

Aus der Medizinischen Klinik für Nephrologie
Charité - Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

eingereicht über das Institut für Veterinär-Anatomie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Histologische und histochemische Untersuchungen bei Mäusen mit Urämie nach
Gabe von Mycophenolsäure**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Simone Boes
Tierärztin
aus Bochum

Berlin 2015

Journal-Nr.: 3800

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Univ.- Prof. Dr. Johanna Plendl
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. van der Giet
Dritter Gutachter: Univ.- Prof. Dr. Christa Thöne-Reineke

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

mice, cardiovascular diseases, uraemia, animal models, histology,
calcification, heart

Tag der Promotion: 16.10.2015

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-661-6

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2015

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Coverbild vorne ©7activestudio - Fotolia.com

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2015

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

**Meinen lieben Eltern in Dankbarkeit dafür, dass sie mir auch in schweren Zeiten immer
alle Wege offen gehalten haben**

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
1 Einleitung	1
1.1 Pathologische Kalzifizierung.....	1
1.2 Kardiovaskuläre Kalzifizierung	2
1.2.1 Pathogenese der Arteriosklerose	3
1.2.2 Folgen der Arteriosklerose	5
1.2.3 Therapieansätze bei der Arteriosklerose	6
1.3 Niereninsuffizienz, Nierentransplantation und immunsuppressive Therapie	9
1.4 Mycophenolsäure.....	10
1.5 Tiermodelle der medialen Kalzifizierung.....	11
1.6 Ziel der Arbeit.....	13
2 Material und Methoden.....	14
2.1 Versuchstiere und deren Haltung	14
2.2 Tiermodell	14
2.3 Körpergewichtsbestimmung	15
2.4 Operationen	15
2.5 Pumpenimplantation und -wechsel.....	19
2.6 Blutentnahme	20
2.7 Organentnahme	21
2.8 Blutparameterbestimmung	21
2.8.1 Bluttrockenchemie.....	21
2.8.2 Parathormon-ELISA	22
2.9 Histologische Aufarbeitung.....	23
2.9.1 Fixierung, Entwässerung und Einbetten	23
2.9.2 Anfertigen der Paraffinschnitte	23

Inhaltsverzeichnis

2.9.3	Entparaffinierung und Hydratisierung	25
2.9.4	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	25
2.9.5	Alizarinrot S-Färbung	26
2.9.6	Von Kossa-Färbung	27
2.10	Histomorphometrische Untersuchung der rechten Niere und des Herzens.....	28
2.11	Histomorphologische Quantifizierung der Kalziumablagerungen im Herzen.....	28
2.12	Biochemische Kalziumbestimmung im Herzen	32
2.13	Statistik	33
3	Ergebnisse	34
3.1	Mortalität	34
3.2	Messungen des Körpergewichts im Verlauf.....	35
3.3	Sektionsbefunde	37
3.4	Herzgewichte	38
3.5	Bluttrochemie.....	39
3.6	Parathormon-ELISA	42
3.7	Histomorphologische Untersuchung der rechten Niere und des Herzens.....	43
3.7.1	Rechte Niere	43
3.7.2	Herz	48
3.8	Histomorphometrische Quantifizierung der Kalziumablagerungen im Herzen.....	53
3.9	Biochemische Kalziumbestimmung im Herzen	54
4	Diskussion.....	55
4.1	Bewertung der Methoden und Ergebnisse.....	60
4.2	Ausblick.....	62
5	Zusammenfassung.....	65
6	Summary.....	67
	Literaturverzeichnis	69
	Danksagung	77
	Selbständigkeitserklärung	78

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Nomenklatur der biologischen Kalzifizierungen.....	2
Abbildung 1.2 Mit dem Verlust der arteriellen Gefäßelastizität (rechts) treten folgende Veränderungen der aortalen Blutdruckkonfiguration auf.	5
Abbildung 1.3 Gestörter Mineralstoffwechsel bei CKD-Patienten und die zentrale Rolle der Hyperphosphatämie.	8
Abbildung 1.4 Strukturformeln von Mycophenolsäure und Mycophenolat-Mofetil.	10
Abbildung 2.1 Versuchsablauf.	15
Abbildung 2.2 Darstellung des operativen Arbeitsplatzes (A) und der mikrochirurgischen Instrumente (B).....	18
Abbildung 2.3 Darstellung des Querschnitts einer Alzet [®] -Minipumpe.	20
Abbildung 2.4 Darstellung des Rotationsmikrotoms mit Schnitttransfersystem.	24
Abbildung 2.5 a Quantitative Histomorphometrie.....	29
Abbildung 3.1 Kaplan-Meier-Kurve nach Induktion einer Urämie bei Mäusen, mediane Überlebenszeit in %.	35
Abbildung 3.2 Kontrolle des Körpergewichts der Mäuse.....	36
Abbildung 3.3 Herzgewichte im Gruppenvergleich bezogen auf das Körpergewicht der Mäuse nach 16 VW.	39
Abbildung 3.4 Parathormon (PTH)-Konzentration im Blutplasma.	42
Abbildung 3.5 Histologische Übersichtsaufnahme einer Niere der Kontrollgruppe, HE-Färbung.....	43
Abbildung 3.6 Detailaufnahme des Nierenrindengewebes der Kontrollgruppe, HE-Färbung.....	44
Abbildung 3.7 Histologische Übersichtsaufnahme der rechten Niere der Nephrektomiegruppe, HE-Färbung.....	45
Abbildung 3.8 Detailansicht des nicht-nephrektomierten Anteils in der rechten Niere der Nephrektomiegruppe, HE-Färbung.....	46
Abbildung 3.9 Detailansicht des nephrektomierten Anteils in der rechten Niere, HE-Färbung.	46
Abbildung 3.10 Histologische Übersichtsaufnahmen der rechten Niere der Kontrollgruppe.	47
Abbildung 3.11 Histologische Übersichtsaufnahmen der rechten Niere der Nephrektomiegruppe.....	47
Abbildung 3.12 Histologische Übersichtsaufnahmen des Herzens der Kontrolle (A) und der LM-Gruppe (B), HE-Färbung.	48
Abbildung 3.13 Detailaufnahme der Herzmuskulatur der Kontrollgruppe, HE-Färbung.....	49
Abbildung 3.14: Detailaufnahme der Herzmuskulatur der LM-Gruppe, HE-Färbung.....	49

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.15 Histologische Übersichtsaufnahmen des Herzens der LD- (A) und der HD-Gruppe (B), HE-Färbung.....	50
Abbildung 3.16 Detailaufnahme der Herzmuskulatur der LD-Gruppe, HE-Färbung.	51
Abbildung 3.17 Detailaufnahme der Herzmuskulatur der HD-Gruppe, HE-Färbung.....	51
Abbildung 3.18 Histologische Übersichtsaufnahmen der Herzanschnitte der Kontrolle (A), der LM- (B), der LD- (C) und der HD-Gruppe (D).....	52
Abbildung 3.19 Relative Kalziumfläche im Herzen in %.....	53
Abbildung 3.20 Biochemische Kalziumbestimmung im Herzen.....	54

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1 Mortalität der Gruppen.	34
Tabelle 3.2 Sektionsbefunde.	37
Tabelle 3.3 Herzgewichte im Gruppenvergleich und bezogen auf das Körpergewicht der Mäuse nach VW 16.	38
Tabelle 3.4 Blutparameter der Mäuse.....	40
Tabelle 3.5 Relative Kalziumfläche im Herzen.....	53
Tabelle 3.6 Relativer Kalziumgehalt im Herzen.	54

Abkürzungsverzeichnis

ALP	alkalische Phosphatase
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
BUN	<i>blood urea nitrogen</i> , Harnstoff-Stickstoff
Cbfa1	core binding factor α -1
CHOL	Gesamtcholesterin
CKD	<i>chronic kidney disease</i> , chronische Nierenerkrankung
CVCs	<i>calcifying vascular cells</i> , kalzifizierende vaskuläre Zellen
DBA/2	Mausinzuchtstamm, DBA/2 NCrl, <i>diluted brown non-agouti</i>
DCC	<i>dystrophic cardiac calcification</i> , dystrophe kardiale Kalzifizierung
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay, antikörperbasiertes Nachweisverfahren
ESRD	<i>end-stage renal disease</i> , terminales Nierenversagen
FGF 23	fibroblast growth factor, Fibroblasten-Wachstumsfaktor
HCl	Salzsäure
HD	<i>high dose</i> , Hochdosis
HE	Hämatoxylin-Eosin
HP	Hochphosphatdiät
IP	<i>inorganic phosphate</i> , anorganisches Phosphat
KGW	Körpergewicht
LD	<i>low dose</i> , Niedrigdosis
LM	Lösungsmittel
MGP	Matrix-Gla Protein
MMF	Mycophenolat-Mofetil
MPA	Mycophenolic acid, Mycophenolsäure
OD	optische Dichte
OPG	Osteoprotegerin
OPN	Osteopontin
P	Pumpe
PPi	Pyrophosphat

PTH	Parathormon
PW	Pumpenwechsel
RPM	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungszahl pro Minute
VSMCs	<i>vascular smooth muscle cells</i> , glatte Gefäßmuskelzellen
VW	Versuchswoche

1 Einleitung

1.1 Pathologische Kalzifizierung

Unter einer Kalzifizierung ist die Ablagerung von unlöslichen Kalziumsalzen im Gewebe zu verstehen, insbesondere Hydroxylapatit mit der Summenformel $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$. Die physiologische Verkalkung ist auf Gewebe wie Knochen, Zähne und bestimmte Bereiche des Knorpels beschränkt. Die pathologische Kalzifizierung in Weichteilgeweben wird als ektopische Kalzifizierung bezeichnet und kann schwerwiegende Folgen für den Organismus haben (Abbildung 1.1). Deswegen ist das Verständnis der Faktoren und Mechanismen, die den Kalzifizierungsprozess regulieren, wichtig für die Entwicklung neuer Therapieansätze (Kirsch, 2012). Man unterscheidet zwei Formen der pathologischen Kalzifizierung: die metastatische und die dystrophe Verkalkung (Govan et al., 1991). Die metastatische Verkalkung tritt im vorher gesunden Gewebe auf, wohingegen die dystrophe Verkalkung in bereits vorgeschädigtem Gewebe anzutreffen ist. Metastatische Verkalkungen sind verknüpft mit einem Ungleichgewicht im systemischen Kalzium- oder Phosphatstoffwechsel (Parfitt, 1969). Sie sind u.a. bei chronischer Niereninsuffizienz (CKD), in Gefäßen, im Herzen und anderen Weichteilgeweben zu finden (Govan et al., 1991). Bei dystrophen Verkalkungen ist der Kalzium- und Phosphatstoffwechsel nicht gestört (Derici und El Nahas, 2006). Die dystrophe kardiale Kalzifizierung (DCC) wurde 1964 bereits durch Dipaolo et al. in einigen Inzuchtmausstämmen, wie z. B. DBA/2 NCrI (DBA/2) entdeckt (Dipaolo et al., 1964, Imaoka et al., 1986). Hierbei ist nicht nur das Herz betroffen, es lassen sich vielmehr auch andere Lokalisationen, wie z. B. die Nieren und die Zunge feststellen (Rings und Wagner, 1972). Als Ursache spielen genetische und exogene Faktoren eine Rolle, wie z. B. phosphatreiches und magnesiumarmes Futter bei DBA/2 Mäusen (van den Broek und Beynen, 1998, Korff et al., 2006). *Dyscalc1* wurde als Hauptgenlocus bei der DCC identifiziert (Korff et al., 2006).

1 Einleitung

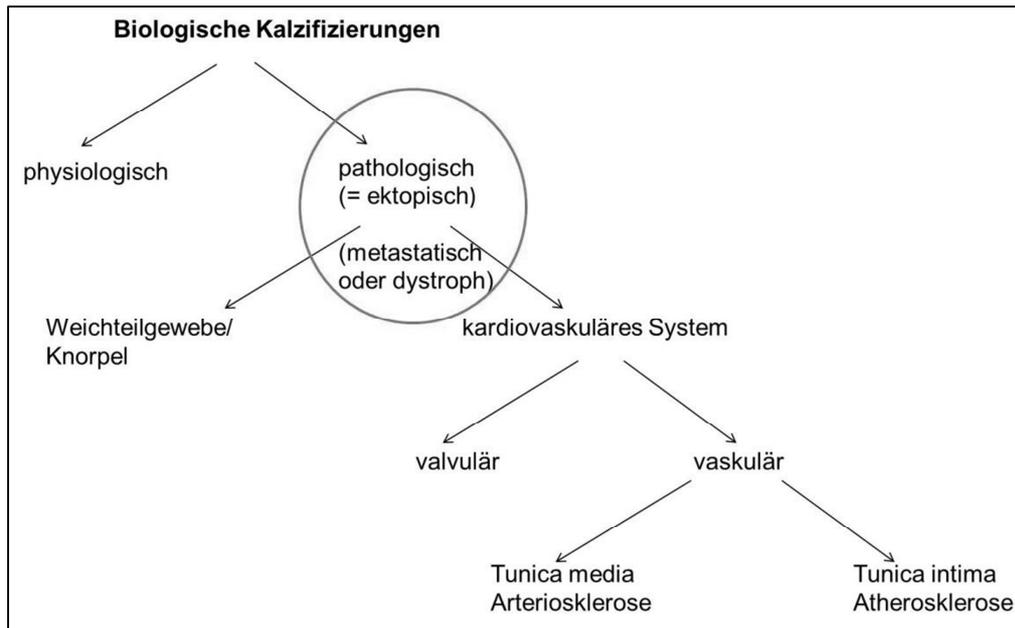


Abbildung 1.1 Nomenklatur der biologischen Kalzifizierungen.

Es gibt physiologische und pathologische Verkalkungsformen. Die pathologischen oder sog. ektopischen Kalzifizierungen lassen sich je nach Ablagerungsort in Weichteil- und Knorpelgewebe und Verkalkungen des kardiovaskulären Systems unterteilen. Sie können in gesundem Gewebe in metastatischer und in vorgeschädigtem Gewebe in dystropher Form vorkommen. Verkalkungen des kardiovaskulären Systems werden in die valvulären und die vaskulären Verkalkungen unterteilt. Im vaskulären System gibt es die Arterio- und die Atherosklerose. Modifiziert nach Lanzer (Lanzer et al., 2014).

1.2 Kardiovaskuläre Kalzifizierung

Herz-Kreislaferkrankungen gehören, neben Tumorerkrankungen, nach dem statistischen Bundesamt zu den Haupttodesursachen in Deutschland (Statistisches Bundesamt, 2012). Klinisch stellen kardiovaskuläre Verkalkungen dabei ein erhebliches Problem dar und sind weder ausschließlich metastatische noch dystrophe Verkalkungen, sondern gehören beiden Formen von Verkalkungen an. Ein passender Begriff wäre hier die „urämische Kalzifizierung“ (Deric und El Nahas, 2006). Die kardiovaskuläre Verkalkung umfasst die pathologische Kalziumphosphatablagerung in den Blutgefäßen, im Myokard und in den Herzklappen (Abbildung 1.1). Die klinischen Konsequenzen dieser Verkalkungen sind abhängig von deren Ausmaß und deren Lokalisation.

Bei der Entwicklung von Herz-Kreislaferkrankungen kommt der Atherosklerose und der Arteriosklerose eine große Bedeutung zu (Edwards et al., 2006). Während die Atherosklerose ein inflammatorischer Prozess der *Tunica intima* der Gefäße ist (Wu et al., 2013), handelt es sich bei der Arteriosklerose nicht um einen entzündlichen Vorgang (Moe und Chen, 2005). Außerdem führt die Arteriosklerose nicht zu einer Gefäßverengung durch atherogene Plaques, sondern zu einer Gefäßversteifung (O'Neill und Lomashvili, 2010), was ein entscheidender Faktor hinsichtlich der Entstehung von Folgeerkrankungen ist. Auf das Krankheitsbild der Atherosklerose soll hier nicht näher eingegangen werden, da sie nicht Gegenstand dieser Arbeit ist. Die Arteriosklerose ist hingegen in der *Tunica media* der

Gefäße lokalisiert (Edwards et al., 2006). 1903 wurde die sog. Mönckebergklerose erstmals als mediale Kalzifizierung der Arterien des muskulären Typs beschrieben (Amann, 2008). Die mediale Schicht der Gefäßwand besteht aus glatten Muskelzellen und elastinreicher, extrazellulärer Matrix. Besonders bei CKD-Patienten stellen kardiovaskuläre Erkrankungen eine erhebliche klinische Belastung dar (London et al., 1996). Patienten mit CKD können die Athero- und die Arteriosklerose gleichzeitig ausbilden (London et al., 2003). Neben den klassischen Risikofaktoren der Arteriosklerose wie z. B. Diabetes mellitus, Hypertonie und höheres Alter treten auch noch urämiespezifische Risikofaktoren hinzu wie z. B. ein erhöhtes Kalzium-Phosphat-Produkt, der Hyperparathyreoidismus und Urämietoxine (Derici und El Nahas, 2006).

1.2.1 Pathogenese der Arteriosklerose

Die Pathogenese der Arteriosklerose ist noch nicht vollständig erforscht. Neuere Studien zeigen, dass die vaskuläre Kalzifizierung bei der Urämie kein passiver, metastatischer Prozess als Folge eines erhöhten Kalzium-Phosphat-Produkts ist (Jablonski und Chonchol, 2013). Vielmehr handelt es sich um einen aktiven zellmedierten Prozess, bei dem die glatten Gefäßmuskelzellen (VSMCs) in der Media der Gefäßwand verkalken (Mizobuchi et al., 2009, Zhang et al., 2013), was eine Versteifung der Gefäße zur Folge hat. Hierbei kommt es zu einer Transformation der VSMCs zu Osteoblasten-ähnlichen Zellen (Giachelli et al., 2005). In der Folge bildet dieser proliferative, synthetische Phänotyp extrazelluläre Matrix aus. Diese Transformation kann durch oxidativen Stress und eine Abnahme des Pyrophosphatgehalts induziert werden (Mizobuchi et al., 2009). Bei der Urämie steigt der oxidative Stress noch an (Annuk et al., 2001). Einige prokalzifizierende oder anti-kalzifizierende Substanzen beeinflussen die vaskuläre Verkalkung. Dadurch wird grundsätzlich die ektopische Kalzifizierung vermieden. Unter pathologischen Bedingungen, wie z. B. bei der CKD ist diese Balance gestört (Derici und El Nahas, 2006). Physiologische Inhibitoren sind unter anderem: Matrix-Gla Protein (MGP), Fetuin A (*α 2-Heremans-Schmid glycoprotein*), Pyrophosphat (PPi), Osteoprotegerin (OPG) und Osteopontin (OPN) (Derici und El Nahas, 2006, Giachelli et al., 2005).

MGP wird grundsätzlich in hohem Grad im Knorpel und VSMCs exprimiert. MGP-*knockout* Mäuse sterben innerhalb von zwei Monaten wegen einer Gefäßruptur oder einer Herzinsuffizienz. Dies ist ein Resultat der erheblichen vaskulären Verkalkung. Zusätzlich zeigen diese Mäuse eine pathologische Knorpelverkalkung und Osteopenie (Luo et al., 1997).

Fetuin A ist ein Kalzium gebundenes Glykoprotein, welches im Serum zu finden ist (Schinke et al., 1996). Bei Dialysepatienten wird die vaskuläre Kalzifizierung dadurch gefördert, dass

1 Einleitung

bei ihnen im Vergleich zu gesunden Probanden eine geringere Fetuin A-Konzentration vorhanden ist (Ketteler et al., 2003)

Die gewebeunspezifische alkalische Phosphatase (ALP) wird durch Osteoblasten gebildet. Sie bewirkt eine Pyrophosphatspaltung, folglich ist ausreichend anorganisches Phosphat (IP) für die Osteogenese verfügbar (Schäfer et al., 2005). PPI, das Substrat der ALP, ist ein wichtiger Inhibitor der vaskulären Kalzifizierung, indem es die Bildung von Hydroxylapatitkristallen verhindert (Harmey et al., 2004). Bei einigen Knochenkrankheiten ist der ALP-Spiegel erhöht und kann deswegen für die Diagnostik verwendet werden (Reynolds et al., 1991).

OPG hemmt die Osteoklastendifferenzierung und ist ein entscheidender Regulator der Knochenresorption. Bei *OPG-knockout* Mäusen konnte man eine Abnahme der Knochendichte und damit verbunden eine höhere Inzidenz von Frakturen feststellen. Außerdem wiesen diese Mäuse eine mediale Kalzifizierung in der Aorta und in den Nierengefäßen auf (Bucay et al., 1998).

OPN ist ein nicht-kollagenes Matrixprotein, das im Knochen vermehrt vorhanden ist und nur bei pathophysiologischen Zuständen, wie bei der vaskulären Kalzifizierung, stärker in Gefäßen gebildet wird (Giachelli, 2003, Zhang et al., 2013). Durch OPN kommt es zu einer Blockierung der Hydroxylapatitbildung und Aktivierung der Osteoklasten (Scatena et al., 2007).

Der osteoblastenspezifische Transkriptionsfaktor *Cbfa1* (*core binding factor α -1*) hat auch eine wichtige Bedeutung bei der vaskulären Kalzifizierung. Dieses Protein ist entscheidend für die Differenzierung von Osteoblasten aus ihren mesenchymalen Vorläuferzellen. *Cbfa1-knockout* Mäuse besitzen keine funktionstüchtigen Osteoblasten, was zu Kalzifizierungen und Skelettdefekten führt (Otto et al., 1997). Die Urämie stimuliert *in vitro* die Expression von *Cbfa1* und anderen osteogenen Proteinen, was auf den Phänotypenwechsel bei den VSMCs hinweist (Moe et al., 2003).

In mehreren Studien (Bostrom et al., 1993, Watson et al., 1994) wurde eine klonale Population von arteriellen medialen Zellen, die als *calcifying vascular cells* (CVCs) bezeichnet werden, gefunden. CVCs bilden spontan Knötchen aus und kalzifizieren unter langfristiger Zellkultur. Außerdem zeigen diese Zellen osteoblastische Eigenschaften, einschließlich der Expression von z. B. ALP (Tintut et al., 2003). Eine andere Hypothese zum Ursprung der Osteoblasten-ähnlichen Zellen in der *Tunica media* der Gefäße ist, dass diese sich aus mesenchymalen Stammzellen oder Perizyten entwickeln können (Tintut et al., 2003, Schor et al., 1990).

1.2.2 Folgen der Arteriosklerose

Die mit der Arteriosklerose einhergehende Versteifung der Gefäße kann zu Beeinträchtigungen der Herzfunktion führen (Abbildung 1.2). Wenn die Aorta betroffen ist, vermindert sich ihre Elastizität und sie kann die sog. Windkesselfunktion nicht mehr in vollem Umfang erfüllen. Dieser Windkesselleffekt puffert im gesunden Zustand etwa 50 % des linksventrikulären Schlagvolumens während der Systole ab, sodass sich der systolische Druck und die Strömungsgeschwindigkeit entsprechend reduzieren. In der diastolischen Phase befördern die elastischen Kräfte der Aortenwand das Blutvolumen dann kontinuierlich in den peripheren Kreislauf. Versteifen sich nun die Gefäße, im Besonderen die Aorta, so führt dies zu einem Anstieg des systolischen und einem Abfall des diastolischen Blutdrucks. Außerdem kommt es zu einem Anstieg der systolischen Blutgeschwindigkeit und einem Anstieg der linken ventrikulären Nachlast, sowie einem Abfall des subendokardialen Blutnachschiebs während der Diastole (Belz, 1995).

Klinisch zeigen sich (Abbildung 1.2) eine Erhöhung des Schlaganfallrisikos, eine linksventrikuläre Hypertrophie und eine Verminderung der koronaren Durchblutung (Nurnberger et al., 2007). Schließlich entsteht hierdurch eine Herzinsuffizienz, die die kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität verstärkt (Foley et al., 2005, Nurnberger et al., 2007).

Der Begriff „Kardiorenales Syndrom“ wird verwendet, um die negativen Auswirkungen der reduzierten Nieren- bzw. Herzfunktion auf das Herz bzw. die Niere und den Kreislauf zu beschreiben (Ronco et al., 2008b). Dabei wird zwischen 5 Typen unterschieden: 1. Abnahme der Nierenfunktion nach akuter Herzinsuffizienz; 2. Abnahme der Nierenfunktion nach chronischer Herzinsuffizienz; 3. Abnahme der Herzfunktion nach akuter Niereninsuffizienz; 4. Abnahme der Herzfunktion nach chronischer Niereninsuffizienz; 5. Entwicklung einer Herz- und Niereninsuffizienz nach Systemerkrankung (Ronco et al., 2008a).

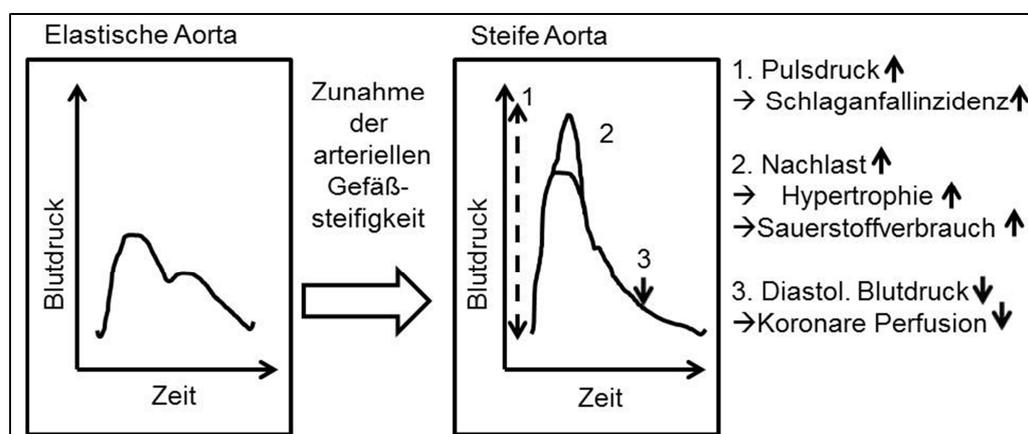


Abbildung 1.2 Mit dem Verlust der arteriellen Gefäßelastizität (rechts) treten folgende Veränderungen der aortalen Blutdruckkonfiguration auf.

1. Anstieg des Pulsdrucks, 2. Anstieg der Nachlast, 3. Abfall des (mittleren) diastolischen Blutdrucks. (Nurnberger et al., 2007).

1.2.3 Therapieansätze bei der Arteriosklerose

Potentielle therapeutische Ansatzpunkte sind überall dort, wo systemische oder lokale Faktoren die vaskuläre Verkalkung fördern oder inhibieren (O'Neill und Lomashvili, 2010). Bei fortgeschrittenen Nierenerkrankungen versucht die derzeitige Therapie in den gestörten Knochen- und Mineralstoffwechsel einzugreifen und bezieht die Verminderung des Phosphat- und Kalziumstoffwechsels mit ein (O'Neill und Lomashvili, 2010). Aktuell werden unter anderem die folgenden Medikamente zur Arteriosklerosetherapie eingesetzt (Abbildung 1.3): Bisphosphonate, Phosphatbinder, Vitamin D-Rezeptor Agonisten, Natriumthiosulfate, Kalziummimetika und Vitamin K (Wu et al., 2013).

Bisphosphonat, das nicht-hydrolysierbare Analogon von PPI, wurde entwickelt, da hier niedrigere Dosierungen als bei PPI notwendig sind (Francis et al., 1969). Bisphosphonate blockieren die Hydroxylapatitnukleierung und deren Wachstum (Boskey, 2003). Bisphosphonate können bei fortgeschrittenen CKD-Patienten Nebenwirkungen wie z. B. urämische Osteodystrophie oder Osteomalazie hervorrufen (Liu et al., 2013).

Phosphatbinder bilden im Verdauungssystem einen unlöslichen Komplex mit Phosphat aus, welcher ausgeschieden wird. Bei CKD-Patienten mit Dialyse ist dies nützlich, da deren Nieren unfähig sind, eine hinreichende Phosphat-Homöostase aufrecht zu erhalten (Hutchison et al., 2011). Es gibt zwei Haupttypen von Phosphatbindern: kalziumhaltige- und kalziumfreie Binder. In einer Studie mit Dialyse-Patienten führte die Behandlung mit kalziumhaltigen Phosphatbindern zu einer beschleunigten Entwicklung der vaskulären Verkalkung im Vergleich zu der Behandlung mit kalziumfreien Phosphatbindern, bei denen dies nicht der Fall war (Block et al., 2005).

Vitamin D lässt die intestinale Kalziumabsorption ansteigen, um eine ausreichende Knochenmineralisierung zu gewährleisten (Khazai et al., 2008). Die aktive Form von Vitamin D ist 1,25-Dihydroxy-Vitamin D. Sie bindet als Steroidhormon an den Vitamin D-Rezeptor, welcher in Kardiomyozyten, VSMCs und Endothelien zu finden ist. Ein Vitamin D-Mangel erhöht das Risiko einer kardiovaskulären Erkrankung. Die kardioprotektive Wirkungsweise von Vitamin D ist noch nicht vollständig geklärt (Judd und Tangpricha, 2009). Vitamin D-Rezeptor Agonisten wirken bei CKD-Patienten den Effekten des Hyperparathyreoidismus und dem Vitamin D-Mangel entgegen (Wu et al., 2013). In einem Mausmodell mit Vitamin D-Rezeptor Agonisten konnte die aortale Verkalkung signifikant reduziert werden (Lau et al., 2012).

Das Parathormon (PTH) ist ein Peptid, das von der Nebenschilddrüse gebildet wird. Es spielt eine Rolle im Kalzium- und Phosphatstoffwechsel (Abbildung 1.3). Wenn sich der Kalziumspiegel im Blut verringert, wird vermehrt PTH sezerniert, um Kalzium aus dem Hydroxylapatit des Knochens freizusetzen. In der Niere steigert PTH die Phosphatsekretion im distalen Tubulus, hemmt die Phosphatresorption im proximalen Tubulus und erhöht die

Kalziumrückresorption. Das Ergebnis ist eine Erhöhung der Kalziumkonzentration im Serum. Durch PTH wird auch die renale Herstellung von 1,25-Dihydroxy-Vitamin D gefördert, wodurch eine synergistische Wirkung zum PTH entsteht. So kann vor allem im Intestinum eine genügende Kalziumaufnahme gewährleistet werden. Die Ursache für den sekundären Hyperparathyreoidismus ist häufig eine Niereninsuffizienz mit Hypokalzämie (Riede und Bianchi, 2004). Der sekundäre alimentäre Hyperparathyreoidismus ist durch ein unausgeglichenes Kalzium-Phosphat-Verhältnis in der Nahrung bedingt. Dies führt zu einem hohen Phosphat- und niedrigen Kalziumspiegel im Serum (Dahme et al., 2007). Das therapeutische Vorgehen beim sekundären Hyperparathyreoidismus fokussiert sich auf die Minimierung der Hyperphosphatämie und der Hypokalzämie. Dies kann durch orale Phosphatbinder, Vitamin D-Rezeptor Agonisten und auch durch Kalzिमimetika erreicht werden (O'Neill und Lomashvili, 2010).

Natriumthiosulfat wird erfolgreich bei der Kalziphylaxietherapie eingesetzt. Hierbei bildet es mit Kalzium Komplexe aus und so kann eine Kalzium-Phosphat-Ablagerung verhindert werden. Außerdem besitzt es antioxidative Eigenschaften. Die Kalziphylaxie stellt eine mediale Verkalkung der Arteriolen der Haut dar, was zu einer Nekrose und Ulzeration der Haut führen kann. Diese Erkrankung tritt häufig bei CKD-Patienten mit Nierenersatztherapie auf und ist durch eine hohe Mortalität gekennzeichnet (Hayden et al., 2008, Raymond und Wazny, 2008). Wegen seines Erfolgs in der Behandlung bei der Kalziphylaxie wurde Natriumthiosulfat auch zur Behandlung von anderen vaskulären Formen der Verkalkung untersucht. Im Urämie-Modell der Ratte konnte die komplette Verkalkung der Aorta durch die Behandlung mit Natriumthiosulfat verhindert werden. Dies führte aber zu einer verminderten Knochenfestigkeit bei den behandelten Versuchstieren (Pasch et al., 2008). Mathews et al. (2011) untersuchten in einer Pilotstudie die Behandlung mit Natriumthiosulfat bei Dialysepatienten. Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit Natriumthiosulfat geringe Nebenwirkungen aufweist. Außerdem konnte ein Fortschreiten der vaskulären Verkalkung vermindert werden. Es werden noch umfangreichere Studien benötigt, um diese Wirksamkeit zu bestätigen (Mathews et al., 2011).

Kalzिमimetika können bei Dialysepatienten den sekundären Hyperparathyreoidismus verringern (Block et al., 2004). Sie binden an kalziumsensitive Rezeptoren der Nebenschilddrüse und können so einen ausreichenden Kalziumspiegel vortäuschen. Folglich sinkt die PTH-Sekretion (Nemeth et al., 1998, Hammerland et al., 1998). Im Urämie-Modell der Ratte wurde gezeigt, dass Kalzिमimetika die vaskuläre Kalzifizierung hemmen (Jung et al., 2012). Bei Dialysepatienten konnte gezeigt werden, dass Kalzिमimetika zusammen mit niedrigdosierten Vitamin D-Rezeptor Agonisten das Fortschreiten der vaskulären Verkalkung verlangsamen (Raggi et al., 2011).

1 Einleitung

Der Kofaktor Vitamin K wird benötigt, um MGP in die aktive Form zu überführen (Price et al., 1983). Beim Menschen stehen verminderte Expressionen von aktivem MGP mit der vaskulären Verkalkung und einer erhöhten kardiovaskulären Mortalität in Verbindung (Schlieper et al., 2011).

