

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

**Die Rolle der Aktivierung des renalen sympathischen
Nervensystems auf die Entwicklung eines atrialen
proarrhythmischen Substrates in einem hypertensiven
Rattenmodell mit chronischer Niereninsuffizienz**

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

2025

vorgelegt von: Anika Jutta Schulz
geb. am 21.01.1999 in Saarbrücken

Tag der Promotion: 21.10.2025

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. dent. Matthias Hannig

1. Berichterstatter: Universitätsprofessor Dr. med. Michael Böhm

Berichterstattende: Universitätsprofessorin Dr. med. Julia Heinzelbecker

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis.....	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Zusammenfassung	1
2 Abstract	3
3 Einleitung	5
3.1 Bluthochdruck	5
3.1.1 Definition und Klassifikation	5
3.1.2 Epidemiologie	6
3.1.3 Ätiologie	6
3.1.4 Pathophysiologie	7
3.1.5 Klinik	8
3.1.6 Therapie	8
3.2 Chronische Nierenerkrankung (CKD)	10
3.2.1 Definition.....	10
3.2.2 Klassifikation.....	11
3.2.3 Epidemiologie	12
3.2.4 Ätiologie	13
3.2.5 Pathophysiologie	13
3.2.6 Klinik	14
3.2.7 Therapie	15
3.3 Vorhofflimmern	16
3.3.1 Definition.....	16
3.3.2 Epidemiologie	17
3.3.3 Pathophysiologie	18
3.3.4 Klinik	20
3.3.5 Therapie	20
3.3.6 Arterielle Hypertonie und VHF	23
3.3.7 CKD und VHF	24
3.4 Oxidativer Stress	25
3.5 Die Rolle des RAAS	27
3.6 Das kardiale Hormon BNP	29
3.7 Renale Denervation.....	30
3.8 Fragestellung und Ziele	31
4 Materialien und Methoden	34
4.1 Materialien	34
4.2 Methoden	36

4.2.1	Tiermodelle.....	36
4.2.1.1	Spontan hypertensive Ratten (SHR)	36
4.2.1.2	Das hypertensive CKD-Rattenmodell.....	37
4.2.2	Versuchsablauf.....	38
4.2.3	Katheter-basierte Telemetrie	39
4.2.4	Renale Denervation.....	41
4.3	EKG.....	42
4.4	Western Blot	44
4.4.1	Proteinisolierung.....	44
4.4.2	Protein-Bestimmung.....	45
4.4.3	SDS-PAGE	46
4.4.4	Gelherstellung	47
4.4.5	Elektrophorese	48
4.4.6	Transferblot	50
4.4.7	Immundetektion.....	52
4.5	Amplifikation isolierter mRNA mittels der Polymerase-Kettenreaktion.....	55
4.5.1	RNA-Isolation	55
4.5.2	DNase-Verdau.....	57
4.5.3	Reverse Transkriptase PCR (cDNA-Synthese).....	57
4.5.4	Real-time PCR	58
4.6	Histologie	60
4.6.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE).....	61
4.6.2	Pikro-Siriusrot-Färbung	64
4.6.3	Tyrosin-Hydroxylase-Färbung.....	67
4.7	Statistik	68
5	Ergebnisse	69
5.1	Allgemeine Tierdaten.....	69
5.1.1	Tiergewicht, Aufnahme von Futter und Wasser	69
5.1.2	Mittlerer arterieller Blutdruck und Herzfrequenz	73
5.1.3	Nierenfunktion	76
5.2	Renale Expression ROS-produzierender und anti-oxidativ wirkender Proteine	78
5.3	Renale Expression Katecholamin-produzierender Proteine.....	85
5.4	Renales Remodeling	87
5.5	Strukturelles Remodeling des linken Vorhofs	89
5.5.1	Hypertrophie der Vorhofmyozyten	89
5.5.2	Atriale interstitielle Fibrose	91
5.5.3	Linksatriale sympathische Aktivierung.....	91
5.6	Elektrophysiologisches Remodeling des linken Vorhofs	93

5.7	Strukturelles Remodeling im linken Ventrikel.....	96
6	Diskussion	99
6.1	Blutdruckentwicklung.....	99
6.2	Renale Denervation.....	100
6.3	Renales Remodeling	102
6.3.1	Renale Expression ROS-produzierender und anti-oxidativ wirkender Proteine 104	
6.4	Kardiales Remodeling	106
6.4.1	Strukturelles und elektrophysiologisches Remodeling des linken Vorhofs....	106
6.4.2	Remodeling des linken Ventrikels.....	108
6.5	Klinische Relevanz	113
	Literaturverzeichnis	115
	Poster	123
	Danksagung	124
	Eidesstattliche Versicherung.....	125
	Lebenslauf.....	126

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Klassifikation der CKD	12
Abbildung 2: Exemplarische EKG-Ausschnitte der Versuchstiere im Sinusrhythmus und atrialer arrhythmischer Episode	17
Abbildung 3: Ziele der Arbeit.....	33
Abbildung 4: Entstehung von 2,8-Dihydroxyadenin bei Adenin-Überschuss	38
Abbildung 5: Versuchsablauf	39
Abbildung 6: Implantation der Messsonde zur Katheter-basierten Telemetrie.....	40
Abbildung 7: Intraaortal implantierte Messsonde des Telemetrieimplantats	41
Abbildung 8: Renale Denervation	42
Abbildung 9: EKG-Ableitung	43
Abbildung 10: Beispiel EKG.....	44
Abbildung 11: peqGOLD Protein Marker III.....	50
Abbildung 12: Schematischer Aufbau eines Western-Blots.....	51
Abbildung 13: Fluoreszenz-Nachweis mittels TaqMan-Sonde	60
Abbildung 14: Ausmessen des Kardiomyozyten-Diameters mit Hilfe des Computerprogramms Image Scope.....	63
Abbildung 15: Speichern der ausgemessenen Daten mittels des Computerprogramms Image Scope.....	63
Abbildung 16 Linker Ventrikel (LV) nach Pikro-Siriusrot Färbung.....	65
Abbildung 17: Linker Vorhof (LA) nach Pikro-Siriusrot Färbung	66
Abbildung 18: Tyrosin-Hydroxylase-Färbung sympathischer Nervenfasern im linken Ventrikel (LV)	68
Abbildung 19: Tiergewichte.....	70
Abbildung 20: Tiergewichte	71
Abbildung 21: Futtermenge	72
Abbildung 22: Wasseraufnahme	73
Abbildung 23: Blutdruckwerte nach 16 Wochen und finale Differenz zur Baseline des Mittleren arteriellen Drucks (MAP) und der Herzfrequenz (HF) [bpm].....	75
Abbildung 24: Nierenfunktionsparameter im Plasma zum Zeitpunkt des Versuchsendes	77
Abbildung 25: Nierenfunktionsparameter im Urin zum Zeitpunkt des Versuchsendes	78
Abbildung 26: Renale Expression des ROS-produzierenden Enzyms NADPH-Oxidase 2 (Nox 2).....	79
Abbildung 27: Renale Expression des ROS-produzierenden Enzyms Xanthin-Oxidase (XO)	80
Abbildung 28: Renale Expression des antioxidativen Enzyms Superoxid-Dismutase 1 (SOD1).....	81

Abbildung 29: Renale Expression des antioxidativen Enzyms Superoxid-Dismutase 2 (SOD2).....	82
Abbildung 30: Renale Expression des antioxidativen Enzyms Katalase	83
Abbildung 31: Renale Expression des antioxidativen Enzyms Peroxiredoxin 3 (PrxIII).....	84
Abbildung 32: Renale Expression des antioxidativen Enzyms Häm-Oxygenase 1 (HO-1) ...	85
Abbildung 33: Renale Expression Katecholamin-produzierender Enzyme	86
Abbildung 34: Anzahl der renalen 2,8-Dihydroxyadenin Kristalle	88
Abbildung 35: Größenbezogene Nierengewichte.....	89
Abbildung 36: Kardiomyozytenhypertrophie im linken Vorhof (LA).....	90
Abbildung 37: Interstitielle Fibrose im linken Vorhof (LA)	91
Abbildung 38: Tyrosinhydroxylase-Gehalt im linken Vorhof (LA).....	92
Abbildung 39: EKG-Ausschnitte zur Auswertung im Hinblick auf das elektrophysiologische Remodeling	94
Abbildung 40: Auswertung der EKGs im Hinblick auf das elektrophysiologische Remodeling	95
Abbildung 41 Kardiomyozytenhypertrophie im linken Ventrikel (LV)	97
Abbildung 42: Interstitielle Fibrose im linken Ventrikel (LV)	98
Abbildung 43: Zusammenschau aller Ergebnisse	112

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifikation der Hypertonie	6
Tabelle 2: Primärantikörper Western Blot.....	54
Tabelle 3: Sekundärantikörper Western Blot.....	55
Tabelle 4: Taq-Man Sonden	59

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Ampere
A.	Arteria
ACE	Angiotensin-Converting-Enzym
Ad	Adenin
AMP	Adenosinmonophosphat
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
APRT	Adenin-Phosphoribosyltransferase
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ARE	antioxidant response element (Antioxidans-Reaktionselement)
AT ₁	Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp-1
ATP	Adenosintriphosphat
AV	atrioventrikulär
BMI	Body Mass Index
bmp	Beats per minute (Schläge pro Minute)
BNP	brain natriuretic peptide (B-Typ natriuretisches Peptid)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAT	Catalase (Katalase)
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CI	Konfidenzintervall
CKD	chronic kidney disease (chronische Nierenerkrankung)
CO	Kohlenstoffmonoxid
CVD	cardiovascular disease (kardiovaskuläre Erkrankung)
d	Tag
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DGK	Deutsche Gesellschaft für Kardiologie
DHA	2,8-Dihydroxyadenin
dl	Deziliter
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
eGFR	estimated glomerular filtration (geschätzte glomeruläre Filtrationsrate)
EKG	Elektrokardiogramm

ESC	European Society of Cardiologie (europäische Fachgesellschaft der Kardiologen)
et al.	et alii
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid
h	Stunde
H ⁺	Wasserstoff-Ion
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HE	Hämatoxylin-Eosin
HF	Herzfrequenz
HO	Häm-Oxygenase
HO·	Hydroxyl-Radikal
HPLC	high pressure liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
IOD	Integrated Optical Density
kDA	Kilodalton
KDIGO	Kidney Disease: Improving Global Outcomes
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KHK	koronare Herzerkrankung
Ko	Kontrolle/n
L	Liter
LA	Linkes Atrium (linker Vorhof)
LV	Linker Ventrikel (linke Kammer)
LVEF	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
m	Meter
M	Mol
m ²	Quadratmeter
MAP	mean arterial pressure (mittlerer arterieller Druck)
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Milimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mmol	Millimol
mRNA	messenger RNA (Boten-RNA)
ms	Millisekunden

n	Anzahl
N ₂ O ₃	Distickstofftrioxid
Na ⁺	Natrium-Ion
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid (oxidierte Form)
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (oxidierte Form)
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduzierte Form)
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NO [·]	Stickstoffmonooxid-Radikal
NO ₂ [·]	Stickstoffdioxid-Radikal
NOAK	neue orale Antikoagulantien
Nox	NADPH-Oxidase
NT-proBNP	N-terminal pro-brain natriuretic peptide
O ₂	Sauerstoff
O ₂ ^{-·}	Superoxid-Anion
O ₂ ²⁻	Peroxidanion
PBS-T	phosphate-buffered saline tween (Phosphat-gepufferte Salzlösung mit Tween)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRPP	5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat
Prx	Peroxiredoxin
PVI	Pulmonalvenenisolation
QTc	frequenzkorrigierte QT-Zeit
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RDN	renale Denervation
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNS	Reaktive Stickstoffspezies
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
s	Sekunde
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelektrophorese)
SEM	Standard error of the mean (Standardfehler)
SHR	Spontan hypertensive Ratte/n
SOD	Superoxid-Dismutase
sog.	sogenannte/-er/-es
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TH	Tyrosinhydroxylase
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

U	Umdrehungen
u.a.	unter anderem
V	Volt
vgl.	vergleiche
VHF	Vorhofflimmern
vs.	versus
WHO	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)
XO	Xanthin-Oxidase
z.B.	zum Beispiel
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer

1 Zusammenfassung

Die arterielle Hypertonie und die chronische Nierenerkrankung (CKD) sind durch gemeinsame Risikofaktoren und pathophysiologische Vorgänge eng miteinander verbundene Erkrankungen. Dabei führt die arterielle Hypertonie wie die chronische Nierenerkrankung zu einer Überaktivität des sympathischen Nervensystems. Diese erhöhte sympathische Aktivität spielt eine relevante Rolle bei der Entstehung von Vorhofflimmern und erhöht durch strukturelle, biochemische und elektrische Remodeling-Vorgänge die Inzidenz atrialer Arrhythmien. Aufgrund weltweit hoher Prävalenz der betrachteten Erkrankungen und einem gesteigerten Einfluss auf Morbidität und Mortalität war das Ziel dieses experimentellen Modells der kardiovaskulären Komorbiditäten bei CKD, den Einfluss der Aktivierung des renalen sympathischen Nervensystems auf die Entwicklung eines atrialen proarrhythmischen Substrates in einem Hypertensiven Rattenmodell mit CKD eingehend zu untersuchen.

Methoden: Männliche Spontan Hypertensive Ratten (SHR) erhielten für insgesamt 16 Wochen ausschließlich 0,25 % Adenin-haltiges Spezialfutter, um eine CKD zu induzieren. Nach vier Wochen Fütterung mit Adenin-Futter erfolgte bei der Hälfte der Tiere (n=4) eine beidseitige renale Denervation zur Modulation des sympathischen Nervensystems (Ad+RDN: Interventionsgruppe). Die verbleibenden SHR (n=4) wurden einer Sham-Operation unterzogen (Ad). Als Kontrolltiere (Ko) dienten vier SHR, welche mit einer normalen Haltungsdiät ernährt wurden und nach vier Wochen einer Sham-operation unterzogen wurden. Die Entwicklung des Blutdrucks über den Versuchszeitraum wurden wöchentlich mittels Katheter-basierter Telemetrie durchgeführt. Zur Überprüfung der Nierenparameter wurde alle zwei Wochen die Konzentration von Kreatinin und Harnstoff jeweils im Serum und Urin erfasst. Zur Bestimmung des elektrischen Remodelings wurden EKG-Aufzeichnungen verwendet. Zur Erfassung des strukturellen und biochemischen Remodelings wurde nach 16 Wochen das Gewebe von Niere und Herz mittels Western Blots, Polymerase-Kettenreaktion und Gewebe-Histologie untersucht.

Ergebnisse: Die Fütterung mit 0,25 % Adenin-haltigem Spezialfutter führte zu Versuchsende hin zu deutlich erhöhten Plasma Harnstoff und Kreatinin Werten im Vergleich zur Kontrolle, was auf die Ausbildung einer Nierenschädigung schließen lässt. Diese Adenin-induzierte Nephropathie war mit einer erhöhten renalen Expression der Xanthin-Oxidase, der Häm-Oxygenase 1 (HO-1) sowie reduzierten Katalase-Level assoziiert, was auf eine schwere Schädigung der Nieren schließen lässt. Die renale Denervation führte in den Adenin-gefütterten Tieren zu keiner Verbesserung dieser Nierenparameter. In Adenin-gefütterten Tieren führte eine renal Denervation zu einem deutlich reduzierten renalen Norepinephrin-Gehalt (Ad: $89,47 \pm 16,06$ ng/mg vs. Ad+RDN: $29,08 \pm 13,31$ ng/mg, $p=0,007$) als auch zu einer

verringerten Expression der renalen Tyrosin-Hydroxylase (TH) (Ad: $1,53\pm0,26$ IOD/GAPDH vs. Ad+RDN: $0,73\pm0,26$ IOD/GAPDH, $p=0,05$). Der mittlere arterielle Druck und die Herzfrequenz blieben trotz bestehender Niereninsuffizienz auf dem Niveau der SHR-Kontrollgruppe.

Die Auswirkung der chronischen Nierenerkrankung auf das pro-arrhythmische atriale Remodeling zeigte sich in Form einer deutlich erhöhten interstitiellen Fibrose im linken Vorhof der Adenin-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (Ad: $12,82\pm2,87$ % vs. Ko: $6,1\pm0,75$ %, $p=0,06$), einer erhöhten Anzahl atrialer TH-positiver Zellen (Ad: $10,19\pm1,18$ vs. Ko: $4,69\pm0,23$, $p=0,01$) und einer verlängerter P-Wellen Dauer (Ad: $29,6\pm1,9$ ms vs. Ko: $25,7\pm0,7$ ms, $p=0,13$). Die renale Denervation führte in den Adenin-gefütterten Tieren zu einer numerischen, aber nicht signifikanten Reduktion der links atrialen interstitiellen Fibrose (Ad+RDN: $8,80\pm1,29\%$, $p=0,99$ vs. Ad), einer verringerten Anzahl an TH-positiven Zellen (Ad+RDN: $6,87\pm0,89$, $p=0,42$ vs. Ad) und einer Tendenz zur Verkürzung der P-Welle (Ad+RDN: $27,0\pm0,4$ ms, $p=0,99$ vs. Ad). Das strukturelle und elektrische Remodeling des Vorhofs war unabhängig von Veränderungen des linken Ventrikels. Hier konnten kein Einfluss einer CKD auf Herzgewicht, den linksventrikulären Kardiomyozyten Diameter, die linksventrikuläre BNP-Expression oder die linksventrikuläre interstitielle Fibrose im Vergleich zur SHR-Kontrolle festgestellt werden.

Fazit: Die Adenin-induzierte Nephropathie führte in spontan hypertensiven Ratten zu einer Zunahme der interstitiellen atrialen Fibrose, einer vermehrten sympathischen Innervation des linken Vorhofs und einer Verlängerung der P-Welle. Demnach begünstigt eine Nierenerkrankung die Ausbildung eines pro-arrhythmischen Substrates im Vorhof hypertensiver Ratten. In Adenin-gefütterten SHR führte eine renale Denervation zu erniedrigten Norepinephrin-Konzentrationen und reduzierter TH-Expression in den Nieren. Diese Modulation des sympathischen Nervensystems war verbunden mit einer numerisch deutlich erniedrigten Fibrotisierung, einer verminderten Anzahl an TH-positiven Zellen im linken Vorhof und einer tendenziellen Verkürzung der P-Welle. Demzufolge könnte die renale Denervation bei Bluthochdruck-Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz das Auftreten von Vorhofflimmern reduzieren.

2 Abstract

Arterial hypertension and chronic kidney disease (CKD) are closely linked diseases due to shared risk factors and pathophysiological processes. Arterial hypertension, like chronic kidney disease, leads to overactivity of the sympathetic nervous system. This increased sympathetic activity plays a relevant role in the development of atrial fibrillation and increases the incidence of atrial arrhythmias through structural, biochemical and electrical remodeling processes. Due to the worldwide high prevalence of these two conditions and an increased impact on morbidity and mortality, the aim of this experimental model of cardiovascular comorbidities in CKD was to investigate the influence of renal sympathetic nervous system activation on the development of an atrial proarrhythmic substrate in a hypertensive rat model with CKD.

Methods: Male spontaneously hypertensive rats (SHR) were exclusively fed a 0.25% adenine-containing diet for a total of 16 weeks to induce CKD. After four weeks, half of the animals ($n=4$) underwent bilateral renal denervation to modulate the sympathetic nervous system (Ad+RDN: intervention group). The remaining adenine-fed SHR ($n=4$) underwent sham surgery (Ad). Four SHR, which were fed a normal standard diet and underwent sham surgery, served as control animals (Ko). The development of blood pressure over the experimental period was monitored weekly using catheter-based telemetry. The concentration of creatinine and urea in serum and urine was recorded every two weeks to validate kidney function. ECG recordings were used to determine electrical remodeling. To determine structural and biochemical remodeling, kidney and heart tissue was examined after 16 weeks using western blots, polymerase chain reaction and tissue histology.

Results: Feeding 0.25 % adenine-containing diet led to significantly increased plasma urea and creatinine levels after 16 weeks compared to the control, indicating the development of renal damage. This adenine-induced nephropathy was associated with increased renal expression of xanthine oxidase, heme oxygenase 1 (HO-1) and reduced catalase levels, indicating severe renal injury. Renal denervation did not improve these renal parameters in the adenine-fed animals. Renal denervation resulted in significantly reduced renal norepinephrine levels in adenine-fed animals (Ad: 89.47 ± 16.06 ng/mg vs. Ad+RDN: 29.08 ± 13.31 ng/mg, $p=0.007$) as well as a reduced expression of renal tyrosine hydroxylase (TH) (Ad: 1.53 ± 0.26 IOD/GAPDH vs. Ad+RDN: 0.73 ± 0.26 IOD/GAPDH, $p=0.05$). Mean arterial pressure and heart rate remained at the level of the SHR control group despite the presence of renal dysfunction.

In SHR, 16 weeks of adenine-induced CKD was associated with significantly increased interstitial fibrosis in the left atrium compared to the control group (Ad: 12.82 ± 2.87 % vs. Ko: 6.1 ± 0.75 %, $p=0.06$), an increased number of atrial TH-positive cells (Ad: 10.19 ± 1.18 vs. Ko: 4.69 ± 0.23 , $p=0.01$) and a prolonged P-wave duration (Ad: 29.6 ± 1.9 ms vs. Ko: 25.7 ± 0.7 ms,

$p=0.13$). In the adenine-fed animals, renal denervation resulted in a numerical but not significant reduction in left atrial interstitial fibrosis (Ad+RDN: $8.80\pm1.29\%$, $p=0.99$ vs. Ad), a reduced number of left atrial TH-positive cells (Ad+RDN: 6.87 ± 0.89 , $p=0.42$ vs. Ad) and a tendency to shorten the P-wave (Ad+RDN: 27.0 ± 0.4 ms, $p=0.99$ vs. Ad). The structural and electrical remodeling of the atrium was independent of changes in the left ventricle. Here, no influence of CKD on heart weight, left ventricular cardiomyocyte diameter, left ventricular BNP expression or left ventricular interstitial fibrosis could be detected compared to SHR control.

Conclusion: In spontaneously hypertensive rats, adenine-induced nephropathy led to an increase in interstitial left atrial fibrosis, increased sympathetic innervation and prolongation of the P wave. Thus, renal disease favors the development of a pro-arrhythmic substrate in the atrium of hypertensive rats. In adenine-fed SHR, renal denervation led to decreased norepinephrine concentrations and reduced TH expression in the kidneys. This modulation of the sympathetic nervous system was associated with a numerically significantly decreased fibrosis formation, a reduced number of TH-positive cells in the left atrium and a tendency to shorten the P-wave. Consequently, renal denervation could be therapy option to reduce the burden of atrial fibrillation in hypertensive patients with CKD.

3 Einleitung

Zur besseren Lesbarkeit wird in dieser Dissertation das generische Maskulinum verwendet. Die in dieser Arbeit verwendeten Personenbezeichnungen beziehen sich – sofern nicht anders kenntlich gemacht – auf alle Geschlechter.

3.1 Bluthochdruck

Die Hypertonie ist definiert als Praxisblutdruckmessung im Sitzen mit systolischen Werten ≥ 140 mmHg und/oder diastolischen Werten ≥ 90 mmHg. Dabei überwiegt in Studien der Behandlungsnutzen klar den Behandlungsrisiken. Aufgrund weltweit steigender altersabhängiger Prävalenzen stellt diese Erkrankung eine hohe globale Krankheitslast dar. Es zeigen sich zudem multiple mögliche Folgeerkrankungen, beispielsweise Vorhofflimmern, chronische Nierenerkrankung, ischämischer oder hämorrhagischer Zerebraler Insult, koronare Herzkrankheit bis hin zum Myokardinfarkt.³¹

3.1.1 Definition und Klassifikation

Die European Society of Cardiologie (ESC) und Deutsche Gesellschaft für Kardiologie (DGK) definieren die arterielle Hypertonie ≥ 140 mmHg systolisch und/oder ≥ 90 mmHg diastolisch. Dieser Grenzwert wurde auf Grundlage zahlreicher randomisierter kontrollierter Studien festgelegt. Davon ausgehend gibt es noch exaktere Abstufungen je nach Höhe des gemessenen Blutdrucks in Hypertonie Grade 1-3 (vgl. **Tabelle 1**). Klinische Studien stellten den Nutzen der Hypertoniebehandlung der definierten Werte dabei klar über die Risiken der Therapie. Wichtig ist hierbei die korrekte Erfassung des Praxisblutdrucks. Dafür empfehlen die ESC und DGK die Messung bei zuvor für 5 min sitzendem Patienten mit passender Manschette auf Herzhöhe angelegt durchzuführen. Nach dreimaligem Wiederholen soll der Mittelwert aus den ermittelten Ergebnissen berechnet und als gemessener Wert betrachtet werden. Dabei ist darauf zu achten, dass Arrhythmien oder Seitendifferenzen das Ergebnis nicht verfälschen. Andere Möglichkeiten zu Werteerhebung stellt die häusliche Blutdruck-Messung und die Langzeitblutdruckmessung dar. Die endgültige Diagnosestellung sollte nach mehrmalig erfolgten Praxisbesuchen mit jeweils erhöhten Blutdrücken erfolgen und nicht anhand eines einzelnen Besuches festgemacht werden.¹¹⁰

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

Tabelle 1: Klassifikation der Hypertonie

Das Ausmaß der Hypertonie lässt sich anhand der systolischen und oder diastolischen Blutdruckwerte in 7 Grade einteilen.

(Modifiziert nach: Williams B, Mancia G, Spiering W, et al.)¹¹⁰

3.1.2 Epidemiologie

Bluthochdruck stellt den häufigsten Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen (cardiovascular disease, CVD) dar.¹ Dabei betrifft diese Erkrankung etwa ein Drittel der Deutschen. Die Prävalenz steigt mit dem Alter auf bis zu 60 % an. Trotz der hohen sozioökonomischen Bedeutung liegt eine kontrollierte Hypertonie nur bei etwa 24 % der Patienten vor.⁵⁰ Weltweit gilt ein Viertel der Bevölkerung als an Bluthochdruck erkrankt. Aufgrund dieser hohen Fallzahl, aber auch wegen der multiplen kardiovaskulären, renalen und cerebralen Komplikationen trägt die arterielle Hypertonie maßgeblich zur globalen Krankheitslast bei.³⁵

3.1.3 Ätiologie

Generell wird in eine primäre und sekundäre Hypertonie eingeteilt, wobei in ca. 95 % der Fälle die primäre Form vorliegt. Die Ursache der primären (essentiellen) Hypertonie ist noch nicht abschließend erforscht, korreliert aber eng mit weiteren Faktoren des metabolischen Syndroms wie hohe Kochsalz- und Alkoholzufuhr, Rauchen, Bewegungsmangel oder Übergewicht. Weitere mögliche Ursachen, die die Komplexität dieser Erkrankung hervorheben, sind veränderte Baroreflexmechanismen, verminderte Aktivität natriuretischer Peptide und erhöhte osmotisch inaktive Natriumspeicherung.⁴⁴ Die mit ungefähr 5 % deutlich seltener sekundäre Hypertonie ist häufig durch das Schlafapnoe-Syndrom bedingt. Weitere Ursachen werden in renale Hypertonie und endokrine Hypertonie eingeteilt. Zur renalen Hypertonie zählen als Ursache jegliche Nierenerkrankungen wie beispielsweise die Niereninsuffizienz, Nierenarterienstenose oder Glomerulonephritis. Hyperaldosteronismus,

Hypercortisolismus, Hyperthyreose oder ein Phäochromozytom sind Beispiele für eine endokrine Hypertonie.¹⁰⁸

3.1.4 Pathophysiologie

Bluthochdruck ist eine Störung der Kreislaufregulation. Die Pathophysiologie ist sehr komplex und variabel. Sie ist bis heute noch nicht abschließend ergründet. Prinzipiell unterliegt der Blutdruck dem Ohm'schen Gesetz, wobei sich dieser aus dem Herzzeitvolumen und dem systemischen Gefäßwiderstand zusammensetzt. Der systemische Gefäßwiderstand wiederum beruht auf der Blutviskosität und dem Tonus der Widerstandsgefäße. Ein Hypertonus entwickelt sich dann, wenn das Herzzeitvolumen, der systemische Widerstand oder beides langfristig erhöht ist.⁴⁴

Zu Beginn der Hypertonieforschung gelang es Irvine Page und Braun Menendez im Jahre 1939 Angiotensin, einen potenteren Vasokonstriktor und pro-hypertensives Agent, aus Nieren zu isolieren. Es wurde die Theorie aufgestellt, dass nicht nur die Vasokonstriktion allein, sondern auch das Zentrale Nervensystem, kardiovaskuläre Faktoren, endokrine Faktoren und Nierenfunktionsstörungen Bluthochdruck vermitteln. Darauf aufbauend stellte Page das Mosaik-Modell auf, welches die multifaktorielle Genese der Hypertonie aufzeigen sollte. Der Grundsatz dieser Mosaik-Theorie hat sich bis heute durchgesetzt. Die Faktoren, aus denen sich das Mosaik zusammensetzt, bilden die zentralen Bausteine einer anhaltenden Diskussion. Von großer Bedeutung sind dabei die Nieren, das Gefäßsystem bezüglich Elastizität und Gefäßkaliber und das Zentrale Nervensystem.³⁴ Weitere mögliche pathophysiologische Ursachen sind eine gesteigerte Aktivität des sympathischen Nervensystems, zu hohe Natriumaufnahme oder hohe Natriumreabsorption, pathologische Reninsekretion, mangelhafte Vasodilatation, abnorme Resistenzgefäße, Diabetes mellitus oder veränderte Adrenorezeptoren. Die Bestimmung dieser jeweiligen möglichen Faktoren wäre jedoch im klinischen Alltag aufgrund der hohen Kosten und Komplexität nicht durchführbar und wird daher nur in seltenen Fällen angewendet.²³

Im höheren Alter ist die isolierte systolische Hypertonie die häufigste Form. Zur Erklärung dieser Pathophysiologie wird vor allem Augenmerk auf die zunehmende Gefäßsteifigkeit im Alter gelegt. Arterielle Kapazitätsgefäße sind für zwei Aufgaben zuständig: mittels eines ausreichenden Druckgradienten, den Mittleren arteriellen Druck (mean arterial pressure, MAP), wird ausreichend Blut zur metabolischen Versorgung vom Herzen in die Peripherie geleitet. Daneben nehmen sie das große, in der Systole ausgestoßene Blutvolumen auf und leiten es in der diastolischen Phase weiter, um eine kontinuierliche Perfusion zu ermöglichen.⁹¹ Altersabhängig erhöht sich die Steifigkeit der großen Gefäße aufgrund von Umbauprozessen in der Gefäßwand und die Windkesselfunktion nimmt ab. Gleichzeitig verringert sich der

Gefäßdurchschnitt. Beide Faktoren bedingen eine Addition der systolischen Pulswelle, indem sich die Geschwindigkeit der Pulswelle erhöht und die Welle vorzeitig reflektiert wird. Diese summierte Welle aus systolischer und reflektierter Pulswelle verstärkt sich von peripher nach proximal zunehmend. Somit erhöht sich auch die kardiale Belastung, das sog. „afterload“.⁹³

3.1.5 Klinik

Bluthochdruck verläuft meist asymptomatisch und wird folglich oft unterschätzt und zu spät diagnostiziert. Dieses Problem besteht weltweit. In Deutschland wurde im Rahmen des Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease (MONICA)-Projektes Augsburg die 50 %-Faustregel beschrieben, welche aussagen soll, dass 50 % der Hypertoniker erkannt sind, davon wiederum 50 % sich in Behandlung befinden und nur die Hälfte der Behandelten tatsächlich den Zielblutdruckwert erreichen.¹⁰² Die klinischen Zeichen sind oft unspezifisch. Mögliche Symptome einer Hypertonie können sein: Schwindel, Übelkeit, Nasenbluten, Angina Pectoris oder Abgeschlagenheit.

Die Erkrankung birgt zudem mannigfaltige Komplikationen. Die Studie Global Burden of Disease 2010 zeigte bereits, dass die Hypertonie einer der drei Hauptrisikofaktoren für die globale Krankheitslast ist. In Zentraleuropa, Asien, Nordafrika und dem mittleren Osten stellt sie sogar den bedeutendsten Hauprisikofaktor dar.⁵⁸ So erhöht sich die Schlaganfall- und Herzinfarktmortalität exponentiell mit dem Blutdruckanstieg. Pro Anstieg um 20 mmHg systolisch bzw. 10 mmHg diastolisch verdoppelt sich das Risiko in der Altersgruppe 40 bis 69 ausgehend von üblichen Vergleichswerten um die 115/75 mmHg.⁵⁷ Das Gesamt-Lebenszeitrisiko für kardiovaskuläre Erkrankungen liegt für Hypertoniker bei 63 %, bei Menschen mit Normotension beträgt es 46 %. Auch verlieren Hypertoniker, abhängig vom Alter bei Erkrankungsbeginn, Lebensjahre frei von kardiovaskulären Erkrankungen: Bei Krankheitsbeginn im Alter von 30 Jahren liegt der Verlust bei 5 Jahren, im Alter von 60 Jahren bei 3,4 Jahren und im Alter von 80 Jahren bei 1,6 Jahren.⁸⁹

3.1.6 Therapie

Die Behandlung der Hypertonie kann üblicherweise ambulant erfolgen. Gründe für eine stationäre Behandlung in einem Krankenhaus können u.a. der Verdacht auf eine sekundäre Hypertonie und eine therapieresistente Hypertonie sein. Lebensstil-Interventionen sollten von allen hypertonen Patienten inklusive hochnormalem Blutdruck erbracht werden. Die Kochsalzzufuhr sollte ebenso wie der Alkoholkonsum und das Rauchen möglichst reduziert werden, eine Adipositas vermieden und regelmäßige Belastung angestrebt werden. Patienten mit Hypertonie Grad 1 wird empfohlen, nach ausbleibender Verbesserung des Blutdrucks durch Lebensstilanpassungen eine pharmakologische Therapie zu beginnen. Zudem sollte bei allen Patienten mittels dem SCORE-System eine kardiovaskuläre Risikostratifizierung

erfolgen. Eindeutige klinische oder in der Bildgebung dokumentierte kardiovaskuläre Erkrankungen, Diabetes mellitus mit Endorganschaden, schwere chronische Nierenerkrankung (chronic kidney disease, CKD) mit geschätzter glomerulärer Filtrationsrate (estimated glomerular filtration rate, eGFR) $<30 \text{ ml/min}/1,73 \text{ m}^2$, hypertensive linksventrikuläre Hyperplasie oder ein einzelner deutlich erhöhter Risikofaktor werden hierbei direkt als hohes oder sehr hohes Risiko kategorisiert. Bei Patienten ab Hypertonie Grad 2 wird unabhängig des kardiovaskulären Risikos empfohlen, eine medikamentöse Behandlung einzuleiten. Der Behandlungszielwert liegt primär unter 140/90 mmHg, bei gutem Vertragen der Therapie sollte sogar ein Wert unter 130/80 mmHg angestrebt werden. Dabei ist das Ziel immer abhängig vom Patientenalter, den Begleiterkrankungen und der Verträglichkeit der Medikamente. Ab einem Patientenalter von ≥ 65 wird ein Blutdruckbereich von systolisch 130-139 mmHg angestrebt.¹¹⁰

Die medikamentöse Blutdrucksenkung bewirkt eine signifikante relative Risikoreduktion kardiovaskulärer Erkrankungen. Dies zeigte eine Studie der Blood Pressure Lowering Treatment Trialists' Collaboration (BPLTTC). Dabei war die absolute Risikoreduktion von der Gruppe mit dem niedrigsten Risiko zur höchsten Risikogruppe hin zunehmend. Eine 5-Jahres Behandlung mit blutdrucksenkenden Medikamenten von 1000 Probanden würde 14 kardiovaskuläre Ereignisse verhindern ((95 % CI 8–21). Daraus ergibt sich eine „Number needed to treat“ um ein kardiovaskuläres Ereignis in 5 Jahren zu verhindern von 71 (95 % CI 49–130) in der niedrigsten Risikogruppe und von 26 (95 % CI 17–62) in der höchsten Risikogruppe.⁹

Die medikamentöse Standardtherapie setzt sich aus einer Zweierkombination zusammen. Initial besteht diese aus einem Angiotensin-Converting-Enzym(ACE)-Hemmer oder Angiotensin-II-Rezeptorblocker plus Calciumantagonist oder Diuretikum. Ist eine Blutdruckregulierung mit dieser Zweifachkombination nicht ausreichend, kommt eine Dreifachkombination bestehend aus ACE-Hemmer oder Angiotensin-II-Rezeptorblocker plus Calciumantagonist plus Diuretikum zur Anwendung. Im Falle einer resistenten Hypertonie wird ein weiteres Medikament, meist Spironolacton, der Dreifachkombination hinzugefügt. In ausgewählten Fällen kann eine renale Denervation als Therapie in Erwägung gezogen werden. Diese eignet sich zum Beispiel für therapieresistente Hypertonien, nachgewiesene Medikamentenunverträglichkeiten oder mangelnde Therapieadhärenz.¹¹⁰

Die PURE-Studie zeigte deutlich, dass die Compliance gegenüber der medikamentösen Therapie noch nicht ausreichend ist. In der Studie wussten lediglich 46,5 % der Patienten, dass sie an einer Hypertonie erkrankt sind. Zwar erhielt die Mehrheit dieser Patienten, denen ihre Erkrankung bekannt war, eine entsprechende pharmakologische Behandlung (87,5 %). Doch nur die Minderheit dieser behandelten Patienten (32,5 %) befand sich auch in regelmäßiger Kontrolle. Eine Möglichkeit, die eine verbesserte Therapieadhärenz ergeben

würde, stellte eine intensivierte Aufklärung über die Erkrankung und Therapie dar.¹⁴ Eine Verbesserung der Medikamententreue senkt zudem auch die Prävalenz der Resistenten Hypertonie.³⁷

3.2 Chronische Nierenerkrankung (CKD)

Unter dem Begriff Chronische Nierenerkrankung (chronic kidney disease, CKD) werden alle irreversiblen Auffälligkeiten der Nierenstruktur und -funktion zusammengefasst. Dieser Zustand muss per Definition der Kidney Disease: Improving Global Outcome (KDIGO) länger als 3 Monate bestehen und Auswirkungen auf die Gesundheit haben. Im Rahmen der CKD kommt es zu einem erhöhten Risiko für weitere Komplikationen, hervorzuheben ist das gesteigerte Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen (CVD). Daher hat diese Krankheit eine hohe Relevanz bezogen auf die hohe Mortalität, Morbidität und damit einhergehende sozioökonomische Last für das globale Gesundheitswesen.

3.2.1 Definition

Unter dem Begriff CKD sind laut Leitlinie der KDIGO alle Auffälligkeiten der Nierenfunktion und Nierenstruktur miteinbezogen, welche länger als 3 Monate bestehen und mit Einschränkungen der Gesundheit einhergehen. Kriterien, um diese Erkrankung zu erfassen, sind Marker der Nierenschädigung wie eine Albuminurie (erhöhte Albuminexkretionsrate $\geq 30 \text{ mg}/24 \text{ h}$ bzw. Albumin/Kreatinin-Quotient $\geq 30 \text{ mg/g}$), Abnormitäten im Urinsediment, auffällige Elektrolytwerte aufgrund von Tubulusstörungen, pathologische histologische Befunde, Bildbefunde mit abnormen strukturellen Gegebenheiten oder eine erfolgte Nierentransplantation. Ebenso zählt eine verringerte Glomeruläre Filtrationsrate (GFR) $<60 \text{ ml}/\text{min}/1,73 \text{ m}^2$ zu den möglichen hinweisgebenden Befunden.

Dieses breite Spektrum an beurteilbaren Parametern ist eher unspezifisch für die Ursache der Nierenschädigung, oft geht aber eine Einschränkung der Nierenfunktion voraus und anschließend mit ihr einher. Eine eingeschränkte Nierenfunktion führt zudem meist sowohl zu einer verringerten Ausscheidefunktion, als auch zu einer verminderten endokrinen Funktion. Dabei gilt die GFR als allgemein bester Gesamtmarker für die Niereninsuffizienz. Der definierte zeitliche Rahmen ermöglicht eine Abgrenzung der CKD gegenüber der akuten Niereninsuffizienz oder akuten Glomerulonephritiden. Die genaue Einteilung erfordert folglich eine regelmäßige Reevaluation.

Die GFR wird mittels der Kreatinin-Clearance geschätzt. Kreatinin ist ein Produkt des Muskelstoffwechsels und dient als endogener Filtrationsmarker. Es ist abhängig von der Muskelmasse und -aktivität, damit zusammenhängend auch von der Ernährung, dem Körpergewicht, Geschlecht und dem Alter. Aufgrund dieser zahlreichen Einflussfaktoren

resultieren große interindividuelle Differenzen. Zu dieser Ungenauigkeit trägt bei, dass die Beziehung zwischen GFR und Kreatinin einem hyperbolischen Verlauf folgt. Dies hat zur Folge, dass erst bei einer erheblichen Einschränkung der GFR ein Anstieg des Serumkreatinins resultiert. So wird ein Anstieg über den oberen Referenzbereich erst ab einer GFR-Verminderung auf 60-40 ml/min deutlich. Frühere Kreatininerhöhungen werden oft nicht detektiert und die damit verbundenen GFR-Einschränkungen fallen in den sog. „Kreatinin-Blinden-Bereich“. Dadurch werden Therapien oft erst mit deutlicher Verspätung initiiert. Es ergibt sich die Notwendigkeit einer präziseren Bestimmungsmethode der GFR. Die eGFR bietet solch eine präzisere Einschätzung über zwei Formeln: die MDRD-Formel oder die CKD-EPI-Formel. Die MDRD-Formel entstammt der Studie Modification of Diet in Renal Disease Study und berechnet die GFR anhand vier Faktoren, dem Serumkreatinin, Alter, Geschlecht und der Ethnie. Im Vergleich dazu hat die CKD-EPI-Formel (Chronic-Kidney-Disease-Epidemiology-Collaboration-Formel) eine komplexere Form, bedient sich aber der gleichen vier Variablen. Die international verwendete Klassifikation der CKD in fünf Stadien beruht auf diesen Kalkulationsalgorithmen.^{97,90}

3.2.2 Klassifikation

Die Klassifikation der CKD erfolgt über die erhaltene GFR als Marker der Ausscheidungsfunktion und das mit dem Urin ausgeschiedene Albumin. So ist eine Einteilung ohne Kenntnis über die kausale Ursache möglich. Die erforderlichen Parameter zur Identifizierung sind objektiv und standardisiert im Labor ermittelbar. Aufgrund der Korrelation zwischen eingeschränkter GFR und metabolischer und endokriner Komplikationen wurde die CKD in 5 Stadien (G1-G5) eingeteilt (vgl. **Abbildung 1**). Darin inbegriffen ist eine weitere Unterteilung des 3. Stadiums in G3a und G3b aufgrund unterschiedlicher Prognosen und Risikoprofile dieser beiden Gruppen. In den beiden Stadien G1 und G2 ist die GFR normal bis leicht verringert. Hier ist erst dann die Diagnose einer CKD korrekt, wenn weitere Nierenfunktionsstörungen diagnostizierbar sind. Erreicht ein Patient eine GFR < 15 ml/min/1,73 m², kann die Nierenfunktion nicht mehr länger die lebensnotwendigen Funktionen aufrechterhalten. In diesem Endstadium der Nierenerkrankung hat der Patient abseits der palliativen Behandlung nur noch durch Nierenersatzverfahren wie Dialyse oder Nierentransplantation eine Überlebensmöglichkeit.¹⁰⁷

Als zweiten Parameter betrachtet die Einteilung der CKD gemäß der Leitlinie der KDIGO die Albuminurie. Dieser Wert hat ebenfalls einen großen Vorhersagewert bezüglich der Prognose. Es werden 3 Kategorien unterschieden (A1-A3). Im ersten Stadium A1 ist die Albuminausscheidung noch normal bis leicht erhöht, wohin gegen im Stadium A3 mit einer stark erhöhten Exkretion eine Makroalbuminurie erreicht wird. Mit zunehmendem Anstieg

steigt das Risiko weiterer Komplikationen kontinuierlich an und macht damit die Albuminurie zu einem relevanten diagnostischen und prognostischen Faktor.

Abseits dieser weit verbreiteten Einteilung sollte nicht übersehen werden, dass die CKD nicht per se einer Diagnose entspricht. Die Ursachenfindung darf nicht vernachlässigt werden, auch sie beeinflusst die Prognose und Behandlung. Daher wird als zusätzliche mögliche Einteilung eine Einteilung in systemische Erkrankungen, welche die Nieren mitbetreffen und primäre Nierenerkrankungen empfohlen, bezogen auf glomeruläre, tubulointerstitielle, vaskuläre und zystisch-kongenitale Erkrankungen.⁹⁰

Progression von CKD durch GFR und Albuminurie Kategorien				Albuminurie Kategorien Beschreibung und Reichweite		
GFR Kategorien (ml/min/1,73m ²)	G1	Normal bis erhöht	≥90	A1	A2	A3
	G2	Leicht reduziert	60-90			
	G3a	Leicht bis mäßig reduziert	45-59			
	G3b	Mäßig bis stark reduziert	30-44			
	G4	stark reduziert	15-29			
	G5	Nierenversagen	15			

Grün: geringes Risiko (wenn keine anderen Marker für eine Nierenerkrankung vorliegen, keine CKD)
Gelb: mäßig erhöhtes Risiko; Orange: hohes Risiko; Rot: sehr hohes Risiko; Grün: geringes Risiko

Abbildung 1: Klassifikation der CKD

Einteilung der CKD anhand des Ausmaßes der Albuminurie in Grad A1-A3 und anhand der GFR in Grad G1-G5. Aus der Zusammenschau dieser beiden Parameter ergibt sich eine farbkodierte Klassifikation: Die grünen Tabellenfelder stellen ein geringes Risiko für CKD dar, gelb ein mäßigiges Risiko, orange ein hohes Risiko und die roten Felder im unteren Tabellenbereich ein sehr hohes Risiko, an einer CKD zu erkranken.
(Modifiziert nach: Marx, N., Floege, J., Böhm, M., et al.)⁶⁹

3.2.3 Epidemiologie

Die chronische Nierenerkrankung besitzt eine hohe Relevanz in Bezug auf ihre sozioökonomische Last auf das globale Gesundheitswesen aufgrund ihrer hohen Mortalität und Morbidität. So berichtete die Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization,

WHO) im Jahre 2012, dass 1,5 % der Tode weltweit auf die chronische Nierenerkrankung zurückzuführen sind und somit Platz 15 der führenden Todesursachen einnimmt. Bis ins Jahr 2030 wird ein kontinuierlicher Anstieg dieser Zahlen prognostiziert. Zudem beinhaltet diese Erkrankung eine Erhöhung der Morbidität, weltweit bedingt die CKD 1,1 % der krankheitsbeinhaltenden Lebensjahre bzw. 1,3 % der verlorenen Lebensjahre.¹⁰⁷ Altersabhängig steigt die Prävalenz mit zunehmendem Alter. Verlässliche Zahlen für Deutschland fehlen aktuell noch.³⁹

3.2.4 Ätiologie

Die Ätiologie der CKD variiert stark, abhängig von der Geografie. Während in Industrienationen Diabetes mellitus und Hypertonie die häufigste Ursache darstellen und vor allem ältere Menschen betroffen sind, reihen sich in Entwicklungsländern Diabetes mellitus und Hypertonie zusammen mit anderen Ursachen gleichermaßen häufig ein. In Asien, Indien und Subsahara-Afrika gelten die Glomerulonephritis und unbekannte Ursachen als häufigster Grund für die Entstehung einer CKD. Eine spezialisierte Ursachenbestimmung entsprechend Nierenbiopsien oder invasive Bildgebungen sind dabei nicht immer notwendig. Hier sollte eine genaue Abwägung zwischen Kosten, Risiken und dem Nutzen der Diagnostik erfolgen. Gerade bei älteren Menschen in Nationen mit sehr hohen Prävalenzen von Diabetes mellitus und Hypertonie ist eine Abgrenzung dieser Erkrankungen als tatsächliche ursächlich oder lediglich koexistent schwierig.^{90,107}

3.2.5 Pathophysiologie

Die Pathophysiologie der CKD setzt sich aus zwei Faktoren zusammen: Einem initialen Trigger und dem weiterführenden Pathomechanismus. Der initiale Trigger (beispielsweise Entwicklungsstörungen der Niere, Immunkomplexablagerungen, Glomerulonephritis-assoziierte Inflammationen) führt zu einer Hypertrophie und Hyperfiltration der verbleibenden funktionsfähigen Nephrene. Dies resultiert häufig in einem Verlust an funktionsfähigen Niereinheiten, unabhängig der zugrundeliegenden Erkrankung, und führt zu einem zunehmenden Rückgang der Nierenfunktion. Die Folgen der Nephron-Reduktion werden durch vasoaktive Hormonsekretion, Zytokinausschüttung und Wachstumshormone vermittelt. In Folge der zur Aufrechterhaltung der GFR vorliegenden Hypertrophie und Hyperfiltration kommt es vermutlich zu einer Erhöhung des Drucks und Flusses innerhalb der Nephrene. Dadurch wird über längere Zeit die Struktur der Glomeruli beschädigt, die Podozytenfunktion nimmt ab und eine Reduktion der Filtrationsleistung führen schlussendlich zur Sklerosierung und Versagen der übrigen funktionsfähigen Nephrene. Dabei scheint ein erhöhtes Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) intrarenal sowohl der initial kompensatorische

Hyperfiltration als auch der darauffolgenden maladaptiven Hypertrophie und Sklerose beizusteuern.⁶

Die Fibrose stellt die gemeinsame finale Manifestation der CKD dar und nimmt somit eine zentrale pathologische Rolle ein. Das Nierengewebe nutzt sie als nicht erfolgreichen „Wundheilungsprozess“ verursacht durch einen chronisch anhaltenden Schaden. Es resultiert ein Teufelskreis, welcher in der Fibrose und Gewebezerstörung endet, als Ergebnis eines fehlgelaufenen Reparaturversuches. Unter physiologischen Bedingungen würde die Fibrogenese die normale Gewebestruktur wieder herstellen.

