

Bianca Frauscher Bsc.

Nephrokalzinose

Ein neues Mausmodell für die Untersuchung von Störungen des
Mineral- und Knochenhaushalts bei chronischer Niereninsuffizienz

MASTERARBEIT

Zur Erlangung des akademischen Grades

Master of Science

Masterstudium Biochemie und Molekulare Biomedizin

eingereicht an der

Technischen Universität Graz

Betreuerin

Ass.-Prof.ⁱⁿ Priv.-Doz.ⁱⁿ Dr.ⁱⁿ med.univ. Kathrin Eller

Klinische Abteilung für Nephrologie

Universitätsklinik für Innere Medizin

Graz, September 2015

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst, andere als die angegebenen Quellen/Hilfsmittel nicht benutzt, und die den benutzten Quellen wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Das in TUGRAZonline hochgeladene Textdokument ist mit der vorliegenden Masterarbeit identisch.

Datum

Unterschrift

*„Wer fragt, ist ein Narr für eine Minute.
Wer nicht fragt, ist ein Narr sein Leben lang.“*

Konfuzius

Danksagung

Als ich Sommer 2014 mit einem Praktikum im Labor der Nephrologie begann, wusste ich noch nicht, dass ich dort auch nach den Sommermonaten weiterhin einkehren würde. Aber nach einem sehr lehrreichen Sommer, bekam ich die Möglichkeit meine Masterarbeit an der klinischen Abteilung für Nephrologie zu verfassen. So bedanke ich mich in erster Linie bei meiner Betreuerin Ass.-Prof. Priv.-Doz. Dr. med.univ. Kathrin Eller für diese Möglichkeit sowie für ihre Geduld und ihre hervorragende Begleitung während dieser Arbeit.

Weiters möchte ich mich bei Dr. med. univ. Katharina Artinger bedanken, die mich von Beginn an unterstützte, mir stets alles geduldig erklärte und mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand; auch dann wenn der Feierabend längst begonnen hatte.

Außerdem möchte ich mich bei Dr. med. univ. Alexander Kirsch bedanken, der mir immer mit seinem Wissen weiterhalf und jede meiner Fragen beantworten konnte.

Ein weiteres Dankeschön gilt der BMA, Corinna Schabhüttl, die mich mit viel Geduld eingeschult hat: ich glaube ohne deine Hilfe würde ich heute noch histologische Schnitte anfertigen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. med. univ. Ida Aringer für ihre Hilfsbereitschaft bei etwaigen Problemen.

Ein besonderer Dank geht an meine Eltern und Großeltern, die mir mein Studium ermöglicht haben. Insbesondere danke ich meiner Mutter, welche immer für mich da war und stets ein offenes Ohr für mich hatte.

Zu guter Letzt bedanke ich mich bei meinem Freund Matthias, der mich immer liebevoll unterstützt und mich unaufhörlich motiviert hat.

Zusammenfassung

Hintergrund: Chronische Niereninsuffizienz (CKD) wird durch eine signifikante Morbidität und Mortalität charakterisiert. Eine der häufigsten Komplikationen der CKD ist ein gestörter Mineral- und Knochenstoffwechsel. Diese Störungen werden allgemein als chronic kidney disease-mineral and bone disorder (CKD-MBD) zusammengefasst. Wir haben ein Mausmodell für die CKD-MBD entwickelt und den Phänotyp der Niere, mit all seinen veränderten endokrinen und metabolischen Parametern, welche für die CKD-MBD typisch sind, evaluiert.

Methoden: DBA/2 Mäuse sind anfällig für ektope Nierenverkalkung, wenn sie einer erhöhten oralen Phosphatgabe ausgesetzt sind. Um einen Nierenschaden zu erzeugen, wurden diese Mäuse mit Standardfutter (CTRL-Gruppe) oder Hochphosphatfutter (CKD-Gruppe) für vier Tage mit sofortiger Rückkehr zu Standardfutter für 14 (n=7) oder 84 (n=8) Tagen gefüttert. Es wurden Serum und Urin Proben sowie Proben von Nieren und Knochen für histologische Untersuchungen und RT-PCR gesammelt.

Ergebnisse: Die Mäuse der CKD-Gruppe entwickelten eine chronische Niereninsuffizienz und wiesen eine Verkalkung der Nieren sowie eine reduzierte glomeruläre Filtrationsrate (GFR), welche mittels FITC-Inulin Clearance bestimmt wurde, auf. Die Serum FGF-23 Werte waren in den mit Hochphosphat gefütterten Mäusen deutlich erhöht und auch die PTH Werte zeigten einen Trend der Erhöhung. Immunhistochemische Färbungen legten einen Anstieg von infiltrierenden CD4⁺ und CD8⁺ Zellen dar. CD68⁺ Makrophagen, welche sich vor allem in der Grenzzone zwischen Mark und Rinde befanden, waren jedoch die Zellen mit der höchsten Infiltration. Diese Ergebnisse wurden durch eine Real-Time PCR bestätigt. Die mRNA Levels der Makrophagen Marker *Ccr2*, *Ccr5* und *Ccl2* waren in der CKD-Gruppe verglichen mit der CTRL-Gruppe erhöht. Mit der Ausnahme von *Tnfa* und *Il6* waren keine anderen T-Zellen Marker in der CKD-Gruppe erhöht. Die histologischen Untersuchungen der Knochen, deuten darauf hin, dass die Mäuse der CKD-Gruppe eine Knochenanomalie mit niedrigem Knochen-Turnover entwickelt haben.

Conclusio: Wir präsentieren hier ein Modell der CKD-MBD, welches viele Merkmale des humanen Äquivalents widerspiegelt. In diesem Modell ist die vaskuläre Verkalkung noch unter aktiver Erforschung. So ist dieses Modell ein nützliches Werkzeug für die weiteren Untersuchungen von pathogenen Faktoren in der CKD-MBD ohne der Notwendigkeit von chirurgischen Methoden.

Abstract

Background:

Chronic kidney disease (CKD) is characterized by significant long-term morbidity and mortality. One of the most frequent complications of CKD is a disturbed mineral and bone metabolism. These disorders are collectively referred to as chronic kidney disease-mineral and bone disorder (CKD-MBD). We developed a murine model of chronic kidney disease-mineral and bone disorder and evaluated the kidney-phenotype along with the systemic changes in endocrine and metabolic parameters typical for CKD-MBD.

Methods:

DBA/2NCrI mice are susceptible to ectopic renal calcification when exposed to increased oral phosphate loads. In order to cause renal damage, these mice were fed standard chow diet (CTRL-group) or high phosphate diet (CKD-group) for four days with subsequent return to SCD for 14 (n=8) or 84 days (n=8). Serum and urine samples, as well as samples for histology and qPCR were taken from kidney and bone.

Results:

CKD mice developed uremic kidney disease with marked calcification of the kidneys and a marked reduction in measured glomerular filtration rate (GFR) as determined by FITC-inulin clearance. Serum Fgf-23 was significantly increased in HPD-fed mice with a coherent trend towards increased Pth in these mice. Immunohistochemical stainings of kidneys further revealed a significant increase of infiltrating CD4⁺ and CD8⁺ cells, however CD68⁺ macrophages constituted the major infiltrating cell population. They were mainly present in the cortico-medullary border zone, where calcium-phosphate precipitations occurred. This finding was confirmed by qPCR, where mRNA levels of the macrophage markers *ccr2*, *ccr5* and *ccl2* were up regulated in CKD mice when compared CTRL mice. With the exception of *tnfa* and *il6*, no other T cell markers were up regulated in mice with uremic kidney disease. The histological investigation of the bone revealed that the CKD mice have developed a high turnover disorder.

Conclusion:

We here present a model of chronic kidney disease-mineral and bone disorder which reflects important features of the human equivalent. In this murine model, the vascular calcification is still under active investigation. This model represents a useful tool for the investigation of pathogenetic features in CKD and mineral bone metabolism without the need for surgical methods.

Glossar und Abkürzungen

ABBC6	ATP-binding cassette Transporter C6
ABC	Avidin-Biotin-Complex
AEC	3-Amino -9 ethylcarbazol
AK	Antikörper
BFR	Bone Formation Rate; Knochenformationsrate
Ca	Calcium
Ccl	Chemokin Ligand
Ccr	Chemokin-Rezeptor
CD	Cluster of Differentiation
CKD-Gruppe	chronic kidney disease Gruppe, chronische Niereninsuffizienz-Gruppe
CTRL-Gruppe	control-Gruppe, Kontroll-Gruppe
DBA/2	diluted brown non-agouti
(c)DNA	(complementary) desoxyribonucleinacid, (komplementäre) Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FCS	fetal calf serum, fetales Kälberserum
FGF 23	fibroblast growth factor 23, Fibroblasten Wachstumsfaktor 23
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Gata 3	GATA Bindeprotein 3
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPD	Hochphosphatdiät
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HPF	high-power field
HPRT	= Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
IL	Interleukin
KG	Körpergewicht
MAR	Mineral Apposition Rate, Mineralappositionsrate
P	Phosphat

PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PTH	parathyroid hormone, Parathormon
m(RNA)	(messenger) ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
Rorc	RAR-related orphan receptor C
SCD	Standarddiät
SEM	standard error of the mean, Standardfehler des Mittelwerts
TBX 21	T-box Transkriptionsfaktor 21
TGF β	Transformierender Wachstumsfaktor beta
TH-Zelle	T-Helferzelle
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor alpha

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Repräsentative Darstellung eines Glomerulum	2
Abbildung 2: Grafische Darstellung der drei Komponenten der CKD-MBD. Modifiziert nach Nigwekar SU, Tamez H, Thadhani RI. (2014) Vitamin D and chronic kidney disease–mineral bone disease (CKD–MBD). BoneKEy Reports	7
Abbildung 3: Graphische Darstellung des Zusammenspiels von FGF-23 und PTH. Modifiziert nach Farrow, E. G. & White, K. E. (2010) Recent advances in renal phosphate handling. <i>Nat. Rev. Nephrol.</i>	8
Abbildung 4: Schematische Darstellung des ABC-Systems.....	15
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Sandwich-ELISA Methode.....	20
Abbildung 6: Nephrokalzinose in der CKD-Gruppe (A) Kaum Verkalkungen in der CTRL-Gruppe (B) nach 18 Tagen. (Alizarin-Rot-Färbung)	24
Abbildung 7: Infiltration von CD4 ⁺ Zellen in der Niere einer CKD-Gruppen Maus nach 18 Tagen. (40x Vergrößerung).....	25
Abbildung 8: Infiltration von CD4 ⁺ Zellen in der Niere einer CKD-Gruppen Maus nach 88 Tagen. (40x Vergrößerung)	25
Abbildung 9: Evaluierung der infiltrierenden CD4 und CD8 positiven T-Zellen nach 18 Tagen.	25
Abbildung 10: Evaluierung der infiltrierenden CD4 und CD8 positiven T-Zellen nach 88 Tagen.....	25
Abbildung 11: Infiltration von CD68 positiven Zellen in der Niere einer CKD-Gruppen Maus nach 18 Tagen. (40x Vergrößerung).....	26
Abbildung 12: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Real Time PCR von der ersten Experimentreihe.	26
Abbildung 13: Graphische Darstellung der glomerulären Filtrationsrat	27
Abbildung 14: Graphische Darstellung der zweiphasigen Zerfallskurve der FITC-Inulin Clearance.....	27
Abbildung 15: Serumwerte von Harnstoff, Phosphat und Calcium nach 18 Tagen.	28
Abbildung 16: Serumwerte von Harnstoff, Phosphat und Calcium nach 88 Tagen.	28
Abbildung 17: Serumwerte von FGF-23 sowie PTH nach 18 Tagen.	29
Abbildung 18: Serumwerte von FGF-23 sowie PTH nach 88 Tagen.	29
Abbildung 19: Calcein gelabelte Tibia einer CKD-Maus. (40x Vergrößerung)	30
Abbildung 20: Evaluierung der Mineralappositionsrate nach 88 Tagen.	30

Abbildung 21: Evaluierung der Knochenformationsrate nach 88 Tagen.....31

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: GFR Kategorien der Chronischen Niereninsuffizienz (CKD)	5
Tabelle 2: Albuminurie Kategorien der Chronischen Niereninsuffizienz (CKD).....	5
Tabelle 3: TMV-Klassifikationssystem	9

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Hintergrund und Zielsetzung	1
1.2	Niere	1
1.2.1	Anatomie und Histologie	1
1.2.2	Physiologie und Funktion	3
1.2.3	Glomeruläre Filtrationsrate	4
1.3	Chronische Niereninsuffizienz	5
1.4	CKD-MBD: Chronic kidney disease-mineral and bone disorder	6
1.4.1	Veränderung der biochemischen Parameter: Die Rolle von FGF-23 und PTH	7
1.4.2	Knochenanomalien der CKD-MBD	8
1.4.3	Risikofaktor: Vaskuläre Kalzifikation	10
2	Material und Methoden	12
2.1	Studiendesign	12
2.2	Probengewinnung	13
2.3	Anfertigung von Methacrylatschnitten	13
2.4	Anfertigung von Gefrierschnitten	14
2.5	Anfertigung von Paraffinschnitten	14
2.5.1	Fixierung	14
2.5.2	Einbettung in Paraffin	14
2.6	Immunhistochemische Färbungen	15
2.6.1	Auswertung der immunhistochemischen Färbungen	17
2.7	Alizarin-Rot-Färbung	18
2.8	Calcein-Labeling der Knochen	19
2.9	Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate (GFR)	19
2.10	Bestimmung von Parathormon und Fibroblasten Wachstumsfaktor 23	20
2.11	Real Time Polymerase Chain Reaction	21
2.12	Statistische Analyse	23
3	Ergebnisse	24
3.1	Das neue Mausmodell der CKD-MBD basiert auf der Nephrokalzinose	24
3.2	Makrophagen infiltrieren die Nieren von DBA/2 Mäusen der CKD-Gruppe	25
3.3	Nephrokalzinose bewirkt eine Reduktion der glomerulären Filtrationsrate	27
3.4	Veränderte biochemische Parameter bei DBA/2 Mäusen mit CKD	28
3.5	Erhöhung der Serumwerte von FGF-23 sowie PTH	29
3.6	DBA/2 Mäuse der CKD-Gruppe entwickeln eine Knochenanomalie mit niedrigem Knochen-Turnover	30
4	Diskussion und Conclusio	32
5	Literaturverzeichnis	35

1 Einleitung

1.1 Hintergrund und Zielsetzung

Die chronische Niereninsuffizienz (CKD; chronic kidney disease) ist ein immer größer werdendes Gesundheitsproblem und betrifft mittlerweile 10% der Gesamtbevölkerung.

(1) Die Anzahl der Patienten mit terminalen Nierenversagen steigt weltweit an und hat einen jährlichen Zuwachs von etwa 7%. (2)

Die CKD wird mit einer hohen Morbidität und Sterblichkeit assoziiert. (3) (4) Eine der häufigsten Komplikationen der CKD sind Störungen des Mineral- und Knochenstoffwechsel, welche als chronic kidney disease- mineral and bone disorder (CKD-MBD) bezeichnet werden. (5)

Neben der geringeren Lebensqualität von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (6) (7), hat die CKD auch einen großen Einfluss auf die Kosten des Gesundheitssystems. So verursacht in den USA ein Patient mit chronischer Niereninsuffizienz vor dem terminalen Nierenversagen etwa \$26.000 Dollar pro Jahr. (8)

Aufgrund der steigenden Prävalenz der CKD, den damit verbundenen Komplikationen und Folgekrankheiten sowie den erhöhten Kosten ist die Erforschung der chronischen Niereninsuffizienz und in weiterer Folge der CKD-MBD von zentraler Bedeutung. Diese Gründe waren auch der Hintergrund dieser vorliegenden Masterarbeit. So wurde ein neues Mausmodell entwickelt, welches für die Untersuchung und Erforschung der CKD-MBD verwendet werden kann.

1.2 Niere

1.2.1 Anatomie und Histologie

Die Nieren (Ren oder Nephros) liegen im Retroperitonealraum, sind etwa 10-12 cm lang, 5-6 cm breit und etwa 4 cm dick. Die bohnenförmigen und paarig angeordneten Nieren sind Harn-bereitende Organe. Nierenbecken, Harnleiter, Harnblase und Harnröhre werden als Harn-ableitende Strukturen bezeichnet. (9) (10) (11)

Die Niere wird von einer dünnen Kapsel aus straffem Bindegewebe (Capsula fibrosa) und einer Fettgewebekapsel (Capsula adiposa) umgeben.

