

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

**Renale Denervation reduziert die myokardiale Expression von Pattern Recognition Receptors sowie die Plasma-Konzentration des Urämietoxins Indoxylsulfat und hemmt die Entstehung einer linksventrikulären Hypertrophie in einem Rattenmodell der chronischen Nierenerkrankung**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES  
2024**

vorgelegt von: Philipp Markwirth  
geb. am: 15.08.1998 in Homburg

Tag der Promotion: 22.08.2025

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

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Michael Böhm

Prof. Dr. med. Matthias Laschke

Prof. Dr. med. Daniel Dürschmied

# Inhaltsverzeichnis

<b>I. Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>II. Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>VI</b>
<b>III. Abkürzungen und Symbole .....</b>	<b>VII</b>
<b>1 Zusammenfassung.....</b>	<b>10</b>
1.1 Deutsche Zusammenfassung.....	10
1.2 Abstract .....	12
<b>2 Einleitung .....</b>	<b>14</b>
2.1 Chronische Nierenerkrankung.....	14
2.1.1 Definition und Klassifikation .....	14
2.1.2 Klinik und Epidemiologie der CKD .....	15
2.1.3 Pathophysiologie der CKD.....	15
2.2 Urämische Kardiomyopathie .....	17
2.2.1 Pathophysiologie der urämischen Kardiomyopathie.....	17
2.3 Sympathoadrenerges System .....	18
2.4 Angeborenes Immunsystem und Pattern Recognition Rezeptoren....	21
2.4.1 Toll-like Rezeptor 4.....	24
2.4.2 Toll-like Rezeptor 2.....	27
2.4.3 Receptor for Advanced Glycation End Products.....	28
2.5 Renale Denervation.....	33
2.6 Fragestellung.....	35
<b>3 Material und Methoden .....</b>	<b>37</b>
3.1 Material.....	37
3.1.1 CKD-Rattenmodell der Adenin-induzierten Nephropathie.....	37
3.1.2 Verwendete Substanzen und Lösungen .....	41
3.1.3 Verbrauchsmaterialien, Geräte und Zubehör.....	46
3.1.4 Software .....	47
3.2 Methoden.....	48
3.2.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	48
3.2.2 Immunfluoreszenz-Färbung .....	52
3.2.3 Zellkultur.....	54
3.2.4 Probengewinnung .....	55
3.2.5 Western Blot Analyse .....	57
3.2.6 Durchflusszytometrie.....	60

3.2.7	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie .....	64
3.2.8	Enzyme-linked Immunosorbent Assay .....	66
3.2.9	Statistik.....	68
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>69</b>
4.1	Induktion der CKD .....	69
4.2	Blutdruck.....	70
4.3	Niere .....	70
4.3.1	Indoxylsulfat .....	70
4.3.2	Sonographie.....	72
4.3.3	Hämatoxylin-Eosin-Färbung und Sirius-Red-Färbung .....	73
4.3.4	Western Blot.....	80
4.3.5	HPLC.....	82
4.3.6	Immunfluoreszenzfärbung.....	82
4.4	Herz .....	85
4.4.1	Echokardiographie .....	85
4.4.2	Kardio-MRT .....	87
4.4.3	Hämatotoxylin-Färbung.....	87
4.4.4	Linksventrikuläre Hypertrophie und Indoxylsulfat.....	90
4.4.5	Western Blot.....	91
4.4.6	Immunfluoreszenzfärbung.....	94
4.5	Zellkultur .....	97
4.5.1	H9c2-Stimulation mit Indoxylsulfat und sRAGE .....	97
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>99</b>
5.1	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	99
5.2	Wahl des CKD-Tiermodells .....	100
5.2.1	0,25 %-Adenin-Modell der CKD .....	100
5.3	Herz .....	104
5.3.1	Kardiale Hypertrophie und Blutdruck .....	104
5.3.2	Proteinexpression .....	108
5.4	Niere .....	112
5.5	Urämietoxine .....	120
5.5.1	Metabolismus von Indoxylsulfat .....	121
5.5.2	Bedeutung von Indoxylsulfat bei CKD.....	122
5.5.3	Einfluss von renaler Denervation auf Indoxylsulfat .....	123
5.5.4	Indoxylsulfat und sRAGE .....	125
5.6	Limitationen .....	126
5.7	Schlussfolgerungen .....	126

---

<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>128</b>
<b>7</b>	<b>Publikationsliste .....</b>	<b>149</b>
<b>8</b>	<b>Danksagungen.....</b>	<b>152</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>153</b>

## I. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Einteilung und Prognose der CKD.....	14
Abbildung 2: IS-induzierte Kardiomyopathie .....	19
Abbildung 3: Adrenerge Signalkaskaden.....	20
Abbildung 4: Komponenten des angeborenen Immunsystems.....	22
Abbildung 5: Übersicht über Pattern Recognition Receptors (PRRs) .....	23
Abbildung 6: Struktur und Ligandenbindung des TLR4.....	25
Abbildung 7: TLR4-Signaltransduktion .....	26
Abbildung 8: Toll-like Rezeptor 2 Dimerisierung.....	27
Abbildung 9: Struktur des Receptor for Advanced Glycation End Products .....	29
Abbildung 10: RAGE-Signaling .....	30
Abbildung 11: RAGE, sRAGE und esRAGE.....	31
Abbildung 12: Modulation des Sympathikotonus durch RDN.....	33
Abbildung 13: Versuchstiere.....	37
Abbildung 14: Zeitlicher Ablauf des Tierversuches.....	38
Abbildung 15: Sonographie .....	39
Abbildung 16: Doppler-Indizes .....	40
Abbildung 17: Glomeruläre Morphometrie.....	51
Abbildung 18: H9c2-Zellen in der Zellkultur.....	54
Abbildung 19: Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	58
Abbildung 20: FACS .....	62
Abbildung 21: Scatter Plot.....	64
Abbildung 22: HPLC .....	65
Abbildung 23: Prinzip des Sandwich-ELISA.....	67
Abbildung 24: Nierenretentionsparameter.....	69
Abbildung 25: Elektrolyte.....	70
Abbildung 26: Systolischer Blutdruck .....	71
Abbildung 27: Indoxylsulfat.....	71
Abbildung 28: Nierenultraschall.....	72
Abbildung 29: RRI .....	72
Abbildung 30: Histopathologische Befunde der Adenin-Nephropathie.....	73
Abbildung 31: Nieren in Sirius-Red-Färbung.....	74
Abbildung 32: Kristalldichte .....	75
Abbildung 33: Glomeruli in HE-Färbung (links) und SR-Färbung (rechts) .....	76
Abbildung 34: Glomeruläre Morphometrie.....	77
Abbildung 35: Glomerular Score .....	78
Abbildung 36: Histologische Darstellung der Glomerulusdichte.....	79
Abbildung 37: Glomerulusdichte.....	79
Abbildung 38: HMGB1 Niere .....	80
Abbildung 39: TLR2 Niere .....	81
Abbildung 40: TLR4 Niere .....	81
Abbildung 41: NGAL im Urin.....	82
Abbildung 42: Noradrenalin im Nierengewebe.....	83
Abbildung 43: Immunfluoreszenzfärbung RAGE Niere .....	84
Abbildung 44: Echokardiographie Beispielbilder .....	85
Abbildung 45: Echokardiographie.....	86
Abbildung 46: Kardio-MRT Beispielbilder.....	87
Abbildung 47: Kardio-MRT .....	88
Abbildung 48: Myozytengröße im LV.....	88
Abbildung 49: Kardiomyozyten im Querschnitt.....	89
Abbildung 50: Korrelation IS und LVH.....	90

---

Abbildung 51: RAGE LV .....	91
Abbildung 52: sRAGE LV.....	91
Abbildung 53: esRAGE LV.....	92
Abbildung 54: HMGB1 LV.....	92
Abbildung 55: TLR2 LV.....	93
Abbildung 56: TLR4 LV.....	93
Abbildung 57: Immunfluoreszenzfärbung RAGE Herz .....	95
Abbildung 58: Immunfluoreszenzfärbung TH Herz.....	96
Abbildung 59: TH-positive Nervenfasern im LV .....	97
Abbildung 60: H9c2 Stimulation mit Indoxylsulfat.....	98
Abbildung 61: H9c2 Stimulation mit IS und sRAGE .....	98
Abbildung 62: Metabolismus der Base Adenin .....	101
Abbildung 63: Kardiovaskuläres Risiko bei Niereninsuffizienz .....	105
Abbildung 64: Indoxylsulfat Metabolismus .....	122
Abbildung 65: Graphische Zusammenfassung.....	127

## II. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Substanzen und Reagenzien .....	41
Tabelle 2: Primärantikörper für Western Blot Analyse .....	43
Tabelle 3: Sekundärantikörper für Western Blot Analyse.....	43
Tabelle 4: Primärantikörper für Immunfluoreszenz-Histologie .....	44
Tabelle 5: Sekundärantikörper für Immunfluoreszenz-Histologie .....	44
Tabelle 6: ELISA für Indoxylsulfat .....	44
Tabelle 7: Elektrophorese- und Blotbedingungen .....	44
Tabelle 8: Lösungen für die Western Blot Analyse .....	45
Tabelle 9: Lösungen für die FACS-Analyse .....	46
Tabelle 10: Verbrauchsmaterialien, Geräte und Zubehör .....	46
Tabelle 11: Software .....	47
Tabelle 12: Glomerular Score .....	51

### III. Abkürzungen und Symbole

ADAM10	A Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10
AGEs	advanced glycation end products
AMPK	Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase
ANS	Autonomes Nervensystem
AR	Adrenozeptor
AT-II	Angiotensin-II
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CHF	chronische Herzinsuffizienz
CKD	chronische Nierenerkrankung
DAMPs	damage-associated molecular patterns
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DHA	Dihydroxyadenin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFR	geschätzte glomeruläre Filtrationsrate
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
esRAGE	endogenous secretory RAGE
FACS	fluorescence-activated cell scanning
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor
FGFR	Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
FSC	forward scatter
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
h	Stunde

---

HDL	high density lipoprotein
HE	Hämatoxylin-Eosin
HMGB1	high mobility group box 1
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP	Horseradish Peroxidase
HSP	Hitzeschockprotein
IL	Interleukin
IS	Indoxylsulfat
LPS	Lipopolysaccharid
LV	linker Ventrikel
LVH	linksventrikuläre Hypertrophie
LVMI	linksventrikulärer Massenindex
mDia1	diaphanous-1
min	Minute
MMP9	Matrix-Metalloproteinase 9
mRNA	messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
NA	Noradrenalin
NF- $\kappa$ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NGAL	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin
NLR	NOD(nucleotide-binding oligomerization domain)-like Rezeptor
NLRP3	NLR family pyrin domain containing 3
NO	Stickstoffmonoxid
NRCFs	neonatal rat cardiac fibroblasts
NRCMs	neonatal rat cardiac myocytes
NYHA	New York Heart Association
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PBS-T	Phosphatgepufferte Salzlösung + Tween
PI	Pulsatilitäts-Index

PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRRs	Pattern Recognition Receptors
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems
RAGE	Receptor for Advanced Glycation End Products
RDN	renale Denervation
RI	Resistance-Index
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	revolutions per minute
RRI	renal resistive index
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SAA	Serum Amyloid A
SDS	Natriumdodecylsulfat
sRAGE	soluble RAGE
SSC	side scatter
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TH	Tyrosinhydroxylase
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TRIF	TIR-domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
ZNS	zentrales Nervensystem

# 1 Zusammenfassung

## 1.1 Deutsche Zusammenfassung

### Hintergrund:

Die chronische Nierenerkrankung (CKD) stellt einen unabhängigen Risikofaktor für kardiovaskuläre Komplikationen dar. CKD-Patienten entwickeln eine urämische Kardiomyopathie, die durch linksventrikuläre Hypertrophie (LVH), Fibrose und Anfälligkeit für Arrhythmien charakterisiert ist. Zudem ist CKD mit einer erhöhten Aktivität des sympathischen Nervensystems (SNS) assoziiert. Die renale Denervation (RDN) ist ein Verfahren zur Modulation renaler sympathischer Fasern durch Hochfrequenzstrom oder Ultraschallenergie. RDN stellt heutzutage eine minimalinvasive Therapieoption zur Behandlung der arteriellen Hypertonie dar. Ferner kann nach RDN eine Reduktion der LVH beobachtet werden. In der Genese der urämischen Kardiomyopathie spielen Urämietoxine, insbesondere Indoxylsulfat (IS), eine entscheidende Rolle. Des Weiteren tragen sogenannte Pattern Recognition Rezeptoren (PRRs) zur myokardialen Inflammation bei CKD bei. Inwiefern RDN die Entstehung einer urämischen Kardiomyopathie beeinflusst, ist unklar. Das Ziel dieser Arbeit ist es, anhand eines Rattenmodells der CKD den Einfluss der RDN auf die Entstehung der urämischen Kardiomyopathie zu untersuchen. Ferner wird untersucht, inwiefern RDN einen Einfluss auf den renalen Phänotyp in diesem Rattenmodell hat.

### Methoden:

Männliche Sprague-Dawley-Ratten erhielten über einen Zeitraum von 16 Wochen entweder eine Standarddiät (CTRL, n = 4) oder eine 0,25 %-haltige Adenin-Diät, um eine CKD zu induzieren (AD, n = 10). Nach 4 Wochen erfolgte bei AD eine Randomisierung in eine sham-Gruppe (AD, n = 5) und eine Interventionsgruppe (AD-RDN, n = 5), welche renal denerviert wurden. RDN erfolgte chemisch mittels Betupfens der Adventitia der Nierenarterien mit einer Phenol/Ethanol-Lösung. AD und CTRL erhielten jeweils eine sham-Prozedur. Nach 16 Wochen wurden die Tiere getötet und Organe für weitere Untersuchungen entnommen. Das Ausmaß der LVH wurde durch Echokardiographie, Kardio-MRT und histologische Analysen untersucht. Die Messung der Konzentrationen des Urämietoxins IS im Plasma, der Niere und der Leber erfolgte durch ELISA. Western Blot Analysen dienten der Bestimmung der Expression der PRRs RAGE, TLR2 und TLR4 sowie des Liganden HMGB1 im Myokard und der Niere. Die erfolgreiche RDN wurde

durch Messung der Noradrenalin-Konzentration in den Nieren bestätigt. In-vitro-Experimente mit H9c2-Zellen wurden durchgeführt, um die pro-hypertrophen Effekte von IS und den Einfluss des Decoy-Rezeptors sRAGE zu untersuchen. Die Zellhypertrophie wurde mittels Forward Scatter der FACS-Analyse bestimmt.

**Ergebnisse:**

Bei AD war die LV Wanddicke (LV Septumdicke,  $2,36 \pm 0,032$  mm vs.  $1,92 \pm 0,016$  mm in CTRL,  $p < 0,0001$ ) sowie die E/A-Ratio, ein Marker für die diastolische Funktion, sowie die Myozytenquerschnittsfläche im Vergleich zu CTRL erhöht. Nach RDN waren die LV Wanddicke ( $1,95 \pm 0,05$  mm,  $p < 0,0001$  vs. AD), die E/A-Ratio ( $1,08 \pm 0,04$  vs.  $1,93 \pm 0,12$  in AD,  $p < 0,0001$ ) sowie die Myozytenquerschnittsfläche signifikant erniedrigt. Die Plasma-Konzentration von IS war bei AD signifikant erhöht ( $0,7 \pm 0,10$  µg/ml vs.  $0,2 \pm 0,12$  µg/ml in CTRL,  $p = 0,0044$ ) und nach RDN verringert ( $0,28 \pm 0,072$  µg/ml,  $p = 0,0073$  vs. AD). Die renale Ausscheidung von IS war nach RDN unverändert, während die hepatische Konzentration von IS nach RDN reduziert war ( $1,72 \pm 0,09$  µg/500 µg vs.  $2,45 \pm 0,21$  µg/500µg in AD,  $p = 0,023$ ). Es zeigte sich eine Korrelation zwischen der LVH und der Plasma-IS-Konzentration ( $n=14$ ,  $r=0,67$ ,  $p = 0,008$ ). Die Expression der kardialen PRRs zeigte lediglich bei RAGE eine Regulation (RAGE-Expression  $+266$  % in AD vs. CTRL,  $p = 0,015$ ;  $-88$  % in AD-RDN vs. AD,  $p = 0,047$ ). Myokardiales sRAGE wurde durch RDN erhöht ( $+433$  % vs. AD,  $p = 0,013$ ). Sowohl im Herzen als auch in der Niere ergab sich bei TLR2 und TLR4 keine Regulation. Die vorteilhaften Effekte der realen Denervation waren unabhängig vom Blutdruck und der Nierenfunktion.

**Schlussfolgerungen:**

RDN reduziert die Plasma-Konzentration von IS und verringert die LVH in einem Rattenmodell der CKD. Die geringere IS-Konzentration könnte auf eine geringere intestinale Resorption oder hepatische Bildung des Toxins zurückzuführen sein. RDN könnte eine sinnvolle Therapieoption bei Patienten mit CKD darstellen, um kardiovaskuläre Endpunkte zu reduzieren.

## 1.2 Abstract

### Background:

Chronic kidney disease (CKD) is an independent risk factor for cardiovascular complications. CKD patients develop a uremic cardiomyopathy characterized by left ventricular hypertrophy (LVH), fibrosis and susceptibility for arrhythmias. Furthermore, CKD is associated with increased activity of the sympathetic nervous system (SNS). Renal denervation (RDN) is a method of ablating renal sympathetic nerve fibers using radiofrequency or ultrasound energy. Today, RDN represents a catheter-based therapeutic option for patients with hypertension. In addition, RDN has been shown to reduce LVH. Uremic toxins, above all Indoxyl sulfate (IS), play a key role in the development of uremic cardiomyopathy. Also, so-called pattern recognition receptors (PRRs) contribute to myocardial inflammation in CKD. It is unknown whether RDN influences the development of uremic cardiomyopathy. This study aimed at investigating the influence of RDN on uremic cardiomyopathy in a rat model of CKD. Furthermore, we analyzed whether RDN has any effects on renal parameters in this rat model.

### Methods:

Over a period of 16 weeks, male Sprague-Dawley-Rats received either standard chow (CTRL, n=4) or a 0,25%-adenine-containing diet to induce CKD (AD, n=10). After 4 weeks, AD were randomized to sham (AD, n=5) or RDN (AD-RDN, n=5). RDN was performed chemically using a phenol/ethanol solution. AD and CTRL were subjected to sham procedures. After 16 weeks, animals were sacrificed and organs were harvested for further analyses. LVH was assessed by echocardiography, cardiac MRI and by histological analysis. Plasma, hepatic and urinary concentrations of IS were measured by ELISA. Western blot analyses were used to determine the expression of the PRRs RAGE, TLR2 and TLR4 as well as their ligand HMGB1 in myocardium and kidney. Successful RDN was confirmed by measurement of norepinephrine in kidney tissue. In-vitro experiments using H9c2 cells were conducted to study the pro-hypertrophic effects of IS and the influence of the decoy-receptor sRAGE. Cell hypertrophy was estimated by forward scatter in FACS analysis.

### Results:

In AD, LV wall thickness (LV septum thickness,  $2.36 \pm 0.03$ mm vs.  $1.92 \pm 0.02$ mm in CTRL,  $p < 0.0001$ ), E/A ratio, a marker of diastolic function, as well as myocyte cross sectional

area were increased compared with CTRL. After RDN, LV wall thickness ( $1.95 \pm 0.05$  mm,  $p < 0.0001$  vs. AD), E/A ratio ( $1.08 \pm 0.04$  vs.  $1.93 \pm 0.12$  in AD,  $p < 0.0001$ ) as well as myocyte cross sectional area were significantly reduced. Plasma concentration of IS was significantly increased in AD ( $0.71 \pm 0.10$   $\mu$ g/ml vs.  $0.2 \pm 0.12$   $\mu$ g/ml in CTRL,  $p = 0.0044$ ) and decreased in AD-RDN ( $0.28 \pm 0.072$   $\mu$ g/ml,  $p = 0.0073$  vs. AD). Renal excretion of IS was unaltered by RDN, while hepatic concentration of IS was reduced after RDN ( $1.72 \pm 0.09$   $\mu$ g/500 $\mu$ g vs.  $2.45 \pm 0.21$   $\mu$ g/500 $\mu$ g in AD,  $p = 0.023$ ). LVH correlated significantly with plasma IS ( $n = 14$ ,  $r = 0.67$ ,  $p = 0.008$ ). Expression of cardiac PRRs showed regulation only with respect to RAGE (RAGE expression +266% in AD vs. CTRL,  $p = 0.015$ ; -88% in AD-RDN vs. AD,  $p = 0.047$ ). Myocardial sRAGE was increased by RDN (+433% vs. AD,  $p = 0.013$ ). TLR2 and TLR4 did not show any regulation both in the heart and kidney. The beneficial effects of RDN were independent of blood pressure decrease and renal function.

**Conclusions:**

RDN reduces plasma concentration of IS and improves LVH in a rat model of CKD. The decreased IS concentration may be due to decreased intestinal absorption or hepatic production of the toxin. RDN may represent a therapeutic option for patients with CKD to reduce cardiovascular outcomes.

## 2 Einleitung

### 2.1 Chronische Nierenerkrankung

#### 2.1.1 Definition und Klassifikation

Die chronische Nierenerkrankung (*chronic kidney disease*, CKD) ist definiert als ein mindestens drei Monate persistierender Zustand eingeschränkter Funktion oder struktureller Abnormität der Niere.<sup>1</sup> Zur Beurteilung der Nierenfunktion werden die geschätzte glomeruläre Filtrationsrate (*estimated glomerular filtration rate*, eGFR) sowie das Ausmaß der Albuminurie herangezogen.<sup>1</sup> Die eGFR wird durch Gleichungen berechnet, die wesentlich durch die Serumkonzentration des Retentionsparameters Kreatinin (oder alternativ Cystatin C) beeinflusst wird, während die Albuminurie durch die Albumin-Kreatinin-Ratio approximiert wird.<sup>1</sup> Die Einteilung der CKD-Stadien erfolgt nach den beiden Parametern eGFR (G1–G5) und Albuminurie (A1–A3), wobei das Risiko einer CKD mit abfallender eGFR sowie hoher Albuminurie steigt (**Abbildung 1**).

Neben einer ausreichenden GFR ist eine intakte tubuläre Funktion unerlässlich. Ein relativ neuer Biomarker für die tubuläre Funktion stellt das *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin* (NGAL) dar.<sup>220</sup> NGAL ist ein 25 kDa Protein, welches frei glomerulär filtriert und von Tubulusepithelzellen des distalen Nephrons in den Urin sezerniert wird.<sup>75</sup> NGAL im Urin ist sowohl bei akuter Nierenschädigung als auch bei CKD erhöht.<sup>164</sup> Bei Patienten

			Albuminurie [mg/g]		
			A1	A2	A3
			< 30	30–300	> 300
GFR [ml/min/1,73 m <sup>2</sup> ]	G1	≥ 90			
	G2	60–89			
	G3a	45–59			
	G3b	30–44			
	G4	15–29			
	G5	< 15			

**Abbildung 1: Einteilung und Prognose der CKD**

grün: geringes Risiko, gelb: moderat erhöhtes Risiko, orange: hohes Risiko, rot: sehr hohes Risiko. **GFR** glomeruläre Filtrationsrate (Quelle: modifiziert nach KDIGO-Leitlinie, 2012<sup>1</sup>)

mit Diabetes mellitus kann der tubuläre Marker NGAL als sehr sensitiver diagnostischer Test einer Nephropathie eingesetzt werden, da es bereits vor dem Einsetzen einer Albuminurie eine Nierenschädigung anzeigt.<sup>24</sup>

## 2.1.2 Klinik und Epidemiologie der CKD

CKD-Patienten zeigen verschiedene Symptome, die sowohl durch ihre Erkrankung, als auch durch die Behandlung hervorgerufen werden.<sup>3</sup> Obwohl terminal niereninsuffiziente Patienten eine starke Lebensqualität-mindernde Symptomlast aufweisen, ist über Patienten in früheren Stadien weniger bekannt.<sup>27</sup> Bei letzterem Patientenkollektiv sind die häufigsten Symptome verstärkte Müdigkeit, Schlafstörungen und Knochen- bzw. Gelenkschmerzen.<sup>27</sup> Bei fortgeschrittener CKD zeigen die Patienten Müdigkeit, Appetitlosigkeit, Übelkeit, Erbrechen, metallischen Geschmack, Gewichtsverlust, Juckreiz, Luftnot oder periphere Ödeme.<sup>32</sup> Ferner wird über psychologische Symptome wie Besorgnis, Nervosität, Gereiztheit und Traurigkeit, besonders bei Patienten mit fortgeschrittener CKD ohne Nierenersatztherapie, berichtet.<sup>3</sup>

Im Jahr 2017 litten weltweit 697,5 Mio. Menschen an CKD jedes Stadiums, entsprechend einer globalen Prävalenz von 9,1 %, wobei 1,2 Mio. Menschen an den Folgen der CKD verstarben.<sup>18</sup> 2010 betrug die Zahl der Patienten mit Nierenersatztherapie 2,6 Mio., sie soll sich bis 2030 auf 5,4 Mio. mehr als verdoppeln.<sup>129</sup> Insgesamt ist die CKD eine direkte Ursache globaler Morbidität und Mortalität und ein wichtiger Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen.<sup>18</sup>

## 2.1.3 Pathophysiologie der CKD

Zu den häufigsten Ursachen, die eine CKD hervorrufen können, gehören Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie und Glomerulonephritiden.<sup>38</sup> Weitere Ursachen sind hereditäre Erkrankungen (z. B. autosomal-dominante polyzystische Nierenerkrankung), systemische Autoimmunkrankheiten (z. B. Lupus erythematoses), obstruktive Uropathien und rezidivierende Pyelonephritiden sowie die Einnahme nephrotoxischer Medikamente (z. B. nicht-steroidale Antirheumatika).

Die beim Diabetes mellitus (Typ 1 und 2) auftretende hyperglykämische Stoffwechsellage bewirkt eine renale Hyperfiltration sowie die Generierung von zirkulierenden *advanced glycation endproducts* (AGEs) und hämodynamischen und hormonellen Veränderungen, die ihrerseits zur Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und

Entzündungsmediatoren führen.<sup>203</sup> Innerhalb dieses Milieus entwickelt sich eine diabetische Nephropathie (Kimmelstiel-Wilson-Syndrom), die sich histopathologisch in Form von Verdickung der glomerulären Basalmembran sowie interstitieller Fibrose und Glomerulosklerose manifestiert.<sup>203</sup>

Des Weiteren ist der arterielle Hypertonus ein Hauptrisikofaktor für die Entstehung einer CKD. Übersteigt der arterielle Druck den Bereich der renalen Autoregulation (Widerstandsänderung der afferenten Arteriolen), entstehen disruptive vaskuläre und glomeruläre Läsionen.<sup>141</sup> Die Schädigung des Glomerulus äußert sich vor allem in segmentaler Nekrose und Glomerulosklerose mit konsekutiver Hyperfiltration von Plasmaproteinen.<sup>141</sup> Zudem bewirkt die Konstriktion des Vas efferens einen glomerulären Druckanstieg mit resultierender Proteinurie, welche durch eine Therapie mit Inhibitoren des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) unterbunden werden kann.

Die Auswirkungen der CKD auf den Körper sind sehr vielschichtig und beinhalten Inflammation, Störungen des autonomen (ANS) und zentralen Nervensystems (ZNS), kardiopulmonale und vaskuläre Erkrankungen sowie Knochenkrankheiten.<sup>243</sup>

Die Serum-Spiegel von Entzündungsmediatoren steigen mit zunehmendem Nierenfunktionsverlust.<sup>243</sup> Zum einen ist die Niere für die Clearance zahlreicher Zytokine verantwortlich,<sup>7,157</sup> zum anderen führt die sympathische Aktivierung bei CKD zur vermehrten Produktion von Zytokinen.<sup>122</sup> Vermehrter oxidativer Stress und Akkumulation von AGEs sind weitere Ursachen für Inflammation, die das kardiovaskuläre Risiko erhöhen.<sup>213</sup> Folglich kann die CKD im weiteren Sinne als chronisch inflammatorische Erkrankung aufgefasst werden.<sup>191</sup>

Störungen des Wasser- und Elektrolythaushaltes sind häufig bei CKD-Patienten anzutreffen. Dabei scheint insbesondere die Hypervolämie ein Risikofaktor mit hohem prädiktivem Wert für renale und kardiovaskuläre Endpunkte zu sein.<sup>84</sup> Hypervolämie kann ein exzentrisches Remodelling des Herzens zur Folge haben, das mit einer schlechteren Prognose als eine konzentrische Hypertrophie assoziiert ist.<sup>123</sup> Erhöhte links- und rechtsventrikuläre Füllungsdrücke aufgrund von Flüssigkeitsretention führen letztlich auch zu erhöhten Drücken in den Nierenvenen<sup>167</sup> mit konsekutiver Verminderung der renalen Perfusion und Erhöhung der Natriumretention, wodurch ein *Circulus vitiosus* aufrechterhalten wird.<sup>62</sup> Wegen der oftmals verminderten Kaliumausscheidung ist bei niereninsuffizienten Patienten häufig eine chronische Hyperkaliämie anzutreffen,<sup>41</sup> die nicht selten dem Einsatz von Inhibitoren des RAAS bei diesem Patientenkollektiv geschuldet ist.<sup>12</sup> Auch durch die Hyperkaliämie weisen CKD-Patienten eine erhöhte kardiovaskuläre Mortalität und Inzidenz ventrikulärer Arrhythmien bei akutem Myokardinfarkt auf.<sup>79</sup>

Darüber hinaus sind CKD-Patienten von einer Reihe endokriner Störungen wie renaler Anämie betroffen<sup>11</sup> oder leiden an einem sekundären Hyperparathyreoidismus aufgrund einer verminderten Aktivierung von Vitamin D.<sup>53</sup>

## 2.2 Urämische Kardiomyopathie

### 2.2.1 Pathophysiologie der urämischen Kardiomyopathie

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind bei CKD-Patienten eine häufige Komorbidität.<sup>120</sup> Ist eine chronische Niereninsuffizienz ursächlich für eine Schädigung des Herzens, spricht man von einem kardierenalen Syndrom Typ IV, das auch als chronisches renokardiales Syndrom bezeichnet wird.<sup>138</sup> Der hierzu synonym gebräuchliche Begriff „urämische Kardiomyopathie“ ist geprägt durch linksventrikuläre Hypertrophie (LVH), ausgeprägte kardiale Fibrose, Wandverdickungen intramyokardial gelegener Arteriolen und vorwiegend diastolische Dysfunktion, gefolgt von einer systolischen Dysfunktion mit fortschreitender chronischen Herzinsuffizienz.<sup>120</sup> Da die traditionellen Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen wie arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus und Hyperlipidämie das hohe Risiko von CKD-Patienten nicht ausreichend erklären, sind Urämietoxine, insbesondere der Fibroblasten-Wachstumsfaktor 23 (FGF23), Indoxylsulfat (IS) und p-Cresylsulfat, als potentielle nicht-traditionelle Risikofaktoren ins Zentrum des Interesses gerückt.<sup>120</sup>

Urämietoxine können gemäß ihres Molekulargewichtes und ihrer Proteinbindung in drei Gruppen unterteilt werden: (i) kleine Moleküle (< 500 Da) ohne Proteinbindung, (ii) proteingebundene Moleküle und (iii) große Moleküle (> 500 Da).<sup>140</sup> Während kleine wasserlösliche Urämietoxine durch konventionelle Hämodialyse relativ einfach eliminiert werden können, gestaltet sich die Entfernung größerer und insbesondere proteingebundener Moleküle schwieriger.<sup>44</sup>

Zu den kleinen wasserlöslichen Molekülen zählen unter anderem Kreatinin, Harnstoff, Phosphat, Harnsäure, asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) und Trimethylamin-N-oxid. Es wurden zahlreiche negative Auswirkungen dieser Urämietoxine auf das vaskuläre System beschrieben, jedoch mangelt es an Untersuchungen bezüglich direkter kardialer Effekte.<sup>120</sup> Hohe Harnstoffkonzentrationen wirken beispielsweise durch Carbamylierung von Proteinen (posttranslationale Modifikation) atherogen und erhöhen die kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität.<sup>205</sup>

Die Gruppe der großen Urämietoxine (> 500 Da) beinhaltet unter anderem oxidiertes *low density lipoprotein*, AGEs, inflammatorische Zytokine sowie den FGF23. AGEs führen durch Inaktivierung der Stickstoffmonoxid-(NO)-Synthese zu Vasokonstriktion<sup>44</sup> und bergen somit ein hohes vaskuläres Risikopotential. Ein Urämietoxin mit direkter kardiotoxischer Wirkung ist FGF23, ein Hormon, das im Phosphat- und Vitamin D-Haushalt eine regulatorische Funktion hat.<sup>120</sup>

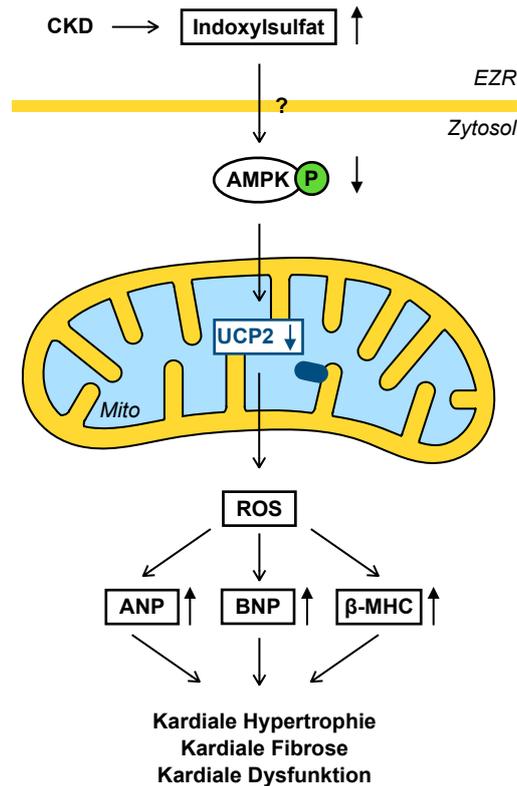
IS und p-Cresylsulfat sind niedermolekulare, an Proteine (hauptsächlich Albumin) gebundene Urämietoxine,<sup>212</sup> die aus den Vorläufermolekülen Indol und p-Cresol gebildet werden. Das intestinale Mikrobiom, das für die Produktion dieser Vorstufen verantwortlich ist, scheint bei CKD-Patienten zugunsten von Indol- und p-Cresol-produzierender Bakterien verschoben zu sein.<sup>221</sup> Darüber hinaus ist die intestinale Barriere bei Urämie geschädigt, sodass mehr Toxine resorbiert werden.<sup>6</sup> Sowohl IS als auch p-Cresylsulfat sind toxisch und mit der Progression vaskulärer und renaler Erkrankungen assoziiert.<sup>204</sup>

In-vitro-Experimente zeigten, dass IS pro-fibrotische, pro-hypertrophische und pro-inflammatorische Wirkungen besitzt. Stimulation von neonatalen Rattenfibroblasten (*neonatal rat cardiac fibroblasts, NRCFs*) führte zu erhöhter Kollagensynthese und neonatale Rattenkardiomyozyten (*neonatal rat cardiac myocytes, NRCMs*) hypertrophierten.<sup>118</sup> Humane monozytäre THP-1-Zellen reagierten auf IS-Stimulation mit erhöhter Expression von Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) sowie von Interleukin (IL)-6 und IL-1 $\beta$ .<sup>118</sup> Die beobachtete Hypertrophie von NRCM nach Stimulation beruht teilweise auf einer Hemmung der Adenosinmonophosphat-aktivierten Proteinkinase (AMPK) mit konsekutiver ROS-Produktion (**Abbildung 2**).<sup>227</sup> Auch in-vivo-Studien konnten die Kardiotoxizität von IS nachweisen, indem die orale Gabe von AST-100 (Urämietoxin-Adsorbens) zu einer Normalisierung der kardialen Fibrose im 5/6-Nephrektomie-Rattenmodell führte.<sup>119</sup>

Neben der urämischen Komponente bei CKD spielt die chronisch erhöhte Sympathikusaktivität ebenfalls eine Rolle bei der Pathogenese der Kardiomyopathie.<sup>99</sup>

## 2.3 Sympathoadrenerges System

Das sympathoadrenerge System ist Teil des ANS und reguliert verschiedenste Körperfunktionen im Sinne einer ergotropen Reaktion. Die Somata der ersten (präganglionären) sympathischen Neurone liegen im Seitenhorn des thorakolumbalen Rückenmarkes. Diese cholinergen Neurone bilden in Grenzstrang- oder Prävertebralganglien Synapsen mit dem zweiten (postganglionären) sympathischen Neuron, dessen Axone die peripheren Organe innervieren und als Neurotransmitter Noradrenalin (NA) (außer bei



**Abbildung 2: IS-induzierte Kardiomyopathie**

IS reduziert, zumindest teilweise durch Inaktivierung der AMPK, die mitochondriale UCP2-Expression. Die Folgen sind erhöhte ROS-Produktion und kardiale Hypertrophie.<sup>227</sup> **AMPK** AMP-aktivierte Proteinkinase, **ANP** atriales natriuretisches Peptid, **BNP** brain natriuretic peptide, **EZR** Extrazellulärraum, **MHC** myosin heavy chain, **Mito** Mitochondrium, **ROS** reaktive Sauerstoffspezies, **UCP2** uncoupling protein 2

Schweißdrüsen) freisetzen. Eine Ausnahme bildet das Nebennierenmark, das cholinerg von präganglionären Neuronen innerviert wird und die Katecholamine Adrenalin und NA (im Verhältnis 4:1) sezerniert. Es kann daher als endokrin wirksames sympathisches Ganglion angesehen werden. Katecholamine binden an metabotrope Adrenozeptoren (AR), die in zwei Klassen ( $\alpha$ - und  $\beta$ -AR) eingeteilt werden.  $\alpha_1$ -AR sind mit  $G_q$  gekoppelt und führen über Aktivierung der Phospholipase C und dem *second messenger* Inositoltriphosphat zu erhöhten zytosolischen Calcium-Konzentrationen. Die Sympathikus-induzierte Vasokonstriktion beruht wesentlich auf der  $\alpha_1$ -AR-abhängigen glattmuskulären Kontraktion (**Abbildung 3 A**).  $\alpha_2$ -AR werden vor allem auf der präsynaptischen Membran exprimiert und dienen einer negativen Rückkopplung, indem sie durch ein inhibitorisches G-Protein ( $G_i$ ) die Transmitterfreisetzung vermindern.  $\beta$ -AR sind mit stimulierenden G-Proteinen ( $G_s$ ) gekoppelt und wirken bei Ligandenbindung positiv chronotrop und inotrop ( $\beta_1$ -AR) (**Abbildung 3 B**), bronchodilatatorisch ( $\beta_2$ -AR) und lipolytisch ( $\beta_3$ -AR). NA hat eine hohe Affinität zu  $\alpha$ -AR, während Adrenalin stärker an  $\beta_2$ -AR bindet. Für  $\beta_1$ -AR haben beide Katecholamine etwa die gleiche Affinität.

Die präganglionären sympathischen Neurone im Seitenhorn des Rückenmarks erhalten Afferenzen von höheren Zentren, insbesondere der rostralen ventrolateralen Medulla oblongata, der rostralen ventromedialen Medulla oblongata, den kaudalen Raphe-Kernen, der noradrenergen Zellgruppe A5 im kaudalen ventrolateralen Pons und dem Nucleus paraventricularis im Hypothalamus.<sup>46</sup> Außerdem wird die sympathische Aktivität durch allgemein-viszerale Afferenzen moduliert, die Informationen peripherer Sensoren, wie arterieller und kardialer Baro- und Chemorezeptoren, in das ZNS leiten.

Die Niere wird efferent von postganglionären sympathischen Neuronen, deren Somata sich hauptsächlich im Ganglion aorticorenale befinden, innerviert. Erhöhte Sympathikus-Aktivität bewirkt in der Niere eine  $\beta_1$ -AR-abhängige Reninausschüttung im juxtaglomerulären Apparat und eine  $\alpha_1$ -AR-abhängige Natriumretention im Sammelrohr sowie Vasokonstriktion renaler Arterien.<sup>46</sup>

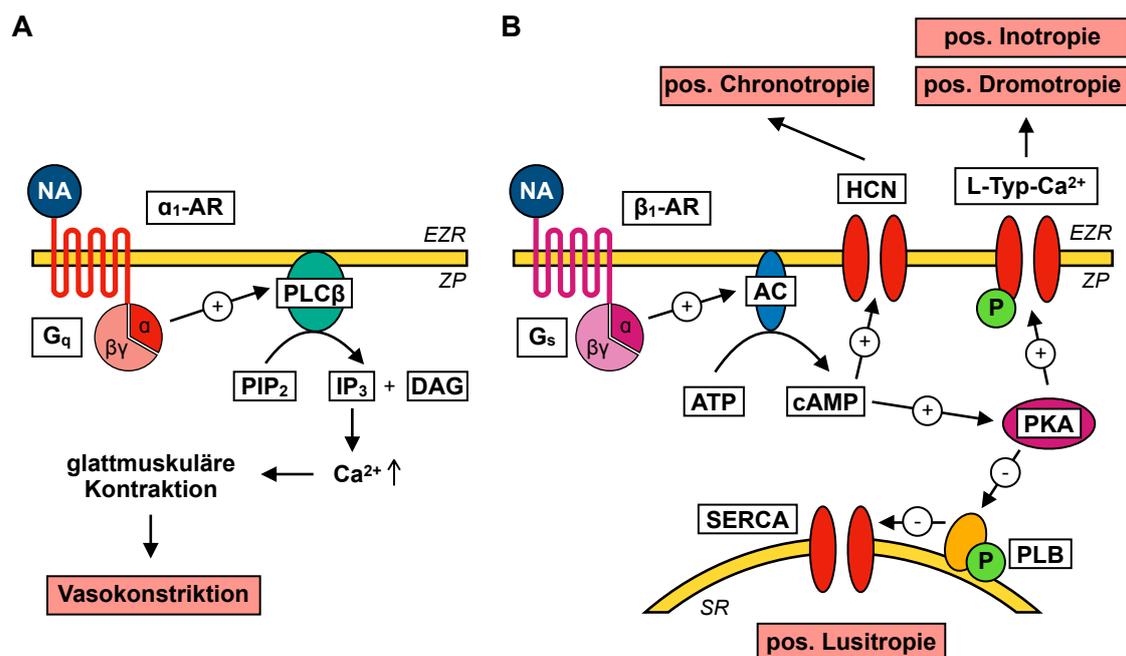


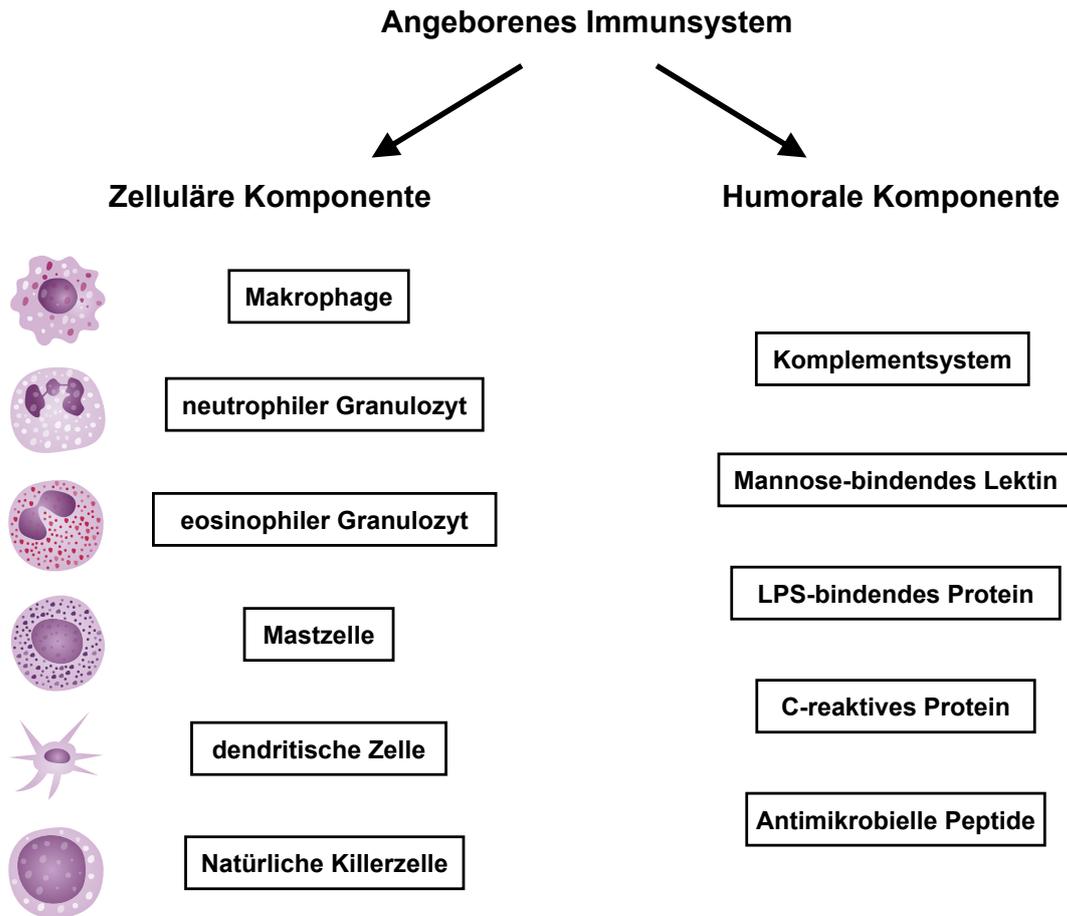
Abbildung 3: Adrenerge Signalkaskaden

(A)  $\alpha_1$ -adrenerge Signalkaskade in glatter Muskelzelle. NA bindet an den  $\alpha_1$ -AR und führt über Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration zu einer Tonussteigerung glatter Muskelzellen. (B)  $\beta_1$ -adrenerge Signalkaskade im Herzen. Im Herzen bindet NA an  $\beta_1$ -AR und erzielt über den second messenger cAMP einen positiv chronotropen, inotropen, dromotropen und lusitropen Effekt. Es sei darauf hingewiesen, dass diese vier Wirkungen räumlich voneinander getrennt sind (Chronotropie im Sinusknoten, Dromotropie im AV-Knoten, Inotropie und Lusitropie im Ventrikelmyokard). AC Adenylatcyclase, AR Adrenozeptor, ATP Adenosintriphosphat, cAMP cyclisches Adenosinmonophosphat, DAG Diacylglycerol, EZR Extrazellulärraum, G<sub>q/s</sub> GTP-bindendes Protein, HCN hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel, IP<sub>3</sub> Inositol-1,4,5-trisphosphat, L-Typ-Ca<sup>2+</sup> L-Typ-Calcium-Kanal, NA Noradrenalin, P Phosphat, PIP<sub>2</sub> Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat, PKA Proteinkinase A, PLB Phospholamban, PLC $\beta$  Phospholipase C $\beta$ , pos. positiv, SERCA sarcoplasmatic reticulum calcium ATPase, SR Sarkoplasmatisches Retikulum, ZP Zytoplasma

Langanhaltende sympathische Überaktivität trägt wesentlich zur Progression einer chronischen Herzinsuffizienz (*chronic heart failure*, CHF) bei,<sup>199</sup> obwohl in der Initialphase der Erkrankung diesem Mechanismus auch ein Nutzen zukommt, weil positive Inotropie und periphere Vasokonstriktion eine beginnende CHF kompensieren können.<sup>218</sup> Das Myokard bei CHF weist eklatante Veränderungen der  $\beta$ -AR-abhängigen Signaltransduktion auf, welche sowohl auf einer geringeren Dichte der  $\beta$ -AR, als auch auf einer Entkopplung des assoziierten G-Proteins fußt.<sup>21</sup> Insbesondere ist die Zahl der  $\beta_1$ -AR vermindert (50 % der  $\beta_1$ -AR-mRNA bei NYHA IV vermindert), während die  $\beta_2$ -AR-Expression nahezu unverändert ist.<sup>56</sup> Die Desensibilisierung der  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren beginnt mit deren Phosphorylierung, vornehmlich katalysiert durch die  $\beta$ -AR Kinase 1 ( $\beta$ ARK1), folgender Entkopplung des assoziierten G-Proteins und letztendlicher Internalisierung des Rezeptors.<sup>154</sup> Es scheint sich dabei insofern um eine protektive Adaptation zu handeln, als die intrazellulären Konzentrationen des *second messenger* zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) trotz erhöhter NA-Spiegel konstant gehalten werden.<sup>58</sup> Längerfristig erhöhte sympathische Aktivität, gemessen an NA-Konzentrationen im Plasma, ist mit einer erhöhten Mortalität und größerem Risiko fataler kardiovaskulärer Ereignisse vergesellschaftet.<sup>71</sup> Sympathische Stimulation kann, besonders im ischämisch infarzierten Myokard, die Entstehung ventrikulärer Tachyarrhythmien fördern.<sup>182</sup>

## 2.4 Angeborenes Immunsystem und Pattern Recognition Rezeptoren

Das angeborene (früher: unspezifische) Immunsystem dient der schnellen Erkennung und Eliminierung pathogener Fremdkörper und kann in eine zelluläre und humorale Komponente eingeteilt werden (**Abbildung 4**). Im Gegensatz zur adaptiven Immunantwort, die vermittelt somatischer Rekombination eine Vielzahl an Rezeptoren für fremde Antigene generiert, beruht das angeborene Immunsystem auf einer geringeren Zahl an Rezeptoren, die hochkonservierte pathogene Strukturen, sogenannte *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), erkennen. Allerdings wird es durch endogene Moleküle, die im Rahmen einer Gewebeschädigung freigesetzt werden (*damage-associated molecular patterns*, DAMPs), ebenfalls aktiviert.



**Abbildung 4: Komponenten des angeborenen Immunsystems**

Das angeborene Immunsystem kann in eine zelluläre (links) und eine humorale (rechts) Komponente eingeteilt werden. (Quelle: modifiziert nach Turvey et al., 2010<sup>201</sup>)

Zellen des angeborenen Immunsystems exprimieren verschiedene Rezeptoren, die PAMPs und DAMPs binden und die Zelle aktivieren. Aufgrund ihrer Fähigkeit, *patterns* (deutsch „Muster“) zu erkennen, bezeichnet man sie auch als Pattern Recognition Receptors (PRRs). Einen Überblick über die verschiedenen PRRs bietet **Abbildung 5**. Es existieren sowohl transmembranäre PRRs (Toll-like-Rezeptoren (TLR), C-Typ-Lektin-Rezeptor, Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE)), die extrazelluläre oder endosomale Liganden binden, als auch zytosolische Rezeptoren (RIG-I-like Rezeptor (RLR), NOD-like Rezeptor (NLR), Cyclic-GMP-AMP-Synthase). Allen PRRs ist gemein, dass die Ligandenbindung proinflammatorische Signalkaskaden auslöst, beispielsweise durch Induktion der Transkriptionsfaktoren *nuclear factor* (NF)- $\kappa$ B oder *Interferon regulatory factor 3* (IRF3) oder durch Induktion eines Inflammasoms, wodurch Zytokine (IL-1 $\beta$ , IL-18) sezerniert werden.<sup>83,91,103,201</sup>

TLR bilden insofern eine bedeutende Untergruppe der PRRs, als sie die ersten Rezeptoren waren, die als PRRs identifiziert wurden und bis heute sehr gut charakterisiert sind.<sup>100</sup>

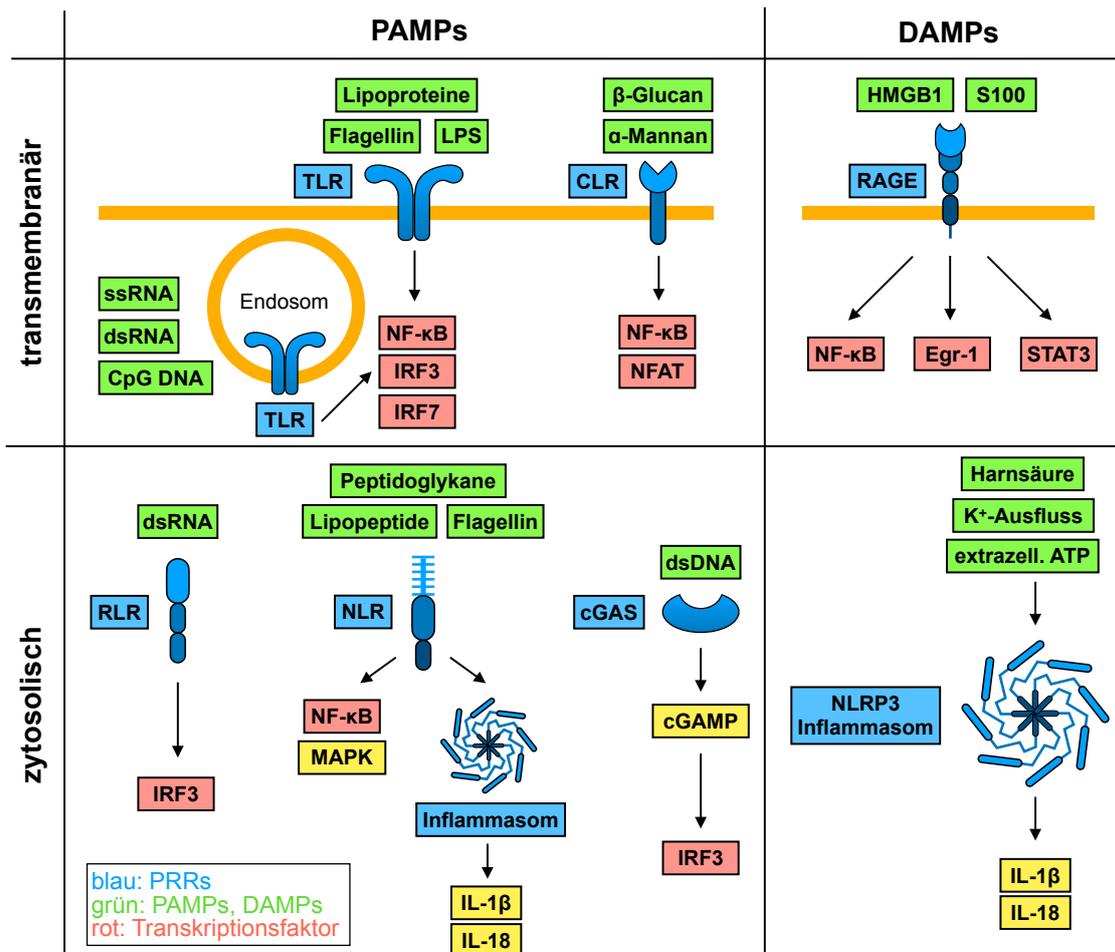


Abbildung 5: Übersicht über Pattern Recognition Receptors (PRRs)

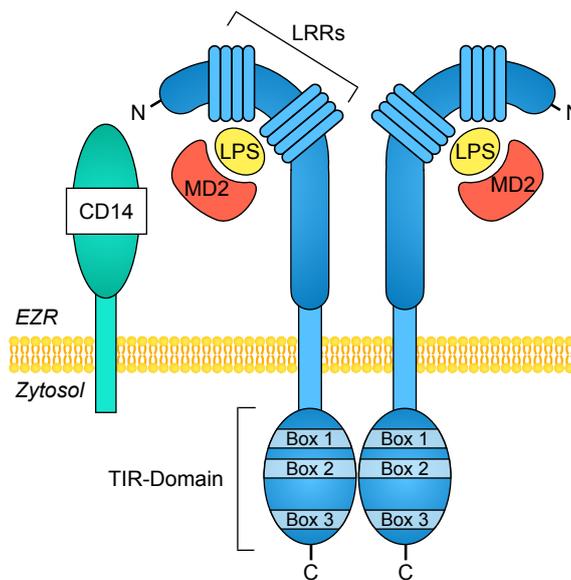
Die PRRs (blau) können in transmembranäre und zytosolische Rezeptoren unterteilt werden. Erstere binden Liganden im Extrazellularraum oder im endosomalen Lumen, letztere im Zytoplasma. Die Liganden (grün) sind PAMPs (pathogenen Ursprungs) oder DAMPs (endogenen Ursprungs). Die Wirkung wird durch Induktion eines Transkriptionsfaktors (rot) hervorgerufen, während das Inflammasom eine unmittelbare Antwort durch Ausschüttung von Zytokinen generiert. **ATP** Adenosintriphosphat, **cGAMP** cyclic GMP-AMP, **cGAS** Cyclic GMP-AMP synthase, **CLR** C-Typ-Lektin-Rezeptor, **CpG DNA** CpG-Motiv-DNA, **DAMPs** damage-associated molecular patterns, **dsDNA** Doppelstrang-DNA, **dsRNA** Doppelstrang-RNA, **Egr-1** early growth response protein 1, **extrazell.** extrazellulär, **HMGB1** High mobility group box 1 protein, **IL** Interleukin, **IRF** Interferon regulatory factor, **LPS** Lipopolysaccharide, **MAPK** mitogen-activated protein kinase, **NFAT** nuclear factor of activated T-cells, **NF- $\kappa$ B** nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells, **NLR** NOD(nucleotide-binding oligomerization domain)-like Rezeptor, **NLRP3** NLR pyrin 3, **PAMPs** pathogen-associated molecular patterns, **RAGE** Receptor for Advanced Glycation Endproducts, **RLR** RIG(retinoic acid-inducible gene)-I-like Rezeptor, **ssRNA** Einzelstrang-RNA, **STAT3** signal transducer and activator of transcription 3, **TLR** Toll-like Rezeptor (Quelle: zusammengetragen aus Turvey et al., 2010<sup>201</sup>; Kagan et al., 2015<sup>91</sup>; Kim et al., 2016<sup>103</sup>; Hudson et al., 2018<sup>83</sup>).