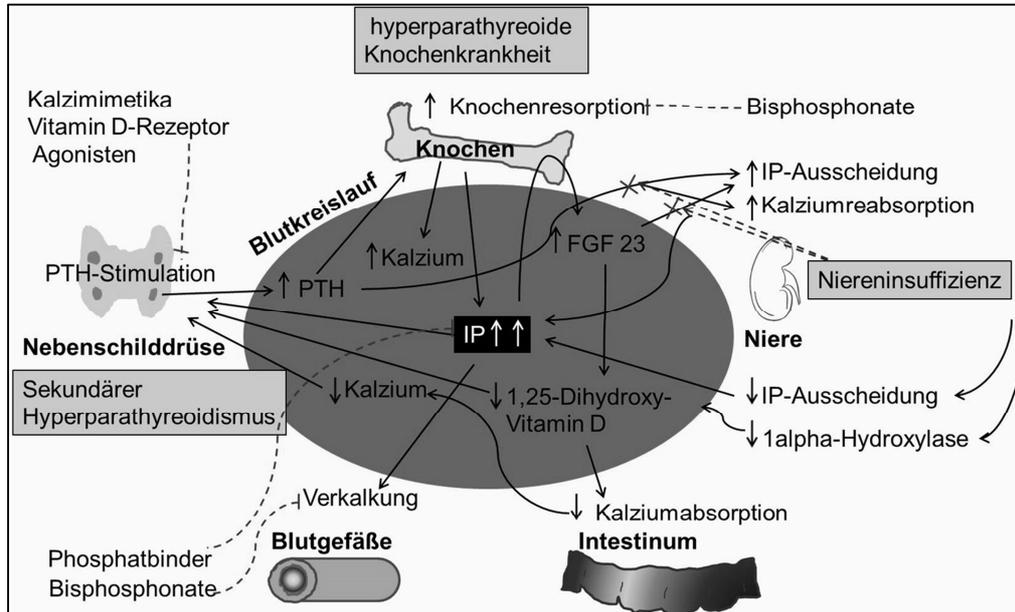


Abbildung 1.3 Gestörter Mineralstoffwechsel bei CKD-Patienten und die zentrale Rolle der Hyperphosphatämie.

Die Niereninsuffizienz führt zu einer reduzierten Phosphatausscheidung und zu einer verminderten aktiven Vitamin D-Produktion. Erhöhte Phosphatspiegel im Serum induzieren die Sekretion des Hormons Fibroblasten-Wachstumsfaktor 23 (FGF 23) in den Osteozyten, dies hemmt die aktive Vitamin D-Produktion, was zu einer herabgesetzten Kalziumabsorption im Darm führt. Niedrige Kalzium- und Vitamin D-Konzentrationen führen zusammen mit hohen Phosphatspiegeln zu einer angeregten PTH-Produktion. PTH führt zu einer gesteigerten renalen Phosphatausscheidung und zu einer gesteigerten Kalziumrückresorption. Bei der Niereninsuffizienz kann die Niere aber nicht angemessen reagieren. PTH rekrutiert Kalzium aus dem Knochen, dadurch wird auch Phosphat freigesetzt. Die Hyperphosphatämie bleibt bestehen und schafft einen *circulus vitiosus*. Phosphatbinder, Vitamin D-Rezeptor Agonisten, Kalzिमimetika und Bisphosphonate haben im gestörten Mineralstoffwechsel unterschiedliche Angriffspunkte. PTH: Parathormon; FGF 23: fibroblast growth factor 23, Fibroblasten-Wachstumsfaktor 23; IP: inorganic phosphate, anorganisches Phosphat; Modifiziert nach Neven und D'Haese (Neven und D'Haese, 2011).

1.3 Niereninsuffizienz, Nierentransplantation und immunsuppressive Therapie

Das terminale Nierenversagen (*end-stage renal disease*, ESRD) ist das Endstadium des irreversiblen, chronisch fortgeschrittenen Nierenfunktionsausfalls. Glomeruläre, tubuläre und endokrine Aufgaben können nicht mehr ausreichend wahrgenommen werden. Unter einer Nierenersatztherapie ist entweder die Hämodialyse, die Peritonealdialyse oder die Nierentransplantation zu verstehen, wobei letztere die effizienteste ist (Geberth und Nowack, 2014). Problematisch dabei ist besonders die Immunantwort des Organismus, die zu einer Abstoßungsreaktion und damit zum Verlust des Nierentransplantats führen kann. Erst seit den 1960er Jahren sind Möglichkeiten verfügbar, die Immunreaktion abzuschwächen. Dies wird durch die Gabe von Immunsuppressiva erreicht. Ferner wurden die Möglichkeiten zum Organerhalt außerhalb des menschlichen Körpers verbessert (Keller und Geberth, 2010). Ursprünglich waren Infektionen die Haupttodesursache nach einer Nierentransplantation. Nunmehr sind in erster Linie kardiovaskuläre Erkrankungen die Haupttodesursache bei CKD-Patienten. Sie sterben häufiger daran, als an den unmittelbaren urämiespezifischen Folgen der ESRD (Keith et al., 2004). Die Herzinsuffizienz ist die Hauptursache für die Morbidität und Mortalität bei CKD-Patienten. Die Erkrankungsrate ist drei- bis viermal höher als bei nierengesunden Patienten (Foley et al., 2005). Dieses Risiko kann durch eine Nierentransplantation gesenkt werden, wenngleich sie nicht wieder auf das Niveau eines Nierengesunden zurückgeführt werden kann (Arend et al., 1997). Ursachen können hierbei zum einen die klassischen Risikofaktoren (Diabetes mellitus, Hypertonie und höheres Alter) sein (Kasiske et al., 2000). Zum anderen sind auch transplantatbedingte Risikofaktoren (langfristige Verabreichung von Immunsuppressiva, Folgen der Nierenersatztherapie) daran beteiligt (Boots et al., 2004). Azathioprin, Steroide, Mycophenolat-Mofetil (MMF), Ciclosporin, Tacrolimus und Sirolimus werden zurzeit vielfach nach einer Nierentransplantation als Immunsuppressiva eingesetzt (Keller und Geberth, 2010). Das Risiko einer akuten Abstoßungsreaktion ist in den ersten drei Monaten nach der Transplantation am höchsten, deshalb werden in diesem Zeitraum auch höhere Dosierungen von Immunsuppressiva eingesetzt (Induktionstherapie). Im Sinne einer langfristigen Erhaltungstherapie sollte der Einsatz von Immunsuppressiva nach und nach minimiert werden, um mögliche Tumorbildungen, Infektionen und kardiovaskuläre Erkrankungen zu vermeiden (Arastéh, 2013). So wurde z. B. bei Dialysepatienten durch den Einsatz von Ciclosporin eine Prävalenz von Hypertonie und Hypercholesterinämie beobachtet. Außerdem konnten bei Tacrolimus Hyperglykämien festgestellt werden (Kramer et al., 2003). Hyperinsulinismus und Hyperglykämie wurden unter Prednisolontherapie beobachtet (Lemieux et al., 2002). Bei der Verabreichung von MMF konnten die obengenannten Nebenwirkungen nicht festgestellt werden.

1.4 Mycophenolsäure

Mycophenolsäure (MPA) gehört in die Gruppe der Antimetaboliten und wird nach Organtransplantation als Immunsuppressivum zur Abstoßungsprophylaxe eingesetzt (Arastéh, 2013). In der Abbildung 1.4 ist die chemische Strukturformel von MPA dargestellt.

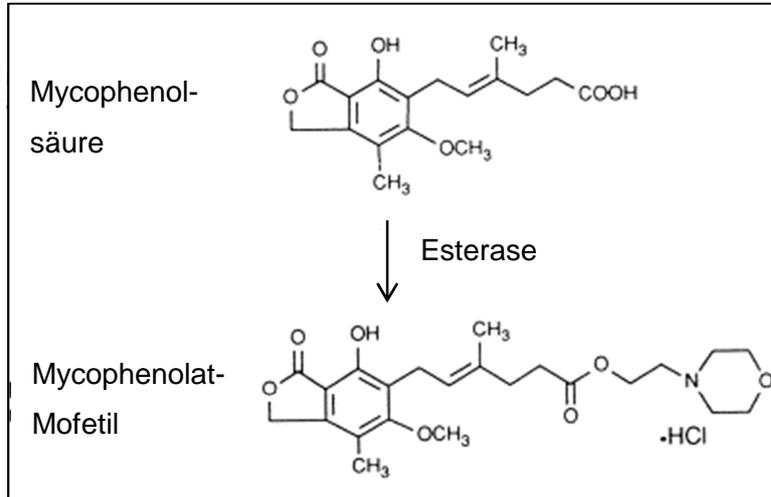


Abbildung 1.4 Strukturformeln von Mycophenolsäure und Mycophenolat-Mofetil.
Modifiziert nach Allison und Eugui (Allison und Eugui, 2000).

MPA wurde erstmals 1896 von Gosio als Fermentationsprodukt aus mehreren *Penicillium*-Spezies gewonnen (Gosio, 1896, Muth und Nash, 1975). Es handelt sich um den reversiblen Inhibitor der Inosinmonophosphat-Dehydrogenase, der selektiv und nicht-kompetitiv wirkt (Villarroel et al., 2009). Der pharmakologische Ansatzpunkt von MPA ist die Inosinmonophosphat-Dehydrogenase, welche die Umwandlung von Inosinmonophosphat zu Xanthinmonophosphat katalysiert (Villarroel et al., 2009). Dadurch kommt es zur Störung der *de novo* Purin-Biosynthese und als Folge zur Inhibierung der Proliferation von T- und B-Lymphozyten (Villarroel et al., 2009). Zur Verbesserung der oralen Resorption wurde MPA zu MMF (Handelsname: Cellcept[®], Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) verestert, wie in der Abbildung 1.4 dargestellt ist (Allison und Eugui, 2000). Außerdem wurde zum Schutz des oberen Gastrointestinaltrakts ein magensaftresistentes Natriumsalz der MPA (Mycophenolat-Natrium, Handelsname: Myfortic[®], Novartis Pharma, Nürnberg, Deutschland) entwickelt (Salvadori et al., 2004). MMF wird als Ersatzmedikament für Azathioprin verwendet, da es nicht wie dieses nephrotoxisch und außerdem weniger knochenmarksupprimierend wirkt (Keller und Geberth, 2010). Es treten allerdings häufig Gastritiden und Diarrhöen als Nebenwirkungen auf (Keller und Geberth, 2010). Transplantatverluste und Abstoßungen sechs Monate nach Nierentransplantation sind unter MMF seltener als unter Azathioprin festzustellen (Sollinger, 1995). Es erfolgt eine Anwendung von MMF in Form einer Triple-Therapie mit Steroiden und Ciclosporin (Wuthrich et al., 1999).

Zusätzlich wurde bereits im Jahre 1968 im Rahmen von *in vitro* und *in vivo* Studien entdeckt, dass MPA auch anti-virale und anti-tumorale Charakteristika besitzt (Williams et al., 1968).

Außerdem hemmt MPA die Proliferation und die Synthese der extrazellulären Matrix in VSMCs. Dies erfolgt im Einzelnen über die NAD(P)H-Oxidase und deren Untereinheit Rac1, wo es ohne MPA zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies kommt (Park et al., 2008).

1.5 Tiermodelle der medialen Kalzifizierung

Die meisten Versuchstierspezies, wie z. B. Mäuse, Ratten, Kaninchen und Hunde entwickeln im Gegensatz zum Menschen spontan keine vaskuläre Kalzifizierung (Amann, 2008). Außerdem existieren keine genmanipulierten Tiermodelle zur Arteriosklerose. Erst durch eine verminderte Nierenfunktion kann eine Arteriosklerose erzeugt werden. Diese kann entweder durch eine Diät oder eine operative Reduzierung des Nierengewebes (Nephrektomie, Elektrokauterisation) erzielt werden.

In dem Rattenmodell von Price et al. konnte nach einer ca. 4-wöchigen Fütterung einer adeninreichen Diät (0,75 %), kombiniert mit einer Niedrigproteindiät (2,5 %), eine Arteriosklerose induziert werden (Price et al., 2006). Bei Adeninfütterung ist das Enzym für den Adeninstoffwechsel gesättigt und Adenin wird zu 2,8-Dihydroxyadenin oxidiert (Wyngaarden und Dunn, 1957). Dieses nephrotoxische Reaktionsprodukt lagert sich aufgrund schlechter Löslichkeit in den Nierentubuli ab. Dadurch kommt es zur Ausbildung einer Urolithiasis mit nachfolgender chronischer Niereninsuffizienz (Simmonds et al., 1976, Nasr et al., 2010). Ein Vorteil bei diesem Tiermodell ist, dass keine Operationen erforderlich sind (Shobeiri et al., 2010). Dies bedeutet einen geringeren finanziellen Aufwand und den Wegfall des Narkoserisikos. Allerdings verloren die Ratten innerhalb der ersten fünf Versuchswochen bis zu 34 % ihres Initialgewichts, was eine erhebliche Belastung für die Versuchstiere darstellte (Price et al., 2006, Arbeitskreis Berliner Tierschutzbeauftragter, 2010). Außerdem kam es zu einer hohen biologischen Variabilität der Kalzifizierung, da sich nur bei ca. 30% der Ratten eine Kalzifizierung entwickelte (Price et al., 2006). Aufgrund dieser Nachteile wurde für die vorliegende Studie ein anderes Modell gewählt. Das sog. „Adeninmausmodell“ existierte zu Beginn der Versuchsplanung noch nicht.

Nach Nephrektomien von Ratten ohne Phosphatdiät kam es nicht zur vaskulären Verkalkung (Mizobuchi et al., 2006). Mizobuchi et al. konnten zeigen, dass sich bei einem Rattenmodell mit Nephrektomien und Normalfütterung (0,8 % Phosphat, 1,1 % Kalzium) in der Aorta keine mediale Verkalkung entwickelte (Mizobuchi et al., 2006). Auch bei Erhöhung des Phosphatgehalts im Futter auf 0,9 % entwickelten die nephrektomierten Ratten nach 6-8 Versuchswochen keine mediale Verkalkung (Noonan et al., 2008). Erst nach sechs

1 Einleitung

Monaten stieg der Kalziumgehalt der Aorta bei den nephrektomierten Ratten gering an (Cozzolino et al., 2003). Nur bei einem höheren Phosphatgehalt (1,2 %) und niedrigeren Kalziumgehalt (0,4 %) im Futter konnte bei 5 von 8 nephrektomierten Ratten ein schwerer sekundärer Hyperparathyreoidismus und eine schwere mediale Verkalkung der abdominalen Aorta nach 10 Wochen induziert werden (Mizobuchi et al., 2006). Um eine deutliche mediale Verkalkung bei nephrektomierten Ratten zu induzieren, ist eine 1,25 (OH)₂Vitamin D-Gabe notwendig (Haffner et al., 2005).

In dem Mausmodell mit Nephrektomien und Hochphosphatdiät nach El-Abbadi et al. (2009) bildete sich eine ausgeprägte mediale vaskuläre Kalzifizierung innerhalb von 13-14 Wochen aus. Die Ausprägung der Arteriosklerose war vergleichbar mit der beim Menschen und trat ohne inflammatorische Anzeichen und ohne die Beeinflussung durch die Atherosklerose auf (El-Abbadi et al., 2009). Deswegen wurde für die vorliegende Arbeit dieses Mausmodell, welches Nephrektomien in Kombination mit einer Hochphosphatdiät beinhaltet, eingesetzt. Dabei wurde der Inzuchtmausstamm DBA/2 ausgewählt, weil dieser sehr empfänglich für die ektopische Verkalkung ist. Im Gegensatz dazu ist der Mausinzuchtstamm C57BL/6NCrlBR dagegen resistent (Ivandic et al., 2001).

1.6 Ziel der Arbeit

Die der Arteriosklerose zugrundeliegende Pathogenese ist Gegenstand umfangreicher Untersuchungen. Die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. van der Giet, Charité, Berlin, in der die experimentellen Arbeiten durchgeführt wurden, befasst sich bereits seit einigen Jahren mit der Erforschung der Zusammenhänge, die zur Kalzifizierung der VSMCs führen. In zellbasierten Methoden konnten verschiedene Substanzen identifiziert werden, die modulierend in diese Prozesse eingreifen (van der Giet, persönliche Mitteilung). Aus klinischen Studien ergaben sich erste Hinweise darauf, dass Immunsuppressiva bei Nierentransplantierten einen unterschiedlichen Einfluss auf das kardiovaskuläre Geschehen haben können. So konnte in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe der Einfluss von nach der Nierentransplantation eingesetzten Medikamenten wie MPA, Ciclosporin, Rapamycin u.a. auf die Kalzifizierung von VSMCs im Zellkultursystem nachgewiesen werden (van der Giet, persönliche Mitteilung). MPA konnte die Kalzifizierung der VSMCs sowie die Enzymaktivität von ALP hemmen und blockierte die Expression von osteogenen Proteinen wie z.B. cbfa1 und ALP (van der Giet, persönliche Mitteilung). Diese und weitere Befunde deuten darauf hin, dass MPA die Kalzifizierung verhindern und somit bei der Arteriosklerosetherapie eingesetzt werden könnte. Bevor allerdings klinische Studien am Menschen durchgeführt werden können, ist eine Verifizierung der Ergebnisse im Tiermodell erforderlich.

Ziel der Studie war es, die anti-kalzifizierende Wirkung von MPA im Mausmodell zu überprüfen, um die *in vitro* Befunde zu bestätigen. Dies bedeutete im Einzelnen, dass zuerst Nephrektomien zur Induktion der Niereninsuffizienz erfolgen mussten, um dann wöchentlich den Gesundheitszustand der Mäuse und später auch die pathologischen Veränderungen zu überprüfen. Durch die Bestimmung von Blutparametern und die Auswertung von histologischen Nierenschnitten zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten wurde die erfolgreiche Induktion der Niereninsuffizienz überprüft. Des Weiteren erfolgten eine histomorphometrische Quantifizierung der Kalziumablagerungen im Herzen sowie eine biochemische Kalziumbestimmung, um die Wirkung von MPA auf die kardiale Struktur zu überprüfen.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere und deren Haltung

Für die vorliegende Studie wurden insgesamt 37 weibliche Mäuse des Stammes DBA/2 verwendet. Sie wurden im Alter von 13 Wochen von Charles River Laboratories in Sulzfeld, Deutschland, bezogen. Während der gesamten Versuchsdurchführung wurden die Mäuse unter konventionellen Bedingungen (19-21 °C, 50-55 % Luftfeuchtigkeit, freier Zugang zu Wasser und Futter, 3-4 Mäuse in einem Makrolon[®]-Käfig Typ 3, künstlicher 12 Stunden Tag-Nacht-Zyklus) in den Tierställen des Campus Benjamin Franklin der Charité, Berlin, gehalten. Der Tierversuch wurde vom Landesamt für Gesundheit und Soziales in Berlin unter der Nummer G0323/10 genehmigt.

2.2 Tiermodell

Bei dem Tierversuch gab es vier Versuchsgruppen: Kontrollgruppe (n = 7), Lösungsmittelgruppe (LM, n = 10), *low dose* MPA Gruppe (LD, n = 10) und *high dose* MPA Gruppe (HD, n = 10). Alle Tiere wurden zunächst während einer 2-wöchigen Eingewöhnungszeit auf Normaldiät gehalten. Während dieser Zeit erfolgten die Ohrmarkierungen, die Gruppeneinteilungen und die anfänglichen Blutentnahmen. Nach Ablauf dieser zwei Wochen wurde mit den Operationen begonnen. Die Nephrektomien erfolgten zweistufig nach El-Abbadi, indem als erstes die rechte Niere zu 75 % und 2 Wochen später die linke Niere zu 100 % nephrektomiert wurde (El-Abbadi et al., 2009). Ursprünglich wurde diese Methode durch Gagnon und Gallimore entwickelt (Gagnon und Gallimore, 1988). Im Gegensatz zur den Studien von El-Abbadi (2009) sowie Gagnon und Gallimore (1988) wurde in der vorliegenden Arbeit Nierengewebe nicht durch Elektrokauterisation ausgeschaltet, sondern indirekt durch eine partielle Ligatur der versorgenden Gefäße. Während der zweiten Operation bekamen die LM-, LD- und HD-Gruppen jeweils eine osmotische Pumpe (Alzet[®], Durect Corporation, Cupertino, USA) in die Nackenfalte implantiert, über die kontinuierlich MPA bzw. Lösungsmittel appliziert wurde. Drei Tage nach der zweiten Operation wurden die Mäuse aller Versuchsgruppen von der Normaldiät (ssniff[®], Soest, Deutschland) auf eine sog. Hochphosphatdiät (0,9 % Phosphat, ssniff[®], Soest, Deutschland) gesetzt. Für die Entwicklung einer ausgeprägten medialen Kalzifizierung ist ein hoher Phosphatanteil im Futter notwendig. Aufgrund des begrenzten Fassungsvermögens der osmotischen Pumpen und der Versuchsdauer (16 Wochen) musste ein Pumpenwechsel in der 11. Versuchswoche (VW 11) durchgeführt werden. Bei der Kontrollgruppe erfolgten nur Scheinoperationen und keine Nephrektomien. Außerdem gab es

bei dieser Gruppe keine osmotischen Pumpen. Am Versuchsende (VW 16) erfolgten finale Blut- sowie Organentnahmen. Der Versuchsablauf ist in Abbildung 2.1 schematisch dargestellt.

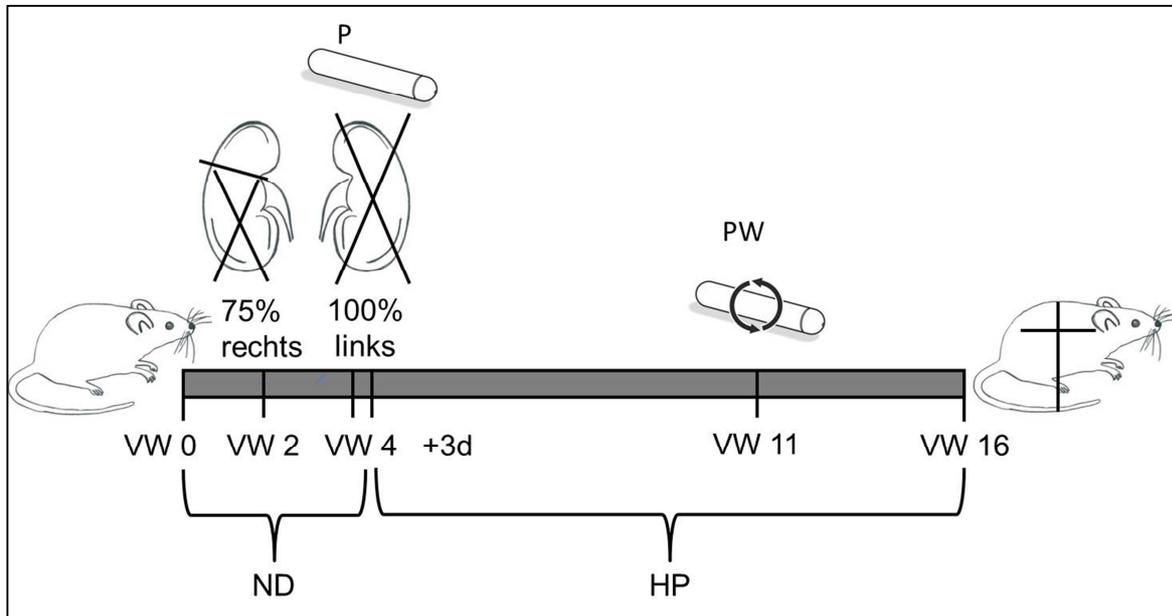


Abbildung 2.1 Versuchsablauf.

Nach der Eingewöhnungszeit bekamen die Mäuse Ohrmarkierungen, wurden in Gruppen eingeteilt und ihnen wurde Blut abgenommen. VW 2 markiert die erste Operation (Nephrektomie 75 % rechts). In VW 4 erfolgten die 100 %ige Nephrektomie links sowie ggf. die Implantation der osmotischen Pumpe (P). Drei Tage später wurde das Futter auf Hochphosphatdiät (HP) umgestellt. Der Pumpenwechsel (PW) erfolgte in der VW 11. In der VW 16 erfolgten eine Blut- und Organentnahmen und danach die Tötung (+), VW: Versuchswoche, ND: Normaldiät.

2.3 Körpergewichtsbestimmung

Bei allen Mäusen wurde sowohl zu Versuchsbeginn, als auch zu Versuchsende sowie während des Versuchsverlaufes jeweils wöchentlich das Körpergewicht mit einer Waage (Sartorius Weighing Technology GmbH, Göttingen, Deutschland) ermittelt. Anhand des Körpergewichtes wurde der Gewichtsverlauf bestimmt und graphisch dargestellt.

2.4 Operationen

Bei der rechtsseitigen 75%igen Nephrektomie und der linksseitigen 100%igen Nephrektomie wurde die vollständig antagonisierbare Anästhesie verwendet. Hierbei kamen die Agonisten Medetomidin (Domitor[®], 0,5 mg/kg Körpergewicht, KGW, Pfizer GmbH, Berlin, Deutschland), Midazolam (Dormicum[®], 5,0 mg/kg KGW, Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) und Fentanylcitrat (Fentanyl-Janssen[®], 0,05 mg/kg KGW, Janssen Cilag GmbH, Neuss, Deutschland) zur Anwendung. Für die Antagonisierung wurden Atipamezol (Alzane[®], 2,5 mg/kg KGW, Pfizer, Berlin, Deutschland), Flumazenil (Flumazenil-hameln[®], 0,5 mg/kg KGW, Hameln Pharma Plus GmbH, Hameln, Deutschland) und

Naloxonhydrochlorid (Naloxon[®], 1,2 mg/kg KGW, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) verwendet. Die drei Komponenten der Agonisten bzw. Antagonisten wurden in einer Spritze gemischt und es erfolgte eine subkutane Injektion in die Nackenfalte der Maus. Die Einzeldosis der Anästhetika ließ sich durch deren Kombination deutlich herabsetzen, wodurch eine Reduzierung unerwünschter Nebenwirkungen (z. B. langer Nachschlaf, Hypothermie) erreicht werden sollte (Erhardt et al., 2011).

Zur Operationsvorbereitung wurden die Tiere am Operationstag aus den Gruppenkäfigen in Einzelkäfige gesetzt und anschließend in den Operationsraum gebracht. Die Mäuse wurden zunächst gewogen, um eine exakte Narkosedosierung bezogen auf das Körpergewicht zu berechnen.

Vor den Operationen wurde die nötige Narkosetiefe durch Reflexüberprüfung gewährleistet. Der Zwischenzehenreflex kann einen Hinweis auf die Ausbildung einer Analgesie während der Narkose geben und sollte für schmerzhafte Eingriffe nicht mehr vorhanden sein. Nach dem Verlust des Stellreflexes wurde zum Schutz der Kornea auf beide Augen Augensalbe (Bepanthen[®] Augen- und Nasensalbe, Bayer Vital, Leverkusen, Deutschland) aufgetragen. Es wurde jeweils ein narkotisiertes Tier in Rückenlage auf den beheizten Operationstisch (Type 862/1 Hugo Sachs Elektronik Harvard Apparatus GmbH, March, Deutschland) gelegt (Abbildung 2.2 A). Hierbei wurde der Schwanz fixiert. Es erfolgte eine Desinfektion des Operationsfeldes (Softasept[®] N, Wirkstoff: Ethanol, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland).

Bei der rechtsseitigen 75%igen und der linksseitigen 100%igen Nephrektomie wurde das Abdomen mit einem ca. 1 cm langen Flankenschnitt eröffnet und mit einem Wundspreizer (Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland) gehalten. Anschließend erfolgte die Darstellung des Nierenhilus im Retroperitonealraum unter mikroskopischer Sicht (Abbildung 2.2 A) mittels eines Stereomikroskops (Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland).

Bei der rechtsseitigen 75%igen Nephrektomie (erste Operation) erfolgte die Induktion der Niereninsuffizienz indirekt, d.h. es wurde kein Nierengewebe entfernt, sondern die Blutversorgung wurde teilweise unterbrochen, indem die führende Nierenpolarterie (*A. renalis*) am Hilus vorwiegend kranial umstochen und unterbunden wurde (Ethilon monofil, nicht resorbierbar, USB 9-0, metric 0,3, Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland). Diese Operation dauerte ca. 20 min.

In der zweiten Operation (linksseitige 100%ige Nephrektomie) zwei Wochen später, die ca. 15 min gedauert hat, wurden die Vene und die Arterie im Nierenhilus (*V. und A. renalis*) durch eine Durchstechungsligatur unterbunden. Anschließend erfolgte das Präparieren der Niere aus dem Retroperitonealraum. Der Ureter wurde ca. 1 cm nach Austritt aus dem Nierenbeckenkelchsystem durch eine offene Durchstechung ligiert (Ethilon monofil, nicht

resorbierbar, USB 9-0, metric 0,3, Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland). Dadurch konnten der Nierenhilus und die Nebennieren geschont werden.

Die Kontrollgruppe wurde scheinoperiert, indem alle Schritte analog zur Nephrektomiegruppe durchgeführt wurden, bis auf die Ligaturen der Gefäße und des Ureters. Die abdominale Muskelschicht sowie die Haut wurden bei beiden Operationen separat mit fortlaufenden Nähten (Monocryl, monofil, resorbierbar, USB 5-0, metric 1, Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland) versorgt. Die oben beschriebenen Nephrektomien wurden durch Herrn Dr. med. Ronald Lützenberg, Facharzt für Gefäß- und Thoraxchirurgie, durchgeführt.

Nach den Operationen erfolgte die Antagonisierung der Narkose durch eine subkutane Injektion in die Nackenfalte der Mäuse. Um eine Hypothermie in der gesamten Aufwachphase zu verhindern, wurden die Mäuse mit einer Rotlichtlampe (Petra electric, Geislingen/Steige, Deutschland) bestrahlt. Alle Operationen erfolgten unter sterilen Bedingungen. Dies beinhaltete das Tragen von sterilen Handschuhen, Mundschutz, Operationshaube und dem Verwenden eines sterilen Operationstuchs bzw. -bestecks (Mikrochirurgische Instrumente, S & T, Neuhausen, Schweiz), wie in Abbildung 2.2 B gezeigt.

Zur Analgesie wurde den Versuchstieren post-operativ 5 mg/kg KGW Carprofen (Rimadyl[®], Pfizer, Berlin, Deutschland) subkutan in die Nackenfalte mit einer Wirkungsdauer von 24 Stunden gespritzt. An den folgenden zwei Tagen wurde diese Injektion wiederholt. Nach den Operationen wurden mehrmals täglich Gesundheitskontrollen durchgeführt, um Nahtinsuffizienzen und Wundinfektionen frühzeitig zu diagnostizieren. Der Gesundheitszustand der Mäuse wurde in *score sheets* dokumentiert und bei Überschreitung von einem *score* von 1,0 wurden entsprechende Maßnahmen ergriffen (z. B. Euthanasie oder Einzelhaltung).

2 Material und Methoden



Abbildung 2.2 Darstellung des operativen Arbeitsplatzes (A) und der mikrochirurgischen Instrumente (B). Im Bild A ist das Mikroskop mit dem beheizbaren Operationstisch zu sehen. Hinten rechts neben dem Mikroskop im Bild A ist der Instrumentensterilisator (Steri 350, Simon Keller AG, Burgdorf, Schweiz) zu erkennen. Das Bild B zeigt vergrößert die einzelnen mikrochirurgischen Instrumente (Mikroschere, -pinzette, Nadelhalter, Wundspreizer), den resorbierbaren Faden und sterile Tupfer.

2.5 Pumpenimplantation und -wechsel

Die Applikation von Mycophenolsäure (MPA) (*Mycophenolic acid*, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) erfolgte über eine osmotische Pumpe (Alzet[®], Model 2006, Durect Corporation, Cupertino, USA), welche in die Nackenfalte der Mäuse implantiert wurde. Die Außenwand der Pumpe war semipermeabel (Abbildung 2.3), so dass infolge osmotischer Druckdifferenz Gewebsflüssigkeit diffundieren konnte. Diese Gewebsflüssigkeit deformierte im Pumpeninneren eine elastische Blase, welche mit MPA gefüllt war. So konnte eine definierte und konstante Mengenabgabe von MPA mit einer Pumpleistung von 0,15 µl/Stunde über den Versuchszeitraum gewährleistet werden. Noch während der Narkose im Zuge der linksseitigen Nephrektomie, wurde durch einen kleinen Schnitt in der Nackenfalte die Minipumpe mit der Substanz eingesetzt. Die Haut wurde fortlaufend (Monocryl, monofil, resorbierbar, USB 5-0, metric 1, Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland) verschlossen, dies dauerte ca. 5 min. Das Flüssigkeitsvolumen der osmotischen Pumpe umfasst maximal 200 µl. Dieses Volumen kann über einen Zeitraum von maximal sechs Wochen abgegeben werden. Ein Pumpenwechsel wurde sechs Wochen vor Versuchsende unter Narkose vorgenommen. Für eine optimale Löslichkeit, Stabilität und Verträglichkeit mit dem Pumpeninhalt wurde ein Lösungsmittelgemisch aus 50 % Dimethylsulfoxid (DMSO, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland), 15 % Ethanol (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland), 15 % sterilem Wasser für Injektionszwecke (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) und 20 % Cremophor (Fagron GmbH & Co. KG, Barsbüttel, Deutschland) verwendet. Es wurden zwei verschiedene Dosen von MPA kontinuierlich appliziert: 3 mg/kg KGW/Tag in der LD-Gruppe und 30 mg/kg KGW/Tag in der HD-Gruppe. Die Befüllung der Pumpen erfolgte unter sterilen Bedingungen. Vor der Implantation der Pumpen, erfolgte eine Vorinkubation in steriler Pufferlösung (Phosphate Buffered Saline, PBS, Biochrom, Berlin, Deutschland) bei 37 °C im Brutschrank. So konnte die Substanzapplikation unmittelbar nach der Pumpenimplantation gewährleistet werden.

