Mikroskop	Leica, Image Scope x64
Statistische Analysen	GraphPad Prism Version 8.4.2, San Diego, CA, USA
Western Blot	FusionCapt Advance peqlab

3.2 Methoden

3.2.1 Tiermodell

Um die Wirkung blutdrucksenkender Medikamente und deren Effekte nach der RDN zu beurteilen, wurde ein experimentelles Tiermodell durchgeführt. Das Kleintiermodell der SHR bietet hierbei die Möglichkeit, die Effekte von blutdrucksenkenden Medikamenten und/oder der sympathischen Denervation zu untersuchen. SHR sind ein häufig verwendetes Modell für Bluthochdruck. Bei SHR steigt der Blutdruck in den ersten zehn Wochen nach der Geburt.³⁹ Wir haben SHR im Alter von 23 Wochen angewendet, nachdem die chronische Hypertonie bei erwachsenen SHR vollständig etabliert war.^{37,38}

Insgesamt wurden 64 männliche Ratten untersucht (s. Abbildung 4). Die Ratten wurden im Alter von sechs Wochen von Janvier Labs in Le Genest-Saint-Isle, Frankreich, erworben. Anschließend wurden sie unter standardisierten Bedingungen im Institut für klinisch-experimentelle Chirurgie am Universitätsklinikum des Saarlandes gehalten. Die Raumtemperatur betrug 24 °C und es gab einen 12-Stunden-Dunkel-/ Lichtzyklus. Sie hatten freien Zugang zu einer Standarddiät (#V1534 mit 2.128 mg/kg NaCl und 8.797 mg/kg Kalium; ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) und Leitungswasser. Im Alter von 23 Wochen wurde den Ratten über die Aorta abdominalis ein katheterbasiertes Telemetriesystem implantiert, um den Blutdruck und die Herzfrequenz wöchentlich aufzuzeichnen und überwachen zu können. Im Alter von 26 Wochen wurden die Ratten randomisiert in zwei Gruppen aufgeteilt. 32 Ratten wurden einer Scheinoperation (SHAM) unterzogen und erhielten eine antihypertensive Medikation; die restlichen 32 Ratten wurden einer RDN unterzogen und erhielten zusätzlich eine

blutdrucksenkende Medikation. Die Auswirkungen der Behandlungen wurden über vier Wochen aufgezeichnet und miteinander verglichen. Alle Experimente wurden gemäß den Vorgaben des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt und erhielten die Genehmigung der Ethikkommission des Saarländischen Landesamtes für Verbraucherschutz (Genehmigungsnummer: #12/2016). Der experimentelle Zeitplan ist in Abbildung 4 dargestellt.

Tiergruppen

SHR-Kontrollen ohne medikamentöse Behandlung:

1. SHR-SHAM operierte Ratten (n=9)
2. SHR-RDN (n=9)

SHR-Gruppen nach SHAM mit medikamentöser Behandlung:

1. SHR-SHAM + Kalziumkanalblocker (n=6), Amlodipin 20 mg/kg KG
2. SHR-SHAM + Angiotensinrezeptorblocker (n=6), Olmesartan 5 mg/kg KG
3. SHR-SHAM + Thiaziddiuretikum (n=5), Hydrochlorothiazid 12.5 mg/kg KG
4. SHR-SHAM + Mineralokortikoidrezeptorantagonist (n=6), Eplerenon 100 mg/kg KG

SHR-Gruppen nach RDN mit medikamentöser Behandlung:

1. SHR-RDN + Kalziumkanalblocker (n=6), Amlodipin 20 mg/kg KG
2. SHR-RDN + Angiotensinrezeptorblocker (n=6), Olmesartan 5 mg/kg KG
3. SHR-RDN + Thiaziddiuretikum (n=6), Hydrochlorothiazid 12.5 mg/kg KG
4. SHR-RDN + Mineralokortikoidrezeptorantagonist (n=5), Eplerenon 100 mg/kg KG

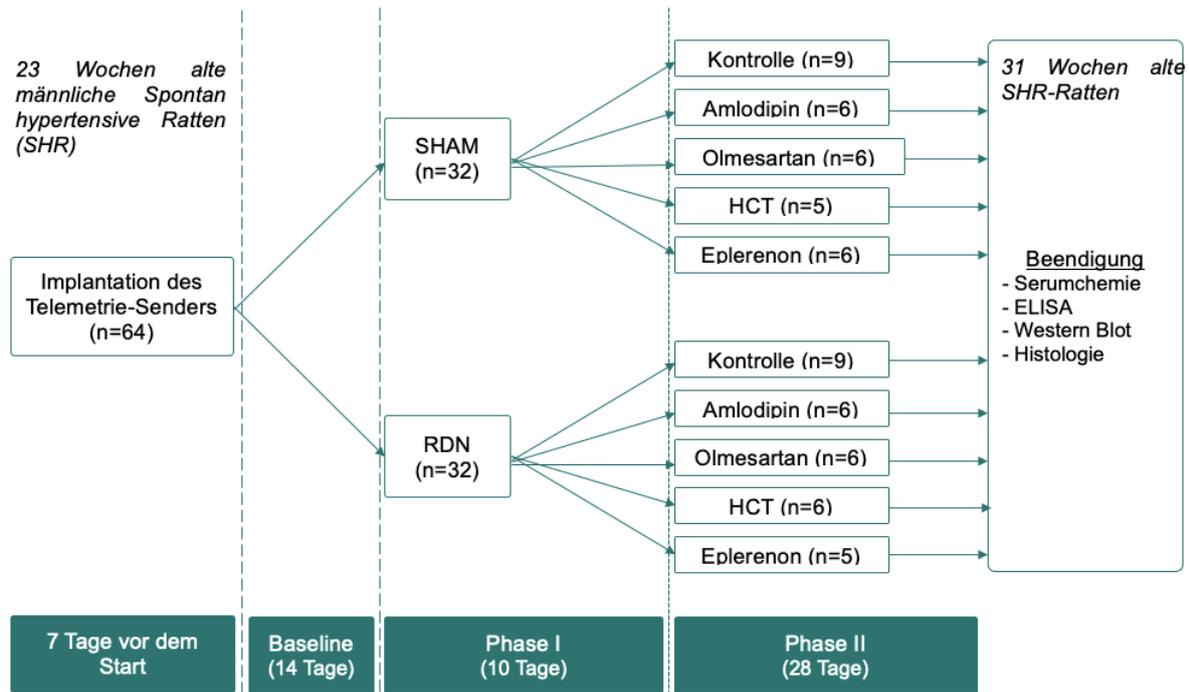


Abbildung 4: Experimenteller Zeitplan

Eine Woche vor Beginn der Studie: Im Alter von 23 Wochen wurde 64 männlichen SHR ein kathetergestützter Radiotelemetrie-Sender (DSI Systems) in die abdominale Aorta implantiert, um den mittleren arteriellen Druck, den systolischen und diastolischen Blutdruck sowie die Herzfrequenz kontinuierlich aufzuzeichnen.

Baseline (14 Tage): Nach einer siebentägigen postoperativen Erholungsphase wurden zwei Wochen lang telemetrische Grundlinienmessungen durchgeführt.

Phase I (10 Tage): Anschließend wurden SHR im Verhältnis 1:1 einer renalen sympathischen Denervierung (RDN n=32) oder einer Scheinoperation (SHAM n=32) unterzogen. In beiden Tiergruppen gab es jeweils 9 Ratten, die keine antihypertensiven Medikamente bekamen und als Kontrolle dienten.

Phase II (28 Tage): Zehn Tage nach der RDN, als der Blutdruck stabilisiert war, wurden die Tiere 28 Tage lang mit blutdrucksenkenden Medikamenten behandelt. Während der 28-tägigen Behandlung erhielten die Ratten randomisiert entweder Futter ohne blutdrucksenkende Medikamente oder den Kalziumkanalblocker Amlodipin, den Angiotensinrezeptorblocker Olmesartan, das Thiaziddiuretikum Hydrochlorothiazid oder den Mineralokortikoidrezeptorantagonisten Eplerenon.

Im Alter von 31 Wochen wurden alle Tiere euthanasiert und Serum und Gewebe wurden für biochemische Untersuchungen aufbewahrt.

Implantation der Telemetrie-Sender in die Aorta abdominalis

Die Implantation der Telemetrie-Sender in die Aorta abdominalis wurde zwei Wochen vor dem experimentellen Verfahren von der Biologielaborantin Nina Rebmann und der Medizinisch Technischen Assistentin Jeannette Zimolong durchgeführt (s. Abbildung 5). Nach einer Beobachtungszeit von einer Woche zur Überwachung des Operationserfolges und einer stabilen Übertragung der Blutdruckwerte gingen die Tiere in den experimentellen Teil der Studie über.

Während des Experiments ging bei zwei Ratten (1x SHAM+HCT, 1x RDN+Eplerenon) die Kathetersignalübertragung aufgrund von Thrombusbildung an der Katheterspitze verloren.



Abbildung 5: Telemetrie-Sender

Katheterbasierte Telemetrie

Die katheterbasierte Telemetrie ermöglicht eine durchgehende Blutdruckmessung mit drahtloser Datenübertragung und elektronischer Speicherung. Im Alter von 23 Wochen wurden Radiotelemetriesender zur Überwachung von Blutdruck und Herzfrequenz implantiert. Die Blutdruckmessung erfolgte einmal wöchentlich in den Räumlichkeiten der kardiologischen Forschung des Universitätsklinikums des Saarlandes. Dazu wurden die Tiere einzeln in Käfigen auf die Telemetrie-Empfängerstationen gesetzt (s. Abbildung 6). Dabei hatten die Tiere freien Zugang zu Futter und Leitungswasser. Der Sender wurde mittels eines Magneten aktiviert und die Messdaten wurden elektronisch für etwa 21 Stunden aufgezeichnet und gespeichert.

Gegenüber herkömmlicher Blutdruckmessmethoden bei Ratten, wie z.B. tail-cuff, bietet die Telemetrie den Vorteil, dass eine stressinduzierte Verfälschung der Messwerte vermieden werden kann, da sich die Tiere während der Messung frei im Käfig bewegen können und die Messung ohne zusätzlich belastendes Handling der Tiere erfolgt.

Nach einer Woche postoperativer Erholung wurden zwei Wochen lang Basismessungen durchgeführt.



Abbildung 6: Telemetriestationen

Renale Denervation

Im Alter von 26 Wochen wurden die SHR-Ratten randomisiert. 32 Ratten wurden einer bilateralen RDN unterzogen (s. Abbildung 7) und 32 Ratten wurden SHAM-operiert. Die Operation wurde von der Biologielaborantin Nina Rebmann und der Medizinisch Technischen Assistentin Jeannette Zimolong durchgeführt.

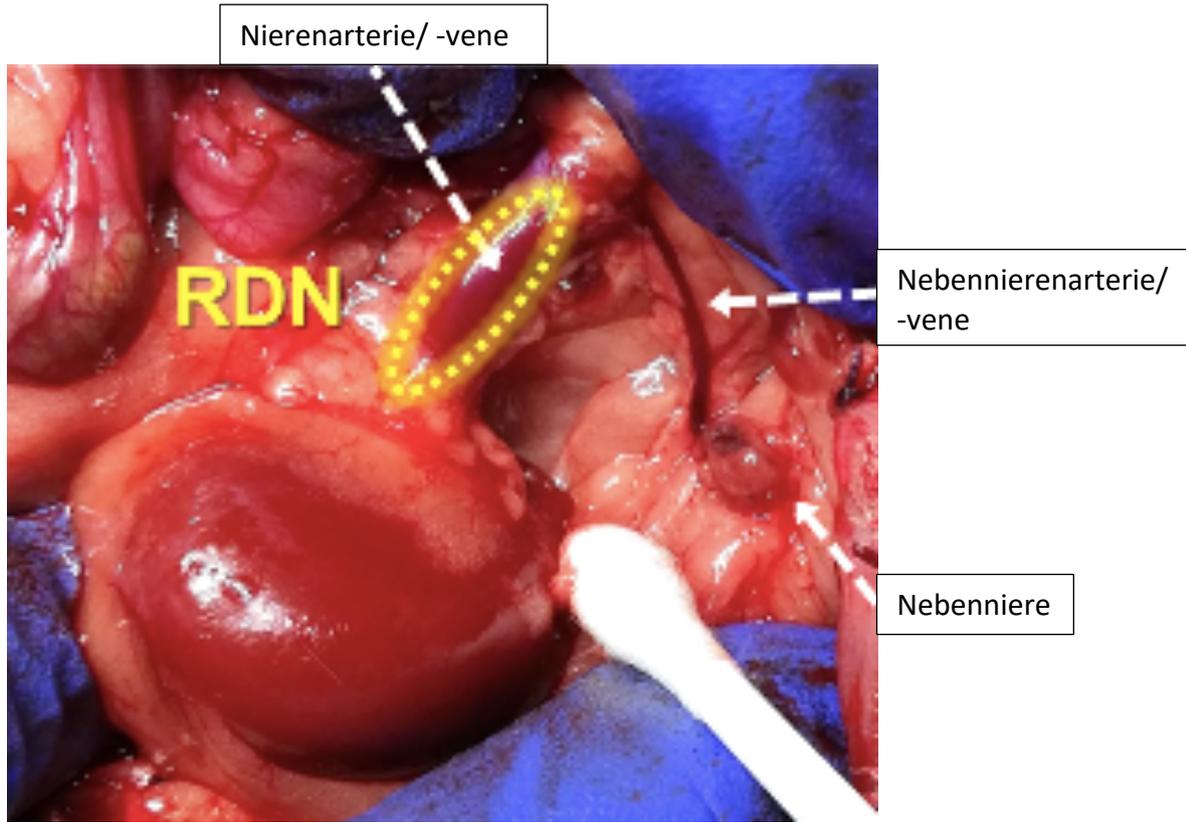


Abbildung 7: Renale Denervation

OP-Situs zur Durchführung einer renalen Denervation. Dargestellt sind die Niere und Nebenniere mit den dazugehörigen Gefäßen. Die Darstellung der A. renalis erfolgt vom Ursprung an der Aorta bis zur Niere. Sie wird freigelegt und die sympathischen Nervenfasern werden durch Anwendung einer Lösung aus 20 % Phenol/Ethanol verödet (unpublizierte Daten Hohl et al.).

Medikamentenapplikation

Während der zehn Tage post RDN (Phase I) wurden die Tiere auf einer Standarddiät ohne antihypertensive Medikamente gehalten. Zehn Tage nach RDN erhielten die Ratten randomisiert entweder keine blutdrucksenkenden Medikamente (Kontrollgruppe) oder eine der folgenden blutdrucksenkenden Medikamente: Kalziumkanalblocker Amlodipin (HEXAL®, Hersteller: Hexal AG in Holzkirchen, Deutschland 20 mg/kg KG/Tag im Standardfutter (ssniff)), Angiotensinrezeptorblocker Olmesartan (#SML1391, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland, 5 mg/l Trinkwasser/Tag), Thiaziddiuretikum Hydrochlorothiazid (HCT) (#H2910, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland, 12.5 mg/l Trinkwasser/Tag) oder Mineralokortikoidrezeptorantagonist Eplerenon (STADA®, Stadapharm GmbH, Bad Vilbel, Deutschland, 100 mg/kg KG/Tag in Standardfutter (ssniff)) für 28 Tage (Phase II). Die Dosierungen der Medikamente wurden anhand von Literaturberichten zu ihrer blutdrucksenkenden Wirkung bei SHR bestimmt. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 8 dargestellt.

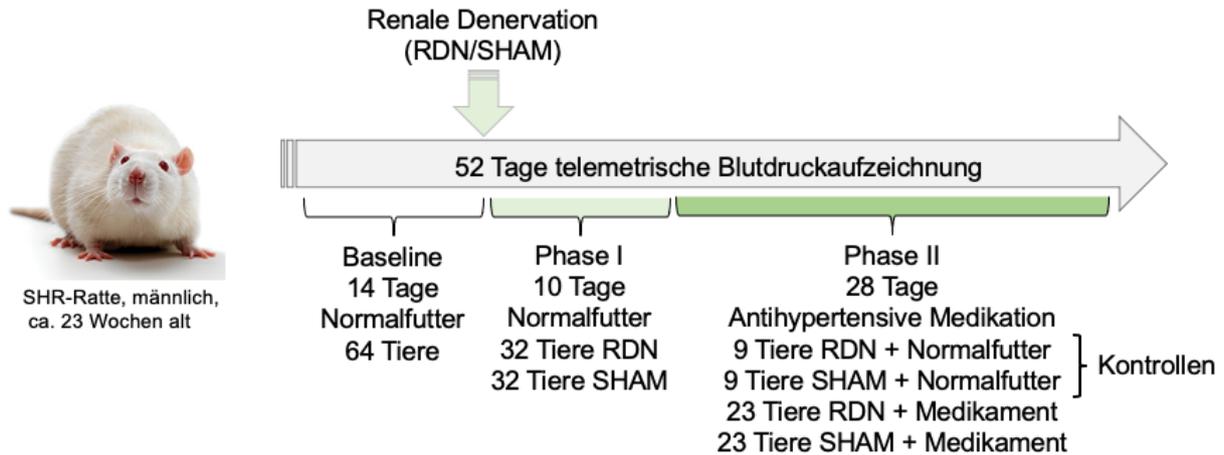


Abbildung 8: Versuchsaufbau

Die telemetrische Blutdruckaufzeichnung dauerte insgesamt 52 Tage. Für 14 Tage erhielten insgesamt 64 Tiere Normalfutter. In der 10-tägigen Phase I wurden randomisiert 32 Tiere einer RDN bzw. die anderen 32 Tiere einer Scheinoperation unterzogen. Während der 28-tägigen Behandlungsphase II erhielten die Tiere entweder Futter oder Trinkwasser ohne Medikamentenzusatz oder mit dem Kalziumkanalblocker Amlodipin, dem Angiotensinrezeptorblocker Olmesartan, dem Thiaziddiuretikum Hydrochlorothiazid oder dem Mineralokortikoidrezeptorantagonisten Eplerenon.

Terminierung der Studie

Nach Versuchsende wurden die Tiere aller Versuchsgruppen zur Organentnahme für biochemische Analysen schmerzlos unter tiefster Narkose euthanasiert. Dazu wurden die Ratten zuerst mittels Isofluran Anästhesiegas (5 %) betäubt und dann umgehend mittels einer Injektionsnarkose bestehend aus einem Gemisch aus Rompun (6 mg/kg KG) und Ketavet (80 mg/kg KG) in Tiefschlaf versetzt, der Brustkorb eröffnet und eine Blutprobe direkt aus dem Herzen entnommen. Anschließend wurde das Herz herausgenommen und das Tier entblutet. Nach Entnahme der Nieren und Herzen wurden die Vorhöfe und Ventrikel separiert und für biochemische Analysen aufbereitet.

3.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Genexpressionsanalyse wurde durch PCR durchgeführt. Die Gesamt-RNA wurde aus dem linksventrikulären Gewebe der Ratte mit dem Extraktionsreagenz peqGold Trifast (#30-2010; PeqLab, Erlangen, Deutschland) nach Herstellerprotokoll extrahiert. Genomische DNA-Verunreinigungen wurden mittels DNase-Verdau eliminiert, und die cDNA (kopierte DNA) wurde durch die Umkehrtranskription der isolierten RNA unter Verwendung des HighCap cDNA RT-Kits (#4368814; Applied Biosystems, Waltham, USA) gemäß den Anweisungen des Herstellers synthetisiert. Die TaqMan-PCR wurde in einem StepOnePlus Thermocycler

(Applied Biosystems, Waltham, USA) mit dem TaqMan GenEx Mastermix (#4369016, Applied Biosystems, Waltham, USA) durchgeführt. Die Signale wurden auf entsprechende Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)- Kontrollen normalisiert. Der ΔC_t wurde für die statistische Analyse und $2^{-\Delta\Delta C_t}$ für die Datenpräsentation verwendet.

RNA-Isolation

Zur Extraktion von RNA wurde einem kleinen Stück Gewebe 500 μ l PegGold Trifast hinzugefügt. Nachdem dieses Gemisch homogenisiert wurde, wurden nochmal 500 μ l PegGold Trifast hinzugegeben und das Reagiergefäß wurde für 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Im Anschluss wurden 200 μ l Chloroform hinzugegeben und für 15 Sekunden gut durchmischt. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Mischung für 10 min bei 13000 U/min bei 4 °C zentrifugiert. Im letzten Schritt der Phasentrennung wurde die wässrige Phase vorsichtig entnommen und behutsam in ein frisches Reaktionsgefäß transferiert. Daraufhin wurde die entnommene Phase auf Eis gestellt. Zur RNA-Präzipitation wurden 500 μ l Isopropanol zugegeben, durchmischt und für 15 min auf Eis gestellt. Anfänglich wurde die Probe für eine Dauer von 60 min bei einer Zentrifugationsgeschwindigkeit von 13000 U/min und einer Temperatur von 4 °C bearbeitet. Nachdem der überstehende Isopropanol-Anteil entfernt wurde, wurde das Pellet mit 1 ml 75%igem Ethanol erneut einer fünfminütigen Zentrifugation bei 13000 U/min und einer Temperatur von 4 °C unterzogen. Nach der Zentrifugation wurde die gesamte Flüssigkeit behutsam abgesaugt, und das Pellet an der Luft getrocknet. Abschließend wurden 50 μ l RNase-freies H₂O hinzugefügt und das Gemisch für 5 min bei 60 °C im Thermoschüttler inkubiert, um das Pellet zu resuspendieren. Im Anschluss wurde die RNA-Messung unter Verwendung des Programms NanoDrop durchgeführt. Die RNA-Menge wurde auf 2 μ g/ μ l umgerechnet, das entsprechende Volumen in ein neues Reagiergefäß übergeführt und auf 10 μ l mit RNase freiem-H₂O aufgefüllt. Die Proben wurden bis zu ihrem Einsatz bei einer Temperatur von -80 °C gelagert.

DNase-Verdau

Der DNase-Verdau ist ein molekularbiologisches Verfahren, bei dem die genomische DNA, die in einer Probe vorhanden ist, durch die Zugabe des Enzyms DNase in kleinere Fragmente zerlegt wird. Hierfür wurde zunächst ein Mastermix zusammengestellt.

Mastermix für eine Probe:

- 5.5 µl RNase-freies H₂O
- 2 µl DNase I (Pepqab, pepqGOLD DNase, Artikelnummer: PEQL04-1180)
- 2 µl DNase I + MgCl₂-Puffer
- 0.5 µl RNase-Inhibitor (Applied Biosystems von Thermo Fisher Scientific, Chargennummer: 00759850)

10 µl Mastermix wurden pro Probe aus 10 µl RNA, die 2 µg entsprechen, hinzugegeben, um auf ein Gesamtvolumen von 20 µl zu kommen. Aus den nun entstandenen Proben wurden im PCR Cycler (Pepqab Primus 96 Erlangen, Deutschland) 40 min lang die chromosomalen Verunreinigungen entfernt.

Programm DNase-Verdau:

- 1.) Gerätedeckel wird auf 110 °C erhitzt
- 2.) Pause bei 37 °C für 10 min
- 3.) Probe bei 75 °C für 10 min
- 4.) Aufbewahren der Probe bei 8 °C für 10 min

Reverse-Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)/ cDNA-Synthese

Die Reverse-Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) ist eine molekularbiologische Technik, die verwendet wird, um RNA in DNA umzuwandeln und dann spezifische DNA-Sequenzen zu vervielfältigen.

Zuerst wird RNA aus einer Probe extrahiert. Dann wird die Reverse Transkriptase eingesetzt, um diese RNA in komplementäre DNA (cDNA) umzuschreiben. Die erzeugte cDNA dient als Vorlage für die PCR, bei der spezifische DNA-Regionen durch wiederholte Amplifikation vervielfältigt werden. Die RT-PCR wird häufig verwendet, um die Expression von Genen zu quantifizieren oder RNA-Moleküle zu analysieren, insbesondere in der Genexpression und bei der Untersuchung von RNA-Viren. Die folgenden Komponenten wurden miteinander vermengt, um die gewünschte Reaktionsmischung herzustellen.

Mastermix für eine Probe:

- 2 µl 10-facher Reverse-Transkriptase-Puffer (RT-Puffer)

- 0.8 µl 25-facher dNTP-Mix (100 mM)
- 2 µl 10-facher RT Random Primer (zufälliger Primer)
- 1 µl Multiscribe Reverse Transkriptase (Applied Biosystems von Thermo Fisher Scientific, Chargennummer: 00364690)
- 0.5 µl RNase-Inhibitor
- 3.2 µl Reinstwasser Aqua ad-H₂O (Firma Braun)

10 µl dieses Mastermixes wurden mit 10 µl RNA nach dem DNase Verdau durchmischt und kurz abzentrifugiert. Danach wurde die RT-PCR im Peqlab Primus 96 durchgeführt. Bis zur Durchführung der Real-Time PCR wurden die Proben auf Eis gestellt bzw. bei -80 °C eingefroren.