## 2.4.1 Toll-like Rezeptor 4

Die Entdeckung der TLR ereignete sich im Zuge der Identifizierung des Toll-Rezeptors, der von Insekten exprimiert wird und essentiell für die Etablierung dorsoventraler Polarität während der Embryogenese ist.<sup>2</sup> Der Name „Toll“ rührt aus der Exclamatio „Das war ja toll!“ der Nobelpreisträgerin Christiane Nüsslein-Volhard, mit der sie 1985 ihr Erstaunen über eine seltsam aussehende Fliegenlarve mit unterentwickeltem ventralen Körperabschnitt äußerte.<sup>72</sup> Weitere Untersuchungen legten nahe, dass dem Toll-Rezeptor eine bedeutende Rolle bei der Abwehr von Pilzinfektionen zukommt.<sup>2</sup> Folglich wurde das Interesse auf die Funktion von Toll-Rezeptoren im angeborenen Immunsystem gerichtet. Im Genom von Säugern fanden sich ebenfalls Proteine, die dem Toll-Rezeptor von *Drosophila* sehr ähnlich sind. 1997 gelang es, das erste humane Homolog zum *Drosophila*-Toll-Rezeptor zu klonen, heute bekannt als TLR4.<sup>139,196</sup> In der Folge sind weitere strukturell verwandte Proteine identifiziert worden; das menschliche Genom codiert für insgesamt zehn verschiedene TLR (TLR1–10).

TLR4 ist ein transmembranäres Glykoprotein, das eine dem IL-1-Rezeptor homologe zytoplasmatische Domäne aufweist.<sup>2,100</sup> Einzelheiten zur genauen Struktur und Aktivierung des Rezeptors können der **Abbildung 6** entnommen werden. Die Ligandenbindung führt zu einer Konformationsänderung und einer Rekrutierung spezieller Adapterproteine.<sup>143</sup> Es kann zwischen einer *myeloid differentiation primary response protein* (MyD88)-abhängigen und MyD88-unabhängigen Signaltransduktion unterschieden werden (**Abbildung 7**), deren wichtigste Effektoren die Transkriptionsfaktoren *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- $\kappa$ B) und IRF3 sind.<sup>143</sup>

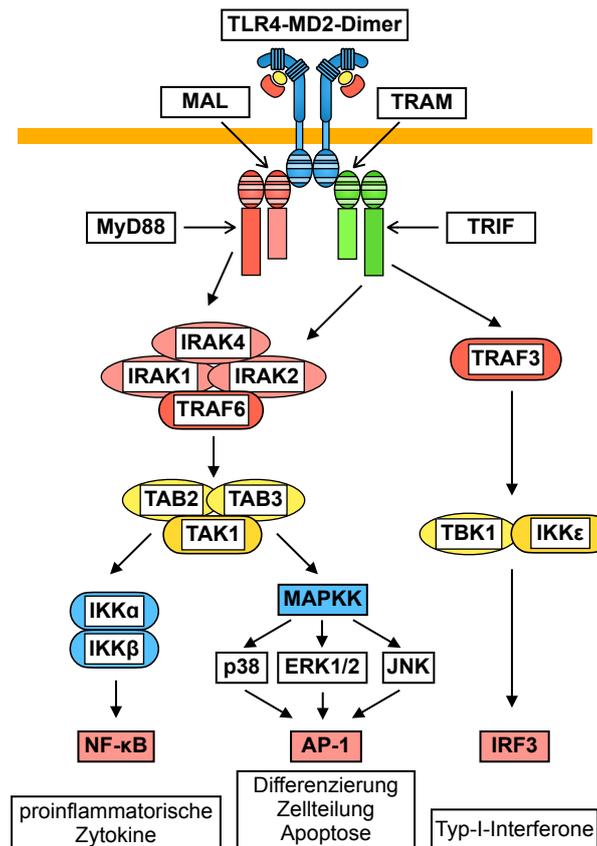
Die Liganden des TLR4 können in exogene PAMPs und endogene DAMPs eingeteilt werden. Zu den PAMPs gehören unter anderem Lipopolysaccharide (LPS), die Bestandteile der Zellwand gram-negativer Bakterien sind,<sup>159</sup> das *fusion protein* des Respiratorisches-Synzytial-Virus<sup>112</sup> und Teichonsäure aus der Zellwand gram-positiver Bakterien.<sup>228</sup> DAMPs sind Moleküle, die der extrazellulären Matrix entstammen oder intrazelluläre Mediatoren, die von Zellen passiv ausgeschieden oder aktiv sezerniert werden.<sup>143</sup> Ein prototypischer Vertreter der extrazellulären TLR4-Liganden ist das Glykosaminoglykan Hyaluronan, das im intakten Gewebe in hochmolekularer Form vorliegt, jedoch bei einem Gewebeschaden zu kleineren Fragmenten degradiert wird und Makrophagen über TLR4 aktivieren kann.<sup>197</sup> Intrazelluläre TLR4-Liganden sind *high mobility group box 1* (HMGB1) und Hitzeschockproteine (HSP), die im Rahmen eines Zellschadens oder Nekrose freigesetzt werden.<sup>30,130</sup>



**Abbildung 6: Struktur und Ligandenbindung des TLR4**

Das Protein CD14 bindet LPS und überträgt es auf den TLR4-MD2-Rezeptorkomplex. Nach Ligandenbindung dimerisiert dieser Komplex. N-terminal weist der TLR4 tandem repeats Leucin-reicher Regionen auf (LRRs). An die Transmembrandomäne schließt sich die evolutionär konservierte zytosolische TIR-Domain an, die drei homologe Regionen (Box 1–3) enthält. **C** Carboxyterminus, **EZR** Extrazellulärraum, **LPS** Lipopolysaccharid, **LRRs** Leucin-rich Repeats, **MD2** myeloid differentiation protein 2, **PM** Plasmamembran, **TIR-Domain** Toll/IL-1R homology domain (Quelle: adaptiert nach Akira et al., 2004<sup>2</sup>).

TLR4 wurde mit einigen pathophysiologischen Vorgängen in Zusammenhang gebracht. Der nach einer temporären Ischämie beobachtete Reperfusionsschaden beruht teilweise auf der Freisetzung intrazellulärer Moleküle (z. B. HMGB1), die über Bindung an PRRs die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und konsekutiv die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten bewirken.<sup>143</sup> TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B-Signaling ist involviert in der myokardialen Inflammation nach koronarer Mikroembolisation, einer Komplikation bei akutem Koronarsyndrom und perkutaner koronarer Intervention.<sup>192</sup> In-vitro-Experimente zeigen, dass ebendiese Signalkaskade auch eine Rolle beim Hypoxie/Reoxygenierungs-Schaden in H9c2-Zellen und NRCMs spielt.<sup>67</sup> Über die Hypoxie-bedingten Läsionen hinaus konnte demonstriert werden, dass die Angiotensin-II (AT-II)-induzierte kardiale Hypertrophie abhängig von TLR4/TIR-domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$  (TRIF)- und TLR3/TRIF-Signalwegen ist.<sup>186</sup>



**Abbildung 7: TLR4-Signaltransduktion**

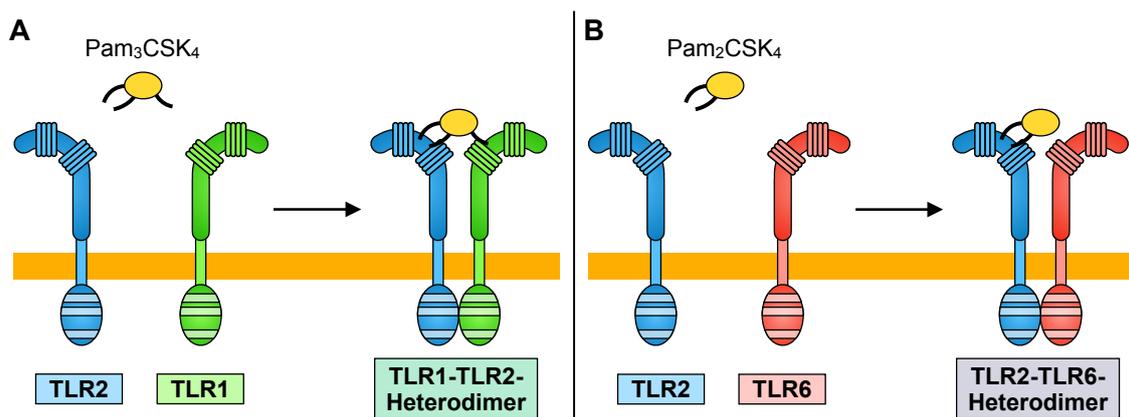
Bindung des Liganden LPS führt zur Dimerisierung des TLR4-MD2-Komplexes. Konformationsänderungen der zytoplasmatischen Domäne des TLR4 rekrutieren Adapterproteine, die ebenfalls TIR-Domänen enthalten (MyD88/MAL und TRIF/TRAM). MyD88 führt zur Rekrutierung und Aktivierung von IRAKs, die mit dem Protein TRAF6 assoziieren. Es kommt zur Aktivierung von TAK1, vermittelt durch TAB2 und TAB3. Die MAPK p38, ERK1/2 und JNK sowie die Aktivierung des IKK induzieren die Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF-κB. Nach Rezeptorinternalisierung kann auch eine MyD88-unabhängige Signaltransduktion erfolgen. Die Adapterproteine TRAM und TRIF aktivieren TRAF3, wodurch letztendlich der Transkriptionsfaktor IRF-3 induziert wird. **AP-1** activator protein-1, **ERK** extracellular signal-regulated kinases, **IKK** IκB kinase complex, **IRAK** IL-1R-associated kinase, **IRF3** IFN regulatory factor 3, **JNK** Jun amino-terminal kinases, **MAL** MyD88-adaptor-like protein, **MAPKK** mitogen-activated protein kinase kinase, **MD2** myeloid differentiation protein 2, **MyD88** myeloid differentiation primary response protein 88, **NF-κB** nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells, **TAB** TAK1-binding protein, **TAK** TGFβ-activated kinase, **TBK1** tank-binding kinase 1, **TLR4** Toll-like receptor 4, **TRAF** TNF-receptor-associated factor, **TRAM** TRIF-related adaptor molecule, **TRIF** TIR-domain-containing adaptor inducing IFN-β (Quelle: adaptiert nach Molteni et al., 2016<sup>143</sup>).

CKD geht mit einem Zustand erhöhter inflammatorischer Aktivität einher (siehe oben). Dieser Zustand äußert sich auch darin, dass bei hämodialysepflichtigen Patienten die TLR4-Expression auf Monozyten und neutrophilen Granulozyten erhöht ist.<sup>69</sup> Ferner weisen CKD-Patienten eine Skelettmuskelinflammation auf, die durch Hochregulation von TLR4 und folgender Aktivierung TNF-α- und NF-κB-regulierter Gene hervorgerufen wird.<sup>211</sup> Die Disposition bezüglich Angiopathien kann auch, zumindest in Teilen, durch TLR4 erklärt werden. So trägt TLR4 und das *NLR family pyrin domain containing 3*

(NLRP3)-Inflammasom zur Entwicklung und Aufrechterhaltung endothelialer Dysfunktion als Folge der urämischen Toxizität bei.<sup>136</sup> Darüber hinaus gehen bei CKD-Patienten die anti-inflammatorischen und vasoprotektiven Effekte der *high density lipoprotein* (HDL)-Partikel verloren, weshalb HDL bei diesem Patientenkollektiv nicht mit einem reduzierten Mortalitätsrisiko assoziiert ist.<sup>189,235</sup> Eine Erklärung hierfür ist die veränderte Zusammensetzung der HDL-Partikel. Serum Amyloid A (SAA) ist ein Akute-Phase-Protein, das bei CKD-Patienten erhöht ist.<sup>5</sup> Es fungiert als Apolipoprotein und inkorporiert vornehmlich in HDL-Partikel, die über TLR2 und TLR4 eine Inflamationsreaktion in *vascular smooth muscle cells* auslösen können.<sup>174</sup> Neben der Inflammation ist TLR4 in Gegenwart hoher Phosphatspiegel auch an vaskulärer Kalzifikation beteiligt.<sup>236</sup> Von großer Bedeutung ist zudem, dass TLR4 zu renaler Fibrose und auf diese Weise zu einer Progression der CKD beiträgt.<sup>188</sup>

## 2.4.2 Toll-like Rezeptor 2

Wie alle TLR ist auch TLR2 ein membranständiges Glykoprotein mit einer Ligandenbindenden aminoterminalen extrazellulären Domäne und einer intrazellulären TIR-Domäne, die für die Signaltransduktion verantwortlich ist (siehe Struktur des TLR4 in **Abbildung 6**). Um eine größere Bandbreite an mikrobiellen Komponenten erkennen zu können, bildet TLR2 Heterodimere mit TLR1 oder TLR6 (**Abbildung 8**).<sup>196</sup> Wichtige bakterielle PAMPs, die TLR2 aktivieren, sind Lipopeptide. Das TLR2-TLR1-Heterodimer



**Abbildung 8: Toll-like Rezeptor 2 Dimerisierung**

**(A) TLR1-TLR2-Dimer.** Das synthetische Triacyl-Lipopeptid Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> bindet mit zwei Acylresten an hydrophobe Kanäle, die sich in der extrazellulären Domäne des TLR2 befinden. Der dritte Acylrest lagert sich an eine hydrophobe Tasche des TLR1 an, sodass es zur Heterodimerisierung mit folgender Aktivierung der intrazellulären TIR-Domänen kommt. **(B) TLR2-TLR6-Dimer.** Das synthetische Diacyl-Lipopeptid Pam<sub>2</sub>CSK<sub>4</sub> bindet ebenfalls an TLR2, der daraufhin mit TLR6 dimerisiert. (Quelle: adaptiert nach Gao et al., 2017<sup>66</sup>)

bindet überwiegend Triacyl-Lipopeptide und wechselwirkt nur schwach mit Diacyl-Lipopeptiden, während das TLR2-TLR6-Heterodimer ausschließlich letztere bindet.<sup>66,89,94</sup> Die Fettsäureketten der Lipopeptide tauchen in hydrophobe Taschen der Rezeptoren ein und der entstehende Komplex, stabilisiert durch zahlreiche Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Interaktionen, initiiert die intrazelluläre Signalkaskade.<sup>89</sup> Diese Signaltransduktion ist bei TLR2, wie bei allen TLR mit Ausnahme von TLR3, MyD88-abhängig und führt zur Induktion proinflammatorischer Zytokine,<sup>196</sup> was **Abbildung 7** am Beispiel von TLR4 entnommen werden kann. Es sei darauf hingewiesen, dass TLR2 nicht mit einer MyD88-unabhängigen Signalkaskade gekoppelt ist, weil diese für TLR4 und TLR3 spezifisch ist.<sup>195</sup>

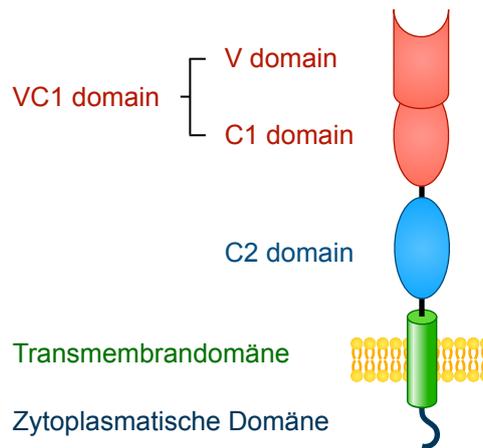
Des Weiteren vermag TLR2 auch einige endogene DAMPs zu binden.<sup>57</sup> So wurden HSP,<sup>10</sup> niedermolekulares Hyaluronan,<sup>172</sup> SAA,<sup>33</sup>  $\beta$ -Amyloid<sup>200</sup> und HMGB1,<sup>151</sup> insbesondere an Nukleosomata gebunden,<sup>185</sup> als endogene Liganden des TLR2 identifiziert.

### 2.4.3 Receptor for Advanced Glycation End Products

Der Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) ist Teil der Immunglobulin-Superfamilie und trägt seinen Namen, weil seine erstbeschriebenen Liganden sogenannte *advanced glycation end products* (AGEs) waren.<sup>83,161</sup> AGEs sind Metabolite, die durch eine nicht-enzymatische Reaktion (Maillard-Reaktion) von reduzierenden Zuckern mit Proteinen, aber auch Fettsäuren oder DNA, entstehen.<sup>142</sup> Initial wurde RAGE für einen *Scavenger*-Rezeptor für AGEs gehalten, jedoch stellte sich heraus, dass RAGE Signaltransduktionen auslöst und Änderungen der Genexpression induziert.<sup>83</sup>

RAGE ist ein Typ-I-Transmembran-Glykoprotein und enthält in seiner extrazellulären Region mehrere Immunglobulin-(Ig)-Domänen (**Abbildung 9**). Die aminoterminalen V-Domäne ist hauptverantwortlich für die Ligandenbindung, jedoch können auch die C1- und C2-Domäne an der Bindung beteiligt sein. Der C2-Domäne schließt sich eine Transmembran-Domäne an, gefolgt von einer carboxyterminalen intrazellulären Domäne, die stark geladen und kritisch für die Signaltransduktion ist.<sup>83</sup>

Nachdem AGEs als erste Liganden von RAGE identifiziert worden waren, entdeckte man eine Reihe weiterer non-AGE-Liganden endogenen und exogenen Ursprungs. Daher kann RAGE als PRR betrachtet werden.<sup>31</sup> Neben den AGEs (z. B. Carboxymethyllysin, Hämoglobin A1c) sind S100-Proteine, HMGB1,  $\beta$ -Faltblatt-Fibrillen und Nukleinsäuren (DNA, RNA) weitere endogene Liganden. S100-Proteine bilden eine heterogene Gruppe von 24 Proteinen, die unterschiedlichste Funktionen haben.<sup>52</sup> Einige S100-



**Abbildung 9: Struktur des Receptor for Advanced Glycation End Products**

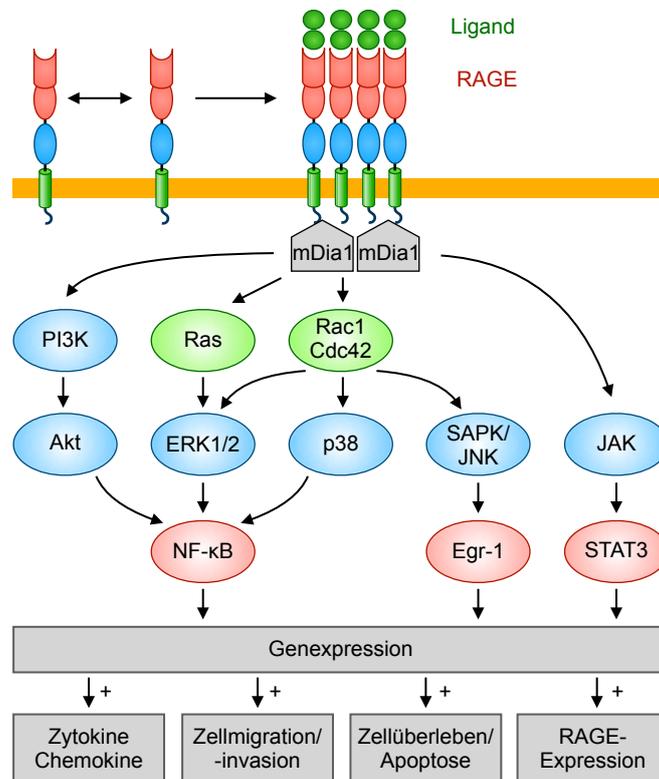
RAGE besteht aus einer extrazellulären Region, die drei Immunglobulin-(Ig)-Domänen enthält, einer Transmembrandomäne sowie einer kurzen, stark geladenen zytoplasmatischen Domäne. Die Ig-Domänen sind vom V-Typ, C1-Typ und C2-Typ. V- und C1-Domäne bilden zusammen die VC1-Domäne, die über eine kurze Aminosäurekette flexibel mit C2 verbunden ist. Die Ligandenbindung erfolgt vorwiegend in der V-Domäne (Quelle: adaptiert nach Hudson et al., 2018<sup>83</sup>).

Proteine werden sezerniert und entfalten ihre Wirkung über Bindung an RAGE. HMGB1 ist ein ubiquitär exprimiertes nukleäres Protein, das Nukleosomata stabilisiert und die Transkription einiger Gene reguliert.<sup>130</sup> HMGB1 kann einerseits von Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen nach Stimulation aktiv sezerniert werden, andererseits auch aus nekrotischen Zellen passiv in den Extrazellularraum diffundieren.<sup>130</sup> Somit fungiert HMGB1 sowohl als Zytokin als auch als Alarmin (DAMP). Der aktiven Sezernierung geht eine Acetylierung von HMGB1 voraus, sodass Kernlokalisierungssequenzen maskiert werden und das Molekül den Zellkern verlassen und zu sekretorischen Vesikeln transportiert werden kann.<sup>130</sup> RAGE dient auch als Rezeptor für exogene PAMPs. Ähnlich den TLR vermag RAGE bakterielles LPS, CpG DNA oder das *fusion protein* des Respiratorisches-Synzytial-Virus zu binden.<sup>83</sup>

RAGE dimerisiert und bildet Multimere vor Ligandenbindung (**Abbildung 10**). Die VC1-Domäne ist arginin- und lysinreich, wodurch sie eine positive Nettoladung erhält. Sie ist daher besonders gut geeignet, die überwiegend anionischen Liganden zu binden.<sup>64</sup> Konformationsänderungen des Rezeptor-Multimers initiieren die intrazelluläre Signalkaskade, beginnend mit der Rekrutierung verschiedener Adapterproteine, von denen mDia1 (diaphanous-1) bisher das einzige Protein ist, das nachweislich die zytoplasmatische RAGE-Domäne bindet.<sup>83</sup> mDia aktiviert GTPasen und Kinasen (**Abbildung 10**), die ihrerseits die Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B, *early growth response protein 1* und *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) aktivieren.<sup>83</sup> RAGE hat somit

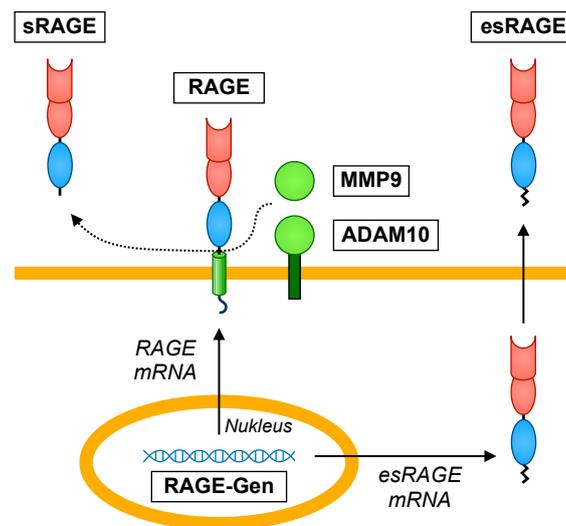
vor allem proinflammatorische Wirkungen, die nicht zuletzt durch Hochregulation seiner eigenen Expression verstärkt werden.

Es existieren zusätzlich zum membrangebundenen Rezeptor lösliche Formen von RAGE, die als soluble RAGE (sRAGE) bezeichnet werden. Hierunter werden eine durch proteolytische Spaltung des membrangebundenen Rezeptors gebildetes *soluble cleaved* RAGE (cRAGE, im Folgenden der Einfachheit halber als sRAGE bezeichnet) und aktiv sezerniertes *endogenous secretory* RAGE (esRAGE) subsumiert (**Abbildung 11**). sRAGE entsteht durch proteolytische Spaltung auf der Zelloberfläche, katalysiert durch die membranständige Proteinase *A Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10* (ADAM10) und die extrazelluläre Matrix-Metalloprotease 9 (MMP9).<sup>238</sup> Membrangebunden verbleibt die Transmembrandomäne und



**Abbildung 10: RAGE-Signaling**

Vor Ligandenbindung dimerisiert RAGE und bildet Multimere. Die Bindung erfolgt vorwiegend über elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Ligand und VC1-Domäne. Die Konformationsänderung führt zur Rekrutierung von mDia1 an die zytoplasmatische RAGE-Domäne, die keine endogene Kinase-Aktivität besitzt.<sup>54</sup> Die RAGE-Signalkaskade läuft über Rho GTPasen (gezeigt in grün) und Kinasen (gezeigt in blau). Letzlich wird die Genexpression durch Induktion verschiedener Transkriptionsfaktoren (gezeigt in rot) verändert. Auch die RAGE-Expression an sich wird gesteigert, im Sinne einer positiven Rückkopplung. **Akt** Proteinkinase B, **Egr-1** early growth response protein 1, **ERK** extracellular signal-regulated kinases, **JAK** Janus kinase, **mDia1** Diaphanous-related formin-1, **NF-κB** nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells, **PI3K** phosphoinositide 3-kinase, **RAGE** Receptor for Advanced Glycation End Products, **SAPK/JNK** stress-activated protein kinases/Jun amino-terminal kinases, **STAT3** signal transducer and activator of transcription 3 (Quelle: adaptiert nach Hudson et al., 2018<sup>83</sup>).



**Abbildung 11: RAGE, sRAGE und esRAGE**

Membran-gebundenes RAGE kann durch proteolytische Aktivität von ADAM10 und MMP9 in die lösliche Form sRAGE überführt werden. Zusätzlich existieren mehrere Spleißvarianten der RAGE-prä-mRNA, eine davon generiert endogenes sekretorisches RAGE (esRAGE), das eine charakteristische C-terminale Aminosäuresequenz aufweist. sRAGE und esRAGE fungieren als *Decoy*-Rezeptoren, die größtenteils protektive Eigenschaften haben, da sie die RAGE-induzierte inflammatorische Antwort abmildern. **ADAM10** A Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10, **esRAGE** endogenous secretory RAGE, **MMP9** Matrix-Metalloprotease 9, **mRNA** messenger RNA, **RAGE** Receptor for Advanced Glycation End Products, **sRAGE** soluble RAGE (Quelle: adaptiert nach Yan et al., 2010<sup>226</sup>).

zytoplasmatische Domäne, die als RAGE-C-terminales-Fragment (RAGE-CTF) bezeichnet und wahrscheinlich durch  $\gamma$ -Sekretasen prozessiert wird.<sup>238</sup> esRAGE entsteht nicht durch Prozessierung des Rezeptors, sondern als alternative Spleißvariante der RAGE-prä-mRNA. Die Persistenz des Intron 9 generiert eine Leserasterverschiebung und ein vorzeitiges Stoppcodon, sodass die in Exon 10 kodierte Transmembrandomäne fehlt und esRAGE eine einzigartige C-terminale Aminosäuresequenz aufweist.<sup>233</sup> Seit ihrer Entdeckung haben zahlreiche Studien versucht, einen Zusammenhang zwischen sRAGE/esRAGE und der Schwere gewisser Krankheiten herzustellen.<sup>226</sup>

RAGE wird ubiquitär exprimiert<sup>54</sup> und nimmt eine wichtige Rolle bei chronisch entzündlichen Erkrankungen ein, unter anderem bei Diabetes, kardiovaskulären Erkrankungen, onkologischen Erkrankungen, Morbus Alzheimer und Autoimmunerkrankungen.<sup>83</sup> Besonders in atherosklerotischen Plaques ist RAGE verstärkt exprimiert und geht einher mit inflammatorischer Aktivität, die eine Destabilisierung der Plaque bewirken kann.<sup>35</sup> Hohe Plasma-Spiegel der löslichen RAGE-Rezeptoren lassen eine vasoprotektive Wirkung vermuten. Die Behandlung von ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen mit sRAGE führt zur Verminderung der diabetischen Atherosklerose, unabhängig von Hyperglykämie und Dyslipidämie.<sup>152</sup> Ferner sind niedrige esRAGE-Spiegel bei Patienten mit Prädiabetes mit

Atherosklerose assoziiert.<sup>45</sup> Die Studienlage bezüglich der protektiven Wirkung von sRAGE ist jedoch teilweise widersprüchlich. Eine prospektive Kohortenstudie ermittelte einen positiven Zusammenhang zwischen sRAGE-Spiegeln und der Inzidenz kardiovaskulärer Ereignisse bei Patienten mit vorbestehender kardiovaskulärer Erkrankung.<sup>163</sup> Bei koronarer Herzerkrankung sind niedrige esRAGE-Spiegel mit einer schlechteren Prognose verbunden.<sup>229</sup> Erniedrigte sRAGE-Spiegel und eine hohe monozytäre RAGE-Expression wurden bei Patienten im kardiogenen Schock nach akutem Myokardinfarkt nachgewiesen,<sup>176</sup> die zumindest teilweise durch unterdrückte MMP9-Aktivität bei diesen Patienten erklärbar ist.<sup>177</sup> Des Weiteren ist der RAGE-Ligand HMGB1 ein guter Surrogat-Marker für die Infarktausdehnung und LV-Restfunktion nach Infarkt.<sup>8</sup>

Die Akkumulation von AGEs und anderen RAGE-Liganden bei chronischer Niereninsuffizienz beruht teilweise auf der verminderten renalen Clearance und spielt eine bedeutende Rolle bei der Pathogenese der Atherosklerose bei CKD-Patienten.<sup>16</sup> Diese Patientengruppe weist eine deutlich erhöhte sRAGE-Plasmakonzentration im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe auf, die wahrscheinlich Ausdruck eines endogenen Kompensationsmechanismus gegen vaskulotoxische AGEs ist.<sup>16</sup> In der Tat korrelieren sRAGE-Spiegel positiv mit der Serum-Kreatininkonzentration, sodass sich ein hyperbolischer Zusammenhang zwischen sRAGE und Kreatinin-Clearance ergibt.<sup>92</sup> Zudem zeigt sich ein inverser Zusammenhang zwischen sRAGE und Atherosklerose der Karotiden.<sup>16</sup> Eine Studie mit Hämodialysepatienten ergab, dass sRAGE negativ mit dem vaskulären Calcium-Score korreliert.<sup>102</sup> Ebenso korrelierte esRAGE negativ mit der aortalen Kalzifikation bei Hämodialysepatienten.<sup>146</sup>

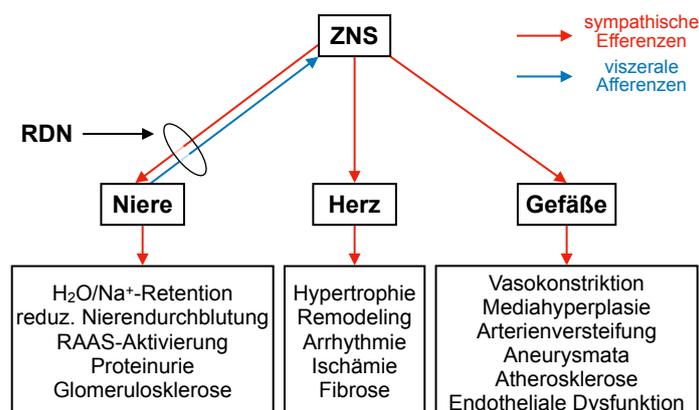
RAGE-Signaling schädigt nicht nur die Gefäße, sondern auch direkt das Herz. Niedrige sRAGE-Spiegel sind invers mit LVH, gemessen an *left ventricular mass index* (LVMI) und *mean wall thickness*, bei CKD-Patienten assoziiert.<sup>121</sup> Auch nach Adjustierung für traditionelle und nicht-traditionelle Risikofaktoren ergab sich eine unabhängige Korrelation. Interessanterweise zeigte sich bei gesunden Kontrollen kein solcher Zusammenhang, sodass es sich um ein Spezifikum bei CKD zu handeln scheint. Ausweislich dieser Befunde wurde die Hypothese aufgestellt, dass RAGE ein kausaler Risikofaktor für LVH bei CKD-Patienten ist und dass der endogene *decoy*-Rezeptor sRAGE bei diesem Patientenkollektiv die LVH abmildern kann.<sup>121</sup>

## 2.5 Renale Denervation

Die Niere ist durch efferente sympathische Neurone innerviert, deren Somata in den prävertebralen Ganglien liegen und ihre Axone entlang beider Nierenarterien zu den renalen Blutgefäßen, Glomeruli und Tubuli entsenden.<sup>46</sup> Zusätzlich existieren viszerale Afferenzen, die intrarenalen Mechano- und Chemozeptoren entspringen und Informationen in das ZNS leiten.<sup>46</sup> Die Stimulation renaler Sympathikusfasern resultiert in einer Verminderung des renalen Blutflusses (durch Erhöhung des Gefäßwiderstandes), der  $\beta_1$ -AR-abhängigen Ausschüttung von Renin aus Zellen des juxtaglomerulären Apparates und der Steigerung der tubulären Wasser- und Natriumretention.<sup>46</sup> Die Signale der renalen Afferenzen werden im ZNS integriert und führen zu einer Erhöhung des systemischen Sympathikotonus.<sup>168</sup>

Erhöhte Sympathikusaktivität spielt eine zentrale Rolle bei der Entwicklung der arteriellen Hypertonie.<sup>60</sup> Dasselbe gilt für die Progression einer CKD, weil die verstärkte Stimulation renaler Afferenzen – durch Ischämie oder Urämietoxine – den Sympathikotonus und infolgedessen den Blutdruck erhöht.<sup>168</sup> Es erscheint daher als logische Schlussfolgerung, dass renale Nerven ein Ziel der Therapie von Bluthochdruck und CKD darstellen können, da der Teufelskreis zwischen erhöhter Sympathikusaktivität einerseits und den resultierenden Endorganschäden andererseits unterbrochen werden kann (**Abbildung 12**).

Die Katheter-basierte renale Denervation (RDN) erfolgt heute durch einen minimal-invasiven Eingriff, bei dem afferente und efferente renale Nerven zerstört werden, um



**Abbildung 12: Modulation des Sympathikotonus durch RDN**

RDN führt durch Zerstörung der renalen sympathischen Efferenzen und viszeralen Afferenzen zu einer Verminderung des zentralen Sympathikotonus, wodurch dessen schädliche Wirkungen auf Organsysteme abgemildert werden. **RAAS** Renin-Angiotensin-Aldosteron-System, **RDN** Renale Denervation, **ZNS** Zentrales Nervensystem (Quelle: adaptiert nach Sata et al., 2016<sup>168</sup>).

den systemischen Sympathikotonus zu verringern.<sup>114</sup> In der Zwischenzeit ist sowohl die Sicherheit, als auch die blutdrucksenkende und nephroprotektive Wirkung der RDN im Tiermodell überzeugend nachgewiesen.<sup>126,168</sup> Trotz der Ernüchterung, die im Rahmen der kontroversen SYMPPLICITY HTN-3-Studie aufkam,<sup>114</sup> findet RDN heutzutage ihre Anwendung zur Therapie der arteriellen Hypertonie.

Die Konzentration von zirkulierendem NA im Blutplasma spiegelt größtenteils die Freisetzung dieses Neurotransmitters aus den sympathischen Neuronen wider und ist ein grobes Maß für die systemische Sympathikusaktivität.<sup>59</sup> Um eine genauere Aussage über die regionale Verteilung der Sympathikusaktivität zu treffen, hat sich die Messung des „NA-Spillovers“ bewährt. Dabei wird aus der lokalen arteriellen und venösen NA-Konzentration sowie aus der Verdünnung einer infundierten Tritium-markierten NA-Lösung auf die dortige NA-Freisetzung geschlossen.<sup>59</sup>

Hohe NA-Plasmaspiegel und insbesondere renaler „NA-Spillover“ ist mit Mortalität und Morbidität bei CHF-Patienten assoziiert.<sup>22</sup> Obwohl die temporäre Sympathikusstimulation eine positiv chronotrope und inotrope Wirkung hat, resultiert langanhaltende Stimulation in kardialer Hypertrophie und Fibrose, sodass das Herz anfälliger für Arrhythmien und Störungen der Pumpfunktion wird.<sup>23</sup> Die positiven Wirkungen einer RDN bei Patienten mit therapierefraktärer Hypertonie auf das Herz beinhalten eine Reduzierung der linksventrikulären Masse sowie eine Verbesserung der diastolischen Funktion.<sup>173</sup> Interessanterweise ergab sich hierbei keine signifikante Korrelation zur Reduzierung des Blutdrucks und der Herzfrequenz, woraus die Autoren einen direkten blutdruckunabhängigen Effekt der RDN auf das Herz ableiteten. Ein solcher blutdruckunabhängiger Effekt der RDN wurde auch in einer Studie gefunden, die eine verbesserte Ejektionsfraktion, diastolische Pumpfunktion und verringerte LVH bei Patienten mit therapierefraktärer Hypertonie feststellte.<sup>134</sup> Dieses Ergebnis wurde insofern erklärt, als eine direkte Sympathikus-induzierte LVH angenommen wurde, basierend auf der Erkenntnis, dass kardiale  $\alpha$ -AR-Stimulation eine Hypertrophie hervorrufen kann.<sup>20</sup> Darüber hinaus vermag auch die verminderte kardiale RAGE-Expression in renal denervierten Ratten<sup>178</sup> einen Beitrag zur Hypertrophie-Reduzierung zu leisten, da RAGE-Agonismus – zumindest bei CKD-Patienten – pro-hypertrophe Signalkaskaden auslöst.<sup>121</sup>

Zum Zeitpunkt der ersten Studien zur RDN kamen Bedenken bezüglich ihrer potentiell schädlichen Auswirkung auf die Nierenfunktion auf.<sup>155</sup> Untersuchungen bei therapierefraktären Hypertonie-Patienten mit hohem Risiko für CKD konnten jedoch die Sicherheit der Intervention belegen.<sup>133</sup> Die Studie zeigte, dass RDN den *Renal Resitive Index* (RRI) intralobulärer Arterien reduzierte, die Zahl der Albuminurie-Patienten verminderte und zu

einer signifikanten Änderung der eGFR (gemessen an Cystatin C) führte. Der geringere RRI als Ausdruck verbesserter Nierenperfusion könnte ein Hinweis darauf sein, dass RDN die Nierenfunktion positiv beeinflusst, jedoch ist die klinische Relevanz des beobachteten Unterschiedes fragwürdig.<sup>133</sup> Auch hier ergab sich keine Korrelation zwischen Reduktion des RRI und Reduktion des systolischen Blutdruckes, sodass ein blutdruckunabhängiger Effekt angenommen werden kann.

## 2.6 Fragestellung

CKD erhöht das Risiko kardiovaskulärer Endpunkte enorm. Mittlerweile konnte eine Vielzahl an pathophysiologischen Faktoren aufgeklärt werden, die zur kardiovaskulären Morbidität beitragen. Nieren spielen eine Schlüsselrolle in der Regulation des sympathischen Nervensystems. Insbesondere geschädigte Nieren weisen eine erhöhte Sympathikusaktivität auf, die nach Integration im ZNS zu einer systemischen Sympathikusaktivierung führt. Die nachteiligen Folgen für das Herz beruhen beispielsweise auf einer Auslösung von Herzrhythmusstörungen und einer Induktion myokardialer Hypertrophie. Darüber hinaus stellt auch die Urämie selbst einen Risikofaktor für kardiale Ereignisse dar. Urämetoxine können direkt eine Hypertrophie myokardialer Zellen herbeiführen. Bislang ist wenig in der Pathophysiologie dieses Prozesses bekannt.

PRRs sind Rezeptoren, die vorwiegend von Zellen des angeborenen Immunsystems exprimiert und von einer Vielzahl an Liganden aktiviert werden. Diese Rezeptoren finden sich ebenfalls auf Kardiomyozyten und haben bei Aktivierung womöglich negative Auswirkungen auf das Herz.

Die Ablation renaler sympathischer Nervenfasern (renale Denervation) ist eine Katheter-basierte Intervention, bei der die vegetativen sympathischen Fasern entlang der Nierenarterien mittels Radiofrequenzenergie unterbrochen werden. Dieses Verfahren wird beispielsweise erfolgreich zur Therapie des unkontrollierten arteriellen Hypertonus eingesetzt. In den aktuellen ESH-Leitlinien von 2023 zur Therapie des Hochdruckes kann die RDN bei Patienten mit unkontrolliertem Hypertonus trotz medikamentöser Kombinationstherapien oder Unverträglichkeiten erwogen werden (Empfehlungsgrad II, Evidenzlevel B).<sup>135</sup> Zudem wurden Ende 2023 zwei Devices zur RDN von der US-amerikanischen Zulassungsbehörde FDA genehmigt.

Ziel dieser Arbeit ist es, einen Einfluss von Urämetoxinen (am Beispiel Indoxylsulfat) und PRRs (RAGE, TLR4, TLR2) auf myokardiale Hypertrophie sowie deren Modulation durch RDN zu untersuchen. Darüber hinaus sollen auch die Auswirkungen der RDN auf

die Niere mitbetrachtet werden. Konkret wird ein Rattenmodell der Adenin-induzierten CKD herangezogen, im Zuge dessen sich ein renokardiales Syndrom ausbildet. Es erfolgt eine Zuteilung in eine Kontrollgruppe sowie eine CKD-Gruppe. Letztere wurde entweder renal denerviert oder einer Sham-Operation zugeführt.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 CKD-Rattenmodell der Adenin-induzierten Nephropathie

Die durchgeführten Tierstudien waren im Einklang mit dem *Guide for the Care and Use of Laboratory* der *United States National Institutes of Health* (8. Auflage) und entsprachen dem Deutschen Tierschutzgesetz. Sie wurden durch das Saarländische Landesamt für Verbraucherschutz genehmigt (#35/2017).

Die Studie wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) finanziert (TRR219, Project-ID 322900939).

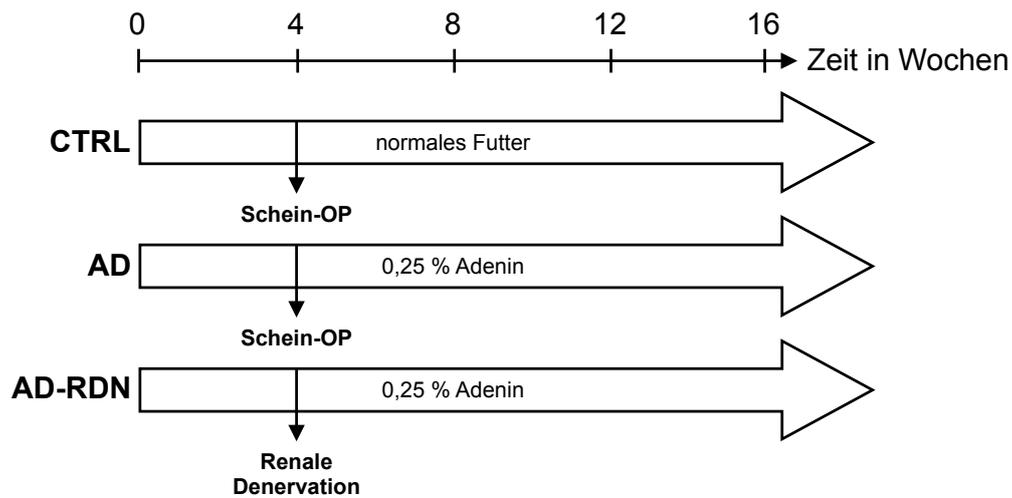
##### 3.1.1.1 Studienprotokoll

14 männliche Sprague-Dawley-Ratten wurden über einen Zeitraum von 16 Wochen gehalten (**Abbildung 13**). Ratten dienten dabei als Kontrolle (CTRL, n = 4), die eine Standardnahrung über den gesamten Zeitraum erhielten (**Abbildung 14**). Bei 10 Ratten wurde durch eine 0,25 % Adenin angereicherte Diät eine CKD induziert.<sup>48</sup> Nach 4 Wochen erfolgte bei der Hälfte dieser Adenin-gefütterten Ratten eine operative beidseitige renale Denervation (AD-RDN, n = 5), die restlichen Adenin-Tiere (AD, n = 5) und die Kontroll-Tiere (CTRL, n=4) erhielten eine Schein-Operation. Durch regelmäßiges Wiegen konnte eine ausreichende Nahrungsaufnahme sichergestellt werden. Es erfolgten



**Abbildung 13: Versuchstiere**

Zu sehen sind vier männliche Sprague-Dawley-Ratten.



**Abbildung 14: Zeitlicher Ablauf des Tierversuches**

4 Kontrollratten erhielten über den gesamten Verlauf von 16 Wochen ein Standardfutter. 10 Tiere (AD und AD-RDN) erhielten über 16 Wochen eine mit 0,25 % Adenin angereicherte Nahrung. Nach 4 Wochen wurden die Ratten der AD-RDN-Gruppe renal denerviert. Bei CTRL und AD erfolgte eine Schein-OP. **CTRL** Kontrollgruppe, **AD** Adenin-Gruppe, **AD-RDN** renal denervierte Gruppe

Blutdruckmessungen mittels Tail-cuff sowie echokardiographische, Kardio-MR-graphische sowie nierensonographische Untersuchungen zur Beurteilung der Herz- und Nierenfunktion. Nach 16 Wochen wurden alle Tiere getötet und Organe für verschiedene Untersuchungen entnommen.

### 3.1.1.2 Renale Denervation

Die operative renale Denervation der Ratten erfolgte in Narkose mit 1,5-2,5 % Isofluran. Nach Eröffnung des Abdomens und Mobilisierung des Darmes wurden beidseits die Nierenarterien dargestellt und von perivaskulärem Fettgewebe freipräpariert, die Adventitia wurde soweit wie möglich abgezogen. Die Nierenarterien wurden anschließend mit einer 20 %-igen Phenol/Ethanol-Lösung betupft und die verbliebenen renalen sympathischen Nervenfasern wurden damit zerstört.

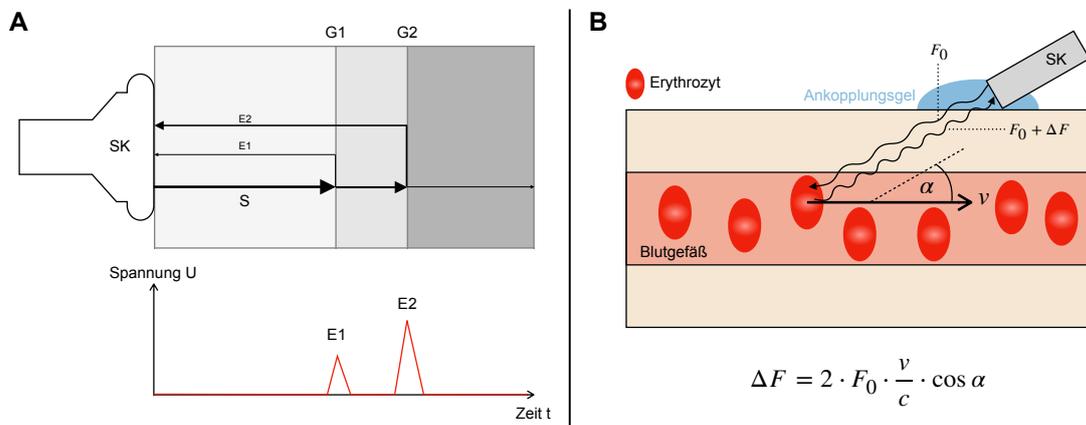
### 3.1.1.3 Nierensonographie

Bei allen Versuchstieren wurde eine Nierensonographie in Isoflurannarkose durchgeführt (Baseline, 4 Wochen und 16 Wochen), wobei ein Ultraschallgerät (GE Healthcare LOGIQ S6) mit zugehörigem Linearschallkopf (12 MHz) verwendet wurde. Die Sonographie diente der Beurteilung anatomischer und hämodynamischer Parameter der Niere.

Die Technik beruht auf der Ausbreitung und Reflexion von Ultraschallwellen im Gewebe (**Abbildung 15 A**). Treffen diese Wellen auf eine Grenzfläche mit unterschiedlichem Schallwellenwiderstand (Impedanz), beispielsweise zwischen verschiedenen Organstrukturen, wird ein Teil der Wellen reflektiert, woraus ein sogenanntes B-Bild berechnet wird. Die Intensität des reflektierten Signals wird in Graustufen dargestellt.

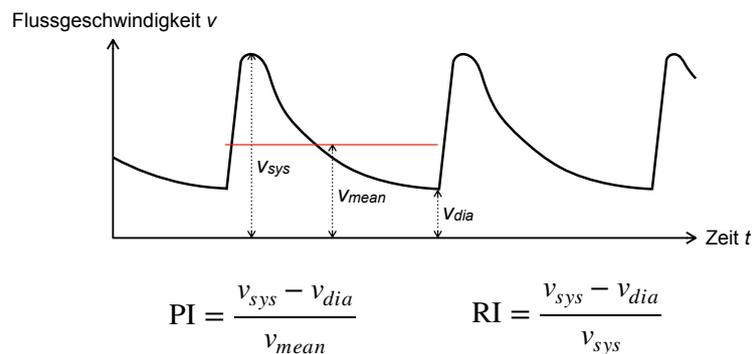
Mit Hilfe der Doppler-Sonographie ist es möglich, Blutflussgeschwindigkeiten zu messen. Werden Schallwellen von bewegten Objekten (korpuskuläre Bestandteile des Blutes, im Wesentlichen Erythrozyten) reflektiert, kommt es zu einer Frequenzänderung der reflektierten Wellen, sofern die Bewegungsrichtung des Blutes eine Richtungskomponente entlang des einfallenden Schallstrahls besitzt (**Abbildung 15 B**). Aus der Frequenzverschiebung kann die Flussgeschwindigkeit berechnet werden. Es ist zu beachten, dass die gemessene Frequenzverschiebung und die daraus berechnete Flussgeschwindigkeit wesentlich vom Winkel zwischen dem einfallenden Schallstrahl und der Richtung des Blutflusses abhängt. Da dieser Winkel nicht immer eindeutig bestimmt werden kann, hat sich die Berechnung von Indizes zur Beurteilung der Hämodynamik bewährt.

Man unterscheidet den Pulsatilitäts-Index nach Gosling (PI) und den Resistance-Index nach Pourcelot (RI), deren Berechnung in **Abbildung 16** dargestellt ist. Der *renal*



**Abbildung 15: Sonographie**

**(A) Prinzip der Sonographie.** Ein Schallstrahl **S** wird von einem Schallkopf **SK** ausgesandt und trifft auf eine Grenzfläche **G1** zwischen zwei Geweben unterschiedlicher Impedanz (als Grauton dargestellt). Ein Teil des Strahles wird reflektiert (**E1**), während der restliche Strahl tiefer eindringt. An der Grenzfläche **G2** mit sehr hohem Impedanzunterschied wird fast der gesamte Strahl reflektiert (**E2**). Die beiden Echos **E1** und **E2** treffen zeitlich nacheinander auf den Schallkopf und lösen einen Spannungsimpuls aus, dessen Stärke die Intensität des Schalles widerspiegelt. **(B) Prinzip der Doppler-Sonographie.** Ein Schallkopf sendet eine Schallwelle mit Frequenz  $F_0$  aus, die von einem sich mit der Geschwindigkeit  $v$  bewegenden Erythrozyten reflektiert wird. Die reflektierte Welle weist eine Frequenzverschiebung  $\Delta F$  auf, aus der mit gegebener Gleichung auf die Flussgeschwindigkeit  $v$  geschlossen werden kann.  $\alpha$  Beschallungswinkel,  $c$  Schallgeschwindigkeit im Gewebe (ca. 1540 m/s), **E1** Echo 1, **E2** Echo 2,  $F_0$  Frequenz der ausgesandten Schallwelle,  $\Delta F$  Frequenzverschiebung, **S** Schallstrahl, **SK** Schallkopf,  $v$  Blutflussgeschwindigkeit



**Abbildung 16: Doppler-Indizes**

Der PI und RI ermöglichen winkelunabhängige Aussagen über die Hämodynamik. **PI** Pulsatilitäts-Index nach Gosling, **RI** Resistance-Index nach Pourcelot,  $v_{dia}$  enddiastolische Flussgeschwindigkeit,  $v_{mean}$  mittlere Flussgeschwindigkeit,  $v_{sys}$  systolische Spitzengeschwindigkeit

*resistive index* (RRI) eignet sich besonders gut, um den intrarenalen Flusswiderstand zu messen. Dieser ist beispielsweise bei intrarenaler Fibrose und Arteriosklerose erhöht.

Die sonographische Untersuchung beider Nieren wurde bei allen 14 Ratten durchgeführt. Sowohl im Längs- als auch im Querschnitt wurde die maximale Länge und Breite gemessen, sowie auch die Breite des Parenchyms und des Pyelons. Ferner wurde nach Zeichen eines Harnstaus gesucht. Die Echogenität des Nierenparenchyms kann als qualitatives Maß für die interstitielle Fibrose herangezogen werden. Dopplersonographisch wurde der RRI in den Aa. renales sowie in drei Segmentarterien je Niere gemessen. Dabei kam bisweilen das B-Flow-Verfahren zum Einsatz, um die Arterien aufzuspüren. Beim B-Flow-Verfahren werden zeitlich aufeinander folgende Echosignale subtrahiert, sodass stationäre Echosignale ausgelöscht werden und bewegte Signale zur Darstellung kommen. Pro Gefäß erfolgte die Messung des RRI an drei verschiedenen Pulswellen, um einen Mittelwert berechnen zu können.

### 3.1.1.4 Kardio-Magnetresonanztomographie

Die Magnetresonanztomographie (MRT) wurde durch die Kollegen der Radiologie und Tierexperimentellen Chirurgie mit einem 9,4 T Tierscanner (Biospec Avance III 94/20, Bruker BioSpin GmbH, Ettlingen, Deutschland) durchgeführt. Die Ratten erhielten für die Untersuchung eine Allgemeinanästhesie. Die Induktion erfolgte mit 3 % Isofluran in einer dafür vorgesehenen Kammer. Während der Bildgebung wurde die Narkose mit 1–1,5 % Isofluran bei einem Fluss von 0,7–1,5 l/min aufrechterhalten. Die

Kerntemperatur, die Atemfrequenz sowie das EKG wurde kontinuierlich überwacht und durch eine Software (PC-SAM32, SA Instruments, Stony Brook, NY) aufgezeichnet. Zwei-Kammer- und Vier-Kammer-Blicke wurden mittels cine FLASH Sequenzen (repetition time (TR): 18,1 ms, echo time (TE): 1,8 ms, flip angle (FA): 15°, field of view (FOV): 25,6 x 25,6 mm, matrix (MTX): 160 x 160, Schichtdicke (ST): 1 mm, Voxelgröße: 160 x 160 x 1,000 µm) aufgenommen. Um die Herzfunktion zu beurteilen, wurden sechs bis acht Sequenzen in der kurzen Achse von basal nach apikal aufgenommen. Hierfür wurden cine FLASH Sequenzen mit höherer örtlicher und zeitlicher Auflösung erstellt (TR: 5,6 ms, TE: 1,5 ms, FA: 15°, FOV: 25,6 x 25,6 mm, MTX: 256 x 256, ST: 1 mm, Voxelgröße 100 x 100 x 1,000 µm). Die Bilddaten wurden mit Hilfe der Software Segment (v2.0 R4265, Medviso, segment.heiberg.se) analysiert. Die Beurteilung der ventrikulären Hypertrophie erfolgte durch Messung der Wanddicken enddiastolisch in septaler, anteriorer, lateraler und inferiorer Position auf Höhe der Papillarmuskelansätze. Für jeden Wandabschnitt wurde ein Mittelwert aus drei Messungen herangezogen.