Das Nierenmark besteht aus 6-8 Markpyramiden, die mit ihren Spitzen, den sog. Nierenpapillen, in die Kelche des Nierenbeckens ragen. Die Nierenrinde liegt als etwa 1 cm breiter Streifen zwischen der Bindegewebskapsel und der Basis der Markpyramiden. Von jeder Markpyramide setzen sich Markstrahlen in Richtung Nierenoberfläche fort. Das Rindengewebe zwischen den Markstrahlen wird als Rindenlabyrinth zusammengefasst. Die wesentliche Funktionseinheit der Niere ist das Nephron, welches aus dem Nierenkörperchen und dem Tubulus renalis besteht. (10) (11)

Nierenkörperchen

Die Nierenkörperchen liegen alle in der Nierenrinde und bestehen aus einem Kapillarknäuel (Glomerulus), das von einer doppelwandigen Kapsel (Bowmann-Kapsel) umgeben ist. Am Gefäßpol des Glomerulus liegen die beiden Arteriolen (Ateriola afferens und Ateriola efferens), welche das Blut hinein- und hinausleiten. Diese Kapillarschlingen sind am intraglomerulären Mesangium, welches sich zwischen den Blugefäßen befindet, befestigt. Gegenüber des Gefäßpols liegt der Harnpol. Der Harnpol leitet den vom Glomerulus abfiltrierten Primärharn in das Nierenkanälchen weiter, wo er anschließend in den Tubulus proximalis fließt. (10) (11)

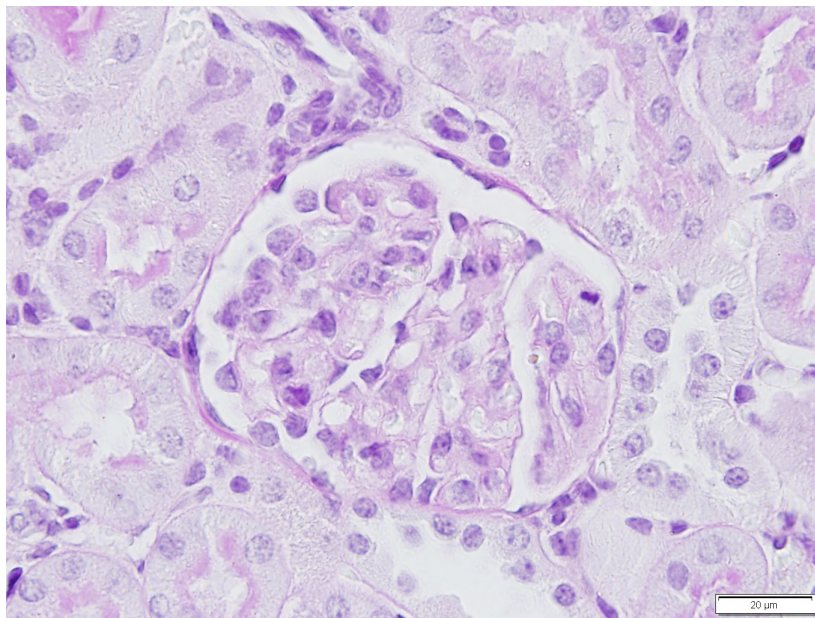


Abbildung 1: Repräsentative Darstellung eines Glomerulum

Die Bowmann-Kapsel ist aus einem inneren und äußeren Blatt zusammengesetzt. Dazwischen befindet sich ein spaltförmiger Raum, in welchen der Primärharn filtriert wird. Eine weitere charakteristische Struktur ist der juxtaglomeruläre Apparat, welcher den Filtrationsdruck und somit die Produktion des Primärharns beeinflusst. (10) (11)

Tubulus renalis

Der Tubulus renalis wird in drei verschiedene Abschnitte gegliedert. Direkt am Harnpol beginnt der Tubulus proximalis, welcher anfangs in der Nierenrinde stark gewunden verläuft, bis er in gestreckter Form Richtung Rindenmark zieht. Daran schließt der Tubulus intermedius. Dieser Abschnitt setzt sich zunächst bis in die Spitzen der Markpyramiden fort, wo er dann eine haarnadelförmige Wendung in Richtung Rinde vollführt. Der dritte Abschnitt, der sogenannte Tubulus distalis, zieht bis zum Gefäßpol seines zugehörigen Glomerulus und setzt sich von dort gewunden fort bis er vom Verbindungstubulus aufgenommen wird. Der Verbindungstubulus bildet den Übergang zwischen Tubulus renalis und dem Sammelrohr. Das Sammelrohr vereinigt sich im inneren des Marks zum Ductus papillares, welcher schlussendlich in die Nierenkanälchen des Nierenbeckens mündet. (10) (11)

1.2.2 Physiologie und Funktion

Die Hauptaufgabe der Niere ist die Ausscheidung harnpflichtiger Substanzen, wie Harnstoff, Harnsäure oder Kreatinin. Dazu filtriert die Niere im Glomerulus aus dem Blut ein sehr großes Flüssigkeitsvolumen in den Tubulus ab. Der so entstandene Primärharn, der sich aus Wasser und kleinmolekularen Stoffen des Plasmas zusammensetzt, beträgt etwa 180 Liter pro Tag. Anschließend werden bestimmte Substanzen des Primärharns wieder durch die Tubuluswand zurück in das Blut transportiert (Re(ab)sorption). Einige andere Stoffe werden von den Tubuluszellen in das Tubuluslumen transportiert, dabei handelt es sich um die sogenannte Sekretion. Der Rest des Filtrats wird mit dem Harn ausgeschieden. (12) (13)

Neben der Elimination der Endprodukte des Stoffwechsels (Harnstoff) sowie von Fremdstoffen (Medikamente) hat die Niere noch viele weitere Aufgaben. So ist die Niere für die Kontrolle der Salz- und Wasserausscheidung verantwortlich. Durch Resorption hält die Niere das Volumen sowie die Osmolalität des Extrazellulärraums konstant.

Die Niere spielt auch eine wichtige Rolle im Säure-Basen-Haushalt. Dieser Haushalt wird im Gleichgewicht gehalten, indem die Niere die H^+ - und HCO_3^- -Ausscheidung an die in den Körper aufgenommenen Ionen sowie an die durch Atmung und Stoffwechsel verbrauchten Ionen anpasst. (12) (13)

Außerdem hat die Niere eine wichtige Funktion im Stoffwechsel und ist bei Protein- und Peptidabbau sowie Gluconeogenese beteiligt. (12) (13)

Eine weitere Wirkung auf den Körper hat die Niere durch Hormonproduktion, wie Calcitriol oder Erythropoietin. So beeinflusst die Niere beispielsweise über das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System auch die langfristige Regulation des Blutdrucks. (12) (13)

1.2.3 Glomeruläre Filtrationsrate

Die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) reflektiert das Flüssigkeitsvolumen, welches pro Zeiteinheit von allen Glomeruli in den Nieren filtriert wird. Die GFR ist direkt vom effektiven Filtrationsdruck abhängig und somit ein wesentlicher Parameter zur Beurteilung der Nierenfunktion. (12) (13)

Die Messung der GFR erfolgt über eine Inulin-Clearance. Inulin wird deswegen als Indikatorsubstanz verwendet, weil es frei filtrierbar ist. Das heißt Inulin wird weder resorbiert noch sekretiert. Inulin wird auch nicht von der Niere verstoffwechselt und hat keinen Einfluss auf die Nierenfunktion. Somit entspricht die Clearance (= pro Zeiteinheit von Indikatorsubstanz völlig befreites Plasmavolumen) des Inulins der GFR. (12) (13)

In der Praxis ist die Inulin-Clearance häufig zu aufwendig und deswegen wird diese Methode oft nur mehr in Rahmen von wissenschaftlichen Versuchen angewandt. Stattdessen kann zur Bestimmung der GFR eine Kreatinin-Clearance durchgeführt werden. (14) Hierbei ist jedoch zu beachten, dass die tatsächliche GFR ein wenig überschätzt wird, da Kreatinin auch tubulär sezerniert wird. Je mehr die Nierenfunktion eingeschränkt ist, desto höher wird die tubuläre Sekretionsrate des Kreatinins. Aus diesem Grund wird zur Berechnung der GFR ein Mittelwert aus Harnstoff- und Kreatinin-Clearance verwendet. Da man bei der Harnstoff-Clearance wegen der tubulären Rückresorption niedrigere Werte erhält, kommt man so den Werten der Inulin-Clearance am nächsten. (15)

1.3 Chronische Niereninsuffizienz

Die chronische Niereninsuffizienz ist ein weltweites Gesundheitsproblem, welches durch eine hohe Morbidität und Mortalität gekennzeichnet ist. (3) (4) Die 2012 veröffentlichten KDIGO (Kidney Disease Improving Global Outcomes) Richtlinien definieren CKD als Störung der Nierenfunktion bzw. der Nierenstruktur, wenn diese länger als drei Monate andauern und Auswirkungen auf die Gesundheit haben.

Wobei CKD nach der Ursache, der glomerulären Filtrationsrate (GFR) und der Albuminurie klassifiziert wird. (16)

Tabelle 1: GFR Kategorien der Chronischen Niereninsuffizienz (CKD)

GFR Kategorien der CKD (16)		
Kategorie	GFR (mL/min/1,73 m ²)	Beschreibung
G1*	≥ 90	Normal oder hoch
G2*	60-89	Mild eingeschränkt
G3a	45-59	Mild bis moderat eingeschränkt
G3b	30-44	Moderat bis schwer eingeschränkt
G4	15-29	Schwer eingeschränkt
G5	< 15	Nierenversagen

*Ohne erkenntlichen Nierenschaden, erfüllen weder GFR Kategorie G1 oder G2 die Kriterien einer CKD.

Tabelle 2: Albuminurie Kategorien der Chronischen Niereninsuffizienz (CKD)

Albuminurie Kategorien der CKD (16)			
Kategorie	AER (mg/24 h)	ACR (mg/g)	Beschreibung
A1	<30	<30	Normal bis leicht erhöht
A2	30-300	30-300	Moderat erhöht*
A3	>300	>300	Stark erhöht

AER = Albumin excretion rate; Albumin Ausscheidungsrate

ACR = Albumin-to-creatinine ratio; Albumin-Kreatinin-Quotient

* berücksichtigt das Nephrotische Syndrom (AER_{normal} >2200 mg/24 h)

In den USA sind die häufigsten Ursachen des terminalen Nierenversagens Diabetes mellitus Typ 2 und Bluthochdruck. (17) (18) Weitere Ursachen können beispielsweise

Glomerulonephritis, Diabetes mellitus Typ 1, Interstitielle Nephritis, hereditäre bzw. kongenitale Erkrankungen oder Neoplasie sein. (17) (19)

Laut dem Österreichischen Dialyse- und Transplantationsregister (ÖDTR) gab es im Jahr 2013 4394 dialysepflichtige Patienten und 4510 Patienten mit funktionierendem Nierentransplantat (Stichtag: 31.12.2013). (20)

Nicht nur das terminale Nierenversagen sondern auch die frühen Stadien der chronischen Niereninsuffizienz werden von einer erheblichen Morbidität sowie einer ansteigenden Sterblichkeit begleitet. (21) Dies führt zu einer großen Belastung des Gesundheitssystems und zu erhöhten Therapiekosten. (3) (4) (22) (23)

Vor allem auch deswegen weil mit zunehmender Einschränkung der Nierenfunktion viele Folgekrankheiten auftreten. So kann es in Folge der Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems zu Hypertonie kommen und zu weiteren kardiovaskulären Erkrankungen (24) (25) (26) (27) (28). Weiters können hämatologische Veränderungen (29), wie renale Anämie (30) oder Gerinnungsstörungen (31) auftreten. Im Laufe der chronischen Niereninsuffizienz sind Störungen des Wasser-Elektrolyt-Haushaltes und des Säure-Basen-Haushaltes obligatorisch (32). Andere Komplikationen sind oxidativer Stress (33) (34), die Abnahme der kognitiven Leistungsfähigkeit (35), chronische Entzündungen (36) (37), sowie Störungen des Mineral- und Knochenhaushalts (CKD-MB; chronic kidney disease-mineral and bone disorder). (5)

1.4 CKD-MBD: Chronic kidney disease-mineral and bone disorder

Ein häufiges Merkmal der chronischen Niereninsuffizienz, sogar schon in den frühen Stadien, ist die Veränderung des Mineral- und Knochenstoffwechsels, welche allumfassend als CKD-MBD bezeichnet wird. (38)

Diese Veränderungen beinhalten erstens Abweichungen der biochemischen Parameter, wie Calcium, Phosphat, Vitamin D, Parathormon (PTH) und Fibroblasten-Wachstumsfaktor 23 (FGF 23); zweitens Abweichungen der Knochenmorphologie, welche Knochenmineralisation, Knochenvolumen und Knochen-Turnover umfassen und drittens Verkalkungen der Weichteile sowie der Blutgefäße. (38) (39)



Abbildung 2: Grafische Darstellung der drei Komponenten der CKD-MBD. Modifiziert nach Nigwekar SU, Tamez H, Thadhani RI. (2014) Vitamin D and chronic kidney disease–mineral bone disease (CKD–MBD). BoneKEy Reports

1.4.1 Veränderung der biochemischen Parameter: Die Rolle von FGF-23 und PTH

Der Mineral- und Knochenstoffwechsel wird hauptsächlich von Calcium, Phosphat, Vitamin D, FGF-23 sowie durch PTH gesteuert und geregelt. (40) Die charakteristischen biochemischen Veränderungen eines Patienten mit CKD-MBD sind Hypokalzämie, Hyperphosphatämie, Hypovitaminose D, erhöhte FGF 23-Werte. (41)

Die gesunde Niere reguliert das Calcium und Phosphat Gleichgewicht über tubuläre Resorption. (40) Phosphat wird mit Hilfe des Natrium-Phosphat Cotransporter Systems über das Glomerulum gefiltert und über den proximalen Tubulus reabsorbiert. Die Menge des reabsorbierten Phosphats wird durch PTH, 1,25-(OH)₂-Vitamin D und FGF-23 reguliert. (42) (43) Verliert nun die Niere die Fähigkeit die adäquate Menge an Phosphat auszuschcheiden, kommt es zu einem Anstieg des freien Phosphates im Körper. Dadurch werden die Osteozyten stimuliert und diese beginnen in der Folge FGF-23 zu produzieren.

FGF-23 steigert die Phosphatausscheidung der Niere und hemmt die Hydroxylierung von 25-(OH)-Vitamin D zu 1,25-(OH)₂-Vitamin D. Somit wirkt FGF-23 der Aktivität von Vitamin D und PTH entgegen. (5) (44)

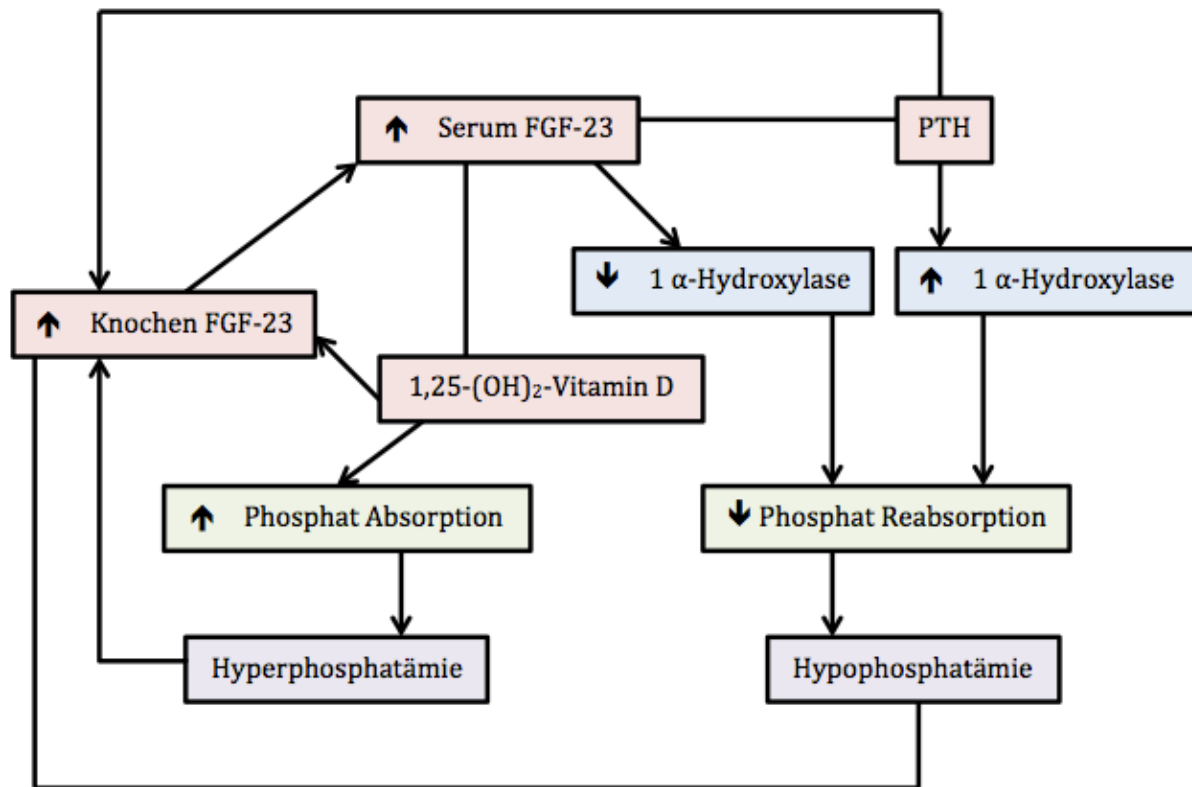


Abbildung 3: Graphische Darstellung des Zusammenspiels von FGF-23 und PTH. Modifiziert nach Farrow, E. G. & White, K. E. (2010) Recent advances in renal phosphate handling. *Nat. Rev. Nephrol.*

Die Synthese von PTH wird vor allem durch Calciummangel stimuliert. Die verringerte Calcium Konzentration wird von Calcium-sensitiven Rezeptoren an der Nebenschilddrüse detektiert und führt somit zu einer erhöhten Produktion und Sekretion von PTH. Es kommt zu Freisetzung von Calcium aus den Knochen, da PTH indirekt über Osteoblasten die Osteoklasten aktiviert.

Außerdem steigert PTH die Calcium Resorption in der Niere und fördert die Synthese von 1,25-(OH)₂-Vitamin D, indem es die 1α-Hydroxylase-Aktivität steigert. (45) Dieses Enzym katalysiert die Hydroxylierung von 25-(OH)-Vitamin D zum aktiven 1,25-(OH)₂-Vitamin D.