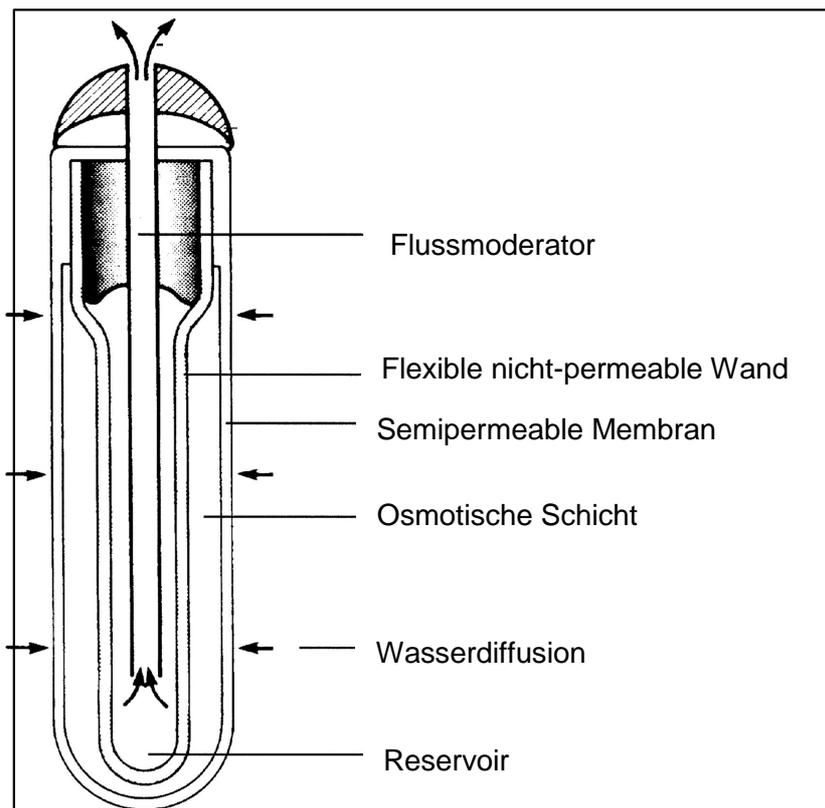


Abbildung 2.3 Darstellung des Querschnitts einer Alzet®-Minipumpe.

Bezeichnung der einzelnen Kompartimente, modifiziert nach Wamberg und Tauson (Wamberg und Tauson, 1998).

2.6 Blutentnahme

Sowohl zu Versuchsbeginn als auch zu Versuchsende erfolgte bei jedem Tier eine Blutentnahme. Am Versuchsanfang wurde dazu eine Punktion der *Vena facialis* im Unterkieferbereich mit einer Lanzette (4 mm, Medipoint Inc., USA) durchgeführt, wobei weder eine Fixationsapparatur noch eine Narkose nötig war. Die maximal entnommene Blutmenge war abhängig vom Körpergewicht. Für eine 25 g schwere Maus mit einem geschätzten Blutvolumen von 1,8 ml sollte die einmalig entnommene maximale Blutmenge 0,17 ml betragen (GV-SOLAS, 2009). Nach der Blutentnahme wurde die Einstichstelle für ca. 1 min komprimiert, um Hämatome zu vermeiden (GV-SOLAS, 2009).

Am Versuchsende erfolgte die Blutentnahme durch Herzpunktion mit einer Kanüle (20 G, Sterican, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland). Die Mäuse wurden dazu mit Pentobarbital-Natrium (Narcoren®, 2,5 ml/kg KGW, Merial, Halbermoos, Deutschland) narkotisiert und in Rückenlage fixiert. Nach der Blutentnahme wurde das Blut in ein mit Heparin (17 IE/ml, Rotexmedia, Trittau, Deutschland) benetztes 1,5 ml Eppendorf-Gefäß (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) abgefüllt und bei 3000 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Das gewonnene Blutplasma wurde für die Blutparameterbestimmung bei -80 °C gelagert.

2.7 Organentnahme

Nach einer Beobachtungszeit von 16 Wochen erfolgten nach der finalen Blutentnahme die Sektion und makroskopische Befunderhebung von jedem Tier. Es wurden folgende Organe entnommen: rechte Niere (nephrektomiert durch Gefäßunterbindung) Herz, Lunge, Leber, Milz, Gehirn, Muskel (*Musculus gastrocnemius*) und *Aorta thoracalis*. Diese wurden mit PBS-Puffer (Biochrom, Berlin, Deutschland) in einer Petrischale (Ø 92 mm, Sarstedt, Nürnberg, Deutschland) gespült, um sie für die Kryo- und Formalinkonservierung aufzubereiten. Lunge, Leber, Milz, Gehirn, Muskel und Aorta waren nicht Gegenstand dieser Dissertation. Sie wurden asserviert und für andere Versuche verwendet. Außerdem wurde das Herznassgewicht bestimmt. Des Weiteren erfolgten eine mikroskopische Präparation (Stereomikroskop, Zeiss, Jena, Deutschland) von verschiedenen Gefäßabschnitten und ebenfalls eine Aufbereitung für die Kryo- und Formalinkonservierung. Die Konservierung mit Formalin (4 %ige Formaldehydlösung, Herbeta Arzneimittel, Berlin, Deutschland) war für die Fixierung der Organe und die darauf folgende Einbettung in Paraffin notwendig, um anschließend histologische Untersuchungen an Organschnitten durchführen zu können. Außerdem erfolgte die Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff. Die Kryokonservierung war notwendig, um später molekulare Untersuchungen, wie die Messung der Expression von im Kalzifizierungsprozess wichtiger Proteine mittels Real-Time PCR- und Western Blot-Untersuchungen durchzuführen. Die Materialien wurden asserviert, aber in der vorliegenden Dissertation nicht bearbeitet, da dies nicht Ziel der Arbeit war.

2.8 Blutparameterbestimmung

2.8.1 Bluttrockenchemie

Das bei -80 °C eingefrorene Blutplasma wurde auf Eis aufgetaut. Für die Bluttrockenchemie wurde das klinisch-chemische Analysegerät Fuji DRI-CHEM 4000i (FUJIFILM Europe GmbH, Düsseldorf, Deutschland) verwendet. Die klinisch-chemischen Parameter wurden nach Zugabe von 10 µl Probe pro Parameter auf kalorimetrischen Testplättchen im Fuji DRI-CHEM 4000i Analysegerät ermittelt. Es wurden die folgenden fünf Parameter jeweils am Versuchsanfang und am Versuchsende untersucht: Gesamtcholesterin (CHOL), Kalzium, ALP, Harnstoff-Stickstoff (BUN) und IP. Je nach vorhandenem Probenvolumen wurden die Plasmaproben unverdünnt oder verdünnt gemessen. Die Art der Verdünnung mit doppelt destilliertem Wasser (Purelab Ultra, ELGA, Celle, Deutschland) wurde an den jeweiligen Referenzbereich angepasst.

2.8.2 Parathormon-ELISA

Für die quantitative Parathormonbestimmung wurde das *Mouse PTH (1-84) ELISA Kit* (Immutopics Inc., San Clemente, USA) verwendet. Dieser *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) arbeitete nach dem „Sandwich-Prinzip“ und sollte Aufschluss über die Plasmakonzentration von physiologisch sezerniertem PTH (1-84) geben. Unter anderem waren im Kit zwei polyklonale Antikörper zur Detektion der aktiven Form von PTH enthalten. Der erste Antikörper war biotinyliert und erkannte die Epitope im mittleren und im C-terminalen Bereich (39-84) des Peptids. Der zweite Antikörper war zur Detektion mit Horseradish Peroxidase konjugiert und band an die N-terminalen Epitope (1-34).

Eine Probe wurde gleichzeitig mit dem biotinylierten Antikörper und dem Horseradish Peroxidase konjugierten Antikörper in einem Streptavidin-beschichteten Streifen einer Mikrotiter-Platte für drei Stunden bei Raumtemperatur in einem horizontalen Schüttler (180-220 RPM, IKA, Staufen, Deutschland) inkubiert. Der erste Antikörper band das intakte PTH (1-84). Nach drei Stunden Inkubationszeit wurden die Vertiefungen der verwendeten 96er Kulturplatte, im folgenden *wells* genannt, jeweils fünfmal mit Waschpuffer gewaschen, um alle ungebundenen Antikörper und andere Bestandteile zu entfernen. Nach der 30-minütigen Inkubation mit der Substratlösung wurde die optische Dichte (OD) des gebundenen Enzym-Komplexes spektrophotometrisch bei 620 nm bzw. 450 nm gemessen. Die bestimmte enzymatische Aktivität war direkt proportional zu der in der Probe enthaltenen PTH-Menge. Zur Probenvorbereitung wurden die Standards und Kontrollen in Aqua bidest. (Purelab Ultra, ELGA, Celle, Deutschland) gelöst, sowie eine Antikörpermischung im Verhältnis 1:2 aus beiden Antikörpern hergestellt. Außerdem wurde ein gebrauchsfertiger Waschpuffer durch 20-fache Verdünnung hergestellt.

Standards, Kontrollen und Proben wurden laut Anleitung in die Streptavidin-beschichteten *wells* pipettiert. Dann erfolgten die Zugabe der Antikörpermischung und anschließende Inkubation der mit Alufolie versiegelten 96-Well-Platte für drei Stunden auf einem horizontalen Schüttler (200 *rounds per minute*, RPM, IKA, Staufen, Deutschland) bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurden die *wells* mit Waschpuffer jeweils fünfmal gewaschen, Substratlösung wurde hinzupipettiert und erneut für 30 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur bei 200 RPM inkubiert. Im Anschluss wurde die Absorption bei 620 nm gemessen. Unmittelbar danach wurde die Stopp-Lösung des Kits in jedes *well* pipettiert. Nach einer weiteren Minute auf dem Schüttler wurde die Absorption bei 450 nm gegen ein Gemisch aus Substrat und Stopp-Lösung (1:2) als Leerwert gemessen. Die Messung bei zwei verschiedenen Absorptionswerten berücksichtigt eine Korrektur für Proben mit einem hohen PTH-Gehalt. Es wurden die Werte der ersten fünf Standards aus der Messung bei 450 nm zur Berechnung der ersten Kurve herangezogen. Lag der Absorptionswert der

Proben oberhalb von Standard 5, erfolgte die Berechnung nach dem *Mouse PTH (1-84) ELISA Secondary Assay*. Die Konzentrationen [pg/ml] wurden mittels einer mit Excel erstellten Trendlinienformel berechnet.

2.9 Histologische Aufarbeitung

2.9.1 Fixierung, Entwässerung und Einbetten

Nach der Organentnahme wurden die Organproben für 24 Stunden in 4%iger Formalinlösung (Formaldehydlösung, Herbeta Arzneimittel, Berlin, Deutschland) fixiert und im Kühlschrank gelagert. Dann erfolgte die Überführung der Gewebeproben in Gewebekassetten (Rotilabo[®], Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland). Im Institut für Pathologie des Campus Benjamin Franklin wurden die formalinfixierten Gewebeproben mit Hilfe des Einbettautomaten (Shandon Excelsior, Thermo Fisher Scientific, Walldorf, Deutschland) entwässert. Die Kassetten mit dem Gewebe wurden nach dem Entwässern in die beheizte Aufbewahrungsschublade des Einbettautomaten (EG 1160, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) gelegt. Die Einbettung der Gewebe mit Paraffin (Histosec[®] Pastillen, Merck, Darmstadt, Deutschland) erfolgte am selben Tag. Der Boden der Ausgießform wurde mit flüssigem Paraffin (Histosec[®] Pastillen, Merck, Darmstadt, Deutschland) bedeckt und das Gewebestück mit der Schnittfläche nach unten auf den Boden der Ausgießform (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) gesetzt. Danach wurde die Ausgießform kurz auf die Kühlplatte gezogen, damit die Organprobe in der gewünschten Position blieb. Dabei wurde das Gewebestück fest auf den Boden gedrückt bis es haften blieb. Als nächstes wurde der Kassettenboden mit der Beschriftung auf die mit Paraffin gefüllte Ausgießform aufgesetzt und festgedrückt. Zum Schluss wurde flüssiges Paraffin auf den Kassettenboden gefüllt und die gesamte Form auf die Kälteplatte gestellt. Nach ca. 15 min war das Paraffin ausgehärtet und die Ausgießform ließ sich leicht entfernen. Der Paraffinüberschuss zwischen dem Förmchen und der Kassette wurde mit einem Messer entfernt.

2.9.2 Anfertigen der Paraffinschnitte

Das Schneiden der Paraffinblöcke erfolgte mit einem Rotationsmikrotom (HM340E, Thermo Fisher Scientific, Walldorf, Deutschland) mit Schnitt-Transfersystem STS (Thermo Fisher Scientific, Walldorf, Deutschland), wie in Abbildung 2.4 gezeigt. Die Schnittdicke betrug bei allen Präparaten 4 µm. Die Paraffinblöcke wurden vor und zwischen den Schneidvorgängen auf eine Kühlplatte (SLEE, Mainz, Deutschland) mit einer Temperatur von -12 °C gelegt, um

eine Ausdehnung des Paraffins bei höheren Temperaturen und eine dadurch bedingte Reduzierung der Schneidefähigkeit der Gewebe zu vermeiden. Der jeweilige Paraffinblock wurde mit Schnittebene parallel zur Klinge (Typ N 35 für hartes Gewebe, Typ S 35, Standardklinge für Routineschnitte, Feather, Japan) eingespannt. Während des Schneideprozesses mit dem STS wurden die Schnitte auf einem Wasserfilm gleitend über den Einwegklingenträger und die Transferbrücke in das Streckbad überführt. Es entstand ein Wasserkreislauf, der durch eine Pumpe angetrieben wurde. Die Schnitte wurden durch den leichten Wasserstrom während des Schneidevorganges gestreckt und es entfiel die übliche manuelle Übertragung der Schnitte in Streckbad 1 (ca. 36 °C). Nach ca. 2-3 min im Streckbad 1 wurden die Schnitte mit Hilfe eines Objektträgers (Super-frost® Plus Objektträger, R. Langenbrinck, Labor- und Medizintechnik GmbH, Emmendingen, Deutschland) in das Streckbad 2 überführt. Durch die höhere Wassertemperatur im Streckbad 2 (ca. 52 °C) kam es zu einer Ausdehnung des Paraffins, so dass sich das Präparat voll entfalten konnte. Um den zirkulierenden Wasserkreislauf möglichst kühl zu halten, sollte die Vermischung mit destilliertem Wasser aus dem Wasserbad 1 vermieden werden und deswegen die Transferbrücke nur geschlossen werden, wenn Schnitte transportiert werden sollten. Nach dem Glätten in Streckbad 2 wurden die Objektträger auf dessen warmem Rand luftgetrocknet. Die weitere Trocknung der Präparate erfolgte in einem Wärmeschrank (Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland) bei 37 °C für 24 Stunden, um die Haftung der Paraffinschnitte auf dem Objektträger zu erhöhen. Es wurden 25 Objektträger mit jeweils vier bis fünf Serienschnitten von der rechten Niere und dem Herzen angefertigt.



Abbildung 2.4 Darstellung des Rotationsmikrotoms mit Schnitttransfersystem.

2.9.3 Entparaffinierung und Hydratisierung

Vor den histologischen Färbungen mussten die Präparate entparaffiniert und hydratisiert werden. Durch die Entparaffinierung wurde der Zugang der Farbstoffe zum Gewebe möglich (Lang, 2006). Hierbei wurde das Paraffin mit Xylol-Ersatz (Roti[®]-Histol, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland; 2 mal 10 min) entfernt und danach erfolgte eine Hydratisierung der histologischen Schnitte mittels einer absteigenden Alkoholreihe (jeweils 5 min in 95 %, 80 % und 70 % Ethanol) bis zu Aqua bidest. (2-3 min).

2.9.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin (HE)-Übersichtsfärbung wird zur Differenzierung unterschiedlicher morphologischer Gewebe verwendet und gilt als eine der am häufigsten verwendeten Standardfärbemethoden in der Histologie. Zuerst bewirkte das Hämatoxylin eine rötlich-braune Zellkernfärbung. Anschließend erfolgte durch Spülen mit Leitungswasser ein Wechsel in die typische Blaufärbung. Im nächsten Schritt wurde das Zytoplasma mittels einer alkoholischen Eosinlösung rosa gefärbt (Lang, 2006). Kalziumsalze lassen sich mit Hämatoxylin dunkelblau anfärben (Mulisch et al., 2010).

Die HE-Färbungen wurden bei Präparaten der rechten Niere und des Herzens aus drei unterschiedlichen Bereichen angefertigt, nämlich dem Anfangs-, Mittel- und Schlussteil des jeweiligen Organs. Dies waren bei der rechten Niere die Objektträger Nr. 1, 12 und 23 und beim Herz die Objektträger Nr. 1, 12 und 23. Es befanden sich jeweils vier Serienschnitte auf einem Objektträger.

Durchführung:

1. 2 min in gefiltertem Hämatoxylin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) färben,
2. kurz mit Aqua bidest. spülen,
3. 15 min unter fließendem Leitungswasser bläuen,
4. 5 min in 80 % Ethanol (Merck, Darmstadt, Deutschland) dehydrieren,
5. 3 min in alkoholischer Eosin Y-Lösung (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) gegenfärben,
6. 10 s in Aqua bidest. auswaschen,
7. in einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässern:
 - 1 min 70 % Ethanol
 - 3 min 80 % Ethanol
 - 3 min 95 % Ethanol
 - 2 x 5 min 99 % Ethanol

8. 3 min in Xylol-Ersatz (Roti[®]-Histol, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) inkubieren,
9. Objektträger auf Zellstoff legen,
10. 4-5 Tropfen Cytoseal 60 (Microm International GmbH, Walldorf, Deutschland) auf den Objektträger geben und mit einem Deckglas (60 x 24 mm, R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik GmbH, Emmendingen, Deutschland) luftblasenfrei eindecken,
11. Objektträger liegend 24 Stunden unter dem Abzug trocknen lassen.

2.9.5 Alizarinrot S-Färbung

Im Organismus kommt Kalzium entweder in gelöster Form (Chlorid, Sulfat, Lactat) oder in Form von ungelösten Kalziumsalzen (Carbonat, Phosphat, Oxalat) vor (Mulisch et al., 2010). Für den qualitativen Nachweis des Kalzifizierungsprozesses diente die Alizarinrot S-Färbung. Hierbei werden die Kalziumablagerungen durch rötlich-orange Färbung sichtbar (Lang, 2006). Alizarin kann mit zweiwertigen Kationen wie z. B. Kalzium Chelatverbindungen bilden (Mulisch et al., 2010).

Die Alizarinrot S-Färbung wurde bei der rechten Niere und dem Herzen für jeweils drei unterschiedliche Bereiche angefertigt: dem Anfangs-, dem Mittel- und dem Schlussteil des jeweiligen Organs. Dies waren bei der rechten Niere die Objektträger Nr. 2, 13 und 24 und beim Herz die Objektträger Nr. 2, 13 und 24. Es befanden sich jeweils vier Serienschnitte auf einem Objektträger.

Durchführung:

1. Herstellung von 0,5 % Alizarinrot S-Lösung, pH 4,0 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) mit Aqua bidest.,
2. 5 min in filtrierter 0,5 % Alizarinrot S-Lösung (pH 4,0) färben,
3. 10 x Eintauchen in Aceton (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland),
4. 10 x Eintauchen in Aceton/Xylol-Ersatz (Roti[®]-Histol, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland), (1:2)-Verdünnung,
5. 10 x Eintauchen in Xylol-Ersatz,
6. Objektträger auf Zellstoff legen,
7. 4-5 Tropfen Cytoseal 60 (Microm International GmbH, Walldorf, Deutschland) auf den Objektträger geben und mit einem Deckglas (60 x 24 mm, R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik GmbH, Deutschland) luftblasenfrei eindecken,
8. Objektträger liegend 24 Stunden unter dem Abzug trocknen lassen.

2.9.6 Von Kossa-Färbung

Die Silbermethode nach von Kossa dient zum Kalziumnachweis (McGee-Russell, 1958). Bei diesem indirekten Nachweis von Kalzium kommt es zu einem Austausch von Kalzium- gegen Silberionen in den Carbonaten und Phosphaten (Mulisch et al., 2010, Lang, 2006). Diese werden anschließend durch UV-Licht zu metallischem Silber reduziert. Kalziumablagerungen werden durch diese Versilberung als braun-schwarze Areale sichtbar (Mulisch et al., 2010, Lang, 2006).

Die von Kossa-Färbung wurde bei der rechten Niere und dem Herz für drei unterschiedliche Bereiche angefertigt: den Anfangs-, den Mittel- und den Schlussteil des jeweiligen Organs. Das waren bei der Niere rechts die Objektträger Nr. 3, 14 und 25 und beim Herz die Objektträger Nr. 3, 14 und 25. Es befanden sich jeweils vier Serienschritte auf einem Objektträger.

Durchführung:

1. Herstellung von 1 % Pyrogallollösung (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) mit Aqua bidest.,
2. in Aqua bidest. waschen,
3. 30 min in Silbernitratlösung in UV-Dunkelkammer (Vilber Lourmat, Eberhardzell, Deutschland) färben,
4. in Aqua bidest. waschen,
5. 2-3 min in 1 % Pyrogallollösung geben,
6. in Aqua bidest. waschen,
7. 2-3 min in 5 % Natriumthiosulfatlösung (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) geben,
8. in Aqua bidest. waschen,
9. in aufsteigender Ethanolreihe entwässern:
 - 5 s in 70 % Ethanol
 - 5 s in 80 % Ethanol
 - 5 s in 95 % Ethanol
 - 2 x 5 min in 99 % Ethanol,
10. 3 min in Xylol inkubieren,
11. Objektträger auf Zellstoff legen
12. 4-5 Tropfen Cytoseal 60 (Microm International GmbH, Walldorf) auf den Objektträger geben und mit Deckglas (60 x 24 mm, R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik GmbH, Emmendingen, Deutschland) luftblasenfrei eindecken
13. Objektträger liegend 24 Stunden unter dem Abzug trocknen lassen.

2.10 Histomorphometrische Untersuchung der rechten Niere und des Herzens

Es wurden zwei Mikroskope (Axiovert 200 M mit der Software AxioVision Release 4.6.3, beides von Zeiss, Jena, Deutschland; Fluoreszenz-Mikroskop BZ-9000 mit der Software BZ-Analyzer Version 2.1, beides von Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland) eingesetzt. Für das Screening der Proben wurde das Mikroskop von Zeiss verwendet. Die Abbildungen wurden mit dem Mikroskop von Keyence hergestellt.

Beim Herzen und der nephrektomierten rechten Niere wurden in der HE-, Alizarinrot S- und von Kossa-Färbung Übersichtsaufnahmen des kompletten Organanschnittes in der 40- bzw. 100-fachen Vergrößerung mit Hilfe der Bildzusammensetzungsfunktion der Keyence-Software durchgeführt. Hierbei wurde aus Teilbildern mit Hilfe der Software ein zusammengesetztes Bild erzeugt. Zur Detailbestimmung wurde bei der HE-Färbung außerdem mit der 400-fachen Vergrößerung gearbeitet.

2.11 Histomorphologische Quantifizierung der Kalziumablagerungen im Herzen

Für die Histomorphometrie wurden pro Maus zwölf Alizarinrot-gefärbte Serienschritte des Herzens mit Hilfe des Mikroskops BZ-9000 in 40-facher Vergrößerung eingescannt. Dies bedeutet, dass mindestens drei Randpunkte des jeweiligen Anschnitts ausgewählt wurden und dann mit Hilfe der Software ein zusammengesetztes Bild erzeugt wurde. Diese histologischen Bilder wurden mit Hilfe der Bildbearbeitungssoftware BZ-Analyzer ausgewertet. Bei der Alizarinrot S-Färbung stellen sich Kalziumablagerungen rot dar. Die gemessene rote Fläche, die der bildlichen Darstellung des Kalziumsalzes entspricht, wird im Verhältnis zur Gesamtfläche des Gewebes gesetzt und dann im Folgenden „Kalziumfläche“ genannt. In den Abbildung 2.5 a bis 2.5 d sind die einzelnen Schritte der Analyzer Software dargestellt. Alle Herzanschnitte wurden einzeln mit Hilfe der *hybrid cell count* Funktion analysiert. Als erstes wurde die Gesamtfläche ausgewählt. Dann wurden Artefakte wie Schmutz, Hintergrundfärbung oder Luftblasen entfernt. Als nächstes wurden die roten Flächen markiert. Auch hier konnten Artefakte entfernt werden. Zum Schluss der Analyse wurden die Messwerte (Gesamtfläche in μm^2 , rote Fläche in μm^2 , Anzahl der roten Flächen, rote Fläche in %) in einer Tabelle angegeben. Die relative Kalziumfläche in % wurde nach folgender Formel berechnet, wobei a die Kalziumfläche in [μm^2] und b die Gesamtfläche in [μm^2] angibt: $\frac{\sum a}{\sum b} \times 100$.

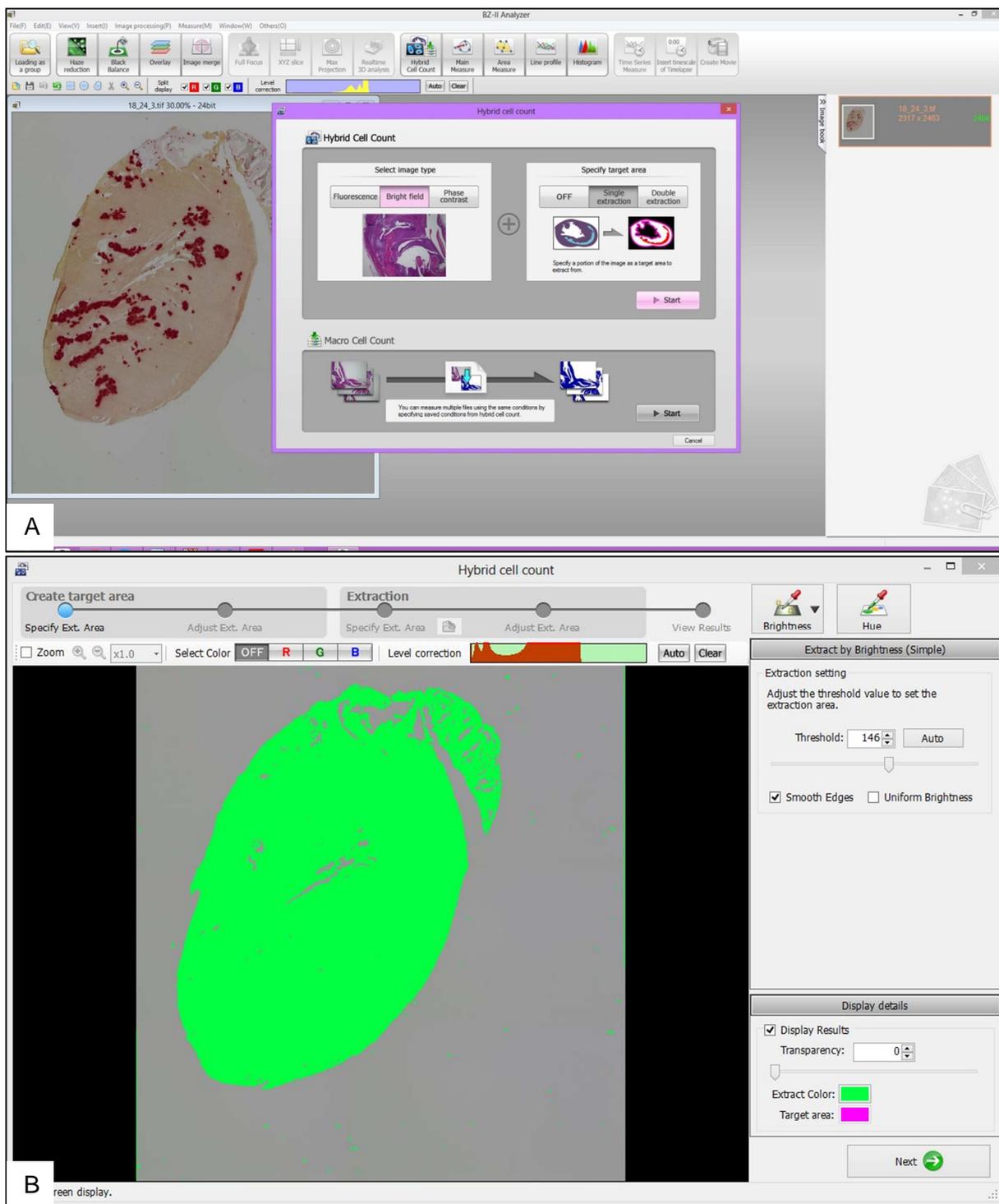


Abbildung 2.5 a Quantitative Histomorphometrie

Erste Arbeitsschritte: Herzpräparat mit Alizarinrot S-Färbung: Nacheinander dargestellte Arbeitsschritte; *Hybrid cell count* mit *bright field* und *single extraction* auswählen (A), Gesamtfläche grün markieren (B).

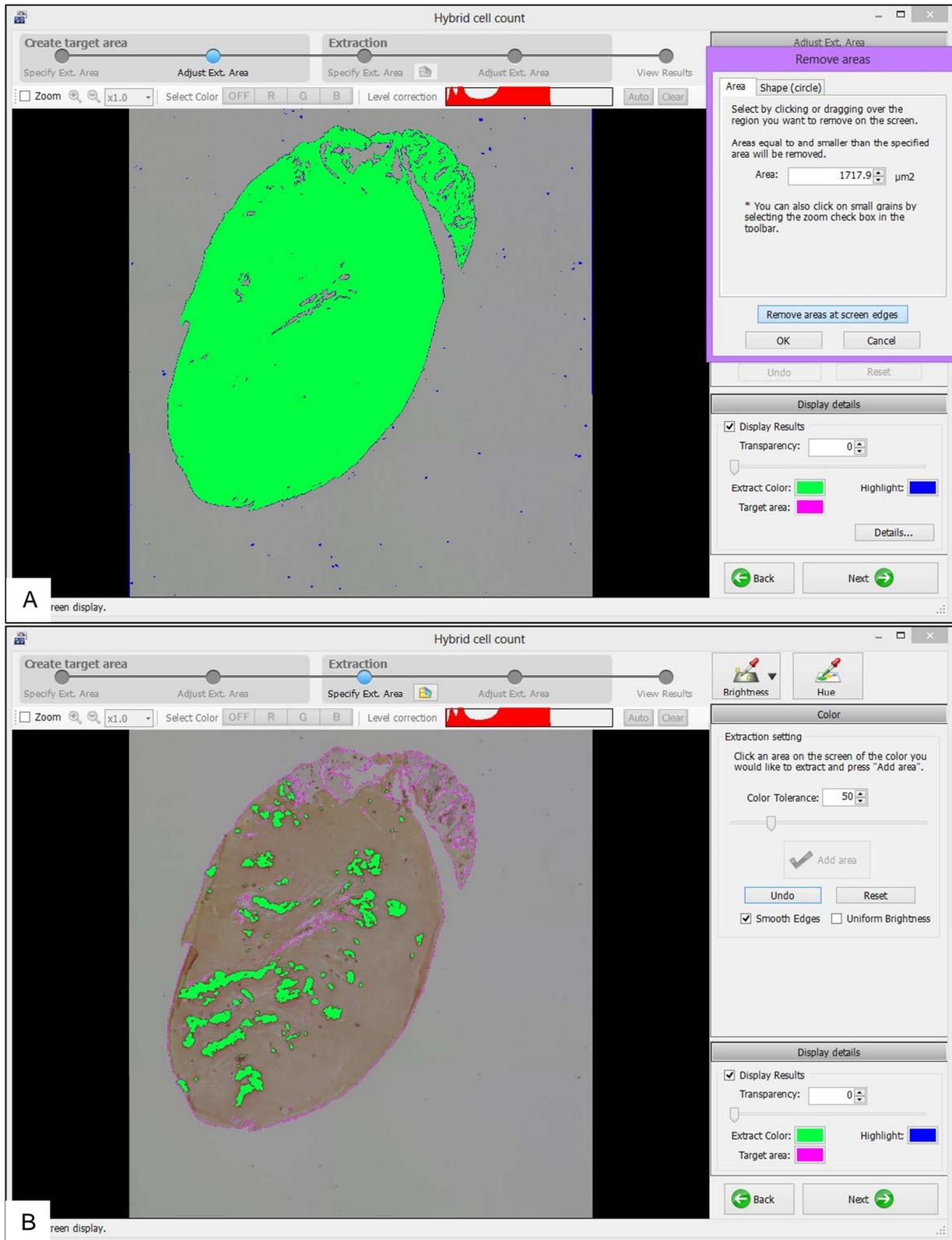


Abbildung 2.5 b Quantitative Histomorphometrie: Artefakte entfernen, Fläche markieren.

Herzpräparat mit Alizarinrot S-Färbung: Nacheinander dargestellte Arbeitsschritte; Schmutzpartikel, Färbeartefakte und ggf. Luftblasen von der Gesamtfläche entfernen (A), zu quantifizierende Kalziumfläche grün markieren (B).

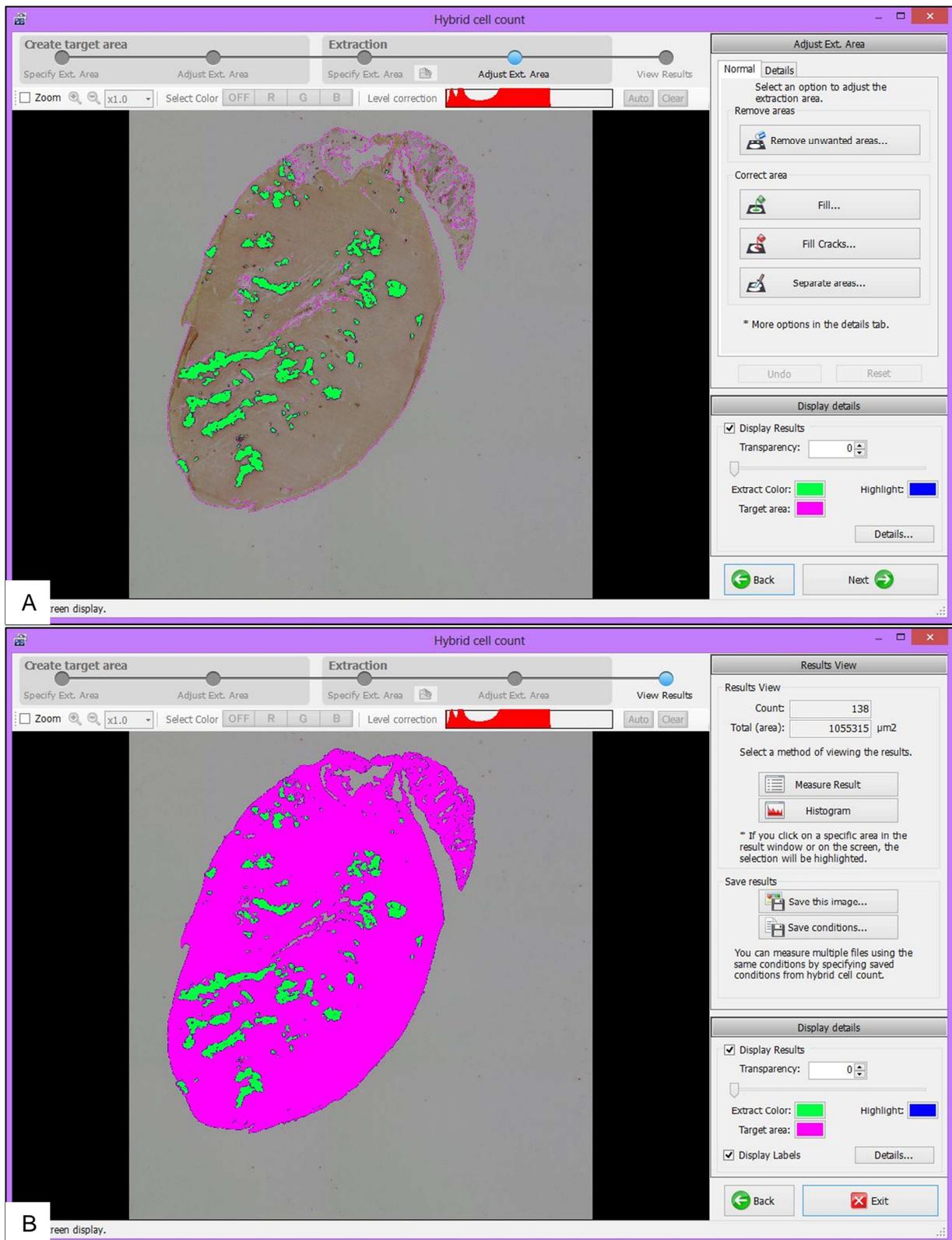


Abbildung 2.5 c Quantitative Histomorphometrie: Artefakte entfernen, Ergebnisbild.