### 3.1.2 Verwendete Substanzen und Lösungen

#### 3.1.2.1 Substanzen und Reagenzien

Tabelle 1: Substanzen und Reagenzien

Substanzen und Reagenzien	
Substanz/Reagenz	Firma
Acrylamid/Bis Solution (30 %)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Angiotensin II	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Aprotinin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Bepanthen® Augensalbe	Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland
Blocking Reagent	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
CellWASH	Becton Dickinson France SAS, Erembodegem, Belgien
Citraconsäureanhydrid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
DC Protein Assay Reagent A	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
DC Protein Assay Reagent B	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

Dinatriumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
DTT	
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Life Technologies Europe BV, Bleiswijk, Niederlande
ECL™ Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare Limited, Little Chalfont, UK
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Entellan®	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Entwickler G153 A und B	Agfa NV, Mortsel, Belgien
Ethanol (99,5 %)	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Fixierer G354	Agfa NV, Mortsel, Belgien
FKS	Thermo Fisher Scientific, Auckland, Neuseeland
Formaldehyd (4 %)	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Deutschland
Glycerin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Glycin	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Hämatoxylin/Eosin	Morphisto GmbH, Offenbach am Main, Deutschland
HCL-Alkohol	70 % Isopropanol 99 ml; konzentrierte Salzsäure 1 ml
Indoxylsulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Isopropranol (100 %)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Isoproterenol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Leupeptin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Magermilchpulver	Sucofin Magermilchpulver leicht löslich, TSI GmbH & Co. KG, Zeven, Deutschland
Magnesiumchlorid	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Natriumazid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Paraffin	
Paraformaldehyd (PFA) 95 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Life Technologies Europe BV, Bleiswijk, Niederlande
PMSF 0,1 mM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

Ponceau S Lösung für Elektrophorese 0,2 %	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Precision Plus Protein Dual Color Standards	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Salzsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Sirius-Red	Morphisto GmbH, Offenbach am Main, Deutschland
sRAGE	BioVendor, Brno, Tschechien
Thiomersal	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Trypsin-EDTA 0,05 %	Life Technologies Europe BV, Bleiswijk, Niederlande
TWEEN® 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Xylol	Engelbrecht GmbH, Edermünde, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

### 3.1.2.2 Antikörper

#### 3.1.2.2.1 Western Blot Analyse

**Tabelle 2: Primärantikörper für Western Blot Analyse**

Primärantikörper für Western Blot Analyse	
Antikörper	Firma
rabbit polyclonal anti-RAGE IgG	Abcam plc, Cambridge, UK
rabbit polyclonal anti-esRAGE IgG	Aviscera Bioscience, Inc., Santa Clara, CA, USA
mouse monoclonal anti-TLR4 IgG2b	Abcam plc, Cambridge, UK
rabbit polyclonal anti-HMGB1 IgG	Abcam plc, Cambridge, UK
goat polyclonal anti-NGAL IgG	R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA
mouse monoclonal anti-GAPDH IgG1	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
mouse monoclonal anti-β-Actin IgG1 κ light chain	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA

**Tabelle 3: Sekundärantikörper für Western Blot Analyse**

Sekundärantikörper für Western Blot Analyse	
Antikörper	Firma
goat anti-Rabbit IgG (H+L)-HRP Conjugate	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
goat anti-Mouse IgG (H+L)-HRP Conjugate	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland

rabbit anti-Goat IgG (H+L)-HRP Conjugate

Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland

### 3.1.2.2 Immunfluoreszenz-Histologie

**Tabelle 4: Primärantikörper für Immunfluoreszenz-Histologie**

Primärantikörper für Immunfluoreszenz-Histologie	
Antikörper	Firma
rabbit polyclonal anti-RAGE IgG	Abcam plc, Cambridge, UK
rabbit polyclonal anti-Tyrosine Hydroxylase IgG	Abcam plc, Cambridge, UK

**Tabelle 5: Sekundärantikörper für Immunfluoreszenz-Histologie**

Sekundärantikörper für Immunfluoreszenz-Histologie	
Antikörper	Firma
Goat anti-rabbit IgG (H+L)-FITC	Dianova, Hamburg, Germany
Donkey anti-rabbit IgG (H+L)-TRITC	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA

### 3.1.2.3 ELISA für Indoxylsulfat

**Tabelle 6: ELISA für Indoxylsulfat**

ELISA für Indoxylsulfat	
ELISA	Firma
Rat Indoxyl Sulfate ELISA Kit	MyBioSource, San Diego, CA, USA

### 3.1.2.3 Proteinspezifische Elektrophorese- und Blotbedingungen

Bei jeder Elektrophorese wurde ein passender Komigrationsstandard verwendet.

**Tabelle 7: Elektrophorese- und Blotbedingungen**

Elektrophorese- und Blotbedingungen						
Protein	Gel	Proben	Denaturierung	Blotting	Prim. AK	Sek. AK
esRAGE	12 %	50 µg	95 °C/5 min	200 mA/45 min	1:1.000/PBS-T/ 4 °C/12 h	1:10.000/2% Milch/RT/1 h
GAPDH					1:10.000/5% Milch/ 4 °C/12 h	1:10.000/PBS- T/RT/1 h
HMGB1	12 %	50 µg	95 °C/5 min	200 mA/45 min	1:1.000/PBS-T/ 4 °C/12 h	1:10.000/2% Milch/RT/1 h

NGAL	12 %	1:1	–	200 mA/45 min	1:1.000/PBS-T/ 4 °C/60 h	1:10.000/2% Milch/RT/1 h
RAGE/ sRAGE	12 %	50 µg	95 °C/5 min	200 mA/45 min	1:1.000/PBS-T/ 4 °C/12 h	1:10.000/2% Milch/RT/1 h
TLR2	12 %	50 µg	95 °C/5 min	200 mA/45 min	1:1.000/PBS-T/ 4 °C/12 h	1:10.000/2% Milch/RT/1 h
TLR4	12 %	50 µg	95 °C/5 min	200 mA/45 min	1:1.000/PBS-T/ 4 °C/12 h	1:10.000/2% Milch/RT/1 h

### 3.1.2.4 Lösungen für die Western Blot Analyse

Tabelle 8: Lösungen für die Western Blot Analyse

Lösungen für die Western Blot Analyse	
Lösung	Zusammensetzung
APS (10 %)	APS 1 g; ad 10 ml Aqua dest.; Lagerung bei 4 °C
EDTA (1 mM)	EDTA 372 mg; ad 1 l Aqua dest.; pH 7,0
Elektrophoresepuffer (10x)	Glycin 720 g; TRIS 151,5 g; SDS 50 g; ad 5 l Aqua dest.
Hypotonic Buffer	TRIS (0,25 M) 2,5 ml; EDTA (0,25 M; pH 8) 500 µl; MgCl <sub>2</sub> (0,1 M) 625 µl; pH 7,6; ad 125 ml Aqua dest.; Lagerung bei 4 °C
Ladepuffer (1x)	Glycerol (100 %) 2 ml; SDS (10 %) 2 ml; TRIS (0,625 M; pH 6,8) 2,5 ml; ad 10 ml Aqua dest.; Bromphenolblau 1 Spatelspitze
Ladepuffer für Western Blot	Ladepuffer (1x) 950 ml; DTT 50 µl
Lysepuffer für Western Blot	Hypotonic Buffer 1 ml; Leupeptin 1 µl; PMSF 1 µl; Aprotinin 0,29 µl
Milch (2 %)	Magermilchpulver 500 mg; ad 25 ml PBS-T
Milch (5 %)	Magermilchpulver 2,5 g; ad 50 ml PBS-T
PBS (10x)	NaCl 80 g; KCl 2 g; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2,4 g; Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 14,4 g; pH 7,4; ad 1 l Aqua dest.
PBS-T (10x)	PBS (10x) 1 l; Tween® 20 20 ml
PMSF (1 M)	PMSF 1,742 g; ad 10 ml Ethanol (100 %); Lagerung bei 4 °C
Polyacrylamidgel (5 % Sammelgel)	Aqua dest. 1,4 ml; Acrylamid (30 %) 330 µl; TRIS (1 M; pH 6,8) 250 µl; SDS (10 %) 20 µl; APS (10 %) 20 µl; TEMED 2 µl
Polyacrylamidgel (10 % Trenngel)	Aqua dest. 4 ml; Acrylamid (30 %) 3,3 ml; TRIS (1,5 M; pH 8,8) 2,5 ml; SDS (10 %) 100 µl; APS (10 %) 100 µl; TEMED 4 µl
Polyacrylamidgel (12 % Trenngel)	Aqua dest. 3,3 ml; Acrylamid (30 %) 4 ml; TRIS (1,5 M; pH 8,8) 2,5 ml; SDS (10 %) 100 µl; APS (10 %) 100 µl; TEMED 4 µl
SDS (10 %)	SDS 25 mg; ad 250 ml Aqua dest.
Stripping Buffer	SDS (10 %) 20 ml; TRIS (0,5 M; pH 6,8) 12,5 ml; Aqua dest. 67,5 ml; β-Mercaptoethanol 800 µl
Transferpuffer für Western Blot	TRIS 2,9 g; Glycin 14,5 g; Methanol 200 ml; pH 8,3; ad 1 l Aqua dest.
TRIS (1,5 M)	TRIS 90,85 g; ad 500 ml Aqua dest.; pH 6,8 oder 8,8

### 3.1.2.5 Lösungen für die FACS-Analyse

**Tabelle 9: Lösungen für die FACS-Analyse**

Lösungen für die FACS-Analyse	
Lösung	Zusammensetzung
FACS-Puffer	PBS 500 ml; FKS 25 ml; BSA 2,5 g; Na-Azid (0,1 %) 3,5 ml; steril filtrieren
Na-Azid (0,1 %)	Na-Azid (10 %) 1 ml; ad 100 ml PBS (steril)
Na-Azid (10 %)	NaN <sub>3</sub> 5 g; PBS 39,7 ml (steril)
PFA (1 %)	PFA (4 %) 25 ml; PBS 75 ml (steril)
PFA (4 %)	PFA 8 g; ad 200 ml PBS (steril); bei 56 °C lösen; pH 7,4–7,6

### 3.1.3 Verbrauchsmaterialien, Geräte und Zubehör

**Tabelle 10: Verbrauchsmaterialien, Geräte und Zubehör**

Verbrauchsmaterialien, Geräte und Zubehör	
Material/Gerät	Firma
Amersham Hyperfilm ECL (Größe 12.7 x 17.8 cm)	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Analysenwaage ABS 120-4	Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
Aperio Versa 8 Scanner	Leica Mikrosysteme, Wetzlar, Deutschland
CanoScan LIDE 90	Canon Deutschland GmbH, Krefeld, Deutschland
CK2 inverted Microscope	Olympus, Hamburg, Deutschland
DU 730 UV/Vis Spectrophotometer	Beckman-Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Elektrophoresekammer Mini PROTEAN® Tetra cell	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Entwicklermaschine Curix 60	Agfa, Mortsel, Belgien
Extra Thick Blot Filter Paper, vorgeschnitten, 7,5 x 10 cm	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Falcon® Conical Centrifuge Tubes, 15 ml, 50 ml	Becton Dickinson, N.J., USA
Gel Casting Module Mini-Protean Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Glass Plates	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Heracell™ 150i CO <sub>2</sub> -Inkubator	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Isofluranvernebler "Fluovac System Harvard Apparatus"	Harvard Apparatus, Holliston, USA
Kühlzentrifuge Centri Napco 2019R	Thermo Fisher Scientific, Waltham Massachusetts, USA
Magnetrührer M 6.1, Ingenieurbüro CAT	Zipperer GmbH, Staufen, Deutschland
Mikroskopsystem Eclipse Ti-S/L100	Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland
pH-Elektrode SenTix 22	WTW, Weilheim, Deutschland
pH-Meter, Eutech Instruments, pH 510	VWR, Darmstadt, Deutschland
Zentrifuge Galaxy 16DH	
UV-Küvetten	Sarstedt AG und Co., Nümbrecht, Deutschland

Pipettierhilfe pipetus®	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Pipettenspitzen, 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Plattformschüttler Polymax 1040, 10 °Neigungswinkel	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
PowerPac HC power supply	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Reagiergefäß 0,5 ml, 1 ml, 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
SevenCompact S220-Basic, pH/Ionen-Tischmessgerät	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
Sonifier Modell 250 CE	Branson Ultrasonics, Danbury, USA
Pipetten, 5 ml, 10 ml, 15 ml, 25 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Sicherheitswerkbank Safe 2020 (Klasse II)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Thermomixer R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer cell	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Transferpipetten, 6 ml	Sarstedt AG und Co., Nümbrecht, Deutschland
Vortex Mixer VV3	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Zellkulturschalen 100 mm	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturtestplatten 6 wells	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz

### 3.1.4 Software

Tabelle 11: Software

Software	
Software	Firma
GraphPad Prism 10.2.3	GraphPad Software, Boston, USA
ImageScope	Leica Mikrosysteme, Wetzlar, Deutschland
Image Studio Lite (v5.2.5)	LI-COR Biotechnology, Lincoln, USA
Microsoft Excel 2016	Microsoft Corporation, Redmond, USA
NIS-Elements „Basic Resarch“	NIKON CORPORATION, Tokyo, Japan
Segment (v2.0 R4265)	Medviso AB, Lund, Schweden

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

#### 3.2.1.1 Theoretische Grundlagen

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) ist eine grundlegende Färbung in der Histologie und dient der morphologischen Untersuchung eines Gewebepräparates. Bevor die Färbung durchgeführt werden kann, wird das Gewebe zunächst chemisch fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet.

Das Ziel der Fixierung ist es, eine Vernetzung und Denaturierung der Proteine im Gewebe zu bewirken. Dazu wird das Präparat in eine 4 %-Formaldehydlösung eingelegt. Anschließend müssen die Proben entwässert werden, indem das Wasser durch Ethanol ersetzt wird. Vor dem Einbetten in Paraffin wird das Ethanol durch Xylol ersetzt. Diese Schritte wurden von einem Gewebeinfiltrationsautomaten über Nacht durchgeführt. Um das Gewebestück schneiden zu können, wird das Xylol durch flüssiges Paraffin ersetzt, das bei Abkühlung erhärtet. Mithilfe eines Mikrotoms werden Schnitte gefertigt und auf Objektträger aufgebracht. Bevor die eigentliche Färbung durchgeführt werden kann, muss das Paraffin aus den Schnitten herausgelöst werden (Entparaffinieren). Dabei wird das Paraffin durch Xylol ersetzt, das im nächsten Schritt wiederum durch Alkohol ersetzt wird (Rehydratisierung). Dann wird die Färbung im engeren Sinne durchgeführt.

Hämatoxylin ist eine natürlich vorkommende Verbindung, die erst nach Oxidation zum Hämatein eine ockerbraune Farbe erhält. Hämatein ist imstande, mit mehrwertigen Metallkationen wie  $Al^{3+}$  Chelatkomplexe einzugehen. Diese Komplexe werden als Häma-laune bezeichnet und haben eine charakteristische violette Farbe. Aufgrund seiner positiven Ladung färbt Häma-laun die negativ geladenen (basophilen) Strukturen blau an. Dies sind vor allem der Zellkern mit darin enthaltener DNA sowie das raue endoplasmatische Retikulum, das mit RNA-haltigen Ribosomen besetzt ist. Eosin ist ein rötlicher, saurer Farbstoff, der basische (azidophile, eosinophile) Strukturen wie Zytoplasmaproteine, glattes endoplasmatisches Retikulum, Mitochondrien und Kollagen rot anfärbt.

Nachdem die Färbung durchgeführt wurde, erfolgt der Entzug von Wasser (Dehydratisierung) in einer aufsteigenden Alkoholreihe. Der letzte Schritt besteht darin, den Alkohol durch Xylol zu ersetzen, das sich mit Eindeckmittel verbindet und erhärtet.

### 3.2.1.2 Durchführung

Jeweils ein Gewebestück der untersuchten Herzen und Nieren wurde sofort nach der Organentnahme in einer 4 %-Formaldehydlösung (isotonisch gepufferte Kochsalzlösung) chemisch fixiert. Die Entwässerung erfolgte durch einen Gewebeeinfiltrationsautomaten (HistoCore PEARL, Leica Biosystems). Anschließend wurden die Organe in Paraffin eingebettet (HistoCore Arcadia H, Leica Biosystems). Mithilfe eines Mikrotoms (Rotationsmikrotom RM2255, Leica Biosystems) wurden 3 µm dicke Schnitte hergestellt. Die HE-Färbung der Präparate erfolgte nach untenstehendem Protokoll.

#### 1. Entparaffinieren

- Xylol I 10 min
- Xylol II 10 min
- Xylol III 10 min

#### 2. Rehydratisierung

- Isopropanol 100 % 5 min
- Isopropanol 90 % 5 min
- Isopropanol 70 % 5 min
- Aqua dest. 5 min

#### 3. Hämatoxylin-Färbung

- Hämatoxylin n. Ehrlich 10 min
- Aqua dest. kurz spülen
- HCL-Alkohol (differenzieren) sehr kurz
- Aqua dest. kurz spülen
- Fließendes Leitungswasser (bläuen) 15 min
- Aqua dest. kurz spülen

#### 4. Eosin-Färbung

- Eosin (frisch angesetzt) 15 s
- Aqua dest. kurz spülen

#### 5. Dehydratisierung

- Isopropanol 90 % 2 min
- Isopropanol 100 % 2 min
- Xylol I 3 min
- Xylol II 3 min
- Xylol III 3 min

## 6. Eindecken mit Entellan®

### 3.2.1.3 Auswertung

#### 3.2.1.3.1 Herz

Die HE-Färbung der Herzen diente der quantitativen Analyse der Kardiomyozyten-Hypertrophie. Verschiedene Bereiche des LV wurden dabei getrennt untersucht. Die Aufnahme der Bilder erfolgte durch Lichtmikroskopie im 40xObjektiv und entsprechender Software (NIS-Elements „Basic Research“, NIKON CORPORATION, Tokyo, Japan), mittels derer die Myozyten vermessen wurden.

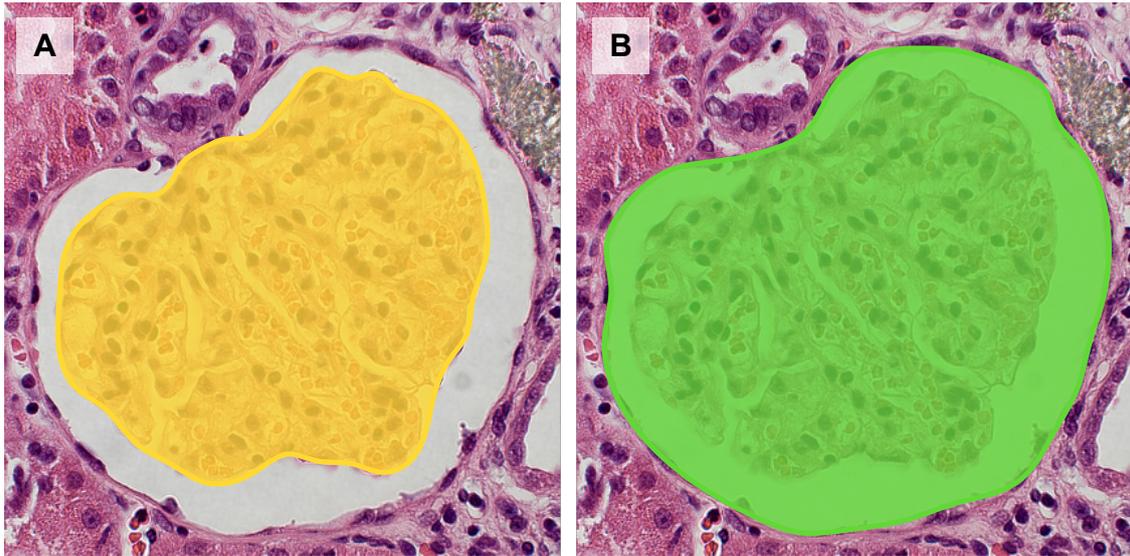
Von jedem der 14 Tiere (CTRL, AD, AD-RDN) wurden ca. 80 Kardiomyozyten ausgewertet. Für die Auswertung kamen nur runde Kardiomyozyten mit zentral angeschnittenem Zellkern in Betracht, da sie dem wahren Querschnitt der Myozyten am nächsten kommen. Als Maß für die Größe der Zellen wurde deren Fläche herangezogen.

#### 3.2.1.3.2 Niere

Die histologischen Untersuchungen der HE-Färbung der Niere umfassten die 2,8-Dihydroxyadeninkristall(2,8-DHA)-Dichte, die Größe des glomerulären Kapillarvolumens und des Bowman-Kapselvolumens, sowie des Glomerular Score und der Glomerulus-Dichte.

Die 2,8-DHA-Kristalldichte ist die Anzahl der 2,8-DHA-Kristalle pro Fläche des angeschnittenen Nierenparenchyms (Rinde und Mark). Die Anfertigung von Panorama-Aufnahmen der Nieren ermöglichte neben der einfachen Vermessung der Fläche auch eine systematische Zählweise. Die Bilder wurden durch ein Lichtmikroskop (Aperio Versa 8 Scanner, Leica Mikrosysteme, Wetzlar, Deutschland) im 10xObjektiv aufgenommen und durch die zugehörige Software (ImageScope, Leica Mikrosysteme, Wetzlar, Deutschland) ausgewertet.

Grundlage der glomerulären Morphometrie waren Einzelaufnahmen von etwa 40 Glomeruli mit Stiel je Niere, welche analog einer Vorarbeit ausgewertet wurden.<sup>74</sup> Wie in **Abbildung 17** gezeigt, wurden die angeschnittene Kapillarfläche und Bowman-Kapsel vermessen. Aus der mittleren glomerulären Kapillarquerschnittsfläche und der mittleren Bowman-Kapselquerschnittsfläche konnte durch Verwendung der Weibel-Gomez-Gleichung<sup>219</sup> auf das mittlere glomeruläre Kapillarvolumen und das mittlere Bowman-Kapselvolumen sowie ihr Verhältnis zueinander geschlossen werden.<sup>113</sup>



**Abbildung 17: Glomeruläre Morphometrie**

Gezeigt ist ein Glomerulus in HE-Färbung. Die für die glomeruläre Morphometrie relevanten Flächen sind farblich hervorgehoben. **(A)** Die glomeruläre Kapillarfläche (gelb) wird durch das viszerale Blatt der Bowman-Kapsel berandet. **(B)** Die Fläche der gesamten Bowman-Kapsel (grün) wird durch ihr parietales Blatt berandet.

Der Glomerular Score ist ein Maß für die Glomerulusschädigung und wurde, wie zuvor beschrieben, evaluiert.<sup>126</sup> Jede Niere erhält eine Punktzahl von 0 bis 5, entsprechend der Ausprägung der Glomerulusschädigung (**Tabelle 12**). Um den Score zu ermitteln, wurde das gesamte Präparat der Niere in HE-Färbung durchgesehen und eine adäquate Punktzahl vergeben.

Die Glomerulus-Dichte ist die Anzahl der Glomeruli pro Kortexfläche. In jeder Niere wurden alle Glomeruli gezählt und auf die vermessene renale Kortexfläche normiert. Die Grenze zwischen Kortex und Medulla orientierte sich an den juxtamedullären Glomeruli.

**Tabelle 12: Glomerular Score**

Glomerular Score	
Score	Kriterien
0	normale Erscheinung
1	fokal-segmentale mesangiale Verdickungen in wenigen isolierten Glomeruli
2	mesangiale Verdickungen in mehreren Glomeruli
3	diffuse/noduläre mesangiale Verdickungen und Synechien mit Bowman-Kapsel in vielen, aber weniger als 50 % der Glomeruli oder diffuse glomeruläre Sklerose
4	diffuse/noduläre mesangiale Verdickungen und Synechien mit Bowman-Kapsel oder diffuse glomeruläre Sklerose in mehr als 50 % der Glomeruli
5	diffuse Glomerulosklerose und Synechien mit Bowman-Kapsel

## 3.2.2 Immunfluoreszenz-Färbung

Immunfluoreszenz-Färbungen dienen dazu, die Expression bestimmter Proteine in einem Gewebe genauer zu untersuchen. Während ein Western Blot oder Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) die Gesamtmenge dieses Proteins in einem Gewebe analysiert, erlaubt die Immunfluoreszenz-Färbung, eine Aussage über die Verteilung der Expression in verschiedenen Zellen des Gewebes und sogar innerhalb verschiedener intrazellulärer Kompartimente zu treffen.

### 3.2.2.1 Theoretische Grundlagen

Das Grundprinzip der Immunfluoreszenz-Mikroskopie besteht darin, dass gewisse Proteine innerhalb eines Gewebeschnittes durch entsprechende Antikörper sichtbar gemacht werden können. Ein Primärantikörper bindet an das zu untersuchende Protein und ein mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelter Sekundärantikörper, der gegen den Primärantikörper gerichtet ist, wird mit Licht einer spezifischen Wellenlänge angeregt und emittiert dabei seinerseits Photonen, die im Mikroskop beobachtet werden können. Zur Anwendung kamen die Fluoreszenzfarbstoffe Tetramethylrhodaminisothiocyanat (TRITC) und Fluoresceinisothiocyanat (FITC). Durch Hinzunahme verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe können auch mehrere Proteine parallel untersucht werden. Zellkerne können durch 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) angefärbt werden. DAPI bindet an die DNA von Zellkernen und fluoresziert blau bei Anregung mit ultraviolettem Licht.

Ein wichtiges Grundproblem der Immunhistologie ergibt sich daraus, dass Proteine durch die Formaldehyd-Fixierung denaturiert und miteinander quervernetzt werden. Dadurch werden Epitope, die für die Antikörperbindung essentiell sind, maskiert. Es existieren verschiedene Möglichkeiten, dennoch eine gute Antigen-Antikörper-Reaktion zu gewährleisten. Eine effektive und einfache Methode, die Antigene in einem Formaldehyd-fixierten Gewebe zu demaskieren, stellt das Kochen in einer Citraconsäureanhydridlösung dar.<sup>145</sup> Niedrig konzentrierte Citraconsäureanhydridlösung (0,05 %) in Verbindung mit Hitze führt zum Auflösen der Quervernetzungen und macht die Proteine zugänglich für Antikörper.

### 3.2.2.2 Durchführung

Histologische Schnitte von Herz und Niere wurden wie oben beschrieben (siehe Kapitel 3.2.1.2) hergestellt und zwei Tage vor der Färbung bei 60 °C im Inkubator gelagert.

Die Immunfluoreszenzfärbung gegen RAGE und TH erfolgte gemäß folgendem Protokoll.

### 1. Entparaffinieren

- Xylol I 10 min
- Xylol II 10 min
- Xylol III 10 min

### 2. Rehydratisierung

- Isopropanol 100 % 2 × 5 min
- Isopropanol 90 % 5 min
- Isopropanol 70 % 5 min
- Aqua dest. 35 min

### 3. Antigen-Demaskierung

- 0,05 % Citraconsäureanhydrid bei 97 °C, pH 7,4–7,45 50 min
- Abkühlen in Citraconsäureanhydrid 30 min
- Waschen in 0,1 % PBS-T 10 min
- Trocken unter Abzug 10 min

### 4. Primärantikörper

- Schnitte mit Fettstift umranden
- Inkubation mit rabbit anti-RAGE 1:300 respektive rabbit anti-TH 1:100 in PBS bei 4 °C über Nacht in feuchter Kammer, dann bei 37 °C für 2 h im Wasserbad
- Waschen in 0,1 % PBS-T 3 × 5 min

### 5. Sekundärantikörper

- Inkubation mit donkey anti-rabbit IgG-TRITC 1:50 respektive goat anti-rabbit IgG-FITC 1:50 in PBS bei 37 °C für 90 min im Wasserbad
- Waschen in 0,1 % PBS-T 3 × 5 min

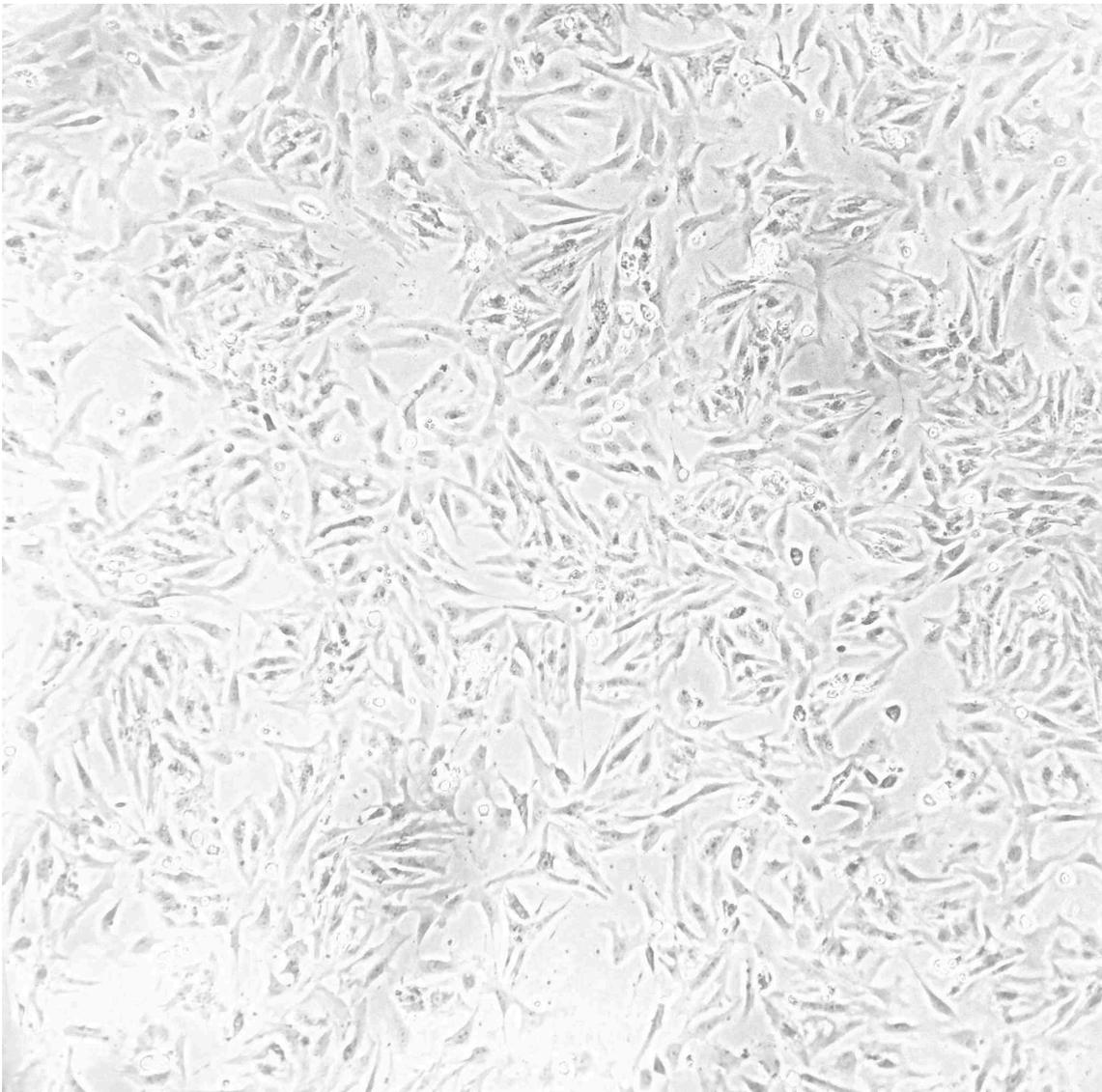
### 6. DAPI-Färbung und Einbettung

- Inkubation mit DAPI bei RT 5 min
- Waschen in Aqua dest. 5 min
- Einbetten in Mounting Medium

### 3.2.3 Zellkultur

#### 3.2.3.1 H9c2-Zellen

H9c2 ist eine klonale Zelllinie aus Kardiomyoblasten.<sup>104</sup> Diese Zelllinie entstammt der heterogenen Zellkultur H9, die aus dem Ventrikel eines 13 Tage alten BDIX-Ratten-Embryos gewonnen wurde. Der Subklon H9c2(2-1) besteht aus spindelförmigen mononukleären Myoblasten, die bezüglich ihrer transmembranären Signaltransduktion<sup>76</sup> und Elektrophysiologie<sup>187</sup> Kardiomyozyten ähneln. Obwohl es sich bei H9c2-Zellen um stark proliferierende Myoblasten handelt, können sie als in-vitro-Modell zur Untersuchung der Kardiomyozyten-Hypertrophie verwendet werden (**Abbildung 18**).<sup>217</sup>



**Abbildung 18:** H9c2-Zellen in der Zellkultur

H9c2-Zellen (ATCC CRL 1446, Wesel, Deutschland) wurden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) mit 10 % FKS und 1 % Penicillin/Streptomycin bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt. Vor den Stimulationsexperimenten erfolgte die Aufteilung der Zellen. Die Inkubation in einer Trypsin/EDTA-Lösung (maximal 3 min) löst die Zellen vom Boden der Zellkulturschale ab. Durch Zugabe von Medium mit 10 % FKS wird die Reaktion gestoppt. Die erhaltene Zellsuspension wird für 3 min bei 900 rpm zentrifugiert und das Pellet in frischem Medium resuspendiert. Es erfolgte die Passagierung auf 6-well-Platten, in denen die Stimulationsexperimente durchgeführt wurden, sobald 70-80% Konfluenz erreicht wurde.

In den Stimulationsexperimenten wurden H9c2-Zellen in 1 ml DMEM mit 0,1 % FKS kultiviert (für 24h „gehungert“) und nach folgendem Plan mit Indoxylsulfat und sRAGE stimuliert.

#### **1. H9c2-Stimulation mit Indoxylsulfat**

- Kontrollen (CTRL, n=6)
- Indoxylsulfat 10 µg/ml (n=6)
- Indoxylsulfat 100 µg/ml (n=6)
- Die Stimulation erfolgte täglich über einen Zeitraum von 72 h

#### **2. H9c2-Stimulation mit Indoxylsulfat und sRAGE**

- Kontrollen (CTRL, n=7)
- Indoxylsulfat 100 µg/ml (n=7)
- Indoxylsulfat 100 µg/ml + sRAGE 5 ng/ml (n=7)
- Die Stimulation erfolgte täglich über einen Zeitraum von 72 h

Die Zellgröße wurde mittels Durchflusszytometrie (Kapitel 3.2.6) gemessen.

### **3.2.4 Probengewinnung**

#### **3.2.4.1 Probengewinnung für die Western Blot Analyse**

Ein Teil der Organe (Herz, Niere) der Versuchstiere (CTRL, AD, AD-RDN) wurde direkt nach Explantation in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt. Die Gewinnung von ca. 2 ml Urin erfolgte mittels einer Kanüle direkt aus der Harnblase

im Rahmen der Endversuche. Die Urinproben wurden ebenfalls schockgefroren und bei -20 °C aufbewahrt.

### **3.2.4.2 Vorbereitung des Gesamthomogenats**

#### **3.2.4.2.1 Gewebe der Versuchstiere**

Etwa gleich große Stücke der Organe wurden in 500 µl Lysepuffer für Western Blot (Hypotonic Buffer mit Zusatz der Proteaseinhibitoren Leupeptin, PMSF und Aprotinin) überführt und durch Ultraschall homogenisiert.

#### **3.2.4.2.2 Zellkultur**

Nachdem das Medium entfernt und 100 µl Lysepuffer (Hypotonic Buffer mit Zusatz der Proteaseinhibitoren Leupeptin, PMSF und Aprotinin) hinzugegeben wurde, konnten die Zellen mit einem Zellschaber vom Boden der Schale gelöst werden. Die Homogenisierung erfolgte durch Ultraschall.

#### **3.2.4.3 Proteinbestimmung nach Lowry**

Die Messung der Proteinkonzentration in den Proben erfolgte durch das kolorimetrische Verfahren nach Lowry.<sup>131</sup> In einer alkalischen Lösung bilden Kupfer(II)-Ionen dunkelviolette Chelatkomplexe mit Peptidbindungen von Proteinen aus (Biuretreaktion). Die Kupfer(II)-Ionen werden dabei durch die Peptidbindung zu Kupfer(I)-Ionen reduziert. Durch Zugabe von Folin-Ciocalteau-Reagenz, eine Mischung aus Molybdätophosphorsäure und Wolframatophosphorsäure, läuft eine weitere Redox-Reaktion ab. Die Kupfer(I)-Ionen werden durch das Folin-Ciocalteau-Reagenz wieder oxidiert, während das Folin-Ciocalteau-Reagenz zu Heteropolymolybdenblau reduziert wird. Heteropolymolybdenblau weist ein charakteristisches Absorptionsmaximum bei 750 nm auf. Die photometrische Messung der Absorption bei dieser Wellenlänge erlaubt, nach vorheriger Messung eines Proteinstandards, die Berechnung der Proteinkonzentration in der Probe.

Zunächst wurden die Proben 1:10 verdünnt (2 µl Probe, 18 µl Hypotonic Buffer), bevor 100 µl Reagent A (*DC Protein Assay*, Bio-Rad Laboratories) hinzugegeben wurde. Danach wurden die Proben kurz gevortext und mit 800 µl Reagent B (*DC Protein Assay*, Bio-Rad Laboratories) versetzt. Nach 15 min Inkubation bei RT erfolgte die Messung der Absorption bei 750 nm im Photometer (DU730, UV/Vis Spectrophotometer, Beckman

Coulter, Krefeld, Deutschland). Die Berechnung der Proteinkonzentration beruht auf einer Standardkurve, die zuvor mittels einer Verdünnungsreihe von BSA erstellt wurde. Um ein genaueres Ergebnis zu erhalten, wurde von jeder Probe eine Doppelbestimmung durchgeführt und die erhaltenen Werte gemittelt.

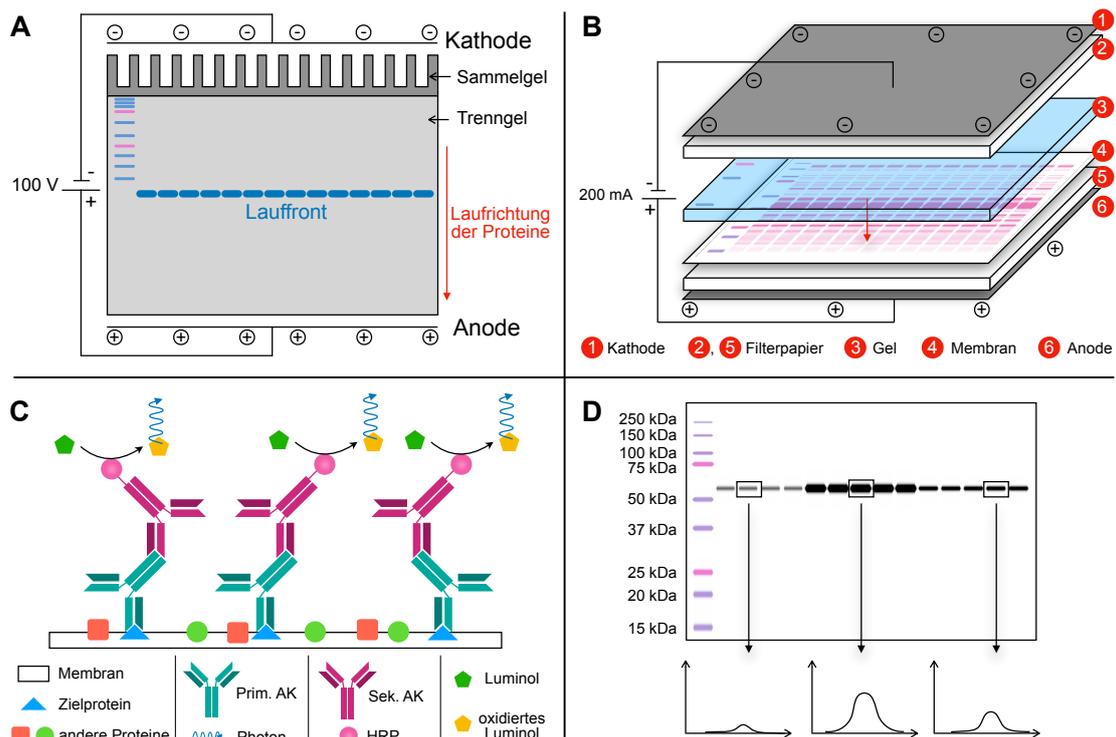
### 3.2.5 Western Blot Analyse

Das Western Blot-Verfahren ist eine Technik, mithilfe derer bestimmte Proteine in einer Probe semiquantitativ untersucht werden können. Im engeren Sinne bezeichnet der Begriff „Western Blot“ das Übertragen von Proteinen auf eine Membran („Blotting“). Die theoretischen Grundlagen und die Durchführung des Verfahrens werden im Folgenden näher erläutert.

#### 3.2.5.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese dient dem Auftrennen von Proteinen nach ihrer molaren Masse (**Abbildung 19 A**). SDS ist ein anionisches Detergens, das in einem konstanten Verhältnis über hydrophobe Wechselwirkungen an Proteine bindet und ihnen somit eine gleichmäßige Ladungsdichte verleiht. Das Kochen der Proben (5 min bei 95 °C) führt zu einem Verlust der Tertiär- und Sekundärstrukturen, wodurch die Proteine entfaltet werden (Denaturierung). Wird ein Polyacrylamidgel mit einem Proteingemisch beladen und eine elektrische Spannung angelegt, wandern die anionischen Proteine zur Anode, wobei das Gel wie ein molekulares Sieb wirkt. Größere Proteine werden stärker an ihrer Migration gehindert als kleinere Proteine und wandern daher langsamer durch das Gel. Die Linearisierung und gleichmäßige negative Ladungsdichte der Proteine gewährleisten ein vorwiegend durch die Molekülgröße bestimmtes elektrophoretisches Auftrennen. Ein Gemisch aus gefärbten Proteinen bekannter Masse (Komigrationsstandard, synonym Proteinmarker) ermöglicht die Bestimmung der Proteinmasse anhand der Laufweite durch das Gel. Der niedermolekulare anionische Farbstoff Bromphenolblau wandert vor den Proteinen und ist als sogenannte Lauffront sichtbar, die Auskunft über den Fortschritt der Elektrophorese gibt.

Ein 10 %- oder 12 %-Polyacrylamidgel (Kap. 3.1.2.3) wurde mit 50 µg Protein pro Spur beladen. 5 µl eines geeigneten Proteinmarkers diente als Molekulargewicht-Standard. Die Elektrophorese erfolgte in einer mit Elektrophoresepuffer gefüllten Kammer



**Abbildung 19: Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese**

**(A) Gelelektrophorese.** Ein Polyacrylamidgel wurde mit einem Proteinmarker (ganz links) und 14 Proben beladen. Die Proteine werden während der Elektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt, die „Lauffront“ zeigt den Fortschritt an. **(B) Blotting.** Die aufgetrennten Proteine werden von dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen („Blotting“). Dieser Vorgang erfolgt nach dem „Semi-dry“-Prinzip. Um die gleichmäßige Übertragung der Proteine zu validieren, wurde die geblottete Nitrocellulose-Membran mit Ponceau S angefärbt. Der Pfeil gibt die Bewegungsrichtung der Proteine an. **(C) Immundetektion.** Ein spezifischer Primärantikörper bindet an das Zielprotein auf der Membran. Der gegen den F<sub>C</sub>-Teil des Primärantikörpers gerichtete Sekundärantikörper ist mit dem Enzym HRP kovalent verbunden, das die Oxidation von Luminol mit nachfolgender Chemilumineszenz katalysiert. **(D) Auswertung.** Der entwickelte Film wird eingescannt und die Banden mittels Densitometrie ausgewertet. Die Fläche unter der Dichtekurve ist ein Maß für die Menge des untersuchten Proteins. **HRP** Horseradish peroxidase, **Prim. AK** Primärantikörper, **Sek. AK** Sekundärantikörper

(Mini PROTEAN<sup>®</sup> Tetra cell, Bio-Rad) bei einer Spannung von 80 V für die Sammelphase und 100 V für die Trennphase (PowerPac HC power supply, Bio-Rad). Die Elektrophorese dauerte etwa 3 h.

### 3.2.5.2 Blotting

Das Blotting erfolgt im Anschluss an die Elektrophorese und bezeichnet das Übertragen der Proteine aus dem Gel auf eine Trägermembran (**Abbildung 19 B**). Dazu wird eine Nitrocellulose- oder PVDF-Membran anodenwärts an das Gel angelagert und – ähnlich einem Sandwich – von zwei in Transferpuffer-getränkten Filterpapieren bedeckt. Die Proteine wandern im senkrecht zum Gel stehenden elektrischen Feld Richtung

Anode und werden dabei auf der Membran fixiert. Um den korrekten und gleichmäßigen Transfer der Proteine auf die Membran zu überprüfen, können sie temporär mit Ponceau S sichtbar gemacht werden. Dieser Farbstoff bindet reversibel an Aminogruppen und lässt sich mit Wasser wieder abspülen.

In dieser Arbeit wurden Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran (Nitrocellulose Membran 0,2 µm, BioRad) mittels „*semi-dry electrophoretic blotting*“ transferiert. Hierfür wurde die Membran zusammen mit dem Gel zwischen zwei in Transferpuffer getränkten Filterpapieren (Extra Thick Blot Paper, BioRad) in einer Elektroden-Vorrichtung (Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, BioRad) angeordnet. Bei einer Stromstärke von 200 mA erfolgte der Proteintransfer in 45 min bzw. 55 min (Kap. 3.1.2.3). Der vollständige und gleichmäßige Transfer wurde durch eine Färbung der Membran mit Ponceau S bestätigt.

### 3.2.5.3 Immundetektion

Die Immundetektion ermöglicht das Aufspüren eines bestimmten Proteins durch spezifische Antikörper. Nach dem Blotting müssen in einem ersten Schritt alle nicht mit Protein beladenen Stellen der Membran blockiert werden, sodass bei der späteren Immundetektion keine unspezifischen Bindungen von Antikörpern an die Membran entstehen. Dies kann mit Inkubation der Membran in Lösungen verschiedener Proteine und Detergenzien erreicht werden. Die Membran wird mit einem Primärantikörper inkubiert, der spezifisch an das zu untersuchende Protein auf der Membran bindet (**Abbildung 19 C**). Nicht gebundener Primärantikörper wird gewaschen und es folgt die Inkubation mit Sekundärantikörper, der gegen den  $F_C$ -Teil des Primärantikörpers gerichtet ist und der mit dem Enzym *Horseradish Peroxidase* (HRP) gekoppelt ist. Nach einem zweiten Waschgang erfolgt die Zugabe von Luminol, das in Gegenwart der HRP oxidiert wird und durch Chemilumineszenz ein Photon emittiert. Die Photonen schwärzen einen Röntgenfilm an den Stellen, an denen der Sekundärantikörper gebunden hat.

Nachdem das Ponceau S mit PBS-T abgewaschen worden ist, erfolgte die Blockierung der Membran, indem sie 2–3 h in einer Blocking-Lösung (500 µl Western Blocking Solution, Roche, in 50 ml PBS-T) bei RT inkubiert wurde. Danach wurde die Membran in dem jeweiligen angesetzten Primärantikörper (Kap. 3.1.2.3) bei 4 °C über Nacht inkubiert. Dem ersten Waschgang (2 x 5 min PBS-T, 2 x 10 min PBS-T) folgte die Inkubation mit Sekundärantikörper (Kap. 3.1.2.3) bei RT für 1 h. Nach einem zweiten Waschgang (2 x 5 min PBS-T, 2 x 10 min PBS-T, 1 x 10 min PBS) erfolgte die Inkubation mit dem Western Blot-Detektionsreagenz (ECL Prime Western Blotting-Detektionsreagenz, GE

Healthcare) und die Belichtung eines Röntgenfilms (Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare), der daraufhin entwickelt wurde (Curix 60, Agfa).

Die Berücksichtigung unterschiedlicher Proteinbeladungen zwischen den Spuren erfolgte durch Bestimmung des „house-keeping“ Proteins Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Diese ubiquitär exprimierten Proteine werden in relativ gleichmäßigen Mengen von Zellen produziert und können somit als Maß für die Proteinbeladung herangezogen werden. Hingegen wurde das gemessene NGAL-Signal im Urin auf die Urin-Kreatinin-Konzentration normalisiert. Vor Bestimmung der House-Keeping-Proteine wurden gebundene Antikörper von den Membranen entfernt („gestrippt“). Dafür inkubierten die Membranen in 10 ml Stripping Buffer bei 57 °C für 27 min. Nach einem Waschgang bei RT (2 x 5 min PBS-T, 2 x 10 min PBS-T, 2 x 5 min PBS, 2 x 10 min PBS) wurden die Membranen für 1,5–2 h in 5 % Milch geblockt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper anti-GAPDH (Kap. 3.1.2.3) erfolgte bei 4 °C über Nacht.

#### 3.2.5.4 Auswertung

Die entwickelten Filme wurden eingescannt und die Banden durch eine densitometrische Analyse quantifiziert (Image Studio Light 4.0, LI-COR Biotechnology, Lincoln, USA). Dabei wird die Tonwertdichte digital berechnet und als Funktion des Ortes (entspricht Molekülmassen) dargestellt (**Abbildung 19 D**). Die Fläche unter dieser Kurve ist ein Maß für die Menge des untersuchten Proteins. Der endgültige Wert ergibt sich aus der Normalisierung des ursprünglichen Signals auf das GAPDH-Signal. Im Urin erfolgte eine Normalisierung auf die Urin-Kreatinin-Konzentration.

#### 3.2.6 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren, das Eigenschaften einer Vielzahl von Zellen analysiert, indem diese einzeln einen Laserstrahl passieren. Das Akronym FACS ist polysem und bezeichnet einerseits *fluorescence-activated cell scanning*, eine Variante, bei der lediglich Eigenschaften analysiert und die Zellen danach verworfen werden. Auf der anderen Seite bezeichnet FACS *fluorescence-activated cell sorting*, wobei die Zellen nach ihrer Analyse anhand gewisser Eigenschaften sortiert werden. In letzterer Hinsicht ist FACS™ eine unregistrierte Handelsmarke eines Herstellers.

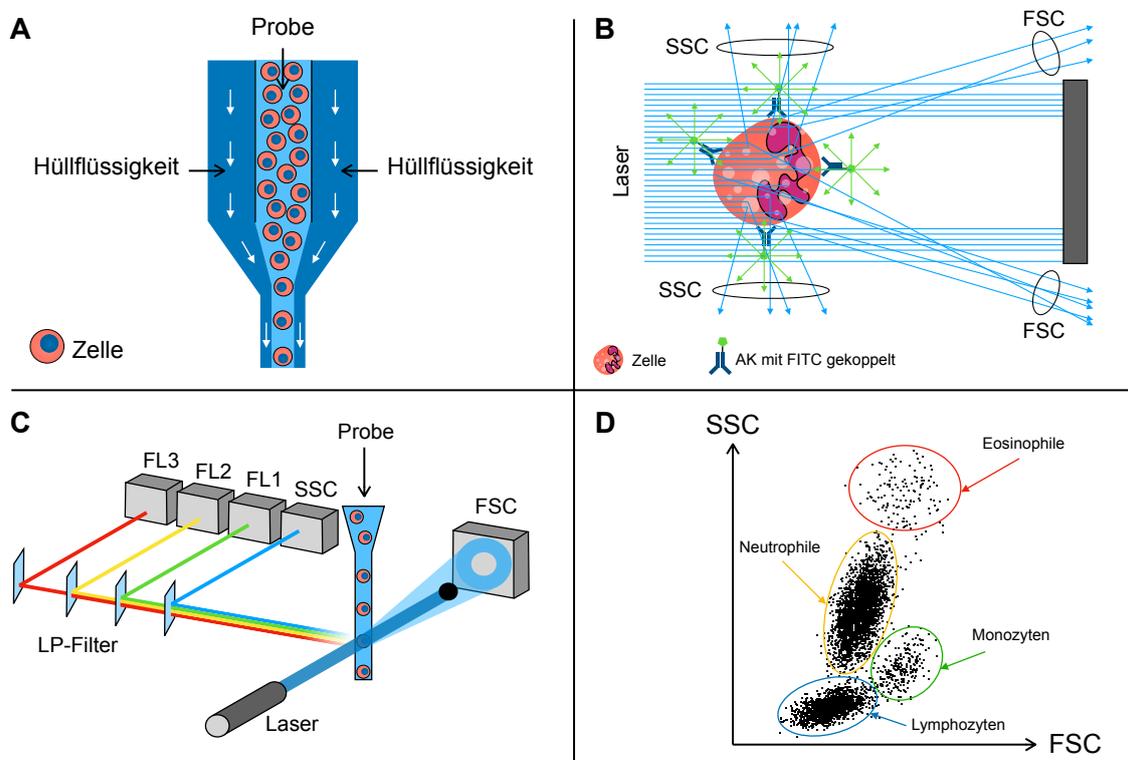
### 3.2.6.1 Theoretische Grundlagen

Eine Zellsuspension wird mit konstantem Druck angesaugt und in eine laminare Strömung von sogenannter Hüllflüssigkeit injiziert. Aufgrund unterschiedlicher Geschwindigkeiten kommt es nicht zu einer Vermischung von Probe und Hüllflüssigkeit. Die Probe wird im Verlauf der Messküvette durch hydrodynamische Fokussierung (**Abbildung 20 A**) immer weiter verjüngt, sodass die Zellen einzeln nacheinander analysiert werden können.

Sobald eine Zelle den Laserstrahl (Argon-Laser, 488 nm) passiert, wird das Licht gestreut (**Abbildung 20 B**). Die Vorwärtsstreuung (FSC, *forward scatter*) beruht auf Beugung vorwiegend an der Zelloberfläche und ist daher proportional zur Größe der Zelle. Die Seitwärtsstreuung (SSC, *side scatter*) entsteht durch Beugung an intrazellulären Strukturen wie Vesikeln, ER, Mitochondrien und Zellkern. Dementsprechend kann der SSC als Maß für die „Granularität“ oder „Komplexität“ der Zelle aufgefasst werden. Die Stärke der Durchflusszytometrie liegt darin, dass mittels spezifischer Antikörper Zellpopulationen voneinander unterschieden werden können. Diese Antikörper binden an Oberflächenstrukturen, oder nach vorheriger Permeabilisierung der Zellmembran an intrazelluläre Antigene. Ein fluoreszierendes Molekül wie FITC oder TRITC, das an den Antikörper gekoppelt ist, wird durch den Laser angeregt und emittiert ein Photon aus dem charakteristischen Emissionsspektrum des Moleküls. Durch Kombination von verschiedenen Antikörpern mit anderen Fluoreszenzfarbstoffen können mehrerer Parameter gleichzeitig bestimmt werden.

Verschiedene Detektoren messen die Intensität des Streulichtes sowie der Fluoreszenzsignale (**Abbildung 20 C**). Das Licht muss durch eine Anordnung von Filtern in Wellenlängenbereiche aufgeteilt werden, die den Spektren der Fluoreszenzmoleküle entsprechen. Die zu einem Zeitpunkt gemessenen Signale an allen Detektoren beziehen sich auf eine Zelle und werden digitalisiert. Ein Problem stellt die Tatsache dar, dass sich die Emissionsspektren der gängigen Fluorochrome in ihren Randbereichen teilweise überlappen. Ein gemessenes Photon kann also nicht immer eindeutig dem Farbstoff zugeordnet werden, von dem es ausgesandt wurde. Die spektrale Kompensation bietet die Möglichkeit zur Beseitigung dieses Problems, indem zwei Detektoren gekoppelt werden und von jedem ein Teil des Signals elektronisch subtrahiert wird.

Die Durchflusszytometrie generiert sehr viele Daten in kurzer Zeit. Um einen ersten Überblick zu erhalten, eignet sich der Scatter Plot gut (**Abbildung 20 D**). In diesem Streudiagramm wird der SSC gegen den FSC einer jeden Zelle aufgetragen. Auf diese Weise können unterschiedliche Zellpopulationen anhand der Parameter Größe und Komplexität differenziert werden, während die Kombination mit den Fluoreszenzkanälen einen tiefergehenden Einblick ermöglicht. Alternativ können die Daten auch als Konturdiagramm (Isolinien gleicher Zelldichte) oder als Histogramm visualisiert werden.



