

Aus der Klinik für Innere Medizin III
- Kardiologie, Angiologie und internistische Intensivmedizin -
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Michael Böhm

Einfluss einer SGLT2-Inhibition auf das Remodeling und die sympathische Innervation im linken Atrium in einem Maus-Modell mit chronischer Nierenerkrankung

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2023

vorgelegt von:
Vanessa Pfau
geb. am: 24.11.1999 in Schwetzingen

Tag der Promotion: 31.01.2024

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. Michael D. Menger

1. Berichterstatter: Universitätsprofessor Dr. med. Michael Böhm

2. Berichterstatter: Universitätsprofessor Dr. med. Danilo Fliser

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Zusammenfassung.....	1
1.1 Deutsche Zusammenfassung.....	1
1.2 Abstract	3
2 Einleitung.....	5
2.1 Chronische Nierenerkrankung (CKD).....	5
2.1.1 Definition.....	5
2.1.2 Stadieneinteilung	5
2.1.3 Epidemiologie	6
2.1.4 Ätiologie.....	6
2.1.5 Klinik und Komplikationen	7
2.1.6 Therapie	8
2.2 Korrelation zwischen der chronischen Nierenerkrankung und dem Entstehen einer urämischen Kardiomyopathie.....	9
2.2.1 Aktivierung des sympathischen Nervensystems	10
2.2.2 Inflammation	11
2.2.3 Kardiale Hypertrophie.....	11
2.2.4 Kardiale Fibrose	12
2.2.5 Zusammenhang zwischen der chronischen Nierenerkrankung und dem Entstehen von Vorhofflimmern	13
2.3 Inhibition des SGLT2 als Therapie der chronischen Nierenerkrankung und der kardiovaskulären Erkrankungen.....	15
2.3.1 Das Tubulussystem der Niere	15
2.3.2 SGLT2-Inhibitoren	15
2.4 Ziele der Arbeit	18
3 Materialien und Methoden.....	19

3.1	Materialien	19
3.1.1	Geräte.....	19
3.1.2	Software	19
3.1.3	Substanzen für die Immunhistochemie	20
3.1.4	Chemikalien	20
3.1.5	Sonstige Materialien	21
3.2	Methoden.....	22
3.2.1	Induktion einer chronischen Nierenerkrankung	22
3.2.2	Tiermodell.....	22
3.2.3	Histologie.....	25
3.2.3.1	Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung.....	26
3.2.3.2	Pikro-Siriusrot-Färbung.....	29
3.2.3.3	F4/80-Färbung	33
3.2.3.4	“Wheat Germ Agglutinin”-(WGA)-Färbung	37
3.2.3.5	Tyrosinhydroxylase-Färbung	39
3.2.4	Statistik	43
4	Ergebnisse	44
4.1	Linksatriale Hypertrophie.....	44
4.2	Linksatrialer Fibrosegehalt	46
4.2.1	Linksatriale Fibrose	46
4.2.2	Linksatriale interstitielle Fibrose	46
4.3	Linksatriale Inflammation.....	48
4.4	Expansion der linksatrialen interstitiellen extrazellulären Matrix	50
4.5	Linksatriale sympathische Innervation.....	52
5	Diskussion	54
5.1	Linksatriale Hypertrophie.....	54
5.2	Linksatrialer Fibrosegehalt und Expansion der linksatrialen interstitiellen extrazellulären Matrix	56
5.3	Linksatriale Inflammation.....	58
5.4	Linksatriale sympathische Innervation.....	60
5.5	Zusammenschau aller Ergebnisse	61

6	Literaturverzeichnis	64
7	Publikationen	72
8	Poster	72
9	Danksagung	73
10	Lebenslauf	74

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Stadieneinteilung und Prognose der chronischen Nierenerkrankung anhand der glomerulären Filtrationsrate und der Albuminurie nach Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO)	6
Abb. 2: kardiovaskuläre Erkrankungen (CVD) bei chronischer Nierenerkrankung (CKD)	10
Abb. 3: Die Pathophysiologie von Vorhofflimmern bei chronischer Nierenerkrankung (CKD)....	14
Abb. 4: Wirkmechanismen von SGLT2-Inhibitoren (SGLT2i).....	17
Abb. 5: Versuchsablauf	24
Abb. 6: Messung des Kardiomyozyten-Diameters im Hämatoxylin-Eosin-gefärbten linken Atrium mittels Image Scope.....	28
Abb. 7: Linkes Atrium nach Picro-Siriusrot-Färbung	31
Abb. 8: Auswertung am Beispiel der interstitiellen Fibrose nach Picro-Siriusrot-Färbung	32
Abb. 9: Markierung der F4/80-positiven Makrophagen im Rahmen der F4/80-Färbung.....	35
Abb. 10: Bestimmung der Gesamtgewebefläche des Atriumgewebes im Rahmen der Auswertung für die F4/80-Färbung.....	36
Abb. 11: Prinzip der Auswertung der Expansion der interstitiellen extrazellulären Matrix (EZM) im Rahmen der „Wheat Germ Agglutinin“-Färbung	38
Abb. 12: Markierung der Tyrosinhydroxylase-(TH)-positiven Nervenfasern im Rahmen der Tyrosinhydroxylase-Färbung.....	41
Abb. 13: Bestimmung der Gesamtgewebefläche des Atriumgewebes im Rahmen der Auswertung für die Tyrosinhydroxylase-Färbung.....	42
Abb. 14: Linksatriale (LA) Hypertrophie	45
Abb. 15: Linksatrialer (LA) Fibrosegehalt.....	47
Abb. 16: Linksatriale (LA) Inflammation	49
Abb. 17: Expansion der linksatrialen (LA) interstitiellen extrazellulären Matrix (EZM).....	51
Abb. 18: Linksatriale (LA) sympathische Innervation	53
Abb. 19: Zusammenschau der Ergebnisse	63

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte	19
Tabelle 2: Verwendete Softwares	19
Tabelle 3: Verwendete Substanzen für die Immunhistochemie	20
Tabelle 4: Verwendete Chemikalien.....	21
Tabelle 5: Sonstige verwendete Materialien	21

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin-Converting-Enzyme
AD	Adenin-Gruppe
AD+Empa	Behandlungsgruppe
ANOVA	analysis of variance (Varianzanalyse)
APRT	Adenin-Phosphoribosyl-Transferase
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CKD	chronic kidney disease (chronische Nierenerkrankung)
CVD	cardiovascular disease (kardiovaskuläre Erkrankung)
2,8-DHA	2,8-Dihydroxyadenin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
Empa	Empagliflozin
EZM	extrazelluläre Matrix
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
GLUT2	Glukosetransporter 2
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIF	hypoxieinduzierender Faktor
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
IL	Interleukin
IGF	Insulin-like growth factor (insulinartiger Wachstumsfaktor)
KDIGO	Kidney Disease: Improving Global Outcomes
Ko	Kontrollgruppe
l	Liter
LA	linkes Atrium (linker Vorhof)

m	Meter
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
mmol	Millimol
m ²	Quadratmeter
n	Anzahl
NYHA	New York Heart Association
O ₂	Sauerstoff
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PBS-T	Phosphate-Buffered Saline Tween
RA	rechtes Atrium (rechter Vorhof)
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
Ren	Renin
ROS	reaktive oxygen species (reaktive Sauerstoffspezies)
s.	siehe
SA	Streptavidin
SEM	standard error of the mean (Standardfehler)
SGLT	sodium dependent glucose cotransporter (natriumabhängiger Glukosecotransporter)
SGLT2i	SGLT2-Inhibitoren
TGF	Transforming growth factor (transformierender Wachstumsfaktor)
TH	Tyrosinhydroxylase
TNB	Tris-NaCl-blocking buffer
TNF	Tumornekrosefaktor
u.a.	unter anderem
vgl.	vergleiche
VHF	Vorhofflimmern
vs.	versus
WGA	Wheat Germ Agglutinin (Weizenkeimagglutinin)
z.B.	zum Beispiel
Z.n.	Zustand nach
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

1 Zusammenfassung

1.1 Deutsche Zusammenfassung

Die chronische Nierenerkrankung (CKD) stellt eine weltweit hoch prävalente Erkrankung dar und ist mit einem hohen Risiko, kardiovaskuläre Erkrankungen zu entwickeln, assoziiert. Eine hierbei nicht zu vernachlässigende Komplikation ist das Vorhofflimmern (VHF), das wiederum zu einer gesteigerten Mortalität und Morbidität führt. Es entsteht im Rahmen atrialer Umbauprozesse, dem sogenannten Remodeling. Auch die erhöhte sympathische Aktivität bei einer CKD trägt zur Entstehung und Progression von VHF bei. Sodium dependent glucose cotransporter 2- („SGLT2“)-Inhibitoren zeigten in den letzten Jahren kardioprotektive Effekte, die nicht auf das Patient*innenkollektiv mit Diabetes mellitus beschränkt waren. Der Einfluss dieser Medikamentengruppe auf atriale Remodelingprozesse und die erhöhte atriale sympathische Innervation und somit auf die Progression von VHF im Rahmen einer CKD wurde allerdings noch nicht charakterisiert. Ziele dieser Studie waren, die Einflüsse einer CKD auf proarrhythmische Umbauprozesse und die sympathische Innervation im linken Atrium, sowie den Einfluss einer SGLT2-Inhibition mittels Empagliflozin auf das linksatriale Remodeling und die linksatriale sympathische Innervation zu charakterisieren.

Methoden: SV129-Mäusen wurden über einen Zeitraum von 16 Wochen wechselnde Konzentrationen von 0.1 % bzw. 0.2 % Adenin-haltigem Futter verabreicht, um eine CKD zu induzieren. Die Mäuse wurden hierbei in eine Kontrollgruppe unter Normalfutter (Ko), eine Adenin-Gruppe (AD) und in eine Adenin-gefütterte Behandlungsgruppe eingeteilt, die von Beginn an zusätzlich eine Therapie mit Empagliflozin erhielt (AD+Empa). Sowohl die linksatrialen Remodelingprozesse als auch die linksatriale Expression der Tyrosinhydroxylase als Marker für die sympathische Innervation wurden im Anschluss der 16 Wochen über histologische Nachweisverfahren charakterisiert.

Ergebnisse: Das Adenin-Modell mit wechselnden Adenin-Konzentrationen führte im Vergleich zur Kontrolle zu einer signifikanten Reduktion des linksatrialen Kardiomyozyten-Diameters (Ko: $16.60 \pm 0.8 \mu\text{m}$ vs. AD: $13.65 \pm 0.2 \mu\text{m}$, $p=0.037$), während keine Veränderungen sowohl im Gehalt der Fibrose (Ko: $7.58 \pm 0.4 \%$ vs. AD: $6.85 \pm 0.7 \%$, $p=0.61$), bestehend aus epikardialer, endokardialer, perivaskulärer und interstitieller Fibrose, als auch im Gehalt der interstitiellen Fibrose (Ko: $3.61 \pm 0.2 \%$ vs. AD: $4.19 \pm 0.4 \%$, $p=0.49$) nach Adenin-Fütterung im Vergleich zur Kontrolle feststellbar waren. Jedoch konnte in den Tieren mit CKD eine signifikant erhöhte Expression der Ty-

rosinhydroxylase im linken Atrium festgestellt werden (Ko: 1.0 ± 0.1 Tyrosinhydroxylase-positiv gefärbte Nervenfasern pro linksatrialer Gesamtfläche vs. AD: 1.58 ± 0.1 Tyrosinhydroxylase-positiv gefärbte Nervenfasern pro linksatrialer Gesamtfläche, $p=0.047$). Verglichen gegen die unbehandelte Adenin-Gruppe zeigte die Gabe von Empagliflozin bei CKD zwar keine Veränderung der Kardiomyozyten-Größe (AD: $13.65 \pm 0.2 \mu\text{m}$ vs. AD+Empa: $13.97 \pm 0.4 \mu\text{m}$, $p=0.99$), jedoch sanken sowohl die Fibrose (AD: $6.85 \pm 0.7 \%$ vs. AD+Empa: $5.14 \pm 0.3 \%$, $p=0.047$) als auch die interstitielle Fibrose (AD: $4.19 \pm 0.4 \%$ vs. AD+Empa: $2.67 \pm 0.3 \%$, $p=0.013$) im Rahmen der Therapie mit Empagliflozin signifikant ab. Ebenfalls konnte Empagliflozin die erhöhte linksatriale sympathische Innervation numerisch reduzieren (AD: 1.58 ± 0.1 Tyrosinhydroxylase-positiv gefärbte Nervenfasern pro linksatrialer Gesamtfläche vs. AD+Empa: 1.28 ± 0.1 Tyrosinhydroxylase-positiv gefärbte Nervenfasern pro linksatrialer Gesamtfläche, $p=0.39$). Die Adenin-induzierte CKD führte weder zu einem signifikanten Anstieg der Inflammation noch zu einer Zunahme der interstitiellen extrazellulären Matrix (EZM) im linken Atrium. Auch zeigte die Behandlungsgruppe weder anti-inflammatorische Effekte noch Auswirkungen auf die interstitielle EZM.

Fazit: In SV129-Mäusen führte eine Adenin-induzierte CKD zu einer signifikant erhöhten Expression der Tyrosinhydroxylase im linken Atrium, was auf eine vermehrte sympathische Innervation als Folge der CKD hinweisen könnte. In diesem CKD-Modell führte die Empagliflozin-Therapie zu einer signifikanten Reduktion des linksatrialen Fibrosegehalts und konnte gleichzeitig die erhöhte linksatriale sympathische Innervation leicht reduzieren. Auf die Abnahme der Kardiomyozyten-Größe bei CKD konnte hingegen kein Effekt durch Empagliflozin festgestellt werden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine SGLT2-Inhibition durch Empagliflozin bei CKD die Bildung eines arrhythmogenen Substrates im linken Atrium unterdrückt und somit das Auftreten von VHF in Patient*innen mit CKD vermindern könnte.

1.2 Abstract

Chronic kidney disease (CKD) is a highly prevalent disease worldwide and is associated with a high risk of developing cardiovascular disease. A complication that should not be neglected is atrial fibrillation (AF), which in turn leads to increased mortality and morbidity. It develops in the context of atrial remodeling processes. Increased sympathetic activity in CKD also contributes to the development and progression of AF. Sodium dependent glucose cotransporter 2-('SGLT2') inhibitors have shown cardioprotective effects in recent years that were not limited to the patient population with diabetes mellitus. However, the influence of this drug class on atrial remodeling processes and on increased atrial sympathetic innervation and thus, on the progression of AF in the setting of CKD has not been characterized yet. The aims of this study were to characterize the influences of CKD on proarrhythmic remodeling processes and on sympathetic innervation in the left atrium, as well as to characterize the influence of SGLT2 inhibition by empagliflozin on left atrial remodeling and on left atrial sympathetic innervation.

Methods: SV129 mice were administered alternating concentrations of 0.1% or 0.2% adenine-containing chow over a period of 16 weeks to induce CKD. The mice were divided into a control group on normal chow (Ko), an adenine group (AD) and an adenine-fed treatment group that received additional therapy with empagliflozin from baseline (AD+Empa). Both left atrial remodeling processes and left atrial expression of tyrosine hydroxylase as a marker for sympathetic innervation were characterized by histological detection techniques at the end of 16 weeks.

Results: The adenine model with alternating adenine concentrations resulted in a significant reduction of the left atrial cardiomyocyte diameter compared to the control (Ko: $16.60 \pm 0.8 \mu\text{m}$ vs. AD: $13.65 \pm 0.2 \mu\text{m}$, $p=0.037$), while no changes were observed in both the content of fibrosis (Ko: $7.58 \pm 0.4 \%$ vs. AD: $6.85 \pm 0.7 \%$, $p=0.61$), consisting of epicardial, endocardial, perivascular and interstitial fibrosis, as well as in the content of interstitial fibrosis (Ko: $3.61 \pm 0.2 \%$ vs. AD: $4.19 \pm 0.4 \%$, $p=0.49$) after adenine feeding compared to control. However, a significantly increased expression of tyrosine hydroxylase in the left atrium was detected in the animals with CKD (Ko: 1.0 ± 0.1 tyrosine hydroxylase positively stained nerve fibers per total left atrial area vs. AD: 1.58 ± 0.1 tyrosine hydroxylase positively stained nerve fibers per total left atrial area, $p=0.047$). Compared with the untreated adenine group, administration of empagliflozin in CKD showed no change in cardiomyocyte size (AD: $13.65 \pm 0.2 \mu\text{m}$ vs. AD+Empa: $13.97 \pm 0.4 \mu\text{m}$, $p=0.99$), however, both fibrosis (AD: $6.85 \pm 0.7\%$ vs. AD+Empa: $5.14 \pm 0.3\%$, $p=0.047$) and interstitial fibrosis (AD: $4.19 \pm 0.4\%$ vs. AD+Empa: $2.67 \pm 0.3\%$, $p=0.013$) decreased significantly during therapy with empagliflozin. Furthermore, empagliflozin was able to numerically reduce the increased left atrial sympathetic innervation (AD: 1.58 ± 0.1 tyrosine hydroxylase positively stained nerve fibers per total left atrial area

vs. AD+Empa: 1.28 ± 0.1 tyrosine hydroxylase positively stained nerve fibers per total left atrial area, $p=0.39$). Adenine-induced CKD did not significantly increase inflammation or interstitial extracellular matrix (ECM) in the left atrium. Also, the treatment group showed neither anti-inflammatory effects nor effects on interstitial ECM.

Conclusion: In SV129 mice, adenine-induced CKD resulted in significantly increased expression of tyrosine hydroxylase in the left atrium, which may indicate increased sympathetic innervation as a consequence of CKD. In this CKD model, empagliflozin therapy resulted in a significant reduction in left atrial fibrosis content and in a concomitant slight reduction in increased left atrial sympathetic innervation. In contrast, no effect of empagliflozin was detected on the decrease in cardiomyocyte size in CKD. In conclusion, SGLT2 inhibition by empagliflozin in CKD suppresses the formation of an arrhythmogenic substrate in the left atrium and thus might reduce the occurrence of AF in patients with CKD.

2 Einleitung

2.1 Chronische Nierenerkrankung (CKD)

2.1.1 Definition

Die Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) definiert eine CKD als eine > 3 Monate bestehende strukturelle oder funktionelle Nierenveränderung. Sie wird anhand der glomerulären Filtrationsrate (GFR) und der Albuminurie in verschiedene Stadien unterteilt. Eine geläufige Methode zur Berechnung der GFR stellt die Kreatinin-Clearance dar. Zu den Kriterien einer CKD zählen gemäß der KDIGO eine herabgesetzte GFR von $< 60 \text{ ml/min/1.73 m}^2$ und mindestens ein Marker einer Nierenschädigung, zu denen eine Albuminurie mit einem Albumin-Kreatinin-Quotienten von $\geq 30 \text{ mg/g}$, Pathologien im Urinsediment, Elektrolyt- und weitere Anomalien im Rahmen von tubulären Defekten, Strukturdefekte, die im Rahmen bildgebender Verfahren detektiert wurden, histologisch detektierte Pathologien und der Z.n. Nierentransplantation zählen. Mindestens eines der Kriterien muss für die Diagnosestellung einer CKD für > 3 Monate bestehen.³²

2.1.2 Stadieneinteilung

Die Einteilung der CKD erfolgt gemäß der KDIGO anhand der GFR und der Albuminurie (vgl. Abb. 1).⁶⁴ Die GFR wird in fünf Stadien, G1 bis G5 unterteilt, wobei das Stadium G3 nochmals in die Stadien G3a und G3b unterteilt wird (vgl. Abb. 1). Die GFR ist in den Stadien G1 ($\text{GFR} \geq 90 \text{ ml/min/1.73 m}^2$) und G2 (GFR zwischen 60 und $89 \text{ ml/min/1.73 m}^2$) noch normwertig, bzw. nur gering reduziert, weswegen Marker einer Nierenschädigung für die Diagnose einer CKD vorliegen müssen. Im Stadium G5, das auch als Nierenversagen bezeichnet wird, liegt die GFR bei $< 15 \text{ ml/min/1.73 m}^2$. Betroffene dieses Stadiums stehen unter dem höchsten Risiko, eine kardiovaskuläre Erkrankung zu erleiden.³² Die Albuminurie wird in die Stadien A1 bis A3 eingeteilt. A1 entspricht mit einem Albumin-Kreatinin-Quotienten von $< 30 \text{ mg/g}$ einer normal bis leichtwertig erhöhten Albuminurie. Im Stadium A3 liegt ein Albumin-Kreatinin-Quotient von $> 300 \text{ mg/g}$ vor. Dieses Stadium wird auch als Makroalbuminurie bezeichnet. Das Stadium A2 wird als Mikroalbuminurie betitelt. Mit sinkender GFR bzw. mit steigender Albuminurie verschlechtert sich die Prognose der CKD bei den Erkrankten.³³

Stadien der chronischen Niereninsuffizienz

Prognose der chronischen Niereninsuffizienz				Albuminausscheidung im Urin (mg/g)		
				A1	A2	A3
				Normal bis leicht erhöht	Mäßig erhöht	Schwer erhöht
				< 30	30–300	> 300
Glomeruläre Filtrationsrate (ml/min/1,73 m ²)	G1	Normal oder hoch	≥ 90	Niedriges Risiko	Mäßiges Risiko	Hohes Risiko
	G2	Leicht erniedrigt	60–89	Niedriges Risiko	Mäßiges Risiko	Hohes Risiko
	G3a	Leicht bis mäßig erniedrigt	45–59	Mäßiges Risiko	Hohes Risiko	Sehr hohes Risiko
	G3b	Mäßig bis schwer erniedrigt	30–44	Hohes Risiko	Sehr hohes Risiko	Sehr hohes Risiko
	G4	Schwer erniedrigt	15–29	Sehr hohes Risiko	Sehr hohes Risiko	Sehr hohes Risiko
	G5	Nierenversagen	< 15	Sehr hohes Risiko	Sehr hohes Risiko	Sehr hohes Risiko

Abb. 1: Stadieneinteilung und Prognose der chronischen Nierenerkrankung anhand der glomerulären Filtrationsrate und der Albuminurie nach Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO)

Die Einteilung der CKD in die verschiedenen Stadien erfolgt anhand der GFR und der Albuminurie. (Rüster C, Wolf G)⁶⁴

2.1.3 Epidemiologie

Die weltweite Prävalenz der CKD beträgt etwa 13.4 %. Sie ist mitunter aufgrund einer immer älter werdenden Bevölkerung, einer erhöhten Prävalenz von Diabetes mellitus Typ 2 und Hypertonie, zu geringer Diagnostik und unzureichender Therapie vor allem in den frühen Stadien der Erkrankung steigend. Etwa 10 Millionen Betroffene sind für eine Nierenersatztherapie qualifiziert, von denen allerdings nur etwa 3 Millionen eine erhalten.³¹

2.1.4 Ätiologie

Man geht bei der CKD von einem multifaktoriellen Geschehen aus. Zudem ist bei etwa 20 % der Betroffenen keine Ursache zu erkennen.⁷⁶ Zu den Risikofaktoren der CKD zählen mitunter Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, primäre Glomerulopathien, chronische Pyelonephritiden, der chronische Missbrauch nichtsteroidaler Antiphlogistika, Autoimmunerkrankungen, polyzystische Nierenerkrankungen, das Alport-Syndrom und kongenitale Malformationen.^{76,2} Die führenden Ursachen sind laut der German Chronic Kidney Disease-Studie mit 23 % die vaskuläre Nephropathie, mit 18.5 % die primäre Glomerulopathie und mit 14.5 % die diabetische Nephropathie.⁷⁶

2.1.5 Klinik und Komplikationen

Oftmals verläuft die CKD bis zu den Stadien 4 und 5 asymptomatisch, weswegen die Erkrankung häufig zufällig im Rahmen von Routineuntersuchungen durch eine reduzierte abgeschätzte GFR oder durch erhöhtes Serum-Kreatinin diagnostiziert wird.²⁸ Im Falle einer vorhandenen Symptomatik sind Makrohämaturie (makroskopisch sichtbares Blut im Urin), schäumender Urin, Nykturie (nächtlicher Harndrang), Flankenschmerzen oder eine reduzierte Urinmenge häufige Auffälligkeiten, über die die Betroffenen klagen. Im Rahmen einer fortgeschrittenen CKD entwickeln sich weitere Symptome wie Fatigue, Appetitlosigkeit mit ungewolltem Gewichtsverlust, Übelkeit und Erbrechen, Pruritus (Juckreiz), Bewusstseinsveränderungen, periphere Ödeme und Dyspnoe (subjektiv empfundene Atemnot) aufgrund von pulmonaler Überwässerung oder aufgrund von Pleura- und Perikardergüssen.^{28,11} Die CKD hat weitreichende Folgen. Zu den Komplikationen der CKD zählen mitunter eine gestörte Sekretionsfähigkeit der Nieren, Störungen im Wasser-, Säure-Basen- und Elektrolythaushalt (u.a. Hypocalcämie und Hyperphosphatämie), Störungen im Knochen- und Mineralstoffwechsel, renale Anämie und dermatologische, neurologische sowie kardiovaskuläre Komplikationen.^{28,61} Kardiovaskuläre Komplikationen im Rahmen der CKD zeigen eine hohe Prävalenz. Die Hälfte aller Personen im CKD-Stadium 4 oder 5 leidet an kardiovaskulären Erkrankungen, die den führenden Grund für die Mortalität bei Betroffenen mit CKD darstellen. 40-50 % aller Todesfälle im CKD-Stadium 4 oder 5 sind auf kardiovaskuläre Erkrankungen zurückzuführen.³¹ Im Gegensatz dazu sind kardiovaskuläre Erkrankungen in nur 26 % der Fälle die Todesursache bei Personen mit einer $GFR \geq 60 \text{ ml/min/1.73 m}^2$ und ohne Proteinurie.⁷⁵ Selbst in früheren Stadien der CKD ist es wahrscheinlicher, an den Folgen von kardiovaskulären Komplikationen zu versterben als einen Progress zum Nierenversagen zu entwickeln.⁷⁷ Damit ist die CKD einer der stärksten Risikofaktoren für die Entwicklung von kardiovaskulären Erkrankungen bis hin zur Entstehung einer Herzinsuffizienz.³¹ Bei fortgeschrittener Nierenerkrankung ist die Lebenszeit der Betroffenen im Vergleich mit nierengesunden Personen um etwa 25 Jahre verkürzt.³¹

Eine Komplikation ist die urämische Kardiomyopathie, die sich durch eine kardiale Hypertrophie, Fibrose, Inflammation und kardiale Dysfunktion äußert.^{81,71} Die Prävalenz der linksventrikulären Hypertrophie reicht hierbei von 30 % bei Betroffenen in den CKD-Stadien 2-4 bis zu 70-80 % bei Betroffenen mit Nierenversagen.⁸¹ Des Weiteren kommt es bei ca. 80 % der Betroffenen mit CKD und bei nahezu 100 % der Betroffenen mit Nierenversagen zur Entwicklung eines Hypertonus, der wiederum den Progress der CKD fördert, was zu einem Circulus vitiosus führt.⁴⁰

Auch VHF stellt mit einer Prävalenz von 15-20 % eine nicht zu vernachlässigende Komplikation dar, die wiederum mit einer erhöhten Mortalität und Morbidität, darunter einem erhöhten Schlaganfallrisiko, assoziiert ist⁸⁰ (s. hierzu auch 2.2.5).