Herzpräparat mit Alizarinrot S-Färbung: Nacheinander dargestellte Arbeitsschritte; ggf. einzelne markierte Kalziumflächen korrigieren (A), Ergebnisbild mit rosa dargestellter Gesamtfläche und grüner Kalziumfläche (B).

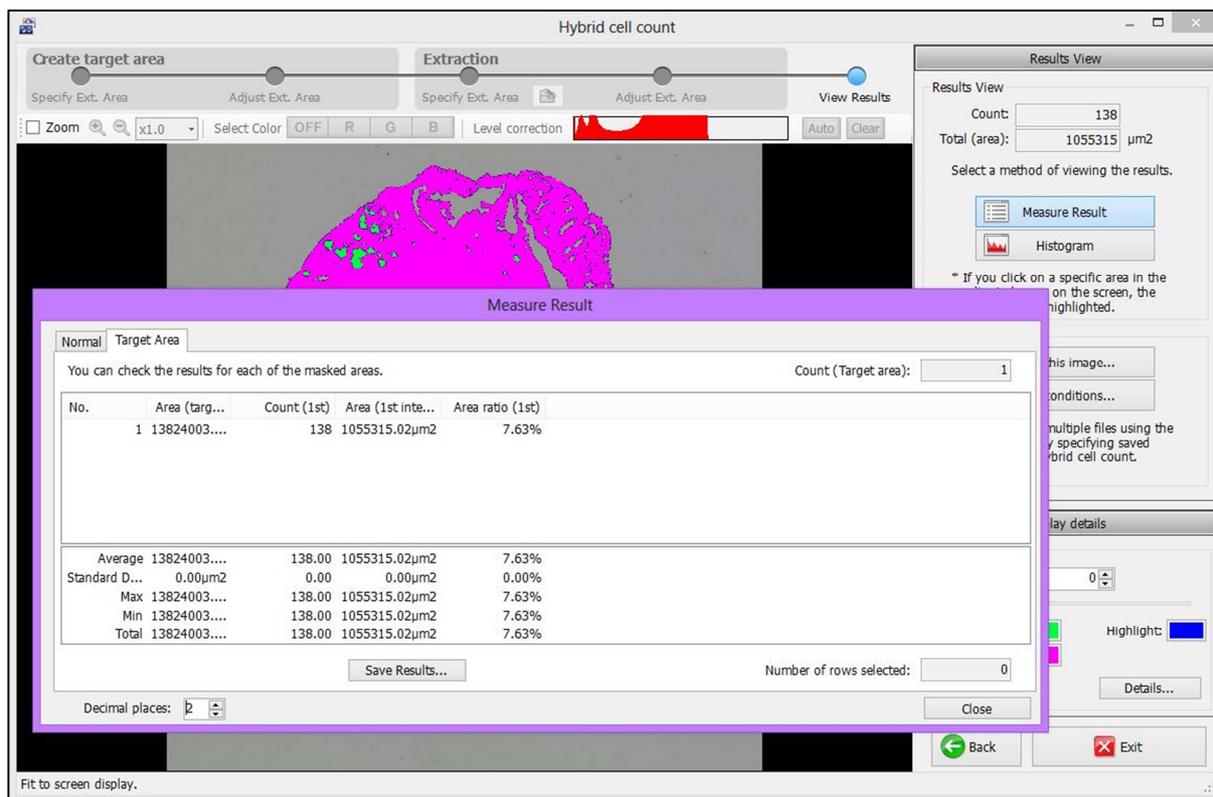


Abbildung 2.5 d Quantitative Histomorphometrie: Messergebnisse.

Herzpräparat mit Alizarinrot S--Färbung: Nacheinander dargestellte Arbeitsschritte; Messergebnis mit Angabe der Gesamtfläche [µm²], der Kalziumfläche [µm²] und des Kalziumanteils in %.

2.12 Biochemische Kalziumbestimmung im Herzen

Die bei -80 °C gelagerten Herzen wurden auf Eis aufgetaut und es wurde von jeder Maus ¼ des ganzen Herzens für die Messung des Kalziumgehaltes verwendet. Die Herzstücke wurden für zwei Tage mit 0,6 M Salzsäure (HCl) dekalzifiziert. Dann wurde der Überstand abgenommen und das Volumen mit Hilfe einer Gefriertrocknungsanlage (RVC 2-33, Christ, Osterode am Harz, Deutschland) eingeeengt. Danach wurde der getrocknete Überstand über Nacht in 5 µl HCl gelöst. Anschließend wurde der Kalziumgehalt mittels Kalzium C Test (ScienCell, Carlsbad, USA) photometrisch bei 570 nm bestimmt. Diese Messung beruht auf der o-Cresolphthalein-Komplexon (OCPC)-Methode. Die Herzstücke wurden im Trockenschrank (Memmert GmbH, Schwabach, Deutschland) bei 37 °C getrocknet und das Trockengewicht zur Normalisierung der ermittelten Konzentrationswerte bestimmt.

2.13 Statistik

Die Statistik wurde mit Hilfe der Software Prism 5.0/6.0 GraphPad und Microsoft 2007/2010 Excel durchgeführt. Für die Auswertung wurden, sofern nicht anders angegeben, die Mittelwerte (*mean*) und der Standardfehler des Mittelwertes (\pm SEM = *standard error mean*) verwendet. Die graphische Darstellung erfolgte in Form von Kurven-, Balken- und Punktdiagrammen. Um jeweils zwei Versuchsgruppen miteinander zu vergleichen, wurde, wenn nichts anderes angegeben, der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Die Kaplan-Meier-Überlebenszeitkurven wurden mit Hilfe des Log-Rank-Tests miteinander verglichen.

Um einen Unterschied der vier Versuchsgruppen festzustellen, wurde beim Körpergewicht zu bestimmten Zeitpunkten der Kruskal-Wallis-Test durchgeführt.

Der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test wurde bei dem paarweisen Vergleich der Blutparameter zum Versuchsanfang und –ende verwendet.

Es gilt als signifikant, wenn der *p*-Wert kleiner 0,05 ist. Die Signifikanz wird graphisch durch einen Stern (*) gekennzeichnet.

Die Beratung erfolgte durch das Institut für Statistik und Ökonometrie (fu:stat) der Freien Universität Berlin.

3 Ergebnisse

3.1 Mortalität

Die vorliegende Studie umfasste 37 weibliche DBA/2 Mäuse, deren Mortalität in der Tabelle 3.1 dargestellt ist. Der Kontrollgruppe wurden sieben Tiere zugeordnet, von denen ein Tier vorzeitig verstarb, als Befund war eine pulpöse Milzhyperplasie festzustellen. Die LM-Gruppe bestand aus zehn DBA/2 Mäusen, von denen drei Tiere vorzeitig verstarben. Von den zu Versuchsanfang vorhandenen zehn Tieren der LD-Gruppe verstarben vier Mäuse vorzeitig. Die höchste Sterblichkeit war bei der HD-Gruppe festzustellen, hier verstarben 7 von 10 Tieren.

Zwei Tiere verstarben kurz nach der zweiten Operation bzw. dem Pumpenwechsel an Atemstillstand, vermutlich aufgrund der Narkoseeinwirkung. Insgesamt verstarben sechs Mäuse ein bis fünf Tage nach der zweiten Operation, nachdem sie Symptome eines akuten Nierenversagens zeigten. Diese Todesfälle traten unabhängig davon auf, ob die Mäuse Lösungsmittel, MPA in niedriger oder hoher Dosierung erhielten. Sechs Mäuse der LD- und HD-Gruppe wurden euthanasiert, da sie massive Hautreizungen in der Pumpenregion besaßen. Von den insgesamt 37 Versuchstieren konnten 22 für die Auswertung herangezogen werden. Dies bedeutet 59,5 % von der Gesamtzahl der Tiere, die den 16-wöchigen Versuchszeitraum überlebten. Die Überlebenswahrscheinlichkeit in % ist in der Abbildung 3.1 in Form einer Kaplan-Meier-Kurve dargestellt. Mittels Log-Rank-Test wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt ($p = 0,116$).

Tabelle 3.1 Mortalität der Gruppen.

Gruppe	Anzahl der gestorbenen/ euthanasierten Mäuse je Gruppe	mögliche Ursachen/ Befunde, Anzahl der Mäuse
Kontrolle	1	pulpöse Milzhyperplasie
LM	3	Narkose (1), akute Niereninsuffizienz (2)
LD	4	Narkose (1), akute Niereninsuffizienz (1), massive Hautreizungen Pumpenregion (2)
HD	7	akute Niereninsuffizienz (3), massive Hautreizungen Pumpenregion (4)

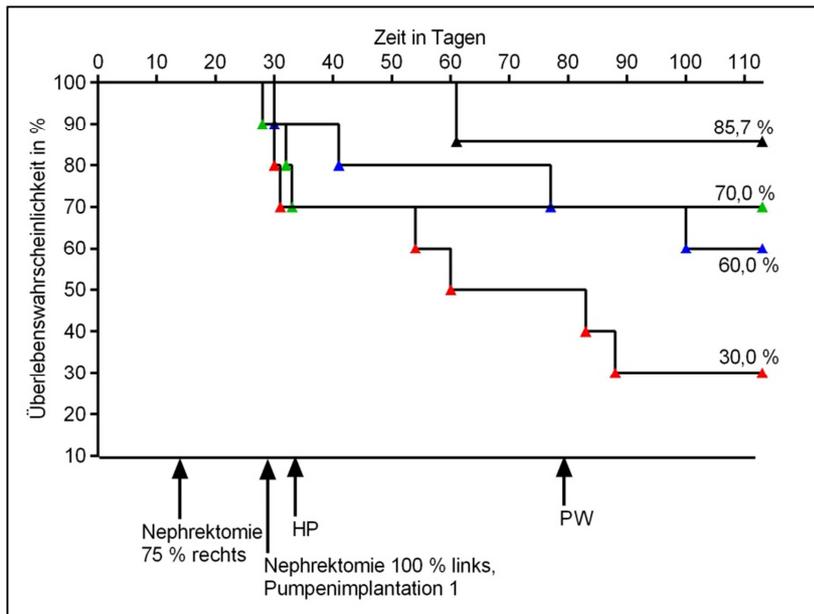


Abbildung 3.1 Kaplan-Meier-Kurve nach Induktion einer Urämie bei Mäusen, mediane Überlebenszeit in %.

Dargestellt sind Überlebenskurven der Kontrollgruppe (▲), der LM-Gruppe (▲), der LD-Gruppe (▲) und der HD-Gruppe (▲). Die einzelnen Symbole geben die verschiedenen Gruppen mit dem jeweiligen Todestag an. Die höchste Überlebenswahrscheinlichkeit (85,7 %) war bei der Kontrollgruppe festzustellen und die niedrigste Überlebenswahrscheinlichkeit (30,0 %) zeigte die HD-Gruppe; HP: Hochphosphatdiät, PW: Pumpenwechsel.

3.2 Messungen des Körpergewichts im Verlauf

Abbildung 3.2 zeigt die Mittelwerte und die Standardfehler des Körpergewichts im Verlauf der Versuchsgruppen über die gesamte Versuchsdauer. Das Pumpenleergewicht (1,1 g) wurde ab der VW 5 vom Körpergewicht der Nephrektomiegruppen abgezogen, wobei das Gewicht des Pumpeninhaltes unberücksichtigt blieb.

Bis zur ersten Operation war bei der Kontrolle, der LM-Gruppe und der LD-Gruppe jeweils eine Gewichtszunahme zu beobachten, wobei diese bei der LM-Gruppe am stärksten ausgeprägt war ([g], VW 0 Kontrolle: 19,97 vs. VW 2: 20,12; LM VW 0: 20,12 vs. 21,28; LD VW 0: 20,22 vs. VW 2: 20,72). Bei der HD-Gruppe stieg das Ausgangsgewicht in der ersten Versuchswoche von 21,45 g auf 22,10 g an und fiel in der darauf folgenden Woche wieder auf den Ausgangswert zurück.

Bei allen vier Gruppen war nach der zweiten Operation ein Gewichtsverlust festzustellen ([g], Kontrolle: VW 4: 19,80 vs. VW 5: 18,95; LM: VW 4: 21,42 vs. VW 5: 19,71; LD: VW 4: 20,73 vs. VW 5: 19,63; HD: VW 4: 21,00 vs. VW 5: 19,61), wobei dieser bei der Kontrollgruppe am geringsten war ([g], Kontrolle: 0,85 vs. LM: 1,7 vs. LD: 1,1 vs. HD: 1,39).

In der VW 6 kam es bei der Kontrolle, der LM- und der LD-Gruppe zu einem Gewichtsanstieg ([g], Kontrolle: VW 5: 18,96 vs. VW 6: 19,57; LM-Gruppe: VW 5: 20,14 vs. VW 6: 20,30; LD-Gruppe: VW 5: 19,63 vs. VW 6: 20,18). Der Mittelwert der Körpergewichte der HD-Gruppe fiel in der VW 6 auf 19,32 g ab und stieg erst in der VW 7 auf 21,1 g an. Bei den anderen

3 Ergebnisse

Versuchsgruppen stieg das Körpergewicht nach der VW 5 kontinuierlich bis zur VW 13 (Kontrolle: 22,1 g), VW 11 (LM: 22,39 g) und VW 10 (LD: 22,22 g) an.

Ab der VW 13 war sowohl bei der Kontroll- als auch bei der LM-Gruppe ein kontinuierlicher Gewichtsabfall festzustellen, während bei den MPA-Gruppen nach der VW 13 ein leichter Anstieg in VW 14 gemessen wurde, der sich im weiteren Verlauf wie bei den anderen Gruppen entwickelte.

Vergleicht man das Ausgangs- mit dem Endgewicht, so war, außer bei der Kontrollgruppe, immer ein Gewichtsverlust festzustellen. Bei der Kontrollgruppe betrug der Gewichtsanstieg 4,29 %, während bei den Nephrektomiegruppen die Gewichtsabnahmen 4,03 % (LM-Gruppe), 7,96 % (LD-Gruppe) bzw. 5,90 % (HD-Gruppe) betragen. Somit hatte die induzierte Urämie bei allen drei Nephrektomiegruppen einen Gewichtsverlust zur Folge. Eine Analyse der Gewichte mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests erfolgte jeweils nach VW 0, VW 2, VW 4, VW 11 und VW 16. Hierbei wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt.

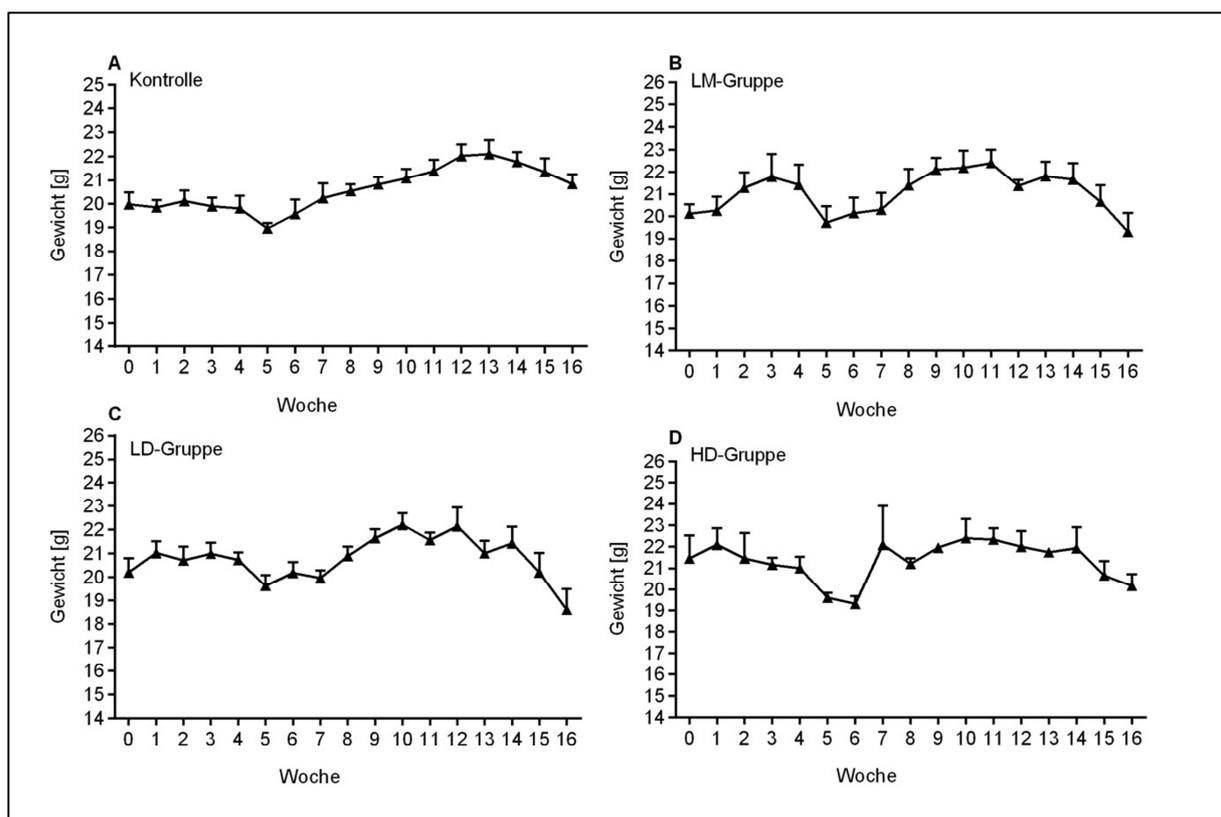


Abbildung 3.2 Kontrolle des Körpergewichts der Mäuse.

Die Tiere wurden wöchentlich gewogen und die Veränderungen des Körpergewichts der einzelnen Gruppen (A-D) sind dargestellt (Mittelwerte mit Standardfehler). Das Pumpenleergewicht wurde abgezogen. Die Versuchsgruppen unterschieden sich bezüglich ihrer Gewichtsentwicklung nicht signifikant. Es zeigte sich beim Vergleich des Anfangs- zum Endgewicht eine geringe Reduktion des Körpergewichts, außer bei der Kontrolle. VW 2: Nephrektomie 75 % rechts, VW 4: Nephrektomie 100 % links und Pumpenimplantation, VW 4 +3Tage: Hochphosphatdiät; VW 11: Pumpenwechsel.

3.3 Sektionsbefunde

In der Tabelle 3.2 sind die fünf häufigsten makroskopischen Sektionsbefunde der Mäuse, die bis zum Versuchsende überlebt haben, dargestellt.

Bei allen nephrektomierten Mäusen wurde bei der Sektion festgestellt, dass das Herz weiß streifig war, ebenso bei der Hälfte der Kontrollgruppe. Die rechte Niere war operationsbedingt bei allen nephrektomierten Mäusen verkleinert, besaß weißliche Einziehungen und eine Verhärtung des restlichen Nierengewebes. Bei insgesamt zehn von 16 Mäusen der Nephrektomiegruppen war im Abdomen eine Verklebung der Niere mit der Bauchwand sowie teilweise dem Ovar und dem Magen vorhanden. Zwei Mäuse der LM-Gruppe und vier der LD-Gruppe besaßen bei der Sektion weißliche, runde und erhabene Zubildungen auf der Zunge. Außerdem wurden bei drei Mäusen während der Sektion weißliche, steinartige Konkremete zwischen Magen, Niere und Leber gefunden. Diese Befunde wurden teilweise histologisch weiter untersucht (Kapitel 3.7).

Tabelle 3.2 Sektionsbefunde.

n = Tieranzahl

Organ	makroskopische Befundbeschreibung	Anzahl (n) der betroffenen Mäuse in der jeweiligen Gruppe in VW 16
Herz	streifig, weiß	Kontrolle n = 3 / 6 LM n = 7 / 7 LD n = 6 / 6 HD n = 3 / 3
rechte Niere	verkleinert, hart, an nephrektomierter Seite weiße Einziehung	Kontrolle n = 0 / 6 LM n = 7 / 7 LD n = 6 / 6 HD n = 3 / 3
Bauchhöhle allgemein	Verklebung von Niere + Bauchwand + (Ovar) + (Magen)	Kontrolle n = 0 / 6 LM n = 4 / 7 LD n = 4 / 6 HD n = 2 / 3
Zunge	runde, weißliche Verfärbungen	Kontrolle n = 0 / 6 LM n = 2 / 7 LD n = 5 / 6 HD n = 0 / 3
Konkremete	zwischen Magen, Niere u. Leber weißlich, steinartig Größe: ca. 0,3 x 0,5 x 0,2 cm	Kontrolle n = 0 / 6 LM n = 1 / 7 LD n = 1 / 6 HD n = 0 / 3

3.4 Herzgewichte

Bei der Sektion wurden die Herznassgewichte aller Mäuse bestimmt. Die relativen Herzgewichte waren in allen Nephrektomiegruppen höher als in der Kontrollgruppe (Tabelle 3.3 und Abbildung 3.3).

Im Vergleich zur Kontrollgruppe mit einem gemittelten Gewicht von 5,75 mg Herz/ g KGW war das relative Herzgewicht von 8,67 mg Herz/ g KGW der LM-Gruppe signifikant erhöht.

Die relativen Herzgewichte der LD-Gruppe waren im Vergleich zu denen der LM-Gruppe im Mittelwert um 0,136 mg Herz/ g KGW erhöht. Bei der HD-Gruppe kam es zu einer Reduktion der relativen Herzgewichte im Vergleich zu der LM- und LD-Gruppe im Mittelwert (LM: $8,67 \pm 0,80$ mg Herz/ g KGW, LD: $8,80 \pm 0,97$ mg Herz/ g KGW vs. HD: $6,84 \pm 0,23$ mg Herz/ g KGW).

In der Tabelle 3.3 sind auch die absoluten Herzgewichte aller Versuchsgruppen angegeben. Hier war im Unterschied zum relativen Herzgewicht das absolute Herzgewicht der LD-Gruppe geringer als das der LM-Gruppe ($159,5 \pm 8,0$ mg vs. $168,2 \pm 18,4$ mg).

Tabelle 3.3 Herzgewichte im Gruppenvergleich und bezogen auf das Körpergewicht der Mäuse nach VW 16.

Mittelwert und Standardabweichung (SEM)

Gruppe	Tier-anzahl	Relatives Herzgewicht [mg Herz /g KG W] (Mittelwert, Standardfehler)	Absolutes Herzgewicht [mg] (Mittelwert, Standardfehler)
Kontrolle	6	$5,75 \pm 0,21$	$119,5 \pm 3,8$
LM-Gruppe	7	$8,67 \pm 0,80$	$168,2 \pm 18,4$
LD-Gruppe	6	$8,80 \pm 0,97$	$159,5 \pm 8,0$
HD-Gruppe	2	$6,84 \pm 0,23$	$136,7 \pm 1,9$

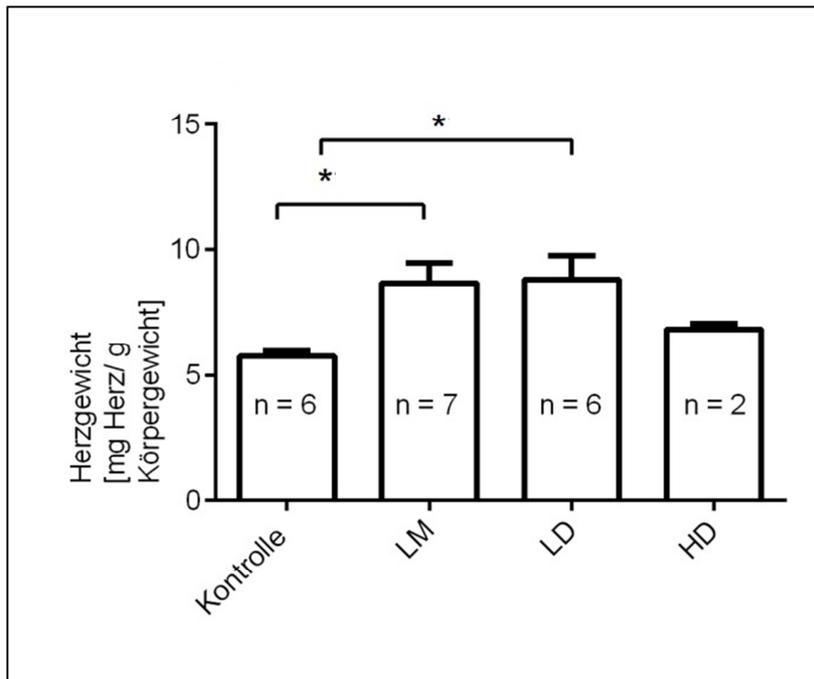


Abbildung 3.3 Herzgewichte im Gruppenvergleich bezogen auf das Körpergewicht der Mäuse nach 16 VW.

Die Angaben sind Gruppenmittelwerte mit dem Standardfehler. Die bilaterale Nephrektomie führte sowohl bei der LM- als auch bei der LD-Gruppe zu einer signifikanten Zunahme der relativen Herzgewichte. Die relativen Herzgewichte der LM-Gruppe waren im Vergleich zu der HD-Gruppe vermindert. (Mann-Whitney-U-Test, Signifikanz, * $p < 0,01$)

3.5 Bluttrockenchemie

Durch eine Analyse des Blutplasmas sollte insbesondere die erfolgreiche Induktion der Niereninsuffizienz überprüft werden. Dazu wurde das Blutplasma zu Versuchsbeginn und zu Versuchsende untersucht. Es kam dabei auf folgende Parameter an: Kalzium, ALP, BUN, CHOL und IP. In Tabelle 3.4 sind die Ergebnisse als Gruppenmittelwert \pm Standardfehler (SEM) angegeben. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen wurden mittels Mann-Whitney-U-Test identifiziert. Zur Überprüfung des Unterschiedes zwischen dem Versuchsbeginn (VW 0) und dem Versuchsende (VW 16) der einzelnen Tiere einer Gruppe wurde der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test durchgeführt. Ein p -Wert von $< 0,05$ wurde als signifikant (*) angesehen.

Der zu Versuchsende gemessene BUN-Wert war signifikant höher bei der LM-, der LD- und HD-Gruppe im Vergleich zu der Kontrolle (LM: $p = 0,002$; LD: $p = 0,009$; HD: $p = 0,048$). Der Mittelwert der Kontrollgruppe verringerte sich geringfügig, von $23,38 \pm 3,41$ mg/dl auf $21,16 \pm 2,31$ mg/dl. Der Anstieg war nur bei der LM-Gruppe statistisch signifikant ($p = 0,031$), von $22,17 \pm 3,97$ mg/dl auf $50,87 \pm 5,00$ mg/dl. Beide MPA-Gruppen zeigten am Versuchsende einen geringeren Anstieg von BUN als die LM-Gruppe. Bei der LD-Gruppe stieg dieser Wert von $22,08 \pm 3,38$ mg/dl auf $39,79 \pm 4,06$ mg/dl ($p = 0,125$) und bei der HD-Gruppe von $28,58 \pm 2,95$ mg/dl auf $38,70 \pm 5,44$ mg/d ($p = 0,500$).

3 Ergebnisse

Tabelle 3.4 Blutparameter der Mäuse.

Angegeben ist der jeweilige Gruppenmittelwert mit dem Standardfehler, VW 0: Versuchswoche null; VW 16 = Versuchswoche 16; n = Tieranzahl; p = p -Wert; (*) = Signifikanz, * p < 0,05. Die n-Tieranzahl ist zusätzlich angegeben, falls diese bei der jeweiligen Gruppe abweichend war.

Gruppe Parameter	Kontrolle n = 6	Signifikanz- niveau Wilcoxon- Vorzeichen- Rang-Test p , Kontrolle	LM n = 7	Signifikanz- niveau Wilcoxon- Vorzeichen- Rang-Test p , LM	LD n = 6	Signifikanz- niveau Wilcoxon- Vorzeichen- Rang-Test p , LD	HD n = 3	Signifikanz- niveau Wilcoxon- Vorzeichen- Rang-Test p , HD
BUN [mg/dl] VW 0 VW 16	23,38 ± 3,41 21,16 ± 2,31	0,438	22,17 ± 3,97 n = 6 50,87 ± 5,00 n = 6	0,031 (*)	22,08 ± 3,38 n = 5 39,79 ± 4,06 n = 5	0,125	28,58 ± 2,95 38,70 ± 5,44	0,500
Kalzium [mmol/l] VW 0 VW 16	2,18 ± 0,13 1,49 ± 0,12	0,031 (*)	2,27 ± 0,16 n = 6 1,62 ± 0,14 n = 6	0,063	2,24 ± 0,12 n = 4 1,47 ± 0,08 n = 4	0,125	2,34 ± 0,59 1,33 ± 0,20	0,250
ALP [U/l] VW 0 VW 16	126,70 ± 14,64 101,00 ± 11,18	0,438	132,50 ± 9,48 121,10 ± 23,28	0,578	157,50 ± 8,78 n = 4 86,25 ± 15,72 n = 4	0,125	125,00 ± 39,29 95,67 ± 16,41	0,750
CHOL [mg/dl] VW 0 VW 16	86,40 ± 24,88 n = 5 74,00 ± 7,97 n = 5	> 0,999	68,83 ± 5,41 n = 6 95,00 ± 10,67 n = 6	0,156	61,67 ± 1,45 n = 3 96,33 ± 13,02 n = 3	0,250	74,00 ± 18,04 68,33 ± 7,88	> 0,999
IP [mmol/l] VW 0 VW 16	5,38 ± 0,78 6,93 ± 0,53	0,156	4,31 ± 0,77 n = 6 7,50 ± 0,43 n = 6	0,031 (*)	2,80 ± 0,59 n = 4 8,13 ± 0,35 n = 4	0,125	4,90 ± 1,49 8,83 ± 0,28	0,250

Der Kalziumgehalt im Blutplasma aller Versuchsgruppen nahm zum Versuchsende hin ab, wobei die Abnahme nur bei der Kontrollgruppe signifikant war ($p = 0,031$). Bei der Kontrollgruppe verringerte sich der Wert von $2,18 \pm 0,13$ mmol/l auf $1,49 \pm 0,12$ mmol/l.

Der Blutplasmawert der ALP fiel bei allen Versuchsgruppen zum Versuchsende hin ab. Die Reduktion des ALP-Werts war bei den MPA-Gruppen am deutlichsten. Bei der LD-Gruppe fiel der Wert von $157 \pm 8,78$ U/l auf $86,25 \pm 15,72$ U/l und bei der HD-Gruppe von $125,00 \pm 39,29$ U/l auf $95,67 \pm 16,41$ U/l. Innerhalb der LM-Gruppe fiel der Wert von $132,50 \pm 9,48$ U/l auf $121,10 \pm 23,28$ U/l, während er sich in der Kontrollgruppe von $126,70 \pm 14,64$ U/l auf $101,00 \pm 11,18$ U/l verringerte.

Wie aus der Tabelle 3.4 ersichtlich wird, konnte beim CHOL bei der Kontrolle ($86,40 \pm 24,88$ mg/dl vs. $74,00 \pm 7,97$ mg/dl) und der HD-Gruppe ($74,00 \pm 18,04$ mg/dl vs. $68,33 \pm 7,88$ mg/dl) eine Abnahme beobachtet werden. Hingegen wurde bei der LM-Gruppe sowie der LD-Gruppe eine Zunahme festgestellt, von $68,83 \pm 5,41$ mg/dl auf $95,00 \pm 10,67$ mg/dl bzw. von $61,67 \pm 1,45$ mg/dl auf $96,33 \pm 13,02$ mg/dl.

Der IP-Wert stieg in der LM-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (Kontrolle: $5,38 \pm 0,78$ mmol/l, LM-Gruppe: $4,31 \pm 0,77$ mmol/l vs. Kontrolle: $6,93 \pm 0,53$ mmol/l, LM-Gruppe: $7,50 \pm 0,43$ mmol/l) stärker an. Von VW 0 zu VW 16 stieg der IP-Wert der LM-Gruppe signifikant an ($p = 0,031$). In den beiden MPA-Gruppen lag dieser Wert oberhalb des Wertes der LM-Gruppe (LD-Gruppe: $8,13 \pm 0,35$ mmol/l vs. HD-Gruppe: $8,83 \pm 0,28$ mmol/l). Vergleicht man den IP-Wert der Kontrollgruppe in der VW 16 mit dem jeweiligen Wert der LD- und HD-Gruppe, bestand ein signifikanter Anstieg (LD: $p = 0,038$; HD: $p = 0,048$).

Tabelle 3.4 zeigt außerdem, wie viele Tiere in den jeweiligen Gruppen bis VW 16 überlebt haben. Die Tieranzahl (n) kann abweichend sein, weil bei einigen Werten der Linearitätsbereich überschritten wurde oder die Werte nicht im Messbereich waren. Dann war das Ergebnis nicht zu verwerten.