**Abbildung 20: FACS**

**(A) Hydrodynamische Fokussierung.** Die Probe (Zellsuspension) wird angesaugt und in einen laminaren Strom aus Hüllflüssigkeit injiziert, wodurch die Probe im Bereich der Messküvette so stark verjüngt wird, dass nur einzelne Zellen den Laserstrahl passieren. **(B) Streuvorgänge an einer Zelle.** Ein blauer Laserstrahl trifft auf eine Zelle und wird einerseits durch Beugung vorwärts gestreut (FSC), auf der anderen Seite senkrecht zur Einfallsrichtung seitwärts gestreut (SSC). Sind mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelte AK an die Zelle gebunden, wird durch Anregung des Lasers Licht mit größeren Längenwellen (grün) emittiert. **(C) Schematischer Aufbau des FACS.** Passieren Zellen den Laserstrahl, wird die Vorwärtstreuung (FSC) detektiert. Das seitlich gestreute Licht (SSC) sowie die Fluoreszenz (FL1–3) wird durch Detektoren gemessen, auf die jeweils nur eine schmale Bandbreite des sichtbaren Spektrums gelangt. **(D) Beispielhafter Scatter-Plot.** In diesem Streudiagramm wird die Seitwärtsstreuung einer jeden Zelle auf der Ordinate gegen ihre Vorwärtsstreuung auf der Abszisse aufgetragen. Es können verschiedene Zellpopulationen (Ellipsen) unterschieden werden. **AK** Antikörper, **FITC** Fluoresceinisothiocyanat, **FL1–3** Fluoreszenzdetektor 1–3, **FSC** forward scatter, **LP-Filter** longpass Filter, **SSC** side scatter

### 3.2.6.2 Durchführung

#### 1. Ernten der Zellen (H9c2)

- Medium entfernen
- Zugabe von 500 µl Trypsin (37 °C) pro *well*, maximal 3 min einwirken lassen
- Zugabe von 500 µl FACS-Puffer, Resuspendieren, in FACS-Röhrchen transferieren
- 10 min Zentrifugation bei 1300 rpm und RT
- Überstand entfernen

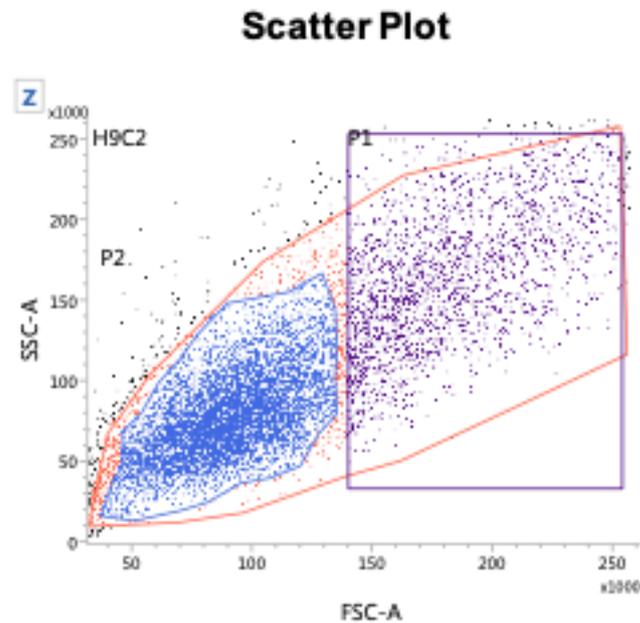
#### 2. Fixieren der Zellen

- Zugabe von 450 µl FACS-Puffer und 20 µl 0,5 M EDTA
- 10 s vortexen
- 15 min Inkubation bei RT
- 10 min Zentrifugation bei 1300 rpm und RT
- Überstand entfernen
- Zugabe von 2 ml CellWash
- 10 min Zentrifugation bei 1300 rpm und RT
- Überstand entfernen
- Zugabe von 300 µl PFA (4 %)
- 5 min Inkubation bei RT
- Zugabe von 2 ml FACS-Puffer
- 10 min Zentrifugation bei 1300 rpm und RT
- Überstand entfernen
- Zugabe von 200 µl FACS-Puffer
- 10 s vortexen
- Zugabe von 100 µl PFA (1 %)

Unmittelbar nach Fixierung der Zellen erfolgte die Messung mittels FACS.

### 3.2.6.3 Auswertung

Die Zellpopulation wurde zunächst in einem Scatter Plot dargestellt, um ein passendes Gate zu erstellen. In **Abbildung 21** ist beispielhaft ein solcher Plot mit Gate



**Abbildung 21: Scatter Plot**

Dargestellt ist ein beispielhafter Scatter Plot. Jeder Punkt entspricht dabei einer Zelle. Das orangefarbene Gate beinhaltet H9c2-Zellen. **FSC** forward scatter, **SSC** side scatter

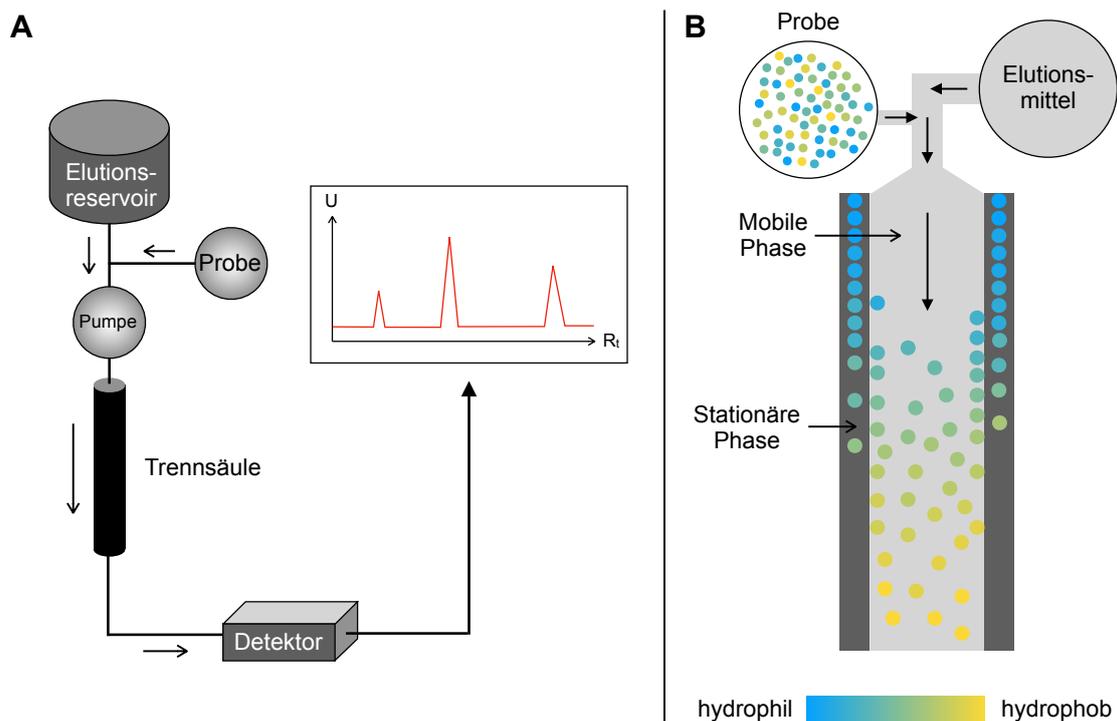
dargestellt. In jeder Probe wurden 10000 H9c2-Zellen gemessen und der *mean forward scatter* als Maß für die Zellgröße herangezogen.

### 3.2.7 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*high performance liquid chromatography*, HPLC) ist eine Methode, die ein Gemisch verschiedener Substanzen chromatographisch auftrennt und dessen Bestandteile identifizieren und quantifizieren kann. Allen chromatographischen Verfahren ist gemein, dass die Trennung des Gemisches auf den Wechselwirkungen der zu analysierenden Substanzen mit einer flüssigen (mobilen) Phase und einer festen (stationären) Phase beruht. Die HPLC wurde durch Kollegen der Klinischen Chemie durchgeführt und diente zur Bestimmung der NA-Konzentration im Nierengewebe.

### 3.2.7.1 Theoretische Grundlagen

Die HPLC ist ein sogenanntes Säulenchromatographie-Verfahren, bei dem die Auftrennung einer Probe in ihre Bestandteile in einer Säule geschieht. Ein vereinfachter Aufbau eines HPLC-Systems ist in (**Abbildung 22 A**) dargestellt. Das Elutionsmittel (mobile Phase) fließt zusammen mit der Probe durch die Trennsäule, in der sich die stationäre Phase befindet. Die stationäre Phase unterscheidet sich hinsichtlich gewisser chemischer Eigenschaften von der mobilen Phase, die wesentlich das Maß der Adsorption verschiedener Substanzen an diese stationäre Phase bestimmen. Stark adsorbierende Substanzen verbleiben länger in der stationären Phase und bewegen sich folglich langsam durch die Trennsäule. Im Gegensatz dazu fließen schwach adsorbierende Substanzen mit der mobilen Phase in kürzerer Zeit durch die Säule. Bleibt die mobile Phase während der Chromatographie in ihrer Zusammensetzung konstant, spricht man von einer isokratischen Trennung. Ändert sich die mobile Phase im zeitlichen Verlauf, handelt



**Abbildung 22: HPLC**

**(A) Schematischer Aufbau eines HPLC-Systems.** Das Elutionsreservoir enthält die mobile Phase. Die Probe wird in den Fluss des Eluenten injiziert und mit hohem Druck durch die Trennsäule gepumpt. In der Säule erfolgt die eigentliche chromatographische Auftrennung. Verschiedene Substanzen erreichen den Detektor zu unterschiedlichen Zeiten ( $R_t$ ) und lösen einen Impuls aus (drei peaks), dessen zeitliches Integral der Analytkonzentration proportional ist. **(B) Prinzip der chromatographischen Trennung anhand der NP-HPLC.** Bei der NP-HPLC fließt die Probe mit dem organischen (hydrophoben) Elutionsmittel (mobile Phase) durch eine Trennsäule, die eine stationäre Phase aus polarem (hydrophilem) Kieselgel enthält. Je nach Hydrophobizität (farbkodiert) lösen sich die Bestandteile der Probe mehr oder weniger im Kieselgel. Hydrophobe Substanzen verlassen die Säule zuerst und haben daher kürzere Retentionszeiten.  $R_t$  Retentionszeit,  $U$  Spannungssignal

es sich um eine Gradiententrennung. Nachdem die Probe nach diesem Prinzip aufgetrennt wurde, erreicht sie einen Detektor, der Eigenschaften des passierenden Eluenten erfasst. Ist eine Substanz im Eluenten gelöst, wird ein Signal registriert, das im zeitlichen Verlauf graphisch aufgetragen wird. Während der Zeitpunkt des Signals (Retentionszeit  $R_t$ ) für eine Substanz charakteristisch ist, repräsentiert sein zeitliches Integral die Konzentration jener Substanz in der Probe.

Bei der Normalphasen-HPLC (NP-HPLC) werden die Bestandteile der Probe nach ihrer Hydrophobizität aufgetrennt (**Abbildung 22 B**). Die Säule enthält eine polare (hydrophile) stationäre Phase aus Kieselgel (Siliciumdioxid), die von einer apolaren (hydrophoben) mobilen Phase, einem organischen Elutionsmittel, durchflossen wird. Hydrophile Moleküle haben eine hohe Affinität zum Kieselgel, weshalb sie eine verhältnismäßig lange Zeit in der stationären Phase verbleiben. Auf der anderen Seite gehen hydrophobe Teilchen nur wenig Wechselwirkungen mit dem Kieselgel ein. Sie werden deshalb gelöst in der mobilen Phase in kürzerer Zeit durch die Säule gepumpt.

Die Umkehrphasen-HPLC (*reverse phase* HPLC, RP-HPLC) trennt die Substanzen ebenfalls nach ihrer Hydrophobizität auf. Im Gegensatz zur NP-HPLC ist die stationäre Phase jedoch hydrophober, indem das Kieselgel mit apolaren Alkylketten beschichtet wurde. Daher kommen bei der RP-HPLC hydrophile mobile Phasen (z. B. wässrige Lösungen) zum Einsatz.

### 3.2.7.2 Durchführung und Auswertung

Die HPLC wurde durch die Kollegen der Klinischen Chemie durchgeführt und ausgewertet.

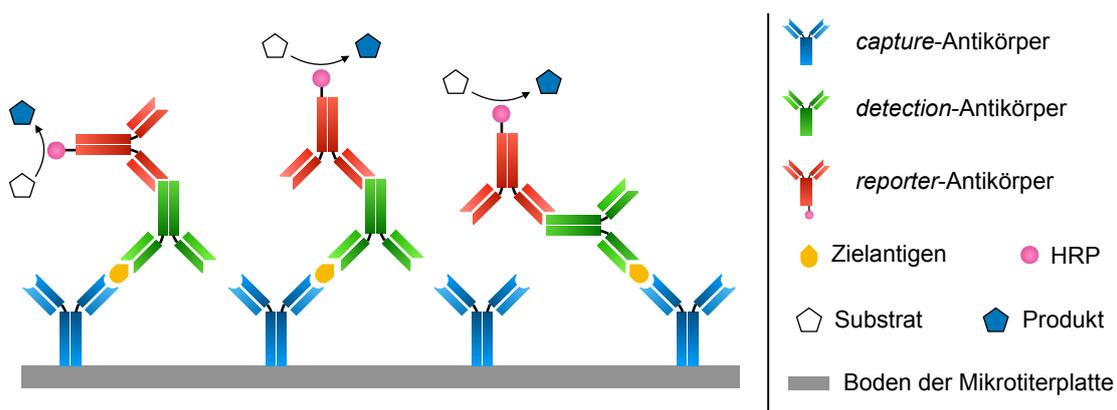
## 3.2.8 Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) ist ein Verfahren, das Proteine quantitativ nachweist. Handelt es sich bei dem zu untersuchenden Protein um einen Antikörper, wird der ELISA als *Antikörper-ELISA* bezeichnet. Im Falle eines Antigens heißt er *Sandwich-ELISA* (synonym *Antigen-ELISA*). Der Name rührt aus einer *sandwich*-artigen Anordnung zweier Primärantikörper um das Antigen.

Der Begriff „Immunsorbent“ beinhaltet zwei wesentliche Merkmale des ELISA. Zum einen bringt er zum Ausdruck, dass es sich um ein Antikörper-basierendes Verfahren handelt. Andererseits kommt dem Sorbens als integraler Bestandteil des ELISA eine

zentrale Bedeutung zu. Als Sorbens wird der Stoff bezeichnet, an den Proteine (Antigene oder Antikörper) gekoppelt und somit immobilisiert wurden.

Bei einem *Sandwich-ELISA* ist ein Primärantikörper (*capture*-Antikörper, synonym *coat*-Antikörper) am Boden einer Mikrotiterplatte (Sorbens) fixiert (**Abbildung 23**). Es folgt die Inkubation mit der Probe, sodass das nachzuweisende Antigen an den *capture*-Antikörper binden kann. Nach einem Waschgang, in dem alle nicht gebundenen Proteine entfernt werden, erfolgt die Inkubation mit einem weiteren Primärantikörper, dem sogenannten *detection*-Antikörper. Es ist dabei von Bedeutung, dass beide Primärantikörper an unterschiedliche Epitope des Antigens binden, um sterische Behinderungen zu vermeiden. Letztlich wird das messbare Signal durch Bindung des *reporter*-Antikörpers an den *detection*-Antikörper generiert. Dieser Sekundärantikörper ist an das Enzym HRP gekoppelt, das die Oxidation eines farblosen Substrates (in der Regel Phenylendiamine) zu einem farbigen Produkt katalysiert. Die quantitative Analyse erfolgt entweder als Messung der Extinktionsrate (Änderung der Extinktion pro Zeiteinheit) oder als Messung der Extinktion zu einem Zeitpunkt nach Zugabe einer Stopplösung, welche die Farbreaktion beendet. Da bei hohen Antigen-Konzentrationen die Bindestellen des *capture*-Antikörpers eine Sättigungskinetik aufweisen, ergibt sich ein hyperbolischer Zusammenhang zwischen der gemessenen Extinktion (oder Extinktionsrate) und der Antigen-Konzentration. Durch Logarithmieren der Antigen-Konzentration erhält man eine Sigmoide, die durch eine zusätzliche Transformation der (normalisierten) Extinktionswerte in Logit-Werte linearisiert wird. Aus den Extinktionswerten von Proben bekannter Antigen-



**Abbildung 23: Prinzip des Sandwich-ELISA**

Der auf dem Boden der Mikrotiterplatte immobilisierte *capture*-Antikörper bindet das zu untersuchende Zielantigen aus der Probe. Nach einem Waschgang erfolgt die Inkubation mit einem weiteren Primärantikörper (*detection*-Antikörper), der ebenfalls das Antigen bindet. Das an den Sekundärantikörper (*reporter*-Antikörper) gekoppelte Enzym HRP katalysiert die Umwandlung eines farblosen Substrates in ein farbiges Produkt. Durch photometrische Messung der Extinktion kann auf die Konzentration des Zielantigens geschlossen werden.

Konzentrationen kann durch eine lineare Regression der Werte im Logit-Log-Plot eine Standardkurve berechnet werden. Anhand dieser Kurve erfolgt die Berechnung der Antigen-Konzentrationen in den Proben.

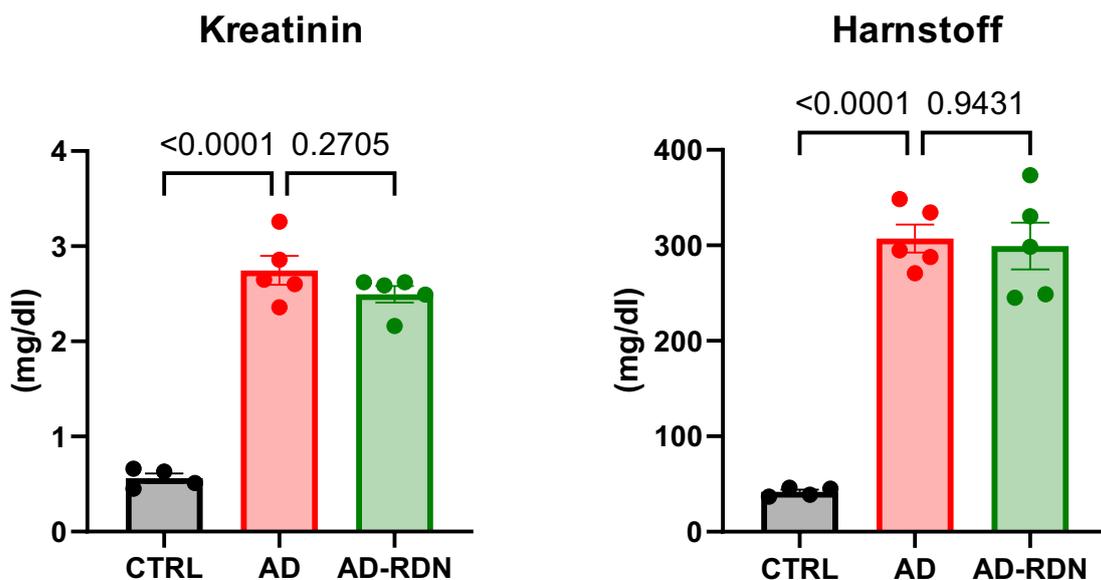
### **3.2.9 Statistik**

Alle angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die Datenanalyse und Visualisierung erfolgte mit der Software GraphPad Prism Version 10.2.3 (GraphPad Software, Boston, USA). Um die Normalverteilung der Daten zu überprüfen, wurde ein Shapiro-Wilk-Test durchgeführt. Bei Normalverteilung kam als statistischer Test eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit Tukey's post-hoc-Test für Mehrfachvergleiche zum Einsatz. Ansonsten ist ein Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's post-hoc-Test für Mehrfachvergleiche durchgeführt worden. Alle p-Werte  $< 0,05$  wurden als statistisch signifikant betrachtet.

## 4 Ergebnisse

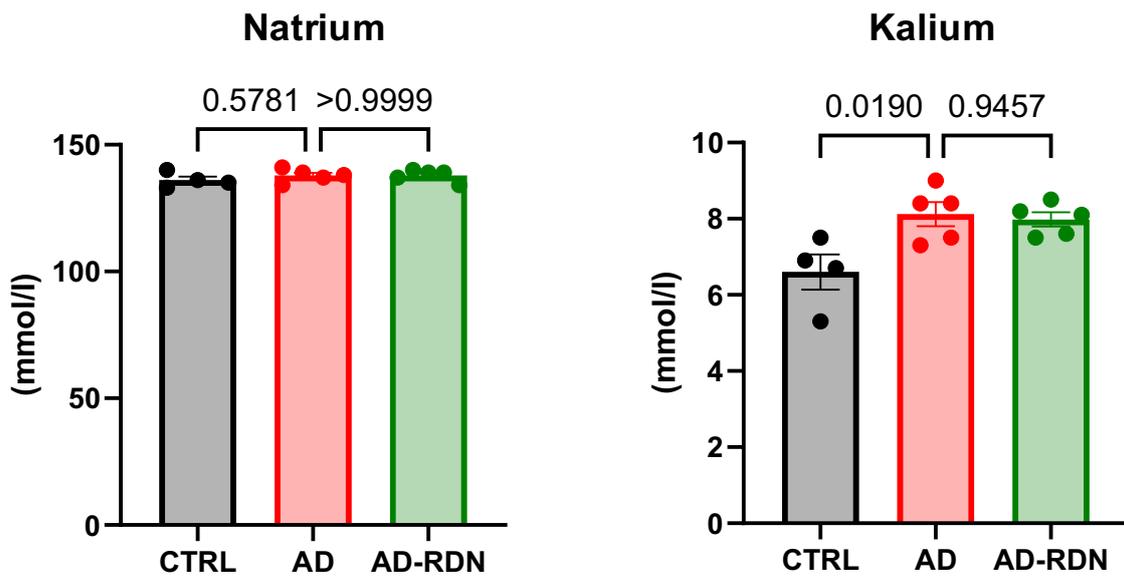
### 4.1 Induktion der CKD

Die Induktion einer Niereninsuffizienz zeigte sich laborchemisch anhand eines Anstieges der Plasmakonzentrationen von Kreatinin und Harnstoff nach 16 Wochen (**Abbildung 24**). Sowohl bei AD (2,53 mg/dl vs. 0,56 mg/dl in CTRL,  $p < 0,0001$  vs. CTRL) als auch bei AD-RDN (2,72 mg/dl,  $p < 0,0001$  vs. CTRL) waren die Nierenretentionsparameter erhöht. Nach renaler Denervation zeigte sich kein Unterschied im Vergleich zu AD ( $p = 0,27$  und  $p = 0,94$  für Kreatinin und Harnstoff). Die Plasmakonzentration von Natrium war bei allen drei Gruppen ohne signifikanten Unterschied, wohingegen sich bei AD und AD-RDN eine Hyperkaliämie zeigte (8,12 mmol/l in AD vs. 6,60 mmol/l in CTRL,  $p = 0,019$ ; 7,98 mmol/l in AD-RDN,  $p = 0,94$  vs. AD) (**Abbildung 25**).



**Abbildung 24: Nierenretentionsparameter**

Sowohl bei AD als auch bei AD-RDN zeigen sich erhöhte Konzentrationen von Kreatinin und Harnstoff. Nach Denervation besteht kein Unterschied. Mittelwerte  $\pm$  SEM, ANOVA mit Tukey's post-hoc-Test.



**Abbildung 25: Elektrolyte**

Die Plasmakonzentration von Natrium zeigte zwischen den Gruppen keinen Unterschied, wohingegen bei AD und AD-RDN eine Hyperkaliämie zu beobachten war. Mittelwerte  $\pm$  SEM, ANOVA mit Tukey's post-hoc-Test.

## 4.2 Blutdruck

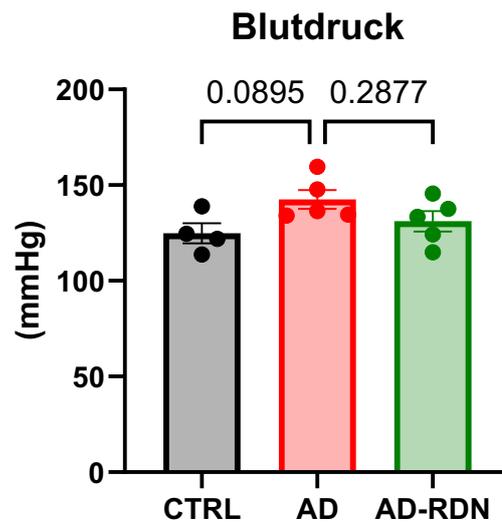
AD wies im Vergleich zu den Kontrollen einen numerischen Anstieg des systolischen Blutdruckes auf (142 mmHg vs. 125 mmHg,  $p = 0,089$ ). Bei AD-RDN war der Blutdruck tendenziell geringer als bei AD (131 mmHg,  $p = 0,28$  vs. AD), jedoch ohne statistische Signifikanz (**Abbildung 26**).

## 4.3 Niere

### 4.3.1 Indoxylsulfat

Die Konzentration von Indoxylsulfat im Plasma war bei CTRL  $0,20 \pm 0,12 \mu\text{g/ml}$  (**Abbildung 27**). Bei AD zeigte sich ein deutlicher Anstieg auf  $0,71 \pm 0,10 \mu\text{g/ml}$  (+257 % vs. CTRL,  $p = 0,004$ ). Nach renaler Denervation ist die Indoxylsulfat-Konzentration auf fast normale Werte ( $0,28 \pm 0,11 \mu\text{g/ml}$ ) reduziert (–60 % vs. AD,  $p = 0,007$ ).

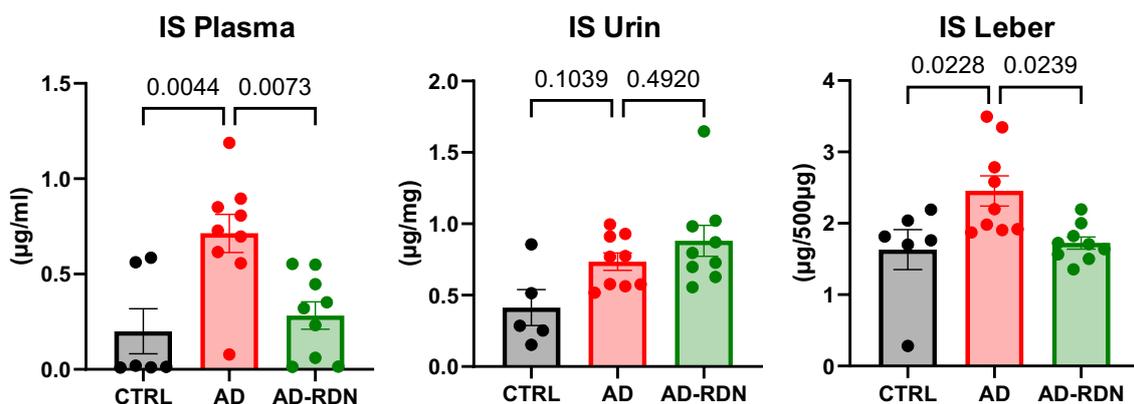
In der Urinuntersuchung konnte bei AD ein geringer, aber nicht signifikanter Anstieg der Indoxylsulfat-Konzentration gemessen werden. Lediglich bei AD-RDN war die Konzentration signifikant erhöht (+113 % vs. CTRL,  $p = 0,013$ ). Zwischen AD und AD-RDN war kein Unterschied beobachtet worden ( $p = 0,49$ ).



**Abbildung 26: Systolischer Blutdruck**

Es zeigt sich ein geringer numerischer Anstieg des systolischen Blutdruckes bei AD im Vergleich zu CTRL (+14 %). Nach Denervation ergibt sich eine geringe Abnahme ohne statistische Signifikanz (–8 % vs. AD). Mittelwerte  $\pm$  SEM, ANOVA mit Tukey's post-hoc-Test.

Die Indoxylsulfat-Konzentration im Leberparenchym war bei AD signifikant erhöht (+50 % vs. CTRL,  $p = 0,022$ ). Bei AD-RDN zeigte sich eine Normalisierung der Indoxylsulfat-Konzentration (–30 % vs. AD,  $p = 0,023$ ).



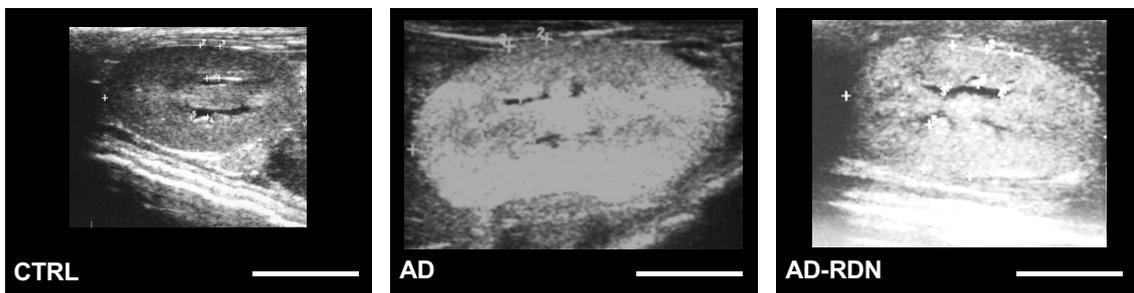
**Abbildung 27: Indoxylsulfat**

Die Plasmakonzentration von Indoxylsulfat ist bei AD signifikant erhöht (+257 % vs. CTRL), nach RDN zeigt sich eine signifikante Reduktion (–60 % vs. AD) auf fast normale Werte. Im Urin ist die Indoxylsulfat-Konzentration bei AD nicht signifikant erhöht, bei AD-RDN sogar signifikant (+113 % vs. CTRL). In der Leber zeigte sich eine signifikant erhöhte Konzentration bei AD (+50 % vs. CTRL) und eine signifikant erniedrigte Konzentration bei AD-RDN (–30 % vs. AD). Mittelwerte  $\pm$  SEM, ANOVA mit Tukey's post-hoc-Test.

### 4.3.2 Sonographie

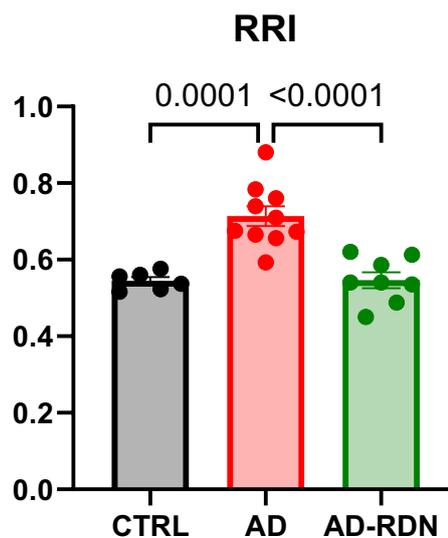
In **Abbildung 28** sind Beispielbilder der Nierensonographie gezeigt. Sowohl AD als auch AD-RDN wiesen im Vergleich zu CTRL vergrößerte und echodichte Nieren auf. Einige CKD-Ratten präsentierten zudem einen geringgradigen Harnstau.

Die Messung des RRI erfolgte in jeder Niere an drei verschiedenen intrarenalen Arterien, woraus ein Mittelwert gebildet wurde. AD wies im Vergleich zu CTRL einen erhöhten RRI auf (+31 %,  $p = 0,0001$ ), wohingegen der RRI nach renaler Denervation wieder normalisiert wurde (−23 % vs. AD,  $p < 0,0001$ ) (**Abbildung 29**).



**Abbildung 28: Nierensonographie**

Zu sehen sind repräsentative Beispiele der Nierensonogramme. AD und AD-RDN zeigen eine Hyperechogenität sowie vergrößerte Nierendurchmesser. **Maßstab 1 cm.**



**Abbildung 29: RRI**

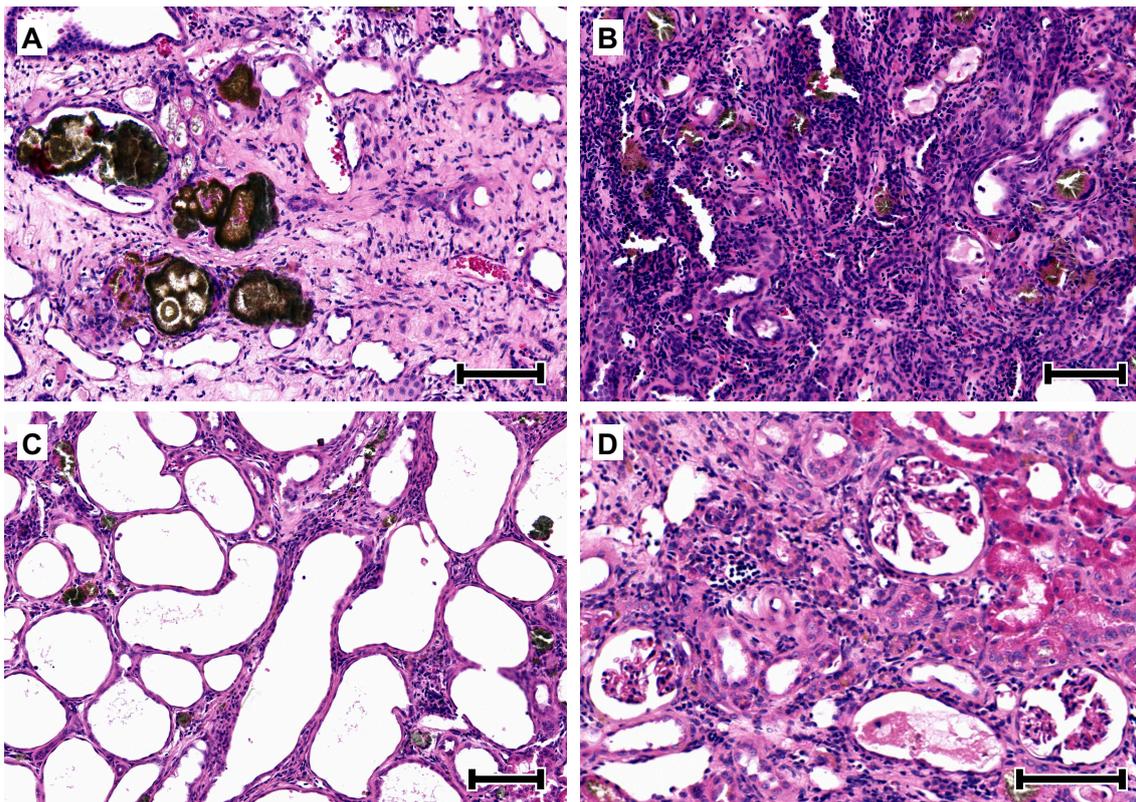
Bei AD ist der RRI im Vergleich zu CTRL signifikant erhöht. Bei AD-RDN zeigt sich wieder eine Normalisierung des RRI. Mittelwerte  $\pm$  SEM, ANOVA mit Tukey's post-hoc-Test.

### 4.3.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung und Sirius-Red-Färbung

Die histologische Untersuchung von Nierenpräparaten in HE- und SR-Färbung diene der qualitativen Beurteilung von Schädigungsmustern bei Adenin-Nephropathie, der Quantifizierung einiger spezieller Parameter sowie der Feststellung einer Einflussnahme der renalen Denervation.

#### 4.3.3.1 Allgemeines Schädigungsmuster bei Adenin-Nephropathie

Die Adenin-Nephropathie kann als eine spezielle Form der obstruktiven Nephropathie aufgefasst werden und ähnelt daher einer tubulointerstitiellen Nephritis. Das histopathologische Bild war geprägt von einer Tubulopathie, einhergehend mit interstitieller Inflammation und Fibrose (**Abbildung 30**). Im Tubuluslumen ausgefällte 2,8-DHA-Kristalle, die sich dunkelbraun bis schwarz darstellten und die wegen ihrer Doppelbrechung gut in der



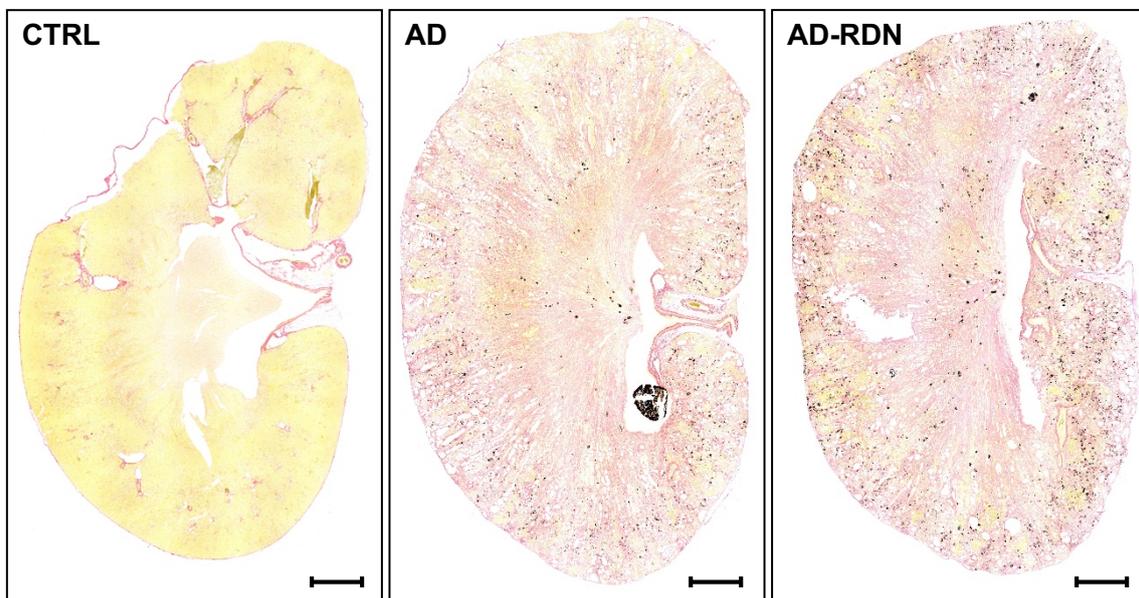
**Abbildung 30: Histopathologische Befunde der Adenin-Nephropathie**

Niere eines Adenin-Tiers, HE-Färbung. **(A) Kristalle und Fibrose.** In der linken Bildhälfte sind dunkelbraune 2,8-Dihydroxyadeninkristalle zu erkennen, die in den Lumina der Tubuli präzipitiert sind. Die rechte Bildhälfte zeigt eine stark ausgeprägte interstitielle Fibrose. **(B) Lymphozytäres Infiltrat.** Auffallend ist die besonders hohe Kerndichte, die größtenteils durch ein lymphozytäres Infiltrat, aber auch durch proliferierende Fibroblasten bedingt ist. **(C) Dilatierte Tubuli.** Durch einen Harnstau kommt es zur Dilatation der Tubuli, die in einer zystischen Degeneration enden kann. **(D) Degenerierte Glomeruli.** Die auf dem Boden der obstruktiven Nephropathie entstehende sekundäre Glomerulopathie spiegelt sich in einer Atrophie mit Verlust der Kapillarschlingen wider. **Maßstab 100 µm.**

Polarisationslichtmikroskopie zu beobachten waren, führten zu einem Harnaufstau und damit zur Dilatation der Tubuli, was besonders eindrücklich im renalen Kortex beobachtet werden konnte. Gelegentlich fanden sich einzelne Kristalle auch im Interstitium, umgeben von einem leukozytären Infiltrat. Vermehrtes Bindegewebe und eine deutlich erhöhte Anzahl von Fibroblasten waren Ausdruck der interstitiellen Fibrose. Obwohl es sich um eine primäre tubulointerstitielle Erkrankung handelt, konnte auch eine Glomerulusschädigung beobachtet werden. Diese sekundäre Glomerulopathie äußerte sich in einer Degeneration und Atrophie der Glomeruli mit Verlust von Kapillarschlingen, die ein Resultat des durch den Harnstau bedingten Druckanstieges in der Bowman-Kapsel (glomeruläre Hypertonie) sind.

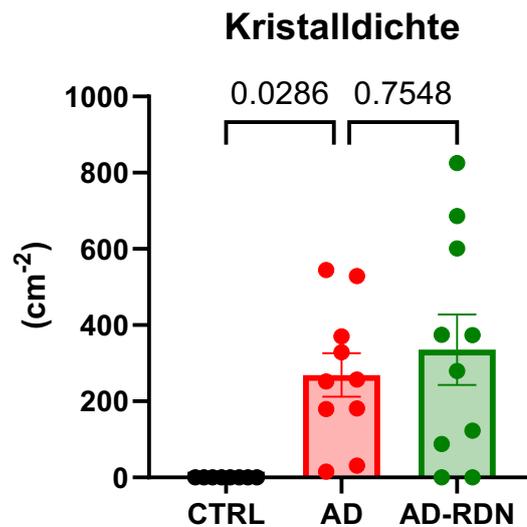
#### 4.3.3.2 Anzahl der 2,8-DHA-Kristalle

2,8-DHA-Kristalle sind überwiegend in den Tubuli des renalen Kortex lokalisiert, aber auch in den Sammelrohren und Nierenbecken (**Abbildung 31**). Erwartungsgemäß fanden sich bei den Kontrollen keine Kristalle (**Abbildung 32**). Bei AD war die mittlere 2,8-



**Abbildung 31: Nieren in Sirius-Red-Färbung**

Die Übersichtsaufnahmen der Nieren zeigen eindrücklich das Ausmaß der Adenin-Nephropathie. Gesundes Parenchym färbt sich gelb an (CTRL), während sich Bindegewebe rot darstellt (AD und AD-RDN). Zu erkennen sind schwarze 2,8-Dihydroxyadenin-Kristalle im Lumen des Tubulussystem sowie im Interstitium. Der große Kristall im Nierenbecken der Adenin-Ratte (Durchmesser ca. 1,5 mm) hätte bei Mobilisierung vermutlich eine Ureterkolik ausgelöst. Dilatierte Tubuli sind teilweise zystisch degeneriert, insbesondere im renalen Kortex. Die Fibrose ist begleitet von einem inflammatorischen Infiltrat (in dieser Färbung nicht zu erkennen). **Maßstab 2 mm.**



**Abbildung 32: Kristalldichte**

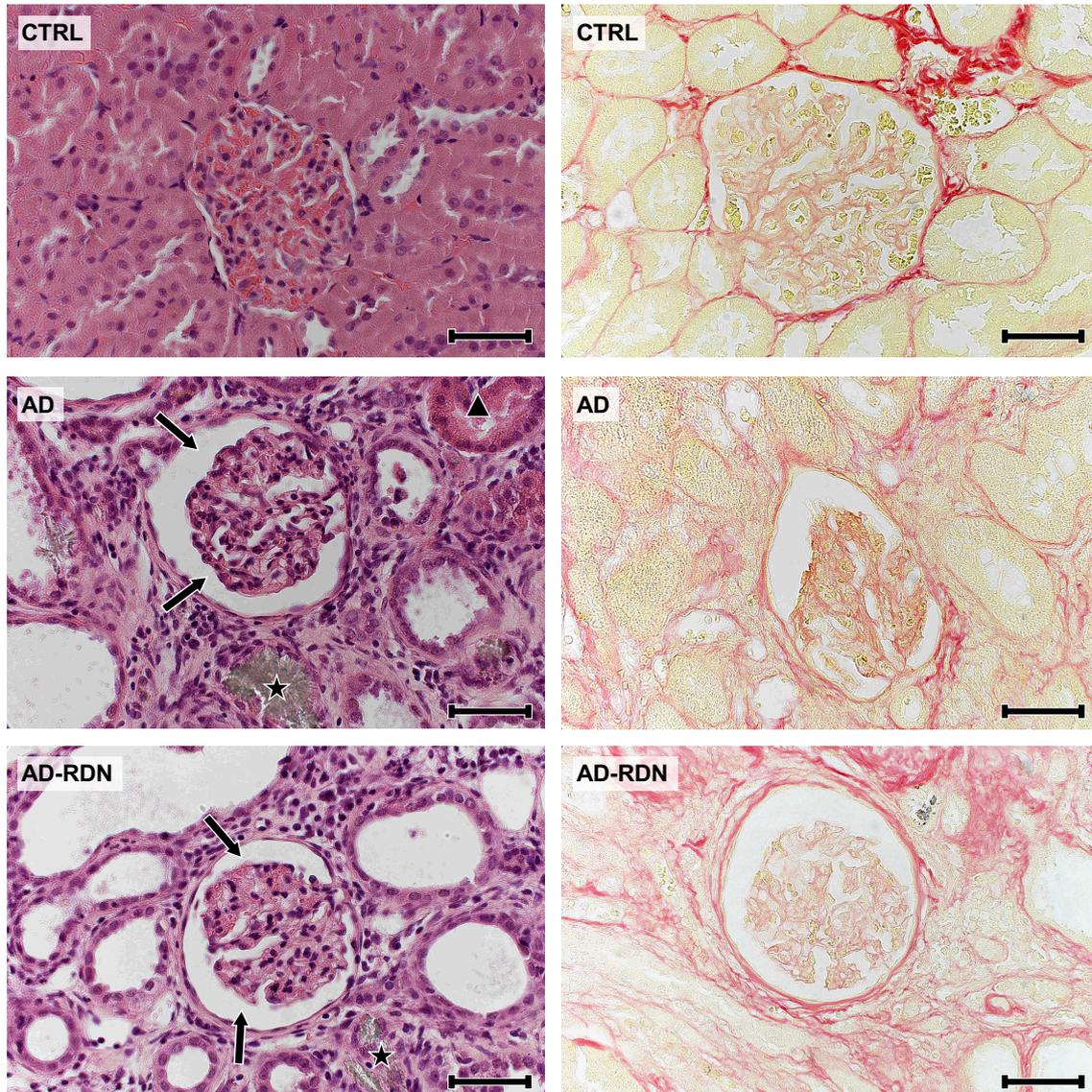
In den Übersichtsaufnahmen beider Nieren eines jeden Tieres wurden alle Kristalle gezählt und auf die angeschnittene Querschnittsfläche des Nierenparenchyms normiert. Erwartungsgemäß zeigten sich signifikante Unterschiede von AD und AD-RDN im Vergleich zu CTRL. Der Unterschied von AD-RDN (+25 % vs. AD) war statistisch nicht signifikant. Mittelwerte  $\pm$  SEM, ANOVA mit Tukey's post-hoc-Test.

DHA-Kristalldichte  $269 \text{ cm}^{-2} \pm 57 \text{ cm}^{-2}$  ( $p = 0,028$  vs. CTRL) und bei AD-RDN  $335 \text{ cm}^{-2} \pm 92 \text{ cm}^{-2}$  ( $p = 0,0058$  vs. CTRL). Der Unterschied von AD-RDN im Vergleich zu AD (+25 %;  $p = 0,75$ ) war nicht statistisch signifikant.

#### 4.3.3.3 Glomeruläre Morphometrie

Die glomeruläre Morphometrie beinhaltete die Vermessung der Querschnittsfläche von glomerulären Kapillaren, der Bowman-Kapsel sowie der Berechnung des Kapillar-Kapsel-Verhältnisses. Da das glomeruläre Kapillarkonvolut und die Bowman-Kapsel dreidimensionale Strukturen sind, wurden die gemessenen Querschnittsflächen durch eine stereometrische Gleichung in Volumina umgerechnet.

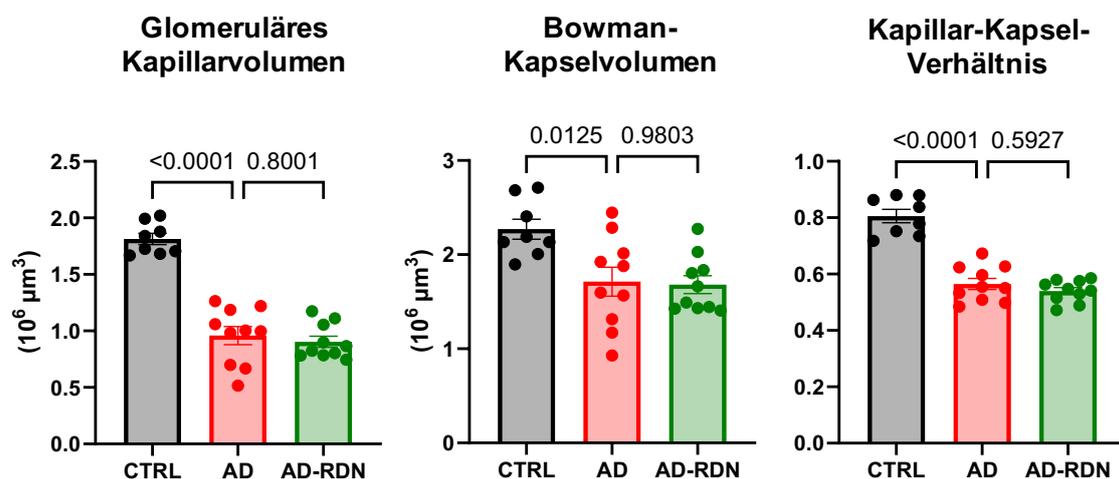
**Abbildung 33** zeigt repräsentative Glomeruli in HE- und Sirius-Red-Färbung. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Fläche der glomerulären Kapillarschlingen bei AD und AD-RDN im Vergleich zu CTRL vermindert ist. Darüber hinaus ist das Lumen der Bowman-Kapsel bei AD und AD-RDN erweitert.



**Abbildung 33: Glomeruli in HE-Färbung (links) und SR-Färbung (rechts)**

Im Vergleich zu den Kontrollen zeigen sich bei AD und AD-RDN ein hyperzelluläres und fibrosiertes Interstitium, ein sekundärer Glomerulusschaden sowie dilatierte Tubuli. Die chronische Tubulusobstruktion durch 2,8-Dihydroxyadenin-Kristalle (Sterne) resultiert in einem Harnstau mit Erweiterung des Lumens der Bowman-Kapsel (Pfeile). Stark eosinophile Tubulusepithelzellen (Dreieck) stellen wahrscheinlich das histologische Korrelat der Proteinurie dar. **Maßstab 50 µm.**

Das mittlere glomeruläre Kapillarovolumen betrug bei CTRL  $1,81 \times 10^6 \mu\text{m}^3 \pm 0,05 \times 10^6 \mu\text{m}^3$  (**Abbildung 34**). Es war bei AD mit  $0,96 \times 10^6 \mu\text{m}^3 \pm 0,08 \times 10^6 \mu\text{m}^3$  ( $-47\%$  vs. CTRL,  $p < 0,0001$ ) signifikant verringert. Bei AD-RDN betrug das mittlere Kapillarovolumen  $0,90 \times 10^6 \mu\text{m}^3 \pm 0,05 \times 10^6 \mu\text{m}^3$  ( $-50\%$  vs. CTRL,  $p < 0,0001$ ), was jedoch keinem statistisch signifikanten Unterschied im Vergleich zu AD entspricht ( $p = 0,80$ ). Interessanterweise nahm auch das mittlere Volumen der Bowman-Kapsel ab. Während die Kontrollen ein mittleres Volumen von  $2,27 \times 10^6 \mu\text{m}^3 \pm 0,11 \times 10^6 \mu\text{m}^3$  aufwiesen, war es sowohl bei AD mit  $1,71 \times 10^6 \mu\text{m}^3 \pm 0,15 \times 10^6 \mu\text{m}^3$  ( $-25\%$  vs. CTRL,  $p = 0,0125$ ) als auch bei AD-RDN mit  $1,68 \times 10^6 \mu\text{m}^3 \pm 0,10 \times 10^6 \mu\text{m}^3$  ( $-26\%$  vs. CTRL,  $p = 0,0081$ ) signifikant vermindert. Der marginale Unterschied zwischen AD und AD-RDN war statistisch unbedeutend ( $p = 0,98$ ). Aufgrund der stärkeren relativen Abnahme des glomerulären Kapillarovolumens verglichen mit der relativen Abnahme des Bowman-Kapselvolumens, war bei AD und AD-RDN das Kapillar-Kapsel-Verhältnis verringert. Bei CTRL betrug dieses Verhältnis  $0,81 \pm 0,02$ , bei AD  $0,56 \pm 0,02$  ( $-31\%$  vs. CTRL,  $p < 0,0001$ ) und bei AD-RDN  $0,54 \pm 0,01$  ( $-33\%$  vs. CTRL,  $p < 0,0001$ ). Auch hier blieb der Unterschied zwischen AD und AD-RDN ohne statistische Signifikanz ( $p = 0,59$ ).



**Abbildung 34: Glomeruläre Morphometrie**

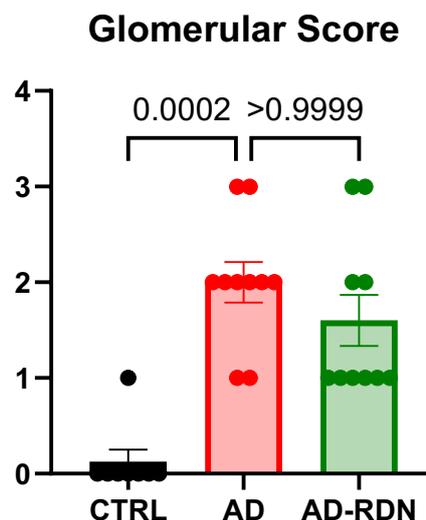
Sowohl AD ( $-47\%$  vs. CTRL) als auch AD-RDN ( $-50\%$  vs. CTRL) weisen ein deutlich vermindertes glomeruläres Kapillarovolumen auf. Darüber hinaus ist auch das Gesamtvolumen der Bowman-Kapsel vermindert ( $-25\%$  bei AD vs. CTRL;  $-26\%$  bei AD-RDN vs. CTRL). Die stärkere relative Reduktion des Kapillarovolumens gegenüber des Bowman-Kapselvolumens resultiert in einer Abnahme des Kapillar-Kapsel-Verhältnisses ( $-31\%$  bei AD vs. CTRL;  $-33\%$  bei AD-RDN vs. CTRL). Bezüglich aller drei Parameter ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen AD und AD-RDN. Mittelwerte  $\pm$  SEM, ANOVA mit Tukey's post-hoc-Test.

#### 4.3.3.4 Glomerular Score

Der Glomerular Score ist ein Maß zur Beschreibung eines glomerulären Schadens. Jeder Niere wird eine Punktzahl von 0 (normale Erscheinung) bis 5 (diffuse Glomerulosklerose und Synechien mit Bowman-Kapsel) zugeordnet (siehe Kapitel 3.2.1.3.2). Die Kontrollen wiesen einen mittleren Score von  $0,125 \pm 0,125$  auf (**Abbildung 35**). Ein Score von  $2 \pm 0,21$  bei AD zeigte eine diskrete Glomerulusschädigung an ( $p = 0,0002$  vs. CTRL). Die Glomeruli bei AD-RDN hatten einen geringfügig, aber nicht signifikant besseren Score ( $1,6 \pm 0,27$ ,  $-20\%$  vs. AD,  $p = 0,99$ ).

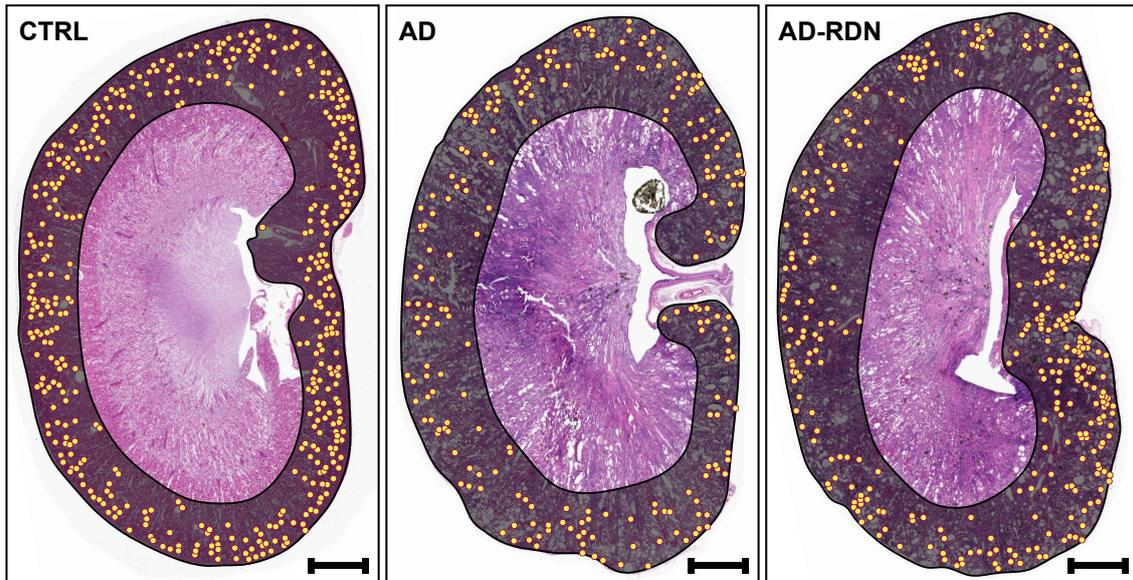
#### 4.3.3.5 Glomerulusdichte

Die Glomerulusdichte ist die Anzahl der Glomeruli pro Flächeneinheit des renalen Kortex. **Abbildung 36** zeigt beispielhaft, wie sich die Glomerulusdichte bei AD und AD-RDN im Vergleich zu den Kontrollen ändert. Letztere hatten durchschnittlich  $4,47 \pm 0,15$  Glomeruli pro  $\text{mm}^2$  (**Abbildung 37**). Bei AD war eine deutliche Abnahme zu erkennen ( $2,52 \text{ mm}^{-2} \pm 0,15 \text{ mm}^{-2}$ ,  $-44\%$  vs. CTRL,  $p < 0,0001$ ). Nach RDN zeigte sich eine



**Abbildung 35: Glomerular Score**

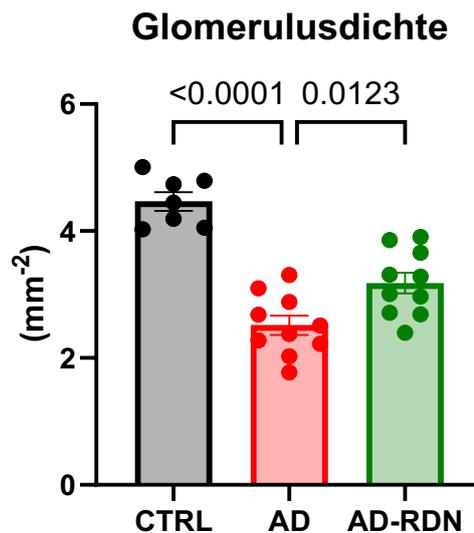
Der Glomerular Score beschreibt das Ausmaß glomerulärer Schädigung. Pro Niere wird eine Punktzahl von 0 (normale Erscheinung) bis 5 (diffuse Glomerulosklerose und Synechien mit Bowman-Kapsel) vergeben. Es zeigen sich signifikante Unterschiede bei AD und AD-RDN im Vergleich zu CTRL, die geringfügige Verbesserung nach RDN ( $-20\%$  vs. AD) war jedoch nicht statistisch signifikant. Mittelwerte  $\pm$  SEM, Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's post-hoc-Test.