1.4.2 Knochenanomalien der CKD-MBD

Die CKD-MBD wird schon in frühen Stadien von Störungen des Knochenstoffwechsels begleitet, welche mit abnehmender Funktion der Niere zunehmen. So liegt das

Frakturrisiko bei Patienten zu Beginn der Nierenersatztherapie bei bis zu 50% und ist damit signifikant höher als bei der Normalbevölkerung. (5) (46) (47) (48) Ein Beispiel hierfür ist die erhöhte Prävalenz einer Hüftfraktur bei Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion. Bei Patienten im Stadium 2 der CKD nimmt das Risiko einer Hüftfraktur um 50 % zu und im Stadium 4 ist das Risiko beinahe vier Mal höher, als in der Normalbevölkerung. (49) (50)

Die Knochenanomalien welche die CKD-MBD begleiten, umfassen ein weites Spektrum. Um die einzelnen Anomalien besser zu charakterisieren, erfolgt eine histologische Einteilung nach der TMV-Klassifikation (Turnover, Mineralisation, Volumen), welche auf der standardisierten Nomenklatur der American Society for Bone and Mineral Research beruht. (51)

Tabelle 3: TMV-Klassifikationssystem

TMV-Klassifikation (38)		
Turnover	Mineralisation	Volumen
reduziert	normal	reduziert
normal		normal
	abnormal	
hoch		hoch

Der Knochen-Turnover gibt die Rate der Knochengeweberemodellierung wieder, die sich im Normalfall aus den Prozessen des Knochenabbaus sowie der Knochenneubildung zusammensetzt. Die Mineralisation spiegelt wieder, inwieweit die Knochenkollagene während der Formationsphase der Knochengeweberemodellierung kalzifiziert werden. Das Volumen gibt die Menge an Knochen pro Volumeneinheit des Gewebes an. (38)

Es gibt eine weite Bandbreite an Störungen des Knochenstoffwechsels. So treten Krankheiten mit hohem Knochen-Turnover normaler Mineralisation und erhöhten Knochenvolumen auf, welche häufig auf einen sekundären Hyperparathyreoidismus zurückzuführen sind, wie beispielsweise die Ostitis fibrosa. Es gibt aber auch Alterationen, die durch einen niedrigen Knochen-Turnover sowie durch eine geringe Mineralisation des Knochengewebes gekennzeichnet sind, wie die sogenannte

Osteomalazie. Außerdem tritt noch der adynome Knochenstoffwechsel auf. Für diesen ist ein niedriger Knochen-Turnover mit normaler Mineralisation und reduziertem Knochenvolumen charakteristisch. Durch die hohe Komplexität und Variabilität dieses Krankheitsbildes können aus diesen drei Hauptformen auch „Mischformen“ entstehen, welche charakteristische Merkmale der einzelnen Formen aufweisen. (52) (53) (54) (55)

1.4.3 Risikofaktor: Vaskuläre Kalzifikation

Die chronische Niereninsuffizienz zeichnet sich durch eine hohe Morbidität sowie Sterblichkeit aus. (3) (4) Eine der Hauptursachen dieser hohen Sterblichkeitsrate sind kardiovaskuläre Erkrankungen, welche bereits in frühen Stadien der CKD auftreten können. (17) (56) (57) (58) So ist die Sterblichkeitsrate auf Grund kardiovaskulärer Erkrankungen bei Dialysepatienten mindesten 10 Mal höher als in der Normalbevölkerung. (58) Verschiedene medizinische Studien belegen, dass dieses erhöhte Risiko der kardiovaskulären Mortalität durch eine Störung des Mineralstoffwechsels verstärkt wird. (59) (60) (61)

Häufig sind die kardiovaskulären Erkrankungen von Patienten mit CKD auf eine vaskuläre Kalzifikation zurückzuführen (62) (63), wobei sowohl intimale (Atherosklerose) als auch mediale Verkalkungen (Arteriosklerose) auftreten. (64) (65)

Die Pathogenese der vaskulären Kalzifikation ist ein dynamischer, hochkomplexer Prozess, welcher Ähnlichkeiten mit der Bildung bzw. Mineralisation von Knochen aufweist. (66) (67) (68) (69) (70) Auf Grund der vielen Faktoren, welche die kardiovaskuläre Verkalkung beeinflussen, spricht man von einem multifaktoriellen Prozess. So wird die kardiovaskuläre Verkalkung nicht nur durch Alterationen des Calcium-Phosphathaushaltes (71) (72) (73) sondern beispielsweise auch durch oxidiertes LDL (74) (75) (76), aktives Vitamin D (77) (78), oder durch Entzündungsprozesse (79) (80) gefördert. Andere Faktoren, wie Pyrophosphat (81) (82) (83) (84), Fetuin-A (85) (86), Osteoprotegerin (87) oder Klotho (88) wirken dem Risiko der vaskulären Kalzifikation entgegen.

Die vaskuläre Kalzifikation beginnt mit einer Umformung bzw. Differenzierung der vaskulären glatten Muskelzellen (VSMCs, vascular smooth muscle cells). Normalerweise differenzieren mesenchymale Stammzellen, welche die Vorläuferzellen des

Bindegewebes sind, in Adipozyten, Osteoblasten, Chondrozyten oder VSMCs. (67) (89)
Während des Verlaufs einer chronischen Niereninsuffizienz können diese Zellen jedoch durch Hochregulation von Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise *Runx2* oder *Msx2* in Osteoblasten ähnliche Zellen umgewandelt werden. (89) (90)

Anschließend können diese Zellen Matrixvesikel sowie apoptotische Körperchen bilden, welche dann die extrazelluläre Matrix mineralisieren. Dieser Prozess, der ähnlich wie im Knochen abläuft, kann durch überschüssiges Calcium und Phosphat, welches aufgrund der Störung des Mineralstoffwechsels vorliegt, beschleunigt werden. (89)

Generell wird die Pathogenese durch ein Gleichgewicht von Faktoren, welche die Kalzifikation fördern (Hyperphosphatämie, Hyperparathyreoidismus) bzw. von Faktoren, welche diese hemmen geregelt. Jedoch sind inhibitorische Faktoren wie Fetuin-A oder Osteoprotegerin normalerweise während der CKD-MBD kaum vorhanden. (89)

2 Material und Methoden

2.1 Studiendesign

Alle Experimente im Rahmen dieser Masterarbeit wurden vom Bundesministerium für Wissenschaft, Forschung und Wirtschaft genehmigt und wurden unter Einhaltung der Vorschriften des österreichischen Tierschutzgesetzes durchgeführt.

Es wurden acht Wochen alte, weibliche DBA/2 Mäuse für die Experimente verwendet. Sie wurden von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) geliefert und unter virusfreien Bedingungen im Tierstall der Medizinischen Universität Graz untergebracht. DBA/2 Mäuse neigen dazu an Nephrokalzinose zu erkranken. (91) (92) Diese Mäuse besitzen eine Mutation des *Abcc6* Gens, welches das *Abcc6* Protein, einen ABC-Transporter (ATP-binding cassette transporter) kodiert, welcher vor allem in basolateralen Plasmamembran von Hepatozyten und im Basalmembran des Tubulus proximalis vorkommt. (92) (93) (94) (95) (96) (97) (98) Weibliche DBA/2 Mäuse wurden deswegen für die Experimente verwendet, weil diese anfälliger für Kalzifikationen und Weichteilverkalkung sind, als die männlichen DBA/2 Mäuse. (99) (100)

Um eine Nierenschädigung hervorzurufen wurden die DBA/2 Mäuse auf Hochphosphat-Diät gesetzt. (93) (101) (102) (103) In der ersten Versuchsreihe wurde einer Gruppe von DBA2/Mäusen (CKD-Gruppe, n=4) vier Tage lang Hochphosphatfutter (20,2 g Phosphat; 9,4 g Calcium; 0,7 g Magnesium und 500 IU/kg Vitamin D₃) verabreicht und anschließend Standardfutter (7,0 g Phosphat; 10,0 g Calcium; 2,2 g Magnesium und 1000 IU/kg Vitamin D₃) für 14 weitere Tage. In der zweiten Versuchsreihe bekam die CKD-Gruppe (n=4) für vier Tage Hochphosphatfutter und anschließend Standardfutter für 84 Tage. Beide Male wurde je eine Kontrollgruppe (CTRL-Gruppe, erste Experimentreihe: n=3, zweite Experimentreihe: n=4) mitgeführt, welche für die ganze Beobachtungszeit Standardfutter erhielt.

2.2 Probengewinnung

Am Ende jeder Experimentreihe wurden zuerst Urinproben von jedem Tier gesammelt. Die Urinproben wurden in Eppendorf Tubes (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) bei -20°C aufbewahrt. Dann wurden die DBA/2 Mäuse mit Avertin (SIGMA Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland), welches in die Bauchhöhle injiziert wurde, anästhesiert und anschließend erfolgte eine zervikale Dislokation. Der retrobulbäre Venenplexus wurde mit einer dünnen Glaskapillare (Brand GmbH & Co.KG, Wertheim, Deutschland) punktiert, um Blut für weitere Analysen zu gewinnen. Zunächst wurde das Blut in einem Eppendorf Tube (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) aufgefangen, dann bei 4000 g für zehn Minuten zentrifugiert und schließlich der Überstand, welcher dem Serum entspricht, vorsichtig abpipettiert und bei -20°C aufbewahrt.

Im nächsten Schritt wurde die Bauchhöhle geöffnet und beide Nieren entnommen. Nach der Entfernung der Nierenkapsel wurden die Nieren geteilt. Für die Anfertigung von Paraffinschnitten wurde eine Hälfte der Niere in eine Einbettkassette (Simport, Beloeil, Qc, Kanada) gegeben und anschließend bis zu weiteren Aufarbeitung in einen mit Formalin (Donauchem GmbH, Wien, Österreich) gefüllten Behälter gelegt. Die andere Hälfte der Niere wurde in Einbett-Gussformen gelegt, mit O.C.T Compound Tissue-Tek® (Sakura Fintek Europe B.V., Zoeterwoude, Niederlande) eingebettet und in flüssigen Stickstoff schockgefroren, um später Gefrierschnitte herzustellen. Die anderen beiden Nierenhälften wurden in ein steriles Tube (Simport, Beloeil, Qc, Kanada) gegeben und bei -80°C gelagert, um sie später für RNA-Analysen zu verwenden.

In der zweiten Experimentreihe wurde außerdem die Tibia präpariert, welche in 70% Ethanol (EMSURE®, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) eingelegt wurde, um anschließend Methacrylatschnitte anzufertigen.

2.3 Anfertigung von Methacrylatschnitten

Nach der Entnahme wurden die Tibia für zwei Tage lichtgeschützt in 70%igen Ethanol (EMSURE®, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) fixiert. Dann wurden die Knochen für zwei weitere Tage in 96%igen Ethanol (EMSURE®, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) eingelegt, bevor sie für zwei Tage in Isopropanol (EMSURE®, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) eingebettet wurden. Anschließend wurden die Knochen für

einen Tag in Xylol (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) gelegt und danach für einen Tag in Methacrylsäure. Die so vorbehandelten Knochen wurden horizontal in einen Glasbecher platziert, welcher am Boden bereits mit Methacrylat beschichtet war. Nun wurden die Knochen mit einer Harzmischung bedeckt und zum Aushärten in ein Wasserbad gelegt. Nach einer Woche waren die Knochenproben ausgehärtet und es konnten am Knochen-Mikrotom (Leica RM 2155, Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland) 4 µm dicke Schnitte angefertigt werden.

2.4 Anfertigung von Gefrierschnitten

Die gewonnenen Organe wurden in Einbett-Gussformen gelegt, mit O.C.T Compound Tissue Tek® (Sakura Fintek Europe B.V., Zoeterwoude, Niederlande) eingebettet und anschließend in einem Methylenbutanbad in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Am Kryomikrotom (Cryostat-Microtome HM560M, Microm International GmbH, Walldorf, Deutschland) wurden 4 µm dicke Schnitte der Gewebe angefertigt und je zwei Schnitte wurden auf einem Objektträger (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) befestigt. Die Gefrierschnitte wurden bei -20°C aufbewahrt.

2.5 Anfertigung von Paraffinschnitten

2.5.1 Fixierung

Die gewonnenen Organe müssen sofort fixiert werden, um das Gewebe so gut wie möglich zu erhalten und postmortale Veränderungen zu vermeiden. Aus diesem Grund wurden die Organe sofort nach der Entnahme in 4 % Formalin (Donauchem GmbH, Wien, Österreich) eingelegt. Das Prinzip dieser chemischen Fixierung ist die Vernetzung und Denaturierung von Proteinen, wobei die Struktur der Zellen erhalten bleibt. (104)

2.5.2 Einbettung in Paraffin

Das Gewebe muss eingebettet werden, um es in eine so harte Konsistenz zu überführen, dass die Herstellung von dünnen Schnitten möglich ist. Aus diesem Grund wurden die Organe mit flüssigem Paraffin durchtränkt. Da Paraffin jedoch nicht wasserlöslich und folglich nicht mit Wasser mischbar ist, musste den Organen zunächst das Wasser vollständig entzogen werden. Die Entwässerung geschah, indem man die Organe mit

einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%-80%-96%-100% (EMSURE®, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)) behandelte und somit das Wasser durch Ethanol ersetzte. Anschließend wurde der Alkohol durch ein Intermedium (Xylol (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)) ersetzt, welches den Alkohol aus dem Gewebe verdrängte. Am Ende wurde Xylol durch flüssiges Paraffin ersetzt. (104) All diese Schritte liefen automatisch in einem Histokinette Einbettautomat (Tissue-Tek®VIP™, Sakura Fintek Europe B.V., Zoeterwonde, Niederlande) ab. Zur Herstellung von Paraffinblöcken wurden die mit Paraffin durchtränkten Organe in Gießschälchen gelegt und mit Paraffin eingedeckt. Auf den noch flüssigen Paraffinblock wurde die Einbettkassette aufgelegt, da diese den Boden des Paraffinblocks bildet. Nach dem Abkühlen waren die Blöcke ausgehärtet, das Gießschälchen wurde entfernt und es konnten 4 µm dicke Schnitte am Rotationsmikrotom (Microm HM360, Microm International GmbH, Walldorf, Deutschland) angefertigt werden.

2.6 Immunhistochemische Färbungen

Immunhistochemische Färbungen der Niere wurden durchgeführt, um zu überprüfen, ob eine Infiltration von Lymphozyten und Makrophagen vorliegt. Dafür wurde die Niere auf CD4/CD8 positive T-Zellen sowie auf CD68 positive Zellen untersucht. Die Färbungen erfolgten nach einem Standardprotokoll der Arbeitsgruppe, welches auf dem Prinzip der ABC-Methode beruht. (105) (106) Bei dieser Methode nutzt man die starke Affinität von Eiweißglykoprotein Avidin für das Vitamin Biotin.

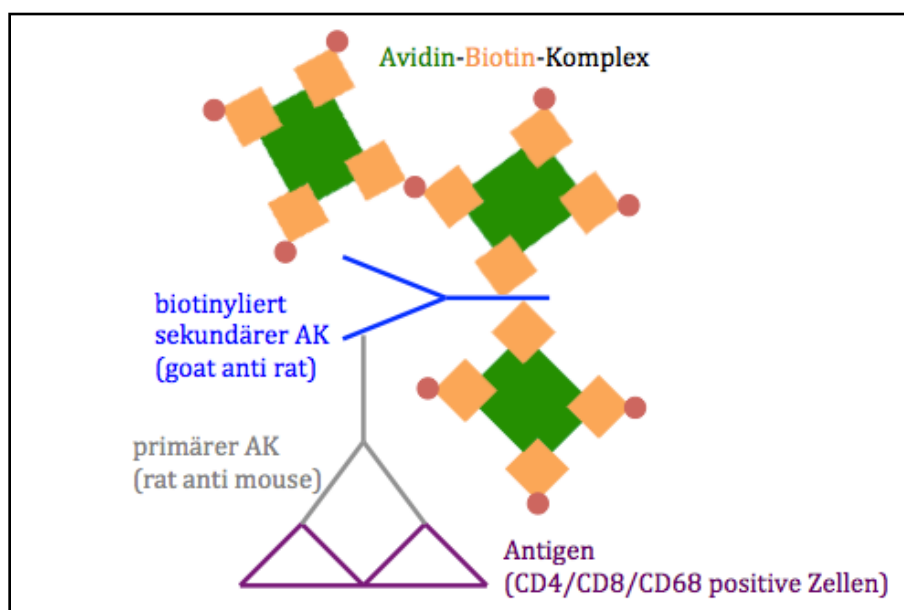


Abbildung 4: Schematische Darstellung des ABC-Systems.

Das System besteht aus drei Komponenten: einem unkonjugierten primären Antikörper, einem biotinylierten sekundären Antikörper sowie aus einem Komplex aus biotinylierter Peroxidase und Avidin. Avidin besitzt vier Bindungsstellen für das Biotin, dies ermöglicht die Bindung an die Biotin-Gruppen des Sekundärantikörpers. So können pro Primärantikörper, welcher an das Antigen bindet, viele Enzymmoleküle gebunden werden. Die Färbung und somit die Erkennung des Antigens erfolgt dann über die Umsetzung von Chromogensubstrat durch Peroxidase.

Zu Beginn der Färbung wurden die Objektträger für 30 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Dann wurden die Schnitte für acht Minuten in Aceton (EMSURE®, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) fixiert. Anschließend wurden die Objektträger für eine Minute an der Luft getrocknet, bevor sie mit einem Fettstift umrandet wurden.