Charakterisiert wird der Pathomechanismus durch Glomerulosklerose, Atrophie der Tubuli und interstitielle Fibrose. Die Glomerulosklerose wird veranlasst durch Endothelschaden und -dysfunktion, proliferierte glatte Muskelzellen und Mesangiumzellen. Zudem kommt es zur Destruktion von Podozyten, welche physiologisch ein Bestandteil der glomerulären Basalmembran darstellen.¹⁰⁷

3.2.6 Klinik

Die CKD verläuft bei den meisten Patienten initial asymptomatisch. Zur Diagnosestellung kommt es erst dann, wenn die herabgesetzte Nierenleistung in einer Routinekontrolle bemerkt wird oder eine fortgeschrittene CKD Beschwerden bereitet. Das initiale Stadium der kompensatorischen Hyperfiltration äußert sich in einer Polyurie. Aufgrund der zunehmenden gewebszerstörenden Prozesse reduziert sich die Nierenfunktion und damit einhergehend die Exkretionsfunktion. Harnpflichtige Toxine akkumulieren im Körper. Diese Urämietoxine haben komplexe, bisher nur unvollständig verstandene, Effekte. Man schreibt ihnen Mitwirkung an Inflammationsreaktionen, Immundysfunktionen, Gefäßerkrankungen, Störungen der Thrombozytenfunktion, eine Veränderung des Medikamentenmetabolismus und Progression der CKD zu. Im Endstadium der CKD folgt dann ein nahezu vollständiger Ausfall der Regulation des Wasserhaushaltes. Das osmotische Gleichgewicht ist durch die hohe Albuminausscheidung infolge der gestörten Proteinfiltration aus der Balance gebracht. Wasser lagert sich in Form von Ödemen an, zunächst peripher, klassischerweise als Unterschenkelödeme oder mit zunehmendem Ausmaß im Rahmen eines renalen Lungenödems und folglicher Dyspnoe. Es kommt zum klinischen Bild eines nephrotischen Syndroms.¹⁰⁷

Als weitere Komplikation der gestörten renalen Filtration können Elektrolytentgleisungen resultieren. Insbesondere durch erhöhte Kaliumretention können lebensgefährliche Herzrhythmusstörungen auftreten. Die ebenfalls gestörte Bikarbonat-Retention und Protonenelimination können zu pH-Wert-Entgleisungen führen, bis hin zur metabolischen Azidose.

Die Folgen der endokrinen Funktionsabnahme führen häufig zu einer renalen Anämie. In der Niere wird Erythropoetin in den peritubulären Fibroblasten gebildet. Dieses Protein wird physiologisch bei erniedrigtem renalem Sauerstoffpartialdruck vermehrt transkribiert und stimuliert die Erythropoese im Knochenmark. Kommt es nun zu einer verringerten Erythropoetin-Synthese durch die CKD folgt eine normochrome normozytäre Anämie. Damit einhergehend eine verminderte Belastungsfähigkeit und erhöhte Transfusionsnotwendigkeit.⁵⁶ Des Weiteren kommt es zu schwerwiegenden Veränderungen im Calcium-Phosphathaushalt welche unter dem Sammelbegriff der renalen Osteopathie zusammengefasst werden. Der menschliche Körper kann das aktive Vitamin D-Hormon physiologisch selbst synthetisieren. Der letzte Syntheseschritt findet in der Niere statt, wobei 25-Hydroxycholecalciferol zu 1,25-Dihydroxycholecalciferol hydroxyliert wird. Das 1,25-Dihydroxycholecalciferol hat im Körper vielfältige Funktionen, unter anderem die Förderung der Calcium- und Phosphatresorption sowie die Knochenmineralisierung. Bei Patienten mit CKD ist die Synthese von 1,25-Dihydroxycholecalciferol stark eingeschränkt und auch die Phosphatausscheidung über die Niere ist vermindert. Die resultierende Hyperphosphatämie und Hypokalzämie aufgrund des Calcitriol-Mangels führen über einer Erhöhung des Parathormons zu einem sekundären Hyperparathyreoidismus. Die Verringerte Knochenmineralisierung zeigt sich klinisch in Knochenschmerzen, Osteopenie mit Fraktureigung bis hin zu einer manifesten Osteoporose.⁵⁶

3.2.7 Therapie

Meist ist die CKD irreversibel und es wird therapeutisch keine drastische Verbesserung erreicht. Daher ist die wichtigste Maßnahme die Prävention. Ein Fortschreiten der Erkrankung und das kardiovaskuläre Risiko müssen möglichst vermieden werden.

Besonders wichtig gestalten sich hierbei die adäquate Blutdruckeinstellung. Die arterielle Hypertonie stellt im Rahmen der CKD sowohl eine mögliche Ursache als auch Folge der Erkrankung dar. Folglich nimmt die antihypertensive Therapie einen zentralen Stellenwert ein.¹⁰¹ Die KDIGO empfiehlt eine medikamentöse Blutdruckreduktion auf $\leq 140/90$ mmHg bei CKD-Patienten mit oder ohne diabetischer CKD mit einer Albuminurie von < 30 mg/24 h. Bei erhöhter Albumin Exkretion auf ≥ 30 mg/24 h wird eine intensivierte Blutdruckeinstellung auf $\leq 130/80$ mmHg diskutiert.⁹⁰ Als Initialtherapie lautet die Empfehlung der DGK eine Kombination aus RAAS-Blocker und einem Calciumkanalblocker.¹¹⁰ Dabei sollen RAAS-Blocker die Albuminurie wirksamer verringern als vergleichbare Antihypertensiva. ACE-Hemmer oder AT1-Antagonisten erfüllen zwei Funktionen: Sie vermindern ein Fortschreiten der CKD und das Aufkommen kardiovaskulärer Ereignisse.¹¹¹ Eine Kombination aus zwei RAAS-Blockern wird nicht empfohlen. Diese Kombinationstherapie erhöht sowohl das Risiko einer Hyperkaliämie als auch das Auftreten eines Akuten Nierenversagens.^{110,26} Die Auswahl der

medikamentösen Therapie sollte individuell unter Berücksichtigung der Komorbiditäten des Patienten erstellt werden.¹⁰¹

Die der chronische Nierenerkrankung folgenden endokrinen Erkrankungen, wie die renale Anämie, die renale Osteopathie und der sekundäre Hyperparathyreoidismus, sollten mittels spezifischer Therapieverfahren behandelt werden.

Des Weiteren sollten lebensstilverändernde Maßnahmen getroffen werden, welche ebenfalls den Progress der CKD verhindern und das kardiovaskuläre Risiko minimieren. Dazu zählen die Nikotinkarenz, Gewichtsreduktion bei Adipositas und eine regelmäßige sportliche Betätigung. Die Salzaufnahme sollte diätetisch auf < 90 mmol (< 2 g) pro Tag beschränkt sein, sofern keine Kontraindikationen bestehen. In Stadium G4-G5, wenn die GFR weniger als 30 ml/min/1,73 m² erreicht hat, empfiehlt die KDIGO eine reduzierte Proteinaufnahme < 0.8 g/kg/d bzw. für alle Patienten mit Risiko der CKD-Progression < 1.3 g/kg/d.^{90,101}

Darüber hinaus muss jede weitere akute Nierenschädigung möglichst vermieden werden, da die CKD für ein akutes Nierenversagen prädisponiert. Dazu zählt gerade bei der Älteren Bevölkerung die Vermeidung einer Dehydratation und Vorsicht gegenüber vieler Medikamente, die nephrotoxisch wirken bzw. renal eliminiert werden.^{22,90}

3.3 Vorhofflimmern

Vorhofflimmern (VHF) ist die häufigste Herzrhythmusstörung und geht mit einem erhöhten Risiko für einen Schlaganfall, periphere Embolien und dem Tod einher. Mehreren Faktoren, wie beispielsweise elektrische und strukturelle Veränderungen des Vorhofgewebes, werden eine ursächliche Wirkung zugeschrieben. Therapeutisch gibt es erfolgreiche Methoden, welche jedoch mit hohen Kosten für das Gesundheitswesen verbunden sind. Aus diesem Grund ist es von großer Relevanz, die Entstehung des VHF zu verhindern, indem Risikofaktoren und prädisponierende Faktoren präventiv behandelt werden.¹¹

3.3.1 Definition

Das VHF ist definiert als supraventrikuläre arrhythmische Tachykardie mit unkoordinierter elektrischer Vorhofaktivität. Daraus resultiert eine ineffektive Vorhofkontraktion. Die Diagnose wird mittels Elektrokardiogramms (EKG) gestellt, idealerweise mittels Ableitung eines vollständigen 12-Kanal-EKGs von mindestens 30 s. Elektrokardiographische Merkmale des VHF sind unregelmäßige R-R-Intervalle, das Fehlen von erkennbaren regelmäßigen P-Wellen und eine unregelmäßige Vorhofaktivierung (vgl. **Abbildung 2**).³⁸

VHF kann anhand der Episodendauer oder Ätiologie genauer klassifiziert werden. Wird die Einteilung nach Persistenz gewählt, werden vier Stadien unterschieden. Terminiert das VHF spontan innerhalb von 7 Tagen in den Sinusrhythmus, spricht man von paroxysmalem VHF.

Dauert die Episode mindestens 7 Tage und kann erst durch eine Kardioversion (elektrisch oder medikamentös) unterbrochen werden oder konvertiert spontan, wird es als persistierendes VHF definiert. Langanhaltendes persistierendes VHF nimmt eine Dauer von mindestens 12 Monaten ein. Stellen Patient und Arzt die Versuche ein, das VHF in einen Sinusrhythmus zu konvertieren, bleibt das VHF therapieresistent und wird als permanentes VHF klassifiziert.¹¹

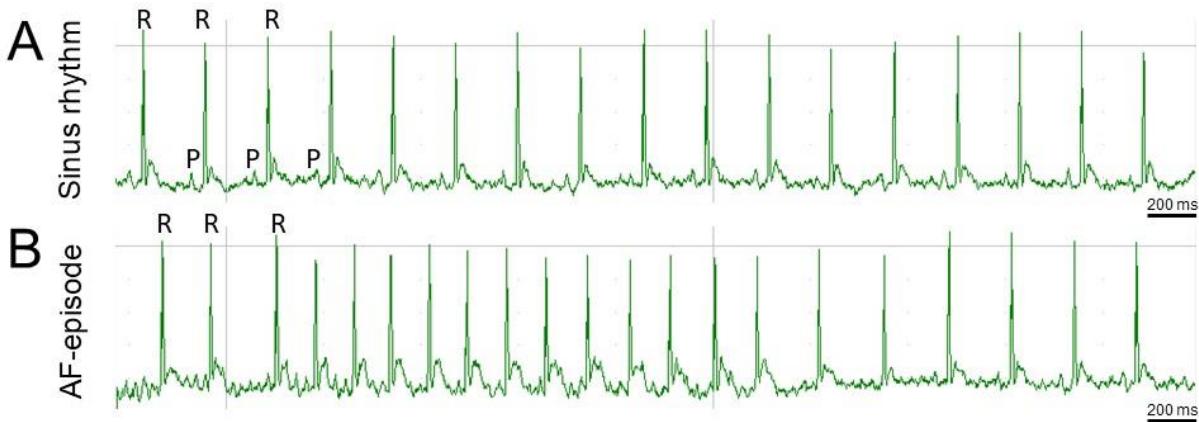


Abbildung 2: Exemplarische EKG-Ausschnitte der Versuchstiere im Sinusrhythmus und atrialer arrhythmischer Episode

A: Ausschnitt eines Ratten-EKGs, zu sehen ist ein physiologischer Sinusrhythmus mit gut erkennbaren P-Wellen

B: Ausschnitt eines Ratten-EKGs mit einer Vorhofflimmern-Episode, welche anschließend zurück in den Sinusrhythmus konvertiert. Zu erkennen ist, dass während der Vorhofflimmerepisoden die P-Welle verschwindet und das RR-Intervall, d.h. der Abstand zwischen zwei R, abnimmt. Die R-Zacke spiegelt als Teil des QRS-Komplexes die Ventrikel-Depolarisation wider, sodass aus dem Abstand zweier R-Zacken die Herzfrequenz bestimmt werden kann.

3.3.2 Epidemiologie

Inzidenz und Prävalenz des VHF steigen global stetig an. Das „Global Burden of Disease project“ bestimmte 2016 eine Prävalenz von 46,4 Millionen Menschen weltweit. In Europa lag die Prävalenz von VHF im Jahre 2010 bei ca. 9 Millionen Menschen und es wird ein Anstieg bis in das Jahr 2060 auf voraussichtlich 14 Millionen erwartet.⁵³ Weltweit bedingt VHF ein erhöhtes Risiko der Mortalität und Morbidität. Allein 2017 führte es zu einem Verlust von 6 Millionen krankheitsfreien Lebensjahren.¹¹

Hauptursache des enormen Prävalenzanstiegs ist die älter werdende Gesellschaft. Jüngere Patienten haben eine sehr niedrige Wahrscheinlichkeit an VHF zu erkranken (< 1 % bei Personen < 40 Jahren), wobei die Prävalenz mit > 80 Jahren auf 10-17 % ansteigt.⁶⁵

VHF steht in einem engen epidemiologischen Zusammenhang mit anderen Erkrankungen wie Herzklappenerkrankungen, Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie und Adipositas. Auch

genetische Faktoren und Lifestyle bedingte Risikofaktoren wie Alkohol, Rauchen und exzessiver Ausdauersport werden diskutiert.⁶⁵

CKD ist mit einer höheren Inzidenz von VHF verbunden. So wurde in einer japanischen Kohorte ein 32 % höheres Risiko für VHF beobachtet bei Patienten mit einer GFR von 30-59 ml/min im Vergleich zu Patienten mit normaler Nierenfunktion. Das Risiko eines VHF erhöhte sich dabei linear mit sich verschlechternder GFR. Ursächlich ist bei beiden Erkrankungen die Aktivierung des RAAS, von daher teilen sie sich Risikofaktoren und Pathomechanismen. VHF stellt eine häufige Arrhythmie dar bei dialyse-pflichtigen Patienten im Endstadium der CKD. Patienten mit chronischer Nierenerkrankung haben zudem ein erhöhtes Risiko für Herzinsuffizienz, Myokardinfarkt und Gesamtmortalität.^{53,106}

3.3.3 Pathophysiologie

Im Sinusrhythmus gibt der sinoatriale Knoten die Herzfrequenz, angepasst an die metabolischen Bedürfnisse, vor und übernimmt so die Schrittmacherfunktion des Herzens. Im Rahmen des VHF kommt es jedoch zu 400-600 unregelmäßigen Erregungen der Vorhofzellen pro Minute. Die Filterfunktion des atrioventrikulären (AV) Knotens verhindert dabei, dass diese hochfrequenten Erregungen ungefiltert an die Herzkammern weitergeleitet werden und schützt das Herz vor lebensbedrohlichen Kammertachykardien. Möglich ist dies durch die begrenzte Impulskapazität des AV-Knotens. So werden die elektrischen Entladungen nicht im Verhältnis 1:1 sondern unregelmäßig an die Ventrikel weitergeleitet. Herzfrequenzen von ungefähr 150/min sind typisch für nicht medikamentös behandeltes VHF.⁷⁵

Ektope Aktivitäten sind pathophysiologisch ursächlich für die Entstehung von VHF-Episoden. Dabei stellen diese ektopen Aktivitäten spontane Depolarisationen der Vorhofgewebezellen dar, welche außerhalb des Sinusknoten entstehen. Sie sind insgesamt schneller als der Sinusrhythmus. Diese Erkenntnisse über die Elektropathologie wurden vor allem durch moderne elektrische Kartierungsstudien der epikardialen Oberfläche der Vorhöfe erlangt.¹¹ Anhaltendes VHF kann in Veränderungen der Refraktärzeit und des zugrundeliegenden elektrophysiologischen Substrats im Vorhof resultieren. Diesen Prozess bezeichnet man als atriales Remodelling. Die Umbauprozesse führen schlussendlich zu einer fortschreitenden Verkürzung der Refraktärzeit und einer längeren Dauer der pathologischen Aktivität, was zu Re-Entry-Kreisläufen führen kann. Diese kreisende Erregung wird durch die kurze Refraktärzeit begünstigt, so können zuvor depolarisierte Kardiomyozyten schneller wieder erregt werden. Dadurch kann anhaltendes VHF entstehen.⁷

Die Bildung von Myokardfibrose ist einer der Hauptfaktoren, die zu zum atrialen Remodeling führen. An der Bildung der Fibrose sind multifaktorielle Prozesse beteiligt, die aus komplexen Wechselwirkungen zwischen zellulären und neurohormonalen Mediatoren resultieren. In diesem Umbauprozess nehmen kardiale Fibroblasten eine zentrale Rolle ein. Sie sind im

Wesentlichen nicht erregbare Zellen, können jedoch über Connexine elektrische Erregung zwischen den Kardiomyozyten übertragen. Daraus resultiert eine Heterogenität der Erregung, die Aktionspotentiale verkürzen sich, ruhende Kardiomyozyten werden erregt. Regionen der Vorhoffibrose verursachen so eine Verlangsamung der Erregungsleitung, erhöhen die Heterogenität der Stromleitung und stellen schlussendlich ein Arrhythmiesubstrat dar. Die Vorhoffibrose ist somit an der Entstehung und Aufrechterhaltung des VHF beteiligt.⁹⁸

Ein weiterer Baustein der komplexen kardialen Remodeling-Vorgänge, welche in der Entstehung von Arrhythmie-Substraten resultieren, stellt die Hypertrophie von Kardiomyozyten dar. Dabei korreliert die Kardiomyozytentgröße reziprok mit der Kerndichte. Die Hypertrophie der Kardiomyozyten steht in engem Zusammenhang mit einer Abnahme der Kerndichte der Kardiomyozyten, was darauf hindeutet, dass die Hypertrophie der Kardiomyozyten im Wesentlichen eine kompensatorische Reaktion auf die Abnahme der Kardiomyozytenzahl sein könnte. Eine verringerte Kardiomyozytenzahl stellt einen weiteren wichtigen Faktor für das Fortschreiten der atrialen Kardiomyopathie dar, ebenso wie die Zunahme der Kardiomyozytentgröße in einer ausgeprägten Ausbreitungsverzögerung der Erregungsleitung resultiert. Die Abnahme der Vorhoffunktion, die auf eine Abnahme der Zahl der Herzmuskelzellen bei gleichzeitiger kompensatorischer Kardiomyotenhypertrophie zurückzuführen ist, gilt als eine mögliche Ursache für die Zunahme des Risikos einer Herzinsuffizienz und der Entstehung von Thromboembolien mit zunehmendem Alter.^{112,94}

Ein weiterer Faktor, der zur Entstehung von Herzrhythmusstörungen beitragen kann, ist die erhöhte Aktivität des sympathischen Nervensystems. Noradrenalin kann dabei als Neurotransmitter des sympathischen Nervensystems auf sympathische Stimuli hin freigesetzt werden und kardiale Betarezeptoren aktivieren. Zudem konnte gezeigt werden, dass die sympathische Aktivierung die Entwicklung des arrhythmogenen Substrats über neurohumorale Mechanismen wie das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System fördert. Daraus resultiert eine Hochregulierung von profibrotischen elektrischen Leitungsbahnen in den Vorhöfen. Zusammenfassend kann so eine erhöhte Sympathikusaktivität sowohl zum strukturellen als auch zum elektrischen Umbau des Herzens beitragen. Die Aktivierung des autonomen Nervensystems übernimmt so eine wichtige Rolle bei der Auslösung und Aufrechterhaltung von Vorhofflimmern.⁶⁰

Neben den genannten strukturellen Remodelingvorgängen kommt es auch zu elektrophysiologischen Veränderungen. Das elektrophysiologische Remodeling ist durch die Verkürzung der Refraktärperiode gekennzeichnet, was zu einer Erhöhung der Stabilität des Vorhofflimmerns beiträgt.¹¹² Dabei stellt vor allem die P-Wellen-Dauer einen elektrokardiographischen Marker dar, der die Erregungsleitung im Vorhof widerspiegelt und dessen Verlängerung mit Vorhofflimmern einhergeht.³³

Die mit atrialen Arrhythmien verbundene hämodynamische Überlastung des Vorhofs führt zu einer Dilatation.⁹⁸ Auch kommt es zu pathologischen endokardialen Veränderungen. Beides erhöht das Risiko der Thrombenbildung. Des Weiteren führt die Flimmerbewegung des Vorhofs im Gegensatz zur physiologischen geregelten Vorhofkontraktion im Sinusrhythmus zu einer Stase des Blutes.

Die ektopen Zentren entstammen zu 95 % der Pulmonalvenen-Region.¹¹ Ursächlich dafür ist, dass die Kardiomyozyten der Pulmonalvenen-Region eine Schrittmacher-ähnliche Aktivität entwickeln und spontane Depolarisationen auslösen. Das Gewebe unterscheidet sich in diesem Bereich in seinem elektrophysiologischen Aufbau vom umliegenden Gewebe. Dieser Unterschied wirkt sich auf die Refraktärzeit und die Leitungsgeschwindigkeit aus, sodass es zu einer unregelmäßigen elektrischen Aktivität kommt.⁷ Erwähnenswert ist ebenfalls das Bachmann-Bündel, ein Kardiomyozyten-Bündel, welches den linken und rechten Vorhof miteinander verbindet. Dieses Muskelbündel stellt durch die Verbindung beider Vorhöfe einen bevorzugten Ort für Überleitungsstörungen dar. Patienten mit VHF weisen in beiden Vorhöfen mehr Erregungsleitungsstörungen auf, am stärksten ausgeprägt im Bachmann-Bündel.¹¹

3.3.4 Klinik

Patienten mit VHF können unterschiedliche Symptome aufweisen. Zu den Symptomen zählen Palpitationen, Atemnot und Müdigkeit, aber auch Brustschmerzen, thorakales Engegefühl, Belastungsintoleranz, Synkope oder Schlafstörungen können auftreten. Dabei sind 50-87 % aller Patienten asymptomatisch. Dies führt möglicherweise zu einer ungünstigen Prognose.³⁸ Hierbei kann es vorkommen, dass erst durch eine VHF-bedingte Komplikation wie z.B. einen Schlaganfall das VHF diagnostiziert wird.⁶⁴ Umso mehr Relevanz kommt einer Früherkennung im Rahmen von Screening-Programme zu. Beispielsweise regelmäßige EKG-Untersuchungen > 65 Jahre im Rahmen von Vorsorgeuntersuchungen. Ein systematisches EKG-Screening wird für Patienten ab dem 75 Lebensjahr und mit erhöhtem Schlaganfallrisiko empfohlen. Zukünftig sollten auch Smartwatches mit EKG-Funktion das Erkennen eines VHF ermöglichen. Diese Techniken sind aber noch nicht standardmäßig in Verwendung.³⁸

3.3.5 Therapie

Die Therapie des VHF stützt sich auf 3 Säulen: der Rhythmuskontrolle, Frequenzkontrolle und Antikoagulation. Als Vorteile durch die Konversion in den Sinusrhythmus erhofft man sich eine Verbesserung der Symptome, der Hämodynamik und eine Verringerung des Risikos thromboembolischer Ereignisse.⁷

Die Rhythmuskontrolle umfasst eine elektrische oder medikamentöse Kardioversion. Zahlreiche Antiarrhythmika dienen zur Aufrechterhaltung des Sinusrhythmus, weisen jedoch eine begrenzte Wirksamkeit und ein hohes Nebenwirkungsprofil auf. Pharmakologisch stehen

z.B. Vernakalant, Flecainid oder Propafenon zur Verfügung. Intravenöses Amiodaron sollte dabei bei Patienten mit Herzinsuffizienz oder strukturellen Herzerkrankungen bevorzugt werden.³⁸ Aufgrund des Jodanteils ist dieses Klasse III-Antiarrhythmikum jedoch potenziell toxisch für die Schilddrüse und andere Gewebe.⁷ Eine pharmakologische Kardioversion sollte nur bei hämodynamisch stabilen Patienten und unter Abwägung des thromboembolischen Risikos durchgeführt werden.³⁸

Die Herzfrequenzkontrolle kann ebenfalls durch mehrere pharmakologische Wirkstoffe erreicht werden, darunter Betablocker, Digitalis und Kalziumkanalblocker. Als Medikamente der ersten Wahl bei VHF-Patienten mit linksventrikulärer Ejektionsfraktion (LVEF) $\geq 40\%$ stehen Betablocker, Diltiazem und Verapamil zur Verfügung. Ist die LVEF auf $< 40\%$ verringert werden Betablocker oder Digitoxin empfohlen. Über die genaue Zielfrequenz herrscht aktuell noch Uneinigkeit. Die DGK empfiehlt eine Ruhe-Herzfrequenz $< 100/\text{min}$ als initiales Ziel bei asymptomatischen Patienten oder Patienten mit nur geringen Symptomen. Aggravieren die Symptome oder es kommt zu einer Verschlechterung der linksventrikulären Funktion bzw. Indikationsstellung für eine kardiale Resynchronisationstherapie, liegt die Ziel-Herzfrequenz bei $< 80/\text{min}$. Wird die Zielfrequenz mittels Monotherapie nicht erreicht, sollte eine Kombinationstherapie erwogen werden.³⁸

Mehrere Studien zeigten eine Vergleichbarkeit der Behandlungsergebnisse zwischen Rhythmus- und Frequenzkontrolle.⁸⁵

Alternativ zu den pharmakologischen Therapieoptionen gibt es noch interventionelle Verfahren. Das weitverbreitetste Verfahren ist die Pulmonalvenenisolation über eine Katheterablation.⁸⁴ Hierbei werden, unterstützt durch dreidimensionale elektroanatomische Mappingsysteme, die Lungenvenen vollständig durch lineare Läsionen mittels Radiofrequenz- oder Kryoablation um ihr Antrum elektrisch isoliert.^{84,38} Das Ziel besteht darin, den ektopen Auslöser oder das Substrat zu beseitigen, dass die pathologische Depolarisation auslöst.⁶⁴ Dieser Eingriff wurde über die letzten Jahre ständig weiterentwickelt, so dass er mittlerweile als sicher und effektiv gilt. Die Leitlinie empfiehlt die Pulmonalvenenisolation als Zweitlinientherapie für Patienten mit symptomatischen paroxysmalem VHF oder persistierendem VHF. Die Ergebnisse mehrerer randomisierter kontrollierter Studien und Metaanalysen zeigen deutlich, dass die Katheterablation das Wiederauftreten von VHF wirkungsvoller reduziert und den Sinusrhythmus deutlich effektiver aufrechterhält als der Einsatz von antiarrhythmischen Medikamenten bei Patienten, die bei denen mindestens ein antiarrhythmisches Medikament versagt hat.^{84,82} So zeigt diese Intervention bei 64-71 % der Patienten klinischen Erfolg. Eine Symptomverbesserung und Steigerung der Lebensqualität konnte ebenfalls durch erfolgreiche Katheterablation erreicht werden.⁶⁴

Dennoch konnten Studien zeigen, dass ein erheblicher Anteil der Patienten ein spätes Wiederauftreten von VHF nach einer Katheterablation entwickelt.^{64,81} Des Weiteren gibt es

keinen Hinweis dafür, dass dieser Eingriff die Mortalität über die Rhythmus- und Symptomkontrolle hinaus reduzieren kann. Das Risiko der Intervention für schwerwiegende Komplikationen liegt bei 3-4 %.⁶⁴

Aufgrund des erhöhten Risikos für thromboembolische Ereignisse mit dem ischämischen Schlaganfall als häufigste Komplikation unter VHF, muss bei jedem Patienten das individuelle Risiko mittels Scoringsystemen ermittelt werden. Dazu eignet sich der CHA₂DS₂-VASc-Score. Dieser Score zur Ermittlung des Schlaganfallrisikos unter VHF berechnet sich aus den als Akronym zusammengefassten folgenden Risikofaktoren: **C**ongestive heart failure, **H**ypertension, **A**ge ≥75 years, **D**iabetes mellitus, **S**troke, **V**ascular disease, **A**ge 65-74 years, **S**ex category (female). Jeder Parameter wird mit einem Punkt gewertet, abgesehen der zwei Risikoparameter, die bereits im Akronym mit der Zahl 2 versehen werden: **A**ge ≥75 years und **V**ascular disease werden 2 Punkte zugeteilt. Patienten mit einem Punktwert von 0 bzw. Frauen ohne weitere Risikofaktoren (Punktwert 1) benötigen keine antikoagulative Dauertherapie. Das Risiko dieser Patientengruppen, einen Schlaganfall zu erleiden, liegt < 1 %. Bei Erfüllung eines Risikofaktors bei Männern (Punktwert 1) bzw. eines nicht-geschlechtsspezifischen Risikofaktors bei weiblichen Patienten (Punktwert 2), kann eine Antikoagulation nach individueller Nutzen-Risiko-Abwägung erwogen werden. Die Indikation einer Antikoagulation ist bei Männern ab einem Punktwert ≥ 2 und bei Frauen ab einem Wert ≥ 3 Punkten gestellt. Dabei werden neue orale Antikoagulantien (NOAK) den Vitamin-K-Antagonisten vorgezogen.³⁸

Parallel zur Risikobewertung des Schlaganfallrisikos sollte das Blutungsrisiko berücksichtigt werden. Auch dazu sollte ein Risikoscore herangezogen werden, geeignet ist der HAS-BLED-Score. Die Buchstaben des Akronyms stehen für folgende klinische Risikofaktoren: Uncontrolled **H**ypertension, **A**bnormal renal and/or hepatic function, **S**troke, **B**leeding history or predisposition, **L**abile INR, **E**lderly > 65 years and **D**rugs or excessive alcohol drinking. Pro Risikofaktor wird ein Punkt berechnet. Die Kategorien mit 2 Variablen (**A**bnormal renal and/or hepatic function und **D**rugs or excessive alcohol drinking) können somit bis zu 2 Punkte ergeben. Insgesamt liegt der maximal erreichbare Wert folglich bei 9 Punkten. Ab einer Risikokonstellation ≥ 2 Punkten spricht man von einem hohen Blutungsrisiko, Werte ≤ 2 Punkte gehen mit einem niedrigen bis moderaten Blutungsrisiko einher. Wichtig ist hierbei zu erwähnen, dass ein hoher Blutungsrisiko-Score nicht dazu führen sollte, orale Antikoagulantien abzulehnen. Der Score dient dazu, die Aufmerksamkeit auf Patienten mit hohem Risiko zu erhöhen. Die Beachtung der dynamischen Veränderungen des Blutungsrisikos sind relevanter als das Ermitteln eines Ausgangszustands.³⁸

Zusätzlich zu den bisherigen besprochenen Therapiemaßnahmen sollten immer auch Lebensstilmodifikationen angestrebt werden, um atriale Remodelingprozesse zu minimieren und so die Entstehung von VHF zu verhindern. Dazu zählen unter anderem das Erreichen

eines physiologischen Body Mass Index (BMI), regelmäßige sportliche Aktivität, Alkoholabstinenz und die Behandlung von Obstruktiver Schlafapnoe.⁸⁴

3.3.6 Arterielle Hypertonie und VHF

Arterielle Hypertonie und VHF treten häufig gemeinsam auf. Diese Tatsache ist darauf zurückzuführen, dass erhöhte Blutdrucklevel die Inzidenz von VHF beeinflussen.⁴⁵ Eine norwegische Studie mit initial 2014 männlichen Teilnehmer, beobachtete über 35 Jahre, dass sowohl erhöhte systolische Blutdrucklevel als auch diastolische Blutdrucklevel mit einem erhöhten Risiko VHF zu entwickeln einhergehen.²⁹ Ein ähnliches Studienergebnis konnte im Rahmen der „Women's Health Study“ erfasst werden. Hierbei wurden 34.221 Teilnehmerinnen für eine Studiendauer von 12,5 Jahren eingeschlossen. Bei den initial gesunden Frauen korrelierte der Blutdruck deutlich mit der Inzidenz von VHF. Dabei stellte sich der systolische Wert als stärkerer Prädiktor heraus im Vergleich zum diastolischen Blutdruckwert. Systolische Blutdruckwerte innerhalb des nichthypertensiven Bereichs waren unabhängig mit dem Auftreten von Vorhofflimmern assoziiert.¹⁶ Als Ursache für die erhöhte Inzidenz von VHF unter arterieller Hypertonie wird dabei die linksventrikuläre Hypertrophie und linksatriale Dilatation angenommen. Beide Faktoren prädisponieren für die Entstehung von VHF. Des Weiteren lösen sowohl die linksventrikuläre Hypertrophie als auch arterielle Hypertonie eine sympathische Überaktivität aus. Diese sympathische Überaktivität spielt eine relevante Rolle bei der Entstehung von VHF, da sie sowohl als Baustein in der kardiovaskulären Homöostase fungiert, als auch bei übermäßiger Aktivität multiple Herzkrankheiten verursachen kann.⁶⁸ Aufgrund dieser häufigen Korrelation sollten Patienten mit Bluthochdruck umfassend auf VHF mittels regelmäßigen Langzeit-EKG-Kontrollen gescreent werden, genauso wie bei VHF-Patienten eine regelmäßige Kontrolle des Blutdrucks erfolgen sollte.⁴⁵ Die DGK empfiehlt bei Patienten mit VHF auf eine gute Blutdruckkontrolle zu achten, damit VHF-Rezidive und das Risiko von Schlaganfällen und Blutungen möglichst minimiert werden kann.³⁸ Ein Vorteil ist dabei, dass mehrere Medikamentenklassen, die zur Kontrolle von VHF eingesetzt werden, auch blutdrucksenkende Wirkung haben, beispielsweise Betablocker. Aber auch Medikamente, die das RAAS blockieren und somit die sympathische Überaktivierung unterdrücken, wirken beiden Pathomechanismen entgegen.⁴⁵ Außerdem verbindet beide Erkrankungen auch ihre gemeinsamen Risikofaktoren, dazu zählt Rauchen, Diabetes mellitus und Alkoholkonsum. Daher ist es von großer Bedeutung, beide Krankheiten rechtzeitig zu erkennen und gleichermaßen zu behandeln, inklusive krankheitsverbessernder Lebensstilmodifikationen. Diese Aufgabe stellt das Gesundheitssystem in Hinblick auf eine immer älter werdende Gesellschaft zunehmend vor

eine Herausforderung, aufgrund des steigenden Anteils der Patienten mit VHF und Bluthochdruck.⁴⁵

3.3.7 CKD und VHF

CKD und VHF sind eng miteinander verbundene Krankheiten und haben gemeinsame Risikofaktoren wie Hypertonie, Diabetes mellitus und koronare Herzerkrankung (KHK). Die Prävalenz beider Erkrankungen wächst, so dass künftig immer mehr Menschen betroffen sein werden und eine zunehmende Relevanz in Hinblick auf die optimale Behandlung der Patienten entsteht.

Beide Erkrankungen sind bidirektional miteinander verbunden, das bedeutet CKD erhöht das Risiko für die Entstehung von VHF genauso wie VHF mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von CKD einhergeht. Die Prävalenz von VHF unter CKD ist etwa auf das 3-4fache erhöht im Vergleich zu den geschätzten 2-4 % der Allgemeinbevölkerung.¹⁸ Eine Metaanalyse, welche 25 Studien miteinschloss, untersuchte die Inzidenz, Prävalenz und das Outcome von VHF bei Patienten mit CKD im Endstadium unter Nierenersatztherapie. Das Ergebnis zeigte eine signifikant höhere Inzidenz und Prävalenz von VHF in der beschriebenen Patienten Kohorte. Zudem konnte eine Assoziation mit einem erhöhten Risiko für Schlaganfall und Tod festgestellt werden als in der Normalbevölkerung.¹¹⁵ Aber auch CKD-betroffene Patienten mit einer GFR zwischen 15-59/ml pro 1,73 m² haben ein erhöhtes Risiko für VHF, wie in einer weiteren Studie anhand von 1840 Teilnehmern (615 Frauen und 1225 Männer) deutlich gemacht werden konnte.⁵⁵ Des Weiteren erhöhte sich das Risiko des Erreichen des Endstadiums der CKD bei Patienten, welche zu Studienbeginn noch nicht unter VHF litten, es jedoch im Verlauf entwickelten. Patienten, welche über den Zeitraum der Studie nicht an VHF erkrankten, gelangten signifikant seltener in das letzte Stadium der CKD.⁵

Es gibt mehrere Mechanismen, die beide Erkrankungen miteinander verbindet. Als ein mögliches Bindeglied wurden Entzündungsmarker beobachtet, welche im Rahmen der CKD entstehen und nachweislich die Entwicklung und Persistenz von VHF fördern.^{15,18} Ein weiterer wichtiger Faktor ist die Aktivierung des RAAS, welche sowohl in der Pathogenese der CKD mitwirkt als auch beispielsweise durch Bildung atrialer Fibrose zur Entwicklung von VHF beitragen kann. Zudem spielt die Hochregulierung des Sympathikus und ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen eine Rolle. Genauso wie Medikamente gegen Vorhofflimmern oft nephrotoxische Nebenwirkungen zeigen. VHF und CKD sind beide außerdem durch einen prothrombotischen Zustand gekennzeichnet. Die Thrombozytenaktivierung steht dabei in umgekehrter Beziehung zur Nierenfunktion.¹⁸

Aufgrund dieser engen Verbindung beider Krankheiten sollte ein großes Augenmerk auf eine exakte Diagnostik, Risikostratifizierung und ein optimales Management von Komorbiditäten gelegt werden.

3.4 Oxidativer Stress

Oxidativer Stress ist definiert als Ungleichgewicht zwischen (freien) Radikalen und dem unzureichenden Abbau dieser Radikale durch antioxidative Systeme. Kommt es zu einer Verschiebung des Gleichgewichts hin zu den Oxidantien, spricht man von oxidativem Stress. Reaktive Sauerstoff- (ROS) und Stickstoffspezies (RNS) werden im Übermaß gebildet und schaden der Zelle. Es kommt zur Oxidation von Lipiden, Proteinen und Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid, DNA). Viele pathologische Zustände sind durch oxidativen Stress bedingt, darunter Bluthochdruck, Arteriosklerose, Diabetes und CKD.^{17,8}

Reaktive Spezies haben in moderater Konzentration den physiologischen Nutzen als Botenstoffe und wirken in der Signaltransduktion mit. Sie werden kontinuierlich durch Oxidationsreaktionen in lebenden Zellen während normaler Stoffwechselprozesse gebildet. Als freies Radikal bezeichnet man eine chemische Spezies mit einem oder mehreren ungepaarten Valenzelektronen. Klassische Beispiele sind Hydroxyl- (HO^\cdot), Stickstoffmonooxid- (NO^\cdot), Stickstoffdioxid-Radikale (NO_2^\cdot) oder das Superoxidanion (O_2^-). Sie haben den hochaktiven Drang, sich mit einem weiteren ungepaarten Elektron zu verbinden und somit in Form einer kovalenten Bindung ein neues nicht-radikalisches Molekül entstehen zu lassen. Eine weitere, häufigere Möglichkeit ist jedoch, dass freie Radikale nicht-radikalische Moleküle angreifen. So entsteht ein neues (sekundäres) radikalisches Molekül und eine Art Kettenreaktion wird ausgelöst. Diese mehrfach hintereinander ablaufenden Reaktionen schädigen das Gewebe in Form von übermäßigen oxidativen Schädigungen. Sekundäre Radikale können Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Distickstofftrioxid (N_2O_3) oder Lipidperoxide sein.¹⁷

Eine der Hauptquellen für reaktive Sauerstoffspezies stellt die mitochondriale Atmungskette dar, zusammen mit den Enzymen NADPH-Oxidase (Nox) und Xanthin-Oxidase (XO). Von den fünf existierenden NADPH-Oxidasen ist Nox2 die häufigste. Nox katalysiert den Elektronentransfer vom Zytosol in den extrazellulären Raum bzw. spezialisierte Zellkompartimente. NADPH stellt dabei im Zytosol das Elektron zur Verfügung, dass zur Reduktion von Sauerstoff durch Nox benötigt wird. Nox 4, eine weitere Isoform, spielt eine zentrale Rolle im Rahmen von Nieren- und Gefäßerkrankungen. Das im normalen Zustand kaum aktive Enzym wird durch Zytokine, Wachstumsfaktoren, Hyperlipidämie oder

Hyperglykämie aktiviert. Es werden nach der Aktivierung mehrere ROS erzeugt, welche wiederum andere prooxidative Enzyme auslösen und so einen Teufelskreis in Gang bringen.¹⁷

Eine weitere Quelle oxidativen Stresses ist die Xanthin-Oxidase (XO). Die Xanthinoxidoreduktase fungiert gleichzeitig als Xanthinhydrogenase und Xanthinoxidase und nimmt mit ihrer Doppelfunktion eine relevante Funktion in den letzten Schritten des Purinabbaus ein. Die XO überträgt unter physiologischen Bedingungen Elektronen hauptsächlich auf NAD⁺ unter Bildung von Xanthin aus Hypoxanthin und Harnsäure aus Xanthin. Dabei wird der Co-Faktor NADH produziert. Herrschen jedoch Bedingungen einer Inflammation, wird die Xanthinhydrogenase posttranslational durch Oxidation von Cysteinresten zum Enzym Xanthinoxidase modifiziert. Diese Umwandlung ist für die Bildung oxidativen Stresses relevant, da XO eine höhere Affinität zu Sauerstoff als Co-Faktor besitzt. Bei den Abbauschritten von Hypoxanthin zu Xanthin bzw. Xanthin zu Harnstoff wird H₂O₂ gebildet. Das entstandene H₂O₂ und andere reaktive Sauerstoffspezies verstärken die Zellschädigung erheblich.¹⁷

Zur Abwehr solcher Zellschädigungen, verursacht durch oxidativen Stress, verfügt der Körper über Antioxidationsmechanismen. Antioxidantien werden selbst oxidiert, um den Teufelskreis weiterer Oxidationsreaktionen zu unterbrechen. Es können dabei zwei verschiedene enzymatische Antioxidantien unterschieden werden: Konstitutionell wirksame antioxidative Enzyme (z.B. Katalase (CAT), Peroxiredoxin (Prx), Superoxid-Dismutase (SOD), welche das Redox-Gleichgewicht intrazellulär aufrechterhalten, und „antioxidant response element“-gesteuerte Enzyme (ARE). AREs werden durch den Transkriptionsfaktor Nrf2 reguliert und aktiviert. Kommt es nun im Metabolismus zu verstärktem Stress oder Inflammation, werden AREs durch Nrf2 aktiviert und exprimieren antioxidative Enzyme wie beispielsweise Häm-Oxygenase-1 (HO-1).¹⁷

Ein primäres enzymatisches Antioxidans ist die Superoxid-Dismutase (SOD). Dieses zink- und kupferhaltige Enzym wandelt das reaktive Superoxidion (O₂⁻) durch Aufnahme eines zweiten Elektrons in ein Peroxidanion (O₂²⁻) um. Dadurch kann sich das Peroxidanion mit zwei Wasserstoffprotonen zu H₂O₂ verbinden. Um nun das angefallene H₂O₂ in das stabile H₂O umzuwandeln, stehen 2 verschiedene Optionen zur Verfügung. Im ersten Falle zersetzt die Häm-haltige Katalase (CAT) H₂O₂ direkt zu Wasser und O₂.¹⁷ Dieses Enzym hat eine der höchsten Umsatzraten aller Enzyme. Die zweite Variante wird über die in allen Zellkompartimenten vorkommende Enzymfamilie der Peroxiredoxine verwirklicht. Sie oxidieren H₂O₂ zu H₂O, indem sie ein anderes Substrat oxidierten, z.B. Glutathion (GSH). Das verwendete Reduktionsmittel ist namensgebend.⁵⁴ GSH wird dabei als Reduktionsmittel und Wasserstoffdonator verwendet und zu Glutathiondisulfid (GSSG) oxidiert.¹⁷

Aus der Gruppe der ARE-gesteuerten Enzyme ist die Häm-Oxygenase (HO) ein wichtiger Vertreter. HO-1 ist ein bei vermehrtem Stress induzierbares Enzym, welches eine zentrale Rolle im Häm-Abbau einnimmt. Dabei öffnet HO-1 den Tetrapyrrolring des Häms an der Methinbrücke im ersten Schritt des Abbauvorgangs. Das rote Häm wird so in grünes Biliverdin überführt. Als Co-Faktoren der HO-1 wird NADPH+H⁺ zu NADP⁺ oxidiert, genauso wie in dem O₂-abhängigen Schritt H₂O und Kohlenstoffmonoxid (CO) frei werden.¹⁷

3.5 Die Rolle des RAAS

Das RAAS (Renin-Angiotensin-Aldosteron-System) hat sowohl eine Rolle in der Pathophysiologie des Bluthochdrucks als auch in der Organschädigung, beispielsweise der Nieren im Rahmen der CKD. Aufgrund dieser relevanten Rolle wurde es in den letzten Jahren zunehmend in den Fokus der Forschung gerückt.

In der Niere sind alle Komponenten des RAAS vertreten. Die Aspartylprotease Renin wird hauptsächlich von den juxtaglomerulären Zellen an den afferenten Arteriolen freigesetzt. Neben der Niere können auch andere Gewebe Renin bzw. Prorenin produzieren. Angiotensinogen wird in erster Linie von Leberzellen gebildet und kontinuierlich in den Kreislauf sezerniert. Dies ermöglicht eine Bildung von Angiotensin II im gesamten Blutkreislauf. Zur Bildung von Angiotensin I spaltet die Protease Renin Angiotensinogen am N-Terminus ab. Das auf Endothelzellen weit verbreitete Angiotensin-konvertierende Enzym (ACE) konvertiert Angiotensin I schließlich zu Angiotensin II.⁵²

Angiotensin II ist das stärkste biologisch aktive Produkt des RAAS.⁵² Durch die Bindung an den AT1-Rezeptor an der Plasmamembran wird der Rezeptor phosphoryliert und somit nachgeschaltete Signalwege aktiviert. Diese führen zu intrazellulären Reaktionen und endozytotischen Prozessen.⁷⁰ Zu seiner Wirkung zählt die Verengung glatter Gefäßmuskelzellen, die Steigerung der Kontraktilität des Herzmuskels, die Stimulation der Aldosteronproduktion, die Anregung der Katecholaminfreisetzung aus dem Nebennierenmark und sympathischen Nervenendigungen und die Erhöhung der Aktivität des sympathischen Nervensystems. Eine weitere Aufgabe beinhaltet die Regulation des Natriumtransports in der Niere und dem Darm. Zusätzlich zu den genannten physiologischen Funktionen induziert Angiotensin II Entzündungen, Zellwachstum, Mitogenese, Apoptose, reguliert die Genexpression bioaktiver Substanzen und aktiviert intrazelluläre Signalwege, die zu einer Gewebeschädigung beitragen können. Mehrere Studien konnten anhand der Auswirkungen von ACEs und Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp-1(AT1)-Rezeptorblockern zeigen, dass Angiotensin II eine zentrale Rolle bei der Entstehung von Bluthochdruck und Nierenschädigungen einnimmt. Diese Auswirkungen resultieren auf der unangemessenen

Aktivierung von AT1-Rezeptoren. Tierexperimentelle Studien an Ratten konnten zeigen, dass Angiotensin II eine Verringerung der glomerulären Filtrationsrate einzelner Nephrone und des glomerulären Plasmaflusses bewirkt.⁵² Es führt zu einer Vasokonstriktion sowohl der afferenten als auch efferenten Nierengefäße, was in der Entwicklung einer glomerulären kapillaren Hypertonie resultiert und den renalen Blutfluss drosselt.⁷⁰ Zudem erhöht es den afferenten und efferenten arteriären Widerstand. Anhaltend erhöhtes intrarenales Angiotensin II führt zu einer Proteinurie und zu einer fortschreitenden Schädigung der glomerulären Filtrationsrate. Als eines der stärksten natriumrückhaltenden Hormone im Körper führt eine zu hohe Angiotensin-II-Konzentration zu einer unphysiologische hohen Salz- und Wasserretention.⁵² Diese kann am deutlichsten im Bereich des Nierenmarks beobachtet werden.⁷⁰ Die Natrium(Na^+)-Retention wird verstärkt durch die Regulatorfunktion des Hormons auf Aldosteron, welches über Mineralokortikoidrezeptoren in den Sammelrohren der Niere ebenfalls Natrium rückresorbiert. Somit wird Angiotensin II eine starke anti-natriuretische Wirkung beigemessen.⁵²

Neben Angiotensin II sind auch weitere RAAS-Komponenten entscheidend an entzündlichen und fibrotischen Nierenschäden beteiligt. Insbesondere Aldosteron, welches auch durch Angiotensin II stimuliert wird, übt eine pro-oxidative Wirkung aus. Diese wird unter anderem über NADPH-Oxidase-abhängige Mechanismen vermittelt. Die proinflammatorischen und profibrotischen Aldosteron-Einflüsse werden vermutlich über den spezifischen Transkriptionsfaktor NF- κ B eingeleitet, der an der Entzündung, Immunität, Zellproliferation und Apoptose beteiligt ist. Die Stimulation der Aldosteron-Sekretion aus der Nebennierenrinde durch das Hormon Angiotensin II führt synergistisch ebenfalls zu einer verstärkten Rückresorption von Natrium und Wasser. Des Weiteren wird vermehrt Endothelin-1 produziert, ein potentes vasokonstriktorisches Peptid mit entzündungsfördernden und pro-fibrotischen Wirkungen.⁷⁰

Aufgrund dieser zahlreichen und multifaktoriellen Wirkungen nimmt das RAAS, insbesondere das Hormon Angiotensin II, eine bedeutende Rolle in der Pathogenese des systemischen Bluthochdrucks und im Rahmen von Nierenerkrankungen ein. Im Tiermodell mit spontan hypertensiven Ratten konnte eine erhöhte intrarenale Angiotensinogen-Produktion nachgewiesen werden, welche zu erhöhten Angiotensin-II-Spiegeln beitrug und zur Entwicklung einer arteriellen Hypertonie und Nierenschädigung führte. Auch bei zahlreichen Pathologien der Niere nimmt das RAAS eine zentrale Position ein. Angiotensin II hat eine Reihe schädlicher Wirkungen bei CKD. Neben den bereits angeführten hämodynamischen Wirkungen wirkt Angiotensin II auch über nicht-hämodynamische Effekte nierenschädigend, darunter über die Stimulierung fibogener Mediatoren, verstärkte Bildung freier Radikale, Aggravation des glomerulären Blutdrucks und die Induktion einer tubulointerstitiellen Hypoxie.