**Abbildung 36: Histologische Darstellung der Glomerulusdichte**

Zu sehen sind drei repräsentative Nieren in HE-Färbung. Jeder Glomerulus ist durch einen gelben Punkt gekennzeichnet. Der renale Kortex ist dunkel hervorgehoben, die Rinden-Mark-Grenze orientiert sich dabei an den juxtamedullären Glomeruli. Die Glomerulusdichte (Anzahl Glomeruli pro Kortexfläche) nimmt bei AD im Vergleich zu CTRL deutlich ab. Die Abnahme der Glomerulusdichte bei AD-RDN ist etwas geringer ausgeprägt. **Maßstab 2 mm.**

statistisch signifikante Zunahme der Glomerulusdichte ( $3,18 \text{ mm}^{-2} \pm 0,16 \text{ mm}^{-2}$ , +26 % vs. AD,  $p = 0,012$ ).



**Abbildung 37: Glomerulusdichte**

Glomeruli wurden in allen Nieren gezählt und auf die Querschnittsfläche des renalen Kortex normiert. Zu sehen ist eine starke Abnahme der Glomerulusdichte bei AD (-44 % vs. CTRL) und eine signifikante Zunahme bei AD-RDN (+26 % vs. AD). Mittelwerte  $\pm$  SEM, ANOVA mit Tukey's post-hoc-Test.

## 4.3.4 Western Blot

### 4.3.4.1 HMGB1

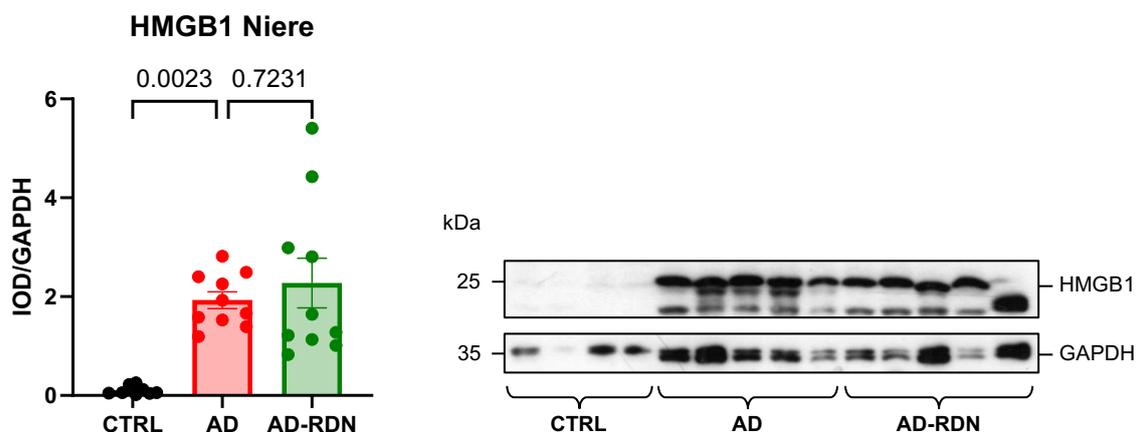
HMGB1 war bei AD signifikant verstärkt exprimiert ( $\times 18,6$  vs. CTRL,  $p = 0,0023$ ). Bei AD-RDN war die erhöhte Expression von HMGB1 ebenfalls signifikant ( $\times 21,9$  vs. CTRL,  $p < 0,0001$ ). Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen AD und AD-RDN ( $p = 0,72$ ) (**Abbildung 38**).

### 4.3.4.2 TLR2

Die TLR2-Expression war bei AD (+844 % vs. CTRL,  $p < 0,0001$ ) und AD-RDN (+913 % vs. CTRL,  $p < 0,0001$ ) stark erhöht. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen AD und AD-RDN ( $p = 0,74$ ) (**Abbildung 39**).

### 4.3.4.3 TLR4

Die Expression von TLR4 in der Niere war sowohl bei AD (+75 % vs. CTRL,  $p = 0,12$ ) als auch bei AD-RDN numerisch erhöht ohne Unterschied zwischen AD und AD-RDN ( $p = 0,92$ ) (**Abbildung 40**).



**Abbildung 38: HMGB1 Niere**

Die Expression von HMGB1 in der Niere ist sowohl bei AD als auch bei AD-RDN signifikant erhöht im Vergleich zu CTRL. Zwischen AD und AD-RDN ergibt sich kein Unterschied. Linke und rechte Nieren wurden zusammen ausgewertet. Mittelwerte  $\pm$  SEM, ANOVA mit Tukey's post-hoc-Test.

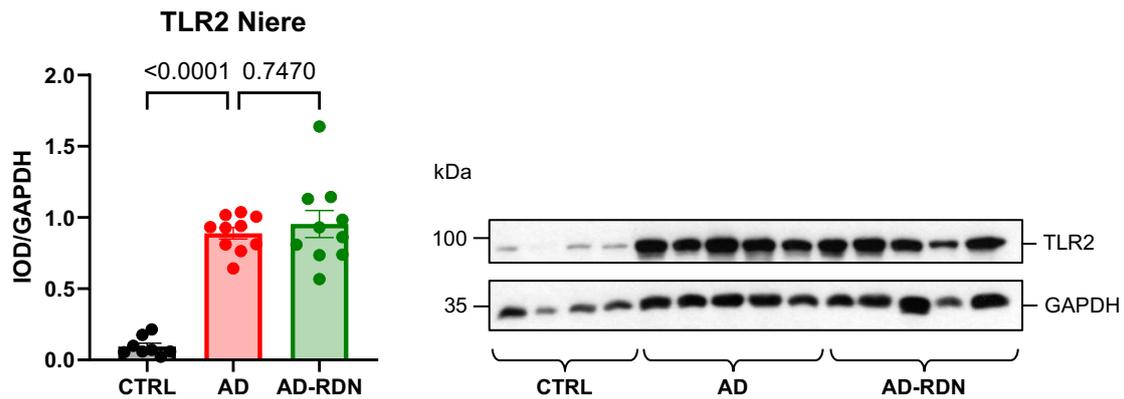


Abbildung 39: TLR2 Niere

Bei AD und AD-RDN war die Expression von TLR2 erhöht im Vergleich zu CTRL. Nach RDN ergab sich kein Unterschied verglichen mit AD. Linke und rechte Nieren wurden zusammen ausgewertet. Mittelwerte  $\pm$  SEM, ANOVA mit Tukey's post-hoc-Test.

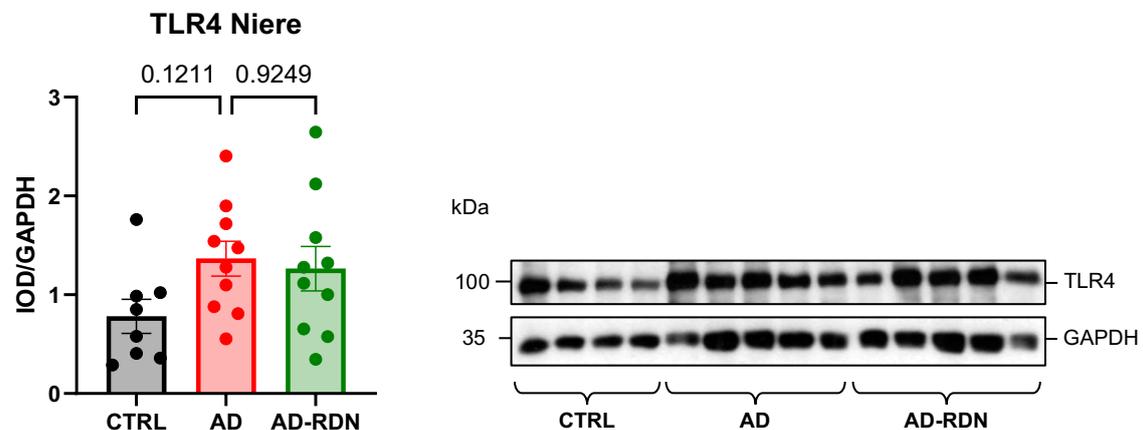


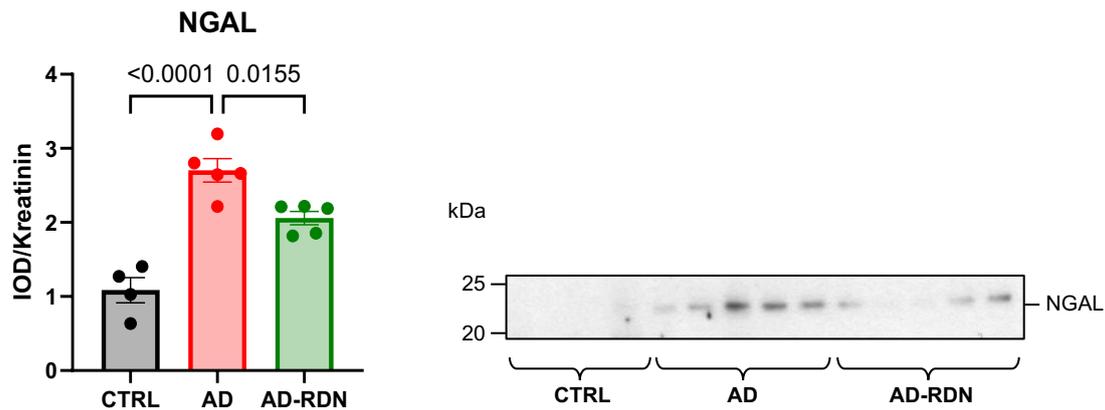
Abbildung 40: TLR4 Niere

Die Expression von TLR4 war bei AD und AD-RDN im Vergleich zu CTRL numerisch erhöht ohne Unterschied zwischen AD und AD-RDN. Linke und rechte Nieren wurden zusammen ausgewertet. Mittelwerte  $\pm$  SEM, ANOVA mit Tukey's post-hoc-Test.

#### 4.3.4.4 NGAL

Als Marker für die tubuläre Schädigung wurde NGAL herangezogen. NGAL wurde mittels Western Blot im Urin gemessen und auf die Kreatinin-Konzentration im Urin normalisiert, um Verdünnungseffekte auszugleichen.

Bei AD war die NGAL-Ausscheidung signifikant erhöht (+149 % vs. CTRL,  $p < 0,0001$ ). Nach renaler Denervation zeigte sich ein Rückgang (−24 % vs. AD,  $p = 0,015$ ) (**Abbildung 41**).



**Abbildung 41: NGAL im Urin**

Die Messung von NGAL im Urin erfolgte mittels Western Blot, die Daten wurden auf die Kreatinin-Konzentration im Urin normalisiert. Bei AD zeigt sich ein signifikanter Anstieg von NGAL im Vergleich zu CTRL. Nach Denervation ergibt sich ein signifikanter Rückgang der NGAL-Sekretion. Mittelwerte  $\pm$  SEM, ANOVA mit Tukey's post-hoc-Test.

## 4.3.5 HPLC

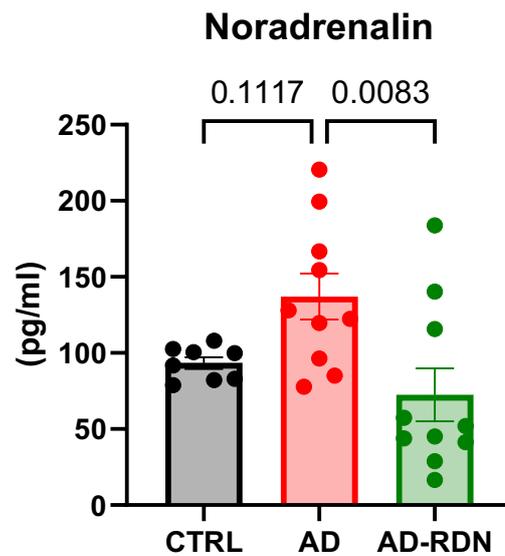
### 4.3.5.1 Katecholamine

Um eine erfolgreiche renale Denervation zu bestätigen, wurde die Noradrenalin-Konzentration im Nierengewebe mittels HPLC bestimmt. Bei AD zeigte sich im Vergleich zu CTRL eine nicht signifikant erhöhte Noradrenalin-Konzentration (+47 %,  $p = 0,11$ ). Bei AD-RDN war die renale Noradrenalin-Konzentration im Vergleich zu sham-operierten AD-Ratten signifikant niedriger (−47 %,  $p = 0,0083$ ) (**Abbildung 42**).

## 4.3.6 Immunfluoreszenzfärbung

### 4.3.6.1 RAGE

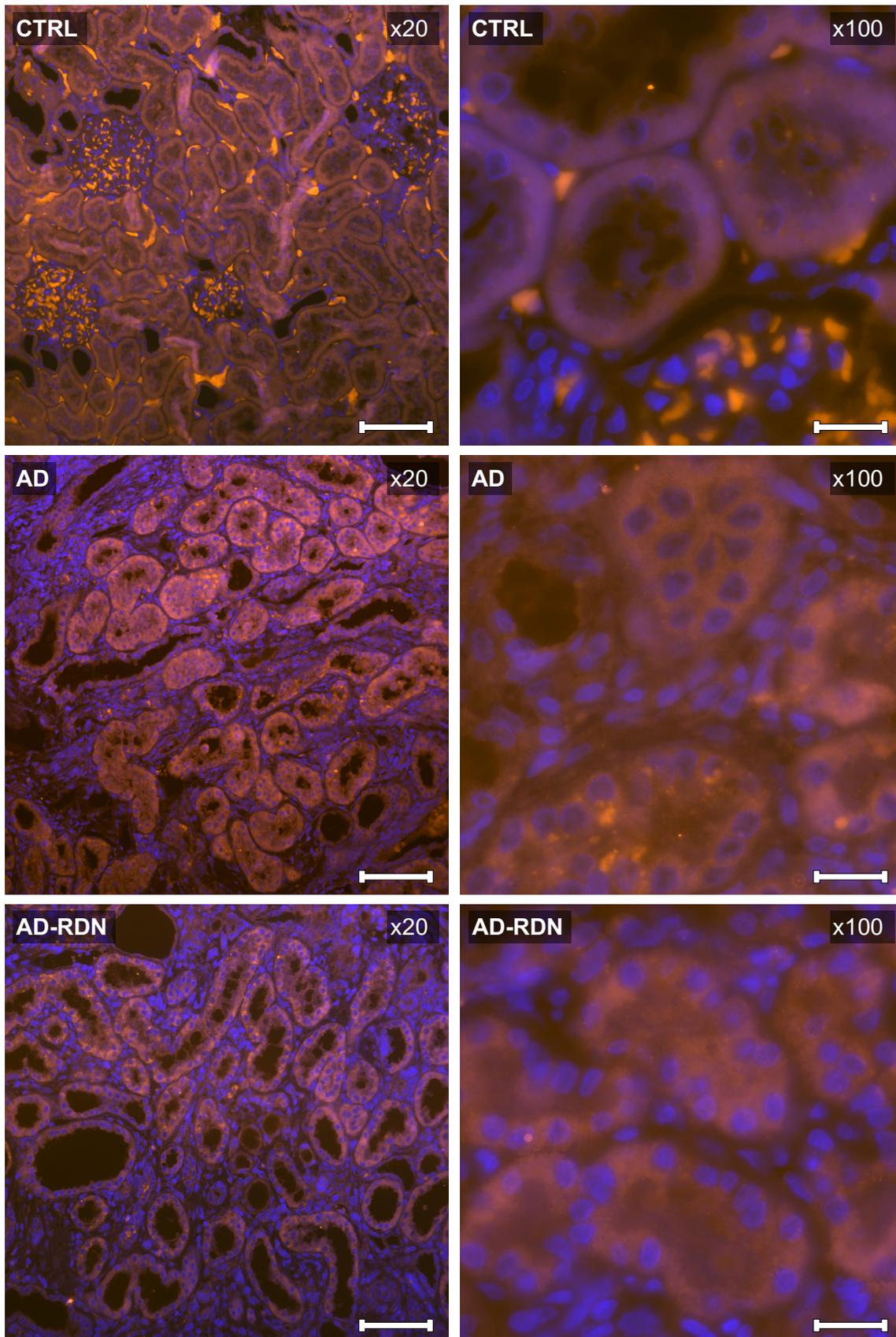
Die Immunfluoreszenzfärbung von RAGE in der Niere lässt erkennen, dass RAGE vor allem von Tubulusepithelzellen und weniger von glomerulären Zellen exprimiert wird (**Abbildung 43**). Darüber hinaus war zu beobachten, dass das leukozytäre Infiltrat bei AD und AD-RDN ebenfalls stark RAGE-positiv war. Insgesamt war die RAGE-



**Abbildung 42: Noradrenalin im Nierengewebe**

Bei AD war die Noradrenalin-Konzentration im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöht. Nach renaler Denervation zeigte sich diese niedriger. Linke und rechte Nieren wurden zusammen ausgewertet. Mittelwerte  $\pm$  SEM, ANOVA mit Tukey's post-hoc-Test.

Expression in der Niere bei AD im Vergleich zu CTRL hochreguliert. Nach renaler Denervation nimmt die Expression von RAGE im Vergleich zu AD etwas ab.



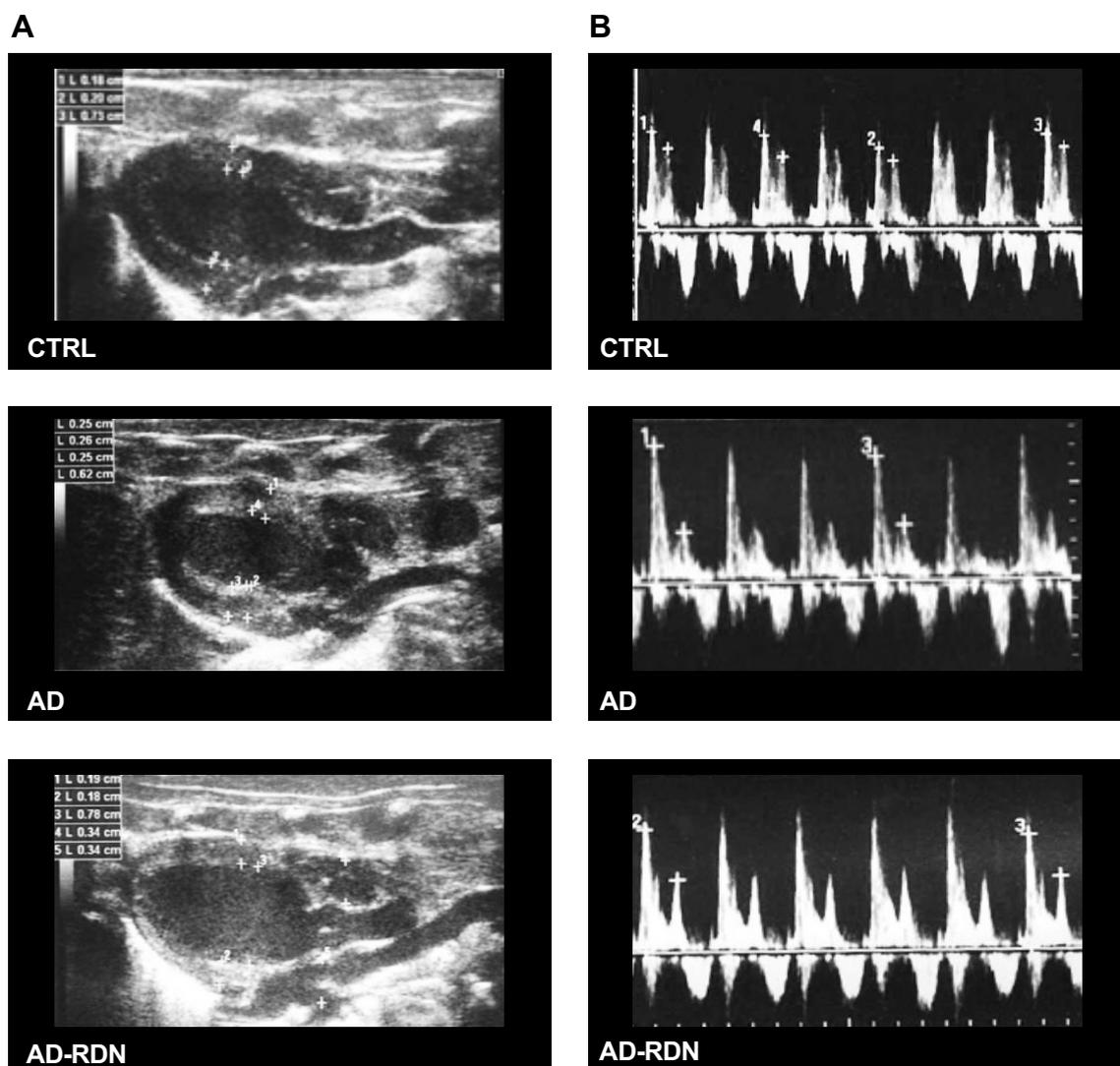
**Abbildung 43: Immunfluoreszenzfärbung RAGE Niere**

RAGE wird vor allem in Tubulusepithelzellen exprimiert. Die Expression ist bei AD stärker hochreguliert als bei AD-RDN. Die Autofluoreszenz der Erythrozyten ist zu beachten. TRITC RAGE, DAPI Zellkerne. Maßstab x20 100 µm, x100 20 µm.

## 4.4 Herz

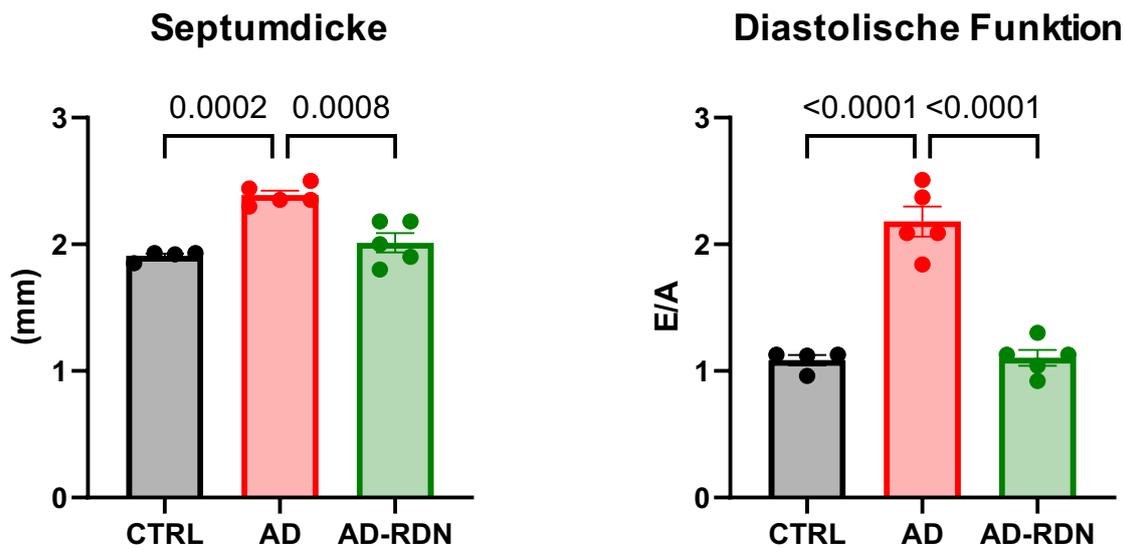
### 4.4.1 Echokardiographie

Die Echokardiographie diente der Beurteilung der linksventrikulären Hypertrophie sowie der diastolischen Herzfunktion. In **Abbildung 44** sind repräsentative Echokardiogramme sowie Dopplerkurven des Mitraleinflusses (E/A) zu sehen. Quantitativ konnte eine Zunahme der Wanddicke des interventrikulären Septums bei AD nachgewiesen werden (+23 % vs. CTRL,  $p = 0,0002$ ) (**Abbildung 45**). Nach RDN ergab sich eine



**Abbildung 44: Echokardiographie Beispielbilder**

**(A) Parasternale lange Achse.** Zu sehen sind repräsentative Echokardiogramme. Bei AD zeigt sich eine Verdickung des interventrikulären Septums. **(B) Dopplerspektrum des Mitraleinflusses.** Bei AD zeigt sich einer Erhöhung des E/A-Verhältnisses als Ausdruck erhöhter linksventrikulärer Füllungsdrücke bei diastolischer Dysfunktion.



**Abbildung 45: Echokardiographie**

Es zeigte sich eine Zunahme der Septumdicke bei AD (+23 % vs. CTRL) und eine Normalisierung nach RDN. Bei AD konnte eine diastolische Funktionsstörung, gemessen am E/A-Verhältnis, nachgewiesen werden. Bei AD-RDN war die diastolische Funktion verbessert. Mittelwerte  $\pm$  SEM, ANOVA mit Tukey's post-hoc-Test.

Normalisierung der Wanddicke ( $-14$  % vs. AD,  $p = 0,0008$ ). Bei AD zeigte sich eine diastolische Dysfunktion, gemessen an einer erhöhten E/A-Ratio (2,18 in AD vs. 1,09 in CTRL,  $p < 0,0001$ ). Bei AD-RDN war E/A wieder normalisiert (1,1 in AD-RDN,  $p < 0,0001$  vs. AD).

## 4.4.2 Kardio-MRT

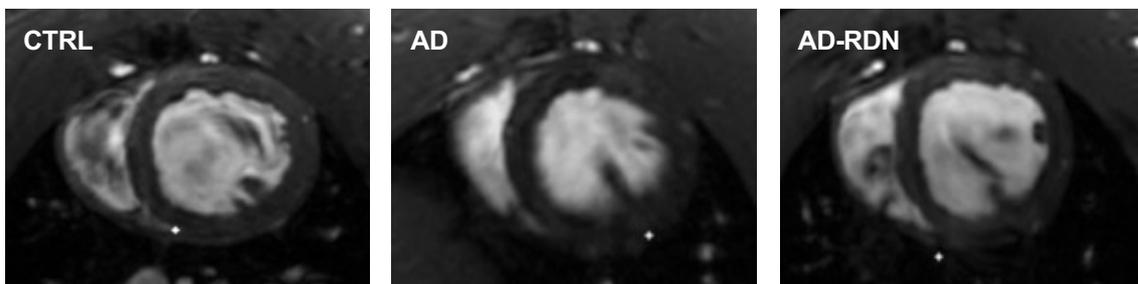
Zusätzlich zur Echokardiographie wurden Kardio-MRT-Untersuchungen durchgeführt, um das Ausmaß der linksventrikulären Hypertrophie zu bestimmen. Die Auswertung erfolgte in der kurzen Achse auf Höhe der Papillarmuskeln. In **Abbildung 46** sind beispielhaft Kardio-MRT-Bilder der kurzen Achse zu sehen. Die Quantifizierung der einzelnen Wandabschnitte des LV ergab bei AD eine Hypertrophie (+17 %, +18 %, +7 %;  $p = 0,0073$ ,  $p = 0,0032$ ,  $p = 0,049$ ; für Septum, Vorderwand und Hinterwand, alle vs. CTRL) (**Abbildung 47**). Bei AD-RDN war die Hypertrophie signifikant geringer ausgeprägt (-12 %, -14 %, -7 %;  $p = 0,0334$ ,  $p = 0,009$ ,  $p = 0,035$ ; für Septum, Vorderwand und Hinterwand, alle vs. AD).

## 4.4.3 Hämatotoxylin-Färbung

Die HE-Färbung des Herzens diente in erster Linie der Bestimmung des mittleren Kardiomyozytenquerschnittes, der als histologisches Korrelat einer myokardialen Hypertrophie angesehen werden kann.

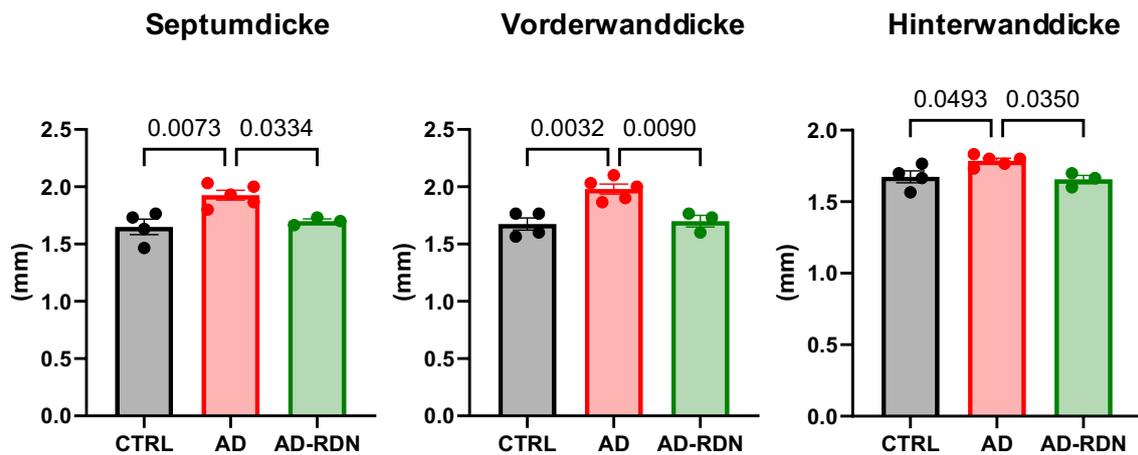
### 4.4.3.1 Kardiomyozytenquerschnittsfläche im LV

Die mittlere Querschnittsfläche der Kardiomyozyten im LV betrug bei den Kontrollen  $340 \mu\text{m}^2 \pm 21 \mu\text{m}^2$  (**Abbildung 48**). Bei AD zeigte sich eine Vergrößerung der Myozyten auf  $405 \mu\text{m}^2 \pm 23 \mu\text{m}^2$  (+19 % vs. CTRL,  $p = 0,0025$ ). Nach renaler Denervation konnte mit  $364 \mu\text{m}^2 \pm 21 \mu\text{m}^2$  eine etwas stärkere Abnahme der Myozytengröße beobachtet werden (-10 % vs. AD,  $p = 0,033$ ).



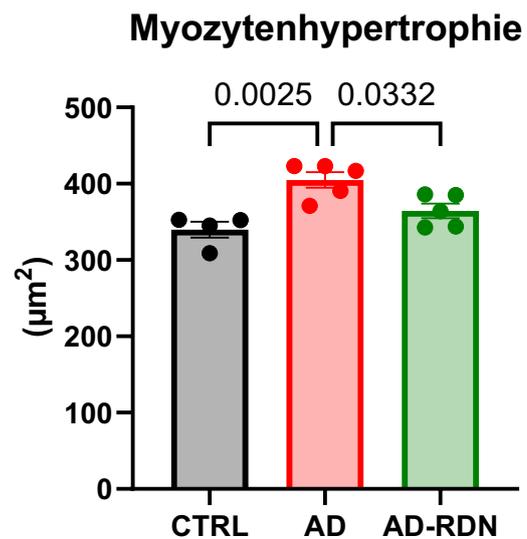
**Abbildung 46: Kardio-MRT Beispielbilder**

Repräsentative Kardio-MRT-Aufnahmen in der kurzen Achse. Die Hypertrophie bei AD ist deutlich erkennbar. Nach Denervation normalisiert sich die Wanddicke wieder.



**Abbildung 47: Kardio-MRT**

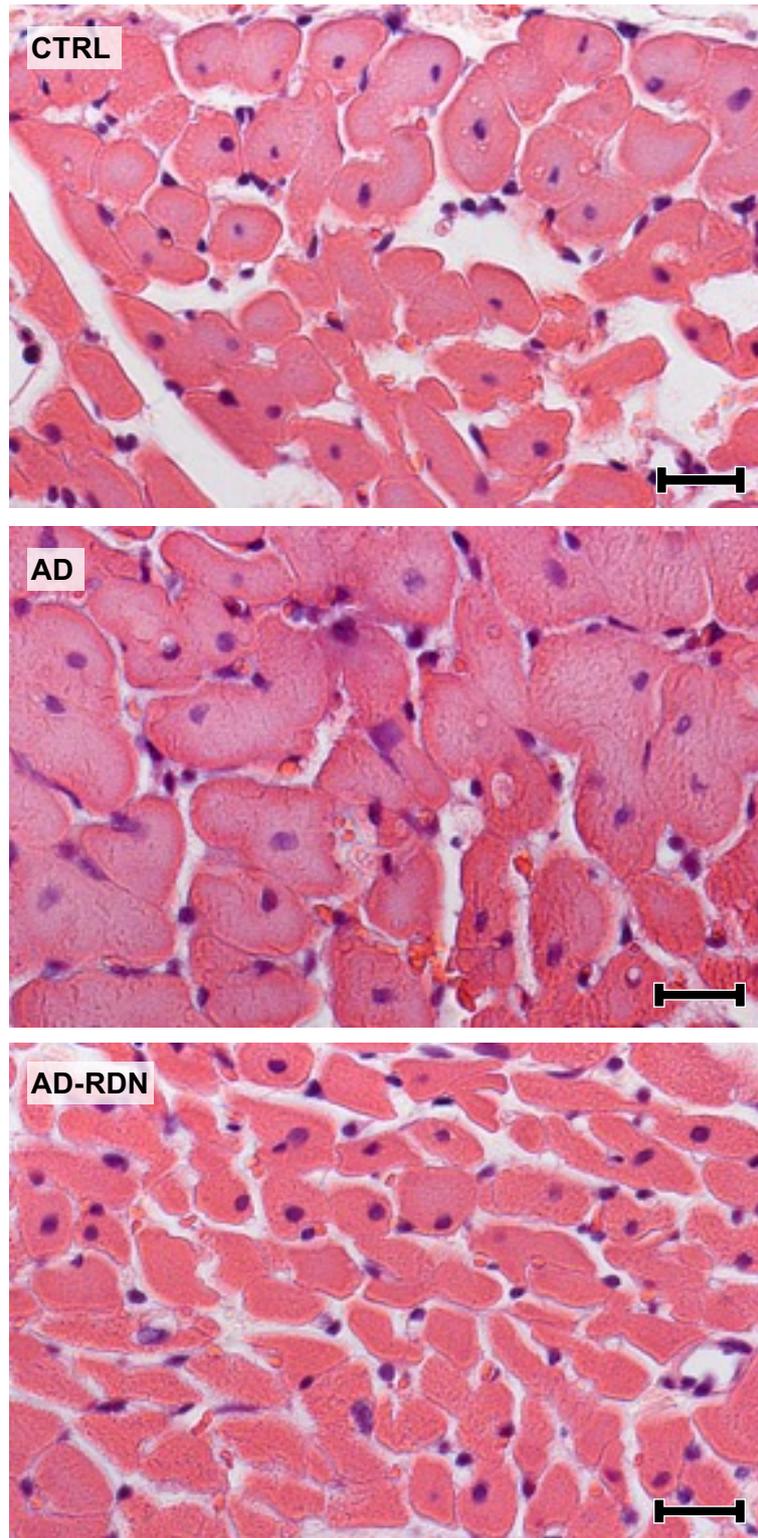
Es zeigt sich bei verschiedenen Wandabschnitten des LV eine Hypertrophie bei AD, die nach Denervation rückläufig ist. Mittelwerte  $\pm$  SEM, ANOVA mit Tukey's post-hoc-Test.



**Abbildung 48: Myozytengröße im LV**

Im LV zeigt sich eine Hypertrophie bei AD. Bei AD-RDN ist die Hypertrophie reduziert. Mittelwerte  $\pm$  SEM, ANOVA mit Tukey's post-hoc-Test.

In **Abbildung 49** sind repräsentative Ausschnitte aus dem Myokardgewebe zu sehen.

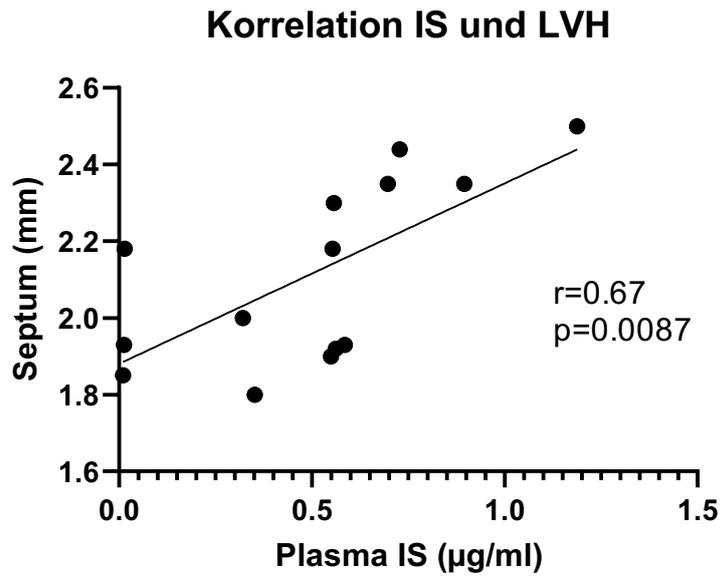


**Abbildung 49: Kardiomyozyten im Querschnitt**

Linker Ventrikel, HE-Färbung. Zu erkennen ist eine Größenzunahme der Kardiomyozyten bei AD im Vergleich zu CTRL. Die Hypertrophie ist bei AD-RDN weniger stark ausgeprägt. **Maßstab 20 µm.**

#### 4.4.4 Linksventrikuläre Hypertrophie und Indoxylsulfat

Das Ausmaß der LVH gemessen an der Septumdicke korrelierte signifikant mit der Plasmakonzentration von IS ( $n = 14$ ,  $r = 0,67$ ,  $p = 0,0087$ ) (**Abbildung 50**).



**Abbildung 50: Korrelation IS und LVH**

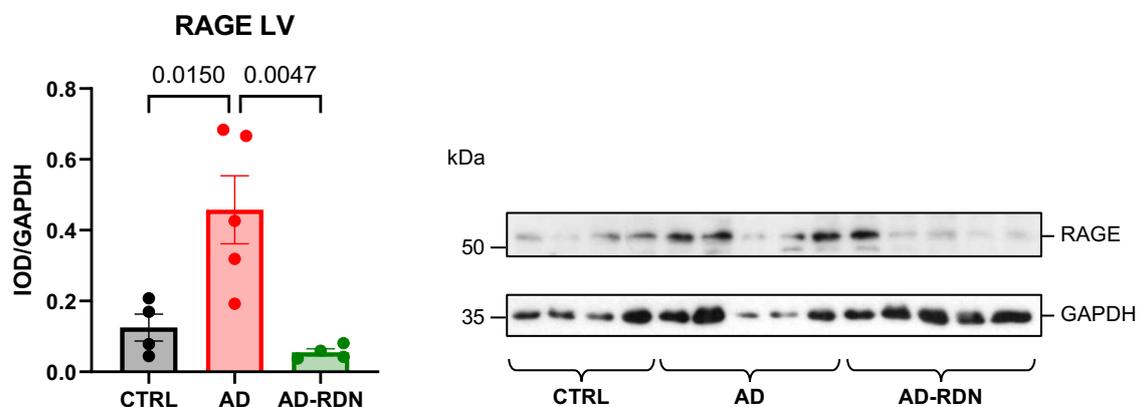
Es zeigt sich eine signifikante Korrelation der Plasmakonzentration von IS und dem Ausmaß der LVH. Korrelation nach Pearson.

## 4.4.5 Western Blot

### 4.4.5.1 RAGE, sRAGE und esRAGE

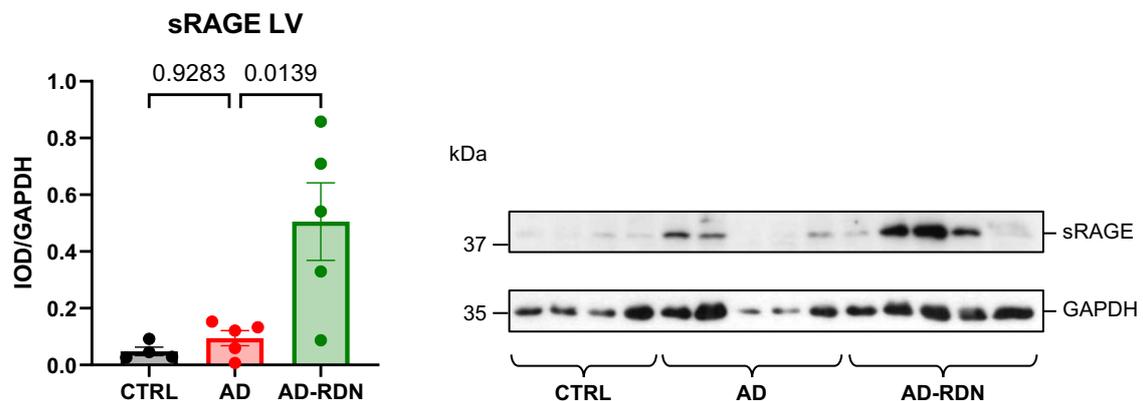
Die Expression von RAGE im LV war bei AD im Vergleich zu CTRL deutlich erhöht (+266 %,  $p = 0,015$ ). Nach renaler Denervation zeigte sich die RAGE-Expression wieder normalisiert (−88 % vs. AD,  $p = 0,0047$ ) (**Abbildung 51**).

sRAGE im LV war bei AD unverändert im Vergleich zu CTRL ( $p = 0,92$ ). Es zeigte sich jedoch bei AD-RDN eine deutlich erhöhte Expression von sRAGE (+433 % vs. AD,  $p = 0,0139$ ) (**Abbildung 52**).



**Abbildung 51: RAGE LV**

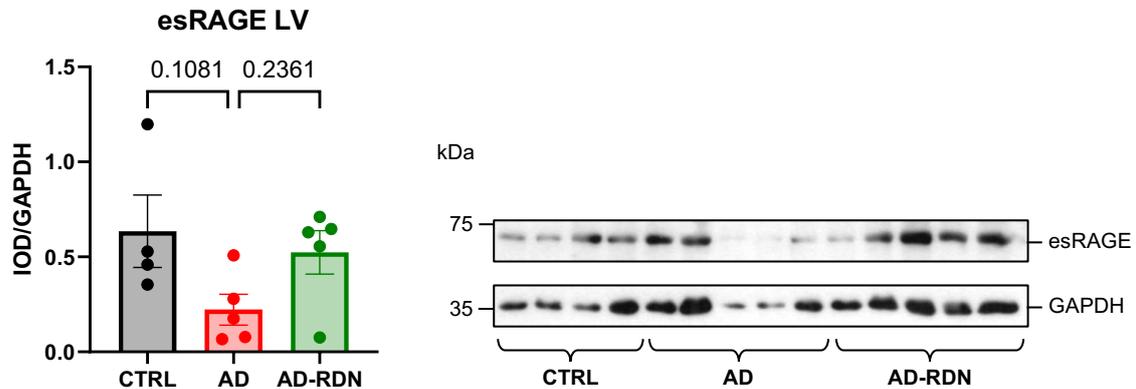
Die Expression von RAGE im LV ist bei AD signifikant erhöht (+266 % vs. CTRL). Nach RDN zeigt sich eine signifikante Abnahme von RAGE (−88 % vs. AD). Mittelwerte ± SEM, ANOVA mit Tukey's post-hoc-Test.



**Abbildung 52: sRAGE LV**

Die Expression von sRAGE im LV zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen AD und CTRL. Bei AD-RDN war die Expression jedoch erhöht (+433 % vs. AD). Mittelwerte ± SEM, ANOVA mit Tukey's post-hoc-Test.

Die Expression von esRAGE bei AD nimmt im Vergleich zu den Kontrollen nicht signifikant ab ( $-65\%$  vs. CTRL,  $p = 0,10$ ). Nach RDN nimmt die esRAGE-Expression im Vergleich zu AD etwas zu ( $+137\%$  vs. AD,  $p = 0,23$ ), jedoch ohne statistische Signifikanz (Abbildung 53).

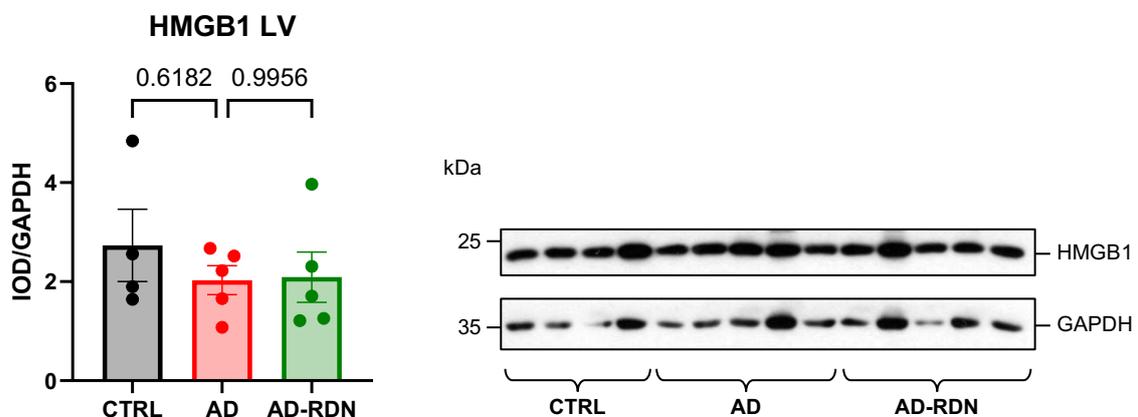


**Abbildung 53: esRAGE LV**

Die esRAGE-Expression ist bei AD nicht signifikant herunterreguliert ( $-65\%$  vs. CTRL). Nach RDN steigt die Expression wieder an ( $+137\%$  vs. AD), jedoch ohne statistische Signifikanz. Mittelwerte  $\pm$  SEM, ANOVA mit Tukey's post-hoc-Test.

#### 4.4.5.2 HMGB1

Es konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Expression von HMGB1 zwischen den verschiedenen Gruppen beobachtet werden (Abbildung 54).

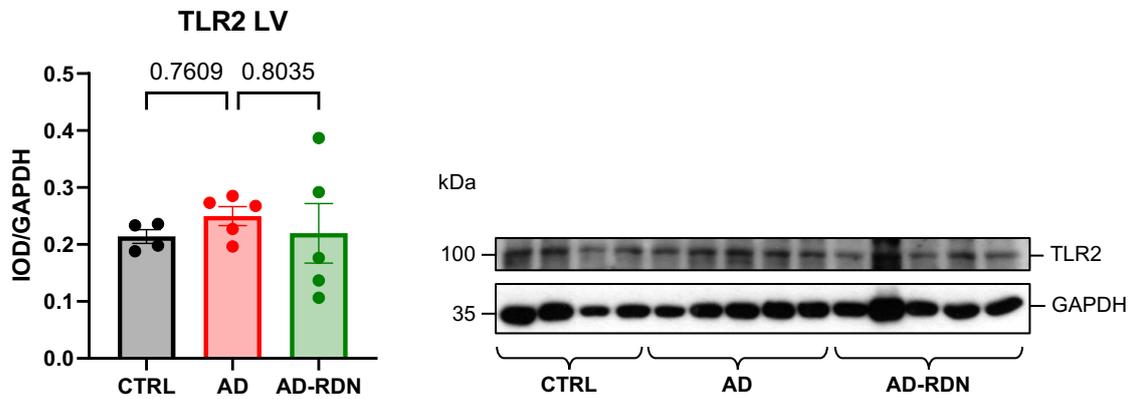


**Abbildung 54: HMGB1 LV**

Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Mittelwerte  $\pm$  SEM, ANOVA mit Tukey's post-hoc-Test.

#### 4.4.5.3 TLR2

Es konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Expression von TLR2 zwischen den verschiedenen Gruppen beobachtet werden (**Abbildung 55**).

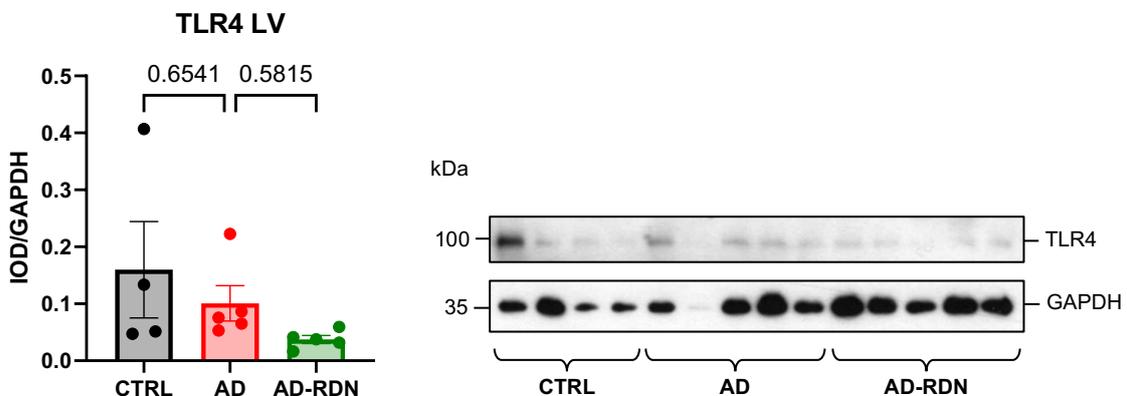


**Abbildung 55: TLR2 LV**

Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Mittelwerte  $\pm$  SEM, ANOVA mit Tukey's post-hoc-Test.

#### 4.4.5.4 TLR4

Es konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Expression von TLR2 zwischen den verschiedenen Gruppen beobachtet werden (**Abbildung 56**).



**Abbildung 56: TLR4 LV**

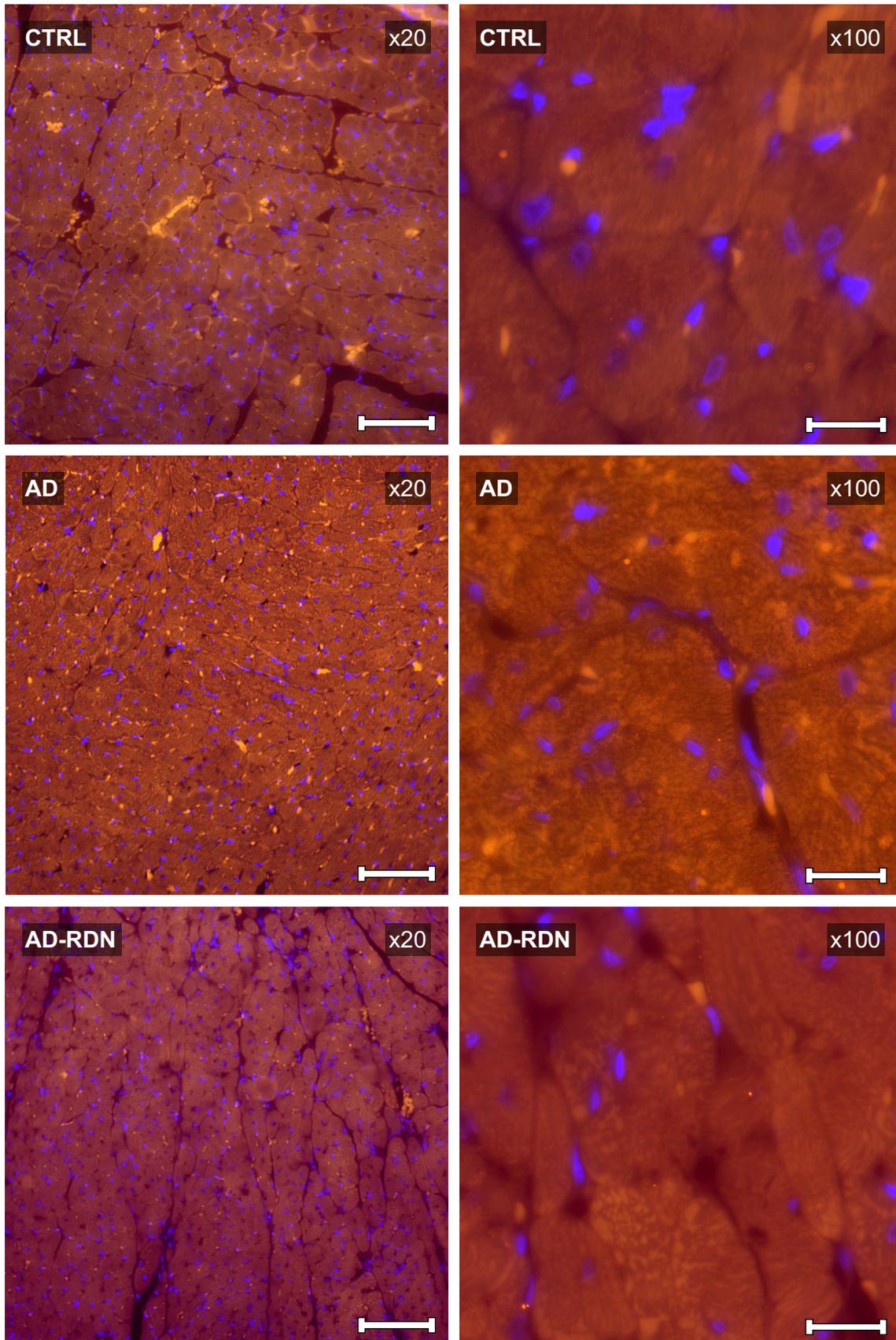
Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Mittelwerte  $\pm$  SEM, ANOVA mit Tukey's post-hoc-Test.

## 4.4.6 Immunfluoreszenzfärbung

### 4.4.6.1 RAGE

**Abbildung 57** zeigt repräsentative Ausschnitte des Myokards in einer Immunfluoreszenzfärbung gegen RAGE. Die stärkste Fluoreszenz konnte im Zytoplasma der Kardiomyozyten beobachtet werden, während die Plasmamembran der Kardiomyozyten nur stellenweise ein Fluoreszenzsignal aufwies. Interessanterweise zeigte sich auch in einigen Zellkernen eine Fluoreszenz.

Die RAGE-Expression ist bei AD im Vergleich zu CTRL deutlich heraufreguliert. Nach renaler Denervation ist die Expression im Vergleich zu AD etwas niedriger.