Um unspezifische Bindungen des Antikörpers (AK) zu verhindern, wurden die Schnitte für 20 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer mit Deckel geblockt. Die Blocklösung setzte sich aus 70% PBS (Donauchem GmbH, Wien, Österreich), 20 % FCS (SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) 10% Serum der Spezies des zweiten AK (durch Hitze inaktiviertes Ziegenserum) und einer adäquaten Menge an Avidin (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) zusammen. Dann erfolgten zwei Waschschriffe für je zwei Minuten in PBS bzw. Gelatine-Waschlösung (0,8 g Gelatine in 100 ml Aqua dest auflösen und kochen sowie Zugabe von 300 ml PBS).

Im Anschluss wurde der Primärantikörper aufgetragen und die Objektträger wurden für 60 Minuten in einer feuchten Kammer mit Deckel inkubiert. Dabei handelte es sich je nach Färbung entweder um den rat anti mouse CD4-AK (Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA, USA), um den rat anti mouse CD8-AK (Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA, USA) oder um den rat anti mouse CD68-AK (Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA, USA) mit einer jeweiligen Endkonzentration von 2 µl/ml. Die Verdünnungen der primären AK wurden mit einer adäquaten Menge an Biotin (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) versetzt. Anschließend wurden die Objektträger drei Mal für je vier Minuten in PBS gewaschen.

Nach diesem Waschschriff erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (goat anti rat, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA), welcher eine Endkonzentration von 5 µl/ml aufwies, für 45 Minuten in einer feuchten Kammer mit Deckel. Dann wurden die Schnitte erneut drei Mal für je vier Minuten in PBS gewaschen. Im nächsten Schriff wurden die Objektträger in der Lösung des AB-Komplexes (Vector

Laboratories, Burlingame, CA, USA) für weitere 45 Minuten inkubiert. Zur Herstellung des AB-Komplexes wurden 10 µl der Lösung A sowie der Lösung B in 1000 µl PBS pipettiert und anschließend musste diese Lösung für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen stehen. Nach der Inkubation der Objektträger mit dem AB-Komplex, wurden die Schnitte wieder dreimal für je vier Minuten in PBS gewaschen. Darauf folgte ein Waschschriff der Objektträger in 0,1 M Acetat-Puffer (300 ml 0,2 N-Acetat, 100 ml Essigsäurelösung, 400 ml Aqua dest) für drei Minuten.

Die Schnitte wurden dann für sechs bis acht Minuten in einer AEC-Lösung entwickelt, wobei die Entwicklung im Mikroskop überprüft wurde. Die AEC-Lösung bestand aus 3 ml AEC Stocklösung (6 AEC-Tabletten (SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) in 30 ml n,n-dimethylformamid (EMPLURA®, Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn, Deutschland) und 60 ml 0,1 M Acetat-Puffer. Kurz vor dem Gebrauch der Lösung wurden noch 30 µl 30%ige H₂O₂ (EMSURE®, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) dazugegeben. Nach der Entwicklung wurden die Schnitte dreimal je eine Minute in Aqua dest gewaschen. Dann erfolgte das Gegenfärben in Gill's Nr. 3 Hämatoxilin (2 Teile Gill's (SIGMA Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) und 1 Teil Aqua dest). Am Ende der Färbung wurden die Objektträger noch ein weiteres Mal mit Leitungswasser sowie mit Aqua dest gespült.

Die fertig gefärbten Schnitte wurden mit Aquatex® (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) eingebettet. Die positiven CD4/CD8 T-Zellen sowie die positiven CD68 Zellen weisen nun eine bräunliche Färbung auf, wohingegen das umliegende Gewebe bläulich erscheint.

2.6.1 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Die histologischen Evaluierungen aller immunhistochemischer Färbungen wurden mit einem Olympus BX51 Mikroskop (OLYMPUS EUROPA SE & CO.KG, Hamburg, Deutschland) durchgeführt.

Für die Auswertung der CD4 sowie CD8 positiven T-Zellen wurden pro Schnitt einer Probe sechs high-power fields (HPF; 400x Vergrößerung) ausgezählt.

Für die Auswertung der Makrophagen (CD68 positive Zellen) wurden insgesamt sechs low-power fields (LPF; 200x Vergrößerung) ausgezählt und zur Beurteilung nach dem Schema eines semiquantitativen Scores eingeteilt:

- 0 = 1-4 positiv gefärbte Zellen
- 1 = 5-10 positiv gefärbte Zellen
- 2 = 11-50 positiv gefärbte Zellen
- 3 = 51-200 positiv gefärbte Zellen
- 4 = >200 positiv gefärbte Zellen

2.7 Alizarin-Rot-Färbung

Die Alizarin-Rot-Färbung ist eine sehr spezifische Methode zum Nachweis von ektopen Weichteilverkalkungen. Alizarin-Rot formt mit den zweiwertigen Calciumionen Chelatverbindungen aus und folglich sind die Verkalkungen orange-rot ersichtlich.

Dafür mussten die Paraffinschnitte vor der Färbung entparaffiniert werden. Deswegen wurden die Objektträger zuerst für 10 Minuten in Xylol (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) getaucht, anschließend mit einer absteigenden Ethanolreihe (100%-96%-70% (EMSURE®, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)) für je drei Minuten behandelt und schlussendlich mit Aqua dest. abgespült. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte für etwa 5 Minuten in der Alizarin-Rot-Färbelösung gefärbt, wobei der Fortschritt der Färbung mikroskopisch kontrolliert wurde. Die Färbelösung bestand aus 2 g Alizarin Red S (SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland), welches in 100 ml Aqua dest. aufgelöst wurde. Zusätzlich wurde die Lösung auf einen pH zwischen 4,1-4,3 mit Ammoniumhydroxid eingestellt. Nach der Färbung wurden die Schnitte dehydriert, indem sie nacheinander je 20 Mal in Aceton (EMSURE®, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) bzw. in ein Aceton-Xylol Gemisch (1:1) getaucht wurden. Dann wurden die Objektträger zur Reinigung noch ein Mal in Xylol (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) getaucht, bevor die Schnitte schlussendlich mit Roti®-Histokitt II (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) eingedeckt wurden.

2.8 Calcein-Labeling der Knochen

Das Calcein-Labeling wurde durchgeführt, um den Knochenstoffwechsel zu untersuchen. Das Prinzip dieser Methode ist es, das Knochenwachstum sowie den Knochenumbau darzustellen, indem den Mäusen eine Woche vor dem geplanten Versuchsende zwei Mal, in einem Intervall von vier Tagen, Calcein (20mg/kg KG, (SIGMA Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)) injiziert wurde. Das Calcein baute sich in die Mineralisationsfront vom Knochengewebe ein und durch den zeitlichen Abstand der Injektionen waren zwei fluoreszierende Labels ersichtlich. Mittels der OsteoMeasure™ Software (OsteoMetrics, Decatur, GA, USA) wurden sowohl die Knochenformationsrate (BFR = Bone Formation Rate) als auch die Mineralappositionsrate (MAR = Mineral Apposition Rate) bestimmt.

2.9 Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate (GFR)

Die glomeruläre Filtrationsrate, welche mittels FITC-Inulin Clearance bestimmt wurde, ist eine der wichtigsten Parameter für die Beurteilung der Nierenfunktion.

Für die Bestimmung wurde zunächst FITC-Inulin (SIGMA Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) in Natriumchlorid gelöst und anschließend via Membran dialysiert. Im nächsten Schritt wurden den Mäusen 2 µL/g KG des dialysierten FITC-Inulin intravenös injiziert. Dann wurde etwa ein Millimeter des Mausschwanzes mit einer Schere abgetrennt, um anschließend das Blut 3, 5, 7, 10, 15, 56 und 75 Minuten nach der Injektion in mit Heparin gefüllten Eppendorf Tubes (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) zu sammeln. Die Proben wurden fünf Minuten zentrifugiert und anschließend in Duplikaten vermessen (FLUOstar Omega Photometer, BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland).

Für die Standardreihe wurde die FITC-Inulin Lösung mit Plasma (1:10 mit HEPES) von denselben DBA/2 Mäusen verdünnt. So wurde eine Standardkurve mit sieben Verdünnungen im Bereich von 1:10 bis 1:100000 erstellt.

Zur Berechnung der GFR wurde eine zweiphasige exponentielle Zerfallskurve verwendet. Diese Zerfallskurve basiert auf der FITC-Inulin Konzentration im Plasma und spiegelt ein Zwei-Kompartiment-Modell wieder. In diesem Modell, reflektiert die beginnende rasch abfallende Phase, die Verteilung von FITC-Inulin vom intravaskulären Kompartiment in die extrazellulären Körperflüssigkeiten.

Die zweite Phase, welche einen langsamen Abfall der FITC-Inulin Konzentration aufweist, repräsentiert die systemische Clearance des Plasmas. (107)

2.10 Bestimmung von Parathormon und Fibroblasten Wachstumsfaktor 23

Die Plasma Konzentrationen von Parathormon (PTH) und Fibroblasten Wachstumsfaktor 23 (FGF 23) wurde mittels ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) bestimmt. Die Durchführung zur Bestimmung der PTH Konzentration erfolgte mittels Mouse PTH 1-84 ELISA Kit (Immutopics International, San Clemente, California USA) und für die Bestimmung der FGF 23 Konzentration wurde ein Mouse FGF 23 (C-Term) ELISA Kit (Immutopics International, San Clemente, California USA) verwendet.

Beide Kits basieren auf der Methode des Sandwich-ELISA. Bei diesem Verfahren werden im ersten Schritt die einzelnen Wells einer Mikrotiterplatte mit einem Capture-Antikörper beschichtet, welcher gegen ein spezifisches Antigen gerichtet ist.

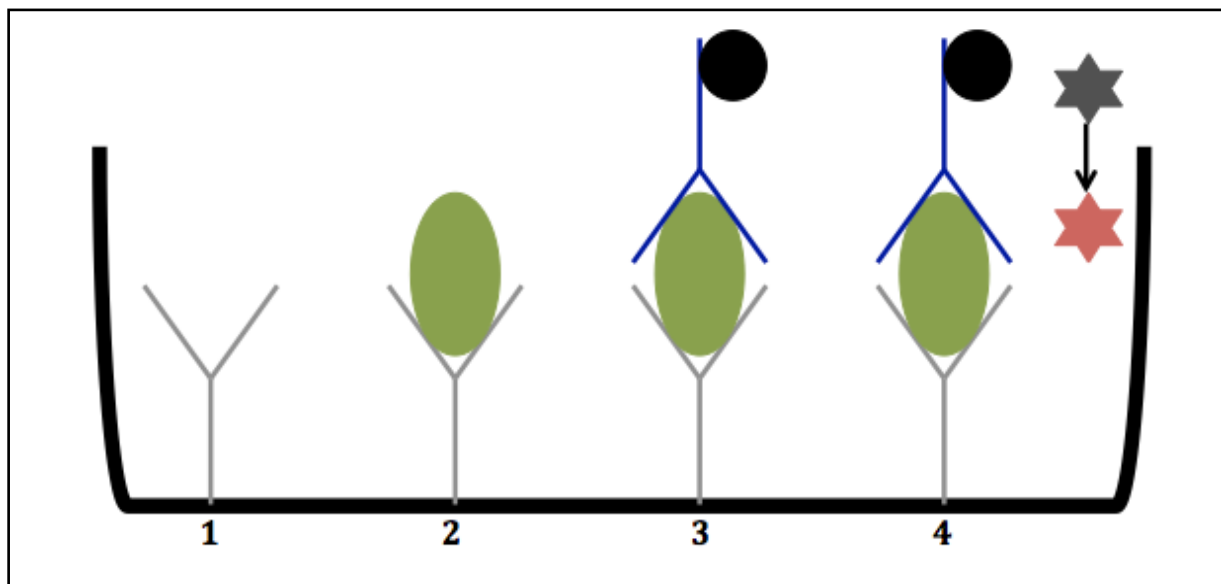


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Sandwich-ELISA Methode.

Im nächsten Schritt werden die Proben aufgetragen, wobei der fixierte Capture-Antikörper spezifisch an das Antigen bindet. Dann erfolgen mehrere Waschstschritte, um ungebundene Bestandteile der Probe zu entfernen. Im darauffolgenden Schritt wird ein weiterer Antikörper, der sogenannte Detection-Antikörper, hinzugefügt. Dieser bindet an einer anderen Stelle des Antigens und ist außerdem an ein Reporterenzym gekoppelt.

Dieses Enzym ermöglicht die Umwandlung einer chromogenen Substanz und dadurch dessen Aktivierung. Die Enzymaktivität kann schlussendlich photometrisch bestimmt werden und daraus kann die Menge des Antigens ermittelt werden.

Die Durchführung der Kits erfolgte nach den mitgeführten Protokollen. Am Ende wurde die jeweilige Enzymaktivität photometrisch (FLUOstar Omega Photometer, BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland) gemessen und daraus die dazugehörigen Konzentrationen bestimmt.

2.11 Real Time Polymerase Chain Reaction

Zur Bestimmung der mRNA Expression von *Tnfa*, *Tbx21*, *Tgfb*, *Gata3*, *Rorc*, *Il6*, *Il10*, *Ccr2*, *Ccr5* und *Ccl2* wurde eine Real Time PCR durchgeführt.

Dafür musste zu Beginn die RNA aus dem Nierengewebe isoliert werden, dann in cDNA umgeschrieben werden und schlussendlich die Real Time PCR durchgeführt werden.

Im ersten Schritt wurde die Hälfte einer Niere in 700 µL TRIzol ® Reagent (SIGMA Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) homogenisiert. Zu diesem Homogenat wurden weitere 300 µL TRIzol ® Reagent sowie 200 µL Chloroform (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) hinzugefügt. Diese Lösung wurde dann geschüttelt bis eine rosa Suspension entstand. Nach acht Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Suspension 15 Minuten bei 4 °C und 12000 g zentrifugiert. Die durch die Zentrifugation erhaltene durchsichtige Phase wurde in ein neues Eppendorf Tube (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) transferiert und mit 0,5 mL Isopropanol (EMSURE®, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) vermengt. Nach einem weiteren Inkubationsschritt von acht Minuten folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (8 Minuten, 12000g, 4 °C). Dann wurde 1 mL Ethanol (70%, EMSURE®, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) hinzugefügt und fünf Minuten bei 7000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgehoben und derselbe Schritt mit 0,5 mL Ethanol wiederholt. Anschließend wurde das gesamte Ethanol entfernt, indem die Proben etwa 20 Minuten bei Luft getrocknet wurden. Das erhaltene Pellet wurde in 20 µL Aqua dest. gelöst und auf Eis gestellt. Im nächsten Schritt wurde die Konzentration der gewonnenen RNA am Photometer (Biophotometer, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) gemessen.

Im Anschluss erfolgte die Umschreibung in cDNA. Dafür wurde ein SuperScript III™ reverse Transkriptase Kit (Invitrogen Carlsbad, CA, USA) verwendet. Zuerst wurde in PCR-Tubes (Greiner Bio One International GmbH, Kremsmünster, Österreich) ein Mix aus 0,5 µL Random Primern (F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Schweiz), 1 µL 10mM dNTPs, 2µg der jeweiligen RNA-Probe sowie einer adäquaten Menge dH₂O (Endvolumen 13 µL) hergestellt. Dann wurden die Proben für fünf Minuten bei 65°C in einem Thermocycler (Primus 96 plus, MWG, Biotech AG, Ebersberg, Deutschland) inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben auf Eis gestellt und mit 7 µL eines vorbereiteten Mix versetzt. Dieser Mix bestand aus 4 µL 5X First-Strand Puffer (250mM Tris-HCl, 375 mM KCl, 15mM MgCl₂), 1 µL DTT, 1µL einer 1:4 verdünnten Lösung des Rnase-Inhibitors RNaseOUT™ und 1 µL der SuperScript III™ reversen Transkriptase. Die Proben wurden zuerst für fünf Minuten bei 25°C, dann für 45 Minuten bei 50°C und zuletzt für 15 Minuten bei 70°C im Thermocycler inkubiert. Schlussendlich wurden die Proben mit 150 µL Auqa dest. verdünnt und bei -25°C bis zu Weiterverarbeitung aufbewahrt.

Für die anschließende Quantifizierung von *Tnfa*, *Tbx21*, *Tgfb*, *Gata3*, *Rorc*, *Il6*, *Il10*, *Ccr2*, *Ccr5* und *Ccl2* wurden die TaqMan Genexpression Assays (Applied Biosystems®, LifeTech, Wien, Österreich) Mm00443258_m1, Mm00450960_m1, Mm03024053_m1, Mm00484683_m1, Mm01261022_m1, Mm00446190_m1, Mm00439616_m1, Mm00438270_m1, Mm01216171_m1 und Mm00441242_m1 verwendet.

Als House-keeping Kontrolle wurde das HPRT-Gen verwendet und die Detektion erfolgte über das SYBR® Green Kit (Invitrogen Carlsbad, CA, USA). Als forward Primer wurde 5'-GCT TCC TCC TCA GAC CGC TTT TTG C-3' und als reverse Primer 5'-ATC GCT AAT CAC GAC GCT GGG ACT G-3' verwendet.

Die RT-PCR wurde nach einem Standardprotokoll im CFX96™ Real-Time PCR-System (Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA, USA)) durchgeführt. Dazu wurde im ersten Schritt die HPRT vervielfältigt, indem je 12,5 µL Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen Carlsbad, CA, USA) mit je 0,5 µL der 20mM Primer sowie mit 11,5 µL der cDNA-Proben versetzt wurden. Für die eigentliche Quantifizierung wurde ein Mix bestehend aus 8 µL des TagMan® 2x Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems®, LifeTech, Wien, Österreich) 0,8 µL der jeweiligen Sonde und 6,2 µL der cDNA-Proben verwendet.