2.1.6 Therapie

Ziele sind die Therapie der Grunderkrankung, wenn dies möglich ist, die Verzögerung des Progresses und die Therapie von entstandenen Komplikationen.^{28,11} Es existieren viele Empfehlungen, die dazu beitragen sollen, den Progress einer CKD zu verlangsamen. Zu den nicht-medikamentösen Maßnahmen zählen mitunter eine gesunde Führung des Lebensstils, Patient*innen-Edukation und, je nach Stadium der Erkrankung, Ernährungsanpassungen (u.a. Restriktion der Natrium- bzw. Kochsalzaufnahme, Restriktion der Phosphataufnahme aufgrund einer möglicherweise bestehenden Phosphatretention, moderate Eiweißzufuhr, Restriktion der Kaliumzufuhr).¹⁴ Zu den medikamentösen Verfahren zählt mitunter die Therapie des Blutdrucks. Es besteht ein gemeinsamer Konsens mehrerer Leitlinien, dass für alle Betroffenen individuelle Ziel-Blutdruckwerte festgelegt werden sollen.¹⁴ Als neuer Zielwert wird von der KDIGO-Leitlinie aus dem Jahr 2021 für erwachsene Personen, die keine Dialyse erhalten, ein Blutdruck von < 120 mmHg systolisch empfohlen. Sollte dieser Wert nicht toleriert werden oder liegt eine reduzierte Lebenserwartung vor, so kann eine weniger aggressive Blutdrucksenkung angegangen werden.³³ Erwachsene Nierentransplantat-Empfänger*innen sollen auf einen Ziel-Blutdruck von < 130/80 mmHg eingestellt werden.³³ In der früheren KDIGO-Leitlinie aus dem Jahr 2012 waren noch höhere Ziel-Blutdrücke für erwachsene CKD-Patient*innen ($\leq 140/90$ mmHg bzw. bei Albuminausscheidung von ≥ 30 mg/d $\leq 130/80$ mmHg)³² festgelegt und die Aktualisierung der Zielwerte stößt aufgrund der schwierigen Umsetzung in der Klinik auf Kritik.⁵⁰ In der Regel ist eine antihypertensive Kombinationstherapie erforderlich, wobei im Vordergrund die Inhibition des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) mittels Angiotensin-Converting-Enzyme-(ACE)-Inhibitoren oder Angiotensin-Rezeptorblockern steht.^{28,67} Neben einer Reduktion von kardiovaskulären Ereignissen reduzieren sie zudem das Progressionsrisiko der CKD.⁸² Es wird klar von einer Kombination von ACE-Inhibitoren mit Angiotensin-Rezeptorblockern abgeraten, da dies zu einem vermehrten Auftreten von Hyperkaliämien und akutem Nierenversagen führt.^{28,21} Als weitere medikamentöse Angriffspunkte sind die Therapie einer Hypercholesterinämie und/oder eines metabolischen Syndroms, die Therapie einer möglicherweise bestehenden Hyperurikämie und die Therapie eines möglicherweise bestehenden Diabetes mellitus zu nennen. Es ist zu bedenken, dass Medikamente aufgrund der CKD kontraindiziert sein können oder dass eine Dosisanpassung obligat ist.²⁸

Bei Nierenversagen werden eine Nierenersatztherapie oder eine Nierentransplantation erforderlich.²²

2.2 Korrelation zwischen der chronischen Nierenerkrankung und dem Entstehen einer urämischen Kardiomyopathie

Es ist bekannt, dass die CKD als unabhängiger Risikofaktor zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit führt, kardiovaskuläre Erkrankungen zu entwickeln (vgl. Abb. 2).^{31,81,71,52} Das Auftreten kardiovaskulärer Komplikationen im Rahmen einer CKD wird nach Ronco als Typ 4 des kardiorenenalen Syndroms bezeichnet (chronisch renokardiales Syndrom).⁶³ Zusätzlich zu den typischen Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen, wie u.a. Hypertonie, Diabetes mellitus, Dyslipidämien und Nikotin-Abusus, die sowohl die Prognose der CKD als auch die Prognose von kardiovaskulären und zerebrovaskulären Folgen aggravierern, existieren Risikofaktoren, die speziell bei CKD-Erkrankten gehäuft beobachtet werden. Hierzu zählen vaskuläre Kalzifikationen, eine Hyperaktivität des RAAS, Natriumretention, Hypervolämie, endotheliale Dysfunktion, Koagulopathien, Inflammation, Anämie, Hyperparathyreoidismus, Hypoalbuminämie, Hyperphosphatämie, Störungen der Knochenmineralisation, Urämie und oxidativer Stress.^{31,57}

Zu den sich entwickelnden kardiovaskulären Erkrankungen im Rahmen einer CKD zählen mitunter die ischämische Herzkrankheit (Myokardinfarkt, Angina pectoris, plötzlicher Herztod), die die größte Todesursache der CKD-bezogenen kardiovaskulären Erkrankungen darstellt,⁵² zerebrovaskuläre Erkrankungen und die urämische Kardiomyopathie, die eine kardiale Hypertrophie, kardiale Fibrose und kardiale Inflammation umfasst.^{52,31,81,71} Die urämische Kardiomyopathie als solche kann wiederum zu kardialen Arrhythmien, Herzinsuffizienz und zum plötzlichen Herztod führen.^{71,52} Pathophysiologisch betrachtet liegt hierbei eine Interaktion zwischen Nieren, Gefäßsystem und Myokard vor. Zum einen sezerniert die Niere als Reaktion auf die Nierenerkrankung Hormone, Enzyme und Zytokine, die sich auf das Gefäßsystem auswirken. Zum anderen kommt es zu hämodynamischen Veränderungen und zur Ausschüttung von Mediatoren, die kardiale Schäden hervorrufen.^{31,52,84} Zudem ist die im Rahmen einer CKD vorhandene Aktivierung des sympathischen Nervensystems zu nennen, die weitreichende kardiale Auswirkungen hat.^{30,59}

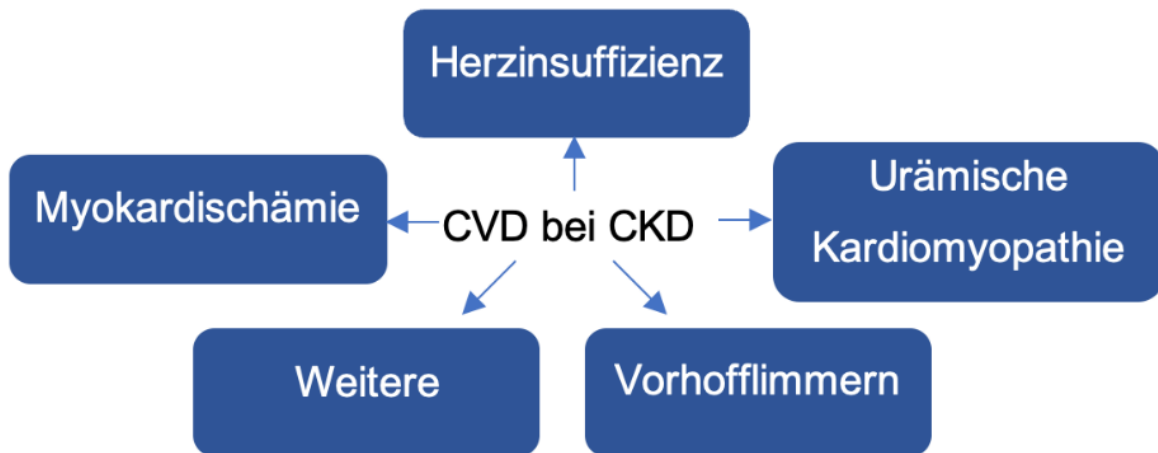


Abb. 2: kardiovaskuläre Erkrankungen (CVD) bei chronischer Nierenerkrankung (CKD)
 Die CKD gilt als unabhängiger Risikofaktor für die Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen. Hierzu zählen mitunter die Myokardischämie, die Herzinsuffizienz, die urämische Kardiomyopathie und das Vorhofflimmern. (modifiziert nach: Marx N, Noels H, Jankowski J, Floege J, Fliser D, Böhm M)⁵²

2.2.1 Aktivierung des sympathischen Nervensystems

Bereits in frühen Stadien der CKD wird das sympathische Nervensystem aktiviert³⁰ und bleibt über den gesamten Verlauf bis zur Entwicklung eines Nierenversagens überaktiv.⁵⁹ Die Aktivierung ist auf afferente Signale zurückzuführen, die aus den erkrankten Nieren stammen. Die Stärke der Sympathikusaktivierung korreliert hierbei mit dem Schweregrad der CKD.³⁰ Zudem tragen weitere mit CKD assoziierte Komplikationen, nämlich die vermehrte Expression von Angiotensin II, oxidativer Stress und die Akkumulation von asymmetrischem Dimethylarginin, einem endogenen Inhibitor der Stickstoffmonoxid-Synthetase, mit folglich reduzierter Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid zur Aktivierung des sympathischen Nervensystems bei.⁵⁹ Ein überaktives sympathisches Nervensystem im Rahmen einer CKD hat weitreichende Folgen. Es kann zur Entwicklung eines atrialen proarrhythmogenen Substrats und als sogenannter „Trigger“ an der Entstehung und Progression von VHF beitragen³⁰, den Blutdruck erhöhen, eine ventrikuläre Hypertrophie begünstigen und zur Konstriktion der Koronargefäße führen. Konsekutiv steigt das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen und den plötzlichen Herztod.⁵⁹ Zudem trägt die Überaktivität des Sympathikus zum Progress der CKD bei.^{59,30}

Als möglicher therapeutischer Ansatz gilt die renale Denervation, die die Aktivität des Sympathikus reduziert.³⁰ In einer Studie mit Patient*innen im CKD-Stadium 3 und 4 und mit resistenter

Hypertonie konnte gezeigt werden, dass die renale Denervation sowohl den Blutdruck reduziert als auch den Progress der CKD verlangsamt oder sogar stoppt.⁵⁵ Zudem zeigte ein tierexperimentelles CKD-Modell, dass das interventionelle Verfahren den Progress des atrialen Remodelings und die Vulnerabilität der Atrien für VHF reduziert.³⁰

2.2.2 Inflammation

Simultan mit der Verschlechterung der Nierenfunktion und der Retention von urämischen Toxinen kommt es zu einem Anstieg pro-inflammatorischer Zytokine, wie z.B. Interleukin-(IL)-6 und Tumornekrosefaktor (TNF), und zur Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies.^{31,65,84} Zusätzlich steigt im Rahmen der Inflammation der intrazelluläre Glukose-Stoffwechsel in den Immunzellen an, was unter den Begriff „metabolic reprogramming“ fällt.^{72,83} Dies führt wiederum zu einer Aktivierung der Immunzellen.⁸³ Die Folgen all dieser pathophysiologischen Prozesse sind vaskuläre Kalzifikationen, die eine Steifigkeit der Arterien bewirken, und eine endotheliale Dysfunktion. Auslöser von vaskulären Kalzifikationen sind des Weiteren u.a. die Hyperphosphatämie und der Hyperparathyreoidismus, die bei CKD-Patient*innen häufig vorkommen. Versteifte Arterienwände haben hämodynamische und kardiale Auswirkungen. Durch die reduzierte Elastizität der Aorta geht ihre physiologische Windkesselfunktion verloren. Folglich steigt der zentral systolische Druck, während der zentral diastolische Druck fällt. Der zentrale Pulsdruck steigt, wodurch das Risiko für Schlaganfälle erhöht ist. Der linke Ventrikel hypertrophiert aufgrund des erhöhten Drucks, der während der Systole aufgebracht werden muss und die Koronarien werden aufgrund des niedrigeren zentral diastolischen Drucks vermindert perfundiert, wodurch das Risiko für Myokardischämien steigt. Zudem wirken sich vaskuläre Kalzifikationen auch auf die CKD aus, indem sie den Progress aggravieren.⁸⁴

2.2.3 Kardiale Hypertrophie

Circa ein Drittel aller Personen mit CKD und 70-80 % der Personen mit Nierenversagen entwickeln eine linksventrikuläre Hypertrophie.^{31,51} Damit stellt sie die häufigste strukturelle Veränderung im Rahmen einer CKD dar.⁵¹ Hierfür verantwortlich sind eine erhöhte Vor- und Nachlast und Faktoren, die weder mit der Vor- noch mit der Nachlast assoziiert sind. Bei erhöhter Nachlast, z.B. aufgrund von erhöhtem arteriellen Gefäßwiderstand oder systolischer Hypertonie, entwickelt sich zunächst eine konzentrische linksventrikuläre Hypertrophie. Eine permanente Volumenbelastung des linken Ventrikels führt zu Anpassungsreaktionen und dem Absterben von Kardiomyozyten,

wodurch sich eine exzentrische Hypertrophie und infolgedessen eine linksventrikuläre Dilatation, systolische Dysfunktion und reduzierte Ejektionsfraktion entwickeln. Zu einer erhöhten Vorlast kommt es mitunter aufgrund einer Erhöhung des intravasalen Volumens im Rahmen einer CKD und aufgrund von linksventrikulärem exzentrischen oder asymmetrischen Remodeling. Zu Faktoren, die weder mit einer Veränderung der Vor- noch mit einer Veränderung der Nachlast assoziiert sind, gehören mitunter intrazelluläre Botenstoffe, die zum Fortschreiten einer linksventrikulären Hypertrophie führen.³¹ Die von Makrophagen sezernierten Interleukine IL-18 und IL-1 β fördern die Hypertrophie von Kardiomyozyten und aggravieren sowohl fibrotische Prozesse als auch die kardiale Dysfunktion.⁷⁸ Im Verlauf folgt die Apoptose oder Nekrose der hypertrophierten Kardiomyozyten mit konsekutivem Ersatz durch Fibroblasten und folglich verstärkter Fibrose.⁵⁷

2.2.4 Kardiale Fibrose

Fibrose ist definiert als übermäßige Ansammlung von extrazellulärer Matrix (EZM), die überwiegend aus Kollagen besteht.⁵⁷ Die EZM füllt die Zellzwischenräume aus und besteht des Weiteren u.a. aus Fibronektin, Lamininen, Entactin und Fibromodulin.^{49,24} Das Remodeling der EZM stellt eine maladaptive Reaktion auf kardiale strukturelle und funktionelle Veränderungen im Rahmen von Herzerkrankungen dar.²⁴ Das Entstehen von Fibrose steht in engem Zusammenhang zu inflammatorischen Prozessen. Eine chronische Inflammation, wie sie bei der CKD der Fall ist, führt zu einer vermehrten Sekretion von inflammatorischen Chemokinen und Zytokinen und zu einer vermehrten Aktivierung von Immunzellen. So konnte gezeigt werden, dass Makrophagen vermehrt IL-10, Insulin-like growth factor-(IGF)-1, Transforming growth factor-(TGF)- β 1 und Galectin-3 sezernieren, wodurch das Remodeling der EZM in Gang gesetzt wird.⁵⁷ Ein weiterer Faktor, der am fibrotischen Remodeling beteiligt ist, ist das Renin-Angiotensin-Aldosteron System (RAAS). Das RAAS dient der Regulation des Blutdrucks und des Volumenhaushalts. Bei chronischer Überaktivität des RAAS, wie sie bei CKD-Erkrankten vorkommt, sind renale und kardiale Komplikationen die Folge. Hierzu zählt neben der Hypertonie und der Herzinsuffizienz auch das renale und kardiale fibrotische Remodeling. Besonders Angiotensin II als aktivste Substanz des RAAS hat hierbei eine wichtige Funktion. Es trägt u.a. zur Synthese von Kollagen und Fibronektin bei.⁵⁷

Bei der CKD sind die renalen Vitamin-D-Syntheseschritte gestört, wodurch es zu einem Vitamin-D-Defizit kommt, das wiederum das RAAS aktiviert.⁵⁷ Zudem liegen eine Hypocalcämie und Hyperphosphatämie bei den Betroffenen vor. Das Zusammenspiel aus Vitamin-D-Mangel, Hypocalcämie und Hyperphosphatämie führt zur Entwicklung eines sekundären Hyperparathyreoidis-

mus,⁴² der mit kardialer Fibrose assoziiert ist.⁵⁷ Parathormon stimuliert die Freisetzung von Aldosteron, die Ablagerungen von Kollagenen und das Kardiomyozyten-Wachstum, das wiederum zu einer linksventrikulären Hypertrophie führt. Durch die Hypertrophie sind mehr Fibroblasten vorhanden, die zu einer kardialen Fibrose beitragen können.⁵⁷

Folge dieser Form des Remodelings ist eine Organdysfunktion mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität. Die Versteifung des linken Ventrikels infolge der Fibrosierung erschwert die linksventrikuläre Relaxation während der Diastole mit der Folge eines erhöhten end-diastolischen Drucks. Die Prävalenz der diastolischen Dysfunktion beträgt bei Personen im CKD-Stadium 3-5 ca. 75 %. Dies wirkt sich auf den linksatrialen Druck aus, da eine verstärkte atriale Kontraktion gegen Ende der Diastole erforderlich ist, um eine vollständige Ventrikelfüllung zu gewährleisten. Dem Druckanstieg im linken Atrium folgt eine allmähliche atriale Dilatation, die als Risikofaktor für die Entwicklung von VHF gilt.⁵⁸ Zudem konnte gezeigt werden, dass ein linksatriales Volumen von > 32 ml/m² signifikant mit einem schnelleren Verlust der residuellen Nierenfunktion assoziiert ist.³⁷

2.2.5 Zusammenhang zwischen der chronischen Nierenerkrankung und dem Entstehen von Vorhofflimmern

Unter den CKD-Patient*innen leiden 15-20 % zusätzlich an VHF.⁸⁰ Es aggraviert die Prognose einer CKD und erhöht die Wahrscheinlichkeit, ein Nierenversagen zu entwickeln. Zudem steigt die Wahrscheinlichkeit von Schlaganfällen und die Mortalität bei Dialysepatient*innen.⁸⁰ VHF gilt des Weiteren als Ursache für eine Herzinsuffizienz.⁵² Sowohl die CKD als auch das VHF teilen sich gemeinsame Risikofaktoren, wie u.a. das männliche Geschlecht, das Alter, kardiovaskuläre Erkrankungen, Obesitas⁸⁰ und die Aktivierung des sympathischen Nervensystems und des RAAS.³⁰ An der Entstehung von VHF sind sowohl ein auslösender „Trigger“ als auch ein Substrat beteiligt. Trigger stellen i.d.R. atriale Extrasystolen oder schnelle Entladungen in den Atrien oder in den Einmündungen der Pulmonalvenen dar. Das Substrat dient der Aufrechterhaltung des VHF und kann sowohl strukturell als auch elektrisch sein.³⁴ Das linke, erkrankte Atrium liefert die Trigger und Substrate für die Entstehung von VHF.³⁰ Die Faktoren, die ein VHF im Rahmen der CKD begünstigen, sind vielfältig und miteinander verbunden. Besonders inflammatorische Prozesse, das RAAS, reaktive Sauerstoffspezies und die Fibrose sind hierbei zu nennen. Die konsekutiven elektrophysiologisch und strukturell atrialen Remodelingprozesse sind wesentliche Substrate des VHF. Das VHF wiederum fördert das elektrophysiologische und strukturelle Remodeling, wodurch ein Circulus vitiosus entsteht (vgl. Abb. 3).⁸⁰ Zudem konnte gezeigt werden, dass die durch Anomalien im Calcium- und Phosphathaushalt verursachten Kalzifikationen des Mitralklappenrings

oder der Aortenklappe VHF begünstigen können, indem sie den atrialen Druck erhöhen und so zu einer Dilatation führen.^{15,58} Ebenso der Anstieg von Urämietoxinen und die Aktivierung des sympathischen Nervensystems im Rahmen einer CKD wirken proarrhythmogen.^{30,15}

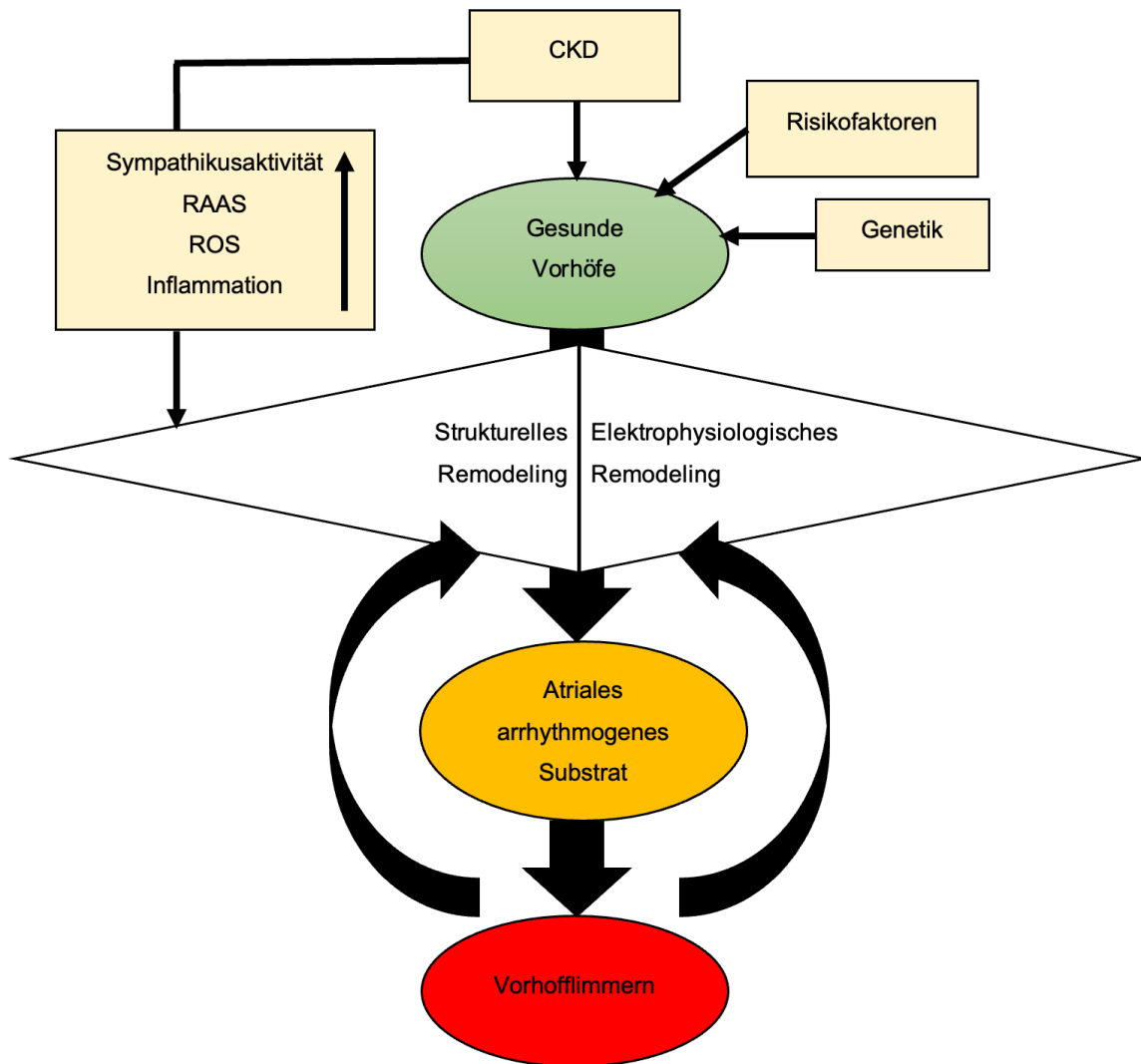


Abb. 3: Die Pathophysiologie von Vorhofflimmern bei chronischer Nierenerkrankung (CKD)

Genetische Faktoren, Risikofaktoren und die im Rahmen einer CKD erhöhte Aktivität des Sympathikus, des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS), die erhöhten Spiegel von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und die erhöhte Inflammation begünstigen atriale strukturelle und elektrophysiologische Remodelingprozesse. Die konsekutive Entstehung eines atrialen arrhythmogenen Substrats resultiert im Auftreten von Vorhofflimmern. Vorhofflimmern fördert strukturelle und elektrophysiologische Remodelingprozesse, wodurch ein Circulus vitiosus entsteht. (modifiziert nach: Wang Y, Yang Y, He F)⁸⁰

2.3 Inhibition des SGLT2 als Therapie der chronischen Nierenerkrankung und der kardiovaskulären Erkrankungen

2.3.1 Das Tubulussystem der Niere

Im Tubulussystem der Niere finden diverse Resorptions- und Sekretionsprozesse statt, die durch die Expression von „Tight Junctions“ entlang des gesamten Tubulussystems und durch die selektive Expression von Funktionsproteinen reguliert werden. Das System lässt sich in den proximalen Tubulus, die Henle-Schleife, den distalen Tubulus und das Sammelrohr einteilen. Glukose wird im proximalen Tubulus resorbiert. Dies geschieht über die zwei luminalen Natrium-gekoppelten Cotransporter SGLT1 bzw. SGLT2. Proximal ist primär der SGLT2 lokalisiert. Gegen distal findet man vorwiegend den SGLT1 vor. Die Cotransporter unterscheiden sich sowohl in der Affinität als auch in der Kapazität: Während der SGLT2 eine hohe Kapazität (Resorption von 90 % der Glukose)²³ und geringe Affinität hat, besitzt der SGLT1 eine geringe Kapazität und hohe Affinität. Der Glukosetransporter 2 (GLUT2), ein Uniporter, ermöglicht im Anschluss die erleichterte Diffusion ins Interstitium. Im Normalfall ist der Urin nach der Glukoseresorption im Tubulussystem glukosefrei. Sollte die Nierenschwelle von 10 mmol/l allerdings überschritten werden, was häufig im Rahmen eines Diabetes mellitus der Fall ist, wird die maximale Transportkapazität von SGLT1 und SGLT2 überschritten und es folgt die Ausscheidung von Glukose über den Urin, bekannt als Glukosurie.⁴

2.3.2 SGLT2-Inhibitoren

SGLT2-Inhibitoren, auch Gliflozine genannt, hemmen selektiv SGLT2 und führen somit zu einer geringeren Rückresorption von Glukose in den Nieren.²³ Konsekutiv steigt die Ausscheidung sowohl von Glukose als auch von Natrium.⁷⁴ Zudem kommt es nach 6 Monaten Einnahme zu einer Gewichtsreduktion von 2-3 kg und zu einer Senkung des systolischen und diastolischen Blutdrucks. Ursächlich für die Blutdruckreduktion scheinen die reduzierte Natrium-Rückresorption und der Abfall des intravasalen Volumens durch die stattfindende Osmodiurese zu sein.²³ Zu Beginn einer Therapie mit SGLT2-Inhibitoren kann die abgeschätzte GFR innerhalb der ersten 3 Wochen bis zu 30 % abfallen.¹⁷ Dies lässt sich durch die erhöhte Natriumkonzentration im distalen Tubulus erklären, die über tubuloglomeruläres Feedback zu einer Vasokonstriktion des Vas afferens der

Niere führt. Hierdurch sinkt der Filtrationsdruck in den Glomeruli.^{23,17} Initial waren SGLT2-Inhibitoren (darunter Empagliflozin)⁸⁵ für die Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 angedacht.⁴⁸ In der Zwischenzeit konnten allerdings mehrere Studien zeigen, dass die Substanzklasse ein weitaus größeres Wirkungsspektrum (vgl. Abb. 4)¹⁷ hat. So zeigte die EMPA-REG Outcome-Studie aus dem Jahr 2015, dass eine Therapie mit Empagliflozin bei Diabetes mellitus Typ 2-Erkrankten mit einem hohen Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse signifikant die Mortalitätsrate, sowohl bedingt durch kardiovaskuläre als auch durch nicht-kardiovaskuläre Ursachen, und die Hospitalisierungsrate aufgrund von Herzinsuffizienz sinkt.⁸⁵ Die Post-hoc-Analyse von Böhm et al. zeigte zudem, dass Patient*innen mit Diabetes mellitus, kardiovaskulären Erkrankungen und Vorhofflimmern besonders von einer Therapie mit Empagliflozin profitieren könnten.⁵ Die im Jahr 2019 veröffentlichte DAPA-HF-Studie charakterisierte die Wirkung von Dapagliflozin an Personen mit Herzinsuffizienz in den New York Heart Association-(NYHA)-Stadien II bis IV und mit einer reduzierten linksventrikulären Ejektionsfraktion von ≤ 40 %, von denen nicht alle an Diabetes mellitus gelitten haben. Das Risiko einer Verschlechterung der Herzinsuffizienz war durch die Einnahme von Dapagliflozin reduziert, unabhängig davon, ob ein Diabetes mellitus vorlag oder nicht. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Mortalitätsrate aufgrund kardiovaskulärer Ursachen, ebenso unabhängig vom Vorhandensein oder Nichtvorhandensein eines Diabetes mellitus, sinkt.⁵⁴ Die EMPEROR-Preserved-Studie aus dem Jahr 2021 zeigte, dass Empagliflozin bei Patient*innen mit Herzinsuffizienz in den NYHA-Stadien II bis IV und einer linksventrikulären Ejektionsfraktion von > 40 % die Mortalitätsrate aufgrund kardiovaskulärer Ursachen und die Hospitalisierungsrate aufgrund der Herzinsuffizienz reduziert. Auch hier waren die Ergebnisse von einer Erkrankung an Diabetes mellitus unabhängig. Ein Vergleich mit der ähnlich ausgefallenen EMPEROR-Reduced-Studie,⁵⁶ bei der die Ejektionsfraktion der Patient*innen ≤ 40 % betrug, lässt vermuten, dass die Wirkung der SGLT2-Inhibition nicht nennenswert mit dem Ausmaß der Ejektionsfraktion variiert.³

2022 wurde die EMPA-KIDNEY-Studie publiziert, die sich mit der Wirkung von Empagliflozin auf Patient*innen mit CKD mit oder ohne Diabetes mellitus fokussierte. Hierbei wurde festgestellt, dass Empagliflozin sowohl das Risiko eines Fortschreitens der CKD als auch das Mortalitätsrisiko aufgrund kardiovaskulärer Ereignisse unabhängig von einer Diabetes mellitus-Erkrankung reduziert.⁷³

In tierexperimentellen Studien konnten weitere Erkenntnisse gewonnen werden. So konnte in einem CKD-Modell an Ratten gezeigt werden, dass durch die Gabe von Canagliflozin sowohl die Inflammation als auch der oxidative Stress in den Nieren der Versuchstiere gesenkt werden.¹ In einem weiteren Tierexperiment mit hypertensiven Mäusen kam man zu der Erkenntnis, dass durch die Gabe von Dapagliflozin sowohl die Aktivität des sympathischen Nervensystems in den Nieren als auch die endotheliale Dysfunktion reduziert werden. Zudem konnten anti-inflammatorische

Auswirkungen im renalen und kardialen Gewebe nachgewiesen werden.²⁷ In einem Versuchsmodell an Ratten mit einem Streptozotocin-induzierten Diabetes mellitus Typ 2 führte die Gabe von Empagliflozin zu einer Reduktion des strukturellen und elektrischen Remodelings in den Atrien.⁶⁹

Über die Auswirkung einer SGLT2-Inhibition auf die Progression von VHF im Rahmen einer CKD ist jedoch nichts bekannt.