Programm Reverse-Transkription:

- 1.) Erhitzen des Gerätedeckels auf 110 °C
- 2.) Probe bei 25 °C für 10 min
- 3.) Probe bei 37 °C für 2 h
- 4.) Probe bei 85 °C für 5 min
- 5.) Aufbewahren der Probe bei 4 °C

Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (Taqman-PCR)

Die Real-Time PCR ist eine Nukleinsäure-Amplifikationsmethode, bei der die Vervielfältigung der DNA-Sequenz in Echtzeit beobachtet wird. Diese Technik ermöglicht die kontinuierliche und direkte Messung der resultierenden Amplifikationsprodukte während der Reaktion, welches eine schnelle und präzise Quantifizierung der DNA ermöglicht. Dabei werden TaqMan-Sonden, eine Art von molekularen Sonden genutzt, um spezifische DNA-Sequenzen zu erkennen und zu quantifizieren. TaqMan-Sonden bestehen aus einer kurzen einzelsträngigen DNA, die spezifisch zur Ziel-DNA-Sequenz passt. An beiden Enden der Sonde sind spezifische Marker: ein Fluoreszenzfarbstoff und ein Quencher (Absorber des Fluoreszenzsignals). Während der PCR bindet sich die TaqMan-Sonde an die Ziel-DNA, wenn die Temperaturbedingungen für die Hybridisierung erreicht sind. Die Sonde bindet an den passenden DNA-Strang in der Nähe der Region, die der DNA-Polymerase als Vorlage für die Synthese dient. Die Taq-DNA-Polymerase, die die PCR durchführt, beginnt mit der Synthese eines neuen DNA-Strangs der Vorlage. Wenn die DNA-Polymerase die Stelle erreicht, an der die TaqMan-Sonde gebunden ist, wird sie durch die Polymerase abgebaut und der Quencher

wird freigesetzt. Da der Quencher freigesetzt wird, gibt es keinen Absorber mehr in unmittelbarer Nähe des Fluoreszenzfarbstoffs auf der Sonde. Dies ermöglicht es dem Fluoreszenzfarbstoff, Licht zu emittieren und zu fluoreszieren. Das ausgesendete Licht wird von einem Detektor erfasst. Die Intensität des Fluoreszenzsignals korreliert mit der Menge an PCR-Produkt, das während der Reaktion gebildet wird.

Zunächst wurde die Plattenbelegung geplant. Danach wurde die cDNA in neuen 1.5 ml Reagiergefäßen im Verhältnis 1:5 verdünnt (8 µl cDNA und 32 µl DEPC-H₂O). Auch hier wurde ein Mastermix angesetzt.

Ansatz für TaqMan-Sonden Mastermix (20 µl pro Well):

- 14.5 µl Reinstwasser Aqua ad (Braun)-H₂O
- 5 µl TaqMan MasterMix (Applied Biosystems von Fisher Scientific, Chargennummer: 2737514)
- 0.5 µl Gene Expression Assay (Sonde)

In jedem Well (Vertiefung) wurden zunächst 19 µl Flüssigkeit platziert. Danach wurde 1 µl zuvor verdünnte cDNA in jedes Well hinzugefügt. Die Platte wurde nach Belegung mit einer Folie versiegelt und für 5 min bei 500 U/min zentrifugiert. Abschließend wurde die TaqMan-PCR in einem StepOnePlus Thermocycler durchgeführt.

Die folgenden Sonden (Applied Biosystems Life Technologies in Waltham, USA) wurden verwendet, um die Transkripte zu amplifizieren:

- Sonde für das B-Typ natriuretische Peptid (Nppb; Rn00580641_m1)
- Sonde für das Zytokin Transforming growth factor beta (TGF-β; Rn00572010_m1)
- Sonde für den Connective tissue growth factor (CTGF; Rn01537279_g1)
- Sonde für das Alpha-1-Typ-I-Kollagen (Col1a1; Rn01463848_m1)
- Sonde für das Alpha-2-Typ-I-Kollagen (Col1a2; Rn00670286_m1)
- Sonde für die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH; Rn01775763_g1)

3.2.3 Western Blot

Als Nachweisverfahren für Proteine dient der Western Blot. Zu Beginn werden die Proteine aus dem Gewebe durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. Im nächsten Schritt werden die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran übertragen (Blotten). Die Blots werden mit Antikörpern versehen, sodass man anschließend die Antigen-Antikörperreaktion über einen zweiten Antikörper enzymimmunologisch sichtbar machen und analysieren kann.

Proteinisolation

Zuerst wurden die 1.5 ml großen Reagiergefäße mit 400 µl Homogenisierungspuffer gefüllt. Von dem zu untersuchenden Gewebe wurden jeweils 40 mg entnommen und in ein 1.5 ml großes Reagiergefäß überführt. Dabei wurden alle Schritte auf Eis ausgeführt. Mit Hilfe des Ultraschalls wurden die Proben homogenisiert und anschließend 30 min lang bei 13000 rpm und 4 °C in der Kühlzentrifuge zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurde die obere Flüssigkeitsphase schonend in ein frisches 1.5 ml großes Reagiergefäß übertragen, wohingegen das Pellet, resultierend aus den aufgeschlossenen Zellbestandteilen, nicht weiterverwendet wurde. Die Proben wurden vor ihrer Verwendung in einem Tiefkühlschrank bei einer Temperatur von -80 °C aufbewahrt.

Die Stammlösung des Homogenisierungspuffers (250 ml) wurde wie folgt hergestellt:

- 465.3 mg Ethylenediaminetetraacetat (EDTA, 0.00255 mol/l)
- 262.4 mg Natriumfluorid (NAF, 0.00625 mol/l)
- 25.67 g Saccharose (Sucrose, 0.075 mol/l)
- 1.02 g Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4 , 0.00586 mol/l)

Für die Herstellung von 10 ml Homogenisierungspuffer wurden folgende Komponenten verwendet:

- 100 µl PMSF (100 µmol/l)
- 1 Tablette Phosphatase-Inhibitor (PhosStop, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland)
- 1/4 Tablette Mini cOmplete Proteaseinhibitor (EDTA-frei, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland)

Proteinbestimmung

Um die Proteinkonzentration für den nachfolgenden Western Blot anzupassen, musste zunächst der Gesamtproteingehalt bestimmt werden. Durch darauffolgende Hinzugabe von destilliertem Wasser konnten die Proben vereinheitlicht werden. Der Gesamtproteingehalt wurde photometrisch durch ein Protein Assay bestimmt.

Zur Proteinbestimmung wurden 18 µl Aqua dest. mit 2 µl der jeweiligen Probe gemischt. Zur Erzeugung des Leerwerts wurden 18 µl destilliertes Wasser mit 2 µl Homogenisierungspuffer vermischt. Anschließend wurden jeweils 100 µl Reagenz A (BioRad Laboratories Inc, USA) hinzugefügt und es entstand ein blau-violetter Komplex. Im nächsten Schritt wurden jeweils 800 µl Reagenz B (BioRad Laboratories Inc, USA) hinzugefügt und es entstand Molybdänblau, welches man photometrisch messen konnte.

Jeder Ansatz wurde im Vortexer durchmischt und danach für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zweifacher photometrischer Messung wurde der Mittelwert der Probenkonzentration mittels einer Standardkurve berechnet. Anschließend wurde das Probenvolumen in mg/ml ermittelt, so dass jedes Probenvolumen 100 µg Protein enthielt. Um eine einheitliche Proteinkonzentration in allen Proben sicherzustellen, wurden die Proben mit destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt. Danach wurden die Proben für die Elektrophorese vorbereitet. Dazu wurden jedem Ansatz 20 µl Ladepuffer hinzugefügt und die Mischung auf einem Heizblock bei 95 °C für 5 min gekocht. Anschließend wurden sie auf Eis gekühlt.

Der Ladepuffer wurde durch die Vereinigung von 950 µl Stammlösung des Ladepuffers mit 50 µl Dithiothreitol (DTT) in einer Konzentration von 1 mol/l hergestellt.

Die Ladepuffer-Stammlösung wurde wie folgt zusammengesetzt:

- 2 ml Glycerol (100 %)
- 2 ml 10%iges SDS (Natriumdodecylsulfat)
- 2.5 ml Tris-Puffer pH 6.8 (0.625 mol/l)
- 10 ml destilliertes Wasser
- eine Spatelspitze Bromphenolblau

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE werden Proteine basierend auf ihrer Molekülmasse aufgetrennt. Ein Polyacrylamidgel dient dabei als Trägermaterial und wird zwischen zwei Glasplatten

aufgegossen. Der Puffer, in dem die Proteine aufgetragen werden, enthält das negativ geladene Detergens SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) und das Reduktionsmittel DTT.⁴⁰ Das SDS bewirkt, dass die Proteine durch die Wechselwirkung ihrer hydrophoben Alkanketten mit den hydrophoben Bereichen der Proteine denaturiert werden, wodurch der hydrophobe Kern der Proteine aufgelöst wird.⁴⁰ Gleichzeitig werden Protein-Protein-Interaktionen geschwächt. Das DTT reduziert mögliche Disulfidbrücken, wodurch sich die Proteine entfalten und Polymere dissoziieren können. Die SDS-Protein-Komplexe, die eine negative Ladung tragen, bewegen sich aufgrund ihrer elektrischen Ladung in Richtung der positiv geladenen Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt nun nur noch von der Größe der Proteine ab und ist nahezu proportional zu ihrer molekularen Masse. Dadurch werden die Proteine entsprechend ihrer Molekülmasse getrennt und auf dem Gel visualisiert.

Das Gel für die SDS-PAGE bestand aus zwei verschiedenen Teilen: dem Sammelgel und dem Trenngel. Die Proteine durchwanderten diese beiden Gelbereiche während der Elektrophorese. Die Proben wurden in die gleichmäßig verteilten Wells des Sammelgels pipettiert, wodurch nach der Elektrophorese parallele Proteinspuren entstanden. Zur Bestimmung der Molekülmassen wurde in eine Tasche des Sammelgels eine Referenzprobe gegeben, die Proteine mit bekannten Molekülmassen enthielt. Das Trenngel trennte die Proteine voneinander und ermöglichte eine klare Detektion der entstehenden Proteinbanden. Die genaue Zusammensetzung des Trenngels war entscheidend für die effektive Trennung der Proteine. Der Anteil an Bis-Acrylamid im Trenngel beeinflusste die Größe des entstehenden Gitternetzes. Um die Gele herzustellen, wurden sie zwischen zwei Glasplatten eingespannt und in einem Gießstand nacheinander gegossen. Die Inhalte der Gele wurden zuvor in einem separaten Reaktionsgefäß gemischt. Bevor das flüssige Sammelgel aushärtete, wurde ein Probenkamm mit 10 Wells mit jeweils 1.5 mm Dicke in das Gel eingeführt. Nachdem das Gel vollständig ausgehärtet war, konnte der Probenkamm entfernt werden.

Das Sammelgel wurde mit einer Konzentration von 5 % hergestellt, welches einem Volumen von 4 ml entspricht. Die folgenden Komponenten wurden verwendet:

- 2.7 ml destilliertes Wasser (H₂O)
- 0.67 ml 30 % Acryl-Bisacrylamid-Mix (BioRad Laboratories, Inc., China)
- 0.5 ml 1.5 mol/l Tris (pH 6.8) (VWR International, Leuven, Belgien)
- 0.04 ml 10 % SDS (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
- 0.04 ml 10 % Ammoniumpersulfat (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland)

- 0.004 ml TEMED (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland)

Das Trenngel wurde mit einer Konzentration von 10 % hergestellt, welches einem Volumen von 20 ml entspricht. Die folgenden Komponenten wurden verwendet:

- 7.9 ml destilliertes Wasser (H₂O)
- 6.7 ml 30 % Acryl-Bisacrylamid-Mix
- 5.0 ml 1.5 mol/l Tris (pH 8.8)
- 0.2 ml 10 % SDS
- 0.2 ml 10 % Ammoniumpersulfat
- 0.008 ml TEMED

Das vorbereitete und bereits polymerisierte Gel wurde in die Elektrodeneinheit eingefügt und dann senkrecht in die zuvor mit 1x Elektrophoresepuffer gefüllte Elektrophoresekammer platziert. In die erste Tasche des Gels wurden 5 µl eines Proteinmarkers pipettiert, der gefärbte Proteine mit bekannten Molekülmassen enthielt. Die restlichen Taschen des Gels wurden mit jeweils 18 µl der Proben beladen, wodurch insgesamt eine Proteinmenge von 50 µg geladen wurde. Die Elektrophorese wurde bei einer anfänglichen Spannung von 80 V für 15 min gestartet. Danach wurde sie für die nächsten 60-90 min bei einer Spannung von 100 V fortgesetzt.

Der 10x Elektrophoresepuffer wurde aus den folgenden Komponenten hergestellt:

- 50 g SDS (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
- 720 g Glycin (VWR International, Leuven, Belgien)
- 151.5 g Tris (VWR International, Leuven, Belgien)
- 5 l destilliertes Wasser (Aqua dest.)

Um den 1x Elektrophoresepuffer herzustellen, wurde der 10x Elektrophoresepuffer in einer 1:10-Verdünnung mit Wasser gemischt.

Transferblot

Die zuvor durch Elektrophorese getrennten Proteinbanden wurden sichtbar gemacht, indem sie durch einen Transferprozess vom Gel auf eine Nitrozellulosemembran mit einer Porengröße von 0.2 µm übertragen wurden. Dieser Transfer wurde durch ein sogenanntes

Nass-Blotting in einem Tank-Blot-System durchgeführt. Das Tank-Blot-System besteht aus einer Kammer, einem Kühlakku, einer Gelkassette mit zwei Schwämmen und Elektroden, die eine Kathode und eine Anode umfassen. Diese Elektroden werden mit einer Stromquelle verbunden. Die Proteine wanderten in dieser Methode durch die Spannung im System entlang eines elektrischen Gradienten. Der Transfer ermöglichte es, die Proteinbanden von der Gelmatrix auf die Nitrozellulosemembran zu übertragen, wodurch die Banden auf der Membran sichtbar gemacht wurden.

Zu Beginn wurde eine 10x Towbin-Lösung hergestellt, indem die folgenden Komponenten vermengt wurden:

- 60.56 g Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethan) für eine Konzentration von 250 mmol/l
- 288.26 g Glycin für eine Konzentration von 1.92 mol/l

Die Lösung wurde dann mit Aqua dest. auf ein Gesamtvolumen von 2 Litern aufgefüllt.

Die endgültige Transferpuffer-Lösung wurde hergestellt, indem 160 ml der zuvor hergestellten 10x Towbin-Lösung mit 1440 ml Aqua dest. und 400 ml Methanol (von VWR, Darmstadt, Deutschland) vermischt wurden.

Es wurde eine 1:10 Verdünnung des Transferpuffers in das System gegeben. Dann wurde die Gelkassette vorbereitet. Dazu wurde auf die eine Seite der Gelkassette einer der zwei Schwämme gelegt. Anschließend wurden der Reihe nach drei Filterpapiere, das Gel, die Membran, drei weitere Filterpapiere und zum Abschluss der zweite Schwamm daraufgelegt. Damit keine Luftblasen bei der Übertragung der Proteinbanden vom Gel auf die Membran entstehen, wurden alle Bestandteile der Gelkassette vorher mit dem Transferpuffer befeuchtet. Die Gelkassette wurde nun vorsichtig verschlossen und in die Elektrodeneinheit geschoben. Diese wurde senkrecht in die Kammer gestellt und war vollkommen vom Puffer umgeben. Zum Abschluss wurde ein Kühlakku eingesetzt und das Tank-Blot-System an die Stromquelle angeschlossen. Bei 300 mA wurde für 90 min geblottet.

Nachdem der Transfer auf die Membran vollbracht war, konnte die Gelkassette wieder auseinandergebaut werden. Die Membran wurde vorsichtig mit Aqua dest. abgespült, um die Reste vom Transferpuffer zu entfernen. Das Gel und die Filterpapiere wurden verworfen. Dann konnte eine Kontrolle mit dem 0.2 % Farbstoff Ponceau Rot (SERVA Elektrophoresis GmbH, Heidelberg) durchgeführt werden, da dieser Farbstoff reversibel an die Aminogruppe der Proteine bindet und die Banden sich somit rot färben (s. Abbildung 9). Mit diesem Test konnte man erkennen, ob die Proben bzw. Banden gleichermaßen Proteine enthalten haben. Der Farbstoff wurde dafür für ca. eine Minute auf die Membran aufgetragen. Um die Färbung nach der Kontrolle zu entfernen, wurde die Membran mit 1x PBS-T beschichtet und kurz gewaschen.

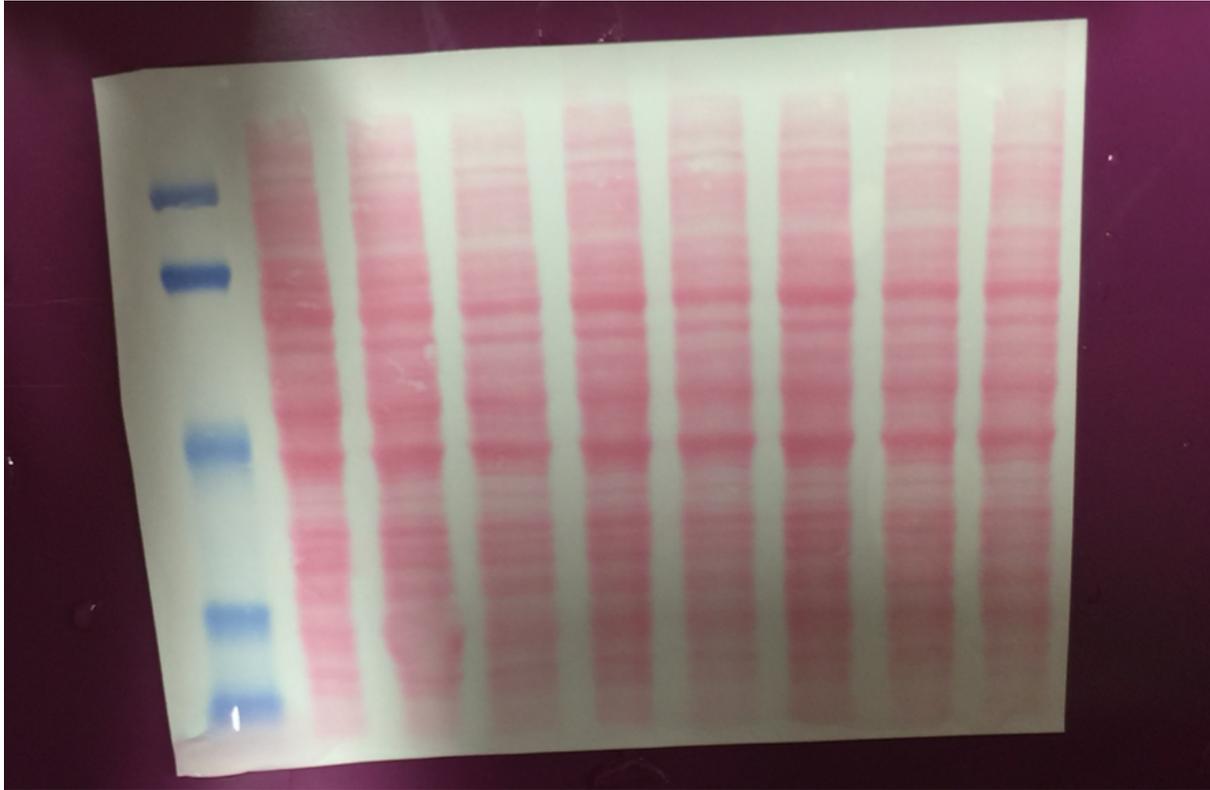


Abbildung 9: Kontrolle der Membran mit Ponceau Rot

Das Ponceau Rot-Färbeprotokoll ist eine nützliche Methode, um die Effizienz und Genauigkeit der Western-Blot-Analyse zu überprüfen, insbesondere in Bezug auf die Übertragung der Proteine von einem Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran und auf den Proteinabbau im Western Blot. Wenn Proteine degradiert wurden, erscheinen die Banden auf der Ponceau-Rot-gefärbten Membran schwächer oder fragmentiert im Vergleich zu nicht degradierten Proteinen.

Bevor es mit der Immundetektion weiterging, wurde die Membran für ca. 2 h bei Raumtemperatur in 5%iger 1x PBS-T Milch langsam geschwenkt und inkubiert. Die Proteine der Milch banden an die freien unspezifischen Proteinbindungsstellen und somit waren sie für unspezifische Antikörperbindung blockiert. Die Membran konnte danach mit einem Primärantikörper inkubiert werden (s. Tabelle 5).

Zur Herstellung von 10x PBS-T wurden die folgenden Bestandteile vermengt:

- 80 g NaCl (Natriumchlorid, 1.37 mol/l)
- 2 g KCl (Kaliumchlorid, 0.027 mol/l)
- 2.4 g KH_2PO_4 (Kaliumdihydrogenphosphat, 0.0176 mol/l)
- 14.4 g Na_2HPO_4 (Dinatriumhydrogenphosphat, 0.101 mol/l)
- Aqua dest. (destilliertes Wasser) wurde hinzugefügt, um ein Gesamtvolumen von 1000 ml zu erreichen
- der pH-Wert der Lösung wurde auf 7.4 eingestellt

- 10 ml Tween®-20 (von Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland)

Um 1x PBS-T herzustellen, wurden 100 ml der zuvor hergestellten 10x PBS-T-Lösung mit 900 ml Aqua dest. gemischt.

Detektion

Für die Identifizierung der Proteine wurde die Antigen-Antikörper-Reaktion angewendet. Zunächst erfolgte die Inkubation der Membran mit einem Primärantikörper. Es wurden verschiedene Primärantikörper verwendet, die aus unterschiedlichen Wirtsorganismen stammten. Der Primärantikörper band spezifisch an die entsprechenden Proteinbanden. Nach mehreren Waschschrritten wurden nicht spezifisch gebundene Primärantikörper entfernt. Anschließend wurde ein Sekundärantikörper hinzugefügt, der spezifisch an den Fc-Teil (schwere Kette) des Primärantikörpers band. Der Sekundärantikörper war mit dem Enzym Meerrettichperoxidase als Konjugat versehen. Durch Zugabe der entsprechenden Substrate wurde eine Chemilumineszenzreaktion ausgelöst, wodurch die Proteinbanden durch eine spezielle Kamera sichtbar wurden.

Die Nitrozellulosemembran wurde in einem 50 ml Reagiergefäß mit 7 ml 5%iger 1x PBS-T Milch und der entsprechend verdünnten Primärantikörpermenge inkubiert (s. Tabelle 5). Am folgenden Tag erfolgten zwei Waschschrritte der Membran mit 1x PBS-T, um ungebundenen Primärantikörper zu eliminieren. Dann wurde die Membran mit dem Sekundärantikörper (s. Tabelle 6) in einer Verdünnung von 1:10000 in 0.5%iger 1x PBS-T Milch für eine Stunde bei Raumtemperatur im Schüttler inkubiert. Nach diesem Schritt wurde die Membran zweimal mit 1x PBS-T gewaschen. Die Membran wurde mit Aqua dest. abgespült, um jegliche Rückstände zu entfernen. Die Detektion wurde mit ECL (Enhanced Chemiluminescence) durchgeführt. Dafür wurden Reagenz 1 und Reagenz 2 auf die Membran gegeben, um die Chemilumineszenzreaktion auszulösen. Die Membran wurde in die Detektionsplatte einer Detektionskamera gelegt und eine Aufnahme der Proteinbanden erstellt. Die entstandene Abbildung der Proteinbanden wurde digital gespeichert und mittels Computersoftware ausgewertet, um spezifische Proteine zu quantifizieren.

Als Primärantikörper wurden verwendet:

Antikörper	Herkunft	Verdünnung	Hersteller
Anti-CD10	Kaninchen	1:5000	abcam, ab79423
Anti-GAPDH	Maus	1:5000	Millipore, MAB374
Anti-NET	Kaninchen	1:500	abcam, ab41559
Anti-Renin	Maus	1:250	Santa Cruz, sc-133145
Anti-Tyrosinhydroxylase	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling, #58844

Tabelle 5: Western Blot Primärantikörper
 (TH: Tyrosinhydroxylase, CD10: Nepilysin, NET: Norepinephrin-Transporter, GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase)

Nepilysin, auch als CD10 bezeichnet, ist ein Enzym, das den Abbau und die Inaktivierung von Peptidhormonen und anderen bioaktiven Substanzen im Körper fördert. Es spielt eine Rolle bei der Regulation des Blutdrucks durch den Abbau von Vasodilatoren.

Die Tyrosinhydroxylase ist in den Nervenfasern und sympathischen Nervenenden der Niere vorhanden. Sie spielt eine Rolle bei der Regulation des Blutflusses in den Nierenarterien und beeinflusst damit die Nierenfunktion und den Blutdruck.

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System, das von Renin ausgelöst wird, ist ein entscheidender Mechanismus zur Regulation des Blutdrucks. Durch die Freisetzung von Renin kann der Körper den Blutdruck erhöhen, wenn dies erforderlich ist, um die ausreichende Durchblutung von Organen und Geweben sicherzustellen.

Norepinephrin (NE) ist ein Neurotransmitter mit einer zentralen Rolle bei der Regulation des Blutdrucks. NE bindet spezifisch an α 1-Adrenozeptoren in den glatten Muskelzellen der Arterien, was zu einer Vasokonstriktion der Blutgefäße führt. Als Ergebnis steigt der periphere Widerstand, der den Blutdruck erhöht. Der Norepinephrin-Transporter (NET) spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulierung der Menge an Norepinephrin im synaptischen Spalt und somit bei der Intensität und Dauer der durch Norepinephrin medierte Vasokonstriktion der Arterien.

Die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) wurde als Referenzprotein verwendet. Es wurde zur Quantifizierung verwendet, da es als ein Enzym der Glykolyse in allen Zellen nahezu gleichmäßig exprimiert wird.

Als Sekundärantikörper wurden verwendet:

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

Tabelle 6: Western Blot Sekundärantikörper

3.2.4 Histologie

Mithilfe der Histologie konnte man das Gewebe mikroskopisch näher untersuchen und strukturelle Veränderungen sichtbar machen. Es wurden die interstitielle Fibrose und die Hypertrophie der Kardiomyozyten im linken Ventrikel beurteilt. Zur Beurteilung der interstitiellen Fibrose wurde der Gewebeschnitt mit Pikro-Siriusrot gefärbt. Um die Hypertrophie genauer abgrenzen zu können, wurde der Gewebeschnitt mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt.