Anhand der Entwicklung der Parameter (VW 0, VW 16) lässt sich zusammenfassend festhalten, dass die Niereninsuffizienz mittels Nephrektomie und Hochphosphatdiät erfolgreich induziert werden konnte. Durch die Behandlung mit MPA konnten die durch die Nephrektomien und die Hochphosphatdiät hervorgerufenen erhöhten BUN- und ALP-Werte positiv beeinflusst werden.

3.6 Parathormon-ELISA

Des Weiteren wurde die Konzentration von Parathormon (PTH) mittels ELISA bestimmt. In der Abbildung 3.4 ist das Ergebnis der Parathormonspiegel im Blutplasma jeweils in Form eines Punktdiagrammes mit dem Mittelwert und dem Standardfehler (SEM) dargestellt. Durch die Induktion der Niereninsuffizienz und die Durchführung der Hochphosphatdiät sollte es zur Ausbildung eines alimentären und renal bedingten Hyperparathyreoidismus kommen. Durch die PTH-Dysbalance und den damit verbundenen Störungen im Kalzium- und Phosphathaushalt sollte es zur Ausbildung einer in der *Tunica media* der Gefäße lokalisierten Kalzifizierung kommen.

Wie in Abbildung 3.4 gezeigt, kam es in der LM-, LD- und HD-Gruppe jeweils zu einem Anstieg des Parathormonlevels im Blutplasma (Differenz zwischen VW 0 und VW 16: LM: 577,8 pg/ml; LD: 789,6 pg/ml, HD: 748,0 pg/ml), wobei dieser bei der LM-Gruppe signifikant war ($p = 0,031$). In der Kontrollgruppe konnte ein geringer Unterschied von 107,4 pg/ml in der PTH-Konzentration zwischen Versuchsbeginn und -ende detektiert werden.

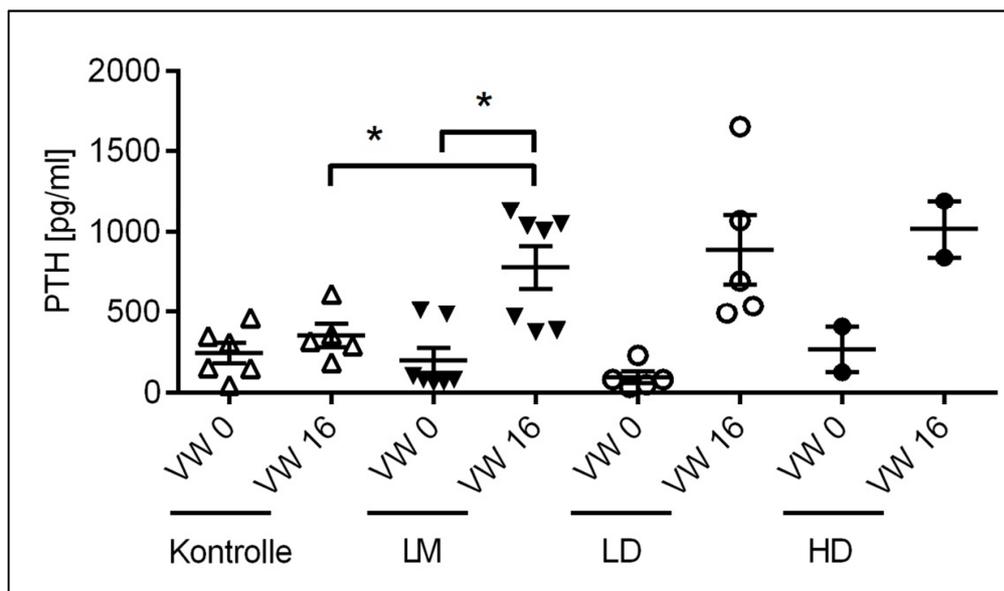


Abbildung 3.4 Parathormon (PTH)-Konzentration im Blutplasma.

Die PTH-Konzentration im Blutplasma wurde mittels ELISA bestimmt. Die Punkte repräsentieren die jeweiligen Einzelwerte der Tiere mit dem Standardfehler (SEM). Erkennbar ist ein höherer PTH-Anstieg bei den Nephrektomiegruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe. (Signifikanz, $*p < 0,05$)

3.7 Histomorphologische Untersuchung der rechten Niere und des Herzens

3.7.1 Rechte Niere

Wie bereits im Kapitel 2.9 beschrieben, wurde das Ausmaß der Nierenschädigung mittels HE-Färbung untersucht. Mit Hilfe der Alizarinrot S- und von Kossa-Färbung erfolgte der Kalziumnachweis. Bei allen drei Färbungen wurden jeweils drei Objektträger aus dem vorderen-, mittleren- und hinteren Nierenteil gefärbt und jeweils in 100- bzw. 400-facher Vergrößerung mikroskopisch untersucht.

Die Nierenanschnitte der Kontrollgruppe waren erwartungsgemäß histologisch nicht verändert (Abbildung 3.5 und Abbildung 3.6). Im Längsschnitt der Niere ließ sich die typische Nierenstruktur mit Nierenrinde (*Cortex renalis*), Nierenmark (*Medulla renalis*) und Nierenbecken (*Pelvis renalis*) erkennen. In der Nierenrinde waren außerdem die Nierenkörperchen (*Corpuscula renale*) zu identifizieren. Die Abbildung 3.6 zeigt in der Detailansicht (400-fache Vergrößerung) das *Corpusculum renale* in morphologisch unveränderter Form. Es besteht aus einem Gefäßknäuel (*Glomerulum*) und der umgebenden Bowman'schen Kapsel (*Capsula glomeruli*). Hier findet die Blutversorgung über den Gefäßpol (*Polus vascularis*) statt. Am Harnpol erfolgt der Übertritt des Primärharns in den proximalen Tubulus (Baumgärtner und Gröne, 2012).

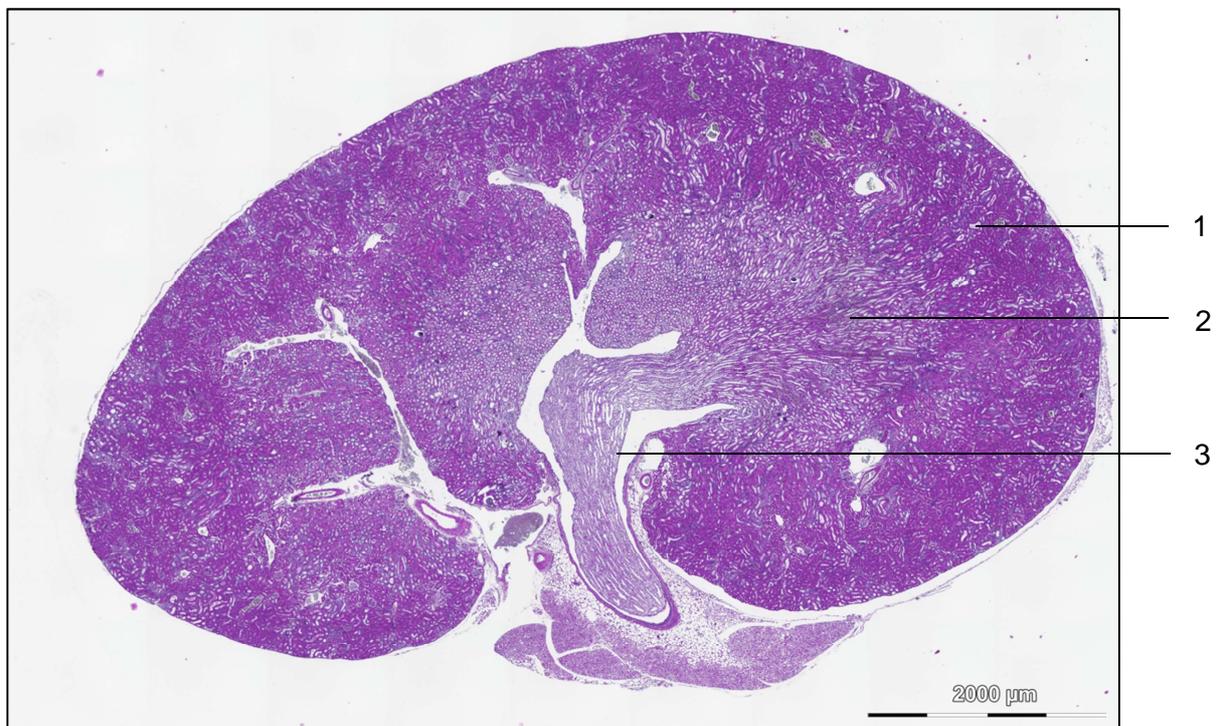


Abbildung 3.5 Histologische Übersichtsaufnahme einer Niere der Kontrollgruppe, HE-Färbung. Die typische physiologische Nierenstruktur mit Nierenrinde (1, *Cortex renalis*), Nierenmark (2, *Medulla renalis*) und Nierenbecken (3, *Pelvis renalis*) ist zu erkennen.

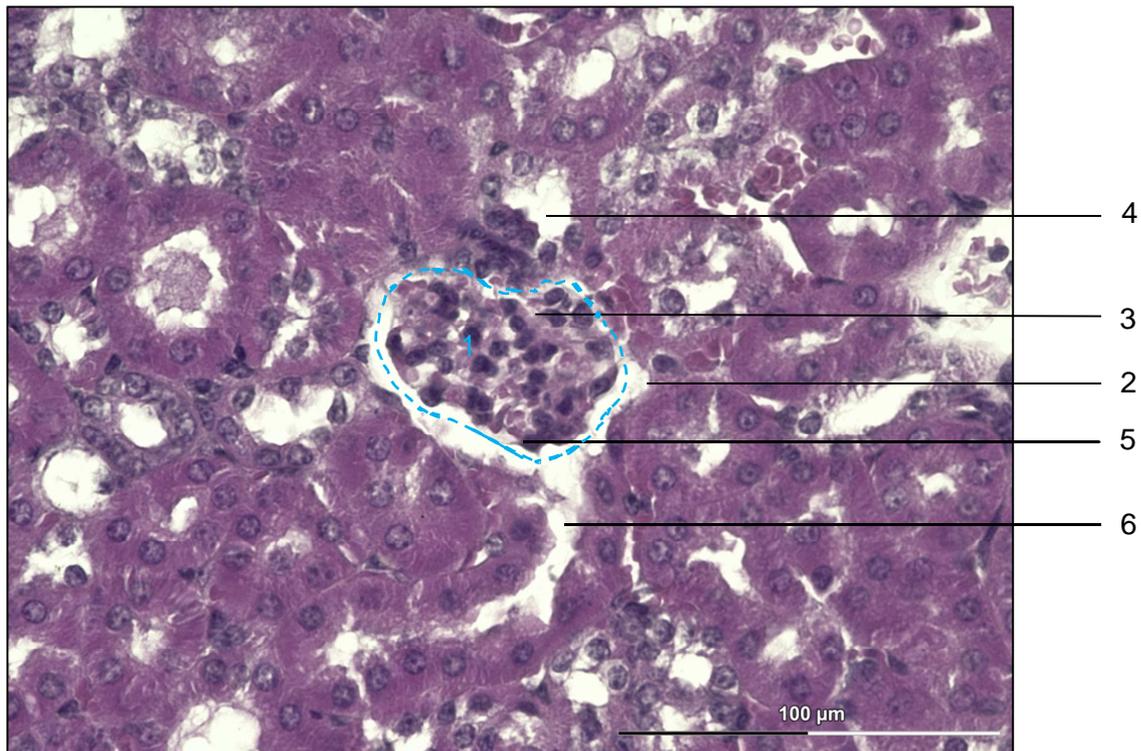


Abbildung 3.6 Detailaufnahme des Nierenrindengewebes der Kontrollgruppe, HE-Färbung.

Das Nierenkörperchen (*Corpusculum renale*, 1) schließt das von der Bowman-Kapsel (parietales Blatt, 2) umgebende Gefäßknäuel (*Glomerulum*, 3) ein. An dem Gefäßpol (4) tritt die *Arteriola glomerularis afferens* ein und die *Arteriola glomerularis efferens* aus. Der Bowman-Kapselraum (5) sammelt den Primärharn, der im Harnpol (6) das Nierenkörperchen verläßt und in den proximalen Tubulus übertritt. Das Glomerulum erscheint morphologisch unverändert.

Die Gewebestruktur der rechten Niere von den nephrektomierten Mäusen war im Vergleich zu den Kontrolltieren verändert. In dem nicht-nephrektomierten Teil der rechten Niere bildete sich als Kompensationsmechanismus in Folge der Nephrektomie eine glomeruläre Hypertrophie aus, welche sich in einer Volumenzunahme der verbleibenden Glomeruli manifestierte (Abbildung 3.7). Im weiteren Verlauf entwickelte sich eine Glomerulosklerose, Tubulusdilatationen und tubuläre Proteinzylinder. Zudem bildete sich eine interstitielle Fibrose mit Entzündungszellen aus (Abbildung 3.8 und Abbildung 3.9).

Kurz nach der zweiten Operation starben sechs Versuchstiere, davon drei durch Euthanasie. Die strukturellen Nierenveränderungen sowohl bei den euthanasierten als auch den verstorbenen Versuchstieren waren zwar wenig ausgeprägt, allerdings war das Gewebe nach der zweiten Operation am nephrektomierten Teil verhärtet und verfestigte sich durch die fortschreitende Nierenfunktionsstörung weiter. Hierbei gab es keine Unterschiede zwischen den Gruppen.

Außerdem waren im nephrektomierten Nierenanteil dunkelviolette, kristallartige Strukturen feststellbar (Abbildung 3.9 und Abbildung 3.7). Mit Hilfe der Alizarinrot S- und auch Kossa-Färbung konnte nachgewiesen werden, dass es sich hierbei um Kalziumablagerungen handelt (Abbildung 3.11). Hier gab es keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Geringe

Kalziumablagerungen waren auch bei der Kontrollgruppe im Nierenmark zu finden (Abbildung 3.10).

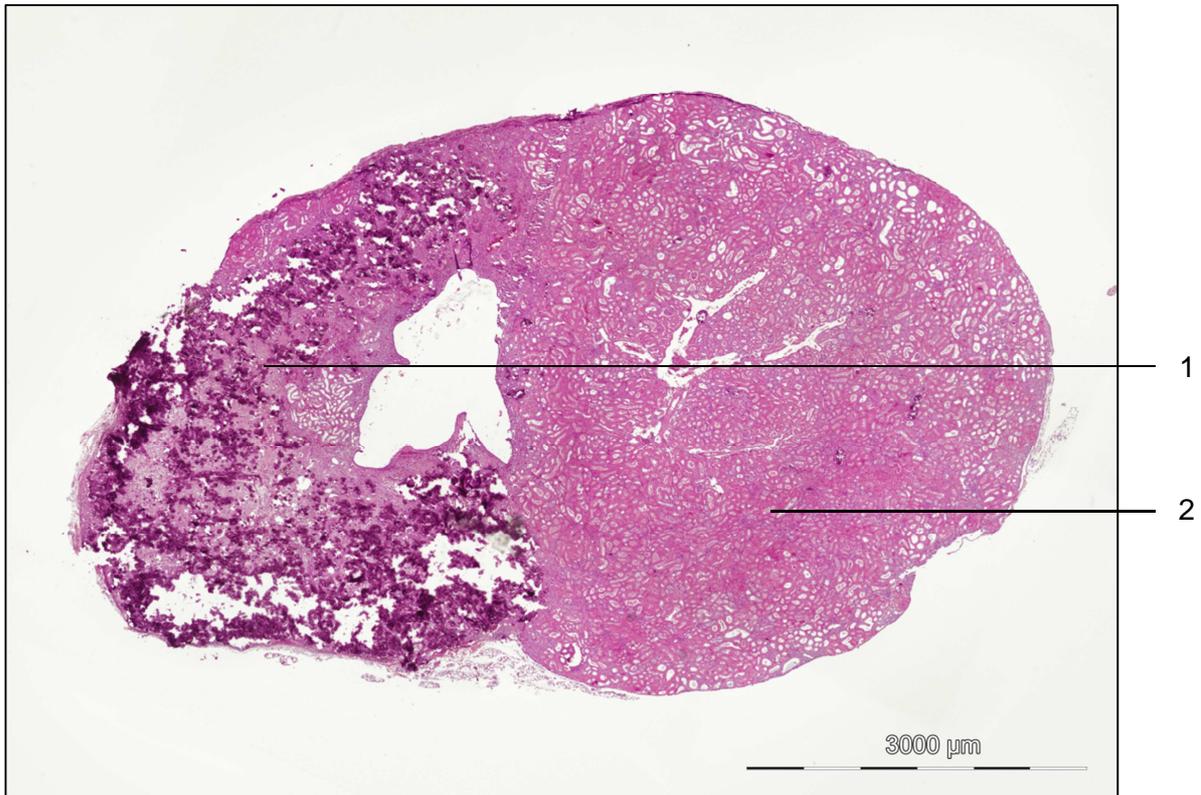


Abbildung 3.7 Histologische Übersichtsaufnahme der rechten Niere der Nephrektomiegruppe, HE-Färbung.
Die Zerteilung der Niere ist deutlich zu erkennen: nephrektomierter Teil (1) und hypertrophierter Teil (2).

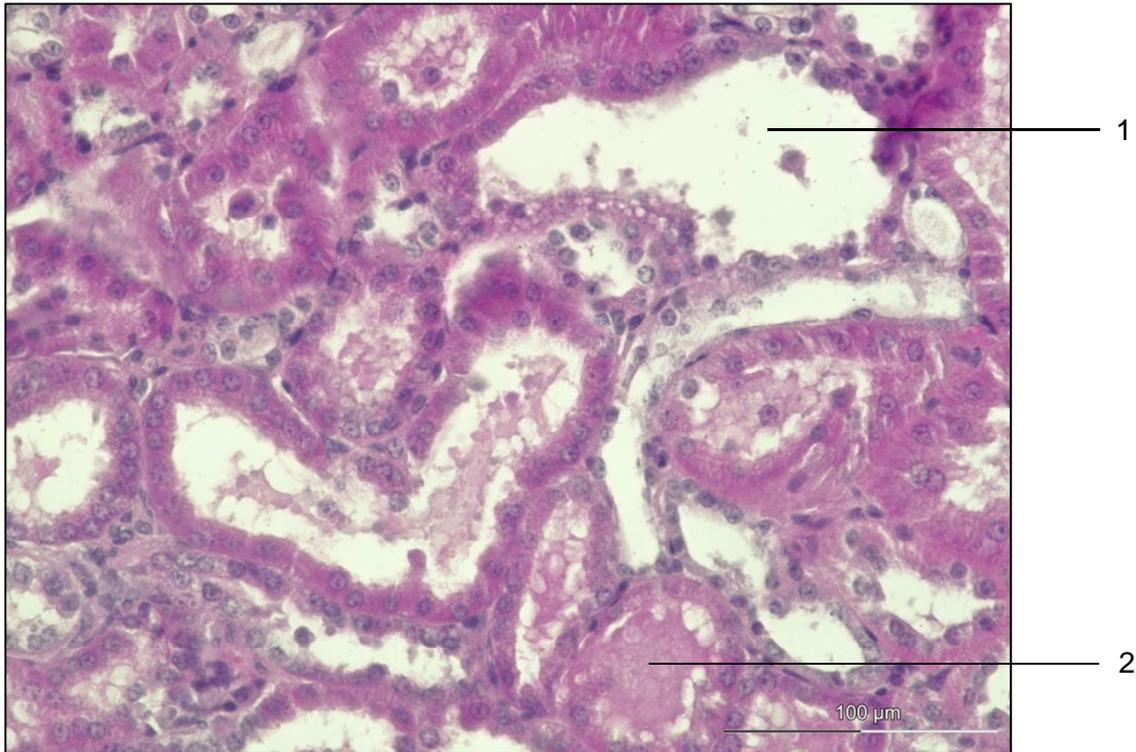


Abbildung 3.8 Detailansicht des nicht-nephrektomierten Anteils in der rechten Niere der Nephrektomiegruppe, HE-Färbung.

Die Tubulusanschnitte besitzen ein deutlich dilatiertes Lumen (1), teilweise mit Proteinzyllindern (2).

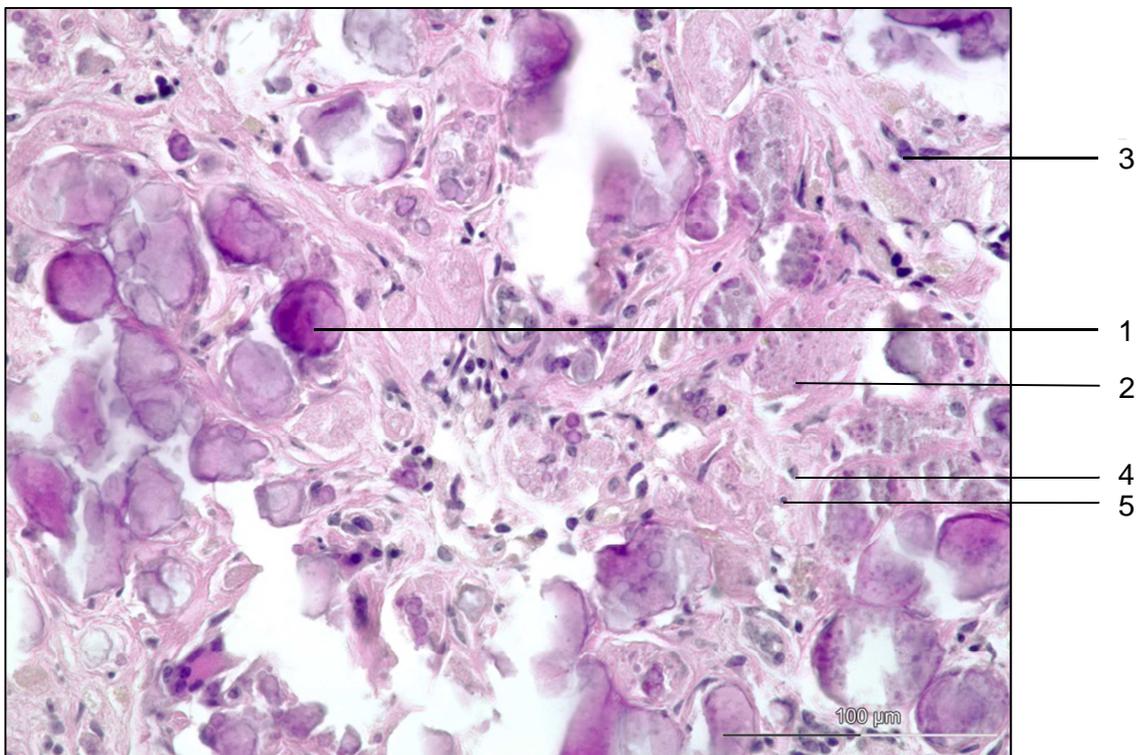


Abbildung 3.9 Detailansicht des nephrektomierten Anteils in der rechten Niere, HE-Färbung.

Zu sehen sind Proteinzyllinder der verkalkten Tubuli (1). Das Nierengewebe besteht aus strukturlosen, nekrotischen Tubulusepithelzellen, (2) teilweise mit Kernpyknose (3) und interstitiellen Verbreiterungen durch inflammatorische Prozesse durch Makrophagen (4) und Lymphozyten (5).

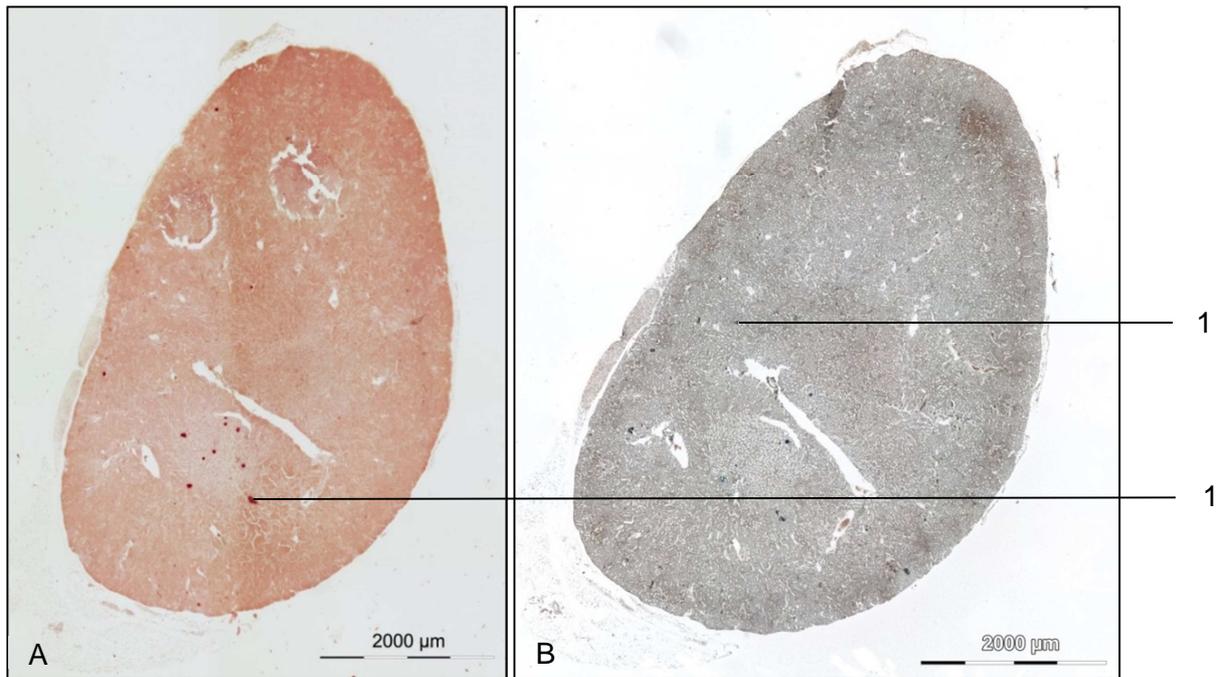


Abbildung 3.10 Histologische Übersichtsaufnahmen der rechten Niere der Kontrollgruppe. Alizarinrot S- (A), von Kossa-Färbung(B), beides 40-fache Vergrößerung. Es sind geringgradige Kalziueinlagerungen (rot bzw. schwarz gefärbte Kristalle) im Nierenmark sichtbar (1).

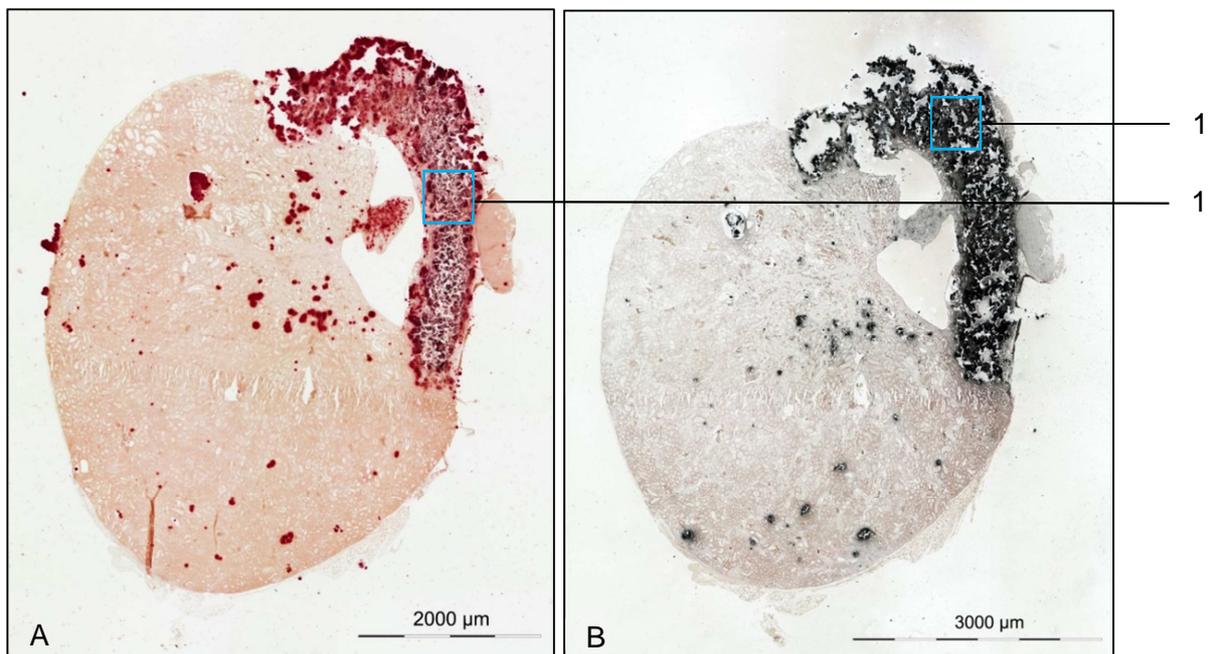


Abbildung 3.11 Histologische Übersichtsaufnahmen der rechten Niere der Nephrektomiegruppe. Alizarinrot S- (A), von Kossa-Färbung (B), beides 40-fache Vergrößerung. Es sind Kalziueinlagerungen (rot bzw. schwarz gefärbte Kristalle) überwiegend im nephrektomierten Anteil der Niere sichtbar (1).

3.7.2 Herz

Die HE-Färbung gestattete eine Beurteilung der Beschaffenheit der Kardiomyozyten und der extrazellulären Matrix. Die Herzmuskulatur der Kontrollgruppe besaß überwiegend eine physiologische Struktur (Abbildung 3.12 A und Abbildung 3.13). In jeder Herzmuskelzelle befand sich ein zentraler Zellkern im Sarkoplasma (Abbildung 3.13), umgeben von bindegewebigem Endomysium. Randständig im Myokard waren neben nekrotischen Arealen auch dunkel-violette Ablagerungen zu finden. Mittels Alizarinrot S- bzw. von Kossa-Färbung ließen sich diese als Kalziumphosphatkristalle nachweisen (Abbildung 3.18).

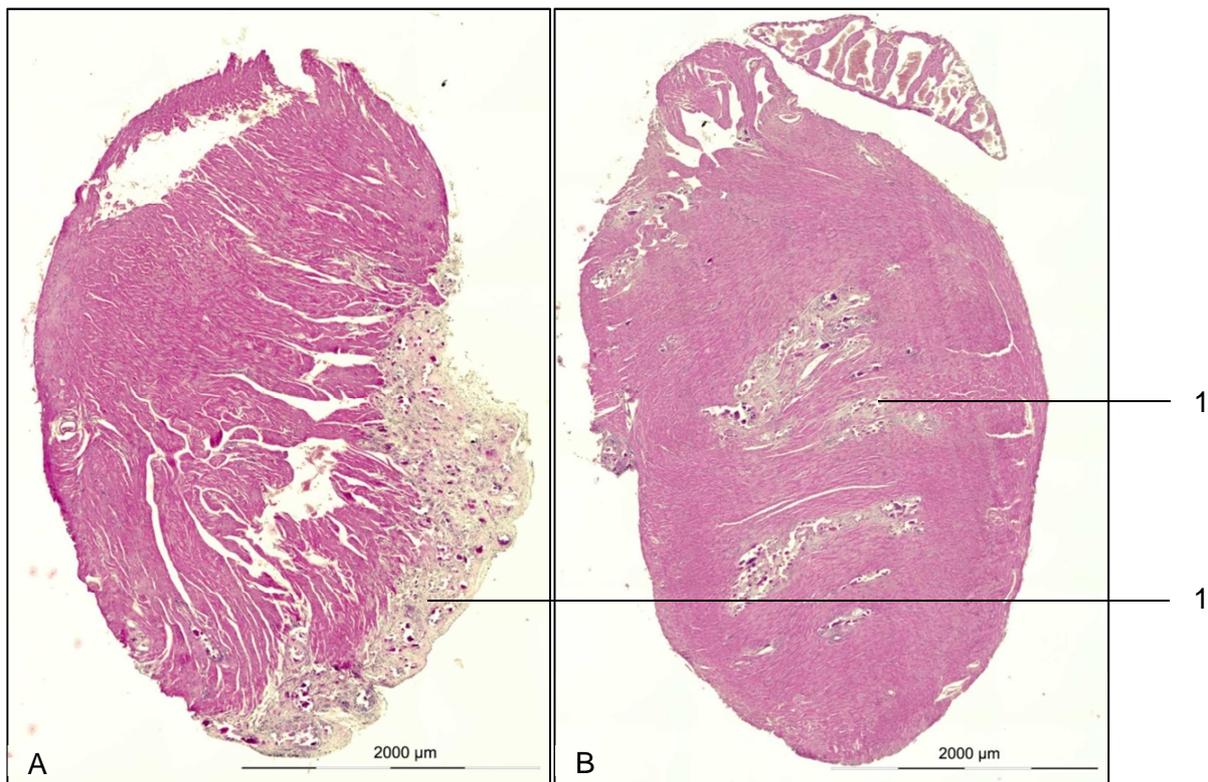


Abbildung 3.12 Histologische Übersichtsaufnahmen des Herzens der Kontrolle (A) und der LM-Gruppe (B), HE-Färbung.

Es sind Kalkeinlagerungen (1) bei der LM- und bei der Kontrollgruppe festzustellen.

In der Abbildung 3.12 B und der Abbildung 3.14 sind beispielhaft Herzanschnitte in unterschiedlichen Vergrößerungen der LM-Gruppe dargestellt. Hier sind ebenfalls nekrotische und verkalkte Kardiomyozyten zu finden, allerdings nehmen diese einen viel größeren Anteil an der Herzmuskulatur ein als bei der Kontrollgruppe. Die Abbildung 3.14 zeigt, dass die Kalziumeinlagerungen von einer chronischen Entzündung mit Infiltrationen von Makrophagen, Plasmazellen sowie Fibroblasten umgeben sind. Bei diesen histologischen Veränderungen handelt es sich um eine sekundäre Kardiomyopathie.