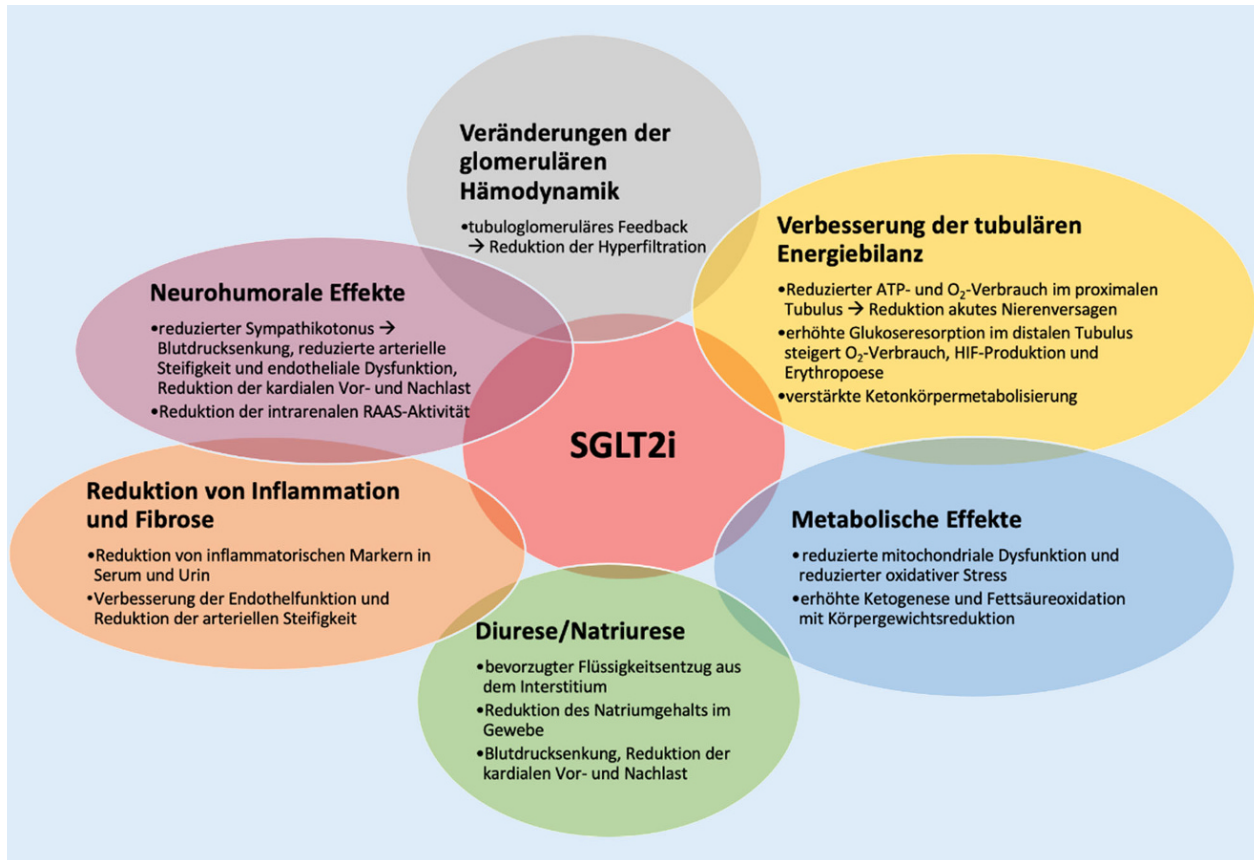


Abb. 4: Wirkmechanismen von SGLT2-Inhibitoren (SGLT2i)

Das Wirkungsspektrum von SGLT2-Inhibitoren umfasst Veränderungen der glomerulären Hämodynamik, die Verbesserung der tubulären Energiebilanz, metabolische Effekte, eine Diurese/Natriurese, die Reduktion von Inflammation und Fibrose und auch neurohumorale Effekte (ATP: Adenosintriphosphat, HIF: hypoxieinduzierender Faktor, RAAS: Renin-Angiotensin-Aldosteron-System). (Dumann E, Menne J)¹⁷

2.4 Ziele der Arbeit

Ziele dieser Arbeit waren, anhand eines Maus-Modells mit Adenin-induzierter CKD sowohl die daraufhin folgenden linksatrialen Remodelingprozesse als auch die linksatriale sympathische Innervation zu charakterisieren, die jeweils die Vulnerabilität für VHF steigern. Zudem wurde charakterisiert, inwiefern die Gabe des SGLT2-Inhibitors Empagliflozin den Prozess des linksatrialen Remodelings und die linksatriale sympathische Innervation inhibieren kann. Die wesentlichen Fragestellungen dieser Arbeit lauten daher wie folgt:

- 1.) Wie wirkt sich eine CKD auf das linksatriale Remodeling aus?

Hierbei wurde der Fokus in dieser Arbeit auf die kardiomyozytäre Hypertrophie, den Fibrosegehalt, inflammatorische Prozesse und die interstitielle EZM-Expansion gelegt.

- 2.) Wie wirkt sich eine CKD auf die linksatriale sympathische Innervation aus?
- 3.) Lassen sich linksatriale proarrhythmische Remodelingprozesse und die linksatriale sympathische Innervation im Rahmen einer CKD durch die Gabe des SGLT2-Inhibitors Empagliflozin minimieren?

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Abzug	ARGE Labor- und Objekteinrichtungen GmbH, Wathlingen, Deutschland
Heizplatte	Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland
Mikroskop Aperio Versa 8	Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland
Mikrotom RM 2255	Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland
Vortex Mixer (#SN 41119030)	Labnet international, Edison, Vereinigte Staaten
Wasserbad	pfmmedical, Köln, Deutschland
Feuchte Kammer	Simport, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 1: Verwendete Geräte

3.1.2 Software

Zweck	Software
Bildbearbeitung	GIMP 2.1 (GNU Image Manipulation Program)
Mikroskop	Image Scope x64, Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland
Auswertung von Inflammation, Fibrosegehalt, interstitieller EZM-Expansion und sympathischer Innervation	NIS Elements, Nikon Instruments Europe B.V., Amsterdam, Niederlande
Auswertung von Inflammation, Hypertrophie und sympathischer Innervation	Aperio Image Scope

Tabelle 2: Verwendete Softwares

3.1.3 Substanzen für die Immunhistochemie

Substanz	Hersteller
Primärantikörper Anti-mouse F4/80 (#14-4801-82)	eBioscience, San Diego, Vereinigte Staaten
Goat-anti-Rat Sekundärantikörper, der mit Biotin konjugiert ist (#sc-2041)	Santa Cruz, Dallas, Vereinigte Staaten
Streptavidin-HRP-Antikörper	PerkinElmer, Waltham, Vereinigte Staaten
Biotinyl-Tyramid	PerkinElmer, Waltham, Vereinigte Staaten
SA-Fluorophor ("Texas Red™", #SA-5006)	Vector Laboratories Inc, Burlingame, CA, Vereinigte Staaten
WGA-Fluorescein (#FL-1021)	Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, Vereinigte Staaten
Tyrosinhydroxylase-Primärantikörper („ab112“)	abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
anti-Rabbit FITC	dianova, Hamburg, Deutschland
Mounting medium, das DAPI enthält („VEC-TASHIELD HardSet™“, #H-1500)	Vector Laboratories Inc, Burlingame, CA, Vereinigte Staaten
Blocklösung (#FP1020)	PerkinElmer, Waltham, Vereinigte Staaten
Signal-Amplifikations-Verdünnungsmittel	PerkinElmer, Waltham, Vereinigte Staaten

Tabelle 3: Verwendete Substanzen für die Immunhistochemie

3.1.4 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Xylol (#28975.325)	VWR, Darmstadt, Deutschland
Ethanol (100 %, #20821.330)	VWR, Darmstadt, Deutschland
Ampuwa® Wasser für Injektionszwecke	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
Wasserstoffperoxid (3 %ig H ₂ O ₂)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natrium-Citrat-Puffer (Citronensäure Monohydrat)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tween® 20	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
HEPES-Puffer	Merck, Darmstadt, Deutschland

Isopropanol (100 %, #1.09634.2511)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Hämatoxylin nach Ehrlich (#2C-163)	Waldeck, Münster, Deutschland
Eosin Y (Certistain®)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Siriusrot-Lösung (0.1 %)	Morphisto, Offenbach am Main, Deutschland
Citraconsäure (Citraconic Anhydride 98%)	Sigma-Aldrich; Deutschland
Entellan® (#1.07961.0100)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Mounting medium	Agilent Technologies, Santa Clara, Vereinigte Staaten

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien

3.1.5 Sonstige Materialien

Material	Hersteller
Ergonomic High Performance Pipetten	VWR, Darmstadt, Deutschland
Fettstift (#H-4000)	Vector Laboratories, Newark, Vereinigte Staaten
Deckgläser (#631-0146)	VWR, Darmstadt, Deutschland
Objektträger (Superfrost Plus™ Adhäsionsobjektträger, #J1800AMNZ)	epredia, Portsmouth, Vereinigte Staaten

Tabelle 5: Sonstige verwendete Materialien

3.2 Methoden

3.2.1 Induktion einer chronischen Nierenerkrankung

Es existieren diverse Modelle, um eine CKD zu induzieren. Die 5/6-Nephrektomie (Modell für akuten Verlust von funktionalem Nierengewebe) stellt ein bekanntes Modell dar, das der menschlichen CKD auch in einigen Aspekten ähnelt, allerdings verlangt dieses Verfahren einen chirurgischen Eingriff, der eine Mortalitätsrate von 40 % hat.¹⁶ Zudem ähnelt der schnelle Verlust an Nierenmasse infolge des Eingriffs nicht dem progressiven Verlauf einer CKD bei Menschen.³⁶ Eine weitere Methode, die auch in der hiesigen Studie gewählt wurde, stellt die Gabe von mit Adenin versetztem Futter dar. In Versuchen mit Nagetieren wurde gezeigt, dass die histopathologischen Veränderungen, die aufgrund einer Adenin-haltigen Ernährung entstehen, nahezu identisch mit den Veränderungen sind, die bei Personen mit einem Adenin-Phosphoribosyl-Transferase-(APRT)-Mangel auftreten.³⁹ Das Enzym APRT katalysiert die Umwandlung von Adenin zu Adenosinmonophosphat. Bei einem Mangel an diesem Enzym, bzw. im Rahmen einer Adenin-haltigen Diät, kommt es zu einem Überschuss an Adenin, das daraufhin von der Xanthindehydrogenase zu 2,8-Dihydroxyadenin (2,8-DHA) oxidiert wird. 2,8-DHA ist nur gering löslich und bildet daraufhin Präzipitate im Tubulussystem.³⁵ Folge ist die Entwicklung einer 2,8-DHA-Nephropathie mit der Ausbildung einer tubulären Schädigung, Inflammation und Fibrose.³⁹ Im weiteren Verlauf entwickelt sich eine CKD.³⁵

3.2.2 Tiermodell

Um den Einfluss einer CKD auf linksatriale proarrhythmische Remodelingprozesse und die linksatriale sympathische Innervation zu charakterisieren, wurde an der Uniklinik RWTH in Aachen unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Michael Lehrke und Frau Dr. Julia Möllmann ein Maus-CKD-Modell etabliert (vgl. Abb. 5). Hierbei wurden insgesamt 34 SV129-Mäuse verwendet, die in eine Kontrollgruppe mit Normalfutter (Ko, n=11), eine Adenin-Gruppe mit Adenin-induzierter CKD (AD, n=11) und in eine Behandlungsgruppe mit Adenin-induzierter CKD inklusive Therapie mit Empagliflozin (225 mg/kg Körpergewicht über das Futter verabreicht, AD+Empa, n=12) eingeteilt wurden. SV129-Mäuse besitzen 2 Renin-Gene (*Ren-1^d* und *Ren-2*), wohingegen vergleichsweise C57BL/6-Mäuse nur 1 Renin-Gen (*Ren-1^c*) besitzen.⁷⁹ Wang et al. zeigten in einem Modell mit SV129-Mäusen und C57BL/6-Mäusen, dass Mäuse mit 2 Renin-Genen (z.B. SV129-Stamm) im

Vergleich mit Mäusen mit einem Renin-Gen (z.B. C57BL/6-Stamm) unter anderem eine 10-fach höhere Plasma-Renin-Aktivität, eine 100-fach höhere Plasma-Renin-Konzentration und einen erhöhten Angiotensin-II-abhängigen Blutdruck haben.⁷⁹ Zudem wurde festgestellt, dass SV129-Maus-Stämme infolge einer Nephrektomie im Vergleich mit C57BL/6-Mäusen eher zur Entwicklung einer Hypertonie, einer kardialen Hypertrophie und einer stärker ausgeprägten Nierenschädigung neigen.^{81,25}

Für diese Arbeit wurden über einen Zeitraum von 16 Wochen wechselnde Konzentrationen von 0.1 % bzw. von 0.2 % Adenin-haltigem Futter verabreicht. Die Therapie mit Empagliflozin erfolgte über den gesamten Versuchszeitraum. Die Kontrollgruppe erhielt über die gesamte Zeit eine Kontroll-Diät bestehend aus Normalfutter. Nach 16 Wochen erfolgte die Tötung der Tiere mit Entnahme der Herzen. In Aachen erfolgte zudem die Bestimmung der Plasma-Harnstoff-Spiegel. In der Kontrollgruppe konnte ein Plasma-Harnstoff-Spiegel von 9.21 ± 0.5 mmol/L festgestellt werden. Die Adenin-Diät führte im Vergleich mit der Kontrollgruppe zu einem signifikanten Anstieg der Plasma-Harnstoff-Spiegel auf 15.03 ± 1.7 mmol/L ($p=0.0068$). Die Therapie mit Empagliflozin sank die Plasma-Harnstoff-Spiegel im Vergleich mit der Adenin-Gruppe auf 11.4 ± 0.9 mmol/L ab ($p=0.091$). Zwischen der Kontrollgruppe und der Behandlungsgruppe konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p=0.42$). Am Universitätsklinikum in Aachen wurden die Atrien der Versuchstiere freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Lehrke fixiert, in Paraffin eingebettet und anschließend an das kardiologische Forschungslabor in Homburg gesendet.

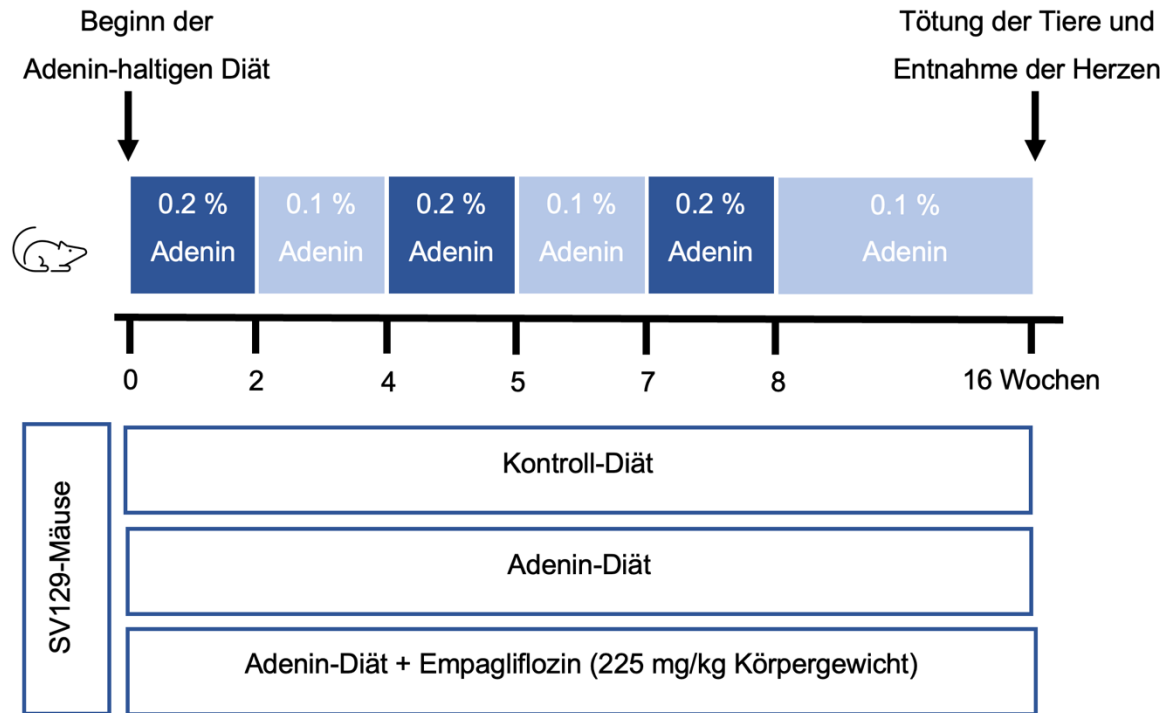


Abb. 5: Versuchsablauf

SV129-Mäuse wurden in eine Kontrollgruppe mit Kontroll-Diät, eine Adenin-Gruppe, bei der eine CKD mit 0.1 % bzw. 0.2 % Adenin-haltigem Futter induziert wurde, und in eine Behandlungsgruppe mit Adenin-Diät und Empagliflozin-Therapie von Beginn an eingeteilt. Nach 16 Wochen erfolgte die Tötung der Tiere mit Entnahme der Herzen.

3.2.3 Histologie

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Einflüsse einer CKD auf linksatriale proarrhythmische Remodelingprozesse und die linksatriale sympathische Innervation histologisch charakterisiert. Jede Färbung ermöglicht hierbei aufgrund ihrer Eigenschaften die Betrachtung verschiedener Zell- und Gewebebestandteile. Zudem können anhand von Antigen-Antikörper-Reaktionen in immunhistochemischen Färbungen spezifische Proteine nachgewiesen werden.

Die Atrien wurden uns als fertige Paraffinblöckchen von Frau Dr. Julia Möllmann (Uniklinik RWTH in Aachen) zur Verfügung gestellt. Im kardiologischen Forschungslabor in Homburg wurden mittels eines Mikrotoms (Leica Biosystems, RM 2255) 3 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt, die daraufhin auf die Objektträger übertragen wurden. Im weiteren Verlauf erfolgten die spezifischen Färbungen. Zur Beurteilung der linksatrialen Hypertrophie erfolgte eine Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung. Die Fibrose, bestehend aus epikardialer, endokardialer, perivaskulärer und interstitieller Fibrose, und die interstitielle Fibrose wurden mittels der Pikro-Siriusrot-Färbung charakterisiert. Zur Charakterisierung inflammatorischer Prozesse wurde die immunhistochemische F4/80-Färbung durchgeführt. Mittels der immunhistochemischen „Wheat Germ Agglutinin“-(WGA)-Färbung wurde die Expansion der interstitiellen EZM charakterisiert. Um die linksatriale sympathische Innervation zu charakterisieren, wurden sympathische Nervenfasern mithilfe der immunhistochemischen Tyrosinhydroxylase-Färbung dargestellt.

Die zu analysierenden Proben wurden vorher verblindet.

3.2.3.1 Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung

Prinzip:

Die HE-Färbung ist eine routinemäßige Färbung und dient der Anfertigung von Übersichtsaufnahmen von Gewebeschnitten. Hämatoxylin ist ein basischer Farbstoff und färbt saure (basophile) Strukturen, wie z.B. Zellkerne, aufgrund des hohen Gehalts an Nukleinsäuren, blau an. Eosin hingegen ist ein saurer Farbstoff und färbt basische (azido-, bzw. eosinophile) Strukturen, wie z.B. das Zytoplasma, in unterschiedlichen Intensitäten rot an.

Durchführung:

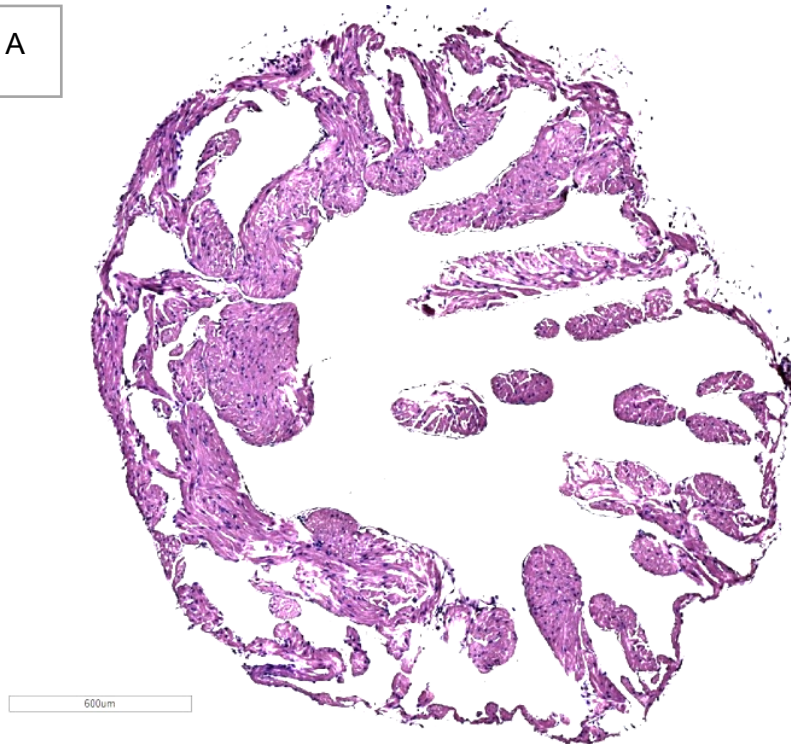
Zunächst wurden die Schnitte dreimal für je 10 min in Xylol entparaffiniert. Daraufhin wurden sie für jeweils 3 min in Färbeküvetten mit einer absteigenden Alkoholreihe, bestehend aus 100 %, 90 % und 70 % Isopropanol, getaucht und anschließend für 1 min in Aqua dest. gegeben. Die darauffolgende Färbung mit Hämatoxylin erfolgte über 12 min. Danach wurden die Schnitte einmalig mit Aqua dest. gewaschen, um überschüssigen Farbstoff zu entfernen. Es folgte das Bläuen für 15 min unter fließendem Leitungswasser und das erneute Waschen mit Aqua dest.. Das Bläuen dient dem Anheben des pH-Werts auf einen Wert > 3 , damit sich die Strukturen in das typische blau färben können.¹⁰ Im Anschluss erfolgte die Färbung mit Eosin (Eosin-Lösung (0.2 %; bestehend aus 1g Eosin, 500 ml Aqua dest., 1 Tropfen 99-100 %ige Essigsäure) für 20 s, gefolgt von einem kurzen Schwenken der Schnitte in Aqua dest.. Nachdem die Schnitte für 3 min in 100 %igem Isopropanol belassen wurden, wurden sie dreimal für je 3 min in Xylol geklärt. Als bald die Schnitte getrocknet waren, wurden sie mithilfe von Entellan® luftblasenfrei eingedeckt.

Auswertung:

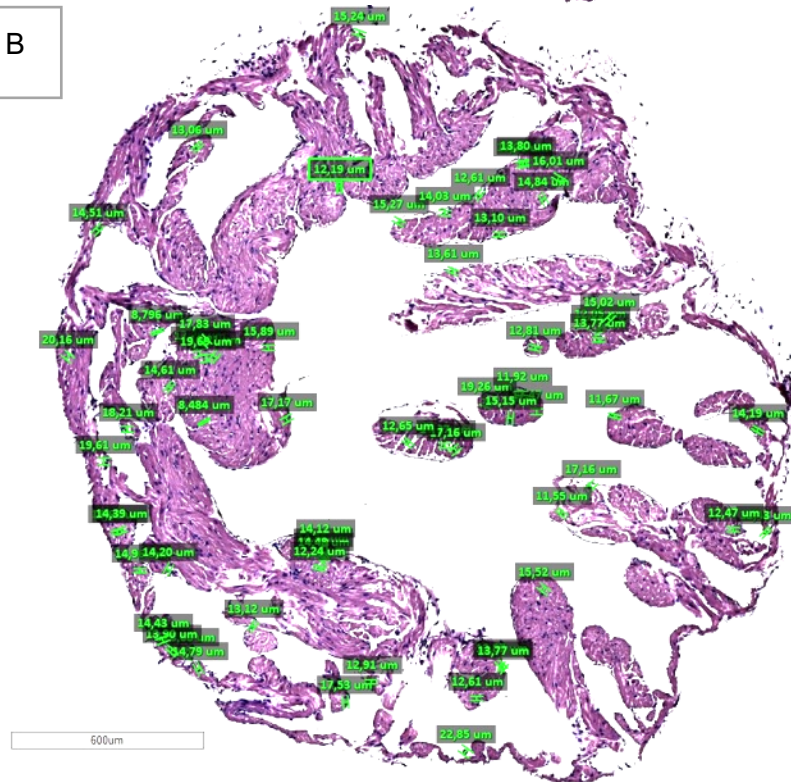
Zur Anfertigung digitaler Bilder wurden die Schnitte mittels einer auf dem Mikroskop (Leica Biosystems, Aperio Versa 8) befindlichen Kamera abgescannt und gespeichert.

