Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV der Ludwig-Maximilians-Universität München Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

Immundysfunktion bei chronischer Nierenerkrankung Welchen Einfluss hat die bakterielle Darmflora?

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanmedizin an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

> vorgelegt von Lukas Alfons Konrad aus Würzburg

> > 2020

II

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Hans-Joachim Anders
Mitberichterstatter:	PD Dr. Andreas Wieser
	PD Dr. Bärbel Lange-Sperandio
	PD Dr. Torsten Olszak

Mitbetreuung durch die	
promovierte Mitarbeiterin:	Dr. med. vet. Kirstin Andersen
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	21.04.2020

Die vorliegende Arbeit wurde von November 2013 bis Juli 2015 im "Nephrologischen Zentrum" der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV des Klinikums der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt. Betreut wurde die Arbeit durch Herrn Prof. Dr. med. Hans-Joachim Anders und Frau Dr. med. vet. Kirstin Andersen.

Förderung des Projekts

Diese Arbeit wurde im Rahmen des Promotionsstudiums "Systembiologische Medizin" durch das Förderprogramm für Forschung und Lehre (FöFoLe) der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München ideell und finanziell unterstützt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden regelmäßig im wöchentlichen Seminar der Arbeitsgruppen Prof. Dr. med. Anders und PD Dr. med. Vielhauer sowie im Statusseminar des FöFoLe-Programms, 1. - 3. Mai 2015 in Herrsching, präsentiert.

Teile der Arbeit wurden unter dem Titel "The gut flora modulates intestinal barrier integrity but not progression of chronic kidney disease in hyperoxaluria-related nephrocalcinosis" in *Nephrology Dialysis Transplantation* (NDT) veröffentlicht.

Erklärung: Alle in dieser Arbeit aufgeführten Methoden habe ich alleine oder unter Anleitung durch Frau Dr. med. vet. Kirstin Andersen durchgeführt. Dies gilt mit Ausnahme der Analyse von hämatologischen und serumchemischen Laborwerten, die durch das Team des Clinical Chemistry Screens der German Mouse Clinic, Neuherberg, unter Leitung von Dr. Birgit Rathkolb durchgeführt wurden, sowie der Anfertigung und Färbung histologischer Schnitte, welche durch die medizinisch-technischen Assistenten Janina Mandelbaum und Dan Draganovic erfolgte.

INHALTSVERZEICHNIS

ABB	ILDU	NGSVERZEICHNIS	VIII
TAB	ELLE	NVERZEICHNIS	IX
1.	Einlei	tung	1
1.1.	Chr	onische Nierenerkrankung	1
1.2.	Imn	nunsvstem	6
1.2	Into	stingles Mikrohiom	14
1.3.	me		14
1.4.	Ziel	setzung und Hypothese	17
2.	Mater	ial und Methoden	20
2.1.	Mat	erial	20
2.2.	Met	hoden	29
2.2	.1.	Mausmodell und experimentelles Design	
2.2	.2.	Probengewinnung und Tierhaltung	
2.2	.3.	Mikrobiologische Kultur aus Faeces und Lebergewebe	
2.2.4. Analyse von Blutbild, Serumelektrolyten und Retentionsparametern			
2.2	.5.	Leukozytendifferenzierung mittels Durchflusszytometrie	
2.2.6. ELISA		ELISA	
2.2	.7.	Murines Albumin in Faecesproben	
2.2	.8.	Sekretorisches Immunglobulin A in intestinalem Mukus	
2.2.9. Weitere kolorimetrische Nachweisverfahren			
2.2	.10.	mRNA Analyse	
2.2	.11.	Histologie	41
2.2	.12.	Anfertigung der Schnitte und Färbung	41
2.2	.13.	Lichtmikroskopische und quantitative Auswertung	
2.2	.14.	Statistik	44
3.	Ergeb	nisse	45
3.1.	Spe	zifische Charakterisierung des diätetischen Oxalatnephropathiemodells	45
3.1	.1.	Oxalatdeposition	
3.1	.2.	Nierenmorphologie	
3.1	.3.	Renale Entzündungsreaktion	50
3.1	.4.	Nierenfunktion	55
3.1	.5.	Dysbiose	60
3.1	.6.	Strukturelle Darmbarriere	

3.	1.7.	Immunreaktion der Darmwand	66	
3.	1.8.	Funktionelle Darmbarriere	69	
3.	1.9.	Immunreaktion in der Leber	71	
3.	1.10.	Systemische Immunreaktion	76	
3.2.	Aus	wirkungen der Antibiotika-Intervention	84	
3.	2.1.	Eradikation der bakteriellen Darmflora	84	
3.	2.2.	Nierenmorphologie und lokale Entzündungsreaktion	85	
3.	2.3.	Nierenfunktion	85	
3.	2.4.	Darmbarriere in Abhängigkeit der Darmflora	89	
3.	2.5.	Hepatische und systemische Inflammation in Abhängigkeit der Darmflora	92	
4.	Diskus	ssion	96	
4.1.	Ist d	ie diätetische Oxalatnephropathie ein geeignetes murines CKD-Modell?	96	
4.2.	Dysl	biose und Darmbarrierestörung: Was ist Henne und was ist Ei?	100	
4.3.	3. Was trägt zur Immundysfunktion bei CKD bei?			
4.4.	Lim	itationen der Studie und Ausblick	107	
5.	Zusam	ımenfassung	110	
6.	Litera	turverzeichnis	111	
7.	Abkür	zungsverzeichnis	120	
8.	Eidess	tattliche Versicherung	121	
9.	Wissenschaftliche Publikationen des Autors122			
10.	Danks	agung	123	

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Kalziumoxalat	3
Abbildung 2: Symptome und Zeichen der Urämie.	5
Abbildung 3: Schlussleistenkomplex und tight junctions	8
Abbildung 4: Immunogenität der bakteriellen Zellwand.	9
Abbildung 5: Mögliche Rolle der Darmflora bei CKD-assoziierter Immundysfunktion	. 19
Abbildung 6: Schema des Versuchsaufbaus des experimentellen Teils 1	. 30
Abbildung 7: Schema des Versuchsaufbaus des experimentellen Teils 2	. 31
Abbildung 8: Ouantitative Auswertung histologischer Aufnahmen mit ImageJ	. 43
Abbildung 9: Ablagerung von Kalziumoxalatkristallen in der Niere (1).	. 46
Abbildung 10: Ablagerung von Kalziumoxalatkristallen in der Niere (2)	47
Abbildung 11: Mikromorphologischer Nierenschaden	48
Abhildung 12: Morphologischer Nierenschaden bleibt nach Beendigung der CKD-Diät"	49
Abhildung 13: Leukozyteninfiltration des Nierengewebes	51
Abhildung 14. Mikroskopie mit Anfärbung CD3-positiver T-Zellen in der Niere	52
Abhildung 15: Mikroskopie mit Anfärbung E4/80-nositiver Makronhagen in der Niere	53
Abbildung 16: Infiltration der Niere mit T-Zellen (A) und Makronhagen (B) in der Histologie	54
Abbildung 17: Zytokinevpression in der Niere	55
Abbildung 17. Eylökmexpression in der Mere.	. 55
Abbildung 10: Hömatologische Parameter	. 57
Abbildung 19: Varianz von Kolonianmarnhologia und anzahl	. 59
Abbildung 20. Varianiz von Kolonichnolphologie und -anzahl	. 01
Abbildung 22: Milreglanigsha Marnhalagia dag Ilaung yar und nach Oyalatdiët	. 02
Abbildung 22. Mikroskopische Morphologie des neums vor und nach Oxalatulat.	. 02
Abbildung 23. Mikioskopie des fiedlis init Analoung von ZO-1.	. 05
Abbildung 24. Expression von <i>ligni-junction</i> -Proteinen im Daim.	. 03
Abbildung 25: Konzentration sekretorischen Immungtobulins A in Heumspulung.	. 00
Abbildung 20: Leukozyteniniitration des fleumgewebes.	. 0/
Abbildung 27: Expression von TNF- α in fleum und Colon.	. 08
Abbildung 28: Murine Albuminkonzentration in den Faeces	. 69
Abbildung 29: Lipopolysaccharidkonzentration im Serum.	. /1
Abbildung 30: Leukozyteninfiltration des Lebergewebes.	. 72
Abbildung 31: Infiltration der Leber mit T-Zellen (A) und Makrophagen (B) in der Histologie	. 73
Abbildung 32: Mikroskopie mit Anfärbung CD3-positiver T-Zellen in der Leber	. 74
Abbildung 33: Mikroskopie mit Anfärbung F4/80-positiver Makrophagen in der Leber	. 75
Abbildung 34: Expression pro-inflammatorischer Zytokine in der Leber	. 76
Abbildung 35: Leukozytenpopulationen im Differentialblutbild.	. 79
Abbildung 36: Leukozyteninfiltration des Milzgewebes	. 80
Abbildung 37: Mikroskopie mit Anfärbung CD3-positiver T-Zellen in der Milz	. 81
Abbildung 38: Mikroskopie mit Anfärbung F4/80-positiver Makrophagen in der Milz	. 82
Abbildung 39: Infiltration der Milz mit T-Zellen (A) und Makrophagen (B) in der Histologie	. 83
Abbildung 40: Expression pro-inflammatorischer Zytokine in der Milz.	. 83
Abbildung 41: Eradikation der Darmflora durch Antibiotikaintervention.	. 84
Abbildung 42: Kalziumoxalat und Morphologie der Niere in Abhängigkeit der Darmflora.	. 86
Abbildung 43: Infiltration des Nierengewebes mit T-Zellen und Makrophagen in Abhängigkeit der	
Darmflora (Histologie - qualitativ).	. 87
Abbildung 44: Mikroskopische Darmbarriere im Ileum in Abhängigkeit der Darmflora	. 90
Abbildung 45: Murines Albumin in den Faeces und Lipopolysaccharid im Serum	. 91
Abbildung 46: Infiltration des Lebergewebes mit T-Zellen und Makrophagen in Abhängigkeit der	
Darmflora (Histologie - qualitativ).	. 93
Abbildung 47: Infiltration des Milzgewebes mit T-Zellen und Makrophagen in Abhängigkeit der	
Darmflora (Histologie - qualitativ).	. 95
Abbildung 48: Vervollständigtes Modell der CKD-assoziierten Immundysfunktion	106

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: CKD-Stadien und Erhöhung des Mortalitätsrisikos durch CKD	1
Tabelle 2: Bakterielle Aktivierung des Immunsystems über Toll-like-Rezeptoren [77]	10
Tabelle 3: Veränderungen des Immunsystems durch CKD	13
Tabelle 4: Tierhaltung	20
Tabelle 5: Geräte und Einmalmaterial	20
Tabelle 6: Kits	22
Tabelle 7: Inhaltsstoffe der verwendeten Diäten	22
Tabelle 8: Medikamente und Reagenzien	23
Tabelle 9: Lösungen	25
Tabelle 10: Antikörper	27
Tabelle 11: Murine Oligonukleotidprimer	27
Tabelle 12: Software	28
Tabelle 13: Übersicht über Proben, Asservierung und Verwendungszweck	32
Tabelle 14: Färbungs-Sets für FACS-Analyse	35
Tabelle 15: Leukozytenpopulationen und dazugehörige Oberflächenantigene [174-176]	36
Tabelle 16: Temperaturprogramm für real-time qPCR	41
Tabelle 17: Zytokinexpression in der Niere in Abhängigkeit der Darmflora	87
Tabelle 18: Infiltration des Nierengewebes mit T-Zellen und Makrophagen in Abhängigkeit der	
Darmflora (Histologie - quantitativ)	87
Tabelle 19: Leukozyteninfiltration des Nierengewebes in Abhängigkeit der Darmflora	88
Tabelle 20: Elektrolyte und Retentionsparametern in Abhängigkeit der Darmflora	88
Tabelle 21: Hämatologische Parameter in Abhängigkeit der Darmflora	88
Tabelle 22: Expression von <i>tight-junction</i> -Proteinen in Abhängigkeit der Darmflora	89
Tabelle 23: Zytokinexpression im Darm in Abhängigkeit der Darmflora	89
Tabelle 24: Leukozyteninfiltration des Ileumgewebes in Abhängigkeit der Darmflora	91
Tabelle 25: Zytokinexpression in der Leber in Abhängigkeit der Darmflora	92
Tabelle 26: Infiltration des Lebergewebes mit T-Zellen und Makrophagen in Abhängigkeit der	
Darmflora (Histologie - quantitativ)	92
Tabelle 27: Leukozyteninfiltration des Lebergewebes in Abhängigkeit der Darmflora	93
Tabelle 28: Leukozytenpopulationen im Blut in Abhängigkeit der Darmflora	94
Tabelle 29: Leukozyteninfiltration des Milzgewebes in Abhängigkeit der Darmflora	94
Tabelle 30: Infiltration des Milzgewebes mit T-Zellen und Makrophagen in Abhängigkeit der	
Darmflora (Histologie - quantitativ)	94
Tabelle 31: Zytokinexpression in der Milz in Abhängigkeit der Darmflora	95

1. Einleitung

1.1. Chronische Nierenerkrankung

Definition und Bedeutung chronischer Nierenkrankheit

Chronische Nierenerkrankung (engl.: *chronic kidney disease*, CKD) beschreibt den fortschreitenden Verlust von Nephronen und damit eine irreversible Einschränkung der Nierenfunktion. Definiert wird die CKD nach den Leitlinien der KDIGO (Kidney Disease: Improving Global Outcomes) als Abweichung von Nierenfunktion- oder struktur über mehr als drei Monate mit Auswirkungen auf den Gesundheitszustand. Die Klassifikation erfolgt nach Krankheitsursache, glomerulärer Filtrationsrate (GFR) und Albuminurie [1]. Auf diese Weise kann der Schweregrad der Erkrankung abgeschätzt und eine Aussage über die Prognose getroffen werden. In Tabelle 1 sind GFR- und Albuminuriestadien und die dazugehörige Mortalitätserhöhung abgebildet. Das Endstadium der CKD (engl.: *end-stage renal disease*, ESRD) ist von der Dekompensation des Nierenversagens im Stadium G5 geprägt, lässt sich allerdings nicht allein am GFR-Wert festmachen [2]. Eine eingeschränkte Nierenfunktion betrifft aufgrund der Multifunktionalität der Niere viele Gesundheitsbereiche betrifft und schränkt die Lebensqualität erheblich ein [3]. Mit einer weltweiten Prävalenz von ca. 10% zählt sie zu den Volkskrankheiten [4]. In Deutschland liegt die Prävalenz sogar noch höher und wird mit bis zu 17% [5] angegeben.

Dal	Airrog D	iailea fiin		Albuminurie-Kategor	rie
allgemeine Mortalität		A1	A2	A3	
		< 30 mg/g	30-300 mg/g	> 300 mg/g	
-2 G	G1	≥90	1,4	1,6	2,7
gori 3m	G2	60-89	1,4	1,8	2,7
ateg 1,7	G3a	45-59	1,7	2,2	3,6
-Ka in/	G3b	30-44	2,3	3,3	4,9
FR l/m	G4	15-29	3,6	4,7	6,6
D E	G5	< 15	n. a.	n. a.	n. a.

Tabelle 1: CKD-Stadien und Erhöhung des Mortalitätsrisikos durch CKD.

Die GFR-Kategorie bezieht sich auf die geschätzte glomeruläre Filtrationsrate (eGFR). Die Albuminurie-Kategorie bezieht sich auf das Albumin-zu-Kreatinin-Verhältnis (ACR) im Urin. Die Daten in den roten Feldern geben das adjustierte relative Risiko für allgemeine Mortalität in Referenz zur Gruppe von Personen mit einer eGFR zwischen 90 und 105 ml/min/1,73m² und einer ACR von unter 10 mg/g an. Die allgemeine Mortalität in der Referenzgruppe beträgt 7/1000 Personenjahren. Die Daten entstammen einer Metaanalyse und wurden in [1] publiziert. Die Intensität der roten Farbe illustriert das Ausmaß der Risikoerhöhung durch CKD.

Eine zusätzliche Bürde stellt die Kostenintensivität der verfügbaren Nierenersatztherapien dar, die einem Großteil der Weltbevölkerung aus diesem Grund auch nicht zur Verfügung stehen [6]. Dies wiederum ist mitverantwortlich dafür, dass entgegen der allgemeinen Entwicklung der Abnahme der Letalität vieler Krankheiten [7] die Mortalität durch Nierenerkrankungen von 1990 bis 2013 weltweit sogar um 36,9% zunahm und diese es so in die traurige Liste der zwanzig häufigsten Todesursachen schafften [8]. Zu den Risikofaktoren für die Entwicklung einer CKD gehören Alter [9], Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, Übergewicht, Dyslipidämie und weibliches Geschlecht [10, 11]. Diabetische und hypertensive Nephropathie machen in Industrieländern zusammen über die Hälfte der CKD-Fälle aus. entzündliche wie Weitere Ursachen sind Erkrankungen interstitielle oder Glomerulonephritiden, die autoimmun, toxisch oder - besonders in Entwicklungsländern auch infektiös bedingt sein können, angeborene Erkrankungen wie Zystennieren, Fehlbildungen oder Nierensteinleiden, die mit Harnstau einhergehen. und Stoffwechselerkrankungen. Darüber hinaus verbleibt eine nicht unerhebliche Zahl an Fällen, deren Ätiologie sich selbst in nephrologischer Betreuung nicht klären lässt [12, 13].

Hyperoxalurie und Oxalatnephropathie

Eine seltenere aber für das Verständnis dieser Arbeit wichtige Ursache für chronische Nierenerkrankung ist die Oxalatnephropathie. Da es für den experimentellen Ansatz der Arbeit unmöglich war, die gewünschte wissenschaftliche Erkenntnis direkt am nierenkranken Menschen zu gewinnen, wurde ein murines CKD-Modell gewählt, bei dem die Nierenschädigung über eine erhöhte, orale Oxalatzufuhr erfolgte. Oxalat ist das Salz der Oxalsäure, das im Körper nicht abgebaut, sondern fast ausschließlich über die Niere ausgeschieden wird [14]. Es wird je etwa zur Hälfte über die Nahrung intestinal aufgenommen und zur Hälfte endogen beim Abbau von Glyoxylat gebildet [15]. Bei Übersättigung bildet es mit Kalzium schwerlösliche Kalziumoxalat-Kristalle (Abbildung 1), die entweder als Mono- oder als Dihydrat vorkommen [16]. Eine erhöhte Serumoxalatkonzentration führt daher über eine vermehrte renale Ausscheidung zunächst in der Niere zur Bildung von Kalziumoxalatkristallen, die sich im Nierengewebe ablagern und zu Oxalatnephropathie und Nephrolithiasis führen können. Bei Oxalatserumspiegeln über 30 µM [17] kann es auch zu systemischer Oxalose mit Oxalatablagerung in anderen Organen kommen. Von einer Hyperoxalurie wird bei Ausscheidung von mehr als 40-45 mg Oxalat im 24-Stunden-Urin gesprochen [18]. Im Verlauf kommt es zu einem progredienten Funktionsverlust der Nieren, was ab einer GFR von weniger als 30-40 ml/min/1,73m² einen weiteren Anstieg der Oxalatkonzentration im Serum zur Folge hat [19].



Abbildung 1: Kalziumoxalat. Strukturformel und elektronenmikroskopische Aufnahme [20] von Kalziumoxalatkristallen.

Es wird unterschieden zwischen primären und sekundären Formen der Hyperoxalurie. Die primäre Hyperoxalurie stellt eine Gruppe von seltenen, erblichen Enzymdefekten dar, die dazu führen, dass Glyoxylat vermehrt zu Oxalat abgebaut wird. Ihre Prävalenz wird auf etwas mehr als 1:400.000 geschätzt [21]. Der Erbgang verläuft autosomal-rezessiv. Es wurden bisher drei Typen charakterisiert. Darüber hinaus gibt es noch Fälle, die sich keinem der drei Typen zuordnen lassen [22]. Sekundäre Formen beruhen auf einer vermehrten, passiven Absorption von Oxalat aus dem Darm. Neben dem übermäßigen Verzehr oxalatreicher Lebensmittel wie zum Beispiel Nüssen, Sternfrucht, Rhabarber, Sauerampfer oder Spinat, der gelegentlich sogar zu akutem Nierenversagen führen kann [23, 24], spielt die Malabsorption von Fetten hierbei eine wichtige Rolle [25]. Unter normalen Umständen sorgt die Komplexierung mit Kalzium aus der Nahrung für eine geringe Oxalatresorption im Darm von nur ca. 5-10% [26]. Nicht resorbierte, freie Fettsäuren binden jedoch die Kalziumionen, was zur Folge hat, dass der Anteil des nicht-komplexierten Oxalats ansteigt und im Colon absorbiert wird. Auf diese Weise können Erkrankungen, die mit einer Fett-Malabsorption einhergehen, wie etwa chronische Pankreatitis, biliäre Leberzirrhose, Kurzdarmsyndrom, Zustand nach bariatrischer Operation, chronisch-entzündliche Darmerkrankungen oder Zöliakie zu einer sekundären Hyperoxalurie mit konsekutiver Nierenerkrankung führen [27]. Systemische Oxalose tritt bei sekundärer Hyperoxalurie nur selten auf, wurde jedoch für einige schwere Fälle von Morbus Crohn beschrieben [28].

In der Niere wird Oxalat nicht nur glomerulär filtriert, sondern zur Regulation der Konzentrationen in Plasma und Urin tubulär sowohl aktiv sezerniert als auch resorbiert [29]. Die Resorption findet im S1- und S2-Segment des proximalen Tubulus statt und verhindert eine Oxalatübersättigung im Tubulussystem [30]. Die Sekretion erfolgt über die Familie der SLC26-Transportproteine, die die Sekretion von Oxalat nicht nur in der Niere, sondern in

geringem Ausmaß auch intestinal vermittelt [28]. Die renale Oxalatclearance ist GFRabhängig [31].

Bei Überschreitung des Löslichkeitsprodukts kommt es zur Bildung von Kristallen, die einen tubulointerstitiellen Schaden verursachen, der über eine Entzündungsreaktion vermittelt wird. Lange wurde vermutet, dass die tubuläre Schädigung rein mechanisch über eine Obstruktion und intratubuläre Druckerhöhung geschieht. Mulay konnte jedoch zeigen, dass an dieser Entzündungsreaktion das NLRP3-Inflammasom, ein zytosolständiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems [32], über IL1β essentiell beteiligt ist, was von Knauf unabhängig bestätigt werden konnte [33]. Größere Formationen von Kalziumoxalatkristallen spielen eine Rolle als obstruierende Steine in den ableitenden Harnwegen [34].

Morbidität und Mortalität durch CKD

Unabhängig von der Ätiologie wird das klinische Bild der CKD über spezifische Symptome der Grunderkrankung hinaus vom Untergang der Nephrone und damit vom Ausfall der exkretorischen und endokrinen Nierenfunktion geprägt. Über ihre Ausscheidungsfunktion trägt die Niere zur Homöostase vom Flüssigkeits-, Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushalt bei und spielt darüber hinaus bei der Elimination toxischer Metabolite eine entscheidende Rolle. Eine Einschränkung dieser Funktion führt daher zum einen übermäßiger zu Flüssigkeitsretention mit der Folge von Hypertonie und Ödemen. Zum anderen ist die Gefahr von metabolischer Azidose und Hyperkaliämie erhöht. Gravierend ist auch die verminderte Elimination harnpflichtiger Substanzen, die zum Urämiesyndrom führt. Dieses äußert sich neben Allgemeinsymptomen wie Abgeschlagenheit und Kopfschmerzen, Appetitlosigkeit und Übelkeit bis zur Anorexie, auch in urämischem Foetor ex ore, verändertem Hautkolorit und generalisiertem Pruritus. Eine Reihe von morbiditäts- und mortalitätsbestimmenden Folgeerkrankungen sind hiermit assoziiert [12]. Die endokrine Funktion der Niere wird über Synthese von Renin, Erythropoetin und Calcitriol (Vitamin-D) vermittelt. die Erythropoetinmangel führt über eine verminderte Stimulierung der Erythropoese zur normochrom-normozytären, renalen Anämie, die durch eine reduzierte Eisenresorption verstärkt werden kann [35]. Ein Vitamin-D-Mangel hat sowohl immunmodulatorische Effekte [36, 37] als auch Auswirkungen auf den Kalziumhaushalt. Letztere führen über einen verminderten Serumkalziumspiegel zur reaktiven Überproduktion von Parathormon und damit zum sekundären Hyperparathyreoidismus, der zusätzlich durch die eingeschränkte Phosphatausscheidung befeuert wird. Auf diese Weise kommt es zur renalen Osteopathie [38]. In Abbildung 2 sind Symptome und Zeichen der Urämie illustrierend aufgeführt.

4

Übelkeit, Singultus, Geruch und Geschmack↓, Katabolismus, Kachexie, Insulinresistenz, Serositis und Pericarditis

Körpertemperatur ↓, Pruritus, oxidativer Stress, Anämie, Immundysfunktion, chronische Entzündung, Thrombozytopathie

Sexuelle Dysfunktion, Amenorrhoe



Fatigue, epileptische Anfälle, Anorexie, kognitive Dysfunktion, Schlafstörungen, Koma

Krämpfe, Muskelruhepotential ↓, Muskelabbau ↑

Periphere Neuropathie, Restless-Legs-Syndrom, Osteopathie

Abbildung 2: Symptome und Zeichen der Urämie.

Eigene Darstellung nach [39] zur Illustration der vielfältigen Symptome von Urämie. Die Zeichnung in der Abbildungsmitte wird dem mittelalterlichen Universalgelehrten Leonardo da Vinci zugeordnet und ist urheberrechtsfrei. Entnommen wurde sie dem englischsprachigen Wikipediaartikel "Human body", abgerufen am 25.10.2018 um 12:30.

Da die chronische Nierenerkrankung oligosymptomatisch und schleichend verläuft, kommt es häufig erst spät im Krankheitsverlauf zur Diagnose, was ursächliche therapeutische Optionen in vielen Fällen zunichte macht [40]. Da Nephrone bei Säugetieren nicht nachwachsen [41], ist CKD nicht heilbar. Die therapeutische Strategie besteht daher nach Ausschöpfung spezifischer progressionsverzögernder Therapien in der Kompensation der verminderten Nierenfunktion durch Diuretika, Hormonsubstitution und diätetische Steuerung des Elektrolyt- und pH-Haushaltes. Daneben spielt die begleitende Behandlung der Symptome (Kachexie, Pruritus, Infektionskontrolle, etc.) eine wichtige Rolle [42, 43]. Wenn eine Kompensation auf diese Weise nicht mehr ausreichend ist und es zu medikamentös unkontrollierbarer Entgleisung der Elektrolyte, des pH-Wertes oder des Volumenstatus kommt, ist eine Nierenersatztherapie inidiziert [44]. Hier stehen neben der Transplantation eines Spenderorgans Hämo- oder Peritonealdialysemethoden zur Verfügung, wobei die Verfügbarkeit nicht immer gegeben ist [45]. Dies liegt zum einen an der zu niedrigen Zahl von Spenderorganen und zum anderen an den hohen Kosten der Dialyse, die auch in ärmeren Ländern mehrere 10.000 Euro pro Patient und Jahr betragen [46].

Obwohl sich durch die Dialyse der Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushalt ausgleichen lässt und vielfältige retentionspflichtige Stoffe aus dem Blut entfernt werden können, leiden Dialysepatienten genauso wie Patienten mit ESRD, die noch keine Nierenersatztherapie erhalten, unter einer stark erhöhten Morbidität und Mortalität, die trotz der medizinischen Fortschritte der letzten Jahre kaum zurückgeht [47]. So beträgt das 5-Jahres-Überleben von Dialysepatienten nur 40-50% [48]. Die häufigsten Todesursachen sind kardiovaskuläre Erkrankungen (engl. cardiovascular disease, CVD) [49, 50] und Infektionen [51]. Das Risiko für Dialysepatienten an einem kardialen Ereignis zu versterben ist gegenüber der Vergleichsgruppe etwa 20-fach erhöht [52]. Die Mortaliät durch Infektionen ist für diese Gruppe sogar über 80-fach erhöht [51]. Ursächlich spielen Auswirkungen der CKD auf das Immunsystem eine Rolle. Während dies bei Infektionen naheliegt, ist die Pathogenese der CKD-assoziierten kardiovaskulären Sterblichkeit vielfältiger. CKD und CVD teilen sich zunächst einmal viele Risikofaktoren und Ursachen und sind schon deshalb assoziiert. Darüber hinaus verstärkt CKD manche dieser Risikofaktoren noch: Sie begünstigt arterielle Hypertonie, Dyslipidämie, Hyperurikämie, oxidativen Stress und extraossäre Kalzifikationen und trägt häufig zu sowohl Rechts- als auch Linksherzinsuffizienz bei. Gerade bei Patienten mit ESRD tritt jedoch auch die Urämie als pathogenetischer Faktor in den Vordergrund. Das Urämiesyndrom geht neben der Ansammlung toxischer, harnpflichtiger Metabolite mit systemischer Inflammation [53] und Immunsuppression einher [54, 55]. Systemische Inflammation wiederum gehört zu den wichtigsten progressionstreibenden Faktoren von Artherosklerose [56], die der CVD zugrundeliegt, und ist ein unabhängiger Faktor für CVD-Mortalität bei CKD-Patienten [57].

1.2. Immunsystem

Die Hauptfunktion des Immunsystems ist es, den Körper vor dem Eindringen und der Vermehrung schädlicher Mikroorganismen oder Viren zu schützen. Grundvoraussetzung hierfür ist es, die mit der Umwelt kommunizierenden Körperoberflächen (Haut, Hohlorgane des Verdauungstraktes, Lunge, etc.) für die Fülle an Mikroorganismen, die den Körper umgeben und teils sogar besiedeln, undurchlässig zu machen, ohne sie dabei in ihren physiologischen Austauschfunktionen zu beeinträchtigen. Dies wird durch eine komplexe Barriere geleistet, die sich sowohl physikalischer, als auch chemischer und biologischer Mittel bedient. Bei Versagen dieser Barriere kommen die Mechanismen des Immunsystems im engeren Sinne zum Tragen. Der Krankheitserreger wird identifiziert und unter Schonung der eigenen Zellen schnellstmöglich unschädlich gemacht. Zudem wird ein Gedächtnis ausgebildet, das bei erneutem Eindringen eines gleichen Erregers die Antwort des Immunsystems schneller und effektiver macht. Die diffizile Aufgabe, zwischen selbst und fremd sowie schädlich und harmlos zu unterscheiden und das Ausmaß der Immunantwort genau zu regulieren, erklärt die Komplexität dieses Immunsystems, das sich grob in einen angeborenen und einen adaptiven Teil ordnen lässt [58]. Im Folgenden werden die Barrieremechanismen, sowie das angeborene und das adaptive Immunsystem - soweit für das Verständnis der Arbeit notwendig - genauer beleuchtet.

Äußere Barrieremechanismen

Die äußeren Barrierefunktionen, die den Körper vor dem Eindringen von Schädlingen schützen, lassen sich dem angeborenen Immunsystem zuordnen, werden hier aber aufgrund ihrer etwas anderen Wirkweise getrennt behandelt. Grundbestandteil ist die Epithelzellschicht, die durch eine oder mehrere Lagen dicht miteinander verbundener Zellen gebildet wird und jede Körperoberfläche nach außen hin abriegelt [59]. Die Dichte wird durch den Schlussleistenkomplex gewährleistet, der die Zellen miteinander verbindet. Dieser besteht von apikal nach basolateral aus Zonula occludens (engl.: tight junction), Zonula adhaerens und Makula adhaerens. Zonula adhaerens und Makula adhaerens verstärken die Stabilität der Zellschicht, indem sie intrazelluläre Verstrebungen wie Aktin und Keratin miteinander verknüpfen [60]. Tight junctions werden aus 10nm dicken Strängen dieser Membranproteine gebildet, die sich in ca. 18nm Entfernung von einander befinden [61], und bestehen aus Membranproteinen (Zonula-occludens-Proteine, Claudine, Occludin und weitere), die die Zellen fest verknüpfen, so den parazellulären Raum beschränken und damit den parazellulären Transport von Molekülen einschränken. Eine besondere Rolle für die Funktionalität der tight junctions und die Begrenzung parazellulären Transports spielt Occludin [62]. Auch die Familie der Claudine stellt die enge Verbindung der Zellen sicher [63], während die Zonula-occludens-Proteine 1 und 2 regulatorische Funktion haben und auf diese Weise zum Beispiel die Polymerisierung der Claudine steuern [64].

Neben dem Epithel kommen noch andere mechanische Schutzmechanismen zum Einsatz, wie etwa der Wimpernschlag, das Flimmerepithel in den Atemwegen oder auch die Peristaltik im Darm, die ein längeres Anhaften von Pathogenen erschweren. Verstärkt wird dieser mechanische Schutz durch ein chemisches Milieu, das pathogenen Organismen das Überleben oder die Vermehrung schwermacht. So herrscht beispielsweise auf einigen Epithelien ein niedriger pH vor: der Haut-pH beträgt 5,5, in der Vagina beträgt er 3,5-4,5 [65] und im Magen sogar bis zu 1 [66]. Vielfache Studien sowie die klinische Erfahrung lehren, wie schnell es bei einem Ansteigen des pHs zu Infektionen kommt.



Abbildung 3: Schlussleistenkomplex und *tight junctions*.

Vereinfachte schematische Darstellung des Zell-Zell-Kontakts von Darmepithelzellen (N=Zellkern) mit aus *tight junctions* (TJ), *Zonula adhaerens* (ZA) und *Makula adhaerens* (MA) bestehendem Schlussleistenkomplex. Vergrößerung der *tight junctions* mit den Membranproteinen Zonula-occludens-1 (ZO-1), Zonula-occludens-2 (ZO-2), Claudine, Occludin und junctional adhesional molecule (JAM) stellvertretend für viele weitere bekannte Proteine, die die *tight junctions* bilden. Eigene Darstellung nach [64].

Einem ähnlichen Zweck dient die Produktion von Mucus, das insbesondere im Darm eine Schutzschicht zwischen Außenwelt und Epithel setzt [67], oder antibakterielles Lysozym in der Tränenflüssigkeit des Auges [68]. Über solch unspezifische Mechanismen hinaus kommen auch spezielle immunaktive Peptide zum Einsatz, die sich gegen Erreger richten. In der Lamina propria des Ileums befinden sich zum Beispiel B-Zellen, die Immunglobulin A in den Mucus sezernieren und damit die Zusammensetzung der bakteriellen Flora regulieren [69, 70]. Der Körper handelt hierbei in verschiedenen Fällen nicht autark, sondern in symbiotischer Zusammenarbeit mit Mikroorganismen, meist Bakterien. So wird das saure Milieu nicht etwa durch die Schleimhaut der Vagina, sondern durch Lactobacillen, die Döderlein-Stäbchen, erzeugt [71]. Diese symbiotischen Mikroorganismen verdrängen letztlich durch ihre reine Anwesenheit und gute Angepasstheit an das jeweilige Milieu kompetitiv pathogene Organismen und verhindern so eine übermäßige Vermehrung derselben und daraus folgende Infektionen [72]. Ein sehr bekanntes Beispiel ist das Ausbrechen der *Clostridium-difficile*-Enteritis durch konkurrenzlose Ausbreitung von *Clostridium difficile* nach antibiotischer Reduktion anderer Spezies [73].

Angeborenes Immunsystem

Schon früh im Laufe der Evolution vor etwa 700 Millionen Jahren begann die Entwicklung des angeborenen Teils des Immunsystems [74], das daher schon einfache Mehrzeller besitzen und das in allen Tierarten hoch konserviert ist [75]. Er wird "angeboren" genannt, weil die

Struktur seiner Elemente in der Keimbahn bereits eindeutig codiert ist. Das angeborene Immunsystem setzt sich sowohl aus Zellen der myeloiden Reihe, wie Granulozyten, Makrophagen oder Natürlichen Killerzellen, als auch aus humoralen Bestandteilen, wie dem Komplementsystem und den Interleukinen zusammen [76]. Es ist gut darin, fremd von selbst zu unterscheiden, und reagiert im Prinzip auf jede neue Bedrohung ähnlich: Zunächst werden körperfremde, molekulare Muster von Krankheitserregern (engl.: pathogen associated molecular patterns) von darauf spezialisierten Rezeptoren, den pattern recognition receptors, erkannt. Zu diesen Rezeptoren gehören die Toll-like-Rezeptoren (TLRs). TLRs sitzen entweder an der Zelloberfläche von zum Beispiel Makrophagen oder auf der Membran von Zellorganellen wie den Endolysosomen. Sie sind unter anderem für die Erkennung bakterieller pathogen associated molecular patterns zuständig, wie zum Beispiel von Lipopolysaccharid (TLR4) und Peptidoglykan (TLR2), die an der Zelloberfläche gramnegativer bzw. gram-positiver Bakterien vorkommen (siehe auch Abbildung 4 und Tabelle 2). Wird ein TLR aktiviert, kommt es durch die Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytound Chemokinen zur Aktivierung und Rekrutierung weiterer Immunzellen. Zudem wird über die Aktivierung des Komplementsystems und des Transkriptionsfaktor NF-kB eine Entzündungsreaktion ausgelöst [77]. Die auf diese Weise angelockten und aktivierten Immunzellen können den fremden Organismus entweder per Phagozytose unschädlich machen (Makrophagen) oder toxische, zellzersetzende Stoffe wie Lysozym, Myeloperoxidase



Abbildung 4: Immunogenität der bakteriellen Zellwand.