Präparation des Gewebes für die histologische Untersuchung:

Nach Entnahme der Herzen aus den Ratten, wurden sie für einen Zeitraum von 24 h in einer 4%igen Formaldehydlösung (Hersteller: Otto Fischer GmbH, Saarbrücken, Deutschland; PZN: 02653048) fixiert. Durch diesen Schritt ähnelt das Gewebe möglichst seiner lebendigen Form und die Zellen gehen nicht zugrunde. Die anschließende Entwässerung des Gewebes erfolgt in Einbettautomaten (Excelsior, Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland) mittels einer aufsteigenden Ethanolreihe (70 %, 80 %, 95 %, 3x 100 %). Danach wird das mit Xylol (Morphisto, Offenbach, Deutschland) entfettete und entwässerte Gewebe in Paraffin (Engelbrecht GmbH, Edermünde (Besse), Deutschland) eingebettet. Die entstandenen Paraffinblöcke wurden mithilfe eines Mikrotoms (Leica, Modell RM155) in 5 µm dicke Schnitte geschnitten. Anschließend wurden die Schnitte auf einen Objektträger aufgelegt und über Nacht bei einer Temperatur von 56 °C getrocknet.

Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)

Mit Hilfe dieser Färbemethode lassen sich saure Zellbestandteile mit Hämatoxylin (Morphisto, Frankfurt, Deutschland; #12662.01000) blau und basische Strukturen mit Eosin rot färben. Nach der Hämatoxylin-Eosin-Färbung erscheinen die sauren Zellkerne zunächst rötlich-braun. Der typische blauviolette Farbton entsteht durch die Erhöhung des pH-Wertes. Anschließend folgt die Färbung des basischen Zytoplasmas mittels des sauren Farbstoffs Eosin (Microscopy, Darmstadt, Deutschland; #1.15935.0025) und es erscheint aufgrund der darin enthaltenen Zytoplasmaproteine rot.

Zunächst wurden die Gewebeschnitte dreimal für je 10 min mit Xylol entparaffiniert. Im Anschluss wurden die Gewebeschnitte in eine absteigende Isopropanolreihe (100 %, 90 %, 70 %, Merck, EMSURE 2-Propanol, Darmstadt, Deutschland; #1.09634.2511) und in Aqua

dest. für jeweils 5 min eingetaucht. Anschließend wurde für 12 min mit Hämotoxylin (Morphisto, Frankfurt, Deutschland; #12662.01000) gefärbt und danach mindestens zweimal mit Aqua dest. gespült, um Farbrückstände vollständig zu entfernen. Die Differenzierung erfolgte durch ein kurzes Eintauchen der Objektträger in HCl-Alkohol, gefolgt von einer erneuten Spülung mit destilliertem Wasser. Danach wurden sie für 15 min unter fließendem Leitungswasser gebläut und erneut mit destilliertem Wasser gespült. Anschließend wurden die Objektträger für 15 Sekunden in Eosin getaucht und erneut mit destilliertem Wasser gewaschen. Nach diesen Färbeschritten wurden die Objektträger durch eine aufsteigende Reihe von Isopropanol (70 %, 90 %, 100 %) dreimal für jeweils 2 min entwässert und danach dreimal für jeweils 3 min in Xylol getaucht. Zum Abschluss wurden die Schnittproben mit Entellan® (hergestellt von Merck, Darmstadt, Deutschland; Artikelnummer: 1.07961.0100) eingedeckt und sorgfältig mit einem Deckglas versehen, um jegliche Luftblasen zu vermeiden. Für die Auswertung wurden zunächst digitale Bilder der Präparate erstellt, um sie anschließend mit spezieller Software zu analysieren. Die histologischen Präparate wurden unter einem Mikroskop betrachtet, gescannt und gespeichert. Die Beurteilung der Vergrößerung des linken Ventrikels wurde unter Verwendung der Software Image Scope (Aperio) durchgeführt (s. Abbildung 10). Dabei wurden die durchschnittliche Querschnittsfläche und der Durchmesser der Kardiomyozyten gemessen. Es wurden nur Zellen ausgewählt, die bestimmte morphologische Kriterien erfüllten, wie ein zentral gelegener Zellkern und eine annähernd runde Zellform. Die Zellen wurden manuell konturiert, damit das Programm anschließend den Flächeninhalt der umrissenen Zellen automatisch berechnen konnte. Für jedes Tier wurde die durchschnittliche Querschnittsfläche der Kardiomyozyten berechnet, und daraufhin der Mittelwert für jede Gruppe ermittelt. Die einzelnen Gruppen wurden anschließend miteinander verglichen.

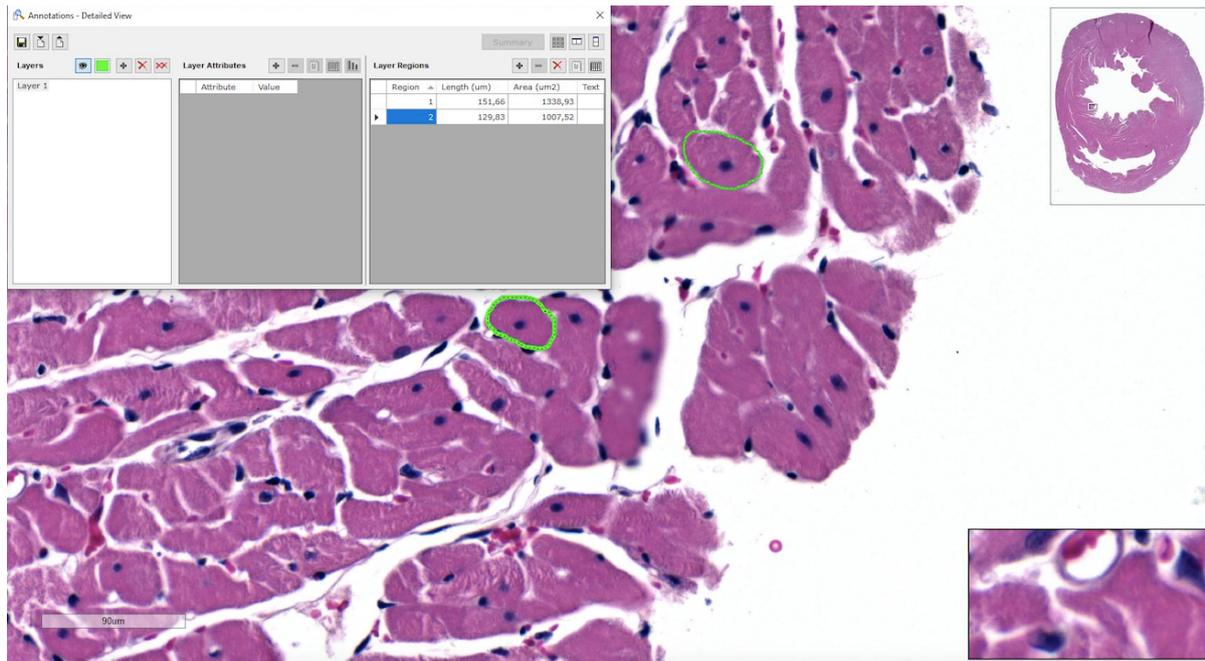


Abbildung 10: Bestimmung der Querschnittsfläche der Kardiomyozyten (Computerprogramm Image Scope (Aperio))

Nach Kalibrierung des Maßstabes wurden pro Präparat ca. 100 Kardiomyozyten mit zentralem Zellkern und annähernd runder Zellform manuell umkreist (grüne Markierung). Die Software Image Scope (Aperio) berechnete die Fläche der Kardiomyozyten automatisch (tabellarisch oben links).

Pikro-Siriusrot-Färbung

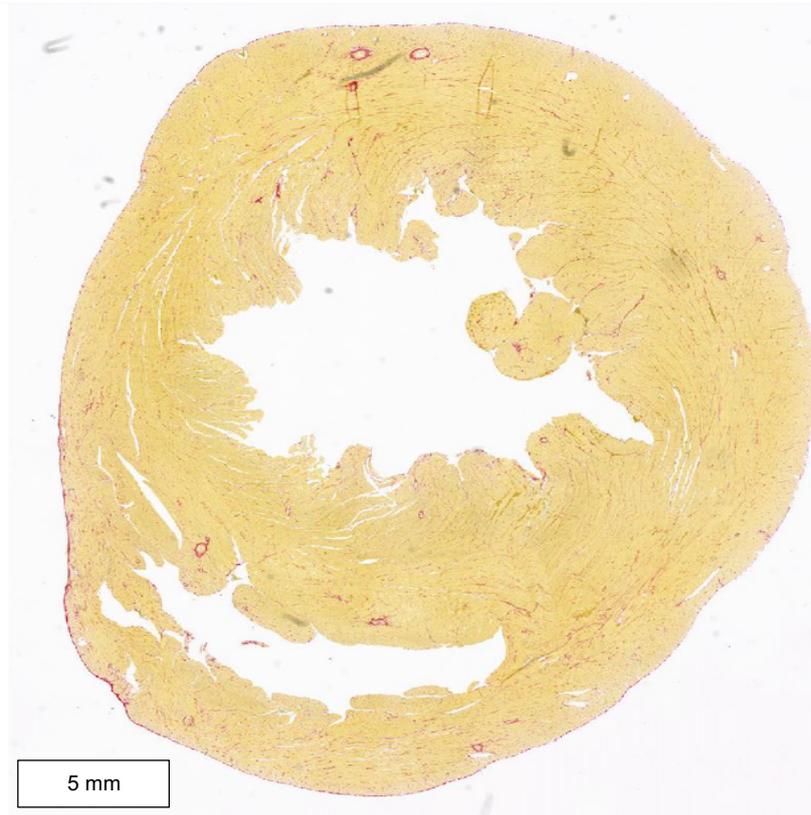
Für die Darstellung von Fibrose wird die Pikro-Siriusrot-Färbung verwendet. Kollagenfasern lassen sich bei dieser Färbung rot anfärben, Muskel und Zytoplasma gelb. Durch die rote Färbung der Kollagenfasern lässt sich mit dieser Methode die Fibrose der linken Ventrikel gut darstellen.

Die Gewebeschnitte wurden einer bestimmten Bearbeitung unterzogen, um die interstitielle Fibrose zu beurteilen. Zunächst wurden sie dreimal für jeweils 10 min in Xylol getaucht, um sie zu entwässern. Anschließend wurden die Gewebeschnitte in absteigender Reihenfolge von Isopropanol-Lösungen (100 %, 90 %, 70 %) für jeweils 5 min eingetaucht und danach gründlich mit destilliertem Wasser für weitere 5 min gespült. Daraufhin wurden die Gewebeschnitte mit einer 0.1%igen Lösung von Pikro-Siriusrot gefärbt und für eine Stunde inkubiert. Nach einer weiteren Spülung mit destilliertem Wasser wurden die Objektträger in einer aufsteigenden Isopropanol-Reihe (90 %, 100 %) entwässert. Schließlich wurden die Gewebeschnitte dreimal für jeweils 2 min in Xylol eingelegt, bevor sie mit Entellan® eingedeckt wurden, um Luftblasen zu vermeiden.

Um die interstitielle Fibrose zu bewerten, wurden die Gewebeschnitte zunächst mikroskopisch erfasst und digitalisiert. Dies ermöglichte es, sie mit dem Computerprogramm GIMP 2.10 (GNU Image Manipulation Program) zu bearbeiten (s. Abbildung 11). Die Bereiche der digitalen

Bilder, die für die Auswertung der Fibrose nicht relevant waren, wurden entfernt. Im Zuge der Untersuchung wurde der rechte Ventrikel nicht berücksichtigt, da das Hauptinteresse ausschließlich der linksventrikulären Fibrose galt. Deshalb wurde der rechte Ventrikel von den weiteren Schritten der Analyse ausgeschlossen und entfernt. Die Mengen an interstitieller Fibrose wurden gemäß vordefinierten Kriterien unter Anwendung von der Software NIS Elements Analysis (Nikon Instruments Europe BV) analysiert. Nach vorheriger Rotfärbung der Kollagenfasern konnten diese leicht erkannt werden, indem alle roten Pixel identifiziert wurden. Daraufhin wurde der Prozentsatz der markierten Regionen im Gesamtschnittbild berechnet, um den Anteil der interstitiellen Fibrose am Gesamtgewebe zu bestimmen. Diese Methode ermöglichte eine präzise quantitative Analyse des Fibrosegehalts im Gewebe. Die errechneten Durchschnittswerte der verschiedenen Gruppen wurden anschließend miteinander verglichen.

A



B

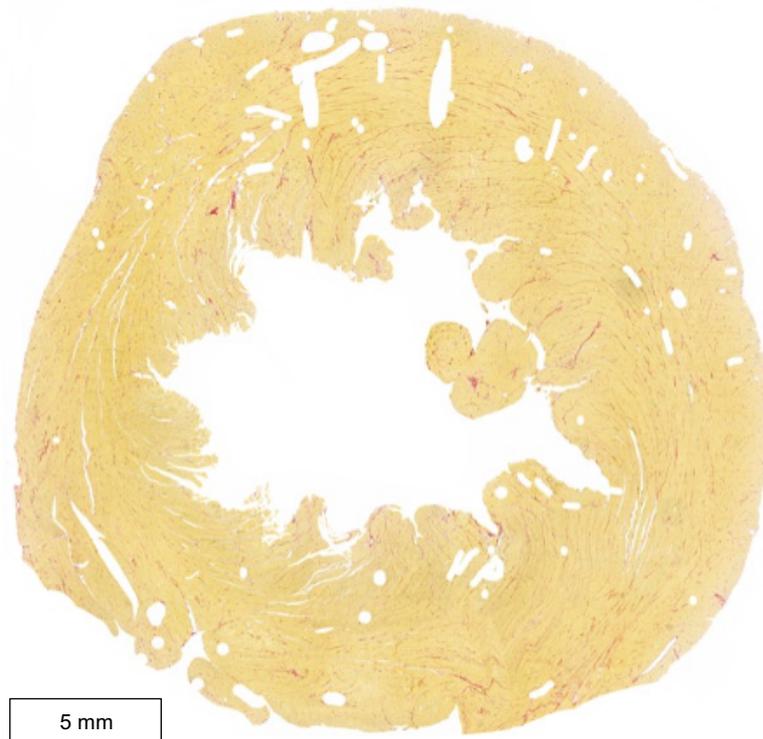


Abbildung 11: Histologischer Gewebeschnitt des linken Ventrikels in Picro-Siriusrot-Färbung (A) unbearbeiteter linker Ventrikel mit rechtsventrikulärem Anteil und perivaskulärer Fibrose. (B) bearbeiteter linker Ventrikel.

Im Rahmen der Untersuchung wurde der rechte Ventrikel nicht berücksichtigt und nicht in die Analyse einbezogen. Die endo- und epikardiale Fibrose wurde mittels Computerprogramm GIMP 2.10 ausradiert.

Tyrosinhydroxylase-Färbung

Die Tyrosinhydroxylase-Färbung wird verwendet, um sympathische Strukturen sichtbar zu machen. Dafür werden Gewebeschnitte mit primären Antikörpern inkubiert, die spezifisch für die Tyrosinhydroxylase und an der Synthese sympathischer Neurotransmitter beteiligt sind. Anschließend werden Sekundärantikörper hinzugefügt, die bei Anregung mit einer bestimmten Lichtwellenlänge Licht einer anderen Wellenlänge emittieren, was unter einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar wird. Dadurch erscheinen nur die Bereiche, in denen die primären und sekundären Antikörper gebunden sind, hell gefärbt, während der Rest des Präparats schwarz bleibt.

Die Vorbereitung der Gewebeschnitte erfolgte durch mehrere Schritte: Zu Beginn wurden die Objektträger für 30 min auf einer Heizplatte platziert, um eine effektive Entparaffinierung zu ermöglichen. Anschließend wurden sie dreimal für jeweils 10 min in Xylol eingetaucht, um die Paraffinschichten zu entfernen. Danach erfolgte eine Tauchabfolge in absteigenden Ethanol-Konzentrationen (100 %, 80 % und 70 %). Abschließend wurden sie zweimal in PBS gewaschen. Die Gewebeschnitte wurden dann in einem Citraconsäurepuffer für 60 min bei 95 °C gekocht, um die Proteine zu renaturieren und für die Antikörperbindung in ihre natürliche Konformation zurückzuführen. Nachdem die Objektträger 20 min lang abgekühlt waren, wurden sie zweimal für jeweils 5 min gründlich mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Objektträger über Nacht bei einer Temperatur von 4 °C in einer feuchten Kammer belassen, wobei der primäre Antikörper (Anti-Tyrosinhydroxylase, Abcam, ab112) in einer 1:100 Verdünnung in PBS verwendet wurde. Am folgenden Tag erfolgte eine zweistündige Inkubation der Proben in einem Wasserbad bei einer Temperatur von 37 °C. Danach folgten zwei aufeinanderfolgende Waschschrte von jeweils 5 min mit PBS-T und abschließend eine weitere fünfminütige Waschung mit PBS bei Raumtemperatur. Nach der Entwässerung der Schnitte wurde ein sekundärer Antikörper (Anti-Kaninchen-FITC, Dianova) in einer Verdünnung von 1:50 in PBS zugefügt und anschließend für zwei Stunden in einem Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Der sekundäre Antikörper ist mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceinisothiocyanat versehen, das bei Anregung im blauen Spektralbereich grünes Licht emittiert. Anschließend erfolgte zweimal eine fünfminütige Spülung der Zellen mit PBS-T und einmal eine fünfminütige Spülung mit PBS. Zur Markierung der Zellkerne wurde 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) verwendet, ein Fluoreszenzfarbstoff, der an die DNA bindet und unter ultraviolettem Licht eine blau fluoreszierende Eigenschaft aufweist. Die Auswertung erfolgte, indem die vorbereiteten Gewebeschnitte unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet, gescannt und digital archiviert wurden. Die Software Nis Elements (Nikon Instruments Europe BV) wurde genutzt, um den Gehalt an

Tyrosinhydroxylase zu quantifizieren. Hierbei wurden sämtliche Gewebebereiche mit grüner Fluoreszenz gekennzeichnet und ihr Anteil an der gesamten Gewebefläche ermittelt.

3.2.5 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) ist ein Verfahren zur Bestimmung von Proteinen oder Peptiden in einer Probe. Im Rahmen des Sandwich-ELISA wurde die Konzentration von verschiedenen Substanzen, wie Aldosteron und die Plasma Renin Aktivität von Ratten gemessen.

Für das Sandwich-ELISA wurde eine Mikrotiterplatte verwendet, auf der ein spezifischer primärer Antikörper inkubiert wurde. Die zu messenden Substanzen im Plasma (Plasmakonzentrationen von Ratten-Aldosteron (R&D Systems; Abington, UK; #KGE016), Ratten-Plasma-Renin-Aktivität (MyBioSource; San Diego, US, #MBS3808279) und BNP der Ratte (MyBioSource; #MBS2700198) banden an den primären Antikörper. Nachdem nicht gebundene Antigene durch Waschschriffe entfernt wurden, erfolgte die Zugabe eines sekundären Antikörpers. Dieser war spezifisch gegen den konstanten Teil des zuvor verwendeten Antikörpers gerichtet und mit einem Indikatorenzym gekoppelt. Der sekundäre Antikörper band an den bereits gebildeten Antigen-Antikörper-Komplex. Durch eine geeignete Enzymreaktion konnte die Konzentration des Peptids bestimmt werden. Hierzu wurde ein Substrat hinzugegeben, das durch das Indikatorenzym in eine Farbreaktion umgewandelt wurde, die photometrisch gemessen werden konnte. Die photometrisch gemessene Konzentration der Farbreaktion stand in proportionaler Beziehung zur Antigen-Konzentration.

3.2.6 Statistische Analyse

Die Ergebnisse wurden in Form des Mittelwerts \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) präsentiert. Um statistische Analysen und den Vergleich zweier Gruppen durchzuführen, wurde ein ungepaarter t-Test (zweiseitig) verwendet. Zur Untersuchung der Unterschiede zwischen den Gruppen für kontinuierliche Variablen wurde eine Oneway-ANOVA mit einem Mehrfachvergleichstest nach Tukey angewendet. Um die Genauigkeit der statistischen Aussagen sicherzustellen, wurden die p-Werte für Mehrfachvergleiche angepasst, wobei ein p-Wert von unter 0.05 als statistisch signifikant betrachtet wurde.

Die statistischen Analysen erfolgten unter Einsatz von STATA, Version 16.1 von StataCorp LLC aus College Station, TX, USA, sowie mit GraphPad Prism Version 8.4.2 von GraphPad Software aus San Diego, CA, USA.

4 Ergebnisse

4.1 Versuchsaufbau

Im Alter von 23 Wochen wurden 64 männlichen spontan hypertensiven Ratten ein kathetergestützter Radiotelemetriesender in die abdominale Aorta implantiert, um den MAB, den systolischen und diastolischen Blutdruck sowie die Herzfrequenz kontinuierlich aufzuzeichnen. Nach einer siebentägigen postoperativen Erholungsphase wurden zwei Wochen lang telemetrische Grundlinienmessungen durchgeführt (Baseline). Anschließend wurden die Ratten im Verhältnis 1:1 einer renalen sympathischen Denervation (RDN n=32) oder einer Scheinoperation (SHAM n=32) unterzogen (Phase I). Dabei gab es jeweils 9 Ratten, die keine antihypertensiven Medikamente bekamen und als Kontrolle dienten. Zehn Tage nach der RDN, als der Blutdruck stabilisiert war, wurden die Tiere 28 Tage lang mit blutdrucksenkenden Medikamenten behandelt. Während der 28-tägigen Behandlung (Phase II) erhielten die Ratten randomisiert keine blutdrucksenkenden Medikamente oder den Kalziumkanalblocker Amlodipin, den Angiotensinrezeptorblocker Olmesartan, das Thiaziddiuretikum Hydrochlorothiazid oder den Mineralokortikoidrezeptorantagonisten Eplerenon. Nach 28 Tagen antihypertensiver Behandlung wurde bei den nun 31 Wochen alten Ratten die Analysen auf die gewünschten Parameter durchgeführt (s. Abbildung 4).

4.2 Auswirkungen auf die Hämodynamik

4.2.1 Auswirkungen auf den mittleren arteriellen Druck

In Abbildung 12 sind die während des gesamten Versuchszeitraums mittels Telemetrie gemessenen mittleren arteriellen Blutdrücke aller Gruppen dargestellt.

Vor der Phase I war der Ausgangswert des MAB in allen Behandlungsgruppen ähnlich (SHAM: 143.5 ± 1.4 mmHg, RDN: 146.7 ± 2.0 , $p=0.21$). Am Ende der Phase I änderte sich der MAB in den SHAM-Gruppen im Vergleich zu den Ausgangswerten nicht (SHAM: 1.5 ± 1.2 mmHg; SHAM+Amlodipin: 2.4 ± 1.4 mmHg; SHAM+Olmesartan: 0.9 ± 1.5 mmHg; SHAM+Eplerenon: 0.2 ± 0.3 mmHg). In der RDN-Gruppe nahm der MAB zwischen den Ausgangswerten und der zehntägigen Nachbeobachtung signifikant ab (RDN: -11.9 ± 1.6 mmHg; $p < 0.0001$ vs. SHAM; RDN+Amlodipin: -10.9 ± 1.6 mmHg, $p=0.0001$ vs. SHAM+Amlodipin; RDN+Olmesartan: -16.4 ± 2.1 mmHg, $p < 0.0001$ vs. SHAM+Olmesartan; RDN+HCT: -16.1 ± 3.4 mmHg, $p=0.013$ vs. SHAM+HCT; RDN+Eplerenon: -11.1 ± 1.2 mmHg, $p < 0.0001$ vs. SHAM+Eplerenon).

Mit der Behandlungsphase II begann die 28-tägige antihypertensive Behandlung in den SHAM und den RDN behandelten Gruppen. In der SHAM-Gruppe senkte Amlodipin den MAB um -15.7 ± 2.1 mmHg ($p < 0.001$ vs. Baseline), Olmesartan um -17.0 ± 3.0 mmHg ($p < 0.001$ vs. Baseline) und HCT um -9.1 ± 1.5 mmHg ($p = 0.008$ vs. Baseline). Eplerenon senkte den MAB nicht ($+1.4 \pm 1.0$ mmHg, $p = 0.37$ vs. Baseline, s. Abbildung 12 F).

Am Ende der Phase II (Studienende) war der mittlere arterielle Druck in den RDN-behandelten Tieren der unbehandelten Kontrollgruppe im Vergleich zu deren SHAM signifikant reduziert (SHAM: -0.13 ± 1.3 mmHg, RDN: -11.5 ± 2.3 mmHg, $p = 0.0006$, s. Abbildung 12).

Nach Beginn der antihypertensiven Behandlung konnte der MAB bei den Tieren mit RDN im Vergleich zur ihrer jeweiligen SHAM-Gruppe signifikant stark gesenkt werden. So führte die Behandlung mit Amlodipin nach RDN zu einer Blutdrucksenkung von -26.8 ± 3.9 mmHg ($p = 0.032$ vs. SHAM+Amlodipin). Olmesartan senkte den MAB nach RDN um -32.8 ± 3.1 mmHg ($p = 0.030$ vs. SHAM+Olmesartan). HCT senkte den MAB nach RDN um -20.5 ± 2.7 mmHg ($p = 0.009$ vs. SHAM+HCT) und Eplerenon um -11.2 ± 2.8 mmHg ($p = 0.009$ vs. SHAM+Eplerenon). In der Abbildung 12 F sind die mittleren arteriellen Blutdrücke als Differenz zur Baseline (gestrichelte Linie) bei SHAM und RDN dargestellt, um die Veränderungen bzw. Unterschiede zwischen SHAM und RDN zu veranschaulichen.