Die so erhaltenen Proben wurden in Duplikaten auf die PCR-Platten aufgetragen und anschließend im Thermocycler (2 Minuten bei 60°C, 10 Minuten bei 95°C und 40x je 15 Sekunden bei 95°C sowie 1 Minute bei 60°C) inkubiert. Die Auswertung der Real-Time PCR erfolgte nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode.

2.12 Statistische Analyse

Alle Ergebnisse dieser Masterarbeit wurden als Mittelwert \pm SEM angegeben. Zuerst wurde mittels Kolmogorov-Smirnov-Test bzw. mittels Lilliefors-Test überprüft, ob die Daten normalverteilt sind. Dann wurden die beiden Gruppen (CTRL und CKD) mit Hilfe eines zweiseitigen t-Tests verglichen, wobei $p < 0,5$ als statistisch signifikant angesehen und in den Graphiken mit * gekennzeichnet wurde. In den Graphiken wurden weiters $p < 0,05$ mit ** und $p < 0,005$ mit *** erkenntlich gemacht.

Alle statistischen Analysen wurden mit dem Statistikprogramm SPSS für Windows (SPSS, Chicago, IL, USA) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Das neue Mausmodell der CKD-MBD basiert auf der Nephrokalzinose

Als erstes führten wir eine Evaluierung des Phänotyps der Niere durch, um das neue Mausmodell zu charakterisieren.

Die Hochphosphatdiät induzierte eine signifikante Verkalkung der Niere in den DBA/2 Mäusen. Die histologischen Resultate der Alizarin-Rot-Färbung, zeigten die deutlich sichtbaren ektopen Weichteilverkalkungen der CKD-Gruppe im Vergleich zu der CTRL-Gruppe. In beiden Experimentreihen waren diese Ergebnisse vergleichbar.

Abbildung 6 zeigt repräsentative Aufnahmen (40x Vergrößerung) der Nieren von einer DBA/2 Maus mit Niereninsuffizienz (A) und von einer DBA/2 Maus der Kontrollgruppe (B) nach 18 Tagen.

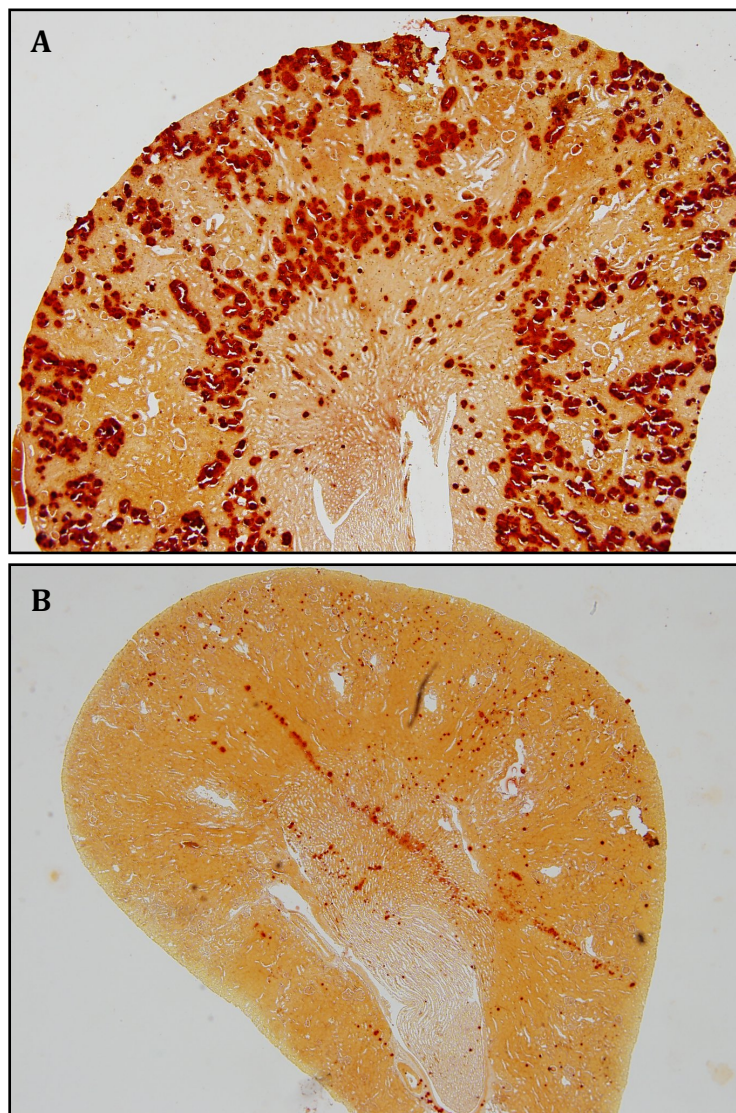


Abbildung 6: Nephrokalzinose in der CKD-Gruppe (A) Kaum Verkalkungen in der CTRL-Gruppe (B) nach 18 Tagen. (Alizarin-Rot-Färbung)

3.2 Makrophagen infiltrieren die Nieren von DBA/2 Mäusen der CKD-Gruppe

Zur weiteren Beurteilung des Phänotyps der Niere, legten wir den Fokus auf die infiltrierenden Zellen in der Niere. Die immunhistochemischen Färbungen zeigten eine signifikante Infiltration der CD4 sowie der CD8 positiven T-Zellen.

Ergebnisse der ersten Experimentreihe

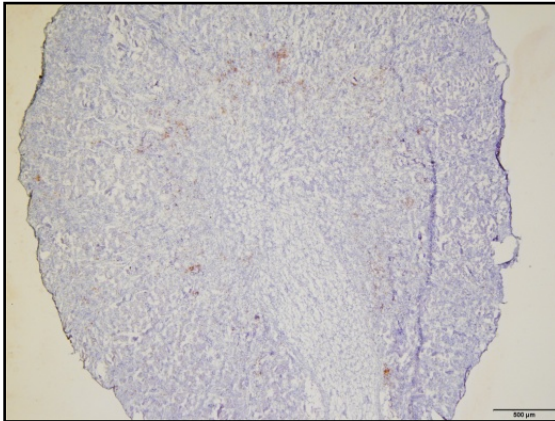


Abbildung 7: Infiltration von CD4⁺ Zellen in der Niere einer CKD-Gruppen Maus nach 18 Tagen. (40x Vergrößerung)

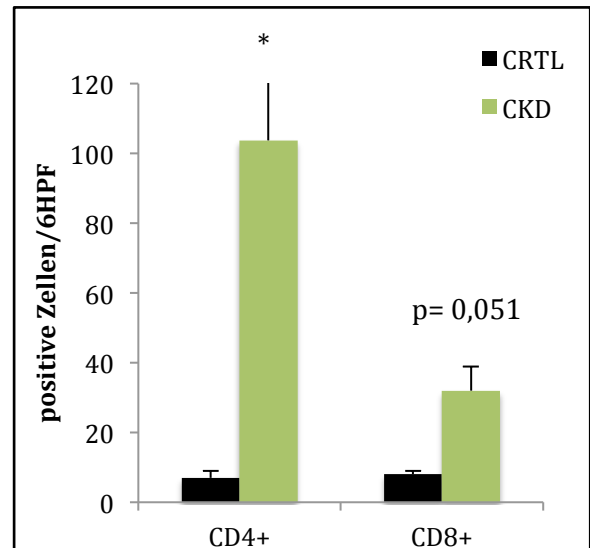


Abbildung 9: Evaluierung der infiltrierenden CD4 und CD8 positiven T-Zellen nach 18 Tagen.

Ergebnisse der zweiten Experimentreihe

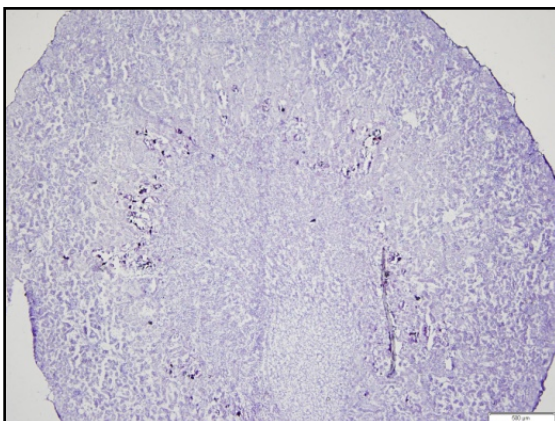


Abbildung 8: Infiltration von CD4⁺ Zellen in der Niere einer CKD-Gruppen Maus nach 88 Tagen. (40x Vergrößerung)

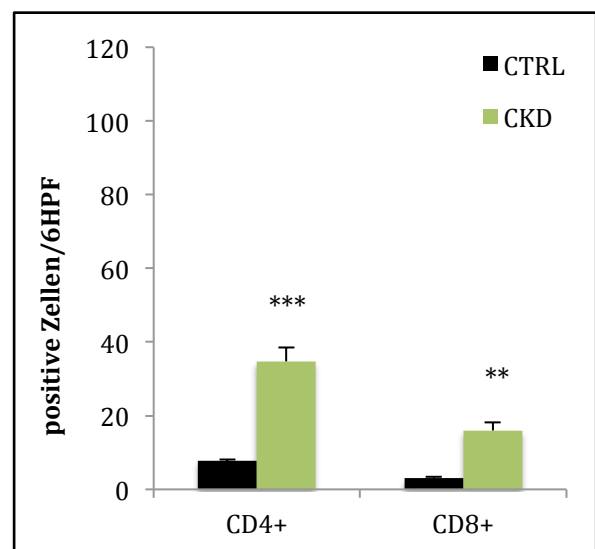


Abbildung 10: Evaluierung der infiltrierenden CD4 und CD8 positiven T-Zellen nach 88 Tagen

Weitere immunhistochemische Färbungen legten dar, dass die CD68 positiven Zellen, die Zellen mit der höchsten Infiltrationsrate waren. Die Makrophagen waren vor allem in der Grenzzone zwischen Cortex und Medulla lokalisiert. Dies konnte sowohl in der ersten als auch in der zweiten Experimentreihe beobachtet werden.

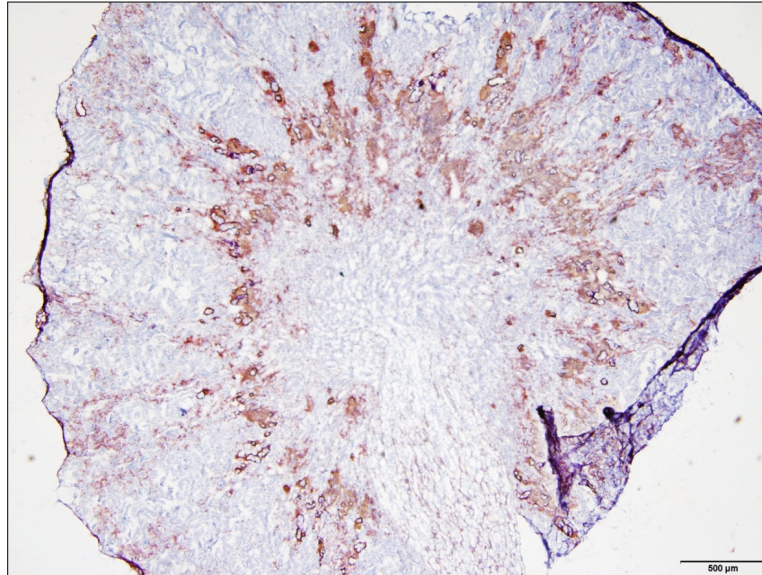


Abbildung 11: Infiltration von CD68 positiven Zellen in der Niere einer CKD-Gruppen Maus nach 18 Tagen. (40x Vergrößerung)

Die durch histologische Methoden erhaltenen Ergebnisse wurden durch eine Real-Time PCR (Abbildung 12) bestätigt. Außer den T_H1 Zytokinen *Il6* und *Il10* waren keine weiteren T-Zell Marker up-reguliert. Jedoch wiesen die Makrophagen Marker *CCr2*, *CCr5* und *CCl2* eine erhöhte Expression auf.

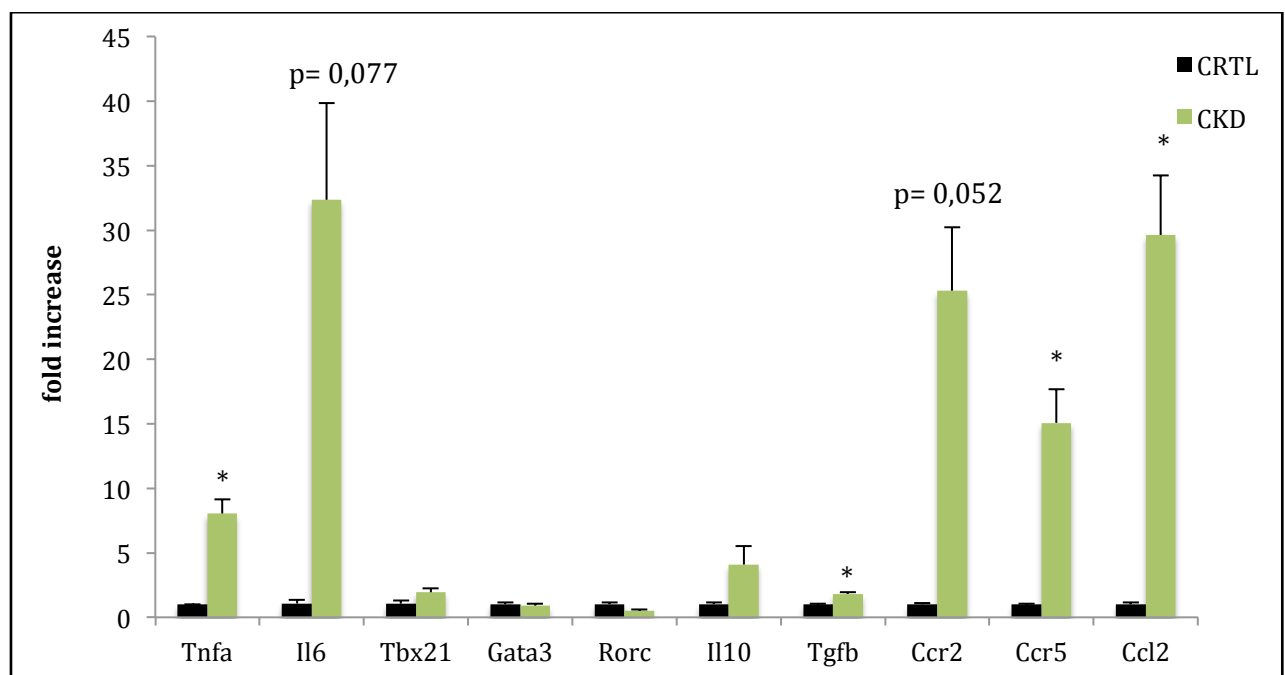


Abbildung 12: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Real Time PCR von der ersten Experimentreihe.

3.3 Nephrokalzinose bewirkt eine Reduktion der glomerulären Filtrationsrate

Um festzustellen ob die DBA/2 Mäuse eine chronische Niereninsuffizienz entwickelt haben wurde in der zweiten Experimentreihe die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) bestimmt. In

Abbildung 13 ist deutlich zu erkennen, dass die Mäuse der CKD-Gruppe eine signifikant niedrigere GFR aufwiesen, als die Mäuse der CTRL-Gruppe.

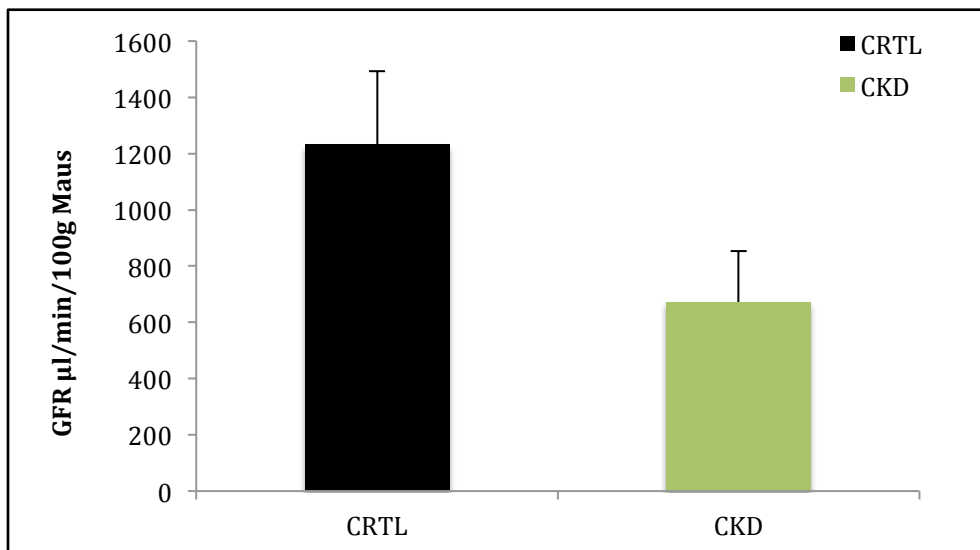


Abbildung 13: Graphische Darstellung der glomerulären Filtrationsrat

Zur Berechnung der GFR wurde eine zweiphasige exponentielle Zerfallskurve verwendet, welche auf der durchschnittlichen Fluoreszenz basierte. In Abbildung 14 sind repräsentative Graphen einer DBA/2 Maus der Kontrollgruppe (A) bzw. einer DBA/2 Maus der CKD-Gruppe (B) dargestellt.