Darstellung der Zellwand gram-positiver und gram-negativer Bakterien mit immunaktivierenden Bestandteilen (Teichonsäure, Lipoteichonsäure, Lipopolysaccharid (LPS), Peptidoglykan und Lipid A). Modifiziert nach [78].

Aktivierende Substanz	Bakteriengruppe	TLR
Lipopolysaccharid	Gram-negative Bakterien	TLR4
Diacyl-Lipopeptide	Mycoplasmen	TLR6/TLR2
Triacyl-Lipopeptide	Bakterien und Mycobakterien	TLR1/TLR2
Lipoteichonsäure	B-Streptokokken	TLR6/TLR2
Peptidoglykan	Gram-positive Bakterien	TLR2
Porins	Neisserien	TLR2
Lipoarabinomannan	Mycobakterien	TLR2
Flagellin	Flagellierte Baktieren	TLR5
CpG-DNA	Bakterien und Mycobakterien	TLR9
noch unbekannt	Uropathogene Bakterien	TLR11

Tabelle 2: Bakterielle Aktivierung	des Immunsvstems über	Toll-like-Rezeptoren	[77]

und reaktive Sauerstoffspezies freisetzen (Granulozyten) [76]. Das Komplementsystem besteht aus einer Reihe unterschiedlicher Proteine, die sich kaskadenartig gegenseitig aktivieren. Es führt zu einer Opsonierung der Erreger, sodass diese der Phagozytose kaum entgehen können, und letztendlich durch Bildung des Membran-Angriffs-Komplexes zur Perforierung der Zellwände der Angreifer. Außerdem bewirkt es die chemotaktische Aktivierung von Leukozyten, verstärkt T-Zell- und Antikörperantwort und reduziert die Aktivität regulatorischer T-Zellen [79]. Obwohl auf diese Weise beinahe alle Eindringlinge in Schach gehalten werden können [76], hat dieses evolutionär ausgefeilte System ein paar Schwächen. Es ist zwar sehr gut darin fremd von selbst zu unterscheiden, die Differenzierung zwischen fremd und fremd gelingt jedoch nur unzureichend. Sie ist aber wichtig, da längst nicht jeder fremde Organismus Gefahr bedeutet. Des Weiteren ist der Körper auf diese Weise nur eingeschränkt in der Lage, ein Infektionsgedächtnis auszubilden - es kann lediglich von "antrainierter Immunantwort" gesprochen [80] werden. Die Folge ist, dass bei wiederkehrenden Infektionen immer wieder mehr oder weniger der gleiche Weg von vorne beschritten werden muss. Dies ist nicht nur energieaufwendig und zeitraubend, sondern führt auch jedes Mal zu einer Entzündungsreaktion, die, da sie eher unspezifisch ist, auch eigene, gesunde Zellen schädigt.

Erworbenes Immunsystem

Vor circa 500 Millionen Jahren entwickelte sich in Vertebraten etwas Elegantes: Erste Lymphozyten waren der Beginn einer adaptiven Immunität [81]. Lymphozyten haben die Fähigkeit, Erreger spezifisch zu erkennen und zu bekämpfen. Darüber hinaus sind sie in der Lage, ein Immungedächtnis zu bilden. Die Lymphozyten des Menschen werden im Knochenmark gebildet und lassen sich in zwei Gruppen unterteilen, die nach dem Ort ihrer Ausreifung T(*hymus*)- und B(*one marrow*)-Lymphozyten genannt werden, wobei erwähnt

werden muss, dass das die Bezeichnung der B-Lymphozyten ursprünglich vom Ort ihrer ersten Entdeckung der *Bursa fabricii* stammt [82]. Die Besonderheit der Lymphozyten sind ihre Rezeptoren, Immunglobuline auf den B-Zellen und T-Zellrezeptoren auf den T-Zellen, deren variable Regionen nicht exakt in der Keimbahn festgelegt sind, sondern durch somatische Rekombination kurzer Genabschnitte für jede Zelle neu zusammengestellt werden. Aus den Millionen verschiedener Rezeptortypen, von denen auf jeder neuen Zelle nur einer exprimiert wird, werden durch positive und negative Selektion während der Ausreifung diejenigen ausgewählt, die sowohl funktional als auch tolerant gegenüber eigenen Zellen sind. Alle Zellen, die diese Eigenschaften am Ende der Reifeprüfung nicht erfüllen, gehen durch Apoptose zugrunde [83].

Die verschiedenen Lymphozytentypen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Wirkweise. T-Zellen, deren wichtigste Vertreter zytotoxische T-Zellen (CTL), T-Helfer-Zellen (ThC) und regulatorische T-Zellen (Tregs) sind, benötigen zur Antigenerkennung die Mithilfe anderer Zellen. Diese präsentieren Antigene auf sogenannten MHC- (engl.: major histocompatibility complex) Proteinen. MHC-Proteine der Klasse 1 werden von allen Zellen des Körpers exprimiert und präsentieren verschiedenste Fragmente von Proteinen, die im Zellinneren synthetisiert werden. Mit ihrer Hilfe erkennen CTLs über Bindung an den T-Zellrezeptor entartete oder von Viren befallene Zellen, die körperfremde Proteinfragmente präsentieren, und zerstören diese durch einen Angriff mit Perforinen und Proteasen. MHC-Proteine der Klasse 2 werden nur von bestimmten Immunzellen exprimiert und präsentieren phagozytierte Proteine von Krankheitserregern. Zu diesen Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) gehören zum einen Zellen des angeborenen Immunsystems, wie Makrophagen und vor allem dendritische Zellen, und zum anderen B-Lymphozyten. Die durch MHC-Klasse-2 präsentierten Fragmente können von ThCs und Tregs gebunden werden. Diese zerstören die Zellen daraufhin natürlich nicht, da es ja selbst funktionierende Zellen des Immunsystems sind, sondern regulieren die Immunantwort gegen den entsprechenden Erreger [84]. Bei den ThCs hängt die Art der Antwort vom Subtyp ab. Am besten bekannt sind die Funktionen von Th1-, Th2- und Th17-Zellen. Th1-Zellen vermitteln eine zelluläre Immunantwort, indem sie durch die Ausschüttung von Zytokinen wie Interferon-y (IFNy) oder Tumornekrosefaktor-a (TNFα) Effektorzellen wie Makrophagen oder Natürliche Killerzellen anlocken. Th2-Zellen spielen bei der Aktivierung von B-Lymphozyten eine entscheidende Rolle [85]. Th17-Zellen lösen besonders bei der Bekämpfung extrazellulärer Bakterien über die Ausschüttung von Interleukinen (darunter 17 und 22) eine starke Entzündungsreaktion mit Attraktion von neutrophilen Granulozyten aus. Diese Reaktion kann zu einer überschießenden und dauerhaften Immunaktivierung führen und spielt auch bei Autoimmunerkrankungen eine Rolle [86]. Tregs wiederum dämmen auf verschiedene Weise (zum Beispiel durch die Ausschüttung inhibitorischer Zytokine wie Interleukin-10 und TGFB (engl.: transforming growth factor)) die T-Zellantwort ein und verhindern so übermäßige oder autoreaktive Immunreaktionen [87]. Th17-Zellen und Tregs stimulieren sich gegenseitig und treten so als Gegenspieler gemeinsam auf, um das Gleichgewicht der Immunreaktion zu wahren [88]. B-Lymphozyten binden über ihre membrangebundenen Antikörper direkt an entsprechende Antigene von Erregern. Sie haben die Fähigkeit Erregerpeptide über MHC-Klasse-2 zu präsentieren und können auf zwei Wegen aktiviert werden. Entweder T-Zell-unabhängig durch mehrfache Antigen-Antikörperbindung oder nach zusätzlicher Stimulation durch Th2-Zellen, die an präsentierte Fragmente binden. Die T-Zell-unabhängige Aktivierung führt zur Vermehrung der B-Zelle und Produktion von freilöslichen, monoklonalen IgM-Varianten ihres eigenen Antikörpers. Die T-Zell-abhängige Aktivierung ist dagegen ungleich stärker. Sie führt nicht nur zur Vermehrung der B-Zelle, sondern auch zu deren Differenzierung zur Plasmazelle, die in großem Ausmaß Antikörper der Klassen IgM, IgG, IgA und IgE produzieren kann und die Fähigkeit besitzt wie auch manche T-Zellen zu einer besonders langlebigen Gedächtniszelle weiter zu differenzieren [85].

Die Lymphozyten des adaptiven Immunsystems ergänzen also das angeborene Immunsystem, indem sie äußerst spezifisch auf Pathogene reagieren, das Ausmaß der Entzündungsreaktion regulieren und durch ihre Gedächtnisfunktion bei wiederkehrenden Infekten äußerst schnell und effektiv agieren können. Die hohe Spezifität bringt jedoch ein statistisches Verteilungsproblem mit sich. Nicht von jedem der Millionen verschiedenen Lymphozytentypen kann ständig einer überall sein und auf Eindringlinge warten. Daher besitzt der Mensch neben den primär lymphatischen Organen, Thymus und Knochenmark, in denen Lymphozyten (aus-)gebildet werden, noch sekundär lymphatische Organe, wie die Milz, Lymphknoten oder die Peyer-Plaques in der Darmwand, durch die Körperflüssigkeiten geschleust werden und in denen sich eine große Anzahl sowohl von T- als auch von B-Lymphozyten befindet und die von Antigen-präsentierenden Zellen nach Ingestion des Fremdlings gezielt aufgesucht werden [89].

Die individuelle Ausprägung besonders des adaptiven Immunsystems ist nicht mit Geburt festgelegt, sondern wird im Laufe der Lebensjahre durch den Kontakt mit Organismen aus der Umwelt geformt. Es liegt auf der Hand, dass hierbei die Besiedelung des im Mutterleib noch sterilen Körpers durch die bereits zu Beginn dieses Kapitels erwähnte kommensale Flora von Mikroorganismen und der ständige Kontakt des Immunsystems zu dieser eine herausragende Rolle spielt. Das nächste Kapitel soll daher ein tieferes Verständnis des humanen Mikrobioms, insbesondere der Darmflora, vermitteln. Zunächst werden jedoch noch die

12

Auswirkungen chronischer Nierenerkrankung auf Funktion und Ausprägung des Immunsystems beleuchtet.

Systemische Entzündung und Immunschwäche durch chronische Nierenerkrankung

Chronische Nierenerkrankung, insbesondere im Endstadium, hat einige Auswirkungen auf das Immunsystems zur Folge. Wie am Ende des letzten Teilkapitels bereits angeschnitten, wurde sowohl eine Aktivierung des Immunsystems im Sinne einer systemischen Entzündung, als auch ein Immundefizit, das sich in einer starken Erhöhung lebensbedrohlicher Infektionen [51], zunehmendem Impfversagen [57] und einer erhöhten Krebsmortalität [90] äußert, beobachtet. Beide sind wie bereits beschrieben für Morbidität und Mortalität chronisch Nierenerkrankter sehr relevant.

Im Einzelnen konnten folgende Veränderungen beobachtet werden: Chronische Nierenkrankheit und Urämie führen zu einer Zunahme systemisch zirkulierender Monozyten mit damit einhergehender Vermehrung der weiter oben beschriebenen TLRs 2 und 4 [91]. Diese Monozyten aber auch Neutrophile Granulozyten produzieren entsprechend mehr Zytokine und Sauerstoffradikale und erhöhen so den oxidativen Stress [92], sind aber andererseits nur in eingeschränkter Weise zur Phagozytose fähig [93]. Hyperzytokinämie wird zusätzlich durch eine geringere renale Elimination verstärkt [94]. Auch Dendritische Zellen, die als Antigen-präsentierende Zellen eine Schlüsselrolle bei der Regulierung sowohl von angeborener als auch von adaptiver Immunantwort besetzen, zeigen ein dysfunktionales Verhalten [95] und gleichzeitig eine überschießende Reaktion auf Stimulation mit bakteriellem LPS [96].

Veränderung durch CKD	Effektor	Veränderung durch CKD	
Dysfunktionale Phagozytose	Monozyten/	Vermehrung, erhöhte Produktion von	
	Makrophagen	Radikalen und Zytokinen	
Dysfunktion der Antigenpräsentation	Dendritische Zellen	Überreaktion auf LPS	
Reduzierte Anzahl und	Lymphozyten	Überhang von zytotoxischen T-Zellen	
Lebensdauer		Erhöhte T-Zell-Aktivierung	
Verlust von Gedächtniszellen		Abnahme und Dysfunktion von Tregs	
	Komplement- system	Aktivierung	
Immunsuppression		Überschießende Inflammation	
Folge: Infekte, Impfversagen, Krebs		Folge: CVD, Kachexie, Anämie	
Morbidität und Mortalität in CKD			

Tabelle 3:	Veränderungen	des Immunsystems	durch CKD.
------------	---------------	------------------	------------

Es findet sich eine inadäquate Aktivierung des Komplementsystems [97]. Zusätzlich ist eine Lymphopenie beschrieben. Im Verhältnis zu T-Helferzellen, nehmen zytotoxische T-Zellen zu. Die Gesamtzahl und Lebensdauer von T-Zellen nimmt ab, während die Aktivierung der verbliebenen zunimmt [98, 99]. Besonders T-Zellen mit Gedächtnisfunktion und Tregs gehen verloren [100, 101]. Darüber hinaus kommt es zu einer B-Zell-Lymphopenie [102], die weniger durch eine geringere Bildung als durch frühere Apoptose bedingt ist [103].

Chronische Nierenerkrankung führt zu Barrierestörung im Darm

Nicht nur die zelluläre und humorale Immunantwort verändert sich bei nierenkranken Patienten, sondern auch basale Barrieremechanismen, wie das Darmepithel, werden in ihrer Funktion gestört. Tierexperimentell und in vitro konnte gezeigt werden, dass urämisches Plasma zu einer höheren Durchlässigkeit von Darmepithelzellen mit Reduktion der Proteine Claudin-1, Occludin und ZO-1 in Immunhistologie und Western-Blot führt [104, 105]. Andersen und Kesper konnten darüber hinaus den Transport von Bakterien und bakteriellen Bestandteilen aus dem Darmlumen ins Blutsystem nierenkranker Mäuse zeigen [106]. Dies deckt sich mit systemisch nachweisbarem LPS bei nierenkranken Patienten, das mit dem CKD-Stadium zunimmt [107]. Ähnliches lässt sich auch bei Patienten mit dekompensierter Herzinsuffizienz beobachten [108, 109]. Es liegt daher nahe, dass es pathophysiologische Gemeinsamkeiten gibt. Wie bei der dekompensierten Herzinsuffizienz stellt auch bei terminaler Niereninsuffizienz eine relevante Volumenüberladung ein häufiges Problem dar, sodass Hypoperfusion und ein intramurales Ödem der Darmwand eine ursächliche Rolle spielen können [109, 110]. Da die funktionelle Darmbarriere nicht nur auf den Epithelzellen, sondern genauso auf dem intraluminalen, iuxtaepithelialen Milieu wie auf dem Zusammenspiel von Symbionten und Immunsystem beruht, soll das folgende Kapitel ein Verständnis der bisher bekannten Funktionsweise des intestinalen Mikrobioms liefern.

1.3. Intestinales Mikrobiom

Das Mikrobiom des Menschen bezeichnet die komplexe Gemeinschaft von Mikroben (Bakterien, Archaea, Eukaryoten und Viren), die alle Oberflächen des Körpers, die in Kontakt mit der Umwelt stehen, dauerhaft besiedeln [111]. Allein die schiere Zahl dieser Organismen lässt ihre Bedeutung und die Komplexität der Interaktionen untereinander und mit dem menschlichen Körper erahnen: Schon der Darm eines erwachsenen Menschen beherbergt mit etwa 100 Billionen Organismen mehr fremde Zellen als der menschliche Körper eigene

besitzt [112]. Deren mehr als 1000 Spezies [113] verfügen zusammen über circa 3 Millionen Gene und damit ein 150-mal größeres Genom als menschliche Zellen [114]. Entlang des Darmtraktes steigt die Dichte und Vielfalt der bakteriellen Besiedelung von oral zu aboral mit fallender Sauerstoffkonzentration, sodass das Colon mit einer Dichte von 10¹² Bakterien pro Gramm Faeces etwa 70% des gesamten humanen Mikrobioms beherbergt [115]. Von mehr als 50 bisher bekannten bakteriellen Phyla [116] wurden nur sieben im menschlichen Darm gefunden: Bacteroidetes und Firmicutes, die zusammen 80-90% der Bakterien [117, 118] Proteobacteria, ausmachen, Actinobacteria, Verrucomicrobia, Fusobacteria und Cyanobacteria [119]. Art und Zusammensetzung der verschiedenen Spezies variieren zwischen Individuen, sodass das intestinale Mikrobiom jedes Menschen als einzigartig gilt [120]. Die Besiedelung des sterilen Darms beginnt bei Geburt durch die vaginale und fäkale Flora der Mutter [121], wobei Vergleiche zwischen Geschwistern [122] aber auch die Unterschiede in der Darmflora per Kaiserschnitt geborener Kinder [123] die überragende Bedeutung der initialen, vertikalen Transmission deutlich machen. Weitere bedeutende physiologische Einflussgrößen auf die Zusammensetzung des Mikrobioms sind die (Immuno)genetik des Wirts [124], seine Diät [125], Aktivität [126], sowie sein Gesundheitsstatus [127], sein Alter und sein Wohnort [128].

Die Symbiose von Mensch und intestinalem Mikrobiom ist von wechselseitigem Interesse geprägt. Die Mikroorganismen schätzen das stabile und nährstoffreiche Milieu des menschlichen Darms. Dafür übernehmen sie eine Reihe wertvoller Aufgaben für ihren Wirt. Sie stellen wie bereits beschrieben einen Teil der funktionellen Darmbarriere, indem sie mit pathogenen Keimen konkurrieren und es ihnen daher auf verschiedene Weise schwermachen, sich in relevanter Weise zu vermehren [72]. Sie bereiten schwerverdauliche Nahrungsanteile für ihren Wirt auf, sodass sie von ihm resorbiert werden können [129], und synthetisieren sogar essentielle Nahrungsbestandteile (Vitamine, Folsäure, etc.) [115, 130]. Sie wirken motilitätsfördernd [129] und ernähren Enterozyten mit kurzkettigen Fettsäuren [131]. Letztere haben auch regulatorische Effekte auf das Immunsystem [132], mit dem die intestinale Flora in enger, wechselseitiger Beziehung existiert.

Intestinales Mikrobiom und Immunsystem

Während das Immunsystem systemische Infektionen mit Mikroorganismen radikal bekämpft, ist es in der Lage diese große Zahl an unterschiedlichsten Mikroben zu tolerieren und ihre Zusammensetzung zu kontrollieren. Diese als Immuntoleranz bezeichnete Fähigkeit, wird erst im Laufe der Ontogenese erworben [133]. Von Beginn der Besiedelung bei Geburt bis zur allmählichen Stabilität der Darmflorazusammensetzung mit ungefähr drei Jahren [128], formt

sich das adaptive Immunsystem und bildet verschiedene Mechanismen, um auf die kommensalen Flora nicht zu hyperreagieren. Eine wichtige Methode besteht in der Kompartimentierung: Durch die Produktion von Mucus, anti-mikrobiellen Peptiden und spezifischen, sekretorischen Antikörpern (sIgA) wird der Großteil der Darmbewohner auf Abstand zum Epithel gehalten [69, 134]. Auch epithelnahe, intraluminale neutrophile Granulozyten tragen hierzu bei [135]. Hierbei gelten je nach bakterieller Spezies unterschiedliche Abstände, wobei die "näheren" Spezies mithelfen, andere in Richtung Lumen zu verdrängen. So bedeutet der falsche Keim im falschen Kompartiment eine Störung der Homöostase und löst eine Immunreaktion aus. Intestinale Makrophagen lernen auf mikrobiellen Kontakt nur mit im Vergleich zu ihren systemischen Geschwistern geringen Mengen an pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNFa und IL-12 zu reagieren [135] und gleichzeitig über die spontane Produktion von anti-inflammatorischen Zytokinen wie IL-10 oder TGFβ die Aktivierung des Immunsystems zu drosseln [136, 137]. Eine wichtige Rolle hierbei spielen Tregs, die darüber hinaus Mikroben-reaktive Effektor-T-Zellen supprimieren und so eine unangemessene Entzündungsreaktion verhindern [138, 139]. Von Tregs produziertes TGFB stimuliert B-Zellen zum Klassenwechsel und zur Produktion von IgA, das über Immunglobulinrezeptoren der Epithelzellen ins Lumen gelangt und dort das Gleichgewicht des eigenen Mikrobioms und die Zusammensetzung der Spezies reguliert [140]. Mithilfe von sIgA ist es sogar möglich die Genexpression und damit Funktion der Bakterien zu steuern [69]. Gleiches gilt natürlich auch umgekehrt: Versuche mit keimfreien Mäusen lehren, dass das Mikrobiom für das Reifen des systemischen und insbesondere des intestinalen Immunsystems essentiell ist [133, 141]. Nur in besiedelten Tieren findet eine relevante Induktion von Th17- und Treg-Zellen statt. Intestinale Lymphfollikel, wie die Peyer-Plaques, sind in keimfreien Mäusen kaum ausgeprägt. Diese sind daher wesentlich anfälliger für Infektionen. Da die mangelnde Produktion von IgA in diesen Tieren zu einer Überproduktion von IgE führt, sind sie auch empfänglicher für Allergien [142]. Zuletzt stärkt und reguliert die Zusammensetzung einer symbiotischen Darmflora die Barrierefunktion des Darmepithels [143, 144]. Der Kontakt des systemischen Immunsystems mit der intestinalen Flora ist in gesunden Individuen daher eher gering, sodass manche Autoren von Ignoranz anstatt von Toleranz sprechen [140, 145].

Dysbiose durch chronische Nierenerkrankung

All die Vorteile, die die Symbiose aus Wirt und Mikrobiom so erfolgreich machen, kommen jedoch nur zum Tragen, wenn in der Zusammensetzung der intestinalen Mikroflora ein Zustand des Gleichgewichts herrscht, die sogenannte Eubiose. Kommt das System aus seinem Gleichgewicht und wird zur Dysbiose, kann das gravierende Auswirkungen haben. Allgemein ist Dysbiose als jegliche Veränderung hinsichtlich quantitativer und qualitativer Ausgestaltung des intestinalen Mikrobioms im Vergleich zu bisher bekannten Mikrobiomen offensichtlich gesunder Individuen definiert [146]. Dies kann zu einem Verlust vorteilhafter, symbiontischer und einer Ausweitung potentiell schädlicher, kommensaler Mikroben, die auch als Pathobionten bezeichnet werden [147], sowie zu einer generellen Reduktion der intraindividuellen, bakteriellen Vielfalt (β-Diversität) führen [146]. Folge ist der Verlust symbiotischer Funktionen, die Produktion von toxischen Metaboliten und eine überschießende Entzündungsreaktion, die eine Zerstörung der Darmbarriere zur Folge haben kann [148]. Darüber hinaus wird der intestinalen Dysbiose eine pathogenetische Rolle bei einer Reihe unterschiedlichster, nichtübertragbarer Erkrankungen, wie Autismus [149], chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen [150], Diabetes mellitus Typ 2 [151], colorektalem Karzinom [152] und Depression [153] zugeschrieben. Gründe für eine Dysbiose können prinzipiell alle weiter oben aufgeführten Einflussfaktoren sein. Besonders hervorzuheben sind die Einnahme von Antibiotika, die zu einer persistierenden Dysbiose führen kann [146, 154, 155], und chronische Erkrankungen wie zum Beispiel Leber- oder Herzinsuffizienz [156].

Experimentelle Daten zeigen auch eine Veränderung des Mikrobioms durch CKD beim Menschen [157]. Mögliche Erklärungen für die Entwicklung einer Dysbiose durch chronische Nierenerkranung liegen in Folgen der verminderten Exkretion, wie metabolische Azidose, die Ansammlung urämischer Toxine und Volumenüberladung, aber auch in Folgen der Therapie, wie häufige Antibiotikagabe, orale Eisensubstitution oder Inhibitoren des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems, die zu Darmischämie führen können [158]. Allerdings zeigten tierexperimentelle Studien auch dann ein dysbiotisches Mikrobiom mit einer starken Zunahme der Proteobakterien, wenn keinerlei Therapie erfolgte [106, 157]. Eine Expansion der Proteobakterien und spezieller der Enterobacteriaceae gehören zu den am häufigsten berichteten Ausprägungen von Dysbiose [159].

1.4. Zielsetzung und Hypothese

Obwohl die Veränderungen des Immunsystems mit chronischer Entzündung bei gleichzeitiger Immunschwäche als Haupttreiber von Morbidität und Mortalität bei chronischer Nierenerkrankung lange bekannt sind, bleibt weitgehend unklar, wie es zu dieser ungünstigen Immunkonstellation kommt. Es werden auf der einen Seite direkte Folgen des renalen Funktionsverlusts, wie verminderte Exkretion pro-inflammatorischer Zytokine und urämischer Toxine, sowie oxidativer Stress und Azidose, und auf der anderen Seite Nebenwirkungen der Dialysebehandlung, die durch den Kontakt des Blutes mit Dialysemembranen und -flüssigkeiten entstehen, diskutiert [53].

Bis zu einem gewissen Ausmaß sind diese Faktoren sicherlich mitverantwortlich für das beobachtete Phänomen. Da Zeichen der systemischen Entzündung aber bereits vor Dialysebeginn auftreten [107], metabolische Auswirkungen der Nierenerkrankung durch die Dialyse größtenteils behoben werden [160] und in den vergangenen Jahren die Immunogenität der Dialysematerialien durch neue Techniken deutlich verringert werden konnte [53], muss es weitere relevante Akteure geben, die mit chronischer Nierenerkrankung in Verbindung stehen und systemische Entzündung und Immunsuppression vermitteln können. Es haben sich verschiedene Modelle gebildet, die den dauerhaften oder zumindest häufigen Kontakt zu pathogenen Erregern im Sinne einer dysfunktionalen Stimulation des Immunsystems als mögliche Ursache betrachten. Dies ist plausibel, da das Phänomen der gleichzeitigen Inflammation und Immunsuppression auch in Patienten mit chronischen Infektionen [161] oder Sepsis [162] beschrieben wurde. Darüber hinaus muss es, wenn die Dialyse als Quelle ausfällt, eine andere Quelle für die gemessenen Endotoxinspiegel geben. So werden etwa Katheter-assoziierte Infektionen oder die Häufung systemischer Infekte anderer Genese verdächtigt. Allerdings handelt es sich bei ersterem ebenfalls um ein Dialyse-assoziiertes Risiko und dürfte daher bei (noch) nicht dialysierten ESRD-Patienten nicht auftreten und letzteres beschreibt bereits eine Folge der beschriebenen Immunsuppression und kann daher nicht allein für diese Veränderungen verantwortlich sein. Zunehmend Beachtung findet die intestinale Darmflora, die als größtes mikrobiologisches Reservoir im Körper und Quelle bakterieller Immunstimulation lange kaum Beachtung fand [163]. Wie bereits erörtert ergaben Studien eine durchlässigere Darmbarriere und Dysbiose in chronisch urämischen Patienten. Eine relevante Mitbeteiligung dieser dysbiotischen Darmflora an der veränderten Funktionalität und Reaktivität des Immunsystems bei CKD erscheint in diesem Zusammenhang unvermeidbar. Andersen und Kesper [106] lieferten einen wichtigen Baustein in diesem Modell, indem sie eine antibiotische Eradikation der bakteriellen Darmflora in Kollagen-Typ-4α3-defizienten Mäusen, einem anerkannten Mausmodell progressiver, chronischer Nierenerkrankung, durchführten. Es konnte gezeigt werden, dass es in urämen Mäusen zu einer intestinalen Dysbiose und einer bakteriellen Translokation vom Darm in die Leber kam. Diese ging einher mit erhöhten LPS- und Peptidoglykanspiegeln, sowie Markern der systemischen Entzündung. Durch Eradikation der bakteriellen Darmflora, konnte eine Regression der Entzündungswerte und ein Absinken der LPS-Spiegel erreicht werden.



Abbildung 5: Mögliche Rolle der Darmflora bei CKD-assoziierter Immundysfunktion. Graphische Zusammenfassung des vermuteten Zusammenhangs zwischen chronischer Nierenerkrankung (CKD), Darmflora, systemischer Immundysfunktion und Morbidität und Mortalität. Rot dargestellt sind die in dieser Arbeit operationalisierten und untersuchten Faktoren. Eigene Darstellung.

Um diese Ergebnisse auf eine breitere wissenschaftliche Basis zu stellen und zu überprüfen, ob die festgestellten Effekte wirklich auf den Auswirkungen chronischer Nierenerkrankung beruhen oder eher dem spezifischen Krankheitsbild der Alport-Nephropathie angehören, wurden die von Andersen und Kesper [106] durchgeführten Analysen im Rahmen dieser Arbeit an einem neuen diätetischen Modell der Kristallnephropathie wiederholt. Dieses musste zunächst entsprechend charakterisiert werden.

Die zu beantwortenden Hypothesen lauten dementsprechend:

- Eine oxalatreiche, kalziumarme Diät führt in C57BL/6N-Mäusen zu chronischer Nierenerkrankung, systemischer Entzündung und Immunsuppression, Dysbiose und Darmbarrierestörung. (H0: Durch eine oxalatreiche, kalziumarme Diät lassen sich chronische Nierenerkrankung, systemische Entzündung und Immunsuppression, Dysbiose und Darmbarrierestörung nicht auslösen.)
- Durch die oxalatreiche Diät ausgelöste Veränderungen des Immunsystems und der Darmbarriere sind durch antibiotische Eradikation der dysbiotischen Darmflora reversibel. (H0: Die antibiotische Eradikation der Darmflora hat keine Auswirkungen auf die gemessenen Parameter des Immunsystems und der Darmbarriere.)
- Die antibiotische Eradikation der dysbiotischen Darmflora verringert Ausma
 ß oder Progredienz der chronischen Nierenerkrankung. (H0: Die antibiotische Eradikation der Darmflora hat keine Auswirkungen auf die gemessenen Parameter f
 ür die Nierenfunktion.)

2. Material und Methoden

2.1. Material

Tabelle 4: Tierhaltung

Artikel	Hersteller
C57BL/6N Wildtyp-Mäuse, weiblich	Charles River Laboratories, Sulzfeld, D
Käfige Eurostandard Typ II long	TECNIPLAST S.p.A, Buguggiate, I
Maushäuser aus Polycarbonat	TECNIPLAST S.p.A, Buguggiate, I
Tierfutter	Ssnif, Soest, D
Reusable Animal Oral Gavage	Cadence Science, Staunton, USA

Artikel Hersteller Pipetten Serologische Pipetten 5, 10, 25ml BD, Heidelberg, D Pipetten Pipetman® Gilson, Middleton, WI, USA Multikanalpipette Eppendorf AG, Hamburg, D Pipettierhilfe Pipetus®-classic Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, D Pipettierhilfe Easypet Eppendorf, Hamburg, D Pipettenspitzen Typ Gilson® Peske, Aindling-Arnhofen, D Pipettenspitzen, Filter tips, pyrogenfrei nerbe plus, Winsen/Luhe, D Pipettenspitzen epT.I.P.S.® Eppendorf AG, Hamburg, D Waagen BP 110 S Sartorius, Göttingen, D Mettler PJ 3000 Mettler-Toledo, Greifensee, CH Zentrifugen Heraeus, Minifuge T VWR Internation, Darmstadt, D Heraeus, Sepatech Biofuge A Heraeus Sepatech, Osterode, D Centrifuge 5415 C Eppendorf, Hamburg, D Centrifuge 5418 C Eppendorf, Hamburg, D Universal 16 Hettich, Bäch, CH **ELISA** ELISA-Reader Tecan, GENios Plus Tecan, Crailsheim, D ELISA Microplate Strip Washer ELx50 BioTek, Bad Friedrichshall, D NUNC-Immunoplate F96 Thermo Scientific, Waltham, USA **Real-time PCR** Spektrophotometer Nano drop® ND-1000 PEQLAB Biotechnology, Erlangen D

Tabelle 5: Geräte und Einmalmaterial

LightCycler[™] 480 Real-Time PCR System Klebefolie LightCycler[™] 480 Multiwell-Platte 96 FACS **FACSCalibur™** FACS-Reaktionsgefäße Hämatographie und Serumanalyse AU480 Chemistry Analyzer Sysmex capillary tubes Sysmex XT-2000iV Mikroskopie Lichtmikroskop Leitz DM IL Libra 120 CCD-Kamera (*charge-coupled device*) Deckgläser Lichtmikroskop Zeiss Axioplan 2 Axiocam HR Histologie-Einbettkassetten SuperFrost+® Objektträger Mikrobiologie Brutschrank Heracell Typ B5060 EC-CO2 Columbia-Blutagar Pharm. Einmalimpfschlingen Einmalspatel L-Shape Spreader Sterile Einwegpinzetten Steriles Filtersieb Cell Strainer 100, 70µm **Sonstiges** Autoklaviergerät Einwegküvetten 1,5ml Plastibrand Eppendorf-Tubes 1,5ml steril/pyrogenfrei Falcons 15ml, 50ml Homogenisator Ultra Turrax T25 Magnetrührer IKAMAG REO Microlance Kanülen 20, 26, 30G Mikroreaktionsgefäße 1,5, 2, 5ml pH-Meter WTW Sicherheitsskalpell Sicherheitswerkbank Microflow®

Roche Diagnostics Ltd., Rotkreuz, CH Roche, Basel, CH Roche, Basel, CH **BD** Bioscience, Heidelberg BD Pharmingen, San Diego, USA Beckman Coulter, Brea, USA Sysmex D. GmbH, Norderstedt, D Sysmex D. GmbH, Norderstedt, D Leica Microsysteme, Solms, D Carl-Zeiss AG, Oberkochen, D Tröndle, Moorenwies, D Menzel-Gläser, Braunschweig Carl-Zeiss AG, Oberkochen, D Carl-Zeiss AG, Oberkochen, D Neolab, Heidelberg, D Menzel-Gläser, Braunschweig Heraeus Sepatech, Osterode, D Merck, Darmstadt, D Nunc GmbH, Wiesbaden, D VWR, Leuven, B Angiokard, Friedeburg, D BD Falcon, Franklin Lakes, USA Webeco, Selmsdorf, D Brand, Gießen, D nerbe plus, Winsen/Luhe, D TPP, Trasadingen, CH IKA GmbH, Staufen, D IKA GmbH, Staufen, D BD, Fraga, E TPP, Trasadingen, CH WTW GmbH, Weilheim, D Aesculap AG, Tuttlingen, D Nunc GmbH, Wiesbaden, D

Sonifier® B-12	Branson Sonic Power, Danburry, USA
Spritzen Diskardit II 1, 2, 5, 10ml	BD, Fraga, E
Sterile Einmalskalpelle	Feather Safety Razor Co. LTD, Osaka, J
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, D
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, D
UV-Lampe	Bachofer Laborgeräte, Reutlingen, D
Vortex Genie 2 TM	Bender & Hobein AG, Zürich, CH

Tabelle 6: Kits

Artikel	Hersteller
Ambion PureLink® RNA Mini Kit	Life technologies GmbH, Darmstadt, D
Cytofix/Cytoperm Plus	BD, Franklin Lakes, USA
ELISA Kit for Secretory IgA	Cloud-Clone Corp., Houston, USA
LAL-Chromogenic Endpoint Assay	Hycult Biotech, Uden, NL
Mouse Albumin ELISA Quantitation Set	Bethyl Lab. Inc., Montgomery, USA
RNAse-freies DNAse Set	Qiagen GmbH, Hilden, D
TMB-Substrate Reagent Set	BD Biosciences, San Diego, USA

Tierfutter

Alle drei Diäten basieren auf der "*Calcium free diet*" (Harlaan Cat. No. TD.95027) und wurden als Spezialanforderung von der Firma Ssniff, Soest, D, hergestellt. Diese Diäten enthielten die in Tabelle 7 dargestellten Inhaltsstoffe.