Das Resultat dieser Effekte ist insgesamt die Fibrogenese und Steigerung des oxidativen Stresses innerhalb der Niere.^{52,70}

Durch eine inadäquate Stimulation des RAAS übt Angiotensin II aufgrund synergistischer Wirkungen auf mikrozirkulatorische und epitheliale Transportsysteme der Niere einen starken hypertensinogenen Einfluss aus. Die anhaltende Stimulation des intrarenalen RAAS bei erhöhtem arteriellem Blutdruck führt zu einer gesteigerten Natriumrückresorption, Nierenschädigung, Proliferation und Fibrose.⁵²

3.6 Das kardiale Hormon BNP

Das B-Typ natriuretische Peptid (brain natriuretic peptide, BNP) ist ein aus 32 Aminosäuren aufgebautes Polypeptid. Es wurde primär aus porcinem Hirngewebe isoliert. Im menschlichen Genom befindet sich das entsprechende Gen auf Chromosom 1 und kodiert das Prohormon proBNP. Dieser inaktive Vorläufer wird in den Herzmuskelzellen proteolytisch in die biologisch aktive Form BNP und N-terminale proBNP (N-terminal pro-brain natriuretic peptide, NT-proBNP) aufgespalten.^{30,73}

Das Hormon wird hauptsächlich durch Kardiomyozyten sezerniert. Der Synthese- und Sekretionsstimulus stellt dabei die Dehnung der Myozyten durch erhöhte ventrikuläre Wandspannung dar. Dabei wird BNP zum größten Teil von ventrikulären Myozyten produziert, im Gegensatz zu dem atrialen natriuretischen Peptid (ANP), welches namensgebend bevorzugt im Vorhofgewebe synthetisiert wird.³⁰

Unter pathologischen Zuständen des Herzmuskelgewebes wie im Falle der Herzinsuffizienz oder eines Myokardinfarkts kommt es zu einer Hochregulation der ventrikulären Produktion des kardialen Hormons. In Folge dieser verstärkten Sezernierung bindet BNP in den peripheren Zielorganen an den Peptidrezeptor Typ A und bewirkt somit eine Steigerung der intrazellulären zyklischen-Guanosinmonophosphat(cGMP)-Produktion. Die Wirkung des kardialen Hormons ist vielfältig, es hemmt die Renin- und Aldosteronproduktion, steigert die renale Elektrolyt- und Wasserexkretion und fungiert folglich als Gegenpart zum RAAS.^{30,73} Zudem wirkt es vasodilatierend, steigert die Diurese und vermindert das Wachstum der Herz- und Gefäßmuskelzellen. Tierversuche an Mäusen konnten zeigen, dass ein Knockout des BNP-Gens die kardiale Fibrose steigert, im Gegenzug bewirkt eine Überexpression von BNP Hypotonie.³⁰ Aus diesem Grund eignet sich die Quantifizierung der BNP-Konzentration als Maß für die Herzfunktion. Dabei zeichnet sich insbesondere der hohe negative Prädiktionswert zum Ausschluss einer Herzinsuffizienz aus. Die leitliniengerechte Therapie der Herzinsuffizienz mit ACE-Hemmern, Sartanen, Spironolacton und Diuretika senkt den BNP-Spiegel. Daher eignet sich BNP auch als Verlaufskontrolle zur Überwachung der

Therapieeffizienz. Neben diesen klassischen intrinsischen Herzfunktionsstörungen finden sich erhöhte BNP-Level auch bei Nierenerkrankungen.²¹ Patienten mit CKD sind anfälliger für myokardiale Schäden, welche in systolischer und diastolischer Dysfunktion resultieren können. Dies erhöhte Risiko beruht auf der Akkumulation kardiotoxischer Stoffwechselprodukte wie Kreatinin, pathologischen Veränderungen des RAAS und erhöhten Blutdruck. Daran schließt sich ein Teufelskreis aus Minderdurchblutung der Nieren aufgrund der Herzinsuffizienz und daraus folgender Verschlechterung der Herzleistung an. Aus diesem Grund ist das frühzeitige Erkennen der Herzinsuffizienz mittels kardialer Marker wie BNP relevant für die Prognose des Patienten.³²

3.7 Renale Denervation

Die interventionelle sympathische Nierenarteriendenerivation (renale Denervation, RDN) stellt ein Verfahren zur selektiven renalen Sympathektomie dar, mit dem Ziel durch eine Abnahme der zentralen Sympathikusaktivität eine anhaltende Blutdrucksenkung zu erlangen. Als Zielgruppe werden Patienten mit einer therapierefraktären arteriellen Hypertonie ausgewählt. Dabei ist zu beachten, dass es sich um eine echte Therapieresistenz und keine Pseudoresistenz (mangelnde Compliance, Weißkittelhypertonie) oder sekundäre Hypertonie handelt.⁶⁷

Die RDN wird als minimal-invasives Verfahren unter Analgosedierung durchgeführt. Zu Beginn des Eingriffs erfolgt Katheter-gestützt über die Punktation der Arteria (A.) femoralis eine Angiographie der Nierenarterien. Sie dient zum Ausschluss einer relevanten Nierenarterienstenose. Das Lumen der Nierenarterie muss einen großen Blutfluss ermöglichen, um das Gefäß ausreichend kühlen zu können. Nach Überprüfung der Durchlässigkeit des Gefäßes wird unter Einsatz von Röntgenbildstrahlung ein Ablationskatheter eingesetzt. Dieser wird über die Aorta abdominalis bis in die A. renalis geführt. Zur Verödung der in der Adventitia liegenden sympathischen Nervenfasern wird über die Katheterspitze ein hochfrequenter Strom verabreicht. Die Gefäßwand wird auf 45-70 °C erwärmt. Währenddessen wird das Gefäß intraluminal mittels hohen Blutflusses gekühlt. Insgesamt wird das Nierengefäß an 4-6 Stellen abladiert in einem Abstand von ca. 5 mm.⁶⁷

Bisher beschränkt sich der Einsatz dieses Verfahrens auf spezialisierte Zentren in Deutschland. Alternativ zum Verfahren mittels Radiofrequenz-Energie kann die RDN auch ultraschallgestützt oder chemisch, beispielsweise durch Alkohol-Verödung, erfolgen.⁹² Eine effektive Blutdrucksenkung stellt sich meist erst Wochen bis Monate nach der RDN ein.⁶⁷ Mehrere Studien untersuchten die Wirkung der RDN, darunter die Symplicity-HTN-1, Symplicity-HTN-2 und die DENER-HTN Studie. Die Symplicity-HTN-1 Studie konnte eine

signifikante Senkung des Blutdrucks um 15-25 mmHg bereits nach 6 Monaten bei Patienten mit therapierefraktärer Hypertonie zeigen.⁹² Auf eine reduzierte Aktivität des sympathischen Nervensystems konnte aufgrund einer signifikanten Abnahme der renalen Noradrenalin-Spilloverrate geschlossen werden. Auch die Langzeitergebnisse dieser Studie über einen Zeitraum von 24 Monaten konnten überzeugen. Eine anhaltende Blutdruckreduktion von 32/14 mmHg 24 Monate nach der RDN verfestigte das Ergebnis. Das definierte Ziel einer Blutdrucksenkung bei Prismessung um ≥ 10 mmHg lag in den Studien bei 84-92 %.⁶⁷

Das autonome Nervensystem nimmt eine zentrale Rolle in der Entstehung und Aufrechterhaltung von Vorhof- und Herzrhythmusstörungen ein. Daraus ergibt sich die Überlegung, ob durch eine verminderte Sympathikusaktivierung die Vorbeugung und Behandlung von Herzrhythmusstörungen erreicht werden kann. Bisherige Studien konnten zeigen, dass eine RDN die Herzfrequenzrate signifikant senkt und auch die Induzierbarkeit von VHF verringert.^{41,104} Dahinter wird ein komplexer und multifaktorieller Mechanismus vermutet, durch den RDN als Antiarrhythmikum wirkt. Die Hypothese beruht darauf, dass die adrenerge Aktivierung eines vulnerablen Herzsubstrats ein Auslöser für VHF sein kann, bzw. es aufrechterhält. In Tierversuchen wurden mehrere potenziell antiarrhythmische Wirkungen der RDN beobachtet: eine weniger heterogene Erregungsleitung, weniger Fibrose und eine geringere neurohumorale Aktivierung.⁴⁰

Patienten mit reduzierter Nierenfunktion wurden bisher nicht in die Studien der RDN miteingeschlossen. Aufgrund pathophysiologischer Überlegungen erhofft man sich aber auch in dieser Kohorte eine Verbesserung durch RDN, um die sympathische Überaktivität, welche mit einer Nierenschädigung einhergeht, zu unterbinden. Klinische randomisierte Studien existieren dazu noch nicht und sind möglicherweise Grundlage weiterer Forschungen.⁶⁷ Eine kleinere Studie, welche 15 Patienten mit resistenter Hypertonie und CKD im Stadium 3-4 einschloss, konnte jedoch eine signifikante Abnahme des Blutdrucks zeigen. Unabhängig davon, ob Kontrastmittel verwendet wurde oder eine Kohlenstoffdioxid(CO₂)-Angiographie, blieben die Nierenwerte unverändert. Der signifikanten Blutdrucksenkung auch nach 12 Monaten schloss sich zudem eine signifikante Reduktion des nächtlichen ambulanten Blutdrucks an. Somit wurde in dieser Studie eine positive Auswirkung der RDN auch bei Patienten mit CKD im fortgeschrittenen Stadium ermittelt.³⁶

3.8 Fragestellung und Ziele

Das Ziel der Arbeit besteht darin, tiefere Aufschlüsse über den Effekt des renalen Nervensystems auf die Entstehung maligner Arrhythmien in einem multifaktoriellen experimentellen Modell von kardiovaskulären Komorbiditäten zu erlangen, wie man es bei Patienten mit CKD beobachtet. Darüber hinaus soll die RDN als interventionelle

Therapiemöglichkeit zur Prävention kardialer Arrhythmien bei CVD-assoziierten Komorbiditäten und CKD hervorgehoben werden.

Die beiden wesentlichen Ziele der Arbeit sind konkret:

Ziel 1: Untersuchung des Einflusses einer chronischen Hypertonie als CKD-assoziierte kardiovaskuläre Begleiterkrankung auf das kardiale pro-arrhythmische Remodeling. Etablierung eines hypertensiven CKD-Rattenmodels.

Ziel 2: Untersuchung, ob die Modulation des renalen sympathischen Nervensystems das Voranschreiten kardialer arrhythmogener Veränderungen des Herzens in einem hypertensiven CKD-Rattenmodel verhindert.

Zu Ziel 1: Der Einfluss einer chronischen Hypertonie auf das maladaptive kardiale Remodeling und die Entstehung eines Pro-arrhythmogenen Substrates bei CKD soll näher erforscht werden. Dabei steht die Frage im Vordergrund, ob eine bestehende Hypertonie die CKD-vermittelten Umbauprozesse im linken Vorhof verstärkt und so Bildung eines pro-arrhythmischen Substrates zusätzlich beeinflusst. Diese Frage soll mittels eines hypertensiven CKD-Modells an der Ratte untersucht werden. Unter Verwendung dieses experimentellen Modells der kardiovaskulären Komorbiditäten bei CKD soll der zugrundeliegende Pathomechanismus untersucht werden, mit Fokus auf den autonomen und strukturellen Remodeling-Prozessen, der neurohumoralen Aktivität, dem oxidativen Stress und der Inflammation.

Zu Ziel 2: In diesem multifaktoriellen „Komorbiditäten“-Modell der CKD soll erforscht werden, inwieweit die Modulation des sympathischen Nervensystems bei CKD das progressive pro-arrhythmische Remodeling beeinflusst.

Um beide Ziele zu verfolgen und die damit verbundenen Fragestellungen zu beantworten, kommen zwei Tiermodelle zur Anwendung:

Die Interventionsgruppe erhält als Therapieoption eine renale Denervation. Dieser Eingriff erfolgt nach bereits induzierter CKD mittels Adenins und Entwicklung einer systemischen arteriellen Hypertonie bei Spontan hypertensiven Ratten (SHR). Als Kontrollgruppe dienen ebenfalls SHR, welche jedoch normale Standarddiät erhalten und keiner renalen Denervation zugeführt werden.

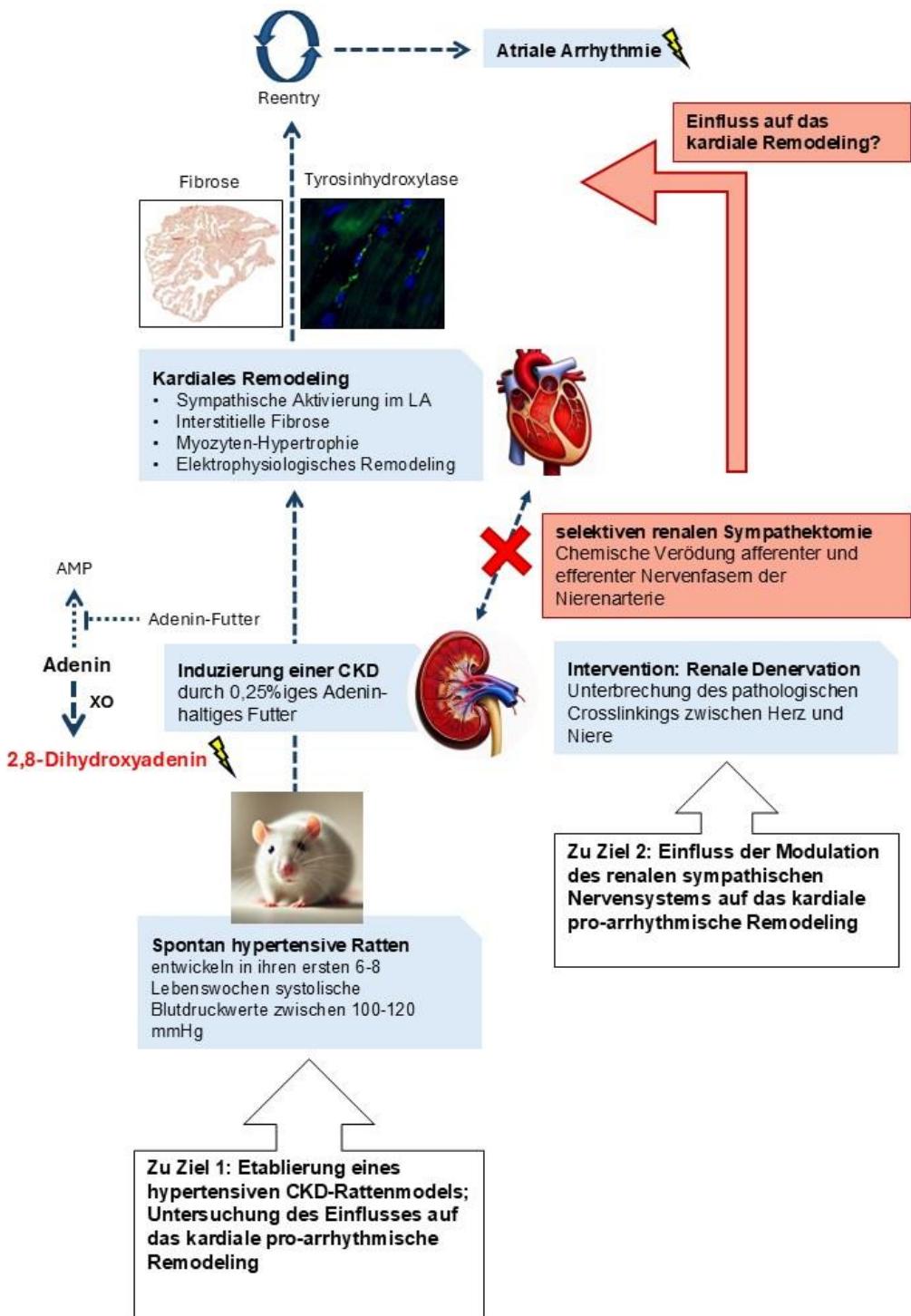


Abbildung 3: Ziele der Arbeit

Graphischer Überblick über die Ziele der Arbeit

Zur Verfolgung von Ziel 1 wurde ein hypertensives CKD-Modell etabliert, indem SHR mit einer Adenin-haltige Diät gefüttert wurden. Es folgte die Untersuchung der Einflüsse dieser Komorbiditäten auf das kardiale pro-arrhythmische Remodeling und die Entwicklung einer atrialen Arrhythmie. Um den Einfluss einer Modulation des sympathischen Nervensystems auf das kardiale pro-arrhythmische Remodeling zu beleuchten, wurde die Interventionsgruppe einer renalen Denervation im Sinne einer selektiven renalen Sympathektomie unterzogen (Ziel 2).

4 Materialien und Methoden

4.1 Materialien

Abzug	ARGE Labor- und Objekteinrichtungen GmbH, Wathlingen, Deutschland
Chemilumineszenz-Imaging-System	peqlab Fusion SL, VILBER LOURMAT GmbH, Eberhardzell, Deutschland
Gewebeeinbettungsautomat	HistoCore Arcadia, Leica, Wetzlar, Deutschland
Gewebeinfiltrationsautomat	HistoCore PEARL, Leica, Wetzlar, Deutschland
Heizblock	HLC BioTech, DITABIS AG, Pforzheim, Deutschland
Kühlzentrifuge	Thermo Scientific Fresco 17 Mikrozentrifuge, Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
Mikroskop	Aperio Versa 8, Leica, Wetzlar, Deutschland
Mikrotom	HistoCore AUTOCUT, Leica, Wetzlar, Deutschland
Photometer	DU 730 UV/Vis-Spectrophotometer, Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Schüttler	Polymax 1040, Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, Deutschland
Spannungsquelle	PowerPac HC, Biorad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, USA
Katheter-basierte Telemetrie	Data Sciences International (DSI), Saint Paul, MN, USA
Tischzentrifuge	Biofuge Pico, Heraeus, Hanau, Deutschland
Überkopfschüttler	Tube rotator, VWR, Darmstadt, Deutschland

Ultraschallgerät	Branson Ultrasonics Sonifier, Danbury, Connecticut, USA
Vortex Mixer	VV3, VWR, Darmstadt, Deutschland
Waage	CS Series, Ohaus GmbH, Gießen, Deutschland

Sonstiges Material:

Gelelektrophorese-Zubehör	Mini PROTEAN Tetra Cell, Biorad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, USA
Pipetten	Ergonomic High Performance Pipetten, VWR, Darmstadt, Deutschland
Tank Blot-System	Mini Trans-Blot Cell, Biorad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, USA

Software:

Bildbearbeitung	GIMP 2.10.24 (GNU Image Manipulation Program)
Mikroskop	Aperio ImageScope, Version 12.3.3, Leica, Wetzlar, Deutschland
EKG	Notocord hem evolution
Fibroseauswertung	NIS Elements, Nikon Instruments Europe BV, Amstelveen, Niederlande
Katheter-basierte Telemetrie	DSI Analyse Software, Data Sciences International (DSI), Saint Paul, MN, USA
Western Blot	FusionCapt Advance peqlab, VWR, Darmstadt, Deutschland

Reaktionskits/Fertiglösungen

cOmplete Proteaseinhibitor	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
----------------------------	--

ECL	GE Healthcare, Amersham, Vereinigtes Königreich
PhosStop Phosphataseinhibitor	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Picro-Siriusred	Morphisto, Offenbach am Main, Deutschland
Ponceau rot	SERVA Elektrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Protein Assay Reagent A und B	Biorad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, USA
peqGOLD Proteinmarker III	VWR life science, Lithuania

4.2 Methoden

4.2.1 Tiermodelle

Die Tierversuche wurden vom zuständigen Landesamt für Verbraucherschutz (LAV) nach Genehmigungsnummer 35/2017 bewilligt. Alle Operationen wurden durch dafür speziell qualifizierte medizinisch-technische Assistenten gemäß des Tierschutzgesetzes ausgeführt.

4.2.1.1 Spontan hypertensive Ratten (SHR)

Zum besseren Verständnis des Einflusses kardiovaskulärer Komorbiditäten auf das maladaptive kardiale Remodeling und die Entstehung von Arrhythmien bei CKD, ebenso des Einflusses von therapeutischen Interventionen, eignet sich das gängige Modell der Spontan Hypertensiven Ratte (SHR) für die experimentelle Forschung. SHR sind ein speziell gezüchteter Rattenstamm, ursprünglich aus der Kreuzung der Nachfahren einer männlichen hypertensiven Wistar-Ratte einer Kolonie in Kyoto (Japan) und einer weiblichen Ratte derselben Gattung mit ebenfalls erhöhtem Blutdruck.⁷⁸ Sie zählen zu den mit am häufigsten untersuchten Versuchstieren bei Forschungsfragen bezogen auf Bluthochdruck- und Nierenerkrankungen. Mit diesem gezüchteten Rattenstamm ist es möglich, kontinuierlich entstehende kardiovaskuläre Erkrankungen mit komplexen neurohumoralen Veränderungen zu simulieren. SHR entwickeln in ihren ersten 6-8 Lebenswochen systolische Blutdruckwerte zwischen 100-120 mmHg. Die Hypertonie prägt sich in den folgenden 12-14 Wochen aus und erreicht ein stabiles Niveau im Alter von 20- Wochen.⁴²

4.2.1.2 Das hypertensive CKD-Rattenmodell

Als Versuchstiere dienten 12 männliche SHR. Sie wurden im Alter von 15 Wochen gekauft (JanvierLabs, Saint-Berthevin Cedex, Frankreich). In der Literatur wurde beschrieben, dass der Blutdruck der Tiere bereits während der ersten zehn Wochen nach der Geburt ansteigt und ab einem Alter von 20 Wochen ein stabiles Niveau erreicht.⁴² Die Ratten wurden während des gesamten Experiments je zu viert in Käfigen in den Räumen der experimentellen Chirurgie gehalten. Die Verteilung der Interventions- und Kontrolltiere wurde verblindet. Die Aufteilung der 12 Ratten erfolgte in 3 Gruppen: eine Kontrollgruppe (Ko, n=4), eine Gruppe, die ein Adenin-haltiges Futter erhielt (Adeningeruppe (Ad, n=4) und eine Adenin+RDN-Gruppe (Ad+RDN, n=4).

Die Ratten hatten sowohl Trinkwasser als auch Futter im Überschuss zur Verfügung. Im Alter von 20 Wochen wurde mit der Adenin-induzierten CKD begonnen. Dazu erhielten 8 der 12 SHR ein mit 0,25 % Adenin versetztes Spezialfutter in normaler Haltungsdiät (Altromin #1324, Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Deutschland). Die Kontrollgruppe erhielt über den Gesamtzeitraum normales Trockenfutter (Altromin Standard Haltungsdiät #1324, Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Deutschland). Insgesamt erhielten die Versuchstiere diese Diät für 16 Wochen. Dieses Überangebot von Adenin führt zu einer vermehrten Bildung von Adenosin-Monophosphat und somit zu einer Produkthemmung des Enzyms Adenin-Phosphoribosyltransferase (vgl. **Abbildung 4**). Unter physiologischen Bedingungen im Rahmen des salvage pathways des Nukleotidstoffwechsels würde das Enzym Adenin-Phosphoribosyltransferase die Synthese von Adenosin-Monophosphat aus Adenin und 5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat katalysieren. Adenosin-Monophosphat würde als Nukleotid einen Grundbaustein im Aufbau der DNA bzw. RNA darstellen. Stattdessen wird das überschüssige Adenin über das Enzym Xanthinoxidase zu 2,8-Dihydroxyadenin (DHA) oxidiert. DHA ist im normalen pH-Bereich des menschlichen Urins nur schwer löslich. Dies führt zur Ausfällung von DHA-Kristallen in den Urin und somit zur Verlagerung der Kristalle in das Tubulussystem und Nierenparenchym.²⁴ Diese pathologischen Veränderungen führen zu Inflammationsreaktionen und Fibrosierung in den betroffenen Abschnitten des Harntraktes und somit zu einer sogenannten Adenin-Nephropathie.²⁵ Die Adenin-Nephropathie ist ein geeignetes Modell eine konstante Niereninsuffizienz und kardiovaskuläre Erkrankung, ähnlich der humanen CKD, zu simulieren. Zusätzlich eignet sie sich, um Interventionen zur Besserung der Krankheit darzustellen.^{19,20}

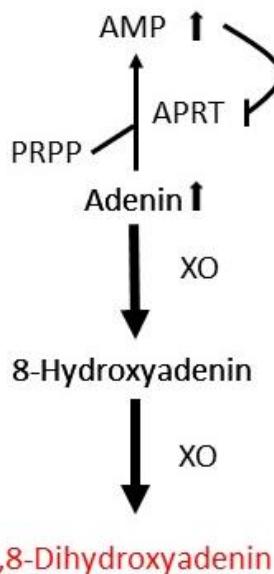


Abbildung 4: Entstehung von 2,8-Dihydroxyadenin bei Adenin-Überschuss

Hemmung der Synthese von AMP aus Adenin und PRPP durch Adenin-Überschuss. In Folge daraus wird 2,8-Dihydroxyadenin aus dem im Überschuss vorliegendem Adenin gebildet.

(AMP = Adenosinmonophosphat, APRT = Adenin-Phosphoribosyltransferase, PRPP = 5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat, XO = Xanthinoxidase)

4.2.2 Versuchsablauf

In der ersten Woche wurden allen Ratten ein Telemetriesender implantiert. Dieser Eingriff erfolgte, um eine konstante Erfassung des systolischen und diastolischen Blutdrucks, der Herzfrequenz, der Körperkerntemperatur, der Aktivität und eines EKGs zu ermöglichen.

Nach diesem Eingriff folgte eine Akklimatisierungsphase von 5 Wochen (vgl. **Abbildung 5**).

Im Anschluss an die Eingewöhnungsphase erhielten 8 Ratten (Ad, n=4 und Ad+RDN, n=4) für insgesamt 16 Wochen ausschließlich 0,25 % Adenin-haltiges Spezialfutter im Überschuss.

Nach 4 Wochen Fütterung mit Adenin-Futter erfolgte die beidseitige renale Denervation der Ad+RDN-Gruppe bzw. die Sham-Operation der Ad- und Kontrollgruppe.

Innerhalb der 21-wöchigen Experimentendauer wurden folgende Parameter gemessen und protokolliert: Die Tiergewichte einmal wöchentlich, ebenso wie die verbrauchte Futter- und Wassermenge. Mittels der Telemetriesender erfolgte wöchentlich in speziellen Käfigen im Labor der Kardiologischen Forschung des UKS eine 21h Quantifizierung des Blutdrucks. Des Weiteren wurde im Abstand von 14 Tagen mittels Blutentnahme aus der Schwanzvene der Ratten das Serum Kreatinin und der Harnstoff gemessen, um das Fortschreiten der CKD über den Zeitraum dokumentieren zu können. Dies fand in Zusammenarbeit mit der Nephrologie des Universitätsklinikums des Saarlandes statt. Mittels metabolischer Käfige konnte zudem die Urinausscheidung überwacht werden. Die Bewertung der kardialen Funktion erfolgte über

Echokardiographie, Blutdruck und Herzfrequenz wurden über Katheter-basierte Telemetrie aufgezeichnet.

Nach insgesamt 21-wöchiger Versuchsdauer im Rahmen der finalen Versuche wurden die Ratten unter Entnahme des Herzens und beider Nieren geschlachtet. Die Organe wurden abschließend für die folgenden Untersuchungen tiefgefroren.

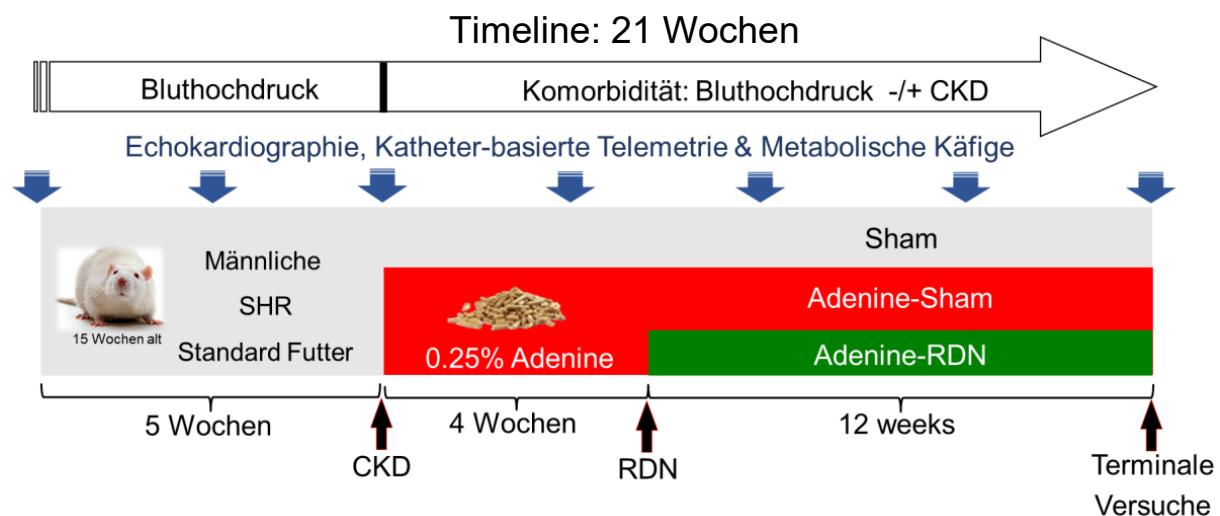


Abbildung 5: Versuchsablauf

SHR-Ratten wurden in eine Kontrollgruppe mit Standarddiät, eine Adenin-Gruppe mit 0,25 % Adenin-versetztem Spezialfutter und eine Adenin-Gruppe mit ebenfalls Adenin-haltigem Futter und renaler Denervation als Intervention eingeteilt. Nach 21 Wochen Versuchsdauer wurden die Tiere durch Entnahme der Organe im Rahmen der terminalen Versuche schmerzlos getötet.

4.2.3 Katheter-basierte Telemetrie

Die Katheter-basierte Telemetrie ermöglicht eine kontinuierliche systemische Blutdruckmessung. Die Messsonde wird im Rahmen einer Operation von speziell geschulten medizinisch-technischen Assistenten unter Isofluran-Narkose in die Aorta abdominalis platziert (vgl. **Abbildung 6** und **Abbildung 7**). Dadurch kann der zentrale Blutdruck intraaortal gemessen werden. Der in einem Plastikgehäuse befindliche Transmitter wird subkutan in die Peritonealhöhle eingebracht. Dieses Verfahren geht zudem mit einer drahtlosen Datenübermittlung und elektronischen Speicherung der Daten einher.



Abbildung 6: Implantation der Messsonde zur Katheter-basierten Telemetrie

Das Peritoneum des Versuchstiers wurde unter Allgemeinanästhesie eröffnet. Das Randgebiet des Operationsfeldes wurde mittels eines sterilen Tuchs abgedeckt. Das Telemetrie-Implantat von Data Sciences International (DSI) liegt noch extraperitoneal, während die Messsonde bereits intraabdominell eingebracht und festgeklebt wurde.

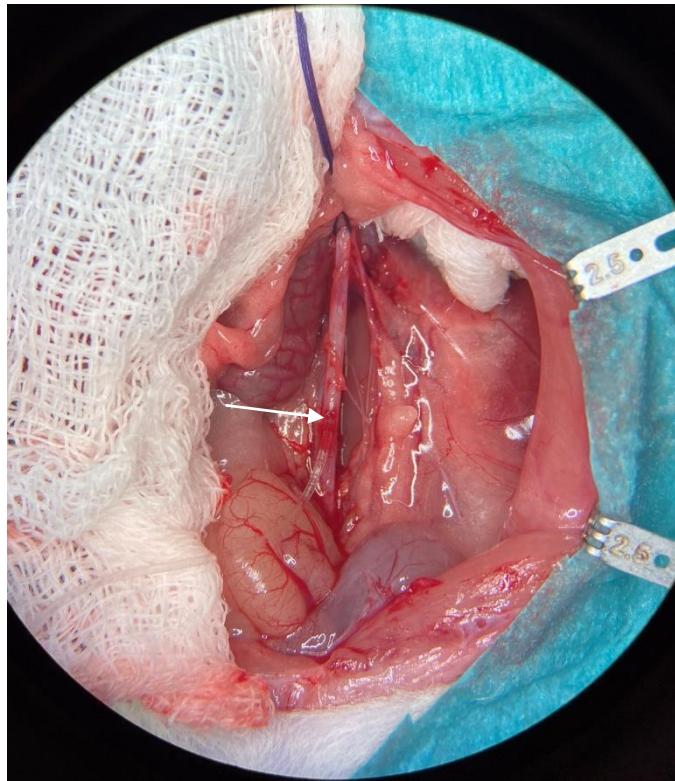


Abbildung 7: Intraaortal implantierte Messsonde des Telemetrieimplantats

Der Pfeil markiert die Stelle, an der der Katheter in die Bauchaorta des Versuchstiers eingebracht wurde. Die Aufnahme wurde durch das Mikroskop aufgenommen.

4.2.4 Renale Denervation

Der Eingriff findet unter Isofluran-Narkose statt, im Durchschnitt 2,0-2,5 % und wird von speziell ausgebildeten medizinisch-technischen Assistenten ausgeführt. Mittels einer medianen Laparotomie und Eröffnung des Peritoneums werden beide Nieren freigelegt. Die Darmschlingen werden vorübergehend nach extrakorporal verlagert und mittels feuchter Tücher vor dem Austrocknen geschützt. Alle sichtbaren sympathischen Nervenfasern werden selektiv auf Höhe der Nierenhili durchtrennt. Zusätzlich wird die Adventitia der A. renalis abgesetzt, um die darin befindlichen Nervenfasern zu entfernen. Im Anschluss wird die A. renalis mittels 20 % Phenol/Ethanol-Lösung bepinselt (vgl. **Abbildung 8**) und folglich chemisch verödet.⁹⁵

Zur besseren Vergleichbarkeit der Interventions- und Kontrollgruppen wurden alle Tiere operiert. Die Gruppen ohne RDN (Ko, n=4 und Ad, n=4) wurden schein-operiert (Sham), um eine Verzerrung durch den operativen Eingriff zu verhindern. Beobachtungen im Zusammenhang mit der renalen Denervation können so auf den Eingriff selbst und nicht auf die damit verbundenen Umstände wie die Narkose, das Eröffnen des Bauchraums, die Manipulation an den renalen Gefäßen, postoperative Wundheilungsstörungen oder inflammatorische Prozesse zurückgeführt werden.

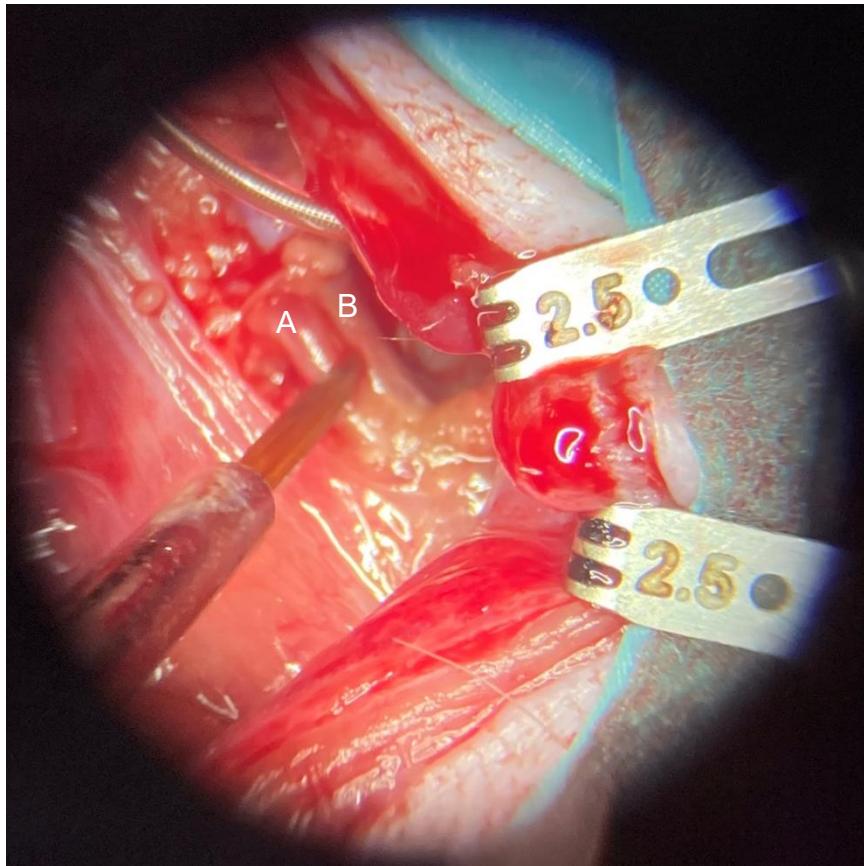


Abbildung 8: Renale Denervation

Die renale Denervation der A. renalis wird chemisch mittels eines Phenol/Ethanol-Gemischs vollzogen. Die Aufnahme zeigt das Auftragen dieses Gemischs durch einen Pinsel. Dargestellt sind die A. renalis (A) und die parallelverlaufende V. renalis (B). Fotographie durch das Mikroskop

4.3 EKG

Im Verlauf des Experiments wurde allen Ratten zu 3 Zeitpunkten ein EKG abgeleitet: ein Baseline-EKG, ein EKG vor der RDN und im Rahmen der terminalen Versuche. Dazu wurden die Versuchstiere mit 2,5 % Isofluran in Narkose versetzt. In Rückenlage wurden 2 Elektroden subkutan platziert, eine in den Bereich der rechten Axilla und die zweite im Bereich der linken Oberschenkelinnenseite. Die Position ist in **Abbildung 9** exemplarisch dargestellt. Die Lage der Elektroden wurde ähnlich der humanen zweiten Ableitung nach Einthoven gewählt, da sie den Hauptvektor der Vorhoferregung vom Sinusknoten zum AV-Knoten zeigt. So liegt der Vektor in gleicher Richtung wie die angebrachten Elektroden und ermöglicht es so, den größtmöglichen Ausschlag der P-Wellen-Amplitude zu erfassen.

Die Auswertung des EKGs erfolgte mittels der Software Notocord hem evolution. Anhand von jeweils 24 repräsentativen Herzschlägen wurde die P-Welle, die PQ-Intervall und die QT-Zeit erfasst (vgl. **Abbildung 10**). So konnte auch die jeweilige QTc-Zeit berechnet werden. Im Anschluss wurde für jedes EKG der Mittelwert der P-Welle, des PQ-Intervalls und der QTc-Zeit ermittelt.



Abbildung 9: EKG-Ableitung

Zwei subkutane Elektroden leiten mit Fokus auf der Vorhofaktivität ein EKG ab. Die Elektrodenposition entspricht der zweiten Ableitung nach Einthoven. Die Ratte befindet sich während der Messung der elektrischen Herzaktivität unter Isofluran-Narkose.

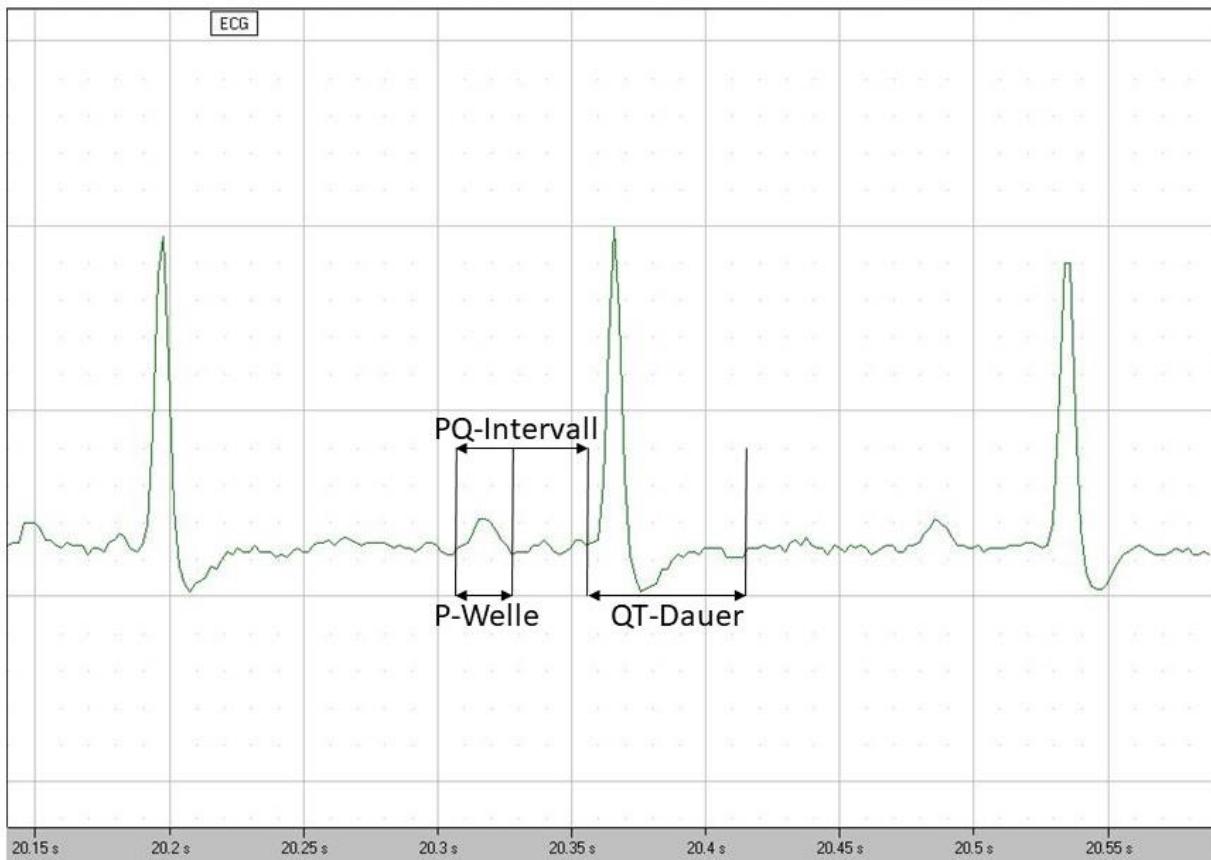


Abbildung 10: Beispiel EKG

Exemplarische Auswertung der P-Welle, des PQ-Intervalls und der QT-Zeit. Am unteren Bildrand befindet sich die Zeitachse.

4.4 Western Blot

Der Western Blot ist ein molekularbiologisches Verfahren zum Nachweis und Quantifizieren von Proteinen. Zunächst müssen die Proteine aus den zu untersuchenden Gewebeproben isoliert werden. Anschließend werden die vorbereiteten Proben mittels Elektrophorese der Größe nach in Proteinbanden aufgetrennt. Im folgenden Schritt erfolgt die Übertragung auf ein Nitrocellulose-Membran, das sogenannte Blotten. Mittels markierter Antikörper werden die Proteine durch Chemolumineszenz nachgewiesen und als digitales Bild festgehalten.

4.4.1 Proteinisolation

Um das Gewebe in seine Proteine auftrennen zu können, wurde zunächst aus den tiefgefrorenen Nieren- und Herzgewebe der Ratten ähnlich große Gewebsstücke in Millimetergröße mittels Skalpells abgetrennt. Die Gewebsteile wurden in Mikroreaktionsgefäß gegeben. Zur Isolation der Proteine wurde ein Homogenisationspuffer angesetzt. Von diesem angesetzten Puffer kam jeweils 350 µl zu dem Gewebe in das Mikroreaktionsgefäß hinzu. Während der Vorbereitung befanden sich die Gefäße zur Kühlung auf Eis.

Im Anschluss wurden die Proben mittels Ultraschalls homogenisiert und bei 4°C und 13.000 Umdrehungen die Minute für 5 Minuten zentrifugiert. Der nun entstandene Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß pipettiert. Der solide Rest am Mikroreaktionsgefäß-Boden (sog. Pellet) wurde verworfen.

Homogenisationspuffer (250 ml):

465,3 mg EDTA (5 mmol/L)

262,4 mg NaF (25 mmol/L)

25,67 g Sucrose (300 mmol/L)

1,02 g KH₂PO₄ (30 mmol/L)

pH = 7,0

Arbeitslösung:

6 ml Homogenisationspuffer

¼ Tablette Proteaseinhibitor cOmplete (EDTA-free) (Roche, REF11873580001, Mannheim, Deutschland)

1 Tablette Phosphataseinhibitor PhosStop (Roche, REF 04 906 845 001, Mannheim, Germany)

60 µl Proteaseinhibitor PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) (SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, P7626-5G, Steinheim, Germany)

4.4.2 Protein-Bestimmung

Das Ziel der Protein-Bestimmung ist es, dass alle Proben nahezu identische Proteinkonzentrationen beinhalten. Nur so ist es möglich, quantitativ aussagekräftige Ergebnisse im Western Blot zu erhalten. Dazu wurde zunächst der Gesamtproteingehalt der jeweiligen Proben bestimmt. Das noch verbleibende Volumen der insgesamt 20 µl wurde mit destilliertem Wasser (Aqua dest.) aufgefüllt, sodass jede Probe dieselbe Proteinkonzentration enthielt.

Mittels des Protein Assay Kits (Biorad) wurde die Konzentration photometrisch ermittelt. Dieses Verfahren beruht modifiziert auf der Methode nach Lowry⁶⁶, welche aus zwei aufeinanderfolgenden Reaktionen aufgebaut ist. Die erste Reaktion entspricht einer Biuretreaktion, welche Proteine photometrisch über den Nachweis ihrer Peptidbindungen detektieren kann. Hierbei kommt es unter Bildung eines Kupferionenkomplexes zur

Verbindung der Peptidbindungen mit Kupferionen in alkalischer Lösung. Dieser neu entstandene farbige Komplex bewirkt einen photometrisch nachweisbaren Farbumschlag nach blauviolett. Die zweite Reaktion ist die Reduktion des Folin-Ciocalteu-Reagenzes, bestehend aus Molybdän- und Wolframheteropolysäure, durch den reduzierenden Kupfer-Amid-Bindungskomplex. Das reduzierte Folin-Ciocalteu-Reagenz besitzt eine blaue Farbe und kann somit mit einem Spektralphotometer im Bereich von 500 bis 750 nm nachgewiesen werden.⁷⁹

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde zunächst 2 µl in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß gegeben. Zum Normieren wurde 2 µl Homogenisationspuffer als Leerwert verwendet. Beide Reaktionsgefäße wurden mit 18 µl Aqua dest. auf insgesamt 20 µl aufgefüllt. Anschließend wurden 100 µl Protein Assay Reagent A und 800 µl des Protein Assay Reagent B hinzugegeben. Nachdem dieser 920 µl Ansatz mittels Vortexmischer durchmischt wurde, folgte die Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur. Unter Verwendung des Photometers wurde nun die Proteinkonzentration der Proben jeweils als Doppelbestimmung gemessen und anschließend der Mittelwert beider Messungen bestimmt. Mit den ermittelten Werten (mg/ml) fand im Anschluss eine Bestimmung des Probenvolumens statt, welches 100 µg Proteinkonzentration enthält. Die 100 µg stehen dabei für 2 mögliche Western Blot-Runden mit jeweils 50 µg Protein.

Ladepuffer:

950 µl 1x Ladepuffer-Stammlösung
50 µl 1 mol/L DTT

1x Stammlösung (10ml):

2 ml Glycerol (100 %)
2 ml 10 % SDS
2.5 ml Tris pH 6,8 (0,625 mol/L)
10 ml Aqua dest.
1 Spatelspitze Bromphenolblau

4.4.3 SDS-PAGE

Mittels der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) werden Proteine im Verfahren der Gelelektrophorese nach Molekulargewicht und -größe in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Proteinogene Aminosäuren bilden die Grundstruktur der Proteine. Sie lagern sich in Ketten zusammen und bilden je nach Kettenlänge und Kombination ein Protein. Der Grund dafür, dass Proteine sich im elektrischen Feld auftrennen, liegt darin, dass die Aminosäuren je nach

Seitenkette unterschiedlich geladen sind. Zum vergleichbaren Auswerten müssen alle Proteine mit gleicher Ladungsverteilung und in gestreckter Form der Primärstruktur vorliegen. Die Primärstruktur bezeichnet die reine Abfolge der Aminosäuren ohne dreidimensionale Struktur. Sekundär- und Tertiärstrukturen müssen dafür aufgebrochen werden.

Zunächst füllt man die äquivalenten Milliliter der in der Protein-Bestimmung berechneten 50 µg des Proteinvolumens mit Aqua Dest. zu 10 µl auf. Um ein Verhältnis von 1:1 zu erreichen, addiert man 10 µl Ladebuffer. Dieses Gemisch kocht man für 5 min bei 95°C auf einem Heizblock. Dadurch werden die Wasserstoffbrückenbindungen der Sekundär- und Tertiärstrukturen aufgetrennt. Das im Ladebuffer enthaltene Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate, SDS) bindet an die Proteine und verleiht ihnen so eine negative Ladung, abhängig von ihrer Molekülgröße. Pro 2 Aminosäuren bindet sich annähernd eine Molekül SDS bzw. 1,4 g SDS ein Gramm der Polypeptide. Dadurch weisen alle Proteine eine gleiche Ladungsdichte auf, unabhängig von der intrinsischen Ladung ihrer Seitenketten. Das Verleihen einheitlicher negativer Ladung bewirkt, dass die Proteine durch das Polyacrylgel wandern. Durch Verwendung von Dithiothreitol (DTT) im Ladebuffer werden Thiolverbindungen reduziert und die dreidimensionalen Proteinstrukturen entfalten sich vollständig. Eine linearisierte Form wird erreicht. Je kleiner das Protein, desto schneller wandert es durch die Poren des Gels hin zur Anode. Ähnlich einem Sieb werden große Moleküle eher zurückgehalten und wandern nicht so weit durch das Polyacrylgel. So kann eine Aufteilung rein nach Molekülgröße erfolgen. Das Molekulgewicht kann im Vergleich zu Markern mit bekannten Molekülgrößen abgeschätzt werden.