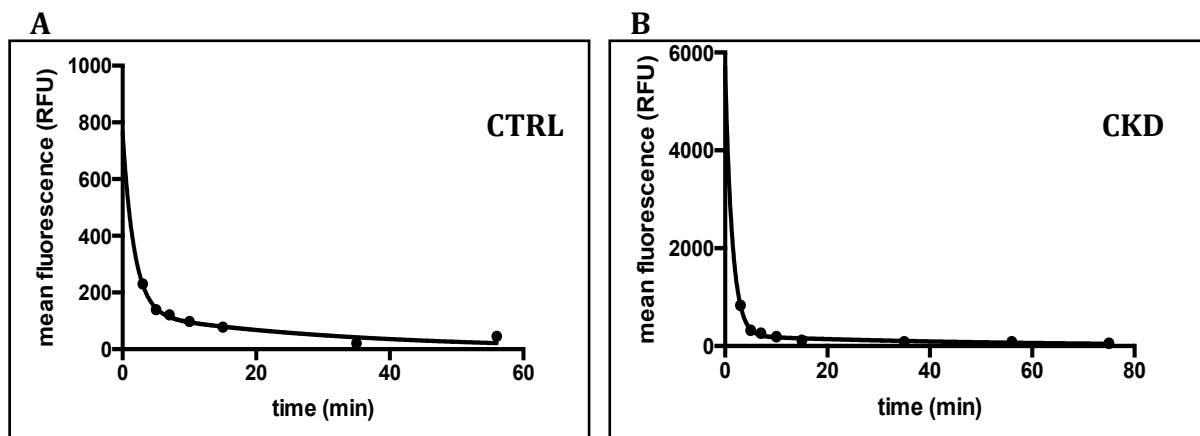


Abbildung 14: Graphische Darstellung der zweiphasigen Zerfallskurve der FITC-Inulin Clearance.

3.4 Veränderte biochemische Parameter bei DBA/2 Mäusen mit CKD

Neben der GFR wurden auch weitere biochemische Parameter wie Phosphat, Calcium und Harnstoff über Blutanalyse bestimmt. Die Analyse zeigte einen signifikanten Anstieg der Harnstoff-Werte in DBA/2 Mäusen mit chronischer Niereninsuffizienz, sowohl in der ersten als auch in der zweiten Experimentreihe. Die Serum Phosphat-Werte wiesen bei beiden Versuchsreihen in der CKD-Gruppe sowie in der CTRL-Gruppe ähnliche Werte auf. In der ersten Experimentreihe zeigten die DBA/2 Mäuse der CKD-Gruppe erhöhte Serum Calcium-Werte auf.

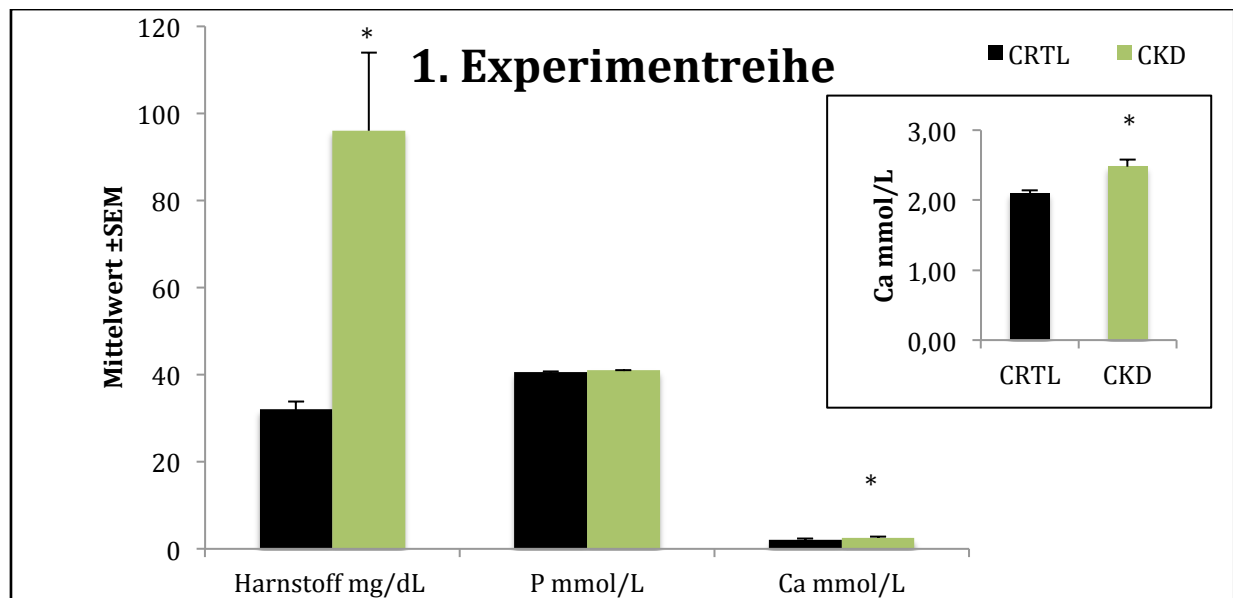


Abbildung 15: Serumwerte von Harnstoff, Phosphat und Calcium nach 18 Tagen.

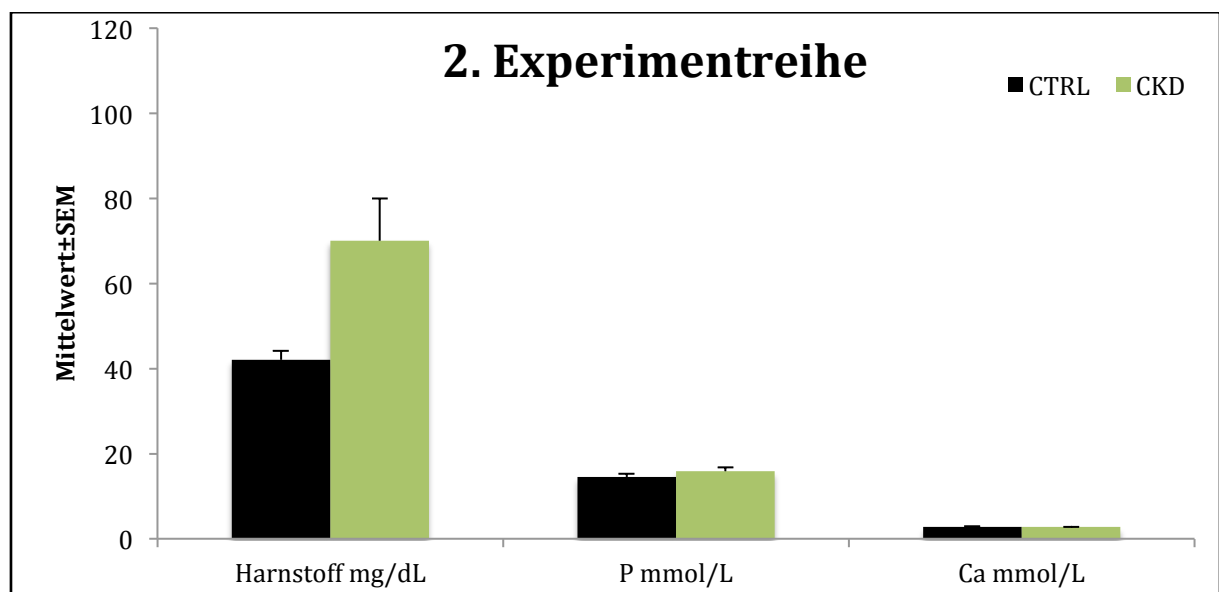


Abbildung 16: Serumwerte von Harnstoff, Phosphat und Calcium nach 88 Tagen.

3.5 Erhöhung der Serumwerte von FGF-23 sowie PTH

Um die Störungen des Mineral- und Knochenstoffwechsels während der chronischen Niereninsuffizienz zu charakterisieren, wurden die klassischen Parameter FGF-23 und PTH mittels ELISA bestimmt.

Die Ergebnisse lieferten eindeutig erhöhte FGF-23 Werte in der CKD-Gruppe im Vergleich zur CTRL-Gruppe. Ebenso zeigten die PTH-Werte eine Tendenz zu steigen, wenn die DBA/2 Mäuse eine chronische Niereninsuffizienz entwickelt hatten. Beide Experimentreihen ließen auf ähnliche Ergebnisse schließen.

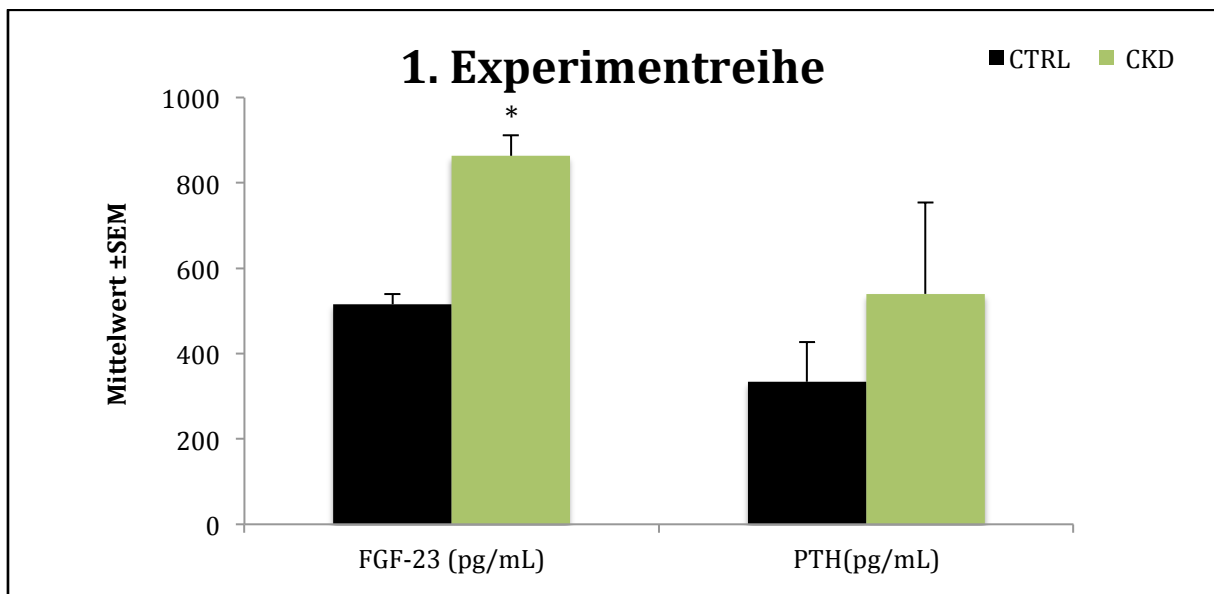


Abbildung 17: Serumwerte von FGF-23 sowie PTH nach 18 Tagen.

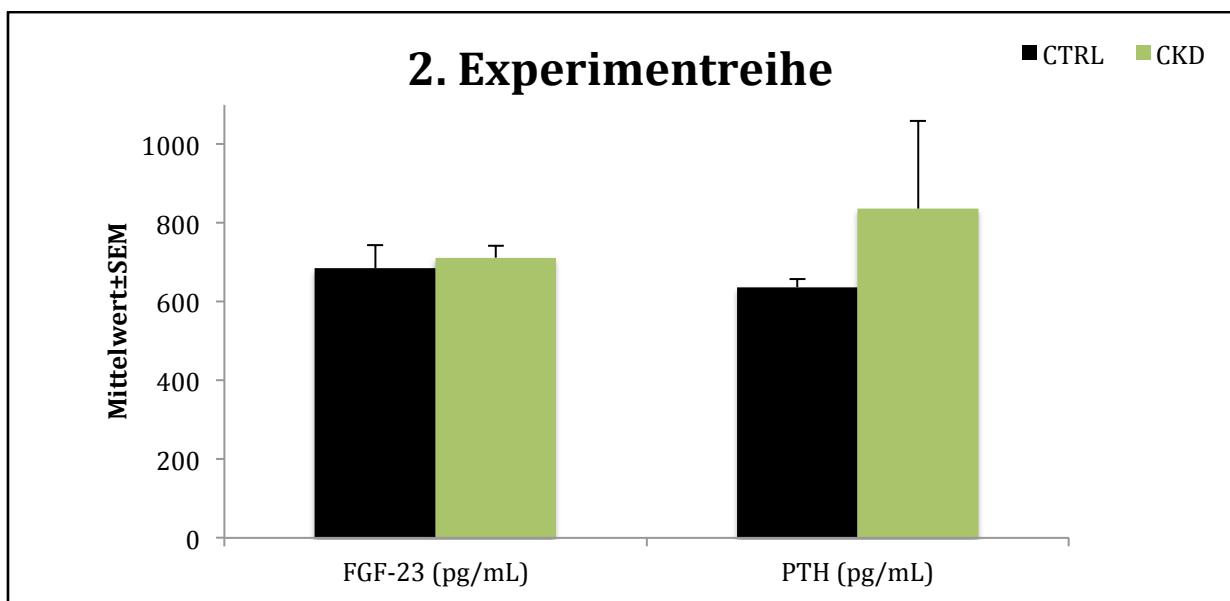


Abbildung 18: Serumwerte von FGF-23 sowie PTH nach 88 Tagen.

3.6 DBA/2 Mäuse der CKD-Gruppe entwickeln eine Knochenanomalie mit niedrigem Knochen-Turnover

Zur Bestimmung der Knochenanomalien wurde ein Calcein-Labeling durchgeführt. Die erhaltenen histologischen Bilder wurden mit Hilfe von OsteoMeasure™ Software ausgewertet. So konnte die Knochenformationsrate (BFR = Bone Formation Rate) sowie die Mineralappositionsrate (MAR = Mineral Apposition Rate) bestimmt werden.

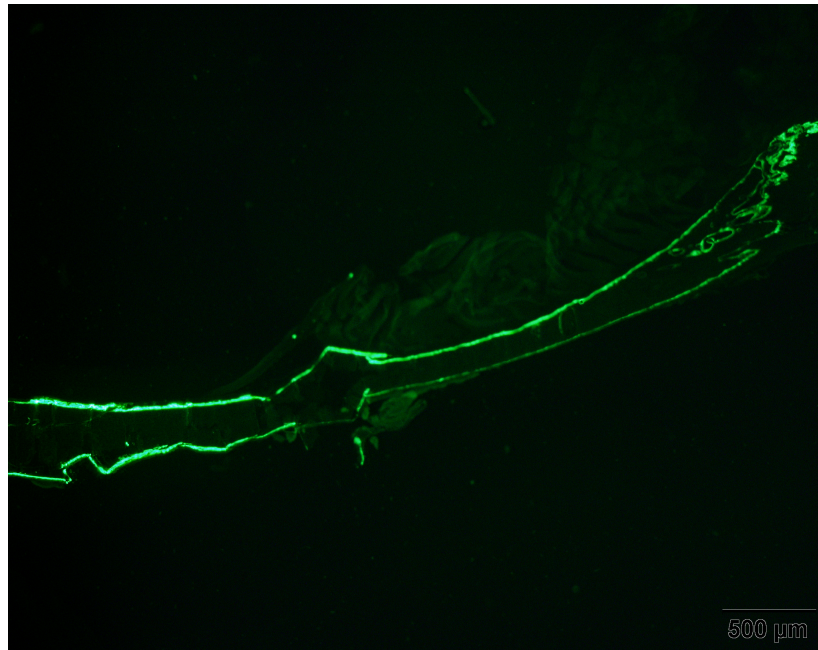


Abbildung 19: Calcein gelabelte Tibia einer CKD-Maus. (40x Vergrößerung)

Die MAR (Abbildung 20) gibt Distanz der zwei Labels dividiert durch die Zeit zwischen den Labels wieder. So gibt die MAR an, inwieweit der neu gebildete Knochen mineralisiert ist.

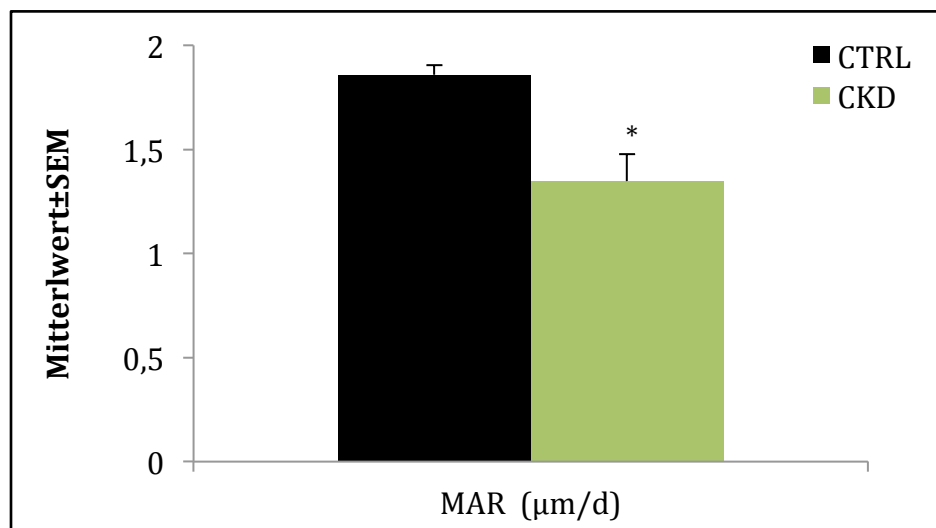


Abbildung 20: Evaluierung der Mineralappositionsrate nach 88 Tagen.

Die BFR multipliziert die MAR mit der Fraktion der Knochenoberfläche, welche gelabelt wurde. Somit ist die BFR ein Maß für die Knochenneubildung pro Zeiteinheit.