Zur Auswertung der Hypertrophie (vgl. Abb. 6) der linken Atrien wurde das Programm Image Scope (Aperio) verwendet. Um die Hypertrophie zu messen, wurden möglichst viele quer angeschnittene, runde Kardiomyozyten mit zentral gelegenem Zellkern ausgewählt und deren Durchmesser manuell gemessen. Für jede Maus wurde nach der Auswertung der mittlere Durchmesser der Kardiomyozyten ausgerechnet.

A



B



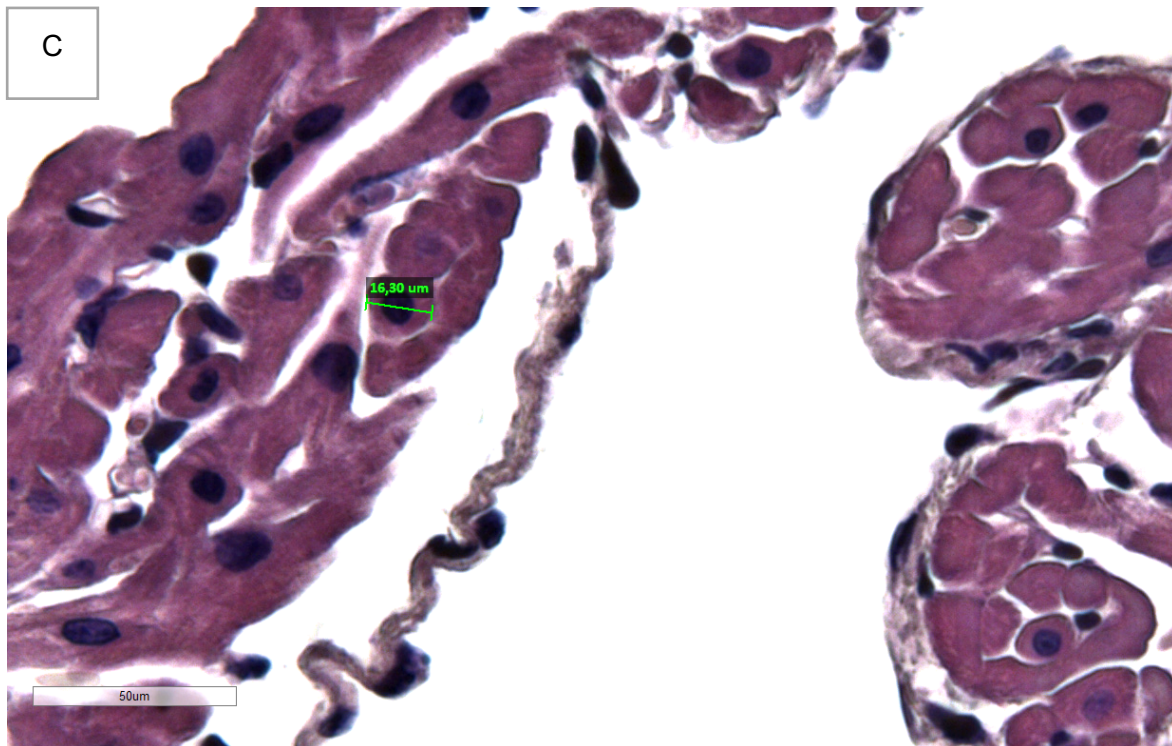


Abb. 6: Messung des Kardiomyozyten-Diameters im Hämatoxylin-Eosin-gefärbten linken Atrium mittels Image Scope

A: Atrium ohne Messung

B: Ausgemessene Kardiomyozyten-Diameter

C: Beispielhaft quer angeschnittener Kardiomyozyt (s. Längenmaß in µm)

3.2.3.2 Pikro-Siriusrot-Färbung

Prinzip:

Die Pikro-Siriusrot-Färbung wird zur Darstellung von Kollagenen, Bestandteil der Fibrose, verwendet. Hierbei färbt der Farbstoff Siriusrot Kollagene rot, während sich das Zytoplasma gelb färbt.

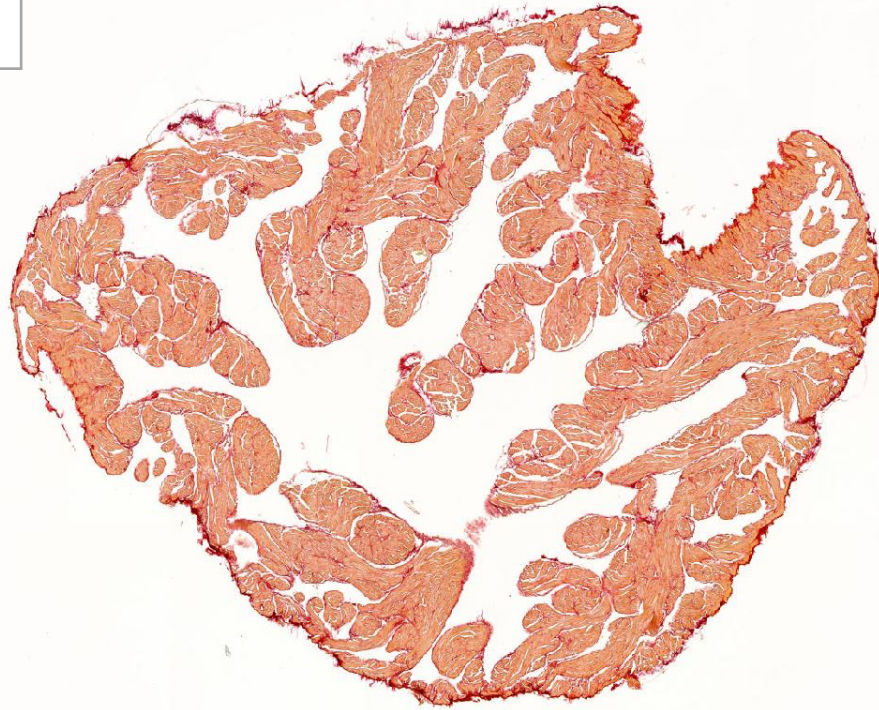
Durchführung:

Die Schnitte wurden anfänglich dreimal für je 10 min in Xylol entparaffiniert. Daraufhin wurden sie für je 2 min in Färbeküvetten mit einer absteigenden Alkoholreihe, bestehend aus 100 %, 90 % und 70 % Isopropanol, getaucht und anschließend für 5 min und daraufhin für 10 min in Aqua dest. gegeben. Es folgte die Färbung mit 0.1 %iger Siriusrot-Lösung für 60 min. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte zweimal kurz in Aqua dest. und einmal kurz in 70 %igem Isopropanol gespült. Abschließend wurden sie für jeweils 3 min in Färbeküvetten mit einer aufsteigenden Alkoholreihe, bestehend aus 90 % und 100 % Isopropanol, entwässert und drei Mal für je 3 min in Xylol geklärt. Als bald die Schnitte getrocknet waren, wurden sie mithilfe von Entellan® luftblasenfrei eingedeckt.

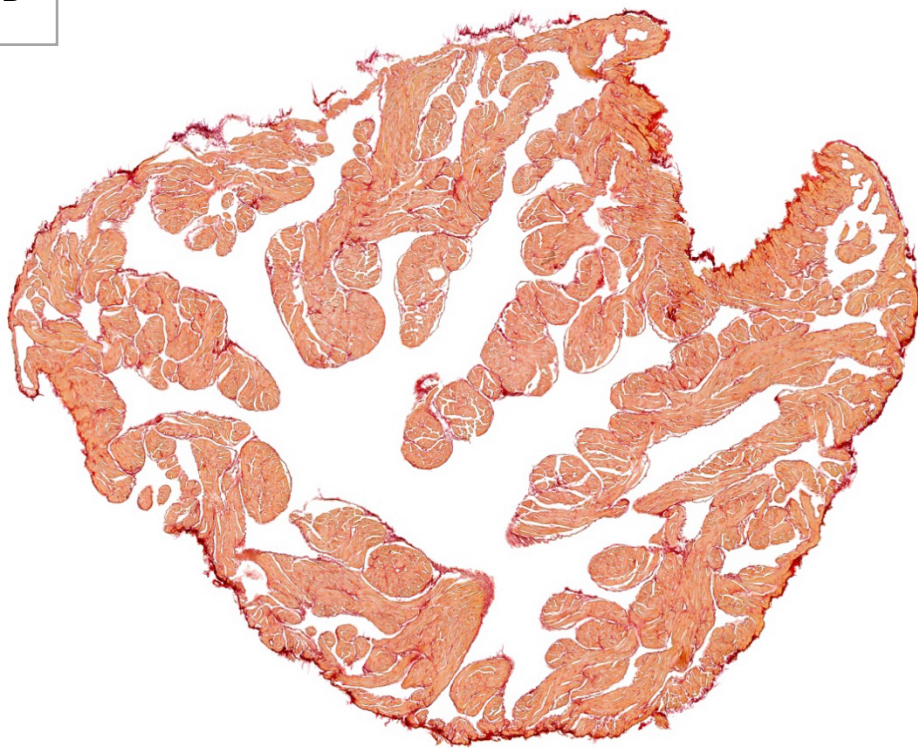
Auswertung:

Nach der Anfertigung digitaler Bilder mittels der auf dem Mikroskop (Leica Biosystems, Aperio Versa 8) befindlichen Kamera wurden die Bilder vor der Auswertung mittels des Computerprogramms GIMP 2.1 (GNU Image Manipulation Program) bearbeitet (vgl. Abb. 7). Für die Auswertung der Fibrose wurden Bereiche entfernt, die nicht ausgewertet werden sollten. Dazu zählten Artefakte und nicht zuordenbare Gewebereste. Für die Auswertung der interstitiellen Fibrose wurde zusätzlich sämtliche epikardiale, endokardiale und perivaskuläre Fibrose entfernt. Zur Auswertung (vgl. Abb. 8) sowohl der Fibrose als auch der interstitiellen Fibrose wurde das Programm NIS Elements (Nikon Instruments Europe B.V.) verwendet. Hierbei wurden alle rot gefärbten Areale markiert und deren prozentueller Anteil an der Gesamtfläche des Gewebes berechnet. Somit erhält man den prozentuellen Anteil der Fibrose und der interstitiellen Fibrose am Gesamtgewebe des linken Atriums. Hierbei wurde die Auswertung der linksatrialen Fibrose sechsmal und die der linksatrialen interstitiellen Fibrose fünfmal durchgeführt. Im Anschluss wurden die Mittelwerte für die jeweiligen Gruppen berechnet.

A



B



C



Abb. 7: Linkes Atrium nach Picro-Siriusrot-Färbung

A: Atrium ohne Bildbearbeitung

B: Atrium nach Bildbearbeitung für die Auswertung der Fibrose

C: Atrium nach Bildbearbeitung für die Auswertung der interstitiellen Fibrose

In der Bildbearbeitung für die Auswertung der Fibrose wurden Artefakte sowie nicht zuordenbare Gewebeanteile entfernt. In der Bildbearbeitung für die Auswertung der interstitiellen Fibrose wurde zusätzlich die epikardiale, endokardiale und perivaskuläre Fibrose entfernt.

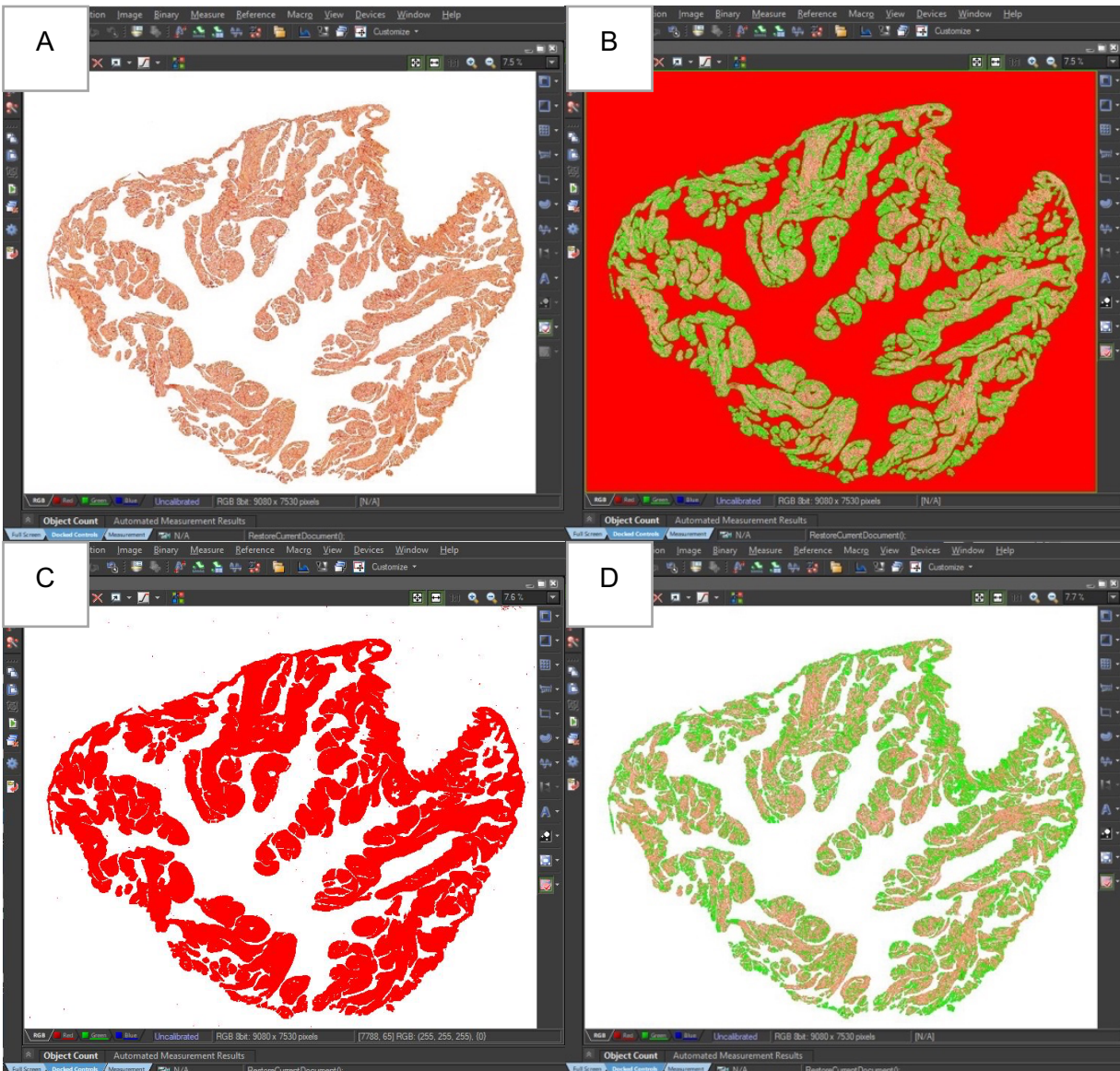


Abb. 8: Auswertung am Beispiel der interstitiellen Fibrose nach Picro-Siriusrot-Färbung

A: Atrium vor Beginn der Auswertung

B: Markierung des Hintergrunds

C: Gesamtfläche des Atriumgewebes nach Invertieren des Hintergrunds

D: Markierung aller rot gefärbten Areale stellvertretend für die interstitielle Fibrose

Zunächst muss der Hintergrund des Bilds markiert werden, um durch Invertieren die Gesamtfläche des Atriumgewebes zu erhalten. Im Anschluss werden alle rot gefärbten Atriumareale stellvertretend für die interstitielle Fibrose markiert. Der prozentuelle Anteil von interstitieller Fibrose am Gesamtgewebe wird berechnet, indem man den markierten Anteil von interstitieller Fibrose durch die Gesamtfläche des Gewebes dividiert. Die Auswertung der Fibrose läuft nach demselben Schema ab, allerdings ist dann zusätzlich noch die epikardiale, endokardiale und perivaskuläre Fibrose vorhanden.

3.2.3.3 F4/80-Färbung

Prinzip:

Mittels der F4/80-Färbung lässt sich die Makrophagendichte stellvertretend für inflammatorische Prozesse auswerten. F4/80 stellt ein Oberflächen-Glykoprotein diverser Makrophagen in Mäusen dar.^{47,66} Durch Bindung eines gegen F4/80 gekoppelten Primärantikörpers, der von einem Sekundärantikörper gebunden wird, Signalamplifikation und die Hinzugabe eines Fluorophors kommt es unter Anregung mit Licht einer definierten Wellenlänge (520-550 nm) zur Emission von rotem Licht. Die Zellkerne werden mit DAPI angefärbt und fluoreszieren bei einer Wellenlänge von 480-510 nm blau. Areale, in denen keine Antigen-Antikörper-Reaktion stattfindet, erscheinen unter dem Fluoreszenzmikroskop hingegen dunkel.

Durchführung:

Diese spezielle Färbung wurde von unserem Kooperationspartner in der Nephrologie (Frau Claudia Noll), Innere Medizin IV, Homburg/Saar durchgeführt. Dabei wurden die Schnitte zunächst in Xylol entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe, bestehend aus Ethanol, hydratisiert. Die Schnitte wurden daraufhin für 1 min in Aqua dest. gewaschen und für 5 min in 3 %igem H₂O₂ inkubiert, das in Aqua dest. verdünnt wurde. Es folgte ein erneutes Waschen mit Aqua dest.. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte für 20 min in einem Natrium-Citrat-Puffer, der 0.05 %iges Tween® 20 enthielt und der einen pH-Wert von 6 und eine Konzentration von 0.01 mol/L hatte, bei 95 °C inkubiert. Nachdem die Schnitte 10 min abgekühlt haben, wurden sie bei Raumtemperatur für je 5 min zweimal in Aqua dest. und einmal in 1x PBS (Phosphate-Buffered Saline: 137 mmol/L NaCl; 2.7 mmol/L KCl; 4.3 mmol/L Na₂HPO₄; 1.47 mmol/L KH₂PO₄, pH 7.4) gewaschen. Daraufhin erfolgte eine Inkubation in TNB-Puffer (0.1 mol/L Tris-HCL (pH 7.5), enthält 0.15 mol/L NaCl und 0.5% Blocklösung (PerkinElmer #FP1020)) für 30 min bei Raumtemperatur. Nach Entfernung des TNB-Puffers wurde der Primärantikörper Anti-mouse F4/80 aufgetragen, der in einem Verhältnis von 1:50 mit TNB-Puffer verdünnt wurde. Es folgte zunächst eine Inkubation über Nacht bei 4 °C für mindestens 15 h und daraufhin eine Inkubation bei 37 °C für 1 h. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte für je 5 min zweimal in 1x PBS gewaschen und der in einem Verhältnis von 1:200 mit TNB-Puffer verdünnte Sekundärantikörper, der mit Biotin konjugiert war, wurde aufgetragen. Nach einer Inkubationszeit von 30 min wurden die Schnitte erneut zweimal für je 5 min in 1x PBS gewaschen und daraufhin für 30 min mit dem Streptavidin-HRP-Antikörper inkubiert, der in einem Verhältnis von 1:100 mit TNB-Puffer verdünnt wurde. Es folgte ein erneutes zweimaliges Waschen für je 5 min in 1x PBS. Im Anschluss wurden die Schnitte zur weiteren Signalamplifikation für 10 min mit Biotinyl-Tyramid inkubiert, das in einem Verhältnis von 1:50 mit

Signal-Amplifikations-Verdünnungsmittel verdünnt wurde. Nach zweimaligem Waschen in 1x PBS für je 5 min wurden die Schnitte für 30 min bei 37 °C mit dem in einem Verhältnis von 1:50 mit HEPES-Puffer verdünnten SA-Fluorophor Texas red streptavidin inkubiert. Zum Abschluss wurden die Schnitte erneut zweimal für je 5 min in 1x PBS gewaschen und dann mit einem Mounting medium, das DAPI enthielt, benetzt und blasenfrei abgedeckt.

Auswertung:

Zur Auswertung der Makrophagendichte wurden digitale Bilder mittels des Fluoreszenzmikroskops (Leica Biosystems, Aperio Versa 8) angefertigt. Mithilfe des Computerprogramms Image Scope (Aperio) wurden alle F4/80-positiven Makrophagen markiert (vgl. Abb. 9) und deren Anteil an der Gesamtfläche des Atriumgewebes berechnet. Als Kriterium für einen F4/80-positiven Makrophagen galt das gleichzeitige Auftreten eines rot fluoreszierenden Signals für das Oberflächen-Glykoprotein F4/80 und eines blau fluoreszierenden Signals für einen Zellkern. Als Näherungswert für die Gesamtfläche des Atriumgewebes wurde die mittels des Computerprogramms NIS Elements (Nikon Instruments Europe B.V.) gemessene Gesamtfläche aus der Auswertung für die Fibrose zu Hilfe genommen (vgl. Abb. 10).

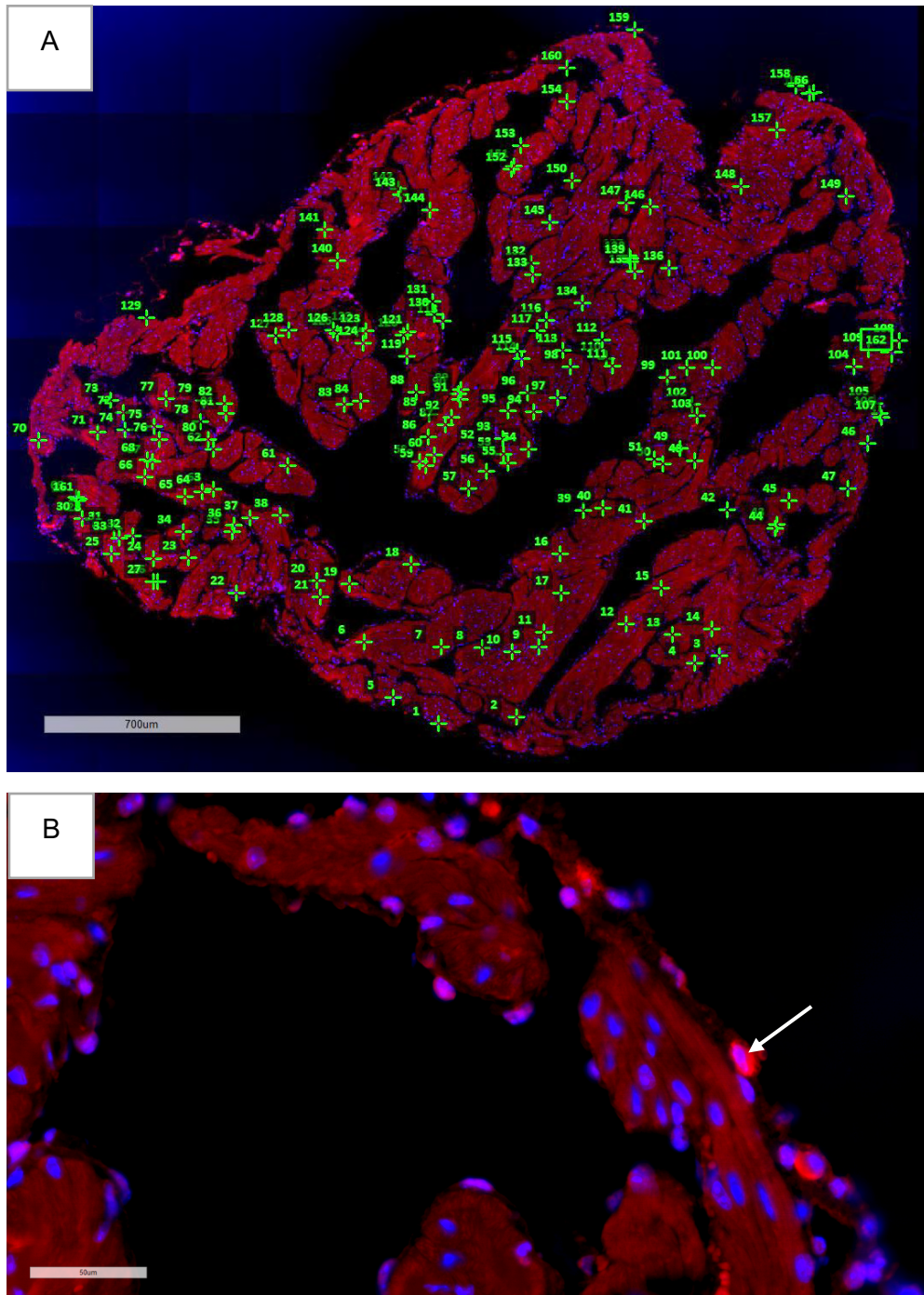


Abb. 9: Markierung der F4/80-positiven Makrophagen im Rahmen der F4/80-Färbung

A: Übersichtsaufnahme mit markierten Makrophagen

B: F4/80-positiver Makrophage (s. Pfeil); rot: F4/80, blau: DAPI

Das rote Fluoreszieren entsteht durch Bindung eines gegen F4/80 gekoppelten Primärantikörpers, der von einem Sekundärantikörper gebunden wird, Signalamplifikation und die Hinzugabe eines Fluorophors. Die Anzahl der F4/80-positiven Makrophagen wird durch die Gesamtfläche des Atriumgewebes dividiert, um die Makrophagendichte als Korrelat für die Inflammation zu quantifizieren.