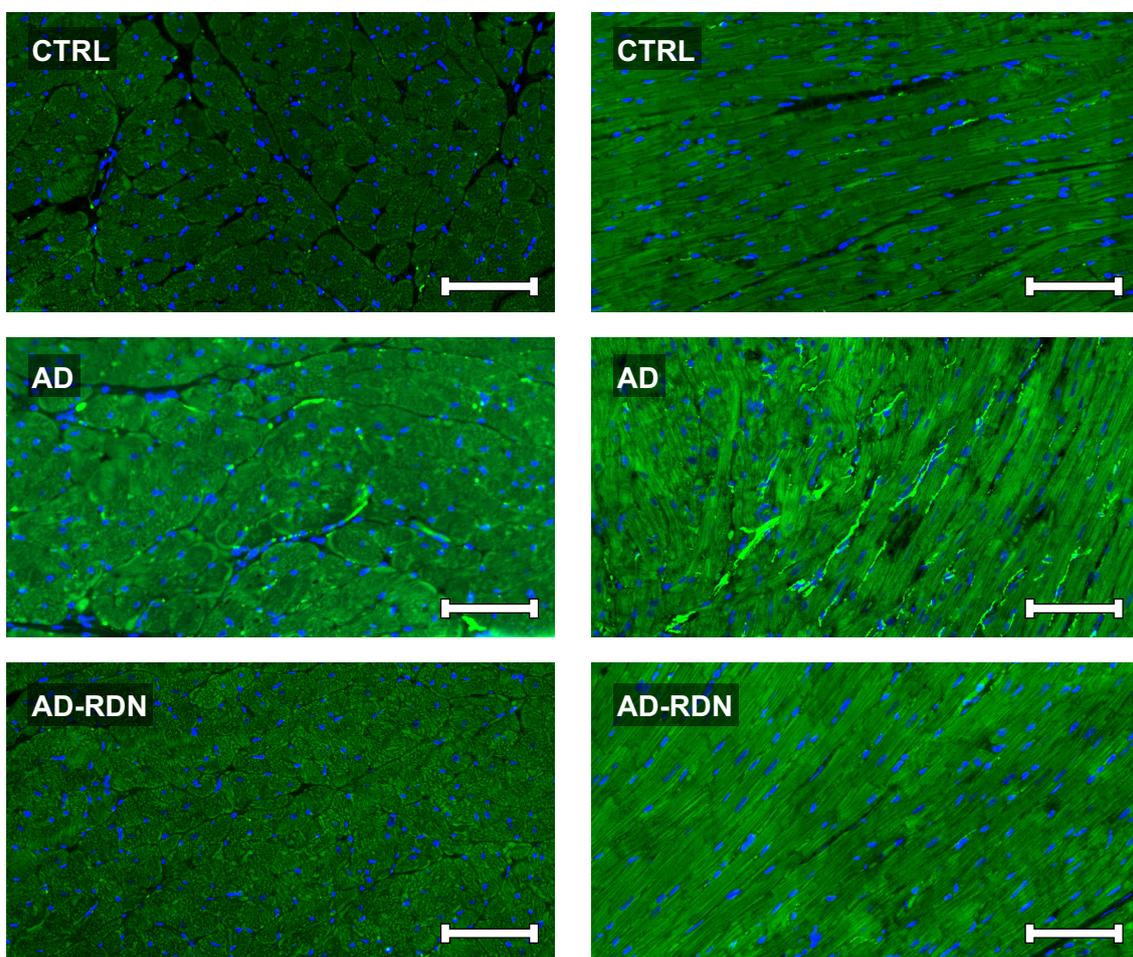
**Abbildung 57: Immunfluoreszenzfärbung RAGE Herz**

Die RAGE-Expression in Kardiomyozyten ist bei AD in stärkerem Maße hochreguliert als bei AD-RDN. Die Autofluoreszenz der Erythrozyten ist zu beachten. TRITC RAGE, DAPI Zellkerne. **Maßstab x20 100 µm, x100 20 µm.**

#### 4.4.6.2 Tyrosinhydroxylase

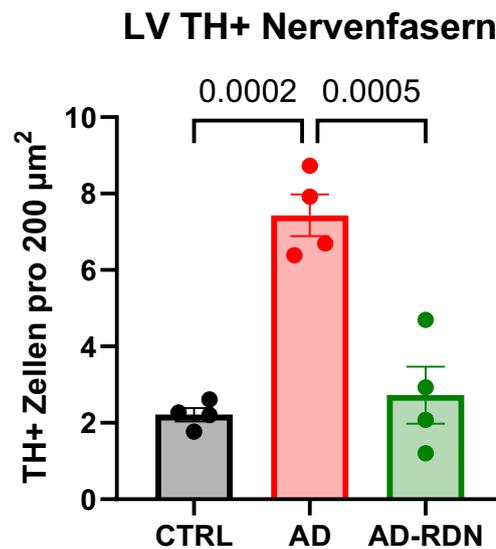
Im linksventrikulären Myokard zeigt sich bei AD eine deutliche Zunahme der TH-positiven Nervenfasern (**Abbildung 58**). Bei AD-RDN ist die Anzahl der TH-positiven Nervenfasern geringer als bei AD.

Die Quantifizierung (**Abbildung 59**) ergab eine Zunahme bei AD von +236 % im Vergleich zu den Kontrollen ( $p = 0,0002$ ). Nach RDN war die Expression um 63 % geringer ( $p = 0,0005$  vs. AD).



**Abbildung 58: Immunfluoreszenzfärbung TH Herz**

Die Anzahl TH-positiver Nervenfasern bei AD ist im Vergleich zu CTRL deutlich erhöht. Nach RDN zeigt sich eine Abnahme TH-positiver Nervenfasern. FITC TH, DAPI Zellkerne. **Maßstab 100  $\mu\text{m}$ .**



**Abbildung 59: TH-positive Nervenfasern im LV**

Bei AD ist die Anzahl TH-positiver Nervenfasern signifikant erhöht (+236 % vs. CTRL). Nach RDN normalisiert sich die Anzahl wieder (−63 % vs. AD). Mittelwerte ± SEM, ANOVA mit Tukey's post-hoc-Test.

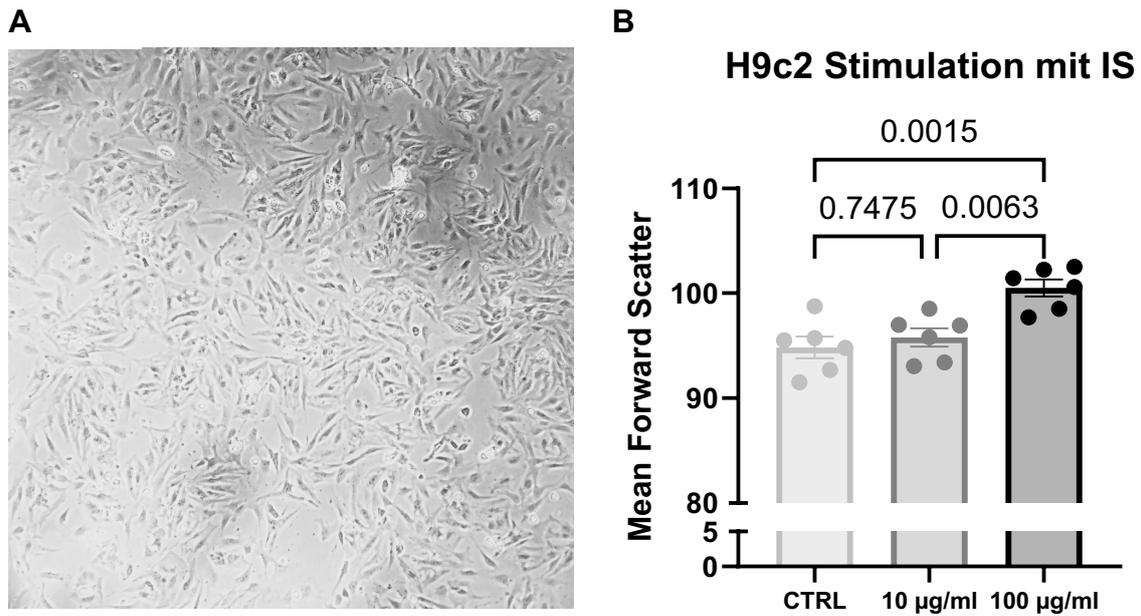
## 4.5 Zellkultur

### 4.5.1 H9c2-Stimulation mit Indoxylsulfat und sRAGE

Um einen hypertrophen Effekt von Indoxylsulfat nachzuweisen, wurden zunächst zwei verschiedene Konzentrationen von Indoxylsulfat (10 µg/ml und 100 µg/ml) getestet. 100 µg/ml entsprechen Plasmakonzentrationen, wie sie bei terminal niereninsuffizienten Patienten an der Hämodialyse gemessen werden können. **Abbildung 60 A** zeigt H9c2 in der Zellkulturschale.

Als Surrogat für die Zellgröße wurde der Mean Forward Scatter in der FACS-Analyse herangezogen. Bei 10 µg/ml zeigte sich eine numerische Vergrößerung der Zellen (+1 % vs. CTRL,  $p = 0,74$ ) ohne Signifikanz. Bei 100 µg/ml konnte eine signifikante Zunahme der Zellgröße beobachtet werden (+6 % vs. CTRL,  $p = 0,0015$ ) (**Abbildung 60 B**).

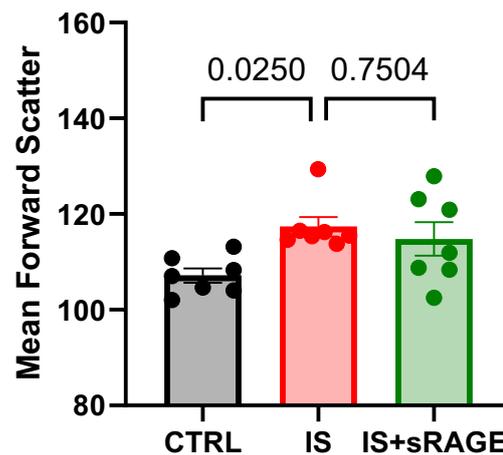
Um zu untersuchen, ob sRAGE eine Indoxylsulfat-induzierte Hypertrophie abmildern kann, wurde Zellen mit Indoxylsulfat (100 µg/ml) und sRAGE (5 ng/ml) stimuliert. Eine signifikante Hypertrophie bei Indoxylsulfat konnte auch hier nachgewiesen werden (+10 % vs. CTRL,  $p = 0,025$ ). Nach Stimulation mit sRAGE ergab sich jedoch kein signifikanter Unterschied (−1,8 % vs. IS,  $p = 0,75$ ) (**Abbildung 61**).



**Abbildung 60: H9c2 Stimulation mit Indoxylsulfat**

(A) H9c2 Zellen in der Zellkultur. (B) Bei 10 µg/ml zeigt sich kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe. Bei 100 µg/ml konnte eine signifikante Hypertrophie beobachtet werden. Mittelwerte  $\pm$  SEM, ANOVA mit Tukey's post-hoc-Test.

### H9c2 Stimulation mit IS und sRAGE



**Abbildung 61: H9c2 Stimulation mit IS und sRAGE**

Bei IS (100 µg/ml) zeigte sich eine signifikante Hypertrophie im Vergleich zu CTRL. Nach Behandlung mit sRAGE (5 ng/ml) ergab sich kein Unterschied. Mittelwerte  $\pm$  SEM, ANOVA mit Tukey's post-hoc-Test.

## 5 Diskussion

### 5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Diese Arbeit untersuchte die Auswirkungen einer chronischen Niereninsuffizienz auf myokardiale Hypertrophie und deren Modulation durch renale Denervation. Es interessierte hierbei insbesondere, inwiefern das Urämietoxin Indoxylsulfat und die Pattern Recognition Receptors RAGE, TLR4 und TLR2 eine Rolle spielen. Des Weiteren untersuchte die Studie Effekte der renalen Denervation auf funktionelle und strukturelle Nierenparameter. Zu Grunde liegt ein Tiermodell, bei dem Ratten eine Adenin-angereicherte Nahrung bekommen, um eine Niereninsuffizienz zu induzieren.

Das Adenin-Modell induzierte eine myokardiale Hypertrophie gemessen an der Myozytenquerschnittsfläche. Nach renaler Denervation zeigte sich eine signifikante Abnahme des Myozytenquerschnittes. Der systolische Blutdruck war bei AD tendenziell erhöht, jedoch ohne statistische Signifikanz. Bei AD-RDN zeigte der Blutdruck eine fallende Tendenz, aber auch hier war im Vergleich zu AD keine statistische Signifikanz beobachtet worden. In der Nierensonographie imponierten die Nieren bei AD und AD-RDN echodicht vergrößert im Vergleich zu den Kontrollen. Der RRI war bei AD erhöht und nahm nach renaler Denervation wieder ab. In der histologischen Nierenuntersuchung zeigte sich eine massive tubulointerstitielle Nephritis sowohl bei AD als auch bei AD-RDN. Das mittlere glomeruläre Kapillarovolumen und das Bowman-Kapsel-Volumen war bei AD und AD-RDN gleichermaßen vermindert. Die Glomerular Density war bei AD und AD-RDN signifikant vermindert verglichen mit Kontrollen, jedoch war der Verlust an Glomeruli bei AD-RDN signifikant geringer ausgeprägt als bei AD. Die Nierenretentionsparameter Kreatinin und Harnstoff waren erwartungsgemäß bei AD erhöht und nach renaler Denervation unverändert im Vergleich zu AD. Die Plasma-Konzentration von Indoxylsulfat war bei AD erhöht und bei RDN signifikant erniedrigt. Im Urin zeigte sich kein Unterschied zwischen AD und RDN, allerdings war in der Leber Indoxylsulfat nur bei AD erhöht, nicht jedoch bei RDN. In der Niere war die Expression der PRRs RAGE, TLR2 und TLR4 bei AD und RDN erhöht ohne signifikanten Unterschied zwischen AD und RDN.

## 5.2 Wahl des CKD-Tiermodells

In der tierexperimentellen Forschung existieren zahlreiche Modelle zur Untersuchung von Nierenschädigungen. Weil die meisten dieser Tiermodelle jedoch vereinfacht sind, spiegeln sie nicht die Komplexität und Individualität der CKD beim Menschen wider und führen nicht notwendigerweise zu CKD-assoziierten kardiovaskulären Erkrankungen.<sup>50</sup>

Neben operativen Methoden zur Induktion einer Nierenschädigung, wie beispielsweise einer subtotalen Nephrektomie oder unilateralen Ureterobstruktion, kann auch eine pharmakologische Induktion einer CKD erzielt werden. Hierfür eignet sich vor allem die Adenin-induzierte Nephropathie, die im Folgenden detailliert beschrieben wird.

### 5.2.1 0,25 %-Adenin-Modell der CKD

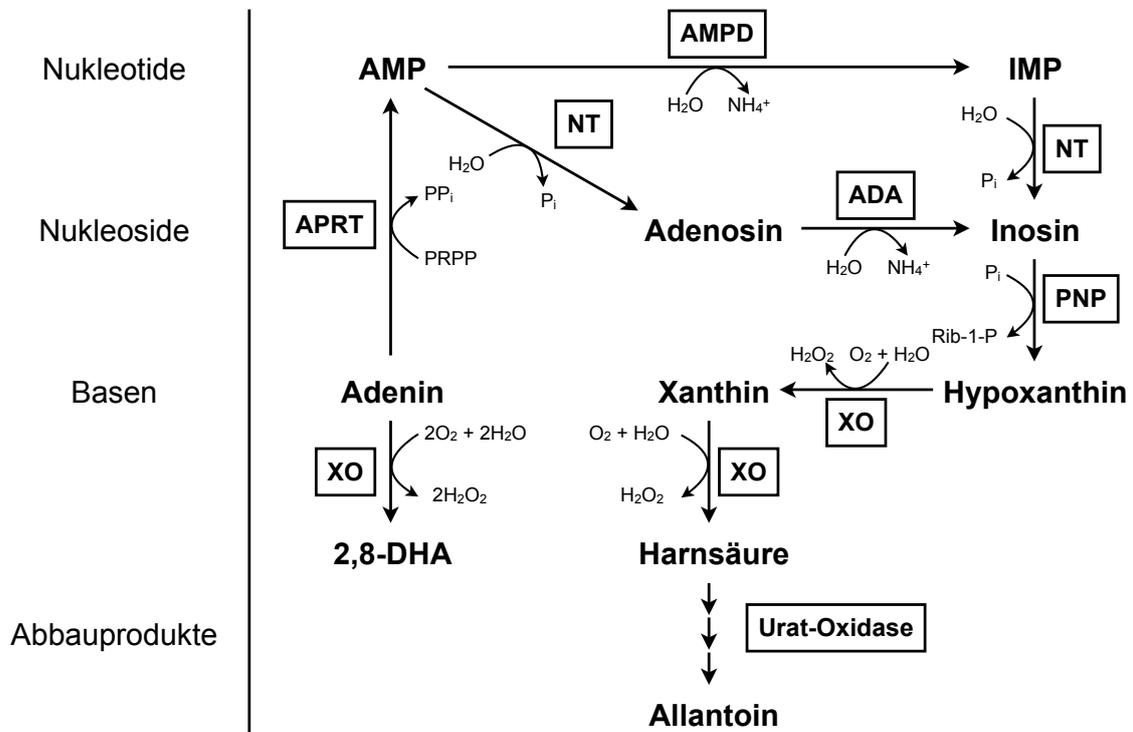
Das 0,25 %-Adenin-Tiermodell über 16 Wochen führt zu einer progredienten CKD und kardiovaskulären Komplikationen. Es bietet gegenüber den oben vorgestellten Methoden den Vorteil, dass es die Pathophysiologie der menschlichen CKD und ihre Auswirkungen auf das kardiovaskuläre System besser nachahmt.<sup>50</sup>

Um zu verstehen, warum eine Adenin-reiche Diät zu einer Nierenschädigung führt, muss zunächst der Stoffwechsel des Adenins betrachtet werden (**Abbildung 62**). Adenin ist neben Guanin die wichtigste Purinbase und wird nach oraler Gabe in hohem Maße resorbiert.<sup>78</sup> Um in den Stoffwechsel der Zellen aufgenommen zu werden, muss Adenin durch Katalyse der *Adenin-Phosphoribosyltransferase* (APRT) zu Adenosinmonophosphat (AMP) umgesetzt werden. Die APRT ist ein Enzym des sogenannten *Salvage-Pathways*, der für die Wiederverwertung der Base notwendig ist. AMP ist ein Nucleotid und kann entweder durch Desaminierung zu Inosinmonophosphat (IMP) oder durch hydrolytische Abspaltung des Phosphatrestes zu Adenosin umgewandelt werden. Analog hierzu wird IMP durch die Eliminierung des Phosphates und Adenosin durch Desaminierung in das Nucleosid Inosin umgesetzt. Durch phosphorolytische Entfernung der Ribose wird aus Inosin die freie Base Hypoxanthin freigesetzt. Hypoxanthin ist Substrat der *Xanthin-Oxidase* (XO), die es über den Zwischenschritt Xanthin zur Harnsäure oxidiert.

Neben der XO, welche molekularen Sauerstoff als Elektronenakzeptor verwendet und deshalb ROS produziert, existiert auch eine *Xanthin-Dehydrogenase* (XDH), die NAD<sup>+</sup> als Oxidationsmittel benutzt (in **Abbildung 62** nicht dargestellt). Unter physiologischen Bedingungen ist hauptsächlich die XDH aktiv, jedoch kann bei Ischämie die XDH –

vermutlich durch proteolytische Spaltung – in die XO überführt werden. Es wurde gezeigt, dass die XO eine wichtige Quelle freier Sauerstoffradikale beim Myokardinfarkt ist und ihre Hemmung einen therapeutischen Ansatz darstellt.<sup>29</sup>

Harnsäure ist ein schlecht wasserlöslicher Metabolit, der beim Menschen und höheren Primaten nicht weiter abgebaut werden kann. Dieser Umstand ist der Tatsache geschuldet, dass ebendiese Spezies ein Pseudogen für die Urat-Oxidase besitzen, das vor etwa 15 Mio. Jahren durch unabhängige Mutationen seine Funktion verloren hat.<sup>90,110</sup> Andere Säugetiere, darunter Ratten, exprimieren eine funktionsfähige Urat-Oxidase und sind daher in der Lage, die Harnsäure weiter abzubauen. Über einige Zwischenschritte entsteht das Endprodukt Allantoin. Allantoin ist besser wasserlöslich als Harnsäure und



**Abbildung 62: Metabolismus der Base Adenin**

Adenin ist eine Purinbase und kann durch Katalyse der APRT, einem Enzym des sogenannten Salvage Pathways, zum Nucleotid AMP umgesetzt werden. Über eine Desaminierung und hydrolytische Abspaltung eines anorganischen Phosphatrestes wird AMP zu Inosin abgebaut. Es folgt eine phosphorolytische Eliminierung der Ribose, sodass die freie Base Hypoxanthin entsteht. Dieser Metabolit wird durch die XO über einen Zwischenschritt zur Harnsäure oxidiert. In allen Säugetieren, außer höheren Primaten und dem Menschen, kann Harnsäure mithilfe der Urat-Oxidase in das besser wasserlösliche Allantoin umgesetzt werden. Bei einem Defekt der APRT oder einer hohen Zufuhr von Adenin kann auch ein alternativer Stoffwechselweg eingeschlagen werden. Die XO vermag neben Hypoxanthin/Xanthin auch Adenin als Substrat zu akzeptieren und an C2 und C8 zum 2,8-DHA zu oxidieren. *Anmerkung:* Die Xanthin-Dehydrogenase (XDH), ein Isoenzym der XO, verwendet  $\text{NAD}^+$  als Oxidationsmittel und produziert daher keine ROS. **ADA** Adenosin-Desaminase, **AMP** Adenosinmonophosphat, **AMPD** AMP-Desaminase, **APRT** Adenin-Phosphoribosyltransferase, **2,8-DHA** 2,8-Dihydroxyadenin, **IMP** Inosinmonophosphat, **NT** Nucleotidase, **P<sub>i</sub>** Phosphat, **PNP** Purin-nucleosid-Phosphorylase, **PP<sub>i</sub>** Pyrophosphat, **PRPP** Phosphoribosylpyrophosphat, **XO** Xanthin-Oxidase

wird renal ausgeschieden. Die Serum-Harnsäurekonzentration ist bei Spezies ohne funktionierende Urat-Oxidase 3–10 mal höher als bei Spezies mit funktionsfähiger Urat-Oxidase,<sup>110</sup> weshalb letztere nicht von Gicht oder Urat-Nephrolithiasis betroffen sind.<sup>162</sup>

Neben dem „klassischen“ Abbau der Purine zu Harnsäure bzw. Allantoin existiert ein alternativer Stoffwechselweg. Bei einer autosomal-rezessiven vererbten Defizienz der APRT kann Adenin nicht wiederverwertet werden. Der schwer wasserlösliche Metabolit 2,8-DHA akkumuliert und führt zu 2,8-DHA-Nephrolithiasis und Nierenversagen.<sup>9</sup> In diesem Fall wird Adenin als Alternativsubstrat von der XO akzeptiert und an zwei Kohlenstoffatomen zum 2,8-DHA oxidiert.<sup>17</sup> Auch bei sehr hoher exogener Zufuhr von Adenin entsteht 2,8-DHA, wahrscheinlich durch APRT-Insuffizienz bei hohen Substratkonzentrationen.<sup>106</sup>

Diwan et al.<sup>48</sup> entwickelten das 0,25 %-Adenin-Modell basierend auf einem ursprünglichen 0,75 %-Adenin-Modell.<sup>232</sup> In einer tierexperimentellen Studie wurde gezeigt, inwiefern sich verschiedene Konzentrationen von Adenin in der Nahrung (0,075 %, 0,25 %, 0,5 % und 0,75 %) über 16 Wochen auf die Niere und das kardiovaskuläre System von Ratten auswirkte. Zusätzlich wurde eine 0,25 %-Adenin-Gruppe mit Allopurinol, einem Xanthin-Oxidase-Inhibitor, behandelt, um den Einfluss von Harnsäure in der Pathogenese zu ermitteln. Weil die Progression der Nierenerkrankung bei 0,5 %- und 0,75 %-Adenin-Diät zu rapide war, mussten die Tiere nach 8 Wochen (0,5 % Adenin) bzw. 6 Wochen (0,75 % Adenin) euthanasiert werden. Im Gegensatz dazu führte die 0,25 %-Adenin-Diät zu einer ausreichenden Nierenschädigung, die langsam genug fortschritt, um den Verlauf der menschlichen CKD zu imitieren.<sup>50</sup> 16 Wochen bei der Ratte entsprechen etwa 8 Jahre beim Menschen.<sup>180</sup>

Laborchemische Veränderungen waren erhöhtes Serum-Kreatinin, Serum-Harnstoff sowie eine erhöhte Serum-Kaliumkonzentration und LDH. Ferner war die Kreatinin- und Harnstoffkonzentration im Urin erniedrigt. Die Ratten entwickelten außerdem eine Proteinurie.<sup>48</sup>

Histopathologisch zeigten sich eine tubuläre Atrophie, Abflachung des proximalen Tubulusepithels, fokale tubuläre Epithelhypertrophie sowie eine Glomerulopathie im Sinne einer Glomerulosklerose und -hypertrophie. Eine Podozytenschädigung konnte durch erhöhte Expression von Desmin und TGF- $\beta$  nachgewiesen werden. Der Glomeruluschaden ist wahrscheinlich sekundärer Natur und entwickelt sich auf dem Boden der tubulären Obstruktion. Infiltrate inflammatorischer Zellen gingen einher mit verstärkter Expression von TNF- $\alpha$ , IL-6 sowie HO-1, einem Biomarker für oxidativen Stress. Ferner

konnte in der Niere eine vermehrte Kollagen-Ablagerung und Apoptose, gemessen an der Expression von Caspase-3, festgestellt werden.<sup>50</sup>

Das 0,25 %-Adenin-Modell führt auch zu kardiovaskulären Veränderungen. Ab vier Wochen war ein Anstieg des systolischen Blutdruckes beobachtet worden und nach 16 Wochen zeigte sich eine LV-Hypertrophie. Der LVESD und LVEDD sowie das LVESV und LVEDV waren vermindert. Interstitielle und perivaskuläre Inflammation und Fibrose führten zu einer erhöhten Steifigkeit des LV. Außerdem reagierte die Aorta mit einer beeinträchtigten Kontraktion und Relaxation auf externe Stimuli.<sup>48</sup>

Eine detaillierte Beschreibung der 2,8-DHA-Nephropathie bietet eine Übersichtsarbeit, in der auf die Pathophysiologie auf zellulärer und molekularer Ebene eingegangen wird.<sup>105</sup> Von großer Bedeutung für die Pathogenese der CKD sind Kristallablagerungen im tubulären Lumen. Verschiedene Untersuchungen legen nahe, dass es sich bei diesen Kristallen um 2,8-Dihydroxyadenin-Ablagerungen (2,8-DHA) handelt.<sup>17,106,184</sup> 2,8-DHA ist im Plasma an Proteine gebunden, im Urin jedoch bei physiologischem pH nicht lösbar<sup>210</sup> und präzipitiert deshalb. Es wurde gezeigt, dass Allopurinol, ein Xanthin-Oxidase-Inhibitor, die schädlichen Auswirkungen des Adenins auf die Niere und das kardiovaskuläre System abmildert.<sup>48</sup> Daraus wurde abgeleitet, dass hauptsächlich die erhöhte Harnsäure für die Schäden verantwortlich ist. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung gestützt, dass die durch Hyperurikämie induzierte Nierenerkrankung bei Ratten weiter fortschreitet, obwohl keine Kristalle in der Niere zu finden sind.<sup>93</sup> Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu der Annahme, dass Urat-Kristalle – analog zur Pathogenese der Gicht – die Urat-Nephropathie verursachen.<sup>90</sup> Viele Untersuchungen belegen jedoch, dass Hyperurikämie per se nierenschädigend ist. Urat ist in der Lage, endotheliale und mitochondriale Dysfunktion zu induzieren<sup>165</sup> und führt zur Freisetzung von HMGB1 aus Endothelzellen, wodurch wiederum TLR aktiviert werden.<sup>160</sup> Weitere pathophysiologische Auswirkungen von Harnsäure sind eine Aktivierung des RAAS sowie die Induktion von oxidativem Stress<sup>36</sup> und renaler Inflammation durch Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges in Tubulusepithelzellen.<sup>240</sup>

Eine Therapie mit Allopurinol hemmt jedoch nicht nur die Bildung von Harnsäure, sondern auch die von 2,8-DHA. Insofern kann die Nephrotoxizität des Adenin-Modells nicht gänzlich der Harnsäure attribuiert werden, sondern die 2,8-DHA-Präzipitation in den Tubuli spielt ebenfalls eine wichtige Rolle, indem sie eine obstruktive Nephropathie verursacht.

## 5.3 Herz

### 5.3.1 Kardiale Hypertrophie und Blutdruck

Die Bestimmung der kardialen Hypertrophie erfolgte durch histologische Messung der Myozytenquerschnittsfläche sowie echokardiographisch und durch die Auswertung der MRT-Aufnahmen. Es zeigte sich bei AD eine signifikante Vergrößerung der Myozytenquerschnittsfläche im LV und eine Verdickung der LV-Wanddicken im Vergleich zu den Kontrollen. Bei AD-RDN nahmen die Parameter ab. Hinsichtlich der diastolischen Funktion zeigte sich bei AD ein erhöhtes E/A-Verhältnis, was auf eine niedrigere Compliance und erhöhte Füllungsdrücke des LV hinweist. Nach RDN nahm E/A signifikant ab. Der systolische Blutdruck war bei AD numerisch erhöht im Vergleich zu den Kontrollen ohne statistische Signifikanz. Bei AD-RDN zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied zu AD.

#### 5.3.1.1 Kardiovaskuläres Risiko bei CKD

Traditionelle kardiovaskuläre Risikofaktoren erhöhen die Wahrscheinlichkeit einer CKD. Insofern ist es nicht erstaunlich, dass niereninsuffiziente Patienten ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko aufweisen (**Abbildung 63**). Es zeigt sich jedoch, dass auch nach Adjustierung für traditionelle Risikofaktoren die Niereninsuffizienz an und für sich einen unabhängigen Risikofaktor darstellt. Neben den klassischen Risikofaktoren Alter, Geschlecht, Hypertonie, Diabetes mellitus und Rauchen tragen nicht-traditionelle Risikofaktoren und Niereninsuffizienz-spezifische Faktoren synergistisch zum Gesamtrisiko bei.<sup>40</sup> CKD-Patienten können eine sogenannte urämische Kardiomyopathie entwickeln, die hauptsächlich durch eine linksventrikuläre Hypertrophie und Fibrose gekennzeichnet ist. Diese Kardiomyopathie ist multifaktoriell bedingt, wobei Urämietoxine, Anämie, Oxidativer Stress, Inflammation und Hormone des Calcium-Phosphat-Stoffwechsels eine Rolle spielen.<sup>40</sup> Die linksventrikuläre Hypertrophie ist insofern problematisch, als sie die Mortalität erheblich erhöht und somit die Prognose verschlechtert.<sup>150,242</sup> Therapeutische Maßnahmen zur Reduktion der linksventrikulären Masse sind also erforderlich, um die Überlebenschancen dieser Patienten zu erhöhen.

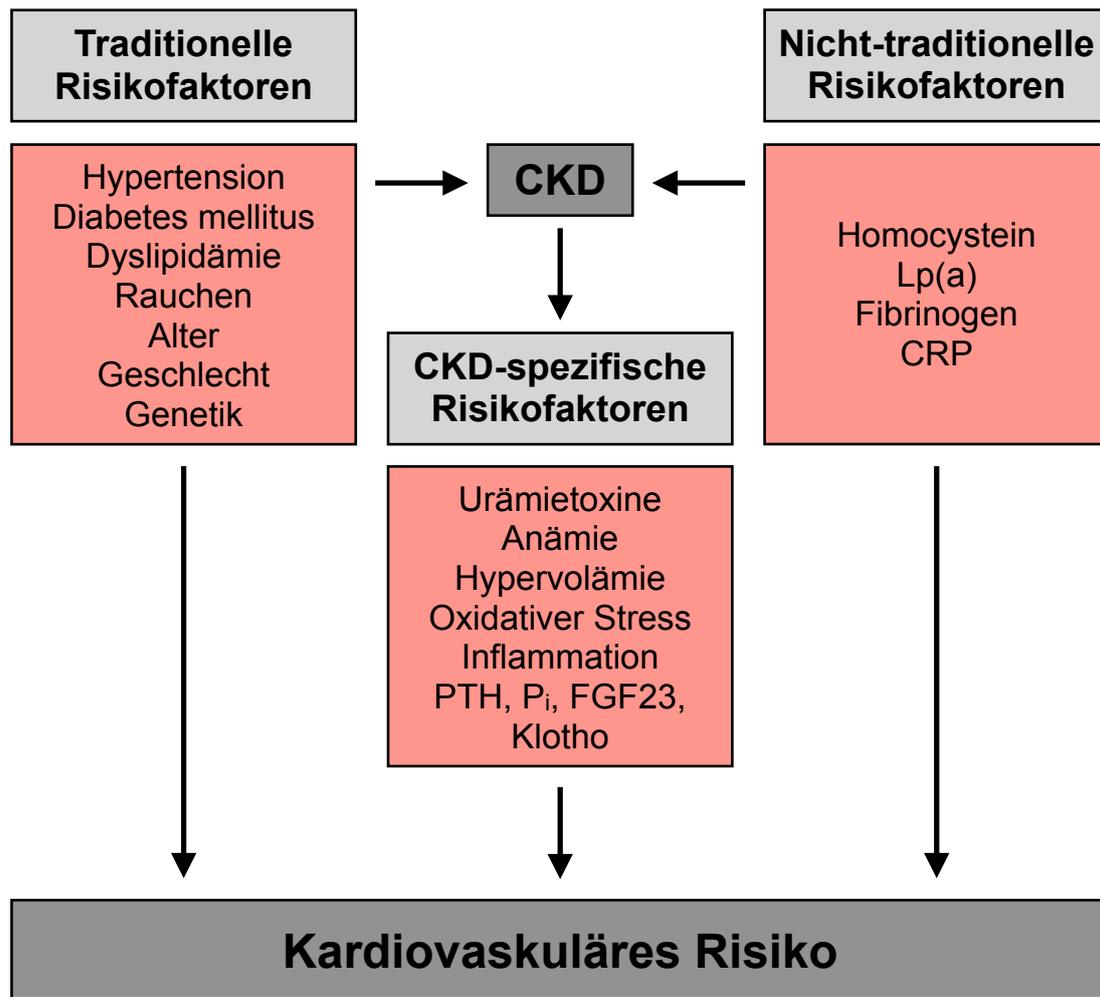


Abbildung 63: Kardiovaskuläres Risiko bei Niereninsuffizienz

### 5.3.1.2 Urämische Kardiomyopathie – Neue Behandlungsansätze

Eine effektive Behandlung der urämischen Kardiomyopathie ist essentiell, um das kardiovaskuläre Risiko chronisch nierenkranker Patienten zu minimieren. Bisherige konventionelle Therapieoptionen zielen vorwiegend auf die Kontrolle traditioneller Risikofaktoren ab, allen voran die Einstellung eines adäquaten arteriellen Blutdrucks.<sup>116</sup> Für Urämie-spezifische gezielte Maßnahmen zur Reduktion der linksventrikulären Hypertrophie sowie zur Reduktion kardiovaskulärer Endpunkte konnte indes keine eindeutige Evidenz in klinischen Studien nachgewiesen werden.<sup>116</sup> Mit zunehmendem Verständnis pathophysiologischer Prozesse der urämischen Kardiomyopathie ist es hingegen gelungen, einige vielversprechende Ansatzpunkte zur spezifischen Therapie zu identifizieren.

Eine bedeutende Säule in der Genese der Kardiomyopathie sind Störungen der Calcium-Phosphat-Homöostase, deren Modulation sich verschiedene Studien gewidmet

haben.<sup>115</sup> CKD-Patienten können aufgrund eines Vitamin-D-Mangel-Zustandes und einer Hypocalciämie einen sekundären Hyperparathyreoidismus (sHPT) entwickeln. Die Therapie mit Cinacalcet, einem Modulator des calciumsensitiven Rezeptors, führt bei Hämodialyse-Patienten mit sHPT zur Reduktion der linksventrikulären Masse und verbessert die diastolische Pumpfunktion gemessen am E/E'-Verhältnis.<sup>34</sup> Ein zentrales Hormon der Phosphat-Regulation ist der FGF23, der die renale Phosphatausscheidung verstärkt. CKD-Patienten retinieren Phosphat und weisen eine kompensatorisch erhöhte FGF23-Konzentration auf, die jedoch kardiotoxische Auswirkungen hat. An isolierten Kardiomyozyten hemmt die Blockade des FGFR4, einem Rezeptor für FGF23, die Entwicklung einer FGF23-induzierten Hypertrophie.<sup>70</sup> In derselben Studie konnte gezeigt werden, dass die Blockade dieses Rezeptors auch in vivo bei 5/6-nephrektomierten Ratten die Ausbildung der linksventrikulären Hypertrophie abschwächt.<sup>70</sup> Darüber hinaus hat die Therapie von urämischen Ratten mit Vitamin D anti-hypertrophe Effekte, welche über die FGF23/FGFR4-Achse vermittelt werden.<sup>117</sup> Zuletzt führt die Gabe des Proteins Klotho, das membrangebunden als Co-Rezeptor für FGF23 fungiert und als lösliche Form im Blut zirkuliert, zu einer Hemmung der kardialen Hypertrophie bei urämischen Mäusen.<sup>117</sup>

Urämietoxine bilden eine weitere wichtige Säule bei der Entstehung der urämischen Kardiomyopathie. Insofern erscheint es sinnvoll, Therapien zur Reduktion zirkulierender Urämietoxine zu entwickeln. Viele Urämietoxine wie Indoxylsulfat entstehen aus Vorläufermolekülen der Verdauung und sind stark proteingebunden, weshalb sie sich einer effektiven Eliminierung durch Hämodialyse entziehen. Deshalb wurden Strategien zur Reduktion der enteralen Bildung respektive Resorption entwickelt. AST-120 ist ein Kohlebasiertes orales Adsorbens, das unspezifisch Urämietoxine und seine Vorläufer bindet und mit den Faeces ausscheidet. In einem Rattenmodell der chronischen Niereninsuffizienz vermag die Gabe von AST-120 der Entstehung einer linksventrikulären Hypertrophie und Fibrose entgegenzuwirken, indem es myokardialen oxidativen Stress vermindert.<sup>65</sup> Des Weiteren führt Indoxylsulfat zu einer Störung der epithelialen Darmbarriere und kann somit die Resorption von Indol weiter aggravieren.<sup>82</sup> AST-120 stellt die Darmbarriere teilweise wieder her und könnte womöglich kardiovaskuläre Komplikationen, die auf einer urämischen Enteropathie beruhen, abmildern.<sup>82</sup> Es existieren einige klinische Studien, die eine prognostische Wirkung von AST-120 untersucht haben. In einer retrospektiven Studie mit CKD-Patienten führt die Langzeittherapie mit AST-120 zu einer Reduktion renaler Endpunkte (Erreichen der Dialysepflichtigkeit) und kardialer Ereignisse.<sup>169</sup> Bei Patienten mit CHF und begleitender CKD konnte AST-120 die systolische

und diastolische Funktion verbessern.<sup>86</sup> In prospektiven Studien bei CKD-Patienten führte die Gabe von AST-120 zusätzlich zur Standardtherapie jedoch nicht zu einer Verlangsamung der CKD-Progression.<sup>28,175</sup> Die Autoren vermuten, dass möglicherweise Patienten mit zu fortgeschrittener CKD eingeschlossen wurden, sodass AST-120 seinen Endpunkt verfehlt hat. Insgesamt ergibt sich für AST-120 keine klare Evidenz bezüglich des kardiovaskulären und renalen Outcomes.

Weitere interessante Ansätze zur Reduktion der Urämie zielen auf die Modifikation des Mikrobioms ab. Diätetische Maßnahmen und Probiotika können die Darmflora verändern und die Menge zirkulierender Toxine verringern, allerdings ist auch hier die klinische Evidenz dieser Interventionen limitiert.<sup>193</sup> Des Weiteren sind anti-inflammatorische Strategien zur Therapie der urämischen Kardiomyopathie in Erprobung. Eine Placebo-kontrollierte Phase-II-Studie untersucht die Sicherheit und Effektivität einer Therapie mit Colchicin bei urämischer Kardiomyopathie (ClinicalTrials.gov identifier: NCT04500665).

### **5.3.1.3 Urämische Kardiomyopathie – Rolle der renalen Denervation**

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass im Adenin-Rattenmodell eine linksventrikuläre Hypertrophie induziert wird. In Übereinstimmung damit konnten vorherige Studien am gleichen Tiermodell ebenso eine linksventrikuläre Hypertrophie nachweisen.<sup>48,49,97,183</sup> Die renale Denervation vermag diese Hypertrophie im Adenin-Modell etwas abzumildern. Es gibt zahlreiche Evidenz dafür, dass die renale Denervation anti-hypertrophe Eigenschaften besitzt. Tierexperimentelle Studien mit SH-Ratten haben eine Reduktion der linksventrikulären Hypertrophie nach renaler Denervation nachgewiesen, wobei anti-inflammatorische Effekte via Herunterregulation von kardialem TLR4,<sup>88</sup> eine Hemmung des Raf/MEK/ERK-Signalweges<sup>222</sup> und eine Modulation der Autophagie<sup>81</sup> beobachtet wurden. Die Reduktion der kardialen Hypertrophie ist sogar stärker ausgeprägt als bei medikamentöser ACE-Inhibition.<sup>47</sup> Bei Dahl-Salz-sensitiven hypertensiven Ratten führt die renale Denervation Blutdruck-unabhängig zu einer Reduktion der linksventrikulären Masse, deren Ausmaß mit einer medikamentösen  $\beta$ -Blockade vergleichbar ist.<sup>214</sup> Studien am Menschen ergaben ähnliche Resultate. So konnte bei nierentransplantierten Patienten nach bilateraler nativer Nephrektomie, die im Wesentlichen einer totalen renalen Denervation entspricht, eine Reduktion der linksventrikulären Hypertrophie nachgewiesen werden.<sup>25,149</sup> Bei Patienten mit unkontrollierter arterieller Hypertonie reduziert die renale Denervation ebenfalls die linksventrikuläre Masse und verbessert die diastolische Funktion teilweise unabhängig von Änderungen des Blutdrucks.<sup>134,173</sup> Die Autoren

vermuten, dass eine Hemmung des zentralen Sympathikotonus und eine damit einhergehende verminderte Stimulation kardialer AR zu dieser Blutdruck-unabhängigen Reduktion der linksventrikulären Hypertrophie beigetragen haben.

Da kein signifikanter Blutdruckunterschied zwischen den Gruppen beobachtet wurde, scheint die Kardiomyozytenhypertrophie auch von anderen Parametern als dem Blutdruck abhängig zu sein. Die bei CKD häufig anzutreffende Aktivierung des sympathischen Nervensystems und die Erhöhung zirkulierender Katecholamine können über Stimulation kardialer AR zu einer Hypertrophie führen. Darüber hinaus spielen bei Niereninsuffizienz Urämietoxine eine wichtige Rolle, wobei dem Indoxylsulfat eine zentrale Bedeutung zukommt. Es existieren zahlreiche Studien, die die pro-hypertrophe Wirkung von Indoxylsulfat sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* demonstriert haben. In Einklang damit war die Plasma-Konzentration von Indoxylsulfat bei AD erhöht und nach renaler Denervation wieder etwas vermindert. Dieser Effekt der renalen Denervation ist in der bisherigen Literatur nicht beschrieben worden und liefert somit einen neuen Erklärungsansatz der Blutdruck-unabhängigen anti-hypertrophen Wirkungen der renalen Denervation.

### 5.3.2 Proteinexpression

Diese Studie untersuchte den Einfluss der renalen Denervation auf die Expression von Pattern-Recognition-Rezeptors im Myokard in einem Rattenmodell der CKD. Kardiales RAGE war bei Niereninsuffizienz hochreguliert, während seine lösliche Form sRAGE vermindert war. Nach renaler Denervation zeigte sich eine Umkehrung dieser sRAGE/RAGE-Dysbalance zugunsten einer erhöhten sRAGE-Expression. Bezüglich der beiden PRRs TLR2 und TLR4 konnte kein Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden. Der Ligand HMGB1 zeigte im Myokard ebenfalls keine Regulation.

PRRs sind zumeist membranständige Rezeptoren, die eine zentrale Rolle bei der Erkennung von PAMPs und DAMPs spielen. Zellen des angeborenen Immunsystems wie Makrophagen exprimieren PRRs und werden somit in die Lage versetzt, körperfremde Moleküle wie beispielsweise das von gram-negativen Bakterien freigesetzte LPS zu identifizieren. Nach Ligandenbindung wird eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang gesetzt, die schlussendlich eine proinflammatorische Antwort auslöst. Die Sezernierung von Zytokinen und Aktivierung von Immunzellen dient der Abwehr mikrobieller Invasoren.

Nachdem die essentielle Rolle der PRRs bei der Beseitigung körperfremder Strukturen aufgeklärt wurde, rückte das Interesse der Forschung hin zur Beteiligung dieser Rezeptoren bei körpereigenen pathophysiologischen Prozessen. Es zeigte sich, dass PRRs durch zahlreiche endogene Liganden aktiviert werden und eine sogenannte sterile Inflammation induzieren. Eine dauerhafte und inadäquate Immunreaktion schädigt Organe und trägt zum Progress relevanter Krankheitsentitäten wie der CKD oder der Arteriosklerose bei. Um die Prognose dieser Patienten zu verbessern, könnten Interventionen sinnvoll sein, die auf die Aktivität der PRRs abzielen.

### 5.3.2.1 PRRs – Relevanz bei kardialem Remodelling

Neben Zellen des Immunsystems werden die Pattern Recognition Receptors RAGE,<sup>54</sup> TLR2<sup>101</sup> und TLR4<sup>63</sup> auch in Kardiomyozyten exprimiert. TLR4 ist dabei der häufigste und am besten untersuchte kardiale TLR.<sup>101</sup> In verschiedenen Studien konnte eine Beteiligung der Rezeptoren sowie ihres Liganden HMGB1 bei myokardialen Umbauprozessen, dem sogenannten Remodelling, nachgewiesen werden.

RAGE ist mit kardialen Pathologien wie Hypertrophie und Fibrose assoziiert, während seine lösliche Form sRAGE protektive Eigenschaften besitzt. sRAGE entsteht durch proteolytische Abspaltung der extrazellulären Domäne von RAGE, die durch die Proteasen ADAM10 und MMP9 katalysiert wird.<sup>238</sup> Nach gegenwärtigem Forschungsstand fungiert sRAGE als Decoy-Rezeptor, der RAGE-Liganden abfängt und eine Bindung an membranständiges RAGE verhindert. Bei Mäusen führt eine Nachlasterhöhung durch *transverse aortic constriction* (TAC) zu einer Hochregulation von RAGE im Herzen.<sup>128</sup> Eine Behandlung der Mäuse mit sRAGE reduziert das Ausmaß des kardialen Remodelling (Hypertrophie und Fibrose) und verbessert die Pumpfunktion, indem oxidativer Stress und Inflammation vermindert werden.<sup>128</sup> Auch bei RAGE-Knockout-Mäusen konnte ein protektiver Effekt bei Nachlasterhöhung beobachtet werden, wobei die Regulation der Autophagie eine Rolle zu spielen scheint.<sup>68,124</sup> Mechanischer Stress an Kardiomyozyten führt zu einer verstärkten Expression von RAGE und TLR4 sowie zu einer Hypertrophie, die durch Bindung von HMGB1 an RAGE verstärkt wird.<sup>239</sup> Zirkulierendes HMGB1 steht zudem in unmittelbarem Zusammenhang zur Infarktgröße und Pumpfunktion nach Myokardinfarkt.<sup>54</sup> Des Weiteren hat HMGB1 negativ inotrope Eigenschaften, die auf eine Aktivierung von RAGE und TLR4 zurückzuführen ist.<sup>202</sup> In-vitro-Studien an H9c2 Zellen legen nahe, dass RAGE an der Entstehung der AT-II-induzierten Hypertrophie beteiligt ist, während sRAGE die Hypertrophie vermindert.<sup>125</sup> Darüber hinaus reduziert sRAGE den

Ischämie-Reperfusionsschaden durch Hemmung der Apoptose von Kardiomyozyten<sup>237</sup> und wirkt einer altersbedingten kardialen Fibrose entgegen.<sup>170</sup>

Neben RAGE wird auch TLR4 mit kardialer Hypertrophie und Inflammation in Verbindung gebracht. Eine gute Zusammenfassung der Erkenntnisse bezüglich TLR4 bietet eine Übersichtsarbeit.<sup>224</sup> Bei TAC-Mäusen kann die Hemmung von TLR4 mit Eritoran die Hypertrophie abmildern und die myokardiale Konzentration der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-6 reduzieren, wobei die Autoren eine Aktivierung von TLR4 durch die Bindung von Fibrinogen vermuten.<sup>55</sup> Die TLR2-Expression war durch die Nachlast-erhöhung jedoch nicht reguliert. In einer anderen Studie mit TLR2-Knockout-Mäusen wurde jedoch gezeigt, dass die TLR2-Defizienz zu einer Verbesserung des kardialen Remodelling bei chronischer Nachlast-erhöhung führt.<sup>101</sup> Die Autoren stellen die Hypothese auf, dass TLR4 und TLR2 additiv zum nachteiligen Remodelling beitragen und somit therapeutische Ziele darstellen. Eine Studie mit TLR2-Knockout-Mäusen hat die Interaktion des extrazellulär freigesetzten Hitzeschockproteins HSP70 mit TLR2 als essentiellen Prozess bei der adaptiven Hypertrophie bei Nachlast-erhöhung identifiziert.<sup>77</sup> Darüber hinaus trägt die myokardiale TLR4-Aktivierung durch HMGB1 zum Ischämie-Reperfusionsschaden und zur vaskulären Kalzifikation bei.<sup>143,236</sup> Im Tiermodell der AT-II-induzierten Hypertrophie ist sowohl TLR4 als auch TLR2 involviert, da ein Knock-out dieser Proteine zu einer Verminderung der kardialen Hypertrophie führt, teilweise sogar unabhängig vom Blutdruck.<sup>137,230</sup> Untersuchungen an H9c2-Zellen haben demonstriert, dass AT-II die Komplexbildung von TLR2-MyD88 fördert und die Hemmung von TLR2 mittels siRNA die Surrogat-Parameter für Hypertrophie, Fibrose und Inflammation reduziert.<sup>230</sup> Auch eine  $\beta$ -adrenerge Stimulation mit Isoproterenol ruft eine kardiale Hypertrophie hervor, wobei TLR4 im Myokard hochreguliert und mit ROS und mitochondrialer Dysfunktion assoziiert ist.<sup>98</sup> Die pathologischen Veränderungen konnten durch Blockade des TLR4 abgeschwächt werden. Des Weiteren ist TLR2 in Herzen von Mäusen mit Isoproterenol-induzierter Herzinsuffizienz vermehrt exprimiert, wobei Kardiomyozyten und Makrophagen als Hauptquelle von kardialen TLR2 ausfindig gemacht wurden.<sup>158</sup> Ein TLR2-Knockout hat in diesem Tiermodell die Isoproterenol-induzierten Schäden abgemildert. In-vitro-Experimente legen nahe, dass die TLR2-Inhibition durch Hemmung des MAPK-NF- $\kappa$ B-Signalweges ihre Wirkung entfaltet.<sup>158</sup> Zuletzt ist auch myokardiales RAGE bei Ratten mit Isoproterenol-Stimulation erhöht.<sup>111</sup>

### 5.3.2.2 Kardiale PRRs – Relevanz bei Urämie

Während die Rolle der kardialen PRRs bei obengenannten Pathologien relativ gut untersucht worden ist, finden sich zur Relevanz dieser Rezeptoren bei Niereninsuffizienz deutlich weniger Untersuchungen. Aufgrund ihrer geringeren Entgiftungsfunktion bei CKD kann die Niere Advanced Glycation End Products (AGEs) schlechter ausscheiden, weshalb AGEs akkumulieren und als Urämietoxine betrachtet werden können.<sup>39</sup> AGEs erhöhen bei CKD-Patienten die kardiovaskuläre Mortalität, indem sie Arteriosklerose und linksventrikuläre Hypertrophie induzieren.<sup>39</sup> Da AGEs ihre schädliche Wirkung über RAGE vermitteln, erscheint es plausibel, dass dieser Rezeptor eine Bedeutung für die Prognose bei Niereninsuffizienz hat. Kardiales RAGE wurde sogar als kausaler Faktor bei der Entstehung der CKD-assoziierten linksventrikulären Hypertrophie postuliert, da zirkulierendes sRAGE in einem inversen Zusammenhang mit der linksventrikulären Masse steht.<sup>121</sup> Dieser Zusammenhang besteht unabhängig von traditionellen und nicht-traditionellen Risikofaktoren. Interessanterweise konnte bei nierengesunden Probanden eine Korrelation zwischen sRAGE und linksventrikulärer Masse nicht beobachtet werden, sodass diese Assoziation womöglich ein Spezifikum bei CKD ist.<sup>121</sup> Eine Beteiligung von TLR4 bei der urämischen Kardiomyopathie konnte ebenfalls bei 5/6-nephrektomierten Ratten gezeigt werden.<sup>241</sup> Die Rolle des TLR2 bei CKD-assoziiierter linksventrikulärer Hypertrophie ist bisher nicht untersucht worden.

### 5.3.2.3 Kardiale PRRs – Modulation durch renale Denervation

Inwiefern kardiale PRRs durch eine renale Denervation reguliert werden, ist bisher nur in wenigen Studien untersucht worden. Ein Zusammenhang zwischen dem sympathischen Nervensystem und den Rezeptoren erscheint möglich, da RAGE, TLR2 und TLR4 durch den  $\beta$ -Agonisten Isoproterenol induziert werden.<sup>98,111,158</sup> Bei fettleibigen SH-Ratten zeigt sich eine Hochregulation von myokardialem RAGE und vermindertem sRAGE, wobei sich nach renaler Denervation diese Dysbalance verbessert.<sup>178</sup> Anschließende in-vitro-Untersuchungen legen nahe, dass Katecholamine eine  $\beta$ 1-abhängige Induktion von RAGE und eine  $\beta$ 2-abhängige Hemmung von ADAM10 und damit einhergehend verminderter sRAGE-Bildung bewirken.<sup>178</sup> Bei diesen Ratten ist RAGE auch in den Vorhöfen verstärkt exprimiert und geht mit atrialer Fibrose einher. Die Modulation des sympathoadrenergen Systems durch renale Denervation führt auch hier zu einer teilweise Blutdruck-unabhängigen Verbesserung des RAGE/sRAGE-Verhältnisses.<sup>179</sup> In einer anderen Studie mit SH-Ratten hemmte die renale Denervation die Progression der

linksventrikulären Hypertrophie, wobei die Expression von kardialem TLR4 sowie von NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$  und IL-6 herunterreguliert war.<sup>88</sup>

In Einklang mit vorherigen Studien an anderen Tiermodellen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass auch bei der Adenin-induzierten CKD die Expression von kardialem RAGE erhöht war und nach renaler Denervation zugunsten von sRAGE vermindert war. Die Reduktion der linksventrikulären Masse nach Denervation könnte somit in kausalem Zusammenhang zur Verbesserung der RAGE/sRAGE-Dysbalance stehen. Zusätzlich zum oben beschriebenen  $\beta$ -adrenergen Mechanismus ist es denkbar, dass auch die Verminderung des Urämietoxins Indoxylsulfat einen Beitrag zur Hemmung von RAGE leistet. Bisher existieren keine Studien, die diesen Sachverhalt näher untersucht haben. Jedoch hat Indoxylsulfat proinflammatorische Eigenschaften und kann oxidativen Stress verstärken, sodass ein Milieu entsteht, das für eine verstärkte RAGE-Expression prädisponiert. Bezüglich der beiden anderen Rezeptoren TLR2 und TLR4 konnte entgegen der Ergebnisse vorheriger Studien keine Regulation bei Urämie beobachtet werden. Ob in diesem Tiermodell tatsächlich keine Regulation besteht oder diese möglicherweise geringer ausgeprägt ist, sodass sie aufgrund der geringen Teststärke nicht entdeckt wurde, bleibt offen.

## 5.4 Niere

Erwartungsgemäß waren die klassischen Nierenretentionsparameter Kreatinin und Harnstoff bei AD und AD-RDN erhöht und zeigten die erfolgreiche Induktion einer Nierenschädigung an. RDN zeigte hierbei keinen Einfluss auf die CKD. Die effektive renale Denervation wurde durch eine verminderte Konzentration von Noradrenalin in den Nieren bestätigt.

Sonographisch zeigte sich das Nierenparenchym bei den Adenin-Ratten echoreich verdichtet im Vergleich zu den Kontrollen. Zudem waren die Nieren vergrößert und wiesen gelegentlich einen geringgradigen Harnstau auf.

Dieser beruhte am ehesten auf einer ureteralen Obstruktion, da eine Hyperperistaltik des proximalen Ureters beobachtet werden konnte. In der B-Bild-Sonographie stellte sich kein Unterschied nach renaler Denervation dar. Die verstärkte Echogenität bei AD und AD-RDN ist wahrscheinlich auf die interstitielle Fibrose zurückzuführen, weil diese in der Sonographie sich besonders echoreich darstellt.<sup>61</sup> Darüber hinaus verursachen deponierte Kristalle hohe Impedanzsprünge, welche ebenfalls zur Hyperechogenität

beitragen könnten. Die Nierengröße – als sonographischer Parameter dient in der Regel die Nierenlänge – kann zur Differenzierung zwischen akuter und chronischer Nierenschädigung hilfreich sein. Kleine Nieren deuten eher auf eine chronische Niereninsuffizienz hin, während vergrößerte Nieren sowohl bei einem akuten als auch einem chronischen Geschehen vorkommen. Die vergrößerten Nieren in diesem CKD-Modell könnten Folge eines infiltrativen Prozesses sein, beispielsweise ausgelöst durch das inflammatorische Leukozyteninfiltrat bei interstitieller Nephritis. Die fehlenden bildmorphologischen Unterschiede bei AD und AD-RDN sind in Einklang mit dem histologischen Befund der Inflammation und Fibrose.