Diät	Inhaltsstoffe	Gewichtsprozent
"Basisdiät"	Saccharose	34,22
(niedriger Oxalat- und niedriger	Maisstärke	32,00
Kalziumgehalt)	Kasein	20,00
	Sojaöl	6,00
	Zellulose	4,00
	CaP-defizienter Mineralienmix	1,34
	(79055)	1,14
	Kaliumphosphat, monobasisch	1,00
	Vitaminmix, Teklad (40060)	0,30
	L-Cystin	0,0012
	Antioxidans: Ethoxyquin	
"Kontrolldiät"	"Basisdiät"	µmol/g
(hoher Oxalat- und hoher Kalziumgehalt)	+ Natriumoxalat	50

Tabelle 7: Inhaltsstoffe der verwendeten Diäten

	+ Kalziumcarbonat	150
"CKD-Diät"	"Basisdiät"	µmol/g
(hoher Oxalat- und niedriger Kalziumgehalt)	+ Natriumoxalat	50

Tabelle 8: Medikamente und Reagenzien

Artikel	Hersteller
Antibiotika	
Ampicillin-T (Chevita)	KUM Apotheke, München, D
Neomycin	KUM Apotheke, München, D
Metronidazol	KUM Apotheke, München, D
Injektionsnarkose	
Medetomedin 1mg/ml	Pfizer, Berlin, D
Midazolam 5mg/ml	Roche, Mannheim, D
Fentanyl 0,05mg/ml	Jansen, Oberriet, CH
Reagenzien	
ABC-Kit (inkl. Anti-Biotin-Antikörper)	Vector, Burlingame, USA
ABC-Substrat	Vector, Burlingame, USA
Agar-Agar	Serva, Heidelberg, D
Ammoniumperoxodisulfat	Bio-Rad, München, D
Annexin binding buffer	BD Pharmingen, Heidelberg, D
Antigen Unmasking Solution	Vector, Burlingame, USA
Avidin	Vector, Burlingame, USA
Aqua ad iniectabilia	B. Braun AG, Melsungen, D
Bacto-Yeast-Extract	BD Biosciences, Sparks, USA
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, D
BioStab PCR Optimizer	Bitop, Witten, D
Biotin	Vector, Burlingame, USA
Bovines Serum Albumin (BSA)	Roche Diagnostics, Mannheim, D
CaCl ₂	Merck, Darmstadt, D
$C_8H_{18}N_2O_4S$	Merck, Darmstadt, D
Diaminobenzidin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DMSO	Merck, Darmstadt, D
dNTPs 25mM	GE Healthcare, München, D
DTT 0,1M	Invitrogen, Karlsruhe, D
Dulbecco's PBS (1x, steril)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, D
EDTA	Biochrom KG, Berlin, D

Eosin	Merck, Darmstadt, D
Ethanol	Merck, Darmstadt, D
Fetal Calf Serum (FCS)	Biochrom KG, Berlin, D
First strand Buffer 5x	Invitrogen, Karlsruhe, D
Formalin	Merck, Darmstadt, D
H_2SO_4	Roth, Karlsruhe, D
Hämatoxylin	Morphisto, Frankfurt, D
HCl	Merck, Darmstadt, D
Hexanucleotide	Roche, Mannheim, D
KCl	Merck, Darmstadt, D
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt, D
Linear Acrylamid	Ambion, Darmstadt, D
MacConkey-Agar	Roth, Karlsruhe, D
Methanol	Merck, Darmstadt, D
Methylgrün	Morphisto, Frankfurt, D
MgCl	Merck, Darmstadt, D
MgCl ₂ 25mM	Fermentas, St. Leon-Rot, D
Na ₂ HPO	Merck, Darmstadt, D
NaCl	Merck, Darmstadt, D
NaOH	Merck, Darmstadt, D
Natriumazid	Merck, Darmstadt, D
Nickelchlorid	Merck, Darmstadt, D
Nuclear Fast Red Solution	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Paraffin	Merck, Darmstadt, D
Periodic acid-Schiff-Reagenz (PAS)	Bio-Optica, München, D
Pertex	Medite, Burgdorf, D
RNAlater	Qiagen GmbH, Hilden, D
RNase free Spray	Gene Choice, Frederick, USA
RNAsin (40 U/µl)	Promega, Mannheim, D
RPMI Glutamax	Invitrogen, Karlsruhe, D
Silbernitrat	Merck, Darmstadt, D
Superscript II	Invitrogen, Karlsruhe, D
SYBR Green Dye detection	Applied Biosystems, Norwalk, USA
Sysmex Cellpack Puffer	Sysmex D. GmbH, Norderstedt, D
Taq DNA Polymerase	New England BioLabs, Ipswich, USA
Taq Puffer without detergent 10x	Fermentas, St. Leon-Rot, D
Tris	Serva Electrophoresis, Heidelberg, D
Tryptophan	Roth, Karlsruhe, D

Tween-20 Wasserstoffperoxid Xylol Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D BD Biosciences, San Diego, USA Fisher Scientific, Pittsburgh, USA

Tubene 7. Elosungen			
Lösung	Reagenz	Menge	
Blockierlösung (ELISA)	PBS/Tween	100ml	
	BSA	0,5g	
Carbonat-Puffer 0,05M	H ₂ O	500ml	
	NaHCO	2,1g	
	Na2CO3	2,645g	
CMF-Lösung	HBSS 10x	50ml	
	HEPES-BicPuffer 10x	50ml	
	FCS	25ml	
	H ₂ O	ad 500ml	
DTE	HBSS-Puffer	50ml	
	HEPES-BicPuffer 10x	50ml	
	FCS	50ml	
	H ₂ O	ad 500ml	
EDTA-Lösung	HBSS 10x	50ml	
	HgPg-Puffer 100x	5ml	
	EDTA 0,5M	1,3ml	
	H ₂ O	ad 500ml	
Harvest medium	RPMI Glutamax	500ml	
	FCS	25ml	
	HgPg-Puffer 100x	5ml	
HBSS-Puffer 10x	NaCl	80g	
	KCl	4g	
	Na ₂ HPO ₄	0,621g	
	KH ₂ PO ₄	0,6g	
	H ₂ O	ad 1000ml	
	Titration mit NaOH/HCl a	uf pH 7,4	
HEPES-Bicarbonat-Puffer 10x	$C_8H_{18}N_2O_4S$	23,8g	
	NaHCO ₃	21g	
	H ₂ O	ad 1000ml	
	Titration mit NaOH/HCl auf pH 7,2		

Tabelle 9: Lösungen

HgPg-Puffer 100x	$C_8H_{18}N_2O_4S$	59,6g
	RPMI Glutamax	500ml
	Titration mit NaOH/HCl a	uf pH 7,5
FACS Puffer	DPBS	500ml
	BSA	1g
	Natriumazid	0,5g
LB-Agar	Tryptophan	10g
	NaCl	10g
	Hefeextrakt	5g
	H ₂ O	ad 1000ml
	Titration mit NaOH/HCl a	uf pH 7,2-7,3
	Agar-Agar	50g
Kollagenase-Lösung	RPMI Glutamax	500ml
	FCS	55ml
	HgPg-Puffer 10x	5,5ml
	MgCl ₂ 0,5M	1ml
	Kollagenase	1mg/ml
MacConkey-Agar	MacConkey-Agar	50g
	H ₂ O	ad 1000ml
	Agar-Agar	5g
PBS-Puffer 10x	NaCl	80,0g
	Na2HPO4	11,6g
	КН2РО	2,0g
	KCl	2,0g
	H ₂ O	ad 1000ml
	Titration mit NaOH/HCl a	uf pH 7
TBS-Puffer 10x	Tris	60,57g
	NaCl	81,82g
	H ₂ O	ad 1000ml
	Titration mit NaOH/HCl a	uf pH 8
qPCR-Mastermix	Taq Puffer 10x	2ml
	dNTP 25mM	150µl
	BioStab PCR optimizer	4ml
	BSA 20mg/ml	200µl
	SYBR Green I	40µ1
	MgCl ₂ 25mM	2,4ml
	H ₂ O	1210µl

Tabelle 1	0:	Antikörper
-----------	----	------------

Antikörperbezeichnung	Hersteller
Antikörper für FACS	
Anti-Maus CD3ɛ FITC (clone 145-2C11)	BD, Heidelberg, D
Anti-Maus CD4 APC (clone RM4-5)	BD, Heidelberg, D
Anti-Maus CD8 PerCP (clone 53-6.7)	BD, Heidelberg, D
Anti-Maus CD69 PE (clone H1.2F3)	BD, Heidelberg, D
Anti-Maus CD11c PE (clone HL3)	BD, Heidelberg, D
Anti-Maus CD25 PerCP; (clone PC61)	BD, Heidelberg, D
Anti-Maus CD86 FITC (clone GL1)	BD, Heidelberg, D
Anti-Maus IL-17 APC (ebio17B7)	BD, Heidelberg, D
Anti-Maus CD11b APC (553312)	BD, Heidelberg, D
Anti-Maus IFN-y PE	BD, Heidelberg, D
Anti-Maus Ly6C FITC (clone AL-21)	BD, Heidelberg, D
Anti-Maus Ly6G FITC (clone 1A8)	BD, Heidelberg, D
Anti-Maus CD45 PE (clone 30-F11)	BD, Heidelberg, D
Anti-Maus FOXP3 PE (clone 150D)	BioLegend, San Diego, USA
Anti-Maus F4/80 APC (clone MCA)	AbD SeroTec, Düsseldorf, D
Anti-Maus Ly6B.2/7/4 PE (MCA 77)	AbD SeroTec, Düsseldorf, D
Antikörper für Immunhistochemie:	
Ratte Anti-Mensch CD3 (MCA1477)	SeroTec, Oxford, GB
Ratte Anti-Maus F4/80 (MCA497G)	SeroTec, Oxford, GB
Ziege Anti-ZO-1 (Invitrogen 61-7300)	Invitrogen, Karlsruhe, D

Primerbezeichnung	Sequenz	
18s	forward	5'-GCAATTATTCCCCATGAACG -3'
	reverse	5'- AGGGCCTCACTAAACCATCC -3'
Claudin-1	forward	5'-GTTTGCAGAGACCCCATCAC-3'
	reverse	5'-AGAAGCCAGGATGAAACCCA-3'
Claudin-2	forward	5'-TATGTTGGTGCCAGCATTGT-3'
	reverse	5'-TCATGCCCACCACAGAGATA-3'
Claudin-3	forward	5'-GCACCCACCAAGATCCTCTA-3'
	reverse	5'-AGCCTGTCTGTCCTCTTCCA-3'
Claudin-4	forward	5'-ATGGCGTCTATGGGACTACA-3'
	reverse	5'-TTACACATAGTTGCTGGCGG-3'
IFNγ	forward	5'-TTCTTCAGCAACAGCAAGGC-3'
	reverse	5'-TCAGCAGCGACTCCTTTTCC-3'
IL-6	forward	5'-TGATGCACTTGCAGAAAACA-3'
	reverse	5'-ACCAGAGGAAATTTTCAATAGGC-3'
----------	---------	-------------------------------
IL-17	forward	5'-TCTCCACCGCAATGAAGACC-3'
	reverse	5'-CACACCCACCAGCATCTTCT-3'
IL-22	forward	5'-TGGGATTTGTGTGCAAAAGCA-3'
	reverse	5'-TAATTTCCAGTCCTGTCTTCTG-3'
Occludin	forward	5'-GATTCCTCTGACCTTGAGTGTG-3'
	reverse	5'-TAGGTGGATATTCCCTGACCC-3'
PTX-2	forward	5'-AGCTGCTGCTGTCATACCCT-3'
	reverse	5'-CAGATTCTCTGGGGGAACACAA-3'
TNFα	forward	5'-CCACCACGCTCTTCTGTCTAC-3'
	reverse	5'-AGGGTCTGGGCCATAGAACT-3'
ZO-1	forward	5'-AATGTATAGCACGGACAGTAGAC-3'
	reverse	5'-TCTCTGCTGGCTTGTTTTTC-3'
ZO-2	forward	5'-AATGCGAGGATCGAAATAGC-3'
	reverse	5'-TAGCTTCCTCTGGTGTCCTG-3'

Tabelle 12: Software

Produkt	Hersteller
CellQuest Pharmingen (FACS)	BD Pharmingen, Heidelberg, D
FlowJo (FACS)	TreeStar, Ashland, USA
GraphPad Prism	GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA
Image J	NIH, Bethesda, USA
GIMP	Spencer Kimball, Peter Mattis
Microsoft Excel	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft Word	Microsoft Corporation, Redmond, USA

2.2. Methoden

2.2.1. Mausmodell und experimentelles Design

Experimentell gliederte sich die Arbeit in zwei Teile: Der erste Teil hatte die Charakterisierung des verwendeten Mausmodells für chronische Nierenkrankheit im Hinblick auf Ausmaß der Nierenerkrankung, Darmflora, systemische Entzündung und Darmbarriere zum Ziel. Im zweiten Teil wurde der Effekt einer antibiotischen Intervention zur Eradikation der Darmflora auf diese Merkmale untersucht.

Das dieser Arbeit zugrunde liegende CKD-Mausmodell basiert auf einer oxalathaltigen Diät. Erhöhte Serumoxalatspiegel führen über die Bildung von Kalziumoxalatkristallen in der Niere zu tubulären Entzündungsreaktionen, Untergang von Nephronen und schließlich Vernarbungen im Nierengewebe und auf diese Weise zu einer chronischen renalen Funktionseinschränkung [33, 164]. Ein entsprechendes Mausmodell für chronische Nierenerkrankung wurde vor der Durchführung der Experimente noch nicht in ausreichender Weise charakterisiert und publiziert. Inzwischen existieren jedoch publizierte Daten aus der Arbeitsgruppe von Professor Anders, mit denen sich die hier erhobenen Daten vergleichen lassen [165]. Allerdings fehlen in der publizierten Studie wichtige für die Fragestellung dieser Arbeit relevante Parameter. Für diese Arbeit wurde zur Charakterisierung des Modells weiblichen C57BL/6N-Mäusen ab einem Alter von sieben bis neun Wochen ein mit gutlöslichem Natriumoxalat angereichertes, kalziumarmes Spezialfutter [33], im Folgenden "CKD-Diät" genannt, verabreicht. Um das intestinale Mikrobiom sowohl in der CKD- als auch in der Kontrollgruppe einer vergleichbaren Umgebung auszusetzen, wurde als Kontrolldiät im ersten Teil der Arbeit eine zusätzlich mit Kalzium angereicherte "CKD-Diät", im Folgenden "Kontrolldiät" genannt, verwendet. Da Oxalat bei entsprechender Kalziumkonzentration schon im Darm mit Kalzium zu Kalziumoxalat komplexiert, sollte auf diese Weise trotz Oxalatexposition der Darmbakterien eine systemische Aufnahme des Oxalats und damit eine renale Schädigung verhindert werden [15, 166, 167]. Um den Verlauf der interessierenden Parameter beurteilen zu können, wurden Gruppen von 5-12 Tieren gebildet und vor der Organentnahme je 0, 5, 10, 15 oder 20 Tage mit der "CKD-" respektive mit der "Kontrolldiät" gefüttert. Dies ist in Abbildung 6 schematisch dargestellt. Nach erster Auswertung der Ergebnisse des ersten experimentellen Teils wurde für die Interventionsstudie von einer stabilen CKD nach 10 Tagen "CKD-Diät" ausgegangen. So wurden 18 Tiere 10 Tage lang mit "CKD-Diät" gefüttert. Hieran schloss sich die ebenfalls 10-tägige Interventionsphase an, während welcher die intestinale, bakterielle Besiedelung der Tiere mittels Antibiotika eradiziert werden sollte.



Abbildung 6: Schema des Versuchsaufbaus des experimentellen Teils 1. Q = weiblich, † = Organentnahme, CKD-Diät: oxalathaltig, kalziumarm; "Kontrolldiät": oxalathaltig, kalziumreich; eigene Darstellung.

Die Diät wurde für die Interventionsphase ebenfalls umgestellt. Hierfür wurde die sowohl kalzium- als auch oxalatarme "Basisdiät" gewählt, um Effekte einer akuten Oxalataufnahme auszuschließen und einzig die Auswirkungen der Intervention auf die nierenkranken Tiere zu untersuchen. In der Interventionsphase erhielt die eine Hälfte der Tiere (Interventionsgruppe) täglich morgens in Wasser gelöste Antibiotika. Diese Antibiotika wurden als Mixtur verabreicht, die sich folgendermaßen zusammensetzte: Die in Pulverform vorliegenden Antibiotika, wurden in H₂O so gelöst, dass sich Konzentrationen von Neomycin 25mg/ml, Ampicillin 115,5mg/ml und Metronidazol 12,5mg/ml ergaben und im Verhältnis 71:37:142 gemischt. Den Tieren wurden 3,53 ml/kgKG (Neomycin 25 mg/kgKG, Ampicillin 60 mg/kgKG, Metronidazol 25 mg/kgKG) dieser Mischung verabreicht. Der anderen Hälfte der Tiere (Interventions-Kontrollgruppe) wurde zur Scheinbehandlung ein entsprechendes Volumen Wasser verabreicht. Die Tiere wurden hierzu in der Hand gehalten, während die entsprechende Flüssigkeit per Pipette mit 200µl-Pipettenspitze oral verabreicht wurde. Das Design der Interventionsstudie ist in Abbildung 7 schematisch dargestellt.

2.2.2. Probengewinnung und Tierhaltung

Die finale Organentnahme beendete den Versuch. Zuvor wurden Faecesproben gewonnen, die direkt nach der Ausscheidung in einem autoklavierten Gefäß aufgefangen wurden.



Abbildung 7: Schema des Versuchsaufbaus des experimentellen Teils 2.

Q = weiblich, † = Organentnahme, "CKD-Diät": oxalathaltig, kalziumarm, "Basisdiät": oxalatarm, kalziumarm; eigene Darstellung.

Der Organentnahme ging eine Gewichtskontrolle, sowie die letzte Gewinnung von Faecesproben voraus. Anschließend erfolgte eine intraperitoneale Injektionsnarkose mit Medetomedin, Midazolam und Fentanyl, die gewichtsabhängig dosiert wurde (Medetomin 0,5 mg/kgKG, Midazolam 5,0 mg/kgKG und Fentanyl 0,05mg/kgKG). Nach Erlöschen sämtlicher Schutzreflexe wurde der retrobulbär gelegene Venenplexus mit einer nicht heparinisierten Glaskapillare (Durchmesser 0,8mm) unter leichtem Drehen vom nasalen Augenwinkel her punktiert [168]. Die ersten 50µl Blut wurden zur Abmessung in eine spezielle Sysmex-Kapillare weitergeleitet und zur Koagulationshemmung im Verhältnis 1:5 mit Sysmex Cellpack Puffer vermischt. Weitere 300µl Blut wurden direkt in ein 1,5ml Reaktionsgefäß geleitet zur Serumgewinnung nach natürlicher Koagulation. Die Maus wurde nun zur Eröffnung des Situs auf einem mit Aluminiumfolie überspannten Styroporbrett aufgespannt. Um einer Keimverschleppung vorzubeugen, wurden drei separate zuvor sterilisierte Bestecksets für drei verschiedene Gewebsschichten (Haut und subkutanes Gewebe, Faszien, Organe) verwendet. Nach Eröffnung des Thorax wurde der linke Ventrikel punktiert und das so gewonnene Blut in ein steriles Gefäß überführt.

Anschließend wurden Milz, Leber und Nieren entnommen, entkapselt (nur Nieren) und mit einem Skalpell zerteilt, damit sie auf folgende Weise asserviert werden konnten: in 500µl RNAlater bei -20°C zur RNA-Analyse, in 10%-Formalin zur histologischen Weiterverarbeitung, in Flüssigstickstoff (Asservierung -80°C) zur möglichen Proteinanalyse und in PBS auf Eis zur Aufbereitung für die Durchflusszytometrie und für die Leber auch zur mikrobiologischen Kultur. Ebenso wurde mit Ileum und Colon verfahren. Außerdem wurde ein 1cm langes Stück des terminalen Ileums mit 300µl PBS dreimal von jeder Seite gespült und die Spülflüssigkeit zur Analyse des sekretorischen IgAs bei -20°C aufgehoben. Die Überreste der Tiere wurden sachgemäß über das Institut entsorgt.

Art der Probe	Verwendungszweck	Asservierung
Faeces	Mikrobiologische Kultur	PBS, sofortige Verarbeitung
	Albumin-ELISA	-20°C
Retrobulbär gewonnenes Blut	Serumchemie	Raumtemperatur
	Hämatologie	EDTA, auf Eis
Kardial gewonnenes Blut	LAL-Assay	-20°C
Niere, Leber, Milz, Ileum und	mRNA-Analyse	RNAlater, -20°C
Colon	Histologie	Formalin, Raumtemperatur
	FACS	PBS, auf Eis
	Proteinanalyse (n. d.)	-80°C
	Mikrobiologische Kultur	PBS, auf Eis
	(nur Leber)	
Ileumspülung	sIgA-ELISA	PBS, -20°C

 Tabelle 13: Übersicht über Proben, Asservierung und Verwendungszweck

Sämtliche Versuche wurden mit weiblichen C57BL/6N-Mäusen der Firma Charles River Laboratories, Sulzfeld, D, durchgeführt. C57BL/6 ist einer der am häufigsten verwendeten und daher mit am besten untersuchten Inzuchtstämme für Versuchsmäuse [169]. Pro Käfig wurden zwei bis fünf Mäuse unter kontrolliert-pathogenfreien Bedingungen und bei 12 Stunden-Hell-Dunkel-Rhythmus, sowie konstanter Luftfeuchtigkeit und Temperatur gehalten. Den Mäusen standen kleine Wattekissen zum Nestbau und rote Polycarbonathütten als Schutzraum zur Verfügung. Mit Ausnahme der Spezialdiäten wurden die Käfige und deren Inhalt vor Gebrauch durch Autoklavieren sterilisiert. Käfigwechsel erfolgten mindestens wöchentlich und die Versuchstiere hatten durchgehend freien Zugang zu Wasser und Futter. Ausnahmslos entsprachen die durchgeführten Experimente den Vorschriften des deutschen Tierschutzgesetzes, sowie der EU-Richtlinie 2010/63/EU 1356 [170] und erfolgten nur nach Genehmigung durch die Regierung von Oberbayern.

2.2.3. Mikrobiologische Kultur aus Faeces und Lebergewebe

Per Ausstrichverfahren sollten Informationen über die bakterielle Darmflora gewonnen werden. Hierzu wurden die gewonnenen Faecesköttel gewogen und in sterilem PBS per Pipette und durch Vortexen suspendiert. Anschließend wurden Verdünnungsreihen durchgeführt und die verdünnten Suspensionen mit sterilen Spateln auf verschiedene Kulturmedien, die in Petrischalen vorgelegt waren, ausgestrichen. Zur Anwendung kamen hierbei MacConkey-Agar, LB-Agar und Vollblut-Agar. Abschließend wurden die Platten

aerob oder anaerob für 14 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ bebrütet. Durch die unterschiedlichen Nährmedien, Bebrütungsmodi und Verdünnungen sollte ein möglichst umfassendes, qualitatives sowie quantitatives Bild des intestinalen Mikrobioms erstellt werden. Am zuverlässigsten erwies sich die primäre Suspension des Faeces-Köttels in 1ml PBS und eine Verdünnung von 50µl dieser Suspension in weiteren 900µl PBS mit Ausplattierung von je 50µl dieser Verdünnungen und aerober Bebrütung. Auf dieser Vorgehensweise basieren daher die im Ergebnisteil präsentierten Daten fast ausschließlich.

Ähnlich wurde auch mit Lebergewebe verfahren: Dieses wurde nach der Entnahme gewogen und anschließend durch einen 100µm Filter zerkleinert und mit PBS ausgespült. Es folgte eine Zentrifugation und eine Resuspension des Pellets in PBS. Diese Resuspension wurde auf den verschiedenen Medien ausgestrichen. Die Bebrütung erfolgte wie bereits beschrieben.

Während die Vollblut-Agar Platten bereits benutzungsfertig vom Hersteller bezogen wurden, erfolgte die Herstellung von LB- (engl.: *lysogeny broth*) und MacConkey-Agar vor Ort. Hierzu wurden die im Materialteil aufgeführten Rezepturen in 1000ml H₂O gelöst, bei 121°C autoklaviert und unter keimarmen Bedingungen auf Petrischalen verteilt. Nach dem Abkühlen und Aushärten wurden diese bei 4°C bis zur Verwendung gelagert.

Die quantitative Auswertung erfolgte über das Auszählen von Bakterienkolonien, sogenannter *colony forming units* (CFU), und der Extrapolation dieser Zahlen auf die CFU-Zahl pro Milligramm der Faeces bzw. Lebergewebe. Zur qualitativen Auswertung war eine Bewertung der CFUs anhand morphologischer Kriterien wie Form- und Farbe vorgesehen. Dies konnte jedoch letztendlich aufgrund des unsystematischen Auftretens verschiedenster Morphologien nicht umgesetzt werden. Jedoch unterscheiden sich die verschiedenen Nährböden und Bebrütungsmodi hinsichtlich der Spezienspezifität, was eine eingeschränkte qualitative Zuordnung zulässt. So sind LB- und Vollblutmedien eher unspezifisch, während auf MacConkey-Agar nur gram-negative Stämme gedeihen.

2.2.4. Analyse von Blutbild, Serumelektrolyten und Retentionsparametern

Die Bestimmung des Blutbildes und der Serumkonzentrationen der Elektrolyte Natrium, Kalium, Kalzium, Chlorid und Phosphat sowie der Retentionsparameter Harnstoff, Harnsäure und Kreatinin erfolgte in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Klinische Chemie der German Mouse Clinic, München. Hierhin wurden die EDTA-Blutproben nach jedem Versuchsabschluss unverzüglich unter Kühlung auf Eis gebracht, sodass die hämatologischen Parameter mithilfe eines Sysmex XT2000iV gemessen werden konnten. Es wurde über die Einstellung "CBC DIFF RET" ein Differenzialblutbild der Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten inklusive von Retikulozyten und Parametern zur Zellmorphologie und -verteilung erstellt [171]. Serumproben wurden bei -20°C gelagert und je 100µl mit einem Beckman-Coulter AU480 analysiert. Es erfolgte hier die Bestimmung der Elektrolyte Natrium, Kalium, Chlorid, Kalzium und Phosphat sowie der Retentionsparameter Kreatinin, Harnstoff und Harnsäure. Die Kreatininkonzentration wurde hierbei auf enzymatische Weise bestimmt. Die Durchführung der Messung geschah durch das Fachpersonal der German Mouse Clinic.

2.2.5. Leukozytendifferenzierung mittels Durchflusszytometrie

Ein bedeutender Teil der Immunphänotypisierung erfolgte per Durchflusszytometrie (FACS, *fluorescence-activated cell sorting*). Durch FACS lassen sich physikalische Eigenschaften einzelner Zellen einer Zellsuspension erfassen. Auf diese Weise lässt sich der Anteil von Zellsubpopulationen, die eine gewisse Eigenschaft erfüllen, ins Verhältnis zur Gesamtzellzahl der Zellsuspension setzen. Neben Größe und Granularität der Zellen gehört zu den mit dieser Methode messbaren Eigenschaften die frequenzabhängige Fluoreszenz. Durch Fluoreszenzfarbstoff-markierte Antikörper, die sich gegen Zellgruppen-spezifische Epitope richten, ist es möglich diese voneinander zu unterscheiden.

Funktionsprinzip der Durchflusszytometrie ist das einzelne Vorbeischleusen der Zellen an einem Laser. Dies wird erreicht, indem die Zellen in einer Kapillare hydrodynamisch fokussiert werden. Beugung und Streuung des Laserstrahls geben Auskunft über Größe und Granularität der Zelle. Außerdem wird die fluoreszenzbedingte Lichtemission der Zelle detektiert. Zur Lichtemission kommt es bei optimaler Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes, die dadurch ihr Energieniveau wechseln und dabei Photonen emittieren. Da diese Fluoreszenz stark von der Frequenz des anregenden Laserlichts abhängt, können verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe durch unterschiedliche Anregungsfrequenzen sensitiv unterschieden werden [172]. Mit dem hier verwendeten FACSCalibur™ ließen sich vier verschiedene Farbstoffe unterschieden.

Ziel war die Erfassung von Leukozytenpopulationen aus Milz, Leber, Niere und Ileum. Nach der Entnahme der Organe mussten die Leukozyten zunächst aus dem Gewebeverband gelöst und in eine Einzelzellsuspension überführt werden, um anschließend mit fluoreszierenden Antikörpern markiert zu werden. Hierfür wurden die Organe durch Pressen durch einen sterilen 70µm Filter zerkleinert und in PBS suspendiert. Die weitere Verarbeitung dieser Suspension zur Einzelzellsuspension umfasste die Lyse der unerwünschten Erythrozyten sowie wiederholtes Waschen mit PBS durch Zentrifugation und Dekantieren des Überstands. Zuletzt wurde die Suspension durch einen feineren 30µm Filter gedrückt und gewaschen. Die verbliebenen Zellen wurden in 2-5ml FACS-Puffer gelöst.

Die Präparation der Ileumproben unterschied sich hier von den übrigen und wurde wie 2012 von Sheridan und Lefrançois [173] publiziert durchgeführt. Im ersten Schritt musste das Präparat hierzu von Faeces-, Fett- und Mediastinumresten befreit werden. Dies erfolgte durch Spülung und feuchter Präparation bei Temperaturen um 4°C, wobei ein spezieller kalziumund magnesiumfreier Puffer (CMF-Puffer) verwendet wurde. Nun folgte eine Inkubation mit DTE bei 37°C. Die in Lösung befindlichen Zellen wurden durch einen 70µm Filter filtriert, abzentrifugiert und in *harvest medium* in Suspension gebracht. Das verbliebene Darmgewebe wurde nach Inkubation in EDTA-Lösung, *harvest medium* und Kollagenase-Lösung durch einen 70µm Filter gepresst und in *harvest medium* suspendiert. Die beiden Suspensionen wurden vereint und nach einem Waschschritt in 1ml FACS-Puffer resuspendiert.

Die fertigen Einzelsuspensionen mussten vor der FACS-Analyse nun noch mit den entsprechenden fluoreszierenden Antikörpern "gefärbt" werden. Die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe waren Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Peridinin Chlorophyll Protein Complex (PerCP) und Allophycocyanin (APC). Die damit konjugierten Antikörper gegen CD- (engl.: cluster of differentiation) Epitope der Zellen finden sich in Tabelle 14. Für Niere, Milz und Ileum wurden sechs (A-F) und für die Leber zwei (C, F) verschiedene Sets aus je zwei bis vier Antikörpern angefertigt, um eine genaue Differenzierung der Leukozyten zu erreichen. In Tabelle 15 ist eine Aufschlüsselung der untersuchten Leukozytenpopulationen und der dazugehörigen CD-Oberflächenantigene aufgeführt. Zur Stimulation der T-Zellen erfolgte eine Inkubation in PBS mit Zusatz von 50 pg/µl PMA und 1 ng/µl Ionomycin für 4,5 Stunden. Für die Anfärbung der Zellen wurden die Antikörper zu je 100µl der fertigen Einzelzellsuspensionen gegeben, inkubiert und gewaschen. Für intrazellulär bindende Antikörper (FoxP3, IL17) musste zusätzlich eine Fixation und Permeabilisierung der Zellmembran per Cytofix Kit durchgeführt werden. Abschließend erfolgte die Analyse mithilfe des FACSCaliburTM.

	Set A1	Set A2	Set B	Set C	Set D	Set E	Set F
FITC	CD3	CD3	CD3	Ly6G	CD86	Ly6C	CD3
PE	CD69	CD45	FoxP3	CD11c	CD11c	Ly6B	IFNγ
PerCP	CD8	CD8	CD25	-	-	-	CD4
APC	CD4	CD4	CD4	CD11b	F4/80	-	IL17
Organe		Niere	Niere	Niere	Niere	Niere	Niere
	Milz		Milz	Milz	Milz	Milz	Milz
	Ileum		Ileum	Ileum	Ileum	Ileum	Ileum
					Leber		Leber

Tabelle	e 14: Färbungs	-Sets für	FACS-	Analyse
---------	----------------	-----------	-------	---------

Leukozytenpopulationen	Clusters of differentiation, Ly-Moleküle
Leukozyten	CD45+
Aktivierte Lymphozyten	CD69+
T-Zellen	CD3+
T-Helfer-Zelle	CD3+CD4+
Aktivierte T-Helfer-Zellen	CD3+CD4+CD69+
Aktivierte T-Helfer-Zellen	CD3+CD4+CD25+
Aktivierte regulatorische T-Zellen	CD3+CD4+CD25+FoxP3+
Th1-Zellen	CD3+CD4+IFNy+
Th17-Zellen	CD3+CD4+IL17+
Zytotoxische T-Zellen	CD3+CD8+
Aktivierte zytotoxische T-Zellen	CD3+CD8+CD69+
Antigen-präsentierende Zellen	CD11c+
Aktivierte Antigen-präsentierende Zellen	CD11c+CD86+
Granulozyten	CD11c+Ly6G++
Neutrophile Granulozyten	CD11b+Ly6G++
Makrophagen	F4/80+
Aktivierte Makrophagen	F4/80+CD86+
Monozyten	Ly6C+
Inflammatorische Monozyten	Ly6B+Ly6C+

 Tabelle 15: Leukozytenpopulationen und dazugehörige Oberflächenantigene [174-176]

2.2.6. ELISA

Der *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA) stellt ein etabliertes immunologisches Nachweisverfahren für immunogene Moleküle dar. Prinzipiell erfolgt der Nachweis über das Binden eines spezifischen Antikörpers an das nachzuweisende Molekül und eine darauffolgende messbare chemische Reaktion, die abhängig von der Konzentration des gebundenen Antikörpers verläuft.

Der in dieser Arbeit verwendete "*Sandwich*"-ELISA funktioniert wie folgt: Ein erster Antikörper (engl.: *coating antibody*) wird auf einer 96-well-Microtiterplatte vorgelegt und ist dadurch fest mit der Platte verbunden. Anschließend wird die Probe aufgetragen. Während der Inkubation binden entsprechende in der Probe enthaltene Moleküle an den fixierten *coating*-Antikörper. Nach einem Waschschritt wird ein zweiter Antikörper (engl.: *detection antibody*) zugegeben, der an ein anderes Epitop des nachzuweisenden Moleküls bindet und die chemische Reaktion vermittelt. Dies geschah in diesem Fall über das mit dem *detection*-Antikörper direkt oder indirekt verbundene Enzym Meerrettichperoxidase (engl.: *horseradish peroxidase*), das ein Tetramethylbenzidin-Substrat spaltet und auf diese Weise zu einem Farbumschlag führt. Die chromogene Reaktion verläuft konzentrationsabhängig und kann photometrisch quantitativ gemessen werden, was mithilfe von Standardproben die Ermittlung

der Probenkonzentration ermöglicht. Die folgenden Substanzen wurden auf diese Weise quantitativ bestimmt.

2.2.7. Murines Albumin in Faecesproben

Serumalbumin ist ein Makroprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 66 kDa, das unter physiologischen Umständen aufgrund seiner Moleküleigenschaften physiologischerweise kaum passiv in das Darmlumen gelangt oder aktiv sezerniert wird [177]. Daher wurde hier die Konzentration intraluminalen Albumins als Marker für das Ausmaß einer Schädigung des Darmepithels bestimmt. Hierzu erfolgte, wie bei der mikrobiellen Untersuchung der Faeces, eine Entnahme direkt von der defäkierenden Maus, um Verunreinigungen oder enzymatischen oder bakteriellen Abbau des Albumins zu verhindern und die zeitliche sowie individuelle Zuordenbarkeit zu gewährleisten. Nach dem Wiegen der Proben wurden diese bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Zunächst erfolgte nun das Coating, wozu in jeder Vertiefung einer 96-well-Microtiterplatte 100µl in Carbonatpuffer 1:1000 verdünnter Anti-Mausalbumin-Antikörper vorgelegt und abgedeckt bei 4°C über Nacht inkubiert wurde. Am Folgetag wurde die Platte mit einer 0,05% Tween-PBS-Lösung gewaschen und die Vertiefungen mit je 125µl Blockierlösung bestehend aus 0,05% Tween-PBS-Lösung mit 5g/l BSA versehen. Nach einer 30-minütigen Inkubationsphase bei Raumtemperatur folgte ein weiterer Waschschritt mit 0,05% Tween-PBS-Lösung. Anschließend erfolgte die Auftragung von je 100µl Probe bzw. Standard, nachdem eine entsprechende Verdünnung in Blockierlösung durchgeführt worden war. Für den Standard wurden elf Konzentrationen in Höhe von 2000ng/ml x 0,5ⁿ und eine Leerprobe aufgetragen. Die Faecesproben wurden in 500µl PBS gelegt und per Sonicator zerkleinert (2x für je 10 Sekunden). Anschließend wurden übrige feste Bestandteile abzentrifugiert und verworfen. Vorversuche zeigten, dass eine weitere Verdünnung von 1:200 in Blockierlösung am ehesten Konzentrationen im Bereich der Standardkurve lieferte. Es wurden je zwei Vertiefungen mit derselben Probe beladen, um Unregelmäßigkeiten nicht zu übersehen. Nach diesem Schritt folgte eine weitere Inkubation von 60 Minuten bei Raumtemperatur mit abschließendem Waschschritt. Nun wurde der 1:10000 in Blockierlösung verdünnte und mit der Meerrettichperoxidase konjugierte detection antibody (je 100µl) dazugegeben und es wurde wieder für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert mit abschließendem Waschschritt. Zuletzt wurden die Substrate A und B im Verhältnis 1:1 gemischt und je 100µl der Lösung wurden in jede Vertiefung pipettiert. Der Standard wurde beobachtet und bei optimaler visueller Differenzierung der Standardreihe wurde die Reaktion durch die Zugabe von Schwefelsäure unterbrochen. Die kolorimetrische Messung erfolgte bei 450nm mit dem ELISA-*Reader*. Zur Auswertung wurde eine nichtlineare, sigmoidale Regression mit GraphPad durchgeführt.