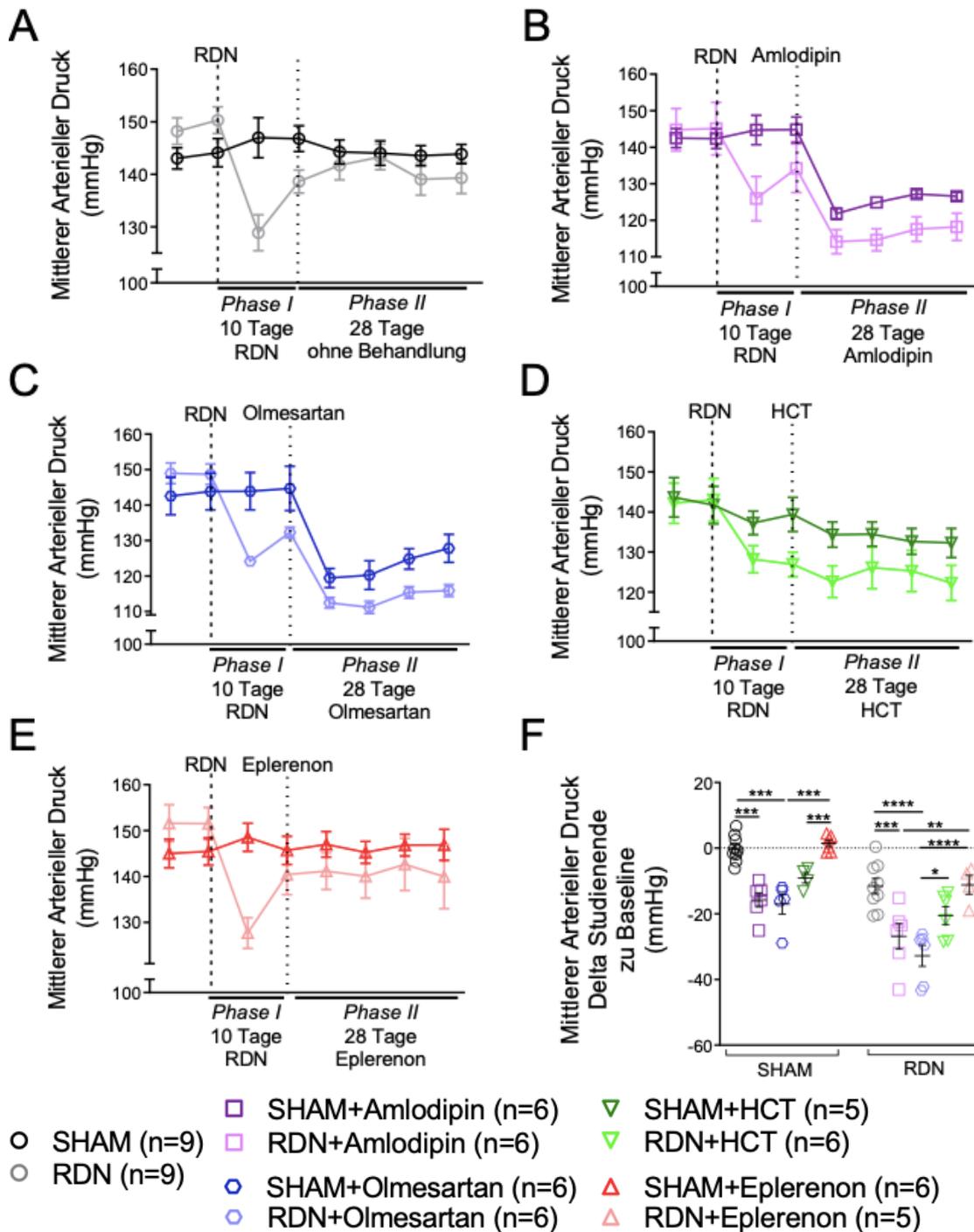


Abbildung 12: Mittlerer arterieller Blutdruck (MAB) bei SHR nach SHAM und RDN mit/ohne medikamentöse Behandlung

Der MAB wurde 28 Tage lang bei (A) SHR ohne blutdrucksenkende Behandlung (Kontrollgruppe; n=9 pro Gruppe), bei mit (B) Amlodipin (n=6 pro Gruppe), (C) Olmesartan (n=6 pro Gruppe), (D) Hydrochlorothiazid (HCT; n=5 für SHAM, n=5 für RDN) und (E) Eplerenon (n=6 für SHAM und n=5 für RDN) behandelten Tieren aufgezeichnet. In (F) ist der MAB als Delta am Studienende im Vergleich zur Baseline bei SHAM und RDN dargestellt. Die Werte sind als Mittelwert±Standardfehler des Mittelwerts dargestellt. Die p-Werte wurden anhand eines ANCOVA-Modells unter Berücksichtigung des Ausgangsblutdrucks ermittelt, wobei die RDN-Gruppen mit der entsprechenden SHAM-Gruppe verglichen wurden.

*p<0.05

**p<0.01

***p<0.001

4.2.2 Auswirkungen auf die Herzfrequenz

Die Herzfrequenz der RDN-Gruppen änderte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant. Bei RDN+HCT war eine dezente Reduktion der Herzfrequenz zu verzeichnen (s. Abbildung 13 D). In der Abbildung 13 F ist die Herzfrequenz als Differenz zur Baseline (gestrichelte Linie) bei SHAM und RDN dargestellt, um die Veränderungen bzw. Unterschiede zwischen SHAM und RDN zu veranschaulichen.

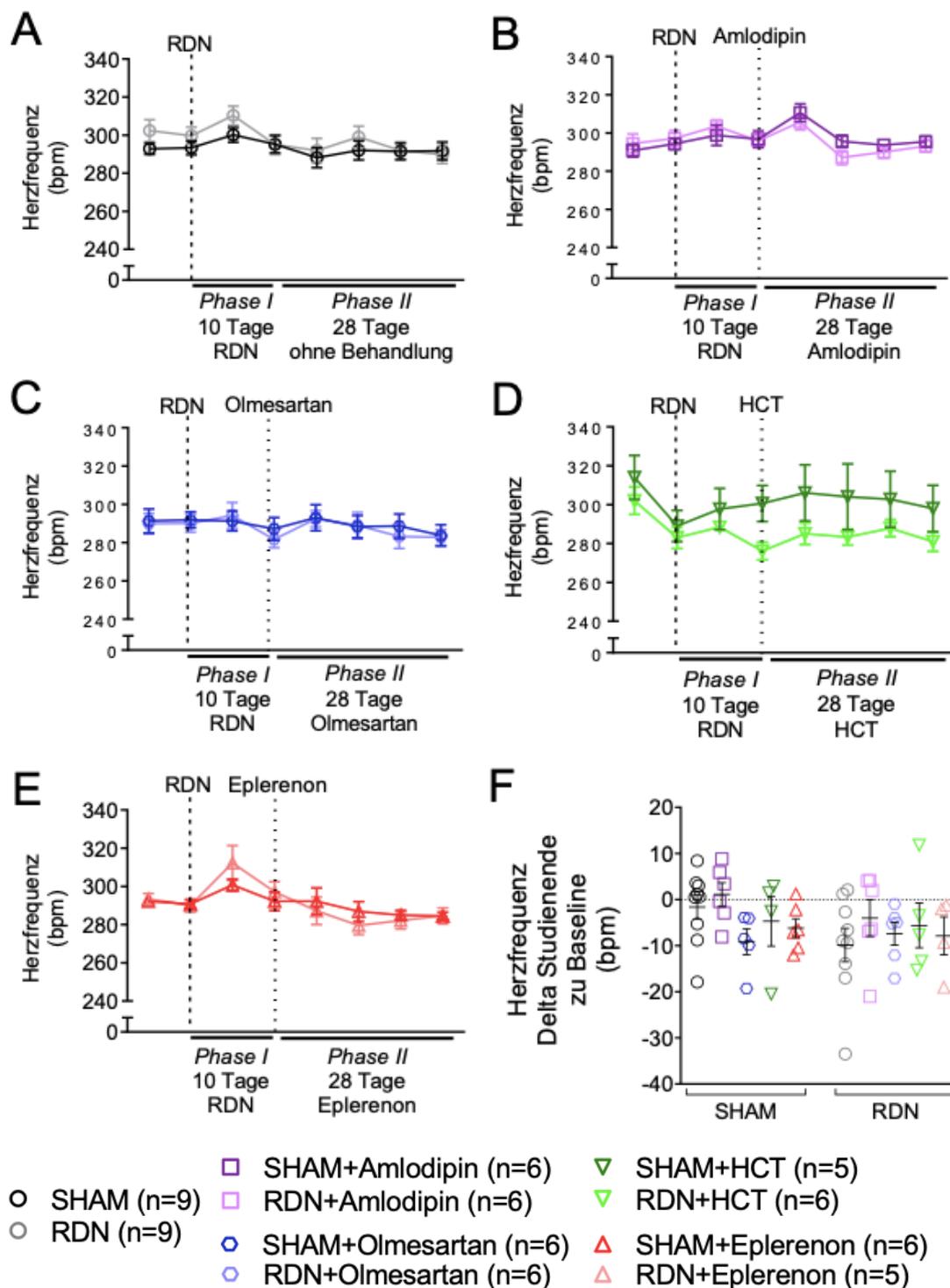


Abbildung 13: Herzfrequenz bei SHR nach SHAM und RDN mit/ohne medikamentöse Behandlung
 Die Herzfrequenz wurde 38 Tage lang bei (A) SHR ohne blutdrucksenkende Behandlung (Kontrollgruppe; n=9 pro Gruppe), bei mit (B) Amlodipin (n=6 pro Gruppe), (C) Olmesartan (n=6 pro Gruppe), (D) Hydrochlorothiazid (HCT; n=5 für SHAM, n=6 für RDN) und (E) Eplerenon (n=6 für SHAM und n=5 für RDN) behandelten Tieren aufgezeichnet. In (F) ist die Herzfrequenz als Delta am Studienende im Vergleich zur Baseline bei SHAM und RDN dargestellt. Die Werte sind als Mittelwert±Standardfehler des Mittelwerts dargestellt. Die p-Werte wurden anhand eines ANCOVA-Modells ermittelt, das den Ausgangsblutdruck berücksichtigt und die RDN-Gruppen mit der entsprechenden SHAM-Gruppe vergleicht.

4.3 Physiologische Parameter (Gewichtsanalyse)

Am Ende des Experiments unterschied sich das Körpergewicht zwischen SHAM und RDN nicht signifikant und wurde auch durch die antihypertensive medikamentöse Behandlung nicht beeinflusst (s. Tabelle 7). Das Verhältnis von Herzgewicht zu Körpergewicht war nur bei RDN mit anschließender Olmesartan-Behandlung signifikant reduziert (SHAM+Olmesartan: 3.18 ± 0.07 vs. RDN+Olmesartan: 2.89 ± 0.07 mg/g, $p=0.018$).

4.4 Serumchemie und Gewebeanalyse zur Expression der renalen Tyrosinhydroxylase und des renalen Norepinephrin-Gehaltes

Die Natrium-, Kalium- und Calciumkonzentrationen im Serum wurden für diese Arbeit im Zentrallabor des Universitätsklinikums des Saarlandes bestimmt. Die Ergebnisse in Tabelle 7 zeigen, dass es in allen Gruppen im Vergleich zu den entsprechenden Tieren in der SHAM-Gruppe keine statistisch signifikanten Veränderungen gab. Der Serumharnstoff war bei RDN+Amlodipin im Vergleich zu SHAM+Amlodipin signifikant niedriger (SHAM+Amlodipin: 41.0 ± 1.6 vs. RDN+Amlodipin: 35.3 ± 1.6 , $p=0.027$).

Das Albumin/Kreatinin-Verhältnis im Urin, ein Marker für eine Schädigung der Niere, war zwischen den Gruppen nicht signifikant unterschiedlich (s. Tabelle 7).

Norepinephrin ist ein Neurotransmitter, der an der Regulation des Blutdrucks durch Vasokonstriktion in den Nieren beteiligt ist. Wie die Tabelle 7 darstellt, war die Norepinephrin-Konzentration nach RDN im Vergleich zu SHAM signifikant reduziert, womit auch nachgewiesen wird, dass die RDN effektiv war und ihre Wirksamkeit über die gesamte Dauer des Experiments erhalten blieb. Der renale Gehalt von Norepinephrin wurde von Herrn Dr. med. Ulrich Hübner mittels HPLC ermittelt und die Daten zur weiteren Analyse zur Verfügung gestellt.

	SHR (ohne medikamentöse Behandlung)		SHR+Amlodipin		SHR+Olmesartan		SHR+HCT		SHR+Eplerenon	
	SHAM (n=9)	RDN (n=9)	SHAM (n=6)	RDN (n=6)	SHAM (n=6)	RDN (n=6)	SHAM (n=5)	RDN (n=6)	SHAM (n=6)	RDN (n=5)
Körpergewicht (g)	444.1± 9.4	433.1± 8.3	469.1± 9.6	459.6± 5.3	441.3± 6.5	431.6± 10.4	457.8± 16.8	463.0± 12.2	455.5± 15.2	424.6± 8.4
Herzgewicht (g)	1.51± 0.05	1.56± 0.04	1.51± 0.03	1.48± 0.04	1.40± 0.03	1.25± 0.04	1.45± 0.03	1.41± 0.04	1.53± 0.04	1.39± 0.03
HG/KG (mg)	3.43± 0.15	3.46± 0.07	3.24± 0.10	3.23± 0.04	3.18± 0.07	2.89± 0.07*	2.65± 0.53	3.05± 0.11	3.37± 0.07	3.28± 0.14
Calcium (mmol/l)	2.46± 0.06	2.40± 0.04	2.40± 0.03	2.38± 0.03	2.36± 0.14	2.33± 0.02	2.38± 0.05	2.23± 0.14	2.38± 0.02	2.42± 0.04
Natrium (mmol/l)	141.4± 2.2	140.8± 1.3	139.3± 0.8	140.0± 0.7	139.6± 0.9	139.8± 0.4	140.8± 1.5	139.0± 0.8	139.5± 0.5	140.2± 0.7
Kalium (mmol/l)	5.64± 0.2	5.06± 0.2	5.37± 0.5	5.79± 0.4	5.82± 0.1	5.28± 0.1	4.46± 0.2	5.83± 0.1	4.60± 0.1	5.08± 0.4
Harnstoff (mg/dl)	43.6± 3.0	44.1± 3.2	41.0± 1.6	35.3± 1.6*	42.0± 1.4	40.0± 2.2	52.2± 2.9	45.3± 2.3	42.8± 1.7	44.4± 2.7
Albumin/ Kreatinin-Verhältnis im Urin (mg/g)	40.52± 18.2	26.00± 2.9	40.48± 23.0	77.74± 39.6	33.03± 13.1	24.23± 7.9	31.90± 7.5	22.80± 12.8	45.95± 18.6	25.20± 9.2
Renaler Norepinephrin-gehalt (pg/ml)	171.6± 27.1	13.8± 2.3**	137.7± 8.8	20.3± 8.3**	204.3± 23.4	51.5± 20.0**	134.6± 20.6	36.0± 17.9**	132.1± 9.8	24.3± 11.5**

Tabelle 7: Physiologische Parameter, Serumchemie und Gewebeanalyse

(HG: Herzgewicht, KG: Körpergewicht)

Für den Vergleich innerhalb der Gruppe wurde ein ungepaarter Student's t-Test verwendet. Die Werte sind als Mittelwert±Standardfehler des Mittelwerts dargestellt.

*p<0.05

**p<0.001

4.5 Proteinexpressionsanalyse

Die Niere ist maßgeblich an der Regulation des Blutdrucks beteiligt. Deshalb ist das Verständnis der Proteinexpression regulatorischer Proteine in der Niere bei Bluthochdruck wichtig für die Entstehung und Behandlung dieser Erkrankung. In dieser Arbeit sollte die Auswirkung verschiedener blutdrucksenkender Medikamente auf die Regulation renaler Proteine untersucht werden, die an der Regulation des Blutdrucks beteiligt sind.

Im Folgenden sieht man die Western Blots der Kontrollgruppe (s. Abbildung 14) und der verschiedenen Versuchsgruppen (s. Abbildungen 15-18). Die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) wurde als Referenzprotein verwendet, um die Expression des Proteins Nephrylin (CD10), des Norepinephrin-Transporters (NET), der Tyrosinhydroxylase (TH) und des Renins zu normieren. Die Expression von GAPDH war in allen Gruppen nahezu identisch und diente daher als geeigneter Kontrollfaktor für die Analyse. Während die Proteinexpression der renalen Metallo-Endopeptidase Nephrylin, des Norepinephrin-Transporters und des Renins nach RDN in allen Gruppen unverändert blieb, war die Expression der renalen Tyrosinhydroxylase in allen RDN-Gruppen im Vergleich zu SHAM operierten SHR signifikant verringert (s. Abbildungen 14-18). Um dieses Ergebnis zu verifizieren, wurde zusätzlich eine histologische TH-Färbung der Niere durchgeführt. Die Analyse der Immunfluoreszenzfärbung zeigte ebenfalls eine stark verringerte TH-Expression rund um die Nierengefäße (s. Abbildungen 14 G-18 G). Die Herunterregulation der TH in der Niere war verbunden mit einem hochsignifikanten verringerten renalen NE-Gehalt in allen RDN-Gruppen im Vergleich zu SHAM, wodurch eine effektive renale Denervation am Studienende bestätigt wird (s. Abbildungen 14 D-18 D).

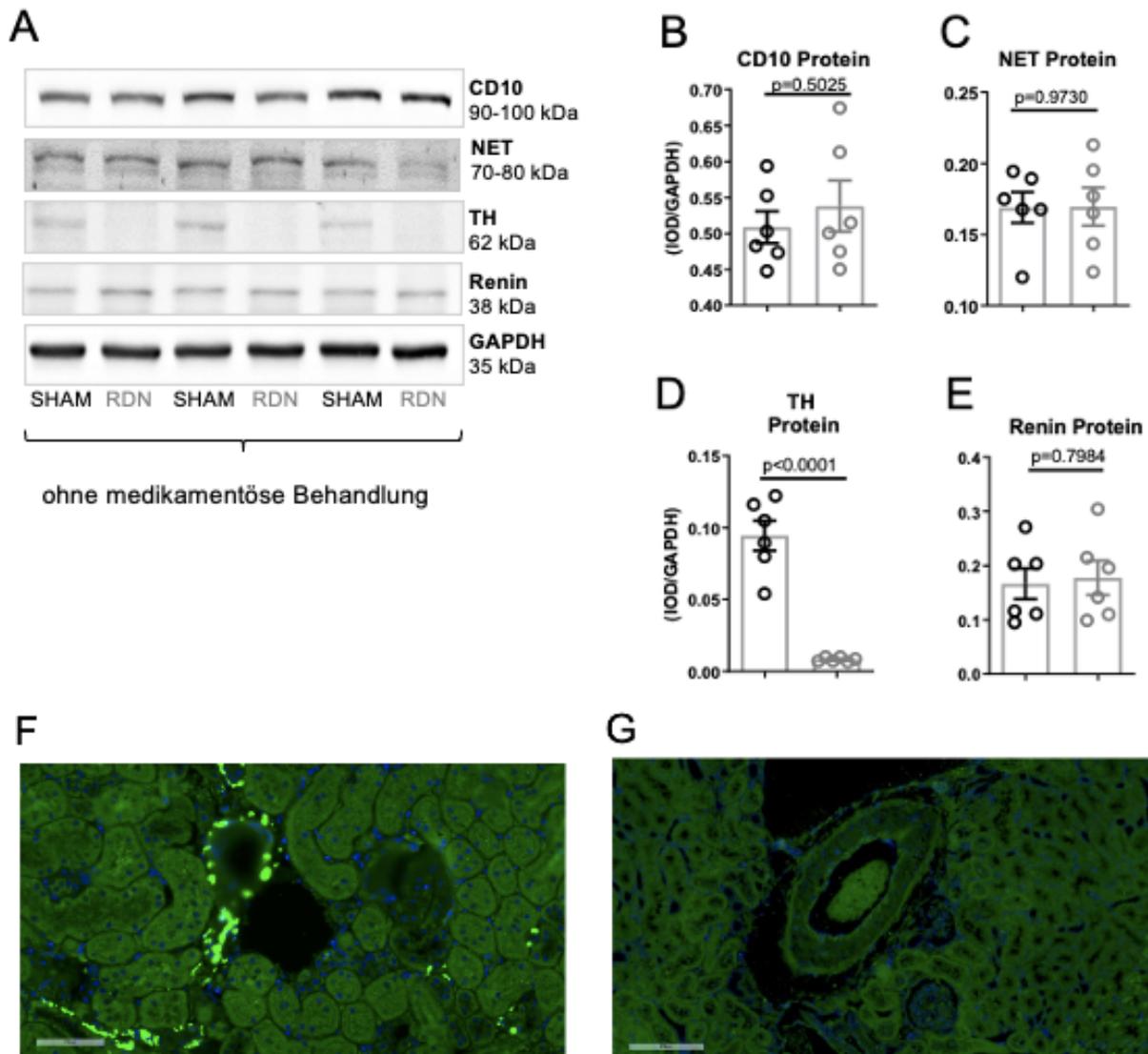


Abbildung 14: Auswirkungen der RDN auf die Expression Blutdruck-regulierender Proteine der Niere in der Kontrollgruppe ohne medikamentöse Behandlung

(A) Repräsentativer Western Blot zum Nachweis der Tyrosinhydroxylase (TH), CD10 (Neprilysin), NET (Norepinephrin-Transporter), Renin und GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) als Referenzprotein in unbehandelten SHAM und RDN.

(B) Quantifizierung der CD10-Proteinanalyse.

(C) Quantifizierung der NET-Proteinanalyse.

(D) Quantifizierung der TH-Proteinanalyse.

(E) Quantifizierung der Renin-Proteinanalyse.

(F) Repräsentatives Bild der Immunfluoreszenzfärbung der renalen TH (hellgrün) bei medikamentös unbehandelten SHAM.

(G) Repräsentatives Bild der Immunfluoreszenzfärbung der verminderten renalen TH nach RDN.

Ein ungepaarter Student's t-Test wurde für den Vergleich zwischen den Gruppen verwendet. Die Werte sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts dargestellt.

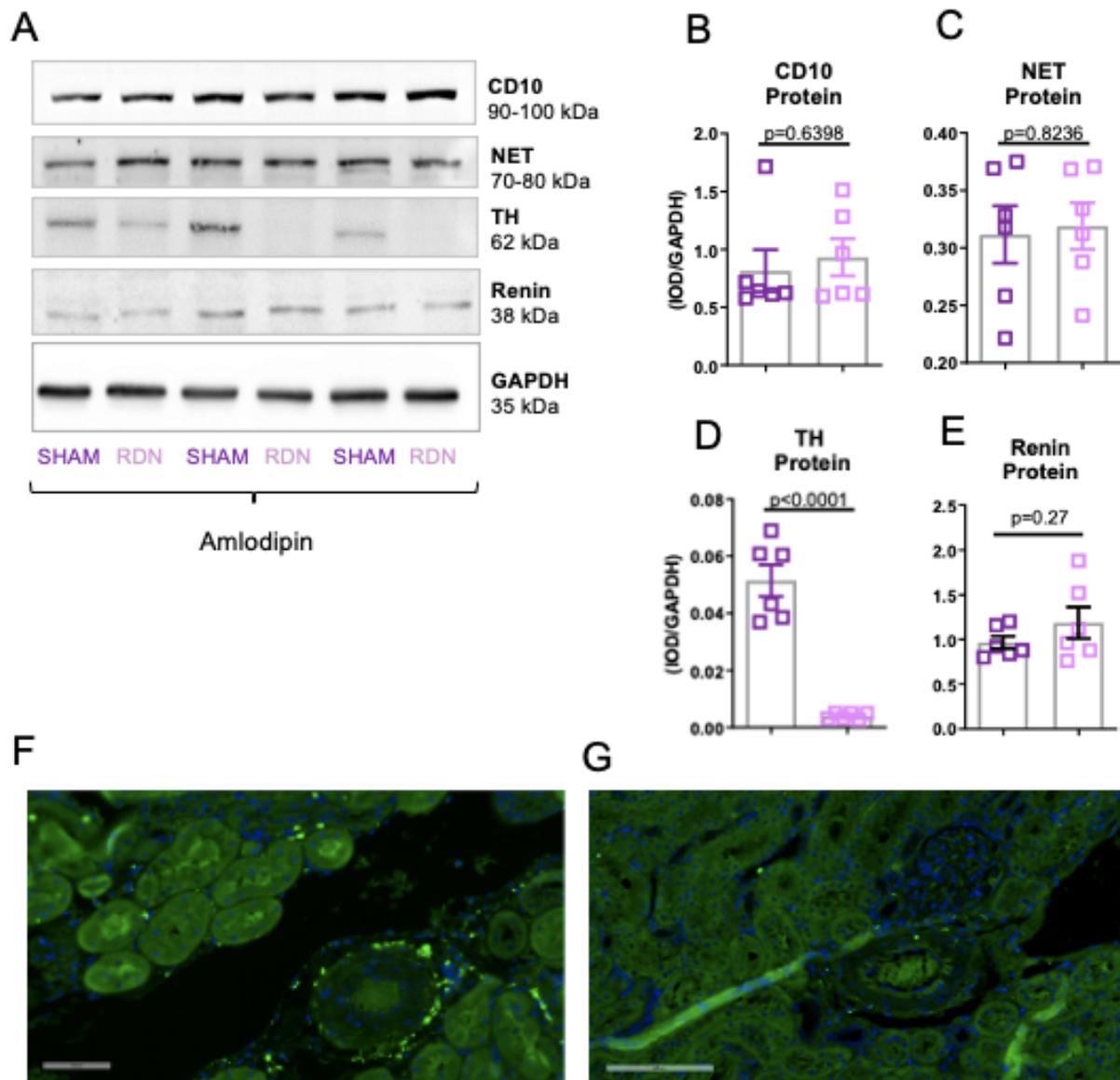


Abbildung 15: Auswirkungen der RDN und Amlodipin auf die Expression Blutdruck-regulierender Proteine der Niere

(A) Repräsentativer Western Blot zum Nachweis der TH (Tyrosinhydroxylase), CD10 (Nepriylisin), NET (Norepinephrin-Transporter), Renin und GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) als Referenzprotein bei SHAM+Amlodipin und RDN+Amlodipin.