Das Polyacrylamidgel ist aus Polymerisationen von Acrylamid-Monomeren mit vernetzenden Substanzen aufgebaut. Am häufigsten wird als vernetzende Substanz Bisacrylamid verwendet. Die Polymerisation des Gels wird mittels Ammoniumpersulfat (APS) initiiert und mittels Tetramethylethyldiamin (TEMED) beschleunigt. Das dreidimensionale Netzwerk wird durch Querverbindungen zwischen entstehenden Polyacrylamid-Ketten gebildet. Je nach Konzentration des Acrylamids und des vernetzenden Bisacrylamid entwickelt das Gel verschiedene Eigenschaften. Dies macht man sich bei der Gelherstellung zunutze. Der untere Teil des Gels besteht aus feinerem Trenngel. In ihm werden die Proteine separiert. Im oberen Anteil befindet sich das Sammelgel, mit eingelassenen Taschen zum Beladen.^{4,48}

4.4.4 Gelherstellung

Zur Herstellung eines zweiphasigen Gels wurde jeweils ein 10 % Trenngel und ein 5 % Sammelgel angefertigt. Unter einer Abzugshaube in einen Gießstand erfolgte die Einspannung zwei zueinander bündiger Glasplatten. Der Abstand zwischen den zwei Glasplatten betrug 1,5 mm, was der späteren Geldicke entspricht. In ein 50 ml Falcon-Röhrchen wurden zuerst die Komponenten des Trenngels gegeben. Das fertig angesetzte Trenngel wurde dann mittels

einer Pipette zwischen die beiden Glasplatten im Gießstand gefüllt. Zur Vermeidung von Luftblasen wurde 1 ml destilliertes Wasser auf das Trenngel pipettiert, welches nach Aushärten des Trenngels einfach verworfen werden konnte. Im Anschluss wurde das ebenfalls in einem 50ml Falcon-Röhrchen angesetzte Sammelgel auf das ausgehärtete Trenngel gegeben. Noch vor dem Aushärten, wurde ein Probenkamm mit 10 Wells in das Sammelgel hineingelegt. Während des Aushärtens polymerisieren die Acrylamid-Monomere wie zuvor beschrieben. Ist das Gel fertig ausgehärtet, wird der Probenkamm entnommen und es verbleiben 10 Kammern zum Beladen.

20 ml Trenngel (10 %):

7.9 ml H₂O

6.7 ml 30 % Acryl-bisacrylamid Mix (BIO-RAD Laboratories, Cat. #1610156,

Deutschland)

5.0 ml 1.5 mol/L Tris (pH 8,8)

0.2 ml 10 % SDS

0.2 ml 10 % Ammoniumpersulfat

0.008 ml TEMED

5 ml Sammelgel (5 %):

3,4 ml H₂O

0.83 ml 30 % Acryl-bisacrylamid Mix

0.63 ml 1.5 mol/L Tris (pH 6,8)

0.05 ml 10 % SDS

0.05 ml 10 % Ammoniumpersulfat

0.005 ml TEMED

4.4.5 Elektrophorese

Als Elektrophorese bezeichnet man die Verteilung elektrisch geladener Moleküle unter Einfluss eines elektrischen Feldes. Das Verfahren ist auf Arne Tiselius zurückzuführen.

Moleküle ähnlicher Ladung, Molekülmasse, Größe und Form grenzen sich zusammen in sogenannten Banden ab.⁹⁹

Zur Vorbereitung der Gelelektrophorese wurden die vorbereiteten Gele in die Elektrophoresekammern eingespannt und der die Gele beinhaltende Behälter mit 1x Elektrophoresepuffer aufgefüllt. Im Anschluss wurden die Probenkämme à 10 Wells vorsichtig entnommen und die Taschen (Slots) mittels einer Pipette von Gelresten gereinigt. Der erste Slot des Gels auf der linken Seite wurde mit 5 µl des Markers (peqGOLD Protein Marker III, 27-1110, VWR life science, Lithuania) befüllt (vgl. **Abbildung 11**). Der Marker enthält 6 Banden bekannter Molekülgrößen und ermöglicht so ein Abschätzen der Proteinproben. In die verbleibenden 9 Slots erfolgte das Pipettieren von 20 µl der Proben. Dies entspricht 50 µg Protein. Nach Abschluss dieser vorbereitenden Maßnahmen wurde die geschlossene Elektrophoresekammer mit einer Spannungsquelle verbunden. Die ersten 30 min unter Verwendung von 80 Volt, anschließend für 1 h 100 Volt. Hierbei wurden immer 2 Gele gleichzeitig in einer Kammer dem elektrischen Feld ausgesetzt.

1x Elektrophoresepuffer:

1:10 Verdünnung des 10x Elektrophoresepuffers

10x Elektrophoresepuffer (5 Liter):

720 g Glycin

151.5 g Tris Base

50g SDS

mit Aqua dest. auf 5 Liter auffüllen

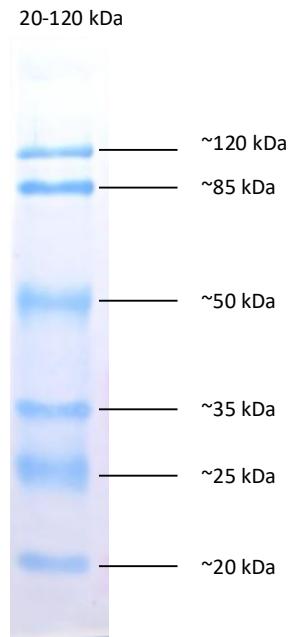


Abbildung 11: peqGOLD Protein Marker III

Die Abbildung zeigt die Banden des Proteinmarkers, welcher stets in den ersten Slot des Gels gefüllt wurde. Anhand der 6 bekannten Molekülgrößen, welche der Marker vorgibt, konnten die Proteingrößen der beladenen Substanzen näherungsweise ermittelt werden. (kDa = Kilodalton)

4.4.6 Transferblot

Das Ziel des sog. Western Blotting ist es, die mittels Elektrophorese entstandenen Proteinbanden durch Anlegen einer Spannung auf Nitrocellulosemembranen zu übertragen. So kann man die nach Molekülgröße aufgetrennten Proteine der Proben visualisieren und als digitales Bild aufnehmen.

Das Blotting erfolgte als Nass-Transfer. Dazu wurde das Gel im Tank-Blot-System in gewisser Reihenfolge mit weiteren Medien angeordnet (vgl. **Abbildung 12**). Als unterste Einheit diente ein vorher in Transferpuffer eingeweichter feinporiger Schwamm. Darauf wurden 3 Filterpapiere angeordnet und anschließend das Gel. Die Nitrocellulosemembran (Porengröße 0.2 µm (Bio-Rad Laboratories, Deutschland) lag ohne Bildung von Luftblasen bündig auf dem Gel. Den Abschluss bildeten 3 weitere Filterpapiere und ein ebenfalls feinporiger Schwamm. In der angegebenen Reihenfolge wurden die einzelnen Teile in einer Gelkassette eingespannt. Die Kassette verhindert durch das feste Einspannen, dass Luftblasen zwischen das Gel und die Membran gelangen. Nach Einsetzen der Gelkassette in die Transferkammer erfolgte das Befüllen des Behältnisses, die Gele vollständig bedeckend, mit 1x Towbin Transferpuffer. Beachtet wurde hierbei die Ausrichtung der Membranen derart, dass das Gel auf der Seite der Kathode und die Membran zur Anodenseite ausgerichtet ist. So wandern die negativ geladenen Proteine in Richtung der positiven Anode auf die Membran. Um dem starken

Erhitzen während des Vorgangs entgegenzuwirken, wurde in die Transferkammer ein Kühlakku eingesetzt. Abschließend wurde der Strom dazugeschaltet und 90 min bei 0,3 A geblottet.

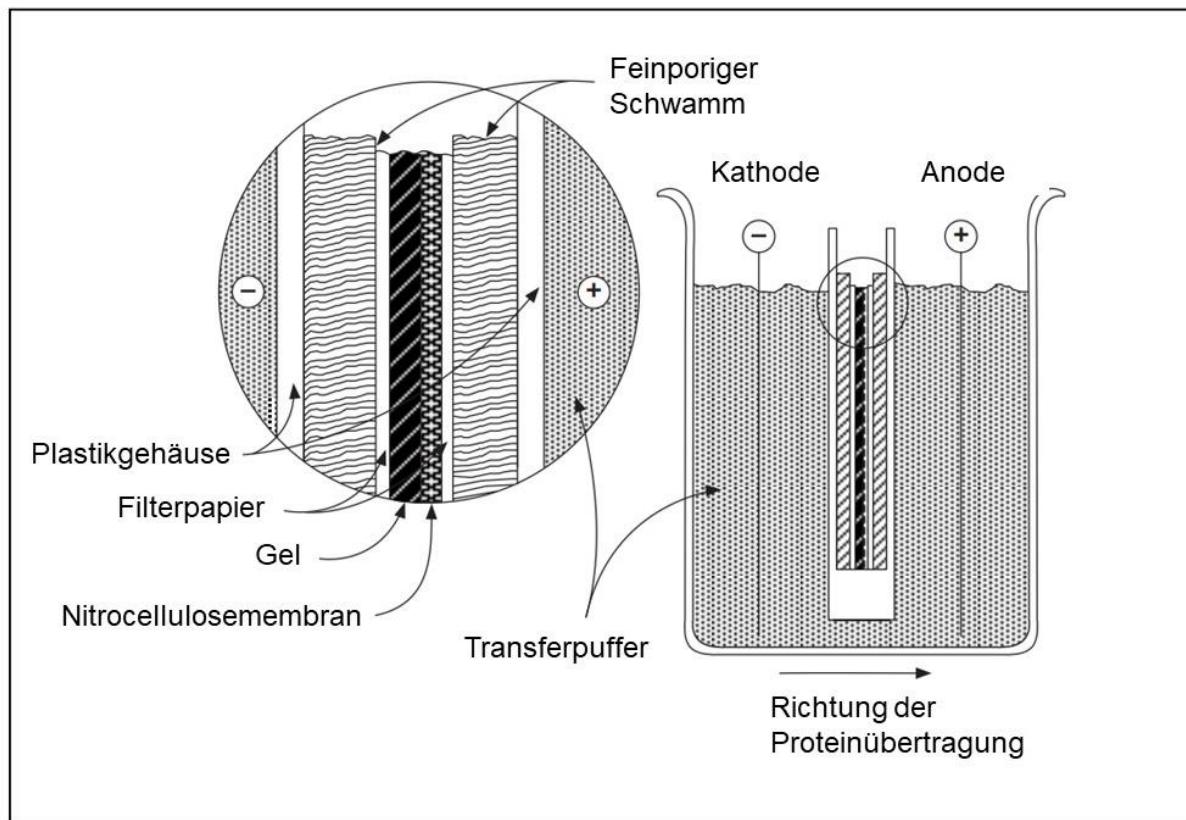


Abbildung 12: Schematischer Aufbau eines Western-BLOTS

Auf der rechten Seite ist ein Tank-Blot-System dargestellt, welches mit Transferpuffer befüllt ist und in welches eine Gelkassette eingelegt wurde. Die Richtung der Proteinübertragung erfolgt von der Kathode zur Anode. Linksseitig im Bild zeigt der vergrößerte Bildausschnitt die korrekte Beladung der Gelkassette von links nach rechts (Kathode nach Anode): Dem Plastikgehäuse der Kassette folgt ein feinporiger Schwamm, 3 Filterpapiere und das Gel. Dem angelagert liegt die Nitrocellulosemembran bündig an, gefolgt von 3 Filterpapieren, einem feinporigen Schwamm und abschließend das Plastikgehäuse der Kassette.
(Modifiziert nach: Ni D, Xu P, Gallagher S)⁷⁷

Transferpuffer 1x Towbin (2 Liter):

1440 ml Aqua dest.

160 ml 10x Towbin

400 ml Methanol (VWR, Darmstadt, Deutschland)

Transferpuffer 10x Towbin (2 Liter):

60,56 g Tris-Base (250 mmol/L)

288,26 g Glycin (1,92 mol/L)

mit Aqua dest. auf 2 Liter aufgefüllt

Nach Beendigung des Transferblots wurden die Membranen mit Aqua dest. von Methanol gereinigt. Im Anschluss erfolgte die Färbung mit Ponceau rot (Serva, 33427.01, Heidelberg, Deutschland). Diese reversible Einfärbung beruht auf der Umsetzung aromatischer Amine. Das Sichtbarmachen der Proteinbanden mittels dieser Färbemethode dient der Überprüfung, ob der Transfer gleichmäßig ohne sichtbare Verunreinigungen erfolgt ist.

Nach der Kontrolle wurde das Ponceau rot mit 1x Phosphat-gepufferter Salzlösung mit Tween (phosphate-buffered saline mit 1 % Tween 20, PBS-T) abgewaschen. Die Membranen wurden nun unter langsamem Schwenken auf einem Plattformschüttler (Polymax, Heidolph, Schwabach, Deutschland) für 1 h in 5 % 1x PBS-T-Milch geblockt. PBS-T verringert unspezifische Protein-Protein Bindungen ebenso wie Proteine der Milch, welche freie Proteinbindungsstellen besetzen.

10x PBS-T:

80 g NaCl

2 g KCl

2.4 g KH₂PO₄

14.4 g Na₂HPO₄

pH= 7.4

mit Aqua dest. auf 1 Liter auffüllen

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

1x PBS-T (1 Liter):

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

4.4.7 Immundetektion

Die Immundetektion führt dazu, dass Antigene, in diesem Fall die aufgetrennten Proteinmischungen, mittels monoklonaler Antikörper identifiziert und quantifiziert werden

können. Um dieses Ziel zu erreichen, werden die Membranen mit einem primären Antikörper inkubiert. Dieser bindet spezifisch an das gesuchte Epitop des Proteins. Unspezifische Proteinbindungen werden durch das Waschen der Membranen mit 1x PBS-T und 1x 5 % PBS-T-Milch unterbunden. Die blockierenden Proteine werden durch die Antikörper nicht erkannt. Primärantikörper können in tierischen Wirten synthetisiert werden, z.B. in Kaninchen (rabbit) oder Mäusen (mouse). Im Anschluss wurden die gegen die Primärantikörper gerichteten Sekundärantikörper mit den Membranen inkubiert, um eine Detektion zu ermöglichen. Entsprechend ihrer Primärantikörper sind die sekundären Antikörper gegen anti-rabbit oder anti-mouse gerichtet und binden an die Fc-Bereiche der primären Antikörper. Die Sekundärantikörper selbst sind mit einem Enzym zur Chemilumineszenz-Detektion, Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase, HRP), gekoppelt. HRP katalysiert die Oxidation von Luminol durch Wasserstoffperoxid. Dabei emittieren Elektronen beim Übergang vom angeregten Zustand in ihren Grundzustand Licht. Dieses Licht wird im Rahmen der Chemolumineszenz von einer Spezialkamera detektiert. Ein großer Vorteil dieser zweistufigen Detektion ist es, dass auch Proteine, die in geringer Konzentration vorliegen, mit ausreichend Empfindlichkeit und Spezifität analysiert werden können.^{3,27}

Die Membranen wurden mit den verdünnten Primärantikörpern (vgl. **Tabelle 2**) in 7 ml 5 % 1x PBS-T-Milch in einem 50 ml Falcon-Röhrchen bei 4°C auf einem gleichmäßig beladenen Überkopf-Rotator (neoLab #D-6050, Heidelberg, Deutschland) inkubiert. Am nächsten Tag wurden die inkubierten Membranen zweimal für 5 min mit 1x PBS-T auf einem Plattformschüttler (Polymax, Heidolph, Schwabach, Deutschland) bei Raumtemperatur gewaschen. Überschüssige Antikörper konnten so abgewaschen werden. Im Anschluss erfolgte die Überführung der Membranen in eine Waschschale, die mit 50 ml 0,5%iger PBS-T Milch befüllt wird. Dieser wird zusätzlich noch 5 µl des entsprechenden sekundären Antikörpers (mouse oder rabbit) zugefügt (vgl. **Tabelle 3**). Dies ergab eine Verdünnung des sekundären Antikörpers von 1:10.000. Die Inkubation erfolgte für 1 h unter langsamen Schwenken auf einem Plattformschüttler (Polymax, Heidolph, Schwabach, Deutschland) bei Raumtemperatur. Darauf folgte erneut eine Waschung für zweimal 10 min mit PBS-T und eine anschließende kurze Spülung mit Aqua dest.

Die Detektion erfolgte mittels Enhanced chemiluminescence (ECL, GE Healthcare). Dieses Detektionsreagenzkit beinhaltet 2 Lösungen, eine Luminol-Lösung und eine Wasserstoffperoxidlösung. Durch Benetzen der Membranen mit je 1 ml dieser beiden Reagenzien startet die Oxidation von Luminol durch Wasserstoffperoxid und Elektronen werden emittiert. Nach Reaktionsstart kann diese Lichtemission für ca. 1 h detektiert werden. Die benetzten Membranen wurden direkt im Anschluss zentral auf die Probenteller der Detektionskamera Fusion SL Vilber Lourmat der Firma peqlab/VWR gelegt. Der Teller wurde in die mittlere Schiene der Dunkelkammer geschoben und die Kammer wurde

lichtundurchlässig verschlossen. Zur Überprüfung der korrekten Position der Membran und Kameraeinstellung erfolgte zuerst eine Weißlichtaufnahme samt Speicherung der Daten. Nun wurde die Detektion gestartet. Das für den jeweiligen Antikörper-Nachweis verwendete Zeitintervall wurde entweder vom Gerät vorgeschlagen oder war aus vorherigen Versuchen bekannt. Im Anschluss erstellte die Kamera ein digitales Bild, welches nach einer Farb-Invertierung die Membranen weiß und die Proteinbanden schwarz abbildete. Zur Fertigstellung wurde das detektierte Bild mit der vorher angefertigten Weißlichtaufnahme fusioniert, so dass der Marker seitlich digital eingefügt werden konnte. Nach erfolgter Speicherung der erstellten Bilder wurde die Software FusionCapt Advance der Firma peqlab/VWR zur Auswertung verwendet. Mittels dieses Programms wird die Signalstärke der einzelnen Proteinbanden, welche sich proportional zum Molekulargewicht verhalten soll, berechnet. Zur vergleichbaren Quantifizierung wird dieses Signal mit dem Housekeeping-Protein Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verrechnet. GAPDH ist ein obligatorisches Enzym der Glykolyse, welche durch Abbau von Glucose zu Pyruvatphosphat Adenosintriphosphat (ATP) für den Zellmetabolismus zur Verfügung stellt. Die GAPDH katalysiert dabei die Dehydrierung des Glycerinaldehyd-3-phosphats zu 1,3-Bisphosphoglycerat und kommt in allen Zellen vergleichbar viel exprimiert vor. Dadurch ist es geeignet, quantitative Unterschiede der Beladung der Proteinbanden zu erkennen und macht es möglich, Proteinbanden zum Auswerten mit der gesamten Beladung in ein Verhältnis setzen zu können.

Verwendete Primärantikörper

Antikörper	Verdünnung	Spezies	Hersteller/Nr.
anti-Katalase	1:1000	rabbit	Cell Signaling, #14097
anti-GAPDH	1:10000	mouse	Millipore, MAB374
anti-HO-1	1:1000	rabbit	Cell Signaling, #82206
anti-Nox 2	1:1000	rabbit	abcam, ab129068
anti-Prx III	1:1000	rabbit	AbFrontier, LF-PA0004
anti-SOD-1	1:5000	rabbit	Santa Cruz, sc-11407
anti-SOD-2	1:5000	rabbit	Santa Cruz, sc-30080
anti-Tyrosinhydroxylase	1:1000	rabbit	Cell Signaling, #58844
anti-Xanthine Oxidase	1:1000	mouse	Santa Cruz, sc-398548

Tabelle 2: Primärantikörper Western Blot

Verwendete Sekundärantikörper

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

Tabelle 3: Sekundärantikörper Western Blot

4.5 Amplifikation isolierter mRNA mittels der Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) wurde von dem Nobelpreisträger K.B. Mullis entwickelt. Sie ermöglicht eine in-vitro-Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente aus einer kleinen Menge Ausgangs-DNA. Um die PCR durchführen zu können, muss zunächst die Ribonukleinsäure (ribonucleic acid, RNA) der Herzgewebe isoliert werden. Anschließend wird der RNA-Gehalt jeder Probe durch das Programm NanoDrop (ThermoFisher Scientific) gemessen. So ist es möglich, quantitativ aussagekräftige Ergebnisse im Rahmen der PCR zu erhalten.

Das kombinierte Verfahren der Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) erlaubt eine PCR-Durchführung auch mit der vorliegenden RNA als Ausgangssubstanz. Das Enzym Reverse Transkriptase, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, schreibt dabei die vorhandene RNA in die zum RNA-Strang komplementäre cDNA um.

Zur Quantifizierung der im PCR-Zyklus entstandenen DNA in Echtzeit (engl. real-time) eignet sich die RT-PCR. Dabei wird zunächst die doppelsträngige DNA in beide Einzelstränge bei 95°C denaturiert. Anschließend folgt die Hybridisierung bei 60°C mit spezifisch an die ausgewählte DNA-Sequenz bindende komplementäre Primer. Als letzten Schritt wird im Rahmen der Elongation mittels der DNA-Polymerase der komplementäre Strang am 3' OH-Ende verlängert. Die Quantifizierung wird dabei durch die TaqMan-Sonde ermöglicht. Proportional zur entstandenen DNA-Menge wird eine Reporter-Fluoreszenz freigesetzt und kann gemessen werden.

4.5.1 RNA-Isolation

Zunächst wurde aus den tiefgefrorenen Rattenherzen RNA isoliert. Die Gewebeproben wurden während der gesamten Vorbereitung auf Trockeneis gekühlt gelagert. Unter einer Abzugshaube wurde in die vorbereiteten Eppendorf Reaktionsgefäß 500 µl Omega RNA-Solv Reagent (VWR) vorgelegt. Dieses aus Phenol und Guanidin-Isothiocyanat bestehende Einreagenzsystem dient der Isolierung der Gesamt-RNA aus Zellen und Gewebe. Endogene RNasen und andere zelluläre Komponenten konnten mit Hilfe dieses Kits denaturiert werden, während die RNA in ihrer Integrität erhalten bleiben konnte. In diese Lösung wurde

anschließend ein Stück ähnlich großer Herzgewebsstücke in Millimetergröße gegeben, welches vorher von dem Rattenherz mittels eines Skalpells abgetrennt wurde. Nun wurden die angesetzten Proben homogenisiert (Homogenisatorantrieb, Schuett-Biotec). Danach erfolgte die Pipettierung von erneut 500 µl Omega RNA-Solv Reagent (VWR) in die Reaktionsgefäße und die Lagerung für 5 min bei Raumtemperatur. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform unter einer Abzugshaube, welches die Proteine zusätzlich denaturiert und das Gemisch in eine organische und eine wässrige Lösung auftrennt, wurden die Eppendorfgefäße mittels eines Vortexmischers gründlich durchmischt. Nach erneutem Inkubieren für 15 min bei Raumtemperatur wurden alle Proben für 10 min bei 13.000 U/min und 4°C zentrifugiert, bis sich eine obenliegende wässrige Phase klar abgrenzen ließ. Die Abnahme dieser neu entstandenen wässrigen Phase erfolgte mittels Pipette und nach Überführung in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß begann die Kühlung auf Eis. Dieser letzte Arbeitsschritt fand ebenfalls unter einer Laborabzugshaube statt.

Nach erfolgter Homogenisierung und Phasentrennung erfolgte die Präzipitation, also die Ausfällung der aktuell in der wässrigen Lösung verbleibenden RNA. Um dies zu erreichen wurde 500 µl Isopropanol hinzugegeben und mithilfe eines Vortexmischers durchmengt. Danach erfolgt eine Ausfällung für 15 min auf Eis.

Mit Abschluss der RNA-Präzipitation konnten die Proben gewaschen werden. Zunächst wurde bei 4°C und 13.000 U/min für 60 min zentrifugiert. Der entstandene Isopropanol-Überstand wurde abpipettiert und das im Reaktionsgefäß verbleibende feste Pellet wurde mit 1 ml 75%igem Ethanol-Aqua ad (Braun) mit dem Vortexmischer verrührt. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min bei 13.000 U/min und 4°C wurde die Flüssigkeit um das Pellet möglichst exakt abgesaugt. Um die verbleibende Flüssigkeit ebenfalls absaugen zu können, erfolgte daraufhin durch kurzes Zentrifugieren der restlichen Flüssigkeit bei Raumtemperatur die Präzipitation. Anschließend wurde das übrig gebliebene Pellet mit offenem Reaktionsgefäß bei Raumluft abtrocknen gelassen, sodass der Alkohol verdampfen konnte. Nach den durchgeführten Waschschritten wurde zu dem abgetrockneten Pellet 50 µl Aqua ad (Braun) hinzugegeben und dieses Gemisch für 5 min bei 60°C in einem Thermoschüttler inkubiert, was das Auflösen des Pellets zur Folge hatte.

Als letzter Schritt der RNA-Isolation wurde die RNA-Messung mit Hilfe des NanoDrop (ThermoFisher Scientific) durchgeführt. Nach Normen des Gerätes durch 1 µl DEPC-Wassers als Leerwert konnte der Proteingehalt für 1 µl jeder Probe berechnet werden. Die Software ermittelt daraus die jeweilige RNA-Menge welche auf 2 µg/µl umgerechnet wurde. Nach Überführung des entsprechenden Volumens in ein neues Eppendorfer Reaktionsgefäß, erfolgte das Auffüllen mit Aqua ad (Braun) auf 10 µl. Das Ziel der RNA-Messung ist es, dass alle Proben nahezu identische RNA-Konzentrationen beinhalten. Nur so ist es möglich, quantitativ aussagekräftige Ergebnisse in der PCR zu erhalten.

4.5.2 DNase-Verdau

Nach Abschluss der RNA-Isolation folgte hydrolytische Spaltung der DNA-Verbindungen mittels Desoxyribonukleasen (DNase). Von dem sogenannten MasterMix, welcher die DNase enthält, wurden 10 µl zur Probe (10 µl RNA, die 2 µg entsprechen) hinzugefügt. Folglich enthielt ein Reaktionsgefäß nach Zugabe des Mastermix 20 µl. Diese wurden im Anschluss für wenige Sekunden zentrifugiert und der DNase-Verdau für ca. 40 min in einem Thermozykler (peqStar 96 Universal, peqlab/VWR) im Programmmodus DNase-Verdau durchgeführt.

DNase-MasterMix für eine Probe

6 µl Aqua ad (Braun)
2 µl DNasel + MgCl₂-Puffer
2 µl DNasel
0,5 µl RNase Inhibitor

4.5.3 Reverse Transkriptase PCR (cDNA-Synthese)

Mittels der klassischen Polymerasen, welche im Verfahren der PCR eingesetzt werden, können keine RNA-Fragmente amplifiziert werden. Daher benötigt man das Enzym Reverse Transkriptase, welches die vorhandene RNA in cDNA umschreibt. Als cDNA bezeichnet man die komplementäre DNA, die aus der RNA mittels reverser Transkriptase synthetisiert wird. So kann man die RNA auch über DNA als Ausgangsmolekül vervielfältigen. Die Kombination beider biochemischer Verfahren wird als Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) bezeichnet.

Im sogenannten MasterMix sind alle für die Reverse Transkriptase notwendigen Komponenten beinhaltet: Puffer, Desoxynukleotidtriphosphate (dNTP), Primer, Reverse Transkriptase und RNase-Inhibitor. Um cDNA aus RNA synthetisieren zu können, lagert sich ein Primer an seinen komplementären Matrizenstrang an. Von diesem Primer ausgehend knüpft das Enzym Reverse Transkriptase als RNA-abhängige DNA-Polymerase die komplementären Desoxynukleotide an. Diese Replikation erfolgt am Leitstrang kontinuierlich, mit anknüpfen an das freie 3'OH-Ende. Am Folgestrang wird diskontinuierlich synthetisiert.

Nach Zugabe von 10 µl MasterMix zu der auf Eis gekühlten RNA nach DNase-Verdau wurden die Proben kurz zentrifugiert. Danach wurde die RT-PCR im Thermozykler peqStar 96 Universal der Firma peqlab/VWR vollzogen. Abschließend wurden die Proben auf Eis gestellt und im Verhältnis von 1:5 mit Aqua ad (Braun) verdünnt, d.h. bei einer Probenmenge von 20

μ l wurden 80 μ l Wasser hinzupipettiert. Die fertig angesetzten Proben wurden nun bei -80°C weggefroren.

RT-PCR MasterMix für eine Probe

2 μ l 10x RT Puffer
0,8 μ l 25x dNTP Mix (100 mmol/L)
2 μ l 10x RT Random Primers
1 μ l Multiscribe Reverse Transkriptase
1 μ l RNase Inhibitor
3,2 μ l Aqua dest. (Braun)

4.5.4 Real-time PCR

Die real-time PCR beruht auf dem bekannten Verfahren der PCR zu Amplifizierung von DNA und ermöglicht zusätzlich die Quantifizierung der gewonnenen DNA. Die Quantifizierung erfolgt mittels Fluoreszenz-Messungen, welche im Rahmen eines PCR-Zyklus in Echtzeit (engl. real time) erfasst werden kann. Durch die proportionale Zunahme der PCR-Produkte kommt es zu einem Anstieg der Fluoreszenz-Signale, was eine genaue Quantifizierung ermöglicht.

Um eine real-time PCR durchführen zu können, wurden 96-Well PCR-Platten (Applied Biosystems™ MicroAmp™ Fast Optical 96-Well-Reaktionsplatte, 0,1 ml, Thermo Fisher Scientific) welche aus 96 zusammenhängenden 100- μ l-Reaktionsgefäß bestehen, mit 19 μ l des TaqMan MasterMix gefüllt. Dazu wurde 1 μ l der cDNA (1:5 mit Aqua ad (Braun) verdünnt) pipettiert. Um Verunreinigungen möglichst zu vermeiden, wurden nicht nur kontinuierlich medizinische Handschuhe getragen, sondern das Probenvorbereiten fand zudem unter aktiver Dekontamination der Arbeitsfläche (PCR Workstation Pro, peqlab/VWR) statt. Die Proben wurden auf den PCR-Platten zu Triplets angelegt. So konnte im Nachhinein die Gefahr eines Quantifizierungsfehlers durch Bildung des Mittelwertes aus den Triplets verringert werden. Für jede verwendete Sonde konnte ein Well mit einer Negativkontrolle (sod. No Template Control) bestückt werden. Anschließend wurden die bestückten Platten mit einer selbstklebenden Klarsichtfolie versiegelt, um bei nachfolgenden Erhitzungsprozessen ein Entweichen der Flüssigkeit durch Kondensation zu verhindern. Die PCR-Platten wurden für 5 min bei 600 U/min zentrifugiert. Als Computerprogramm zur Durchführung der PCR wurde die Software StepOne (ThermoFisher Scientific) verwendet. Die Proben wurden in einen Thermozykler gesetzt, welcher diese gezielt auf die gewünschte Temperatur erhitzt bzw. abkühlt.

Die PCR wurde mit 40 Zyklen angesetzt. Jeder einzelne Zyklus bestand zunächst aus einer Denaturierung. Hierzu erfolgte die Erhitzung der Proben mittels Thermozykler im ersten Schritt auf 50°C für 2 min. Nachfolgend wurden in Schritt 2 für 10 min 95°C erreicht. Dies ermöglicht ein Aufbrechen der doppelsträngigen cDNA zu Einzelsträngen. Daran folgend wurde die Temperatur für 1 min auf 60°C gesenkt. Diese ausgewählte Temperatur ermöglicht eine spezifische Anlagerung der sequenzspezifischen Primer an die cDNA. Als letzter Schritt eines jeden PCR-Zyklus folgte die Elongation. Mittels der hitzestabilen Taq-Polymerase wurde am 3' OH-Ende des angelagerten Primers beginnend eine doppelsträngige DNA synthetisiert. Zu diesem konventionellen Ablauf der PCR lagerten sich im Rahmen der real-time PCR die TaqMan-Sonde an den komplementären DNA-Strang an. Diese Taqman-Sonde besitzt an einem Ende einen Quencher, am anderen Ende einen Reporter-Fluoreszenzfarbstoff. Der Reporter gibt als Donor-Fluorochrom nach Anregung durch eine Lichtquelle einen Teil seiner Energie an den in der Nähe befindlichen Quencher (Akzeptor-Fluorochrom) ab. Befindet sich Reporter und Quencher in einem zu großen Abstand zueinander, kann die Energie nicht strahlenfrei mittels Förster-Resonanzenergietransfer übertragen werden. Nach Denaturierung der DNA hybridisiert die TaqMan-Sonde mit dem DNA-Einzelstrang. Durch ausreichende Nähe zwischen Quencher und Reporter wird keine Energie übertragen. Nach der Anlagerung baut die Taq-Polymerase das 5'-Ende der Sonde ab. Dies führt dazu, dass der nun abgelöste Quencher nicht mehr die Fluoreszenz unterdrücken kann und der Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt wird. Der beschriebene Vorgang ist schematisch in **Abbildung 13** dargestellt. Die entstandene Fluoreszenz verhält sich somit proportional zur entstandenen DNA-Menge und ermöglicht eine präzise Quantifizierung.

TaqMan MasterMix (20 µl)

14,5 µl Aqua ad (Braun)

5 µl TaqMan MasterMix

0,5 µl Gene expression assay Sonde

Verwendete Taq-Man-Sonden

Taq-Man Sonde	Katalognummer	Hersteller
BNP	Rn00580641	Thermo Fisher Scientific
GAPDH	Rn01775763	Thermo Fisher Scientific

Tabelle 4: Taq-Man Sonden

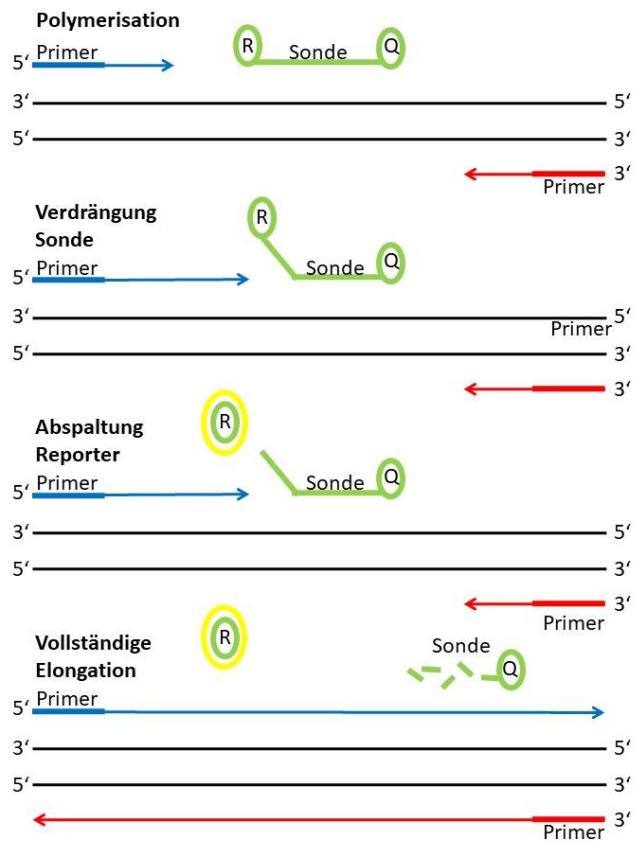


Abbildung 13: Fluoreszenz-Nachweis mittels TaqMan-Sonde

Schematische Darstellung der PCR. Im Anschluss an die Denaturierung der doppelsträngigen cDNA zu Einzelsträngen lagern sich die spezifischen Primer an, welche die Aufgabe der Elongation zum Ziel haben. Zusätzlich lagern sich die mit Fluoreszenzfarbstoff gebundenen Sonden, welche proportional zur entstandenen DNA-Menge Fluoreszenzsignale freigeben.

(R = Reporter, Q = Quencher)

Abbildung nach MVZ Martinsried GmbH

4.6 Histologie

Die Histologie dient zur Untersuchung von Gewebeproben und die darauf einflussnehmenden Pathologien und Behandlungen. Einzelne Zellen können genauso wie Zellverbände und daraus zusammengesetzte Gewebe untersucht werden. Dazu wird das zu untersuchende Gewebe primär fixiert und in Paraffin eingebettet. Nach Übertragung auf einen Objektträger kann die Probe histologisch angefärbt werden. Hierfür stehen sowohl Routine- bzw. Übersichtsfärbungen zur Verfügung, genauso wie immunhistochemische Färbungen, die dem spezifischen Nachweis ausgewählter Proteine dienen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden histologische Schnitte der linken und rechten Vorhöfe, des linken Ventrikels und beider Nieren untersucht. Zur Beurteilung des Kardiomyozyten Diameters wurde die Hämatoxylin-Eosin(HE)-Routinefärbung verwendet. Die Auswertung der

interstitiellen Fibrose erfolgte mit der Pikro-Siriusrot-Färbung, welche speziell Kollagen im Gewebe sichtbar macht. Als letzte histologische Methode wurde eine immunhistologische Färbung der sympathischen Nervenfasern mit Nachweis der Tyrosin-Hydroxylase (TH) gewählt. So wurde das Ausmaß der sympathischen Innervation anhand der Katecholaminsynthese beurteilt.

Die Histologietechnik zur Gewebepräparation erfolgte in dem folgend beschriebenen Ablauf. Zuerst wurden die zu untersuchenden Gewebeproben zur Erhaltung und Stabilisierung der Form 24 h in vierprozentiger Formaldehydlösung (Fisher, Saarbrücken, Deutschland; #PZN 02653048) fixiert, damit sie möglichst vergleichbar zur ursprünglichen vitalen Form konserviert werden. Eine sorgfältige Fixierung ermöglicht es außerdem, chemische und physikalische Merkmale zu erhalten und so Veränderungen zwischen den Proben vergleichen zu können. Weitere degenerative Prozesse werden abgestoppt. Ebenso die Autolyse, welche durch intrazelluläre Enzyme droht. Formaldehyd bildet intra- und intermolekulare Quervernetzungen durch Reaktionen mit Aminogruppen der Proteine und Ausbildung von Methylgruppen. Anschließend erfolgte eine Einbettung in Paraffin, um die einzelnen Gewebeproben zu entwässern. Die Entwässerung ermöglicht das Bad in einer aufsteigender Alkoholreihe (70 %, 80 %, 96 %, 100 %) in einem Gewebeeinbettautomaten (HistoCore PEARL, Leica, Wetzlar, Deutschland). Des Weiteren wurden durch das Einblocken zu einem Paraffin-Quadrat 5 µm große Dünnschnitte am Mikrotom (Leica, RM 2255) erzeugt. Der einparaffinierte Gewebedünnchnitt wurde auf einen Objekträger übertragen und bei 56 °C über Nacht fixiert. Mittels des ausgewählten histologischen Färbeverfahrens konnte die Probe nun angefärbt und anschließend mit einem Deckglas versiegelt werden. Im Verfahren der Lichtmikroskopie wird das sichtbare Lichtspektrum in Kombination mit einer Vergrößerungslinse verwendet.

4.6.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)

Die HE-Färbung dient als Routine- und Übersichtsfärbung und beruht auf zwei verschiedenen Einzelfärbungen. Der natürliche Farbstoff Hämatoxylin färbt alle sauren bzw. basophilen Zellbestandteile blau an. Dazu zählen vor allem der Zellkern mit der sauren DNA und die Ribosome mit dem basophilen rauen endoplasmatischen Retikulum. Im Gegensatz dazu färbt der synthetische Farbstoff Eosin die basischen/eosinophilen Komponenten rot. Zu diesen Komponenten gehört das glatte endoplasmatische Retikulum, Mitochondrien, Zellplasmaproteine sowie Kollagene.

Zunächst wurden die mit den Gewebeproben bestückten Objekträger dreimal für 10 min in Xylol entparaffiniert. Im Anschluss erfolgte ein Bad in absteigender Alkoholreihe (100 %, 90 %, 70 %) für je 5 min, das Waschen in Aqua dest. für ebenfalls 5 min, das Färben der Gewebeschnitte für 12 min mit Hämatoxylin und die zweimalige Reinigung mit Aqua dest.. Danach schloss sich eine Behandlung mit HCL-Alkohol zur Entfernung des überschüssigen

Färbemittels an und eine wiederholende Spülung mit Aqua dest.. Nachfolgend wird das Präparat für 15 min intensiv mit Leitungswasser gespült. Dieser als Bläuen bezeichnete Vorgang ist zum Erhalten der blauen Farbe notwendig, da so ein pH-Wert von mehr als 3 erreicht wird. An das Bläuen wurde ein erneutes Spülen mit Aqua dest. angeknüpft. Hiernach erfolgte die 15-sekündige zweite Einzelfärbung mit Eosin und wiederholte Spülung in Aqua dest.. Zur Entwässerung wurden die beladenen Objekträger für je 2 min in eine aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 90 %, 100 %) und im Anschluss dreimal je 3 min in Xylol getaucht. Abschließend erfolgte nach einer kurzen Trocknungsphase das Bedecken der Gewebsschnitte mit einem Tropfen Entellan und das luftblasenfreie Versiegeln der Objekträger mittels eines Deckglases.

Mit dem Ziel der softwaregestützten Auswertung der Kardiomyozytendiameter zur Hypertrophie-Bestimmung wurden digitale Aufnahmen der anfertigten Präparate aufgenommen. Dazu diente eine in einem Mikroskop (Leica, Aperio Versa 8) eingebaute Kamera. Die Objekträger, zunächst unter dem Mikroskop eingespannt und mittels genauer Einstellungen passend ausgerichtet, konnten so als ein digitales Foto über das Mikroskop von der Kamera eingefangen und gespeichert werden.

Zur Beurteilung der Größe der Herzmuskelzellen wurde das Programm Image Scope (Aperio) verwendet. Die Präparate des linken Vorhofs und des linken Ventrikels aller Versuchstiere wurden nach möglichst runden Myozyten mit mittig gelegenem Nukleus untersucht. Der Durchmesser dieser Zellen wurde mittels eines digitalen Lineals ausgemessen und gespeichert (vgl. **Abbildung 14** und **Abbildung 15**). Pro linken Vorhof wurden 50 solcher idealen Zellanschnitte, pro linkem Ventrikel >150 gesucht und im Anschluss daraus für das jeweilige Tier ein Mittelwert der Zelldiameter erfasst. So konnte das Ausmaß der Zellhypertrophie unter den Tieren verglichen werden.

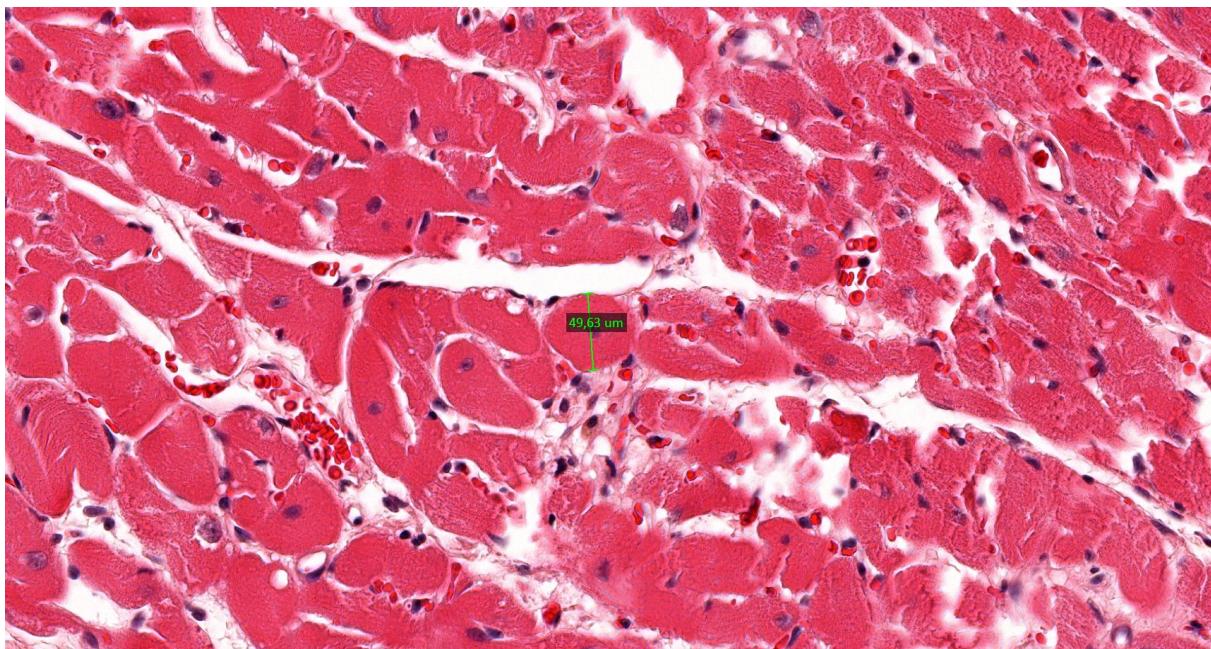


Abbildung 14: Ausmessen des Kardiomyozyten-Diameters mit Hilfe des Computerprogramms Image Scope

Zentral im Bild zu sehen ist eine ideal angeschnitten Zelle mit zentral gelegenem Zellkern. Diese wird mittels des Mess-Tools der Computersoftware Image Scope in ihrem Durchmesser vermessen.

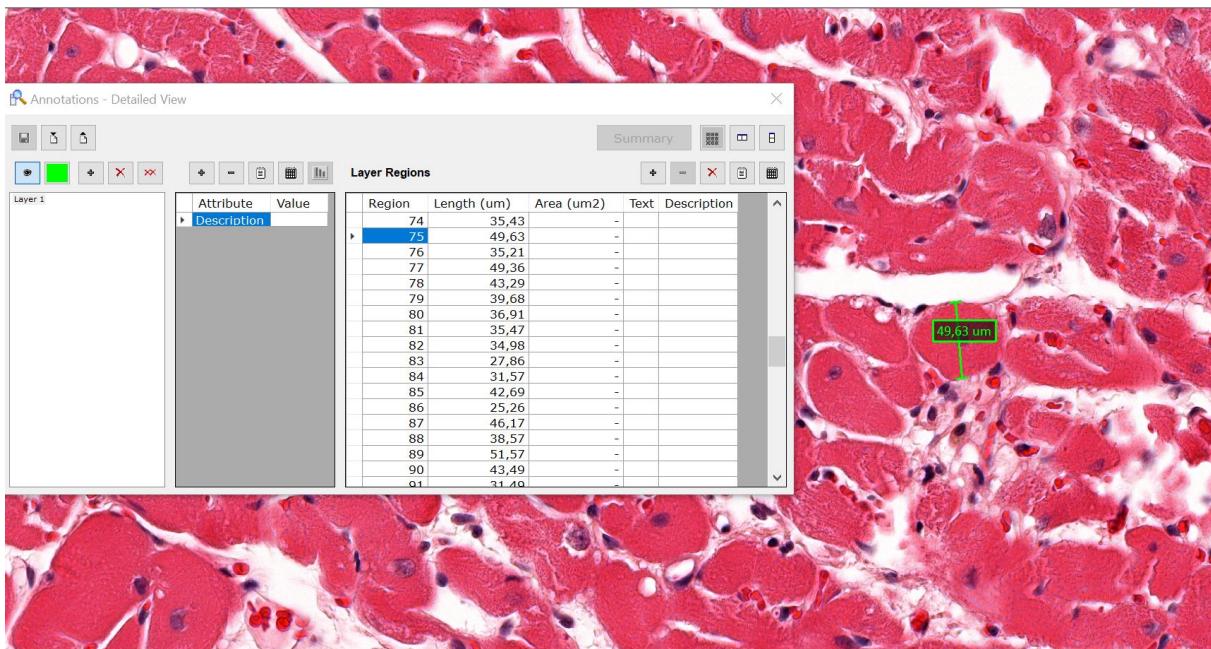


Abbildung 15: Speichern der ausgemessenen Daten mittels des Computerprogramms Image Scope

Alle ausgemessenen Zell-Diameter eines histologischen Schnittes eines Versuchstiers werden von dem Programm Image Scope automatisch in einer Tabelle, wie hier exemplarisch dargestellt, festgehalten und können so im Anschluss gespeichert und ausgewertet werden.

4.6.2 Pikro-Siriusrot-Färbung

Die Pikro-Siriusrot-Färbung ist eine histologische Färbemethode, um Kollagenfasern hervorzuheben. Dazu wird ein Hellfeldmikroskop genutzt. Die Färbelösung beinhaltet den Farbstoff Siriusrot, gesättigt in einer wässrigen Pikrinsäure-Lösung. Die großen Farbmoleküle des Siriusrot lagern sich zum Anfärben längs an die Fasern an. Die Kollagenfasern erscheinen rötlich, das Zytoplasma gelb.

Kollagenfasern bilden den Hauptbestandteil der Fibrose, einer pathologischen Bindegewebsvermehrung. Diese führt im betroffenen Organ zu einer eingeschränkten Organfunktion. Somit eignet sich diese Färbung, um die Fibrose darzustellen und auswerten zu können.

Zu Beginn wurden die Gewebepräparate dreimal in Xylol für je 10 min entparaffiniert. Anschließend wurden die Proben je 5 min in eine absteigende Alkoholreihe (100 %, 90 %, 70 %) getaucht und für ebenfalls 5 min in Aqua dest. gewaschen. Nach der folgenden 60-minütigen Färbung mit Pikro-Siriusrot folgten zwei Spülungen in Aqua dest. Des Weiteren erfolgte die Entwässerung der Objektträger in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 90 %, 100 %) und für je 3 min in Summe dreimal die Benetzung mit Xylol. Damit die Gewebeschnitte abschließend mit einem Deckglas luftblasenfrei abgedeckt werden konnten, wurde Entellan auf diese getropft.