2.2.8. Sekretorisches Immunglobulin A in intestinalem Mukus

Sekretorisches Immunglobulin A (sIgA) spielt eine entscheidende Rolle für die immunologische Komponente der physiologischen Darmbarriere (vgl. Kapitel 1.2). Eine Zunahme von Entzündungsaktivität im Bereich der Darmbarriere sollte daher mit einer erhöhten Sekretion von sIgA einhergehen. Zur Bestimmung des sIgAs wurde nach der Entnahme des Darms 1cm des terminalen Ileums mit 300µl PBS mehrmals durchspült. Die so gewonnene Spülung wurde 20 Minuten zentrifugiert und anschließend bei -20°C aufbewahrt. Die Bestimmung erfolgte in diesem Fall gemäß des Protokolls des verwendeten Kits. Als Reaktionsprinzip kam die Avidin-Biotin-Complex (ABC) Methode zur Anwendung. Hierbei ist der *detection antibody* nicht direkt mit der Meerrettichperoxidase konjugiert, sondern mit Biotin, welches in einem weiteren Schritt an mit der Meerrettichperoxidase konjugiertes Avindin bindet. Die optische Messung und Auswertung erfolgten wie oben beschrieben.

2.2.9. Weitere kolorimetrische Nachweisverfahren

2.2.9.1. LAL-Test in Serum

Der Limulus-Amöbozyten-Lysat (LAL) Test wird zum Nachweis von Lipopolysacchariden (LPS) der Zellwand gramnegativer Bakterien verwendet [178]. Diese Methode wurde hier im Serum durchgeführt, um Hinweise auf eine Translokation bakterieller Endotoxine in den systemischen Kreislauf zu gewinnen. Um eine Kontamination durch Hautflora zu vermeiden wurde speziell für diesen Test Blut kardial und unter sterilen Kautelen gewonnen. Aufgrund von nur sehr geringer Ergiebigkeit der kardialen Punktion wurden auch Analysen mit retrobulbär entnommenem Blut durchgeführt. Diese sind im Ergebnisteil getrennt aufgeführt. Die Durchführung entsprach dem Protokoll des verwendeten Kits. Das Funktionsprinzip des Tests besteht in der Reaktion von lysierten Amöbozyten, die aus dem Blut von Pfeilschwanzkrebsen (engl.: *Limulus polyphemus*) gewonnen werden, auf LPS gramnegativer Bakterien. Diese Reaktion ist chromogen und lässt sich nach Beenden durch die spektrophotometrische Messung der Adsorption bei 405nm quantifizieren. Aufgrund der Anfälligkeit für Verfälschungen durch kleinste Verunreinigungen wurde der Test unter speziellen pyrogenfreien Bedingungen durchgeführt.

2.2.10. mRNA Analyse

Durch Anwendung der Polymerasekettenreaktion (engl.: *polymerase chain reaction*, PCR) können Zellen aus soliden Organen sowohl qualitativ als auch quantitativ auf bestimmte RNA-Sequenzen hin untersucht werden. So ist es möglich, Rückschlüsse auf die Transkription dieser Sequenzen zu gewinnen. Zur quantitativen Analyse wurde in dieser Arbeit wie folgt vorgegangen.

2.2.10.1. RNA-Isolierung

Zur Isolierung der RNA wurden die Organstücke von RNAlater in beta-Mercaptoethanolhaltigen "Lysis buffer" überführt und durch Mixen mit dem Sonicator homogenisiert. Die Isolierung der RNA wurde entsprechend dem PureLink® RNA Mini Kit durchgeführt. Guanidiniumisothiocyanat, das als chaotropes Salz Proteine denaturiert, lysiert hierbei nicht nur die Zellen, sondern inaktiviert außerdem Enzyme wie Ribonukleasen [179]. Anschließend wurde die Probe auf eine Silicagel-Membran aufgebracht, wo sie ohne großen RNA-Verlust gereinigt werden kann, da RNA die Eigenschaft besitzt, unter hohen Salzkonzentrationen reversibel an Siliziumverbindungen zu binden [180]. Abschließend wurde die RNA dann mit RNase-freiem Wasser aus der Membran ausgespült. Alle Arbeitsschritte erfolgten gemäß Kit-Protokoll inklusive eines optionalen Schrittes, bei dem DNAse zugefügt wird, um Verfälschungen durch DNA-Rückstände zu vermeiden. Zur Lösung der RNA wurden im Schritt 30µl RNase-freies Wasser verwendet. Zur Erfolgskontrolle letzten und Mengenberechnung erfolgte eine RNA-Konzentrationsbestimmung mit dem NanoDrop 1000 Spektrophotometer. Aus dem Verlauf der Absorptionskurve und dem Quotienten aus der Absorption bei 260nm und 280nm ist die Reinheit der Probe ersichtlich. Die isolierte RNA wurde bei -80°C gelagert.

2.2.10.2. Reverse Trankription zur Synthese von cDNA

Zur RT-qPCR-Analyse mussten die gewonnenen RNA-Isolate mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Es wurde je 1µg gelöster RNA mit RNAse-freiem Wasser auf 13,2µl aufgefüllt und zur Denaturierung für 5 Minuten bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurden folgende Reagenzien dazugegeben: 4µl 5x-Superscript-Puffer, 0,4µl 25 mM dNTPs, 1µl 0,1 M DTT, 0,5µl RNasin, 0,25µl Linear-Acrylamid (c=15 µg/ml), 0,215µl Hexanucleotide und 0,43µl Superscript II (Reverse Transkriptase). Zusätzlich wurde für jede Probe eine Negativkontrolle (RT⁻) hergestellt, die statt Reverser Transkriptase ein entsprechendes Volumen an RNase-freiem Wasser enthielt, um eine DNA-Verunreinigung der RNA-Proben über die qPCR zu überprüfen. Die Ansätze wurden über 90 Minuten im Thermomixer bei 42°C und 350 Umdrehungen pro Minute inkubiert. Anschließend wurden die Proben zur Enzyminaktivierung für 5 Minuten auf 85°C erhitzt. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

2.2.10.3. Quantitative *real-time* PCR

Die PCR ist im Prinzip eine Methode zur exponentiellen *in vitro* Amplifikation definierter DNA-Fragmente. Die Zunahme dieser Fragmente kann bei der quantitativen *real-time* PCR (qPCR) zusätzlich quantifiziert und so die ursprüngliche Konzentration einer bestimmten Sequenz in einer Probe ermittelt werden. Zur Vervielfältigung der zuvor gewonnenen cDNA mittels PCR wurden je 2µl der 1:10 mit DEPC-behandeltem Wasser verdünnten cDNA-Proben mit 10µl qPCR-Mastermix, 6,64µl DEPC-behandeltem Wasser, 0,6µl des entsprechenden Forward Primers, 0,6µl des entsprechenden Reverse Primers und 0,16µl Taq-Polymerase in ein Loch einer 96-well-Mikrotiterplatte pipettiert. Diese wurde anschließend mit einer selbstklebenden Plastikfolie versiegelt, wenige Sekunden abzentrifugiert und zur PCR in den Roche Lightcycler® 480 gegeben.

Die Amplifikation findet bei der PCR durch Wiederholung von drei Schritten statt:

1. Denaturierung: Das Reaktionsgemisch wird auf 95°C erhitzt, sodass die Wasserstoffbrückenbindungen, die die beiden Stränge der doppelsträngigen DNA (dsDNA) miteinander verbinden, aufbrechen.

2. Annealing: Die Temperatur wird auf 65°C gesenkt, was dazu führt, dass Primer genannte Oligonukleotide, die der Sequenz von Anfang und Ende der zu vervielfältigenden Sequenz entsprechen, sich an die DNA-Vorlage (*template*) anlagern können.

3. Elongation: Beim Temperaturoptimum der hitzestabilen Polymerase kann diese nun ausgehend von den Primern einen neuen DNA-Strang entlang des *templates* synthetisieren.

Bei der *real-time* qPCR kann durch Hinzugeben eines interkalierenden Farbstoffs die Zunahme der Menge an dsDNA beobachtet werden. Es wurde hier der Farbstoff SYBR Green I verwendet, dessen Fluoreszenz bei Interkalierung in dsDNA mit dem Roche Lightcycler® 480 gemessen werden kann. Für die *real-time* qPCRs dieser Arbeit wurde das Temperatur-Programm aus Tabelle 16 verwendet. Nach Abschluss der qPCR wurde ebenfalls mit dem Roche Lightcycler® 480 eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um die Reinheit der Proben sicherzustellen. Da der Schmelzpunkt der DNA-Moleküle in erster Linie von ihrer Länge abhängt, kann auf diese Weise die Homogenität der Fragmentlängen überprüft werden. Für jede Probe wurde neben den interessierenden RNA-Sequenzen auch die Sequenz eines *Housekeeping*-Gens, das in allen Zellen ähnlich stark exprimiert ist, im Fall dieser Arbeit die der 18s rRNA, untersucht.

Startinkubation	Denaturierung	Annealing	Elongation	Schmelzkurvenanalyse
95 °C	95 °C	65 °C	72 °C	65 °C - 95 °C
5 min	15 s	45 s	30 s	10 min
1x		40x		1x

 Tabelle 16: Temperaturprogramm für real-time qPCR

So konnte sichergestellt werden, dass Unterschiede in der gemessenen Expression eines Gens zwischen den Proben nicht durch unterschiedliche Gesamtmengen an RNA verursacht worden waren. Entscheidend für die Auswertung war die Anzahl an Zyklen, die eine Probe benötigte, um einen gewissen Fluoreszenzgrenzwert (*crossing point*) zu erreichen. Dieser Wert wurde dann zur Standardisierung von den Werten für die 18s rRNA abgezogen, sodass die relative Transkriptionsstärke der untersuchten RNA zwischen den Proben verglichen werden konnte. Nur Proben, deren *crossing point* deutlich vor dem der dazugehörigen RT⁻-Kontrollprobe lag, wurden in die Auswertung aufgenommen.

2.2.11. Histologie

Um morphologische Veränderungen feststellen zu können, das Ausmaß der Ablagerung von Kalziumoxalatkristallen und der Invasion inflammatorischer Zellen zu untersuchen, sowie Hinweise auf eine Beeinträchtigung des Darmepithels zu gewinnen, wurden histologische Schnitte von Niere, Milz, Leber, Ileum und Colon angefertigt und entsprechend (immun-) histochemisch zur lichtmikroskopischen Auswertung aufbereitet.

2.2.12. Anfertigung der Schnitte und Färbung

Nach der Entnahme der Organe wurden diese in Histologiekassetten überführt und für 24 Stunden in 10%-Formalin fixiert. Anschließend erfolgte die Einbettung in Paraffin, das Schneiden mit dem Mikrotom (Schichtdicke = 2μ m), wobei auf einheitliche Schnittführung geachtet wurde, und das Trocknen auf Objektträgern, die mit Ammoniumperoxodisulfat vorbehandelt waren. Vor Beginn der Einfärbung erfolgte zur Entparafinierung eine Inkubation der Schnitte in Xylol (3 x 5min) und Ethanol (3 x 1,5min 100%, 2 x 1min 95%, 1 x 1min 70%). Nach entsprechender Färbung erfolgte die Eindeckung mit Pertex.

HE-Färbung: Eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) wurde zur Anfärbung der Darmschnitte, sowie zur Gegenfärbung der Organschnitte verwendet. Die entparafinierten Schnitte wurden hierzu in Hämatoxylin-Lösung und nach einem Waschschritt in Eosin-Lösung inkubiert. Den Abschluss bildete eine Entwässerung mit Ethanol (95% und 100%) und Xylol.

PAS-Färbung: Zur Darstellung der Morphologie der Organe kam eine Färbung durch die PAS-Reaktion (*Periodic acid-Schiff reaction*) zur Anwendung. Mit dieser lassen sich

besonders Kohlenhydrate, die Bestandteil für die Morphologie wichtiger Zelleinheiten sind, anfärben. Die entparafinierten Schnitte wurden in Periodsäure-Lösung (c = 5mg/ml) und in Schiff-Reagenz inkubiert und anschließend mit Hämatoxylin für 2min gegengefärbt. Zwischen jedem Schritt und vor der abschließenden Entwässerung lagen Waschschritte.

CD3-Färbung: Die erste der drei immunhistochemischen Färbungen, die Antigene mithilfe eines Antikörpers sichtbar machen können, erfolgte mittels Anfärbung des T-Zell-Antigens CD3. Die Rehydrierung nach Entparafinierung erfolgte in PBS. Darauf folgte eine Inkubation über 20 Minuten in 20ml 30%-Wasserstoffperoxid, dem 180ml Methanol zugegeben wurden unter Lichtschutz zur Blockierung der endogenen Peroxidase und nach einem Waschschritt die Antigendemaskierung. Hierzu wurde 1% Antigen Unmasking Solution in der Mikrowelle zum Kochen gebracht und anschließend mit den Schnitten autoklaviert. Vor der Blockierung des endogenen Biotins wurden die Schnitte mit dem Fettstift umkreist. Dann wurden nacheinander und von einem Waschschritt getrennt jeweils ein Tropen Avidin und Biotin aufgebracht und für 15min geschwenkt. Dann erfolgte die Detektion des Antigens: Anti-CD3-Antikörper (1:100 in PBS) für 1h, Waschschritt mit PBS, Anti-Biotin-Antikörper (1:300 in PBS) für 30min, Waschschritt mit PBS, ABC-Lösung für 30min und zum Schluss Waschen mit PBS und Tris. Zur Anfärbung wurde Diaminobenzidin, Nickelchlorid und 3%-Wasserstoffperoxid verwendet. Gegengefärbt wurde mit Methylgrün. Die Entwässerung entsprach den anderen Färbungen.

F4/80-Färbung: Mit einem gegen F4/80-Antigen gerichteten Antikörper konnten Makrophagen detektiert werden. Die Behandlung des Schnittes folgte weitgehend dem Protokoll für die CD3-Färbung. Es unterschied sich in der Demaskierung des Antigens, die hier mit Salzsäure (pH 0,9) geschah. Zur Detektion des Antigens wurden die Schnitte mit dem Anti-F4/80-Antikörper (1:100 in 10%-Magermilch) über Nacht bei 4°C und nach einem Waschschritt mit dem Anti-Biotin-Antikörper (1:300 in 10%-Magermilch) für 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Waschen, Färben und Entwässerung entsprachen erneut dem Protokoll der CD3-Färbung.

ZO-1-Färbung: Zur Visualisierung der *tight junctions* des Darmepithels wurde ein gegen Zonula occludens 1 (ZO-1) gerichteter Antiköper gewählt. Auch diese Färbung folgte dem Protokoll der CD3- und F4/80-Färbung. Die Demaskierung des Antigens erfolgte hier durch die Zugabe von Proteinase (50μ g/ml). Die Detektion des Antigens geschah wie bei F4/80 in 10%-Magermilch. Die Konzentration des Anti-ZO-1-Antikörpers betrug 1:200, die Inkubationszeit 1h bei Raumtemperatur.

Pizzolato-Färbung: Die Färbung nach Pizzolato erfolgte zur Darstellung der Kalziumoxalatkristalle im Organgewebe. Die entparafinierten Schnitte wurden hierfür mit

42

destilliertem Wasser bedeckt, mit Silbernitrat-Lösung (1:1 Mischung aus Silbernitrat (5%) und Wasserstoffperoxid (30%)) übergossen, eine Stunde lang mit einer 60W Glühbirne im Abstand von 15cm erwärmt und schließlich mit destilliertem Wasser abgewaschen. Die Gegenfärbung erfolgte für 5min in Nuclear Fast Red Solution. Zum Schluss wurden die Schnitte wie zuvor beschrieben entwässert.

2.2.13. Lichtmikroskopische und quantitative Auswertung

Mit einer *Charge-coupled-device*-Kamera erfolgte die Aufnahme lichtmikroskopisch vergrößerter Bilder der Schnitte. Die Wahl des Vergrößerungsobjektivs richtete sich nach dem jeweiligen untersuchten Fokus. Von den HE-gefärbten Ileumschnitten wurden zur qualitativen Beurteilung der Morphologie je Gruppe 100- und 200-fach vergrößerte, exemplarische Rot-Grün-Blau-Aufnahmen angefertigt. Zur Überprüfung der Epithelintegrität erfolgte die Anfertigung 200- und 630-fach vergrößerter Aufnahmen der ZO-1-gefärbten Ileumschnitte. Von den Schnitten, die Niere, Milz und Leber enthielten, wurden exemplarische Rot-Grün-Blau-Aufnahmen unterschiedlicher Vergrößerung nur für die Niere gemacht. Zur quantitativen Auswertung der Infiltration mit T-Zellen (CD3-Färbung) und Makrophagen (F4/80-Färbung) sowie der Ablagerung von Kalziumoxalatkristallen (Pizzolato-Färbung) wurden 25-fach vergrößerte Schwarz-Weiß-Aufnahmen der entsprechenden Organe gemacht, die anschließend mithilfe der ImageJ Software ausgewertet wurden. Zunächst wurde hierzu ein Schwellenwert festgelegt, ab dem ein Pixel als angefärbt gilt.



Abbildung 8: Quantitative Auswertung histologischer Aufnahmen mit ImageJ.

Beispielhafte Darstellung der quantitativen Bestimmung der angefärbten Fläche eines Pizzolatogefärbten Nierenschnittes in einer 25x-vergrößerten Schwarz-Weiß-Aufnahme (A). Festlegung des Schwellenwertes (B). Die rote Fläche wird als angefärbt definiert. Umfahrung der zu messenden Organfläche unter Ausschluss von Artefakten (C). Ergebnistabelle nach Messung (D). "%Area" gibt die angefärbte Fläche in Prozent des ausgemessenen Ausschnitts an. Eigene Aufnahmen. Die Festlegung wurde für jede Aufnahme individuell durch den Untersucher festgelegt, da bildindividuelle Eigenschaften wie die Beleuchtung oder Intensitätsunterschiede der Anfärbung sonst zu großen Fehlern hätten führen können. Im Anschluss wurde das Organ unter Ausschluss von Artefakten umfahren und die als angefärbt erkannte Fläche ins Verhältnis zum gesamten Organquerschnitt gesetzt. Da die Organe nicht exakt gleich angeschnitten worden waren und somit Strukturen nicht im gleichen Verhältnis dargestellt wurden, wurde darauf geachtet nur vergleichbares Gewebe mit relativ homogener Verteilung oder Zellen auszuwerten. Da sich zum angefärbter Kristalle Beispiel kaum Kalziumoxalatkristalle im Bereich der Sammelrohre und des Kelchsystems ablagerten, dieser aber je nach Anschnitt einen anderen Flächenanteil einnahm, wurde dieser Bereich wie ein Artefakt ausgeschlossen. Das Vorgehen ist beispielhaft in Abbildung 8 dargestellt.

2.2.14. Statistik

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit Microsoft Excel. Statistische Signifikanz des Unterschiedes zwischen zwei Stichproben wurde über einem zweiseitigen Student'schen t-Test ermittelt. Aufgrund der Datenstruktur wurde der t-Test für unabhängige Stichproben gewählt und es wurde Normalverteilung und Homoskedastizität angenommen. Als statistisch signifikant wurde ein Unterschied zwischen zwei Stichproben akzeptiert, wenn der p-Wert des Testes unter 0,05 lag. Aufgrund der kleinen Stichprobengrößen und des metrischen Skalenniveaus wurde zur Darstellung der Daten das arithmetische Mittel gewählt. Präsentierte Daten werden im Folgenden stets zusammen mit dem dazugehörigen Standardfehler des arithmetischen Mittels (SEM) angegeben, der sich aus der Standardabweichung geteilt durch die quadratische Wurzel der Stichprobengröße errechnet. Graphisch werden die Signifikanzniveaus wie folgt wiedergegeben: p < 0.05 signifikant, *; p < 0.01 sehr signifikant, **; p < 0.001 hoch signifikant, ***. Hierbei meint im ersten Teil des Ergebnisteils Sternchen (*) den Vergleich der Stichprobe zur Stichprobe "Tag 0", Raute (#) den Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe und Plus (+) den Vergleich zur "I-Kontrolle". Im zweiten Teil des Ergebnisteils werden nur noch Sternchen verwendet, da es nur noch zwei Stichproben gibt, die miteinander verglichen werden können (Interventions- und Interventions-Kontrollgruppe).

3. Ergebnisse

3.1. Spezifische Charakterisierung des diätetischen Oxalatnephropathiemodells

In diesem Kapitel erfolgt zunächst die Darstellung der Auswirkungen der Oxalat-Diät auf die für diese Arbeit entscheidenden Parameter für Nierenfunktion, systemische Entzündung, Darmflora und Darmbarriere.

Hierzu werden entsprechende Daten gezeigt, die in Gruppen von Mäusen erhoben wurden, die über entweder 5, 10, 15 oder 20 Tage oxalathaltige, kalziumarme "CKD-Diät" verabreicht bekamen. Diese Daten werden im Folgenden verglichen mit jenen von unbehandelten Tieren (Tag 0) und jenen von Kontrolltieren, die über die gleichen Zeiträume eine oxalathaltige aber kalziumreiche "Kontrolldiät" erhielten. Zur Analyse der Permanenz der gemessenen Veränderungen nach Beendigung der Oxalatzufuhr erfolgt in diesem Unterkapitel zudem ein Vergleich mit den später erhobenen Daten der Interventions-Kontrollgruppe (I-Kontrolle). Diese Gruppe erhielt "CKD-Diät" über zehn Tage und wurde anschließend über weitere zehn Tage mit einer oxalat- und kalziumarmen "Basisdiät" gefüttert, bevor Proben entnommen und analysiert wurden. Die Daten dieser Gruppe geben daher Auskunft, welche Effekte der "CKD-Diät" chronischer Natur sind und nach Beendigung der Oxalatzufuhr nicht wieder verschwinden, sodass die Bezeichnung "I-Kontrolle" in diesem Kapitel des Ergebnisteils als Irreversibilitäts-Kontrolle verstanden werden kann.

Die meisten Parameter konnten nur *post mortem* erhoben werden. In diesen Fällen existiert für jedes Tier daher nur eine Messung. Wenn von "Ausgangswerten" oder unterschiedlichen "Zeitpunkten" die Rede ist, sind daher Daten von vergleichbaren Tieren mit anderer Diätdauer gemeint. In diesem Sinne lassen sich auch nachfolgende Liniendiagramme verstehen.

3.1.1. Oxalatdeposition

Die Veränderung der Nieren durch die Ablagerung der Kalziumoxalatkristalle ließ sich bereits makromorphologisch leicht erkennen. Die Nieren imponierten im Vergleich zu Nieren gesunder Tiere vergrößert, verhärtet und weißlich verfärbt (s. Abbildung 9-A). Um zu überprüfen, in welchem Ausmaß die verwendeten Diäten zu einer Kristallbildung in den Nieren der Tiere führten, wurden histologische Schnitte der Nieren nach Pizzolato angefärbt und auf diese Weise die Kalziumoxalatkristalle sichtbar gemacht. Hierbei zeigte sich in der CKD-Gruppe eine relevante Bildung von Oxalatkristallen bereits nach fünf Tagen, die im weiteren Verlauf weiter zunahm. Die Tiere der Kontrollgruppe, die kalziumreiches, oxalathaltiges Futter erhielten, entwickelten gegenüber der unbehandelten Gruppe keine relevante Zunahme von anfärbbaren Kristallen, was die experimentelle Strategie, dass es durch die orale Zugabe von Kalzium nicht zu relevanter systemischer Aufnahme von Oxalat kommt, stützt. Zur Überprüfung der Permanenz der Kristalle nach Absetzen der oxalathaltigen Diät sind zum Vergleich die histologischen Schnitten der I-Kontrolle dargestellt. Es lässt sich hier innerhalb von 10 Tagen ein deutlicher Abfall ungefähr auf das Niveau von Tag 5 feststellen. Die Kristalle scheinen also mit der Zeit zumindest teilweise wieder ausgewaschen zu werden. Zur Veranschaulichung der Ergebnisse ist je ein Pizzolatogefärbter Schnitt jeder Gruppe in Abbildung 10 dargestellt. Hierbei wird sichtbar, dass die Kristallbildung im Wesentlichen im Bereich des Übergangs von Cortex zu Mark stattfindet. Größere Kristallverbände lagerten sich in den distalen Tubuli ab, während kleinere Kristalle auch im interstitiellen Gewebe zu finden waren. In Abbildung 9-B ist mittels eines Graphs die Zunahme der Kristalldichte in diesem Bereich darstellt. Signifikanzen können hier aufgrund der geringen Zahl von angefärbten Schnitten nur für wenige Gruppen angegeben werden.



Abbildung 9: Ablagerung von Kalziumoxalatkristallen in der Niere (1).

A. Fotographie einer Mäuseniere nach oxalatreicher Diät, die sich im Vergleich zu Nieren unbehandelter Tiere vergrößert, verhärtet und weißlich tingiert darstellte.

B. Quantitative Darstellung der angefärbten Fläche von Pizzolato-gefärbten histologischen Nierenschnitten von Mausgruppen, die für 5, 10, 15 oder 20 Tage entweder eine kalziumreiche, oxalatreiche Diät (Kontrollgruppe) oder eine kalziumarme, oxalatreiche Diät (CKD-Gruppe) erhielten. Zudem sind die Ergebnisse von Tieren aufgeführt, die 10 Tage kalziumarme, oxalatreiche und anschließend 10 Tage kalziumarme und oxalatarme Diät erhielten (I-Kontrolle). Die Zahl der untersuchten Schnitte pro Gruppe liegt zwischen 1 und 9. Messwerte ohne Fehlerbalken wurden an nur einem Schnitt erhoben, sodass hier kein statistischer Vergleich möglich ist. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwerts wieder. Signifikanzniveaus: ***=p<0,001; **=p<0,01; *=p<0,05 vs. "Tag 0"; # vs. Kontrollgruppe; + vs. I-Kontrolle.



Abbildung 10: Ablagerung von Kalziumoxalatkristallen in der Niere (2).

Schwarz-weiß Aufnahmen Pizzolato-gefärbter histologischer Nierenschnitte in 25x-Vergrößerung von Mäusen, die für 5, 10, 15 oder 20 Tage entweder eine kalziumreiche, oxalatreiche Diät (Kontrollgruppe) oder eine kalziumarme, oxalatreiche Diät (CKD-Gruppe) erhielten. Zudem wird ein Bild eines Tieres gezeigt, das 10 Tage kalziumarme, oxalatreiche und anschließend 10 Tage kalziumarme und oxalatarme Diät erhielt (I-Kontrolle).

3.1.2. Nierenmorphologie

Zur morphologischen Beurteilung wurden PAS-gefärbte, histologische Nierenschnitte herangezogen. Hierbei zeigte sich eine Aufweitung der Tubuli und eine mit der Diätdauer progressive tubuläre Atrophie, die zu atubulären Glomeruli führte (Abbildung 11). 10 Tage nach Beendigung der oxalatreichen Diät stellten sich die Tubuli nicht mehr aufgeweitet dar.



vor Diätbeginn

nach 20 Tagen CKD-Diät

Abbildung 11: Mikromorphologischer Nierenschaden.

Mikroskopische Aufnahmen Pizzolato- und PAS-gefärbter histologischer Nierenschnitte in 50x- und 200x-Vergrößerung von Mäusen, die entweder eine normale (oxalatfreie) oder eine 20-tägige kalziumarme, oxalatreiche Diät (CKD-Gruppe) erhielten.



Abbildung 12: Morphologischer Nierenschaden bleibt nach Beendigung der "CKD-Diät". Mikroskopische Aufnahmen Pizzolato- und PAS-gefärbter histologischer Schnitte in 50x- und 200x-Vergrößerung von Mäusenieren, die entweder nach 10-tägiger kalziumarmer, oxalatreicher Diät direkt entnommen wurden (CKD-Gruppe) oder anschließend für weitere 10 Tage kalziumarme, oxalatarme "Basisdiät" bekamen und dann entnommen wurden (I-Kontrolle).

Anstelle der atrophen und nekrotischen Tubuli bildete sich nach Diätstopp bindegewebiges Ersatzgewebe. Dargestellt sind diese Veränderungen in Abbildung 12. In der Kontrollgruppe fanden sich keine morphologischen Auffälligkeiten im Vergleich zum Ausgangsbefund.

3.1.3. Renale Entzündungsreaktion

Da es sich, wie bereits in der Einleitung beschrieben, bei der Oxalatnephropathie um eine Erkrankung mit relevanter entzündlicher Komponente handelt, erfolgte eine Analyse der lokalen, renalen Entzündungsreaktion über die Bestimmung der Leukozyteninfiltration und Zytokinexpression im Nierengewebe.

In der Leukozytendifferenzierung mittels Durchflusszytometrie, in Abbildung 13 graphisch dargestellt, zeigte sich in der CKD-Gruppe eine etwa sieben- bis zehnfache Erhöhung des Anteils der Leukozyten an der Gesamtzellzahl des Nierengewebes, die sich bis Tag 20 fortsetzte und in der Kontrollgruppe nicht zu beobachten war. Bei den T-Zellen kam es ebenfalls zu einem ausgeprägten Anstieg, der allerdings nur bis Tag 10 anhielt. Anschließend persistierte der T-Zell-Anteil. Die Untergruppen der T-Zellen verhielten sich unterschiedlich: Während sich der Anteil der T-Helferzellen, der aktivierten T-Helferzellen und der aktivierten regulatorischen T-Zellen gemeinsam mit den gesamten T-Zellen bewegte, kam es bei den zytotoxischen T-Zellen zu einem weiteren starken Anstieg auch über Tag 10 hinaus. Auch andere Gruppen immunkompetenter Zellen zeigten in der CKD-Gruppe ein Bild des steilen Anstiegs bis Tag 10, worauf entweder eine Stagnation (Makrophagen, aktivierte APCs, etc.) oder ein weiterer Anstieg (neutrophile Granulozyten, inflammatorische Monozyten, etc.) bis Tag 20 folgte. In der Kontrollgruppe fand sich keine entsprechende Erhöhung der untersuchten Leukozytenpopulationen, teilweise sogar eine leichte Reduktion des Zellanteils. Nach Beendigung der Diät an Tag 10 kam es in fast allen Populationen zu einem Abfall des Zellanteils (I-Kontrolle). Eine Ausnahme bildeten die neutrophilen Granulozyten.

In der immunhistochemischen Kontrolle ließ sich der starke Anstieg von T-Zellen und Makrophagen bestätigen (s. Abbildung 16). Wie schon in der FACS-Analyse stagnierte die Zahl der T-Zellen nach Tag 10, während sich die Makrophagen anders als im FACS weiter vermehrten. Infiltrierende T-Zellen verteilten sich einigermaßen homogen über Nierenrinde und -mark und traten nur vereinzelt im Kelch- oder Nierenbeckenbereich auf. Makrophagen konnten vor allem in den Wänden der Tubuli, zunächst vornehmlich im Bereich des Übergangs vom Nierenmark zum Kelchsystem, mit zunehmender Diätdauer aber über den gesamten Organquerschnitt verteilt, detektiert werden. Abgebildet sind diese Veränderungen in Abbildung 14 und Abbildung 15.





Darstellung des Anteiles verschiedener Leukozytenpopulationen am Nierenzelllysat in der FACS-Analyse von Mausgruppen, die für 5, 10, 15 oder 20 Tage entweder eine kalzium- und oxalatreiche (Kontrollgruppe, gepunktet) oder eine kalziumarme, oxalatreiche (CKD-Gruppe, durchgezogen) Diät erhielten. Die I-Kontrolle (gestrichelt) erhielt 10 Tage kalziumarme, oxalatreiche und anschließend 10 Tage kalzium- und oxalatarme Diät. Die Gruppengröße n liegt zwischen 4 und 8 Tieren. Signifikanzniveaus: ***=p<0,001; **=p<0,01; *=p<0,05 vs. "Tag 0"; # vs. Kontrollgruppe; + vs. I-Kontrolle.



Abbildung 14: Mikroskopie mit Anfärbung CD3-positiver T-Zellen in der Niere.

Ausschnitte aus 25-fach vergrößerten lichtmikroskopischen Schwarz-Weiß-Aufnahmen von Nierenschnitten, auf denen CD3-positive Zellen immunhistochemisch angefärbt wurden. Jeder Schnitt repräsentiert eine Mausgruppe, die für 5, 10, 15 oder 20 Tage entweder eine kalziumreiche, oxalatreiche Diät ("Kontrolldiät") oder eine kalziumarme, oxalatreiche Diät ("CKD-Diät") erhielt. Zudem sind die Aufnahmen von Tieren aufgeführt, die 10 Tage kalziumarme, oxalatreiche und anschließend 10 Tage kalziumarme und oxalatarme Diät erhielten (I-Kontrolle).



Abbildung 15: Mikroskopie mit Anfärbung F4/80-positiver Makrophagen in der Niere.

Ausschnitte aus 25-fach vergrößerten lichtmikroskopischen Schwarz-Weiß-Aufnahmen von Nierenschnitten, auf denen F4/80-positive Zellen immunhistochemisch angefärbt wurden. Jeder Schnitt repräsentiert eine Mausgruppe, die für 5, 10, 15 oder 20 Tage entweder eine kalziumreiche, oxalatreiche Diät ("Kontrolldiät") oder eine kalziumarme, oxalatreiche Diät ("CKD-Diät") erhielt. Zudem sind die Aufnahmen von Tieren aufgeführt, die 10 Tage kalziumarme, oxalatreiche und anschließend 10 Tage kalziumarme und oxalatarme Diät erhielten (I-Kontrolle).



Abbildung 16: Infiltration der Niere mit T-Zellen (A) und Makrophagen (B) in der Histologie. Quantitative Darstellung des Prozentanteils der angefärbten Fläche am gesamten Organquerschnitt immunhistochemisch angefärbter Nierenschnitte von Mausgruppen, die für 5, 10, 15 oder 20 Tage entweder eine kalziumreiche, oxalatreiche Diät (Kontrollgruppe) oder eine kalziumarme, oxalatreiche Diät (CKD-Gruppe) erhielten. Zudem sind die Ergebnisse von Tieren aufgeführt, die 10 Tage kalziumarme, oxalatreiche und anschließend 10 Tage kalziumarme und oxalatarme Diät erhielten (I-Kontrolle). Die Gruppengröße n liegt zwischen 2 und 5 Tieren. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwerts wieder. Signifikanzniveaus: ***=p<0,001; **=p<0,01; *=p<0,05 vs. "Tag 0"; # vs. Kontrollgruppe; + vs. I-Kontrolle.

Für die humorale Entzündungsreaktion konnte eine parallele Entwicklung beobachtet werden (s. Abbildung 17): Während die Expression des für Interleukin-6 kodierenden DNA-Abschnitts in der CKD-Gruppe bis Tag 10 einen signifikanten Anstieg um etwa zwei Zehnerpotenzen erfuhr, blieb sie in der Kontrollgruppe in der gesamten Beobachtungszeit auf dem Niveau des Ausgangswertes. Die Daten für Tumornekrosefaktor-a zeigten ebenfalls einen Anstieg in der CKD-Gruppe, der bis zum Tag 20 anhielt und eine gute Zehnerpotenz betrug, während in der Kontrollgruppe keine Veränderung der Expression festgestellt werden konnte. Während es durch Beendigung der Oxalatzufuhr zu einem leichten Absinken der Interleukin-6-Transkription kam, unterschied sich die Transkriptionsrate von Tumornekrosefaktor-α an Tag 20 nicht signifikant zwischen CKD-Gruppe und I-Kontrolle. Die übrigen verwendeten Primer (Interferon-y, Interleukin-17 und -22) lieferten keine verwendbaren Daten, da die gemessene Expression im Bereich der non-template control lag.



Abbildung 17: Zytokinexpression in der Niere.