(B) Quantifizierung der CD10-Proteinanalyse.

(C) Quantifizierung der NET-Proteinanalyse.

(D) Quantifizierung der TH-Proteinanalyse.

(E) Quantifizierung der Renin-Proteinanalyse.

(F) Repräsentatives Bild der Immunfluoreszenzfärbung der renalen TH (hellgrün) bei SHAM+Amlodipin.

(G) Repräsentatives Bild der Immunfluoreszenzfärbung der verminderten renalen TH nach RDN+Amlodipin.

Ein ungepaarter Student's t-Test wurde für den Vergleich zwischen den Gruppen verwendet. Die Werte sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts dargestellt.

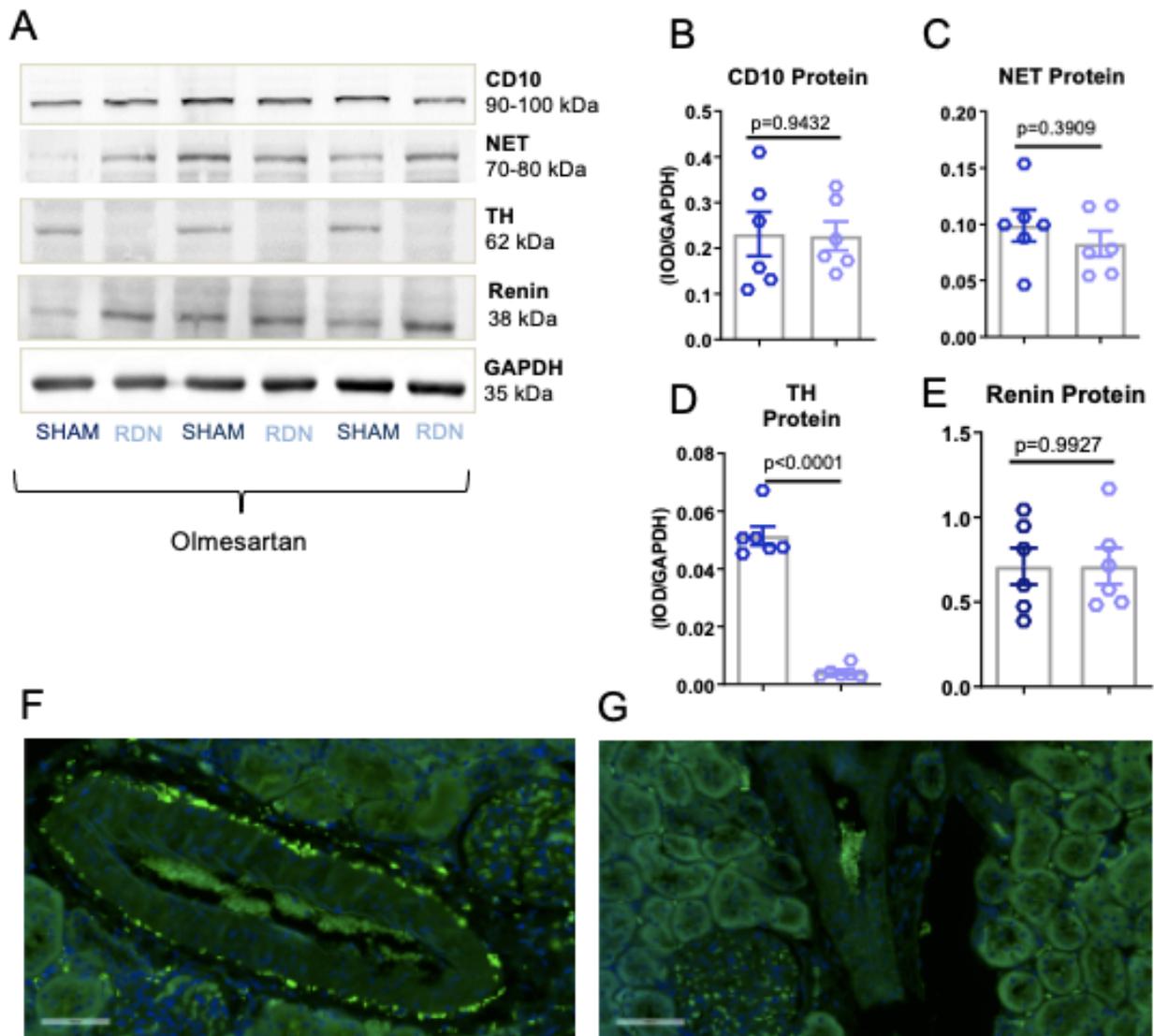


Abbildung 16: Auswirkungen der RDN und Olmesartan auf die Expression Blutdruck-regulierender Proteine der Niere

(A) Repräsentativer Western Blot zum Nachweis der TH (Tyrosinhydroxylase), CD10 (Neprilysin), NET (Norepinephrin-Transporter), Renin und GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) als Referenzprotein bei SHAM+Olmesartan und RDN+Olmesartan.

(B) Quantifizierung der CD10-Proteinanalyse.

(C) Quantifizierung der NET-Proteinanalyse.

(D) Quantifizierung der TH-Proteinanalyse.

(E) Quantifizierung der Renin-Proteinanalyse.

(F) Repräsentatives Bild der Immunfluoreszenzfärbung der renalen TH (hellgrün) bei SHAM+Olmesartan.

(G) Repräsentatives Bild der Immunfluoreszenzfärbung der verminderten renalen TH nach RDN+Olmesartan.

Ein ungepaarter Student's t-Test wurde für den Vergleich zwischen den Gruppen verwendet. Die Werte sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts dargestellt.

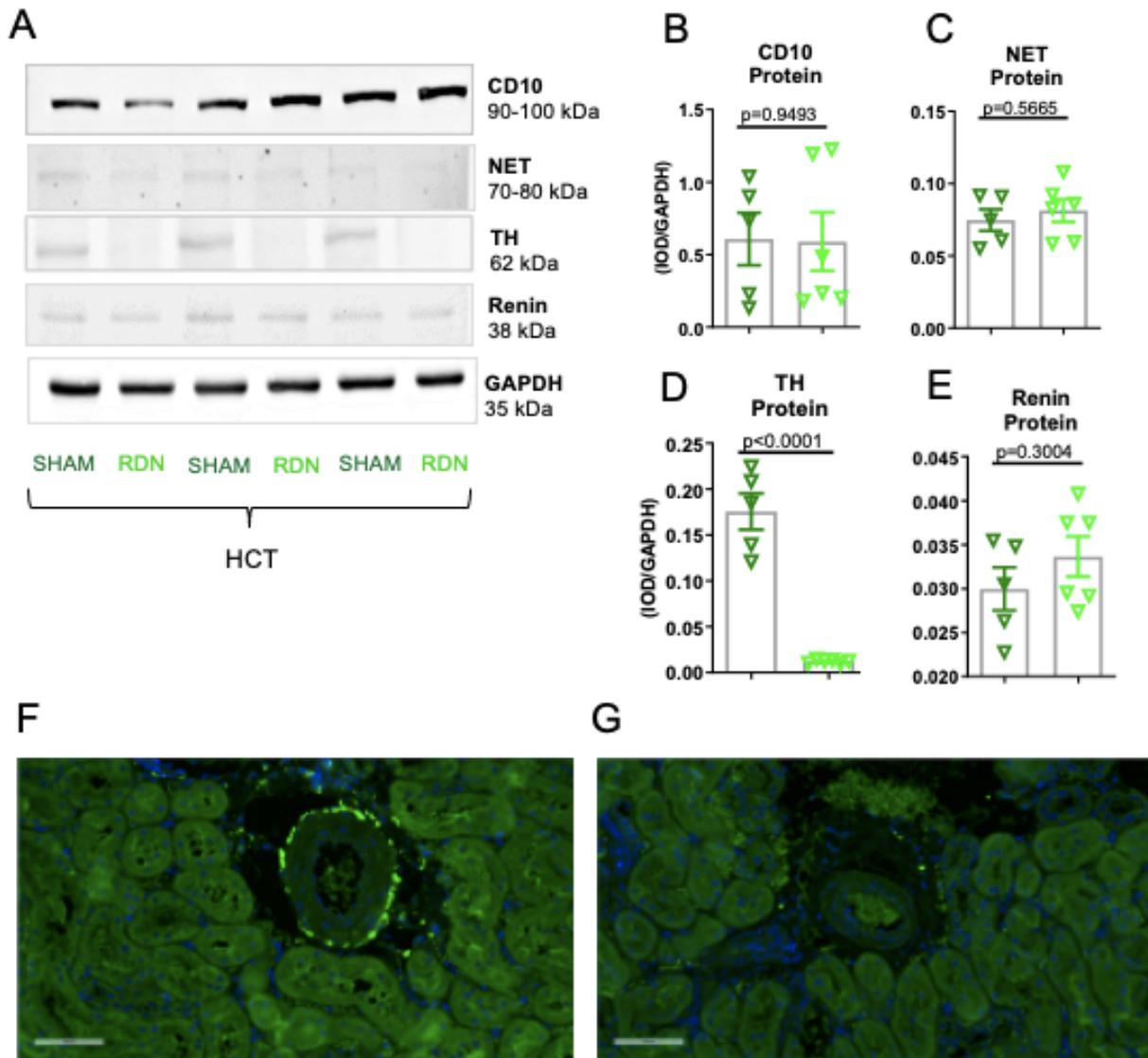


Abbildung 17: Auswirkungen der RDN und HCT auf die Expression Blutdruck-regulierender Proteine der Niere

(A) Repräsentativer Western Blot zum Nachweis der TH (Tyrosinhydroxylase), CD10 (Nepriylsin), NET (Norepinephrin-Transporter), Renin und GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) als Referenzprotein bei SHAM+HCT und RDN+HCT.

(B) Quantifizierung der CD10-Proteinanalyse.

(C) Quantifizierung der NET-Proteinanalyse.

(D) Quantifizierung der TH-Proteinanalyse.

(E) Quantifizierung der Renin-Proteinanalyse.

(F) Repräsentatives Bild der Immunfluoreszenzfärbung der renalen TH (hellgrün) bei SHAM+HCT.

(G) Repräsentatives Bild der Immunfluoreszenzfärbung der verminderten renalen TH nach RDN+HCT.

Ein ungepaarter Student's t-Test wurde für den Vergleich zwischen den Gruppen verwendet. Die Werte sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts dargestellt.

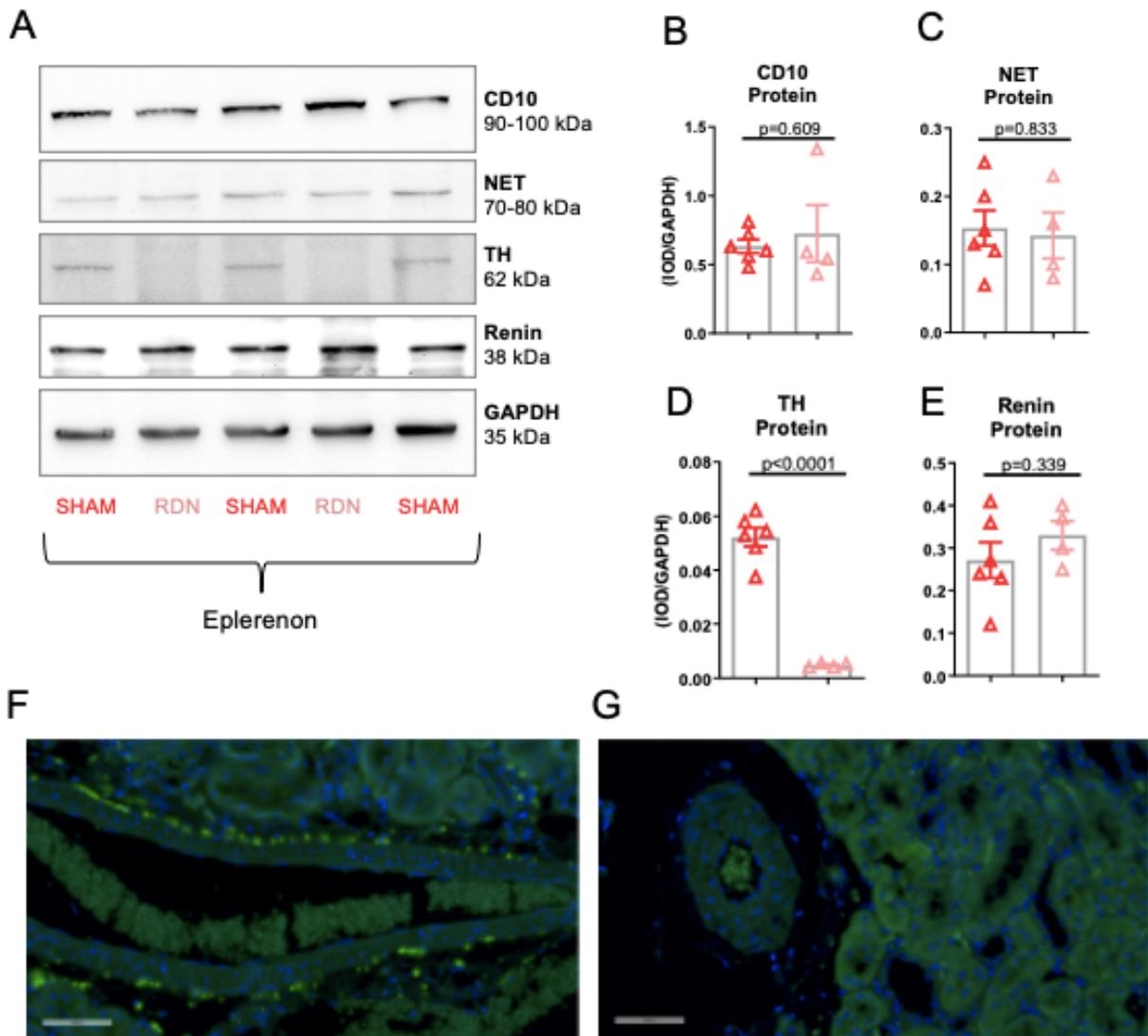


Abbildung 18: Auswirkungen der RDN und Eplerenon auf die Expression Blutdruck-regulierender Proteine der Niere

(A) Repräsentativer Western Blot zum Nachweis der TH (Tyrosinhydroxylase), CD10 (Neprilysin), NET (Norepinephrin-Transporter), Renin und GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) als Referenzprotein bei SHAM+Eplerenon und RDN+Eplerenon.

(B) Quantifizierung der CD10-Proteinanalyse.

(C) Quantifizierung der NET-Proteinanalyse.

(D) Quantifizierung der TH-Proteinanalyse.

(E) Quantifizierung der Renin-Proteinanalyse.

(F) Repräsentatives Bild der Immunfluoreszenzfärbung der renalen TH (hellgrün) bei SHAM+Eplerenon.

(G) Repräsentatives Bild der Immunfluoreszenzfärbung der verminderten renalen TH nach RDN+Eplerenon.

Ein ungepaarter Student's t-Test wurde für den Vergleich zwischen den Gruppen verwendet. Die Werte sind als Mittelwert±Standardfehler des Mittelwerts dargestellt.

4.6 Auswirkung der Blutdrucksenkung auf die Plasma-Renin-Aktivität, die Plasma- Aldosteron-Konzentration und die linksventrikuläre Expression pro-hypertropher Markergene

In den medikamentös unbehandelten Kontrollgruppen war die Plasma-Renin-Aktivität durch RDN im Vergleich zu SHAM signifikant reduziert (SHAM: 9.17 ± 0.1 ng/ml; RDN: 8.65 ± 0.1 ng/ml; $p=0.0272$, s. Abbildung 19 A). Olmesartan und HCT führten sowohl bei den SHAM-Gruppen als auch bei den RDN-Gruppen zu einer Reduktion der Plasma Renin-Aktivität (s. Abbildung 19 A).

Ein Vergleich der jeweiligen RDN-Gruppen mit ihrer entsprechenden SHAM-Gruppe zeigte, dass bei der unbehandelten Kontrollgruppe das Plasma-Aldosteron durch RDN im Vergleich zu SHAM signifikant reduziert wurde (SHAM: 302 ± 44 pg/ml; RDN: 129 ± 17 pg/ml; $p=0.0049$, s. Abbildung 19 B). Amlodipin führte zu einer signifikanten Senkung des Plasma-Aldosterons sowohl bei SHAM als auch bei RDN.

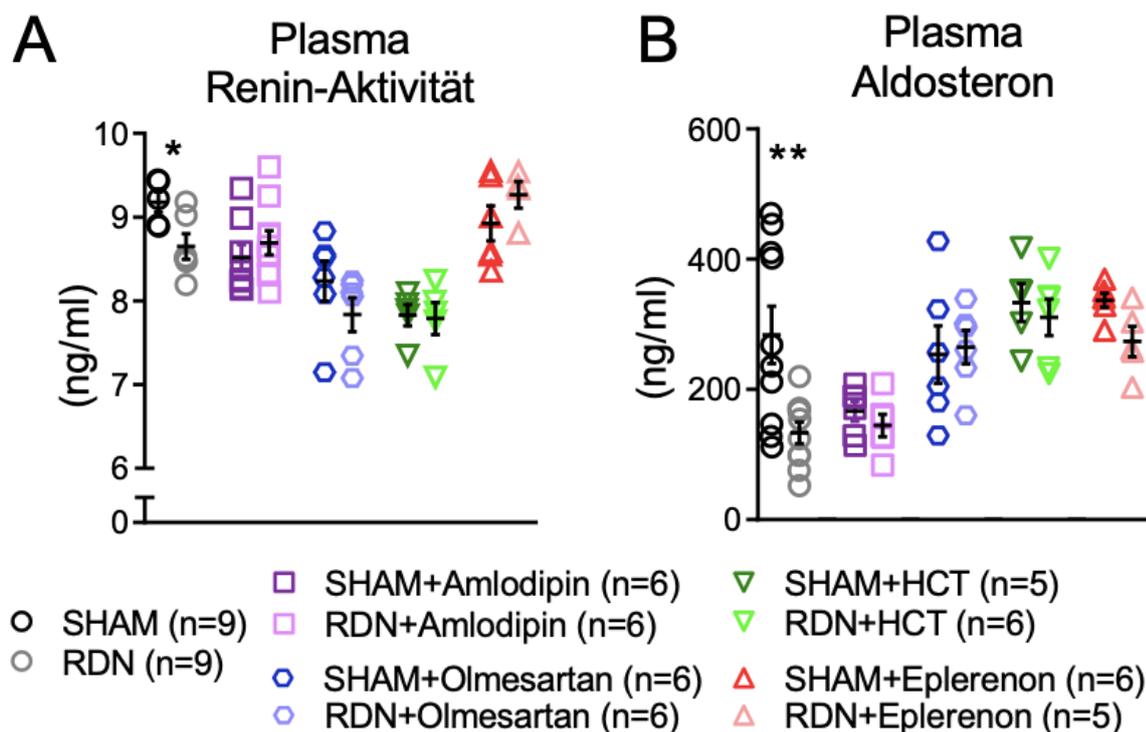


Abbildung 19: Auswirkung der RDN auf die (A) Plasma-Renin-Aktivität und (B) das Plasma-Aldosteron bei SHR nach SHAM und RDN mit/ohne medikamentöse Behandlung

Ein ungepaarter Student's t-Test wurde für den Vergleich zwischen den Gruppen verwendet. Die Werte sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts dargestellt.

* $p < 0.05$
 ** $p < 0.01$

Die TaqMan-Analyse ergab, dass die BNP-mRNA-Expression im linken Ventrikel zwischen allen Gruppen vergleichbar war und weder durch RDN noch durch eine antihypertensive

Behandlung beeinflusst wurde (s. Tabelle 8). Auch das Plasma-BNP war zwischen allen Gruppen vergleichbar und blieb durch die antihypertensive Therapie unbeeinflusst.

Pro-hypertrophe Markergene										
	SHR (ohne medikamentöse Behandlung)		SHR+Amlodipin		SHR+Olmesartan		SHR+HCT		SHR+Eplerenon	
	SHAM	RDN	SHAM	RDN	SHAM	RDN	SHAM	RDN	SHAM	RDN
Plasma-BNP (pg/ml)	58.3±6.0	48.6±2.7	48.1±2.9	46.5±2.3	40.0±4.9	45.8±4.2	34.6±1.9	35.9±2.9	45.0±3.3	41.4±5.4
LV BNP mRNA (Relative Gen-expression GAPDH)	1.21±0.3	1.09±0.2	0.96±0.1	1.22±0.2	1.41±0.7	1.29±0.1	0.81±0.3	1.93±0.7	1.64±0.5	1.74±0.3

Tabelle 8: Pro-hypertrophe Markergene

(BNP: B-Typ natriuretisches Peptid, LV: linksventrikulär, GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase)

Die Werte sind als Mittelwert±Standardfehler des Mittelwerts dargestellt.

4.7 Untersuchung des strukturellen kardialen Remodelings

4.7.1 Linksventrikuläre interstitielle Fibrose

Bei medikamentös unbehandelten SHAM und RDN war die interstitielle linksventrikuläre Fibrose am Studienende nicht signifikant verändert (SHAM: 6.05±0.9 % vs. RDN: 5.09±0.5 %; $p=0.4126$, s. Abbildung 20). Die Bildung von linksventrikulärer Fibrose war bei SHAM+Olmesartan im Vergleich zu SHAM signifikant abgeschwächt (SHAM+Olmesartan: 2.84±0.1 %, $p=0.0051$ vs. SHAM, s. Abbildung 22). Bei RDN wurde die interstitielle linksventrikuläre Fibrose durch die HCT-Behandlung signifikant reduziert (RDN+HCT: 2.33±0.3 %, $p=0.0224$ vs. RDN, s. Abbildung 23). Die linksventrikuläre interstitielle Fibrose war bei SHAM+Amlodipin und SHAM+Eplerenon nicht signifikant verändert.

4.7.2 Linksventrikuläre perivaskuläre Fibrose

Die Analyseergebnisse zur perivaskulären linksventrikulären Fibrose zeigten eine signifikante Wirkung der antihypertensiven Therapie ($p<0.0001$), aber keine signifikante Wirkung der RDN im Vergleich zur SHAM-Gruppe ($p=0.5099$).

Bei den Tieren ohne medikamentöse Behandlung gab es keinen signifikanten Unterschied in der Veränderung des perivaskulären linksventrikulären Fibrosegehalts zwischen RDN und SHAM (SHAM: 52.64±4.6 %; RDN: 50.03±2.8 %; $p=0.6390$, s. Abbildung 20 C). In der SHAM-

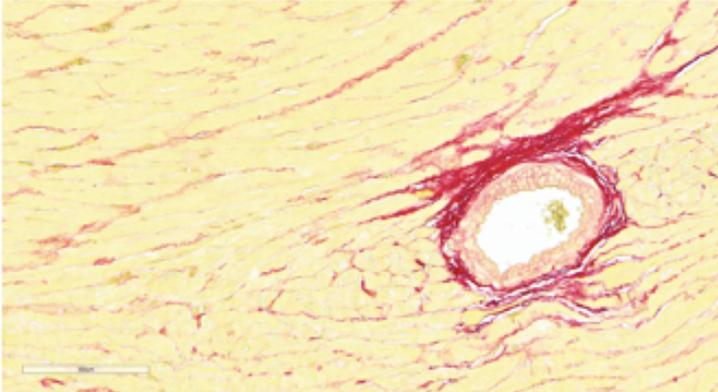
Gruppe reduzierten alle Antihypertensiva den linksventrikulären perivaskulären Fibrosegehalt im Vergleich zur SHAM-Gruppe ohne medikamentöse Behandlung (SHAM+Amlodipin: 39.34 ± 1.9 %, $p=0.0454$ vs. SHAM; SHAM+Olmesartan: 35.96 ± 1.0 %, $p=0.0062$ vs. SHAM; SHAM+HCT: 29.90 ± 4.7 %, $p=0.0002$ vs. SHAM; SHAM+Eplerenon: 39.34 ± 1.9 %, $p=0.0454$ vs. SHAM, s. Abbildungen 20 C-24 C).

In der RDN-Gruppe verringerten alle Medikamente mit Ausnahme von Amlodipin den linksventrikulären perivaskulären Fibrosegehalt im Vergleich zur RDN-Gruppe ohne medikamentöse Behandlung (RDN+Olmesartan: 31.91 ± 1.2 %, $p=0.0024$ vs. RDN; RDN+HCT: 27.55 ± 3.7 %, $p=0.0003$ vs. RDN; RDN+Eplerenon: 39.34 ± 1.9 %, $p=0.0250$ vs. RDN, s. Abbildungen 20 C-24 C).

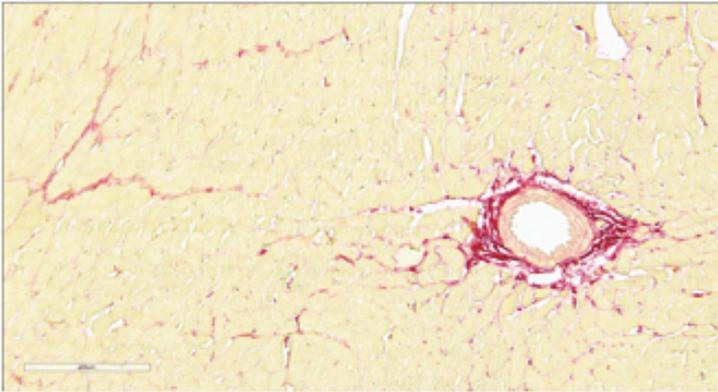
In Abbildung 25 ist der Intragruppenvergleich der linksventrikulären interstitiellen Fibrose und der linksventrikulären perivaskulären Fibrose bei SHAM und RDN dargestellt, um die Veränderungen bzw. Unterschiede zwischen SHAM und RDN zu verdeutlichen.