Die auf den Objektträgern eingefärbten und fixierten Gewebedünnschnitte werden mittels Mikroskops (Leica, Aperio Versa 8) als digitales Bild erfasst. Zur Bearbeitung wurde die Software GIMP 2.10.24 (GNU Image Manipulation Program) verwendet. Bestimmte Bildbereiche wie der rechte Ventrikel, die perivaskuläre Fibrose und epikardiale und endokardiale Anteile wurden vorher durch Bildbearbeitung entfernt (vgl. **Abbildung 16** und **Abbildung 17**). So konnte sichergestellt werden, dass lediglich die linksventrikuläre interstitiellen Fibrose, d.h. die zwischen den Kardiomyozyten befindlichen Kollagenfasern, beurteilt wurden. Das digitale Ausschneiden des rechten Ventrikels hatte den Hintergrund, dass für unsere Arbeit nur die Fibrose des linken Ventrikels betrachtet wurde.

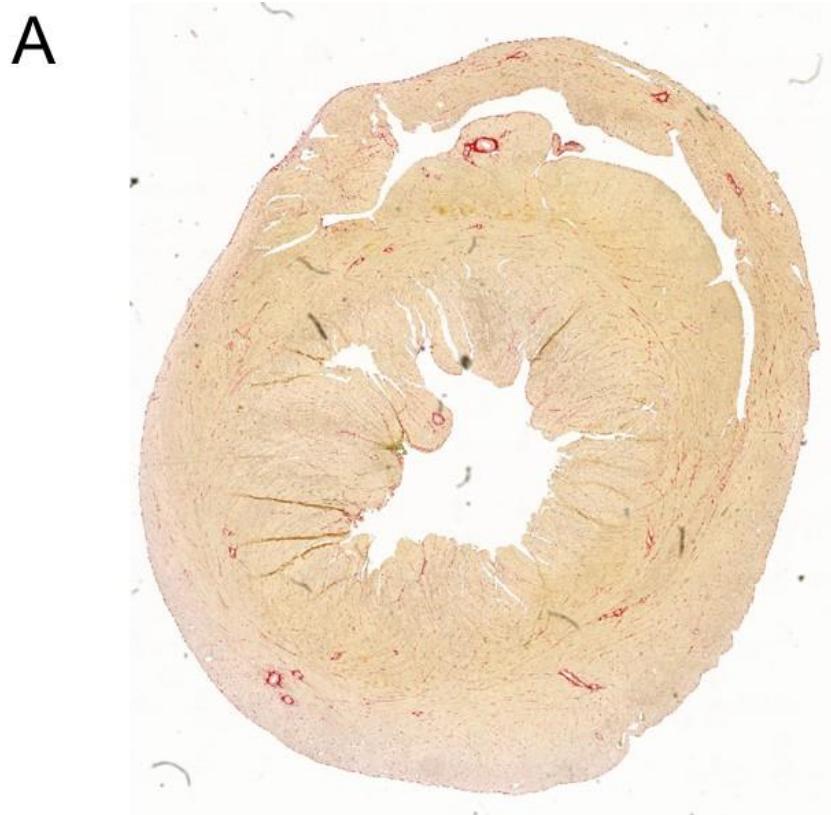


Abbildung 16 Linker Ventrikel (LV) nach Pikro-Siriusrot Färbung

A: Linker Ventrikel vor der Bildbearbeitung

B: Linker Ventrikel nach Entfernung der perivaskulären Fibrose, des rechten Ventrikels und der epi- und endokardialen Anteile

A



B

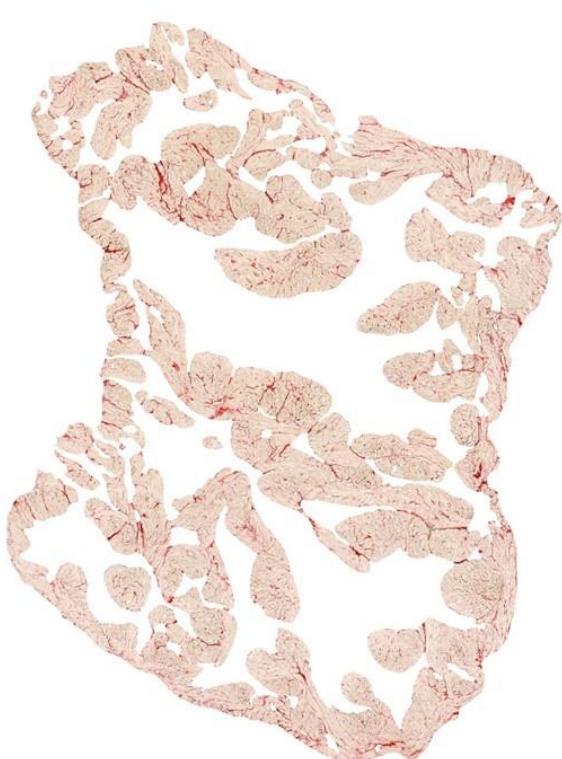


Abbildung 17: Linker Vorhof (LA) nach Pikro-Siriusrot Färbung

A: Linkes Atrium vor Bildbearbeitung

B: Linkes Atrium nach Entfernung der perivaskulären Fibrose, des rechten Ventrikels und der epi- und endokardialen Anteile

Die Auswertung des Fibrose-Anteils wurde mit dem Computerprogramm NIS Elements (Nikon Instruments Europe BV) durchgeführt. Zuerst erfolgte die Berechnung der Pixelanzahl des abgebildeten Gewebes der Präparate, nach Abzug aller weißen Hintergrundpixel von der Gesamtpixelzahl der digitalen Bilder. Anschließend wurden alle rot gefärbten Bildpixel erfasst, welche nach der vorherigen Bearbeitung der Aufnahmen nur noch der rötlich eingefärbten interstitiellen Fibrose entsprach. Der prozentuale Anteil der interstitiellen Fibrose am linken Ventrikel konnte somit berechnet werden.

4.6.3 Tyrosin-Hydroxylase-Färbung

Die Tyrosin-Hydroxylase-Färbung ist eine immunhistologische Färbung der sympathischen Nervenfasern mit Nachweis des Markerenzyms Tyrosin-Hydroxylase (TH). Dieses katalysiert als Schlüsselenzym der Katecholaminsynthese die Hydroxylierung von Tyrosin zu L-DOPA. So kann eine Quantifizierung der sympathischen Innervation anhand der Katecholaminsynthese erfolgen. Dazu werden die Präparate mit einem Primärantikörper, welcher selektiv an den Marker TH bindet, inkubiert. Im Anschluss werden die Gewebeschnitte mit den Sekundärantikörpern inkubiert, an den einen Fluoreszenz-Farbstoff gekoppelt ist. Diese Fluoreszenz kann mit Hilfe des Lichts einer bestimmten Wellenlänge (510-700 nm) angeregt werden und daraufhin Licht einer veränderten Wellenlänge abgeben. Dieses Aufleuchten kann unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden und so TH beinhaltende Nervenfasern detektiert werden.

Die Gewebeschnitte wurden zunächst 30 min auf eine Heizplatte gelegt und dreimal 10 min in Xylol entparaffiniert. Daraufhin wurden sie zweimal für 5 min in 100 % Ethanol, einmal für 5 min in 80 % und erneut für 5 min in 70 % Alkohol gegeben. Nach dem zweimaligen Waschen der Objektträger für 5 min in 1x PBS, erfolgte das Kochen bei 95°C in einem Citraconsäure-Puffer beinhaltenden Wasserbad für 60 min. Dieser Schritt hatte zum Ziel, dass die Proteine wieder in ihre möglichst natürliche, vitale Form zurückfinden. Im Folgenden wurden die Gewebedünn schnitte für 20 min abkühlen gelassen und wieder zweimal fünfminütig in 1x PBS gewaschen. Über Nacht wurden sie nun bei 4°C mit dem entsprechenden primären Antikörper (anti-Tyrosin-Hydroxylase, Abcam, ab112) in der Verdünnung 1:100 in 1x PBS inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Behandlung der Präparate für 2 h in einem 37°C warmen Wasserbad und anschließend das Waschen zunächst zweimal 5 min in 1x PBS-T und danach einmalig für 5 min in 1x PBS. Nachdem diesen Waschschritten durchgeführt waren, wurden die Objektträger abtropfen gelassen und der Sekundärantikörper (anti-Rabbit FITC, Dianova) wurde in der Verdünnung von 1:50 mit 1x PBS für 2 h bei 37 °C in einem Wasserbad inkubiert. Dieser sekundäre Antikörper trägt an sich den Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceinisothiocyanat gebunden. Regt man diesen Farbstoff mit Licht aus dem blauen Wellenlängenbereich an, wird

grünes Licht ausgestrahlt. Nach Abschluss der Inkubation mittels sekundärer Antikörper, folgten zwei fünfminütige Waschschritte mit 1x PBS-T und ein einzelner fünfminütiger Waschschritt mit 1x PBS. Zum Schluss wurden die Zellkerne mit dem DNA-Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) angefärbt, welcher bei ultraviolettem Lichteinfluss die Nukleoli blaues Licht emittieren lässt.

Zur Quantifizierung der Tyrosin-Hydroxylase wurde von den immunhistochemisch eingefärbten Gewebedünnschnitten jeweils ein digitales Bild mit Hilfe des Mikroskops aufgenommen. Mit Hilfe des Computerprogramms Image Scope (Aperio) wurden alle grün leuchtenden Nervenfaseranteile in unmittelbarer Nähe einer sich blau darstellenden Zellkerns markiert (vgl. **Abbildung 18**). Die Computersoftware zählte die gesetzten Markierungen mit, sodass der quantitative Vergleich zwischen den Präparaten möglich wurde.

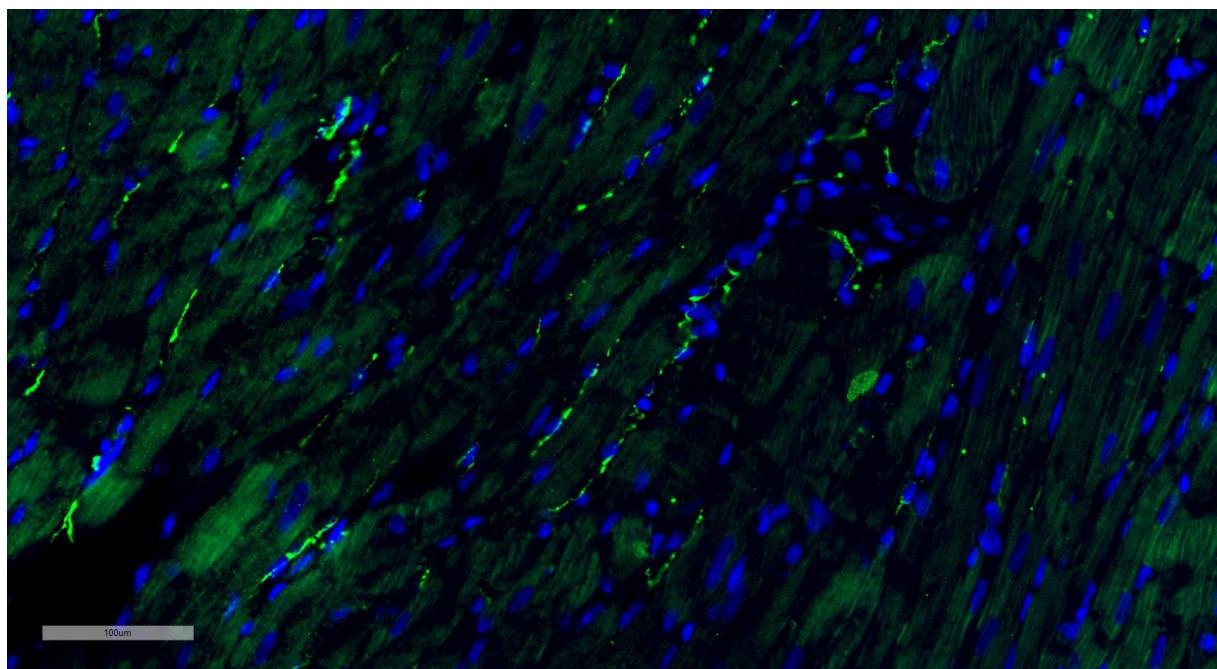


Abbildung 18: Tyrosin-Hydroxylase-Färbung sympathischer Nervenfasern im linken Ventrikel (LV)

Die mittels an den Sekundärantikörper gebundenen Fluoreszenzfarbstoffs grün leuchtenden Markerenzyme winden sich um die blauen Zellkerne der Kardiomyozyten

4.7 Statistik

Die gesamte statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels der Software GraphPad Prism 10.1.2 (La Jolla, USA). Die Ergebnisse wurde jeweils als Mittelwert \pm Standardfehler (standard error of mean, SEM) dargestellt. Im Fall einer Normalverteilung erfolgte die statistische Varianzanalyse „One-way ANOVA“ mit „Tukey’s multiple comparison“-Test. Wurden ausschließlich zwei Gruppen in Normalverteilung verglichen, wurde dazu ein t-test durchgeführt. Lagen die auszuwertenden Daten nicht normalverteilt vor oder war $n < 6$ wurde

die „Kruskal-Wallis“-Varianzanalyse mittels „Dunn's multiple comparison“-Test angewandt. Als Signifikanzniveau wurde stets $p<0,05$ gewählt.

5 Ergebnisse

Um weitreichendere Erkenntnisse über die Entwicklung eines atrialen arrhythmogenen Substrats unter dem Einfluss kardiovaskulärer Komorbiditäten bei CKD zu erlangen und den Effekt des renalen Nervensystems darauf genauer untersuchen zu können, etablierten wir ein hypertensives CKD-Modell an spontan hypertensiven Ratten (SHR). Die Entwicklung des Blutdruckes in SHR wurden zu Beginn dieser Studie über einen Zeitraum von 5 Wochen mittels eines Katheter-basierten Telemetrie Systems überwacht, um sicherzustellen, dass die Hypertonie ein stabiles Niveau erreicht hatte. Nach dieser Initialen Phase, erhielten die Tiere zur Induzierung der CKD 0,25 % Adenin-Futter über einem Zeitraum von 16 Wochen (Adenin-Gruppe; Ad; n=4). Die Hälfte dieser Tiergruppe diente als Interventionsgruppe. Diese erhielten 4 Wochen nach Beginn der CKD-induzierenden Diät eine beidseitige renale Denervation (Adenin+RDN-Gruppe; Ad+RDN; n=4). Die Kontrollgruppe, welche durchgehend Standardfutter erhielt, wurde scheinoperiert (Kontroll-Gruppe, Ko; n=4) (vgl. **Abbildung 5**).

5.1 Allgemeine Tierdaten

5.1.1 Tiergewicht, Aufnahme von Futter und Wasser

Über den insgesamt 21-wöchigen Versuchszeitraum wurden die Tiergewichte einmal pro Woche gemessen. Die Körpermassen der 3 Versuchsgruppen sind in **Abbildung 19** über den gesamten Zeitverlauf dargestellt. Zu Beginn des Versuches, betrug das durchschnittliche Gewicht der Kontroll-Gruppe $343,0 \pm 10,1$ g, der Adenin-Gruppe $353,3 \pm 6,1$ g und das der Adenin+RDN-Gruppe $343,3 \pm 6,1$ g. Somit zeigte sich zu Versuchsbeginn kein signifikanter Unterschied in den Tiergewichten zwischen allen Gruppen (Ad vs. Ko: $p=0,84$, Ad+RDN vs. Ko: $p=0,99$, Ad+RDN vs. Ad: $p=0,98$). Die Versuchstiere nahmen alle über die Zeit kontinuierlich an Gewicht zu. Im Rahmen der finalen Versuche wurden die Gewichte ein letztes Mal bestimmt. Dabei betrug das mittlere Gewicht der Kontrollgruppe $399,5 \pm 22,5$ g, der Adenin-Gruppe $380,8 \pm 20,1$ g und der Adenin+RDN-Gruppe $356 \pm 15,4$ g. Die Kontrollgruppe erhöhte am meisten ihr Körpermass, die Adenin+RDN-Gruppe nahm am geringsten zu. Dennoch zeigte sich auch an diesem Punkt kein signifikanter Gewichtsunterschied zwischen den Versuchsgruppen (Ad vs. Ko: $p=0,99$, Ad+RDN vs. Ko: $p=0,19$, Ad+RDN vs. Ad: $p=0,84$) (vgl. **Abbildung 20**).

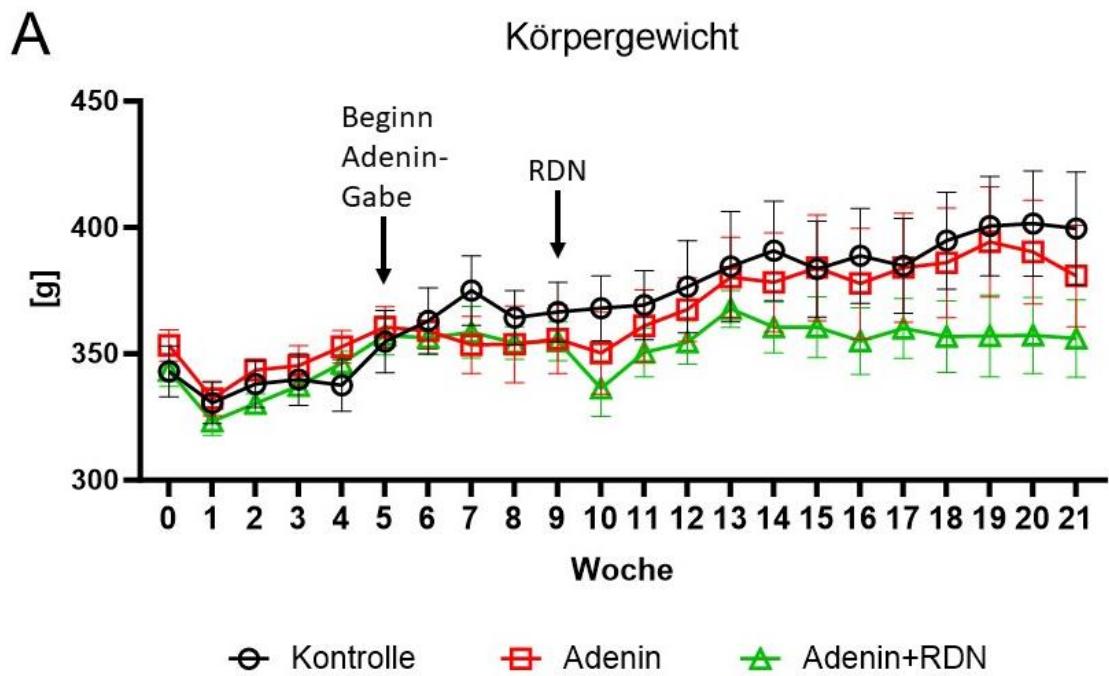


Abbildung 19: Tiergewichte

Wöchentlich gemessene Tiergewichte über den gesamten Versuchszeitraum.

x-Achse: Anzahl der Wochen

y-Achse: Durchschnittliches Tiergewicht einer Gruppe [g]

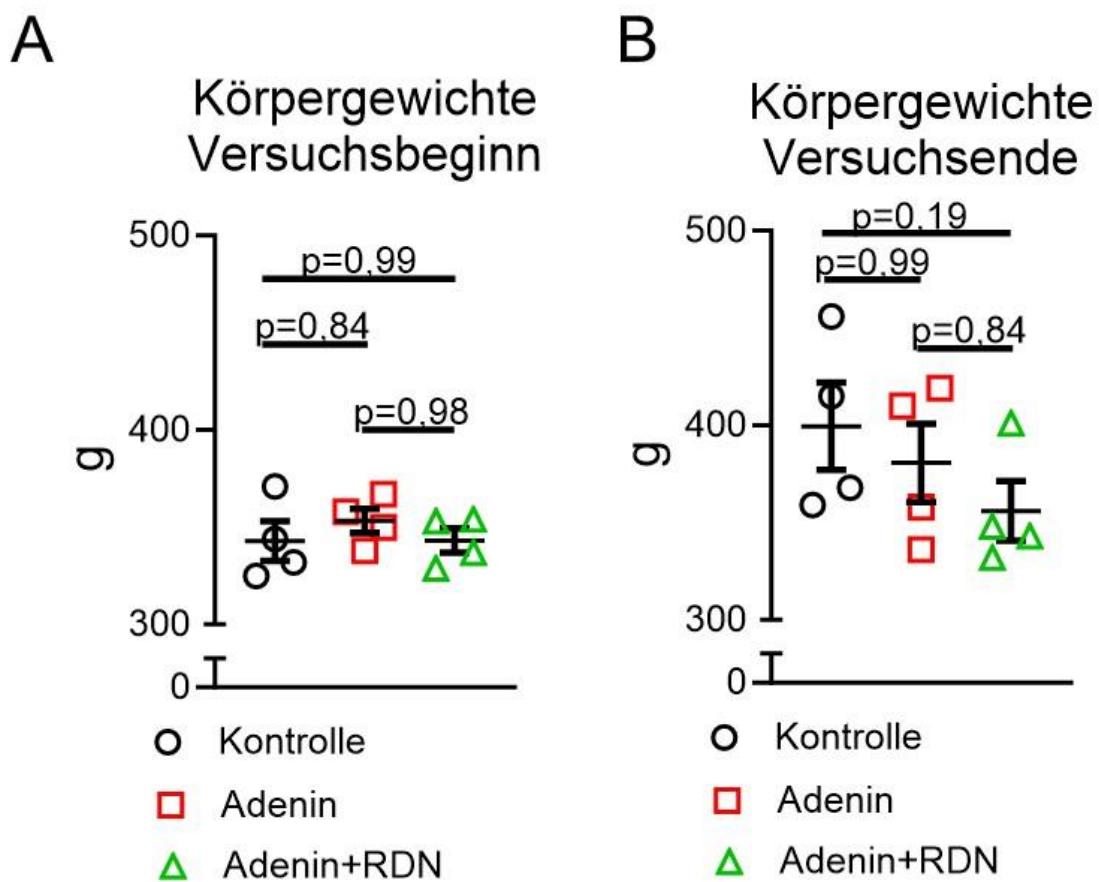


Abbildung 20: Tiergewichte

A: Durchschnittliche Tiergewichte [g] einer Versuchsgruppe (Kontrolle, Adenin, Adenin+RDN) zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns

B: Durchschnittliche Tiergewichte [g] einer Versuchsgruppe (Kontrolle, Adenin, Adenin+RDN) zum Zeitpunkt des Versuchsendes

Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Zur statistischen Analyse wurde die „Kruskal-Wallis“-Varianzanalyse mittels „Dunn's multiple comparison“-Test angewandt. (Signifikanzniveau $p<0.05$)

Während des gesamten Versuches stand den Tieren Futter und Wasser im Überschuss zur Verfügung. Zur wöchentlichen Beurteilung der aufgenommenen Futtermenge wurde das gefressene Futter pro Ratte pro Tag berechnet (vgl. **Abbildung 21**). Unterschieden wurden dabei die Käfige, in denen 0,25%iges Adenin-Futter verfüttert wurde (Ad, n=4 und Ad+RDN, n=4) von dem Käfig der Kontrollgruppe (Ko, n=4), welcher Standarddiät erhielt. In der ersten Woche nach Start des Experiments fraß pro Tag ein Tier der Kontrollgruppe durchschnittlich $20,06\pm0,22$ g Normalfutter. Die Tiere die Adenin-Futter erhielten, nahmen $19,81\pm1,77$ g zu sich und unterschieden sich somit nicht signifikant von der Kontrollgruppe ($p=0,89$). Im Verlauf des Experiments stagnierte die aufgenommene Menge an Futter in der Kontrollgruppe auf einem gleichbleibenden Niveau, während die Tiere, denen Adenin-Futter verabreicht wurde, im Vergleich signifikant weniger aufnahmen. In der letzten Woche vor Tötung der Ratten fraß ein

Tier im Mittel $22,10 \pm 0,16$ g Normalfutter pro Tag, während die Adenin-Gruppe und Adenin+RDN-Gruppe durchschnittlich $16,44 \pm 1,42$ g pro Tag aufnahmen ($p=0,008$). Daraus lässt sich ableiten, dass unter Adenin-haltiger Diät eine geringere Nahrungsaufnahme stattfand.

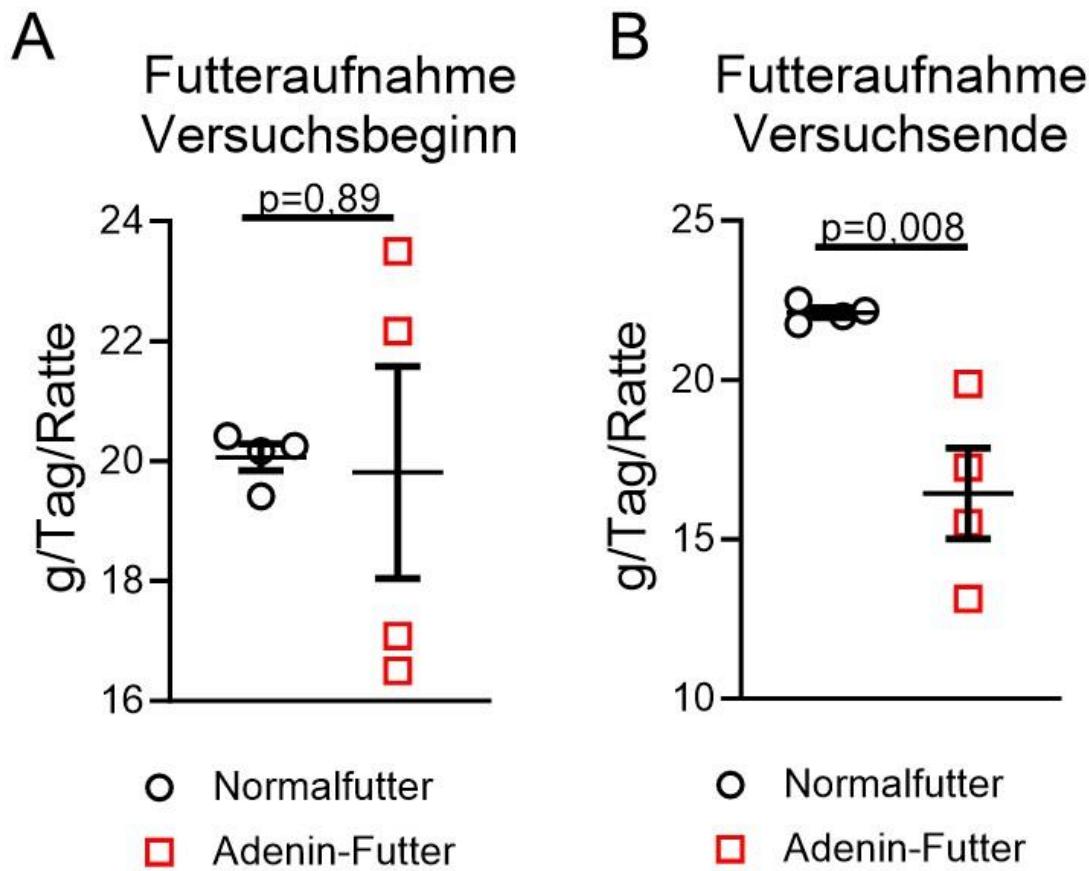


Abbildung 21: Futtermenge

A: Durchschnittliche Futteraufnahme pro Tier und Tag [g] zu Versuchsbeginn unterteilt in die Gruppen Normalfutter (Kontrollgruppe) und Adeninfutter (Ad und Ad+RDN)
B: Durchschnittliche Futteraufnahme pro Tier und Tag [g] zu Versuchsende unterteilt in die Gruppen Normalfutter (Kontrollgruppe) und Adeninfutter (Ad und Ad+RDN)
Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Zur statistischen Analyse wurde die „Kruskal-Wallis“-Varianzanalyse mittels „Dunn's multiple comparison“-Test angewandt.
(Signifikanzniveau $p<0.05$)

Die Trinkmenge der mit Normalfutter gefütterten Kontrolltiere betrug zu Versuchsbeginn $30,21 \pm 1,04$ ml, die der Adenin-Futter gefütterten Tiere $29,79 \pm 3,37$ ml pro Tier pro Tag ($p=0,91$). Diese mittlere Menge an aufgenommenem Wasser veränderte sich zu Versuchsende hin signifikant mit einem p -Wert von $p=0,0003$ (Normalfutter vs. Adenin-Futter). Der Verbrauch der Kontrollgruppe in der finalen Woche unterschied sich dabei im Vergleich zum Ausgangswert kaum (Normalfutter: $33,39 \pm 1,30$ ml), während die Adenin- und

Adenin+RDN-Gruppe über die Zeit mehr Wasser zu sich nahmen (Adenin-Futter: $58,65 \pm 3,01$ ml) (vgl. **Abbildung 22**).

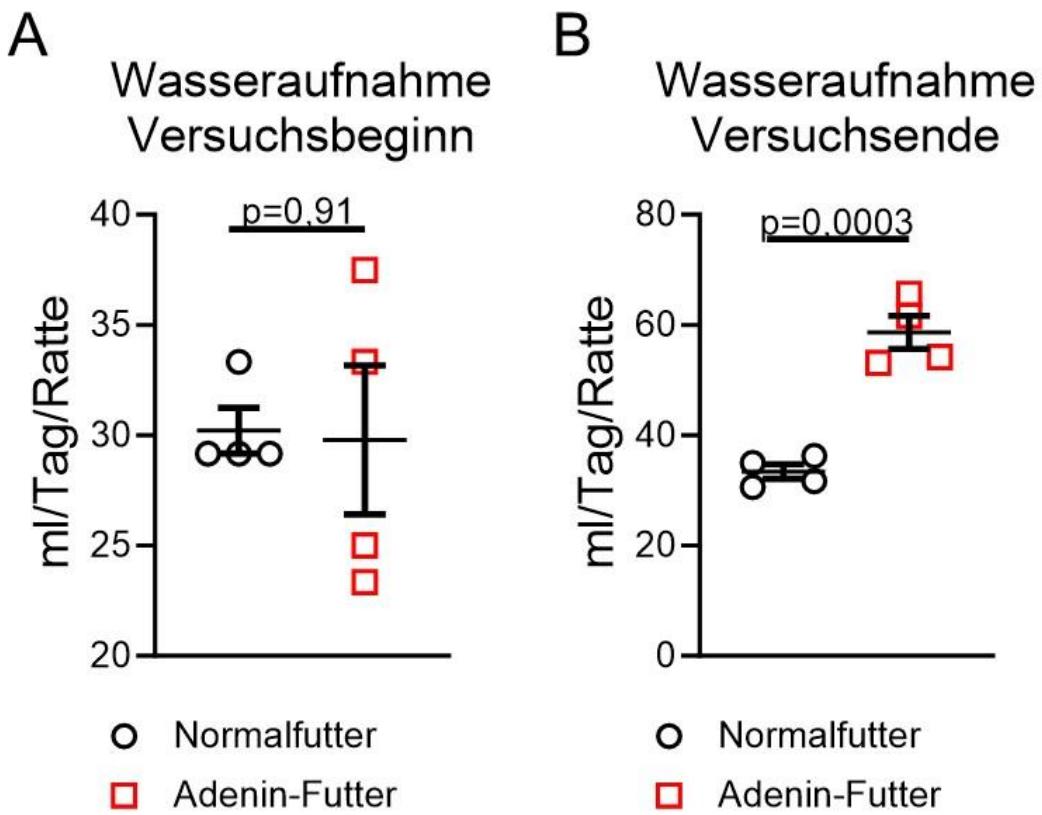


Abbildung 22: Wasseraufnahme

A: Durchschnittliche Wasseraufnahme pro Tier und Tag [ml] zu Versuchsbeginn unterteilt in die Gruppen Normalfutter (Kontrollgruppe) und Adeninfutter (Ad und Ad+RDN)
B: Durchschnittliche Wasseraufnahme pro Tier und Tag [ml] zu Versuchsende unterteilt in die Gruppen Normalfutter (Kontrollgruppe) und Adeninfutter (Ad und Ad+RDN)
Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Zur statistischen Analyse wurde die „Kruskal-Wallis“-Varianzanalyse mittels „Dunn's multiple comparison“-Test angewandt.
(Signifikanzniveau $p<0.05$)

5.1.2 Mittlerer arterieller Blutdruck und Herzfrequenz

Um die Veränderungen des MAP und der Herzfrequenz (HF) aufgrund einer entstehenden CKD quantifizieren zu können, wurden die jeweiligen Werte zu Versuchsbeginn (Baseline) und zu Versuchsende (Woche 16) gemessen. Das Delta stellt dabei die Differenz der beiden Zeitpunkte da. Der MAP betrug zum Zeitpunkt von 16 Wochen für die Kontrollgruppe $156,80 \pm 9,45$ mmHg, für die Adenin-Gruppe $163,40 \pm 5,08$ mmHg und für die Adenin+RDN-Gruppe $169,10 \pm 5,72$ mmHg (**Abbildung 23 A**). Daraus ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen (Ad vs. Ko: $p=0,99$, Ad+RDN vs. Ko: $p=0,72$, Ad+RDN vs. Ad: $p=0,99$). Das Delta zur Baseline betrug für die Kontrollgruppe $18,75 \pm 5,42$

mmHg, der Adenin-gefütterten Gruppe $18,53 \pm 1,49$ mmHg und der Interventionsgruppe mit renaler Denervation $23,21 \pm 2,9$ mmHg (**Abbildung 23B**). Diese Blutdruckwerte konnten ebenfalls keinen statistisch signifikanten Unterschied aufweisen (Ad vs. Ko: $p=0,99$, Ad+RDN vs. Ko: $p=0,99$, Ad+RDN vs. Ad: $p=0,72$).

Die ermittelten Herzfrequenzen zum Versuchsende zeigten keine Veränderung (Baseline: Ad vs. Ko: $p=0,35$, Ad+RDN vs. Ko: $p=0,51$, Ad+RDN vs. Ad: $p=0,99$, Delta zur Baseline: Ad vs. Ko: $p=0,12$, Ad+RDN vs. Ko: $p=0,06$, Ad+RDN vs. Ad: $p=0,99$). Die durchschnittliche HF betrug in der Kontrollgruppe $288,2 \pm 3,14$ bpm nach 16 Wochen und verringerte sich um $10,2 \pm 1,33$ bpm als Delta zur Baseline. Ebenso entwickelte die Gruppe der Adenin-gefütterten Tiere mit und ohne Intervention eine zu Ende des Versuches verringerte Herzfrequenz (16-Wochen-Baseline: Ad: $275,5 \pm 7,11$ bpm, Ad+RDN: $270 \pm 10,57$ bpm; Delta zur Baseline: Ad: $-27,93 \pm 10,19$ bpm, Ad+RDN: $-32,36 \pm 12,21$ bpm) (vgl. **Abbildung 23**).

Zusammenfassend blieben die Vitalparameter unbeeinflusst von einer Adenin-induzierten CKD und Intervention der Versuchsgruppen.

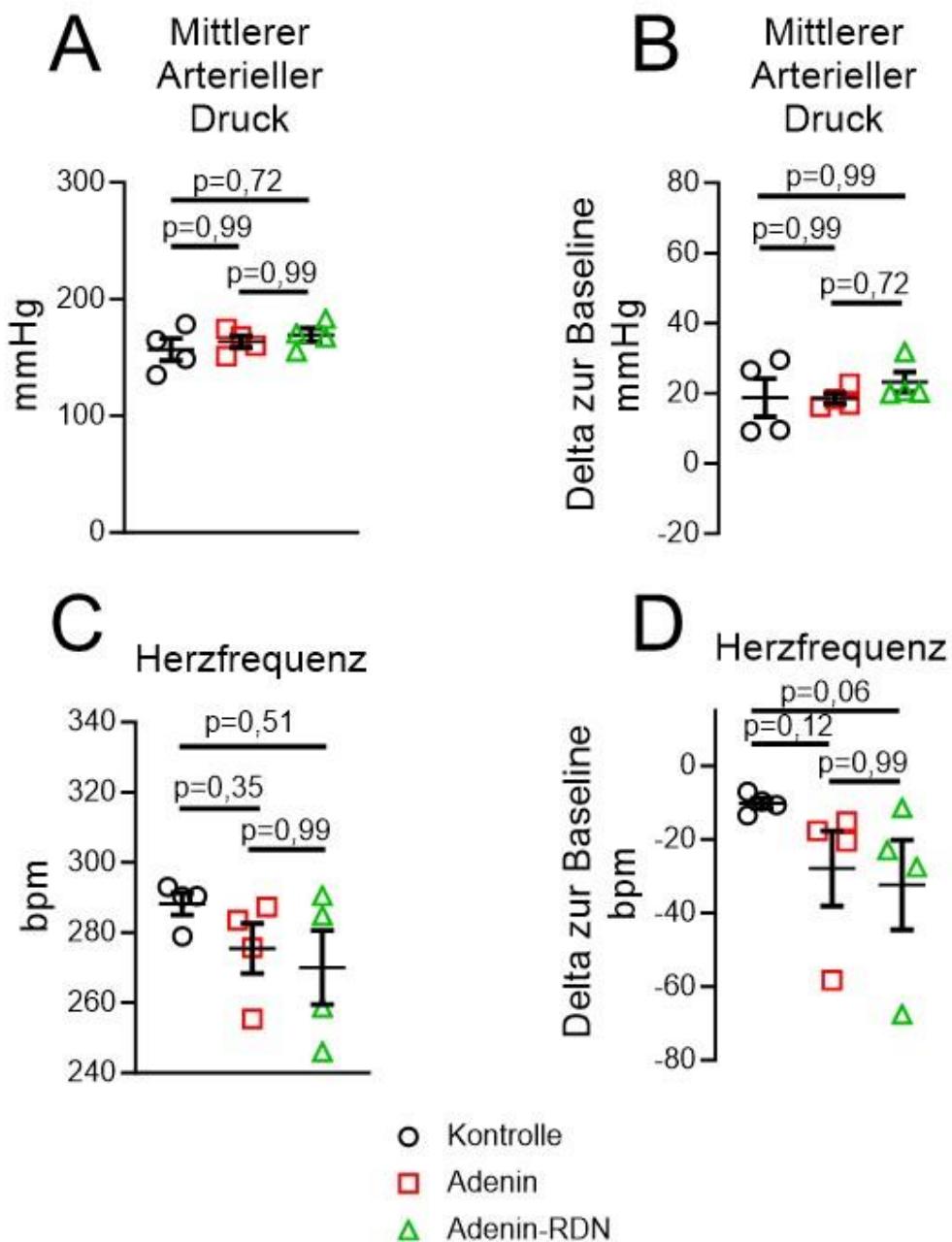


Abbildung 23: Blutdruckwerte nach 16 Wochen und finale Differenz zur Baseline des Mittleren arteriellen Drucks (MAP) und der Herzfrequenz (HF) [bpm]

A: Baseline des durchschnittlichen Mittleren arteriellen Drucks [mmHg] der Kontrollgruppe (Ko, n=4), Adenin-Gruppe (Ad, n=4), und Adenin-Gruppe mit renaler Denervation (Ad+RDN, n=4)

B: Differenz des durchschnittlichen Mittleren arteriellen Drucks [mmHg] der Kontrollgruppe (Ko, n=4), Adenin-Gruppe (Ad, n=4), und Adenin-Gruppe mit renaler Denervation (Ad+RDN, n=4) im Vergleich zur Baseline

C: Baseline der durchschnittlichen Herzfrequenz [bpm] der Kontrollgruppe (Ko, n=4), Adenin-Gruppe (Ad, n=4), und Adenin-Gruppe mit renaler Denervation (Ad+RDN, n=4)

D: Differenz der durchschnittlichen Herzfrequenz [bpm] der Kontrollgruppe (Ko, n=4), Adenin-Gruppe (Ad, n=4), und Adenin-Gruppe mit renaler Denervation (Ad+RDN, n=4) im Vergleich zur Baseline

bpm= beats per minute

Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Zur statistischen Analyse wurde die „Kruskal-Wallis“-Varianzanalyse mittels „Dunn's multiple comparison“-Test angewandt. (Signifikanzniveau p<0,05)

5.1.3 Nierenfunktion

Um die Nierenfunktion und das Ausmaß der Nierenschädigung beurteilen zu können wurde in regelmäßigen Abständen die Plasma- und Urinkonzentration von Kreatinin und Harnstoff gemessen. Diese beiden Stoffwechselprodukte werden unter physiologischen Bedingungen renal eliminiert und dienen somit als endogene Filtrationsmarker. Unter eingeschränkter Nierenfunktionsleistung steigt die Plasmakonzentration der beiden Nierenparameter an, während die Urinkonzentration folglich abfällt. Die Beziehung zwischen der Plasmakonzentration von Kreatinin und Harnstoff und der Nierenfunktion verhält sich somit reziprok.²⁸

Eine 16-wöchige Adenin-Diät hatte zur Folge, dass die Plasma-Kreatininkonzentration der Adenin-Gruppe im Vergleich zu Kontrolle deutlich erhöht war (Ko: 0,74 \pm 0,05 mg/dl vs. Ad: 1,44 \pm 0,21 mg/dl, p=0,19). Die Intervention mittels RDN erzeugte keinen Unterschied (Ad vs. Ad+RDN: p=0,98). Hingegen zeigte sich ein noch deutlicherer Effekt in den Adenin-gefütterten Ratten mit renaler Denervation (Ad+RDN: 1,98 \pm 0,3 mg/dl, Ko: 0,74 \pm 0,05 mg/dl, p=0,01). Ähnliche Tendenzen zeigten sich im Hinblick auf die Plasma-Harnstoffkonzentration. Die Adenin-Gruppe erreichte mit einem Mittelwert von 145,2 \pm 28,37 mg/d ebenfalls deutlich höhere Werte als die Kontrollgruppe (Ko: 59,73 \pm 2,88 mg/dl, Ad vs. Ko: p=0,23). Auch hier konnte die renale Denervation keinen Unterschied bewirken (Ad vs. Ad+RDN: p=0,72). Die höchsten Werte erreichte die Adenin-Gruppe mit renaler Denervation mit durchschnittlich 212,5 \pm 40,88 mg/dl. Damit unterschied sie sich signifikant von der Kontrollgruppe (Ko: 59,73 \pm 2,88 mg/dl, Ad+RDN vs. Ko: p=0,01) (vgl. **Abbildung 24**). Diese Ergebnisse zeigen, dass mittels Adenin-Futter eine Nierenerkrankung induziert werden konnte.

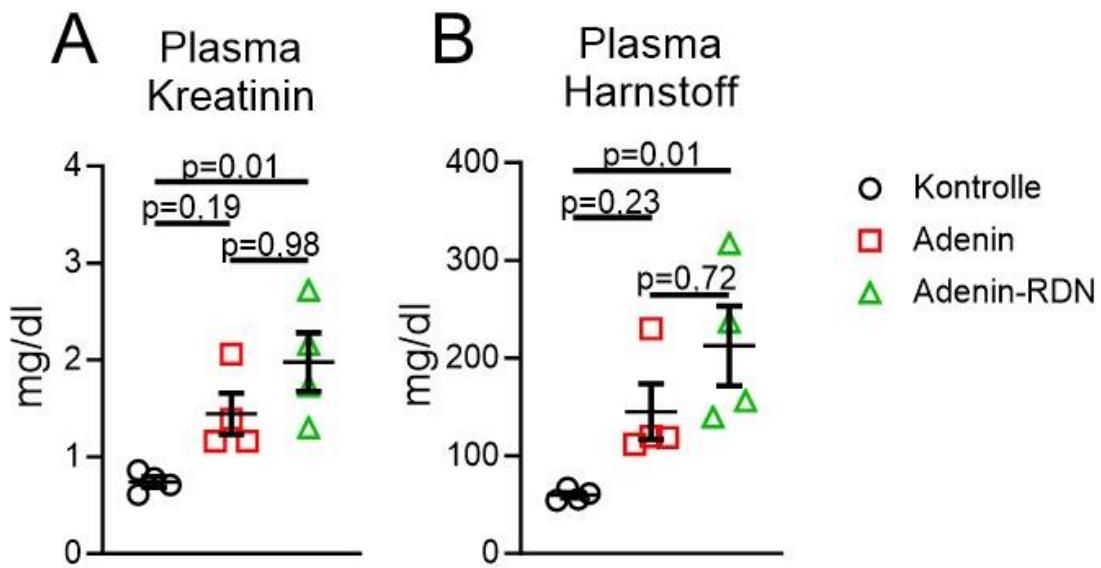


Abbildung 24: Nierenfunktionsparameter im Plasma zum Zeitpunkt des Versuchsendes

A: Plasma-Kreatininkonzentration in Milligramm pro Deziliter (mg/dl) der Kontrollgruppe (Ko, n=4), Adenin-Gruppe (Ad, n=4), und Adenin-Gruppe mit renaler Denervation (Ad+RDN, n=4)
B: Plasma-Harnstoffkonzentration in Milligramm pro Deziliter (mg/dl) der Kontrollgruppe (Ko, n=4), Adenin-Gruppe (Ad, n=4), und Adenin-Gruppe mit renaler Denervation (Ad+RDN, n=4)
Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Zur statistischen Analyse wurde die „Kruskal-Wallis“-Varianzanalyse mittels „Dunn’s multiple comparison“-Test angewandt.
(Signifikanzniveau p<0,05)

Im Gegensatz zu den erhöhten Plasma-Konzentrationen sank in den Adenin-gefütterten Ratten die Urin-Kreatininkonzentrationen im Vergleich zur Kontrolle (Ko: 43,75 \pm 1,18 mg/dl, Ad: 26,25 \pm 3,54 mg/dl, Ad vs. Ko: p=0,21) (vgl. **Abbildung 25A**). Die Modulation des renalen sympathischen Nervensystems bewirkte keinen Unterschied zwischen der Adenin- und Adenin+RDN-Gruppe (Ad+RDN vs. Ad: p=0,84). Eine Verringerung im Vergleich mit der Kontrollgruppe zeigte sich auch in den Adenin-gefütterten Ratten mit renaler Denervation (Ad-RDN: 19 \pm 1,87 mg/dl). Daraus ergibt sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Adenin+RDN-Gruppe und Kontrollgruppe mit einem p-Wert von p=0,01. Die Urin-Harnstoffkonzentration der Adenin-Gruppe zeigte sich im Vergleich mit der Kontrollgruppe stark verringert (Ko: 24319 \pm 1453 mg/dl, Ad: 14993 \pm 1974 mg/dl, Ad vs. Ko: p=0,09) (vgl. **Abbildung 25B**). Die renale Denervation erzielte keinen Unterschied zwischen der Adenin-Gruppe und der Interventionsgruppe (Ad+RDN: 12757 \pm 672 mg/dl, Ad vs. Ad+RDN: p=0,99). Einen signifikanten Unterschied präsentierte die Adenin-Gruppe mit renaler Denervation im Vergleich mit der Kontrollgruppe (Ad+RDN vs. Ko: p=0,03).

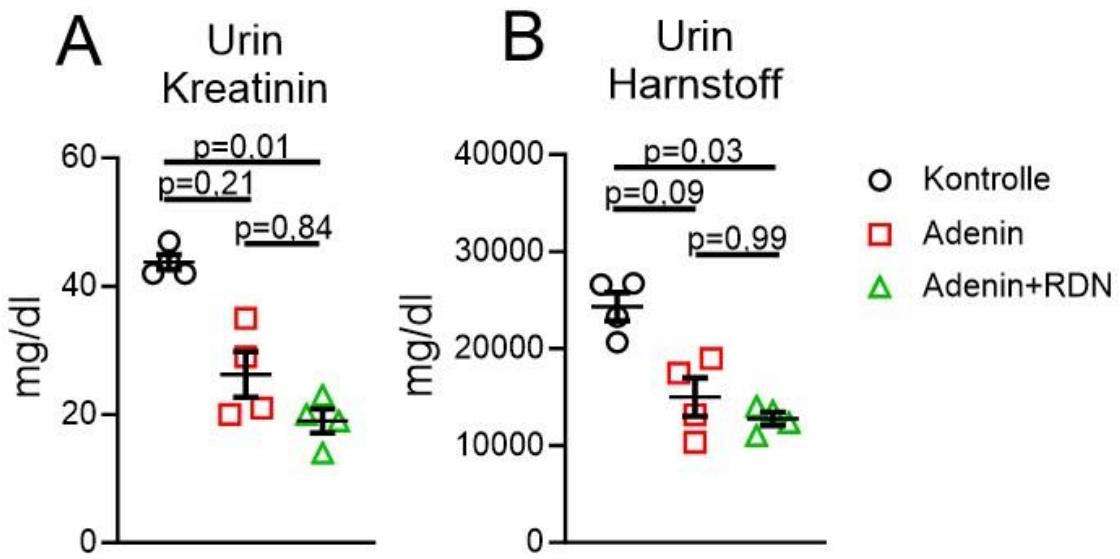


Abbildung 25: Nierenfunktionsparameter im Urin zum Zeitpunkt des Versuchsendes
A: Urin-Kreatinin-Konzentration in Milligramm pro Deziliter (mg/dl) der Kontrollgruppe (Ko, n=4), Adenin-Gruppe (Ad, n=4), und Adenin-Gruppe mit renaler Denervation (Ad+RDN, n=4)
B: Urin-Harnstoffkonzentration in Milligramm pro Deziliter (mg/dl) der Kontrollgruppe (Ko, n=4), Adenin-Gruppe (Ad, n=4), und Adenin-Gruppe mit renaler Denervation (Ad+RDN, n=4)
Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Zur statistischen Analyse wurde die „Kruskal-Wallis“-Varianzanalyse mittels „Dunn's multiple comparison“-Test angewandt.
(Signifikanzniveau p<0.05)

Die deutlich angestiegenen Nierenparameter im Plasma, sowie die verminderte Ausscheidung über den Urin sind Zeichen der fortschreitenden Adenin-induzierten Nierenschädigung der Versuchstiere im Verlauf des Experiments.