Die Ermittlung des RRI erfolgte duplexsonographisch. Der RRI bei Adenin-Ratten war signifikant höher als bei den Kontrollen, nach renaler Denervation normalisierte er sich wieder. Der RRI berechnet sich aus systolischer und enddiastolischer Flussgeschwindigkeit intrarenaler Arterien. Renale Pathologien wie Kapillarverlust bei tubulointerstitieller Fibrose erhöhen den Flusswiderstand und führen zu einer verminderten enddiastolischen Flussgeschwindigkeit, was in einem erhöhten RRI resultiert.<sup>61</sup> Einen sehr guten Überblick über Determinanten des RRI und seine klinischen Implikationen sind in einer Übersichtsarbeit zusammengetragen,<sup>19</sup> deren Kernaussagen im Folgenden kurz wiedergegeben werden.

Initial war man der Auffassung, der RRI sei lediglich vom intrarenalen Flusswiderstand abhängig. Untersuchungen ergaben jedoch, dass die Compliance (Maß für Elastizität) der Nierengefäße ebenso den RRI moduliert. Darüber hinaus wird der RRI jedoch maßgeblich von systemischen Determinanten wie Arteriosklerose oder arterielle Hypertonie bestimmt, weshalb der RRI heute weniger als spezifisches Surrogat für Nierenschädigungen, sondern mehr als ein Surrogat für das allgemeine kardiovaskuläre Risiko eines Patienten aufgefasst wird. Zu den renalen Determinanten, welche den RRI erhöhen, gehören eine tubulointerstitielle Fibrose und ein erhöhter venöser Druck (Harnstau, Nierenvenenthrombose, Rechtsherzinsuffizienz), die beide den renokapillären Verschlussdruck erhöhen. Interessanterweise hat der glomeruläre Gefäßwiderstand kaum einen Einfluss auf den RRI. Der RRI kann durch eine hämodynamisch relevante Nierenarterienstenose vermindert werden, da das poststenotische Flussprofil klassischerweise eine verminderte systolische Flussgeschwindigkeit mit relativ erhöhter diastolischer Geschwindigkeit aufweist. Ebenso verringern weiter proximal gelegene Stenosen (z.B. Aortenklappenstenose) den RRI aus ebendiesem Grund. Eine Tachykardie vermag durch Verkürzung der Diastolendauer mit konsekutiv höherer enddiastolischer Flussgeschwindigkeit den RI ebenfalls zu verringern. Im Gegensatz dazu wird der RRI durch einen

erhöhten systemischen Pulsdruck (bei Arteriosklerose, arterieller Hypertonie, Diabetes mellitus), Bradykardie (verlängerte Diastolendauer) und hohen Sympathikotonus (Vasokonstriktion) erhöht.

Die Erhöhung der Widerstandsindizes bei AD und AD-RDN ist Folge des erhöhten interstitiellen Druckes. Fibrose, inflammatorisches Infiltrat und erhöhter venöser Druck bei Harnstau führen zu einer Kompression renaler Kapillargefäße, was in einer Erhöhung des RRI resultiert. Des Weiteren kann die arterielle Hypertonie ebenfalls einen Beitrag zum erhöhten RRI geleistet haben. Interessanterweise nahm der RRI nach renaler Denervation leicht ab. Es stellt sich die Frage nach den Mechanismen, die eine Abnahme der Widerstandsindizes bewirken. Da kein Unterschied im Grad der tubulointerstitiellen Fibrose sowie des Harnstaus nach renaler Denervation im Vergleich zur Sham-Gruppe beobachtet werden konnte, ist eine Reduktion des RRI durch einen geringeren kapillären Verschlussdruck unwahrscheinlich. In ähnlicher Weise waren keine Unterschiede bezüglich des Blutdrucks festgestellt worden, weshalb von Blutdruck-unabhängigen Ursachen ausgegangen werden muss.

Erhöhte efferente renale Sympathikusaktivität resultiert in einer  $\alpha$ -adrenergen Vasokonstriktion von Nierenarterien.<sup>46</sup> Die renale Denervation unterbindet die Fortleitung von Nervensignalen sympathischer Neurone zur Niere und kann auf diese Weise zu einer Vasodilatation führen, wodurch eine Abnahme des RI erklärt werden kann. Darüber hinaus könnte eine verringerte  $\beta_1$ -abhängige Freisetzung von Renin den intrarenalen Flusswiderstand verringern, indem eine AT-II-vermittelte Vasokonstriktion insbesondere des Vas efferens abgeschwächt wird. Es konnte nachgewiesen werden, dass bei fettleibigen SH-Ratten die renale Denervation die Nierendurchblutung verbessert, obwohl der transrenale Perfusionsdruckgradient abnimmt.<sup>126</sup> Diesem Ergebnis liegt eine Verminderung des intrarenalen Widerstandes zugrunde, die sich womöglich protektiv auf Podozyten auswirkt.

In einer Studie mit gesunden Probanden konnte gezeigt werden, dass eine Provokation des sympathischen Nervensystems (isometrischer Handgriff und Kaltwassertest) zu einer messbaren Erhöhung des RRI führt. Bei Patienten mit unkontrollierter Hypertonie führt die renale Denervation zu einer Reduktion des RRI, wobei die klinische Bedeutung dieses Unterschiedes unbekannt ist.<sup>133</sup> Dabei korrelierte die Änderung des Blutdruckes nicht mit der Änderung des RRI. Als wahrscheinlichen Mechanismus wurde ein verringerter intraparenchymatöser Widerstand postuliert.

Im Allgemeinen sind hohe RRI-Werte beim Menschen mit einer schlechten Prognose verbunden. CKD-Patienten mit erhöhtem RRI ( $> 0,7$ ) weisen eine höhere Mortalität auf

als diejenigen mit niedrigem RRI, sogar nach Adjustierung für andere Risikofaktoren.<sup>198</sup> Bei Patienten mit essentieller Hypertonie korreliert der RRI gut mit dem Ausmaß an Endorganschäden. Ein hoher RRI ist mit Mikroalbuminurie, Intima-Media-Dicke und linksventrikulärer Hypertrophie assoziiert.<sup>156</sup> Darüber hinaus konnte in prospektiven Studien gezeigt werden, dass bei diesem Patientenkollektiv<sup>51</sup> und bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2<sup>43</sup> der RRI ein unabhängiger Prädiktor für kardiovaskuläre und renale Ereignisse ist.

Obwohl der RRI eine relativ einfach zu bestimmende Größe ist, scheint er in experimentellen Studien mit Ratten nur sehr wenig Beachtung gefunden zu haben. Die erste in der wissenschaftlichen Literatur dokumentierte nicht-invasive Messung des RRI bei Ratten erfolgte in einer Studie, die den Einfluss einer partiellen Ureterobstruktion sowie die Therapie mit dem ACE-Hemmer Enalapril auf den RRI untersuchte.<sup>96</sup> Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg des RRI nach Induktion der Obstruktion. Während Enalapril bei Obstruktion zu einer Reduktion des RRI führte, konnte bei gesunden Kontrollratten kein Effekt von Enalapril auf den RRI beobachtet werden. In einer sehr ähnlich aufgebauten Studie wurde der  $\alpha_1$ -Antagonist Alfuzosin als weitere Substanz identifiziert, die bei obstruktiver Nephropathie im Rattenmodell den RRI vermindert.<sup>107</sup>

Die vorliegende Studie hat demonstriert, dass die nicht-invasive Messung des RRI bei Ratten eine einfache und praktikable Methode ist, um Aussagen über die renale Hämodynamik zu treffen. Im Gegensatz zum Menschen fehlt bei Ratten die Evidenz bezüglich einer prognostischen Bedeutung des RRI. Es kann jedoch angenommen werden, dass die zugrunde liegenden pathophysiologischen Mechanismen beim Menschen und der Ratte sich sehr ähneln und daher niedrige RRI-Werte auch bei Ratten eine positive Wirkung vermuten lassen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei Ratten mit Adenin-induzierter CKD die renale Denervation zu einer Abnahme des RRI führt, wobei die Relevanz dieses Unterschiedes nicht bekannt ist. Weitere tierexperimentelle Studien sollten diesen einfach zu bestimmenden Parameter nutzen und hinsichtlich seiner Relevanz untersuchen.

Die konventionelle histologische Untersuchung erfolgte an HE-gefärbten Schnitten. Neben der qualitativen Begutachtung der Pathologien bei AD und AD-RDN wurden auch einige Parameter quantitativ (Glomerulus-Morphometrie, Glomerulusdichte) bzw. semi-quantitativ (Glomerular Score) ausgewertet. Darüber hinaus wurde die Anzahl der Kristalle bestimmt.

Das Adenin-Modell der CKD ruft primär eine tubulointerstitielle Nephritis hervor. Durch tubuläre Obstruktion sistiert der Fluss und es kommt zu einem proximalen Druckanstieg im Tubuluslumen. Histologisches Korrelat sind dilatierte Tubuli, die gelegentlich als Zysten imponieren. Der erhöhte Druck setzt sich bis in die Bowman-Kapsel fort und führt dort zu einer Kompression der Glomeruli, die in der Folge schrumpfen. Terminal geschädigte Glomeruli verlieren ihre Funktion gänzlich und werden in die umgebende Fibrose integriert.

Das glomeruläre Kapillarovolumen war sowohl bei AD als auch bei AD-RDN signifikant verringert im Vergleich zu den Kontrollen. Ebenso zeigte sich bei AD und AD-RDN eine signifikante Verkleinerung der Bowman-Kapsel. Weil die relative Abnahme des Kapillarovolumens größer war als bei der Bowman-Kapsel, hat sich das Kapillar-Kapsel-Verhältnis signifikant verringert. Histologisch konnte eine Verbreiterung des kapillären Spaltes zwischen viszeralem und parietalem Blatt der Bowman-Kapsel festgestellt werden, was als histologisches Korrelat eines erhöhten intrakapsulären hydrostatischen Druckes gewertet werden kann.

Dieser erhöhte Druck führt zu einem sekundären Glomerulusschaden. Außerdem hat er einen direkten Einfluss auf die GFR, indem er dem Druck in den glomerulären Kapillaren entgegenwirkt und somit den effektiven transkapillären Filtrationsdruck herabsetzt, dessen die GFR proportional ist.<sup>37</sup>

Im Allgemeinen sind Nierenerkrankungen mit einem Verlust an Nephronen assoziiert.<sup>37</sup> Die drohende Abnahme der Filtrationsleistung wird durch eine Vergrößerung der verbleibenden Glomeruli kompensiert, die ihre Filtration steigern (relative Hyperfiltration).<sup>37,80</sup> In unserem Modell konnte eine solche Hypertrophie nicht beobachtet werden; es zeigte sich vielmehr eine Atrophie bei AD und AD-RDN. Eine Erklärung könnte darin liegen, dass sich die Adenin-Nephropathie als diffuse panrenale Erkrankung manifestiert und somit keine Nephrone kompensatorisch hypertrophieren, wie es bei fokalen Erkrankungen der Fall ist.

Bezüglich der morphometrischen Parameter konnte kein Unterschied zwischen AD und AD-RDN festgestellt werden. Es kann angenommen werden, dass die Atrophie der Glomeruli in unmittelbarem Zusammenhang mit der tubulären Obstruktion steht. Insofern kann der Schluss gezogen werden, dass die renale Denervation keinen Einfluss auf den Grad der tubulären Obstruktion in diesem Tiermodell hat. In Einklang damit steht der Befund, dass sich die Anzahl der für die Obstruktion verantwortlichen Kristalle zwischen AD und AD-RDN nicht unterschieden hat.

Der Glomerular Score war bei AD im Vergleich zu den Kontrollen wie erwartet erhöht. Nach renaler Denervation zeigte sich eine geringfügige nicht signifikante Abnahme. In einer Studie mit adipösen spontan hypertensiven Ratten (SHRob) hat sich der Glomerular Score nach renaler Denervation tatsächlich signifikant verringert.<sup>126</sup> Die Expression von Desmin in Podozyten hat ebenfalls signifikant abgenommen. Die Autoren dieser Studie vermuten als zugrunde liegende Ursache eine verbesserte renale Perfusion bei geringerem intrarenalen Flusswiderstand, die Podozytenschädigungen abmildert. Es existieren weitere Studien, die einen protektiven Effekt der renalen Denervation auf die Glomeruli nachweisen konnten. Bei Dahl Salz-sensitiven hypertensiven Ratten mit unilateraler Nephrektomie führt die renale Denervation zu einer Abnahme der Glomerulosklerose.<sup>144</sup> Es zeigte sich eine Abnahme der intraglomerulären ROS im Vergleich zu Sham-operierten Ratten, die auf einer verminderten Aktivität der NAD(P)H-Oxidase beruhen. Untersuchungen an isolierten Glomeruli legten nahe, dass die glomeruläre NAD(P)H-Oxidase  $\beta_1$ -abhängig stimuliert wird und der  $\beta$ -Blocker Atenolol die Stimulation verhindert. Darüber hinaus wird vermutet, dass die renale Denervation durch eine RAAS-Blockade den intraglomerulären Druck und damit den endothelialen Scherstress senkt. In einer anderen Studie, in der Ratten mit unilateraler Obstruktion renal denerviert wurden, zeigte sich ebenfalls eine verminderte NAD(P)H-Oxidase-Expression im renalen Kortex.<sup>153</sup> Da kein Unterschied bezüglich der Inflammation bestand, schlussfolgern die Autoren, dass der Effekt der renalen Denervation auf die NAD(P)H-Oxidase sich auf nierenständige Zellen wie Tubulus- oder Endothelzellen beschränkt.

In unserer Studie zeigte sich kein signifikanter Einfluss der renalen Denervation auf den histologischen glomerulären Phänotyp. Dieser Umstand kann der geringen statistischen Power ( $n = 5$ ) mit hohem  $\beta$ -Fehler geschuldet sein. Ebenfalls ist es möglich, dass die kontinuierliche Adenin-Zufuhr über die gesamte Dauer des Experiments hinweg einen solch umfassenden Schaden hervorruft, dass mögliche protektive Effekte der renalen Denervation maskiert werden. Weiterhin ergibt sich die Frage, ob der Effekt der renalen Denervation bei CKD davon abhängt, ob es sich bei der Ursache für die Nierenschädigung um eine primäre Glomerulopathie (z.B. bei Diabetes mellitus, arterieller Hypertonie) oder eine primäre Tubulopathie mit interstitieller Beteiligung wie bei der Adenin-Nephropathie handelt.

Die Glomerular Density ist eine einfach zu bestimmende Größe und dient insbesondere bei Nierenbiopsien als Surrogat für die Anzahl der Nephrone.<sup>73</sup> In dieser Studie nahm die Glomerular Density bei AD signifikant ab im Vergleich zu den gesunden

Kontrollen. Nach renaler Denervation zeigte sich eine geringe Zunahme der Glomerular Density.

Die Anzahl der Nephrone (bzw. Glomeruli) variiert interindividuell und scheint kongenital determiniert, da die Nephrogenese vorgeburtlich abgeschlossen ist und während des Lebens keine neuen Glomeruli gebildet werden.<sup>95</sup> Im Laufe des Lebens ist sogar mit einem Verlust an Nephrone zu rechnen.<sup>80</sup> Ein möglicher kausaler Zusammenhang zwischen niedriger Anzahl von Glomeruli und dem Auftreten eines essentiellen Hypertonus wird vermutet.<sup>26</sup> Nach der Hypothese führt eine verminderte Filtrationsfläche zu einer Störung der renalen Natrium-Exkretion, die in einer Expansion des Plasmavolumens, einer systemischen Hypertonie und in Folge auch in einer glomerulären Hypertonie resultiert. Letztere verstärkt die Schädigung der Glomeruli und unterhält einen Circulus vitiosus, der mit progredientem Verlust an Nephrone einhergeht. In der Folge haben verschiedene Studien einen Zusammenhang zwischen niedriger Glomerulusanzahl und dem Auftreten einer arteriellen Hypertonie und einer Niereninsuffizienz dargelegt.<sup>80</sup> Allerdings ist häufig aufgrund des retrospektiven Designs solcher Studien nicht sicher zu beantworten, ob die niedrige Glomerulusanzahl vor Eintreten der Erkrankung bestand und somit womöglich einen kausalen Faktor darstellt, oder ob der Nephron-Verlust zwangsläufige Folge der eingetretenen Erkrankung ist. In einer prospektiven Studie mit Nierenspendern war eine niedrige Anzahl an Glomeruli in der Nierenbiopsie zum Zeitpunkt der Spende ein Prädiktor für das Auftreten einer Albuminurie beim Lebendspender, sogar nach Adjustierung für andere Risikofaktoren.<sup>87</sup> Ein statistischer Zusammenhang mit einem Verlust der follow-up-eGFR  $< 60 \text{ ml/min/1,73-m}^2$  konnte nach Adjustierung nicht nachgewiesen werden.

Bis dato existieren keine Studien, die den Einfluss des sympathischen Nervensystems oder der renalen Denervation auf die Anzahl der Glomeruli untersucht hat. In unserer Studie konnte keine signifikante Abnahme des systemischen Blutdruckes nach Denervation festgestellt werden. Insofern erscheint es unwahrscheinlich, dass der signifikant geringere Glomerulusverlust bei AD-RDN im Vergleich zu AD auf eine Reduktion des systemarteriellen Druckes zurückzuführen ist. Womöglich ist aber der intraglomeruläre Druck nach RDN durch Vasodilatation des Vas efferens vermindert, was sich in einer nephroprotektiven Wirkung analog zur pharmakologischen RAAS-Inhibition äußert. Wie bereits diskutiert, reduziert die renale Denervation den oxidativen Stress im Glomerulus und könnte auch dazu beitragen, den progredienten Untergang von Glomeruli bei CKD zu verlangsamen.

Es bleibt fraglich, ob der geringe Unterschied der Glomerular Density bei AD und AD-RDN einen Benefit hat. Jedoch ist dieser Befund sehr interessant und sollte in weiteren Studien näher untersucht werden.

Die Expression der Pattern-Recognition-Rezeptoren RAGE, TLR2 und TLR4 war bei AD hochreguliert im Vergleich zu den Kontrollen. Bei AD-RDN zeigte sich kein signifikanter Unterschied. In der Immunfluoreszenzfärbung konnte eine Expression von RAGE besonders in Tubulusepithelzellen und in eingewanderten Makrophagen beobachtet werden. HMGB1 ist einer der wichtigsten endogenen Liganden dieser drei Rezeptoren und war bei Ad ebenfalls verstärkt exprimiert ohne signifikanten Unterschied nach renaler Denervation. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die renale Denervation im vorliegenden Modell keinen signifikanten Einfluss auf das Ausmaß der Inflammation hat. Womöglich ist auch hier die kontinuierliche Exposition gegenüber des toxischen Agens Adenin nach der Intervention dafür verantwortlich, dass mögliche anti-inflammatorische Effekte konterkariert werden.

RAGE wird in proximalen Tubulusepithelzellen exprimiert und ist im Tiermodell der Ureterobstruktion erhöht, wobei es an der Fibrosebildung beteiligt ist.<sup>127</sup> TLR2 und TLR4 werden ebenfalls von verschiedenen Nierenzellen exprimiert und tragen nach Bindung von DAMPs zur Inflammation bei.<sup>181</sup> Sowohl bei akuter als auch bei chronischer Nierenerkrankung sind TLR2 und TLR4 von Bedeutung, da sie wichtige Vermittler von Inflammation, Apoptose und oxidativem Stress sind.<sup>181</sup>

Die renale Denervation verringert in einigen tierexperimentellen Studien die renale Inflammation und könnte somit auch bei CKD-Patienten sinnvoll sein.<sup>209</sup> Allerdings scheint die potenzielle antiinflammatorische Potenz der renalen Denervation abhängig vom verwendeten Modell zu sein. In einem AT-II-Infusions-Modell bei Ratten zur Induktion einer Hypertonie schützt die renale Denervation vor einer Infiltration der Niere mit Entzündungszellen.<sup>223</sup> Bei Dahl-Salz-sensitiven Ratten führt die renale Denervation jedoch nicht zu einer Reduktion der Leukozyteninfiltration.<sup>4</sup> In einer anderen Studie mit DOCA-Salz-Ratten konnte gezeigt werden, dass eine totale renale Denervation, nicht aber eine selektive afferente Denervation die renale Infiltration von T-Lymphozyten und Zytokinproduktion reduziert.<sup>13</sup> Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die antiinflammatorische Wirkung der Denervation von den efferenten Nerven abhängig ist.

In dieser Studie wurde weder das Ausmaß der Infiltration noch die Zytokinkonzentration in der Niere bestimmt. Die Expression der PRRs RAGE, TLR2 und TLR4 werden jedoch auch von Immunzellen exprimiert, weshalb ein Zusammenhang mit dem Grad

der Inflammation angenommen werden kann. Das Alarmin HMGB1 ist bei Entzündungsprozessen ebenfalls erhöht und war nach renaler Denervation nicht reduziert. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass in unserem Adenin-Rattenmodell die renale Denervation keinen Einfluss auf die renale Expression der Pattern-Recognition-Rezeptors RAGE, TLR2, TLR4 und ihres Liganden HMGB1 hat.

## 5.5 Urämietoxine

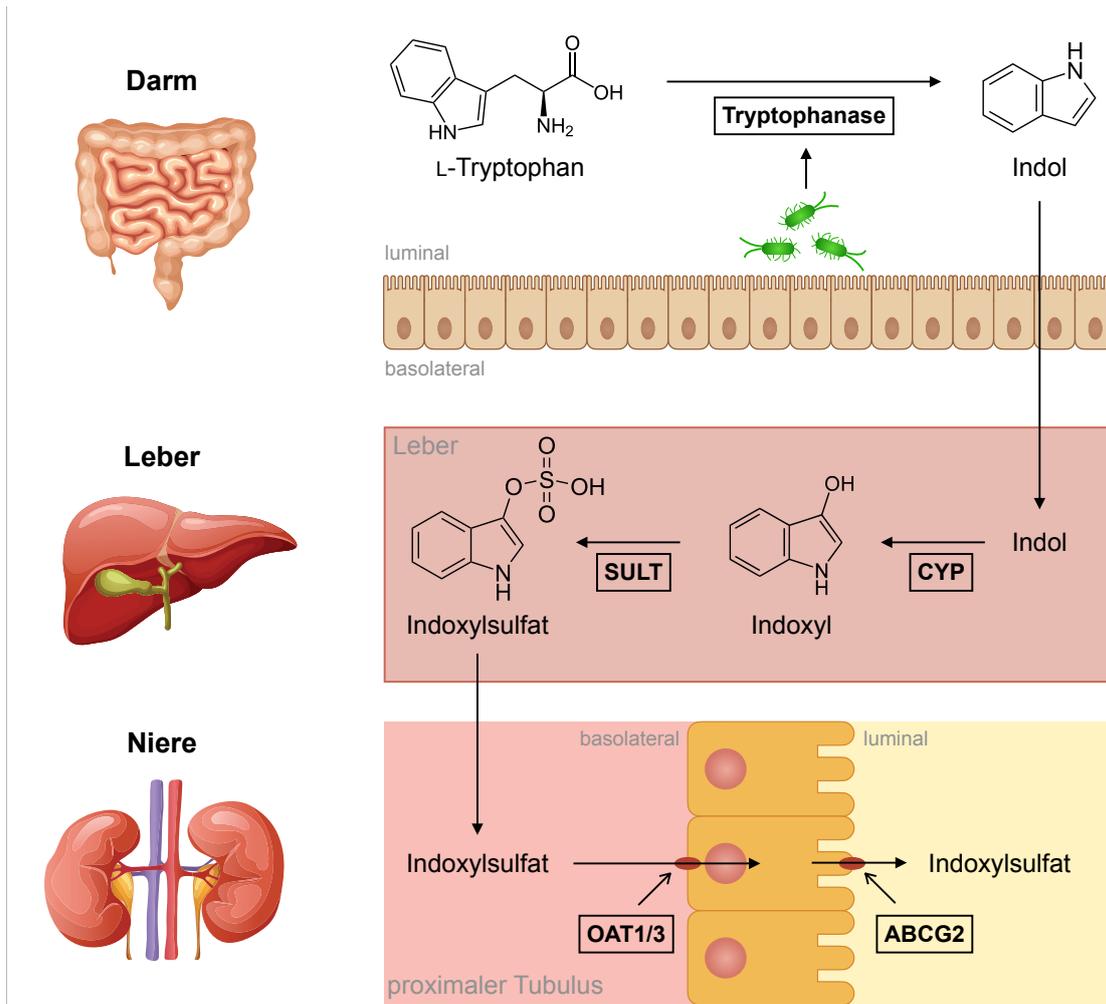
Die Konzentration von Indoxylsulfat im Plasma war erwartungsgemäß bei den niereninsuffizienten Adenin-Tieren gegenüber den Kontrollen erhöht. Interessanterweise zeigte sich eine deutliche Reduktion von Indoxylsulfat nach renaler Denervation auf fast normale Werte. Diese Reduktion kann Resultat einer verminderten intestinalen Produktion bzw. Resorption sein, oder durch eine erhöhte renale Elimination bedingt sein. Um diese Hypothese zu testen, wurden die Indoxylsulfat-Konzentrationen in der Leber (Maß für Produktion) und im Urin (Maß für Elimination) gemessen.

Die Indoxylsulfat-Konzentration im Urin unterschied sich bei beiden CKD-Gruppen nicht, was als Hinweis darauf interpretiert werden kann, dass die geringeren Plasma-Konzentrationen nicht auf einer erhöhten renalen Clearance beruhen. Dafür spricht auch, dass die Entgiftungsfunktion der Niere bei AD und AD-RDN gleichermaßen schlecht war, gemessen an den Retentionsparametern Kreatinin und Harnstoff. Wie bereits weiter oben erwähnt, induziert eine Adenin-Diät eine primäre Tubulopathie im Sinne einer obstruktiven Nephropathie mit tubulo-interstitieller Nephritis und Fibrose. Ein potenziell protektiver Effekt der renalen Denervation auf die tubulointerstitielle Nephritis konnte in dieser Studie nicht nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die nach der Denervation anhaltende Exposition der Tiere gegenüber Adenin, das seine nephrotoxischen Auswirkungen in vollem Maße ausüben kann und kaum durch therapeutische Interventionen, die nicht direkt in die unmittelbare Pathophysiologie des Adenin-Metabolismus eingreifen, zu beeinflussen ist.

In der Leber konnten bei renal denervierten Tieren deutlich reduzierte Indoxylsulfat-Konzentrationen gemessen werden im Vergleich zur Adenin-Gruppe. Dies ist mit der Hypothese zu vereinbaren, dass weniger intestinal gebildetes Indol die Leber erreicht. Womöglich ist die Produktion von Indol durch die Mikroflora und die mukosale Resorption durch die renale Denervation vermindert.

### 5.5.1 Metabolismus von Indoxylsulfat

Die aromatische Aminosäure Tryptophan enthält einen Indol-Ring, der von Tryptophanase-exprimierenden Darmbakterien abgespalten werden kann.<sup>14,148</sup> Mit der Nahrung zugeführtes Tryptophan kann auf diese Weise enzymatisch zu Indol degradiert werden. Indol, ein aromatisches, heterocyclisches Amin, erreicht nach intestinaler Resorption die Leber, wo der Metabolit der Biotransformation zugeführt wird. In einem ersten Schritt wird Indol durch Cytochrom-P-450-Oxidasen in Indoxyl (3-Hydroxyindol) überführt.<sup>14</sup> Danach erfolgt, katalysiert durch Sulfotransferasen, die Konjugation der Hydroxyl-Gruppe mit Sulfat.<sup>15</sup> Indoxylsulfat gelangt in die systemische Zirkulation und liegt zu ca. 90 % an Plasmaproteine gebunden vor, wobei Albumin das Haupttransportprotein darstellt.<sup>212</sup> Die Elimination von Indoxylsulfat erfolgt renal. Aufgrund der ausgeprägten Plasmaproteinbindung spielt die freie glomeruläre Filtration für die Ausscheidung nur eine untergeordnete Rolle. Von weitaus größerer Bedeutung ist die aktive tubuläre Sekretion. Freies Indoxylsulfat wird aktiv durch die Organischen Anionentransporter OAT1 und OAT3 über die basolaterale Membran in proximale Tubulusepithelzellen aufgenommen.<sup>42</sup> So entsteht ein Konzentrationsgradient, der kontinuierlich Indoxylsulfat aus seiner Proteinbindung treibt. Die Sekretion in den Harn erfolgt über den *ATP-binding cassette transporter* ABCG2 (alternativ bekannt als *breast cancer resistance protein* BCRP), der in der apikalen Membran lokalisiert ist.<sup>194</sup> In **Abbildung 64** ist der Stoffwechsel von Indoxylsulfat zusammengefasst.



**Abbildung 64: Indoxylsulfat Metabolismus**

Nutritives Tryptophan wird durch Darmbakterien in Indol überführt, das in der Leber zunächst zum Indoxyl oxidiert und anschließend an Sulfat konjugiert wird. Indoxylsulfat wird renal ausgeschieden. Wegen seiner hohen Plasmaeiweißbindung ist der im Glomerulus frei filtrierte Anteil gering und die Exkretion erfolgt überwiegend durch aktive Sekretion im proximalen Tubulus. **ABCG2** ATP-binding cassette transporter G2, **CYP** Cytochrom-P-450-Oxidasen, **OAT** Organischer Anionentransporter, **SULT** Sulfotransferasen

## 5.5.2 Bedeutung von Indoxylsulfat bei CKD

Indoxylsulfat ist ein niedermolekulares und überwiegend proteingebundenes Urämie-toxin, wodurch es sich einer effektiven Entfernung durch Hämodialyse entzieht.<sup>120</sup> Es existieren mehrere in-vitro-Studien, die eine pro-hypertrophe und pro-fibrotische Wirkung auf Kardiomyozyten nachgewiesen haben.<sup>118,227</sup> Auch in-vivo-Studien mit Ratten legen nahe, dass Indoxylsulfat zu kardialer Fibrose und Hypertrophie beiträgt.<sup>119,231</sup> Darüber hinaus besitzt Indoxylsulfat auch eine prognostische Bedeutung bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen und Niereninsuffizienz.<sup>215,216,234</sup>

Aufgrund dieser Erkenntnisse und der Tatsache, dass die renale Denervation Blutdruck-unabhängige anti-hypertrophe Effekte hat,<sup>134</sup> stellte sich die Frage, ob humorale Faktoren wie das Urämietoxin Indoxylsulfat womöglich eine Rolle in der Wirkung der renalen Denervation spielen, da Indoxylsulfat bekannterweise zur Hypertrophie bei CKD beiträgt.

### 5.5.3 Einfluss von renaler Denervation auf Indoxylsulfat

CKD-Patienten weisen charakteristische Darmpathologien auf, die insbesondere eine gestörte Barrierefunktion und eine intestinale Dysbiose umfassen.<sup>6,208</sup> Diese Veränderungen führen zur Absorption schädlicher Metabolite aus dem Darm und tragen somit zu systemischer Inflammation und urämischer Toxizität bei. Die Barrierefunktion wird maßgeblich durch Tight Junctions gewährleistet. Diese Proteinkomplexe verbinden die epithelialen Enterozyten untereinander und schließen das basolaterale Milieu vom Darmlumen ab. Auf diese Weise kann der parazelluläre Transport von Molekülen aus dem Lumen in die Mukosa reguliert werden. Bei urämischen Patienten konnte eine erhebliche Beeinträchtigung dieser physiologischen Barriere nachgewiesen werden. In einer Studie mit 5/6-nephrektomierten urämischen Ratten konnte eine verminderte Expression von Tight-Junction-Proteinen im Darm für die Barrierestörung ausfindig gemacht werden.<sup>206</sup> In einer weiteren Studie<sup>207</sup> haben die Autoren Harnstoff und sein Abbauprodukt Ammonium als mögliche Ursache für die Störung der Tight Junctions identifiziert.

Neben der intestinalen Barrierestörung ist auch das Mikrobiom durch Urämie verändert. Es zeigt sich eine Expansion der Tryptophanase-bildenden Familien (Clostridiaceae und Enterobacteriaceae), welche zu einer verstärkten Produktion von Indol beitragen.<sup>221</sup> Die erhöhte Plasmakonzentration von Indoxylsulfat bei CKD-Patienten ist das Ergebnis des Zusammenspiels aus vermehrter bakterieller Produktion von Indol, vermehrter Resorption aufgrund der intestinalen Barrierestörung sowie verminderter renaler Ausscheidung.

Der Einfluss des ANS und insbesondere des sympathischen Anteils auf den Darm war Gegenstand zahlreicher Studien. Der Sympathikus innerviert die enterischen Plexus und darüber hinaus auch die intestinale Mukosa sowie das Mukosa-assoziierte lymphatische Gewebe.<sup>190</sup> Eine Steigerung des Sympathikotonus hat vielseitige Auswirkungen auf den Darm und seine Funktionen. Über eine  $\alpha_2$ -adrenerge Aktivierung im Plexus myentericus werden die glatten Muskelzellen inhibiert und somit die Peristaltik

vermindert. Ebenso wird im Plexus submucosus  $\alpha_2$ -abhängig die sekretorische Funktion reduziert und die Blutversorgung des Darms durch  $\alpha_1$ -abhängige Vasokonstriktion gedrosselt.

Erkrankungen, die mit einem erhöhten Sympathikotonus einhergehen, zeigen ähnliche Darmpathologien, wie sie bei CKD-Patienten beobachtet werden. Im Wesentlichen sind dies eine gestörte Barrierefunktion und ein verändertes Mikrobiom. In einer Studie mit SHR-Ratten konnte nachgewiesen werden, dass die Tight-Junction-Proteine Occludin, Tight junction protein 1 und Claudin 4 im Darm signifikant weniger exprimiert werden im Vergleich zu WKY-Kontrollratten.<sup>166</sup> Als Folge der verminderten Expression der Tight-Junction-Proteine hatten die SHR-Ratten eine erhöhte intestinale Permeabilität. Ähnliche Veränderungen konnten auch bei Ratten nachgewiesen werden, denen AT-II infundiert wurde. Eine Reversierung der Darmpathologien konnte bei SHR-Ratten beobachtet werden, die eine pharmakologische Therapie mit dem ACE-Hemmer Captopril erhielten. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass eine regionale Sympathikusblockade mittels thorakaler Periduralanästhesie eine Endotoxin-induzierte Darmpermeabilität bei Ratten<sup>171</sup> und Kaninchen<sup>108</sup> vermindert. Zudem führt chronischer Stress über eine Sympathikus-abhängige Ausschüttung von Katecholaminen zu Veränderungen der intestinalen Mikroflora und zu einer gestörten epithelialen Darmbarriere.<sup>132</sup>

Es stellt sich die Frage, inwiefern eine renale Denervation Einfluss auf die intestinale sympathische Aktivität hat. In einer Studie mit Sprague-Dawley-Ratten, bei denen ein Myokardinfarkt induziert und anschließend die Interventionsgruppe renal denerviert wurde, zeigte sich eine dramatisch reduzierte intestinale Sympathikusaktivität im Vergleich zur Sham-Gruppe.<sup>85</sup> Als Surrogat für die Sympathikusaktivität diente hier die Expression der Tyrosinhydroxylase, die mittels Immunfluoreszenzmikroskopie bestimmt wurde. Des Weiteren untersuchte die Studie, ob Ratten mit Myokardinfarkt eine gestörte Darmbarriere aufweisen. Interessanterweise zeigte die Infarkt-Gruppe eine erhöhte intestinale Permeabilität gemessen an Plasmakonzentrationen von oral appliziertem FITC-markiertem Dextran. Ursächlich hierfür war eine reduzierte Expression der Tight-Junction-Proteine Occludin und ZO-1 im Darm. Nach renaler Denervation war die intestinale Permeabilität rückgängig und die Expression dieser Proteine teilweise wiederhergestellt. Mittels Sequenzierung der 16S rRNA aus Stuhlproben konnten die Autoren ein gestörtes Mikrobiom bei Myokardinfarkt nachweisen. Eine renale Denervation zeigte auch hier insofern eine Verbesserung der Dysbiose, als das Mikrobiom eine größere Ähnlichkeit mit der Kontrollgruppe aufwies als die Myokardinfarkt-Gruppe.

Die CKD ist mit einem erhöhten Sympathikotonus assoziiert. Um die daraus resultierenden Schädigungen abzumildern, sind gegensteuernde Interventionen wie die renale Denervation sinnvoll. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass im Rattenmodell der Adenin-induzierten Niereninsuffizienz die Plasmakonzentration des Urämietoxins Indoxylsulfat durch renale Denervation reduziert werden konnte. Potenzielle Mechanismen könnten auf enteroprotektiven Eigenschaften beruhen. Diese umfassen eine Normalisierung der Darmflora mit Reduktion der Indol-produzierenden Spezies sowie eine Verminderung der Indol-Resorption durch eine teilweise wiederhergestellte Darmbarriere.

#### 5.5.4 Indoxylsulfat und sRAGE

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Indoxylsulfat und myokardiales sRAGE durch eine renale Denervation gegensinnig beeinflusst wurden. In-vitro-Versuche mit H9c2-Kardiomyoblasten haben dargelegt, dass Indoxylsulfat eine Hypertrophie induzieren kann. Ob womöglich Indoxylsulfat mit RAGE/sRAGE interagiert, ist bislang ungeklärt. Daher wurde eine Ko-Stimulation mit Indoxylsulfat und sRAGE durchgeführt. Hier zeigte sich keine signifikante Reduktion der Myoblastenhypertrophie.

Inwiefern Indoxylsulfat auf biochemischer Ebene eine Hypertrophie bewirkt, ist nicht vollständig aufgeklärt. Es ist jedoch bekannt, dass Indoxylsulfat über OAT3-Kanäle nach intrazellulär gelangt und im Zytoplasma an den Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AHR) bindet, der nachfolgend in den Zellkern wandert und die Genexpression reguliert.<sup>225</sup> Der AHR ist ein evolutionär konservierter Transkriptionsfaktor, der durch exogene Substanzen aktiviert wird und Enzyme induziert, die für die Detoxifikation zuständig sind.<sup>109,147</sup> Neuere Studien legen jedoch nahe, dass der AHR nicht nur beim Abbau von Substanzen eine Rolle spielt, sondern auch bei zahlreichen systemischen Erkrankungen mit inflammatorischen Prozessen.<sup>147</sup> Es konnte gezeigt werden, dass Indoxylsulfat-Administration bei Dahl-Salz-sensitiven hypertensiven Ratten zu kardialer Hypertrophie und Fibrose führt und mit einer proinflammatorischen Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms assoziiert ist.<sup>225</sup> Die Autoren schlussfolgern, dass diese sterile Entzündung im Myokard eine wichtige Ursache für die bei CKD-Patienten beobachtete hohe kardiovaskuläre Mortalität ist. Vermutlich spielen auch ROS bei der Indoxylsulfat-induzierten Hypertrophie eine Rolle.<sup>227</sup>

Die Ergebnisse der Arbeit ergeben keine Hinweise auf eine Beteiligung der RAGE/sRAGE-Achse in der Vermittlung der toxischen Effekte von Indoxylsulfat bei urämischer Kardiomyopathie.

## 5.6 Limitationen

Die vorliegende Arbeit weist einige Schwächen auf. Durch die geringe Anzahl an Versuchstieren ist die statistische Power der Studie klein mit folglich erhöhtem  $\beta$ -Fehler. Einige Unterschiede werden aufgrund dieser geringen Teststärke die Signifikanz nicht erreicht haben.

Des Weiteren ist das Adenin-Rattenmodell nur bedingt auf den Menschen übertragbar, obwohl es eine chronische Entwicklung der Niereninsuffizienz im Gegensatz zu anderen Modellen relativ gut imitiert. Die beim Menschen weitaus häufigste Genese der CKD beinhaltet die arterielle Hypertonie und den Diabetes mellitus, welche primäre Glomerulusschäden nach sich ziehen. Das Adenin-Modell ähnelt eher einer obstruktiven Nephropathie, die beim Menschen zum Beispiel in Folge einer postrenalen Nierenschädigung auftreten kann und nur selten eine Ursache für CKD beim Menschen ist.

Ferner wurde nicht untersucht, ob die renale Denervation die Darmflora oder Epithelbarriere verändert und so die Indol-Resorption vermindert. Dieser Mechanismus wurde aufgrund der Ergebnisse anderer Studien postuliert. Zuletzt ist in dieser Studie lediglich eine Assoziation zwischen reduzierten Indoxylsulfatspiegeln und reduzierter linksventrikulärer Hypertrophie beschrieben, woraus sich keine unmittelbare Kausalität ableiten lässt.

## 5.7 Schlussfolgerungen

Im Adenin-Rattenmodell der CKD führt die renale Denervation zu einer Reduktion der linksventrikulären Hypertrophie. Außerdem ist die Plasma-Konzentration des Urämiotoxins Indoxylsulfat nach renaler Denervation verringert. Vermutlich beruht diese Reduktion auf einer verminderten Resorption der Vorstufe Indol aus dem Darm. Zusätzlich verschiebt die renale Denervation das Gleichgewicht von RAGE/sRAGE im Herzen zugunsten von sRAGE. Bezüglich der Nierenfunktion konnte keine verbesserte Entgiftungsfunktion festgestellt werden, allerdings zeigten sich kleine Unterschiede wie eine Abnahme des RRI und ein geringerer Glomerulusverlust. Die wichtigsten Erkenntnisse dieser Arbeit sind graphisch in **Abbildung 65** zusammengefasst.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die renale Denervation eine sinnvolle Therapieoption für Patienten mit CKD darstellen könnte, um die kardiovaskulären Komplikationen bei diesem Patientenkollektiv zu reduzieren.

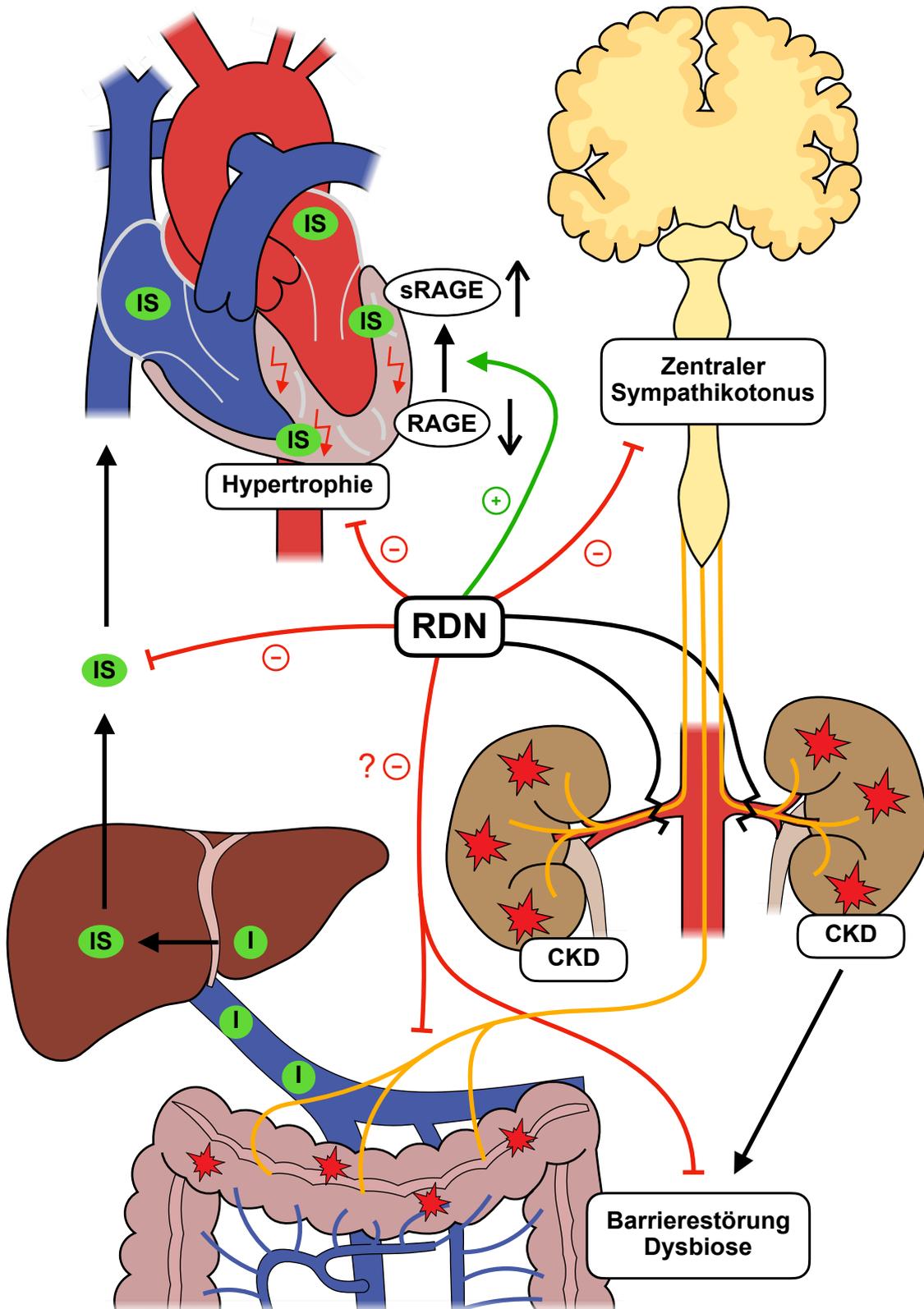


Abbildung 65: Graphische Zusammenfassung

I Indol, IS Indoxylsulfat

## 6 Literaturverzeichnis

1. Summary of Recommendation Statements. *Kidney Int Suppl.* 2013;3(1):5–14. doi:10.1038/kisup.2012.77
2. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(7):499-511. doi:10.1038/nri1391
3. Almutary H, Bonner A, Douglas C. Symptom burden in chronic kidney disease: a review of recent literature. *J Ren Care.* 2013;39(3):140–150. doi:10.1111/j.1755-6686.2013.12022.x
4. Alsheikh AJ, Lund H, Dasinger JH, Abais-Battad JM, Fehrenbach DJ, Mattson DL. Renal nerves and leukocyte infiltration in the kidney during salt-sensitive hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2019;317(1):R182-r189. doi:10.1152/ajpregu.00070.2019
5. Anderberg RJ, Meek RL, Hudkins KL, et al. Serum amyloid A and inflammation in diabetic kidney disease and podocytes. *Lab Invest.* 2015;95(3):250-262. doi:10.1038/labinvest.2014.163
6. Andersen K, Kesper MS, Marschner JA, et al. Intestinal Dysbiosis, Barrier Dysfunction, and Bacterial Translocation Account for CKD-Related Systemic Inflammation. *J Am Soc Nephrol.* 2017;28(1):76-83. doi:10.1681/asn.2015111285
7. Andersen SR, Lambrecht LJ, Swan SK, et al. Disposition of Recombinant Human Interleukin-10 in Subjects with Various Degrees of Renal Function. *J Clin Pharmacol.* 1999;39(10):1015-1020. doi:10.1177/00912709922011773
8. Andrassy M, Volz HC, Riedle N, et al. HMGB1 as a predictor of infarct transmural and functional recovery in patients with myocardial infarction. *J Intern Med.* 2011;270(3):245-253. doi:10.1111/j.1365-2796.2011.02369.x
9. Arancio M, Ranzoni S, Delsignore A, et al. 2,8-Dihydroxyadenine Urolithiasis. Case Report and Literature Review. *Urologia Journal.* 2011;78(4):305-309. doi:10.5301/ru.2011.8307
10. Asea A, Rehli M, Kabingu E, et al. Novel Signal Transduction Pathway Utilized by Extracellular HSP70: ROLE OF Toll-LIKE RECEPTOR (TLR) 2 AND TLR4 \*. *J Biol Chem.* 2002;277(17):15028-15034. doi:10.1074/jbc.M200497200
11. Babitt JL, Lin HY. Mechanisms of Anemia in CKD. *J Am Soc Nephrol.* 2012;23(10):1631-1634. doi:10.1681/asn.2011111078
12. Bandak G, Sang Y, Gasparini A, et al. Hyperkalemia After Initiating Renin-Angiotensin System Blockade: The Stockholm Creatinine Measurements

- (SCREAM) Project. *Journal of the American Heart Association*. 2017;6(7):e005428. doi:10.1161/JAHA.116.005428
13. Banek CT, Knuepfer MM, Foss JD, et al. Resting Afferent Renal Nerve Discharge and Renal Inflammation. *Hypertension*. 2016;68(6):1415-1423. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.07850
  14. Banoglu E, Jha GG, King RS. Hepatic microsomal metabolism of indole to indoxyl, a precursor of indoxyl sulfate. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 2001;26(4):235-240. doi:10.1007/BF03226377
  15. Banoglu E, King RS. Sulfation of indoxyl by human and rat aryl (phenol) sulfotransferases to form indoxyl sulfate. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 2002;27(2):135-140. doi:10.1007/BF03190428
  16. Basta G, Leonardis D, Mallamaci F, et al. Circulating soluble receptor of advanced glycation end product inversely correlates with atherosclerosis in patients with chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2010;77(3):225-231. doi:10.1038/ki.2009.419
  17. Bendich A, Brown GB, Philips FS, Thiersch JB. The direct oxidation of adenine in vivo. *J Biol Chem*. 1950;183(1):267-277.
  18. Bikbov B, Purcell CA, Levey AS, et al. Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*. 2020;395(10225):709–733. doi:10.1016/S0140-6736(20)30045-3
  19. Boddi M. Renal Ultrasound (and Doppler Sonography) in Hypertension: An Update. In: Islam MS, ed. *Hypertension: from basic research to clinical practice*. Springer International Publishing; 2017:191-208.
  20. Böhm M, Mende U, Schmitz W, Scholz H. Cardiac alpha-receptors and cardiac hypertrophy in genetic predisposition to hypertension. *Am Heart J*. 1986;112(6):1347-1349. doi:10.1016/0002-8703(86)90392-3
  21. Böhm M. Alterations of  $\beta$ -adrenoceptor-G-protein-regulated adenylyl cyclase in heart failure. *Mol Cell Biochem*. 1995;147(1):147-160. doi:10.1007/BF00944795
  22. Böhm M, Ewen S, Kindermann I, Linz D, Ukena C, Mahfoud F. Renal denervation and heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2014;16(6):608-613. doi:10.1002/ejhf.83
  23. Böhm M, Ewen S, Mahfoud F. Renal Denervation for Chronic Heart Failure: Background and Pathophysiological Rationale. *Korean Circ J*. 2017;47(1):9-15. doi:10.4070/kcj.2016.0231
  24. Bolignano D, Lacquaniti A, Coppolino G, et al. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin as an Early Biomarker of Nephropathy in Diabetic Patients. *Kidney Blood Press Res*. 2009;32(2):91–98. doi:10.1159/000209379

25. Boratyńska M, Zoń AM, Obremska M, et al. Effect of Reduced Sympathetic Hyperactivity on Cardiovascular Risk Factors in Kidney Transplantation Patients. *Transplant Proc.* 2013;45(4):1571-1574. doi:10.1016/j.transproceed.2012.10.051
26. Brenner BM, Garcia DL, Anderson S. Glomeruli and Blood Pressure: Less of One, More the Other? *Am J Hypertens.* 1988;1(4 Pt 1):335-347. doi:10.1093/ajh/1.4.335
27. Brown SA, Tyrer FC, Clarke AL, et al. Symptom burden in patients with chronic kidney disease not requiring renal replacement therapy. *Clin Kidney J.* 2017;10(6):788–796. doi:10.1093/ckj/sfx057
28. Cha R-h, Kang SW, Park CW, et al. A Randomized, Controlled Trial of Oral Intestinal Sorbent AST-120 on Renal Function Deterioration in Patients with Advanced Renal Dysfunction. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2016;11(4):559-567. doi:10.2215/cjn.12011214
29. Chambers DE, Parks DA, Patterson G, et al. Xanthine oxidase as a source of free radical damage in myocardial ischemia. *J Mol Cell Cardiol.* 1985;17(2):145-152. doi:10.1016/S0022-2828(85)80017-1
30. Chase MA, Wheeler DS, Lierl KM, Hughes VS, Wong HR, Page K. Hsp72 Induces Inflammation and Regulates Cytokine Production in Airway Epithelium through a TLR4- and NF-κB-Dependent Mechanism. *The Journal of Immunology.* 2007;179(9):6318-6324. doi:10.4049/jimmunol.179.9.6318
31. Chavakis T, Bierhaus A, Al-Fakhri N, et al. The Pattern Recognition Receptor (RAGE) Is a Counterreceptor for Leukocyte Integrins : A Novel Pathway for Inflammatory Cell Recruitment. *J Exp Med.* 2003;198(10):1507-1515. doi:10.1084/jem.20030800
32. Chen TK, Knicely DH, Grams ME. Chronic Kidney Disease Diagnosis and Management: A Review. *JAMA.* 2019;322(13):1294–1304. doi:10.1001/jama.2019.14745
33. Cheng N, He R, Tian J, Ye PP, Ye RD. Cutting Edge: TLR2 Is a Functional Receptor for Acute-Phase Serum Amyloid A. *The Journal of Immunology.* 2008;181(1):22-26. doi:10.4049/jimmunol.181.1.22
34. Choi SR, Lim JH, Kim MY, et al. Cinacalcet Improves Endothelial Dysfunction and Cardiac Hypertrophy in Patients on Hemodialysis with Secondary Hyperparathyroidism. *Nephron Clinical Practice.* 2012;122(1-2):1-8. doi:10.1159/000347145
35. Cipollone F, Iezzi A, Fazia M, et al. The Receptor RAGE as a Progression Factor Amplifying Arachidonate-Dependent Inflammatory and Proteolytic Response in Human Atherosclerotic Plaques. *Circulation.* 2003;108(9):1070-1077. doi:10.1161/01.CIR.0000086014.80477.0D

36. Corry DB, Eslami P, Yamamoto K, Nyby MD, Makino H, Tuck ML. Uric acid stimulates vascular smooth muscle cell proliferation and oxidative stress via the vascular renin–angiotensin system. *J Hypertens.* 2008;26(2):269-275. doi:10.1097/HJH.0b013e3282f240bf
37. Cortinovis M, Perico N, Ruggenenti P, Remuzzi A, Remuzzi G. Glomerular hyperfiltration. *Nat Rev Nephrol.* 2022;18(7):435-451. doi:10.1038/s41581-022-00559-y
38. Couser WG, Remuzzi G, Mendis S, Tonelli M. The contribution of chronic kidney disease to the global burden of major noncommunicable diseases. *Kidney Int.* 2011;80(12):1258-1270. doi:10.1038/ki.2011.368
39. Damir R, Aida H-M. Traditional, Nontraditional, and Uremia-Related Threats for Cardiovascular Disease in Chronic Kidney Disease. In: Thomas R, ed. *Chronic Kidney Disease.* IntechOpen; 2017:Ch. 1.
40. de Albuquerque Suassuna PG, Sanders-Pinheiro H, de Paula RB. Uremic Cardiomyopathy: A New Piece in the Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder Puzzle. Review. *Frontiers in Medicine.* 2018;5(206)doi:10.3389/fmed.2018.00206
41. De Nicola L, Di Lullo L, Paoletti E, Cupisti A, Bianchi S. Chronic hyperkalemia in non-dialysis CKD: controversial issues in nephrology practice. *Journal of Nephrology.* 2018;31(5):653–664. doi:10.1007/s40620-018-0502-6
42. Deguchi T, Kusuhara H, Takadate A, Endou H, Otagiri M, Sugiyama Y. Characterization of uremic toxin transport by organic anion transporters in the kidney. *Kidney Int.* 2004;65(1):162-174. doi:10.1111/j.1523-1755.2004.00354.x
43. Delsart P, Vambergue A, Ninni S, et al. Prognostic significance of the renal resistive index in the primary prevention of type II diabetes. *The Journal of Clinical Hypertension.* 2020;22(2):223-230. doi:10.1111/jch.13819
44. Dhondt A, Vanholder R, Van Biesen W, Lameire N. The removal of uremic toxins. *Kidney Int.* 2000;58:S47-S59. doi:10.1046/j.1523-1755.2000.07606.x
45. Di Pino A, Urbano F, Zagami RM, et al. Low Endogenous Secretory Receptor for Advanced Glycation End-Products Levels Are Associated With Inflammation and Carotid Atherosclerosis in Prediabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2016;101(4):1701-1709. doi:10.1210/jc.2015-4069
46. DiBona GF, Kopp UC. Neural control of renal function. *Physiol Rev.* 1997;77(1):75-197. doi:10.1152/physrev.1997.77.1.75
47. Ding X, Xu X, Yan Y, et al. Effects of renal sympathetic denervation and angiotensin-converting enzyme inhibitor on left ventricular hypertrophy. *Herz.* 2015;40(4):695-701. doi:10.1007/s00059-014-4110-5