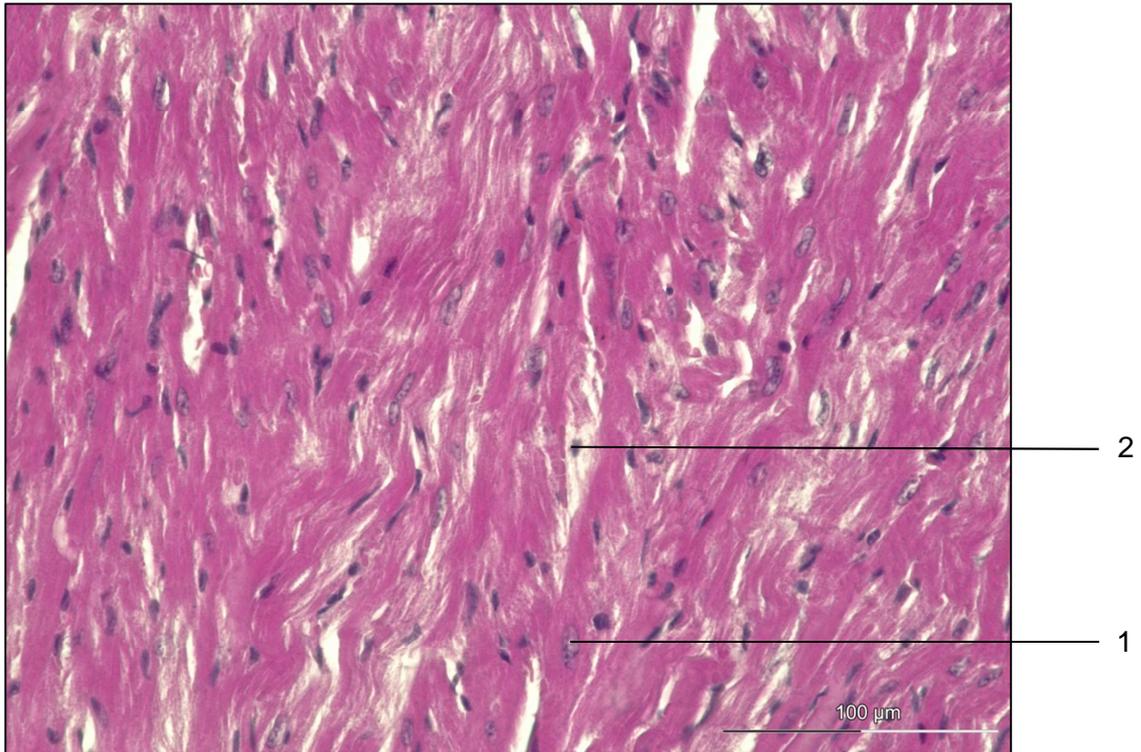


Abbildung 3.13 Detailaufnahme der Herzmuskulatur der Kontrollgruppe, HE-Färbung.
Die Herzmuskulatur ist gekennzeichnet durch die zentrale Lage der Kerne (1). Außerdem lässt sich das Endomysium mit Fibrozytenkern (2) erkennen.

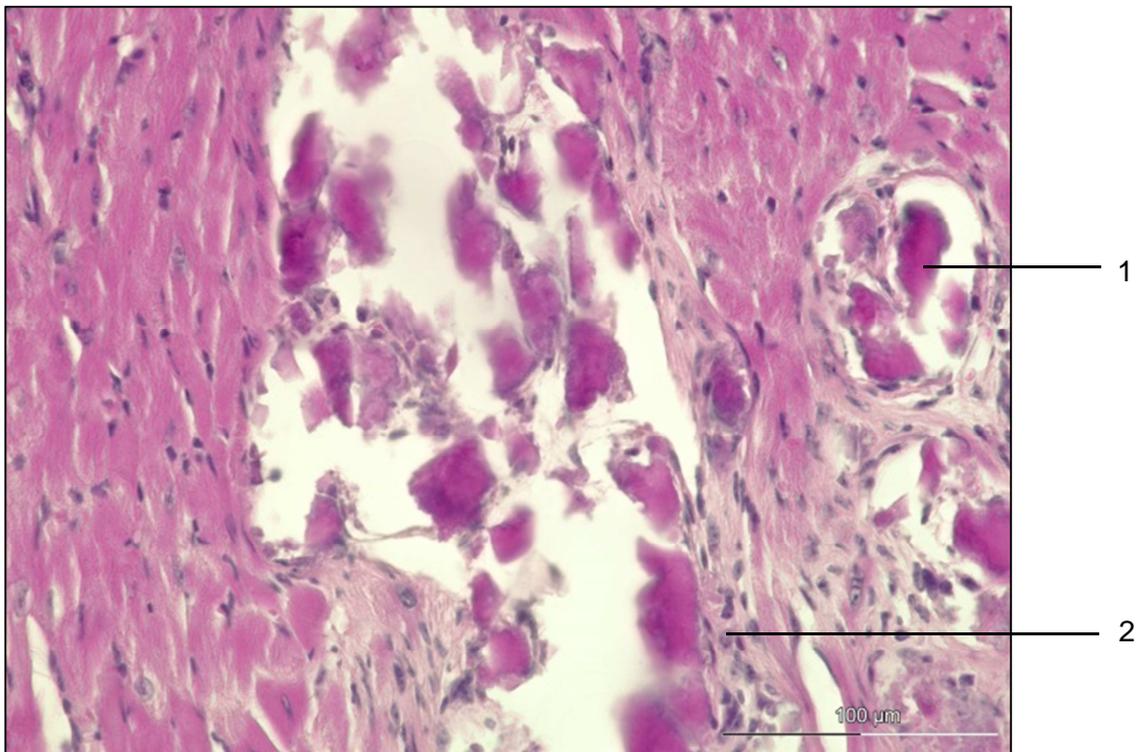


Abbildung 3.14: Detailaufnahme der Herzmuskulatur der LM-Gruppe, HE-Färbung.
Es sind fragmentierte verkalkte Kardiomyozyten (1) sowie eine Fibrose mit Entzündungsinfiltrat (2) zu erkennen.

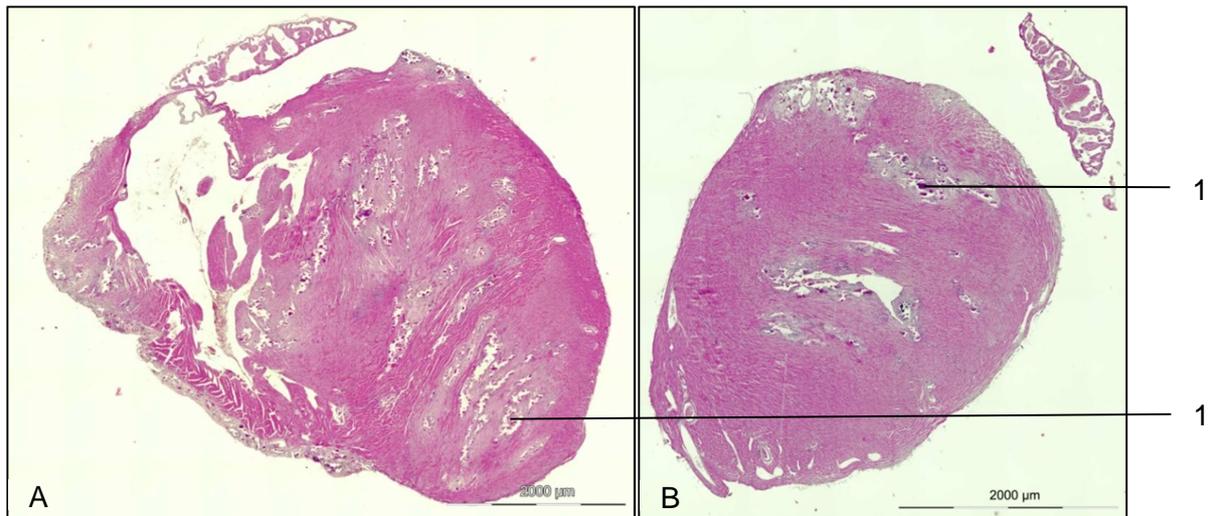


Abbildung 3.15 Histologische Übersichtsaufnahmen des Herzens der LD- (A) und der HD-Gruppe (B), HE-Färbung.

Es sind Kalkablagerungen (1) in der LD-Gruppe und der HD-Gruppe zu erkennen.

Die Kalzifizierung der Herzmuskulatur sowie die intermyozytäre Fibrose war bei der LD-Gruppe stärker ausgeprägt als bei der Kontrollgruppe (Abbildung 3.12 A, Abbildung 3.15 A, Abbildung 3.16 und Abbildung 3.18).

Vergleicht man die HD-Gruppe mit der LD-Gruppe, so konnte eine Reduktion der Kalkablagerungen und der kardialen Fibrose bei Ersterer festgestellt werden (Abbildung 3.15 A, Abbildung 3.15 B, Abbildung 3.16, Abbildung 3.17 und Abbildung 3.18).

Um quantitative Unterschiede im Kalziumgehalt im Herzen zwischen den Gruppen zu detektieren, erfolgten histomorphometrische und biochemische Untersuchungen (Kapitel 3.8 und Kapitel 3.9).

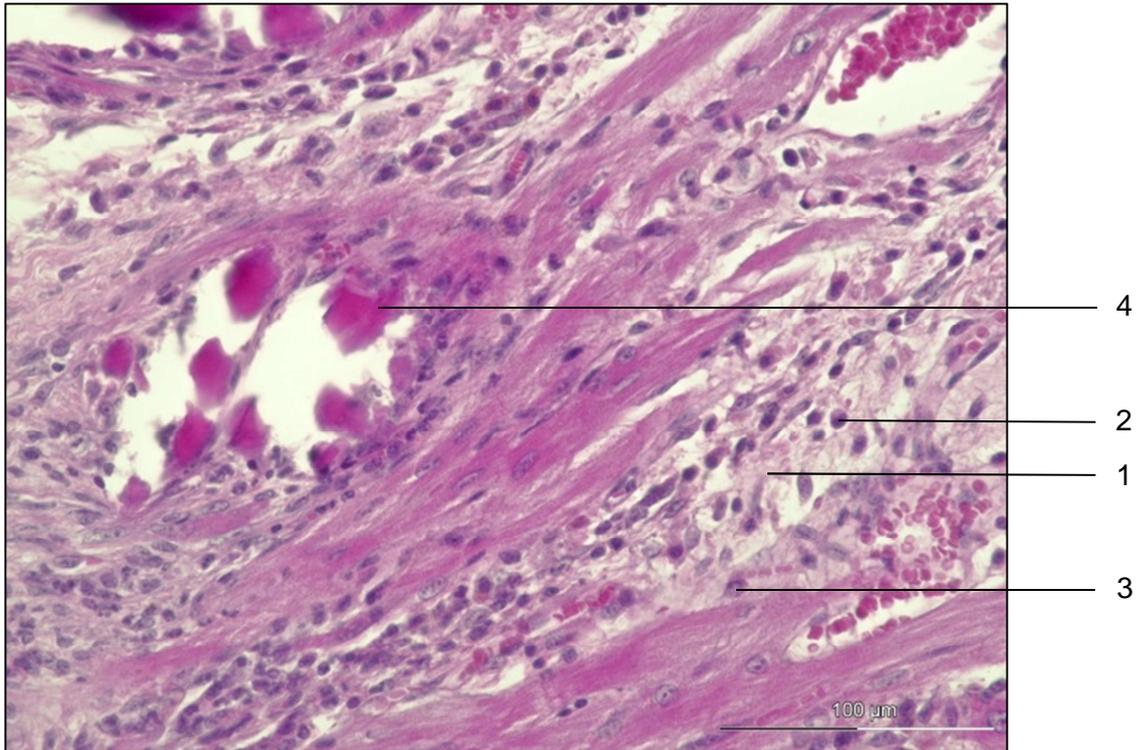


Abbildung 3.16 Detailaufnahme der Herzmuskulatur der LD-Gruppe, HE-Färbung.

Erkennbar ist die Zunahme der extrazellulären Matrix mit ausgeprägter intermyozytärer Fibrose (1) im Vergleich zur Abbildung 3.12 A. Es sind hier außerdem zahlreiche Plasmazellen (2) und Makrophagen (3) sowie Kalziueinlagerungen (4) zu finden.

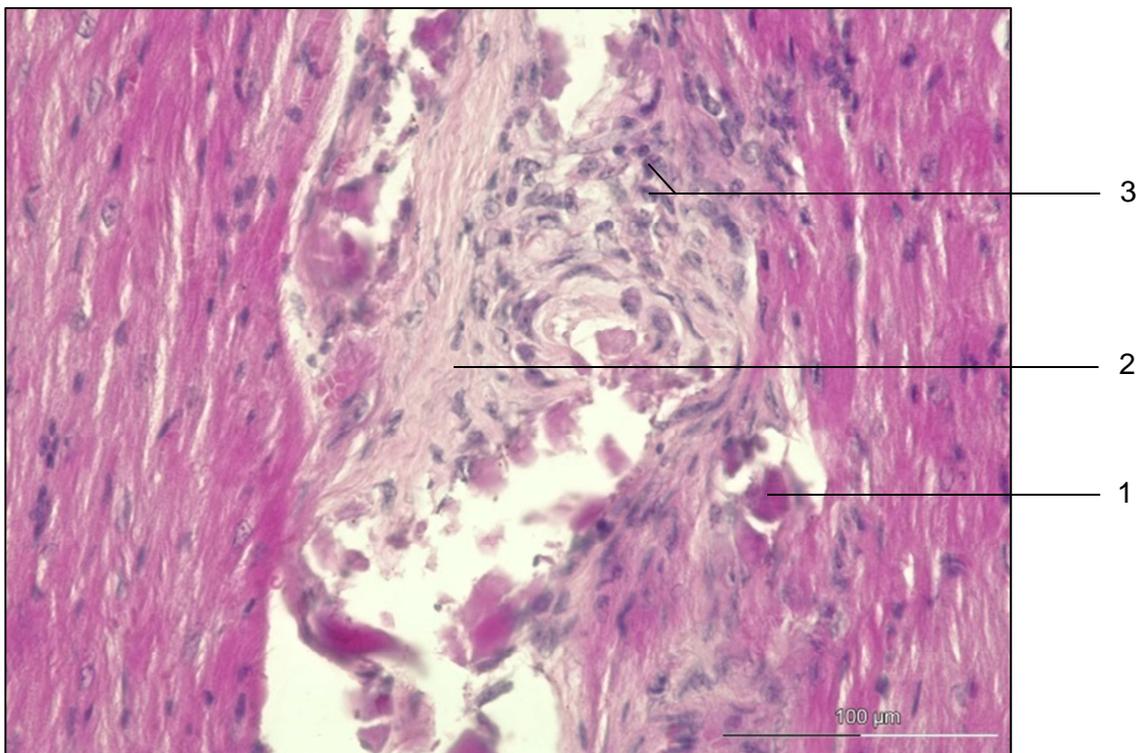


Abbildung 3.17 Detailaufnahme der Herzmuskulatur der HD-Gruppe, HE-Färbung.

Bei der HD-Gruppe sind Verkalkungen (1) sowie eine umgebende Fibrose (2) festzustellen. Ebenfalls befinden sich in der Umgebung Entzündungszellen (3).

3 Ergebnisse

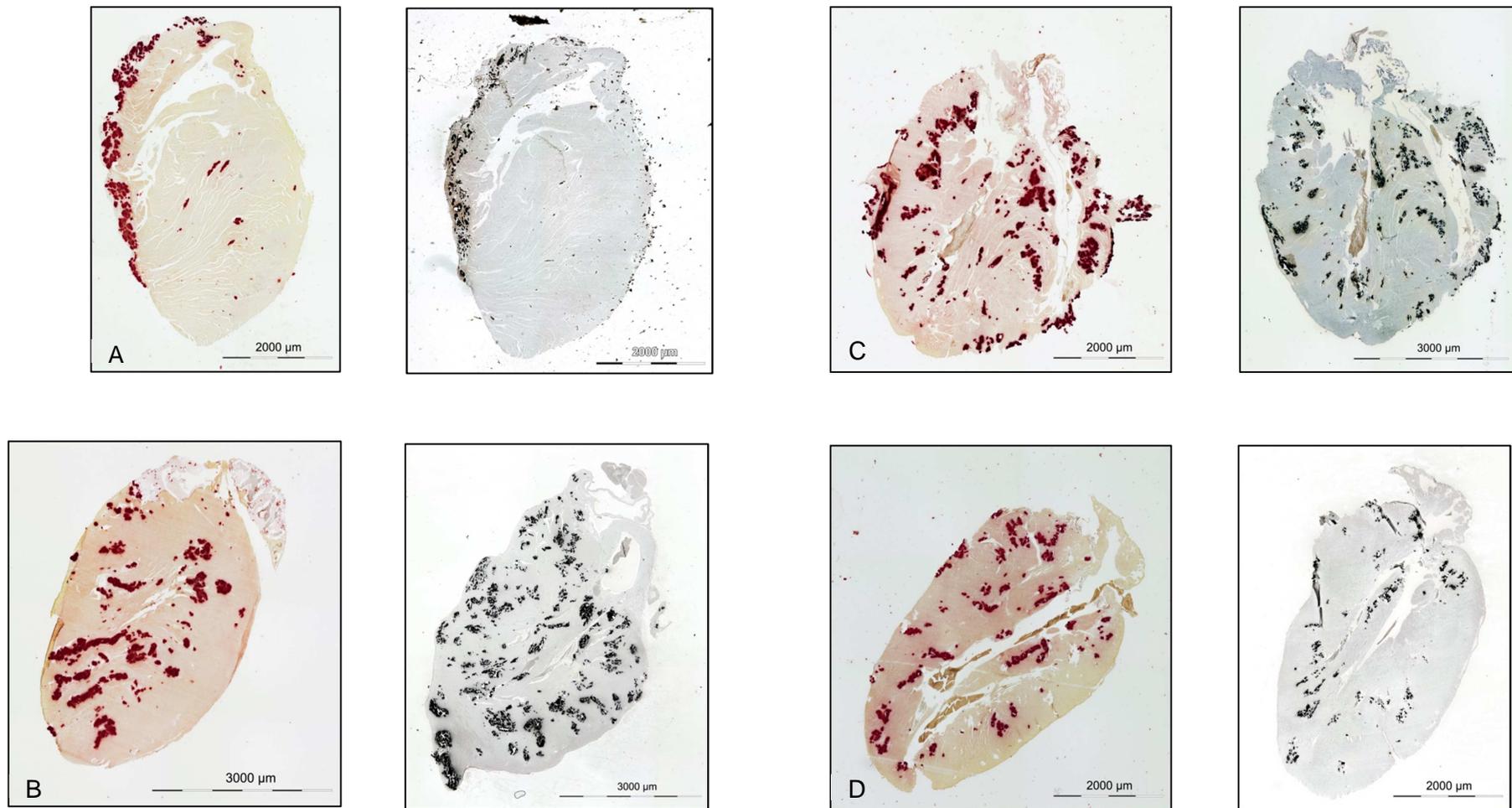


Abbildung 3.18 Histologische Übersichtsaufnahmen der Herzanschnitte der Kontrolle (A), der LM- (B), der LD- (C) und der HD-Gruppe (D).

Für den visuellen Nachweis der Kalzifizierung wurden die histologischen Schnitte mit Alizarinrot S- und von Kossa gefärbt. Die Kalziumablagerungen sind als rot gefärbte oder schwarze Kristalle sichtbar. Im Vergleich mit der Kontrollgruppe ist bei allen Nephrektomiegruppen eine deutliche Zunahme von Kalziumablagerungen im Gewebe erkennbar.

3.8 Histomorphometrische Quantifizierung der Kalziumablagerungen im Herzen

Diese Daten wurden, wie im Kapitel 2.11 beschrieben, mit Hilfe der BZ-2- Analyzer-Software von Keyence ermittelt und nach der beschriebenen Formel berechnet. Die gemessene Kalziumfläche pro Herzanschnitt wird im Folgenden als relative Fläche in Prozent (Tabelle 3.5 und Abbildung 3.19) angegeben. In der Tabelle 3.5 sind die jeweiligen Gruppenmittelwerte mit dem Standardfehler angegeben. Die relative Kalziumfläche im Herzen der LM-Gruppe war mit $12,00 \pm 1,18$ % ($p = 0,003$) signifikant größer als bei der Kontrollgruppe mit $4,12 \pm 1,37$ %. Der Gruppenmittelwert der relativen Kalziumfläche der LD-Gruppe ($13,55 \pm 1,26$ %) lag geringfügig über dem der LM-Gruppe ($12,00 \pm 1,18$ %). Die relative Kalziumfläche in der HD-Gruppe war mit $6,39 \pm 0,75$ % ($p = 0,033$) im Vergleich zur LM-Gruppe mit $12,00 \pm 1,18$ % Kalziumfläche signifikant verringert.

Tabelle 3.5 Relative Kalziumfläche im Herzen.
Mittelwerte und Standardfehler (SEM)

Gruppe	Tieranzahl	Relative Kalziumfläche in % (Mittelwert, Standardfehler)
Kontrolle	6	$4,12 \pm 1,37$
LM-Gruppe	7	$12,00 \pm 1,18$
LD-Gruppe	6	$13,55 \pm 1,26$
HD-Gruppe	3	$6,39 \pm 0,75$

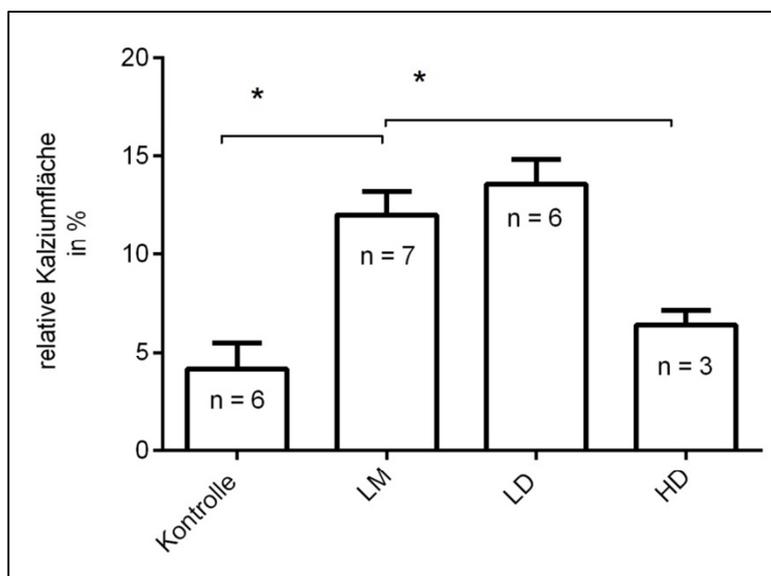


Abbildung 3.19 Relative Kalziumfläche im Herzen in %.

Die Balken repräsentieren den jeweiligen Gruppenmittelwert mit dem Standardfehler. Histomorphometrische Bestimmung mittels BZ-Analyzer Software von Keyence. Die relative Kalziumfläche der LD-Gruppe mit einem Wert von $13,55 \pm 1,26$ % ist leicht erhöht gegenüber der LM-Gruppe mit einem Wert von $12,00 \pm 1,18$ %. Hingegen zeigt die ermittelte relative Kalziumfläche [%] in der HD-Gruppe mit $6,39 \pm 0,75$ % eine signifikante Abnahme zur LM-Gruppe. (Mann-Whitney-U-Test, Signifikanz, $*p < 0,05$)

3.9 Biochemische Kalziumbestimmung im Herzen

Das Ergebnis der biochemischen Kalziumbestimmung im Herzen ist in der Tabelle 3.6 und der Abbildung 3.20 bezogen auf das Herztrockengewicht dargestellt, dabei sind jeweils die Gruppenmittelwerte mit Standardfehler angegeben.

Der relative Kalziumgehalt im Herzen der LM-Gruppe war signifikant um 7,524 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Herz ($p = 0,001$) höher als bei der Kontrollgruppe. Bei beiden MPA-Gruppen konnte der relative Kalziumgehalt vermindert werden, wobei diese Verminderung mit 4,408 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Herz bei der HD-Gruppe deutlich größer war als bei der LD-Gruppe mit 0,975 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Herz.

Tabelle 3.6 Relativer Kalziumgehalt im Herzen.
Mittelwert und Standardfehler (SEM)

Gruppe	Tieranzahl	Relativer Kalziumgehalt in [$\mu\text{g}/\text{mg}$ Herz] (Mittelwert, Standardfehler)
Kontrolle	6	0,570 \pm 0,221
LM-Gruppe	7	8,094 \pm 1,720
LD-Gruppe	6	7,119 \pm 1,242
HD-Gruppe	3	3,686 \pm 0,976

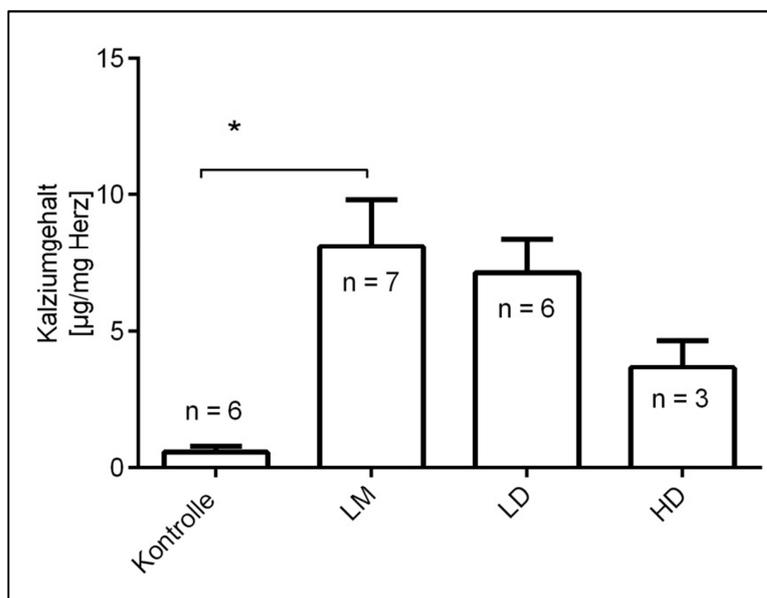


Abbildung 3.20 Biochemische Kalziumbestimmung im Herzen.

Die Balken repräsentieren den jeweiligen Gruppenmittelwert mit dem Standardfehler. Der Kalziumgehalt wurde auf das Herztrockengewicht bezogen. Der Kalziumgehalt im Herzen der LM-Gruppe war signifikant höher als bei der Kontrollgruppe. Dieser nahm bei beiden MPA-Gruppen ab. (Mann-Whitney-U-Test, Signifikanz, $*p < 0,01$)

4 Diskussion

Ziel des vorliegenden Tierversuchs war es, die anti-kalzifizierende Wirkung von MPA im Mausmodell zu überprüfen, die bei *in vitro* Versuchen bereits festgestellt wurde. Hierfür wurde eine Niereninsuffizienz mittels Nephrektomie und Hochphosphatdiät induziert. Die hier eingesetzten Dosierungen von MPA (3 mg/kg KGW/Tag und 30 mg/kg KGW/Tag) richteten sich nach den Vorergebnissen und anderen Studien (van Leuven et al., 2012, Goncalves et al., 2004). In den für diese Arbeit relevanten Studien wurde MMF, die inaktive veresterte Form von MPA und nicht direkt die aktive Form verwendet. Diese Studien werden im weiteren Verlauf der Diskussion im Einzelnen noch näher beschrieben.

Von den insgesamt 37 Versuchstieren konnten 22 für die Auswertungen herangezogen werden. Die verbliebenen 15 Versuchstiere verstarben bzw. wurden auf Grund von Komplikationen euthanasiert. Durch die hier angewendete schonende, vollständig antagonisierbare Anästhesie kam es bei zwei Versuchstieren zu akuten Todesfällen. Die bei Nagern sonst üblichen Narkoserisiken, z. B. Hypothermie und langer Nachschlaf, können durch die Antagonisierung vermieden werden (Erhardt et al., 2011). Abgesehen von gelegentlichen Todesfällen, die während der Operationen und der Anästhesie auftraten, lag die Mortalität in separaten Studien von Gagnon und Gallimore (1988) bei 4-15 % in Abhängigkeit vom Ausmaß der Elektrokoagulation der rechten Niere. Todesfälle traten aufgrund einer akuten Niereninsuffizienz vom zweiten bis vierten Tag nach der linken Nephrektomie auf. Hierbei wurden die BUN-Werte oberhalb von 250 mg/dl gemessen (Gagnon und Gallimore, 1988).

In der vorliegenden Studie lag die Mortalität ein bis fünf Tage nach der zweiten Operation bei 16,22 % aufgrund einer akuten Niereninsuffizienz. Durch die massiven Hautreizungen in der Pumpenregion waren bei beiden MPA-Gruppen die humanen Endpunkte erreicht, so dass 30 % Versuchstieren euthanasiert wurden. Da nur die beiden MPA-Gruppen betroffen waren, scheint die Wirkung des Lösungsmittels (DMSO, Ethanol, steriles Wasser, Cremophor) hierfür nicht verantwortlich zu sein. Die subkutane Applikation oder Wechselwirkungen von MPA mit dem Lösungsmittel könnten mögliche Ursachen sein. Auch bei Patienten mit Nierentransplantation konnten unter MPA-Therapie mehr Wundheilungsstörungen festgestellt werden als bei Azathioprin (Humar et al., 2001).

Bei den Tieren der Kontrollgruppe kam es zu Gewichtszunahmen, während die Tiere der Nephrektomiegruppen an Gewicht verloren, dabei waren die Gewichtsverluste in der LD-Gruppe am höchsten. Diese Gewichtsreduktionen stellen leichte (Gewichtsreduktion von < 5 %) bis mäßige (Gewichtsreduktion von 5-20 %) Belastungen für die Versuchstiere dar (Arbeitskreis Berliner Tierschutzbeauftragter, 2010). Die Gewichtszunahme bei der

Kontrollgruppe fiel geringer aus, als es für diesen Mausstamm zu erwarten war und könnte auf die Scheinoperationen und die Hochphosphatdiät zurückgeführt werden. Die Gewichtsabnahme der Nephrektomiegruppen verdeutlicht die Belastung für die Mäuse durch die Ausbildung einer Urämie. Auch beim Menschen macht sich eine CKD u.a. durch eine Gewichtsabnahme bemerkbar (Keller und Geberth, 2010). In anderen Tierstudien, bei denen Nephrektomien durchgeführt wurden, waren ebenfalls die Körpergewichte der urämischen Mäuse gegenüber der Kontrollgruppe vermindert (Lee et al., 2010, Lau et al., 2013, El-Abadi et al., 2009, Gagnon und Gallimore, 1988, Romero et al., 1999, Fujihara et al., 1998). Eine Woche nach der zweiten Operation kam es auch bei einer Studie von Gagnon und Gallimore zu Wachstumseinbußen (Gagnon und Gallimore, 1988). Gründe hierfür könnten die Belastung durch die Operation, die Futterumstellung auf Hochphosphatdiät, als auch die Implantation der osmotischen Pumpe gewesen sein. Romero et al. (1999) untersuchten die anti-proliferative Wirkung von MMF (30 mg/kg KGW/Tag) auf die progressive Niereninsuffizienz bei nephrektomierten Ratten. Hierbei kam es im Gegensatz zu der vorliegenden Studie zu einer Gewichtszunahme bei der Kontroll- und der MMF-Gruppe (Romero et al., 1999).

Bei der Sektion sahen die Herzen bis auf drei Organe der Kontrollgruppe einheitlich weiß streifig aus. Auf der Zunge befanden sich einzelne weißliche, runde und erhabene Zubildungen. Die typischen Charakteristika der DCC beim DBA/2 Mausstamm (Eaton et al., 1978) konnten auch in der vorliegenden Studie festgestellt werden. Die rechte Niere war bei allen nephrektomierten Mäusen verhärtet und besaß an der nephrektomierten Seite eine weißliche Einziehung, die sich durch die Folgen der Nephrektomie (Ausschaltung von Nierengewebe durch Gefäßunterbindung) erklären lässt. Bei zehn Mäusen der Nephrektomiegruppen kam es durch die zwei Operationen zu Verklebungen in der Bauchhöhle. Bei zwei Mäusen waren als Sektionsbefund Konkremente in der Bauchhöhle festzustellen. Die Ursache hierfür könnte eine erhöhte Mineralstoffversorgung durch die Hochphosphatdiät gewesen sein. Kommt es z. B. bei einer Körperflüssigkeit zu einer Übersättigung mit Mineralstoffen, kann dies zur Ausfällung und primären Steinbildung führen (Meurer und Wolf, 2007).

Bei den Blutparametern kam es in der vorliegenden Studie zu einem signifikanten Anstieg von BUN in der LM-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. In beiden MPA-Gruppen waren die BUN-Werte gegenüber der LM-Gruppe vermindert. Erhöhte BUN-Werte deuten u.a. auf eine bestehende Niereninsuffizienz hin. Beim Menschen und bei den meisten Haustieren ist im Gegensatz zur Maus der Kreatininwert im Blut wichtig für die Diagnostik von Nierenerkrankungen (Gagnon und Ansari, 1990). Bei der Maus sind die Kreatininwerte zu niedrig, um sie zuverlässig mit den meisten Blutanalysegeräten zu messen (Gagnon und Ansari, 1990). Wie in der vorliegenden Tierstudie, führten schon El-Abadi et al. (2009), Lee

et al. (2010), Pai et al. (2011) und Lau et al. (2013) ihre Nephrektomien nach der Methode von Gagnon und Gallimore durch. Das zweiseitige operative Vorgehen bei der Nephrektomie wurde in der vorliegenden Studie übernommen, aber die Teilnephrektomie der rechten Niere wurde nicht, wie in den oben genannten Studien, durch Elektrokauterisation, sondern durch partielle Ausschaltung der Blutversorgung vorgenommen. In den oben genannten Studien wurden ebenfalls weibliche DBA/2 Mäuse verwendet. Daher lassen sich bestimmte Parameter, wie z. B. BUN und Kalzium mit der vorliegenden Studie vergleichen. Im Gegensatz zu dieser Studie gab es zusätzlich noch Versuchsgruppen mit Normaldiät. Allerdings untersuchte man bei den oben erwähnten Studien das Blutserum, wohingegen in der vorliegenden Studie das Blutplasma analysiert wurde. Aufgrund des physiologischen Unterschieds zwischen Serum und Plasma können nur allgemeine Veränderungen verglichen werden. Am Versuchsende erfolgte ein Vergleich der gemessenen Blutparameter. In den zuletzt erwähnten Studien gab es ebenfalls einen Anstieg für BUN zwischen der Kontroll- und der Nephrektomiegruppe (Lau et al., 2013, El-Abbadi et al., 2009, Lee et al., 2010, Pai et al., 2011).