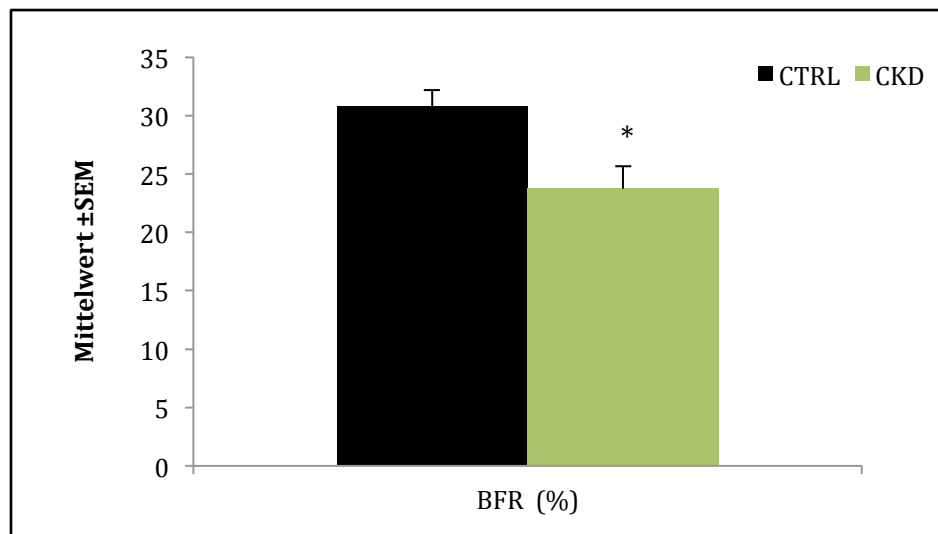


Abbildung 21: Evaluierung der Knochenformationsrate nach 88 Tagen.

Die gesunkenen Werte der MAR sowie der BFR in den DBA/2 Mäusen der CKD-Gruppe deuten darauf hin, dass diese Mäuse eine Störung des Knochenstoffwechsels entwickelt haben. Folglich gehen wir davon aus, dass es sich dabei um eine Anomalie mit erniedrigtem Knochen-Turnover handelt.

4 Diskussion und Conclusio

Die hier vorliegende Masterarbeit beschreibt und charakterisiert ein neues Mausmodell, welches für die Erforschung des CKD-MBD verwendet werden kann.

Das Grundprinzip dieses Modells ist die Verabreichung von Hochphosphat-Futter und die darauffolgende Verkalkung der Niere. Die Ergebnisse zeigen, dass die Niere dadurch in ihrer Funktion eingeschränkt wird und somit sinkt auch die glomeruläre Filtrationsrate von DBA/2 Mäusen auf Hochphosphat-Diät. Diese sogenannte Nephrokalzinose, welche für die chronische Niereninsuffizienz der DBA/2 Mäuse verantwortlich ist, wird außerdem von Entzündungsprozessen begleitet. Diese Prozesse resultieren in einer erhöhten Infiltration von CD4 und CD8 positiven T-Zellen. Die Zellpopulation, welche die Niere am meisten infiltrierte, waren jedoch CD68 positive Makrophagen. Diese waren vor allem in der Grenzzone zwischen Nierenmark und Nierenrinde lokalisiert. In diesem Teil des Nierenparenchyms kommen auch die meisten Calcium- und Phosphatablagerungen vor. So lässt sich daraus schließen, dass die Makrophagen, welche als Fresszellen des Immunsystems bezeichnet werden (108), dort auftraten, um diese Ablagerungen zu beseitigen. Auch auf mRNA Ebene konnte gezeigt werden, dass aufgrund der erhöhten Expression der Makrophagen Marker *Ccr5*, *Ccr2* und *Ccl2*, vor allem Makrophagen eine wesentliche Rolle in diesem Modell spielen. Damit lässt sich zusammenfassend sagen, dass dieses Modell durch einen Makrophagen-Phänotyp, und weniger durch andere infiltrierende Zellen, wie beispielsweise T-Zellen, gekennzeichnet ist.

Eine der wesentlichen Komponenten der CKD-MBD umfasst die Veränderung von biochemischen Parametern im Verlauf der Krankheit (vergl. Kapitel 1.4.1). So sind die erhöhten Harnstoffwerte ein weiteres Indiz für die eingeschränkte Nierenfunktion, da die Niere nicht mehr in der Lage ist ordnungsgemäß alle giftigen Stoffe auszuscheiden. Generell würde man bei einer fortgeschrittenen chronischen Niereninsuffizienz erwarten, dass die Calcium Werte erniedrigt und die Phosphat Werte erhöht sind, wodurch sich auch in weiterer Folge ein sekundärer Hyperparathyroidismus ausbilden kann. In unserem Modell waren jedoch die Phosphat Werte sowohl in der CKD-Gruppe als auch in der CTRL-Gruppe in etwa gleich hoch. Dies lässt sich dadurch erklären, dass sich frühe Störungen des Phosphathaushaltes häufig oft nicht in veränderten Serum-

Phosphat Werten, sondern in erhöhten FGF-23 Werten widerspiegeln (109) (110) (111). FGF-23 ist ein Hormon, welches die Serum-Phosphat Werte senkt (112) (113) und somit für ein normales Phosphatgleichgewicht sorgt, auch wenn die Nierenfunktion bereits eingeschränkt ist. (109) (114) (115) (116)

PTH stimuliert die Freisetzung von Calcium aus den Knochen und folglich sind die erhöhten PTH-Werte auf ein negatives Calcium Gleichgewicht zurückzuführen. (117) In der ersten Experimentreihe waren die Serum-Calcium Werte in der CKD-Gruppe verglichen mit der CTRL-Gruppe jedoch erhöht. Dies könnte möglicherweise bereits als eine Folgereaktion der erhöhten PTH-Werte interpretiert werden.

In der zweiten Experimentreihe waren die Calcium-Werte in der CKD-Gruppe vergleichbar mit der CTRL-Gruppe. Hier zeigten auch die FGF-23 sowie die PTH Werte lediglich die Tendenz erhöht zu sein. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass sich die DBA/2 Mäuse der CKD-Gruppe innerhalb des längeren Beobachtungszeitraums von 88 Tagen bereits etwas erholt hatten und die Nierenschädigung nicht so ausgeprägt war, wie in der ersten Experimentreihe.

Jedoch hatten die veränderten biochemischen Parameter bereits einen Einfluss auf den Knochenstoffwechsel. Die histologischen Untersuchungen ergaben eine erniedrigte BFR und MAR. Somit wiesen die Mäuse der CKD-Gruppe eine eingeschränkte Knochenneubildung und auch eine verminderte Mineralisation des Knochens auf. Diese Resultate zeigen, dass die DBA/2 Mäuse eine Knochenanomalie mit niedrigem Knochen-Turnover entwickelt haben. Da vor allem die sogenannte Osteomalazie durch einen niedrigen Knochen-Turnover sowie durch eine defekte Knochenmineralisation gekennzeichnet wird (118), weisen die DBA/2 Mäuse möglicherweise dieses Krankheitsbild auf.

Berücksichtigt man alle Komponenten wird hier ein Modell präsentiert, welches viele Kennzeichen und Charakteristika des humanen Erscheinungsbilds der CKD-MBD berücksichtigt und widerspiegelt. Ein weiteres sehr wichtiges Merkmal ist die vaskuläre Kalzifikation, welche eine bedeutende Rolle im Verlauf der chronischen Niereninsuffizienz spielt. Aus diesem Grund wird in der zukünftigen Weiterentwicklung dieses Modelles die Erforschung sowie Untersuchung der Gefäß- und Weichteilverkalkung in den Fokus gerückt. Jedoch bietet dieses neue Mausmodell bereits jetzt die Möglichkeit pathogene sowie allgemeine endokrine und metabolische

Faktoren der CKD-MBD zu untersuchen, wobei es von Vorteil ist, dass es keiner chirurgischen Eingriffe bedarf.

5 Literaturverzeichnis

1. Eknoyan G, Lameire N, Barsoum R, Eckardt KU, Levin A, Levin N, Locatelli F, MacLeod A, Vanholder R, Walker R, Wang H. The burden of kidney disease: improving global outcomes. *Kidney Int.* 2004 Oct;66(4):1310-4.
2. Lysaght MJ. Maintenance dialysis population dynamics: current trends and long-term implications. *J Am Soc Nephrol.* 2002 Jan;13 Suppl 1:S37-40.
3. Levey AS, Atkins R, Coresh J, Cohen EP, Collins AJ, Eckhardt K-U, et al. Chronic kidney disease as a global public health problem: approaches and initiatives - a position statement from Kidney Disease Improving Global Outcomes. *Kidney International.* 2007;72:247-25.
4. Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu CY. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med.* 2004 Sep 23;351(13):1296-305.
5. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD-MBD Work Group. KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of chronic kidney disease-mineral and bone disorder (CKD-MBD). *Kidney International* 2009; 76 (Suppl 113): S1-S130.
6. Gorodetskaya I, Zenios S, McCulloch CE, Bostrom A, Hsu CY, Bindman AB, Go AS, Chertow GM. Health-related quality of life and estimates of utility in chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2005 Dec;68(6):2801-8.
7. Kimmel PL, Patel SS. Quality of life in patients with chronic kidney disease: focus on end-stage renal disease treated with hemodialysis. *Semin Nephrol.* 2006 Jan;26(1):68-79.
8. Smith DH1, Gullion CM, Nichols G, Keith DS, Brown JB. Cost of medical care for chronic kidney disease and comorbidity among enrollees in a large HMO population. *J Am Soc Nephrol.* 2004 May;15(5):1300-6.
9. Fritsch H, Kühnel W. Taschenatlas Anatomie, Band 2 Innere Organe. 10. überarbeitete und erweiterte Ausgabe. Stuttgart: Georg Thieme KG, 2009; 232-239.
10. Lüllmann-Rauch R. Taschenlehrbuch Histologie. 3. vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart: Georg Thieme KG, 2009; 443-463.
11. Hartmann M, Pabst MA, Dohr G. Zytologie, Histologie und Mikroskopische Anatomie. Licht- und elektronenmikroskopischer Bildatlas. 5. überarbeitete Auflage. Wien: Facultas Verlags- und Buchhandels AG, 2011; 83-87.
12. Silbernagl S, Despopoulos A. Taschenatlas Physiologie. 8. überarbeitete und erweiterte Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, 2012; 156-197.
13. Klinker R, Pape HC, Kurtz A, Silbernagl S (Hrsg.). Physiologie. 6. vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart: Georg Thieme KG, 2010; 329-383.
14. Keller C, Geberth S. Praxis der Nephrologie. 3. vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage, Berlin: Springer Verlag GmbH, 2010; 30-32.
15. Kuhlmann U, Böhler J, Luft FC, Alscher DM, Kunzendorf U (Hrsg.). Nephrologie. Pathophysiologie-Klinik-Nierenersatzverfahren. 6. vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage. Stuttgart: Georg Thieme KG, 2015; 37-39.
16. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney inter., Suppl.* 2013; 3: 1-150.
17. Saran R, Li Y, Robinson B, et al. US Renal Data System 2014 Annual Data Report:

- Epidemiology of Kidney Disease in the United States. *Am J Kidney Dis.* 2015 Jun;65(6 Suppl 1):A7.
18. Weiner DE. Public health consequences of chronic kidney disease. *Clin Pharmacol Ther.* 2009 Nov;86(5):566-9.
 19. Abboud H, Henrich WL. Clinical practice. Stage IV chronic kidney disease. *N Engl J Med.* 2010 Jan 7;362(1):56-65.
 20. Kramar R. Österreichisches Dialyse- und Transplantationsregister. Nierenersatztherapie in Österreich Jahresbericht 2013. Arbeitsgemeinschaft Österreichisches Dialyse- und Transplantationregister; 2015.
 21. Tonelli M, Wiebe N, Culleton B, House A, Rabbat C, Fok M, McAlister F, Garg AX. Chronic Kidney Disease and Mortality Risk: A Systematic Review. *J Am Soc Nephrol.* 2006 Jul;17(7):2034-47.
 22. Levey AS, Eckardt K-U, Tsukamoto Y, Levin A, Coresh J, Rossert J, et al. Definition and classification of chronic kidney disease: A position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int.* 2005 Jun;67(6):2089-100.
 23. Levey AS, Schoolwerth AC, Burrows NR, Williams DE, Stith KR, McClellan W, et al. Comprehensive public health strategies for preventing the development, progression, and complications of CKD: report of an expert panel convened by the Centers for Disease Control and Prevention. *Am J Kidney Dis.* 2009 Mar;53(3):522-35.
 24. Rubinger D, Backenroth R, Sapoznikov D. Sympathetic activation and baroreflex function during intradialytic hypertensive episodes. *PLoS ONE.* 71;2012 May;7(5).
 25. Chazot C, Jean G. Intradialytic Hypertension: It Is Time to Act. *Nephron Clin Pract.* 2010;115(3).
 26. Locatelli F, Marcelli DI, Conte F et al. Cardiovascular disease in chronic renal failure: the challenge continues. *Nephrol Dial Transplant.* 2000;15 [Suppl 5]: 69-80.
 27. Briet M, Burns KD. Chronic kidney disease and vascular remodelling: molecular mechanisms and clinical implications. *Clin Sci.* 2012 Oct;123(7):399-416.
 28. Elsayed EF, Tighiouart H, Griffith J, Kurth T, Levey AS, Salem D, et al. Cardiovascular disease and subsequent kidney disease. *Archives of internal medicine.* 2007 June;167(11):1130-6.
 29. Kuhlmann U, Böhrer J, Luft FC, Alscher DM, Kunzendorf U (Hrsg.). *Nephrologie. Pathophysiologie-Klinik-Nierenersatzverfahren.* 6. vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage. Stuttgart: Georg Thieme KG, 2015; 408-417.
 30. Fishbane S. Anemia and cardiovascular risk in the patient with kidney disease. *Heart Fail Clin.* 2008 Oct;4(4):401-10.
 31. Mezzano D, Tagle R, Panes O, Pérez M, Downey P, Muñoz B, et al. Hemostatic disorder of uremia: the platelet defect, main determinant of the prolonged bleeding time, is correlated with indices of activation of coagulation and fibrinolysis. *Thromb Haemost.* 1996 Sep;76(3):312-21.
 32. Kuhlmann U, Böhrer J, Luft FC, Alscher DM, Kunzendorf U (Hrsg.). *Nephrologie. Pathophysiologie-Klinik-Nierenersatzverfahren.* 6. vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage. Stuttgart: Georg Thieme KG, 2015; 389-392.
 33. Granata S, Zaza G, Simone S, Villani G, Latorre D, Pontrelli P, Carella M, Schena FP, Grandaliano G, Pertosa G. Mitochondrial dysregulation and oxidative stress in patients with chronic kidney disease. *BMC Genomics.* 2009 Aug;10:388.

34. Himmelfarb J. Uremic toxicity, oxidative stress, and hemodialysis as renal replacement therapy. *Semin Dial.* 2009 Nov;22(6):636–43.
35. Khatri M, Nickolas T, Moon YP, Paik MC, Rundek T, Elkind MS, Sacco RL, Wright CB. CKD associates with cognitive decline. *J Am Soc Nephrol.* 2009 Nov;20(11):2427-32.
36. Kato S, Chmielewski M, Honda H, Pecoits-Filho R, Matsuo S, Yuzawa Y, Tranaeus A, Stenvinkel P, Lindholm B. Aspects of immune dysfunction in end-stage renal disease. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008 Sep;3(5):1526-33.
37. Nusair MB, Rajpurohit N, Alpert MA. Chronic Inflammation and Coronary Atherosclerosis in Patients with End-Stage Renal Disease. *Cardiorenal Med.* 2012 May;2(2):117–24.
38. Moe S, Drueke T, Cunningham J, Goodman W, Martin K, Olgaard K et al. Definition, evaluation, and classification of renal osteodystrophy: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int* 2006;69:1945–1953.
39. Nigwekar SU, Tame H, Thadhani RI. Vitamin D and chronic kidney disease–mineral bone disease (CKD–MBD). *BoneKEY Reports* 3. 2014 Feb; article number 498.
40. Mejía N, Roman-García P, Miar AB, Tavira B, Cannata-Andía JB. Chronic kidney disease-mineral and bone disorder: a complex scenario. *Nefrologia.* 2011;31(5):514-9.
41. Cunningham J, Locatelli F, Rodriguez M. Secondary hyperparathyroidism: pathogenesis, disease progression, and therapeutic options. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2011 Apr;6(4):913-21.
42. Murer H HNFIBJ. Proximal tubular phosphate reabsorption: molecular mechanisms. *Physiol Rev.* 2000 Jan; 80: 1373–1409.
43. Prié D, Ureña Torres P, Friedlander G. Latest findings in phosphate homeostasis. *Kidney Int.* 2009 May;75(9):882–9.
44. Rassow J, Deutzmann R, Netzker R, Hauser K. *Duale Reihe Biochemie. 3. Auflage.* Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, 2012; 626.
45. Rassow J, Deutzmann R, Netzker R, Hauser K. *Duale Reihe Biochemie. 3. Auflage.* Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, 2012; 623.
46. Jamal SA, West SL, Miller PD. Fracture risk assessment in patients with chronic kidney disease. *Osteoporos Int.* 2012 Apr;23(4):1191-8.
47. Lindberg JS, Moe SM. Introduction. *Renal osteodystrophy. Semin Nephrol.* 2004 Jan;24(1):1-2.
48. Lindberg JS, Moe SM. Osteoporosis in end-state renal disease. *Semin Nephrol.* 1999 Mar;19(2):115-22.
49. Alem AM, Sherrard DJ, Gillen DL, Weiss NS, Beresford SA, Heckbert SR, Wong C, Stehman-Breen C. Increased risk of hip fracture among patients with end-stage renal disease. *Kidney Int.* 2000 Jul;58(1):396-9.
50. Dooley AC, Weiss NS, Kestenbaum B. Increased risk of hip fracture among men with CKD. *Am J Kidney Dis.* 2008 Jan;51(1):38-44.
51. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res.* 1987 Dec;2(6):595-610.
52. Martin KJ, Olgaard K, Coburn JW, Coen GM, Fukagawa M, Langman C, Malluche HH,