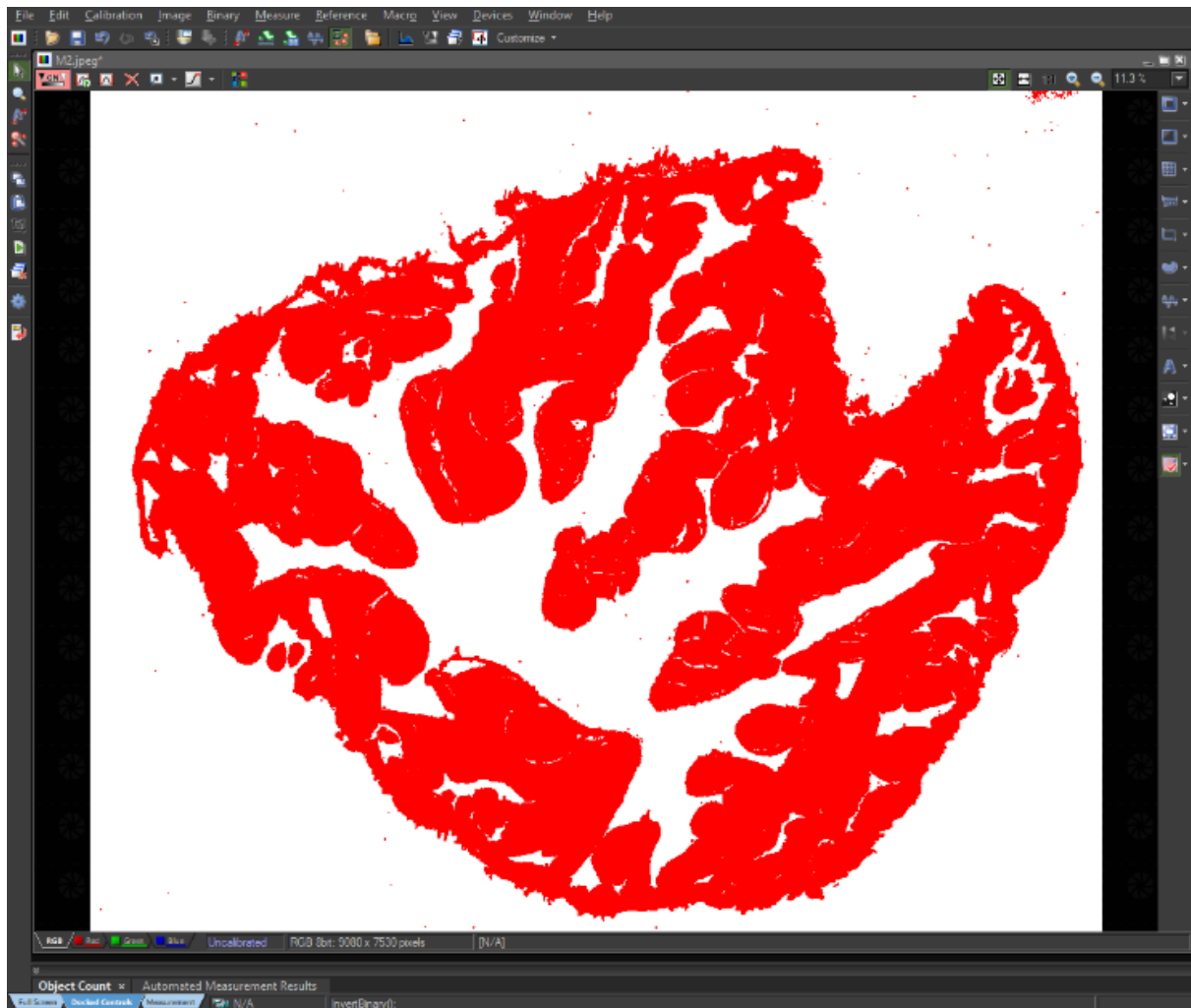


Abb. 10: Bestimmung der Gesamtgewebefläche des Atriumgewebes im Rahmen der Auswertung für die F4/80-Färbung

Als Näherungswert für die Gesamtfläche des Atriumgewebes wurde die gemessene Gesamtfläche aus der Auswertung für die Fibrose zu Hilfe genommen.

3.2.3.4 “Wheat Germ Agglutinin”-(WGA)-Färbung

Prinzip:

Die WGA-Färbung ist eine immunhistochemische Färbung, bei der die Anregung von mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppeltem Weizenkeimagglutinin (WGA) mit Licht einer definierten Wellenlänge (510-700 nm) zur Emission von grünem Licht führt. WGA bindet N-Acetylglucosamin und Sialinsäure.¹⁸ Die WGA-Färbung ist für die Darstellung der EZM geeignet, deren Komponenten reich an N-Acetylglucosamin sind.¹⁸ Areale des Gewebes, die nicht von WGA gebunden werden, erscheinen unter dem Fluoreszenzmikroskop dunkel.

Durchführung:

Zunächst wurden die Schnitte dreimal für je 10 min in Xylol entparaffiniert. Daraufhin wurden sie zweimal für je 5 min in Färbeküvetten mit 100 % Ethanol und danach einmal für je weitere 5 min in Färbeküvetten mit 80 % und 70 % Ethanol getaucht. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte zweimal für je 5 min in 1x PBS (Phosphate-Buffered Saline: 137 mmol/L NaCl; 2.7 mmol/L KCl; 4.3 mmol/L Na₂HPO₄; 1.47 mmol/L KH₂PO₄, pH 7.4) gegeben. Im Anschluss wurden die Schnitte in Plastikküvetten überführt, die mit Citraconsäure gefüllt waren. Die Citraconsäure musste stets mit 50 µl Citraconsäure und 100 ml Ampuwa® frisch angesetzt werden und sollte einen pH-Wert von 6.8 haben. Die Plastikküvetten wurden für 1 h in einem Wasserbad mit einer Temperatur von 95 °C belassen und mussten im Anschluss für 30 min abkühlen. Das Kochen in Citraconsäure führt zur Renaturierung der Proteine mit Wiedererlangen der natürlichen Form für die Antikörperbindung, die im Verlauf folgt. Es folgte ein zweimaliges Waschen für je 5 min mit 1x PBS. Die Schnitte wurden mit einem Fettstift umrandet, sodass die später aufzutragende Substanz auf dem Schnitt verbleibt. Das WGA-Fluorescein wurde in einem Verhältnis von 1:250 mit 1x PBS verdünnt und daraufhin auf die Schnitte gegeben. Dabei wurden pro Schnitt 50 µl der Lösung verwendet. Die Schnitte wurden für 1 h bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert und anschließend zweimal für je 5 min in Färbeküvetten mit 1x PBS-T (Phosphate-Buffered Saline: 137 mmol/L NaCl; 2.7 mmol/L KCl; 4.3 mmol/L Na₂HPO₄; 1.47 mmol/L KH₂PO₄, pH 7.4, 0.1% Tween® 20) und einmal in eine Färbeküvette mit 1x PBS getaucht. Zum Abschluss wurden die Schnitte mit einem Mounting medium, das DAPI enthielt, benetzt und blasenfrei abgedeckt.

Auswertung:

Zur Auswertung der Expansion der interstitiellen EZM wurden digitale Bilder mit dem Fluoreszenzmikroskop (Leica Biosystems, Aperio Versa 8) angefertigt. Da lediglich die interstitielle EZM-Expansion ausgewertet werden sollte, wurden mittels GIMP 2.1 (GNU Image Manipulation Program) epikardiale, endokardiale und perivaskuläre Anteile entfernt. Es wurde stets ein Ausschnitt aus dem Atriumgewebe ausgesucht, der die interstitielle EZM-Expansion des jeweiligen Atriums am besten repräsentierte, da einige Areale der atrialen Gewebe überstrahlt und somit nicht auswertbar waren. Die ausgewählten Bildausschnitte betrugen stets eine Größe von 400 µm mal 800 µm. Im Anschluss wurden mittels des Programms NIS Elements (Nikon Instruments Europe B.V.) alle grün fluoreszierenden Atriumareale der jeweiligen Bildausschnitte markiert und deren prozentueller Anteil an der Gewebefläche des jeweiligen Atriumausschnitts berechnet (vgl. Abb. 11).

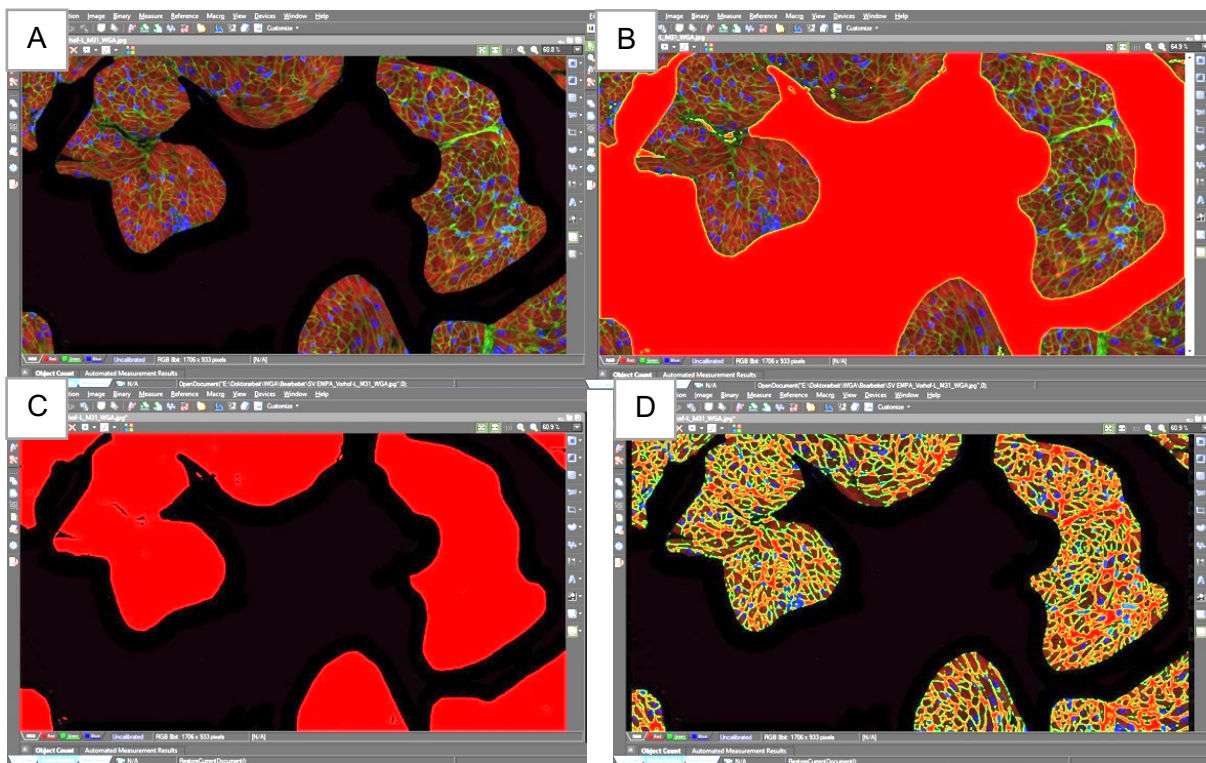


Abb. 11: Prinzip der Auswertung der Expansion der interstitiellen extrazellulären Matrix (EZM) im Rahmen der „Wheat Germ Agglutinin“-Färbung

- A:** Ausgewählter Bildausschnitt, der repräsentativ für das gezeigte Atrium gelten soll, ohne epikardiale, endokardiale und perivaskuläre Anteile; grün: Weizenkeimagglutinin, blau: DAPI
B: Markierung des Hintergrunds
C: Gewebefläche des Atriumausschnitts nach Invertieren des Hintergrunds
D: Markierung der grün fluoreszierenden Atriumareale

Zunächst muss der Hintergrund des Bilds markiert werden, um im Anschluss durch Invertieren die Gewebefläche des Atriumausschnitts zu erhalten. Zur Berechnung des prozentuellen Anteils der interstitiellen EZM an der Gewebefläche wurde der Anteil der grün fluoreszierenden Atriumareale durch die Gewebefläche dividiert.

3.2.3.5 Tyrosinhydroxylase-Färbung

Prinzip:

Die Tyrosinhydroxylase-Färbung eignet sich zur Darstellung sympathischer Nervenfasern. Prinzip hierbei ist die Bindung eines Tyrosinhydroxylase-Primärantikörpers an Tyrosinhydroxylase, einem Enzym in der Katecholamin-Biosynthese.¹³ Durch Hinzugabe eines Sekundärantikörpers, der an einen Fluoreszenzfarbstoff gebunden ist, kommt es unter Anregung mit Licht einer definierten Wellenlänge (510-700 nm) zur Emission von grünem Licht. Die Zellkerne werden mit DAPI angefärbt und fluoreszieren bei einer Wellenlänge von 480-510 nm blau. Areale des Gewebes, die nicht vom Primär- und Sekundärantikörper gebunden werden, erscheinen unter dem Fluoreszenzmikroskop hingegen dunkel.

Durchführung:

Zu Beginn wurden die Schnitte für 30 min auf eine Heizplatte gelegt und daraufhin dreimal für je 10 min in Xylol entparaffiniert. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte für je 5 min zweimal in Färbeküvetten mit 100 % Ethanol und daraufhin einmal für je 5 min in Färbeküvetten mit 80 % und 70 % Ethanol getaucht. Im Anschluss wurden sie zweimal für je 5 min in 1x PBS (Phosphate-Buffered Saline: 137 mmol/L NaCl; 2.7 mmol/L KCl; 4.3 mmol/L Na₂HPO₄; 1.47 mmol/L KH₂PO₄, pH 7.4) gewaschen. Es folgte das Überführen der Schnitte in Plastikküvetten, die mit Citraconsäure gefüllt waren. Der pH-Wert der stets mit 50 µl Citraconsäure, 100 ml Ampuwa® frisch anzusetzenden Citraconsäure sollte 6.8 betragen. Die Küvetten wurden für 1 h in einem Wasserbad mit einer Temperatur von 95 °C gekocht und kühlten im Anschluss für 20 min ab. Es folgte ein zweimaliges Waschen mit 1x PBS für je 5 min. Nach dem Umranden der Schnitte mit einem Fettstift wurde der Tyrosinhydroxylase-Primärantikörper, der in einem Verhältnis von 1:100 mit 1x PBS verdünnt wurde, aufgetragen. Die Schnitte wurden über Nacht bei 4 °C in der feuchten Kammer inkubiert. Am zweiten Tag erfolgte eine weitere Inkubation in der feuchten Kammer in einem 37 °C warmen Wasserbad für 2 h. Daraufhin wurden die Schnitte für je 5 min zweimal in 1x PBS-T (Phosphate-Buffered Saline: 137 mmol/L NaCl; 2.7 mmol/L KCl; 4.3 mmol/L Na₂HPO₄; 1.47 mmol/L KH₂PO₄, pH 7.4, 0.1% Tween® 20) und einmal in 1x PBS bei Raumtemperatur gewaschen. Nach dem Abtropfen der Schnitte wurde der in einem Verhältnis von 1:50 mit 1x PBS verdünnte Sekundärantikörper anti-Rabbit FITC aufgetragen. Der Sekundärantikörper ist an den Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceinisothiocyanat gekoppelt. Es folgte eine Inkubation der Schnitte für 2 h in der feuchten Kammer in einem Wasserbad mit 37 °C Temperatur. Im Anschluss wurden die Schnitte für je 5 min zweimal mit 1x PBS-T und einmal mit 1x PBS gewaschen. Zum Abschluss

wurden die Schnitte mit einem Mounting medium, das DAPI enthielt, benetzt und blasenfrei abgedeckt.

Auswertung:

Zur Auswertung der linksatrialen sympathischen Innervation wurden digitale Bilder mittels des Fluoreszenzmikroskops (Leica Biosystems, Aperio Versa 8) angefertigt. Mithilfe des Computerprogramms Image Scope (Aperio) wurden alle Tyrosinhydroxylase-positiven Nervenfasern markiert, wenn zudem zeitgleich ein blau fluoreszierendes Signal für den Zellkern vorlag (vgl. Abb. 12), und deren Anteil an der Gesamtfläche des Atriumgewebes berechnet. Als Näherungswert für die Gesamtfläche des Atriumgewebes wurde die bereits gemessene Gesamtfläche aus der Auswertung für die Fibrose zu Hilfe genommen (vgl. Abb. 13).

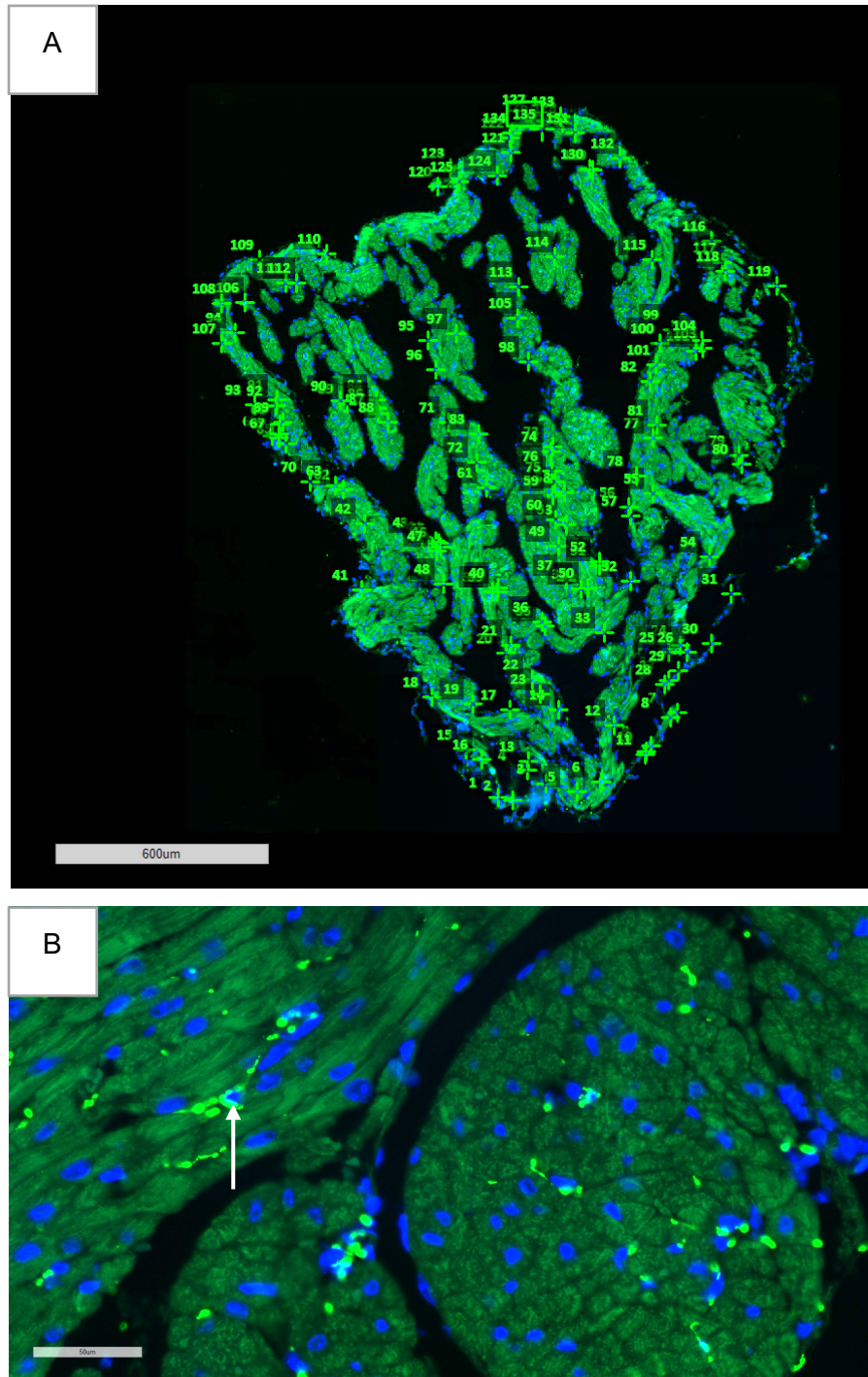


Abb. 12: Markierung der Tyrosinhydroxylase-(TH)-positiven Nervenfasern im Rahmen der Tyrosinhydroxylase-Färbung
A: Übersichtsaufnahme mit markierten TH-positiven Nervenfasern
B: Markierung einer TH-positiven Nervenfaser (s. Pfeil);
 grün: Tyrosinhydroxylase, blau: DAPI

Das Fluoreszieren entsteht durch eine Bindung des Sekundärantikörpers an den Primärantikörper, der wiederum an Tyrosinhydroxylase gebunden hat. Die Anzahl der fluoreszierenden Signale wird durch die Gesamtfläche des Atriumgewebes dividiert, um die atriale sympathische Innervation zu quantifizieren.

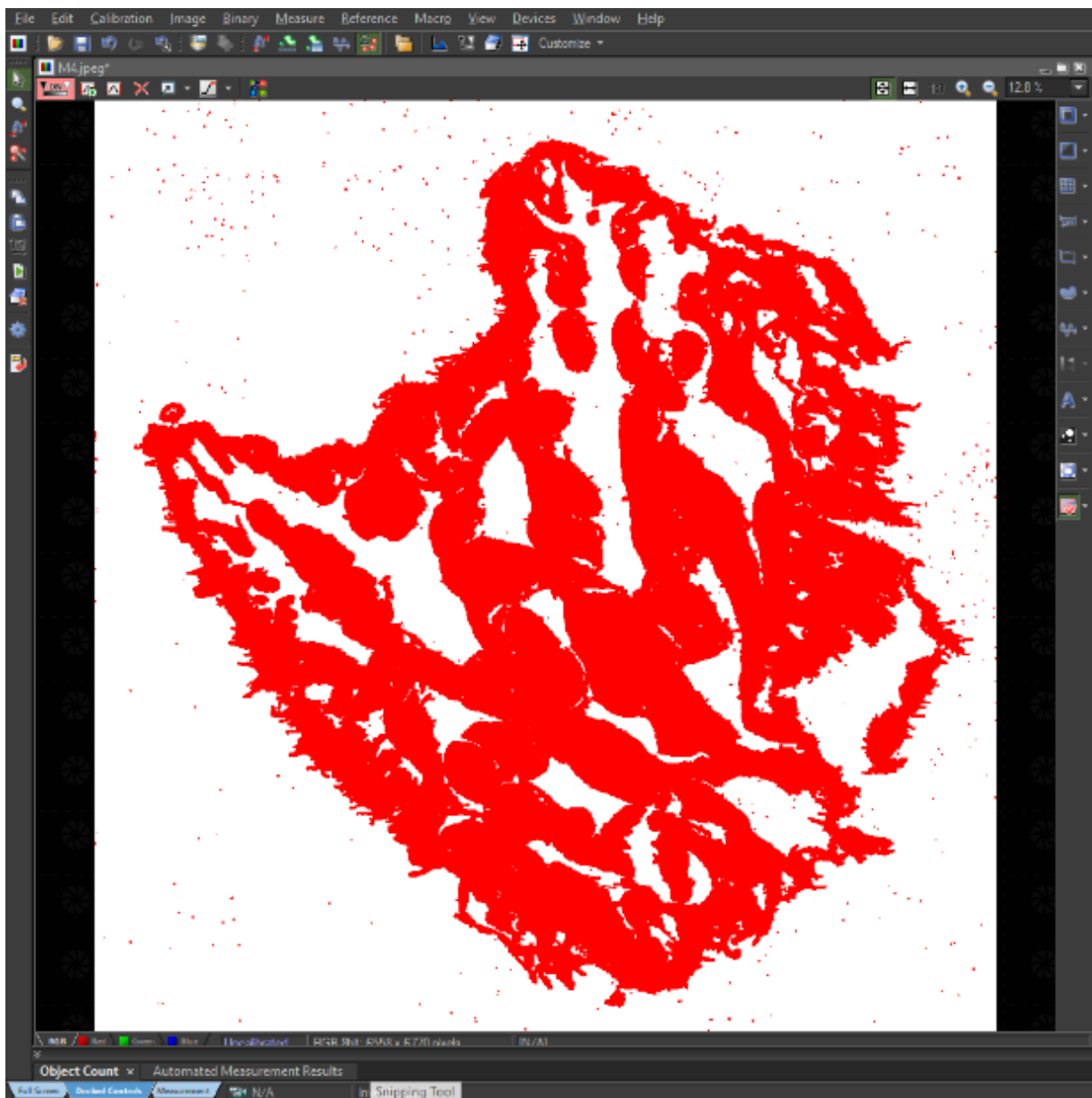


Abb. 13: Bestimmung der Gesamtgewebefläche des Atriumgewebes im Rahmen der Auswertung für die Tyrosinhydroxylase-Färbung

Als Näherungswert für die Gesamtfläche des Atriumgewebes wurde die bereits gemessene Gesamtfläche aus der Auswertung für die Fibrose zu Hilfe genommen.

3.2.4 Statistik

Für die statistische Analyse wurde das Computerprogramm GraphPad Prism 9.3.1 (La Jolla, USA) verwendet.

Mithilfe des „Kolmogorov-Smirnov“-Tests wurden die Daten auf Normalverteilung überprüft. Die Daten werden als Mittelwert $\pm$ SEM (standard error of mean [Standardfehler]) gezeigt.

Beim Vergleich der drei Gruppen wurde im Fall einer nicht-existierenden Normalverteilung die „Kruskal-Wallis“-Varianzanalyse inklusive „Dunn`s multiple comparison“-Test verwendet. Lag eine Normalverteilung vor, so wurde Gebrauch von der Varianzanalyse „one-way ANOVA“ (analysis of variance) mit „Tukey`s multiple comparison“-Test gemacht.

Sollten lediglich 2 normalverteilte Gruppen miteinander verglichen werden, wurde ein t-Test durchgeführt.

Für alle Auswertungen galt hierbei ein Signifikanzniveau von $p < 0.05$.

4 Ergebnisse

Um die Pathophysiologie der Substratbildung bei CKD besser zu verstehen, die eine atriale Arrhythmogenese begünstigen könnte, wurden die kardiomyozytäre Hypertrophie, der Fibrosegehalt, inflammatorische Prozesse und die Expansion der interstitiellen EZM, die Bestandteile des atrialen Remodelings darstellen, im linken Atrium von SV129-Mäusen mit CKD charakterisiert. Zudem wurde die linksatriale sympathische Innervation der Tiere mit CKD charakterisiert, da ein erhöhter Sympathikotonus zur Entwicklung eines proarrhythmogenen Substrats beiträgt.³⁰

4.1 Linksatriale Hypertrophie

Im Rahmen der Auswertung der linksatrialen Hypertrophie (vgl. Abb. 14) wurden lediglich die Atrien einberechnet, in denen > 30 Kardiomyozyten pro Atrium gemessen werden konnten, um einen aussagekräftigen Wert zu erhalten. Die Auswertung der linksatrialen Hypertrophie zeigte hierbei einen signifikanten Abfall des Kardiomyozyten-Diameters der Mäuse mit CKD im Vergleich mit der Kontrollgruppe ($p=0.037$). Während die Kontrollgruppe einen mittleren Kardiomyozyten-Diameter von $16.6 \pm 0.8 \mu\text{m}$ besaß, betrug der mittlere Kardiomyozyten-Diameter bei den Mäusen mit CKD lediglich $13.65 \pm 0.2 \mu\text{m}$. Die Gabe von Empagliflozin in der Behandlungsgruppe führte zu keinen signifikanten Veränderungen im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Hier betrug der mittlere Kardiomyozyten-Diameter $13.97 \pm 0.4 \mu\text{m}$ ($p=0.07$ gegen Kontrolle). Beim Vergleich der Behandlungsgruppe mit den Mäusen mit CKD war kein signifikanter Unterschied nachzuweisen ($p=0.99$).