In der vorliegenden Arbeit wurde am Versuchsende bei allen Gruppen ein verringerter Kalziumwert im Blut gemessen im Vergleich zum Versuchsbeginn. Dabei gab es kaum Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Auch in den anderen Studien gab es kaum Unterschiede im Kalziumgehalt unter den Versuchsgruppen (El-Abbadi et al., 2009, Lee et al., 2010, Pai et al., 2011, Lau et al., 2013). Die Verringerung des Kalziumwertes wird durch einen sekundären Hyperparathyreoidismus verursacht. Der Kalziummangel im Blut kann alimentär bedingt sein, da die Versuchstiere kalziumarm ernährt wurden und er kann renal bedingt sein, da bei einer Niereninsuffizienz Kalzium vermehrt ausgeschieden wird. Der Phosphatüberschuss wiederum wird alimentär durch die zwar kalziumarme, aber phosphatreiche Ernährung verursacht, renal dadurch, dass bei Niereninsuffizienz vermindert Phosphat ausgeschieden wird (Riede und Bianchi, 2004, Dahme et al., 2007).

In der vorliegenden Studie kam es im Blut zu einem Anstieg von ALP bei der Kontrollgruppe gegenüber der LM-Gruppe. Ähnliches war bei den Studien von El-Abbadi et al., Lee et al. und Lau et al. festzustellen (El-Abbadi et al., 2009, Lee et al., 2010, Lau et al., 2012). Diese Daten lassen einen gesteigerten Knochenabbau sowie eine erhöhte Kalzifizierung in den Geweben der urämischen Mäuse annehmen, da ALP ein Marker für den Knochenumbau und die Kalzifizierung ist (El-Abbadi et al., 2009, Lau et al., 2013). In beiden MPA-Gruppen waren die ALP-Werte gegenüber der LM-Gruppe vermindert. In Vorversuchen zur vorliegenden Untersuchungsreihe konnte ebenfalls ein Aktivitätsverlust der ALP im Zellkultursystem ermittelt werden (van der Giet, persönliche Mitteilung). Eine Behandlung mit MPA könnte somit eine Verringerung der Kalzifizierung zur Folge haben.

In der vorliegenden Studie kam es bei der LM- und der LD-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einem Anstieg von CHOL im Blut. El-Abbadi et al. konnten ebenfalls einen Anstieg des CHOL-Werts der Nephrektomiegruppe im Vergleich zur Kontrolle nachweisen (El-Abbadi et al., 2009). Durch die CKD kann die Ausbildung einer sekundären Hypercholesterinämie induziert werden (Keller und Geberth, 2010). Nur der CHOL-Wert der HD-Gruppe war erheblich geringer als bei allen anderen Gruppen. Die deutliche Verringerung des Cholesterinspiegels könnte daher auf die 10-fach höhere Dosierung von MPA im Vergleich zur LD-Gruppe zurückzuführen sein.

Die IP-Werte der Nephrektomiegruppe waren gegenüber der Kontrollgruppe erhöht. In der Studie von El-Abbadi et al. entwickelte die Versuchsgruppe mit einer 75%igen Nephrektomie eine signifikante Hyperphosphatämie (El-Abbadi et al., 2009). Die Ursache hierfür könnte die phosphatreiche Ernährung gewesen sein.

Bei der vorliegenden Studie stieg der PTH-Wert bei allen Versuchsgruppen im Vergleich zum Versuchsende an, wobei dieser bei beiden MPA-Gruppen am höchsten war. In anderen Studien von El-Abbadi et al., Lee et al. und Lau et al. kam es auch zu einem Anstieg von PTH zwischen der Kontroll- und der Nephrektomiegruppe (Lau et al., 2013, Lee et al., 2010, El-Abbadi et al., 2009). Hier entwickelte sich bei den nephrektomierten Mäusen ein sekundärer renaler sowie alimentärer Hyperparathyreoidismus aufgrund der induzierten Niereninsuffizienz und der Hochphosphatdiät. Bei der Kontrollgruppe war nur ein alimentärer Hyperparathyreoidismus festzustellen.

Die oben genannten Blutuntersuchungen zeigen, dass die Induktion einer Niereninsuffizienz und eine Hochphosphatdiät zu einer Veränderung der Blutparameter führen. Der Anstieg von PTH, BUN und ALP lassen vermuten, dass die nephrektomierten Mäuse im Versuchsverlauf urämisch wurden.

Pathohistologisch ließen sich in der vorliegenden Studie bei den Nieren der nephrektomierten Mäuse Tubulusdilatationen mit Proteinzyllindern, eine Glomerulosklerose sowie eine interstitielle Fibrose mit Entzündungszellen feststellen. In einem Rattenmodell, bei dem Nephrektomien durchgeführt wurden, zeigte sich ein ähnliches histologisches Bild (Hahn et al., 1998). In einer Nephrektomiestudie von Romero et al. (1999) war die interstitielle Fibrose bei MMF-behandelten Ratten signifikant reduziert. Auch die tubuläre Dilatation und die Atrophie waren bei der MMF-Gruppe herabgesetzt. Eine Behandlung mit MMF (30 mg/kg KGW/Tag) verbesserte außerdem den Kreatinin-Wert im Serum und die Proteinurie der Ratten (Romero et al., 1999). Daraus lässt sich ableiten, dass MPA einen anti-fibrotischen Einfluss auf die Niere hat und eine positive Wirkung auf die Nierenfunktion besitzt. Dies wurde in der vorliegenden Studie nicht untersucht.

Außerdem kam es in der vorliegenden Arbeit zu Verkalkungen im nephrektomierten Nierenanteil durch die Hochphosphatdiät, wobei auch die Kontrollgruppe geringgradige

Verkalkungen entwickelte. Aus der Literatur ist bekannt, dass DBA/2 Mäuse allein unter Hochphosphatdiät eine Nephrokalzinose entwickeln können (Korff et al., 2006, Kirsch et al., 2013).

Die relativen Herzgewichte der LM-Gruppe und der LD-Gruppe waren signifikant höher, als die der Kontrollgruppe. Hierbei könnte es sich zum einen um eine Hypertrophie und damit verbundener Herzinsuffizienz oder zum anderen um eine Verkalkung handeln, die das spezifische kardiale Gewicht erhöhen. Diejenigen der LD-Gruppe waren dezent höher als die der LM-Gruppe. Die relativen Herzgewichte der HD-Gruppe waren jedoch gegenüber der LM- und LD-Gruppe vermindert, allerdings relativiert sich die Aussagekraft aufgrund der geringen Fallzahl dieser Gruppe. In der Literatur ist die Ausbildung einer sog. sekundären Kardiomyopathie bei der Urämie beschrieben, welche durch eine linksventrikuläre Hypertrophie und eine diffuse interstitielle Fibrose gekennzeichnet ist (Tyralla und Amann, 2002). Kennedy et al. (2008) führten Nephrektomien an Mäusen durch, um die phänotypischen Eigenschaften der urämischen Kardiomyopathie im Vergleich zum Menschen und der Ratte zu untersuchen. MPA bzw. MMF kam hierbei nicht zum Einsatz. Ebenfalls konnten Kennedy et al. (2008) eine signifikante Zunahme der relativen murinen Herzgewichte bei der Nephrektomiegruppe im Vergleich zur nicht-nephrektomierten Kontrollgruppe zeigen (Kennedy et al., 2008). Vergleichswerte bezüglich der Wirkung von MPA auf das Herzgewicht gibt es bislang noch nicht.

Pathohistologisch ließen sich im Herzen bei allen Gruppen Nekrosen und eine intermyozytäre Fibrose mit Entzündungszellen um die kardialen Verkalkungen diagnostizieren. Histologisch ist die metastatische myokardiale Verkalkung durch basophile Kalziumablagerungen innerhalb der Kardiomyozyten charakterisiert, außerdem durch einen intakten Nukleus und wenig oder keine interstitielle Verkalkung (Kuzela et al., 1977). In der vorliegenden Studie ist allerdings eine ausgeprägte interstitielle Verkalkung vorhanden, sodass hier von einer DCC ausgegangen werden kann. Kennedy et al. konnten eine signifikante Zunahme der kardialen Fibrose bei den nephrektomierten Mäusen im Vergleich zu der nicht-nephrektomierten Kontrollgruppe feststellen (Kennedy et al., 2008). Dieses Ergebnis deckt sich mit dem der vorliegenden Studie. Allerdings erfolgten diesbezüglich nur histologische Beurteilungen und keine histomorphometrischen Untersuchungen. Amman et al. (2002) konnten durch eine Behandlung mit dem anti-oxidativ wirkenden Tocopherol eine Abnahme der kardialen interstitiellen Fibrose bei nephrektomierten im Vergleich zu nicht-nephrektomierten Ratten feststellen. Somit hat oxidativer Stress einen Einfluss auf die Ausbildung der interstitiellen kardialen Fibrose bei CKD (Amann et al., 2002). In *in vitro* Studien konnten anti-oxidative Eigenschaften von MPA nachgewiesen werden (Park et al., 2008, Krotz et al., 2007). Möglich wäre auch ein anti-oxidativer Effekt von MPA auf die kardiale Fibrose. Dies würde die Abnahme der Verkalkung in der HD-Gruppe der

vorliegenden Studie erklären. Des Weiteren wurden mittels Histomorphometrie und biochemischen Untersuchungen in der LM-Gruppe signifikant mehr kardiale Verkalkungen festgestellt als bei der Kontrollgruppe. Bei der Studie von Lau et al. wurden in der Kontrollgruppe ohne Nephrektomie und mit Normalphosphatdiät (0,5 %) histologisch weniger kardiale Verkalkungen festgestellt, als in der Nephrektomiegruppe mit Hochphosphatdiät (0,9 %) (Lau et al., 2013). Dies lässt einen Einfluss der CKD sowie der Hochphosphatdiät auf die kardiale Verkalkung vermuten. In der Studie von El-Abbadi et al. waren ebenfalls das Myocard und die Lunge verkalkt (El-Abbadi et al., 2009). Bei der HD-Gruppe waren weniger Verkalkungen als bei der LM-Gruppe vorhanden. Dieses Ergebnis ließ sich auch bei der Herzgewichtbestimmung, der kardialen Histomorphometrie und der kardialen biochemischen Kalziumbestimmung einheitlich ermitteln. Im Gegensatz dazu war bei der LD-Gruppe kein so eindeutiges Ergebnis festzustellen. In der kardialen Histomorphometrie war die relative Kalziumfläche gegenüber der LM-Gruppe marginal erhöht. Dagegen war der relative Kalziumgehalt mittels biochemischer Kalziumbestimmung gegenüber der LM-Gruppe verringert. Einige Studien konnten anti-fibrotische Eigenschaften von MPA in der Niere nachweisen (Nankivell et al., 2007, Mihovilovic et al., 2014, Goncalves et al., 2004), wobei dessen molekularer Mechanismus noch weitgehend unbekannt ist. Um den Einfluss von MPA auf die kardiale Fibrose zu klären, sind weitere Untersuchungen nötig. In der Literatur sind diesbezüglich noch keine Forschungsergebnisse vorhanden. Möglich wäre eine anti-fibrotische Wirkung von MPA, ähnlich wie in der Niere, auch auf die kardiale Struktur. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Ursachen für die Ausbildung der DCC bei der Kontrollgruppe die genetische Disposition des Mausstammes und die Hochphosphatdiät sind. Des Weiteren spielt bei der Nephrektomiegruppe auch noch die Niereninsuffizienz eine Rolle, die die DCC durch die Ausbildung des sog. „Kardiorenenalen Syndroms“ weiter verstärkt. In der vorliegenden Arbeit ist vom „Kardiorenenalen Syndrom des Typs 4“ auszugehen, bei dem es zu einer Abnahme der Herzfunktion nach chronischer Niereninsuffizienz kommt (Kapitel 1.2.2).

4.1 Bewertung der Methoden und Ergebnisse

In der vorliegenden Studie konnten von insgesamt 37 Versuchstieren 22 zur Auswertung herangezogen werden. Die relativ hohe Mortalitätsrate war sehr wahrscheinlich auf die induzierte Niereninsuffizienz, bzw. auf die Belastung durch die massiven Hautreizungen in der Pumpenregion zurückzuführen. Besonders in der HD-Gruppe stellte das Ergebnis aufgrund der geringen Anzahl von Tieren, die das Versuchsende erreichten, nur einen Trend dar. Es ist denkbar, dass es bei einer größeren Fallzahl zu signifikanten Ergebnissen in einzelnen Versuchen der MPA-Gruppe gekommen wäre. Tendenziell ist eine Abnahme der

kardialen Verkalkung durch eine Behandlung mit MPA festzustellen. Zur quantitativen Bestimmung unterschiedlicher Gewebestrukturen im zweidimensionalen histologischen Präparat existieren verschiedene Messverfahren, dabei ist zwischen computergesteuerten und manuell erfassten Methoden zu unterscheiden. Die hier angewandte Technik der quantitativen Histomorphometrie ermittelt mit Hilfe einer speziellen Analysesoftware objektive Flächenberechnungen der Gewebe. Diese Software ermöglichte es, relevante Bereiche von Artefakten zu unterscheiden. Dadurch ist die quantitative Erfassung auch von kleineren Flächen eher möglich als bei manueller Flächenbestimmung, bei der alle relevanten Bereiche manuell umfahren werden, was zwangsläufig zu Ungenauigkeiten führen muss.

Die Problematik beim Anfertigen histologischer Schnitte bei unterschiedlich stark verkalktem Gewebe besteht darin, dass es zu Rissbildungen kommen kann, die ebenfalls die exakte Flächenbestimmung beeinflussen können. Außerdem konnte die unterschiedliche Dichte der Verkalkung auf den farblich markierten Arealen nicht berücksichtigt werden.

Die MPA-Dosis in der LD-Gruppe war möglicherweise zu gering, um eine anti-kalzifizierende Wirkung aufzuzeigen. Bei der HD-Gruppe war ein anti-kalzifizierender Effekt deutlich zu erkennen. Allerdings traten hier vermehrt massive Hautreizungen in der Pumpenregion auf. Die aufgestellte Hypothese, dass MPA eine anti-kalzifizierende Wirkung auf das kardiovaskuläre System hat, konnte jedoch prinzipiell bestätigt werden.

Aufgrund der Todesfälle von Mäusen durch massive Hautreizungen müssen auch eine andere Applikationsformen von MPA als die hier verwendete diskutiert werden. In der Humanmedizin wird MMF gewöhnlich peroral und bis 14 Tage nach Transplantationen auch intravenös verabreicht (Roche Registration, 2012). In verschiedenen Tierstudien erfolgte die MMF-Behandlung mittels einer täglich applizierten Schlundsonde (Klupp et al., 2003, Klawitter et al., 2014, Romero et al., 1999, Romero et al., 2000, Badid et al., 2000). Somit kann eine ausreichende Wirkstoffaufnahme gewährleistet werden. Für die perorale Verabreichung wurden allerdings andere Lösungsmittelzusammensetzungen gewählt. Eine Medikamentenapplikation über das Trinkwasser ist nicht sinnvoll, da MPA schwer wasserlöslich ist. Die perorale MPA-Gabe über die Fütterung wäre wohl die einfachste Applikationsform. Problematisch könnte jedoch die Gewährleistung einer genau dosierten Aufnahme sein. Zudem wäre die Herstellung von Futterpellets aufwendig und die Akzeptanz bei den Versuchstieren fraglich. Es gibt jedoch diesbezüglich vielversprechende Ansätze. Richez et al. (2013) verwendeten für die Behandlung der Mäuse mit MMF die orale Cellcept[®]-Suspension. Hierbei war MMF in die Hochcholesterindiät eingearbeitet. Die Humandosis wurde in eine geeignete Dosis für Mäuse übertragen, da die Verstoffwechslung von Medikamenten zwischen Menschen und Mäusen in hohem Maße unterschiedlich ist. Um eine ausreichende Medikamentenaufnahme zu gewährleisten, wurden Futterraufnahme und Körpergewicht regelmäßig bestimmt. Es bestand kein

Unterschied bei der Futteraufnahme und dem Körpergewicht zwischen der MMF-Gruppe und der Kontrollgruppe (Richez et al., 2013). Bei der HD-Gruppe war MPA 10-fach höher dosiert als bei der LD-Gruppe. Da die massiven Hautreizungen vorwiegend in der HD-Gruppe auftraten, könnte auch die Dosierung von MPA zu hoch gewesen sein. In einem nachfolgenden Versuch könnte man die MPA-Dosierung der HD-Gruppe verringern und zur Verbesserung der Bioverfügbarkeit MMF verwenden.

4.2 Ausblick

Bisher gibt es noch keine gezielte Therapie der Arteriosklerose. Gegenwärtige Therapieansätze beruhen auf einer späten Beeinflussung der Verkalkung mit geringer Wirkung. Um die Entwicklung neuer, gezielter Behandlungsmöglichkeiten voranzutreiben, ist zunächst ein besseres Verständnis der zugrunde liegenden Pathogenese erforderlich (O'Neill und Lomashvili, 2010). Die Ergebnisse des vorliegenden Tierversuchs lassen auf eine anti-kalzifizierende Wirkung von MPA schließen. Dies ist allerdings in weiteren Untersuchungen auch mit dem vorhandenen Probenmaterial zu verifizieren. Dadurch könnte der Anteil der Untersuchungen, der durch Tierversuche realisiert wird, so gering wie möglich gehalten werden und es sollte das Bestreben sein, auch die Sterberate der Versuchstiere zu reduzieren.

Aufgrund des umfangreichen noch vorhandenen und nicht untersuchten Probenmaterials dieser Studie könnten weitere Untersuchungen der antikalzifizierenden Wirkung von MPA zunächst ohne weitere Tierversuche vorgenommen werden. So ließe sich die Zahl weiterer Tierversuche erheblich reduzieren. Insbesondere sind noch pathohistologische, immunhistologische und molekulare Untersuchungen mit dem bereits verfügbaren Probenmaterial durchführbar. Es könnte somit die Wirkung von MPA auf das vaskuläre System, z. B. die Pathohistologie der Aorta untersucht werden. Außerdem wäre es möglich, angelehnt an die Studie von Siedlecki et al. eine histomorphometrische Quantifizierung der kardialen Fibrose vorzunehmen (Siedlecki et al., 2009). Des Weiteren könnte eine Untersuchung der Knochenstruktur einen Aufschluss über eine mögliche Dekalzifizierung als Folge der Urämie und des sekundären Hyperparathyreoidismus geben. Lee et al. konnten z. B. eine signifikante Reduktion der korticalen Knochendichte bei nephrektomierten Mäusen feststellen (Lee et al., 2010).

Ferner könnten auch noch immunhistologische Färbungen der vorhandenen Präparate von Aorta, Herz und Niere vorgenommen werden, um für den Kalzifizierungsprozess relevante Proteine, wie cbfa1, ALP und OPN zu lokalisieren. Kirsch et al. führten immunhistologische Untersuchungen durch, um die Einwanderung von Lymphozyten und Makrophagen in Niere

und Herz zu analysieren (Kirsch et al., 2013). So könnte noch ergänzend untersucht werden, inwieweit MPA eine Wirkung auf die Anzahl an Lymphozyten im Herzen hat.

Die erlangten histologischen Ergebnisse werfen die Frage in Bezug auf die genaue Pathogenese der kardialen Verkalkung auf Zellebene auf. Zur eingehenden Klärung dieser Frage wären weitere Untersuchungen notwendig. Hierbei könnten aus den bereits kryokonservierten Gefäßen, dem Herz und der Niere sowohl RNA als auch Proteine isoliert werden. Dabei könnte eine Genexpressionsuntersuchung osteogener Marker (cbfa1, ALP, OPN etc.) in verschiedenen Geweben der unterschiedlichen Gruppen auf mRNA-Ebene mittels Real-time PCR und auf Proteinebene mittels Western Blot erfolgen.

Problematisch ist, dass mit dem vorhandenen Material keine *in vivo* Erkenntnisse mehr gewonnen werden können. Insoweit müssten noch bestehende Erkenntnislücken durch weitere Tierversuche geschlossen werden.

Das Herz könnte in einer künftigen, ähnlich durchgeführten Versuchsreihe komplett auf die Wirkung von MPA untersucht werden. Dabei könnte eine zusätzliche Gewichtsbestimmung des rechten und linken Herzventrikels erfolgen, um die kardiale Hypertrophie genauer zu untersuchen. Des Weiteren könnte, wie in der Studie von Ren et al., eine Druckmessung im Herzen mittels Linksherzkatheter erfolgen, um die Herzinsuffizienz weiter zu charakterisieren (Ren et al., 2007). Um einen möglichen anti-oxidativen Einfluss von MPA auf die interstitielle Fibrose zu untersuchen, könnte eine Messung des oxidativen Stresses im Herzen erfolgen. Kirsch et al. implantierten DBA/2 Mäusen einen Transmitter, um in regelmäßigen Zeitabständen ein Elektrokardiogramm aufzuzeichnen (Kirsch et al., 2013).

Durch die Anwendung der Mikrocomputertomographie ließe sich die dreidimensionale *in vivo* Quantifizierung der Verkalkungen bestimmen (Le Corre et al., 2012). So könnten die Ungenauigkeiten der zweidimensionalen kardialen Histomorphometrie verringert werden und die Untersuchung eines vollständigen Organs *in vivo* ermöglichen. Außerdem könnte dadurch der Verlauf der Verkalkungen über einen bestimmten Zeitraum beobachtet werden. In einigen Mausstudien konnte der Nutzen der Mikrocomputertomographie bereits bestätigt werden. Mit dieser Methode können Organe natürlich auch *ex vivo* untersucht werden (Gorgels et al., 2011, Le Corre et al., 2012, Kirsch et al., 2013).

Wie bereits in Kapitel 1.5 erwähnt, steht mittlerweile das sog. „Adeninmausmodell“ zur Verfügung. Dies könnte auch zur weiteren Untersuchung von MPA auf das kardiovaskuläre System Anwendung finden. Hierbei entfallen die hier durchgeführten und belastenden Nephrektomien einschließlich des Narkoserisikos. Es stellt eine kostengünstigere, tierfreundlichere sowie weniger aufwendige Methode dar. Jia et al. (2013) konnten ein neues „Adeninmausmodell“ zur erfolgreichen Induktion einer CKD etablieren. Um eine bessere Akzeptanz der Adenindiät zu erreichen, wurde der adeninreichen Diät Kasein hinzugefügt (Jia et al., 2013).

4 Diskussion

Auch die Wahl einer anderen Applikationsform der MPA-Verabreichung sowie eine mögliche Dosisreduktion von MPA könnten die Belastungen der Tiere reduzieren und damit auch die Mortalitätsrate verringern.

Zur Behandlung der Arteriosklerose steht noch keine gezielte und erfolgreiche Therapie zur Verfügung. Nach weiterführender Forschung könnte MPA als kardioprotektives Medikament nicht nur bei Patienten mit Nierentransplantation erfolgreich eingesetzt werden, sondern hätte auch eine bedeutende klinische Relevanz bei Patienten mit hohem kardiovaskulärem Risiko. Die vorliegende Studie stellt eine erfolgversprechende Grundlage dar, die kardiale Verkalkung mittels MPA wirksam zu vermindern.

5 Zusammenfassung

Histologische und histochemische Untersuchungen bei Mäusen mit Urämie nach Gabe von Mycophenolsäure

Hintergrund und Zielsetzung – Kardiovaskuläre Erkrankungen mit vaskulärer Kalzifizierung stellen ein klinisches Problem bei der chronischen Niereninsuffizienz (CKD) sowie bei der Nierentransplantation beim Menschen dar. In Voruntersuchungen konnte im Zellmodell ein hemmender Einfluss von Mycophenolsäure (MPA) auf die Kalzifizierung von glatten Gefäßmuskelzellen nachgewiesen werden. Das Ziel dieser Arbeit war es, die sich aus der Voruntersuchung ergebende, potentielle anti-kalzifizierende Wirkung von MPA im Tiermodell zu verifizieren. MPA ist ein nicht-kompetitiver und reversibler Inhibitor der Inosinmonophosphat-Dehydrogenase, wodurch die Proliferation der T- und B- Lymphozyten gehemmt wird. Neben diesen immunsuppressiven Eigenschaften von MPA, wird der oben genannte Einfluss auf das kardiovaskuläre System vermutet.

Methoden – Zur Induktion einer CKD im Tiermodell wurden nacheinander zwei Nephrektomien durchgeführt. Bei der ersten Operation wurden 75 % der rechten Niere indirekt durch Abbinden der Gefäße teilnephrektomiert. Bei der zweiten Operation wurde die linke Niere vollständig entfernt. Während der zweiten Operation wurde auch die osmotische Pumpe mit MPA am Rücken subkutan implantiert. Drei Tage später erfolgte eine Futterumstellung auf eine Hochphosphatdiät bei allen Versuchstieren, da ein hoher Phosphatanteil im Futter für die Entwicklung einer Kalzifizierung notwendig ist. Es wurden weibliche DBA/2 Mäuse in vier Gruppen eingeteilt. Bei der Kontrollgruppe wurden keine Nephrektomien, sondern lediglich zwei Scheinoperationen ohne nachfolgende Medikation durchgeführt. Bei der Lösungsmittelgruppe wurden zwar Nephrektomien durchgeführt, aber anstelle von MPA nur Lösungsmittel verabreicht. Bei der *low dose*-MPA und bei der *high dose* MPA-Gruppe wurden ebenfalls Nephrektomien durchgeführt. Der *low dose* MPA-Gruppe wurde anschließend 3 mg/kg KGW/Tag MPA, der *high dose* MPA-Gruppe 30 mg/kg KGW/Tag MPA, jeweils in Lösungsmittel, verabreicht. Blutentnahmen fanden jeweils am Versuchsbeginn und -ende statt. Parathormon wurde mittels ELISA bestimmt. Eine Parathormondysbalance kann auf eine Störung des Kalzium- und Phosphathaushalts hinweisen. Ferner wurden Harnstoff-Stickstoff, alkalische Phosphatase, Gesamtcholesterin, Kalzium und anorganisches Phosphat via Trockenchemie ermittelt. Die rechte Niere und das Herz wurden histologisch mit Hilfe einer Hämatoxylin-, Von Kossa- und Alizarinrot S-Färbung untersucht. Außerdem erfolgten eine Bestimmung der Herznassgewichte sowie die biochemische Bestimmung des kardialen Kalziumgehaltes in den Proben.

Ergebnisse - Die Niereninsuffizienz wurde mittels Nephrektomie und Hochphosphatdiät erfolgreich induziert. Für Parathormon und Harnstoff-Stickstoff konnte in der Lösungsmittelgruppe ein Anstieg gemessen werden. Es bildete sich in allen vier Gruppen ein sekundärer Hyperparathyreoidismus aus und auch der Kalzium- und der anorganische Phosphathaushalt waren gestört. Beide MPA-Gruppen zeigten eine Verminderung von Harnstoff-Stickstoff und alkalischer Phosphatase im Blutplasma im Vergleich zur Lösungsmittelgruppe. Das Herz war bei der Lösungsmittelgruppe signifikant kalzifiziert gegenüber der Kontrollgruppe (Alizarinrot S-Färbung, Herzgewicht, Histomorphometrie, biochemische Kalziumbestimmung). Der kardiale biochemische Kalziumgehalt der *low dose* MPA-Gruppe war geringer als bei der Lösungsmittelgruppe. Die kardiale Verkalkung der *high dose* MPA-Gruppe war in allen Untersuchungen im Vergleich zur Lösungsmittelgruppe und auch zur *low dose* MPA-Gruppe vermindert.

Schlussfolgerung – MPA hat anti-kalzifizierende Eigenschaften, da sie im Tierversuch die Kalziumablagerungen im Myokard vermindern konnte. Dies könnte therapeutische Möglichkeiten bei kardiovaskulären Erkrankungen eröffnen.

6 Summary

Histological and histochemical investigations in uremic mice after administration of mycophenolic acid

Background and aim – Cardiovascular diseases with vascular calcification represent a common clinical problem for human patients with chronic kidney disease (CKD) and those having undergone renal transplantation. Preliminary studies verified that mycophenolic acid (MPA) has an inhibitive effect on the calcification of smooth muscle cells *in vitro*. The aim of this study is to verify the anti-calcifying impact of MPA in the animal model. MPA is a non-competitive and reversible inhibitor of the inosinmonophosphate-dehydrogenase, which prevents proliferation of T- and B lymphocytes. In addition to the immunosuppressive characteristics of MPA, an anti-calcifying effect on the cardiovascular system could be suspected.

Methods – In order to induce CKD in the animal model, nephrectomies were conducted in two steps. During the first operation 75 % of the right kidney was nephrectomised by ligature. During the second operation the left kidney was completely removed and the osmotic pump with MPA was subcutaneously implanted into the back. Three days later a high phosphate diet was induced to all animals, because a high level of phosphate in the diet is necessary to develop a calcification. Female DBA/2 mice were split into four groups. The animals of the control group had no nephrectomies, only two sham operations without any medication were done. In the solvent group two operations were carried out, without MPA. In the low dose and a high dose MPA group nephrectomies were carried out. To the low dose MPA group 3 mg/kg body weight/per day of MPA was given. The high dose MPA group received 30 mg/kg body weight/per day of MPA. In both cases MPA was administered in a solvent. Blood samples were taken at the beginning and at the end of the trial. The level of parathyroid hormone was measured with ELISA. A parathyroid hormone dysbalance may point to a disturbance of the calcium and phosphate metabolism. In addition alkaline phosphatase, urea, total cholesterol, calcium and inorganic phosphate were analyzed with dry chemistry. The right kidney and the heart were examined histologically with hematoxylin, von Kossa and alizarin red S staining. In addition the heart wet weights and the calcium content of the hearts were measured biochemically and histomorphometricly.

Results – A renal failure was successfully induced by nephrectomy and high phosphate diet. In the solvent group an increase of parathyroid hormone and urea was detected. All four groups showed the development of secondary hyperparathyroidism, while the calcium and inorganic phosphate metabolism was disturbed. Urea and inorganic phosphate in blood plasma were decreased in both MPA groups compared to the solvent group. Furthermore,

6 Summary

the heart was significantly calcified in the solvent group than in the control group (alizarin red S staining, heart wet weight, histomorphometry, biochemical calcium content). In the low dose MPA group, the biochemical calcium content of the heart was lower compared to the solvent group. In the high dose MPA group all measurements showed a decrease in cardiac calcification compared with the solvent and with the low dose MPA group.

Conclusion – MPA has anti-calcifying properties, since it decreases the calcium content in the myocardium, as shown in the animal model. This finding could have a beneficial impact on the therapy of cardiovascular diseases.