- McCarthy JT, Massry SG, Mehls O, Salusky IB, Silver JM, Smogorzewski MT, Slatopolsky EM, McCann L; Bone Turnover Work Group. Diagnosis, assessment, and treatment of bone turnover abnormalities in renal osteodystrophy. *Am J Kidney Dis.* 2004 Mar;43(3):558-65.
53. Sherrard DJ, Hercz G, Pei Y, Maloney NA, Greenwood C, Manuel A, Saiphoo C, Fenton SS, Segre GV. The spectrum of bone disease in end-stage renal failure--an evolving disorder. *Kidney Int.* 1993 Feb;43(2):436-42.
54. Leslie WD, Lix LM; Manitoba Bone Density Program. Absolute fracture risk assessment using lumbar spine and femoral neck bone density measurements: derivation and validation of a hybrid system. *J Bone Miner Res.* 2011 Mar;26(3):460-7.
55. Fahrleitner-Pammer A. Die renale Osteodystrophie ist keine Osteoporose! *Journal für Mineralstoffwechsel* 2014; 21 (1), 25-28.
56. Elsayed EF, Tighiouart H, Griffith J, Kurth T, Levey AS, Salem D, et al. Cardiovascular disease and subsequent kidney disease. *Archives of internal medicine.* 2007 Jun 11;167(11):1130-6.
57. Sarnak MJ, Levey AS, Schoolwerth AC, Coresh J, Culleton B, Hamm LL, et al. Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and 44 Epidemiology and Prevention. *Hypertension.* 2003 Nov;42(5):1050-65.
58. Foley RN, Parfrey PS. Cardiovascular disease and mortality in ESRD. *J Nephrol.* 1998 Sep-Oct;11(5):239-45.
59. Block GA, Klassen PS, Lazarus JM, Ofsthun N, Lowrie EG, Chertow GM. Mineral metabolism, mortality, and morbidity in maintenance hemodialysis. *J Am Soc Nephrol.* 2004 Aug;15(8):2208-18.
60. Kalantar-Zadeh K, Kuwae N, Regidor DL, Kovesdy CP, Kilpatrick RD, Shinaberger CS, McAllister CJ, Budoff MJ, Salusky IB, Kopple JD. Survival predictability of time-varying indicators of bone disease in maintenance hemodialysis patients. *Kidney Int.* 2006 Aug;70(4):771-80.
61. Kestenbaum B, Sampson JN, Rudser KD, Patterson DJ, Seliger SL, Young B, Sherrard DJ, Andress DL. Serum phosphate levels and mortality risk among people with chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2005 Feb;16(2):520-8.
62. Kestenbaum BR, Adeney KL, de Boer IH, Ix JH, Shlipak MG, Siscovick DS. Incidence and progression of coronary calcification in chronic kidney disease: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Kidney international.* 2009 Nov;76(9):991-8.
63. Goodman WG, London G, Amann K, Block GA, Giachelli C, Hruska KA, et al. Vascular calcification in chronic kidney disease. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation.* 2004 Mar;43(3):572-9.
64. London GM, Guerin AP, Marchais SJ, Métivier F, Pannier B, Adda H. Arterial media calcification in end-stage renal disease: impact on all-cause and cardiovascular mortality. *Nephrol Dial Transplant.* 2003 Jun;18:1731-1740.
65. Noordzij M, Cranenburg EM, Engelsman LF, et al. Progression of aortic calcification is associated with disorders of mineral metabolism and mortality in chronic dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2011 Aug ;26:1662-1669.
66. Schoppet M, Shroff RC, Hofbauer LC, Shanahan CM. Exploring the biology of vascular calcification in chronic kidney disease: What's circulating?. *Kidney*

- International 2008 Nov; (73)384–390.
67. Moe SH, Chen NX. Mechanisms of Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol*. 2008 Feb;19(2):213-6.
 68. Moe SM, Drüeke T, Lameire N, Eknoyan G. Chronic kidney disease-mineral-bone disorder: a new paradigm. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2007 Jan;14(1):3-12.
 69. Giachelli CM, Jono S, Shioi A, Nishizawa Y, Mori K, Morii H. Vascular calcification and inorganic phosphate. *Am J Kidney Dis*. 2001 Oct;38(4 Suppl 1):S34-7.
 70. Massy ZA, Drüeke TB. Magnesium and outcomes in patients with chronic kidney disease: focus on vascular calcification, atherosclerosis and survival. *Clin Kidney J*. 2012; 5(Suppl 1): 52–61.
 71. Shroff RC, McNair R, Skepper JN, Figg N, Schurgers LJ, Deanfield J, Rees L, Shanahan CM. Chronic Mineral Dysregulation Promotes Vascular Smooth Muscle Cell Adaptation and Extracellular Matrix Calcification. *J Am Soc Nephrol*. 2010 Jan;21(1):103-12.
 72. Tentori F, Blayney MJ, Albert JM, Gillespie BW, Kerr PG, Bommer J, Young EW, Akizawa T, Akiba T, Pisoni RL, Robinson BM, Port FK. Mortality risk for dialysis patients with different levels of serum calcium, phosphorus, and PTH: the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study (DOPPS). *Am J Kidney Dis*. 2008 Sep;52(3):519-30.
 73. Block GA, Hulbert-Shearon TE, Levin NW, Port FK. Association of serum phosphorus and calcium x phosphate product with mortality risk in chronic hemodialysis patients: a national study. *Am J Kidney Dis*. 1998 Apr;31(4):607-17.
 74. Dunn S, Vohra RS, Murphy JE, Homer-Vanniasinkam S, Walker JH, Ponnambalam S. The lectin-like oxidized low-density-lipoprotein receptor: a pro-inflammatory factor in vascular disease. *Biochem J*. 2008 Jan 15;409(2):349-55.
 75. Young IS, McEneny J. Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochem Soc Trans*. 2001 May;29(Pt 2):358-62.
 76. Gaut JP, Heinecke JW. Mechanisms for oxidizing low-density lipoprotein. Insights from patterns of oxidation products in the artery wall and from mouse models of atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med*. 2001 Apr-May;11(3-4):103-12.
 77. Zebger-Gong H, Müller D, Diercke M, Haffner D, Hocher B, Verberckmoes S, Schmidt S, D'Haese PC, Querfeld U. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-induced aortic calcifications in experimental uremia: up-regulation of osteoblast markers, calcium-transporting proteins and osterix. *J Hypertens*. 2011 Feb;29(2):339-48.
 78. Shroff R, Egerton M, Bridel M, Shah V, Donald AE, Cole TJ, Hiorns MP, Deanfield JE, Rees L. A Bimodal Association of Vitamin D Levels and Vascular Disease in Children on Dialysis. *J Am Soc Nephrol*. 2008 Jun;19(6):1239-46.
 79. Aikawa E, Nahrendorf M, Figueiredo JL, Swirski FK, Shtatland T, Kohler RH, Jaffer FA, Aikawa M, Weissleder R. Osteogenesis associates with inflammation in early-stage atherosclerosis evaluated by molecular imaging in vivo. *Circulation*. 2007 Dec 11;116(24):2841-50.
 80. Doherty TM, Asotra K, Fitzpatrick LA, Qiao JH, Wilkin DJ, Detrano RC, Dunstan CR, Shah PK, Rajavashisth TB. Calcification in atherosclerosis: bone biology and chronic inflammation at the arterial crossroads. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Sep 30;100(20):11201-6.
 81. Lomashvili KA, Cobbs S, Hennigar RA, Hardcastle KI, O'Neill WC. Phosphate-Induced Vascular Calcification: Role of Pyrophosphate and Osteopontin. *J Am Soc*

- Nephrol. 2004 Jun;15(6):1392-401.
82. Lomashvili KA, Garg P, Narisawa S, Millan JL, O'Neill WC. Upregulation of alkaline phosphatase and pyrophosphate hydrolysis: potential mechanism for uremic vascular calcification. *Kidney Int.* 2008 May;73(9):1024-30.
 83. Russell RG, Bisaz S, Fleisch H. Pyrophosphate and diphosphonates in calcium metabolism and their possible role in renal failure. *Arch Intern Med.* 1969 Nov;124(5):571-7.
 84. JL M. Can biological calcification occur in the presence of pyrophosphate? *Arch Biochem Biophys.* 1984 May 15;231(1):1-8.
 85. Reynolds JL, Skepper JN, McNair R, Kasama T, Gupta K, Weissberg PL, Jahnen-Dechent W, Shanahan CM. Multifunctional roles for serum protein fetuin-a in inhibition of human vascular smooth muscle cell calcification. *J Am Soc Nephrol.* 2005 Oct;16(10):2920-30.
 86. Schafer C, Heiss A, Schwarz A, Westenfeld R, Ketteler M, Floege J, Muller-Esterl W, Schinke T, Jahnen-Dechent W. The serum protein alpha 2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is a systemically acting inhibitor of ectopic calcification. *J Clin Invest.* 2003 Aug;112(3):357-66.
 87. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, Scully S, Tan HL, Xu W, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS. osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev.* 1998 May 1;12(9):1260-8.
 88. Hu MC, Shi M, Zhang J, Quiñones H, Griffith C, Kuro-o M, Moe OW. Klotho deficiency causes vascular calcification in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2011 Jan;22(1):124-36.
 89. Kiattisunthorn K, Moe SM. Chronic kidney disease-mineral bone disorder (CKD-MBD). *IBMS BoneKEy.* 2010 Dec; (7):447-457.
 90. Cozzolino M, Brancaccio D, Gallieni M, Slatopolsky E. Pathogenesis of vascular calcification in chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2005 Aug;68(2):429-36.
 91. Eaton GJ, Custer RP, Johnson FN, Stabenow KT. Dystrophic cardiac calcinosis in mice:genetic, hormonal, and dietary influences. *Am J Pathol.* 1987;90:173-186.
 92. Berndt A, Li Q, Potter CS, Liang Y, Silva KA, Kennedy V, Uitto J, Sundberg JP. A single-nucleotide polymorphism in the *abcc6* gene associates with connective tissue mineralization in mice similar to targeted models for pseudoxanthoma elasticum. *J Invest Dermatol.* 2013;133:833-836.
 93. Kirsch AH, Smaczny N, Riegelbauer V, Sedej S, Hofmeister A, Stojakovic T, Goessler W, Brodmann M, Pilger E, Rosenkranz AR, Eller K, Eller P. Regulatory T Cells Improve Nephrocalcinosis but Not Dystrophic Cardiac Calcinosis in DBA/2 mice. *Am J Pathol.* 2013;183:382-390.
 94. Gorgels TG, Hu X, Scheffer GL, van der Wal AC, Toonstra J, de Jong PT, van Kuppevelt TH, Levelt CN, de Wolf A, Loves WJ, Scheper RJ, Peek R, Bergen AA. Disruption of *Abcc6* in the mouse: novel insight in the pathogenesis of pseudoxanthoma elasticum. *Hum Mol Genet.* 2005;14:1763-1773.
 95. Meng H, Vera I, Che N, Wang X, Wang SS, Ingram-Drake L, Schadt EE, Drake TA, Lusk AJ. Identification of *Abcc6* as the major causal gene for dystrophic cardiac calcification in mice through integrative genomics. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104:4530-4535.
 96. Jiang Q, Oldenburg R, Otsuru S, Grand-Pierre AE, Horwitz EM, Uitto J. Parabolic heterozygous pairing of *Abcc6*^{-/-}/*Rag1*^{-/-} mice and their wild-type counterparts

- halts ectopic mineralization in a murine model of pseudoxanthoma elasticum. *Am J Pathol.* 2010;176: 1855-1862.
97. Pfendner EG, Vanakker OM, Terry SF, Vourthis S, McAndrew PE, McClain MR, Fratta S, Marais A, Hariri S, Coucke PJ, Ramsay M, Viljoen D, Terry PF, de Paepe A, Uitto J, Bercovitch LG. Mutation detection in the ABCC6 gene and genotype-phenotype analysis in a large international case series affected by pseudoxanthoma elasticum. *J Med Genet.* 2007;44:621-628.
 98. Le Saux O, Fulop K, Yamaguchi Y, Ilias A, Szabo Z, Brampton CN, Pomozi V, Huszar K, Aranyi T, Varadi A. Expression and in vivo rescue of human ABCC6 disease-causing mutants in mouse liver. *PLoS One.* 2011;6:e24738.
 99. El-Abbadi MM, Pai AS, Leaf EM, Yang HY, Bartley BA, Quan KK, Ingalls CM, Liao HW, Giachelli CM. Phosphate feeding induces arterial medial calcification in uremic mice: role of serum phosphorus, fibroblast growth factor-23, and osteopontin. *Kidney Int.* 2009;75:1297-1307.
 100. Qiao JH, Fischbein MC, Demer LL, Lusic AJ. Genetic determination of cartilaginous metaplasia in mouse aorta. *Arterioscl Vasc Biol.* 1995;15:2265-2272.
 101. Eller P, Eller K, Kirsch AH, Patsch JJ, Wolf AM, Tagwerker A, Stanzl U, Kaindl R, Kahlenberg V, Mayer G, Patsch JR, Rosenkranz AR. A murine model of phosphate nephropathy. *Am J Pathol.* 2011;178:1999-2006.
 102. Markowitz GS, Nasar SH, Klein P, Anderson H, Stack JI, Alterman L, Price B, Radhakrishnan J, D'Agati VD. Renal failure due to acute nephrocalcinosis following oral sodium phosphate bowel cleansing. *Hum Pathol.* 2004;35:675-684.
 103. Markowitz GS, Stokes MB, Radhakrishnan J, D'Agati VD. Acute phosphate nephropathy following oral sodium phosphate bowel purgative: an underrecognized cause of chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 2005; 16:3389-3396.
 104. Lüllmann-Rauch R. Taschenlehrbuch Histologie. 3rd ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, 2003; 599.
 105. Bratthauer GL. The Avidin-Biotin Complex (ABC) Method and Other Avidin-Biotin Binding Methods. In LC J, editor. *Immunocytochemical Methods and Protocols.* 2nd ed. Totowa: Human Press Inc, 1999; 203-214.
 106. Hsu Sm, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem.* 1981;4:577-80.
 107. Rieg T. High-throughput Method for Measurement of Glomerular Filtration Rate in Conscious Mice. *J. Vis. 2013. Exp. (75), e50330, doi:10.3791/50330.*
 108. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology.* eight edition, Philadelphia: Elsevier Saunders; 2014: 51-84.
 109. Isakova T, Wahl P, Vargas GS, Gutiérrez OM, Scialla J, Xie H, Appleby D, Nessel L, Bellovich K, Chen J, Hamm L, Gadegbeku C, Horwitz E, Townsend RR, Anderson CA, Lash JP, Hsu CY, Leonard MB, Wolf M. Fibroblast growth factor 23 is elevated before parathyroid hormone and phosphate in chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2011 Jun;79(12):1370-8.
 110. Hill KM, Martin BR, Wastney ME, McCabe GP, Moe SM, Weaver CM, Peacock M. Oral calcium carbonate affects calcium but not phosphorus balance in stage 3-4 chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2013 May;83(5):959-66.
 111. Hasegawa H, Nagano N, Urakawa I, Yamazaki Y, Iijima K, Fujita T, Yamashita T,

- Fukumoto S, Shimada T. Direct evidence for a causative role of FGF23 in the abnormal renal phosphate handling and vitamin D metabolism in rats with early-stage chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2010 Nov;78(10):975-80.
112. Quarles LD. Endocrine functions of bone in mineral metabolism regulation. *J Clin Invest.* 2008 Dec;118(12):3820-8.
113. Fukumoto S, Martin TJ. Bone as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab.* 2009 Jul;20(5):230-6.
114. Shigematsu T, Kazama JJ, Yamashita T, Fukumoto S, Hosoya T, Gejyo F, Fukagawa M. Possible involvement of circulating fibroblast growth factor 23 in the development of secondary hyperparathyroidism associated with renal insufficiency. *Am J Kidney Dis.* 2004 Aug;44(2):250-6.
115. Gutierrez O, Isakova T, Rhee E, Shah A, Holmes J, Collerone G, Jüppner H, Wolf M. Fibroblast growth factor-23 mitigates hyperphosphatemia but accentuates calcitriol deficiency in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2005 Jul;16(7):2205-15.
116. Evenepoel P, Meijers B, Viaene L, Bammens B, Claes K, Kuypers D, Vanderschueren D, Vanrenterghem Y. Fibroblast growth factor-23 in early chronic kidney disease: additional support in favor of a phosphate-centric paradigm for the pathogenesis of secondary hyperparathyroidism. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2010 Jul;5(7):1268-76.
117. Craver L, Marco MP, Martínez I, Rue M, Borràs M, Martín ML, Sarró F, Valdivielso JM, Fernández E. Mineral metabolism parameters throughout chronic kidney disease stages 1-5--achievement of K/DOQI target ranges. *Nephrol Dial Transplant.* 2007 Apr;22(4):1171-6.
118. Martin KJ, González EA. Metabolic bone disease in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2007 Mar;18(3):875-85.