5.2 Renale Expression ROS-produzierender und anti-oxidativ wirkender Proteine

Im Rahmen einer Nierenschädigung wie der CKD kommt es zur vermehrten Bildung oxidativen Stresses. Es entsteht ein Ungleichgewicht zu Gunsten der Oxidantien mit verminderter Produktion enzymatischer Antioxidantien und erhöhter Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Durch die Oxidation verschiedener Proteine, Lipide und DNA resultiert eine zunehmende Zellschädigung. Aus diesem Grund wurde die Expression mehrerer oxidativ- und anti-oxidativ wirkender Proteine untersucht. Dafür wurde im Rattenmodell sowohl die Proteinhomogenate der linke als auch der rechten Niere mittels Western-Blots analysiert. Die Kontrollgruppe diente dabei als Vergleich zur Adenin-Gruppe mit der Fragestellung, ob unter

Induzierung einer CKD mittels Adenin-Futters vermehrt oxidativer Stress gebildet wird. Anhand der Interventionsgruppe Adenin+RDN sollte zudem beobachtet werden, ob die renale Denervation sich auf die Expression ROS-produzierender oder anti-oxidativ wirkender Proteine auswirkt.

Eine Hauptquelle für die ROS-Produktion stellt die mitochondriale Atmungskette dar zusammen mit den Enzymen NADPH-Oxidase (Nox) und Xanthin-Oxidase (XO). Der häufigste Vertreter aus der Familie der NADPH-Oxidasen ist das Enzym Nox2.¹⁷

Die renale Expression von Nox2 zeigte sich in den Adenin-gefütterten Ratten leicht erhöht im Vergleich mit der Kontrollgruppe (Ko: $1\pm0,11$ IOD/GAPDH, Ad: $1,72\pm0,52$ Integrated optical density (IOD)/GAPDH, Ad vs. Ko: $p=0,30$). Die renale Denervation als Modulation des renalen sympathischen Nervensystems bewirkte eine Tendenz zur Verringerung der Protein-Expression von Nox2 im Vergleich zu den Adenin-gefütterten Tieren (Ad+RDN: $1,16\pm0,22$ IOD/GAPDH, Ad+RDN vs. Ad: $p=0,47$) (vgl. **Abbildung 26**).

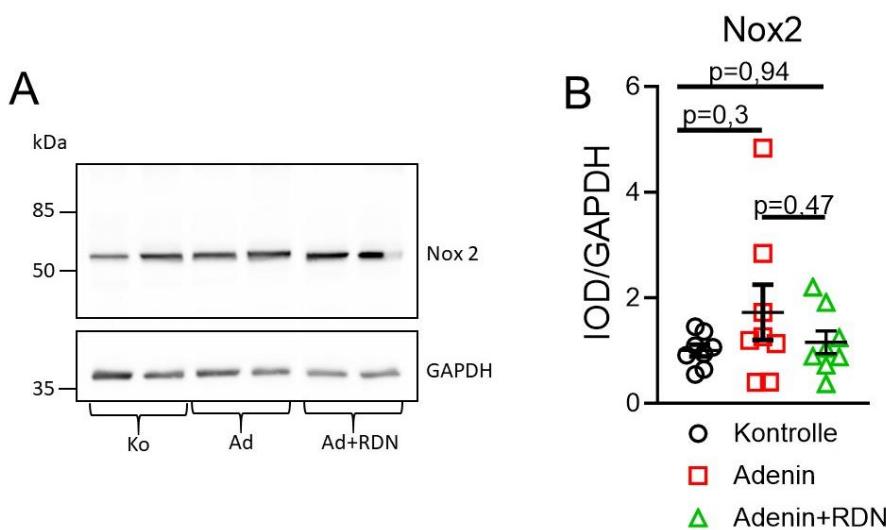


Abbildung 26: Renale Expression des ROS-produzierenden Enzyms NADPH-Oxidase 2 (Nox 2)

A: Repräsentativer Immunoblot zur renalen Expression des Enzyms Nox 2 (65kDa) in den Kontroll-Tieren (Ko), Adenin-gefütterten Ratten (Ad) und Adenin-gefütterten Ratten mit renaler Denervation (Ad+RDN). Als Ladekontrolle diente das „house-keeping Gen“ GAPDH.

B: Immunchemische Quantifizierung der Proteinexpression von Nox 2 in Homogenaten der linken und rechten Niere in Ko ($n=4$), Ad ($n=4$) und Ad+RDN ($n=4$).

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

Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Zur statistischen Analyse wurde One-way ANOVA mit „Tukey's multiple comparison“-Test angewandt. (Signifikanzniveau $p<0,05$)

Ein weiteres relevantes ROS-produzierendes Enzym ist die Xanthin-Oxidase (XO). Das Enzym nimmt eine tragende Rolle in den letzten Stoffwechselschritten des Purinabbaus ein.¹⁷

In der Analyse des Immunoblots lag der IOD-Wert der Kontrollgruppe bei $1\pm0,17$ IOD/GAPDH, der Adenin-Gruppe bei $3,42\pm0,78$ IOD/GAPDH und der Adenin-Gruppe mit renaler Denervation bei $6,26\pm1,7$ IOD/GAPDH. Somit zeigte die Adenin-Gruppe eine deutlich, wenn auch nicht signifikant gesteigerte Expression von XO im Vergleich zur Kontrollgruppe (Ad vs. Ko: $p=0,28$). Ebenso deutete die Interventionsgruppe deutlich gesteigerte XO-Konzentrationen an (Ad+RDN vs. Ad: $p=0,18$). Eine signifikant erhöhte renale XO-Expression präsentierte die Gruppe der Adenin-gefütterten Tieren mit RDN im Vergleich zur Kontrollgruppe (Ad+RDN vs. Ko: $p=0,007$) (vgl. **Abbildung 27**). Diese signifikant erhöhten XO-Werte sind vermutlich Ausdruck der durch das Adenin-Futter herbeigeführten Nephropathie, welche mit erhöhter Bildung von 2,8-Dihydroxyadenin und oxidativen Stresses einhergeht.^{24,25}

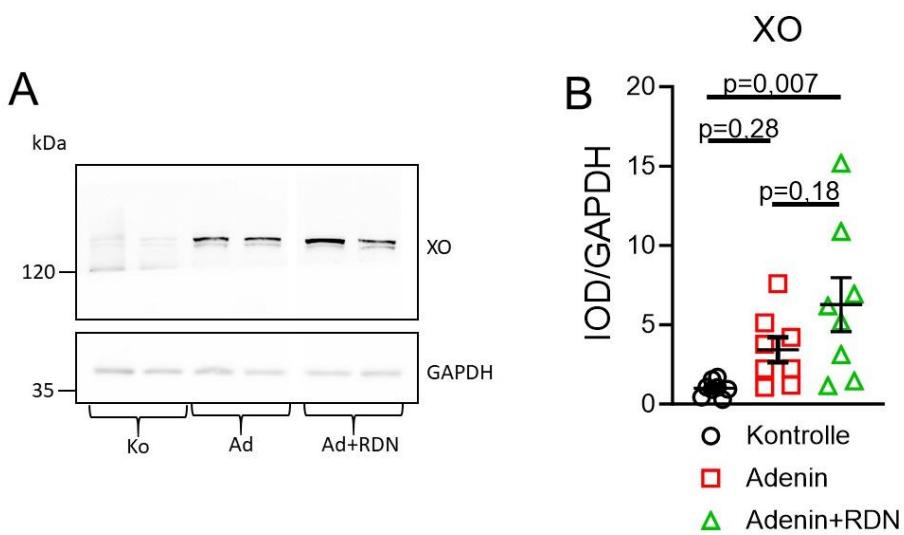


Abbildung 27: Renale Expression des ROS-produzierenden Enzyms Xanthin-Oxidase (XO)

A: Repräsentativer Immunoblot zur renalen Expression des Enzyms XO (150 kDa) in den Kontroll-Tieren (Ko), Adenin-gefütterten Ratten (Ad) und Adenin-gefütterten Ratten mit renaler Denervation (Ad+RDN). Als Ladekontrolle diente das „house-keeping Gen“ GAPDH.

B: Immunchemische Quantifizierung der Proteinexpression von XO in Homogenaten der linken und rechten Niere in Ko ($n=4$), Ad ($n=4$) und Ad+RDN ($n=4$).

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

Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Zur statistischen Analyse wurde One-way ANOVA mit „Tukey’s multiple comparison“-Test angewandt. (Signifikanzniveau $p<0,05$)

Zur Abwehr des oxidativen Stresses und der damit einhergehenden Zellschädigung verfügt der Körper über mehrere Antioxidationsmechanismen. Ein wichtiges antioxidatives Enzym ist die Superoxid-Dismutase (SOD). Durch Aufnahme eines Elektrons katalysiert sie die

Umwandlung des reaktiven O_2^- zu H_2O_2 . Im nachfolgenden Schritt kann das entstandene H_2O_2 mittels der häm-haltigen Katalase (CAT) zu H_2O und O_2 zersetzt werden. Alternativ kann H_2O_2 auch über einen zweiten Weg verwertet werden, nämlich mittels der Peroxiredoxine. Sie oxidieren H_2O_2 unter Oxidation von Glutathion zu Wasser.¹⁷

Die SOD1-Expression zeigte sich in der Adenin-Gruppe (Ad: $0,66 \pm 0,13$ IOD/GAPDH) im Vergleich zur Kontroll-Gruppe mit $1,0 \pm 0,16$ IOD/GAPDH erniedrigt (Ad vs. Ko: $p=0,33$). Die renale Denervation erbrachte keinen statistisch signifikanten Unterschied im Vergleich zur Adenin-Gruppe (Ad+RDN: $0,69 \pm 0,19$ IOD/GAPDH, Ad+RDN vs. Ad: $p=0,99$) (vgl. **Abbildung 28**).

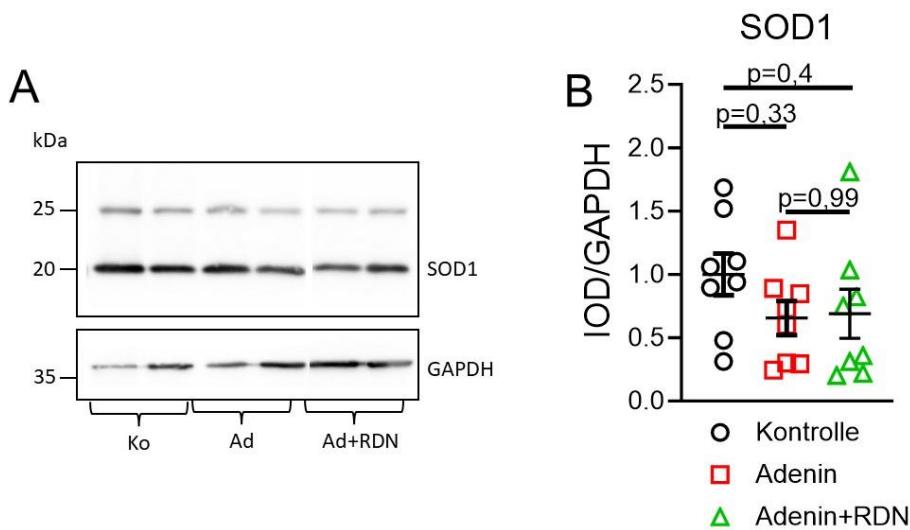


Abbildung 28: Renale Expression des antioxidativen Enzyms Superoxid-Dismutase 1 (SOD1)

A: Repräsentativer Immunoblot zur renalen Expression des Enzyms SOD1 (20kDa) in den Kontroll-Tieren (Ko), Adenin-gefütterten Ratten (Ad) und Adenin-gefütterten Ratten mit renaler Denervation (Ad+RDN). Als Ladekontrolle diente das „house-keeping Gen“ GAPDH.

B: Immunchemische Quantifizierung der Proteinexpression von SOD1 in Homogenaten der linken und rechten Niere in Ko ($n=4$), Ad ($n=4$) und Ad+RDN ($n=4$).

GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; IOD: Integrated Optical Density; SOD1: Superoxid-Dismutase 1

Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Zur statistischen Analyse wurde One-way ANOVA mit „Tukey’s multiple comparison“-Test angewandt. (Signifikanzniveau $p<0,05$)

Als weiteren Vertreter dieser Enzymfamilie wurde die renale Expression von SOD2 analysiert. Als Zeichen der Abwehr des oxidativen Stresses wiesen die Nieren der Adenin-Gruppe, im Vergleich zur Kontrollgruppe, verringerte IOD-Werte in der Immunoblot-Analyse von SOD2 auf (Ko: $1 \pm 0,18$ IOD/GAPDH, Ad: $0,6 \pm 0,13$ IOD/GAPDH, Ad vs. Ko: $p=0,34$). Die renale Denervation als Intervention konnte tendenziell eine dezente Erhöhung der Expression

bewirken, ohne statistische Signifikanz (Ad+RDN: $0,75 \pm 0,26$ IOD/GAPDH, Ad+RDN vs. Ad: $p=0,85$) (vgl. **Abbildung 29**).

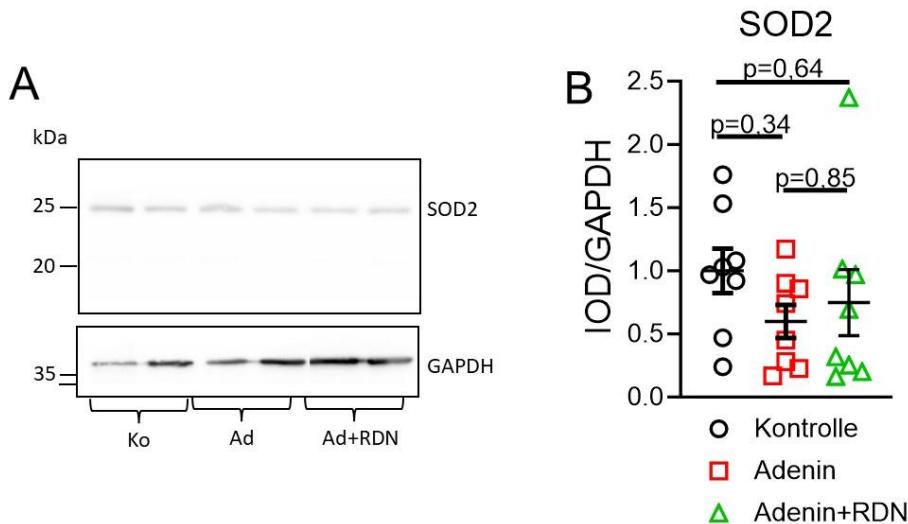


Abbildung 29: Renale Expression des antioxidativen Enzyms Superoxid-Dismutase 2 (SOD2)

A: Repräsentativer Immunoblot zur renalen Expression des Enzyms SOD2 (25 kDa) in den Kontroll-Tieren (Ko), Adenin-gefütterten Ratten (Ad) und Adenin-gefütterten Ratten mit renaler Denervation (Ad+RDN). Als Ladekontrolle diente das „house-keeping Gen“ GAPDH. **B:** Immunchemische Quantifizierung der Proteinexpression von SOD2 in Homogenaten der linken und rechten Niere in Ko ($n=4$), Ad ($n=4$) und Ad+RDN ($n=4$).

GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; IOD: Integrated Optical Density; SOD2: Superoxid-Dismutase 2

Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Zur statistischen Analyse wurde One-way ANOVA mit „Tukey's multiple comparison“-Test angewandt. (Signifikanzniveau $p<0,05$)

Die Proteinexpression des ebenfalls als Antioxidans wirkende Enzym Katalase lag in den Nierengewebeproben der Adenin-Gruppe (Ad: $0,51 \pm 0,08$ IOD/GAPDH, Ad vs. Ko: $p=0,009$) und Adenin-Gruppe mit renaler Denervation (Ad+RDN: $0,4 \pm 0,07$ IOD/GAPDH, Ad+RDN vs. Ko: $p=0,002$) im Vergleich zur Kontrolle ($1,0 \pm 0,15$ IOD/GAPDH) signifikant erniedrigt vor. Die Intervention bewirkte keinen signifikanten Unterschied (Ad+RDN vs. Ad: $p=0,75$) (vgl. **Abbildung 30**).

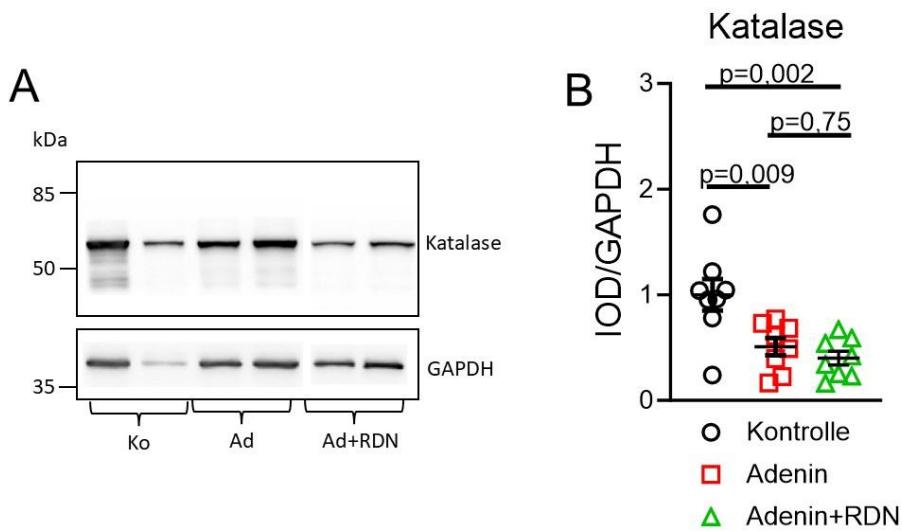


Abbildung 30: Renale Expression des antioxidativen Enzyms Katalase

A: Repräsentativer Immunoblot zur renalen Expression des Enzyms Katalase (60kDa) in den Kontroll-Tieren (Ko), Adenin-gefütterten Ratten (Ad) und Adenin-gefütterten Ratten mit renaler Denervation (Ad+RDN). Als Ladekontrolle diente das „house-keeping Gen“ GAPDH.

B: Immunchemische Quantifizierung der Proteinexpression von Katalase in Homogenaten der linken und rechten Niere in Ko (n=4), Ad (n=4) und Ad+RDN (n=4).

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

Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Zur statistischen Analyse wurde One-way ANOVA mit „Tukey’s multiple comparison“-Test angewandt. (Signifikanzniveau p<0,05)

Als zweite antioxidative Möglichkeit, H_2O_2 zu Wasser zu oxidieren, dient das Enzym Peroxiredoxin III (PrxIII). Die Quantifizierung der PrxIII Protein-Expression ergab folgende Werte. In der Kontrollgruppe $1 \pm 0,13$ IOD/GAPDH, in der Adenin-Gruppe $1,05 \pm 0,24$ IOD/GAPDH und in der renal denervierten Gruppe $0,77 \pm 0,2$ IOD/GAPDH. Daraus ergibt sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den jeweiligen Gruppen (Ad vs. Ko: p=0,98, Ad+RDN vs. Ko: p=0,69, Ad+RDN vs. Ad: p=0,58) (vgl. Abbildung 31).

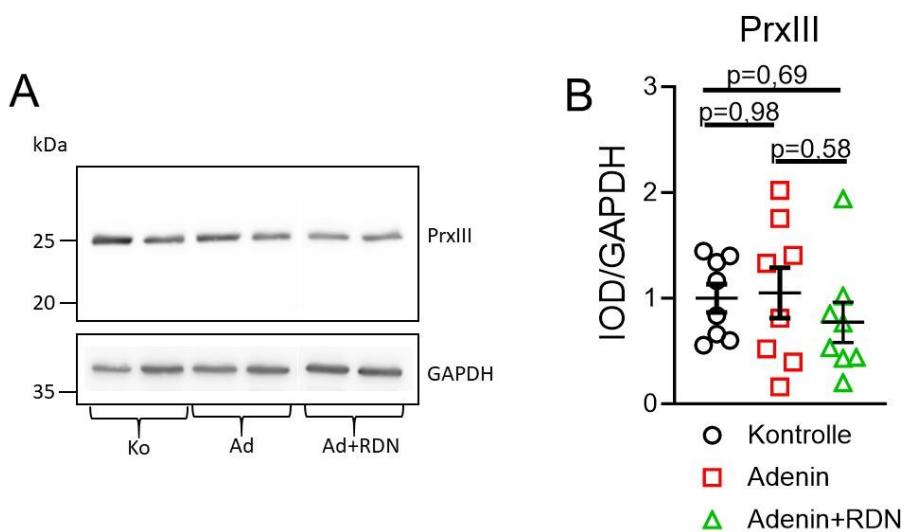


Abbildung 31: Renale Expression des antioxidativen Enzyms Peroxiredoxin 3 (PrxIII)

A: Repräsentativer Immunoblot zur renalen Expression des Enzyms PrxIII (25kDa) in den Kontroll-Tieren (Ko), Adenin-gefütterten Ratten (Ad) und Adenin-gefütterten Ratten mit renaler Denervation (Ad+RDN). Als Ladekontrolle diente das „house-keeping Gen“ GAPDH.

B: Immunchemische Quantifizierung der Proteinexpression von PrxIII in Homogenaten der linken und rechten Niere in Ko (n=4), Ad (n=4) und Ad+RDN (n=4).

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

Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Zur statistischen Analyse wurde One-way ANOVA mit „Tukey’s multiple comparison“-Test angewandt. (Signifikanzniveau p<0,05)

Die Häm-Oxygenase 1 (HO-1) ist ein bei vermehrtem zellulärem Stress induzierbares Enzym. Seine verstärkte Expression bei Inflammation ist ein weiterer Mechanismus, oxidativem Stress entgegenzuwirken.¹⁷ In der Immunoblot-Analyse zeigte sich eine signifikant höhere Expression von HO-1 in der Adenin-Gruppe mit $2,24 \pm 0,34$ IOD/GAPDH, genauso wie in der Adenin-Gruppe mit renaler Denervation mit $2,31 \pm 0,21$ IOD/GAPDH. Daraus ergab sich im Vergleich der Adenin-Gruppe mit der Kontrollgruppe ein p-Wert von p=0,005 (Ko: $1 \pm 0,14$ IOD/GAPDH). Der Unterschied der Adenin-Gruppe zur Adenin-Gruppe mit renaler Denervation war hingegen nicht signifikant (Ad+RDN vs. Ad: p=0,98). Im Vergleich der Adenin+RDN-Gruppe mit der Kontrollgruppe zeigte sich ebenfalls eine signifikante Erhöhung der HO-1-Expression mit einem p-Wert von p=0,003 (vgl. Abbildung 32).

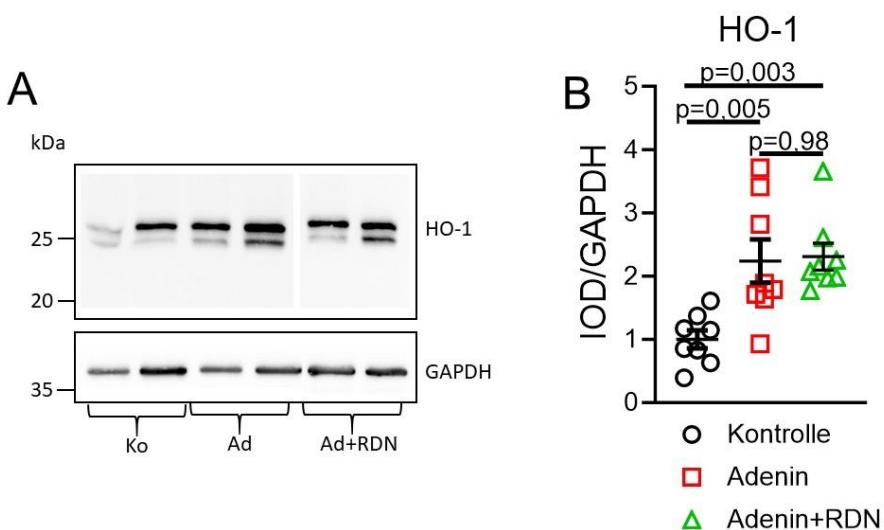


Abbildung 32: Renale Expression des antioxidativen Enzyms Häm-Oxygenase 1 (HO-1)

A: Repräsentativer Immunoblot zur renalen Expression des Enzyms HO-1 (28kDa) in den Kontroll-Tieren (Ko), Adenin-gefütterten Ratten (Ad) und Adenin-gefütterten Ratten mit renaler Denervation (Ad+RDN). Als Ladekontrolle diente das „house-keeping Gen“ GAPDH.

B: Immunchemische Quantifizierung der Proteinexpression von HO-1 in Homogenaten der linken und rechten Niere in Ko (n=4), Ad (n=4) und Ad+RDN (n=4).

GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; IOD: Integrated Optical Density; HO-1: Häm-Oxygenase 1

Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Zur statistischen Analyse wurde One-way ANOVA mit „Tukey’s multiple comparison“-Test angewandt. (Signifikanzniveau p<0.05)

Zusammenfassend lassen die Western Blot-Analysen vermuten, dass die entstandene Adenin-induzierte chronische Nierenerkrankung erhöhte Level an oxidativem Stress entstehen lässt.

5.3 Renale Expression Katecholamin-produzierender Proteine

Ein weiterer Mechanismus der vermutlich an der Entstehung der chronischen Nierenerkrankung im kardiovaskulären Komorbiditätenmodell beteiligt ist, ist die gesteigerte neurohumorale Aktivierung. Diese geht mit einer erhöhten Aktivität des sympathischen Nervensystems einher. Zur Quantifizierung des Ausmaßes der sympathischen Aktivierung eignet sich das Enzym Tyrosin-Hydroxylase (TH). Es katalysiert als Schlüsselenzym der Katecholaminsynthese die Hydroxylierung von Tyrosin zu L-DOPA.⁴⁷

Zur Untersuchung der Regulation der sympathischen Neurotransmitter als Zeichen der gesteigerten sympathischen Aktivität wurde mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high pressure liquid chromatography, HPLC) der Norepinephringehalt der jeweiligen

Rattennieren bestimmt. Diese Quantifizierung wurde freundlicherweise durch das Laborteam rund um Herrn Hübner im Zentrallabor des Universitätsklinikum des Saarlandes (Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin/Zentrallabor, D-66421 Homburg/Saar) durchgeführt.

Der Norepinephrin-Gehalt betrug in den Nieren der Kontroll-Gruppe $79,3 \pm 6,4$ ng/mg, in der Versuchstiergruppe mit Adenin-Diät $89,47 \pm 16,06$ ng/mg und in der Interventionsgruppe Adenin+RDN $29,08 \pm 13,31$ ng/mg. Der Gehalt an renalen sympathischen Neurotransmittern unterschied sich im Vergleich zwischen der Adenin-Gruppe und Kontrollgruppe nicht ($p=0,84$), wenn auch tendenziell eine Erhöhung in der Adenin-Gruppe zu erkennen war. Die Adenin+RDN-Gruppe hatte sowohl im statistischen Vergleich mit der Adenin-Gruppe als auch mit der Kontrollgruppe einen signifikant niedrigeren Norepinephrin-Gehalt (Ad+RDN vs. Ad: $p=0,007$, Ad+RDN vs. Ko: $p=0,03$) (vgl. **Abbildung 33 A**).

Mit Hilfe der Immunoblot-Analyse wurde die renale Expression der TH bestimmt. Dieses Enzym diente dabei als direktes Korrelat des sympathischen Nervensystems bzw. dessen Neurotransmitter, der Katecholamine. Im Vergleich zur Kontrollgruppe (Ko: $1,0 \pm 0,14$ IOD/GAPDH) war die renale Expression der TH in der Adenin-Gruppe leicht erhöht (Ad: $1,53 \pm 0,26$ IOD/GAPDH, Ad vs. Ko: $p=0,25$). Im Gegensatz dazu lag die TH-Proteinexpression in der Adenin-Gruppe mit renaler Denervation stark reduziert vor (Ad+RDN: $0,73 \pm 0,26$ IOD/GAPDH, Ad+RDN vs. Ad: $p=0,05$) (vgl. **Abbildung 33 B und C**).

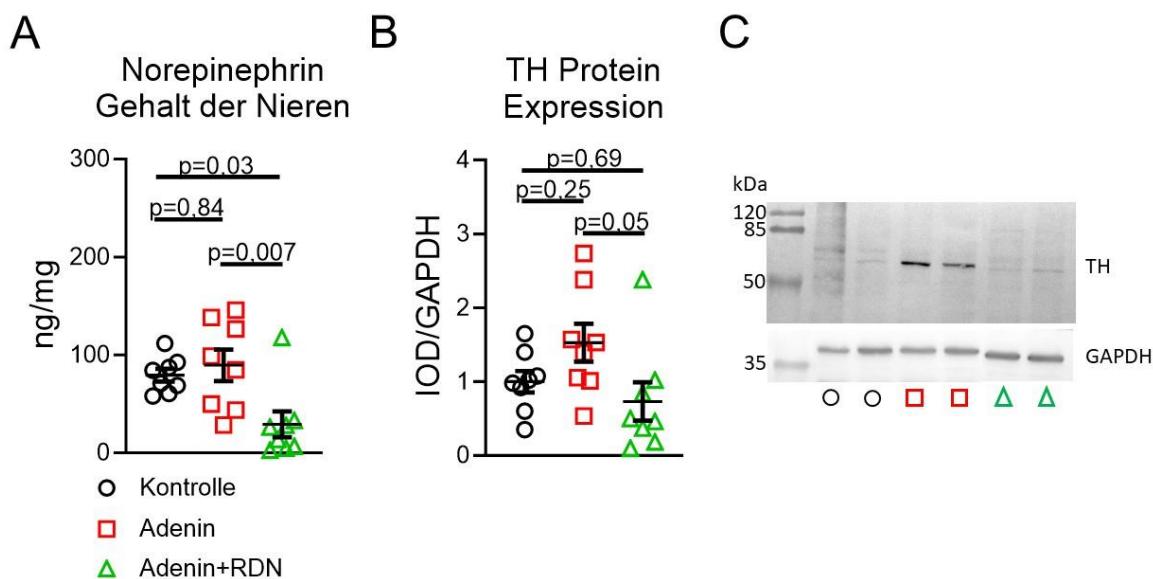


Abbildung 33: Renale Expression Katecholamin-produzierender Enzyme

A: Quantifizierung des renalen Norepinephrin-Gehalts mittels HPLC in mg/ng in Ko (n=4), Ad (n=4) und Ad+RDN (n=4)

B: Immunchemische Quantifizierung der Proteinexpression von TH in Homogenaten der linken und rechten Niere in Ko (n=4), Ad (n=4) und Ad+RDN (n=4)

C: Repräsentativer Immunoblot zur renalen Expression des Enzyms TH (60kDa) in den Kontroll-Tieren (Ko), Adenin-gefütterten Ratten (Ad) und Adenin-gefütterten Ratten mit renaler Denervation (Ad+RDN). Als Ladekontrolle diente das „house-keeping Gen“ GAPDH. GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; IOD: Integrated Optical Density; TH: Tyrosinhydroxylase

Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Zur statistischen Analyse wurde One-way ANOVA mit „Tukey’s multiple comparison“-Test angewandt. (Signifikanzniveau p<0,05)

5.4 Renales Remodeling

Wie bereits unter 4.2.1.1 Spontan hypertensive Ratten (SHR) beschrieben, wurden zur Induktion der CKD die SHR mit 0,25 % Adenin-versetztem Spezialfutter gefüttert. Durch das daraus resultierende Überangebot an Adenin kommt es zu einer Produkthemmung des Enzyms Adenin-Phosphoribosyltransferase und es wird vermehrt 2,8-Dihydroxyadenin (DHA) durch die Xanthinoxidase gebildet. Das vermehrt entstandene DHA bildet im Tubulussystem und Parenchym der Nieren Kristalle aus, da es im pH-Bereich des Urins nur schwer löslich ist. Folglich kann über die Messung der ausgefällten DHA-Kristalle Rückschluss auf die Schwere der Adenin-induzierten CKD gezogen werden.

Um die Anzahl der Kristall in den Nieren der Versuchstiere bestimmen zu können, wurden die Kristalle in repräsentativen histologischen HE-gefärbten Schnitten der Nieren gezählt. Dabei konnten keinerlei Kristalle in den Nieren der Kontrolltiere gefunden werden. Die Anzahl der DHA-Kristalle in der Adenin-Gruppe betrug $542,0 \pm 129,5$ und in der renal denervierten Interventionsgruppe $421,4 \pm 80,03$. Daraus ergibt sich ein jeweils signifikanter Unterschied beider Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Ad vs. Ko: p=0,001, Ad+RDN vs. Ko: p=0,004), jedoch nicht zwischen den beiden Adenin-gefütterten Gruppen (Ad+RDN vs. Ad: p=0,99) (vgl. **Abbildung 34**). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Adenin-haltige Diät durch die vermehrte Bildung von DHA zur Ausfällung von DHA-Kristallen in der Niere führt. Im Gegensatz dazu wurde durch die Fütterung der SHR mit normalem Trockenfutter keine DHA-Kristalle gebildet und somit konnten keine pathologischen Reaktionen zu einer Adenin-Nephropathie führen.

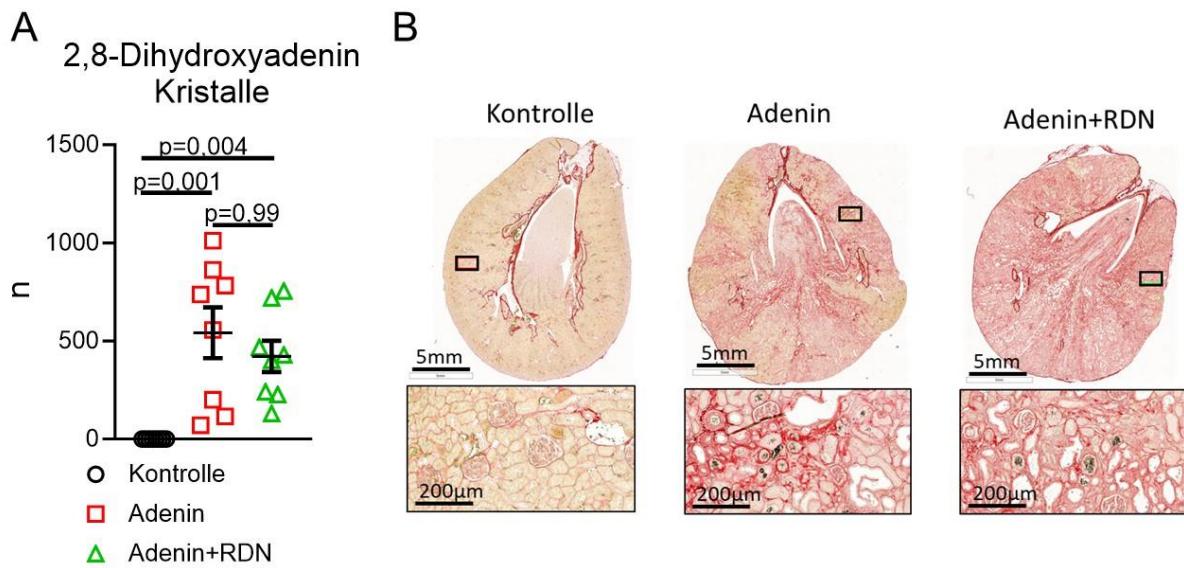


Abbildung 34: Anzahl der renalen 2,8-Dihydroxyadenin Kristalle

A: Quantitative Auszählung der renalen 2,8-Dihydroxyadenin Kristalle

B: Repräsentative histologische Querschnitte der Kristall-durchsetzten Nieren mit vergrößerten Gewebeausschnitten

Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Zur statistischen Analyse wurde One-way ANOVA mit „Tukey's multiple comparison“-Test angewandt. (Signifikanzniveau $p<0.05$)

Zur Beurteilung des Nierengewichts unabhängig von der Körpergröße des jeweiligen Versuchstiers wurde die Ratio zwischen Nierengewicht und Tibialänge ermittelt. Im Rahmen der finalen Versuche wurden hierfür die Länge der Tibia in cm und das Nierengewicht in mg gemessen. Der mittlere Wert der Kontrollgruppe betrug $296,3 \pm 10,2$ mg/cm, der Adenin-Gruppe $313,5 \pm 21,1$ mg/cm und der Adenin+RDN-Gruppe $238,2 \pm 24,01$ mg/cm. Kein statistisch signifikanter Unterschied ergab sich somit zwischen der Adenin-Gruppe im Vergleich mit der Kontrollgruppe (Ad vs. Ko: $p=0,81$). Jedoch konnte ein statistisch signifikanter Größenunterschied zwischen der Interventionsgruppe und der Gruppe der Adenin-gefütterten Ratten festgestellt werden, wobei die Adenin-Gruppe ein größeres Nierengewicht bezogen auf die Körpergröße erreichte (Ad+RDN vs. Ad: $p=0,03$) (vgl. Abbildung 35).

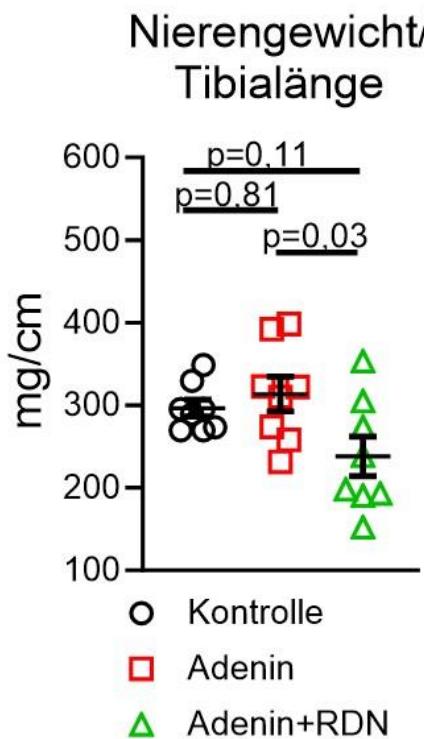


Abbildung 35: Größenbezogene Nierengewichte

Quotient aus Gewicht der Nieren durch Tibialänge in mg/cm

Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Zur statistischen Analyse wurde One-way ANOVA mit „Tukey's multiple comparison“-Test angewandt. (Signifikanzniveau $p<0.05$)

5.5 Strukturelles Remodeling des linken Vorhofs

5.5.1 Hypertrophie der Vorhofmyozyten

Die strukturellen Remodelingprozesse des linken Vorhofs resultieren in einer heterogenen Erregungsausbreitung und führen folglich zur Aufrechterhaltung eines pathologischen Rhythmus wie Vorhofflimmern. Zu ihnen zählen unter anderem die Hypertrophie der Kardiomyozyten im Atrium, die Dilatation des Vorhofs, die gesteigerte interstitielle Fibrose und erhöhte sympathische Aktivierung.⁴⁰

Im Rahmen der finalen Versuche wurde für jedes Versuchstier der Quotient aus dem Gewicht des linken Atriums (LA) zu Tibialänge berechnet. Diese Ratio wurde zur Beurteilung herangezogen, um eine Aussage über das relative LA-Gewicht unabhängig der unterschiedlichen Größe der Tiere treffen zu können. Der mittlere Wert der Kontrollgruppe betrug $9,06\pm1,7$ mg/cm, der Adenin-Gruppe $11,71\pm2,3$ mg/cm und der Adenin+RDN-Gruppe $7,44\pm0,8$ mg/cm. Die Adenin-Gruppe zeigte ein erhöhtes LA-Gewicht in Bezug auf die

Tibialänge, wenn auch ohne signifikanten Unterschied (Ad vs. Ko: $p=0,99$). Die Gruppe der renal denervierten Ratten wies ein tendenziell verringertes LA-Gewicht im Vergleich zur Adenin-Gruppe auf (Ad+RDN vs. Ad: $p=0,19$) (vgl. **Abbildung 36 A**).

Um die Hypertrophie der Kardiomyozyten im LA beurteilen zu können, wurden HE-gefärbte Gewebeschnitte mikroskopisch auf repräsentative, möglichst rund angeschnittene Myozyten mit zentral gelegenem Nukleus untersucht (vgl. **Abbildung 36 B**). Diese konnten softwaregestützt mittels digitalen Lineals in ihrem Durchmesser vermessen werden.

Abbildung 36 C ist zu entnehmen, dass sich keine statistisch relevanten Unterschiede in der Größe der Vorhofmyozyten ergaben. Der mittlere gemessene Wert der Kontrollgruppe umfasste $15,15 \pm 0,5 \mu\text{m}$, der Adenin-Gruppe $14,00 \pm 0,93 \mu\text{m}$ und der Adenin-gefütterten Tiere mit renaler Denervation $14,07 \pm 1,06 \mu\text{m}$ (Ad vs. Ko: $p=0,99$, Ad+RDN vs. Ad: $p=0,99$, Ad+RDN vs. Ko: $p=0,99$). Somit konnte nicht auf eine linksatriale Myozyten-Hypertrophie der Adenin-gefütterten Tiere geschlossen werden, ebenso wenig konnte die renale Denervation als Intervention eine Veränderung im Bezug auf die Kardiomyzytengröße erzielen.

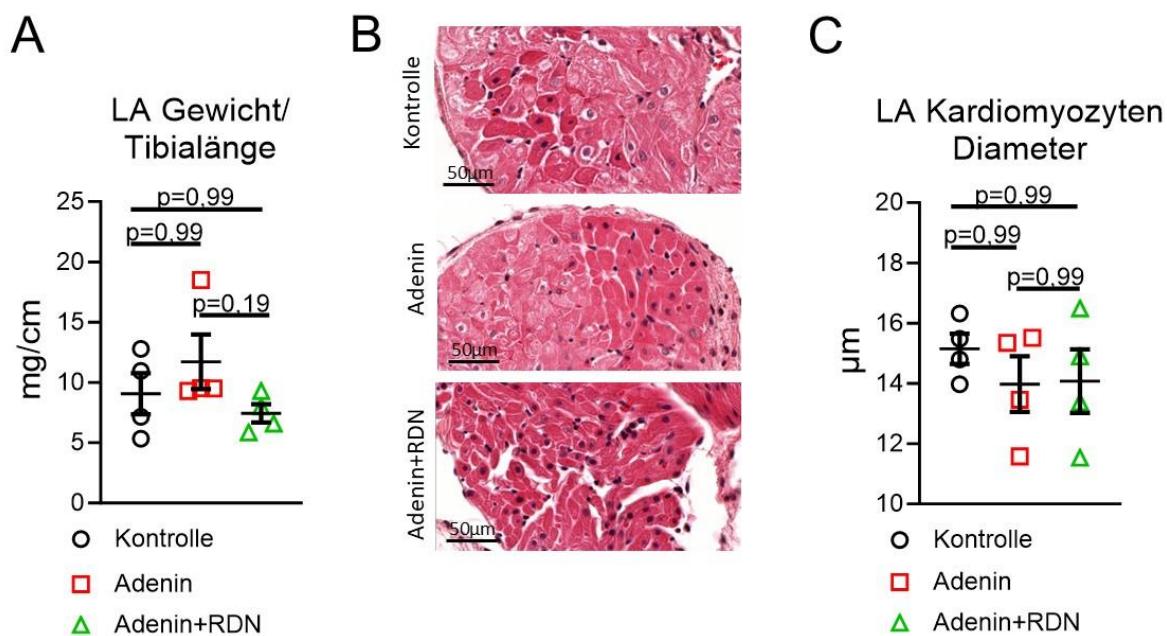


Abbildung 36: Kardiomyozytenhypertrophie im linken Vorhof (LA)

A: Quotient aus Gewicht des linken Atriums durch Tibialänge in mg/cm

B: Repräsentative Ausschnitte der HE-gefärbten linken Vorhöfe

C: Ausgemessene Kardiomyzytendiameter idealisiert angeschnittener Zellen des linken Vorhofs in µm

Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Zur statistischen Analyse wurde die „Kruskal-Wallis“-Varianzanalyse mittels „Dunn's multiple comparison“-Test angewandt. (Signifikanzniveau $p<0,05$)

5.5.2 Atriale interstitielle Fibrose

Eine weitere Folge des strukturellen Remodelings stellt die interstitielle Fibrose dar. Zur Beurteilung dieser pathologischen überschließenden Bindegewebsvermehrung wurde die histologische Färbemethode Pikro-Siriusrot verwendet. Diese lässt Kollagenfasern rötlich erscheinen und ermöglicht so einen quantitativen Nachweis der Fibrose.

Der prozentuale Anteil der linksatrialen interstitiellen Fibrose zeigte sich in der Adenin-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich erhöht (Ko: $6,1 \pm 0,75\%$, Ad: $12,82 \pm 2,87\%$, Ad vs. Ko: $p=0,06$). Des Weiteren präsentierte die Adenin+RDN-Gruppe leicht niedrigere Prozentwerte des atrialen Fibrosegehalts, jedoch ohne Signifikanz (Ad+RDN: $8,8 \pm 1,29\%$, Ad+RDN vs. Ad: $p=0,99$) (vgl. Abbildung 37).

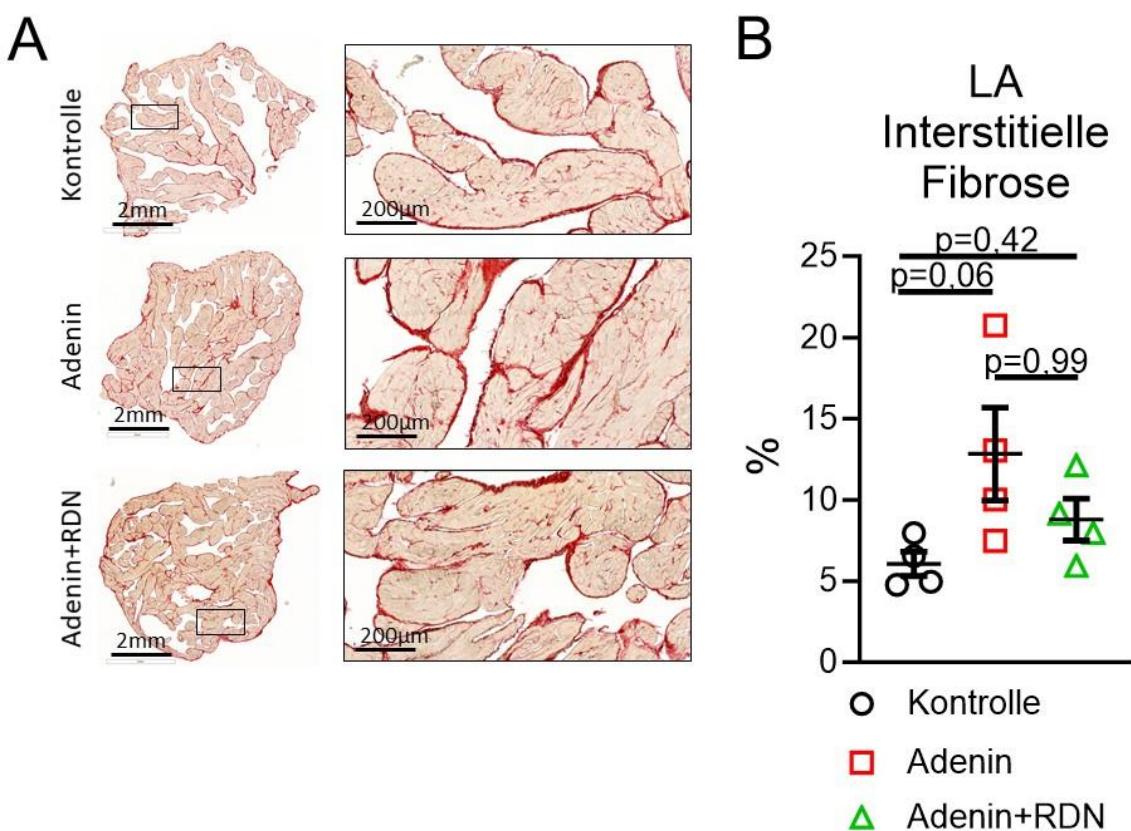


Abbildung 37: Interstitielle Fibrose im linken Vorhof (LA)

A: Repräsentative Gewebsschnitte des linken Atriums, Pikro-Siriusrot-gefärbt

B: Prozentualer Anteil der interstitiellen Fibrose an der Gesamtoberfläche des Vorhofs
Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Zur statistischen Analyse wurde die „Kruskal-Wallis“-Varianzanalyse mittels „Dunn`s multiple comparison“-Test angewandt.
(Signifikanzniveau $p<0,05$)

5.5.3 Linksatriale sympathische Aktivierung

Um das Ausmaß der sympathischen Aktivierung zu veranschaulichen, wurden die Gewebedünnsschnitte des linken Atriums einer immunhistologischen Färbemethode mit

Nachweis des Markerenzyms Tyrosinhydroxylase (TH) unterzogen. Dies ermöglichte die nachfolgende quantitative Auswertung mittels des Computerprogramms NIS elements (Nikon).

Die Kontrollgruppe zählte einen mittleren Wert TH-positiver Zellkerne pro $200\mu\text{m}^2$ von $4,69 \pm 0,23$, Gruppe der Adenin-gefütterten Ratten $10,19 \pm 1,18$ und die Adenin-gefütterten Versuchstiere mit renaler Denervation $6,87 \pm 0,89$. Daraus ergab sich ein signifikant höheres Vorliegen des Syntheseenzyms der sympathischen Neurotransmitters als Korrelat zur sympathischen Innervation des linken Vorhofs bei der Adenin-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe mit einem p-Wert von 0,01. Der statistische Vergleich der Adenin+RDN-Gruppe vs. Adenin-Gruppe zeigte tendenziell erniedrigte Werte TH-positiver Kerne im Atrium (Ad+RDN vs. Ad: $p=0,42$) (vgl. **Abbildung 38**).