A

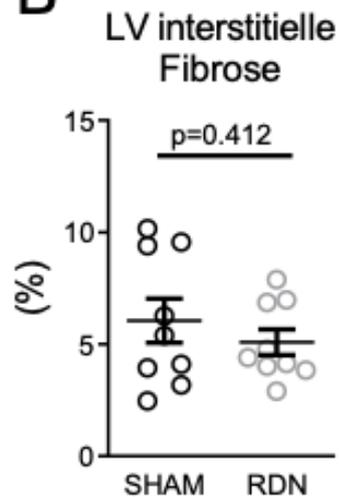
SHAM



RDN



B



C

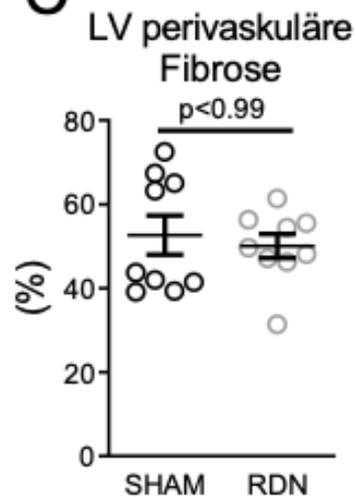


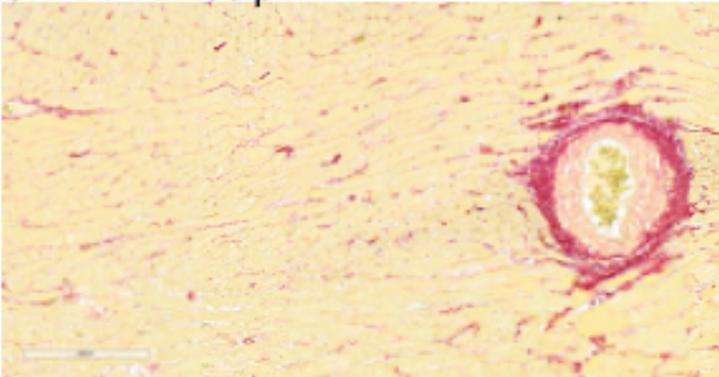
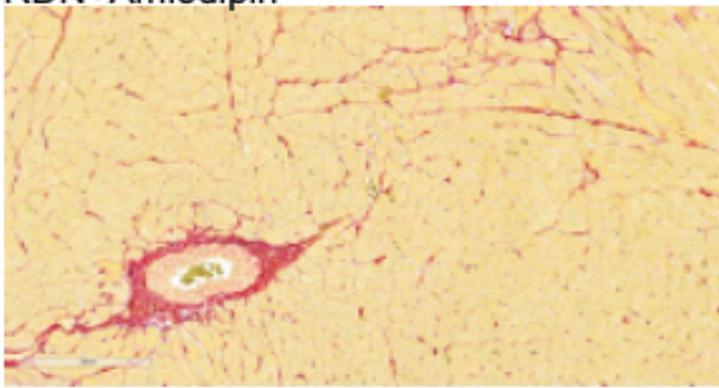
Abbildung 20: Bestimmung der linksventrikulären (LV) interstitiellen und perivaskulären Fibrose bei medikamentös unbehandelten SHR nach SHAM und RDN

A) Repräsentative Bilder Picro-Siriusrot gefärbter linker Ventrikel von SHAM (n=9) und RDN (n=9) zur Bestimmung der linksventrikulären kardialen interstitiellen Fibrose und der linksventrikulären perivaskulären Fibrose.

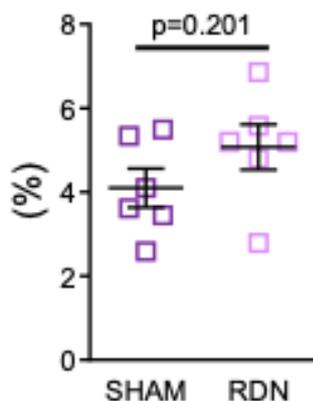
B) Quantifizierung der linksventrikulären interstitiellen Fibrose.

C) Quantifizierung der linksventrikulären perivaskulären Fibrose.

Zur statistischen Auswertung wurde ein ungepaarter Student's t-Test verwendet. Die Werte sind als Mittelwert±Standardfehler des Mittelwerts dargestellt.

A**SHAM+Amlodipin****RDN+Amlodipin****B**

Amlodipin
LV interstitielle
Fibrose

**C**

Amlodipin
LV perivaskuläre
Fibrose

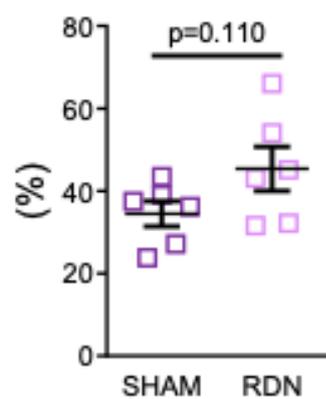


Abbildung 21: Bestimmung der linksventrikulären (LV) interstitiellen und perivaskulären Fibrose bei SHAM+Amlodipin und RDN+Amlodipin

A) Repräsentative Bilder Picro-Siriusrot gefärbter linker Ventrikel SHAM+Amlodipin (n=6) und RDN+Amlodipin (n=6) zur Bestimmung der linksventrikulären kardialen interstitiellen Fibrose und der linksventrikulären perivaskulären Fibrose.

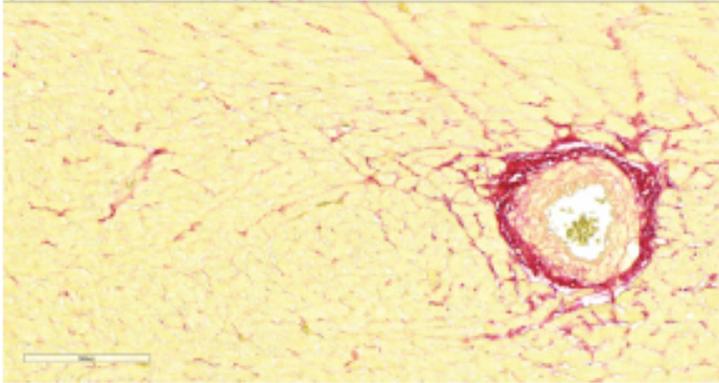
B) Quantifizierung der linksventrikulären interstitiellen Fibrose.

C) Quantifizierung der linksventrikulären perivaskulären Fibrose.

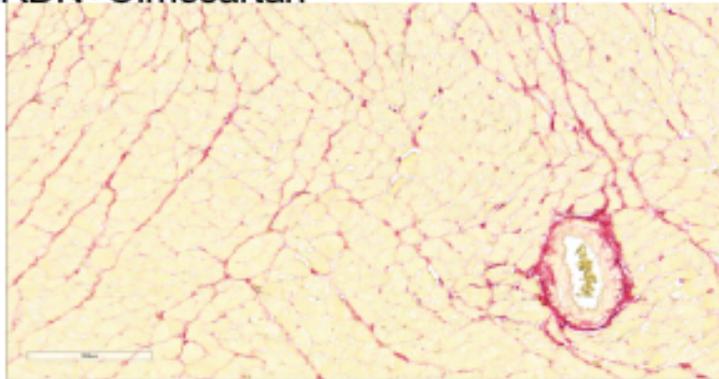
Zur statistischen Auswertung wurde ein ungepaarter Student's t-Test verwendet. Die Werte sind als Mittelwert±Standardfehler des Mittelwerts dargestellt.

A

SHAM+Olmesartan

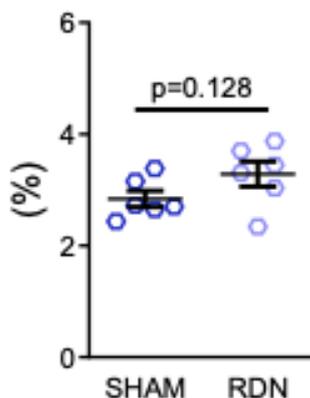


RDN+Olmesartan



B

Olmesartan
LV intersitielle
Fibrose



C

Olmesartan
LV perivaskuläre
Fibrose

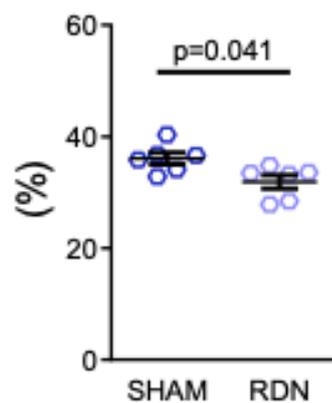


Abbildung 22: Bestimmung der linksventrikulären (LV) interstitiellen und perivaskulären Fibrose bei SHAM+Olmesartan und RDN+Olmesartan

A) Repräsentative Bilder Picro-Siriusrot gefärbter linker Ventrikel SHAM+Olmesartan (n=6) und RDN+Olmesartan (n=6) zur Bestimmung der linksventrikulären kardialen interstitiellen Fibrose und der linksventrikulären perivaskulären Fibrose.

B) Quantifizierung der linksventrikulären interstitiellen Fibrose.

C) Quantifizierung der linksventrikulären perivaskulären Fibrose.

Zur statistischen Auswertung wurde ein ungepaarter Student's t-Test verwendet. Die Werte sind als Mittelwert±Standardfehler des Mittelwerts dargestellt.

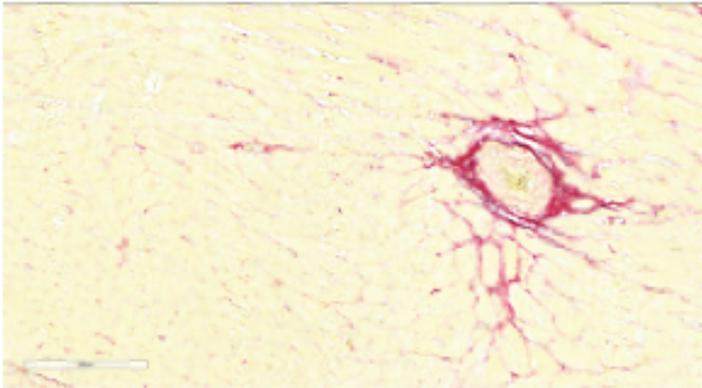
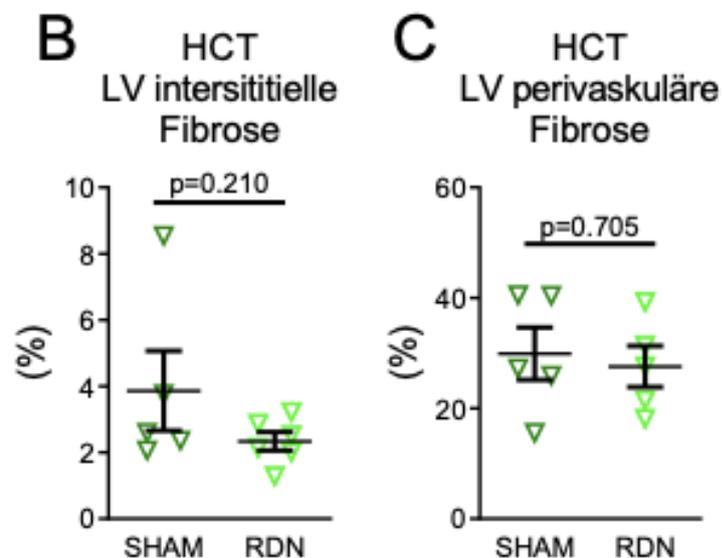
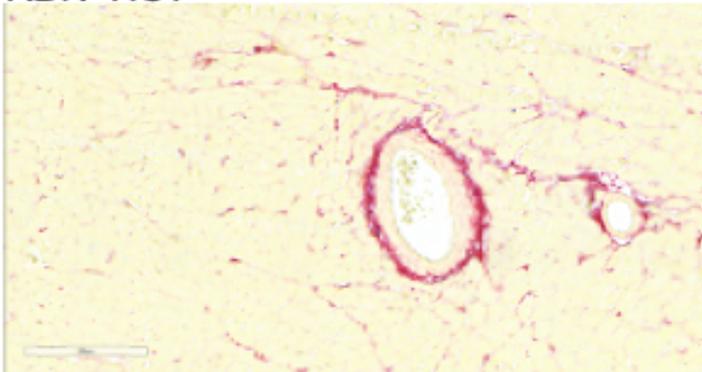
A**SHAM+HCT****RDN+HCT**

Abbildung 23: Bestimmung der linksventrikulären (LV) interstitiellen und perivaskulären Fibrose bei SHAM+HCT und RDN+HCT

A) Repräsentative Bilder Picro-Siriusrot gefärbter linker Ventrikel SHAM+HCT (n=5) und RDN+HCT (n=6) zur Bestimmung der linksventrikulären kardialen interstitiellen Fibrose und der linksventrikulären perivaskulären Fibrose.

B) Quantifizierung der linksventrikulären interstitiellen Fibrose.

C) Quantifizierung der linksventrikulären perivaskulären Fibrose.

Zur statistischen Auswertung wurde ein ungepaarter Student's t-Test verwendet. Die Werte sind als Mittelwert±Standardfehler des Mittelwerts dargestellt.

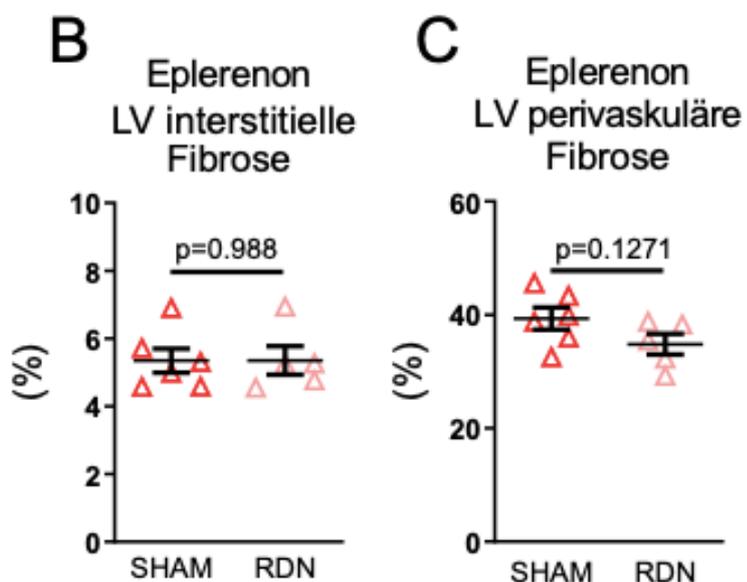
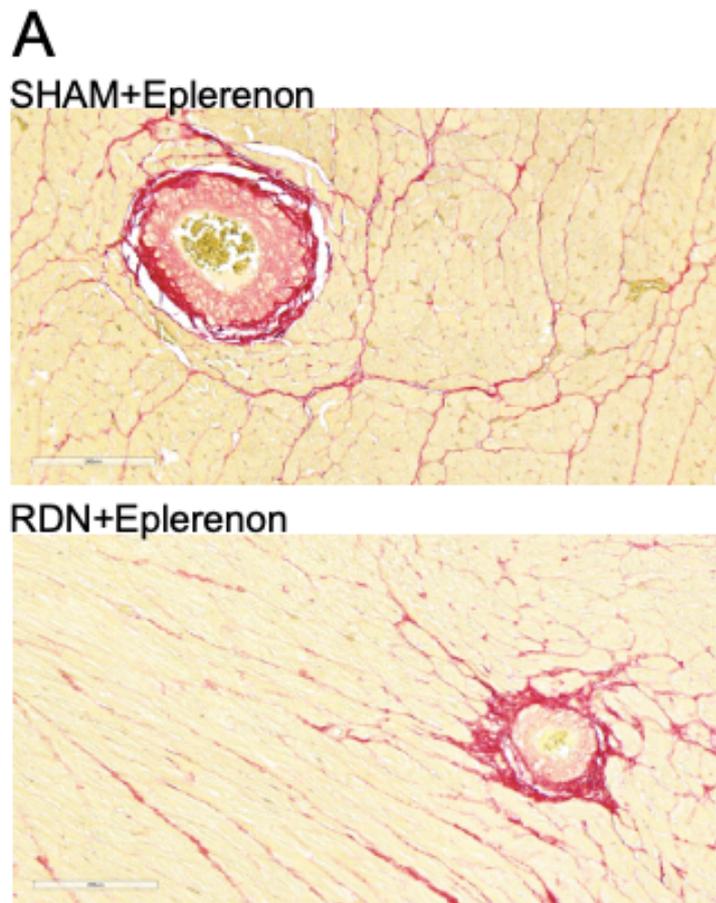


Abbildung 24: Bestimmung der linksventrikulären (LV) interstitiellen und perivaskulären Fibrose bei SHAM+Eplerenon und RDN+Eplerenon

A) Repräsentative Bilder Picro-Siriusrot gefärbter linker Ventrikel SHAM+Eplerenon (n=6) und RDN+Eplerenon (n=5) zur Bestimmung der linksventrikulären kardialen interstitiellen Fibrose und der linksventrikulären perivaskulären Fibrose.

B) Quantifizierung der linksventrikulären interstitiellen Fibrose.

C) Quantifizierung der linksventrikulären perivaskulären Fibrose.

Zur statistischen Auswertung wurde ein ungepaarter Student's t-Test verwendet. Die Werte sind als Mittelwert±Standardfehler des Mittelwerts dargestellt.

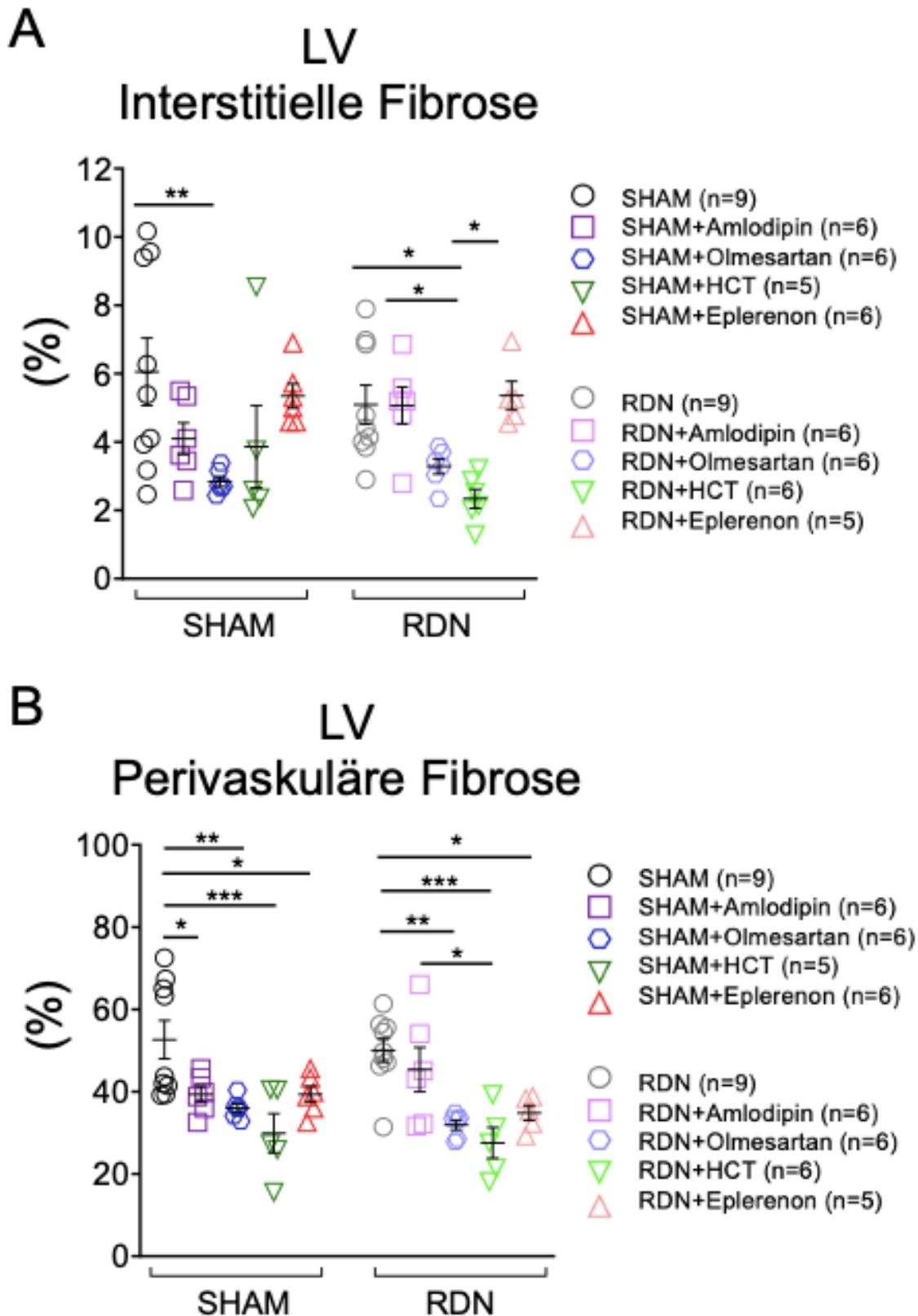


Abbildung 25: Intragruppenvergleich der linksventrikulären (LV) (A) interstitiellen Fibrose und (B) perivaskulären Fibrose bei SHR nach SHAM und RDN mit/ohne medikamentöse Behandlung. Die Werte sind als Mittelwert±Standardfehler des Mittelwerts dargestellt.

* $p < 0.05$

** $p < 0.01$

*** $p < 0.001$

4.7.3 Linksventrikuläre profibrotische Genexpression

Es wurden keine signifikanten Unterschiede in der Expression der profibrotischen Gene CTGF, Col1a1 und Col1a2 in der linksventrikulären mRNA zwischen den Gruppen festgestellt (s. Tabelle 9).

Linksventrikuläre Genexpression										
Gen	SHR (ohne medikamentöse Behandlung)		SHR+Amlodipin		SHR+Olmesartan		SHR+HCT		SHR+Eplerenon	
	SHAM	RDN	SHAM	RDN	SHAM	RDN	SHAM	RDN	SHAM	RDN
Col1a1 mRNA	1.01± 0.06	0.68± 0.03	1.73± 0.3	1.63± 0.2	3.09± 0.3	1.78± 0.4	1.22± 0.3	2.00± 0.6	2.68± 1.5	0.37± 0.2
Col1a2 mRNA	1.02± 0.1	0.85± 0.1	2.34± 1.1*	2.58± 0.2**	1.23± 0.1	0.98± 0.1	1.06± 0.2	1.96± 0.5***	0.73± 0.2	0.49± 0.1
CTGF mRNA	1.17± 0.2	0.93± 0.2	0.45± 0.05	0.44± 0.05	3.31± 1.5	1.50± 0.3	1.08± 0.4	2.11± 0.7	2.19± 1.3	0.44± 0.3

Tabelle 9: Linksventrikuläre profibrotische Genexpression (Real-Time PCR mit TaqMan-Proben, Col1a1: Alpha-1-Typ-I-Kollagen, Col1a2: Alpha-2-Typ-I-Kollagen, CTGF: Connective tissue growth factor)

Die Werte sind als Mittelwert±Standardfehler des Mittelwerts dargestellt.

*p<0.05

**p<0.01

***p<0.001

4.7.4 Linksventrikuläre Kardiomyozytenhypertrophie

In Bezug auf den linksventrikulären (LV) Kardiomyozytendurchmesser zeigen die Analysen keine Wechselwirkung zwischen RDN und Medikamenten ($p=0.4259$, s. Abbildungen 27-31). In der unbehandelten Kontrollgruppe war der Kardiomyozytendurchmesser nach RDN im Vergleich zu SHAM unverändert (SHAM: $21.3\pm 0.6\mu\text{m}$; RDN: $19.28\pm 1.1\mu\text{m}$; $p=0.1585$, s. Abbildung 26). Nach blutdrucksenkender medikamentöser Behandlung blieb der Kardiomyozytendurchmesser sowohl bei SHAM als auch bei RDN unverändert (s. Abbildungen 27-31).

In Abbildung 31 ist der Intragruppenvergleich der linksventrikulären Kardiomyozytenhypertrophie bei SHAM und RDN dargestellt, um die Veränderungen bzw. Unterschiede zwischen SHAM und RDN zu verdeutlichen.