Literaturverzeichnis

- ALLISON, A. C. & EUGUI, E. M. 2000. Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. *Immunopharmacology*, 47, 85-118.
- AMANN, K. 2008. Media calcification and intima calcification are distinct entities in chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*, 3, 1599-605.
- AMANN, K., TORNIG, J., BUZELLO, M., KUHLMANN, A., GROSS, M. L., ADAMCZAK, M., BUZELLO, M. & RITZ, E. 2002. Effect of antioxidant therapy with dl-alpha-tocopherol on cardiovascular structure in experimental renal failure. *Kidney Int*, 62, 877-84.
- ANNUK, M., ZILMER, M., LIND, L., LINDE, T. & FELLSTROM, B. 2001. Oxidative stress and endothelial function in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol*, 12, 2747-52.
- ARASTÉH, K. 2013. *Innere Medizin*, Stuttgart, Thieme.
- ARBEITSKREIS BERLINER TIERSCHUTZBEAUFTRAGTER. 2010. *Orientierungshilfe des Arbeitskreises Berliner Tierschutzbeauftragter zur Einstufung in Belastungsgrade (Tab. 1.6.7) für genehmigungspflichtige Tierversuche: Stand 21.09.2010* [Online]. Charite - Universitätsmedizin Berlin
Available: <http://www.charite.de/tierschutz/download/Orientierungshilfe-Belastungstabelle21-09-10.pdf> [Accessed 07.07.2014 -9:49 Uhr 2014].
- AREND, S. M., MALLAT, M. J., WESTENDORP, R. J., VAN DER WOUDE, F. J. & VAN ES, L. A. 1997. Patient survival after renal transplantation; more than 25 years follow-up. *Nephrol Dial Transplant*, 12, 1672-9.
- BADID, C., VINCENT, M., MCGREGOR, B., MELIN, M., HADJ-AISSA, A., VEYSSEYRE, C., HARTMANN, D. J., DESMOULIERE, A. & LAVILLE, M. 2000. Mycophenolate mofetil reduces myofibroblast infiltration and collagen III deposition in rat remnant kidney. *Kidney Int*, 58, 51-61.
- BAUMGÄRTNER, W. & GRÖNE, A. 2012. *Pathohistologie für die Tiermedizin*, Stuttgart, Enke.
- BELZ, G. G. 1995. Elastic properties and Windkessel function of the human aorta. *Cardiovasc Drugs Ther*, 9, 73-83.
- BLOCK, G. A., MARTIN, K. J., DE FRANCISCO, A. L., TURNER, S. A., AVRAM, M. M., SURANYI, M. G., HERCZ, G., CUNNINGHAM, J., ABU-ALFA, A. K., MESSA, P., COYNE, D. W., LOCATELLI, F., COHEN, R. M., EVENEPOEL, P., MOE, S. M., FOURNIER, A., BRAUN, J., MCCARY, L. C., ZANI, V. J., OLSON, K. A., DRUEKE, T. B. & GOODMAN, W. G. 2004. Cinacalcet for secondary hyperparathyroidism in patients receiving hemodialysis. *N Engl J Med*, 350, 1516-25.
- BLOCK, G. A., SPIEGEL, D. M., EHRLICH, J., MEHTA, R., LINDBERGH, J., DREISBACH, A. & RAGGI, P. 2005. Effects of sevelamer and calcium on coronary artery calcification in patients new to hemodialysis. *Kidney Int*, 68, 1815-24.
- BOOTS, J. M., CHRISTIAANS, M. H. & VAN HOOFF, J. P. 2004. Effect of immunosuppressive agents on long-term survival of renal transplant recipients: focus on the cardiovascular risk. *Drugs*, 64, 2047-73.
- BOSKEY, A. 2003. Bone mineral crystal size. *Osteoporos Int*, 14 Suppl 5, S16-20; discussion S20-1.
- BOSTROM, K., WATSON, K. E., HORN, S., WORTHAM, C., HERMAN, I. M. & DEMER, L. L. 1993. Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest*, 91, 1800-9.
- BUCAY, N., SAROSI, I., DUNSTAN, C. R., MORONY, S., TARPLEY, J., CAPPARELLI, C., SCULLY, S., TAN, H. L., XU, W., LACEY, D. L., BOYLE, W. J. & SIMONET, W. S. 1998. osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev*, 12, 1260-8.
- COZZOLINO, M., STANIFORTH, M. E., LIAPIS, H., FINCH, J., BURKE, S. K., DUSSO, A. S. & SLATOPOLSKY, E. 2003. Sevelamer hydrochloride attenuates kidney and

- cardiovascular calcifications in long-term experimental uremia. *Kidney Int*, 64, 1653-61.
- DAHME, E., WEISS, E. & HAFNER-MARX, A. 2007. *Grundriss der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere 5 Tabellen*, Stuttgart, Enke.
- DERICI, U. & EL NAHAS, A. M. 2006. Vascular calcifications in uremia: old concepts and new insights. *Semin Dial*, 19, 60-8.
- DIPAULO, J. A., STRONG, L. C. & MOORE, G. E. 1964. Calcareous pericarditis in mice of several genetically related strains *Proc Soc Exp Biol Med*, 115, 496-7.
- EATON, G. J., CUSTER, R. P., JOHNSON, F. N. & STABENOW, K. T. 1978. Dystrophic cardiac calcinosis in mice: genetic, hormonal, and dietary influences. *Am J Pathol*, 90, 173-86.
- EDWARDS, N. C., STEEDS, R. P., FERRO, C. J. & TOWNEND, J. N. 2006. The treatment of coronary artery disease in patients with chronic kidney disease. *Qjm*, 99, 723-36.
- EL-ABBADI, M. M., PAI, A. S., LEAF, E. M., YANG, H. Y., BARTLEY, B. A., QUAN, K. K., INGALLS, C. M., LIAO, H. W. & GIACHELLI, C. M. 2009. Phosphate feeding induces arterial medial calcification in uremic mice: role of serum phosphorus, fibroblast growth factor-23, and osteopontin. *Kidney Int*, 75, 1297-307.
- ERHARDT, W., KÖLLE, P. & HENKE, J. 2011. *Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier mit Exoten, Labortieren, Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen ; mit 137 Tabellen*, Stuttgart, Schattauer.
- FOLEY, R. N., MURRAY, A. M., LI, S., HERZOG, C. A., MCBEAN, A. M., EGGERS, P. W. & COLLINS, A. J. 2005. Chronic kidney disease and the risk for cardiovascular disease, renal replacement, and death in the United States Medicare population, 1998 to 1999. *J Am Soc Nephrol*, 16, 489-95.
- FRANCIS, M. D., RUSSELL, R. G. & FLEISCH, H. 1969. Diphosphonates inhibit formation of calcium phosphate crystals in vitro and pathological calcification in vivo. *Science*, 165, 1264-6.
- FUJIHARA, C. K., MALHEIROS, D. M., ZATZ, R. & NORONHA, I. L. 1998. Mycophenolate mofetil attenuates renal injury in the rat remnant kidney. *Kidney Int*, 54, 1510-9.
- GAGNON, R. F. & ANSARI, M. 1990. Development and progression of uremic changes in the mouse with surgically induced renal failure. *Nephron*, 54, 70-6.
- GAGNON, R. F. & GALLIMORE, B. 1988. Characterization of a mouse model of chronic uremia. *Urol Res*, 16, 119-26.
- GEBERTH, S. & NOWACK, R. 2014. *Praxis der Dialyse [nach den Leitlinien NKF KDOQI, KDIGO, EDTA European Best Practice Guidelines (EBPG), DGfN Deutsche Gesellschaft für Nephrologie]*, Berlin [u.a.], Springer.
- GIACHELLI, C. M. 2003. Vascular calcification: in vitro evidence for the role of inorganic phosphate. *J Am Soc Nephrol*, 14, S300-4.
- GIACHELLI, C. M., SPEER, M. Y., LI, X., RAJACHAR, R. M. & YANG, H. 2005. Regulation of vascular calcification: roles of phosphate and osteopontin. *Circ Res*, 96, 717-22.
- GONCALVES, R. G., BIATO, M. A., COLOSIMO, R. D., MARTINUSSO, C. A., PECLY, I. D., FARIAS, E. K., CARDOSO, L. R., TAKIYA, C. M., ORNELLAS, J. F. & LEITE, M., JR. 2004. Effects of mycophenolate mofetil and lisinopril on collagen deposition in unilateral ureteral obstruction in rats. *Am J Nephrol*, 24, 527-36.
- GORGELS, T. G., WAARSING, J. H., HERFS, M., VERSTEEG, D., SCHOENSIEGEL, F., SATO, T., SCHLINGEMANN, R. O., IVANDIC, B., VERMEER, C., SCHURGERS, L. J. & BERGEN, A. A. 2011. Vitamin K supplementation increases vitamin K tissue levels but fails to counteract ectopic calcification in a mouse model for pseudoxanthoma elasticum. *J Mol Med (Berl)*, 89, 1125-35.
- GOSIO, B. 1896. Ricerche batteriologiche e chimiche sulle alterazioni del mais. Contributo all'etiologia della pellagra. *Rivista d'Igiene e Sanità Pubblica*, Bd. 7, Nr. 21 Nr. 22, S. 484-487; S. 869-888.
- GOVAN, A. D. T., MACFARLANE, P. S. & CALLANDER, R. 1991. *Allgemeine Pathologie Ein Bilderlehrbuch. Springer-Lehrbuch*. Berlin ;Heidelberg: Springer.

- GV-SOLAS. 2009. *Empfehlung zur Blutentnahme bei Versuchstieren, insbesondere kleinen Versuchstieren* [Online]. Ausschuss für Tierschutzbeauftragte in der GV-SOLAS und Arbeitskreis 4 in der TVT
Available: http://www.tierschutz-tvt.de/merkblaetter.html?&elD=tx_rtgfiles_download&tx_rtgfiles_pi1%5Buid%5D=172 [Accessed 07.07.2014 11:12 Uhr, 2. Version 2014].
- HAFFNER, D., HOCHER, B., MULLER, D., SIMON, K., KONIG, K., RICHTER, C. M., EGGERT, B., SCHWARZ, J., GODES, M., NISSEL, R. & QUERFELD, U. 2005. Systemic cardiovascular disease in uremic rats induced by 1,25(OH)2D3. *J Hypertens*, 23, 1067-75.
- HAHN, S., KUEMMERLE, N. B., CHAN, W., HISANO, S., SABORIO, P., KRIEG, R. J., JR. & CHAN, J. C. 1998. Glomerulosclerosis in the remnant kidney rat is modulated by dietary alpha-tocopherol. *J Am Soc Nephrol*, 9, 2089-95.
- HAMMERLAND, L. G., GARRETT, J. E., HUNG, B. C., LEVINTHAL, C. & NEMETH, E. F. 1998. Allosteric activation of the Ca²⁺ receptor expressed in *Xenopus laevis* oocytes by NPS 467 or NPS 568. *Mol Pharmacol*, 53, 1083-8.
- HARMEY, D., HESSLE, L., NARISAWA, S., JOHNSON, K. A., TERKELTAUB, R. & MILLAN, J. L. 2004. Concerted regulation of inorganic pyrophosphate and osteopontin by *akp2*, *enpp1*, and *ank*: an integrated model of the pathogenesis of mineralization disorders. *Am J Pathol*, 164, 1199-209.
- HAYDEN, M. R., GOLDSMITH, D., SOWERS, J. R. & KHANNA, R. 2008. Calciphylaxis: calcific uremic arteriopathy and the emerging role of sodium thiosulfate. *Int Urol Nephrol*, 40, 443-51.
- HUMAR, A., RAMCHARAN, T., DENNY, R., GILLINGHAM, K. J., PAYNE, W. D. & MATAS, A. J. 2001. Are wound complications after a kidney transplant more common with modern immunosuppression? *Transplantation*, 72, 1920-3.
- HUTCHISON, A. J., SMITH, C. P. & BRENCHLEY, P. E. 2011. Pharmacology, efficacy and safety of oral phosphate binders. *Nat Rev Nephrol*, 7, 578-89.
- IMAOKA, K., HONJO, K., DOI, K. & MITSUOKA, T. 1986. Development of spontaneous tongue calcification and polypoid lesions in DBA/2NCrj mice. *Lab Anim*, 20, 1-4.
- IVANDIC, B. T., UTZ, H. F., KACZMAREK, P. M., AHERRAHROU, Z., AXTNER, S. B., KLEPSCH, C., LUSIS, A. J. & KATUS, H. A. 2001. New Dyscalc loci for myocardial cell necrosis and calcification (dystrophic cardiac calcinosis) in mice. *Physiol Genomics*, 6, 137-44.
- JABLONSKI, K. L. & CHONCHOL, M. 2013. Vascular calcification in end-stage renal disease. *Hemodial Int*, 17 Suppl 1, S17-21.
- JIA, T., OLAUSON, H., LINDBERG, K., AMIN, R., EDVARDSSON, K., LINDHOLM, B., ANDERSSON, G., WERNERSON, A., SABBAGH, Y., SCHIAVI, S. & LARSSON, T. E. 2013. A novel model of adenine-induced tubulointerstitial nephropathy in mice. *BMC Nephrol*, 14, 116.
- JUDD, S. E. & TANGPRICHA, V. 2009. Vitamin D deficiency and risk for cardiovascular disease. *Am J Med Sci*, 338, 40-4.
- JUNG, S., QUERFELD, U., MULLER, D., RUDOLPH, B., PETERS, H. & KRAMER, S. 2012. Submaximal suppression of parathyroid hormone ameliorates calcitriol-induced aortic calcification and remodeling and myocardial fibrosis in uremic rats. *J Hypertens*, 30, 2182-91.
- KASISKE, B. L., CHAKKERA, H. A. & ROEL, J. 2000. Explained and unexplained ischemic heart disease risk after renal transplantation. *J Am Soc Nephrol*, 11, 1735-43.
- KEITH, D. S., NICHOLS, G. A., GULLION, C. M., BROWN, J. B. & SMITH, D. H. 2004. Longitudinal follow-up and outcomes among a population with chronic kidney disease in a large managed care organization. *Arch Intern Med*, 164, 659-63.
- KELLER, C. K. & GEBERTH, S. K. 2010. *Praxis der Nephrologie mit 63 Tabellen ; [nach den Leitlinien NKF National Kidney Foundation (K/DOQI), DHL Deutsche Hochdruckliga, EDTA European Best Practice Guidelines (EBPG), DGfN Deutsche Gesellschaft für Nephrologie, KDIGO Kidney Disease: Improving Global Outcome ; mit Dialyse und Transplantation]*, Berlin [u.a.], Springer Medizin.

- KENNEDY, D. J., ELKAREH, J., SHIDYAK, A., SHAPIRO, A. P., SMAILI, S., MUTGI, K., GUPTA, S., TIAN, J., MORGAN, E., KHOURI, S., COOPER, C. J., PERIYASAMY, S. M., XIE, Z., MALHOTRA, D., FEDOROVA, O. V., BAGROV, A. Y. & SHAPIRO, J. I. 2008. *Partial nephrectomy as a model for uremic cardiomyopathy in the mouse*.
- KETTELER, M., BONGARTZ, P., WESTENFELD, R., WILDBERGER, J. E., MAHNKEN, A. H., BOHM, R., METZGER, T., WANNER, C., JAHNEN-DECHENT, W. & FLOEGE, J. 2003. Association of low fetuin-A (AHSG) concentrations in serum with cardiovascular mortality in patients on dialysis: a cross-sectional study. *Lancet*, 361, 827-33.
- KHAZAI, N., JUDD, S. E. & TANGPRICHA, V. 2008. Calcium and vitamin D: skeletal and extraskelatal health. *Curr Rheumatol Rep*, 10, 110-7.
- KIRSCH, A. H., SMACZNY, N., RIEGELBAUER, V., SEDEJ, S., HOFMEISTER, A., STOJAKOVIC, T., GOESSLER, W., BRODMANN, M., PILGER, E., ROSENKRANZ, A. R., ELLER, K. & ELLER, P. 2013. Regulatory T cells improve nephrocalcinosis but not dystrophic cardiac calcinosis in DBA/2 mice. *Am J Pathol*, 183, 382-90.
- KIRSCH, T. 2012. Biomineralization--an active or passive process? *Connect Tissue Res*, 53, 438-45.
- KLAWITTER, J., KLAWITTER, J., SCHMITZ, V., SHOKATI, T., EPSHTEIN, E., THURMAN, J. M. & CHRISTIANS, U. 2014. Mycophenolate mofetil enhances the negative effects of sirolimus and tacrolimus on rat kidney cell metabolism. *PLoS One*, 9, e86202.
- KLUPP, J., DAMBRIN, C., HIBI, K., LUNA, J., SUZUKI, T., HAUSEN, B., BIRSAN, T., VAN GELDER, T., FITZGERALD, P. J., BERRY, G. & MORRIS, R. E. 2003. Treatment by mycophenolate mofetil of advanced graft vascular disease in non-human primate recipients of orthotopic aortic allografts. *Am J Transplant*, 3, 817-29.
- KORFF, S., SCHOENSIEGEL, F., RIECHERT, N., WEICHENHAN, D., KATUS, H. A. & IVANDIC, B. T. 2006. Fine mapping of Dyscalc1, the major genetic determinant of dystrophic cardiac calcification in mice. *Physiol Genomics*, 25, 387-92.
- KRAMER, B. K., ZULKE, C., KAMMERL, M. C., SCHMIDT, C., HENGSTENBERG, C., FISCHEREDER, M. & MARIENHAGEN, J. 2003. Cardiovascular risk factors and estimated risk for CAD in a randomized trial comparing calcineurin inhibitors in renal transplantation. *Am J Transplant*, 3, 982-7.
- KROTZ, F., KELLER, M., DERFLINGER, S., SCHMID, H., GLOE, T., BASSERMANN, F., DUYSER, J., COHEN, C. D., SCHUHMANN, C., KLAUSS, V., POHL, U., STEMPFLE, H. U. & SOHN, H. Y. 2007. Mycophenolate acid inhibits endothelial NAD(P)H oxidase activity and superoxide formation by a Rac1-dependent mechanism. *Hypertension*, 49, 201-8.
- KUZELA, D. C., HUFFER, W. E., CONGER, J. D., WINTER, S. D. & HAMMOND, W. S. 1977. Soft tissue calcification in chronic dialysis patients. *Am J Pathol*, 86, 403-24.
- LANG, G. 2006. *Histotechnik: Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*, Wien, Springer-Verlag.
- LANZER, P., BOEHM, M., SORRIBAS, V., THIRIET, M., JANZEN, J., ZELLER, T., ST HILAIRE, C. & SHANAHAN, C. 2014. Medial vascular calcification revisited: review and perspectives. *Eur Heart J*, 35, 1515-1525.
- LAU, W. L., LEAF, E. M., HU, M. C., TAKENO, M. M., KURO-O, M., MOE, O. W. & GIACHELLI, C. M. 2012. Vitamin D receptor agonists increase klotho and osteopontin while decreasing aortic calcification in mice with chronic kidney disease fed a high phosphate diet. *Kidney Int*, 82, 1261-70.
- LAU, W. L., LINNES, M., CHU, E. Y., FOSTER, B. L., BARTLEY, B. A., SOMERMAN, M. J. & GIACHELLI, C. M. 2013. High phosphate feeding promotes mineral and bone abnormalities in mice with chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*, 28, 62-9.
- LE CORRE, Y., LE SAUX, O., FROELIGER, F., LIBOUBAN, H., KAUFFENSTEIN, G., WILLOTEAUX, S., LEFTHERIOTIS, G. & MARTIN, L. 2012. Quantification of the calcification phenotype of Abcc6-deficient mice with microcomputed tomography. *Am J Pathol*, 180, 2208-13.

- LEE, M. M., CHU, E. Y., EL-ABBADI, M. M., FOSTER, B. L., TOMPKINS, K. A., GIACHELLI, C. M. & SOMERMAN, M. J. 2010. Characterization of mandibular bone in a mouse model of chronic kidney disease. *J Periodontol*, 81, 300-9.
- LEMIEUX, I., HOUDE, I., PASCOT, A., LACHANCE, J. G., NOEL, R., RADEAU, T., DESPRES, J. P. & BERGERON, J. 2002. Effects of prednisone withdrawal on the new metabolic triad in cyclosporine-treated kidney transplant patients. *Kidney Int*, 62, 1839-47.
- LIU, W. C., YEN, J. F., LANG, C. L., YAN, M. T. & LU, K. C. 2013. Bisphosphonates in CKD patients with low bone mineral density. *ScientificWorldJournal*, 2013, 837573.
- LONDON, G. M., GUERIN, A. P., MARCHAIS, S. J., METIVIER, F., PANNIER, B. & ADDA, H. 2003. Arterial media calcification in end-stage renal disease: impact on all-cause and cardiovascular mortality. *Nephrol Dial Transplant*, 18, 1731-40.
- LONDON, G. M., GUERIN, A. P., MARCHAIS, S. J., PANNIER, B., SAFAR, M. E., DAY, M. & METIVIER, F. 1996. Cardiac and arterial interactions in end-stage renal disease. *Kidney Int*, 50, 600-8.
- LUO, G., DUCY, P., MCKEE, M. D., PINERO, G. J., LOYER, E., BEHRINGER, R. R. & KARSENTY, G. 1997. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature*, 386, 78-81.
- MCGEE-RUSSELL 1958. Histochemical methods for calcium. *J Histochem Cytochem*, 6, 22-42.
- MEURER, D. G. & WOLF, S. 2007. Allgemeine Pathologie Kompendium für die Veterinärmedizin. 2. Aufl. ed. [s.l.]: Schattauer GmbH.
- MIHOVILOVIC, K., MAKSIMOVIC, B., KOČMAN, B., GUSTIN, D., VIDAS, Z., BULIMBASIC, S., LJUBANOVIĆ, D. G., MATOVINOVIĆ, M. S. & KNOTEK, M. 2014. Effect of mycophenolate mofetil on progression of interstitial fibrosis and tubular atrophy after kidney transplantation: a retrospective study. *BMJ Open*, 4, e005005.
- MIZOBUCHI, M., OGATA, H., HATAMURA, I., KOIWA, F., SAJI, F., SHIZAKI, K., NEGI, S., KINUGASA, E., OOSHIMA, A., KOSHIKAWA, S. & AKIZAWA, T. 2006. Up-regulation of Cbfa1 and Pit-1 in calcified artery of uraemic rats with severe hyperphosphataemia and secondary hyperparathyroidism. *Nephrol Dial Transplant*, 21, 911-6.
- MIZOBUCHI, M., TOWLER, D. & SLATOPOLSKY, E. 2009. Vascular calcification: the killer of patients with chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*, 20, 1453-64.
- MOE, S. M. & CHEN, N. X. 2005. Inflammation and vascular calcification. *Blood Purif*, 23, 64-71.
- MOE, S. M., DUAN, D., DOEHLE, B. P., O'NEILL, K. D. & CHEN, N. X. 2003. Uremia induces the osteoblast differentiation factor Cbfa1 in human blood vessels. *Kidney Int*, 63, 1003-11.
- MULISCH, M., WELSCH, U., AESCHT, E. & ROMEIS, B. 2010. *Romeis mikroskopische Technik*, Heidelberg, Spektrum.
- MUTH, W. L. & NASH, C. H., 3RD 1975. Biosynthesis of mycophenolic acid: purification and characterization of S-adenosyl-L-methionine: demethylmycophenolic acid O-methyltransferase. *Antimicrob Agents Chemother*, 8, 321-7.
- NANKIVELL, B. J., WAVAMUNNO, M. D., BORROWS, R. J., VITALONE, M., FUNG, C. L., ALLEN, R. D., CHAPMAN, J. R. & O'CONNELL, P. J. 2007. Mycophenolate mofetil is associated with altered expression of chronic renal transplant histology. *Am J Transplant*, 7, 366-76.
- NASR, S. H., SETHI, S., CORNELL, L. D., MILLINER, D. S., BOELKINS, M., BROVIAC, J. & FIDLER, M. E. 2010. Crystalline nephropathy due to 2,8-dihydroxyadeninuria: an under-recognized cause of irreversible renal failure. *Nephrol Dial Transplant*, 25, 1909-15.
- NEMETH, E. F., STEFFEY, M. E., HAMMERLAND, L. G., HUNG, B. C., VAN WAGENEN, B. C., DELMAR, E. G. & BALANDRIN, M. F. 1998. Calcimimetics with potent and selective activity on the parathyroid calcium receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 4040-5.
- NEVEN, E. & D'HAESE, P. C. 2011. Vascular calcification in chronic renal failure: what have we learned from animal studies? *Circ Res*, 108, 249-64.

- NOONAN, W., KOCH, K., NAKANE, M., MA, J., DIXON, D., BOLIN, A. & REINHART, G. 2008. Differential effects of vitamin D receptor activators on aortic calcification and pulse wave velocity in uraemic rats. *Nephrol Dial Transplant*, 23, 3824-30.
- NURNBERGER, J., KRIBBEN, A., PHILIPP, T. & ERBEL, R. 2007. [Arterial compliance (stiffness) as a marker of subclinical atherosclerosis]. *Herz*, 32, 379-86.
- O'NEILL, W. C. & LOMASHVILI, K. A. 2010. Recent progress in the treatment of vascular calcification. *Kidney Int*, 78, 1232-9.
- OTTO, F., THORNELL, A. P., CROMPTON, T., DENZEL, A., GILMOUR, K. C., ROSEWELL, I. R., STAMP, G. W., BEDDINGTON, R. S., MUNDLOS, S., OLSEN, B. R., SELBY, P. B. & OWEN, M. J. 1997. Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell*, 89, 765-71.
- PAI, A., LEAF, E. M., EL-ABBADI, M. & GIACHELLI, C. M. 2011. Elastin degradation and vascular smooth muscle cell phenotype change precede cell loss and arterial medial calcification in a uremic mouse model of chronic kidney disease. *Am J Pathol*, 178, 764-73.
- PARFITT, A. M. 1969. Soft-tissue calcification in uremia. *Arch Intern Med*, 124, 544-56.
- PARK, J., CHANG, H. K., HA, H., KIM, M. S., AHN, H. J. & KIM, Y. S. 2008. Mycophenolic acid inhibits cell proliferation and extracellular matrix synthesis in rat vascular smooth muscle cells through direct and indirect inhibition of cellular reactive oxygen species. *J Surg Res*, 150, 17-23.
- PRICE, P. A., ROUBLICK, A. M. & WILLIAMSON, M. K. 2006. Artery calcification in uremic rats is increased by a low protein diet and prevented by treatment with ibandronate. *Kidney Int*, 70, 1577-83.
- PRICE, P. A., URIST, M. R. & OTAWARA, Y. 1983. Matrix Gla protein, a new gamma-carboxyglutamic acid-containing protein which is associated with the organic matrix of bone. *Biochem Biophys Res Commun*, 117, 765-71.
- RAGGI, P., CHERTOW, G. M., TORRES, P. U., CSIKY, B., NASO, A., NOSSULI, K., MOUSTAFA, M., GOODMAN, W. G., LOPEZ, N., DOWNEY, G., DEHMEL, B. & FLOEGE, J. 2011. The ADVANCE study: a randomized study to evaluate the effects of cinacalcet plus low-dose vitamin D on vascular calcification in patients on hemodialysis. *Nephrol Dial Transplant*, 26, 1327-39.
- RAYMOND, C. B. & WAZNY, L. D. 2008. Sodium thiosulfate, bisphosphonates, and cinacalcet for treatment of calciphylaxis. *Am J Health Syst Pharm*, 65, 1419-29.
- REN, J., AVERY, J., ZHAO, H., SCHNEIDER, J. G., ROSS, F. P. & MUSLIN, A. J. 2007. Beta3 integrin deficiency promotes cardiac hypertrophy and inflammation. *J Mol Cell Cardiol*, 42, 367-77.
- REYNOLDS, R. D., LORENC, R. S., WIECZOREK, E. & PRONICKA, E. 1991. Extremely low serum pyridoxal 5'-phosphate in children with familial hypophosphatemic rickets. *Am J Clin Nutr*, 53, 698-701.
- RICHEZ, C., RICHARDS, R. J., DUFFAU, P., WEITZNER, Z., ANDRY, C. D., RIFKIN, I. R. & APRAHAMIAN, T. 2013. The effect of mycophenolate mofetil on disease development in the gld.apoE (-/-) mouse model of accelerated atherosclerosis and systemic lupus erythematosus. *PLoS One*, 8, e61042.
- RIEDE, U.-N. & BIANCHI, L. 2004. *Allgemeine und spezielle Pathologie 168 Tabellen*, Stuttgart, Thieme.
- RINGS, R. W. & WAGNER, J. E. 1972. Incidence of cardiac and other soft tissue mineralized lesions in DBA/2 mice. *Lab Anim Sci*, 22, 344-52.
- ROCHE REGISTRATION, W. G. C., VEREINIGTES KÖNIGREICH. 2012. *CellCept 500 mg-Pulver zur Herstellung eines Infusionslösungskonzentrats* [Online]. Available: <http://www.pharmazie.com/graphic/A/77/0-90177.pdf> [Accessed 24.01.2015 -15:07 Uhr 2015].
- ROMERO, F., RODRIGUEZ-ITURBE, B., PARRA, G., GONZALEZ, L., HERRERA-ACOSTA, J. & TAPIA, E. 1999. Mycophenolate mofetil prevents the progressive renal failure induced by 5/6 renal ablation in rats. *Kidney Int*, 55, 945-55.

- ROMERO, F., RODRIGUEZ-ITURBE, B., PONS, H., PARRA, G., QUIROZ, Y., RINCON, J. & GONZALEZ, L. 2000. Mycophenolate mofetil treatment reduces cholesterol-induced atherosclerosis in the rabbit. *Atherosclerosis*, 152, 127-33.
- RONCO, C., HAAPIO, M., HOUSE, A. A., ANAVEKAR, N. & BELLOMO, R. 2008a. Cardiorenal syndrome. *J Am Coll Cardiol*, 52, 1527-39.
- RONCO, C., HOUSE, A. A. & HAAPIO, M. 2008b. Cardiorenal syndrome: refining the definition of a complex symbiosis gone wrong. *Intensive Care Med*, 34, 957-62.
- SALVADORI, M., HOLZER, H., DE MATTOS, A., SOLLINGER, H., ARNS, W., OPPENHEIMER, F., MACA, J. & HALL, M. 2004. Enteric-coated mycophenolate sodium is therapeutically equivalent to mycophenolate mofetil in de novo renal transplant patients. *Am J Transplant*, 4, 231-6.
- SCATENA, M., LIAW, L. & GIACHELLI, C. M. 2007. Osteopontin: a multifunctional molecule regulating chronic inflammation and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27, 2302-9.
- SCHÄFER, C., JAHNEN-DECHENT, W. & BRANDENBURG, V. 2005. Klinische Relevanz des Serumproteins Fetuin A – einem Regulator der Kalzifizierung. *Laborwelt*.
- SCHINKE, T., AMENDT, C., TRINDL, A., POSCHKE, O., MULLER-ESTERL, W. & JAHNEN-DECHENT, W. 1996. The serum protein alpha2-HS glycoprotein/fetuin inhibits apatite formation in vitro and in mineralizing calvaria cells. A possible role in mineralization and calcium homeostasis. *J Biol Chem*, 271, 20789-96.
- SCHLIEPER, G., WESTENFELD, R., KRUGER, T., CRANENBURG, E. C., MAGDELEYNS, E. J., BRANDENBURG, V. M., DJURIC, Z., DAMJANOVIC, T., KETTELER, M., VERMEER, C., DIMKOVIC, N., FLOEGE, J. & SCHURGERS, L. J. 2011. Circulating nonphosphorylated carboxylated matrix gla protein predicts survival in ESRD. *J Am Soc Nephrol*, 22, 387-95.
- SCHOR, A. M., ALLEN, T. D., CANFIELD, A. E., SLOAN, P. & SCHOR, S. L. 1990. Pericytes derived from the retinal microvasculature undergo calcification in vitro. *J Cell Sci*, 97 (Pt 3), 449-61.
- SHOBEIRI, N., ADAMS, M. A. & HOLDEN, R. M. 2010. Vascular calcification in animal models of CKD: A review. *Am J Nephrol*, 31, 471-81.
- SIEDLECKI, A. M., JIN, X. & MUSLIN, A. J. 2009. Uremic cardiac hypertrophy is reversed by rapamycin but not by lowering of blood pressure. *Kidney Int*, 75, 800-8.
- SIMMONDS, H. A., VAN ACKER, K. J., CAMERON, J. S. & SNEDDEN, W. 1976. The identification of 2,8-dihydroxyadenine, a new component of urinary stones. *Biochem J*, 157, 485-7.
- SOLLINGER, H. W. 1995. Mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection in primary cadaveric renal allograft recipients. U.S. Renal Transplant Mycophenolate Mofetil Study Group. *Transplantation*, 60, 225-32.
- STATISTISCHES BUNDESAMT. 2012. *Sterbefälle, Sterbeziffern (je 100.000 Einwohner, altersstandardisiert) (ab 1998). Gliederungsmerkmale: Jahre, Region, Alter, Geschlecht, Nationalität, ICD-10, Art der Standardisierung* [Online]. Bonn: Todesursachenstatistik, Statistisches Bundesamt, Zweigstelle Bonn; Fortschreibung des Bevölkerungsstandes, Statistisches Bundesamt. Available: http://www.gbe-bund.de/oowa921/install/servlet/oowa/aw92/dboowasys921.xwdevkit/xwd_init?gbe.isgbetol/xs_start_neu/&p_aid=i&p_aid=47766642&nummer=6&p_sprache=D&p_indsp=4063&p_aid=93744334 [Accessed 07.07.2014 10:53 Uhr 2014].
- TINTUT, Y., ALFONSO, Z., SAINI, T., RADCLIFF, K., WATSON, K., BOSTROM, K. & DEMER, L. L. 2003. Multilineage potential of cells from the artery wall. *Circulation*, 108, 2505-10.
- TYRALLA, K. & AMANN, K. 2002. Cardiovascular changes in renal failure. *Blood Purif*, 20, 462-5.
- VAN DEN BROEK, F. A. & BEYNEN, A. C. 1998. The influence of dietary phosphorus and magnesium concentrations on the calcium content of heart and kidneys of DBA/2 and NMRI mice. *Lab Anim*, 32, 483-91.
- VAN LEUVEN, S. I., MENDEZ-FERNANDEZ, Y. V., WILHELM, A. J., WADE, N. S., GABRIEL, C. L., KASTELEIN, J. J., STROES, E. S., TAK, P. P. & MAJOR, A. S.

2012. Mycophenolate mofetil but not atorvastatin attenuates atherosclerosis in lupus-prone LDLr(-/-) mice. *Ann Rheum Dis*, 71, 408-14.
- VILLARROEL, M. C., HIDALGO, M. & JIMENO, A. 2009. Mycophenolate mofetil: An update. *Drugs Today (Barc)*, 45, 521-32.
- WAMBERG, S. & TAUSON, A. H. 1998. Accuracy of quantitative collection of urine in carnivores. *J Nutr*, 128, 2758S-2760S.
- WATSON, K. E., BOSTROM, K., RAVINDRANATH, R., LAM, T., NORTON, B. & DEMER, L. L. 1994. TGF-beta 1 and 25-hydroxycholesterol stimulate osteoblast-like vascular cells to calcify. *J Clin Invest*, 93, 2106-13.
- WILLIAMS, R. H., LIVELY, D. H., DELONG, D. C., CLINE, J. C. & SWEENEY, M. J. 1968. Mycophenolic acid: antiviral and antitumor properties. *J Antibiot (Tokyo)*, 21, 463-4.
- WU, M., REMENTER, C. & GIACHELLI, C. M. 2013. Vascular calcification: an update on mechanisms and challenges in treatment. *Calcif Tissue Int*, 93, 365-73.
- WUTHRICH, R. P., WEINREICH, T., AMBUHL, P. M., SCHWARZKOPF, A. K., CANDINAS, D. & BINSWANGER, U. 1999. Reduced kidney transplant rejection rate and pharmacoeconomic advantage of mycophenolate mofetil. *Nephrol Dial Transplant*, 14, 394-9.
- WYNGAARDEN, J. B. & DUNN, J. T. 1957. 8-Hydroxyadenine as the intermediate in the oxidation of adenine to 2, 8-dihydroxyadenine by xanthine oxidase. *Arch Biochem Biophys*, 70, 150-6.
- ZHANG, X., EIRIN, A., LERMAN, A. & LERMAN, L. O. 2013. Osteopontin: an emerging therapeutic target in uraemic vascular disease. *Cardiovasc Res*, 98, 332-3.

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Markus van der Giet bedanke ich mich für die Möglichkeit der Durchführung der Dissertation in der Renal and Vascular Research Group der Charité Berlin am Campus Benjamin Franklin.

Mein Dank gilt Frau Prof. Dr. Johanna Plendl für die stetige Unterstützung sowie die Betreuung am Fachbereich Veterinärmedizin.

Ein Dankeschön geht an Frau Dr. rer. nat. Mirjam Schuchardt für die engagierte Betreuung. Außerdem möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Ronald Lützenberg für die chirurgische Ausführung der Nephrektomien bedanken.

Des Weiteren danke ich den Arbeitsgruppenmitgliedern Jasmin und Nicole Prüfer sowie Patrizia Wolter für die netten Stunden im Labor und ihre großartige Hilfsbereitschaft.

Ein besonderer Dank richtet sich an Herrn Ralf Höfel für die kompetente Einarbeitung am Keyence Mikroskop. Bei Frau Briest-Forch und Herrn Martin Werner aus der Veterinäranatomie möchte ich mich für Ihre Hilfe bedanken.

Nicht zuletzt möchte ich mich noch bei all denjenigen bedanken, die ich an dieser Stelle nicht explizit erwähnt habe und die dennoch zum Gelingen der Dissertation beigetragen haben. Von ganzem Herzen möchte ich meinen Eltern und meinem Bruder danken, die mich in allen Lebenslagen unterstützen und fördern. Ein besonderer Dank gilt auch meinem Freund, der immer für mich da ist.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe.

Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 31.03.2015

Simone Boes