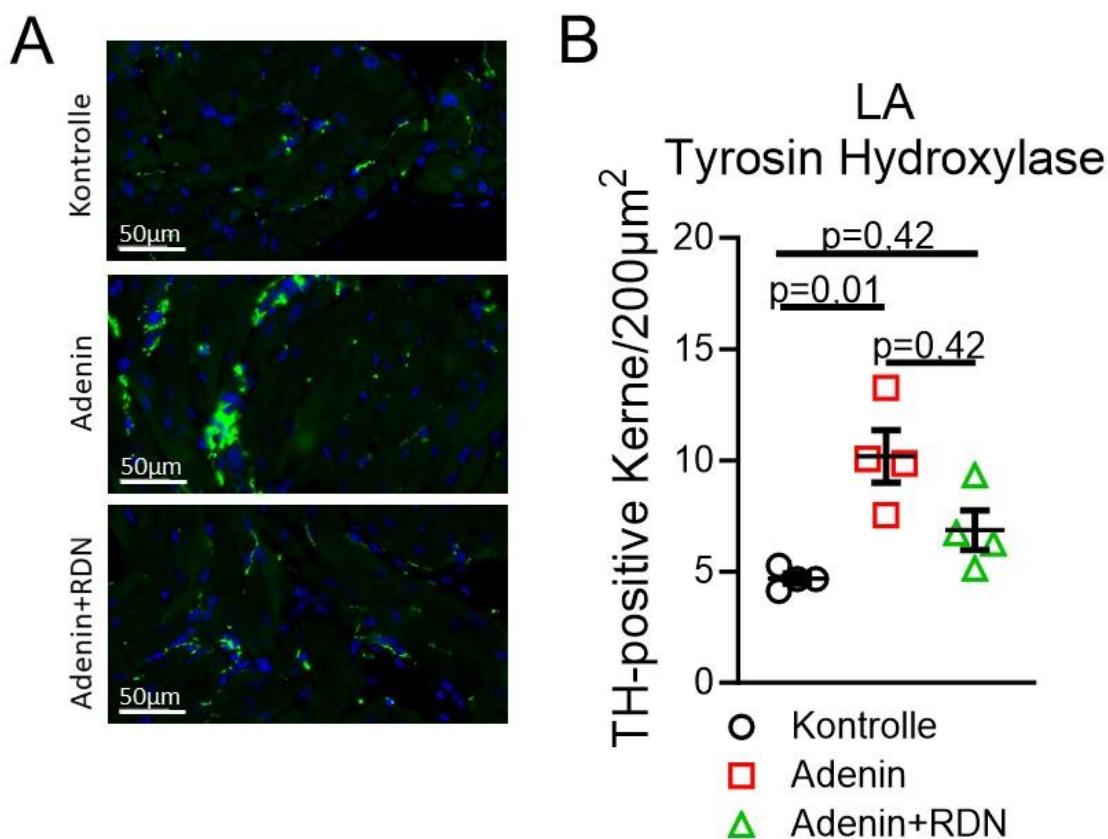


Abbildung 38: Tyrosinhydroxylase-Gehalt im linken Vorhof (LA)

A: Repräsentative Ausschnitte immunhistologisch gefärbter Gewebeschnitte des linken Vorhofs, grün: Tyrosinhydroxylase

B: Anteil der TH-positiven Kerne pro $200\mu\text{m}^2$ im linken Vorhof

Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Zur statistischen Analyse wurde die „Kruskal-Wallis“-Varianzanalyse mittels „Dunn's multiple comparison“-Test angewandt. (Signifikanzniveau $p<0.05$)

5.6 Elektrophysiologisches Remodeling des linken Vorhofs

Veränderungen der Refraktärzeit und des zugrundeliegenden elektrophysiologischen Substrats können in atrialen Arrhythmien resultieren. Um diesen Prozess des elektrophysiologen atrialen Remodelings zu untersuchen, wurden den Versuchstieren im Rahmen der finalen Versuche ein Zwei-Kanal-EKG abgeleitet, der humanen zweiten Ableitung nach Einthoven entsprechend (vgl. **Abbildung 39**). Diese sollten dazu dienen, die P-Welle, das PQ-Intervall und die frequenzkorrigierte QT-Zeit (QTc) als Ausdruck der Erregungsausbreitung im Vorhof genauer messen zu können.

Die P-Wellen-Dauer der Kontrolltieren lag bei $25,7 \pm 0,7$ Millisekunden (ms), die der Adenin-Gruppe wurde im Mittel mit $29,6 \pm 1,9$ ms bemessen. Somit hatten die P-Wellen der Adenin-gefütterten Tiere eine tendenziell verlängerte Dauer im Vergleich zu den gesunden Kontrollen. Auch im Vergleich mit den Adenin-gefütterten SHR mit renaler Denervation (Ad+RDN: $27,0 \pm 0,4$ ms) zeigte sich die P-Wellen-Dauer der Adenin-Gruppe verlängert. Eine statistische Signifikanz erreichten die Werte jedoch nicht (Ad vs. Ko: $p=0,13$, Ad+RDN vs. Ad: $p=0,99$) (vgl. **Abbildung 40**).

Ebenso lag das PQ-Intervall in der Adenin-Gruppe mit $54,4 \pm 2,3$ ms leicht verlängert vor im Vergleich zur Kontrollgruppe mit $48,8 \pm 1,4$ ms (Ad vs. Ko: $p=0,26$). Zwischen den Zeiten des PQ-Intervalls der Adenin-Gruppe und Adenin+RDN-Gruppe konnte kein Unterschied festgestellt werden (Ad+RDN: $55,9 \pm 2,08$, Ad+RDN vs. Ad: $p=0,99$). Die QTc dauerte im Mittel $220,2 \pm 5,4$ ms in der Gruppe der Kontrolltiere, $224,7 \pm 6,1$ ms in der Gruppe der Adenin-gefütterten Versuchstiere und $247,4 \pm 14,1$ ms in der Gruppe der renal denervierten Ratten. Auch hier konnte keine signifikante Verlängerung im Vergleich der Versuchsgruppen untereinander ermittelt werden (Ad vs. Ko: $p=0,88$; Ad+RDN vs. Ko: $p=0,08$; Ad+RDN vs. Ad: $p=0,84$).

In Zusammenschau der gemessenen EKG-Zeiten konnte keine signifikante Verlängerung der Erregungsbildung und Erregungsweiterleitung der Adenin-gefütterten SHR festgestellt werden, welche als Hinweis auf eine erhöhte Anfälligkeit für pathologische atriale Arrhythmien gedeutet hätten werden können. Die renale Denervation konnte ebenfalls keine messbaren Veränderungen in der Erregungsleitung des Vorhofs bewirken.

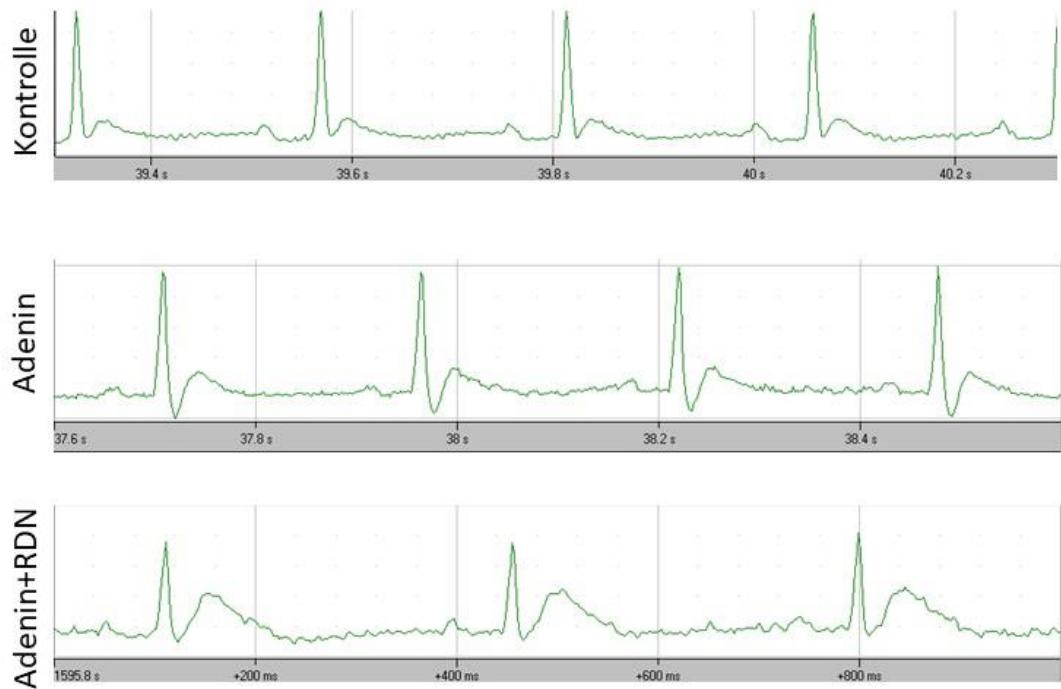


Abbildung 39: EKG-Ausschnitte zur Auswertung im Hinblick auf das elektrophysiologische Remodeling

Repräsentative EKG-Ausschnitte jeweils eines Versuchstieres der Kontrollgruppe, der Adenin-Gruppe und der Adenin+RDN-Gruppe. Im unteren EKG-Bildausschnitt ist die Zeitachse zu sehen.

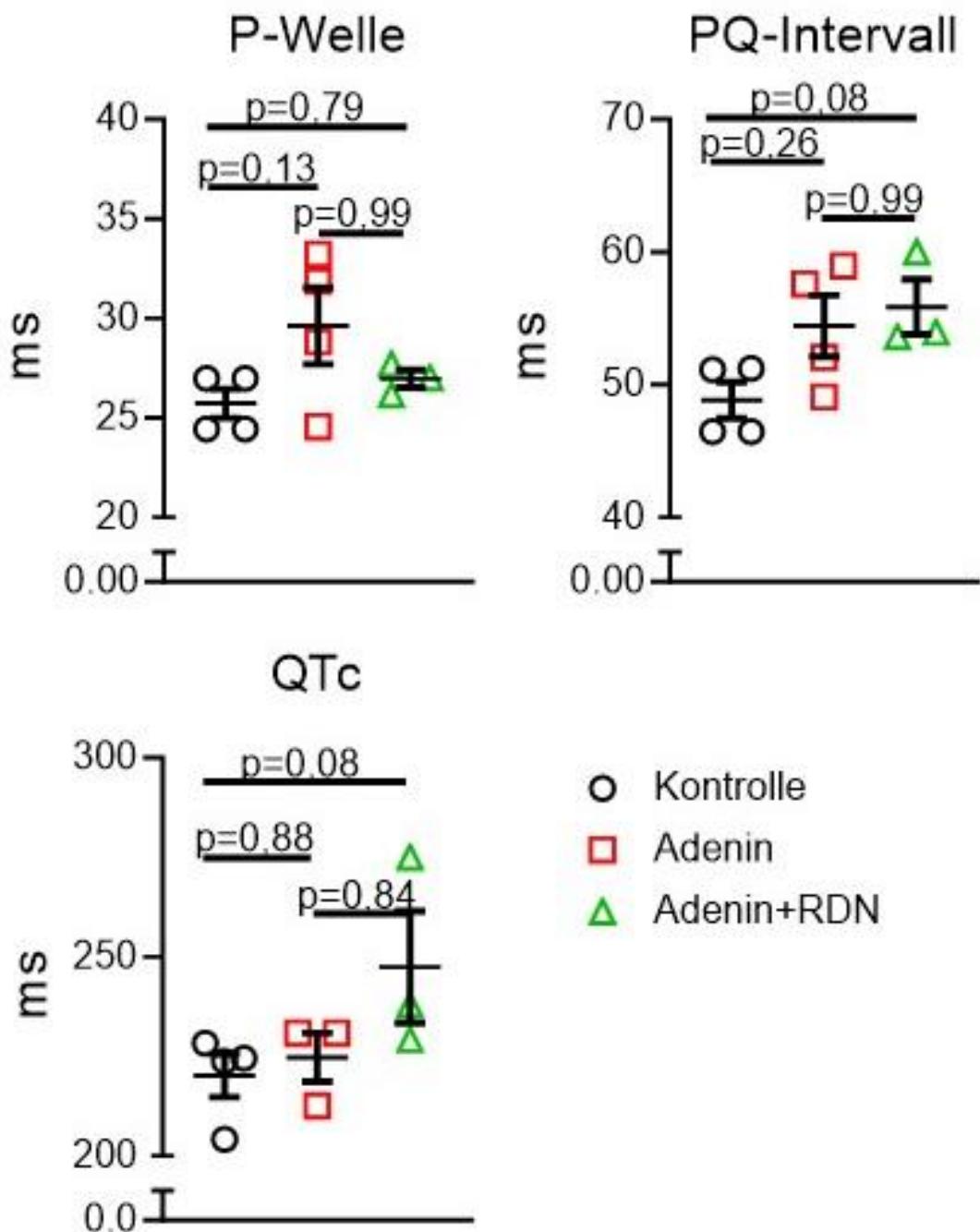


Abbildung 40: Auswertung der EKGs im Hinblick auf das elektrophysiologische Remodeling

Auswertung der EKG-Zeiten P-Welle, PQ-Intervall und QTc

Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Zur statistischen Analyse wurde die „Kruskal-Wallis“-Varianzanalyse mittels „Dunn's multiple comparison“-Test angewandt. (Signifikanzniveau $p<0.05$)

5.7 Strukturelles Remodeling im linken Ventrikel

Analog den Fragestellungen bezüglich des strukturellen Remodelings im linken Atrium, sollte auch die möglichen pathologischen Veränderungen im linken Ventrikel näher beleuchtet werden. Um eine Aussage über das Ausmaß der Remodeling-Vorgänge im linken Ventrikel wie beispielsweise der gesteigerten Expression interstitieller Fibrose treffen zu können, wurden histologische Gewebedünnschnitte angefertigt und je nach zu untersuchendem Merkmal unterschiedlich angefärbt.

Zur Bemessung des großenunabhängigen Herzgewichts wurde der Quotient aus Herzgewicht zu Tibialänge bestimmt. Dabei lagen die Mittelwerte der Herzgewichte der drei Versuchsgruppen in annähernd gleichen Bereichen (Ko: $312,5 \pm 37,4$ mg/cm, Ad: $312,7 \pm 14$ mg/cm, Ad+RDN: $317,1 \pm 3,57$ mg/cm). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Tiergruppen festgestellt werden (Ad vs. Ko: $p=0,99$; Ad+RDN vs. Ko: $p=0,84$; Ad+RDN vs. Ad: $p=0,99$) (vgl. **Abbildung 41 A**).

Die Beurteilung der Kardiomyozytendiameter im linken Ventrikel wurde anhand HE-gefärbter histologischer Schnitte durchgeführt und der Myozytendiameter ausgemessen. Hierbei konnte kein signifikanter Unterschied aufgezeigt werden (Ad vs. Ko: $p=0,99$; Ad+RDN vs. Ko: $p=0,99$; Ad+RDN vs. Ad: $p=0,99$). Die mittleren Durchmesser betrugen in der Kontrollgruppe $25,36 \pm 0,19$ µm, in der Adenin-Gruppe $25,36 \pm 1,03$ µm und in der Adenin-Gruppe mit renaler Denervation $25,71 \pm 0,81$ µm (vgl. **Abbildung 41 B und C**).

Um zu untersuchen, ob mögliche CKD-medierte Remodelingprozesse im linken Ventrikel zu Belastungen des LV-Myokards führten, wurde die Expression des B-natriuretisches Peptids (BNP), einer der wichtigsten Marker der Herzinsuffizienz, mittels PCR bestimmt. Wie in **Abbildung 41 D** dargestellt, konnte keine erhöhte BNP-mRNA-Expression bei Adenin gefütterten SHR im Vergleich zu der Kontrollgruppe festgestellt werden, lediglich eine leichte Verminderung der Konzentration im LV der Ad+RDN-Ratten im Vergleich zur Adenin-Gruppe (Ko: $1,22 \pm 0,42$ Relative Genexpression/GAPDH, Ad: $1,65 \pm 0,41$ Relative Genexpression/GAPDH, Ad+RDN: $0,89 \pm 0,23$ Relative Genexpression/GAPDH; Ad vs. Ko: $p=0,98$, Ad+RDN vs. Ko: $p=0,99$, Ad+RDN vs. Ad: $p=0,51$).

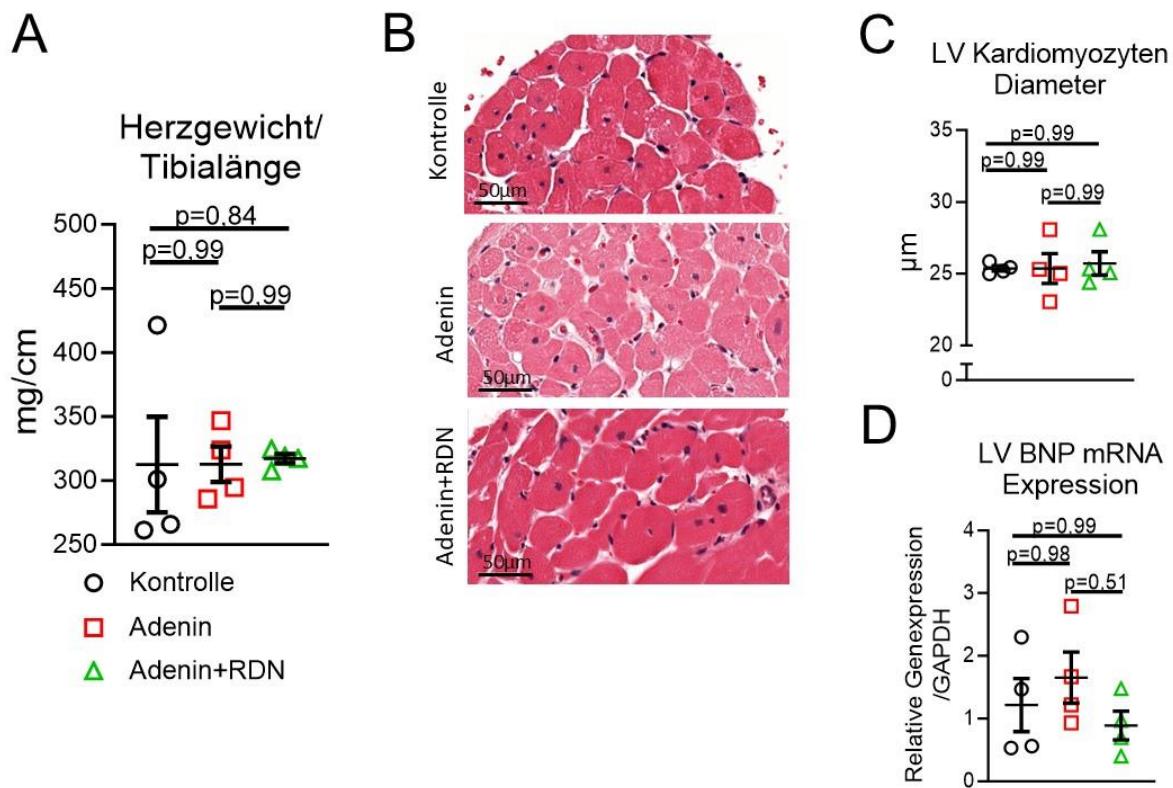


Abbildung 41 Kardiomyozytenhypertrophie im linken Ventrikel (LV)

A: Quotient aus Gewicht des Herzens durch Tibialänge in mg/cm

B: Repräsentative Ausschnitte der HE-gefärbten linken Ventrikel

C: Ausgemessene Kardiomyozytendiameter idealisiert angeschnittener Zellen des linken Ventrikels in µm

D: Expression der BNP-mRNA im linken Ventrikel, ermittelt durch PCR

Als Ladekontrolle diente das „house-keeping Gen“ GAPDH

GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, PCR: Polymerase-Kettenreaktion

Die Ergebnisse sind als Mittelwert±SEM dargestellt. Zur statistischen Analyse wurde die „Kruskal-Wallis“-Varianzanalyse mittels „Dunn's multiple comparison“-Test angewandt.

(Signifikanzniveau p<0.05)

Auch die Auswertung der interstitiellen Fibrose, welche erneut mittels Pikrosirusrot-Färbung durchgeführt wurde, konnte keinen statistischen Unterschied belegen. Der mittlere prozentuale Anteil interstitieller Fibrose im linken Ventrikel ergab $3,16 \pm 0,18\%$ in der Gruppe der Kontrolltiere, $3,3 \pm 0,17\%$ in der Adenin-gefütterten Gruppe und $3,62 \pm 0,46\%$ in der Gruppe der renal denervierten SHR (Ad vs. Ko: p=0,99, Ad+RDN vs. Ko: p=0,99, Ad+RDN vs. Ad: p=0,99) (vgl. Abbildung 42).

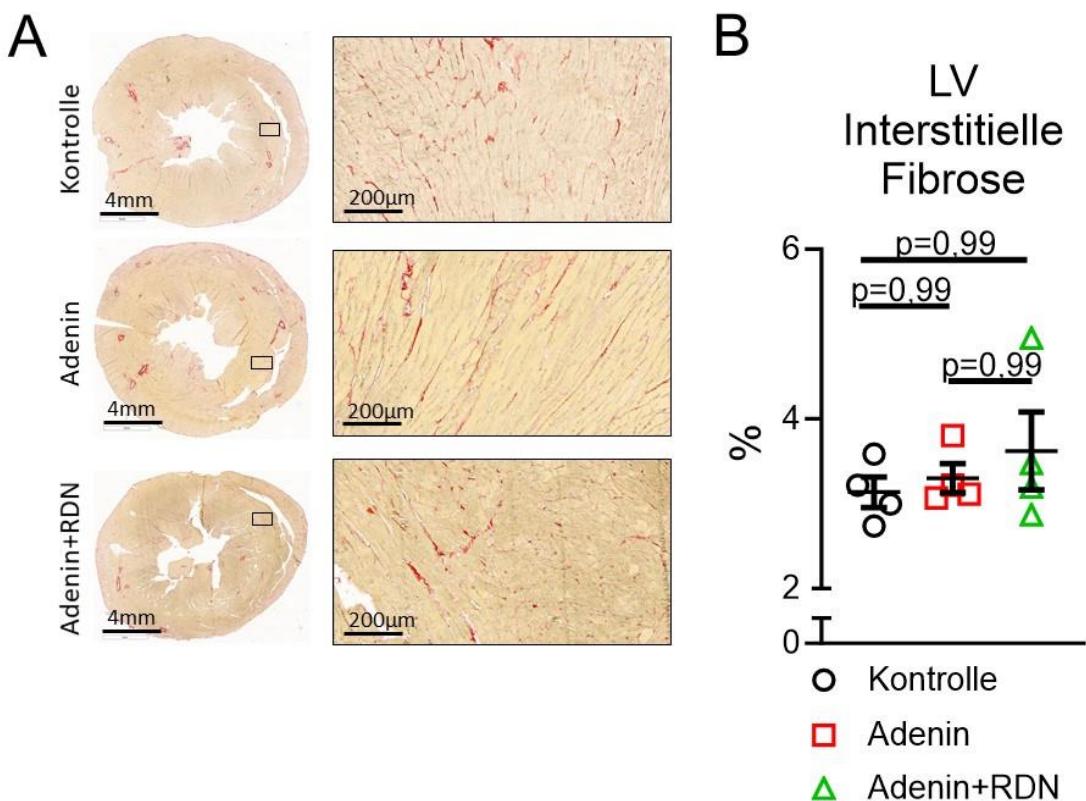


Abbildung 42: Interstitielle Fibrose im linken Ventrikel (LV)

A: Repräsentative Gewebsschnitte des linken Ventrikels, Pikro-Siriusrot-gefärbt

B: Prozentualer Anteil der interstitiellen Fibrose an der Gesamtoberfläche des linken Ventrikels

Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Zur statistischen Analyse wurde die „Kruskal-Wallis“-Varianzanalyse mittels „Dunn's multiple comparison“-Test angewandt. (Signifikanzniveau $p<0.05$)

In Zusammenschau der verschiedenen Untersuchungen konnte sowohl in den histologischen Methoden als auch nach Betrachtung biochemischer Marker kein strukturelles Remodeling im linken Ventrikel nachgewiesen werden.

6 Diskussion

Alle drei in dieser Arbeit aufgegriffenen Erkrankungen arterielle Hypertonie, CKD und Vorhofflimmern haben weltweit eine hohe Relevanz bezogen auf Mortalität, Morbidität und die damit einhergehende sozioökonomische Last für das globale Gesundheitswesen. Dabei stehen diese Erkrankungen in einem sehr engen epidemiologischen Zusammenhang. Das Ziel dieser Arbeit war es, genauere Erkenntnisse über die Entstehung eines atrialen, proarrhythmischen Substrates in einem multifaktoriellen experimentellen Ratten-Model von kardiovaskulären Komorbiditäten zu erlangen und zu untersuchen, ob die renale Denervation eine Therapiemöglichkeit zur Prävention kardialer Arrhythmien darstellt.

6.1 Blutdruckentwicklung

Um die humane arterielle Hypertonie in unserem Tiermodell imitieren zu können verwendeten wir Spontan Hypertensive Ratten (SHR). Sie zählen zu den mit am häufigsten untersuchten Versuchstieren bei Forschungsfragen bezogen auf chronischen Bluthochdruck und dessen Folgeerkrankungen. Aus der Literatur ist bekannt, dass eine Adenin-induzierte CKD in gesunden, normotensiven Ratten mit einer Erhöhung des Blutdrucks verbunden ist.^{19,20,46} Die CKD stellt einen unabhängigen Risikofaktor für die Entwicklung einer arteriellen Hypertonie dar. In unserem Versuch wurde zunächst überprüft, ob eine Adenin-induzierte CKD in SHR mit bereits chronisch erhöhtem Blutdruck zu einer weiteren, durch die Nierenerkrankung medierte, Erhöhung des Blutdruckes führen könnte und somit das proarrythmische Remodeling des Vorhofs noch verstärkt. Die Untersuchung des hier verwendeten Models der hypertensiven CKD-Ratte zeigte, dass es trotz bestehender Adenin-induzierter Nierenschädigung in SHR zu keiner zusätzlichen signifikanten Blutdruckerhöhung kam. Diwan et al. verwendeten männliche Wistar Kyoto-Ratten, welche 16 Wochen lang mit 0,25%igem Adenin-Futter gefüttert wurden, was mäßige Nieren- und Herz-Kreislaufschäden hervorrief. Zu den kardiovaskulären Schäden zählte in dieser Versuchsreihe unter anderem auch der erhöhte systolische Blutdruck, welcher alle vier Wochen unter leichter Sedierung erfasst wurde.²⁰ Unter Verwendung dieses Models konnte Hohl et al. an gesunden Sprague-Dawley-Ratten zeigen, dass eine Adenin-induzierte CKD zu einer moderaten Blutdrucksteigerung führte und das strukturelle und elektrische Remodeling am Vorhof begünstigte.³⁹ Das hier untersuchte Model unterscheidet sich von bisherigen experimentellen Studien, da in dieser Arbeit die Auswirkung einer Niereninsuffizienz bei bereits chronisch erhöhtem Blutdruck untersucht werden sollte. Die hier eingesetzten SHR entwickeln als speziell dafür gezüchteter Rattenstamm spontan ab den ersten 6-8 Lebenswochen erhöhte Blutdruckwerte.⁴² Möglicherweise waren auf dieser genetischen Grundlage die Blutdrucklevel bereits so stark

erhöht, dass die progressiv verlaufende CKD keinen weiteren signifikanten Anstieg mehr erreichen konnte.

6.2 Renale Denervation

Die RDN ist als Therapieoption bei therapierefraktärer arterieller Hypertonie bereits in spezialisierten Zentren etabliert. Die Überaktivität des sympathischen Nervensystems nimmt eine entscheidende Rolle ein in der Entwicklung des Bluthochdrucks und der Entstehung von Komorbiditäten.⁷¹ Mehrere Studien konnten einen signifikanten blutdrucksenkenden Effekt von einigen Monaten bis zu 10 Jahren nach der durchgeführten RDN nachweisen.² Bisher lautete die Empfehlung, außerhalb von klinisch kontrollierten Studien Patienten ab einer GFR < 45 ml/min keine renale Denervation zukommen zu lassen, da bezüglich des Wirkungserfolges keine klinisch validen Studienergebnisse vorliegen. In pathophysiologischen Überlegungen ist jedoch davon auszugehen, dass die Aktivität der Chemo- und Mechanorezeptoren der Niere im Falle einer Nierenschädigung erhöht ist. Dies würde zu einer Weiterleitung über afferente Nervenfasern bis in sympathische Nervenzellkerne im zentralen Nervensystem führen, resultierend in einer Weitergabe der erhöhten sympathischen Aktivität über efferente Nervenfasern in die Zielorgane, unter anderem Herz, Niere oder Gefäße.⁶⁷ Davon ausgehend würde bei Unterbrechung der afferenten Fasern, beispielsweise mittels RDN, eine zentrale Aktivierung des sympathischen Nervensystems ausbleiben. Eine kleine Studie mit 15 Probanden, welche eine resistente arterielle Hypertonie und CKD im Stadium 3-4 aufwiesen, konnte eine signifikante Blutdruckreduktion nach einem Jahr bei stagnierenden Nierenwerten aufzeigen.³⁶

In der Entwicklung und Aufrechterhaltung von Vorhof- und Herzrhythmusstörungen wird dem autonomen Nervensystem eine zentrale Stellung inne.⁵⁹ Aus dieser pathophysiologischen Grundlage resultiert die Überlegung, ob eine reduzierte Aktivität der sympathischen Innervation eine Therapiemöglichkeit für Herzrhythmusstörungen darstellen könnte. In erfolgten Studien konnten eine signifikante Reduktion der Herzfrequenzrate und Induzierbarkeit von VHF durch RDN gezeigt werden.^{41,104} Die Auswirkungen der RDN auf die Herzfrequenz könnten die Folge einer verringerten Ganzkörpersympathikusaktivität sein, die durch eine Reduktion der Aktivität der nierenafferenten Nerven vermittelt wird.¹⁰⁴ Es wird aktuell angenommen, dass der antiarrhythmische Mechanismus der RDN multifaktoriell und komplex ist. So kann eine adrenerge Aktivierung als Auslöser von Vorhofflimmern wirken, wenn sie auf ein anfälliges Herzsubstrat trifft, welches von autonomen Nervenfasern innerviert wird. In Tierversuchsstudien konnten mehrere potenzielle antiarrhythmische Wirkungen der RDN gezeigt werden, dazu zählen eine weniger heterogene Erregungsleitung, ein verringertes linksatriales Remodeling, verringerte linksatriale Durchmesser, reduzierte Anfälligkeit für

Vorhofflimmern und verbesserte linksatriale Leitungslatenz, unabhängig von der Blutdrucksenkung und der Nierenfunktion.⁴⁰ Der Zusammenhang zwischen erhöhter Aktivität des sympathischen Nervensystems und gesteigerter Prävalenz von VHF konnte bereits in mehreren Studien veranschaulicht werden. Der Pathomechanismus dahinter scheint in einer verkürzten Dauer des Aktionspotentials und somit früheren Nachdepolarisationen zu liegen.⁶⁸ So zeigten beispielsweise Linz et al. eine signifikante Reduktion des Auftretens spontaner frühzeitige Vorhofschläge und der Dauer des VHF durch Blockade der Angiotensinrezeptors.⁶¹ Dies deutet darauf hin, dass die Aktivierung des RAAS zumindest teilweise die Initiierung und Aufrechterhaltung des VHF vermittelt. In einer anderen Studie, einem normotensivem Ziegenmodell mit persistentem VHF, konnten Linz et al. ebenfalls mittels Unterbrechung der afferenten und efferenten sympathischen Signalübertragung zwischen Niere und zentralem Nervensystem durch RDN eine Verringerung des strukturellen Umbaus des Vorhofs und Komplexität des VHF bewirken.⁶² Vergleichbare Beobachtungen konnten auch an anderen Tiermodellen wie beispielsweise Schweinen, aber auch am Menschen vorgenommen werden. Auch hier konnte die Blockade der sympathischen Stimulation mittels RDN eine Abschwächung der paroxysmalen VHF-Episoden erreichen.⁶³ Als messbares Korrelat der sympathischen Überaktivierung bzw. deren Neurotransmitter bestimmten wir in dieser Arbeit die renale Expression der TH, einem Schlüsselenzym der Katecholaminbiosynthese. Passend zu der Annahme, dass das sympathische Nervensystem im kardiovaskulären Komorbiditätenmodell an der Entstehung der chronischen Nierenerkrankung beteiligt ist, war die Anzahl der TH-exprimierenden Zellen der Niere in der Gruppe der Adenin-gefütterten Ratten erhöht im Vergleich zu den hypertensiven Kontrolltieren mit Standarddiät, jedoch ohne statistische Signifikanz. Der Effekt der RDN konnte anhand der deutlich geringeren Quantifizierung der TH in der Interventionsgruppe im Vergleich zur Adenin-Gruppe erfolgreich veranschaulicht werden. Diese beiden Ergebnisse sprechen sowohl dafür, dass das überaktive sympathische Nervensystem eine zentrale Rolle in der Pathogenese der CKD einnimmt, als auch dass die RDN diese Überaktivierung einzudämmen vermag.

Ähnliche Ergebnisse lieferte der mittels HPLC bestimmten Norepinephringehalt der jeweiligen Rattennieren. Die Adenin+RDN-Gruppe hatte im statistischen Vergleich einen niedrigeren Norepinephrin-Gehalt als die Kontrollgruppe und die Adenin-Gruppe. Dies lässt vermuten, dass die Intervention mittels RDN eine signifikante Reduktion der Neurotransmitter in der Niere bewirken konnte, welche als Marker für eine verringerte neurohumorale Aktivität gewertet werden kann. Die im Rahmen der arteriellen Hypertonie und der durch Adenin induzierten CKD vermehrte Bildung von Katecholaminen konnte folglich mittels RDN reduziert werden. Das pathologische Crosslinking zwischen Niere und Herzen wurde erfolgreich herunterreguliert. Der Gehalt an renalen sympathischen Neurotransmittern unterschied sich im Vergleich zwischen der Adenin-Gruppe und hypertensiven Kontrollgruppe nicht signifikant.

Eine mögliche Ursache dafür könnte die generell pathologisch erhöhte sympathische Aktivität darstellen, welche sowohl im Rahmen der arteriellen Hypertonie auftritt als auch im Rahmen der CKD.³¹

6.3 Renales Remodeling

Aufgrund des fütterungsbedingten Überangebots von Adenin wird vermehrt 2,8-Dihydroxyadenin (DHA) über das Enzym Xanthinoxidase gebildet. Diese bei Nagetieren durch Adenin-angereicherte Ernährung induzierte Nephropathie entspricht im klinischen Alltag dem Nierenschaden von Patienten mit dem seltenen autosomal-rezessiv vererbten Adenin-Phosphoribosyltransferase-Mangel. Die geschätzte Prävalenz dieser Störung liegt bei 1:50.000-1:100.000, wobei einige Berichte darauf hindeuten, dass diese Zahlen möglicherweise unterschätzt werden. Als klinisch relevant erweist sich die 2,8-DHA-Nephropathie auch bei Nierentransplantaten. Hier kann sich die Nierenschädigung bis zum Transplantatversagen eskalieren. Das Spektrum der durch Kristallablagerungen verursachte Organschäden ist vielfältig. Dabei werden mehrere unterschiedliche Arten von Kristallen in der Niere gebildet und abgelagert, was zur Induktion verschiedener kristallinduzierter Nephropathien führen kann. Häufiger Verursacher stellen Kalziumphosphat-, Kalziumoxalat- und harnsäurehaltige Kristalle dar, gefolgt von mehreren seltenen Kristallarten, einschließlich 2,8-Dihydroxyadenin-Präzipitaten.⁵¹ DHA ist im pH-Bereich des Urins nur schwer löslich und präzipitiert aus diesem Grund zu DHA-Kristallen. Die Kristalle lösen im Tubulussystem und Nierenparenchym Inflammationsreaktionen und Fibrosierungen aus. Eine Adenin-Nephropathie entsteht.²⁵ An einem Rattenmodell mit Adenin-induzierter CKD wurde gezeigt, dass die Hemmung der XO mit Allopurinol die Nierenfunktion verbesserte, was sich unter anderem in einer verminderter Proteinurie, reduziertem Kreatinin und verminderten strukturellen glomerulären Schäden widerspiegelt, den Blutdruck senkte und kardiovaskuläre Schäden (Fibrose, Inflammation) abschwächte.²⁰ Ob eine Modulation des sympathischen Nervensystems eine Auswirkung auf die Expression der renalen XO in einem Adenin-induzierten CKD Modell hat ist jedoch unbekannt. Unsere Daten zeigen, dass aufgrund der signifikant erhöhten Anzahl von DHA-Kristallen, sowie der vermehrten Proteinexpression der an diesen Prozessen beteiligten Xanthin Oxidase, in den Nieren der Adenin-gefütterten Versuchstieren eine Präzipitation von unlöslichen Kristallen gelungen ist. Dies kann als Zeichen eines erfolgreichen Auslösens einer Adenin-induzierten Nephropathie gewertet werden. Das Ergebnis stellte sich besonders deutlich dar, da in den Nieren der Kontrolltieren keine einzigen Kristalle zu finden waren. Dies zeigt, dass es aufgrund des Überangebots an Adenin zu einer vermehrten Bildung von DHA und der katalysierenden XO in den Ausscheidungsorganen kam. Jedoch bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den

Tieren der Adenin- und Adenin+RDN-Gruppe. Die Intervention mittels RDN konnte, trotz signifikant reduzierter Marker der Sympathischen Aktivität, somit weder eine Reduktion an DHA-Kristallen bewirken noch die Proteinexpression der Xanthin-Oxidase in der Niere beeinflussen. Ein Erklärungsversuch wäre die Annahme, dass der Adenin-induzierte Nierenschaden in Form der Kristalle bereits eingetreten ist, bevor die RDN durchgeführt wurde. Im zeitlichen Verlauf wurde die Operation erst 4 Wochen nach Beginn der Adenin-Diät durchgeführt. Im Rahmen dieser Operation zur RDN fiel bereits ein makroskopischer Nierenschaden auf in Form von Ablagerungen auf den Nierenoberflächen. Die Nierenoberflächen der Kontrolltiere waren im Gegensatz blande, ohne Auflagerungen. Dieser veränderte Phänotyp der Nieren der Adenin-gefütterten Ratten entspricht auch den Beobachtungen von Hohl et al., welche in ihrem Tiermodell anhand männlicher Sprague-Dawley-Ratten die erhöhte Induzierbarkeit von Vorhofflimmern bei vorliegender Adenin-induzierter Nephropathie untersuchten. Auch hier beeinflusste die RDN weder das Fortschreiten der CKD noch bewirkte sie eine Umkehrung des durch die Adenin-Fütterung induzierten Phänotyps der Nierenerkrankung. Zudem wiesen die Nieren der Adenin-gefütterten Sprague-Dawley-Ratten ebenfalls stark veränderte Nierenoberflächen auf, im Gegensatz zu den glatt abgegrenzten Nierenoberflächen der Kontrolltiere unter Standardfutter.⁴⁰

Ebenfalls für einen erfolgreich induzierten Nierenschaden durch Adenin-Diät würden die erhöhten Retentionsparameter im Plasma als auch deren erniedrigte Konzentration im Urin der Adenin-gefütterten Versuchstiere im Vergleich zur Kontrollgruppe sprechen. Diese endogenen Filtrationsmarker werden physiologisch über den Harn ausgeschieden. Kommt es nun im Rahmen einer Nierenschädigung wie der CKD zu einer reduzierten Eliminationsfähigkeit der Niere steigt die Plasmakonzentration des Kreatinins und Harnstoffs an, während ihr Konzentration im Urin abfällt. Zum Ende unseres Versuches stiegen die Plasmakonzentrationen von Kreatinin und Harnstoff in den Adenin-gefütterten Gruppen deutlich höher an als in der Kontrollgruppe. Dazu passend fielen die Urinkonzentrationen beider Retentionsparameter in den Adenin-gefütterten Gruppen deutlich mehr ab als in der Kontrollgruppe. Dass die Kreatinin- und Harnstoffwerte auch nach RDN-Behandlung weiter anstiegen, könnte darauf hindeuten, dass die kardialen Auswirkungen der RDN unabhängig vom Schweregrad der etablierten CKD sind. Es könnte sein, dass sich die RDN auch in fortgeschrittenen Stadien der CKD positiv auf das kardiale Remodeling auswirkt.⁴⁰ Eine Abnahme der Plasmakonzentrationen nach RDN konnte die Studien von Veiga et al. zeigen, welche an männlichen Wistar-Ratten mittels 5/6-Nephrektomie eine CKD-Induktion durchführten. Dazu wurde die rechte Niere der Ratten entfernt und bei zwei der drei Äste der linken Nierenarterie eine Ligatur durchgeführt, welche zu einem Infarkt von zwei Dritteln der linken Niere und somit zum Nierenschaden im Sinne einer CKD führte. Im Anschluss wurde

bei der Interventionsgruppe 5-Wochen nach CKD-Induktion eine RDN durchgeführt. Im Rahmen dieses Versuches wies die CKD-Gruppe im Vergleich zu den Kontrolltieren einen Anstieg der Plasmakreatininwerte auf, während die totale Denervation das Plasmakreatinin signifikant reduzierte.¹⁰⁵ Jedoch ist diese Studie auch aufgrund einer anderen Ratten-Rasse und eines vollkommen anders induzierten Nierenschadens nicht auf unsere Ergebnisse zu übertragen. Vor allem im Verfahren der 5/6-Nephrektomie sind entscheidende Unterschiede und Nachteile im Vergleich zur Adenin-induzierten CKD zu sehen. Nicht nur resultiert dieses Verfahren aufgrund seiner hohen Invasivität oft in einer gesteigerten Mortalität⁴⁹, auch verbleibt eine viel geringere Menge an Nierengewebe für Untersuchungszwecken zur Verfügung. Diese Gegebenheiten könnten die Ergebnisse drastisch verändern und erlauben somit keinen exakten Vergleich der Ergebnisse beider Verfahren. Ebenfalls keine veränderten Nierenparameter nach RDN zeigten Patienten in einer Studie von Hering et al. In dieser Studie erhielten 15 Patienten mit resistenter Hypertonie und CKD im Stadium 3-4 eine RDN. In den Verlaufsbeobachtungen nach 3 und 6 Monaten post interventionem konnten keine signifikanten Veränderungen der Nierenfunktion detektiert werden. Betrachtet wurden die eGFR, die Serumkreatinin-, Cystatin-C-Spiegel, die Plasmakreatinin-, Cystatin-C- und Harnstoffspiegel. Zudem wurden keine Störungen der Serum- und Urinelektrolyte beobachtet.³⁶ Eine ähnlich aufgebaute Studie an 27 Patienten von Ott et al., ebenfalls mit resistenter Hypertonie und CKD im Stadium 3-4, konnte Veränderungen der eGFR nach einjährigem Beobachtungszeitraum nach RDN aufweisen. Die Nierenfunktion wurde retrospektiv bis zu 3 Jahre und prospektiv für 1 Jahr gemonitort. Vor der RDN sank die eGFR pro Jahr, im ersten Jahr nach der RDN blieb die RDN stabil. Dabei zeigte sich die jährliche Veränderung der eGFR pro Jahr nach der RDN signifikant verbessert. Somit konnte in der Studie von Ott et al. eine weitere Verschlechterung der Nierenfunktion bei Patienten mit CKD Stadium 3-4 und therapieresistenter Hypertonie mittels RDN verlangsamt werden.⁸⁰ Im Unterschied zu unserem Experiment erhielten die Patienten dieser beiden Studien jedoch während der Versuchsdauer weiterhin ihr antihypertensive Medikation, welche bei therapierefraktärem Bluthochdruck mindestens drei Antihypertensiva einschließlich eines Diuretikums entspricht.

6.3.1 Renale Expression ROS-produzierender und anti-oxidativ wirkender Proteine

Nierenerkrankungen gehen mit erhöhtem oxidativem Stress einher, sowohl aufgrund eines Mangels an Antioxidantien, aber auch aufgrund erhöhter Produktion von ROS. Dabei können gesteigerte Mengen an ROS das Fortschreiten der Erkrankung beschleunigen. In fortgeschrittenen Stadien der CKD werden erhöhte ROS-Werte mit Komorbiditäten wie beispielsweise Bluthochdruck in Verbindung gebracht.¹⁷

Eine Hauptquelle für die Bildung von ROS stellen normale Stoffwechselprozesse unter aeroben Bedingungen dar. Dazu zählt auch das Enzym XO, welches die letzten Schritte des Purinabbaus katalysiert. Unter Verwendung von Sauerstoff als Co-Faktor entsteht dabei neben Xanthin und Harnstoff H_2O_2 .¹⁷ Passend zu unserer These, dass bei Vorliegen einer CKD das Ungleichgewicht des oxidativen Stresses zu Gunsten der Bildung von Prooxidantien verschoben ist, konnten wir eine erhöhte renale Proteinexpression der XO in den Adenin-gefütterten Tiere als Zeichen gesteigerten oxidativen Stresses vermerken. Eine Denervation der Nierenarterie in Adenin-gefütterten Tieren zeigte keinen Einfluss auf die erhöhte renale XO-Expression. Die erhöhten XO-Werte können als Ausdruck des oxidativen Stresses, der durch das Adenin-Futter herbeigeführten Nephropathie entstanden ist, gewertet werden. Da die Interventionsgruppe keine signifikant erniedrigten XO-Level aufwies, scheint es so, als wäre die Expression der XO unabhängig vom sympathischen Nervensystem und könnte durch das Überangebot an Adenin vermittelt sein.

Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch für die beiden enzymatischen Antioxidationen Katalase (CAT) und Häm-Oxygenase (HO-1). Diese beiden Enzyme wirken im Körper als Antioxidationsmechanismen zur Abwehr des oxidativen Stresses und der damit einhergehenden Zellschädigung. Die CAT entgiftet H_2O_2 zu H_2O und O_2 . Das Enzym HO-1 ist bei anfallendem erhöhtem Stress induzierbar. Es ist zuständig für den enzymatischen Abbau von Häm, Kohlenmonoxid und Biliverdin, wobei jedes dieser enzymatischen Endprodukte über verschiedene Mechanismen antioxidative, entzündungshemmende und anti-apoptotische Wirkungen ausübt. In vitro als auch in Tiermodellen konnten bereits die protektiven Eigenschaften von HO-1 unter anderem in Bezug auf akute Nierenschäden nachgewiesen werden.^{17,114} So wirkt HO-1 antiinflammatorisch und schützt durch seine Beteiligung am Abbau von Häm vor der zellschädigenden Wirkung intrazellulärer Häm-Proteine. HO-1-Induktoren wie beispielsweise Bardoxolonmethyl konnten bereits schützende Wirkungen bei experimenteller akuten Nierenerkrankung zeigen.⁷⁴ Die Analyse unserer Western Blots ergab für die CAT ein signifikant reduziertes Vorliegen in der Gruppe der Adenin-gefütterten Ratten bzw. Interventionsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Diese signifikant verringerten CAT-Konzentrationen der Adenin-gefütterten Tiere deutet vermutlich darauf hin, dass der Schutzmechanismus mittels ROS durch das verringerte Vorhandensein der CAT in den CKD-Nieren abgeschwächt ist. Ratten mit 5/6 Nephrektomie zeigten in einer Studie von Sindhu et al. ebenfalls reduzierte CAT-Proteinlevel und eine verminderte Aktivität in dem verbliebenen Nierengewebe. Sindhu et al. führten den beobachteten Mangel dieses Enzyms, angesichts der entscheidenden Rolle die der Katalase im antioxidativen Abwehrsystem zugeschrieben wird drauf zurück, dass es zu dem durch das chronische Nierenversagen induzierten oxidativen Stress beiträgt.⁹⁶ Auch eine Studie an Hämodialyse-Patienten mit terminaler chronischer Nierenerkrankung konnte reduzierte CAT-Aktivitäten nachweisen.⁴³

Dagegen lag das Enzym HO-1 in den Gewebeproben der beiden Adenin-gefütterten Tiergruppen in signifikant höheren Werten vor als in den Nierenproben der Kontrollgruppe. Dieses Ergebnis spricht für eine erhöhte Produktion von ROS in den Nieren mit Adenin-Induzierter Nephropathie, da vermutlich die Produktion des induzierbaren antioxidativen Enzyms HO-1 hochreguliert wurde. Eine Intervention mittels RDN zeigte sowohl für die CAT oder HO-1 keine Veränderung der Enzymkonzentrationen, somit scheint deren differenzielle Expression unabhängig von der sympathischen Aktivität zu sein.