Vergleichende Darstellung der mittleren mRNA-Menge pro-inflammatorischer Zytokine (Interleukin-6 (A), Tumornekrosefaktor- α (B)) im Verhältnis zur mRNA des *housekeeping*-Gens 18s im Nierengewebe von Mausgruppen, die für 5, 10, 15 oder 20 Tage entweder eine kalziumreiche, oxalatreiche Diät (Kontrollgruppe) oder eine kalziumarme, oxalatreiche Diät (CKD-Gruppe) erhielten. Zudem sind die Ergebnisse von Tieren aufgeführt, die 10 Tage kalziumarme, oxalatreiche und anschließend 10 Tage kalziumarme und oxalatarme Diät erhielten (I-Kontrolle). Die Gruppengröße n liegt zwischen 4 und 8 Tieren. Signifikanzniveaus: ***=p<0,001; **=p<0,01; *=p<0,05 vs. "Tag 0"; # vs. Kontrollgruppe; + vs. I-Kontrolle.

Zusammenfassend ließ sich in der Niere eine durch die Diät ausgelöste, ausgeprägte, lokale Immunreaktion, die alle untersuchten Zellreihen und Zytokine betraf, feststellen. Besonders ausgeprägt verlief diese Reaktion bis zum Beobachtungszeitpunkt nach 10 Tagen. In der Kontrollgruppe fand sich keine entsprechende Immunreaktion. Die I-Kontrolle zeigte ein teilweises Abfallen der meisten gemessenen Parameter, was auf einen akuten Zusammenhang zwischen Immunreaktion und "CKD-Diät" hinweist.

3.1.4. Nierenfunktion

Beeinträchtigung der exkretorischen Nierenfunktion

Zur Überprüfung der exkretorischen Nierenfunktion wurden die Serumkonzentrationen der Elektrolyte Natrium, Kalium, Kalzium, Chlorid und Phosphat und der Retentionsparameter Kreatinin, Harnstoff und Harnsäure bestimmt. Die Ergebnisse der Serumchemie sind in Abbildung 18 graphisch dargestellt.

Es ließ sich bereits nach 5-tägiger "CKD-Diät" ein hochsignifikanter Anstieg der Kreatininkonzentration auf etwa das 6-fach des Ausgangswertes beobachten, welcher sich im Verlauf fortführte, wobei für den weiteren Anstieg keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden konnte. Eine ähnliche Dynamik zeigte sich für die Konzentration des Harnstoffes. In der Kontrollgruppe konnte ebenfalls ein leichter Anstieg der beiden Parameter

gemessen werden. Dieser lag für Kreatinin jedoch nur im Bereich des 1,7-fachen und war nicht zu allen Zeitpunkten statistisch signifikant. Die Konzentrationen von Kalium und Phosphat stiegen sowohl in der CKD-Gruppe, als auch, wenngleich weniger stark ausgeprägt, in der Kontrollgruppe im Verlauf deutlich und statistisch signifikant an. Demgegenüber fiel die Chloridkonzentration. Trotz der unterschiedlichen Kalziumkonzentration der verschiedenen Diäten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Serumkalziumkonzentration im Verlauf. Auch die Konzentrationen von Natrium und Harnsäure blieben durch die Diäten unbeeinflusst.

Es lässt sich also eine diätabhängige, ausgeprägte Einschränkung der exkretorischen Nierenfunktion feststellen, die in geringem Ausmaß auch in der Kontrollgruppe auftrat. Zur Beantwortung der Frage, ob es sich bei der Verschlechterung der Nierenfunktion in der Kontrollgruppe um einen diätabhängigen oder um einen durch einen endo- oder exogenen Confounder ausgelösten Effekt handelt, hilft ein Blick auf die später erhobenen Daten der I-Kontrolle. Hier sieht man eine Normalisierung der Elektrolyte Kalium und Phosphat in den Bereich der Ausgangsgruppe sowie einen signifikanten Konzentrationsabfall der Retentionsparameter Kreatinin und Harnstoff. Dies legt zum einen einen diätabhängigen nierenschädigenden Effekt in der Kontrollgruppe nahe, zum anderen weist es auf eine deutliche Erholung der exkretorischen Nierenfunktion nach Beendigung der oxalatreichen Diät der CKD-Gruppe hin, die zwar ein Residuum im Sinne einer chronischen Niereninsuffizienz hinterlässt (im Vergleich zur Ausgangsgruppe eine ca. vierfach erhöhte Kreatinin- bzw. dreifach erhöhte Harnstoffkonzentration), aber ausreichend für eine Wahrung der Elektrolythämostase ist.







Vergleichende Darstellung der mittleren Konzentration von Elektrolyten und Retentionsparameter im Serum von Mausgruppen, die für 5, 10, 15 oder 20 Tage entweder eine kalziumreiche, oxalatreiche Diät (Kontrollgruppe) oder eine kalziumarme, oxalatreiche Diät (CKD-Gruppe) erhielten. Zudem sind die Ergebnisse von Tieren aufgeführt, die 10 Tage kalziumarme, oxalatreiche und anschließend 10 Tage kalziumarme und oxalatarme Diät erhielten (I-Kontrolle). Die Gruppengröße n liegt zwischen 5 und 12 Tieren. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwerts wieder. Signifikanzniveaus: ***=p<0,001; **=p<0,01; *=p<0,05 vs. "Tag 0"; # vs. Kontrollgruppe; + vs. I-Kontrolle.

Beeinträchtigung der endokrinen Nierenfunktion und Thrombozytose

Zur Beurteilung der endokrinen Nierenfunktion wurden exemplarisch hämatologische Parameter bestimmt. Bei einer chronischen Nierenschädigung würde man einen Erythropoetinmangel mit nachfolgend hyporegeneratorischer meist normochromnormozytärer Anämie erwarten [12].

Es ließ sich in der CKD-Gruppe ein bis zum letzten Messpunkt dieser Studie an Tag 20 progredienter und hochsignifikanter Abfall von Erythrozytenzahl, Hämoglobinkonzentration und Hämatokrit beobachten (s. Abbildung 19). Besonders ausgeprägt zeigte sich ein begleitender Abfall der Retikulozytenzahl auf letztlich weniger als ein Fünftel der Ausgangskonzentration, der bereits fünf Tage nach Diätbeginn hochsignifikant gemessen werden konnte. Das mittlere korpuskuläre Volumen (MCV) und Hämoglobin (MCH) der Erythrozyten sank ebenfalls signifikant, wenngleich nur leicht, ab, sodass sich zusammenfassend eine mikrozytäre, hypochrome, retikulozytopene Anämie konstatieren ließ. In der Kontrollgruppe, die eine kalzium- und oxalatreiche Diät erhielt, konnte im beobachteten Zeitraum keine statistisch signifikante Anämie nachgewiesen werden. Allerdings kam es auch hier zu einem signifikanten Abfall der Retikulozytenzahl, sodass von einer Beeinträchtigung der endokrinen Nierenfunktion ausgegangen werden muss.

Nimmt man die ebenfalls in Abbildung 19 dargestellten Daten der I-Kontrolle hinzu, lässt sich feststellen, dass es auch hier nach Tag 10 trotz Beendigung der oxalatreichen Diät zu einer weiteren Progredienz der Anämie kam, deren Ausprägung sich an Tag 20 nur tendenziell von der der CKD-Gruppe unterschied. Im Gegensatz zur CKD-Gruppe kam es hier jedoch zu einer signifikanten und deutlichen Erholung der Retikulozytenzahl und zu einem weiteren Absinken von MCV und MCH. Der Anstieg der Retikulozytenzahl spricht für eine Erholung der endokrinen Nierenfunktion, die aber unvollständig ist. Das weitere Absinken von MCV und MCH lässt sich im Rahmen der Erholung der Blutbildung etwa durch einen zusätzlichen Eisenmangel bei erhöhtem Verbrauch und verringerter Resorption [35] interpretieren. Neben den Veränderungen der Erythrozyten-bezogenen Parameter ließ sich mit einer Verdreifachung der Thrombozytenzahlen in der CKD-Gruppe und einer Verdoppelung derselben in der Kontrollgruppe eine deutliche Thrombozytose beobachten, die bereits nach fünftägiger Diät dieses Niveau erreichte und sich bis Tag 20 nicht wesentlich änderte. Auch bei Umstellung auf "Basisdiät" nach 10 Tagen kam es bis Tag 20 nur zu einem tendenziellen, jedoch statistisch nicht signifikanten Abfall der Thrombozytenzahl (p-Wert = 0,197). Thrombozytose ist im Zusammenhang mit dem renalen Anämiesyndrom und Eisenmangel beschrieben [181]. Die hämatologischen Messwerte sind in Abbildung 19 graphisch dargestellt.





Vergleichende Darstellung der Mittelwerte hämatologischer Parameter von untersuchten Mausgruppen, die für 5, 10, 15 oder 20 Tage entweder eine kalziumreiche, oxalatreiche Diät (Kontrollgruppe) oder eine kalziumarme, oxalatreiche Diät (CKD-Gruppe) erhielten. Zudem sind die Ergebnisse von Tieren aufgeführt, die 10 Tage kalziumarme, oxalatreiche und anschließend 10 Tage kalziumarme und oxalatarme Diät erhielten (I-Kontrolle). Die Gruppengröße n liegt zwischen 5 und 12 Tieren. Signifikanzniveaus: ***=p<0,001; **=p<0,01; *=p<0,05 vs. "Tag 0"; # vs. Kontrollgruppe; + vs. I-Kontrolle.

Aus Gründen der Übersichtlichkeit und aufgrund paralleler Veränderung mit dem MCV sind die Messwerte für MCH nicht graphisch dargestellt (MCH_{Tag 0} = $16,4 \pm 0,1$ pg; MCH_{Tag 20,} _{CKD-Diät} = $15,4 \pm 0,2$ pg). Auf die Auswirkungen der Diät auf die Leukozytenzahl und andere Parameter systemischer Entzündung wird im entsprechenden Unterkapitel eingegangen.

Zusammenfassend ließen sich in der CKD-Gruppe für eine ausgeprägte Nierenschädigung mit endokriner und exkretorischer Funktionsstörung typische morphologische, serumchemische und hämatologische Veränderungen messen. Diese traten in der Kontrollgruppe zwar in signifikant geringerem Maß auf, im Vergleich zu den Messwerten der Ausgangsgruppe sowie zu den Messwerten der I-Kontrolle muss aber auch für diese Gruppe eine diätassoziierte Nierenfunktionseinschränkung konstatiert werden, was für eine systemische Aufnahme des Oxalats trotz Kalziumanreicherung des Futters spricht.

Da sich die relevanten gemessenen Veränderungen nach dem 10. Tag "CKD-Diät" nur noch unwesentlich änderten, wurde hier von einem stabilen Plateau der Nierenschädigung ausgegangen. Im Nachhinein zeigte der Vergleich mit den später erhobenen Daten der I-Kontrolle jedoch eine zumindest teilweise Reversibilität der Nierenfunktionseinschränkung nach Beendigung der Oxalatzufuhr, sodass die Vermutung naheliegt, dass es sich bei den gemessenen Veränderungen zu einem gewissen Ausmaß um akute Effekte der oxalathaltigen Diät handelte. Die Daten der I-Kontrolle machten aber auch deutlich, dass bereits nach 10-tägiger "CKD-Diät" ein irreversibler Nierenschaden entsteht, sodass zu Recht von chronischer Nierenerkrankung gesprochen werden kann.

3.1.5. Dysbiose

Zur Analyse der bakteriellen Besiedelung des Darmes wurden Faeces der unterschiedlichen Versuchsgruppen mit der in Kapitel 2.2.3 beschriebenen Methode aufbereitet, verdünnt und auf verschiedenen wenig spezifischen Nährmedien ausgestrichen. Hierdurch sollte zum einen eine quantitative Bestimmung der Bakteriendichte – durch Auszählen von Kolonie-bildenden Einheiten (engl. *colony forming units*, CFU) – und zum anderen eine qualitative Bestimmung – durch Differenzierung verschiedener Bakterienspezies anhand unterschiedlicher Morphologie der Kolonien – erfolgen. Trotz erheblichen zeitlichen und materiellen Aufwandes zur Standardisierung der Verdünnungen, zum Ausschluss einer Kontamination und zur Verbesserung der Herstellung der Nährmedien traten bis zum Schluss sehr große Schwankungen auf. Verschiedene Verdünnungen ließen sich nur unzureichend durch Umrechnen vergleichen. Insbesondere das unsystematische Auftreten verschiedener Kolonienmorphologien machte eine qualitative Auswertung unmöglich. Je spezifischer das Nährmedium, desto zuverlässiger waren die Ergebnisse. In Abbildung 20 sind die Ergebnisse

verschiedener Tiere in derselben Verdünnung auf dem spezifischsten verwendeten Nährmedium, MacConkey-Agar, abgebildet. Am sensitivsten war der Ausstrich auf Blutagar. Jedoch folgte hieraus, dass sich je nach Verdünnung ganz unterschiedliche Bakterienspezies durchsetzen konnten und die Platte besiedelten. Es war hier weder eine zuverlässige quantitative noch qualitative Auswertung möglich. Da LB- und besonders MacConkey-Platten weniger sensitiv und hinsichtlich des Speziesspektrums deutlich spezifischer waren, ließ sich der Ausstrich hier etwas besser zur quantitativen Auswertung standardisieren. Die erhobenen Daten sind in Abbildung 21 dargestellt und weisen auf einen Anstieg der bakteriellen Besiedelung in der CKD-Gruppe hin, welcher für die auf MacConkey-Agar wachsenden, gram-negativen Bakterienstämme, auch nach Diätwechsel fortbestand. Besonders eine Aussage zur Diät-unabhängigen Assoziation zwischen Niereninsuffizienz und bakterieller Besiedelung des Darmes ist in dieser Arbeit von wissenschaftlichem Interesse. Rückschlüsse auf diese Assoziation können bei Vergleich der CFU-Zahlen vor Beginn der Oxalatdiät (Tag 0) mit denen der I-Kontrolle an Tag 15 und 20 gezogen werden. An diesen Zeitpunkten erhielten die Mäuse eine oxalatfreie Diät und unterschieden sich nur bezüglich des Nierenschadens. Hier zeigten die auf MacConkey-Platten gezählten CFU-Zahlen eine signifikante Überwucherung der nierenkranken Tiere der I-Kontrolle mit gram-negativen Bakterien und lassen so auf einen CKD-abhängigen Effekt schließen.



Abbildung 20: Varianz von Kolonienmorphologie und -anzahl.

Fotografie des Ausstrichergebnisses auf MacConkey-Agar von 50µl Faecessuspension der gleichen Verdünnungsstufe (ein Köttel auf rechnerisch 19ml PBS) verschiedener Tiere derselben Gruppe zur Darstellung der Varianz von Aussehen und Anzahl der Kolonien zwischen den Tieren.



Abbildung 21: Bakteriendichte in den Faeces.

Vergleichende Darstellung der mittleren Zahl an auf MacConkey-Agar (A) und LB-Agar (B) kultivierbaren *colony forming units* (CFU) pro Milligramm Faeces von Mausgruppen, die für 5, 10, 15 oder 20 Tage entweder eine kalziumreiche, oxalatreiche Diät (Kontrollgruppe) oder eine kalziumarme, oxalatreiche Diät (CKD-Gruppe) erhielten. Zudem sind die Ergebnisse von Tieren aufgeführt, die 10 Tage kalziumarme, oxalatreiche und anschließend 10 Tage kalziumarme und oxalatarme Diät erhielten (I-Kontrolle). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwerts wieder. Signifikanzniveaus: ***=p<0,001; **=p<0,01; *=p<0,05 vs. "Tag 0"; # vs. Kontrollgruppe; + vs. I-Kontrolle.

3.1.6. Strukturelle Darmbarriere

Die mikroskopische Morphologie des Ileumepithels wurde anhand von HE-gefärbten Schnitten untersucht. Hierbei fanden sich bezüglich der Integrität des Epithels keine Unterschiede zwischen der CKD- und der Kontrollgruppe, wie in Abbildung 22 exemplarisch an in 100-facher Vergrößerung aufgenommenen, mikroskopischen Bildern zu sehen ist.



Abbildung 22: Mikroskopische Morphologie des Ileums vor und nach Oxalatdiät.

Ausschnitte aus 100-fach vergrößerten lichtmikroskopischen Aufnahmen von Ileumschnitten, die mit HE angefärbt wurden. Während einer Maus für 20 Tage eine kalziumreiche, oxalatreiche Diät ("Kontrolldiät") verabreicht wurde, bekam die andere über diesen Zeitraum eine kalziumarme, oxalatreiche Diät ("CKD-Diät").



Abbildung 23: Mikroskopie des Ileums mit Anfärbung von ZO-1.

Ausschnitte aus 200-fach vergrößerten lichtmikroskopischen Schwarz-Weiß-Aufnahmen von Ileumschnitten, auf denen ZO-1-Proteine immunhistochemisch angefärbt wurden. Jeder Schnitt repräsentiert eine Mausgruppe, die für 5, 10, 15 oder 20 Tage entweder eine kalziumreiche, oxalatreiche Diät ("Kontrolldiät") oder eine kalziumarme, oxalatreiche Diät ("CKD-Diät") erhielt. Zudem sind die Aufnahmen von Tieren aufgeführt, die 10 Tage kalziumarme, oxalatreiche und anschließend 10 Tage kalziumarme und oxalatarme Diät erhielten (I-Kontrolle).
Auch in mikroskopischen Aufnahmen von Schnitten, auf denen ZO-1-Moleküle, als Stellvertreter der *tight junctions*, immunhistochemisch angefärbt wurden, ließen sich im Zeitverlauf der Diät keine relevanten Änderungen erkennen (s. Abbildung 23). Hier war eine Abnahme der anfärbbaren Moleküle erwartet worden, wie das von Vaziri zuvor beschrieben worden war [104, 105]. Das Epithel scheint mikromorphologisch unverletzt geblieben zu sein. Zusätzlich zur histologischen Bewertung des intestinalen Epithels wurde eine Analyse der Expression der mRNA der *tight junction* Proteine Zonula occludens (ZO), Claudine und Occludin in Ileum und Colon durchgeführt. Vorstellbar waren sowohl eine verminderte Expression der *tight junction* Proteine als ursächlicher Faktor einer Barrierestörung, die etwa durch Urämie ausgelöst sein könnte, als auch eine erhöhte Expression als Ausdruck einer reaktiv vermehrten Synthese bei möglicherweise pathologischer Zerstörung der *tight junctions*. Vaziri hatte eine erhöhte Expression für Occludin und ZO-1 im Colon ascendens nierenkranker Ratten gemessen. Demgegenüber konnten keine signifikanten Unterschiede für Claudin-1 im Colon ascendens und für Occludin, ZO-1 und Claudin-1 im Colon descendens gemessen werden [104].

Die Ergebnisse (in Abbildung 24 dargestellt) ließen auch hier keinen einfachen Schluss zu, da sich keine einheitliche Tendenz ausmachen ließ. ZO-1 veränderte sich in seiner Expression durch die Oxalatdiät nicht. Nach Beendigung dieser kam es aber sowohl im Colon, als auch im Ileum zu einem steilen Anstieg der Expression. Die Expression von ZO-2 veränderte sich im Ileum nur tendenziell und stieg im Colon sowohl in der CKD- als auch in der Kontrollgruppe an, während sie nach Beendigung der Oxalatzufuhr wieder etwas abfiel. Die Claudine 1 und 2 stiegen in beiden Darmabschnitten teils signifikant bis Tag 10 an und fielen danach wieder. Besonders auffällig ist das Abfallen auf Expressionslevel deutlich unter dem der Ausgangsgruppe in der I-Kontrolle an Tag 20. Occludin, dessen Expression sich am verlässlichsten in Bezug auf Homogenität der Schmelzkurven und mRNA-Gehalt messen ließ, stieg im Ileum in der CKD-Gruppe stark an und verblieb auf hohem Niveau, während es in der Kontrollgruppe nur schwach anstieg und anschließend abfiel. Im Colon dagegen zeigte sich für die CKD-Gruppe ein tendenzieller Abfall, dem ein leichter signifikanter Anstieg in der Kontrollgruppe gegenüberstand. Es zeigte sich insbesondere ein starkes Ansteigen nach Absetzen der Oxalatzufuhr an Tag 10.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass es zu signifikanten Veränderungen der Expression von Genen kam, die für *tight junction* Proteine kodieren. Die Interpretation der Veränderungen ist jedoch nicht trivial. Insgesamt stützt die Auswertung der mRNA-Analyse eher die Theorie der Hochregulation dieser Gene nach entstandenem Zellkontaktschaden. Diese Hochregulation tritt nach unterschiedlicher Diätdauer ein und scheint ebenso unterschiedlich lang anzuhalten. So könnte beispielsweise argumentiert werden, dass die Nachproduktion von ZO-2 im Colon an Tag 20 in der I-Kontrolle schon abgeschlossen ist. Dass es durch CKD eher zu einem Anstieg als zu einem Abfall kommt, deckt sich mit den oben erwähnten Erkenntnissen von Vaziri [104].



Abbildung 24: Expression von tight-junction-Proteinen im Darm.

Vergleichende Darstellung der mittleren mRNA-Menge von DNA-Sequenzen, die für Vernetzungsproteine des Darmepithels kodieren, im Verhältnis zur mRNA des *housekeeping*-Gens 18s in Ileum- und Colongewebe von Mausgruppen, die für 5, 10, 15 oder 20 Tage entweder eine kalziumreiche, oxalatreiche Diät (Kontrollgruppe, gepunktete Linie) oder eine kalziumarme, oxalatreiche Diät (CKD-Gruppe, durchgezogene Linie). Zudem sind die Ergebnisse von Tieren der I-Kontrolle (gestrichelte Linie) aufgeführt, die 10 Tage kalziumarme, oxalatreiche und anschließend 10 Tage kalziumarme und oxalatarme Diät erhielten. Die Gruppengröße n liegt zwischen 4 und 8 Tieren. Signifikanzniveaus: ***=p<0,001; **=p<0,01; *=p<0,05 vs. "Tag 0"; # vs. Kontrollgruppe; + vs. I-Kontrolle.

65

3.1.7. Immunreaktion der Darmwand

Als Organ, das die Darmflora beherbergt und dessen immunkompetente Zellen in ständiger Kommunikation mit der kommensalen, bakteriellen Besiedelung stehen, sollte der Darm als erstes auf dysbiotische Veränderungen dieser Besiedelung reagieren.

Zusätzlich zur Analyse von Leukozyteninfiltration und Zytokinexpression wurde eine Messung des sekretorischen Immunglobulin A (sIgA) im intestinalen Mukus des Ileums vorgenommen. sIgA wird von B-Zellen der Mukosa sezerniert, die den ersten Kontakt des Immunsystems mit einer möglicherweise veränderten Darmflora darstellen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Konzentration des sIgA sowohl in der CKD- als auch in der Kontroll-Gruppe signifikant anstieg (s. Abbildung 25).



Abbildung 25: Konzentration sekretorischen Immunglobulins A in Ileumspülung.

Vergleichende Darstellung der mittleren Konzentration von sekretorischem Immunglobulin A in PBS-Puffer, der durch Ileumproben gespült wurde, von Mausgruppen, die für 5, 10, 15 oder 20 Tage entweder eine kalziumreiche, oxalatreiche Diät (Kontrollgruppe) oder eine kalziumarme, oxalatreiche Diät (CKD-Gruppe) erhielten. Zudem sind die Ergebnisse von Tieren aufgeführt, die 10 Tage kalziumarme, oxalatreiche und anschließend 10 Tage kalziumarme und oxalatarme Diät erhielten (I-Kontrolle). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwerts wieder. Signifikanzniveaus: ***=p<0,001; **=p<0,01; *=p<0,05 vs. "Tag 0"; # vs. Kontrollgruppe; + vs. I-Kontrolle.

In der Durchflusszytometrie des Ileumgewebes (s. Abbildung 26) ließ sich für die CKD-Gruppe ein Anstieg von T-Zellen und T-Helfer-Zellen feststellen, während die aktivierte Form dieser Zellen vorübergehend (Tag 10) sogar abnahm. APCs und Makrophagen nahmen in dieser Gruppe mit zunehmender Diätdauer ab, während sich am Anteil der aktivierten Zellen nichts änderte. Ein deutlicher Anstieg fand sich jedoch bei Monozyten und inflammatorischen Monozyten.





Darstellung des Anteiles verschiedener Leukozytenpopulationen am Ileumzelllysat in der FACS-Analyse von Mausgruppen, die für 5, 10, 15 oder 20 Tage entweder eine kalzium- und oxalatreiche (Kontrollgruppe, gepunktet) oder eine kalziumarme, oxalatreiche (CKD-Gruppe, durchgezogen) Diät erhielten. Die I-Kontrolle (gestrichelt) erhielt 10 Tage kalziumarme, oxalatreiche und anschließend 10 Tage kalzium- und oxalatarme Diät. Die Gruppengröße n liegt zwischen 4 und 8 Tieren. Signifikanzniveaus: ***=p<0,001; **=p<0,01; *=p<0,05 vs. "Tag 0"; # vs. Kontrollgruppe; + vs. I-Kontrolle.

In der Kontrollgruppe zeigte sich ein etwas ausgeprägteres inflammatorisches Profil: Hier vermehrte sich besonders die Zahl der aktivierten Zellformen verschiedener Leukozytenpopulationen. Die I-Kontrolle lieferte an Tag 20 fast durchgängig eine geringer ausgeprägte Immunreaktion. Immunhistochemische Schnitte wurden für das Ileumepithel nicht angefertigt.

Während in der CKD-Gruppe keine relevanten Veränderungen der Expression von TNF α an den verschiedenen Zeitpunkten festgestellt werden konnte, stieg die Expression von TNF α in der I-Kontrolle an, ohne statistische Signifikanz zu erreichen. Die restlichen verwendeten entzündungsassoziierten Primer (Interleukine-6, -17, -22) lieferten in beiden Darmabschnitten keine brauchbaren Daten. Die Ergebnisse für TNF α sind in Abbildung 27 dargestellt.

Eine Entzündungsreaktion oder allgemeine Leukozyteninfiltration in die Darmwand ließ sich im Ileum zusammenfassend nur teilweise nachweisen. Die Vermehrung insbesondere der aktivierten Antigen-präsentierenden Zellen und des sezernierten IgAs gibt Hinweise darauf, dass es hier zu einem verstärkten Kontakt mit fremden Molekülen kam. Während in der CKD-Gruppe eine mögliche Dysbiose Auslöser der festgestellten Veränderungen sein könnte, kommt in der Kontrollgruppe ein direkter Effekt der harten und obstipativen Faeces, die durch die Kristallbildung entstanden, in Frage.





Vergleichende Darstellung der mittleren mRNA-Menge des pro-inflammatorischen Zytokins Tumornekrosefaktor- α im Verhältnis zur mRNA des *housekeeping*-Gens 18s in Ileum (A) und Colon (B) von Mausgruppen, die für 5, 10, 15 oder 20 Tage entweder eine kalziumreiche, oxalatreiche Diät (Kontrollgruppe) oder eine kalziumarme, oxalatreiche Diät (CKD-Gruppe) erhielten. Zudem sind die Ergebnisse von Tieren aufgeführt, die 10 Tage kalziumarme, oxalatreiche und anschließend 10 Tage kalziumarme und oxalatarme Diät erhielten (I-Kontrolle). Die Gruppengröße n liegt zwischen 4 und 8 Tieren. Signifikanzniveaus: ***=p<0,001; **=p<0,01; *=p<0,05 vs. "Tag 0"; # vs. Kontrollgruppe; + vs. I-Kontrolle.

3.1.8. Funktionelle Darmbarriere

Zur Untersuchung der Funktionalität der Darmbarriere wurden zwei verschiedene Parameter herangezogen: Pathologische Permeabilität in Richtung Lumen wurde über die Konzentration murinen Albumins in den Faeces gemessen, die Durchlässigkeit in Richtung Blutkreislauf wurde über die Konzentration bakteriellen Lipopolysaccharids im Serum und das Vorkommen mikrobiologisch anzüchtbarer Bakterien in der Leber überprüft.

Murines Albumin in den Faeces

In den Faeces wurde die Konzentration murinen Albumins untersucht, das nicht aktiv über das Darmepithel transportiert wird und als globuläres Protein mit einer Molekülmasse um 66 kDa für einen passiven Verlust in das Darmlumen großer Lücken im Epithel bedarf [177]. Die Konzentration murinen Albumins in den Faeces stieg in der CKD-Gruppe bis Tag 10 stark und signifikant an, worauf bis Tag 20 ein leichter, statistisch nicht signifikanter Abfall folgte. Der gemessene Wert an Tag 15 für die CKD-Gruppe, der sich nicht in die erwartete Dynamik einfügt, beruht nur auf einer kleinen Stichprobe und könnte einen Messfehler darstellen.



Abbildung 28: Murine Albuminkonzentration in den Faeces.

Vergleichende Darstellung der mittleren Konzentration murinen Albumins in den Faeces von Mausgruppen, die für 5, 10, 15 oder 20 Tage entweder eine kalzium- und oxalatreiche Diät (Kontrollgruppe) oder eine kalziumarme, oxalatreiche Diät (CKD-Gruppe) erhielten. Zudem sind die Ergebnisse von Tieren aufgeführt, die 10 Tage kalziumarme, oxalatreiche und anschließend 10 Tage kalziumarme und oxalatarme Diät erhielten (I-Kontrolle). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwerts wieder. Signifikanzniveaus: ***=p<0,001; **=p<0,01; *=p<0,05 vs. "Tag 0"; # vs. Kontrollgruppe; + vs. I-Kontrolle.

Auch nach dem Diätwechsel an Tag 10 behielten die Tiere der I-Kontrolle die hohe Konzentration bei. Bei den Tieren der Kontrollgruppe hingegen blieb sie im Bereich des Ausgangswertes. Die Daten weisen also darauf hin, dass die Konzentration murinen Albumins mit dem Ausmaß der Nierenschädigung korreliert. Dargestellt sind die Ergebnisse in Abbildung 28.

Mikrobiologische Kultur des Lebergewebes und Lipopolysaccharid-Spiegel im Serum

Die Gegenrichtung der funktionellen Integrität der Darmbarriere wurde über die Untersuchung der Translokation von Bakterien und bakteriellen Bestandteile in den systemischen Kreislauf getestet. Dies erfolgte zum einen durch die mikrobiologische Kultur zerkleinerten Lebergewebes. Hierbei fanden sich schon in den ersten Versuchen nur selten einzelne CFUs in den verschiedenen Gruppen - ohne Unterschied zwischen CKD- und Kontrollgruppe, sodass eher von einer Kontamination als von bakterieller Translokation auszugehen war und keine weiteren Kulturversuche mit Lebergewebe durchgeführt wurden. Zum anderen erfolgte die Testung der Permeabilität der Darmbarriere in Richtung systemischer Kreislauf durch die Bestimmung der Konzentration von Lipopolysacchariden (LPS), die Teil der Zellwand gram-negativer Bakterien sind, im Serum. Hierzu wurde Serum auf sterile Weise durch kardiale Punktion gewonnen, um eine Kontamination mit der Hautflora der Mäuse zu vermeiden. Es kam in der CKD-Gruppe zwar zu einem signifikanten Anstieg des LPS-Spiegels im Blut, dieser war jedoch mit etwas Verzögerung in der Kontrollgruppe ebenfalls zu beobachten. Aufgrund der schwierigen Blutgewinnung durch kardiale Punktion, deren Ausbeute insbesondere bei kranken Tieren selbst gepoolt kaum für eine Analyse ausreichte, erfolgte eine Nachbestimmung aus retrobulbär entnommenem Serum, um die Gruppengröße zu erhöhen und auch Daten für die Interventions- und Interventions-Kontrollgruppe zu erheben. Die gemessenen Werte aus retrobulbär entnommenem Blut, bei dem eine Verunreinigung mit Keimen der Hautflora anzunehmen ist, überstiegen die Werte aus kardial entnommenem Blut um mehr als eine Zehnerpotenz. Dies kann zum einen an einer möglichen Kontamination liegen, zum anderen ist ein Messfehler in der Analyse des kardial entnommenen Blutes möglich, da es hier zu verstärkter Hämolyse kam und diese das photometrische Verfahren beeinflussen kann. Erhellend ist ein Vergleich mit den LPS-Spiegeln, die von Kesper und Andersen in hochgradig niereninsuffizienten Alportmäusen gemessen wurden [106]. Diese liegen zwei bis drei Zehnerpotenzen über den in dieser Arbeit gemessenen Werten, sodass hier am ehesten von einem negativen Ergebnis im Sinne von normwertigen LPS-Spiegeln auszugehen ist. Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass es zu keiner relevanten Translokation von Bakterien oder Endotoxin kam.



Abbildung 29: Lipopolysaccharidkonzentration im Serum.

Vergleichende Darstellung der mittleren Konzentration von Lipopolysacchariden in kardial (A) und retrobulbär (B) entnommenem Serum von Mausgruppen, die für 5, 10, 15 oder 20 Tage entweder eine kalziumreiche, oxalatreiche Diät (Kontrollgruppe) oder eine kalziumarme, oxalatreiche Diät (CKD-Gruppe) erhielten. Zudem sind die Ergebnisse von Tieren aufgeführt, die 10 Tage kalziumarme, oxalatreiche und anschließend 10 Tage kalziumarme und oxalatarme Diät erhielten (I-Kontrolle). Die Zahl der untersuchten Proben pro Gruppe liegt zwischen 1 und 11. Messwerte ohne Fehlerbalken wurden an nur einer Probe erhoben, sodass hier kein statistischer Vergleich möglich ist. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwerts wieder. Signifikanzniveaus: ***=p<0,001; **=p<0,01; *=p<0,05 vs. "Tag 0"; # vs. Kontrollgruppe; + vs. I-Kontrolle.

Die Ergebnisse lassen zusammenfassend auf eine mit der oxalathaltigen Diät einhergehende Störung der funktionellen Darmbarriere schließen. Allerdings konnte nur eine Richtung, System-Darmlumen und nicht die Gegenrichtung Darmlumen-System gezeigt werden. So kam es zu einem Verlust murinen Albumins in den Darm. Bakterielle Translokation in die Leber, wie das von Kesper und Andersen in einem murinen CKD-Modell beobachtet wurde [106] oder ein Ansteigen bakteriellen Endotoxins im systemischen Kreislauf, wie das für CKD-Patienten beschrieben ist [107], konnte nicht nachgewiesen werden. Der erhöhte Albuminverlust blieb auch nach Diätwechsel bestehen, sodass es sich hierbei eher um eine chronische Folge der Diät (wie CKD) handelt und nicht um ein direktes schädliches Einwirken auf das Darmepithel.

3.1.9. Immunreaktion in der Leber

Durch den *first-pass*-Mechanismus werden alle in die intestinalen Blutgefäße gelangten Substanzen oder gar Organismen zunächst der Leber zugeführt. Daher würden Immunsystemstimulierende Moleküle oder Bakterien, die durch eine gestörte Darmbarriere gedrungen sein könnten, hier zuerst intensiver mit dem Immunsystem in Kontakt kommen [182]. Da es sich bei der Leber zudem um ein immunologisch systemisch wirksames Organ [183] handelt, wurden auch hier Parameter zur Quantifizierung einer Entzündungsreaktion erhoben. So konnte auch hier ein Anstieg von APCs und myeloischen Zellen – insbesondere ein Anstieg der Granulozyten – gemessen werden. In der Kontrollgruppe stiegen diese APCs und Granulozyten weniger stark an, was jedoch nicht für den Gesamtanteil der myeloischen Zellen und den Anteil der neutrophilen Granulozyten galt. Die I-Kontrolle unterschied sich an Tag 20 nicht signifikant von den anderen beiden Gruppen. Die Ergebnisse der Durchflusszyometrie sind in Abbildung 30 dargestellt.

Immunhistochemisch wurden T-Zellen und Makrophagen untersucht. Es zeigte sich bei den nur spärlich verbreiteten T-Zellen ein leichter Anstieg in den Gruppen, die oxalathaltige Diäten erhielten (CKD-Gruppe und Kontrollgruppe), und ein Rückgang von Tag 10 bis Tag 20 in der I-Kontrolle. Die deutlich stärker vertretenen Makrophagen unterschieden sich hinsichtlich ihrer Dichte nicht zwischen den Gruppen. Die quantitativen Ergebnisse sind in Abbildung 31 dargestellt, exemplarische mikroskopische Aufnahmen der histologischen Schnitte finden sich in Abbildung 32 und Abbildung 33.

Bei den in der Leber analysierten, humoralen Parametern war besonders die Expression von Pentraxin-2, einem dem menschlichen C-reaktiven Protein vergleichbaren Akute-Phase-Protein, von Interesse. Hier zeigte sich ein deutlicher Anstieg der Expression in der CKD-Gruppe, der sich signifikant vom nur geringen Anstieg in der Kontrollgruppe abhob.