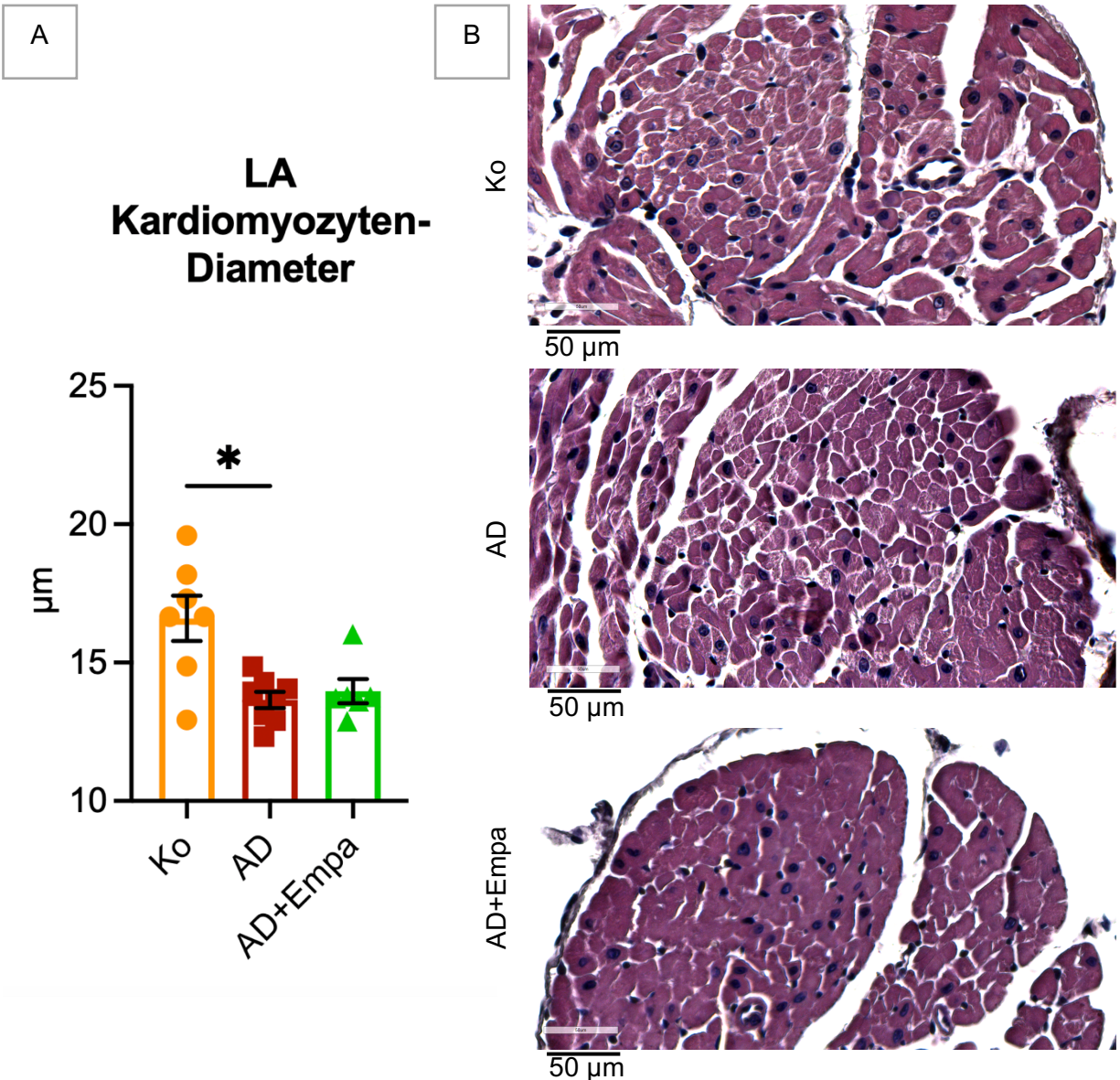


Abb. 14: Linksatriale (LA) Hypertrophie

A: Ausgemessene Kardiomyozyten-Diameter in μm der linken Atrien der Kontrollgruppe (Ko; $n=7$), der Adenin-Gruppe (AD; $n=8$) und der Behandlungsgruppe (AD+Empa; $n=6$). Die Ergebnisse sind als Mittelwert $\pm$ SEM dargestellt. Als statistische Tests dienten der „Kruskal-Wallis“-Test mit „Dunn’s multiple comparison“-Test. (* $p<0.05$)

B: Repräsentative Bildausschnitte der Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Schnitte von Ko, AD und AD+Empa.

4.2 Linksatrialer Fibrosegehalt

Die linksatriale Fibrose setzt sich zusammen aus epikardialer, endokardialer, perivaskulärer und interstitieller Fibrose.

4.2.1 Linksatriale Fibrose

In der Auswertung der linksatrialen Fibrose (vgl. Abb. 15) konnte zwischen der Kontrollgruppe und der Adenin-Gruppe kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p=0.61$). Die linken Atrien der Kontrollgruppe waren zu 7.58 ± 0.4 % fibrosiert, während die der Adenin-Gruppe eine Fibrose von 6.85 ± 0.7 % aufwiesen. Nach Gabe vom Empagliflozin sank die Fibrose auf einen Wert von 5.14 ± 0.3 %. Im Vergleich der Behandlungsgruppe mit der Kontrollgruppe konnte ein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p=0.007$). Der Vergleich der Behandlungsgruppe mit der Adenin-Gruppe zeigte in der Varianzanalyse „one-way ANOVA“ (analysis of variance) mit „Tukey’s multiple comparison“-Test einen nicht signifikanten Wert ($p=0.07$). Beim Vergleich lediglich dieser beiden Gruppen mittels eines t-Tests ließ sich allerdings ein signifikanter Abfall der Fibrose in der Behandlungsgruppe nachweisen ($p=0.047$).

4.2.2 Linksatriale interstitielle Fibrose

Im Rahmen der Auswertung der linksatrialen interstitiellen Fibrose (vgl. Abb. 15) wies die Kontrollgruppe einen interstitiellen Fibrosegehalt von 3.61 ± 0.2 % auf, die Adenin-Gruppe einen Gehalt von 4.19 ± 0.4 % ($p=0.49$ verglichen gegen Ko). Durch Gabe von Empagliflozin sank die interstitielle Fibrose auf einen Gehalt von 2.67 ± 0.3 % ab. Diese Reduktion war im Vergleich mit der Adenin-Gruppe signifikant ($p=0.013$). Im Vergleich mit der Kontrollgruppe war die Reduktion der interstitiellen Fibrose in der Behandlungsgruppe nicht signifikant ($p=0.16$).

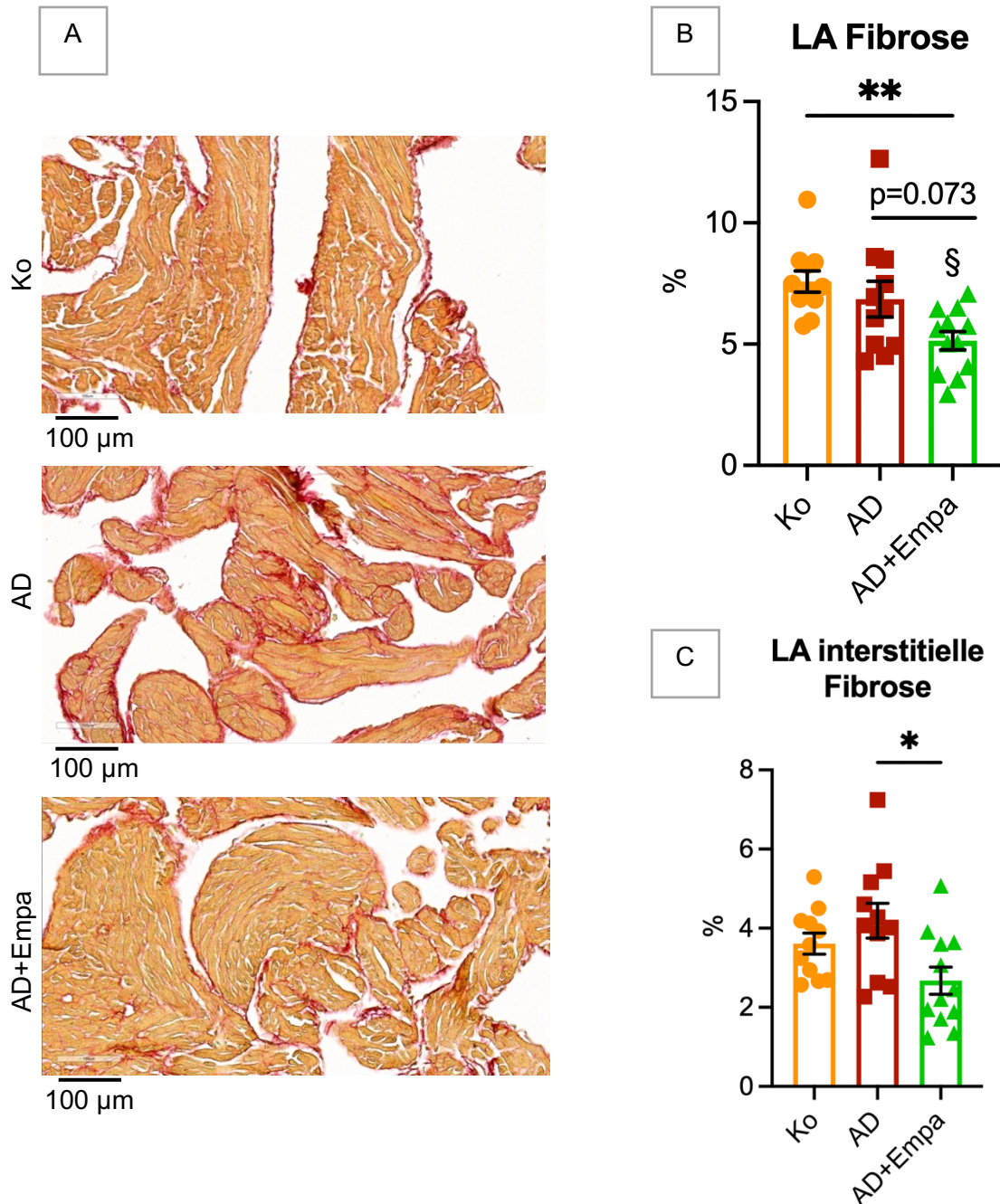


Abb. 15: Linksatrialer (LA) Fibrosegehalt

A: Repräsentative Bildausschnitte der Picro-Siriusrot-gefärbten Schnitte der Kontrollgruppe (Ko), der Adenin-Gruppe (AD) und der Behandlungsgruppe (AD+Empa) für die linksatriale Fibrose, bestehend aus epikardialer, endokardialer, perivaskulärer und interstitieller Fibrose.

B: Prozentueller Anteil an linksatrialer Fibrose von Ko (n=11), AD (n=11) und AD+Empa (n=12).

C: Prozentueller Anteil an linksatrialer interstitieller Fibrose von Ko (n=11), AD (n=11) und AD+Empa (n=12).

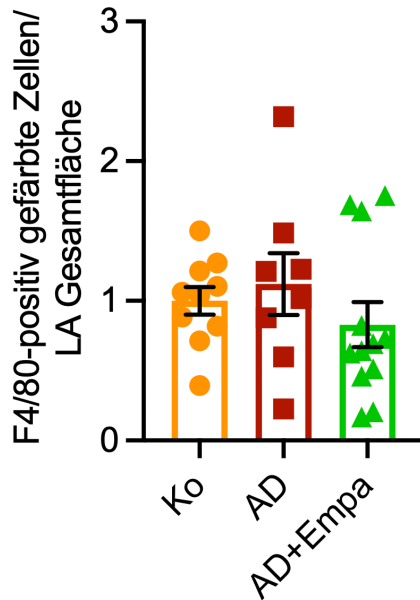
Die Ergebnisse sind als Mittelwert±SEM dargestellt. Als statistische Tests dienen die Varianzanalyse „one-way ANOVA“ (analysis of variance) mit „Tukey’s multiple comparison“-Test und der t-Test. (*p<0.05, **p<0.01; §p<0.05 AD gegen AD+Empa (t-Test))

4.3 Linksatriale Inflammation

Im Rahmen der Auswertung der Makrophageninfiltration für die linksatriale Inflammation (vgl. Abb. 16) waren in der Kontrollgruppe 1.0 ± 0.09 positiv gefärbte Zellen pro linksatrialer Gesamtfläche vorzufinden. Nach 16-wöchiger Adenin-Diät stieg der Anteil der Zellen, die sich positiv anfärben ließen, im Vergleich mit der Kontrollgruppe nicht signifikant auf 1.12 ± 0.2 positiv gefärbte Zellen pro linksatrialer Gesamtfläche an ($p=0.99$). Durch die Gabe von Empagliflozin konnte ein Abfall der Makrophageninfiltration beobachtet werden. Es führte zu einer Reduktion der linksatrialen F4/80-positiven Zellen auf 0.83 ± 0.1 positiv gefärbte Zellen pro linksatrialer Gesamtfläche, die im Vergleich mit der Adenin-Gruppe allerdings nicht signifikant war ($p=0.62$). Der Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Behandlungsgruppe war nicht signifikant ($p=0.63$).

A

LA Makrophageninfiltration



B

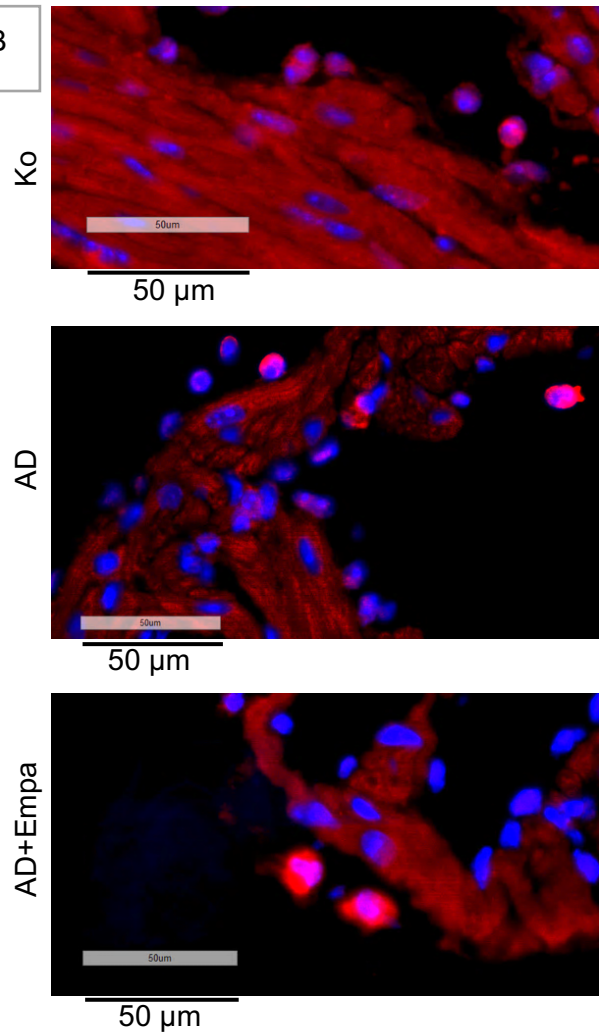


Abb. 16: Linkatriale (LA) Inflammation

A: Anzahl F4/80-positiv gefärbter Zellen pro linksatrialer Gesamtfläche der Kontrollgruppe (Ko; n=10), der Adenin-Gruppe (AD; n=8) und der Behandlungsgruppe (AD+Empa; n=12). Die Ergebnisse sind als Mittelwert±SEM dargestellt. Als statistische Tests dienten der „Kruskal-Wallis“-Test mit „Dunn’s multiple comparison“-Test.

B: Repräsentative Bildausschnitte der F4/80-gefärbten Schnitte von Ko, AD und AD+Empa. Rot: F4/80, blau: DAPI

4.4 Expansion der linksatrialen interstitiellen extrazellulären Matrix

Im Rahmen der Auswertung der Expansion der linksatrialen interstitiellen EZM (vgl. Abb. 17) konnte in der Kontrollgruppe ein durchschnittlicher Anteil von 41.31 ± 1.8 % interstitieller EZM an den Gewebeausschnitten der Atrien festgestellt werden. Dieser Anteil stieg in der Adenin-Gruppe im Vergleich mit der Kontrollgruppe nicht signifikant auf 44.47 ± 2.4 % an ($p=0.57$). Die Gabe von Empagliflozin führte zu einer Reduktion der interstitiellen EZM auf 40.65 ± 2.2 %, die im Vergleich mit der Adenin-Gruppe allerdings nicht signifikant war ($p=0.43$). Im Vergleich mit der Kontrollgruppe war die Reduktion der interstitiellen EZM nicht signifikant ($p=0.97$).

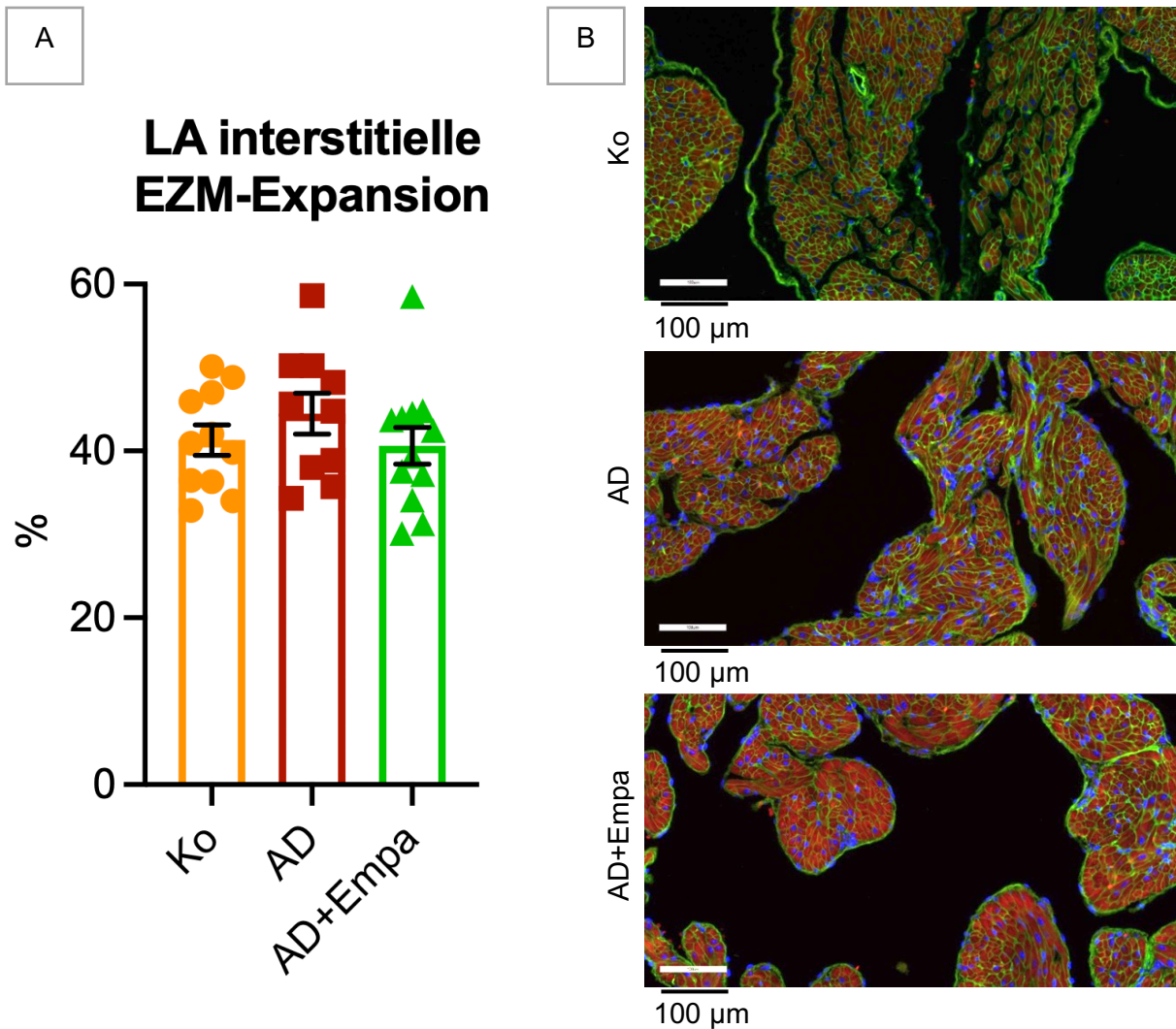


Abb. 17: Expansion der linksatrialen (LA) interstitiellen extrazellulären Matrix (EZM)

A: Prozentueller Anteil der interstitiellen EZM an den linksatrialen Gewebeausschnitten der Kontrollgruppe (Ko; n=11), der Adenin-Gruppe (AD; n=10) und der Behandlungsgruppe (AD+Empa; n=12). Die Ergebnisse sind als Mittelwert±SEM dargestellt. Als statistische Tests dienten die Varianzanalyse „one-way ANOVA“ (analysis of variance) mit „Tukey’s multiple comparison“-Test.

B: Repräsentative Bildausschnitte der „Wheat Germ Agglutinin“- (WGA)-gefärbten Schnitte von Ko, AD und AD+Empa. Grün: Weizenkeimagglutinin, blau: DAPI.

4.5 Linksatriale sympathische Innervation

Die Auswertung der linksatrialen Expression der Tyrosinhydroxylase als Marker für die sympathische Innervation (vgl. Abb. 18) zeigte in der Kontrollgruppe 1.0 ± 0.1 Tyrosinhydroxylase-positive Nervenfasern pro linksatrialer Gesamtfläche. Die Adenin-Diät führte zu einem signifikanten Anstieg Tyrosinhydroxylase-positiver Nervenfasern im Vergleich mit der Kontrollgruppe ($p=0.047$). Durch die Adenin-Diät stieg der Anteil Tyrosinhydroxylase-positiver Nervenfasern pro linksatrialer Gesamtfläche auf 1.58 ± 0.1 an. Die Gabe von Empagliflozin reduzierte den Anteil Tyrosinhydroxylase-positiver Nervenfasern pro linksatrialer Gesamtfläche auf 1.28 ± 0.1 , allerdings war dieser Abfall nicht signifikant im Vergleich mit der Adenin-Gruppe ($p=0.39$). Zwischen der Kontrollgruppe und der Behandlungsgruppe war kein signifikanter Unterschied zu erkennen ($p=0.44$).

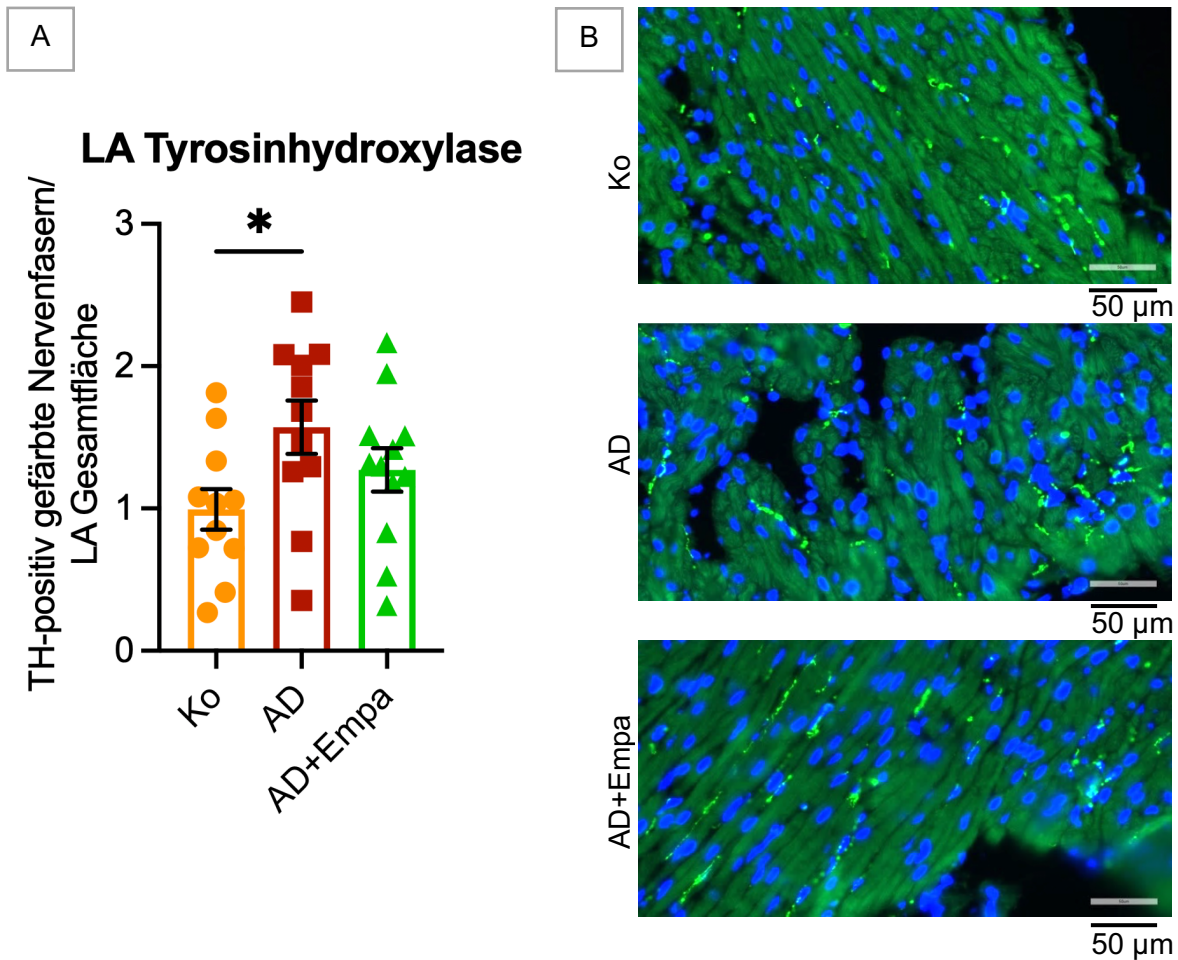


Abb. 18: Linksatriale (LA) sympathische Innervation

A: Anzahl Tyrosinhydroxylase-(TH)-positiv gefärbter Nervenfasern pro linksatrialer Gesamtfläche der Kontrollgruppe (Ko; n=11), der Adenin-Gruppe (AD; n=11) und der Behandlungsgruppe (AD+Empa; n=12). Die Ergebnisse sind als Mittelwert $\pm$ SEM dargestellt. Als statistische Tests dienen die Varianzanalyse „one-way ANOVA“ (analysis of variance) mit „Tukey’s multiple comparison“-Test. (*p<0.05)

B: Repräsentative Bildausschnitte der Tyrosinhydroxylase-gefärbten Schnitte von Ko, AD und AD+Empa. Grün: Tyrosinhydroxylase, blau: DAPI.

5 Diskussion

VHF stellt mit einer Prävalenz von 15-20 % eine nicht zu vernachlässigende Komplikation im Rahmen einer CKD dar.⁸⁰ Demzufolge ist die Charakterisierung sowohl der hierbei zugrundeliegenden Pathomechanismen als auch der möglichen Therapieansätze von großer Bedeutung. Für die Entstehung von VHF werden ein auslösender Trigger und ein Substrat benötigt. Das Substrat dient der Aufrechterhaltung des VHF und kann sowohl strukturell als auch elektrisch sein.³⁴ Das linke, erkrankte Atrium stellt die Mehrheit aller Trigger und Substrate bereit.³⁰ Im Rahmen dieser Arbeit wurden deshalb die kardiomyozytäre Hypertrophie, der Fibrosegehalt, die Expansion der interstiellen EZM, inflammatorische Prozesse und die sympathische Innervation im linken Atrium von SV129-Mäusen mit CKD charakterisiert, um die Pathophysiologie der Substratbildung bei CKD besser zu verstehen, die eine atriale Arrhythmogenese begünstigen könnte. Als möglicher therapeutischer Ansatz wurde der Einfluss einer SGLT2-Inhibition mittels Empagliflozin auf das linksatriale Remodeling und die linksatriale sympathische Innervation charakterisiert.