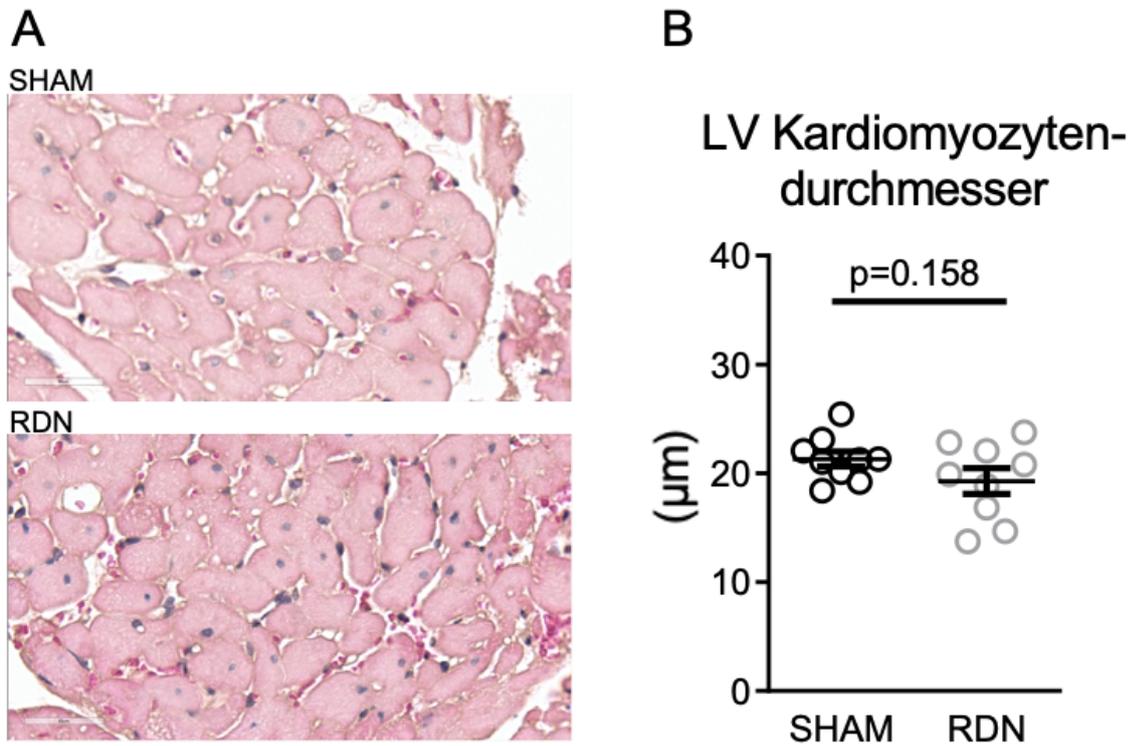


Abbildung 26: Bestimmung des linksventrikulären (LV) Kardiomyozytendurchmessers bei SHR nach SHAM und RDN ohne medikamentöse Behandlung

A) Repräsentative Bilder Hämatoxylin&Eosin gefärbter linker Ventrikel von SHAM (n=9) und RDN (n=9) zur Bestimmung des Kardiomyozytendurchmessers im linken Ventrikel.

B) Quantifizierung des linksventrikulären Kardiomyozytendurchmessers.

Zur statistischen Auswertung wurde ein ungepaarter Student's t-Test verwendet. Die Werte sind als Mittelwert±Standardfehler des Mittelwerts dargestellt.

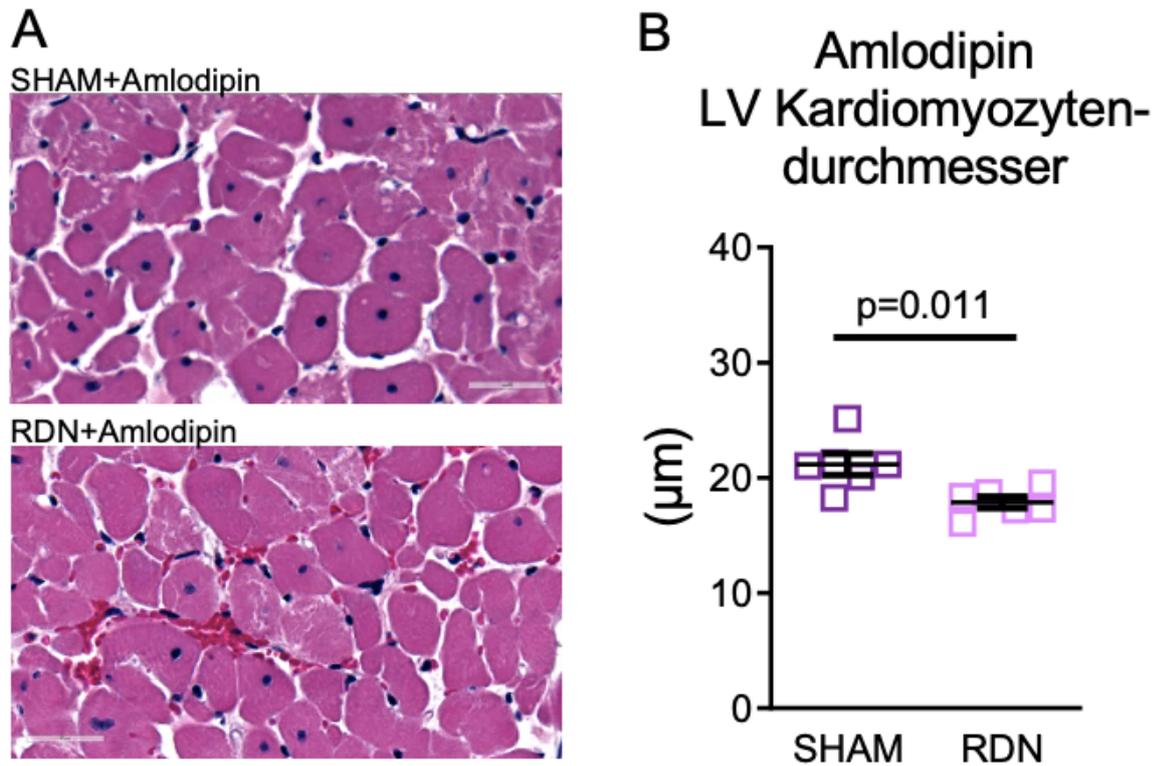


Abbildung 27: Bestimmung des linksventrikulären (LV) Kardiomyozytendurchmessers bei SHAM+Amlodipin und RDN+Amlodipin

A) Repräsentative Bilder Hämatoxylin&Eosin gefärbter linker Ventrikel von SHAM+Amlodipin (n=6) und RDN+Amlodipin (n=6) zur Bestimmung des Kardiomyozytendurchmessers im linken Ventrikel.

B) Quantifizierung des linksventrikulären Kardiomyozytendurchmessers.

Zur statistischen Auswertung wurde ein ungepaarter Student's t-Test verwendet. Die Werte sind als Mittelwert±Standardfehler des Mittelwerts dargestellt.

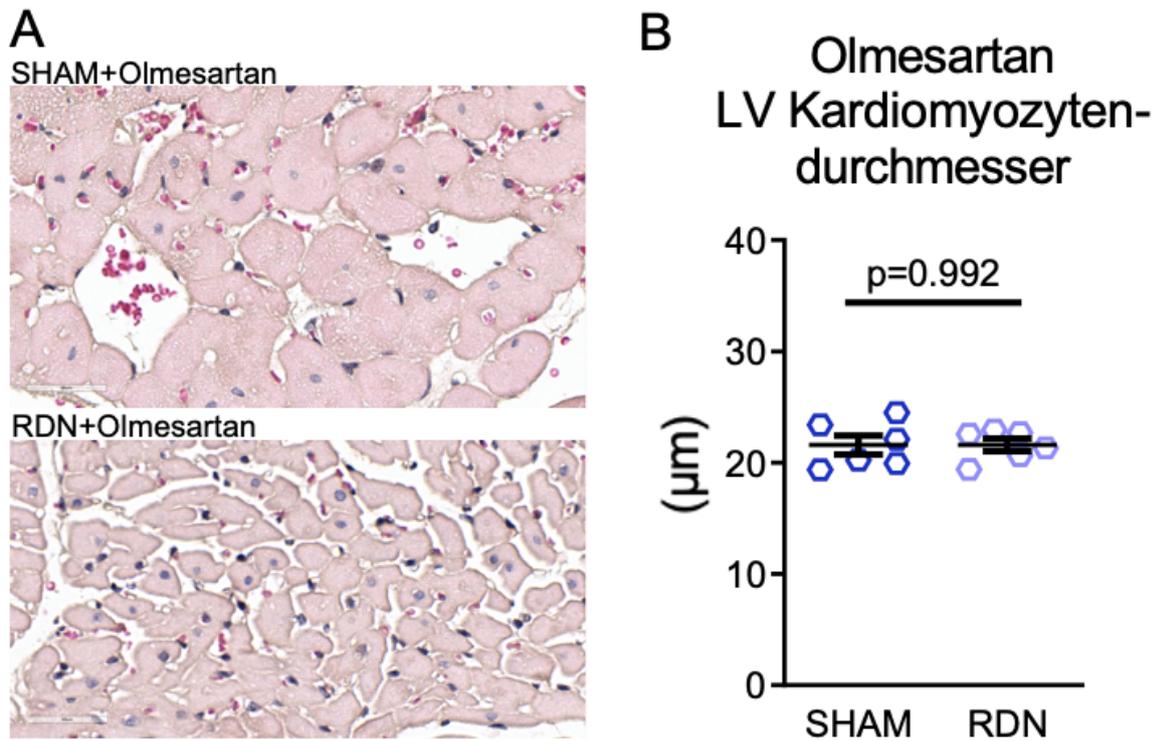


Abbildung 28: Bestimmung des linksventrikulären (LV) Kardiomyozytendurchmessers bei SHAM+Olmesartan und RDN+Olmesartan

A) Repräsentative Bilder Hämatoxylin&Eosin gefärbter linker Ventrikel von SHAM+Olmesartan (n=6) und RDN+Olmesartan (n=6) zur Bestimmung des Kardiomyozytendurchmessers im linken Ventrikel.

B) Quantifizierung des linksventrikulären Kardiomyozytendurchmessers.

Zur statistischen Auswertung wurde ein ungepaarter Student's t-Test verwendet. Die Werte sind als Mittelwert±Standardfehler des Mittelwerts dargestellt.

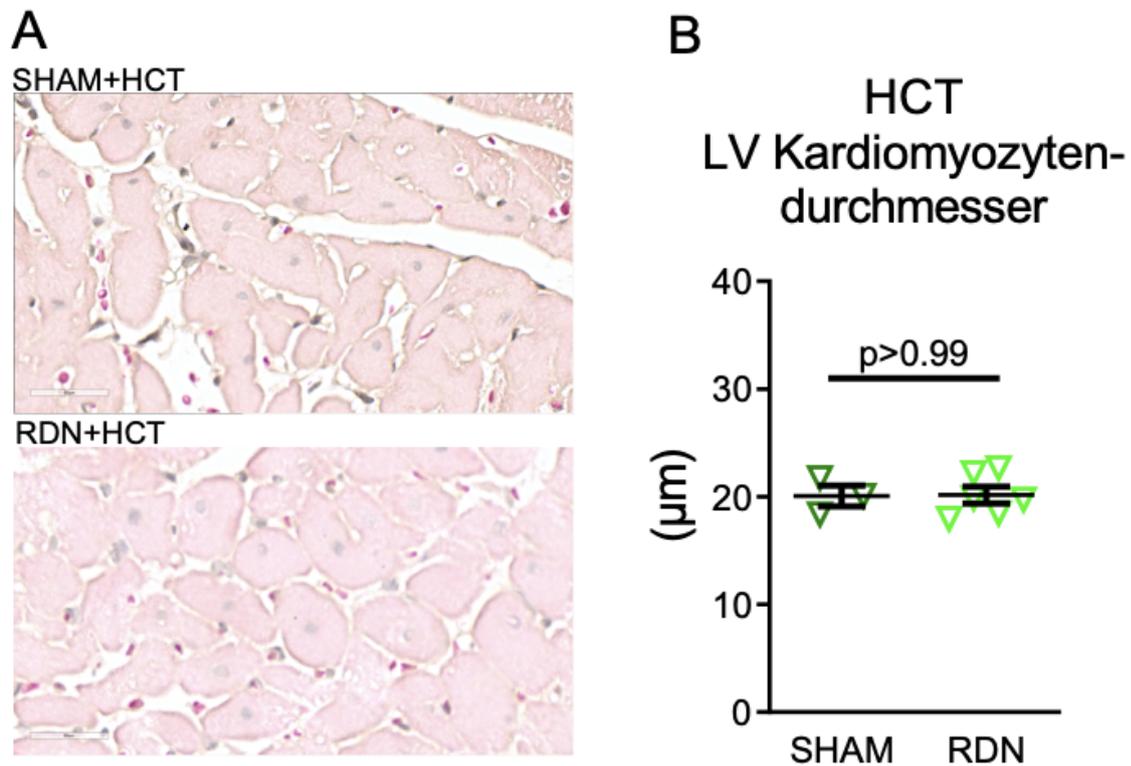


Abbildung 29: Bestimmung des linksventrikulären (LV) Kardiomyozytendurchmessers bei SHAM+HCT und RDN+HCT

A) Repräsentative Bilder Hämatoxylin&Eosin gefärbter linker Ventrikel von SHAM+HCT (n=5) und RDN+HCT (n=6) zur Bestimmung des Kardiomyozytendurchmessers im linken Ventrikel.

B) Quantifizierung des linksventrikulären Kardiomyozytendurchmessers.

Zur statistischen Auswertung wurde ein ungepaarter Student's t-Test verwendet. Die Werte sind als Mittelwert±Standardfehler des Mittelwerts dargestellt.

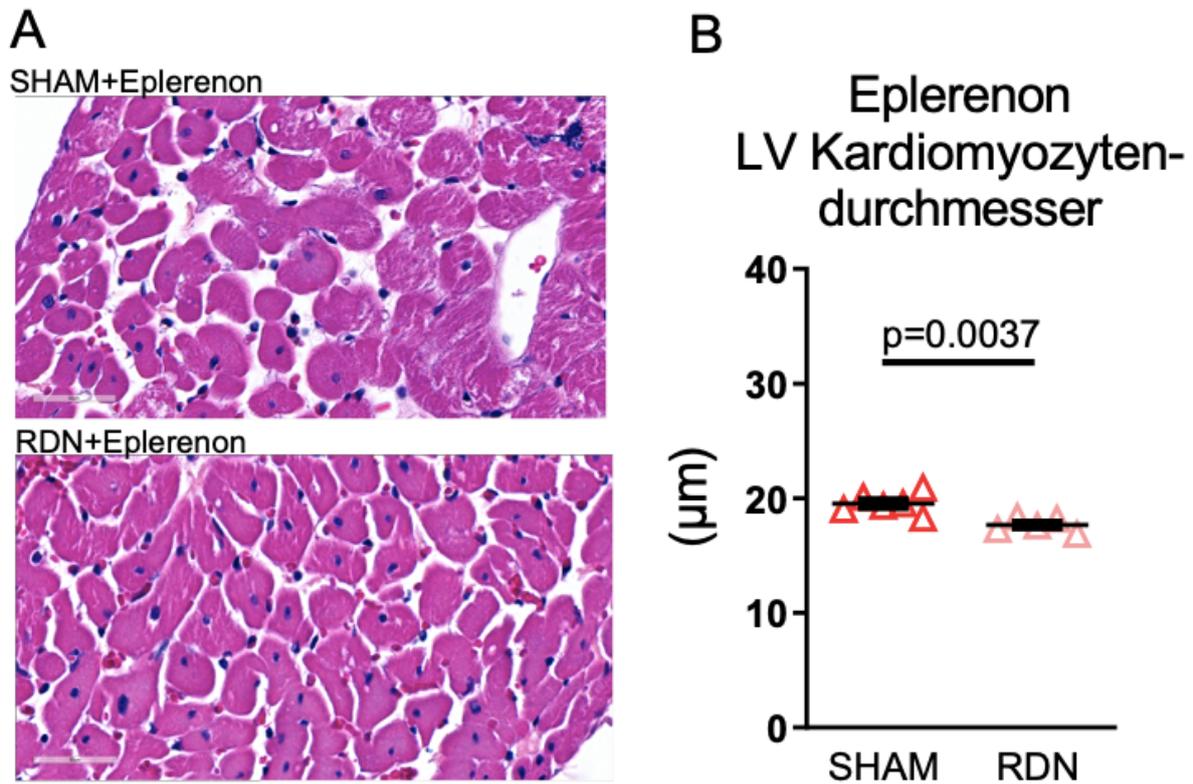


Abbildung 30: Bestimmung des linksventrikulären (LV) Kardiomyozytendurchmessers bei SHAM+Eplerenon und RDN+Eplerenon

A) Repräsentative Bilder Hämatoxylin&Eosin gefärbter linker Ventrikel von SHAM+Eplerenon (n=6) und RDN+Eplerenon (n=5) zur Bestimmung des Kardiomyozytendurchmessers im linken Ventrikel.

B) Quantifizierung des linksventrikulären Kardiomyozytendurchmessers.

Zur statistischen Auswertung wurde ein ungepaarter Student's t-Test verwendet. Die Werte sind als Mittelwert±Standardfehler des Mittelwerts dargestellt.

LV Kardiomyozyten- Hypertrophie

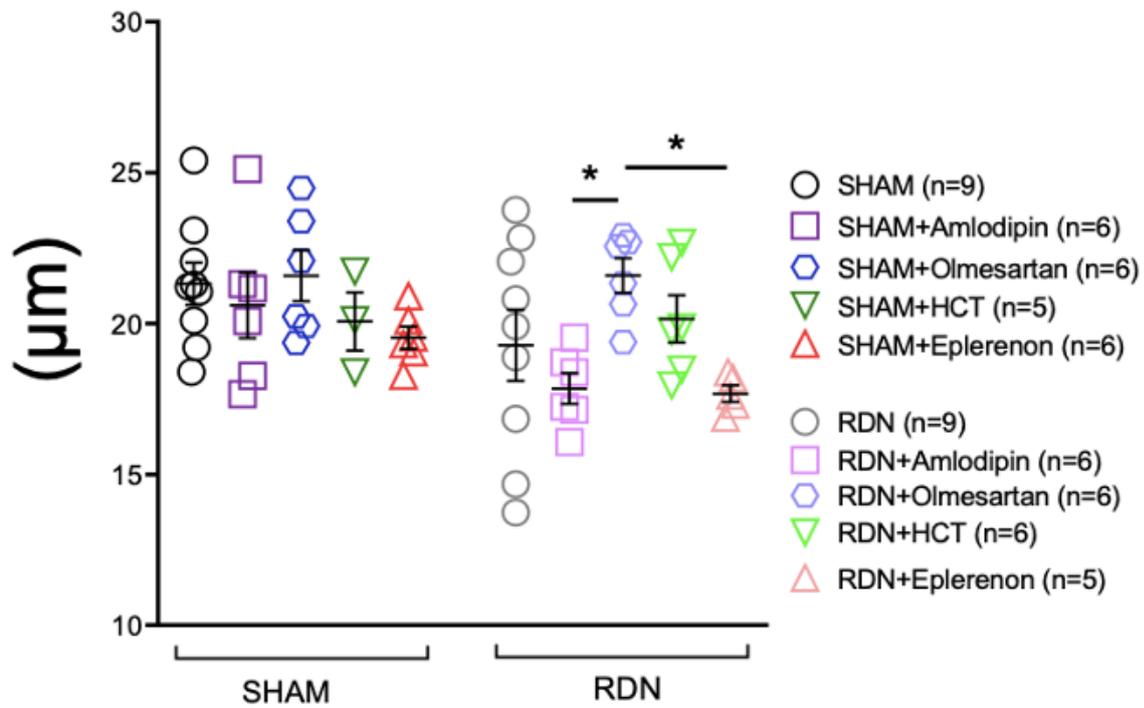


Abbildung 31: Intragruppenvergleich der linksventrikulären (LV) Kardiomyozytenhypertrophie bei SHR nach SHAM und RDN mit/ohne medikamentöse Behandlung

Die Werte sind als Mittelwert±Standardfehler des Mittelwerts dargestellt.

* $p < 0.05$

5 Diskussion

Die katheterbasierte RDN stellt eine zusätzliche, katheterbasierte antihypertensive Behandlungsoption bei unkontrollierter Hypertonie dar.²⁰ Bei den meisten Patienten ist jedoch nach RDN eine zusätzliche Behandlung mit Antihypertensiva erforderlich, um eine Blutdruckkontrolle zu erreichen.²⁰ Es ist nicht bekannt, ob eine Wirkstoffklasse bevorzugt werden sollte, um die blutdrucksenkende Wirkung nach RDN zu maximieren. In der vorliegenden Studie wurden daher vier Erstlinien-blutdrucksenkende Arzneimittelklassen untersucht. Dazu gehören Kalziumantagonisten (Amlodipin), AT₁-Rezeptorantagonisten (Olmesartan), Thiaziddiuretika (HCT) und Mineralokortikoidrezeptorantagonisten (Eplerenon). Die vorliegende Studie hatte zum Ziel, die Auswirkungen von diesen Medikamenten auf den Blutdruck und die kardialen strukturellen Umbauprozesse nach RDN in einem hypertensiven Rattenmodell zu untersuchen.

Die wichtigsten Ergebnisse der Studie können wie folgt zusammengefasst werden:

- 1.) RDN führte zu einer signifikanten Senkung des Blutdrucks, der Plasma-Renin-Aktivität und der Aldosteronkonzentration im Modell der SHR.
- 2.) Die Behandlung mit Amlodipin und Olmesartan führte zu einer zusätzlichen, additiven Senkung des Blutdrucks, wobei RDN+Olmesartan die wirksamste Kombination im Modell der SHR war.

Das SHR-Modell wurde gewählt, da es gut bewährt ist und auf RDN mit einer signifikanten Senkung des Blutdrucks reagiert.⁴¹⁻⁴³ Sobald sich bei SHR eine Hypertonie etabliert hat, erfolgt ein kardialer Umbau, der sich mit zunehmendem Alter weiterentwickelt und eine Aktivierung des RAAS, eine Kardiomyozytenhypertrophie und die Bildung einer myokardialen Fibrose umfasst.^{37,38,44,45,46}

In Anlehnung an die klinische Frage, welches Medikament vorzugsweise nach einer RDN bei arterieller Hypertonie eingesetzt werden sollte, wurden erwachsene SHR im Alter von 26 Wochen einer RDN unterzogen. Zehn Tage danach wurde eine antihypertensive medikamentöse Behandlung eingeleitet, entweder mit Amlodipin, Olmesartan, HCT oder Eplerenon. Die Modulation der renalen sympathischen Aktivität mittels RDN war in der Kontrollgruppe, das heißt in Abwesenheit von antihypertensiven Substanzen, neben einer signifikanten Reduktion des Blutdrucks auch mit einer Abnahme der Plasma-Renin-Aktivität und der Aldosteron-Konzentration verbunden. Diese Beobachtungen stimmen mit früheren

präklinischen Studien und aktuellen klinischen Daten überein, die auf reduzierte Plasma-Renin-Aktivität, Aldosteron-Spiegel und Blutdruck nach RDN bei Patienten ohne antihypertensive medikamentöse Behandlung hindeuten.^{41,42,47,48}

Es ist gut bekannt, dass die gängigen antihypertensiven Substanzen, mit wenigen Ausnahmen, einen Einfluss auf die Plasma-Renin-Aktivität und Aldosteronkonzentration haben. Auch in unserer Studie war die Wirkung von RDN auf die RAAS-Aktivität durch die Behandlung mit blutdrucksenkenden Arzneimitteln beeinflusst, was die Herausforderungen der Verwendung dieser Parameter zur potenziellen Direktion von klinischen Behandlungsentscheidungen hervorhebt. Die Senkung des Blutdrucks hat signifikante Auswirkungen auf das RAAS sowie auf die Expression von Genen, die die kardiale Hypertrophie und die Bildung von Fibrose im Herzen beeinflussen. Die Konzentration an zirkulierendem Angiotensin II und Aldosteron, sowohl im Blut als auch im Gewebe, führen zu einem profibrotischen, entzündlichen und hypertrophen Umbau in den kardiovaskulären und renalen Geweben.⁴⁴ Eine Blutdrucksenkung verringert die Aktivität des RAAS, indem sie die Freisetzung von Renin und die Umwandlung von Angiotensin I in Angiotensin II reduziert. Dies führt zu einer Abnahme der Vasokonstriktion und verringerten Ausschüttung von Aldosteron.¹⁸

Frühere Studien zeigten, dass eine langfristige Blockade des AT₁-Rezeptors mit Olmesartan bei SHR den Blutdruck senkt und die interstitielle und perivaskuläre Fibrose im linken Ventrikel reduziert.^{49,50} In dieser Studie war die Behandlung mit Olmesartan am wirksamsten bei der Senkung des Blutdrucks, der Plasma-Renin-Aktivität und des interstitiellen linksventrikulären Kollagengehalts sowie der perivaskulären Fibrose. RDN in Kombination mit Olmesartan war bei der Senkung des Blutdrucks im Vergleich zu allen anderen Gruppen überlegen und vermittelte additive Wirkungen auf die Reduktion der Plasma-Renin-Aktivität und eine weitere Verringerung der perivaskulären Fibrosebildung. Dies stützt die Hypothese, dass AT₁-Rezeptorantagonisten ein wirksames kardioprotektives Medikament sind.^{49,51}

Das Thiaziddiuretikum HCT induziert Natriurese, verringert das Plasmavolumen und senkt den Blutdruck bei SHR.^{52,53} Die Verabreichung eines Diuretikums aktiviert das RAAS, wodurch der Blutdruck abhängiger von der Reninkonzentration wird und folglich besser auf seine Blockade anspricht.⁵² Durch HCT-induzierte Diurese verringert sich das Plasmavolumen, was sekundär die Renin- und Aldosteron-Sekretion erhöht; beides Hauptregulatoren des Blutdrucks.⁵³ In dieser Studie hatte HCT eine moderate Wirkung auf den Blutdruck, die auch in Kombination mit RDN nicht signifikant verstärkt wurde. Bei SHR, die mit HCT behandelt wurden, war die Nepriylsin-Aktivität verringert, was mit einer Verringerung des Plasma-BNP und erhöhten NT-proBNP-Spiegeln einherging. Parallel dazu beobachteten wir auch eine Reduktion der

perivaskulären Fibrose nach HCT, ein Effekt, der durch RDN verstärkt wurde und die perivaskuläre und ventrikuläre interstitielle Fibrose abschwächte.