Darstellung des Anteiles verschiedener Leukozytenpopulationen am Leberzelllysat in der FACS-Analyse von Mausgruppen, die für 5, 10, 15 oder 20 Tage entweder eine kalzium- und oxalatreiche (Kontrollgruppe, gepunktet) oder eine kalziumarme, oxalatreiche (CKD-Gruppe, durchgezogen) Diät erhielten. Die I-Kontrolle (gestrichelt) erhielt 10 Tage kalziumarme, oxalatreiche und anschließend 10 Tage kalziumarme und oxalatarme Diät. Die Gruppengröße n liegt zwischen 4 und 8 Tieren. Signifikanzniveaus: ***=p<0,001; **=p<0,01; *=p<0,05 vs. "Tag 0"; # vs. Kontrollgruppe; + vs. I-Kontrolle.



Abbildung 31: Infiltration der Leber mit T-Zellen (A) und Makrophagen (B) in der Histologie. Vergleichende Darstellung des mittleren Prozentanteils der angefärbten Fläche am gesamten Organquerschnitt immunhistochemisch angefärbter Leberschnitte von Mausgruppen, die für 5, 10, 15 oder 20 Tage entweder eine kalziumreiche, oxalatreiche Diät (Kontrollgruppe) oder eine kalziumarme, oxalatreiche Diät (CKD-Gruppe) erhielten. Zudem sind die Ergebnisse von Tieren aufgeführt, die 10 Tage kalziumarme, oxalatreiche und anschließend 10 Tage kalziumarme und oxalatarme Diät erhielten (I-Kontrolle). Die Gruppengröße n liegt zwischen 2 und 5 Tieren. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwerts wieder. Signifikanzniveaus: ***=p<0,001; **=p<0,01; *=p<0,05 vs. "Tag 0"; # vs. Kontrollgruppe; + vs. I-Kontrolle.

Das Expressionsniveau blieb nach dem anfänglichen Anstieg jedoch von Tag 10 bis Tag 20 auch in der CKD-Gruppe konstant. Ein Diätwechsel nach Tag 10 induzierte einen relevanten Abfall der Expression in der I-Kontrolle. Die Expression von IL-6 zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen und die von TNF α war in beiden Gruppen bis Tag 10 konstant und stieg dann in der I-Kontrolle und geringfügig ausgeprägt auch in der Kontrollgruppe an, während sie in der CKD-Gruppe konstant blieb. Auch hier wurden die Expressionslevel von Interferon- γ und Interleukin-17 erfolglos getestet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 34 graphisch dargestellt.

Zusammenfassend ließen sich in der Leber Hinweise auf eine systemische Aktivierung des Immunsystems finden, die in der CKD-Gruppe signifikant stärker ausgeprägt waren, als in der Kontrollgruppe. Für eine mögliche Translokation von bakteriellen Bestandteilen oder gar lebenden Organismen waren die gemessenen Anstiege jedoch zu vage. Insbesondere ließ sich keine signifikant vermehrte Ansiedlung von Makrophagen feststellen. Eine Beendigung der Diät scheint hier wenig Einfluss auf die Immunreaktion gehabt zu haben.



Abbildung 32: Mikroskopie mit Anfärbung CD3-positiver T-Zellen in der Leber.

Ausschnitte aus 25-fach vergrößerten lichtmikroskopischen Schwarz-Weiß-Aufnahmen von Leberschnitten, auf denen CD3-positive Zellen immunhistochemisch angefärbt wurden. Jeder Schnitt repräsentiert eine Mausgruppe, die für 5, 10, 15 oder 20 Tage entweder eine kalziumreiche, oxalatreiche Diät ("Kontrolldiät") oder eine kalziumarme, oxalatreiche Diät ("CKD-Diät") erhielt. Zudem sind die Aufnahmen von Tieren aufgeführt, die 10 Tage kalziumarme, oxalatreiche und anschließend 10 Tage kalziumarme und oxalatarme Diät erhielten (I-Kontrolle).



Abbildung 33: Mikroskopie mit Anfärbung F4/80-positiver Makrophagen in der Leber.

Ausschnitte aus 25-fach vergrößerten lichtmikroskopischen Schwarz-Weiß-Aufnahmen von Leberschnitten, auf denen F4/80-positive Zellen immunhistochemisch angefärbt wurden. Jeder Schnitt repräsentiert eine Mausgruppe, die für 5, 10, 15 oder 20 Tage entweder eine kalziumreiche, oxalatreiche Diät ("Kontrolldiät") oder eine kalziumarme, oxalatreiche Diät ("CKD-Diät") erhielt. Zudem sind die Aufnahmen von Tieren aufgeführt, die 10 Tage kalziumarme, oxalatreiche und anschließend 10 Tage kalziumarme und oxalatarme Diät erhielten (I-Kontrolle).



Abbildung 34: Expression pro-inflammatorischer Zytokine in der Leber.

Vergleichende Darstellung der mittleren mRNA-Menge pro-inflammatorischer Zytokine (Interleukin-6 (A), Tumornekrosefaktor- α (B), Pentraxin-2 (C)) im Verhältnis zur mRNA des *housekeeping*-Gens 18s im Lebergewebe von Mausgruppen, die für 5, 10, 15 oder 20 Tage entweder eine kalziumreiche, oxalatreiche Diät (Kontrollgruppe) oder eine kalziumarme, oxalatreiche Diät (CKD-Gruppe) erhielten. Zudem sind die Ergebnisse von Tieren aufgeführt, die 10 Tage kalziumarme, oxalatreiche und anschließend 10 Tage kalziumarme und oxalatarme Diät erhielten (I-Kontrolle). Die Gruppengröße n liegt zwischen 4 und 8 Tieren. Signifikanzniveaus: ***=p<0,001; **=p<0,01; *=p<0,05 vs. "Tag 0"; # vs. Kontrollgruppe; + vs. I-Kontrolle.

3.1.10. Systemische Immunreaktion

Um eine systemische Immunreaktion, die nicht direkt, wie die bereits beschriebenen Immunreaktionen in den Organen Niere, Darm und Leber, von lokal erwarteten Schädigungen (Nephrokalzinose, Dysbiose, bakterielle Translokation) abhängig war, festzustellen, wurden systemisch zirkulierende Leukozytenpopulationen im Blut gemessen, sowie wie für die bereits beschriebenen Organe eine Analyse von humoraler und zellulärer Immunreaktion in der Milz durchgeführt, da die Milz als lymphatisches Organ unmittelbar von Immunzellen durchsetzt ist und deren Zusammensetzung wichtige Informationen über systemische Effekte liefern kann [184].

Leukozytenpopulationen im Blut

Zur Messung der im Blut zirkulierenden Leukozytenpopulationen wurde ein maschinelles Differentialblutbild (s. Abbildung 35) angefertigt. In der CKD-Gruppe kam es zu einem vorübergehenden und gegenüber der Kontrollgruppe signifikanten Anstieg der Gesamtleukozytenzahl, die ihr Maximum nach 10-tägiger "CDK-Diät" erreichte und anschließend in den Bereich des Ausgangswertes abfiel. In der Differenzierung zeigte sich, dass für diesen Anstieg der Gesamtzahl in erster Linie die hochsignifikante Zunahme der neutrophilen Granulozyten auf etwas mehr als das 4-fache der Ausgangszahl verantwortlich war. Ebenfalls kam es zu einem signifikanten Anstieg der Monozytenzahl, die gemeinsam mit der Lymphozytenzahl nach Tag 10 wieder signifikant abfiel. Die Ergebnisse nach Beendigung der oxalatreichen Diät unterschieden sich in der I-Kontrolle an Tag 20 bei der Zahl der eosinophilen Granulozyten, die hier signifikant häufiger waren als in der CKD-Gruppe. Außerdem kam es in dieser Gruppe zu einem signifikanten Abfall der neutrophilen Granulozyten von Tag 10 bis Tag 20, was in der CKD-Gruppe nicht der Fall war. In der Kontrollgruppe kam es im zeitlichen Verlauf zu keiner relevanten Veränderung der Leukozytenpopulationen im Vergleich zur Ausgangsgruppe. Ein an Tag 10 gemessener hoher Wert für die Zahl der basophilen Granulozyten, lässt sich unter Berücksichtigung der insgesamt sehr niedrigen Zellzahl und damit fehleranfälligen Messung der basophilen Granulozyten – oftmals wurde vom Gerät keine einzige Zelle gefunden – ohne Zweifel als Messfehler bezeichnen.

Zusammenfassend scheint es durch das oxalathaltige Futter zu einer vorübergehenden Vermehrung der Leukozyten im Blut zu kommen, die besonders von neutrophilen Granulozyten getragen ist, welche erhöht persistieren, während andere Leukozytenpopulationen bis Tag 20 wieder abfallen. Da sich Erhöhungen der neutrophilen Granulozyten besonders bei akuten bakteriellen Infekten oder Verletzungen finden lassen, könnte es sich hier um ein Zeichen für einen akuten Kontakt des Immunsystems mit Krankheitserregern handeln [185].

Immunreaktion in der Milz

In der Durchflusszytometrie (s. Abbildung 36) ließ sich mit zunehmender Diätdauer ein Anstieg der T-Zellen beobachten. Allerdings galt dies nicht für die aktivierten (CD69positiven) T-Zellen. Ebenso verhielt es sich mit den Antigen-präsentierenden Zellen. Der Anteil der myeloischen Zellen, insbesondere der neutrophilen Granulozyten nahm in der Milz stark zu. Mit etwas Zeitverzögerung kam es auch zum Anstieg bei den Monozyten, was jedoch im Beobachtungszeitraum keine relevanten Veränderungen der Makrophagenkonzentration mit sich brachte. Anders als etwa in der Niere verliefen die Kurven der Kontrollgruppe häufig gleichläufig mit den Ergebnissen der CKD-Gruppe und übertrafen diese sogar bei Granulozyten, Makrophagen und APCs. Bei Beendigung der Oxalatzufuhr (I-Kontrolle) kam es zu fallenden Leukozytenpopulationen. Dies gilt mit Ausnahme der regulatorischen T-Zellen, die in dieser Gruppe prominenter ausfielen.

Immunhistochemisch lieferte die quantitative Auswertung aufgrund der heterogenen Zellverteilung (vgl. Abbildung 37 und Abbildung 38) nur sehr vorsichtig zu bewertende Ergebnisse (s. Abbildung 39). Während sich die Makrophagen in der roten Pulpa um die Sinusoide scharen und in der weißen Pulpa gar nicht zu finden sind, häufen sich T-Zellen in

77

den Marginalzonen der weißen Pulpa um Zentralarterien. Die Häufung dieser Zellen ist so ausgeprägt, dass die Anfärbungen einzelner Zellen konfluieren und somit nicht mehr abgrenzbar sind. Es ist daher mit großer Unsicherheit belastet, wenn wie hier der angefärbte Organflächenanteil gemessen wird – insbesondere da die einzelnen Schnitte sehr unterschiedliche Anteile weißer und roter Pulpa enthalten. Es bestätigte sich jedoch der Trend der ausgeprägteren Makrophagenpopulation in der Kontrollgruppe und das Absinken der T-Zellen nach Beendigung der Oxalatzufuhr.

Die Analyse der mRNA (s. Abbildung 40) lieferte keine signifikanten Unterschiede in der Expression von IL-6 zwischen den Gruppen, sodass von einer konstanten, von der Diät unbeeinflussten IL-6-Expression ausgegangen werden muss. Für TNF α ergab sich bei in beiden Gruppen konstanter Expression bis Tag 10 ein tendenzieller Abfall in der CKD-Gruppe bis Tag 20, dem ein signifikanter Anstieg nach Beendigung der Oxalatzufuhr und eine weiterhin konstante Expression in der Kontrollgruppe gegenüberstand. Für die Analyse von Interferon- γ , Interleukin-17 und -22 konnten keine aussagekräftigen Daten erhoben werden.

Eine Immunreaktion in der Milz war somit zwar messbar, aber wesentlich geringer ausgeprägt als etwa in der Niere. Auch verschwammen hier die Unterschiede zwischen CKD- und Kontrollgruppe. Wie in der Einleitung für CKD-assoziierte Immundysfunktion beschrieben, konnte eine Abnahme aktivierter und damit funktionsfähiger Lymphozyten bei gleichzeitiger Zunahme zytotoxischer T-Zellen, sowie eine starke Zunahme Antigen-präsentierender Zellen und neutrophiler Granulozyten beobachtet werden. Es lässt sich von einer Aktivierung des systemischen Immunsystems mit eingeschränkter Lymphozytenaktivierung durch die oxalatreiche Diät sprechen. Die Beendigung der Oxalatzufuhr nach Tag 10 erzeugte ein gespaltenes Bild: Während auf zellulärer Ebene ein niedrigeres Niveau von Entzündung als in den Vergleichsgruppen auftrat, weisen die Ergebnisse der Transkriptionsanalyse in eine andere Richtung, indem sie eine steigende Immunantwort nach Beendigung der Oxalatzufuhr nahelegen. Allerdings konnte letzteres nur für einen einzelnen Parameter gemessen werden. Insgesamt ist das inflammatorische Profil der Milz komplex.

Eine eindeutige Diagnose einer urämisch bedingten Entzündungsreaktion mit gleichzeitiger Immunsuppression lässt sich allein auf Grundlage der hier erhobenen Daten nicht stellen.

78





Vergleichende Darstellung der mittleren Zelldichten verschiedener Leukozytenpopulationen (A-F) im maschinellen Differentialblutbild von Mausgruppen, die für 5, 10, 15 oder 20 Tage entweder eine kalziumreiche, oxalatreiche Diät (Kontrollgruppe) oder eine kalziumarme, oxalatreiche Diät (CKD-Gruppe) erhielten. Zudem sind die Ergebnisse von Tieren aufgeführt, die 10 Tage kalziumarme, oxalatreiche und anschließend 10 Tage kalziumarme und oxalatarme Diät erhielten (I-Kontrolle). Die Gruppengröße n liegt zwischen 2 und 8 Tieren. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwerts wieder. Signifikanzniveaus: ***=p<0,001; **=p<0,01; *=p<0,05 vs. "Tag 0"; # vs. Kontrollgruppe; + vs. I-Kontrolle.





Darstellung des Anteiles verschiedener Leukozytenpopulationen am Milzzelllysat in der FACS-Analyse von Mausgruppen, die für 5, 10, 15 oder 20 Tage entweder eine kalzium- und oxalatreiche (Kontrollgruppe, gepunktet) oder eine kalziumarme, oxalatreiche (CKD-Gruppe, durchgezogen) Diät erhielten. Die I-Kontrolle (gestrichelt) erhielt 10 Tage kalziumarme, oxalatreiche und anschließend 10 Tage kalzium- und oxalatarme Diät. Die Gruppengröße n liegt zwischen 4 und 8 Tieren. Signifikanzniveaus: ***=p<0,001; **=p<0,01; *=p<0,05 vs. "Tag 0"; # vs. Kontrollgruppe; + vs. I-Kontrolle.



Abbildung 37: Mikroskopie mit Anfärbung CD3-positiver T-Zellen in der Milz.

Ausschnitte aus 25-fach vergrößerten lichtmikroskopischen Schwarz-Weiß-Aufnahmen von Milzschnitten, auf denen CD3-positive Zellen immunhistochemisch angefärbt wurden. Jeder Schnitt repräsentiert eine Mausgruppe, die für 5, 10, 15 oder 20 Tage entweder eine kalziumreiche, oxalatreiche Diät ("Kontrolldiät") oder eine kalziumarme, oxalatreiche Diät ("CKD-Diät") erhielt. Zudem sind die Aufnahmen von Tieren aufgeführt, die 10 Tage kalziumarme, oxalatreiche und anschließend 10 Tage kalziumarme und oxalatarme Diät erhielten (I-Kontrolle).



Abbildung 38: Mikroskopie mit Anfärbung F4/80-positiver Makrophagen in der Milz.

Ausschnitte aus 25-fach vergrößerten lichtmikroskopischen Schwarz-Weiß-Aufnahmen von Milzschnitten, auf denen F4/80-positive Zellen immunhistochemisch angefärbt wurden. Jeder Schnitt repräsentiert eine Mausgruppe, die für 5, 10, 15 oder 20 Tage entweder eine kalziumreiche, oxalatreiche Diät ("Kontrolldiät") oder eine kalziumarme, oxalatreiche Diät ("CKD-Diät") erhielt. Zudem sind die Aufnahmen von Tieren aufgeführt, die 10 Tage kalziumarme, oxalatreiche und anschließend 10 Tage kalziumarme und oxalatarme Diät erhielten (I-Kontrolle).





Vergleichende Darstellung des mittleren Prozentanteils der angefärbten Fläche am gesamten Organquerschnitt immunhistochemisch angefärbter Milzschnitte von Mausgruppen, die für 5, 10, 15 oder 20 Tage entweder eine kalziumreiche, oxalatreiche Diät (Kontrollgruppe) oder eine kalziumarme, oxalatreiche Diät (CKD-Gruppe) erhielten. Zudem sind die Ergebnisse von Tieren aufgeführt, die 10 Tage kalziumarme, oxalatreiche und anschließend 10 Tage kalziumarme und oxalatarme Diät erhielten (I-Kontrolle). Die Gruppengröße n liegt zwischen 2 und 5 Tieren. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwerts wieder. Signifikanzniveaus: ***=p<0,001; **=p<0,01; *=p<0,05 vs. "Tag 0"; # vs. Kontrollgruppe; + vs. I-Kontrolle.





Vergleichende Darstellung der mittleren mRNA-Menge pro-inflammatorischer Zytokine (Interleukin-6 (A), Tumornekrosefaktor- α (B)) im Verhältnis zur mRNA des *housekeeping*-Gens 18s im Milzgewebe von Mausgruppen, die für 5, 10, 15 oder 20 Tage entweder eine kalziumreiche, oxalatreiche Diät (Kontrollgruppe) oder eine kalziumarme, oxalatreiche Diät (CKD-Gruppe) erhielten. Zudem sind die Ergebnisse von Tieren aufgeführt, die 10 Tage kalziumarme, oxalatreiche und anschließend 10 Tage kalziumarme und oxalatarme Diät erhielten (I-Kontrolle). Die Gruppengröße n liegt zwischen 4 und 8 Tieren. Signifikanzniveaus: ***=p<0,001; **=p<0,01; *=p<0,05 vs. "Tag 0"; # vs. Kontrollgruppe; + vs. I-Kontrolle.

3.2. Auswirkungen der Antibiotika-Intervention

Um den Einfluss der Darmflora auf die untersuchten Parameter von anderen Einflüssen, die mit Diät und Nierenerkrankung einhergehen, abgrenzen zu können, wurde eine Intervention mit einer Antibiotikamixtur aus Neomycin, Ampicillin und Metronidazol zur Eradikation der Darmflora durchgeführt. Diese wurde nach 10-tägiger "CKD-Diät" gleichzeitig mit einer Umstellung auf oxalatfreie "Basisdiät" an Tag 11 begonnen und bis zur Entnahme der Organe an Tag 20 fortgeführt. Im Folgenden sind die Auswirkungen im Vergleich zur Interventions-Kontrollgruppe, die bei gleicher Diät eine Scheinbehandlung mit Wasser erhielt, dargestellt. Auf diese Weise kann der alleinige Effekt der antibiotischen Intervention sichtbar gemacht werden. Die Daten der Interventions-Kontrollgruppe und deren Einordnung in die zeitliche Entwicklung und Ausprägung von Niereninsuffizienz, Darmflora, Entzündungsreaktion und Darmbarriere sind bereits aus den vorhergehenden Unterkapiteln bekannt.

3.2.1. Eradikation der bakteriellen Darmflora

Durch die Antibiotikagabe kam es zu einer weitgehenden Reduktion der bakteriellen Darmflora, sodass bei sieben der neun Tiere der Interventionsgruppe kein relevantes Wachstum bei Ausplattierung der Faeces auf MacConkey-Agar beobachtet wurde.



Abbildung 41: Eradikation der Darmflora durch Antibiotikaintervention.

Ergebnis des mikrobiologischen Ausstrichs einer Faecessuspension auf MacConkeyPlatten von jeweils drei Mäusen, die nach 10-tägiger oxalathaltiger und kalziumarmer Diät bis zu diesem Zeitpunkt für 5 Tage entweder eine antibiotische Intervention (Intervention) oder eine Scheinbehandlung (I-Kontrolle) erhalten hatten.

Die mittlere CFU-Zahl pro Platte betrug an Tag 15 16800 \pm 7600 vs. 0,0 \pm 0,0 (p-Wert des t-Tests 0,177) und an Tag 20 18900 \pm 11600 vs. 4,5 \pm 4,1 (p-Wert des t-Tests 0,228). Die fehlende statistische Signifikanz ist durch die große Streuung der ermittelten CFU-Zahlen bedingt. Die Besiedelung des Kulturmediums ist in Abbildung 41 qualitativ exemplarisch dargestellt. Die anderen beiden Tiere zeigten nur anfänglich eine Reduktion der Bakteriendichte, die sich im Verlauf an die der Interventions-Kontrollgruppe anglich, sodass von einer Resistenzentwicklung gegenüber den Antibiotika ausgegangen wurde. Die Daten dieser Tiere wurden in sämtlichen Analysen ausgeschlossen.

3.2.2. Nierenmorphologie und lokale Entzündungsreaktion

In der lichtmikroskopischen Untersuchung fand sich eine tendenziell ausgeprägtere Kalziumoxalatdeposition in den Nieren der Antibiotika-behandelten Tiere (in Flächenprozent: $4,84 \pm 0,72$ vs. $3,64 \pm 0,95$), was sich mit einem p-Wert von 0,212 im t-Test als nicht signifikant erwies. Mikromorphologisch konnten in PAS-gefärbten Schnitten keine Unterschiede zwischen Interventions- und Interventions-Kontrollgruppe gefunden werden. In beiden Gruppen fanden sich nekrotische Areale mit untergegangenen Tubuli und Glomeruli, die teils bindegewebig ersetzt worden waren. Die Schnitte sind in Abbildung 42 dargestellt. Ein statistisch signifikanter Unterschied konnte für das lokale, renale Entzündungsgeschehen nur für die Expression von Interferon- γ gemessen werden, die in der Interventionsgruppe höher ausfiel. Dies passt zu einem tendenziell schwächeren Abfall der Lymphozytenzahl im Vergleich zur Interventions-Kontrollgruppe, da IFN γ auch von T-Zellen produziert wird., was wiederum in Zusammenhang mit dem ebenfalls tendenziell weniger ausgeprägten Rückgang der Oxalatdeposition in der Interventionsgruppe stehen könnte. Die Daten für die lokale,

3.2.3. Nierenfunktion

Die antibiotische Eradikation der Darmflora führte, wie in Tabelle 20 dargestellt, zu keinen signifikanten Unterschieden bei Parametern der exkretorischen Nierenfunktion. Die Retikulozytenzahl, als Parameter für die endokrine Nierenfunktion, stieg in der Interventionsgruppe signifikant stärker an als in der Interventions-Kontrollgruppe (I-Kontrolle). Diese geht mit einer in der Interventionsgruppe tendenziell stärker ausgeprägten und in allen relevanten Parametern konsistenten Anämie einher und lässt sich daher reaktiv verstehen. Die gemessenen Werte finden sich in Tabelle 21.

renale Entzündungsreaktion finden sich in den Tabelle 17-19 und in Abbildung 43.



Abbildung 42: Kalziumoxalat und Morphologie der Niere in Abhängigkeit der Darmflora. Mikroskopische Aufnahmen Pizzolato- und PAS-gefärbter histologischer Nierenschnitte in 25x-, 50xund 200x-Vergrößerung von Mäusen, die nach 10-tägiger oxalathaltiger und kalziumarmer Diät entweder eine antibiotische Intervention (Intervention) oder eine Scheinbehandlung (I-Kontrolle) erhielten.

Ziel-RNA	I-Kontrolle (RNA	/18s-RNA)	Intervention (RNA	/18s-RNA)	p-Wert	
IL-6	$2,37 \text{ x}10^{-6} \pm$	3,58 x10 ⁻⁷	$2,68 \text{ x}10^{-6} \pm$	5,18 x10 ⁻⁷	0,630	n.s.
TNFα	$6,79 \text{ x}10^{-6} \pm$	1,06 x10 ⁻⁶	$7,23 \text{ x}10^{-6} \pm$	1,21 x10 ⁻⁶	0,787	n.s.
IFNγ	$1,39 \text{ x} 10^{-6} \pm$	7,85 x10 ⁻⁸	$2,40 \text{ x}10^{-6} \pm$	2,93 x10 ⁻⁷	0,002	**
IL-22	$7,30 \text{ x}10^{-5} \pm$	$3,41 \times 10^{-6}$	$8,29 \text{ x}10^{-5} \pm$	$8,53 \times 10^{-6}$	0,259	n.s.

Tabelle	17: Zvtokinexr	oression in d	ler Niere in	Abhängigkeit de	r Darmflora
1					2

Tabelle 18: Infiltration des Nierengewebes mit T-Zellen und Makrophagen inAbhängigkeit der Darmflora (Histologie - quantitativ)

Zellpopulation (CD-Antigene)	I-Kontrolle	e (%	()	Interventi	on ('	%)	p-Wert	
T-Zellen (CD3)	1,71	±	0,22	1,05	±	0,13	0,057	n.s.
Makrophagen (F4/80)	10,87	±	0,89	11,48	±	0,57	0,578	n.s.



Abbildung 43: Infiltration des Nierengewebes mit T-Zellen und Makrophagen in Abhängigkeit der Darmflora (Histologie - qualitativ).

Ausschnitte aus mikroskopischen Schwarz-Weiß-Aufnahmen von Nierenschnitten, auf denen CD3und F4/80-positive Zellen immunhistochemisch angefärbt wurden. Die Schnitte stammen von Mäusen, die nach 10-tägiger oxalathaltiger und kalziumarmer Diät entweder eine antibiotische Intervention (Intervention) oder eine Scheinbehandlung (I-Kontrolle) erhielten.

Zellpopulation (CD-Antigene)	I-Kontrolle	Intervention	p-Wert	
	(%)	(%)		
Leukozyten (CD45+)	4,8 ± 1,3	4,0 ± 1,3	0,677 n.s.	
T-Zellen (CD3+)	$1,17 \pm 0,22$	$0,75 \pm 0,13$	0,147 n.s.	
ThCs (CD45+CD3+CD4+)	$0,59 \pm 0,13$	$0,39 \pm 0,08$	0,240 n.s.	
CTLs (CD45+CD3+CD8+)	$0,38 \pm 0,06$	$0,30 \pm 0,06$	0,341 n.s.	
Akt. ThCs (CD3+CD4+CD25+)	$0,73 \pm 0,23$	$0,\!48 \pm 0,\!16$	0,412 n.s.	
Akt. Tregs (CD3+CD4+CD25+FoxP3+)	$0,46 \pm 0,11$	$0,26 \pm 0,02$	0,126 n.s.	
Th1-Zellen (CD3+CD4+IFNγ+)	$0,30 \pm 0,06$	$0,29 \pm 0,11$	0,924 n.s.	
Th17-Zellen (CD3+CD4+IL17+)	$0,28 \pm 0,09$	$0,27 \pm 0,12$	0,922 n.s.	
Myeloische Zellen (CD11b+)	$2,22 \pm 0,17$	$1,88 \pm 0,32$	0,332 n.s.	
Granulozyten (CD11c+Ly6G++)	$0,15 \pm 0,03$	$0,11 \pm 0,03$	0,438 n.s.	
Neutrophile G. (CD11b+Ly6G++)	$0,71 \pm 0,13$	$0,50 \pm 0,08$	0,225 n.s.	
APCs (CD11c+)	$1,39 \pm 0,14$	$1,31 \pm 0,33$	0,820 n.s.	
Akt. APCs (CD11c+CD86+)	$0,14 \pm 0,02$	$0,18 \pm 0,05$	0,472 n.s.	
Makrophagen (F4/80+)	$2,67 \pm 0,54$	$3,7 \pm 1,1$	0,389 n.s.	
Akt. Makrophagen (F4/80+CD86+)	$0,32 \pm 0,09$	$0,\!28 \pm 0,\!08$	0,726 n.s.	
Monozyten (Ly6C+)	$0,95 \pm 0,18$	$1,33 \pm 0,13$	0,184 n.s.	
Inflam. Monozyten (Ly6B+Ly6C+)	$0,63 \pm 0,13$	$0,90 \pm 0,08$	0,164 n.s.	

Tabelle 19: Leukozyteninfiltration des Nierengewebes in Abhängigkeit der Darmflora

Legende: ThCs = T-Helfer-Zellen, CTLs = Zytotoxische T-Zellen, APCs = Antigen-präsentierende Zellen, akt. = aktiviert, G. = Granulozyten, inflam. = inlammatorisch.

Tabelle	e 20:	Elektro	olvte und	Retentions	parametern	in Abł	nängig	keit de	r Darmflora

Messgröße (Einheit)	I-Kontrolle		Intervention		p-Wert
Natrium (mmol/l)	154,9 ±	= 1,6	155,0 ±	= 2,9	0,969 n.s.
Kalium (mmol/l)	4,29 ±	= 0,22	4,40 ±	= 0,15	0,695 n.s.
Kalzium (mmol/l)	2,245 ±	= 0,092	2,26 ±	= 0,15	0,910 n.s.
Chlorid (mmol/l])	114,4 ±	= 1,5	113,2 ±	= 2,6	0,686 n.s.
Phosphat (mmol/l)	3,17 ±	= 0,19	2,77 ±	= 0,18	0,151 n.s.
Harnstoff (mg/dl)	148 ±	= 23	146 ±	= 28	0,946 n.s.
Harnsäure (mg/dl)	2,36 ±	= 0,21	2,78 ±	= 0,26	0,231 n.s.
Kreatinin (mg/cl)	0,327 ±	= 0,027	0,301 ±	= 0,049	0,633 n.s.

Tabelle 21: Hämatologische Paramete	r in Abhängigkeit der Darmflora
-------------------------------------	---------------------------------

Messgröße (Einheit)	I-Kontrolle		Intervention		p-Wert	
Erythrozyten $(10^6/\mu l)$	9,88 ±	0,28	9,37 ±	0,19	0,182	n.s.
Hämoglobin (g/dl)	14,88 ±	0,36	13,96 ±	0,24	0,067	n.s.
Hämatokrit (%)	45,44 ±	0,71	44,11 ±	0,83	0,243	n.s.
MCV (fl)	46,13 ±	0,69	47,11 ±	0,45	0,287	n.s.
MCH (pg)	15,08 ±	0,13	14,91 ±	0,15	0,415	n.s.
MCHC (g/dl)	$32,72 \pm$	0,42	31,66 ±	0,51	0,125	n.s.
Retikulozyten ($10^6/\mu l$)	0,217 ±	0,036	0,335 ±	0,029	0,029	*
Retikulozyten (%)	2,27 ±	0,39	$3,56 \pm$	0,26	0,023	*
Thrombozyten $(10^3/\mu l)$	$1220 \pm$	63	1320 ±	110	0,448	n.s.

3.2.4. Darmbarriere in Abhängigkeit der Darmflora

Histomorphologisch zeigten sich, wie in Abbildung 44 zu sehen ist, keine Unterschiede zwischen Interventions-Kontrollgruppe und Interventionsgruppe. Dies gilt auch für die Schnitte, auf denen ZO-1 immunhistochemisch sichtbar gemacht wurde. Dies ist insofern kompatibel zu den Ergebnissen aus dem ersten Teilversuch, als dass auch dort keine histologische Veränderung entdeckt werden konnte, welche sich durch eine Intervention verbessert haben könnte. Die Expression der untersuchten mRNA-Sequenzen (ZO-1 und 2, Occludin, Claudin 1,2 und 4) ergab ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 22 dargestellt.

Die Eradikation der Darmbakterien löste keine hier messbare, konsistente Veränderung der Immunaktivierung der Darmwand aus. Es kam in der Interventionsgruppe lediglich zu einer signifikanten Zunahme der Th17-Zellen (s. Tabelle 24).

Zur Beurteilung der funktionellen Darmbarriere wurde auch hier die murine Albuminkonzentration in den Faeces sowie Lipopolysaccharid im Serum bestimmt (s. Abbildung 45). Dabei zeigte sich eine eindrückliche, signifikante Reduktion der Albuminkonzentration in der Interventionsgruppe. Die LPS-Konzentration wurde hier nur in retrobulbär entnommenem Serum bestimmt. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen gezeigt werden.

Ziel-RNA	I-Kontrolle	Intervention			p-Wert		
	(mRNA/18s-mR	NA)	(mRNA/18	s-m	RNA)		
Occludin im lleum	$1,78 \times 10^{-4} \pm 3,$,24 x10⁻⁵	1,79 x10 ⁻⁴	±	1,47 x10⁻⁵	0,982	n.s.
Occludin im Colon	$1,89 \times 10^{-4} \pm 1,$,93 x10⁻⁵	1,96 x10 ⁻⁴	±	2,45 x10⁻⁵	0,839	n.s.
ZO-1 im lleum	$1,08 \times 10^{-5} \pm 3,$,11 x10⁻ ⁶	7,47 x10⁻ ⁶	±	1,48 x10⁻ ⁶	0,400	n.s.
ZO-1 im Colon	$1,69 \times 10^{-5} \pm 1,$,94 x10 ⁻⁶	1,52 x10⁻⁵	±	2 <i>,</i> 33 x10 ⁻⁶	0,594	n.s.
ZO2 im lleum	4,95 x10 ⁻⁵ \pm 1,	,22 x10⁻⁵	4,79 x10⁻⁵	±	3,03 x10 ⁻⁶	0,913	n.s.
ZO2 im Colon	$2,48 \times 10^{-5} \pm 4,$,80 x10⁻ ⁶	2,88 x10⁻⁵	±	8,93 x10⁻ ⁶	0,694	n.s.
Claudin 1 im lleum	$7,55 \times 10^{-7} \pm 2,$,46 x10 ⁻⁷	5,48 x10 ⁻⁷	±	6,66 x10 ⁻⁸	0,460	n.s.
Claudin 1 im Colon	$3,79 \times 10^{-8} \pm 7,$,73 x10 ⁻⁹	9,09 x10 ⁻⁸	±	4 <i>,</i> 95 x10 ⁻⁸	0,249	n.s.
Claudin 2 im lleum	$2,51 \times 10^{-4} \pm 5,$,38 x10⁻⁵	1,89 x10 ⁻⁴	±	8,77 x10 ⁻⁶	0 <i>,</i> 335	n.s.
Claudin 2 im Colon	$1,57 \times 10^{-7} \pm 4,$,27 x10 ⁻⁸	2,02 x10 ⁻⁷	±	7,54 x10 ⁻⁸	0 <i>,</i> 587	n.s.
Claudin 4 im lleum	$1,22 \times 10^{-4} \pm 2,$,02 x10 ⁻⁵	1,45 x10 ⁻⁴	±	2,59 x10 ⁻⁵	0,508	n.s.

Tabelle 22: Expression von tight-junction-Proteinen in Abhängigkeit der Darmflora

Ziel-RNA	I-Kontrolle (RNA/18s-RNA)		Intervention (RNA/18s-RNA)			p-Wert	
Ileum							
TNFα	$3,78 \text{ x} 10^{-6} \pm$	6,32 x10 ⁻⁷	2,50 x10 ⁻⁶	± 2,	$49 \text{ x} 10^{-7}$	0,138	n.s.
IL-22	$3,23 \text{ x}10^{-5} \pm$	2,73 x10 ⁻⁶	2,58 x10 ⁻⁵	± 3,	$75 \text{ x}10^{-6}$	0,177	n.s.

Colon					
TNFα	$6,32 \text{ x}10^{-6} \pm$	1,13 x10 ⁻⁶	$6,40 \text{ x}10^{-6} \pm$	8,48 x10 ⁻⁷	0,957 n.s.
IL-22	$6,13 \text{ x}10^{-5} \pm$	1,12 x10 ⁻⁵	$7,29 \text{ x}10^{-5} \pm$	1,47 x10 ⁻⁵	0,536 n.s.



Abbildung 44: Mikroskopische Darmbarriere im Ileum in Abhängigkeit der Darmflora.

Mikroskopische Aufnahmen HE- und ZO-1-gefärbter histologischer Ileumschnitte in 200x- und 360x-Vergrößerung von Mäusen, die nach 10-tägiger oxalathaltiger und kalziumarmer Diät entweder eine antibiotische Intervention (Intervention) oder eine Scheinbehandlung (I-Kontrolle) erhielten.