5.1 Linksatriale Hypertrophie

Die Hypertrophie der linksatrialen Kardiomyozyten ist Bestandteil des atrialen Remodelings und stellt somit ein Substrat für VHF dar. Die genaue Rolle der Hypertrophie der Kardiomyozyten wird hierbei jedoch noch kontrovers diskutiert.⁶⁸ In den CKD-Stadien 3-5 leiden ca. 75 % der Betroffenen unter einer diastolischen Dysfunktion, die konsekutiv über einen Druckanstieg im linken Atrium zu einer atrialen Dilatation führt, die wiederum als Risikofaktor für die Entwicklung von VHF gilt.⁵⁸ Es gilt zu beachten, dass eine atriale Dilatation zwar meist, allerdings nicht immer mit einer Hypertrophie einhergeht.⁶⁸ Hee et al. stellten bei Personen mit einer GFR < 60 ml/min/1.73 m² im Vergleich mit Personen mit einer GFR ≥ 60 ml/min/1.73 m² einen signifikant größeren linksatrialen Volumenindex fest.²⁶ Auch in einem CKD-Modell mit Sprague Dawley Ratten, die einer 5/6-Nephrektomie unterzogen wurden, konnte eine signifikante Dilatation des linken Atriums festgestellt werden. Zudem ließ sich eine Hypertrophie der linksatrialen Kardiomyozyten vermuten.⁶⁰ Ebenso konnten Li et al. in ihrer Studie an C57BL/6J-Mäusen, die einer 5/6-Nephrektomie unterzogen wurden, eine signifikante kardiomyozytäre Hypertrophie feststellen.⁴⁵ In einem Ratten-Modell mit Adenin-induzierter CKD konnte hingegen gezeigt werden, dass eine Vergrößerung des linken Atriums und eine erhöhte Induzierbarkeit von VHF mit keiner Veränderung der atrialen Kardiomyozyten-Größe assoziiert war.²⁷

Wenngleich in der Theorie eine kardiale Hypertrophie im Verlauf einer CKD zu erwarten wäre, so muss dennoch festgestellt werden, dass dies in den Tierversuchen an Mäusen nicht immer der Fall ist. In einer Studie von Wollenhaupt et al., in der insgesamt acht verschiedene CKD-Modelle an verschiedenen Maus-Stämmen durchgeführt wurden, konnte in keinem der Modelle eine kardiale Hypertrophie festgestellt werden. Auch eine kardiale Dysfunktion war nach Durchführung der Versuche nicht vorzufinden. Eines der acht Modelle ähnelt dem Modell unserer Studie am meisten: hier erhielten SV129-Mäuse für 13 Wochen 0.15 % Adenin-haltiges Futter. Dieses Modell musste aufgrund von zu starkem Gewichtsverlust und des Gesundheitszustands der Mäuse in der 13. Woche jedoch abgebrochen werden. Bei den Mäusen mit CKD kam es im Vergleich mit der Kontrollgruppe zu einem nicht signifikanten Abfall des ventrikulären Kardiomyozyten-Diameters.⁸¹ In unserer Studie konnte in den SV129-Mäusen mit Adenin-induzierter CKD ebenfalls keine Zunahme des Kardiomyozyten-Diameters in den Atrien festgestellt werden. Stattdessen lag eine signifikante Abnahme im Vergleich mit der Kontrollgruppe vor. Die Pathophysiologie hinter diesem Mechanismus bleibt zu klären. Die Gabe von Empagliflozin konnte in unserer Studie die Verringerung des linksatrialen Kardiomyozyten-Diameters nicht wieder auf das Niveau der Kontrollgruppe anheben.

Es existieren bereits klinische und experimentelle Daten, die einen positiven Effekt von SGLT2-Inhibitoren hinsichtlich der Reduktion der kardialen Hypertrophie zeigen. In der DAPA-LVH-Studie beispielsweise wurde bei Personen mit Diabetes mellitus Typ 2 und linksventrikulärer Hypertrophie festgestellt, dass die Gabe von Dapagliflozin zu einer signifikanten Reduktion der linksventrikulären Masse führt.⁶ Fan et al. stellten in einer Meta-Analyse fest, dass SGLT2-Inhibitoren, darunter besonders Empagliflozin, bei Patient*innen mit Herzinsuffizienz kardiale Remodelingprozesse, darunter auch den linksatrialen Volumenindex, signifikant reduzieren.¹⁹ In einer experimentellen Studie von Chowdhury et al. mit Sprague Dawley Ratten mit Monocrotalin-induzierter pulmonalarterieller Hypertonie konnte nach täglicher Gabe von Empagliflozin ein Rückgang der rechtsventrikulären Hypertrophie festgestellt werden.¹² Zur Klärung, ob solche Effekte auch im linken Atrium im Rahmen einer urämischen Kardiomyopathie auftreten, müssen weitere Studien durchgeführt werden.

5.2 Linksatrialer Fibrosegehalt und Expansion der linksatrialen interstitiellen extrazellulären Matrix

Einer der wichtigsten Akteure bei der Entstehung des proarrhythmogenen Substrats bei VHF scheint die atriale Fibrose zu sein.⁶⁸ Das Myokard besteht zu 60 % aus kardialen Fibroblasten, die eine große Rolle bei der Bildung der EZM spielen.⁷⁰ Bei einer übermäßigen Ansammlung von EZM, die wiederum überwiegend aus Kollagen besteht, spricht man von Fibrose.⁵⁷ Obwohl Fibroblasten nicht erregt werden können, ist es ihnen mittels Connexinen möglich, elektrische Ströme zwischen den Kardiomyozyten weiterzuleiten. Proarrhythmogene Konsequenzen sind mitunter verkürzte Aktionspotentiale, eine inhomogene Reizweiterleitung und eine Depolarisierung von Kardiomyozyten.⁷⁰

Der Einfluss einer CKD auf die Entwicklung von kardialer Fibrose wurde bereits charakterisiert: aufgrund der chronischen Inflammation, der Überaktivität des RAAS und des sekundären Hyperparathyreoidismus im Rahmen einer CKD wird die kardiale Fibrosierung gefördert.^{57,42}

In dem 5/6-Nephrektomie-Modell an Sprague Dawley Ratten konnten Qiu et al. feststellen, dass die durch die Prozedur induzierte CKD mit einem signifikanten Anstieg der linksatrialen interstitiellen Fibrose verbunden war.⁶⁰ Ebenso konnten Hohl et al. an Sprague Dawley Ratten eine CKD mittels 0.25%iger Adenin-Diät über einen Zeitraum von 16 Wochen induzieren, die ebenfalls in einen signifikanten Anstieg an linksatrialer interstitieller Fibrose resultierte.³⁰ In unserem hier beschriebenen Maus-Adenin-Modell konnte in der Adenin-Gruppe keine signifikante Veränderung des linksatrialen Fibrosegehalts festgestellt werden. Ursächlich für die hohe Streuung innerhalb der Gruppen könnten, neben der biologischen Varianz der SV129-Tiere, eine zu milde CKD oder eine zu kurze Krankheitsdauer gewesen sein, deren kardiale Auswirkungen noch nicht stark genug waren. Zudem muss die Methodik beim Vergleich solcher Studien beachtet werden. Im Vergleich mit der Studie von Qiu et al. muss beachtet werden, dass 5/6-Nephrektomien für einen rapiden Verlust von Nierenmasse sorgen und demnach nicht mit dem progressiven Verlauf einer CKD beim Menschen gleichzusetzen sind.³⁶ In unserem Modell wurde eine Adenin-haltige Diät gewählt, die im Verlauf zu einer CKD führt.³⁵ Signifikante kardiale Schäden sind somit vermutlich erst im späteren Verlauf festzustellen.

Im Vergleich mit der Studie von Hohl et al. muss der Adenin-Gehalt im Rahmen der Adenin-Diät beachtet werden. Während Hohl et al. über 16 Wochen lang Sprague Dawley Ratten kontinuierlich 0.25 % Adenin-haltiges Futter verabreichten, wurde in unserer Maus-Studie ein Adenin-Modell mit

wechselnden Konzentrationen von 0.1 % bzw. von 0.2 % Adenin-haltigem Futter durchgeführt. Es ist demnach mit einem größeren Einfluss der 0.25%igen Konzentration zu rechnen, was den signifikanten Anstieg der interstitiellen Fibrose erklären könnte.

Die Wahl der Versuchstiere spielt im Vergleich von Studien ebenfalls eine Rolle. Während in den Studien von Qiu et al. und Hohl et al. jeweils Ratten verwendet wurden, wurden in unserer Studie Mäuse gewählt. Die morphologischen Unterschiede zwischen verschiedenen Tierarten können eine Erklärung dafür sein, weshalb die Tiere jeweils unterschiedlich auf schädigende Einflüsse reagieren. Zudem muss bedacht werden, dass experimentelle Ergebnisse aus Tierversuchen nicht immer genau das Outcome von klinischen Studien an Patient*innen widerspiegeln.⁷

Durch die Gabe von Empagliflozin konnten in der Behandlungsgruppe sowohl die Fibrose, bestehend aus epikardialer, endokardialer, perivaskulärer und interstitieller Fibrose, als auch die interstitielle Fibrose signifikant gesenkt werden. Dies lässt vermuten, dass hierdurch auch das Auftreten von VHF im Rahmen einer CKD reduziert werden könnte, was einen vielversprechenden Therapieansatz darstellen würde. Hierfür müssen in der Zukunft jedoch weitere Studien durchgeführt werden. In der experimentellen Studie von Lin et al. wurden adipöse Mäuse mit Diabetes mellitus Typ 2 für 10 Wochen mit Empagliflozin behandelt. Einer der vielen Therapieeffekte war auch hier die signifikante Reduktion der kardialen interstitiellen Fibrose.⁴⁶ Ebenso konnten Chowdhury et al. bei Sprague Dawley Ratten mit Monocrotalin-induzierter pulmonaler arterieller Hypertonie durch die Gabe von Empagliflozin eine Reduktion der rechtsventrikulären Fibrose erreichen.¹² Auch Li et al. kamen in ihrer Studie an Mäusen mit Diabetes mellitus Typ 2 zu einer ähnlichen Erkenntnis. Hierbei konnte durch die Gabe von Empagliflozin die kardiale Fibrose, die im Rahmen der diabetischen Kardiomyopathie entstanden war, signifikant reduziert werden. Des Weiteren sank der oxidative Stress im Myokard signifikant ab.⁴³

Zu den Auswirkungen einer Empagliflozin-Behandlung bei CKD auf die Entstehung eines proarrhythmogenen Substrates im Atrium gibt es noch keine experimentellen Daten. Es ist bekannt, dass bei CKD-Patient*innen der oxidative Stress erhöht ist.⁵⁹ Oxidativer Stress stellt wiederum einen begünstigenden Faktor für die Entstehung von VHF im Rahmen einer CKD dar.⁸⁰ Eine neueste Studie an Ratten mit Diabetes mellitus Typ 2 konnte zeigen, dass Empagliflozin die mitochondriale Produktion von oxidativem Stress inhibierte und so die Bildung von Fibrose und die Auslösbarkeit atrialer Tachyarrhythmien reduzierte.⁴¹ Dieser protektive Mechanismus wäre auch bei unserem Maus-CKD-Modell denkbar, jedoch müssen weitere Studien durchgeführt werden, um zu prüfen, ob SGLT2-Inhibitoren auch im Rahmen einer CKD einen Einfluss auf den oxidativen Stress haben.

Die linksatriale Expansion der interstitiellen EZM stieg in unserem Modell bei der Adenin-Gruppe im Vergleich mit der Kontrollgruppe leicht an und die Gabe von Empagliflozin konnte zu einer Reduktion der Expansion der interstitiellen EZM führen, allerdings waren diese Änderungen jeweils gering und nicht signifikant. Da bei dieser Auswertung aufgrund methodischer Probleme bei der histologischen Darstellung der interstitiellen EZM lediglich kleine Ausschnitte der Atrien ausgewertet werden konnten, mangelt es bei den Ergebnissen der linksatrialen interstitiellen EZM-Expansion an Aussagekraft und es können keine valide Interpretation und Vergleich der Daten zum Fibrosegehalt zugelassen werden.

5.3 Linksatriale Inflammation

CKD-Patient*innen leiden unter einer chronischen Inflammation, die auch kardiale Konsequenzen hat.⁵⁷ Zu den Merkmalen einer chronischen Inflammation gehört u.a. die erhöhte Ausschüttung von diversen Zytokinen, IGF-1 und Galectin-3 durch Makrophagen. Folgen dieser vermehrten Ausschüttung sind u.a. die Förderung von kardiomyozytärer Hypertrophie und die Verschlechterung sowohl der kardialen Fibrose als auch der kardialen Dysfunktion.^{57,78} Durch die Förderung der atrialen Remodelingprozesse stellt die Inflammation im Rahmen der CKD somit einen begünstigenden Faktor für VHF dar.⁸⁰

In unserer Studie haben wir geprüft, inwiefern sich eine CKD auf die linksatriale Makrophagendichte auswirkt. Hierbei galt die linksatriale Makrophagendichte repräsentierend für inflammatorische Prozesse. Im Vergleich mit der Kontrollgruppe konnte in den Mäusen mit CKD ein geringer Anstieg der Makrophagendichte festgestellt werden, der allerdings nicht signifikant war. Ursächlich hierfür könnten, ebenso wie bei der linksatrialen interstitiellen Fibrose, eine zu milde CKD oder eine zu kurze Krankheitsdauer gewesen sein. Ebenso ist denkbar, dass die Sensitivität der Färbung oder die Färbemethode an Paraffinschnitten per se nicht optimal zur Darstellung von Makrophagen geeignet war.

Sakata et al. führten eine Studie an SV129-Mäusen durch, die für 8 Wochen eine 0.25 % Adeninhaltige Diät erhielten. Ein Teil der Mäuse wurde ab Woche 4 zusätzlich einer erhöhten Salzzufuhr im Trinkwasser ausgesetzt. Hierbei konnte festgestellt werden, dass die kardiale Makrophagendichte der Mäuse, die zusätzlich eine hohe Salzzufuhr erhielten, im Vergleich mit den Adenin-Mäusen, die statt des gesalzenen Wassers reines Wasser erhielten, signifikant höher ist.⁶⁵ Eine alleinige Adenin-Diät führte im Vergleich mit der Kontrollgruppe zwar, wie in unserer Studie auch,

zu einem Anstieg der Makrophagendichte, allerdings war dieser ebenso nicht signifikant. Vermutlich ist die alleinige Induktion einer CKD für die signifikante Erhöhung der kardialen Makrophagendichte also nicht ausreichend und es bedarf mehrerer Komorbiditäten (sogenannte „hits“). Ähnliches schlussfolgerten Wollenhaupt et al. aus ihrer Studie, in der acht verschiedene CKD-Modelle an verschiedenen Maus-Stämmen durchgeführt wurden: trotz mehrwöchiger Induktion einer mindestens moderaten CKD konnten weder eine kardiale Dysfunktion noch ein kardiales Remodeling festgestellt werden, weswegen die Vermutung aufgestellt wurde, dass es für die Entstehung einer urämischen Kardiomyopathie mehrerer „hits“ bedarf. Dennoch gab es Hinweise darauf, dass kardialer oxidativer Stress vorlag.⁸¹ Anhaltender oxidativer Stress kann wiederum zu chronischer Inflammation führen.⁶² Zudem fördert oxidativer Stress das atriale Remodeling.⁸⁰ Der Einfluss mehrerer „hits“ auf die Entstehung einer urämischen Kardiomyopathie bedarf weiterer Studien. Es existieren dennoch Studien, die zeigen, dass im Rahmen einer CKD die kardiale Inflammation ansteigt. So konnten bspw. Li et al. an C57BL/6J-Mäusen mit 5/6-Nephrektomie zeigen, dass die Expression von inflammatorischen Zytokinen im Myokard signifikant ansteigt.⁴⁵ Ein direkter Vergleich unserer Studie mit dieser Studie ist aufgrund der unterschiedlich verwendeten Methodik zur Induktion der CKD und der unterschiedlichen verwendeten Maus-Stämme jedoch nicht möglich.

In unserer Studie führte die Gabe von Empagliflozin in der Behandlungsgruppe zu einer Reduktion der Makrophagendichte, die allerdings nicht signifikant war. Die Charakterisierung der Einflüsse von SGLT2-Inhibitoren auf inflammatorische Prozesse ist von großem Interesse, weswegen es hierzu vielerlei Studienergebnisse gibt. Xu et al. konnten an einer mit Lipopolysacchariden aktivierten RAW264.7-Zelllinie (Mausmakrophagen-Zelllinie)²⁹ zeigen, dass mitunter Canagliflozin und Empagliflozin signifikant die Produktion von u.a. IL-6 und TNF- α , die als pro-inflammatorische Zytokine bekannt sind, senken. Zudem konnten sie feststellen, dass Canagliflozin signifikant die Spiegel der reaktiven Sauerstoffspezies, die pro-inflammatorisch wirken, senkt.⁸³ Während inflammatorischer Prozesse ist der intrazelluläre Glukose-Stoffwechsel in den Immunzellen erhöht.^{72,83} Die Konsequenz ist eine Aktivierung der Immunzellen.⁸³ Xu et al. konnten in ihrer Studie zeigen, dass Canagliflozin zu einer signifikanten Reduktion der Expression von Phosphofructokinase-2, einem Schlüsselenzym der Glykolyse, führt. Zudem spielt die Phosphofructokinase-2 eine Rolle beim „metabolic reprogramming“ in Makrophagen. Die Inhibition des Glukose-Stoffwechsels stellt eine mögliche Erklärung für die anti-inflammatorische Wirkung von Canagliflozin dar. Als weitere mögliche Erklärung zählt die Verstärkung der Autophagie, die Xu et al. feststellen konnten.⁸³ Ob die in dieser Studie festgestellte anti-inflammatorische Wirkung auch bei der kardialen Inflammation im Rahmen einer CKD zu tragen kommt, müssten weitere Studien charakterisieren.

Byrne et al. charakterisierten an C57BL/6-Mäusen, die im Rahmen einer transversen Aortenkonstriktion eine Herzinsuffizienz entwickelten, die Auswirkungen von Empagliflozin.⁹ Es konnte hierbei eine signifikante Reduktion der kardialen Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen und eine signifikante Reduktion der Makrophageninfiltration festgestellt werden.⁹ Trotz dieser vielversprechenden Studienergebnisse bedarf es weiterer Studien, die den Einfluss von SGLT2-Inhibitoren auf Individuen charakterisieren, die aufgrund einer CKD eine urämische Kardiomyopathie entwickeln. Wenngleich in unserer Studie kein signifikanter Abfall der Makrophagendichte festzustellen war, so ist zumindest ein Trend erkennbar, der einen anti-inflammatorischen Einfluss vermuten lässt.

5.4 Linksatriale sympathische Innervation

Das sympathische Nervensystem wird aufgrund afferenter Signale aus den erkrankten Nieren in frühen Stadien der CKD aktiviert³⁰ und bleibt bis zum Progress in ein Nierenversagen überaktiv.⁵⁹ Dabei besteht eine Korrelation zwischen dem Schweregrad der CKD und dem Grad der Aktivierung des sympathischen Nervensystems.³⁰ Die Auswirkungen dieser Überaktivität sind sowohl renal als auch kardial. Zum einen wird der Progress der CKD gefördert, zum anderen trägt ein überaktives sympathisches Nervensystem zur Entwicklung eines atrialen proarrhythmogenen Substrats bei und erhöht in seiner Funktion als Trigger das Entstehungsrisiko von VHF.^{30,59}

Wir konnten in unserer Studie zeigen, dass die Induktion einer CKD zu einer signifikant erhöhten Expression der Tyrosinhydroxylase im linken Atrium führt. Das verstärkte Vorkommen Tyrosinhydroxylase-positiver Nervenfasern galt hierbei stellvertretend für die sympathische Innervation.⁸ Diese Erkenntnis deckt sich mit den Ergebnissen von Hohl et al., die bei Sprague Dawley Ratten über einen Zeitraum von 16 Wochen eine Adenin-Diät mit einer Konzentration von 0.25 % Adeninhaltigem Futter durchführten, um so eine CKD zu induzieren. Sie konnten dabei einen signifikanten linksatrialen Anstieg Tyrosinhydroxylase-positiver Axone vorfinden.³⁰ Zwar sind die Adeninkonzentrationen und die Versuchstiere nicht mit unserer Studie identisch, der vorhandene Effekt einer CKD auf die linksatriale sympathische Innervation lässt sich hiermit dennoch bestätigen.

Als möglicher therapeutischer Ansatz wurde der Einfluss einer SGLT2-Inhibition mittels Empagliflozin auf die erhöhte linksatriale sympathische Innervation im Rahmen einer CKD charakterisiert. Es kam hierbei zu einer Reduktion der linksatrialen sympathischen Innervation, wenngleich diese nicht signifikant war. Die Datenlage bezüglich Sympathikus-hemmender Effekte von SGLT2-Inhibitoren auf das Herz im Rahmen einer CKD ist sehr gering. Dennoch existieren Daten,

die einen hemmenden Einfluss von SGLT2-Inhibitoren auf das sympathische Nervensystem aufzeigen und somit unser Ergebnis stützen. Herat et al. behandelten hypertensive BPH/2J-Mäuse mit Dapagliflozin und konnten auch hier einen, wenngleich nicht signifikanten, Abfall der kardialen Tyrosinhydroxylase-Expression feststellen.²⁷ Matthews et al. führten eine Studie an C57BL6/J-Mäusen durch, die einer fettreichen Ernährung (sogenannte „high-fat-diet“) unterzogen wurden. Diese führte zu einer Erhöhung der Tyrosinhydroxylase in Herz und Niere. Die Gabe von Dapagliflozin war mit einem signifikanten Abfall der Tyrosinhydroxylase sowohl in den Nieren als auch im Herzen assoziiert.⁵³

Während der Therapie mit SGLT2-Inhibitoren kommt es zu einer Erhöhung der Ketonkörper.²⁰ In einer Studie von Kimura et al. konnte festgestellt werden, dass β -Hydroxybutyrat, ein wichtiger Ketonkörper, antagonistisch am G-Protein gekoppelten Rezeptor 41 wirkt, der wiederum zahlreich in sympathischen Ganglien verteilt und an der Aktivierung des sympathischen Nervensystems beteiligt ist.³⁸ Diese Erkenntnis erlaubt einen möglichen Erklärungsansatz für die hemmende Wirkung von SGLT2-Inhibitoren auf das sympathische Nervensystem.

Es bedarf trotz der aussichtsreichen Studienergebnisse weiterer Experimente, die den Einfluss von SGLT2-Inhibitoren auf die linksatriale sympathische Innervation im Rahmen einer CKD charakterisieren. Obwohl die linksatriale sympathische Innervation in unserer Studie nach Empagliflozin-Gabe nicht signifikant gesunken ist, lässt der dennoch vorhandene Trend in Zusammenschau mit den bereits existierenden Studienergebnissen einen vorhandenen inhibierenden Effekt auf die linksatriale sympathische Innervation vermuten.

5.5 Zusammenschau aller Ergebnisse

Die Adenin-induzierte CKD führte in den SV129-Mäusen zu einer signifikanten Erhöhung der Expression der Tyrosinhydroxylase im linken Atrium, während der linksatriale Fibrosegehalt statistisch nicht signifikant verändert war. Die Empagliflozin-Therapie resultierte in diesem CKD-Modell in einer signifikanten Senkung des linksatrialen Fibrosegehalts und in einer leichten Reduktion der linksatrialen sympathischen Innervation. Auf die Abnahme der Kardiomyozyten-Größe bei CKD konnte jedoch kein Effekt durch Empagliflozin festgestellt werden. Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass eine SGLT2-Inhibition durch Empagliflozin bei CKD die Bildung eines arrhythmogenen Substrates im Atrium unterdrückt und somit das Auftreten von VHF in Patient*innen mit CKD vermindern könnte (vgl. Abb. 19). Entsprechend konnte eine Meta-Analyse zeigen, dass durch die

Gabe von Empagliflozin bei CKD-Patient*innen mit Neigung zu VHF das Risiko für das Auftreten von VHF gesenkt werden konnte.⁴⁴ Jedoch sind weitere Studien über den Effekt von SGLT2-Inhibitoren auf die Entstehung und Progression von VHF und den zugrunde liegenden Mechanismus dringend erforderlich.

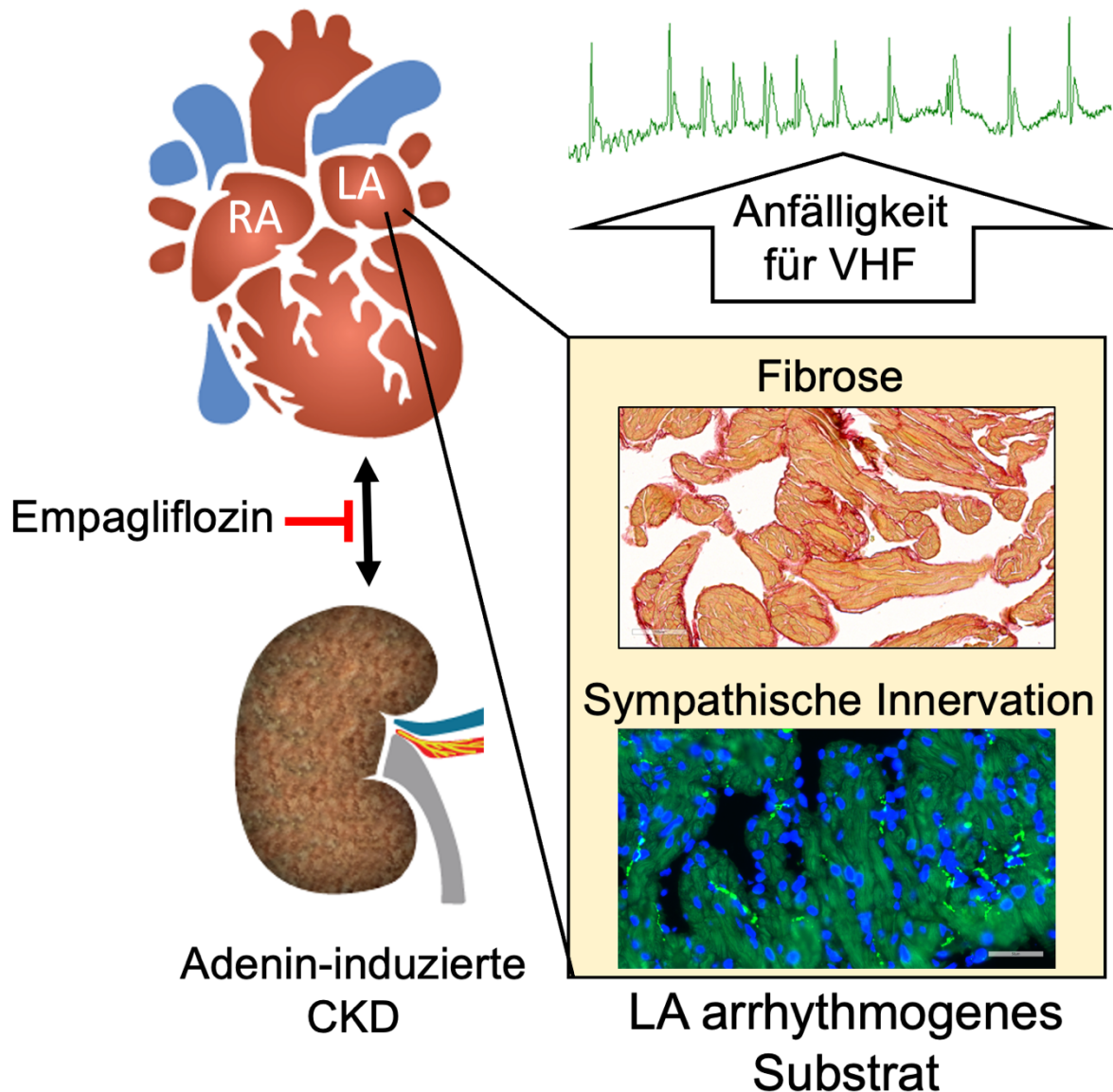


Abb. 19: Zusammenschau der Ergebnisse

In SV129-Mäusen mit Adenin-induzierter chronischer Nierenerkrankung (CKD) wurde untersucht, ob eine Behandlung mit dem SGLT2-Inhibitor Empagliflozin die pathophysiologische Wechselwirkung zwischen erkrankter Niere und den damit assoziierten proarrhythmischen Umbauprozessen im linken Atrium (LA) vermindern kann. In SV129-Mäusen resultierte die CKD in einer signifikant erhöhten linksatrialen sympathischen Innervation. In diesem CKD-Modell führte eine Behandlung mit Empagliflozin zu einer signifikanten Reduktion des linksatrialen Fibrosegehalts und zu einer leichten Reduktion der linksatrialen sympathischen Innervation, beides essentielle Bestandteile des linksatrialen arrhythmogenen Substrats. Es lässt sich schlussfolgern, dass das Auftreten von Vorhofflimmern (VHF) bei CKD durch Empagliflozin vermindert werden könnte. (RA: rechtes Atrium, LA: linkes Atrium)

6 Literaturverzeichnis

1. Ali BH, Al Salam S, Al Suleimani Y, Al Za'abi M, Abelrahman AM, Ashique M, et al. Effects of the SGLT-2 Inhibitor Canagliflozin on Adenine-Induced Chronic Kidney Disease in Rats. *Cell Physiol Biochem*. 2019;52(1):27-39. doi:10.33594/0000000003
2. Ammirati AL. Chronic Kidney Disease. *Rev Assoc Med Bras*. 2020;66(suppl 1):s03-s09. doi:10.1590/1806-9282.66.s1.3
3. Anker SD, Butler J, Filippatos G, Ferreira JP, Bocchi E, Böhm M, et al. Empagliflozin in Heart Failure with a Preserved Ejection Fraction. *N Engl J Med*. 2021;385(16):1451-1461. doi:10.1056/NEJMoa2107038
4. Behrends JC, Bischofberger J, Deutzmann R, et al. *Duale Reihe Physiologie*. 4. Auflage. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart. 2021.
5. Böhm M, Slawik J, Brueckmann M, Mattheus M, George JT, Ofstad AP, et al. Efficacy of empagliflozin on heart failure and renal outcomes in patients with atrial fibrillation: data from the EMPA-REG OUTCOME trial. *Eur J Heart Fail*. 2020;22(1):126-135. doi:10.1002/ehf.1663
6. Brown AJM, Gandy S, McCrimmon R, Houston JG, Struthers AD, Lang CC. A randomized controlled trial of dapagliflozin on left ventricular hypertrophy in people with type two diabetes: the DAPA-LVH trial. *European Heart Journal*. 2020;41(36):3421-3432. doi:10.1093/eurheartj/ehaa419
7. Bryda EC. *The Mighty Mouse: The Impact of Rodents on Advances in Biomedical Research*.
8. Burgi K, Cavalleri MT, Alves AS, Britto LRG, Antunes VR, Michelini LC. Tyrosine hydroxylase immunoreactivity as indicator of sympathetic activity: simultaneous evaluation in different tissues of hypertensive rats. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2011;300(2):R264-R271. doi:10.1152/ajpregu.00687.2009
9. Byrne NJ, Matsumura N, Maayah ZH, Ferdaoussi M, Takahara S, Darwesh AM, et al. Empagliflozin Blunts Worsening Cardiac Dysfunction Associated With Reduced NLRP3 (Nucleotide-Binding Domain-Like Receptor Protein 3) Inflammasome Activation in Heart Failure. *Circ: Heart Failure*. 2020;13(1):e006277. doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.119.006277
10. Carl Roth. Hämatoxylin/Eosin-Färbung H& E (2022). <https://www.carlroth.com/medias/Infobroschuere-HundE-Faerbung-DE.pdf?context=bWFzdGVyfHRIY2huaWN-hbERvY3VtZW50c3wyMzE4OTh8YXBwbGljYXRpb24vcGRmfHRIY2huaWN->

hbERvY3VtZW50cy9oZTgvaGE5LzkxMTY3Mzc4MzA5NDlucGRm-fDAwMDI5ODVjMzBIODVjYWI1MzRiNjBiMml0ZjEzYjQxZGNkYTg5NGM4NDBiZ-mMyZjYwMjA3NmM4N2I5MTA1YWU (Stand: 09.08.2023).