48. Diwan V, Mistry A, Gobe G, Brown L. Adenine-induced chronic kidney and cardiovascular damage in rats. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2013;68(2):197-207. doi:10.1016/j.vascn.2013.05.006
49. Diwan V, Gobe G, Brown L. Glibenclamide improves kidney and heart structure and function in the adenine-diet model of chronic kidney disease. *Pharmacol Res*. 2014;79:104-10. doi:10.1016/j.phrs.2013.11.007
50. Diwan V, Brown L, Gobe GC. Adenine-induced chronic kidney disease in rats. *Nephrology (Carlton)*. 2018;23(1):5-11. doi:10.1111/nep.13180
51. Doi Y, Iwashima Y, Yoshihara F, et al. Renal Resistive Index and Cardiovascular and Renal Outcomes in Essential Hypertension. *Hypertension*. 2012;60(3):770-777. doi:doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.196717
52. Donato R, Cannon BR, Sorci G, et al. Functions of S100 proteins. *Curr Mol Med*. 2013;13(1):24-57.
53. Duque EJ, Elias RM, Moysés RMA. Parathyroid Hormone: A Uremic Toxin. *Toxins (Basel)*. 2020;12(3):189. doi:10.3390/toxins12030189
54. Egaña-Gorroño L, López-Díez R, Yepuri G, et al. Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) and Mechanisms and Therapeutic Opportunities in Diabetes and Cardiovascular Disease: Insights From Human Subjects and Animal Models. Review. *Front Cardiovasc Med*. 2020;7(37)doi:10.3389/fcvm.2020.00037
55. Ehrentraut H, Weber C, Ehrentraut S, et al. The toll-like receptor 4-antagonist eritoran reduces murine cardiac hypertrophy. *Eur J Heart Fail*. 2011;13(6):602-610. doi:10.1093/eurjhf/hfr035
56. Engelhardt S, Böhm M, Erdmann E, Lohse MJ. Analysis of beta-adrenergic receptor mRNA levels in human ventricular biopsy specimens by quantitative polymerase chain reactions: Progressive reduction of beta1-adrenergic receptor mRNA in heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 1996;27(1):146-154. doi:10.1016/0735-1097(95)00425-4
57. Erridge C. Endogenous ligands of TLR2 and TLR4: agonists or assistants? *J Leukoc Biol*. 2010;87(6):989-999. doi:10.1189/jlb.1209775
58. Eschenhagen T.  $\beta$ -adrenergic signaling in heart failure—adapt or die. *Nat Med*. 2008;14(5):485-487. doi:10.1038/nm0508-485
59. Esler M, Jennings G, Korner P, Blombery P, Sacharias N, Leonard P. Measurement of total and organ-specific norepinephrine kinetics in humans. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 1984;247(1):E21-E28. doi:10.1152/ajpendo.1984.247.1.E21
60. Esler M. The 2009 Carl Ludwig Lecture: pathophysiology of the human sympathetic nervous system in cardiovascular diseases: the transition from mechanisms to

- medical management. *J Appl Physiol.* 2010;108(2):227-237. doi:10.1152/jappphysiol.00832.2009
61. Faubel S, Patel NU, Lockhart ME, Cadnapaphornchai MA. Renal Relevant Radiology: Use of Ultrasonography in Patients with AKI. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2014;9(2):382-394. doi:10.2215/cjn.04840513
  62. Firth JD, Raine AEG, Ledingham JGG. Raised venous pressure: a direct cause of renal sodium retention oedema? *The Lancet.* 1988;331(8593):1033-1036. doi:10.1016/S0140-6736(88)91851-X
  63. Frantz S, Kobzik L, Kim YD, et al. Toll4 (TLR4) expression in cardiac myocytes in normal and failing myocardium. *J Clin Invest.* 1999;104(3):271-80. doi:10.1172/jci6709
  64. Fritz G. RAGE: a single receptor fits multiple ligands. *Trends Biochem Sci.* 2011;36(12):625-632. doi:10.1016/j.tibs.2011.08.008
  65. Fujii H, Nishijima F, Goto S, et al. Oral charcoal adsorbent (AST-120) prevents progression of cardiac damage in chronic kidney disease through suppression of oxidative stress. *Nephrology Dialysis Transplantation.* 2009;24(7):2089-2095. doi:10.1093/ndt/gfp007
  66. Gao D, Li W. Structures and recognition modes of toll-like receptors. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics.* 2017;85(1):3-9. doi:10.1002/prot.25179
  67. Gao J-M, Meng X-W, Zhang J, et al. Dexmedetomidine Protects Cardiomyocytes against Hypoxia/Reoxygenation Injury by Suppressing TLR4-MyD88-NF-κB Signaling. *Biomed Res Int.* 2017;2017:1674613. doi:10.1155/2017/1674613
  68. Gao W, Zhou Z, Liang B, et al. Inhibiting Receptor of Advanced Glycation End Products Attenuates Pressure Overload-Induced Cardiac Dysfunction by Preventing Excessive Autophagy. Original Research. *Front Physiol.* 2018;9doi:10.3389/fphys.2018.01333
  69. Gollapudi P, Yoon JW, Gollapudi S, Pahl MV, Vaziri ND. Leukocyte Toll-Like Receptor Expression in End-Stage Kidney Disease. *Am J Nephrol.* 2010;31(3):247-254. doi:10.1159/000276764
  70. Grabner A, Amaral Ansel P, Schramm K, et al. Activation of Cardiac Fibroblast Growth Factor Receptor 4 Causes Left Ventricular Hypertrophy. *Cell Metab.* 2015;22(6):1020-1032. doi:10.1016/j.cmet.2015.09.002
  71. Grassi G, Seravalle G, Mancia G. Sympathetic activation in cardiovascular disease: evidence, clinical impact and therapeutic implications. *Eur J Clin Invest.* 2015;45(12):1367-1375. doi:10.1111/eci.12553

72. Hansson GK, Edfeldt K. Toll To Be Paid at the Gateway to the Vessel Wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(6):1085-1087. doi:10.1161/01.ATV.0000168894.43759.47
73. Haruhara K, Tsuboi N, Kanzaki G, et al. Glomerular Density in Biopsy-Proven Hypertensive Nephrosclerosis. *Am J Hypertens.* 2015;28(9):1164-1171. doi:10.1093/ajh/hpu267
74. Haruhara K, Tsuboi N, Sasaki T, et al. Volume Ratio of Glomerular Tufts to Bowman Capsules and Renal Outcomes in Nephrosclerosis. *Am J Hypertens.* 2018;32(1):45-53. doi:10.1093/ajh/hpy147
75. Helanova K, Spinar J, Parenica J. Diagnostic and Prognostic Utility of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) in Patients with Cardiovascular Diseases - Review. *Kidney Blood Press Res.* 2014;39(6):623–629. doi:10.1159/000368474
76. Hescheler J, Meyer R, Plant S, Krautwurst D, Rosenthal W, Schultz G. Morphological, biochemical, and electrophysiological characterization of a clonal cell (H9c2) line from rat heart. *Circ Res.* 1991;69(6):1476-1486. doi:10.1161/01.RES.69.6.1476
77. Higashikuni Y, Tanaka K, Kato M, et al. Toll-Like Receptor-2 Mediates Adaptive Cardiac Hypertrophy in Response to Pressure Overload Through Interleukin-1 $\beta$  Upregulation via Nuclear Factor  $\kappa$ B Activation. *Journal of the American Heart Association.* 2013;2(6):e000267. doi:doi:10.1161/JAHA.113.000267
78. Ho CY, Miller KV, Savaiano DA, Crane RT, Ericson KA, Clifford AJ. Absorption and Metabolism of Orally Administered Purines in Fed and Fasted Rats. *J Nutr.* 1979;109(8):1377-1382. doi:10.1093/jn/109.8.1377
79. Hoppe LK, Muhlack DC, Koenig W, Carr PR, Brenner H, Schöttker B. Association of Abnormal Serum Potassium Levels with Arrhythmias and Cardiovascular Mortality: a Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2018;32(2):197-212. doi:10.1007/s10557-018-6783-0
80. Hoy WE, Bertram JF, Denton RD, Zimanyi M, Samuel T, Hughson MD. Nephron number, glomerular volume, renal disease and hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2008;17(3):258-265. doi:10.1097/MNH.0b013e3282f9b1a5
81. Huang J, Huang H, Pan W, et al. Renal denervation attenuates cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats via regulation of autophagy. *Mol Med Rep.* 2017;16(2):2023-2029. doi:10.3892/mmr.2017.6790
82. Huang Y, Zhou J, Wang S, et al. Indoxyl sulfate induces intestinal barrier injury through IRF1-DRP1 axis-mediated mitophagy impairment. *Theranostics.* 2020;10(16):7384-7400. doi:10.7150/thno.45455

83. Hudson BI, Lippman ME. Targeting RAGE Signaling in Inflammatory Disease. *Annu Rev Med*. 2018;69(1):349-364. doi:10.1146/annurev-med-041316-085215
84. Hung SC, Lai YS, Kuo KL, Tarng DC. Volume Overload and Adverse Outcomes in Chronic Kidney Disease: Clinical Observational and Animal Studies. *Journal of the American Heart Association*. 2015;4(5):e001918. doi:10.1161/JAHA.115.001918
85. Huo J-Y, Jiang W-Y, Lyu Y-T, et al. Renal Denervation Attenuates Neuroinflammation in the Brain by Regulating Gut-Brain Axis in Rats With Myocardial Infarction. Original Research. *Front Cardiovasc Med*. 2021;8:650140. doi:10.3389/fcvm.2021.650140
86. Imazu M, Asakura M, Hasegawa T, et al. Abstract 17220: Effects of the Oral Adsorbent of AST-120 in Patients with both Chronic Heart Failure and Chronic Kidney Disease. *Circulation*. 2014;130(suppl\_2):A17220-A17220. doi:10.1161/circ.130.suppl\_2.17220
87. Issa N, Vaughan LE, Denic A, et al. Larger nephron size, low nephron number, and nephrosclerosis on biopsy as predictors of kidney function after donating a kidney. *Am J Transplant*. 2019;19(7):1989-1998. doi:10.1111/ajt.15259
88. Jiang W, Tan L, Guo Y, Li X, Tang X, Yang K. Effect of renal denervation procedure on left ventricular hypertrophy of hypertensive rats and its mechanisms. *Acta Cir Bras*. 2012;27:815-820. doi:10.1590/s0102-86502012001100012.
89. Jin MS, Kim SE, Heo JY, et al. Crystal Structure of the TLR1-TLR2 Heterodimer Induced by Binding of a Tri-Acylated Lipopeptide. *Cell*. 2007;130(6):1071-1082. doi:10.1016/j.cell.2007.09.008
90. Johnson RJ, Nakagawa T, Jalal D, Sánchez-Lozada LG, Kang D-H, Ritz E. Uric acid and chronic kidney disease: which is chasing which? *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2013;28(9):2221-2228. doi:10.1093/ndt/gft029
91. Kagan JC, Barton GM. Emerging Principles Governing Signal Transduction by Pattern-Recognition Receptors. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015;7(3)doi:10.1101/cshperspect.a016253
92. Kalousová M, Hodková M, Kazderová M, et al. Soluble Receptor for Advanced Glycation End Products in Patients With Decreased Renal Function. *Am J Kidney Dis*. 2006;47(3):406-411. doi:10.1053/j.ajkd.2005.12.028
93. Kang D-H, Nakagawa T, Feng L, et al. A Role for Uric Acid in the Progression of Renal Disease. *J Am Soc Nephrol*. 2002;13(12):2888-2897. doi:10.1097/01.Asn.0000034910.58454.Fd
94. Kang JY, Nan X, Jin MS, et al. Recognition of Lipopeptide Patterns by Toll-like Receptor 2-Toll-like Receptor 6 Heterodimer. *Immunity*. 2009;31(6):873-884. doi:10.1016/j.immuni.2009.09.018

95. Kanzaki G, Tsuboi N, Shimizu A, Yokoo T. Human nephron number, hypertension, and renal pathology. *The Anatomical Record*. 2020;303(10):2537-2543. doi:10.1002/ar.24302
96. Karakus SC, Turkyilmaz Z, Sonmez K, et al. The Effect of Enalapril on Renal Resistive Index, Urine Electrolyte Levels and TGF- $\beta$ 1 Levels of Kidney Tissues in Rats with Unilateral Partial Ureteropelvic Junction Obstruction. *Eur J Pediatr Surg*. 2011;21(06):356-361.
97. Kashioulis P, Lundgren J, Shubbar E, et al. Adenine-Induced Chronic Renal Failure in Rats: A Model of Chronic Renocardiac Syndrome with Left Ventricular Diastolic Dysfunction but Preserved Ejection Fraction. *Kidney Blood Press Res*. 2018;43(4):1053-1064. doi:10.1159/000491056
98. Katare PB, Bagul PK, Dinda AK, Banerjee SK. Toll-Like Receptor 4 Inhibition Improves Oxidative Stress and Mitochondrial Health in Isoproterenol-Induced Cardiac Hypertrophy in Rats. Original Research. *Front Immunol*. 2017;8doi:10.3389/fimmu.2017.00719
99. Kaur J, Young BE, Fadel PJ. Sympathetic Overactivity in Chronic Kidney Disease: Consequences and Mechanisms. *Int J Mol Sci*. 2017;18(8)doi:10.3390/ijms18081682
100. Kawai T, Akira S. Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. *Immunity*. 2011;34(5):637-650. doi:10.1016/j.immuni.2011.05.006
101. Kessler EL, Wang J-W, Kok B, et al. Ventricular TLR4 Levels Abrogate TLR2-Mediated Adverse Cardiac Remodeling upon Pressure Overload in Mice. *Int J Mol Sci*. 2021;22(21):11823.
102. Kim HS, Chung W, Kim AJ, et al. Circulating levels of soluble receptor for advanced glycation end product are inversely associated with vascular calcification in patients on haemodialysis independent of S100A12 (EN-RAGE) levels. *Nephrology (Carlton)*. 2013;18(12):777-782. doi:10.1111/nep.12166
103. Kim YK, Shin J-S, Nahm MH. NOD-Like Receptors in Infection, Immunity, and Diseases. *Yonsei Med J*. 2016;57(1):5-14. doi:10.3349/ymj.2016.57.1.5
104. Kimes BW, Brandt BL. Properties of a clonal muscle cell line from rat heart. *Exp Cell Res*. 1976;98(2):367-381. doi:10.1016/0014-4827(76)90447-X
105. Klinkhammer BM, Djudjaj S, Kunter U, et al. Cellular and Molecular Mechanisms of Kidney Injury in 2,8-Dihydroxyadenine Nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2020;31(4):799-816. doi:10.1681/asn.2019080827
106. Koeda T, Wakaki K, Koizumi F, Yokozawa T, Oura H. Early changes of proximal tubules in the kidney of adenine-ingesting rats, with special reference to biochemical

- and electron microscopic studies. *The Japanese Journal of Nephrology*. 1988;30(3):239-246. doi:10.14842/jpnjnephrol1959.30.239
107. Kose F, Turkyilmaz Z, Sonmez K, et al. The effect of alfuzosin on renal resistive index, urinary electrolytes and  $\beta_2$  microglobulin levels and TGF  $\beta$ -1 levels of kidney tissue in rats with unilateral ureteropelvic junction obstruction. *Ren Fail*. 2016;38(8):1283-1290. doi:10.1080/0886022X.2016.1207049
108. Kosugi S, Morisaki H, Satoh T, et al. Epidural Analgesia Prevents Endotoxin-Induced Gut Mucosal Injury in Rabbits. *Anesth Analg*. 2005;101(1):265-272. doi:10.1213/01.Ane.0000153863.95598.08
109. Kou Z, Dai W. Aryl hydrocarbon receptor: Its roles in physiology. *Biochem Pharmacol*. 2021;185:114428. doi:10.1016/j.bcp.2021.114428
110. Kratzer JT, Lanaspas MA, Murphy MN, et al. Evolutionary history and metabolic insights of ancient mammalian uricases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(10):3763-3768. doi:10.1073/pnas.1320393111
111. Kumar R, Bhargava P, Suchal K, Bhatia J, Arya DS. Targeting AGE-RAGE signaling pathway by Saxagliptin prevents myocardial injury in isoproterenol challenged diabetic rats. *Drug Development Research*. 2021;82(4):589-597. doi:10.1002/ddr.21779
112. Kurt-Jones EA, Popova L, Kwinn L, et al. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol*. 2000;1(5):398-401. doi:10.1038/80833
113. Lane PH, Steffes MW, Mauer SM. Estimation of glomerular volume: a comparison of four methods. *Kidney Int*. 1992;41(4):1085-9. doi:10.1038/ki.1992.165
114. Lauder L, Wolf MA, Scholz SS, Hohl M, Mahfoud F, Böhm M. Renal Denervation: Is It Ready for Prime Time? *Curr Cardiol Rep*. 2019;21(8):80. doi:10.1007/s11886-019-1164-2
115. Law JP, Price AM, Pickup L, et al. Clinical Potential of Targeting Fibroblast Growth Factor-23 and  $\alpha$ Klotho in the Treatment of Uremic Cardiomyopathy. *Journal of the American Heart Association*. 2020;9(7):e016041. doi:10.1161/JAHA.120.016041
116. Law JP, Pickup L, Pavlovic D, Townend JN, Ferro CJ. Hypertension and cardiomyopathy associated with chronic kidney disease: epidemiology, pathogenesis and treatment considerations. *J Hum Hypertens*. 2022;doi:10.1038/s41371-022-00751-4
117. Leifheit-Nestler M, Grabner A, Hermann L, et al. Vitamin D treatment attenuates cardiac FGF23/FGFR4 signaling and hypertrophy in uremic rats. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2017;32(9):1493-1503. doi:10.1093/ndt/gfw454

118. Lekawanvijit S, Adrahtas A, Kelly DJ, Kompa AR, Wang BH, Krum H. Does indoxyl sulfate, a uraemic toxin, have direct effects on cardiac fibroblasts and myocytes? *Eur Heart J*. 2010;31(14):1771-1779. doi:10.1093/eurheartj/ehp574
119. Lekawanvijit S, Kompa AR, Manabe M, et al. Chronic Kidney Disease-Induced Cardiac Fibrosis Is Ameliorated by Reducing Circulating Levels of a Non-Dialysable Uremic Toxin, Indoxyl Sulfate. *PLoS One*. 2012;7(7):e41281. doi:10.1371/journal.pone.0041281
120. Lekawanvijit S. Cardiotoxicity of Uremic Toxins: A Driver of Cardiorenal Syndrome. *Toxins (Basel)*. 2018;10(9):352. doi:10.3390/toxins10090352
121. Leonardis D, Basta G, Mallamaci F, et al. Circulating soluble receptor for advanced glycation end product (sRAGE) and left ventricular hypertrophy in patients with chronic kidney disease (CKD). *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 2012;22(9):748-755. doi:10.1016/j.numecd.2010.11.008
122. Levick SP, Murray DB, Janicki JS, Brower GL. Sympathetic Nervous System Modulation of Inflammation and Remodeling in the Hypertensive Heart. *Hypertension*. 2010;55(2):270–276. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.142042
123. Levin A, Singer J, Thompson CR, Ross H, Lewis M. Prevalent left ventricular hypertrophy in the predialysis population: Identifying opportunities for intervention. *Am J Kidney Dis*. 1996;27(3):347–354. doi:10.1016/S0272-6386(96)90357-1
124. Liang B, Zhou Z, Yang Z, et al. AGEs–RAGE axis mediates myocardial fibrosis via activation of cardiac fibroblasts induced by autophagy in heart failure. *Exp Physiol*. 2022;107(8):879-891. doi:10.1113/EP090042
125. Lim S, Lee ME, Jeong J, et al. sRAGE attenuates angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy by inhibiting RAGE-NFκB-NLRP3 activation. *Inflamm Res*. 2018;67(8):691-701. doi:10.1007/s00011-018-1160-9
126. Linz D, Hohl M, Schütze J, et al. Progression of Kidney Injury and Cardiac Remodeling in Obese Spontaneously Hypertensive Rats: The Role of Renal Sympathetic Innervation. *Am J Hypertens*. 2014;28(2):256–265. doi:10.1093/ajh/hpu123
127. Liu B, Sun T, Li H, Qiu S, Li Y, Zhang D. Proximal tubular RAGE mediated the renal fibrosis in UUO model mice via upregulation of autophagy. *Cell Death Dis*. 2022;13(4):399. doi:10.1038/s41419-022-04856-z
128. Liu Y, Yu M, Zhang Z, et al. Blockade of receptor for advanced glycation end products protects against systolic overload-induced heart failure after transverse aortic constriction in mice. *Eur J Pharmacol*. 2016;791:535-543. doi:10.1016/j.ejphar.2016.07.008

129. Liyanage T, Ninomiya T, Jha V, et al. Worldwide access to treatment for end-stage kidney disease: a systematic review. *Lancet*. 2015;385(9981):1975–1982. doi:10.1016/S0140-6736(14)61601-9
130. Lotze MT, Tracey KJ. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nature Reviews Immunology*. 2005;5(4):331-342. doi:10.1038/nri1594
131. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265-75.
132. Lyte M, Vulchanova L, Brown DR. Stress at the intestinal surface: catecholamines and mucosa–bacteria interactions. *Cell Tissue Res*. 2011;343(1):23-32. doi:10.1007/s00441-010-1050-0
133. Mahfoud F, Cremers B, Janker J, et al. Renal Hemodynamics and Renal Function After Catheter-Based Renal Sympathetic Denervation in Patients With Resistant Hypertension. *Hypertension*. 2012;60(2):419-424. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.193870
134. Mahfoud F, Urban D, Teller D, et al. Effect of renal denervation on left ventricular mass and function in patients with resistant hypertension: data from a multi-centre cardiovascular magnetic resonance imaging trial. *Eur Heart J*. 2014;35(33):2224-2231. doi:10.1093/eurheartj/ehu093
135. Mancia G, Kreutz R, Brunström M, et al. 2023 ESH Guidelines for the management of arterial hypertension The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension: Endorsed by the International Society of Hypertension (ISH) and the European Renal Association (ERA). *J Hypertens*. 2023;41(12):1874-2071. doi:10.1097/hjh.0000000000003480
136. Martin-Rodriguez S, Caballo C, Gutierrez G, et al. TLR4 and NALP3 inflammasome in the development of endothelial dysfunction in uraemia. *Eur J Clin Invest*. 2015;45(2):160-169. doi:10.1111/eci.12392
137. Matsuda S, Umemoto S, Yoshimura K, et al. Angiotensin II Activates MCP-1 and Induces Cardiac Hypertrophy and Dysfunction via Toll-like Receptor 4. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*. 2015;22(8):833-844. doi:10.5551/jat.27292
138. McCullough PA, Kellum JA, Haase M, et al. Pathophysiology of the cardiorenal syndromes: executive summary from the eleventh consensus conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI). *Contrib Nephrol*. 2013;182:82-98. doi:10.1159/000349966
139. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 1997;388(6640):394-397. doi:10.1038/41131

140. Meert N, Schepers E, De Smet R, et al. Inconsistency of Reported Uremic Toxin Concentrations. *Artif Organs*. 2007;31(8):600-611. doi:10.1111/j.1525-1594.2007.00434.x
141. Mennuni S, Rubattu S, Pierelli G, Tocci G, Fofi C, Volpe M. Hypertension and kidneys: unraveling complex molecular mechanisms underlying hypertensive renal damage. *J Hum Hypertens*. 2014;28(2):74-79. doi:10.1038/jhh.2013.55
142. Michael Brownlee MD. Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Annu Rev Med*. 1995;46(1):223-234. doi:10.1146/annurev.med.46.1.223
143. Molteni M, Gemma S, Rossetti C. The Role of Toll-Like Receptor 4 in Infectious and Noninfectious Inflammation. *Mediators Inflamm*. 2016;2016:6978936. doi:10.1155/2016/6978936
144. Nagasu H, Satoh M, Kuwabara A, et al. Renal denervation reduces glomerular injury by suppressing NAD(P)H oxidase activity in Dahl salt-sensitive rats. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2010;25(9):2889-2898. doi:10.1093/ndt/gfq139
145. Namimatsu S, Ghazizadeh M, Sugisaki Y. Reversing the Effects of Formalin Fixation with Citraconic Anhydride and Heat: A Universal Antigen Retrieval Method. *J Histochem Cytochem*. 2005;53(1):3-11. doi:10.1177/002215540505300102
146. NasrAllah MM, El-Shehaby AR, Osman NA, Salem MM, Nassef A, El Din UAAS. Endogenous soluble receptor of advanced glycation end-products (esRAGE) is negatively associated with vascular calcification in non-diabetic hemodialysis patients. *Int Urol Nephrol*. 2012;44(4):1193-1199. doi:10.1007/s11255-011-0007-x
147. Neavin DR, Liu D, Ray B, Weinshilboum RM. The Role of the Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR) in Immune and Inflammatory Diseases. *Int J Mol Sci*. 2018;19(12)doi:10.3390/ijms19123851
148. Neves AL, Chilloux J, Sarafian MH, Rahim MBA, Boulangé CL, Dumas M-E. The microbiome and its pharmacological targets: therapeutic avenues in cardiometabolic diseases. *Curr Opin Pharmacol*. 2015;25:36-44. doi:10.1016/j.coph.2015.09.013
149. Obremaska M, Boratyńska M, Zyśko D, et al. Beneficial effect of bilateral native nephrectomy as complete denervation on left ventricular mass and function in renal transplant recipients. *Pol Arch Med Wewn*. 2016;126(1-2):58-67. doi:10.20452/pamw.3269
150. Parfrey PS, Harriett JD, Griffiths SM, et al. The Clinical Course of Left Ventricular Hypertrophy in Dialysis Patients. *Nephron*. 1990;55(2):114-120. doi:10.1159/000185937
151. Park JS, Svetkauskaite D, He Q, et al. Involvement of Toll-like Receptors 2 and 4 in Cellular Activation by High Mobility Group Box 1 Protein \*. *J Biol Chem*. 2004;279(9):7370-7377. doi:10.1074/jbc.M306793200

152. Park L, Raman KG, Lee KJ, et al. Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproducts. *Nat Med.* 1998;4(9):1025-1031. doi:10.1038/2012
153. Peleli M, Al-Mashhadi A, Yang T, et al. Renal denervation attenuates NADPH oxidase-mediated oxidative stress and hypertension in rats with hydronephrosis. *American Journal of Physiology-Renal Physiology.* 2016;310(1):F43-F56. doi:10.1152/ajprenal.00345.2015
154. Perrino C, Naga Prasad SV, Patel M, Wolf MJ, Rockman HA. Targeted Inhibition of  $\beta$ -Adrenergic Receptor Kinase-1–Associated Phosphoinositide-3 Kinase Activity Preserves  $\beta$ -Adrenergic Receptor Signaling and Prolongs Survival in Heart Failure Induced by Calsequestrin Overexpression. *J Am Coll Cardiol.* 2005;45(11):1862-1870. doi:10.1016/j.jacc.2005.02.062
155. Petidis K, Anyfanti P, Doumas M. Renal Sympathetic Denervation: Renal Function Concerns. *Hypertension.* 2011;58(4):e19-e19. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.178145
156. Pontremoli R, Viazzi F, Martinoli C, et al. Increased renal resistive index in patients with essential hypertension: a marker of target organ damage. *Nephrology Dialysis Transplantation.* 1999;14(2):360-365. doi:10.1093/ndt/14.2.360
157. Poole S, Bird TA, Selkirk S, et al. Fate of injected interleukin 1 in rats: Sequestration and degradation in the kidney. *Cytokine.* 1990;2(6):416-422. doi:10.1016/1043-4666(90)90050-4
158. Qian J, Liang S, Wang Q, et al. Toll-like receptor-2 in cardiomyocytes and macrophages mediates isoproterenol-induced cardiac inflammation and remodeling. *The FASEB Journal.* 2023;37(2):e22740. doi:10.1096/fj.202201345R
159. Qureshi ST, Larivière L, Leveque G, et al. Endotoxin-tolerant Mice Have Mutations in Toll-like Receptor 4 (Tlr4). *J Exp Med.* 1999;189(4):615-625. doi:10.1084/jem.189.4.615
160. Rabadi MM, Kuo M-C, Ghaly T, et al. Interaction between uric acid and HMGB1 translocation and release from endothelial cells. *American Journal of Physiology-Renal Physiology.* 2012;302(6):F730-F741. doi:10.1152/ajprenal.00520.2011
161. Ramasamy R, Yan SF, Herold K, Clynes R, Schmidt AM. Receptor for Advanced Glycation End Products. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1126(1):7-13. doi:10.1196/annals.1433.056
162. Ramazzina I, Folli C, Secchi A, Berni R, Percudani R. Completing the uric acid degradation pathway through phylogenetic comparison of whole genomes. *Nat Chem Biol.* 2006;2(3):144-148. doi:10.1038/nchembio768

163. Reichert S, Triebert U, Santos AN, et al. Soluble form of receptor for advanced glycation end products and incidence of new cardiovascular events among patients with cardiovascular disease. *Atherosclerosis*. 2017;266:234-239. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2017.08.015
164. Romejko K, Markowska M, Niemczyk S. The Review of Current Knowledge on Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL). *Int J Mol Sci*. 2023;24(13):10470.
165. Sánchez-Lozada LG, Lanaspa MA, Cristóbal-García M, et al. Uric Acid-Induced Endothelial Dysfunction Is Associated with Mitochondrial Alterations and Decreased Intracellular ATP Concentrations. *Nephron Experimental Nephrology*. 2012;121(3-4):e71-e78. doi:10.1159/000345509
166. Santisteban MM, Qi Y, Zubcevic J, et al. Hypertension-Linked Pathophysiological Alterations in the Gut. *Circ Res*. 2017;120(2):312-323. doi:doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.309006
167. Sarraf M, Masoumi A, Schrier RW. Cardiorenal Syndrome in Acute Decompensated Heart Failure. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009;4(12):2013-2026. doi:10.2215/cjn.03150509
168. Sata Y, Schlaich MP. The Potential Role of Catheter-Based Renal Sympathetic Denervation in Chronic and End-Stage Kidney Disease. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2016;21(4):344-352. doi:10.1177/1074248415624156
169. Sato E, Tanaka A, Oyama J-i, et al. Long-term effects of AST-120 on the progression and prognosis of pre-dialysis chronic kidney disease: a 5-year retrospective study. *Heart Vessels*. 2016;31(10):1625-1632. doi:10.1007/s00380-015-0785-7
170. Scavello F, Zeni F, Milano G, et al. Soluble Receptor for Advanced Glycation End-products regulates age-associated Cardiac Fibrosis. Research Paper. *Int J Biol Sci*. 2021;17(10):2399-2416. doi:10.7150/ijbs.56379
171. Schäper J, Wagner A, Enigk F, et al. Regional Sympathetic Blockade Attenuates Activation of Intestinal Macrophages and Reduces Gut Barrier Failure. *Anesthesiology*. 2013;118(1):134-142. doi:10.1097/ALN.0b013e3182784c93
172. Scheibner KA, Lutz MA, Boodoo S, Fenton MJ, Powell JD, Horton MR. Hyaluronan Fragments Act as an Endogenous Danger Signal by Engaging TLR2. *The Journal of Immunology*. 2006;177(2):1272-1281. doi:10.4049/jimmunol.177.2.1272
173. Schirmer SH, Sayed MMYA, Reil J-C, et al. Improvements in Left Ventricular Hypertrophy and Diastolic Function Following Renal Denervation: Effects Beyond Blood Pressure and Heart Rate Reduction. *J Am Coll Cardiol*. 2014;63(18):1916-1923. doi:10.1016/j.jacc.2013.10.073

174. Schuchardt M, Prüfer N, Tu Y, et al. Dysfunctional high-density lipoprotein activates toll-like receptors via serum amyloid A in vascular smooth muscle cells. *Sci Rep.* 2019;9(1):3421. doi:10.1038/s41598-019-39846-3
175. Schulman G, Berl T, Beck GJ, et al. Randomized Placebo-Controlled EPPIC Trials of AST-120 in CKD. *J Am Soc Nephrol.* 2015;26(7):1732-1746. doi:10.1681/asn.2014010042
176. Selejan S-R, Pöss J, Hewera L, Kazakov A, Böhm M, Link A. Role of receptor for advanced glycation end products in cardiogenic shock. *Crit Care Med.* 2012;40(5):1513-1522. doi:10.1097/CCM.0b013e318241e536
177. Selejan S-R, Hewera L, Hohl M, et al. Suppressed MMP-9 Activity in Myocardial Infarction-Related Cardiogenic Shock Implies Diminished RAGE Degradation. *Shock.* 2017;48(1):18-28. doi:10.1097/shk.0000000000000829
178. Selejan S-R, Linz D, Tatu A-M, et al. Sympathoadrenergic suppression improves heart function by upregulating the ratio of sRAGE/RAGE in hypertension with metabolic syndrome. *J Mol Cell Cardiol.* 2018;122:34-46. doi:10.1016/j.yjmcc.2018.08.003
179. Selejan S-R, Linz D, Mauz M, et al. Renal denervation reduces atrial remodeling in hypertensive rats with metabolic syndrome. *Basic Res Cardiol.* 2022;117(1):36. doi:10.1007/s00395-022-00943-6
180. Sengupta P. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *Int J Prev Med.* 2013;4(6):624-30.
181. Shelke V, Kale A, Anders H-J, Gaikwad AB. Epigenetic regulation of Toll-like receptors 2 and 4 in kidney disease. *J Mol Med.* 2022;100(7):1017-1026. doi:10.1007/s00109-022-02218-y
182. Shen MJ, Zipes DP. Role of the Autonomic Nervous System in Modulating Cardiac Arrhythmias. *Circ Res.* 2014;114(6):1004-1021. doi:10.1161/CIRCRESAHA.113.302549
183. Shobeiri N, Pang J, Adams MA, Holden RM. Cardiovascular disease in an adenine-induced model of chronic kidney disease: the temporal link between vascular calcification and haemodynamic consequences. *J Hypertens.* 2013;31(1):160-168. doi:10.1097/HJH.0b013e32835b15bb
184. Shuvy M, Nyska A, Beerli R, et al. Histopathology and apoptosis in an animal model of reversible renal injury. *Exp Toxicol Pathol.* 2011;63(4):303-306. doi:10.1016/j.etp.2010.02.002
185. Sims GP, Rowe DC, Rietdijk ST, Herbst R, Coyle AJ. HMGB1 and RAGE in Inflammation and Cancer. *Annu Rev Immunol.* 2010;28(1):367-388. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132603

186. Singh MV, Cicha MZ, Nunez S, Meyerholz DK, Chapleau MW, Abboud FM. Angiotensin II-induced hypertension and cardiac hypertrophy are differentially mediated by TLR3- and TLR4-dependent pathways. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2019;316(5):H1027-H1038. doi:10.1152/ajpheart.00697.2018
187. Sipido KR, Marban E. L-type calcium channels, potassium channels, and novel nonspecific cation channels in a clonal muscle cell line derived from embryonic rat ventricle. *Circ Res*. 1991;69(6):1487-1499. doi:10.1161/01.RES.69.6.1487
188. Souza ACP, Tsuji T, Baranova IN, et al. TLR4 mutant mice are protected from renal fibrosis and chronic kidney disease progression. *Physiological Reports*. 2015;3(9):e12558. doi:10.14814/phy2.12558
189. Speer T, Schunk SJ, Fliser D. Chronische Nierenerkrankung – eine kardiovaskuläre Höchststrisikokonstellation. *Internist (Berl)*. 2020;61(4):340-348. doi:10.1007/s00108-019-00686-y
190. Straub RH, Wiest R, Strauch UG, Härle P, Schölmerich J. The role of the sympathetic nervous system in intestinal inflammation. *Gut*. 2006;55(11):1640-1649. doi:10.1136/gut.2006.091322
191. Straub RH, Cutolo M, Buttgereit F, Pongratz G. Energy regulation and neuroendocrine-immune control in chronic inflammatory diseases. *J Intern Med*. 2010;267(6):543-560. doi:10.1111/j.1365-2796.2010.02218.x
192. Su Q, Li L, Sun Y, Yang H, Ye Z, Zhao J. Effects of the TLR4/Myd88/NF- $\kappa$ B Signaling Pathway on NLRP3 Inflammasome in Coronary Microembolization-Induced Myocardial Injury. *Cell Physiol Biochem*. 2018;47(4):1497-1508. doi:10.1159/000490866
193. Sumida K, Lau WL, Kovesdy CP, Kalantar-Zadeh K, Kalantar-Zadeh K. Microbiome modulation as a novel therapeutic approach in chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2021;30(1):75-84. doi:10.1097/mnh.0000000000000661
194. Takada T, Yamamoto T, Matsuo H, et al. Identification of ABCG2 as an Exporter of Uremic Toxin Indoxyl Sulfate in Mice and as a Crucial Factor Influencing CKD Progression. *Sci Rep*. 2018;8(1):11147. doi:10.1038/s41598-018-29208-w
195. Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Semin Immunol*. 2004;16(1):3-9. doi:10.1016/j.smim.2003.10.003
196. Takeda K, Akira S. Toll-Like Receptors. *Curr Protoc Immunol*. 2015;109(1):14.12.1-14.12.10. doi:10.1002/0471142735.im1412s109
197. Termeer C, Benedix F, Sleeman J, et al. Oligosaccharides of Hyaluronan Activate Dendritic Cells via Toll-like Receptor 4. *J Exp Med*. 2002;195(1):99-111. doi:10.1084/jem.20001858

198. Toledo C, Thomas G, Schold JD, et al. Renal Resistive Index and Mortality in Chronic Kidney Disease. *Hypertension*. 2015;66(2):382-388. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05536
199. Triposkiadis F, Karayannis G, Giamouzis G, Skoularigis J, Louridas G, Butler J. The Sympathetic Nervous System in Heart Failure: Physiology, Pathophysiology, and Clinical Implications. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54(19):1747-1762. doi:10.1016/j.jacc.2009.05.015
200. Tükel Ç, Wilson RP, Nishimori JH, Pezeshki M, Chromy BA, Bäuml AJ. Responses to Amyloids of Microbial and Host Origin Are Mediated through Toll-like Receptor 2. *Cell Host Microbe*. 2009;6(1):45-53. doi:10.1016/j.chom.2009.05.020
201. Turvey SE, Broide DH. Innate immunity. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(2):S24-S32. doi:10.1016/j.jaci.2009.07.016
202. Tzeng H-P, Fan J, Vallejo JG, et al. Negative inotropic effects of high-mobility group box 1 protein in isolated contracting cardiac myocytes. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2008;294(3):H1490-H1496. doi:10.1152/ajpheart.00910.2007
203. Umanath K, Lewis JB. Update on Diabetic Nephropathy: Core Curriculum 2018. *Am J Kidney Dis*. 2018;71(6):884-895. doi:10.1053/j.ajkd.2017.10.026
204. Vanholder R, Schepers E, Pletinck A, Nagler EV, Glorieux G. The Uremic Toxicity of Indoxyl Sulfate and p-Cresyl Sulfate: A Systematic Review. *J Am Soc Nephrol*. 2014;25(9):1897-1907. doi:10.1681/asn.2013101062
205. Vanholder R, Gryp T, Glorieux G. Urea and chronic kidney disease: the comeback of the century? (in uraemia research). *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2018;33(1):4-12. doi:10.1093/ndt/gfx039
206. Vaziri ND, Yuan J, Rahimi A, Ni Z, Said H, Subramanian VS. Disintegration of colonic epithelial tight junction in uremia: a likely cause of CKD-associated inflammation. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2011;27(7):2686-2693. doi:10.1093/ndt/gfr624
207. Vaziri ND, Yuan J, Norris K. Role of Urea in Intestinal Barrier Dysfunction and Disruption of Epithelial Tight Junction in Chronic Kidney Disease. *Am J Nephrol*. 2013;37(1):1-6. doi:10.1159/000345969
208. Vaziri ND, Zhao Y-Y, Pahl MV. Altered intestinal microbial flora and impaired epithelial barrier structure and function in CKD: the nature, mechanisms, consequences and potential treatment. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2015;31(5):737-746. doi:10.1093/ndt/gfv095
209. Veelken R, Schmieder RE. Renal denervation—implications for chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol*. 2014;10(6):305-313. doi:10.1038/nrneph.2014.59

210. Verma R, Niraimathi M, Prasad P, Agrawal V. Dihydroxyadenine crystal-induced nephropathy presenting with rapidly progressive renal failure. *Kidney Res Clin Pract.* 2018;37(3):287-291. doi:10.23876/j.krcp.2018.37.3.287
211. Verzola D, Bonanni A, Sofia A, et al. Toll-like receptor 4 signalling mediates inflammation in skeletal muscle of patients with chronic kidney disease. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle.* 2017;8(1):131-144. doi:10.1002/jcsm.12129
212. Viaene L, Annaert P, de Loor H, Poesen R, Evenepoel P, Meijers B. Albumin is the main plasma binding protein for indoxyl sulfate and p-cresyl sulfate. *Biopharm Drug Dispos.* 2013;34(3):165-175. doi:10.1002/bdd.1834
213. Vlassara H, Torreggiani M, Post JB, Zheng F, Uribarri J, Striker GE. Role of oxidants/inflammation in declining renal function in chronic kidney disease and normal aging. *Kidney Int.* 2009;76(114):S3-S11. doi:10.1038/ki.2009.401
214. Watanabe H, Iwanaga Y, Miyaji Y, Yamamoto H, Miyazaki S. Renal denervation mitigates cardiac remodeling and renal damage in Dahl rats: a comparison with  $\beta$ -receptor blockade. *Hypertens Res.* 2016;39(4):217-226. doi:10.1038/hr.2015.133
215. Watanabe I, Tatebe J, Fujii T, et al. Prognostic Utility of Indoxyl Sulfate for Patients with Acute Coronary Syndrome. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis.* 2019;26(1):64-71. doi:10.5551/jat.44149
216. Watanabe I, Tatebe J, Fujii T, et al. Prognostic Significance of Serum Indoxyl Sulfate and Albumin for Patients with Cardiovascular Disease. *Int Heart J.* 2019;60(1):129-135. doi:10.1536/ihj.18-116
217. Watkins SJ, Borthwick GM, Arthur HM. The H9C2 cell line and primary neonatal cardiomyocyte cells show similar hypertrophic responses in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2011;47(2):125-131. doi:10.1007/s11626-010-9368-1
218. Watson A, Hood S, May C. Mechanisms of sympathetic activation in heart failure. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2006;33(12):1269-1274. doi:10.1111/j.1440-1681.2006.04523.x
219. Weibel ER, Gomez DM. A principle for counting tissue structures on random sections. *J Appl Physiol.* 1962;17(2):343-348. doi:10.1152/jappl.1962.17.2.343
220. Wen Y, Parikh CR. Current concepts and advances in biomarkers of acute kidney injury. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2021;58(5):354-368. doi:10.1080/10408363.2021.1879000
221. Wong J, Piceno YM, DeSantis TZ, Pahl M, Andersen GL, Vaziri ND. Expansion of Urease- and Uricase-Containing, Indole- and p-Cresol-Forming and Contraction of Short-Chain Fatty Acid-Producing Intestinal Microbiota in ESRD. *Am J Nephrol.* 2014;39(3):230-237. doi:10.1159/000360010

222. Xiao B, Liu F, Jin Y-H, et al. Renal sympathetic denervation attenuates left ventricle hypertrophy in spontaneously hypertensive rats by suppressing the Raf/MEK/ERK signaling pathway. *Clin Exp Hypertens.* 2021;43(2):142-150. doi:10.1080/10641963.2020.1833022
223. Xiao L, Kirabo A, Wu J, et al. Renal Denervation Prevents Immune Cell Activation and Renal Inflammation in Angiotensin II-Induced Hypertension. *Circ Res.* 2015;117(6):547-557. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.306010
224. Xiao Z, Kong B, Yang H, et al. Key Player in Cardiac Hypertrophy, Emphasizing the Role of Toll-Like Receptor 4. Review. *Front Cardiovasc Med.* 2020;7doi:10.3389/fcvm.2020.579036
225. Yamaguchi K, Yisireyili M, Goto S, et al. Indoxyl Sulfate Activates NLRP3 Inflammasome to Induce Cardiac Contractile Dysfunction Accompanied by Myocardial Fibrosis and Hypertrophy. *Cardiovasc Toxicol.* 2022;22(4):365-377. doi:10.1007/s12012-021-09718-2
226. Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM. Soluble RAGE: Therapy and biomarker in unraveling the RAGE axis in chronic disease and aging. *Biochem Pharmacol.* 2010;79(10):1379-1386. doi:10.1016/j.bcp.2010.01.013
227. Yang K, Xu X, Nie L, et al. Indoxyl sulfate induces oxidative stress and hypertrophy in cardiomyocytes by inhibiting the AMPK/UCP2 signaling pathway. *Toxicol Lett.* 2015;234(2):110-119. doi:10.1016/j.toxlet.2015.01.021
228. Yang S, Sugawara S, Monodane T, et al. Micrococcus luteus Teichuronic Acids Activate Human and Murine Monocytic Cells in a CD14- and Toll-Like Receptor 4-Dependent Manner. *Infect Immun.* 2001;69(4):2025-2030. doi:10.1128/iai.69.4.2025-2030.2001
229. Yang ZK, Shen Y, Shen WF, et al. Elevated glycated albumin and reduced endogenous secretory receptor for advanced glycation endproducts levels in serum predict major adverse cardio-cerebral events in patients with type 2 diabetes and stable coronary artery disease. *Int J Cardiol.* 2015;197:241-247. doi:10.1016/j.ijcard.2015.06.003
230. Ye S, Lin K, Wu G, et al. Toll-like receptor 2 signaling deficiency in cardiac cells ameliorates Ang II-induced cardiac inflammation and remodeling. *Translational Research.* 2021;233:62-76. doi:10.1016/j.trsl.2021.02.011
231. Yisireyili M, Shimizu H, Saito S, Enomoto A, Nishijima F, Niwa T. Indoxyl sulfate promotes cardiac fibrosis with enhanced oxidative stress in hypertensive rats. *Life Sci.* 2013;92(24):1180-1185. doi:10.1016/j.lfs.2013.05.008
232. Yokozawa T, Zheng PD, Oura H, Koizumi F. Animal Model of Adenine-Induced Chronic Renal Failure in Rats. *Nephron.* 1986;44(3):230-234. doi:10.1159/000183992

233. Yonekura H, Yamamoto Y, Sakurai S, et al. Novel splice variants of the receptor for advanced glycation end-products expressed in human vascular endothelial cells and pericytes, and their putative roles in diabetes-induced vascular injury. *Biochem J.* 2003;370(3):1097-1109. doi:10.1042/bj20021371
234. Yoshikawa D, Ishii H, Suzuki S, et al. Plasma Indoxyl Sulfate and Estimated Glomerular Filtration Rate – Association With Long-Term Clinical Outcome in Patients With Coronary Artery Disease –. *Circ J.* 2014;78(10):2477-2482. doi:10.1253/circj.CJ-14-0401
235. Zewinger S, Speer T, Kleber ME, et al. HDL Cholesterol Is Not Associated with Lower Mortality in Patients with Kidney Dysfunction. *J Am Soc Nephrol.* 2014;25(5):1073-1082. doi:10.1681/asn.2013050482
236. Zhang D, Bi X, Liu Y, et al. High Phosphate-Induced Calcification of Vascular Smooth Muscle Cells is Associated with the TLR4/NF-kb Signaling Pathway. *Kidney Blood Press Res.* 2017;42(6):1205-1215. doi:10.1159/000485874
237. Zhang J, Han X, Chang J, et al. Soluble RAGE attenuates myocardial I/R injuries via FoxO3–Bnip3 pathway. *Cell Mol Life Sci.* 2022;79(5):269. doi:10.1007/s00018-022-04307-0
238. Zhang L, Bukulin M, Kojro E, et al. Receptor for advanced glycation end products is subjected to protein ectodomain shedding by metalloproteinases. *J Biol Chem.* 2008;283(51):35507-16. doi:10.1074/jbc.M806948200
239. Zhang L, Yang X, Jiang G, et al. HMGB1 enhances mechanical stress-induced cardiomyocyte hypertrophy in vitro via the RAGE/ERK1/2 signaling pathway. *Int J Mol Med.* 2019;44(3):885-892. doi:10.3892/ijmm.2019.4276
240. Zhou Y, Fang L, Jiang L, et al. Uric Acid Induces Renal Inflammation via Activating Tubular NF-κB Signaling Pathway. *PLoS One.* 2012;7(6):e39738. doi:10.1371/journal.pone.0039738
241. Zhu H, Pan L, Dai Y, Zheng D, Cai S. Role of TLR4/MyD88 Signaling Pathway in the Occurrence and Development of Uremia-Induced Myocardial Hypertrophy and Possible Mechanism. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2021;2021:7883643. doi:10.1155/2021/7883643
242. Zoccali C, Benedetto FA, Mallamaci F, et al. Left ventricular mass monitoring in the follow-up of dialysis patients: Prognostic value of left ventricular hypertrophy progression. *Kidney Int.* 2004;65(4):1492-1498. doi:10.1111/j.1523-1755.2004.00530.x
243. Zoccali C, Vanholder R, Massy ZA, et al. The systemic nature of CKD. *Nat Rev Nephrol.* 2017;13(6):344-358. doi:10.1038/nrneph.2017.52

## 7 Publikationsliste

### Originalarbeiten

- Hohl M, Selejan SR, Wintrich J, Lehnert U, Speer T, Schneider C, Mauz M, **Markwirth P**, Wong DWL, Boor P, Kazakov A, Mollenhauer M, Linz B, Klinkhammer BM, Hübner U, Ukena C, Moellmann J, Lehrke M, Wagenpfeil S, Werner C, Linz D, Mahfoud F, Böhm M. **Renal Denervation Prevents Atrial Arrhythmogenic Substrate Development in CKD.** *Circ Res.* 2022;130(6):814–828
- Mauz M, Selejan SR, Hohl M, **Markwirth P**, Blaumer J, Slawik J, Speer T, Jankowski J, Mahfoud F, Böhm M. **Renal denervation reverses left atrial fibrosis in chronic kidney disease – role of collagenase activity.** *submitted*
- **Markwirth P**, Selejan SR, Hohl M, Schunk S, Müller A, Kahles F, Tokcan M, Therre M, van der Vorst E, Rau M, Mahfoud F, Böhm M. **Renal denervation improves uremic cardiomyopathy in rats with chronic kidney disease.** *submitted*
- Buder F, Hohl M, Selejan SR, **Markwirth P**, Pfau V, Linz D, Mahfoud F, Böhm M. **Effects of renal denervation on cardiac and renal damage in different CKD rat models.** *submitted*
- Selejan SR, Mauz M, Hohl M, **Markwirth P**, Blaumer J, Bettink S, Speer T, Wintrich J, Kazakov A, Mahfoud F, Böhm M. **Atrial arrhythmogenic substrate in chronic kidney disease – the role of sympathoadrenergic innervation and “Receptor for Advanced Glycation End products (RAGE)”.** *Submitted*
- Therre M, Hohl M, Selejan SR, Lauder L, Tokcan M, **Markwirth P**, Engler H, Hübner U, Müller A, Konstandin M, Böhm M, Mahfoud M. **Renal denervation attenuates macrophage M2 polarization, myocardial fibrosis and left ventricular dysfunction in rats with myocardial infarction.** *Submitted*
- **Markwirth P**, Haring B. **Age- and sex-specific physiological cardiac remodeling: the search for the Fountain of Youth.** *Clin Res Cardiol.* 2024 Mar 18. doi: 10.1007/s00392-024-02431-4. Epub ahead of print.

- Haring B, **Markwirth P**, Böhm M. **Age-Related Changes of Pulmonary Artery Systolic Pressure: Prevention Is Key.** J Am Coll Cardiol. 2023;82(23):2193–2196
- Hoevelmann J, **Markwirth P**, Tokcan M, Haring B. **What's new in heart failure? August–September 2024.** Eur J Heart Fail. 2024;26:1665–1668.

### Posterbeiträge

- **Markwirth P**, Selejan SR, Hohl M, Blaumer J, Speer T, Mahfoud F, Böhm M. **Renale Denervation reduziert die Indoxylsulfat-Plasmakonzentration und verhindert eine linksventrikuläre Hypertrophie in einem Rattenmodell der chronischen Niereninsuffizienz.** 129. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin, April 2023, Wiesbaden, Deutschland
- **Markwirth P**, Selejan SR, Hohl M, Blaumer J, Schunk S, Speer T, Mahfoud F, Böhm M. **Renal denervation reduces plasma indoxyl sulfate and prevents left ventricular hypertrophy in a rat model of chronic kidney disease.** Aachen Conference on Cardiovascular Disease and Diabetes, November 2023, Aachen, Germany
- **Markwirth P**, Selejan SR, Mauz M, Hohl M, Blaumer J, Slawik J, Speer T, Jankowski J, Mahfoud F, Böhm M. **Renale Denervation führt zur Rückbildung linksatrialer Fibrose bei chronischer Nierenerkrankung – Rolle der Kollagenase-Aktivität.** 90. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, April 2024, Mannheim, Deutschland
- **Markwirth P**, Selejan SR, Hohl M, Blaumer J, Mauz M, Kazakov A, Triem S, Speer T, Böhm M. **Left ventricular anti-hypertrophic effects of renal denervation in a rat model of adenine-induced nephropathy.** 126. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin, April 2020, Wiesbaden, Deutschland
- Mauz M, Selejan SR, Hohl M, **Markwirth P**, Blaumer J, Triem S, Speer T, Böhm M. **Effekte renaler Denervation auf das atriale Remodeling im Rattenmodell für chronische Niereninsuffizienz.** 126. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin, April 2020, Wiesbaden, Deutschland
- Mauz M, Selejan SR, Hohl M, **Markwirth P**, Blaumer J, Bettink S, Speer T, Kazakov A, Wintrich J, Mahfoud F, Böhm M. **Linksatriales metabolisches und interstitielles Remodelling bei chronischer Niereninsuffizienz –**

- Rolle von sympathoadrenerger Aktivität und RAGE.** 88. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, April 2022, Mannheim, Deutschland
- Blaumer J, Selejan S, Hohl M, **Markwirth P**, Speer T, Mahfoud F, Boor P, Böhm M. **Modulation of renal sympathetic activity and its effects on LV and renal re-modeling in adenine induced nephropathy – potential role of IL-17A.** Aachen Conference on Cardiovascular Disease and Diabetes, November 2019, Aachen, Germany
  - Selejan S, Hohl M, **Markwirth P**, Blaumer J, Mauz M, Lehnert U, Triem S, Speer T, Boor P, Böhm M. **Effects of renal denervation on atrial remodeling in a rat model of CKD.** Aachen Conference on Cardiovascular Disease and Diabetes, November 2019, Aachen, Germany
  - Buder F, Hohl M, Selejan SR, **Markwirth P**, Linz D, Mahfoud F, Böhm M. **Effects of renal denervation on cardiac and renal damage in different chronic kidney disease rat models.** DGK Herztage, Oktober 2023, Bonn, Deutschland

### Auszeichnungen

- Posterpreis 2023 in der Kategorie „Systemische Manifestationen von Organerkrankungen“ für die Arbeit „Renale Denervation reduziert die Indoxylsulfat-Plasmakonzentration und verhindert eine linksventrikuläre Hypertrophie in einem Rattenmodell der chronischen Niereninsuffizienz“. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin, April 2023, Wiesbaden, Deutschland

### Vorträge

- **Markwirth P. Renale Denervation als therapeutische Option bei Vorhofflimmern und Niereninsuffizienz?** Maserclass Herzinsuffizienz: „Bench to Bedside“: HI.Therapie 2030 – Neues aus der Forschung, Juni 2023, Frankfurt am Main, Deutschland

## 8 Danksagungen

Mein Dank gilt in erster Linie Herrn Prof. Dr. Michael Böhm für die Erlassung des Themas sowie die exzellente fachliche Unterstützung.

Des Weiteren bedanke ich mich herzlich bei Dr. Simina Selejan für die ausgezeichnete Betreuung dieser Arbeit. Ein großes Dankeschön gilt ebenfalls Laura Frisch, die mich in die Methoden einwies und mir tatkräftig bei den Experimenten zur Seite stand.

Nicht zuletzt spreche ich dem gesamten Labor-Team der Inneren Medizin III meinen Dank aus, insbesondere Dr. Mathias Hohl für wissenschaftliche Anregungen sowie Dr. Andrey Kazakov für die Einweisung in die Immunfluoreszenzmikroskopie.

Zudem bedanke ich mich bei den Kollegen der Nephrologie für die gute Zusammenarbeit und die Bestimmung der Nierenretentionsparameter.

Herrn Dr. Ulrich Hübner aus der Klinischen Chemie danke ich besonders für die Durchführung der Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie.

Ferner gilt Herrn Dr. Andreas Müller aus der Radiologie mein Dank für die Durchführung der MRT-Aufnahmen.

Außerdem möchte ich meiner lieben Kommilitonin Ulrike Lehnert meinen besonderen Dank aussprechen, die mich im gesamten Studium stets begleitet hat. Besten Dank für die zahlreichen anregenden Diskussionen!

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei meinen Eltern Monika und Torsten sowie meiner Zwillingschwester Janina für die unentwegte emotionale Unterstützung während des gesamten Studiums bedanken.

## **9 Lebenslauf**

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