Zellpopulation (CD-Antigene)	I-Kontrolle (%)		Interve	ntion (%)	p-Wert	p-Wert	
Akt. Lymphozyten (CD69+)	1,30 ±	0,22	1,52	± 0,05	0,448	n.s.	
T-Zellen (CD3+)	9,37 ±	1,86	11,1	± 2,3	0,568	n.s.	
ThCs (CD3+CD4+)	1,72 ±	0,26	2,17	± 0,30	0,280	n.s.	
Akt. ThCs (CD3+CD4+CD69+)	0,54 ±	0,15	0,43	\pm 0,08	0,578	n.s.	
Akt. CTLs (CD3+CD8+CD69+)	0,32 ±	0,05	0,32	± 0,04	0,971	n.s.	
Akt. Tregs (CD3+CD4+CD25+FoxP3+)	0,17 ±	0,03	0,17	± 0,03	0,900	n.s.	
APCs (CD11c+)	1,95 ±	0,28	1,84	± 0,38	0,819	n.s.	
Akt. APCs (CD11c+CD86+)	0,09 ±	0,03	0,11	± 0,04	0,701	n.s.	
Myeloische Zellen (CD11b+)	2,87 ±	0,91	2,8	± 1,1	0,963	n.s.	
Granulozyten (CD11c+Ly6G++)	0,43 ±	0,13	0,54	± 0,16	0,602	n.s.	
Neutrophile G. (CD11b+Ly6G++)	0,33 ±	0,12	0,26	± 0,07	0,656	n.s.	
Makrophagen (F4/80+)	2,04 ±	0,58	1,62	± 0,59	0,614	n.s.	
Akt. Makrophagen (F4/80+CD86+)	0,18 ±	0,06	0,18	± 0,05	0,970	n.s.	
Monozyten (Ly6C+)	1,68 ±	0,53	1,17	± 0,39	0,458	n.s.	
Inflam. Monozyten (Ly6B+Ly6C+)	0,76 ±	0,28	0,73	± 0,26	0,933	n.s.	
Th1-Zellen (CD3+CD4+IFNγ+)	$0,\!60$ ±	0,21	0,65	± 0,26	0,893	n.s.	
Th17-Zellen (CD3+CD4+IL17+)	0,03 ±	0,01	0,13	± 0,01	0,011	*	

Tabelle 24: Leukozyteninfiltration des lleumgewebes in Abhängigkeit der Darmflora

Legende: ThCs = T-Helfer-Zellen, CTLs = Zytotoxische T-Zellen, APCs = Antigen-präsentierende Zellen, akt. = aktiviert, G. = Granulozyten, inflam. = inlammatorisch.





Vergleichende Darstellung der mittleren Konzentration murinen Albumins in den Faeces und von Lipopolysacchariden in retrobulbär entnommenem Serum von Mausgruppen, die nach 10-tägiger oxalathaltiger und kalziumarmer Diät entweder eine antibiotische Intervention (Intervention) oder eine Scheinbehandlung (I-Kontrolle) erhielten. Die Gruppengröße n liegt zwischen 4 und 9 Tieren. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwerts wieder. Der p-Wert in (A) beträgt an Tag 15 0,030 und an Tag 20 0,0008, der p-Wert in (B) beträgt 0,518. Graphisch: ***=p<0,001; **=p<0,01; *=p<0,05.

3.2.5. Hepatische und systemische Inflammation in Abhängigkeit der Darmflora

Zur Feststellung der durch mögliche Translokation ausgelösten hepatischen und systemischen Immunreaktion wurden auch in diesem Fall die Expression pro-inflammatorischer Zytokine und die Gewebeinfiltration von Leukozytenpopulationen in Leber- und Milzgewebe, sowie die Differenzierung der Blutleukozyten untersucht.

Es ließen sich weder auf zellulärer, noch auf humoraler Ebene statistisch signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen nachweisen, die für eine generell veränderte Entzündungsreaktion sprächen. Die erhobenen Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen und als mikroskopische Aufnahmen dargestellt.

Einzig die Zytokinexpression in der Milz wies in der Interventionsgruppe ein geringeres Niveau auf, das für TNFα und IL-22 signifikant war und für die anderen beiden gemessenen Zytokine IL-6 und IFNy in der Tendenz bestand (s. Tabelle 31). Dies könnte auf eine geringfügig schwächer ausgeprägte systemische Entzündungsreaktion in der Interventionsgruppe hinweisen. Es erscheint aber in Anbetracht der fehlenden Signifikanz und Tendenz anderer systemischer Parameter genauso gut möglich, dass es sich hier nicht um wahre Unterschiede, sondern um zufallsmäßige Signifikanzen handelt, die bei einer solchen Vielzahl gemessener Parameter mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit auftreten. Daher ist eher davon auszugehen, dass die durchgeführte antibiotische Intervention keinen relevanten Einfluss auf die untersuchten Parameter des systemischen Immunsystems hatte.

Ziel-RNA	I-Kontrolle (RN	NA/18s-RNA)	Intervention (RN	NA/18s-RNA)	p-Wer	rt
IL-6	$4,72 \text{ x}10^{-7} \pm$	5,97 x10 ⁻⁸	$4,35 \text{ x}10^{-7} \pm$	9,26 x10 ⁻⁸	0,729	n.s.
TNFα	$4,48 \text{ x} 10^{-6} \pm$	$6,30 \times 10^{-7}$	$4,00 \text{ x}10^{-6} \pm$	$1,15 \times 10^{-6}$	0,699	n.s.
IFNγ	$4,13 \times 10^{-7} \pm$	6,69 x10 ⁻⁸	$3,77 \times 10^{-7} \pm$	7,41 x10 ⁻⁸	0,726	n.s.
PTX-2	9,32 x10 ⁻⁴ \pm	1,66 x10 ⁻⁴	$6,38 \text{ x} 10^{-4} \pm$	8,82 x10 ⁻⁵	0,199	n.s.

Tabelle 25: Zytokinexpression in der Leber in Abhängigkeit der Darmflora

 Tabelle 26: Infiltration des Lebergewebes mit T-Zellen und Makrophagen in

 Abhängigkeit der Darmflora (Histologie - quantitativ)

Zellpopulation (CD-Antigene)	I-Kontrolle (%)		Intervent	p-Wert	;		
T-Zellen (CD3)	0,47 ±	0,11	0,354	±	0,084	0,493	n.s.
Makrophagen (F4/80)	5,38 ±	0,39	5,8	±	1,1	0,714	n.s.



Abbildung 46: Infiltration des Lebergewebes mit T-Zellen und Makrophagen in Abhängigkeit der Darmflora (Histologie - qualitativ).

Ausschnitte aus mikroskopischen Schwarz-Weiß-Aufnahmen von Nierenschnitten, auf denen CD3- und F4/80-positive Zellen immunhistochemisch angefärbt wurden. Die Schnitte stammen von Mäusen, die nach 10-tägiger oxalathaltiger und kalziumarmer Diät entweder eine antibiotische Intervention (Intervention) oder eine Scheinbehandlung (I-Kontrolle) erhielten.

Tabelle 27: Leukozyteninfiltration des I	Lebergewebes in Abhängigkeit der Darmflora

Zellpopulation (CD-Antigene)	I-Kont	trol	le (%)	Interve	entio	on (%)	p-Wert	
APCs (CD11c+)	3,3	±	1,3	3,8	±	2,7	0,843	n.s.
Myeloische Zellen (CD11b+)	2,85	±	0,77	1,84	±	0,61	0,364	n.s.
Granulozyten (CD11c+Ly6G++)	2,4	±	1,3	3,1	±	2,6	0,815	n.s.
Neutrophile G. (CD11b+Ly6G++)	1,23	±	0,44	0,92	±	0,37	0,621	n.s.
T-Zellen (CD3+)	4,9	±	2,0	3,89	±	0,66	0,694	n.s.
Th1-Zellen (CD3+CD4+IFNγ+)	0,92	±	0,11	1,11	±	0,12	0,293	n.s.
Th17-Zellen (CD3+CD4+IL17+)	0,357	±	0,092	0,51	±	0,17	0,415	n.s.

Legende: ThCs = T-Helfer-Zellen, APCs = Antigen-präsentierende Zellen, G. = Granulozyten.

Messgröße (Einheit)	I-Kontroll	e		Intervention p-			p-Wert	
Leukozyten $(10^3/\mu l)$	7,0	±	1,0	7,19	±	0,95	0,890	n.s.
Lymphozyten $(10^3/\mu l)$	3,84	±	0,76	4,45	±	0,64	0,557	n.s.
Monozyten $(10^3/\mu l)$	1,06	±	0,21	1,25	±	0,17	0,504	n.s.
Neutrophile G. $(10^3/\mu l)$	1,35	±	0,18	1,26	±	0,31	0,783	n.s.
Eosinophile G. $(10^3/\mu l)$	0,178	±	0,048	0,220	±	0,043	0,524	n.s.
Basophile G. $(10^3/\mu l)$	0,0056	±	0,0018	0,0029	±	0,0018	0,312	n.s.

Tabelle 28: Leukozytenpopulationen im Blut in Abhängigkeit der Darmflora

Tabelle 29: Leukozyteninfiltration des Milzgewebes in Abhängigkeit der Darmflora

Zellpopulation (CD-Antigene)	I-Kontrol	le (%)	Interventio	on (%)	p-Wert	
Akt. Lymphozyten (CD69+)	3,63 ±	0,79	3,9 ±	1,0	0,821 n.s.	
T-Zellen (CD3+)	$37,6 \pm$	2,1	34,1 ±	2,4	0,292 n.s.	
Akt. ThCs (CD3+CD4+CD69+)	$2,70$ \pm	0,60	$2,\!65$ ±	0,60	0,952 n.s.	
Akt. CTLs (CD3+CD8+CD69+)	$0,76 \pm$	0,10	$0,\!96$ ±	0,23	0,409 n.s.	
ThCs (CD3+CD4+)	16,2 ±	1,1	15,1 ±	1,1	0,503 n.s.	•
Akt. ThCs (CD3+CD4+CD25+)	$4,9$ \pm	1,3	4,8 ±	1,3	0,964 n.s.	
Akt. Tregs (CD3+CD4+CD25+FoxP3+)	0,424 ±	0,084	$0,\!464$ ±	0,095	0,753 n.s.	
Th1-Zellen (CD3+CD4+IFNγ+)	$1,32 \pm$	0,11	$1,12 \pm$	0,16	0,330 n.s.	
Th17-Zellen (CD3+CD4+IL17+)	$0,587$ \pm	0,055	$0,570 \pm$	0,039	0,829 n.s.	
APCs (CD11c+)	$3,80$ \pm	0,23	$4,08$ \pm	0,17	0,385 n.s.	
Akt. APCs (CD11c+CD86+)	0,154 ±	0,054	$0,\!092$ ±	0,022	0,384 n.s.	
Myeloische Zellen (CD11b+)	4,04 ±	0,58	$3,\!47$ ±	0,31	0,438 n.s.	
Granulozyten (CD11c+Ly6G++)	0,77 ±	0,10	$0,\!80$ \pm	0,12	0,871 n.s.	
Neutrophile G. (CD11b+Ly6G++)	$0,52$ \pm	0,13	$0,\!39$ ±	0,14	0,522 n.s.	
Makrophagen (F4/80+)	$2,\!26$ ±	0,18	$2,33 \pm$	0,27	0,820 n.s.	•
Akt. Makrophagen (F4/80+CD86+)	$0,\!47$ \pm	0,17	$0,355 \pm$	0,079	0,613 n.s.	
Monozyten (Ly6C+)	$0,\!69$ \pm	0,13	$0,\!96$ ±	0,29	0,380 n.s.	
Inflam. Monozyten (Ly6B+Ly6C+)	$0,\!270$ ±	0,055	$0,42 \pm$	0,11	0,201 n.s.	•

Tabelle 30: Infiltration des Milzgewebes mit T-Zellen und Makrophagen in Abhängigkeit der Darmflora (Histologie - quantitativ)

Zellpopulation (CD-Antigene)	I-Kontrolle (%)			Intervention (%)			p-Wert	
T-Zellen (CD3)	19,6	\pm	4,0	28,2	±	2,7	0,213	n.s.
Makrophagen (F4/80)	21,06	±	0,89	18,1	±	1,6	0,151	n.s.



Abbildung 47: Infiltration des Milzgewebes mit T-Zellen und Makrophagen in Abhängigkeit der Darmflora (Histologie - qualitativ).

Ausschnitte aus mikroskopischen Schwarz-Weiß-Aufnahmen von Nierenschnitten, auf denen CD3und F4/80-positive Zellen immunhistochemisch angefärbt wurden. Die Schnitte stammen von Mäusen, die nach 10-tägiger oxalathaltiger und kalziumarmer Diät entweder eine antibiotische Intervention (Intervention) oder eine Scheinbehandlung (I-Kontrolle) erhielten.

Tabelle 31:	Zytokinexpi	ession in de	er Milz in	Abhängigkeit	der Darmflora
	v 1				

Ziel-RNA	I-Kontrolle (RNA/18s-RNA)		Intervention (RNA	p-Wert		
IL-6	$4,75 \text{ x}10^{-7} \pm$	3,97 x10 ⁻⁸	$3,73 \text{ x}10^{-7} \pm$	4,51 x10 ⁻⁸	0,119	n.s.
TNFα	$2,53 \text{ x}10^{-5} \pm$	2,36 x10 ⁻⁶	$1,66 \text{ x} 10^{-5} \pm$	2,09 x10 ⁻⁶	0,020	*
IFNγ	$2,88 \text{ x10}^{-6} \pm$	2,48 x10 ⁻⁷	$2,46 \text{ x}10^{-6} \pm$	$3,35 \text{ x}10^{-7}$	0,338	n.s.
IL-22	$1,39 \text{ x} 10^{-4} \pm$	1,20 x10 ⁻⁵	$7,85 \text{ x}10^{-5} \pm$	7,85 x10 ⁻⁶	0,002	**

4. Diskussion

Ziele dieser Arbeit waren die Charakterisierung eines neuen diätetischen, murinen Oxalatnephropathiemodells hinsichtlich Nierenfunktion, Darmbarriere, Darmflora und Immunsystem, sowie die experimentelle antibiotische Eradikation der bakteriellen Darmflora, um zur Beantwortung der Frage nach dem Einfluss der Darmflora auf die systemische Immundysfunktion bei CKD beizutragen.

Es konnte gezeigt werden, dass durch die oxalatreiche Diät, eine chronische strukturelle und funktionelle Nierenschädigung, eine quantitative Dysbiose, eine Erhöhung der intestinalen Permeabilität und entzündliche Veränderungen der lokalen und systemischen Immunantwort induziert werden konnten. Dies bedeutet, dass für die erste zu Beginn aufgestellte Hypothese H1 angenommen und H0 verworfen werden muss. Die zweite Hypothese, die besagt, dass durch die oxalatreiche Diät ausgelöste Veränderungen des Immunsystems und der Darmbarriere durch antibiotische Eradikation der dysbiotischen Darmflora reversibel sind, konnte teilweise bestätigt werden. Die antibiotische Intervention führte zu einer weitgehenden Eradikation der bakteriellen Darmflora und einem Rückgang der intestinalen Permeabilität aber nicht zu relevanten Veränderungen von Parametern des Immunsystems. Ein Einfluss der antibiotischen Intervention auf die Nierenfunktion oder den Nierenparenchymschaden konnte nicht festgestellt werden, was der Nullhypothese der dritten aufgestellten Hypothese entspricht, die somit weiter angenommen werden muss.

Im Folgenden sollen die erhobenen Ergebnisse im Kontext der bisher veröffentlichten Literatur diskutiert werden. Wichtige Bezugspunkte sind hierbei die Arbeiten von Knauff [33] und Mulay [165] hinsichtlich des Mausmodells, sowie die Arbeit von Kesper und Andersen [106], die unter sehr ähnlicher Zielsetzung an einem genetischen Mausmodell für Alportnephropathie durchgeführt wurde. Diskutiert werden zudem methodische und strategische Limitationen der Arbeit und deren Auswirkungen auf die Aussagekraft der erhobenen Daten. Dabei sollen ein Ausblick in die zukünftige Bedeutung des Themas für Forschung und Klinik gegeben und Anforderungen an zukünftige Forschung in diesem Bereich formuliert werden.

4.1. Ist die diätetische Oxalatnephropathie ein geeignetes murines CKD-Modell?

Ein diätetisch induziertes Modell für murine Oxalatnephropathie wurde zuerst 2013 von Knauf [33] in einer Arbeit zum Pathomechanismus der Oxalatnephropathie vorgestellt. Dies führte in der AG Anders zur Idee der Etablierung dieses Modells als allgemeines CKD- Modell. Die vorliegende Arbeit ist eine der ersten der AG Anders, die dieses Modell verwendete, das etwas später unter Federführung von Mulay eingehender charakterisiert und Manuskriptes auch publiziert wurde [165]. während der Fertigstellung dieses Übereinstimmend mit den Daten von Knauf und Mulay konnte hier gezeigt werden, dass es durch oxalatreiche und kalziumfreie "CKD-Diät" zu einer mit der Diätdauer progredienten Einschränkung der exkretorischen und endokrinen Nierenfunktion kommt, die sich durch ein Ansteigen von Kreatinin, Harnstoff, Kalium und Phosphat auf der einen Seite und einer renalen Anämie auf der anderen Seite ausdrückt. Darüber hinaus konnte Mulay zeigen, dass es auch zum arteriellen Hypertonus, zur Myokardfibrose, zum Ansteigen des Parathormons, im Sinne eines sekundären Hyperparathyreoidismus, und zur metabolischen Azidose kommt. Histologisch zeigten sich wie in den bereits publizierten Arbeiten atrophe, aufgeweitete und teilweise nekrotische Tubuli. Die ersten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legten eine stabile Schädigung der Nierenfunktion nach zehntägiger "CDK-Diät" nahe, sodass dieser Zeitpunkt für den Beginn des Interventionsversuches mit Diätwechsel gewählt wurde. Sowohl die dann erhobenen Daten der Interventions-Kontrollgruppe als auch die Ergebnisse von Mulay, der ebenfalls einen Diätwechsel hin zu oxalatfreier Diät vollzog, zeigen aber eine teilweise Restitution der Nierenfunktion nach Absetzen der "CKD-Diät". Diese Restitution fällt umso stärker aus, je früher der Diätwechsel stattfindet. Während es nach siebentägiger "CKD-Diät" noch zu einem deutlichen Anstieg der GFR innerhalb der folgenden 14 Tage kommt, sind GFR und Serumkreatinin nach 14-tägiger "CKD-Diät" auch nach Diätwechsel weitgehend konstant [165]. Dies deckt sich mit der hier erhobenen Halbierung des Serumkreatinins durch Absetzen der "CKD-Diät" nach Tag 10. Entscheidend und von Mulay nicht berichtet sind die hier festgestellte Restitution der Elektrolythämostase und das Ansteigen der Retikulozytenzahl als Zeichen der Erholung der endokrinen Nierenfunktion. Im Gegensatz dazu zeigte sich keine wesentliche Restitution des morphologischen Nierenschadens. An der Stelle untergegangener Nephrone konnte die Bildung bindegewebigen Ersatzgewebes im Sinne einer Defektheilung beobachtet werden.

Die initial bestimmte Niereninsuffizienz ist also zu einem guten Teil von akuten Folgen erhöhter Serumoxalatspiegel und der Anwesenheit von Oxalatkristallen im Nierengewebe abhängig. Da aber die strukturelle Schädigung des Nierengewebes mit der Nekrose von Tubuli und schließlich dem Untergang von Nephronen ebenfalls mit der Diätdauer zunimmt und durch Beendigung der "CKD-Diät" nicht reversibel ist, lässt sich auf diese Weise ein bestimmtes Ausmaß der Nierenerkrankung sehr individuell einstellen, was einen großen Vorteil des Modells darstellt. Im konkreten Fall dieser Arbeit, in der es um systemische Immundysfunktion geht, die besonders bei ESRD-Patienten beobachtet wurde, hätte

97

rückblickend ein längerer Zeitraum für die Nierenschädigung durch "CKD-Diät" gewählt werden sollen, um aussagekräftigere Daten zu gewinnen.

Auch in Bezug auf das lokale Entzündungsgeschehen stimmen die erhobenen Daten mit den Daten von Knauf und Mulay überein. Es zeigte sich zunächst eine tubuläre und mit zunehmender Diätdauer auch eine interstitielle Bildung von Kalziumoxalatkristallen in der Niere, die einherging mit einer ausgeprägten Entzündungsreaktion. Mulay konnte in einer früheren Arbeit [164] wie Knauf [33] zeigen, dass der renale Parenchymschaden, von dieser Entzündungsreaktion abhängig war und dass diese über die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms und IL1ß vermittelt wurde. Wichtige erhobene Entzündungsparameter waren unter anderem die Infiltration des Nierengewebes mit T-Zellen und Makrophagen, sowie die Erhöhung der Expression von TNFa und IL6, was jeweils hier bestätigt werden konnte. Ein neuer Befund dieser Arbeit ist, dass sowohl die Anzahl und Dichte der Kristallablagerung in der Niere, als auch die Entzündungsreaktion in der Niere durch das Absetzen der "CKD-Diät" deutlich abnimmt. Daher ist anzunehmen, dass die lokale Inflammation, deren unausweichliche Auswirkungen auf die systemische Immunreaktion weiter unten noch diskutiert werden wird, mit zunehmendem, zeitlichem Abstand zur diätetischen Nierenschädigung als Confounder und Einflussfaktor auf andere Mechanismen der urämischen Immundysfunktion abnimmt.

Interessant sind die erhobenen Daten der Kontrollgruppe, die oxalathaltiges, kalziumreiches Futter erhielt, und für die daher aufgrund der Komplexierung des Oxalats im Darm keine systemische Oxalataufnahme erwartet wurde, so wie das auch von Knauf [33] beobachtet worden war. Die hier erhobenen Daten zeigen jedoch signifikante und relevante Effekte der "Kontrolldiät" auf verschiedene der erhobenen Parameter. In Übereinstimmung mit Knauf kam es zwar nicht zu einer relevanten Kristallbildung in der Niere, auch wurde keine lokale Entzündungsreaktion in der Niere festgestellt, die Nierenfunktion jedoch litt unter dem Diätwechsel, was die Daten für Kreatinin, Kalium, Phosphat und besonders für die Retikulound Thrombozytenzahl bewiesen. Darüber hinaus zeigten sich verschiedene Daten der systemischen Immunreaktion in gleicher oder ähnlicher Weise verändert wie in der CKD-Gruppe. Eine Überprüfung der Reversibilität durch Diätwechsel fand für die Kontrollgruppe nicht statt. Es ist aber sehr wahrscheinlich, dass diese ein hohes Maß erreichen würde, da sich keine strukturell-morphologischen Nierenschäden zeigten. Trotzdem ist der Einsatz der oxalat- und kalziumreichen Diät als Kontrolldiät für CKD-Modelle fragwürdig, da sich anders als von Knauf publiziert keine Neutralität gegenüber renalen Parametern feststellen ließ. Die Verwendung als Kontrolldiät in der vorliegenden Arbeit erfolgte unter der Annahme dieser renalen Neutralität und mit der Erwartung einer mit der "CKD-Diät" vergleichbaren Wirkung

auf die bakterielle Darmflora. Der reine Diäteinfluss auf letztere lässt sich von anderen erwarteten Einflüssen wie der Urämie durch die durchgeführten Untersuchungen nicht sauber trennen. Es ist zwar bekannt, dass oxalathaltige Diät zur Veränderung des intestinalen Microbioms mit einer Zunahme Oxalat-metabolisierender Bakterienspezies führt [186], es gibt bisher jedoch noch keine Studien über die Auswirkung komplexierten Oxalats auf das intestinale Mikrobiom. Besonders wahrscheinlich ist eine ähnliche Wirkung auf die Darmflora jedoch nicht, da es bei den Tieren der Kontrollgruppe zu makromorphologisch sich von der CKD-Gruppe unterscheidenden und durch die Kristallbildung sehr harten Faeces und keiner Zunahme der Bakterienzahl kam. Der Einsatz der oxalathaltigen, kalziumreichen Diät hat sich daher rückblickend nicht bewährt.

Abschließend lässt sich feststellen, dass es sich beim diätetischen Oxalatnephropathiemodell, wie es hier vorgestellt wurde, um ein murines CKD-Modell handelt, das eine Reihe bedeutender Vorteile gegenüber anderen murinen CKD-Modellen bietet. Wie von Mulay [165] bereits diskutiert, ist der Nierenschaden sehr einfach, schnell und reproduzierbar zu induzieren, es werden keine nebenwirkungsreichen chirurgischen Interventionen benötigt (wie etwa bei 5/6-Nephrektomie oder unilateraler Obstruktion des Ureters), es sind keine speziellen genetischen Varianten, deren Zucht äußerst zeitraubend ist und mit einem aus Tierschutzsicht bedenklichen Überschuss an nichtverwertbaren Mäusen einhergeht, notwendig und es kann das gewünschte Ausmaß der Nierenschädigung über die Diätdauer sehr präzise eingestellt werden. Da sich Nierenerkrankungen in ihrer Endstrecke pathophysiologisch gleichen [165] ist auch der Umstand, dass es sich hier um eine primärtubuläre Schädigung anstatt des epidemiologisch vorherrschenden Podozytenverlustes [187] handelt, für die Untersuchung von CKD-Komplikationen nachrangig.

Aus dieser Arbeit geht aber hervor, dass zwischen der Induktion des Nierenschadens durch oxalatreiche Diät und der Untersuchung von CKD-assoziierten Parametern eine Karenzzeit liegen sollte, in der die akuten Folgen der Diät und die entzündliche Nierenschädigung zurückgehen und so die Sicht freimachen auf die wahren Auswirkungen und Folgen von CKD. Die genaue Zeitdauer kann aus dieser Studie nicht entnommen werden. Hier wurde nach zehn Tagen "CKD-Diät" nur ein Zeitraum von zehn Tagen Standarddiät getestet. Ob die beobachteten Parameter sich nach dieser Zeit weiter verändern oder schon nach kürzerer Zeit ein stabiles Niveau erreichen, lässt sich nur spekulieren. Außerdem ist davon auszugehen, dass die notwendige Karenzzeitdauer von Umständen wie dem genetischen Hintergrund der Mauslinie, dem Alter und Geschlecht der Mäuse abhängen.
4.2. Dysbiose und Darmbarrierestörung: Was ist Henne und was ist Ei?

Die den Experimenten dieser Arbeit zugrundeliegende Theorie besagt, dass ein relevanter ursächlicher Faktor von CKD-assoziierter Immundysfunktion im dauerhaften, pathologischen Kontakt des Immunsystems mit einer dysbiotisch veränderten Darmflora begründet liegt. Sowohl diese dysbiotische Veränderung der Darmflora als auch eine erhöhte Permeabilität des Darmepithels bis hin zur Translokation von lebenden Bakterien wurden in der Literatur für Individuen mit chronischer Nierenerkrankung wiederholt beschrieben [157, 158, 188] und konnten auch tierexperimentell von Kesper und Andersen [106] bestätigt werden. In dieser Arbeit stand zur Beschreibung der dysbiotischen Darmflora nur die sehr grobe Ausstrichmethode zur Verfügung, die sich äußerst schwer standardisieren ließ und Daten mit sehr großen Schwankungen und Unsicherheiten hervorbrachte. Insgesamt zeigte sich eine Zunahme der Bakterienzahl mit zunehmender CKD, insbesondere die Zunahme gramnegativer Bakterien ließ sich dokumentieren. Die Zahl gram-negativer Bakterien blieb auch nach Diätwechsel vermehrt, was gegen eine direkte Veränderung des Mikrobioms durch die oxalatreiche Diät und für einen über chronische Folgen der Diät (wie möglicherweise CKD) vermittelten Effekt spricht. Die Schwierigkeit direkte von indirekten Effekten der Oxalatdiät, die per se zur Dysbiose führen kann [186], zu unterscheiden wurde bereits im vorherigen Teilkapitel angesprochen. Es wird durch die Arbeit deutlich, dass eine messbare Dysbiose sehr früh im Verlauf der CKD auftreten kann.

Ein bedeutender Baustein der untersuchten Hypothese ist eine Störung der Darmbarriere, sodass es zu einem pathologisch verstärkten Kontakt des systemischen Immunsystems mit der Darmflora kommen kann [158, 188]. Lichtmikroskopisch konnte hier keine strukturelle Pathologie erkannt werden, die jedoch auch fokal aufgetreten und auf diese Weise der Beobachtung entgangen sein könnte. Die mRNA-Expressionsanalyse ergab veränderte Expressionslevel, die auf eine Schädigung hindeuten können und in anderen Studien schon in kleinerem Umfang gezeigt wurden [104]. Funktionell ergaben sich Hinweise auf eine erhöhte Permeabilität durch die starke Zunahme murinen Albumins in den Faeces. Dieses konnte auch nach Diätwechsel noch nachgewiesen werden, was wie schon die nach Diätwechsel persistierende expansive Dysbiose gegen einen direkten Effekt der Diät spricht. Eine wichtige Erkenntnis dieser Arbeit ist der ausgeprägte Rückgang des murinen Albumins in den Faeces durch die antibiotische Eradikation der Darmbakterien. Beachtlich ist besonders der Abfall unter das Niveau des Ausgangswertes an Tag 0. Dieses Ergebnis ist auf den ersten Blick widersprüchlich und lässt Zweifel an der Validität der Bestimmung murinen Albumins in den Faeces als Parameter für eine gestörte Darmbakterier zu. Es erscheint als ob die Intervention

die "löchrige" Darmwand in einem Ausmaß geheilt hätte, das über den Normalzustand hinausgeht. Besonders bei Betrachtung der sehr ähnlichen Entwicklung von CFU-Zahl und Albuminkonzentration drängt sich eine andere Interpretation auf: Die gemessene Albuminkonzentration scheint mehr über die intestinale Bakterienzahl als über die Integrität des Darmepithels auszusagen. Auf den zweiten Blick ist die Tatsache, dass die Albuminkonzentration unter den Ausgangswert abfällt, gar nicht so abwegig. Durch die CKD aber auch durch den gemessenen intestinalen Albuminverlust kommt es mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einer Hypalbuminämie, die hier leider nicht überprüft wurde. Bei niedrigeren Serumalbuminspiegeln lassen sich bei gleicher Permeabilität der Darmbarriere auch niedrigere Albuminkonzentrationen im Faeces erwarten. Für diese Erklärung spricht auch die Abnahme des Albuminverlustes in der CKD-Gruppe von Tag 10 bis Tag 20. Es ist daher nicht unplausibel von einer durch die antibiotische Intervention wiederhergestellten Darmbarriere auszugehen. So ergibt sich ein Hinweis auf eine ursächliche Beteiligung der veränderten Darmflora an der pathologischen Durchlässigkeit des Darmepithels. Die andere Richtung erhöhter Permeabilität, die die für die Hypothesen dieser Arbeit wichtige Translokation von Bakterien oder zumindest bakteriellen Bestandteilen bedingen soll, konnte nicht beobachtet werden. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Kesper und Andersen [106] konnten in diesem Fall keine Bakterien aus Lebergewebe reproduzierbar angezüchtet werden, sodass nicht von einer Translokation vermehrungsfähiger Bakterien in die Leber auszugehen ist. Des Weiteren ergab auch die Analyse bakteriellen Endotoxins per LAL-Assay keinen wegweisenden Befund. Hieraus ist zu schlussfolgern, dass es zu keiner relevanten Translokation von Bakterien oder Endotoxin kam, was möglicherweise an der unzureichend ausgeprägten Niereninsuffizienz lag. Dies ist für diese Arbeit insofern gravierend, als dass das vermutete Bindeglied zwischen Dysbiose und systemischer Immundysfunktion nicht nachgewiesen werden konnte, und stellt einen methodischen Schwachpunkt dar.

In diesem Schwachpunkt könnte aber auch eine unerwartete Stärke der Arbeit liegen. So finden sich durch die nur sehr leichte Schädigung der Darmbarriere Hinweise auf den initialen schädigenden Pathomechanismus. Bisher lässt die Literatur, wie in Kespers Dissertation diskutiert [189], keinen klaren Schluss in dieser Frage zu. Vaziri konnte etwa zeigen, dass allein urämisches Serum zu einer Erniedrigung der elektrischen Resistenz des Epithels [105], zur Abnahme von *tight junction* Molekülen [190] und so zu einer durchlässigen Darmbarriere führt [191]. Auch kann es bei fortgeschrittener CKD zu einem intestinalen Wandödem und – auch Dialyse bedingt – wiederholter intestinaler Ischämie kommen, die ebenfalls völlig Darmflora-unabhängig eine Darmbarrierestörung bedingen [158, 192]. Genauso kann eine intestinale Dysbiose bei CKD unabhängig von einer eingeschränkten Darmbarriere zustande

kommen. Gründe können eine Veränderung der Diät (niedrigerer Konsum faserhaltiger Nahrung [193], orale Eisensubstitution, Phosphat- und Kaliumrestriktion [194]) und Antibiotikakonsum [195], Phosphatbinder, Medikation (regelmäßiger Kaliumund Protonenpumpeninhibitoren [158] und die periinterventionelle Therapie einer Nierentransplantation [196]), eine verlangsamte Darmpassage im Colon [197], die metabolische Azidose und eine erhöhte intestinale Harnstoffexkretion, die zur Ansammlung von Ammoniak und einem veränderten pH-Milieu führt [197], sein.

Im fortgeschrittenen Stadium ist sicherlich davon auszugehen, dass die Schädigung der Darmbarriere multifaktoriell bedingt ist und Darmbarrierestörung und Dysbiose sich gegenseitig befeuern. Zum mechanistischem Verständnis des Entstehens dieser intestinalen Pathologie in CKD-Patienten kann die Tatsache beitragen, dass hier durch die antibiotische Eradikation der dysbiotischen Flora die Darmbarriere in der Interventions-Kontrollgruppe wiederhergestellt wurde, ohne dass es zu signifikanten Unterschieden der Nierenfunktionsparameter im Vergleich zur Interventionsgruppe kam, die eine alternative Erklärung für die wiederhergestellte Darmbarriere liefern könnten. Somit ist die Dysbiose als initialer Schädigungsmechanismus der Darmbarriere anzusehen.

4.3. Was trägt zur Immundysfunktion bei CKD bei?

Die paradoxe Immundysfunktion in CKD mit gleichzeitig auftretender pathologischer, chronischer Entzündung und klinisch relevanter Immunschwäche gibt der immunologischen und nephrologischen Forschung seit Jahren Rätsel auf. Ihre Auswirkungen sind, wie in der Einleitung dargelegt, verheerend. Infektionen und kardiovaskuläre Erkrankungen machen einen übergroßen Anteil der CKD-assoziierten Mortalität aus [49-51, 57]. Gemeinsam mit häufiger auftretenden Krebserkrankungen [90] und weiteren durch chronische Inflammation befeuerten Folgeerkrankungen wie Anämie [198], Osteopathie [199, 200] und vor allem urämischer Kachexie und Gebrechlichkeit [201-203] führen sie durch die zusätzliche Morbidität auch zu einer starken Einschränkung der Lebensqualität [204].

In dieser Arbeit konnten diätabhängige Veränderungen des systemischen Immunsystems festgestellt werden. In Milz und Leber, die als Indikatoren für eine systemische Immunreaktion untersucht wurden, zeigten sich vermehrt Neutrophile Granulozyten, Antigenpräsentierende Zellen und Monozyten. Auch im Blut nahm die Zahl neutrophiler Granulozyten mit der Diät zu. Zudem stieg die Expression von Pentraxin-2, einem dem menschlichen C-reaktiven Protein vergleichbarem Botenstoff, in der Leber an. Besonders ausgeprägt zeigte sich eine Entzündungsreaktion jedoch lokal in der Niere, wo es zu einem starken Anstieg aller gemessenen Immunzellen, insbesondere der zytotoxischen T-Zellen (CTLs), Antigen-präsentierenden Zellen, sowie Monozyten und Makrophagen kam. Auch Interleukin-6 und TNF α wurden hier vermehrt exprimiert. Die Ursache dieser Veränderungen ließ sich jedoch nicht so einfach schlussfolgern. Der von Anders [158] vorgeschlagene und von Andersen und Kesper in einem Alport-Mausmodell für CKD experimentell bestätigte [106] Weg einer bakteriellen, intestino-systemischen Translokation konnte hier nicht gezeigt werden und fällt somit als mögliche Ursache aus. Konsequenterweise kam es durch die antibiotische Eradikation der intestinalen Flora auch nicht zu einem konsistenten Rückgang von Entzündungsparametern im Vergleich zur Interventions-Kontrollgruppe. Im Folgenden sollen verschiedene andere in der Literatur vorgestellte Ursachen urämischer Immundysfunktion diskutiert werden.