11. Chen TK, Knicely DH, Grams ME. Chronic Kidney Disease Diagnosis and Management: A Review. *JAMA*. 2019;322(13):1294. doi:10.1001/jama.2019.14745
12. Chowdhury B, Luu AZ, Luu VZ, Kabir MG, Pan Y, Teoh H, et al. The SGLT2 inhibitor empagliflozin reduces mortality and prevents progression in experimental pulmonary hypertension. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2020;524(1):50-56. doi:10.1016/j.bbrc.2020.01.015
13. Daubner SC, Le T, Wang S. Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2011;508(1):1-12. doi:10.1016/j.abb.2010.12.017
14. Deutsche Gesellschaft für Allgemeinmedizin und Familienmedizin e.V. S3-Leitlinie, Versorgung von Patienten mit chronischer nicht-dialysepflichtiger Nierenerkrankung in der Hausarztpraxis. Published online 2019. https://register.awmf.org/assets/guidelines/053-048I_S3_Versorgung-von-Patienten-mit-nicht-dialysepflichtiger-Niereninsuffizienz__2021-01.pdf
15. Ding WY, Gupta D, Wong CF, Lip GYH. Pathophysiology of atrial fibrillation and chronic kidney disease. *Cardiovascular Research*. 2021;117(4):1046-1059. doi:10.1093/cvr/cvaa258
16. Diwan V, Brown L, Gobe GC. Adenine-induced chronic kidney disease in rats: Models of kidney diseases. *Nephrology*. 2018;23(1):5-11. doi:10.1111/nep.13180
17. Dumann E, Menne J. SGLT2-Inhibitoren: Was gibt es Neues? *Nephrologe*. 2021;16(4):241-255. doi:10.1007/s11560-021-00511-4
18. Emde B, Heinen A, Gödecke A, Bottermann K. Wheat germ agglutinin staining as a suitable method for detection and quantification of fibrosis in cardiac tissue after myocardial infarction. *Eur J Histochem*. Published online December 17, 2014. doi:10.4081/ejh.2014.2448
19. Fan G, Guo DL. The effect of sodium-glucose cotransporter-2 inhibitors on cardiac structure remodeling and function: A meta-analysis of randomized controlled trials. *European Journal of Internal Medicine*. 2023;114:49-57. doi:10.1016/j.ejim.2023.04.002
20. Fathi A, Vickneson K, Singh JS. SGLT2-inhibitors; more than just glycosuria and diuresis. *Heart Fail Rev*. 2021;26(3):623-642. doi:10.1007/s10741-020-10038-w
21. Fried LF, Emanuele N, Zhang JH, Brophy M, Conner TA, Duckworth W, et al. Combined Angiotensin Inhibition for the Treatment of Diabetic Nephropathy. *N Engl J Med*. 2013;369(20):1892-1903. doi:10.1056/NEJMoa1303154
22. Geberth S, Nowack R. Indikationen zur Nierenersatztherapie. In: *Praxis der Dialyse*. Springer Berlin Heidelberg; 2011:1-23. doi:10.1007/978-3-642-13099-1_1

23. Geisslinger G, Menzel S, Gudermann T, Hinz B, Ruth P. Mutschler Arzneimittelwirkungen. 11. Auflage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart. 2020.
24. Goudis CA, Kallergis EM, Vardas PE. Extracellular matrix alterations in the atria: insights into the mechanisms and perpetuation of atrial fibrillation. *Europace*. 2012;14(5):623-630. doi:10.1093/europace/eur398
25. Hamzaoui M, Djerada Z, Brunel V, Mulder P, Richard V, Bellien J, Guerrot D. 5/6 nephrectomy induces different renal, cardiac and vascular consequences in 129/Sv and C57BL/6JRj mice. *Sci Rep*. 2020;10(1):1524. doi:10.1038/s41598-020-58393-w
26. Hee L, Nguyen T, Whatmough M, Descallar J, Chen J, Kapila S, French JK, Thomas L. Left Atrial Volume and Adverse Cardiovascular Outcomes in Unselected Patients with and without CKD. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2014;9(8):1369-1376. doi:10.2215/CJN.06700613
27. Herat LY, Magno AL, Rudnicka C, Hricova J, Carnagarin R, Ward NC, et al. SGLT2 Inhibitor–Induced Sympathoinhibition. *JACC: Basic to Translational Science*. 2020;5(2):169-179. doi:10.1016/j.jacbts.2019.11.007
28. Herold G. Innere Medizin. Gerd Herold, Köln. 2021.
29. Hirano S, Zhou Q, Furuyama A, Kanno S. Differential Regulation of IL-1 β and IL-6 Release in Murine Macrophages. *Inflammation*. 2017;40(6):1933-1943. doi:10.1007/s10753-017-0634-1
30. Hohl M, Selejan SR, Wintrich J, Lehnert U, Speer T, Schneider C, et al. Renal Denervation Prevents Atrial Arrhythmogenic Substrate Development in CKD. *Circ Res*. 2022;130(6):814-828. doi:10.1161/CIRCRESAHA.121.320104
31. Jankowski J, Floege J, Fliser D, Böhm M, Marx N. Cardiovascular Disease in Chronic Kidney Disease: Pathophysiological Insights and Therapeutic Options. *Circulation*. 2021;143(11):1157-1172. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.120.050686
32. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney Int Suppl*. 2013; 3: 1-150.
33. KDIGO 2021 Clinical Practice Guideline for the Management of Blood Pressure in Chronic Kidney Disease. *Kidney Int*. 2021; 99: S1-S87.
34. Khan IA. Atrial fibrillation: interaction between the trigger and the substrate. *International Journal of Cardiology*. 2003;87(2-3):301-302. doi:10.1016/S0167-5273(02)00353-4
35. Khan MA, Nag P, Grivei A, Giuliani KTK, Wang X, Diwan V, et al. Adenine overload induces ferroptosis in human primary proximal tubular epithelial cells. *Cell Death Dis*. 2022;13(2):104. doi:10.1038/s41419-022-04527-z

36. Kim K, Anderson EM, Thome T, Lu G, Salyers ZR, Cort TA, O'Malley KA, Scali ST, Ryan TE. Skeletal myopathy in CKD: a comparison of adenine-induced nephropathy and 5/6 nephrectomy models in mice. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2021;321(1):F106-F119. doi:10.1152/ajprenal.00117.2021
37. Kim SJ, Oh HJ, Yoo DE, Shin DH, Lee MJ, Park JT, et al. Left Atrial Enlargement Is Associated with a Rapid Decline in Residual Renal Function in ESRD Patients on Peritoneal Dialysis. *Journal of the American Society of Echocardiography*. 2012;25(4):421-427. doi:10.1016/j.echo.2011.12.005
38. Kimura I, Inoue D, Maeda T, Hara T, Ichimura A, Miyauchi S, Kobayashi M, Hirasawa A, Tsujimoto G. Short-chain fatty acids and ketones directly regulate sympathetic nervous system via G protein-coupled receptor 41 (GPR41). *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108(19):8030-8035. doi:10.1073/pnas.1016088108
39. Klinkhammer BM, Djudjaj S, Kunter U, Palsson R, Edvardsson VO, Wiech T, et al. Cellular and Molecular Mechanisms of Kidney Injury in 2,8-Dihydroxyadenine Nephropathy. *JASN*. 2020;31(4):799-816. doi:10.1681/ASN.2019080827
40. Kobayashi R, Wakui H, Azushima K, Uneda K, Haku S, Ohki K, et al. An angiotensin II type 1 receptor binding molecule has a critical role in hypertension in a chronic kidney disease model. *Kidney International*. 2017;91(5):1115-1125. doi:10.1016/j.kint.2016.10.035
41. Koizumi T, Watanabe M, Yokota T, Tsuda M, Handa H, Koya J, et al. Empagliflozin suppresses mitochondrial reactive oxygen species generation and mitigates the inducibility of atrial fibrillation in diabetic rats. *Front Cardiovasc Med*. 2023;10:1005408. doi:10.3389/fcvm.2023.1005408
42. Lau WL, Obi Y, Kalantar-Zadeh K. Parathyroidectomy in the Management of Secondary Hyperparathyroidism. *CJASN*. 2018;13(6):952-961. doi:10.2215/CJN.10390917
43. Li C, Zhang J, Xue M, Li X, Han F, Liu X, et al. SGLT2 inhibition with empagliflozin attenuates myocardial oxidative stress and fibrosis in diabetic mice heart. *Cardiovasc Diabetol*. 2019;18(1):15. doi:10.1186/s12933-019-0816-2
44. Li HL, Lip GYH, Feng Q, Fei Y, Tse YK, Wu M zhen, et al. Sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors (SGLT2i) and cardiac arrhythmias: a systematic review and meta-analysis. *Cardiovasc Diabetol*. 2021;20(1):100. doi:10.1186/s12933-021-01293-8
45. Li Y, Wu J, He Q, Shou Z, Zhang P, Pen W, Zhu Y, Chen J. Angiotensin (1-7) prevent heart dysfunction and left ventricular remodeling caused by renal dysfunction in 5/6 nephrectomy mice. *Hypertens Res*. 2009;32(5):369-374. doi:10.1038/hr.2009.25

46. Lin B, Koibuchi N, Hasegawa Y, Sueta D, Toyama K, Uekawa K, et al. Glycemic control with empagliflozin, a novel selective SGLT2 inhibitor, ameliorates cardiovascular injury and cognitive dysfunction in obese and type 2 diabetic mice. *Cardiovasc Diabetol*. 2014;13(1):148. doi:10.1186/s12933-014-0148-1
47. Lin HH, Faunce DE, Stacey M, Terajewicz A, Nakamura T, Zhang-Hoover J, et al. The macrophage F4/80 receptor is required for the induction of antigen-specific efferent regulatory T cells in peripheral tolerance. *Journal of Experimental Medicine*. 2005;201(10):1615-1625. doi:10.1084/jem.20042307
48. Lu YP, Zhang ZY, Wu HW, Fang LJ, Hu B, Tang C, et al. SGLT2 inhibitors improve kidney function and morphology by regulating renal metabolic reprogramming in mice with diabetic kidney disease. *J Transl Med*. 2022;20(1):420. doi:10.1186/s12967-022-03629-8
49. Ma Y, de Castro Brás LE, Toba H, Iyer RP, Hall ME, Winniford MD, Lange RA, Tyagi SC, Lindsey ML. Myofibroblasts and the extracellular matrix network in post-myocardial infarction cardiac remodeling. *Pflugers Arch - Eur J Physiol*. 2014. doi:10.1007/s00424-014-1463-9
50. Mann JFE, Chang TI, Cushman WC, Furth SL, Ix JH, Hou FF, et al. Commentary on the KDIGO 2021 Clinical Practice Guideline for the Management of Blood Pressure in CKD. *Curr Cardiol Rep*. 2021;23(9):132. doi:10.1007/s11886-021-01559-3
51. Maqbool S, Shafiq S, Ali S, Rehman MEU, Malik J, Lee KY. Left Ventricular Hypertrophy (LVH) and Left Ventricular Geometric Patterns in Patients with Chronic Kidney Disease (CKD) Stage 2-5 With Preserved Ejection Fraction (EF): A Systematic Review to Explore CKD Stage-wise LVH Patterns. *Current Problems in Cardiology*. 2023;48(4):101590. doi:10.1016/j.cpcardiol.2023.101590
52. Marx N, Noels H, Jankowski J, Floege J, Fliser D, Böhm M. Mechanisms of cardiovascular complications in chronic kidney disease: research focus of the Transregional Research Consortium SFB TRR219 of the University Hospital Aachen (RWTH) and the Saarland University. *Clin Res Cardiol*. 2018;107(S2):120-126. doi:10.1007/s00392-018-1260-0
53. Matthews VB, Elliot RH, Rudnicka C, Hricova J, Herat L, Schlaich MP. Role of the sympathetic nervous system in regulation of the sodium glucose cotransporter 2. *Journal of Hypertension*. 2017;35(10):2059-2068. doi:10.1097/HJH.0000000000001434
54. McMurray JJV, Solomon SD, Inzucchi SE, Køber L, Kosiborod MN, Martinez FA, et al. Dapagliflozin in Patients with Heart Failure and Reduced Ejection Fraction. *N Engl J Med*. 2019;381(21):1995-2008. doi:10.1056/NEJMoa1911303
55. Ott C, Mahfoud F, Schmid A, Toennes SW, Ewen S, Ditting T, et al. Renal denervation preserves renal function in patients with chronic kidney disease and resistant hypertension. *Journal of Hypertension*. 2015;33(6):1261-1266. doi:10.1097/HJH.0000000000000556

56. Packer M, Anker SD, Butler J, Filippatos G, Pocock SJ, Carson P, et al. Cardiovascular and Renal Outcomes with Empagliflozin in Heart Failure. *N Engl J Med*. 2020;383(15):1413-1424. doi:10.1056/NEJMoa2022190
57. Panizo S, Martínez-Arias L, Alonso-Montes C, Cannata P, Martín-Carro B, Fernández-Martín JL, Naves-Díaz M, Carrillo-López N, Cannata-Andía JB. Fibrosis in Chronic Kidney Disease: Pathogenesis and Consequences. *IJMS*. 2021;22(1):408. doi:10.3390/ijms22010408
58. Paoletti E, Zoccali C. A look at the upper heart chamber: the left atrium in chronic kidney disease. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2014;29(10):1847-1853. doi:10.1093/ndt/gft482
59. Park J. Cardiovascular Risk in Chronic Kidney Disease: Role of the Sympathetic Nervous System. *Cardiology Research and Practice*. 2012;2012:1-8. doi:10.1155/2012/319432
60. Qiu H, Ji C, Liu W, Wu Y, Lu Z, Lin Q, et al. Chronic Kidney Disease Increases Atrial Fibrillation Inducibility: Involvement of Inflammation, Atrial Fibrosis, and Connexins. *Front Physiol*. 2018;9:1726. doi:10.3389/fphys.2018.01726
61. Reiss AB, Miyawaki N, Moon J, Kasselman LJ, Voloshyna I, D'Avino R, De Leon J. CKD, arterial calcification, atherosclerosis and bone health: Inter-relationships and controversies. *Atherosclerosis*. 2018;278:49-59. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2018.08.046
62. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radical Biology and Medicine*. 2010;49(11):1603-1616. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006
63. Ronco C, Haapio M, House AA, Anavekar N, Bellomo R. Cardiorenal Syndrome. *Journal of the American College of Cardiology*. 2008;52(19):1527-1539. doi:10.1016/j.jacc.2008.07.051
64. Rüster C, Wolf G. Prävention der diabetischen Nephropathie: Was ist praktisch machbar? *Deutsches Ärzteblatt Online*. Published online April 24, 2015. doi:10.3238/PersDia.2015.04.24.01
65. Sakata F, Ito Y, Mizuno M, Sawai A, Suzuki Y, Tomita T, et al. Sodium chloride promotes tissue inflammation via osmotic stimuli in subtotal-nephrectomized mice. *Lab Invest*. 2017;97(4):432-446. doi:10.1038/labinvest.2017.4
66. Schaller E, Macfarlane AJ, Rupec RA, Gordon S, McKnight AJ, Pfeffer K. Inactivation of the F4/80 Glycoprotein in the Mouse Germ Line. *Mol Cell Biol*. 2002;22(22):8035-8043. doi:10.1128/MCB.22.22.8035-8043.2002
67. Schmitt R. Blockierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems: Einfluss auf die Progression der chronischen Nierenerkrankung. *Nephrologe*. 2022;17(1):26-33. doi:10.1007/s11560-021-00525-y
68. Schotten U, Verheule S, Kirchhof P, Goette A. Pathophysiological Mechanisms of Atrial Fibrillation: A Translational Appraisal. *Physiological Reviews*. 2011;91(1):265-325. doi:10.1152/physrev.00031.2009

69. Shao Q, Meng L, Lee S, Tse G, Gong M, Zhang Z, et al. Empagliflozin, a sodium glucose co-transporter-2 inhibitor, alleviates atrial remodeling and improves mitochondrial function in high-fat diet/streptozotocin-induced diabetic rats. *Cardiovasc Diabetol*. 2019;18(1):165. doi:10.1186/s12933-019-0964-4
70. Sohns C, Marrouche NF. Atrial fibrillation and cardiac fibrosis. *European Heart Journal*. 2020;41(10):1123-1131. doi:10.1093/eurheartj/ehz786
71. Soppert J, Frisch J, Wirth J, Hemmers C, Boor P, Kramann R, et al. A systematic review and meta-analysis of murine models of uremic cardiomyopathy. *Kidney International*. 2022;101(2):256-273. doi:10.1016/j.kint.2021.10.025
72. Sun L, Yang X, Yuan Z, Wang H. Metabolic Reprogramming in Immune Response and Tissue Inflammation. *ATVB*. 2020;40(9):1990-2001. doi:10.1161/ATVBAHA.120.314037
73. The EMPA-KIDNEY Collaborative Group. Empagliflozin in Patients with Chronic Kidney Disease. *N Engl J Med*. 2023;388(2):117-127. doi:10.1056/NEJMoa2204233
74. The EMPA-KIDNEY Collaborative Group, Herrington WG, Wanner C, Green JB, Hauske SJ, Judge P, et al. Design, recruitment, and baseline characteristics of the EMPA-KIDNEY trial. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2022;37(7):1317-1329. doi:10.1093/ndt/gfac040
75. Thompson S, James M, Wiebe N, Hemmelgarn B, Manns B, Klarenbach S, Tonelli M. Cause of Death in Patients with Reduced Kidney Function. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2015;26(10):2504-2511. doi:10.1681/ASN.2014070714
76. Titze S, Schmid M, Kottgen A, Busch M, Floege J, Wanner C, et al. Disease burden and risk profile in referred patients with moderate chronic kidney disease: composition of the German Chronic Kidney Disease (GCKD) cohort. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2015;30(3):441-451. doi:10.1093/ndt/gfu294
77. Vallianou NG, Mitesh S, Gkogkou A, Geladari E. Chronic Kidney Disease and Cardiovascular Disease: Is there Any Relationship? *CCR*. 2018;15(1):55-63. doi:10.2174/1573403X14666180711124825
78. Wang B, Wang ZM, Ji JL, Gan W, Zhang A, Shi HJ, et al. Macrophage-Derived Exosomal Mir-155 Regulating Cardiomyocyte Pyroptosis and Hypertrophy in Uremic Cardiomyopathy. *JACC: Basic to Translational Science*. 2020;5(2):148-166. doi:10.1016/j.jacbts.2019.10.011
79. Wang Q, Hummler E, Nussberger JD, Cle[Combining Acute Accent]ment S, Gabbiani G, Brunner HR, Burnier M. Blood Pressure, Cardiac, and Renal Responses to Salt and Deoxycorticosterone Acetate in Mice: Role of Renin Genes. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2002;13(6):1509-1516. doi:10.1097/01.ASN.0000017902.77985.84
80. Wang Y, Yang Y, He F. Insights into Concomitant Atrial Fibrillation and Chronic Kidney Disease. *Rev Cardiovasc Med*. 2022;23(3):0105. doi:10.31083/j.rcm2303105

81. Wollenhaupt J, Frisch J, Harlacher E, Wong DWL, Jin H, Schulte C, et al. Pro-oxidative priming but maintained cardiac function in a broad spectrum of murine models of chronic kidney disease. *Redox Biology*. 2022;56:102459. doi:10.1016/j.redox.2022.102459
82. Xie X, Liu Y, Perkovic V, Li X, Ninomiya T, Hou W, Zhao N, Liu L, Lv J, Zhang H, Wang H. Renin-Angiotensin System Inhibitors and Kidney and Cardiovascular Outcomes in Patients With CKD: A Bayesian Network Meta-analysis of Randomized Clinical Trials. *Am J Kidney Dis*. 2016 May;67(5):728-41. doi: 10.1053/j.ajkd.2015.10.011. Epub 2015 Nov 18. PMID: 26597926. Renin-Angiotensin System Inhibitors and Kidney and Cardiovascular Outcomes in Patients With CKD: A Bayesian Network Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials. <https://pub-med.ncbi.nlm.nih.gov/26597926/>
83. Xu C, Wang W, Zhong J, Lei F, Xu N, Zhang Y, Xie W. Canagliflozin exerts anti-inflammatory effects by inhibiting intracellular glucose metabolism and promoting autophagy in immune cells. *Biochem Pharmacol*. 2018 Jun;152:45-59. doi: 10.1016/j.bcp.2018.03.013. Epub 2018 Mar 15. PMID: 29551587.
84. Zanolli L, Lentini P, Briet M, Castellino P, House AA, London GM, et al. Arterial Stiffness in the Heart Disease of CKD. *JASN*. 2019;30(6):918-928. doi:10.1681/ASN.2019020117
85. Zinman B, Wanner C, Lachin JM, Fitchett D, Bluhmki E, Hantel S, et al. Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*. 2015;373(22):2117-2128. doi:10.1056/NEJMoa1504720

7 Publikationen

Felix Buder; Mathias Hohl; Simina-Ramona Selejan; Philipp Markwirth; **Vanessa Pfau**; Dominik Linz; Felix Mahfoud; Michael Böhm. „Effects of renal denervation on cardiac and renal damage in different CKD rat models.“ Submitted bei Plos ONE “PONE-D-23-31868“

Moellmann J, Babler A, Casper T, Klinkhammer B, Peisker F, Halder M, **Pfau V**, Hohl M, Boor P, Kramann R, Marx N, Lehrke M. “Empagliflozin improves cardiac function in a model of adenine-induced uremic cardiomyopathy”

Manuskript in Vorbereitung

8 Poster

M. Hohl, SR. Selejan, J. Wintrich, A. Schulz, J. Hoenig, M. Mauz, **V. Pfau**, T. Speer, F. Mahfoud, M. Böhm: “Role of renal sympathetic nerve activation in a rat model of CKD and hypertension on the development of an atrial pro-arrhythmic substrate - A pilot study“ auf der Aachen Conference on Cardiovascular Disease 21-22. Oktober 2022

M. Hohl, SR. Selejan, J. Wintrich, A. Schulz, J. Hoenig, M. Mauz, **V. Pfau**, T. Speer, F. Mahfoud, M. Böhm: “Role of renal sympathetic nerve activation in a rat model of CKD and hypertension on the development of an atrial pro-arrhythmic substrate“ auf der Aachen Conference on Cardiovascular Disease 10-11. November 2023

9 Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Michael Böhm danken, der mir diese Doktorarbeit ermöglicht hat und der mich mit seiner eigenen Leidenschaft für die Forschung in der Kardiologie stets motiviert hat.

Des Weiteren möchte ich Prof. Dr. Michael Lehrke, Frau Dr. Julia Möllmann und allen Mitarbeiter*innen dieser Forschungsgruppe danken, die mir dank Durchführung des Tierversuchs und Fixierung und Bereitstellung der Präparate diese Arbeit erst möglich gemacht haben.

Ein besonderer Dank geht auch an Claudia Noll aus der Inneren Medizin IV, die mir dank der Färbung die Auswertung der Inflammation ermöglicht hat.

Dr. Mathias Hohl, meinem Betreuer, möchte ich von ganzem Herzen danken. Er war mir stets eine große Hilfe und hat mich in jeder Lage unterstützt und an mich geglaubt. Abgesehen davon hat es mir dank seiner offenen, herzlichen Art und der musikalischen Rock-Untermalung immer wieder Freude bereitet, die Tage im Labor zu verbringen. Tausend Dank!

Auch Simone Jäger, Jeanette Zimolong und Laura Frisch möchte ich von ganzem Herzen danken, da sie auf Fragen bezüglich der Experimente stets eine Antwort hatten. Für die Herzlichkeit und die nette Aufnahme ins Labor bin ich ihnen ebenso sehr dankbar.

Mein letzter Dank gilt meiner Familie, die mich schon immer unterstützt und immer an mich geglaubt hat, auch wenn ich es selbst zeitweise nicht tat. Ohne meine Familie wäre ich nicht ansatzweise so weit gekommen, wie ich es bis heute bin. Ohne meine Familie wäre mir dieses Studium nicht möglich gewesen. Der Dank hierfür lässt sich schwer in Worte fassen.

10 Lebenslauf

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