6.4 Kardiales Remodeling

6.4.1 Strukturelles und elektrophysiologisches Remodeling des linken Vorhofs

Die pathophysiologischen Beziehungen zwischen Vorhofumbau und der daraus folgenden Induktion von Vorhofflimmern sind komplex. Die meistens Auslöser und Substrate des Vorhofflimmerns entstammen dem linken Vorhof.¹⁰⁹ In Tiermodellen wie dem von Hohl et al. konnten bereits gezeigt werden, dass eine progrediente Verschlechterung der Nierenfunktion mit einer Vergrößerung des linken Vorhofs und atrialem Remodeling einhergehen. Dieses atriale Remodeling beinhaltet eine verstärkte interstitielle Fibrosebildung und eine erhöhte sympathische Innervation, welche in einer verlängerten P-Wellen-Dauer, einer erhöhten Anfälligkeit für Vorhofflimmern und einer Beeinträchtigung der Homogenität der atrialen Reizleitung resultierte.⁴⁰ Diese Zusammenhänge wurden bereits vielseitig untersucht. So untersuchten Qui et al. mittels 5/6-nephrektomierten Sprague-Dawley-Ratten, inwiefern die CKD das kardiale Remodeling beeinflusst. Dabei quantifizierten Qui et al. die interstitielle Fibrose sowohl im linken Vorhofanhang als auch im linken Vorhofseptum. In beiden Herzgewebeabschnitten war der Fibrose-Anteil der CKD-Gruppe signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe. Des Weiteren zeigte sich im Rattenmodell von Qiu et al. eine signifikante Vergrößerung des linken Vorhofs.⁸⁷ Auch die Effekte der RDN als mögliche Intervention wurden im Kontext atrialer Arrhythmien bereits näher beleuchtet. So beschreiben Younis et al. mehrere potenzielle antiarrhythmische Wirkungen der RDN auf den Vorhof in Tierversuchsstudien, darunter eine weniger verlangsame oder heterogene Erregungsleitung, eine geringere Fibrose, eine geringere neurohumorale Aktivierung und eine geringere sympathische Nervenausbreitung.¹¹³ Hohl et al. induzierten Sprague-Dawley-Ratten mittels Fütterungen eines 0,25 % Adenin-haltigen-Futters eine CKD und konnten einen strukturellen und autonomen Umbau des linken Vorhofes durch die Adenin-induzierte Nephropathie nachweisen. Die Versuchstiere der Adenin-Gruppe zeigten eine Vergrößerung des LA-Durchmessers und der LA-Fläche im Vergleich zu Kontrollgruppe mit Standarddiät. Diese pathologischen Veränderungen konnten mittels der als Intervention verwendeten RDN signifikant reduziert werden. Des Weiteren kam es zu einer vermehrten Bildung interstitieller

Fibrose in der Adenin-Gruppe, welche ebenfalls durch die RDN verringert werden konnte.⁴⁰ Dies entspricht auch unseren Beobachtungen. So führte die Adenin-induzierte CKD in hypertensiven Ratten zu einer vermehrten atrialen interstitiellen Fibrosebildung und einer erhöhten Anzahl an TH-positiven Zellen, einem etablierten Marker für sympathische Aktivität. Die Quantifizierung der TH-Immunreaktivität, um den Noradrenalin-Gehalt in den Nervenendigungen messen zu können, dient als guter Marker für die regionale sympathische Aktivierung. Die TH-Immunreaktivität zeigte sich in Studien empfindlich genug, um Veränderungen in der sympathischen Innervation aufzuzeigen, die mit einer Hypertonie verbunden sind. Es ließen sich Unterschiede im sympathischen Tonus bzw. der sympathischen Aktivität innerhalb verschiedener Gewebe und zwischen verschiedenen Tieren nachweisen. Die Studie von Burgi et al. stütze die These, dass Veränderungen der TH-Aktivität Veränderungen der sympathischen Aktivität widerspiegeln können.¹²

Im Zuge des atrialen pro-arrhythmischen Remodelings stellt die interstitielle Fibrose eine der Hauptkomponenten dar. Der strukturelle Umbau des Vorhofs, zu welchem insbesondere die Gewebefibrose gehört, geht mit Leitungsanomalien einher, die ein Substrat für die Aufrechterhaltung von Vorhofflimmern bilden. Die Auslösung von Vorhofflimmern beruht auf ektopischen Auslösern und einem Reentry-anfälligen Substrat, wobei Störungen der Erregungsleitung im Zusammenhang mit Gewebefibrose prädisponierend für ein Reentry sind. Vorhoffibrose ist ein häufiges Merkmal bei VHF, und das Ausmaß der Fibrose ist ein Prädiktor für das Wiederauftreten von VHF nach einer Katheterablation. Zahlreiche Forschungsarbeiten haben ein breites Spektrum an molekularen Mechanismen zur Kontrolle der Vorhoffibrose nachgewiesen. Eine Vielzahl von Zellmembranrezeptorsystemen veranlasst Fibroblasten zur Proliferation und Differenzierung in profibrotische, Kollagen sezernierende Myofibroblasten. Dabei stellt die Verhinderung des strukturellen Umbaus einen interessanten therapeutischen Ansatz dar.⁷⁶ Sowohl die interstitielle Fibrose als auch die erhöhte Expression der TH konnte nach RDN wieder deutlich reduziert werden und zeigen deutlich den Einfluss der sympathischen Aktivität auf die atriale Arrhythmogenese.

Zur Beurteilung der Auswirkung strukturellen Remodelings des LA auf die elektrophysiologischen Eigenschaften haben wir im Rahmen der finalen Versuche bei jedem Versuchstier ein Zwei-Kanal-EKG abgeleitet. Die gewählte Ableitung ist der humanen zweiten Ableitung nach Einthoven entsprechend und ermöglicht durch ihren Verlauf die Erfassung des größtmöglichen Ausschlags der P-Wellen-Amplitude und somit die beste Beurteilung der Vorhoferregung. Um die Unterschiede in der Erregungsausbreitung entlang des linken Vorhofs beurteilen zu können, wurden die P-Welle, das PQ-Intervall und die QTc gemessen. Die P-Wellen Dauer zeigte sich in den Adenin-gefütterten Tieren deutlich verlängert, war jedoch vermutlich aufgrund der geringen n-Zahl statistisch nicht signifikant im Vergleich zur Kontrolle.

Die P-Wellen Dauer konnte in den Tieren mit RDN deutlich reduziert werden. Die P-Wellen-Dauer stellt einen elektrokardiographischen Marker dar, der die Erregungsleitung im Vorhof widerspiegelt, und dessen Verlängerung mit Vorhofflimmern einhergeht.³³ Große Bevölkerungsstudien bestätigten diese Erkenntnisse durch Aufzeigen einer linearen Korrelation zwischen der P-Wellen-Verlängerung und dem Risiko für Vorhofflimmern.⁸³ Ebenso konnte bereits der Nachweis einer hohen Prävalenz von Vorhofarrhythmien bei Patienten mit kurzen QT-Intervallen, wenn die Herzfrequenz durch eine neue QTc-Formel angepasst wurde, erbracht werden.⁸⁸ Das elektrophysiologische Remodeling, mit Fokus auf der P-Wellen-Dauer, ist dabei auch vom strukturellen Remodeling abhängig, mit Hauptfokus auf der interstitiellen Fibrose. Eine verstärkte Fibrosebildung beeinträchtigt die intra- und interatriale elektrische Leitung, was erhebliche Auswirkungen auf das Auftreten von VHF bewirkt. Strukturelles Remodeling wie die Vergrößerung des LA und die Fibrose führen zu einer verlängerten P-Wellen-Dauer. Mittels Neuromodulation durch RDN konnte in verschiedenen experimentellen Modellen die atriale autonome Innervation, strukturelle und elektrophysiologische Veränderungen abgeschwächt und die Auslösbarkeit und Komplexität von VHF reduziert werden.⁴⁰

Durch Reduzierung des atrialen Remodelings konnte gezeigt werden, dass die Wahrscheinlichkeit von VHF reduziert werden konnte. Zusätzlich ist bekannt, dass erhöhte Blutdrucklevel die Inzidenz von VHF beeinflussen und die CKD und VHF sich bidirektional beeinflussen.^{45,18} Qui et al. konnten im Rattenmodell zeigen, dass CKD zu einem strukturellen Umbau des Vorhofes führt und aufgrund dessen die Auftretewahrscheinlichkeit von VHF erhöht. Qui et al. zeigten, dass die VHF-Induzierbarkeit und die Dauer des VHF in der CKD-Gruppe im Vergleich zur Scheingruppe signifikant erhöht waren. Dabei stieg die Dauer der P-Welle in der Gruppe der CKD-Ratten signifikant an.⁸⁷ Jedoch bestehen zwischen dem Versuchsaufbau von Qui et al. und unserem erhebliche Unterschiede. So wurden mit normotensiven Sprague-Dawley-Ratten eine grundlegend andere Rattenrasse verwendet, welche nicht die Komorbidität der systemischen arteriellen Hypertonie mit sich bringt. Des Weiteren ist die CKD-Induktion durch Nephrektomie wie in Kapitel 6.3 Renales Remodeling erwähnt mit entscheidenden Unterschieden im Vergleich zur Adenin-induzierten CKD vergesellschaftet.

6.4.2 Remodeling des linken Ventrikels

Auch die möglichen Veränderungen in Bezug auf ein links ventrikuläres Remodeling wurden in vorangegangenen Studien näher beleuchtet. Zur Beurteilung von Morphologie und Funktion des linken Ventrikels bei Ratten mit CKD verwendeten Kashioulis et al. Sprague-Dawley-Ratten mit Adenin-induzierter CKD. Dabei kam es in den linken Ventrikeln der Versuchstiere

zu einer statistisch signifikanten Zunahme des Kardiomyozytendurchmessers, wohingegen sich kein Unterschied im Fibrose-Gehalt zwischen den Gruppen aufweisen ließ.⁴⁶

Diwan et al. verwendeten zur Induktion der CKD in Wister Kyoto Ratten ebenfalls 0,25%iges Adenin-Futter. Nach 16 Wochen zeigte sich eine deutliche Erhöhung des systolischen Blutdrucks und es kam zu einer linksventrikulären Hypertrophie und Zunahme der interstitiellen und perivaskulären Entzündung und Fibrose.¹⁹ Hohl et al. hatten einen ähnlichen Versuchsaufbau zu den beiden zuvor beschriebenen. Sie verwendeten Sprague-Dawley-Ratten und induzierten die CKD durch 0,25 % Adenin-haltigem Futter. In diesem Versuch präsentierte die Adenin-Gruppe echokardiographisch eine konzentrische Hypertrophie des LV, ausgeprägte Hypertrophie der LV-Vorderwand und der LV-Hinterwand. Zudem gab das erhöhte E/A-Verhältnis (Verhältnis von früher zu später ventrikulärer Füllungsgeschwindigkeit) Hinweise auf eine diastolische Dysfunktion. In der Adenin-gefütterten Rattengruppe, welche eine RDN als Intervention erhielten normalisierte sich die vordere und hintere Wanddicke des LV und die erhöhten E/A-Werte, welche für eine diastolische Dysfunktion sprachen, verbesserte sich im Vergleich zur Adenin-Gruppe.⁴⁰

In unserem Modell führte eine Adenin-haltige Diät in SHR zu keiner additiven Zunahme des MAPs, und trotz induzierter CKD zu keinen zusätzlichen Umbauprozessen des LVs. Im linken Ventrikel kam es zu keinen signifikanten Unterschieden der Kardiomyozytendiameter, keinen Veränderungen der Anteile der interstitiellen Fibrose im Vergleich der Versuchsgruppen und die Expression der BNP-mRNA zeigte sich im LV der Ad+RDN-Ratten im Vergleich zur Adenin-Gruppe leicht vermindert. Somit konnte zusammenfassend in unseren Untersuchungen kein strukturelles Remodeling im linken Ventrikel nachgewiesen werden. Um festzustellen, ob die Entwicklung von VHF bei CKD-Patienten mit einem erhöhten Entzündungszustand zusammenhängt, untersuchten Song et al. an dialyseabhängigen Patienten mit CKD im Sinusrhythmus bzw. VHF verschiedene Zytokine in Serumproben. Hierzu betrachteten sie die Kontraktilität und die Abmessungen des LVs mittels Echokardiographie, um einen möglichen Zusammenhang der erhöhten Anfälligkeit für VHF im CKD-Modell mit einer ventrikulären Dysfunktion näher zu untersuchen. In diesem Modell konnte vergleichbar mit unseren Ergebnissen keine Veränderungen bezogen auf den linken Ventrikel verzeichnet werden. So blieb die Ejektionsfraktion bei allen Mäusegruppen ähnlich, genauso wie der LV-Durchmesser und die LV-Wanddicken. Darüber hinaus zeigte ein Pulswellen-Doppler, dass das Verhältnis von früher zu später ventrikulärer Füllungsgeschwindigkeit (E/A) in allen Gruppen vergleichbar war, was laut der Autoren darauf hindeutete, dass die diastolische Funktion auch bei CKD-Mäusen vier Wochen nach der zweiten Nephrektomie erhalten blieb. Song et al. deuteten das als Zeichen, dass eine

ventrikuläre Dysfunktion nicht zu einer erhöhten Anfälligkeit für VHF im Zusammenhang mit CKD beiträgt.¹⁰⁰

Nadruz et al. beschreiben kardiales Remodeling als Veränderungen der Größe, Geometrie, Form, Zusammensetzung und Funktion des Herzens als Folge von Belastung oder Verletzung des Herzens.⁷² Unter Betrachtung dieser Definition könnte man als Erklärung für die fehlenden Unterschiede bezogen auf das kardiale Remodeling zwischen unseren beiden Versuchsgruppen die stetige Belastung des Herzens anführen, welche auch in der Kontrollgruppe aufgrund der Hypertonie besteht. So könnte das Myokard alleinig durch den Hypertonus so weit beeinträchtigt sein, dass es bereits zu pathologischen Veränderungen kommt, unabhängig von der CKD. Das könnte möglicherweise einen Grund darstellen, warum kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen zu erkennen war. So beschreiben Nadruz et al. einen Anstieg der LV-Wandspannung resultierend durch anhaltend erhöhten Blutdruck. Dies führt bei länger andauernder Belastung zu einer Verdickung der linksventrikulären Herzwand und Herzmasse, um die Wandspannung normalisieren zu können, resultiert aber schlussendlich in einer kardialen Hypertrophie. Ein wichtiger Mechanismus, mit dem das Herz die durch Drucküberlastung verursachte LV-Wandbelastung zu reduzieren versucht, ist das hypertrophe Wachstum der Kardiomyozyten. Arterieller Hypertonus verursacht folglich die gleichen Pathologien, welche wir durch die CKD-Induktion erwarten würden.⁷² Boluyt et al. konnten anhand SHR im fortgeschrittenen Alter zeigen, dass die genetisch bedingten hohen Blutdrücke ein Remodeling des LVs verursachen. So wiesen die SHR eine verminderte myokardiale Kontraktionsfunktion und ventrikuläre Fibrose auf, als Zeichen dafür, dass eine stabile kompensierte Hypertrophie zu einer Herzinsuffizienz fortschreitet. Dieser Übergang zur Herzinsuffizienz vollzog sich bei SHR im Alter von 18-24 Monaten und war durch eine beeinträchtigte LV-Funktion, eine ventrikuläre Dilatation und eine reduzierte Auswurffraktion ohne Zunahme der LV-Masse gekennzeichnet. Die Verbesserung der Befunde nach Gabe des RAAS-Hemmerns Captopril könnte ein weiterer Hinweis darauf sein, dass die Hypertonie allein ein LV-Remodeling bewirkt.¹⁰

In Zusammenschau aller Ergebnisse und im Vergleich zu bisherigen Studien und wissenschaftlichen Erkenntnissen könnte man die Vermutung aufstellen, dass die betrachteten vorliegenden Krankheiten CKD und arterielle Hypertonie, auch in gemeinsamer Zusammenschau mit der Entstehung atrialer Arrhythmien, zu eng miteinander pathophysiologische verwoben sind, als dass man Pathologien dezidiert nur einer Erkrankung zuschreiben könnte. Die Ergebnisse weisen auch darauf hin, dass es in nachfolgenden Studien nicht realitätskonform wäre, beide Erkrankungen strikt getrennt voneinander zu betrachten. Es ergibt sich dennoch eine enorme Wichtigkeit darin, weiter auf diesem Feld zu

forschen, aufgrund der epidemiologischen Relevanz bezogen auf weltweit steigende Inzidenzen, Mortalität, Morbidität und die damit einhergehende sozioökonomische Last für das globale Gesundheitswesen.

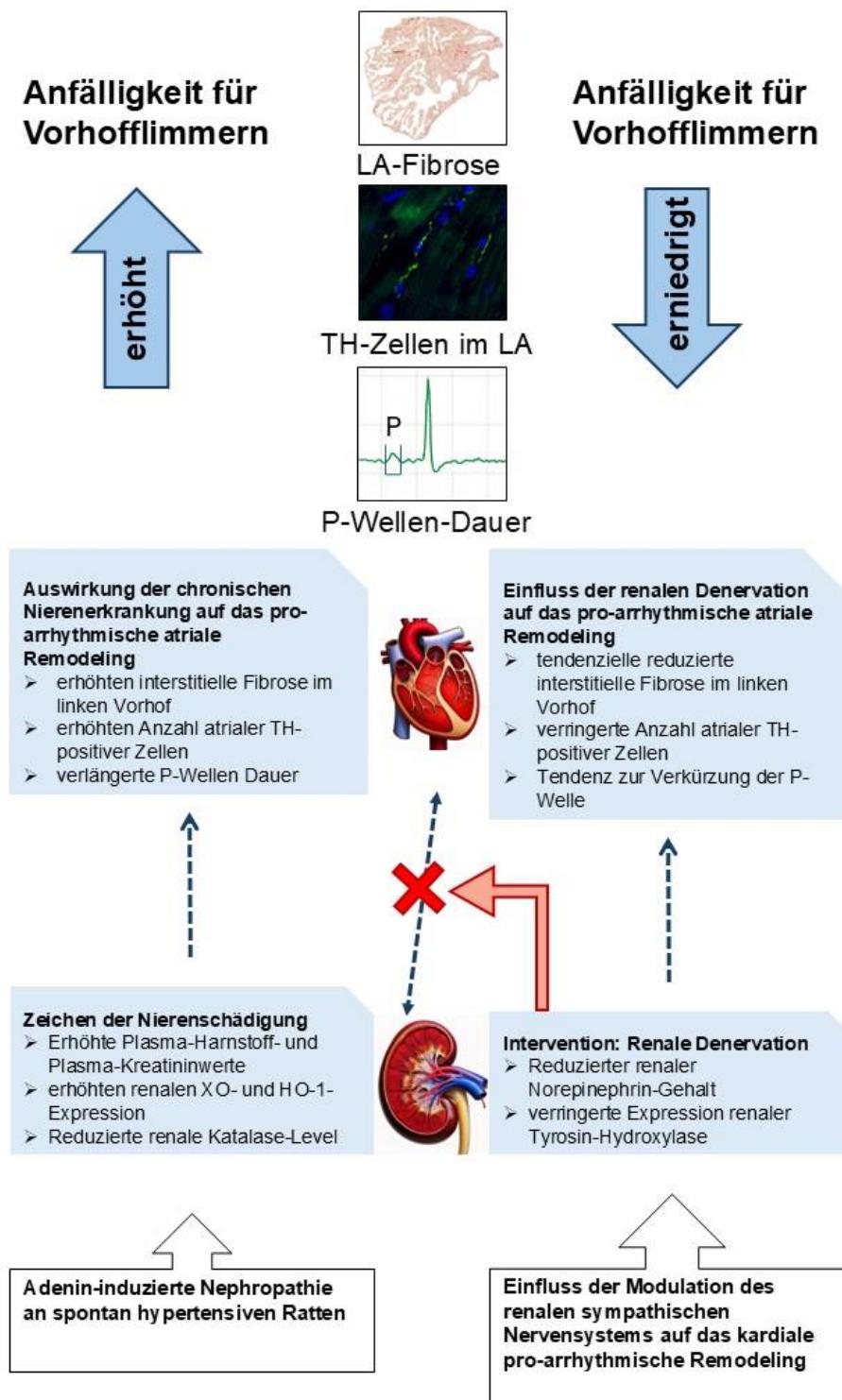


Abbildung 43: Zusammenschau aller Ergebnisse

In SHR bewirkte die Fütterung mit 0,25%igem Adenin-Futter eine nachweisbare Nierenschädigung. Die Adenin-induzierte CKD führte in SHR zu einem gesteigerten pro-arrhythmischen atrialen Remodeling, was zu einer erhöhten Anfälligkeit für Vorhofflimmern führen kann. Die renale Denervation konnte als Intervention zur Verringerung der Expression von Markern der sympathischen Innervation beitragen und das pro-arrhythmischen atrialen Remodeling reduzieren.

6.5 Klinische Relevanz

Eine klinische Studie, die die Auswirkungen der RDN auf neu auftretendes VHF bei Patienten mit CKD und arterieller Hypertonie untersucht, steht noch aus. Die aktuelle Studie SYMPLICITY AF (SYMPLICITY AF (Renal Nerve Denervation in Patients With Hypertension and Paroxysmal and Persistent Atrial Fibrillation): <https://www.clinicaltrials.gov>; unique identifier: NCT02064764) untersuchte RDN und Pulmonalvenenisolation (PVI) vs. alleinige PVI in Hinblick auf Sicherheit und Effektivität bei Patienten mit paroxysmalem und persistierendem Vorhofflimmern und arterieller Hypertonie. Dafür wurden Patienten aus Zentren (USA und Deutschland) mit medikamentenrefraktärem Vorhofflimmern randomisiert. Bei Patienten mit Vorhofflimmern und unkontrolliertem Blutdruck konnte RDN+PVI das Wiederauftreten von Vorhofflimmern nicht besser verhindern als PVI allein. Die Vorhofflimmern-Belastung und der Einsatz von Antiarrhythmika konnte jedoch mittels RDN+PVI verringert werden. Weitere prospektive Untersuchungen sind erforderlich.¹³

Die Studienpopulation der aktuell laufenden klinischen randomisierten Studie ASAFT (Treatment of Atrial Fibrillation in Patients by Pulmonary Vein Isolation in Combination With Renal Denervation or Pulmonary Vein Isolation Only): <https://www.clinicaltrials.gov>; unique identifier: NCT02115100) beinhaltet Patienten mit paroxysmalem oder persistierendem VHF mit arterieller Hypertonie oder Anzeichen einer sympathischen Überaktivität. Die Patienten sollten mindestens 2 blutdrucksenkende Mittel einnehmen oder eine Unverträglichkeit gegenüber blutdrucksenkenden Medikamenten aufweisen. Dabei erhält eine Gruppe RDN+PVI vs. alleinige PVI der anderen Gruppe. Die postinterventionelle Nachbeobachtungszeit, welche bis zu einem Jahr beträgt, beinhaltet regelmäßige Evaluationen des Herzrhythmus zur Kontrolle des Therapieerfolges.

Bisherige klinisch durchgeführte Studien zeigten ebenfalls, dass RDN in Kombination mit PVI die Wiederauftretensrate von Vorhofflimmern bei arzneimittelresistenten Bluthochdruckpatienten mit einer Vorgesichte von paroxysmalem oder refraktärem Vorhofflimmern verringert. Pokushalov et al. konnten eine signifikante Senkung des systolischen und diastolischen Blutdrucks in der Gruppe RDN+PVI verzeichnen, während die Gruppe, die nur PVI erhielt, keine signifikante Blutdruckveränderung aufwies. Ebenso wiesen deutlich mehr Patienten der Gruppe RDN+PVI 12 Monate postinterventionell eine Freiheit von Vorhofflimmern auf.⁸⁶ Eine Meta-Analyse durchgeführt von Ukena et al. unterstützt das Konzept der RDN als ergänzende Behandlung von Vorhofflimmern. Sechs randomisierte kontrollierte Studien mit 689 Patienten mit Bluthochdruck und symptomatischem Vorhofflimmern wurden eingeschlossen. Neben einer verringerten Auftretewahrscheinlichkeit von Vorhofflimmern nach 12 Monaten konnte eine signifikante Blutdrucksenkung dokumentiert werden. Relevante Komplikationen im Zusammenhang mit RDN wurden nicht beschrieben.¹⁰³

In den genannten Studien wird der Bedarf an weiterer Forschung mit standardisierten PVI- und RDN-Verfahren und prospektiven Untersuchungen verdeutlicht. Weiterführende Studien über die Auswirkungen der RDN auf neu auftretendes VHF bei Patienten mit CKD und arterieller Hypertonie sind somit dringend erforderlich.

Literaturverzeichnis

1. Al Ghorani H, Götzinger F, Böhm M, Mahfoud F. Arterial hypertension - Clinical trials update 2021. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2022;32(1):21-31. doi:10.1016/j.numecd.2021.09.007
2. Al Ghorani H, Kulenthiran S, Lauder L, et al. Ultra-long-term efficacy and safety of catheter-based renal denervation in resistant hypertension: 10-year follow-up outcomes. *Clin Res Cardiol.* Published online March 7, 2024. doi:10.1007/s00392-024-02417-2
3. Albrecht S, Brandl H, Adam W. Chemilumineszenz-Reaktionen. Anwendungen in der klinischen Chemie, Biochemie und Medizin. *Chemie in unserer Zeit.* 1990;24(5):227-238. doi:10.1002/ciu.19900240507
4. Al-Tubuly AA. SDS-PAGE and Western Blotting. In: George AJT, Urch CE, eds. *Diagnostic and Therapeutic Antibodies.* Vol 40. Methods in Molecular Medicine. Humana Press; 2000:391-405. doi:10.1385/1-59259-076-4:391
5. Bansal N, Xie D, Tao K, et al. Atrial Fibrillation and Risk of ESRD in Adults with CKD. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2016;11(7):1189-1196. doi:10.2215/CJN.10921015
6. Bargman JM, Skorecki K. Chronic Kidney Disease. In: Loscalzo J, Fauci A, Kasper D, Hauser S, Longo D, Jameson JL, eds. *Harrison's Principles of Internal Medicine, 21e.* McGraw-Hill Education; 2022. Accessed September 2, 2024. accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?aid=1198710566
7. Bhatt HV, Fischer GW. Atrial Fibrillation: Pathophysiology and Therapeutic Options. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2015;29(5):1333-1340. doi:10.1053/j.jvca.2015.05.058
8. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J.* 2012;5(1):9-19. doi:10.1097/WOX.0b013e3182439613
9. Blood Pressure Lowering Treatment Trialists' Collaboration. Blood pressure-lowering treatment based on cardiovascular risk: a meta-analysis of individual patient data. *Lancet.* 2014;384(9943):591-598. doi:10.1016/S0140-6736(14)61212-5
10. Boluyt MO, Bing OHL, Lakatta EG. The ageing spontaneously hypertensive rat as a model of the transition from stable compensated hypertrophy to heart failure. *Eur. Heart J.* 1995;16(suppl N):19-30. doi:10.1093/eurheartj/16.suppl_N.19
11. Brundel BJJM, Ai X, Hills MT, Kuipers MF, Lip GYH, de Groot NMS. Atrial fibrillation. *Nat Rev Dis Primers.* 2022;8(1):21. doi:10.1038/s41572-022-00347-9
12. Burgi K, Cavalleri MT, Alves AS, Britto LRG, Antunes VR, Michelini LC. Tyrosine hydroxylase immunoreactivity as indicator of sympathetic activity: simultaneous evaluation in different tissues of hypertensive rats. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology.* 2011;300(2):R264-R271. doi:10.1152/ajpregu.00687.2009
13. Chinitz L, Böhm M, Evonich R, et al. Long-Term Changes in Atrial Arrhythmia Burden After Renal Denervation Combined With Pulmonary Vein Isolation. *JACC: Clinical Electrophysiology.* Published online June 2024:S2405500X24003839. doi:10.1016/j.jacep.2024.04.035

14. Chow CK, Teo KK, Rangarajan S, et al. Prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension in rural and urban communities in high-, middle-, and low-income countries. *JAMA*. 2013;310(9):959-968. doi:10.1001/jama.2013.184182
15. Chung MK, Martin DO, Sprecher D, et al. C-reactive protein elevation in patients with atrial arrhythmias: inflammatory mechanisms and persistence of atrial fibrillation. *Circulation*. 2001;104(24):2886-2891. doi:10.1161/hc4901.101760
16. Conen D, Tedrow UB, Koplan BA, Glynn RJ, Buring JE, Albert CM. Influence of systolic and diastolic blood pressure on the risk of incident atrial fibrillation in women. *Circulation*. 2009;119(16):2146-2152. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.830042
17. Daenen K, Andries A, Mekahli D, Van Schepdael A, Jouret F, Bammens B. Oxidative stress in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol*. 2019;34(6):975-991. doi:10.1007/s00467-018-4005-4
18. Ding WY, Gupta D, Wong CF, Lip GYH. Pathophysiology of atrial fibrillation and chronic kidney disease. *Cardiovasc Res*. 2021;117(4):1046-1059. doi:10.1093/cvr/cvaa258
19. 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
20. 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
21. Doust J, Lehman R, Glasziou P. The role of BNP testing in heart failure. *Am Fam Physician*. 2006;74(11):1893-1898.
22. Eckardt KU. Chronic Kidney Disease (Not) on the Agenda. *Dtsch Arztebl Int*. 2016;113(6):83-84. doi:10.3238/arztebl.2016.0083
23. Elliott WJ. Systemic hypertension. *Curr Probl Cardiol*. 2007;32(4):201-259. doi:10.1016/j.cpcardiol.2007.01.002
24. Engle SJ, Stockelman MG, Chen J, et al. Adenine phosphoribosyltransferase-deficient mice develop 2,8-dihydroxyadenine nephrolithiasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(11):5307-5312. doi:10.1073/pnas.93.11.5307
25. Evan AP, Bledsoe SB, Connors BA, et al. Sequential analysis of kidney stone formation in the Appt knockout mouse. *Kidney Int*. 2001;60(3):910-923. doi:10.1046/j.1523-1755.2001.060003910.x
26. Fried LF, Emanuele N, Zhang JH, et al. Combined angiotensin inhibition for the treatment of diabetic nephropathy. *N Engl J Med*. 2013;369(20):1892-1903. doi:10.1056/NEJMoa1303154
27. Gallagher S, Winston SE, Fuller SA, Hurrell JGR. Immunoblotting and immunodetection. *Curr Protoc Immunol*. 2001;Chapter 8:8.10.1-8.10.21. doi:10.1002/0471142735.im0810s26
28. Gounden V, Bhatt H, Jialal I. Renal Function Tests. In: *StatPearls*. StatPearls Publishing; 2024. Accessed September 15, 2024.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507821/>

29. Grundvold I, Skretteberg PT, Liestøl K, et al. Upper normal blood pressures predict incident atrial fibrillation in healthy middle-aged men: a 35-year follow-up study. *Hypertension*. 2012;59(2):198-204. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.179713
30. Hall C. Essential biochemistry and physiology of (NT-pro)BNP. *Eur J Heart Fail*. 2004;6(3):257-260. doi:10.1016/j.ejheart.2003.12.015
31. Hamrahan SM, Falkner B. Hypertension in Chronic Kidney Disease. *Adv Exp Med Biol*. 2017;956:307-325. doi:10.1007/5584_2016_84
32. Han X, Zhang S, Chen Z, et al. Cardiac biomarkers of heart failure in chronic kidney disease. *Clin Chim Acta*. 2020;510:298-310. doi:10.1016/j.cca.2020.07.040
33. Hari KJ, Nguyen TP, Soliman EZ. Relationship between P-wave duration and the risk of atrial fibrillation. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*. 2018;16(11):837-843. doi:10.1080/14779072.2018.1533814
34. Harrison DG, Coffman TM, Wilcox CS. Pathophysiology of Hypertension: The Mosaic Theory and Beyond. *Circ Res*. 2021;128(7):847-863. doi:10.1161/CIRCRESAHA.121.318082
35. Hengel FE, Sommer C, Wenzel U. Arterielle Hypertonie – Eine Übersicht für den ärztlichen Alltag. *Dtsch Med Wochenschr*. 2022;147(07):414-428. doi:10.1055/a-1577-8663
36. Hering D, Mahfoud F, Walton AS, et al. Renal denervation in moderate to severe CKD. *J Am Soc Nephrol*. 2012;23(7):1250-1257. doi:10.1681/ASN.2011111062
37. Hering D, Trzebski A, Narkiewicz K. Recent advances in the pathophysiology of arterial hypertension: potential implications for clinical practice. *Pol Arch Intern Med*. 2017;127(3):195-204. doi:10.20452/pamw.3971
38. Hindricks G, Potpara T, Dagres N, et al. 2020 ESC Guidelines for the diagnosis and management of atrial fibrillation developed in collaboration with the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). *Eur. Heart J*. 2021;42(5):373-498. doi:10.1093/eurheartj/ehaa612
39. Hoffmann F, Boeschen D, Dörks M, Herget-Rosenthal S, Petersen J, Schmiemann G. Renal Insufficiency and Medication in Nursing Home Residents. A Cross-Sectional Study (IMREN). *Dtsch Arztebl Int*. 2016;113(6):92-98. doi:10.3238/arztebl.2016.0092
40. Hohl M, Selejan SR, Wintrich J, et al. Renal Denervation Prevents Atrial Arrhythmogenic Substrate Development in CKD. *Circ Res*. 2022;130(6):814-828. doi:10.1161/CIRCRESAHA.121.320104
41. Hou Y, Hu J, Po SS, et al. Catheter-based renal sympathetic denervation significantly inhibits atrial fibrillation induced by electrical stimulation of the left stellate ganglion and rapid atrial pacing. *PLoS One*. 2013;8(11):e78218. doi:10.1371/journal.pone.0078218
42. Hultström M. Development of structural kidney damage in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Hypertension*. 2012;30(6):1087-1091. doi:10.1097/HJH.0b013e328352b89a
43. İnal M, Kanbak G, Şen S, Akyüz F, Sunal E. Antioxidant status and lipid peroxidation in hemodialysis patients undergoing erythropoietin and erythropoietin-vitamin E

- combined therapy. *Free Radical Research*. 1999;31(3):211-216. doi:10.1080/10715769900300771
44. Jordan J. Pathophysiologie der Hypertonie: Was sind unsere aktuellen Vorstellungen? *Internist*. 2015;56(3):219-223. doi:10.1007/s00108-014-3572-0
 45. Kallistratos MS, Poulimenos LE, Manolis AJ. Atrial fibrillation and arterial hypertension. *Pharmacol Res*. 2018;128:322-326. doi:10.1016/j.phrs.2017.10.007
 46. 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
 47. Kaufman S. Tyrosine hydroxylase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*. 1995;70:103-220. doi:10.1002/9780470123164.ch3
 48. Kielkopf CL, Bauer W, Urbatsch IL. Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. *Cold Spring Harb Protoc*. 2021;2021(12):pdb.prot102228. doi:10.1101/pdb.prot102228
 49. Kim K, Anderson EM, Thome T, et al. Skeletal myopathy in CKD: a comparison of adenine-induced nephropathy and 5/6 nephrectomy models in mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2021;321(1):F106-F119. doi:10.1152/ajprenal.00117.2021
 50. Kintscher U, Böhm M, Goss F, et al. Kommentar zur 2013-ESH/ESC-Leitlinie zum Management der arteriellen Hypertonie. *Kardiologe*. 2014;8(3):223-230. doi:10.1007/s12181-014-0575-y
 51. Klinkhammer BM, Djedjaj S, Kunter U, et al. Cellular and Molecular Mechanisms of Kidney Injury in 2,8-Dihydroxyadenine Nephropathy. *JASN*. 2020;31(4):799-816. doi:10.1681/ASN.2019080827
 52. Kobori H, Nangaku M, Navar LG, Nishiyama A. The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacol Rev*. 2007;59(3):251-287. doi:10.1124/pr.59.3.3
 53. Kornej J, Börschel CS, Benjamin EJ, Schnabel RB. Epidemiology of Atrial Fibrillation in the 21st Century: Novel Methods and New Insights. *Circ Res*. 2020;127(1):4-20. doi:10.1161/CIRCRESAHA.120.316340
 54. Larosa V, Remacle C. Insights into the respiratory chain and oxidative stress. *Biosci Rep*. 2018;38(5):BSR20171492. doi:10.1042/BSR20171492
 55. Laukkonen JA, Zaccardi F, Karppi J, Ronkainen K, Kurl S. Reduced kidney function is a risk factor for atrial fibrillation. *Nephrology (Carlton)*. 2016;21(8):717-720. doi:10.1111/nep.12727
 56. Levey AS, Coresh J. Chronic kidney disease. *Lancet*. 2012;379(9811):165-180. doi:10.1016/S0140-6736(11)60178-5
 57. Lewington S, Clarke R, Qizilbash N, Peto R, Collins R, Prospective Studies Collaboration. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet*. 2002;360(9349):1903-1913. doi:10.1016/s0140-6736(02)11911-8

58. Lim SS, Vos T, Flaxman AD, et al. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012;380(9859):2224-2260. doi:10.1016/S0140-6736(12)61766-8
59. Linz D, Elliott AD, Hohl M, et al. Role of autonomic nervous system in atrial fibrillation. *Int J Cardiol*. 2019;287:181-188. doi:10.1016/j.ijcard.2018.11.091
60. Linz D, Hohl M, Elliott AD, et al. Modulation of renal sympathetic innervation: recent insights beyond blood pressure control. *Clin Auton Res*. 2018;28(4):375-384. doi:10.1007/s10286-018-0508-0
61. Linz D, Hohl M, Nickel A, et al. Effect of renal denervation on neurohumoral activation triggering atrial fibrillation in obstructive sleep apnea. *Hypertension*. 2013;62(4):767-774. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01728
62. Linz D, van Hunnik A, Hohl M, et al. Catheter-based renal denervation reduces atrial nerve sprouting and complexity of atrial fibrillation in goats. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2015;8(2):466-474. doi:10.1161/CIRCEP.114.002453
63. Linz D, Ukena C, Mahfoud F, Neuberger HR, Böhm M. Atrial autonomic innervation: a target for interventional antiarrhythmic therapy? *J Am Coll Cardiol*. 2014;63(3):215-224. doi:10.1016/j.jacc.2013.09.020
64. Lip GYH, Tse HF, Lane DA. Atrial fibrillation. *Lancet*. 2012;379(9816):648-661. doi:10.1016/S0140-6736(11)61514-6
65. Lippi G, Sanchis-Gomar F, Cervellin G. Global epidemiology of atrial fibrillation: An increasing epidemic and public health challenge. *Int J Stroke*. 2021;16(2):217-221. doi:10.1177/1747493019897870
66. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265-275.
67. Mahfoud F, Vonend O, Bruck H, et al. [Expert consensus statement on interventional renal sympathetic denervation for hypertension treatment]. *Dtsch Med Wochenschr*. 2011;136(47):2418. doi:10.1055/s-0031-1272580
68. Manolis AJ, Poulimenos LE, Kallistratos MS, Gavras I, Gavras H. Sympathetic overactivity in hypertension and cardiovascular disease. *Curr Vasc Pharmacol*. 2014;12(1):4-15. doi:10.2174/15701611113119990140
69. Marx N, Floege J, Böhm M. Herz und Niere. In: Marx N, Erdmann E, eds. *Klinische Kardiologie*. Springer Reference Medizin. Springer Berlin Heidelberg; 2022:1-15. doi:10.1007/978-3-662-62939-0_10-1
70. 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
71. Monge M, Lorthioir A, Bobrie G, et al. La dénervation rénale endovasculaire dans le traitement de l'hypertension artérielle résistante. *Journal des Maladies Vasculaires*. 2013;38(6):367-372. doi:10.1016/j.jmv.2013.09.002
72. Nadruz W. Myocardial remodeling in hypertension. *J Hum Hypertens*. 2015;29(1):1-6. doi:10.1038/jhh.2014.36

73. Nakagawa Y, Nishikimi T, Kuwahara K. Atrial and brain natriuretic peptides: Hormones secreted from the heart. *Peptides*. 2019;111:18-25.
doi:10.1016/j.peptides.2018.05.012
74. Nath KA. Human AKI and heme oxygenase-1. *J Am Soc Nephrol*. 2012;23(6):971-974.
doi:10.1681/ASN.2012040380
75. Nattel S. New ideas about atrial fibrillation 50 years on. *Nature*. 2002;415(6868):219-226. doi:10.1038/415219a
76. Nattel S, Heijman J, Zhou L, Dobrev D. Molecular Basis of Atrial Fibrillation Pathophysiology and Therapy: A Translational Perspective. *Circ Res*. 2020;127(1):51-72. doi:10.1161/CIRCRESAHA.120.316363
77. Ni D, Xu P, Gallagher S. Immunoblotting and Immunodetection. *CP Cell Biology*. 2017;74(1). doi:10.1002/cpcb.18
78. Okamoto K, Aoki K. Development of a Strain of Spontaneously Hypertensive Rats. *Jpn Circ J*. 1963;27(3):282-293. doi:10.1253/jcj.27.282
79. Olson BJSC. Assays for Determination of Protein Concentration. *CP Pharmacology*. 2016;73(1). doi:10.1002/cpph.3
80. Ott C, Mahfoud F, Schmid A, et al. Renal denervation preserves renal function in patients with chronic kidney disease and resistant hypertension. *J. Hypertens*. 2015;33(6):1261-1266. doi:10.1097/HJH.0000000000000556
81. Ouyang F, Tilz R, Chun J, et al. Long-term results of catheter ablation in paroxysmal atrial fibrillation: lessons from a 5-year follow-up. *Circulation*. 2010;122(23):2368-2377. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.946806
82. Packer DL, Kowal RC, Wheelan KR, et al. Cryoballoon Ablation of Pulmonary Veins for Paroxysmal Atrial Fibrillation. *J. Am. Coll. Cardiol*. 2013;61(16):1713-1723.
doi:10.1016/j.jacc.2012.11.064
83. Palano F, Adduci C, Cosentino P, Silvetti G, Boldini F, Francia P. Assessing Atrial Fibrillation Substrates by P Wave Analysis: A Comprehensive Review. *High Blood Press Cardiovasc Prev*. 2020;27(5):341-347. doi:10.1007/s40292-020-00390-1
84. Parameswaran R, Al-Kaisey AM, Kalman JM. Catheter ablation for atrial fibrillation: current indications and evolving technologies. *Nat Rev Cardiol*. 2021;18(3):210-225.
doi:10.1038/s41569-020-00451-x
85. Parkash R, Wells GA, Rouleau J, et al. Randomized Ablation-Based Rhythm-Control Versus Rate-Control Trial in Patients With Heart Failure and Atrial Fibrillation: Results from the RAFT-AF trial. *Circulation*. 2022;145(23):1693-1704.
doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.121.057095
86. Pokushalov E, Romanov A, Corbucci G, et al. A Randomized Comparison of Pulmonary Vein Isolation With Versus Without Concomitant Renal Artery Denervation in Patients With Refractory Symptomatic Atrial Fibrillation and Resistant Hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol*. 2012;60(13):1163-1170. doi:10.1016/j.jacc.2012.05.036
87. Qiu H, Ji C, Liu W, et al. Chronic Kidney Disease Increases Atrial Fibrillation Inducibility: Involvement of Inflammation, Atrial Fibrosis, and Connexins. *Front Physiol*. 2018;9:1726. doi:10.3389/fphys.2018.01726

88. Rabkin SW, Tang JKK. The Short QTc Is a Marker for the Development of Atrial Flutter and Atrial Fibrillation. *Cardiol Res Pract*. 2020;2020:2858149. doi:10.1155/2020/2858149
89. Rapsomaniki E, Timmis A, George J, et al. Blood pressure and incidence of twelve cardiovascular diseases: lifetime risks, healthy life-years lost, and age-specific associations in 1·25 million people. *Lancet*. 2014;383(9932):1899-1911. doi:10.1016/S0140-6736(14)60685-1
90. References. *Kidney International Supplements*. 2013;3(1):136-150. doi:10.1038/kisup.2012.72
91. Safar ME. Pulse pressure, arterial stiffness and wave reflections (augmentation index) as cardiovascular risk factors in hypertension. *Ther Adv Cardiovasc Dis*. 2008;2(1):13-24. doi:10.1177/1753944707086652
92. Schmieder RE, Mahfoud F, Azizi M, et al. European Society of Hypertension position paper on renal denervation 2018. *J Hypertens*. 2018;36(10):2042-2048. doi:10.1097/HJH.0000000000001858
93. Scholze J. Isolierte systolische Hypertonie: Ein eigenständiges Krankheitsbild. *Herz*. 2010;35(8):568-575. doi:10.1007/s00059-010-3390-7
94. Schotten U, Verheule S, Kirchhof P, Goette A. Pathophysiological Mechanisms of Atrial Fibrillation: A Translational Appraisal. *Physiological Reviews*. 2011;91(1):265-325. doi:10.1152/physrev.00031.2009
95. Selejan SR, 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
96. Sindhu RK, Ehdaie A, Farmand F, et al. Expression of catalase and glutathione peroxidase in renal insufficiency. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2005;1743(1-2):86-92. doi:10.1016/j.bbamcr.2004.08.013
97. Sitter T. Kreatinin und glomeruläre Filtrationsrate (GFR): Serie Laborparameter, Folge 6. *MMW - Fortschritte der Medizin*. 2021;163(10):50-51. doi:10.1007/s15006-021-9853-3
98. Sohns C, Marrouche NF. Atrial fibrillation and cardiac fibrosis. *Eur. Heart J*. 2020;41(10):1123-1131. doi:10.1093/eurheartj/ehz786
99. Sonagra AD, Dholariya SJ. Electrophoresis. In: *StatPearls*. StatPearls Publishing; 2024. Accessed September 7, 2024. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK585057/>
100. Song J, Navarro-Garcia JA, Wu J, et al. Chronic kidney disease promotes atrial fibrillation via inflammasome pathway activation. *J. Clin. Invest*. 2023;133(19):e167517. doi:10.1172/JCI167517
101. Speer T, Schunk SJ, Fliser D. [Chronic kidney disease-a cardiovascular high-risk constellation]. *Internist (Berl)*. 2020;61(4):340-348. doi:10.1007/s00108-019-00686-y
102. Steffen HM. Die Epidemiologie der Hypertonie in Deutschland. *MMW - Fortschritte der Medizin*. 2016;158(17):63-70. doi:10.1007/s15006-016-8781-0

103. Ukena C, Becker N, Pavlicek V, et al. Catheter-based renal denervation as adjunct to pulmonary vein isolation for treatment of atrial fibrillation: a systematic review and meta-analysis. *J. Hypertens.* 2020;38(5):783-790.
doi:10.1097/HJH.0000000000002335
104. Ukena C, Mahfoud F, Spies A, et al. Effects of renal sympathetic denervation on heart rate and atrioventricular conduction in patients with resistant hypertension. *Int J Cardiol.* 2013;167(6):2846-2851. doi:10.1016/j.ijcard.2012.07.027
105. Veiga GL, Nishi EE, Estrela HF, et al. Total renal denervation reduces sympathoexcitation to different target organs in a model of chronic kidney disease. *Auton Neurosci.* 2017;204:81-87. doi:10.1016/j.autneu.2016.11.006
106. Watanabe H, Watanabe T, Sasaki S, Nagai K, Roden DM, Aizawa Y. Close bidirectional relationship between chronic kidney disease and atrial fibrillation: The Niigata preventive medicine study. *Am. Heart J.* 2009;158(4):629-636.
doi:10.1016/j.ahj.2009.06.031
107. Webster AC, Nagler EV, Morton RL, Masson P. Chronic Kidney Disease. *Lancet.* 2017;389(10075):1238-1252. doi:10.1016/S0140-6736(16)32064-5
108. Wermelt JA, Schunkert H. Management der arteriellen Hypertonie. *Herz.* 2017;42(5):515-526. doi:10.1007/s00059-017-4574-1
109. Wijesurendra RS, Casadei B. Mechanisms of atrial fibrillation. *Heart.* 2019;105(24):1860-1867. doi:10.1136/heartjnl-2018-314267
110. Williams B, Mancia G, Spiering W, et al. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. *Eur. Heart J.* 2018;39(33):3021-3104.
doi:10.1093/eurheartj/ehy339
111. Xie X, Liu Y, Perkovic V, et al. Renin-Angiotensin System Inhibitors and Kidney and Cardiovascular Outcomes in Patients With CKD: A Bayesian Network Meta-analysis of Randomized Clinical Trials. *Am J Kidney Dis.* 2016;67(5):728-741.
doi:10.1053/j.ajkd.2015.10.011
112. Yamaguchi T. Atrial structural remodeling and atrial fibrillation substrate: A histopathological perspective. *J. Cardiol.* Published online May 2024:S0914508724000960. doi:10.1016/j.jcc.2024.05.007
113. Younis A, Steinberg JS. Renal Denervation for Patients With Atrial Fibrillation. *Curr Cardiol Rep.* 2021;23(9):126. doi:10.1007/s11886-021-01558-4
114. Zhai H, Ni L, Wu X. The roles of heme oxygenase-1 in renal disease. *Front Nephrol.* 2023;3:1156346. doi:10.3389/fneph.2023.1156346
115. Zimmerman D, Sood MM, Rigatto C, Holden RM, Hiremath S, Clase CM. Systematic review and meta-analysis of incidence, prevalence and outcomes of atrial fibrillation in patients on dialysis. *Nephrol Dial Transplant.* 2012;27(10):3816-3822.
doi:10.1093/ndt/gfs416

Poster

M. Hohl, SR. Selejan, J. Wintrich, **A. Schulz**, J. Hoenig, M. Mauz, V. Pfau, T. Speer, F. Mahfoud, M. Böhm: „Role of renal sympathetic nerve activation in CKD-associated cardiovascular disease and the development of malignant arrhythmias - A pilot study“ auf der 88. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie in Mannheim am 21. April 2022

M. Hohl, SR. Selejan, J. Wintrich, **A. Schulz**, J. Hoenig, M. Mauz, V. Pfau, T. Speer, F. Mahfoud, M. Böhm: „Role of renal sympathetic nerve activation in CKD-associated cardiovascular disease and the development of malignant arrhythmias - A pilot study“ auf dem SFB-TRR219 annual meeting in Seehausen am 06. Mai 2022

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

Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank meinem Doktorvater Prof. Dr. Michael Böhm dafür, dass er mir diese Promotion ermöglicht hat. Ich bedanke mich für das mir entgegengebrachte Vertrauen und dafür, dass mein Interesse für die Forschung und die Motivation für das wissenschaftliche Arbeiten stets von ihm gefördert wurden.

Größter Dank gebührt meinem Betreuer Dr. Mathias Hohl. Ich möchte mich für das immerzu offene Ohr bedanken, dass er mir alle Fragen zu jeder Zeit beantworten konnte und dabei nie seine herzliche und humorvolle Art verloren hat. Einen besseren Betreuer hätte ich mir nicht wünschen können!

Ein besonderer Dank geht an Nina Rebmann, Jeanette Zimolong, Simone Jäger, Laura Frisch und Julia Weber. Ich wurde nicht nur sehr herzlich in das Labor aufgenommen, sondern wurde auch zu jeder Zeit tatkräftig bei allen Anliegen rund um die Experimente unterstützt.

Des Weiteren danke ich allen Mitarbeitern der Nephrologie für die gute Zusammenarbeit und Hilfe bei der Auswertung meiner Ergebnisse. Zudem möchte ich mich herzlichst bei Herrn Hübner und den Mitarbeitern des Zentrallabors des Universitätsklinikum des Saarlandes bedanken für die Quantifizierung der Gewebeproben.

An dieser Stelle möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, meinen Eltern und Großeltern, welche es mir ermöglicht hat, meinen Kindheitstraum in die Realität umzusetzen. Ein besonderer Dank gebührt meiner Mutter, welche unermüdlich meine Arbeit Korrektur gelesen hat.

Zum Schluss möchte ich meinem Liebsten David danken. Seit Beginn meines Studiums konnte ich immer, ohne Ausnahme, mit seiner Unterstützung rechnen in Form von aufbauenden Worten, technischen Hilfen oder medizinischen Nachfragen und natürlich kulinarischer Verpflegung.

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberaterinnen/Promotionsberater oder anderer Personen) in Anspruch genommen. Außer den Angegebenen hat niemand von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder in ähnlicher Form in einem anderen Verfahren zur Erlangung des Doktorgrades einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Die Bedeutung der eidesstattlichen Erklärung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Erklärung sind mir bekannt.

Saarbrücken, den 08.01.2025

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Anika Schulz". The signature is fluid and cursive, with the first name starting with a capital 'A' and the last name with a capital 'S'.

Anika Schulz

Lebenslauf

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