Bei SHR reduzierte die Langzeitbehandlung mit dem Kalziumkanalblocker Amlodipin über einen Zeitraum von sechs Monaten dosisabhängig den systolischen Blutdruck, die Herzfibrose und die linksventrikuläre Hypertrophie.⁵⁴ Dabei führte die vierwöchige Verabreichung von Amlodipin zu einer effektiven Senkung des Blutdrucks und zu einer signifikanten Senkung der Plasma-Aldosteronspiegel und der renalen Nepriylsin-Aktivität, ohne jedoch die zirkulierenden natriuretischen Peptide zu erhöhen. Interessanterweise wurden trotz der verstärkten Blutdrucksenkung durch die Kombinationstherapie die vorteilhaften Effekte der RDN auf perivaskuläre Fibrose und zirkulierendes Aldosteron reduziert.⁵⁴ In unserer Studie scheint Amlodipin den Aldosteron-Spiegel sowohl bei den SHAM-Gruppen als auch bei den RDN-Gruppen gesenkt zu haben, so dass ein zusätzlicher Effekt durch RDN hier nicht mehr zu detektieren war.

In einer Studie, in der SHR mit normaler Kochsalzdiät gefüttert wurden, zeigte eine fünfwöchige Kurzzeitbehandlung mit Eplerenon keine Auswirkungen auf den Blutdruck oder die linksventrikuläre Myokardfibrose.⁵⁵ Allerdings zeigte sich in unserer Studie, dass Eplerenon allein oder in Kombination mit RDN keinen signifikanten Einfluss auf den Blutdruck hatte. Jedoch wurde die durch RDN vermittelte Abnahme des Plasma-Aldosterons bei SHR, die keine antihypertensiven Medikamente erhielten, durch die Kombination von RDN und Eplerenon abgeschwächt. Trotz der fehlenden Blutdrucksenkung wurde eine bedeutende Reduktion der perivaskulären Fibrose durch die Behandlung mit Eplerenon festgestellt. Dies legt die Vermutung nahe, dass Eplerenon möglicherweise zusätzliche protektive Wirkungen auf das Herz-Kreislauf-System entfaltet, die unabhängig von der Blutdrucksenkung sind. In diesem Zusammenhang könnte die Verringerung der perivaskulären Fibrose als Indikator für kardiovaskuläre Schutzwirkungen des Aldosteronrezeptor-Antagonismus interpretiert werden, auch wenn diese nicht mit einer Abnahme des Blutdrucks einherging. Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass Eplerenon, trotz fehlender unmittelbarer Blutdrucksenkung, positive Effekte auf das kardiovaskuläre System hat, insbesondere durch die Reduzierung der perivaskulären Fibrose.

Frühere Studien an einem Tiermodell für Myokardinfarkt mit Ischämie-Reperfusion zeigten, dass RDN die renale Nepriylsin-Aktivität signifikant hemmt und somit das Fortschreiten der Herzinsuffizienz verhindern kann.^{56,57} Die positive Wirkung von RDN war mit der Hemmung der enzymatischen Aktivität von renalem Nepriylsin verbunden, wodurch ein verstärkter Abbau von kardioprotektiven zirkulierenden natriuretischen Peptiden verhindert wurde.^{56,57} In der Studie

von Polhemus et al. (2017) wurden die Auswirkungen einer RDN bei SHR und Wistar-Kyoto Ratten auf die Pathophysiologie der Herzinsuffizienz und die Wechselwirkung zwischen den renalen sympathischen Nerven und dem Stoffwechsel von natriuretischem Peptid untersucht. Dabei kam es zu der Schlussfolgerung, dass RDN zu einer Abschwächung der renalen Neprilysin-Aktivität führt, mit einer gleichzeitigen Erhöhung der zirkulierenden natriuretischen Peptide. Dieser Effekt ging mit einer Reduzierung der Myokardfibrose und einer Verbesserung der linksventrikulären Funktion im Rahmen der Herzinsuffizienz einher.⁵⁶ Interessanterweise hatte RDN in dieser Studie keine Auswirkungen auf die zirkulierenden Spiegel von ANP und BNP oder auf die Neprilysin-Aktivität im Nierengewebe.

Eine Post-hoc-Analyse der SPYRAL HTN-OFF MED-PIVOTAL-Studie untersuchte die Plasma-Renin-Aktivität sowie die Plasma-Aldosteron-Konzentrationen bei 226 Patienten, die sich einer hochfrequenten RDN (n=115) oder einem Scheinverfahren (n=111) unterzogen.⁵⁸ Alle Patienten waren zu Beginn der Studie und bei der dreimonatigen Nachuntersuchung frei von Medikamenten, was durch toxikologische Analysen bestätigt wurde. Nach drei Monaten waren die Plasma-Renin-Aktivität und die Aldosteron-Konzentrationen in der RDN-Gruppe signifikant niedriger als in der Scheingruppe. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass ein höherer Ausgangswert der Plasma-Renin-Aktivität mit einer stärkeren Senkung des Blutdrucks nach der RDN verbunden war.⁵⁶ Diese Ergebnisse bestätigen die Interaktion zwischen der Aktivität des Nierensympathikus und dem RAAS. Eine anhaltende Aktivierung des sympathischen Nervensystems trägt zur myokardialen Schädigung, kardialer Fibrose und linksventrikulärer Dysfunktion bei Herzinsuffizienz bei.⁵⁶

Das Ausmaß der Blutdrucksenkung bei unbehandelten SHR ähnelt der beobachteten Blutdruckreduktion bei Patienten mit unkontrolliertem Bluthochdruck, die keine blutdrucksenkenden Medikamente einnehmen.⁸ Studien, wie die Spyral HTN-ON MED-Studie und die RADIANCE-HTN-Solo-Studie belegten die anhaltende blutdrucksenkende Wirkung von RDN unabhängig von der gleichzeitigen Einnahme von blutdrucksenkenden Medikamenten über einen Zeitraum von bis zu 36 Monaten.^{25,59}

In Bezug auf Patienten mit unkontrollierter Hypertonie war RDN mit einer signifikanten Senkung des Blutdrucks verbunden.⁶⁰ Insbesondere bei Personen mit resistenter Hypertonie erwies sich die Kombination aus RDN und einer standardisierten antihypertensiven Therapie als effektiver in der Blutdrucksenkung im Vergleich zur alleinigen Anwendung der gleichen standardisierten antihypertensiven Therapie.⁸

Limitationen

Die in dieser Studie gewählten Arzneimitteldosierungen basierten auf früheren Studien zu SHR und die Arzneimittelabsorption wurde durch toxikologische Analysen verifiziert. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Dosierungen zu niedrig waren, um ihre volle blutdrucksenkende Wirkung zu entfalten. Darüber hinaus war eine vierwöchige Behandlung mit blutdrucksenkenden Medikamenten möglicherweise zu kurz, um ihre Wirkung auf strukturelle Veränderungen des Herzens zu beurteilen. Wir untersuchten nicht die Auswirkungen der Kombinationstherapien, die in den aktuellen Leitlinien für die Erstbehandlung der meisten Patienten empfohlen werden.⁹ Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit früheren experimentellen Studien an hypertensiven Ratten kann aufgrund von Unterschieden im Alter der Tiere, der angewendeten Medikamentendosierung, der Behandlungsdauer und der Methode der hämodynamischen Überwachung eingeschränkt sein. Zu beachten ist, dass der Blutdruck in dieser Studie, im Vergleich zu früheren Studien, nicht durch Schwanzmanschettenmessungen, sondern durch invasive Messung erfolgte.^{38,43,50} In der aktuellen Studie wurden weibliche Ratten nicht untersucht, da die Hypertension bei diesen Ratten weniger ausgeprägt ist.⁶¹

Schlussfolgerungen

Die RDN führte zu deutlichen Senkungen des Blutdrucks sowie zu signifikanten Reduktionen der Plasma-Renin-Aktivität und der Aldosteron-Konzentration. Die Behandlung mit Amlodipin und Olmesartan nach RDN resultierte in einer zusätzlichen Senkung des Blutdrucks, wobei RDN in Kombination mit Olmesartan die wirksamste Kombination war. Diese Ergebnisse sollten das Vorgehen zukünftiger klinischer Studien beeinflussen, in denen eine zielgerichtete Kombinationstherapie bestehend aus RDN mit blutdrucksenkender Behandlung untersucht wird.

Literaturverzeichnis

1. Lauder L, Azizi M, Kirtane AJ, Böhm M, Mahfoud F. Device-based therapies for arterial hypertension. *Nat Rev Cardiol.* 2020;17(10):614-628. doi:10.1038/s41569-020-0364-1.
2. GBD 2015 Risk Factors Collaborators. Global, Regional, and National Comparative Risk Assessment of 79 Behavioural, Environmental and Occupational, and Metabolic Risks or Clusters of Risks, 1990-2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet.* 2016;388(10053):1659-1724. doi: 10.1016/S0140-6736(16)31679-8.
3. Ettehad D, Emdin CA, Kiran A, et al. Blood pressure lowering for prevention of cardiovascular disease and death: A systematic review and meta-analysis. *The Lancet.* 2016;387(10022):957-967. doi:10.1016/S0140-6736(15)01225-8.
4. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, et al. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. 2003;42(6):1206-52. The JNC 7 Report. doi:10.1161/01.HYP.0000107251.49515.c2.
5. Jordan J, Kurschat C, Reuter H. Arterial hypertension-diagnosis and treatment. *Dtsch Arztebl Int.* 2018;115(33-34):557-558. doi:10.3238/arztebl.2018.0557.
6. Böhm M, Kario K, Kandzari DE, et al. 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.* 2020;395(10234):1444-1451. doi:10.1016/S0140-6736(20)30554-7.
7. Townsend RR, Mahfoud F, Kandzari DE, et al. 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.* 2017;390(10108):2160-2170. doi:10.1016/S0140-6736(17)32281-X.
8. Azizi M et al. Endovascular ultrasound renal denervation to treat hypertension (RADIANCE-HTN SOLO): a multicentre, international, single-blind, randomised, sham-controlled trial. *The Lancet.* 2018;391(10137):2335-2345. doi: 10.1016/S0140-6736(18)31082-1.
9. Williams B, Mancia G, Spiering W, et al. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. *Eur Heart J.* 2018;39(33):3021-3104. doi:10.1093/eurheartj/ehy339.
10. Herold G. *Innere Medizin.* Gerd Herold Verlag; 2021.
11. Ames MK, Atkins CE, Pitt B. The renin-angiotensin-aldosterone system and its suppression. *J Vet Intern Med.* 2019;33(2):363-382. doi:10.1111/jvim.15454.

12. Böhm M, Schumacher H, Teo KK, et al. Achieved blood pressure and cardiovascular outcomes in high-risk patients: results from ONTARGET and TRANSCEND trials. *The Lancet*. 2017;389(10085):2226-2237. doi:10.1016/S0140-6736(17)30754-7.
13. Whelton PK, Carey RM, Aronow WS, et al. 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA guideline for the prevention, detection, evaluation, and management of high blood pressure in adults: Executive summary: A report of the American college of cardiology/American Heart Association task force on clinical practice guidelines. *Hypertension*. 2018;71(6):1269-1324. doi:10.1161/HYP.0000000000000066.
14. Dickinson HO, Mason JM, Nicolson DJ, et al. Lifestyle Interventions to Reduce Raised Blood Pressure: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. *J Hypertens*. 2006;24(2):215-33 doi: 10.1097/01.hjh.0000199800.72563.26.
15. Borjesson M, Onerup A, Lundqvist S, Dahlof B. Physical activity and exercise lower blood pressure in individuals with hypertension: Narrative review of 27 RCTs. *Br J Sports Med*. 2016;50(6):356-361. doi:10.1136/bjsports-2015-095786.
16. Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, et al. The task force for the management of arterial hypertension of the european society of hypertension (esh) and of the european society of cardiology (esc). *J Hypertens*. 2013;31(7):1281-1357. doi:10.1097/01.hjh.0000431740.32696.cc.
17. Jones NR, McCormack T, Constanti M, McManus RJ, Hypertension in Adults: Diagnosis and Management of hypertension in adults NICE Guideline. *Br J Gen Pract*. 2020;30;70(691):90-91. doi: 10.3399/bjgp20X708053.
18. Lüllmann et al. *Pharmakologie und Toxikologie*. Thieme; 2002.
19. De La Sierra A, Segura J, Banegas JR, et al. Clinical features of 8295 patients with resistant hypertension classified on the basis of ambulatory blood pressure monitoring. *Hypertension*. 2011;57(5):898-902. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.168948.
20. Barbato E, Azizi M, Schmieder RE, et al. Renal denervation in the management of hypertension in adults. A clinical consensus statement of the ESC Council on Hypertension and the European Association of Percutaneous Cardiovascular Interventions (EAPCI). *EuroIntervention*. 2023;18(15):1227-1243. doi:10.4244/EIJ-D-22-00723.
21. Bhatt DL, Kandzari DE, O'Neill WW, et al. A Controlled Trial of Renal Denervation for Resistant Hypertension. *New England Journal of Medicine*. 2014;370(15):1393-1401. doi:10.1056/nejmoa1402670.
22. Kandzari DE, Böhm M, Mahfoud F, et al. Effect of renal denervation on blood pressure in the presence of antihypertensive drugs: 6-month efficacy and safety results from the

- SPYRAL HTN-ON MED proof-of-concept randomised trial. *The Lancet*. 2018;391(10137):2346-2355. doi:10.1016/S0140-6736(18)30951-6.
23. Kandzari DE, Townsend RR, Kario K, et al. Safety and Efficacy of Renal Denervation in Patients Taking Antihypertensive Medications. *J Am Coll Cardiol*. 2023;82(19):1809-1823. doi:10.1016/j.jacc.2023.08.045.
 24. Azizi M, Sanghvi K, Saxena M, et al. Ultrasound renal denervation for hypertension resistant to a triple medication pill (RADIANCE-HTN TRIO): a randomised, multicentre, single-blind, sham-controlled trial. *The Lancet*. 2021;397(10293):2476-2486. doi:10.1016/S0140-6736(21)00788-1.
 25. Mahfoud F, Kandzari DE, Kario K, et al. Long-term efficacy and safety of renal denervation in the presence of antihypertensive drugs (SPYRAL HTN-ON MED): a randomised, sham-controlled trial. *The Lancet*. 2022;399(10333):1401-1410. doi:10.1016/S0140-6736(22)00455-X.
 26. Böhm M, Townsend RR, Kario K, et al. Rationale and design of two randomized sham-controlled trials of catheter-based renal denervation in subjects with uncontrolled hypertension in the absence (SPYRAL HTN-OFF MED Pivotal) and presence (SPYRAL HTN-ON MED Expansion) of antihypertensive medications: a novel approach using Bayesian design. *Clinical Research in Cardiology*. 2020;109(3):289-302. doi:10.1007/s00392-020-01595-z.
 27. Al Ghorani H, Kulenthiran S, Recktenwald MJM, et al. 10-Year Outcomes of Catheter-Based Renal Denervation in Patients With Resistant Hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2023;81(5):517-519. doi: 10.1016/j.jacc.2022.11.038.
 28. Sesa-Ashton G, Nolde JM, Muenta I, et al. Catheter-Based Renal Denervation: 9-Year Follow-Up Data on Safety and Blood Pressure Reduction in Patients with Resistant Hypertension. *Hypertension*. 2023;80(4):811-819. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.122.20853.
 29. Li X, Garcia-Elias A, Benito B, Nattel S. The effects of cardiac stretch on atrial fibroblasts: analysis of the evidence and potential role in atrial fibrillation. *Oxford Academic*. 2022;118(2):440-460. doi:10.1093/cvr/cvab035.
 30. Nattel S, Burstein B, Dobrev D. Atrial remodeling and atrial fibrillation: mechanisms and implications. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2008;1(1):62-73. doi:10.1161/CIRCEP.107.754564.
 31. Schotten U, Verheule S, Kirchhof P, Goette A. Pathophysiological mechanisms of atrial fibrillation: a translational appraisal. 2011;91(1):265-325. doi: 10.1152/physrev.00031.2009.
 32. Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, et al. 2017 ACC/AHA/HFSA Focused Update of the 2013 ACCF/AHA Guideline for the Management of Heart Failure: A Report of the

- American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines and the Heart Failure Society of America. *Circulation*. 2017;136(6):e137-e161. doi:10.1161/CIR.0000000000000509.
33. González A, Schelbert EB, Díez J, Butler J. Myocardial Interstitial Fibrosis in Heart Failure: Biological and Translational Perspectives. *J Am Coll Cardiol*. 2018;71(15):1696-1706. doi:10.1016/j.jacc.2018.02.021.
 34. Kong P, Christia P, Frangogiannis NG. The pathogenesis of cardiac fibrosis. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2014;71(4):549-574. doi:10.1007/s00018-013-1349-6.
 35. Ihn H. Pathogenesis of fibrosis: role of TGF-beta and CTGF. *Curr Opin Rheumatol*. 2002;14(6):681-5. doi: 10.1097/00002281-200211000-00009.
 36. Weber KT. Cardiac Interstitium in Health and Disease: The Fibrillar Collagen Network. *J Am Coll Cardiol*. 1989;13(7):1637-52. doi: 10.1016/0735-1097(89)90360-4.
 37. Slama M, Ahn J, Varagic J, Susic D, Frohlich ED. Long-term left ventricular echocardiographic follow-up of SHR and WKY rats: effects of hypertension and age. *J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;286:181-185. doi:10.1152/ajpheart.00642.2003.
 38. Pfeffer JM, Pfeffer MA, Fishbein FC, Frohlich ED. Cardiac function and morphology with aging in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol*. 1979;237(4):H461-8. doi: 10.1152/ajpheart.1979.237.4.H461.
 39. Hultström M. Development of structural kidney damage in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 2012;30(6):1087-1091. doi:10.1097/HJH.0b013e328352b89a.
 40. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-5. doi: 10.1038/227680a0.
 41. Wang M, Han W, Zhang M, et al. Long-Term Renal Sympathetic Denervation Ameliorates Renal Fibrosis and Delays the Onset of Hypertension in Spontaneously Hypertensive Rats. *Am J Transl Res*. 2018;10(12):4042-4053.
 42. Machino T, Nobuyuki M, Akira S, DongZhu X, Tomoya H, Taizo K. Anti-Hypertensive Effect of Radiofrequency Renal Denervation in Spontaneously Hypertensive Rats. *Life Sci*. 2014;110(2):86-92. doi: 10.1016/j.lfs.2014.06.015.
 43. Fink GD, Phelps JT. Can we predict the blood pressure response to renal denervation? *Auton Neurosci*. 2017;204:112-118. doi:10.1016/j.autneu.2016.07.011.
 44. Dang A, Zheng D, Wang B, et al. The Role of the Renin-Angiotensin and Cardiac Sympathetic Nervous Systems in the Development of Hypertension and Left Ventricular Hypertrophy in Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertens Res*. 1999;22(3):217-21. doi: 10.1291/hypres.22.217.
 45. Ito N, Ohishi M, Yamamoto K, et al. Renin-Angiotensin Inhibition Reverses Advanced Cardiac Remodeling in Aging Spontaneously Hypertensive Rats. *Am J Hypertens*. 2007;20(7):792-799. doi:10.1016/j.amjhyper.2007.02.004.

46. Engelmann GL, Vitullo JC, Gerrity RG. Morphometric Analysis of Cardiac Hypertrophy During Development, Maturation, and Senescence in Spontaneously Hypertensive Rats. *Circ Res.* 1987;60(4):487-94. doi: 10.1161/01.res.60.4.487.
47. Lauder L, Moon LB, Pipenhagen CA, et al. A drug-induced hypotensive challenge to verify catheter-based radiofrequency renal denervation in an obese hypertensive swine model. *Clinical Research in Cardiology.* 2022;111(6):595-603. doi: 10.1007/s00392-020-01764-0.
48. Hohl M, Linz D, Fries P, et al. Modulation of the sympathetic nervous system by renal denervation prevents reduction of aortic distensibility in atherosclerosis prone ApoE-deficient rats. *J Transl Med.* 2016;14(1). doi:10.1186/s12967-016-0914-9.
49. Fernandes-Santos C, de Souza Mendonca L, Mandarim-de-Lacerda. Favorable cardiac and aortic remodeling in olmesartan-treated spontaneously hypertensive rats. *Heart Vessels.* SpringerLink. 2009;24(3):219-27. doi: 10.1007/s00380-008-1104-3.
50. Estado V, Obadia N, Carvalho-Tavares J, et al. Blockade of the renin-angiotensin system improves cerebral microcirculatory perfusion in diabetic hypertensive rats. *Microvasc Res.* 2013;87:41-49. doi:10.1016/j.mvr.2013.02.007.
51. Asai T, Kushiro T, Fujita H, Kanmatsuse K. Different effects on inhibition of cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats by monotherapy and combination therapy of adrenergic receptor antagonists and/or the angiotensin II type 1 receptor blocker under comparable blood pressure reduction. *Hypertens Res.* 2005;28(1):79-87. doi: 10.1291/hypres.28.79.
52. Webb RL, Navarrete AE, Davis S. Effects of Valsartan and Hydrochlorothiazide Alone and in Combination on Blood Pressure and Heart Rate in Conscious-Telemetered Spontaneously Hypertensive Rats (SHR). *Am J Hypertens.* 1998;11(1 Pt 1):59-65. doi: 10.1016/s0895-7061(97)00309-9.
53. Mougnot N, Médiani O, Lechat P. Bisoprolol and hydrochlorothiazide effects on cardiovascular remodeling in spontaneously hypertensive rats. *Pharmacol Res.* 2005;51(4):359-65. doi: 10.1016/j.phrs.2004.10.010.
54. Sevilla MA, Voces F, Carrón R, et al. Amlodipine decreases fibrosis and cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats: persistent effects after withdrawal. *Life Sci.* 2004;75(7):881-91. doi: 10.1016/j.lfs.2004.04.004.
55. Endemann DH, Touyz RM, Iglarz M, Savoia C, Schiffrin EL. Eplerenone prevents salt-induced vascular remodelling and cardiac fibrosis in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 2004;43(6):1252-1257. doi:10.1161/01.HYP.0000128031.31572.a3.

56. Polhemus DJ, Trivedi RK, Gao J, et al. Renal Sympathetic Denervation Protects the Failing Heart Via Inhibition of Neprilysin Activity in the Kidney. *J Am Coll Cardiol.* 2017;70(17):2139-2153. doi: 10.1016/j.jacc.2017.08.056.
57. Sharp TE, Polhemus DJ, Li Z, et al. Renal Denervation Prevents Heart Failure Progression Via Inhibition of the Renin-Angiotensin System. *J Am Coll Cardiol.* 2018;72(21):2609-2621. doi:10.1016/j.jacc.2018.08.2186.
58. Mahfoud F, Townsend RR, Kandzari DE, et al. Changes in Plasma Renin Activity After Renal Artery Sympathetic Denervation. *J Am Coll Cardiol.* 2021;77(23):2909-2919. doi:10.1016/j.jacc.2021.04.044.
59. Rader F, Kirtane AJ, Wang Y, et al. Durability of blood pressure reduction after ultrasound renal denervation: three-year follow-up of the treatment arm of the randomised RADIANCE-HTN SOLO trial. *EuroIntervention.* 2022;18(8):E677-E685. doi:10.4244/EIJ-D-22-00305.
60. Azizi M, Schmieder RE, Mahfoud F, et al. Six-Month Results of Treatment-Blinded Medication Titration for Hypertension Control After Randomization to Endovascular Ultrasound Renal Denervation or a Sham Procedure in the RADIANCE-HTN SOLO Trial. *Circulation.* 2019;139(22):2542-2553. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.119.040451.
61. Reckelhoff JF, Zhang H, Granger JP. Testosterone Exacerbates Hypertension and Reduces Pressure-Natriuresis in Male Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertension.* 1998;31(1):435-439. doi:10.1161/01.HYP.31.1.435.

Publikationen

- Hohl M, Lauder L, **Sevimli Ö**, Tokcan M, Wagmann L, Götzinger F, Schneider C, Hübner U, Lehnert U, Meyer MR, Böhm M, Mahfoud F. Efficacy of Antihypertensive Drugs of Different Classes After Renal Denervation in Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertension*. 2023 Jun;80(6):e90-e100. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.122.20756. Epub 2023 Mar 31. PMID: 36999443.

Poster

- Hohl M, Lauder L, **Sevimli Ö**, Tokcan M, Wagmann L, Götzinger F, Schneider C, Selejan S, Hübner U, Lehnert U, Wolf M, Meyer MR, Böhm M, Mahfoud F. Efficacy of different antihypertensive drug classes after renal denervation in the spontaneously hypertensive rat model. 88. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie. Mannheim 2022.

Danksagung

In erster Linie möchte ich meine aufrichtige Dankbarkeit gegenüber meinem Doktorvater Prof. Dr. Felix Mahfoud zum Ausdruck bringen, der diese Arbeit begleitet hat und meine Faszination für das Fachgebiet der Kardiologie und die wissenschaftliche Forschung vertieft hat.

Ein großes Dankeschön kommt meinem Betreuer Dr. Mathias Hohl zu, der mich durchgehend mit großem Engagement unterstützt hat. Seine zugängliche Art und die lockere Atmosphäre im Labor haben zu einem angenehmen und fröhlichen Arbeitsumfeld beigetragen. Ich schätze seine erstklassige Betreuung sehr.

Besonders möchte ich mich bei der großartigen Arbeitsgruppe im Labor, unter anderem bestehend aus Jeannette Zimolong und Nina Rebmann, bedanken. Ihre Hilfsbereitschaft, Ratschläge und die positive Atmosphäre im Labor haben meinen Forschungsprozess immens bereichert.

An dieser Stelle möchte ich meiner lieben Familie, meinen Eltern Zöhre und Süleyman sowie meinem Bruder Ugur, herzlich danken. Ihre bedingungslose Unterstützung und stete Präsenz sind für mich von unschätzbarem Wert. Insbesondere gedenke ich meinem verstorbenen Vater Süleyman, dessen ermutigende Worte, Liebe und Hingabe an Bildung mich maßgeblich geprägt haben. Diese Arbeit widme ich seinem Andenken.

Lebenslauf

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