Eine große Anzahl an Publikationen beschreibt iatrogene und andere Therapie-assoziierte Ursachen. Die Dialyse als invasives Therapieverfahren in ESRD spielt hier eine herausragende Rolle. Monozyten von Dialysepatienten zeigen höhere spontane Aktivität und niedrigeres Ansprechen auf LPS als die von Patienten vor Dialyse [205]. Der ohnehin schon erhöhte systemische Endotoxinspiegel steigt nach Hämodialysebeginn noch einmal steil an [107]. Gründe für die Immunogenität der Dialyse könnten in kurzen DNA-Fragmenten, die im Dialysat gefunden wurden und die Zytokinproduktion anregen [206], liegen. Sehr niedrige und daher zulässige Endotoxinkonzentrationen im Dialysat führen bereits zu einer systemischen Entzündungsreaktion, wie Versuche mit ultrareinem Dialysat zeigten [207]. Außerdem können bioinkompatible Membranen zur Stimulation von Entzündungsreaktionen führen [208, 209]. Auch in Zusammenhang mit der Dialyse wird eine Mitbeteiligung der Darmflora diskutiert, da Kreislaufbelastung und wiederholte, regionale Ischämie zur erhöhten Endotoxintranslokation aus dem Darm [107] führen könnte. Zuletzt sind Dialysekatheter Eintrittspforte für pathogene Keime [210] und sind damit Mitverursacher für die bei CKD häufigen und rezidivierenden Infektionen, die genauso wie Parodontose zu chronischer Entzündung und pathologischer Immuntoleranz beitragen [158, 211]. Trotz des sicherlich bestehenden Einflusses dieser Faktoren auf die urämische Immundysfunktion beim Menschen, scheiden diese im vorliegenden Fall aus, da keine therapeutischen Interventionen unternommen wurden - abgesehen natürlich von der Antibiotikaintervention, die ja nachweislich keinen relevanten Einfluss auf die Immundysfunktion hatte.

Eine Reihe weiterer möglicher ursächlicher Faktoren werden direkt durch den Ausfall der Nierenfunktion bedingt. Die reduzierte Fähigkeit der Niere Elektrolyte und pH-Wert zu kontrollieren, führt zu vermehrtem oxidativem Stress und zur metabolischen Azidose, die wiederum zu veränderter (Immun-)Zellfunktion und Entzündung führen [212-215].

Elektrolytstörungen können ebenfalls die Funktionen des Immunsystems beeinflussen [216]. So beeinflusst der Kalziumspiegel die Albuminbindungskapazität, was aufgrund der Hypalbuminämie bei CKD von besonderer Relevanz ist, und Natrium, Kalium und Chlorid sind die Grundlage des Ruhemembranpotentials und damit der Funktionsfähigkeit aller Zellen. Die verminderte exkretorische Nierenfunktion führt zur Retention und Akkumulation pro-inflammatorischer Toxine. Diese lassen sich in drei Gruppen einteilen: Kleine wasserlösliche Moleküle mit einem Molekulargewicht unter 500 Da, wie Phosphat, Harnstoff und Kreatinin, mittelgroße Moleküle, die mit ihrem Molekulargewicht darüber liegen und zu denen zum Beispiel β2-Mikroglobulin und Parathormon gehören, und zuletzt proteingebundene Moleküle, wie Indoxylsulfat, p-Cresolsulfat und Homocystein, die fest an Plasmaproteine wie Albumin gebunden sind [217, 218]. Zur ersten Gruppe gehören auch zur Kristallbildung neigende Moleküle, wie Oxalat oder Harnsäure, die pro-inflammatorische Eigenschaften haben und chronische Entzündung triggern können [219, 220]. Bei Dialysepatienten sind besonders die letzten beiden Gruppen von Bedeutung, da diese mit den herkömmlichen Dialyseverfahren nicht entzogen werden können und sich daher trotz Nierenersatztherapie weiter ansammeln [217, 218]. Zu diesen Gruppen gehören neben den oben genannten auch pro-inflammatorische Zytokine wie Interleukine und Adipokine, die zur chronischen Entzündung und Mortalität von CKD-Patienten beitragen [215, 221, 222]. β2-Mikroglobulin wiederum weist im Serum eine starke Korrelation mit Procalcitonin auf, das ein spezifischer Marker für bakterielle Infekte ist [223]. Durch die Retention dieser Moleküle bleibt darüber hinaus mehr Zeit für dysfunktionale Glykierung, die nicht-enzymatisch abläuft, und damit zur Bildung sogenannter advanced glycation endproducts. Diese führen über eine NFκB-Aktivierung ebenfalls zu systemischer Entzündung [224].

Urämische Toxine, die zur Immundysfunktion beitragen können, werden jedoch nicht nur endogen produziert oder mit der Nahrung aufgenommen, sondern es gibt auch Moleküle darmbakteriellen Ursprungs, die systemisch aufgenommen und unter normalen Umständen renal eliminiert werden. Die bakterielle Fermentierung im Colon von Aminosäuren wie Tyrosin und Tryptophan führt zum Beispiel zur Produktion von p-Cresol und Indol, die nach systemischer Aufnahme in der Leber zu p-Cresylsulfat bzw. p-Indoxylsulfat metabolisiert werden [225]. Diese binden kompetitiv an Albumin [226] und ihre Konzentration korreliert mit CKD-Progression und Mortalität bei ESRD-Patienten [227-229]. Darmbakterien sind ebenso verantwortlich für die Produktion von Trimethylamin-N-oxid (TMAO) aus L-Carnitin, welches mit Atherosklerose und einer stark erhöhten Mortalität bei CKD-Patienten assoziiert ist [230-232]. Eine Rolle der Darmflora konnte darüber hinaus bei der Produktion nephrotoxischen IgA1 durch die Darmmukosa und damit bei der Entstehung der IgA- Nephropathie nachgewiesen werden [233]. Kurzkettige Fettsäuren (Acetat, Propionat und Butyrat) werden weniger produziert und sind über anti-inflammatorische Effekte nephroprotektiv, wie bei akutem Nierenversagen gezeigt werden konnte [234].

Der Verlust der endokrinen Nierenfunktion spielt sich auf die Immunfunktion über den Verlust des immunregulierenden Vitamin-D [235] und die durch Erythropoetinmangel entstehende renale Anämie und damit systemischen Sauerstoffmangel aus. Die Mäuse der CKD-Gruppe entwickelten eine endokrine, renale Insuffizienz, womit diese beiden Faktoren sicherlich einen Einfluss auf die Immunreaktion hatten.

Genetische Unterschiede, die in epidemiologischen Studien beim Menschen zu unterschiedlich hoher Wahrscheinlichkeit einer Immundysfunktion durch CKD führten [236], bestanden zwischen den einzelnen Mäusen, die einem etablierten C57BL/6-Inzuchtstamm entstammten, nicht und scheiden damit zumindest als Confounder aus. Sie könnten jedoch eine weitere Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse hinsichtlich systemischer Immundysfunktion zwischen dieser Arbeit und der von Kesper und Andersen [106] liefern, die an Col4α3-defizienten Sv129-Mäusen durchgeführt wurde.

Eine wichtige Quelle pathologischer Immunstimulation stellte in dieser Arbeit die systemische Oxalataufnahme dar. Oxalat ist wie oben beschrieben auch bei CKD anderer Genese als urämisches Toxin ein Auslöser chronischer Entzündung. Bei den Mäusen dieser Arbeit kam es durch die oxalatreiche Diät zu deutlich erhöhten systemischen Oxalatspiegeln, wie vergleichbare Daten von Mulay nahelegen [165]. Die pro-inflammatorischen Eigenschaften von Oxalat konnten besonders in der Niere beobachtet werden, wo es auch histologisch beobachtbar zur Kristallablagerung kam. Die Tatsache, dass die Veränderungen systemischer Immunparameter in abgeschwächter Form die Entzündungsreaktion in der Niere widerspiegelten und größtenteils mit dem Absetzen der CKD-Diät nach Tag 10 rückläufig waren, spricht für einen direkten Einfluss des Oxalats auf das Immunsystem. Allerdings manifestiert sich eine über Folgen der Nierenerkrankung vermittelte systemische Immunreaktion natürlich auch in der Niere als systemischem Organ, sodass sich die lokale, renale Immunreaktion nicht unabhängig von der systemischen beobachten und beurteilen lässt. Die Wahl eines inflammatorischen CKD-Modells, das außerdem mit systemisch erhöhter Konzentration eines pro-inflammatorischen Agens einhergeht, zeigte sich an dieser Stelle daher als unglücklich. Die im ersten Teil dieses Kapitels angesprochene Karenzzeit zwischen Analyse und "CKD-Diät" könnte diese Schwäche des Modells abmildern.

Trotz dieser Einschränkung ist wie beim CKD-Patienten aber auch hier von einer multifaktoriellen Genese auszugehen. Einige beim Menschen wichtige Ursachen können aufgrund der Rahmenbedingungen der Studie ausgeschlossen werden. Dazu gehört durch die

105

Ergebnisse der Interventionsstudie und die nicht nachgewiesene bakterielle Translokation auch der Einfluss der Darmflora. Die Arbeit verfehlt daher das Ziel, die Rolle der Darmflora auf die systemische Immundysfunktion in CKD-Patienten zu erleuchten, und zeigt vielmehr auf, für welche Veränderungen des Immunsystems die Darmflora gerade NICHT ursächlich sein kann.



Abbildung 48: Vervollständigtes Modell der CKD-assoziierten Immundysfunktion.

Vervollständigte graphische Übersicht über den Pathomechanismus systemischer Immundysfunktion bei chronischer Nierenerkrankung. Weiß unterlegt sind Faktoren, die zur systemischen Immundysfunktion aufgrund ihrer Abwesenheit in dieser Arbeit nicht beitrugen. Rot unterlegt ist die unphysiologische Hyperoxalatämie, die in dieser Arbeit als Confounder wirkt. Eigene Darstellung.

4.4. Limitationen der Studie und Ausblick

Obwohl diese Arbeit an Mäusen durchgeführt wurde, liegt das wahre Interesse der humanmedizinischen Forschungsarbeit natürlich im Verständnis menschlicher Pathophysiologie, um eine Grundlage für gezielte Interventionen zur Verbesserung von Lebensqualität, Morbidität und letztlich auch Mortalität chronisch nierenerkrankter Menschen zu schaffen. Die Forschung an Mäusen statt an Menschen liegt zum einen an der praktischen Unmöglichkeit, die gesuchten Erkenntnisse ohne die angewandte Invasivität (Organentnahme zu vorher definiertem Zeitpunkt) zu gewinnen, die nur mit Versuchstieren möglich ist. Zum anderen bietet die Forschung an Mäusen darüber hinaus auch bedeutende Vorteile, die mit dem konkreten Thema der Arbeit zusammenhängen: Wie bereits mehrfach angesprochen, ist die Darmflora durch eine Unzahl von Umweltfaktoren beeinflussbar, die sich bei Menschen mit entsprechend individueller Ernährung, Medikation, Aktivität, Genetik und Komorbidität unmöglich kontrollieren ließen. Eine Rolle spielt auch der diskutierte iatrogene Einfluss nicht nur auf die Darmflora, sondern auch auf die Immundysfunktion bei CKD an sich, der sich nur bei Versuchstieren moralisch vertretbar ausschließen lässt. Trotzdem bleibt die unklare Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen eine der größten Limitationen tierexperimenteller Forschung. Im konkreten Fall ist zum Beispiel zu bedenken, dass es eine ganze Reihe bakterieller Spezies gibt, die im murinen aber nicht im menschlichen Darm vorkommen, und dass sich Ernährung, Verdauungssystem und Verhalten - Mäuse neigen etwa zur beim Menschen nicht üblichen Koprophagie - zwischen Maus und Mensch gravierend unterscheiden [237, 238]. Das Design humaner Mikrobiotastudien unter möglichst kontrollierbaren Umweltbedingungen stellt daher weiter eine Herausforderung für zukünftige Mikrobiotaforschung dar.

Trotz der Verwendung eines murinen Modells konnten relevante Endpunkte (Mortalität durch Infektionen oder kardiovaskuläre Erkrankungen) aus praktischen Erwägungen nicht abgewartet werden. Auch setzten Abbruchkriterien der Intensität der induzierten Nierenerkrankung tierschutzrechtliche Grenzen. In zukünftigen Studien zur Untersuchung des Einflusses der Darmflora auf die Immundysfunktion bei CKD wäre es wünschenswert eine fortgeschritteneres Stadium der Niereninsuffizienz herbeizuführen. Wichtige hier nicht beobachtbare Phänomene, die die Aussagekraft der Arbeit stark beeinträchtigen (intestinosystemische Translokation von Bakterien, ausgeprägte systemische Immunreaktion, irreversible Elektrolytentgleisung, etc.) könnten so zum Wissensgewinn beitragen. Dies könnte unter Einhaltung der Abbruchkriterien beispielsweise durch Intervalldiäten mit zwischenzeitlichen Erholungsphasen geschehen. Vorstellbar wäre eine Induktion des

107

Nierenschadens durch zehntägige "CKD-Diät" und anschließender Erholungsphase mit einzelnen Tagen, an denen die Mäuse zur Intensivierung des Nierenschadens "CKD-Diät" erhielten. Zwischen Analysen und "CKD-Diät" sollte wie schon diskutiert ein zeitlicher Abstand liegen. Ein längerer Zeitraum für Entwicklung und Aufrechterhaltung der Nierenschädigung käme auch der eingangs zitierten KDIGO-Definition der CKD, sowie dem wahren Krankheitsverlauf der meisten Fälle von CKD näher.

Die größte methodische Schwachstelle dieser Arbeit und wissenschaftliche Herausforderung für zukünftige Mikrobiotaprojekte stellt jedoch eine suffiziente Beschreibung der intestinalen Flora und ihrer Interaktionen dar. Um den genauen Einfluss des intestinalen Mikrobioms auf Patienten mit CKD oder mit anderen chronischen Erkrankungen letztlich wirklich verstehen zu können, muss der großen Komplexität dieses Mikrobioms und des Interaktionsnetzes seiner Mitglieder Rechnung getragen werden. Diese Studie und viele der in den letzten Jahren veröffentlichten Experimente zeigen, dass sich das Mikrobiom nicht so einfach auseinanderdividieren lässt. Der methodische Ansatz dieser Arbeit, die einfache Ausstrichtechnik, hat sicherlich seine Berechtigung zum gezielten Nachweis bestimmter Spezies. Zur Charakterisierung eines ganzen Mikrobioms – quantitativ oder gar qualitativ – ist er jedoch völlig ungeeignet. Dies macht allein die Tatsache klar, dass sich lediglich 20-30% der Darmbakterien im Labor anzüchten lassen [146]. Modernere Sequenzierungs-Methoden, die sich nicht auf die mikrobiologische Anzüchtbarkeit eines Keimes verlassen müssen, werden immer genauer und verfügbarer. Auch zur umfassenden Analyse metagenomischer Daten der unglaublichen Zahl an Spezies eines Mikrobioms gibt es neuerdings vielversprechende Ansätze [239]. Das Verständnis der metabolischen und immunologischen Interaktionen der Mikroben untereinander und mit ihrem Wirt bleibt jedoch weiter eine Herausforderung. Je mehr wir über die Komplexität des organistischen Zusammenlebens von Mikroben in unserem Darm lernen [115], desto überkommener, müssen uns Kategorien wie Eubiose oder Dysbiose erscheinen. Das ist gerade so, als ob der Gesundheitszustand eines Menschen lediglich den Kategorien "krank" und "gesund" zugeordnet würde. Eine gezielte Therapie wäre unmöglich. Dies lässt auch die viel diskutierten pro-, prä- und synbiotischen Interventionen, die sich auf die eine oder andere "gesunde" Spezies, die es zu fördern gilt, berufen, primitiv wirken. Das gilt natürlich in gleicher Weise für die Intervention dieser Arbeit: Die antibiotische Eradikation der Darmbakterien führt ja in keinster Weise zur Abiose und noch weniger zum "gesunden Zustand" der Eubiose, sondern ganz im Gegenteil zu einer Art von Dysbiose, da das intestinale Mikrobiom, wie eingangs erwähnt, aus vielen weiteren Organismen wie Hefen, Pilzen oder Viren besteht [240]. Eine Entfernung der Bakterien führt zum Beispiel zu einer Überwucherung mit Hefen, wie Candida albicans [240], denen

ebenfalls pathogenetische Eigenschaften zugeschrieben werden [241]. Studien zu probiotischen Interventionen, in die vor wenigen Jahren noch übergroße Hoffnungen gesetzt wurden, machten auch offenkundig, dass diese häufig nutzlos und teilweise sogar schädlich sein können [242]. Dies steht im Kontrast zur Wirksamkeit der Wiederbesiedelung des Darmes mit einer vollständigen Flora durch Stuhltransplantation (FMT) nach zu Dysbiose führenden Interventionen [243, 244]. Dieser Unterschied und viele Hinweise auf die Bedeutung der Vielfalt des Mikrobioms [245, 246] unterstreichen in besonderer Weise das Wesen des Mikrobioms als symbiontischer Organismus, dessen Funktionsfähigkeit in der Komplexität der Interaktionen seiner Mitglieder steckt und sich daher nicht einfach in gute und schlechte Darmbewohner teilen lässt.

Die Erkenntnis des vorangehenden Abschnittes mag zunächst ernüchternd wirken. Sie sollte jedoch vielmehr Weckruf und Ermutigung sein. Zu groß ist die bereits vorhandene Evidenz für das pathogenetische Wirken der Darmflora bei der Entstehung und Progression, aber daher genauso der Verhinderung und Heilung vieler Krankheiten, als dass wir unsere Darmbewohner weiter in ihrer Funktion als lebenswichtiges "menschliches" Organ vernachlässigen können. Auch sollten wir unsere Hoffnungen nicht allein auf die Blackbox FMT setzen. Für den forschenden Arzt kann es keine befriedigende Antwort sein, ein Organ lediglich zu ersetzen – wie die Niere durch die Dialyse. Wir wollen die Zusammenhänge von Funktion und Dysfunktion des menschlichen Körpers – und dazu gehören, das ist heute unbestreitbar, auch seine mikrobiologischen Mitbewohner – in ihrer Komplexität verstehen, um Krankheiten durch spezifische und verstandene Interventionen kausal anzugehen.

5. Zusammenfassung

Chronische Nierenerkrankung (CKD) und insbesondere terminale Niereninsuffizienz (ESRD) sind mit hoher Morbidität und Mortalilität verbunden. Bei CKD-Patienten kommt es zu einer Störung des Immunsystems, die mit gleichzeitiger systemischer Entzündung und Immunsuppression einhergeht. Diese sind pathophysiologisch bedeutend für die Haupttodesursachen bei CKD-Patienten: Infektionen und kardiovaskuläre Erkrankungen. Die systemische Translokation von Bakterien oder bakteriellen Toxinen aus dem Darm könnte zu einer chronisch-pathologischen Stimulation des Immunsystems führen und so mitursächlich für die systemische Immundysfunktion bei CKD sein.

Um dies zu prüfen, wurden C57BL/6-Mäuse, bei denen eine CKD über eine oxalatreiche Diät induziert wurde, hinsichtlich Darmflora, Darmbarriere, Translokation, Immunreaktion und CKD charakterisiert und mit Kontrolltieren verglichen. Die Charakterisierung fand zur Erstellung eines zeitlichen Verlaufes in verschiedenen Gruppen zu den Zeitpunkten 0, 5, 10, 15 und 20 Tage nach Diätbeginn statt. Zur Überprüfung des kausalen Anteils der bakteriellen Darmflora an den gemessenen Veränderungen wurde anschließend in einer Interventionsstudie die bakterielle Darmflora durch eine antibiotische Behandlung eradiziert.

Es konnte gezeigt werden, dass die verwendete oxalatreiche Diät zu einer mit der Diätdauer zunehmenden strukturellen und funktionellen CKD, zu einer Expansion der bakteriellen Darmflora, zu einem Albuminverlust über das Darmepithel und zu einer systemischen und renal lokalen Entzündungsreaktion führt. Die Translokation von Bakterien in die Leber oder von Lipopolysaccharid ins Blut der Mäuse konnte nicht nachgewiesen werden. Ein Absetzen der oxalatreichen Diät nach 10 Tagen bewirkte eine teilweise Remission von CKD und Immunreaktion, nicht jedoch von Dysbiose, Albuminverlust oder strukturellem Nierenschaden. Die antibiotische Behandlung erzielte eine Eradikation der Darmbakterien und führte zur Wiederherstellung der Darmbarriere. Veränderungen von Nierenfunktion oder Immunreaktion konnten im Vergleich zu einer Kontrollgruppe mit Scheinintervention nicht konsistent gemessen werden.

Es lässt sich hieraus schließen, dass die verwendete oxalatreiche Diät zu einem aussagekräftigen murinen CKD-Modell führt, CKD auch in diesem Modell gemeinsam mit Dysbiose, Darmbarrierestörung und Immunreaktion auftritt und Dysbiose ausschlaggebend für die Darmbarriestörung ist. Weiter lässt sich sagen, dass die CKD-assoziierte Immundysfunktion nicht alleine durch eine veränderte Darmflora oder iatrogene Faktoren ausgelöst wird.

6. Literaturverzeichnis

- 1. Levey, A.S., et al., *The definition, classification, and prognosis of chronic kidney disease: a KDIGO Controversies Conference report.* Kidney Int, 2011. **80**(1): p. 17-28.
- 2. Agarwal, R., *Defining end-stage renal disease in clinical trials: a framework for adjudication*. Nephrol Dial Transplant, 2016. **31**(6): p. 864-7.
- 3. Porter, A.C., et al., *Predictors and Outcomes of Health-Related Quality of Life in Adults with CKD*. Clin J Am Soc Nephrol, 2016. **11**(7): p. 1154-62.
- 4. James, M.T., B.R. Hemmelgarn, and M. Tonelli, *Early recognition and prevention of chronic kidney disease*. Lancet, 2010. **375**(9722): p. 1296-309.
- 5. Bruck, K., et al., *CKD Prevalence Varies across the European General Population*. J Am Soc Nephrol, 2016. **27**(7): p. 2135-47.
- 6. Just, P.M., et al., *Reimbursement and economic factors influencing dialysis modality choice around the world*. Nephrol Dial Transplant, 2008. **23**(7): p. 2365-73.
- 7. Jones, D.S., S.H. Podolsky, and J.A. Greene, *The burden of disease and the changing task of medicine*. N Engl J Med, 2012. **366**(25): p. 2333-8.
- 8. Naghavi, M., et al., *Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013.* Lancet, 2015. **385**(9963): p. 117-71.
- 9. Castro, A.F. and J. Coresh, *CKD surveillance using laboratory data from the population-based National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES).* Am J Kidney Dis, 2009. **53**(3 Suppl 3): p. S46-55.
- McMahon, G.M., et al., *Mid-adulthood risk factor profiles for CKD*. J Am Soc Nephrol, 2014.
 25(11): p. 2633-41.
- 11. Taal, M.W. and B.M. Brenner, *Predicting initiation and progression of chronic kidney disease: Developing renal risk scores.* Kidney Int, 2006. **70**(10): p. 1694-705.
- 12. Romagnani, P., et al., *Chronic kidney disease*. Nat Rev Dis Primers, 2017. **3**: p. 17088.
- 13. Titze, S., et al., *Disease burden and risk profile in referred patients with moderate chronic kidney disease: composition of the German Chronic Kidney Disease (GCKD) cohort.* Nephrol Dial Transplant, 2015. **30**(3): p. 441-51.
- 14. Hagler, L. and R.H. Herman, Oxalate metabolism. I. Am J Clin Nutr, 1973. 26(7): p. 758-65.
- 15. Holmes, R.P., H.O. Goodman, and D.G. Assimos, *Contribution of dietary oxalate to urinary oxalate excretion*. Kidney Int, 2001. **59**(1): p. 270-6.
- Hodgkinson, A. and P.M. Zarembski, Oxalic acid metabolism in man: a review. Calcif Tissue Res, 1968. 2(2): p. 115-32.
- 17. Hoppe, B., et al., *Simultaneous determination of oxalate, citrate and sulfate in children's plasma with ion chromatography.* Kidney Int, 1998. **53**(5): p. 1348-52.
- Milliner, D.S., *The primary hyperoxalurias: an algorithm for diagnosis*. Am J Nephrol, 2005.
 25(2): p. 154-60.
- 19. Hoppe, B., B.B. Beck, and D.S. Milliner, *The primary hyperoxalurias*. Kidney Int, 2009. **75**(12): p. 1264-1271.
- Mulay, S.R., et al., Novel Insights into Crystal-Induced Kidney Injury. Kidney Dis (Basel), 2018.
 4(2): p. 49-57.
- 21. van Woerden, C.S., et al., *Primary hyperoxaluria type 1 in The Netherlands: prevalence and outcome*. Nephrol Dial Transplant, 2003. **18**(2): p. 273-9.
- 22. Cochat, P. and G. Rumsby, Primary hyperoxaluria. N Engl J Med, 2013. 369(7): p. 649-58.
- Chen, C.L., et al., *Acute oxalate nephropathy after ingestion of star fruit*. Am J Kidney Dis, 2001.
 37(2): p. 418-22.
- 24. Glew, R.H., et al., *Nephropathy in dietary hyperoxaluria: A potentially preventable acute or chronic kidney disease.* World J Nephrol, 2014. **3**(4): p. 122-42.
- 25. Dobbins, J.W. and H.J. Binder, *Effect of bile salts and fatty acids on the colonic absorption of oxalate*. Gastroenterology, 1976. **70**(6): p. 1096-1100.
- 26. Hylander, E., et al., *Enteric hyperoxaluria: dependence on small intestinal resection, colectomy, and steatorrhoea in chronic inflammatory bowel disease.* Scand J Gastroenterol, 1978. **13**(5): p. 577-88.
- 27. Lorenz, E.C., et al., *Update on oxalate crystal disease*. Curr Rheumatol Rep, 2013. **15**(7): p. 340.

- 28. Bhasin, B., H.M. Urekli, and M.G. Atta, *Primary and secondary hyperoxaluria: Understanding the enigma*. World J Nephrol, 2015. **4**(2): p. 235-44.
- 29. Osswald, H. and R. Hautmann, *Renal elimination kinetics and plasma half-life of oxalate in man*. Urol Int, 1979. **34**(6): p. 440-50.
- 30. Knight, T.F., et al., *Oxalate secretion in the rat proximal tubule*. Am J Physiol, 1981. **240**(4): p. F295-8.
- 31. Tomson, C.R., et al., *Plasma oxalate concentration, oxalate clearance and cardiac function in patients receiving haemodialysis.* Nephrol Dial Transplant, 1989. **4**(9): p. 792-9.
- 32. Gross, O., et al., *The inflammasome: an integrated view*. Immunol Rev, 2011. 243(1): p. 136-51.
- 33. Knauf, F., et al., *NALP3-mediated inflammation is a principal cause of progressive renal failure in oxalate nephropathy.* Kidney Int, 2013. **84**(5): p. 895-901.
- 34. Pearle, M.S., et al., *Urologic diseases in America project: urolithiasis.* J Urol, 2005. **173**(3): p. 848-57.
- 35. Babitt, J.L. and H.Y. Lin, *Mechanisms of anemia in CKD*. J Am Soc Nephrol, 2012. **23**(10): p. 1631-4.
- 36. Querfeld, U., *Vitamin D and inflammation*. Pediatr Nephrol, 2013. **28**(4): p. 605-10.
- 37. Liu, W.C., et al., *Vitamin D and immune function in chronic kidney disease*. Clin Chim Acta, 2015.
 450: p. 135-44.
- 38. Miller, P.D., *Bone disease in CKD: a focus on osteoporosis diagnosis and management.* Am J Kidney Dis, 2014. **64**(2): p. 290-304.
- 39. Meyer, T.W. and T.H. Hostetter, *Uremia*. N Engl J Med, 2007. **357**(13): p. 1316-25.
- 40. Locatelli, F., L.D. Vecchio, and P. Pozzoni, *The importance of early detection of chronic kidney disease*. Nephrol Dial Transplant, 2002. **17**(11): p. 2-7.
- 41. Anders, H.J., *Immune system modulation of kidney regeneration--mechanisms and implications*. Nat Rev Nephrol, 2014. **10**(6): p. 347-58.
- 42. Combs, S.A., J.P. Teixeira, and M.J. Germain, *Pruritus in Kidney Disease*. Semin Nephrol, 2015. **35**(4): p. 383-91.
- 43. Levin, A. and P.E. Stevens, *Summary of KDIGO 2012 CKD Guideline: behind the scenes, need for guidance, and a framework for moving forward.* Kidney Int, 2014. **85**(1): p. 49-61.
- 44. Molnar, M.Z., et al., *Timing of dialysis initiation in transplant-naive and failed transplant patients*. Nat Rev Nephrol, 2012. **8**(5): p. 284-92.
- 45. Bello, A.K., et al., Assessment of Global Kidney Health Care Status. JAMA, 2017. **317**(18): p. 1864-1881.
- 46. Mushi, L., P. Marschall, and S. Flessa, *The cost of dialysis in low and middle-income countries: a systematic review.* BMC Health Serv Res, 2015. **15**(1): p. 506.
- 47. Kovesdy, C.P. and K. Kalantar-Zadeh, *Novel targets and new potential: developments in the treatment of inflammation in chronic kidney disease*. Expert Opin Investig Drugs, 2008. **17**(4): p. 451-67.
- 48. Saran, R., et al., US Renal Data System 2016 Annual Data Report: Epidemiology of Kidney Disease in the United States. Am J Kidney Dis, 2017. **69**(3 Suppl 1): p. A7-A8.
- 49. Thomas, B., et al., *Global Cardiovascular and Renal Outcomes of Reduced GFR*. J Am Soc Nephrol, 2017. **28**(7): p. 2167-2179.
- 50. Navaneethan, S.D., et al., *Cause-Specific Deaths in Non-Dialysis-Dependent CKD*. J Am Soc Nephrol, 2015. **26**(10): p. 2512-20.
- 51. Vogelzang, J.L., et al., *Mortality from infections and malignancies in patients treated with renal replacement therapy: data from the ERA-EDTA registry*. Nephrol Dial Transplant, 2015. **30**(6): p. 1028-37.
- 52. Foley, R.N., P.S. Parfrey, and M.J. Sarnak, *Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease*. Am J Kidney Dis, 1998. **32**(5 Suppl 3): p. S112-9.
- 53. Carrero, J.J. and P. Stenvinkel, *Inflammation in end-stage renal disease what have we learned in 10 years?* Semin Dial, 2010. **23**(5): p. 498-509.
- 54. Cohen, G. and W.H. Horl, *Immune dysfunction in uremia an update*. Toxins (Basel), 2012. **4**(11): p. 962-90.
- 55. Girndt, M., et al., *Impaired cellular immune function in patients with end-stage renal failure*. Nephrol Dial Transplant, 1999. **14**(12): p. 2807-10.
- 56. Lichtman, A.H., *Adaptive immunity and atherosclerosis: mouse tales in the AJP*. Am J Pathol, 2013. **182**(1): p. 5-9.
- 57. Betjes, M.G., *Immune cell dysfunction and inflammation in end-stage renal disease*. Nat Rev Nephrol, 2013. **9**(5): p. 255-65.

- 58. Iwasaki, A. and R. Medzhitov, *Regulation of adaptive immunity by the innate immune system*. Science, 2010. **327**(5963): p. 291-5.
- 59. Marchiando, A.M., W.V. Graham, and J.R. Turner, *Epithelial barriers in homeostasis and disease*. Annu Rev Pathol, 2010. **5**: p. 119-44.
- 60. Powell, D.W., *Barrier function of epithelia*. Am J Physiol, 1981. **241**(4): p. G275-88.
- 61. Anderson, J.M., *Molecular structure of tight junctions and their role in epithelial transport*. News Physiol Sci, 2001. **16**: p. 126-30.
- 62. McCarthy, K.M., et al., *Occludin is a functional component of the tight junction*. J Cell Sci, 1996. **109**(9): p. 2287-98.
- 63. Suzuki, H., et al., *Crystal structure of a claudin provides insight into the architecture of tight junctions*. Science, 2014. **344**(6181): p. 304-7.
- 64. Schneeberger, E.E. and R.D. Lynch, *The tight junction: a multifunctional complex*. Am J Physiol Cell Physiol, 2004. **286**(6): p. C1213-28.
- 65. Amabebe, E. and D.O.C. Anumba, *The Vaginal Microenvironment: The Physiologic Role of Lactobacilli*. Front Med (Lausanne), 2018. **5**: p. 181.
- Ramsay, P.T. and A. Carr, *Gastric acid and digestive physiology*. Surg Clin North Am, 2011. 91(5): p. 977-82.
- 67. Hansson, G.C., *Role of mucus layers in gut infection and inflammation*. Curr Opin Microbiol, 2012. **15**(1): p. 57-62.
- 68. Ridley, F., *Lysozyme: An Antibacterial Body present in Great Concentration in Tears, and its Relation to Infection of the Human Eye.* Proc R Soc Med, 1928. **21**(9): p. 1495-506.
- 69. Pabst, O., *New concepts in the generation and functions of IgA*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(12): p. 821-32.
- 70. Fagarasan, S., et al., *In situ class switching and differentiation to IgA-producing cells in the gut lamina propria*. Nature, 2001. **413**(6856): p. 639-43.
- 71. Nam, H., K. Whang, and Y. Lee, *Analysis of vaginal lactic acid producing bacteria in healthy women.* J Microbiol, 2007. **45**(6): p. 515-20.
- 72. Vogt, S.L. and B.B. Finlay, *Gut microbiota-mediated protection against diarrheal infections*. J Travel Med, 2017. **24**(Suppl 1): p. S39-S43.
- 73. Britton, R.A. and V.B. Young, *Role of the intestinal microbiota in resistance to colonization by Clostridium difficile.* Gastroenterology, 2014. **146**(6): p. 1547-53.
- 74. Douzery, E.J., et al., *The timing of eukaryotic evolution: does a relaxed molecular clock reconcile proteins and fossils?* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(43): p. 15386-91.
- 75. Hoffmann, J.A. and J.M. Reichhart, *Drosophila innate immunity: an evolutionary perspective*. Nat Immunol, 2002. **3**(2): p. 121-6.
- 76. Beutler, B., Innate immunity: an overview. Mol Immunol, 2004. 40(12): p. 845-59.
- Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen recognition and innate immunity*. Cell, 2006.
 124(4): p. 783-801.
- 78. Silhavy, T.J., D. Kahne, and S. Walker, *The bacterial cell envelope*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(5): p. a000414.
- 79. Noris, M. and G. Remuzzi, *Overview of complement activation and regulation*. Semin Nephrol, 2013. **33**(6): p. 479-92.
- 80. Netea, M.G., J. Quintin, and J.W. van der Meer, *Trained immunity: a memory for innate host defense*. Cell Host Microbe, 2011. **9**(5): p. 355-61.
- 81. Flajnik, M.F. and M. Kasahara, *Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures.* Nat Rev Genet, 2010. **11**(1): p. 47-59.
- 82. Cooper, M.D., R.D. Peterson, and R.A. Good, *Delineation of the Thymic and Bursal Lymphoid Systems in the Chicken.* Nature, 1965. **205**: p. 143-6.
- 83. Alberts B, J.A., Lewis J, et al., *Lymphocytes and the Cellular Basis of Adaptive Immunity.*, in *Molecular Biology of the Cell.* 2002, Garland Science: New York.
- 84. Janeway CA Jr, T.P., Walport M, et al., *Antigen recognition by T cells.*, in *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 2001, Garland Science: New York.
- 85. Yatim, K.M. and F.G. Lakkis, *A brief journey through the immune system*. Clin J Am Soc Nephrol, 2015. **10**(7): p. 1274-81.
- 86. Bedoya, S.K., et al., *Th17 cells in immunity and autoimmunity*. Clin Dev Immunol, 2013. **2013**: p. 986789.
- 87. Sakaguchi, S., et al., *Regulatory T cells and immune tolerance*. Cell, 2008. **133**(5): p. 775-87.
- 88. Chen, X. and J.J. Oppenheim, *Th17 cells and Tregs: unlikely allies*. J Leukoc Biol, 2014. **95**(5): p. 723-731.

- 89. Goodnow, C.C. and J.G. Cyster, *Lymphocyte homing: the scent of a follicle*. Curr Biol, 1997. 7(4): p. R219-22.
- 90. Cheung, C.Y., et al., *Cancer Incidence and Mortality in Chronic Dialysis Population: A Multicenter Cohort Study.* Am J Nephrol, 2016. **43**(3): p. 153-9.
- 91. Gollapudi, P., et al., *Leukocyte toll-like receptor expression in end-stage kidney disease*. Am J Nephrol, 2010. **31**(3): p. 247-54.
- 92. Yoon, J.W., M.V. Pahl, and N.D. Vaziri, *Spontaneous leukocyte activation and oxygen-free radical generation in end-stage renal disease*. Kidney Int, 2007. **71**(2): p. 167-72.
- 93. Alexiewicz, J.M., et al., *Impaired phagocytosis in dialysis patients: studies on mechanisms*. Am J Nephrol, 1991. **11**(2): p. 102-11.
- 94. Kato, S., et al., *Aspects of immune dysfunction in end-stage renal disease*. Clin J Am Soc Nephrol, 2008. **3**(5): p. 1526-33.
- 95. Verkade, M.A., et al., *Functional impairment of monocyte-derived dendritic cells in patients with severe chronic kidney disease.* Nephrol Dial Transplant, 2007. **22**(1): p. 128-38.
- 96. Agrawal, S., et al., *Effects of end-stage renal disease and haemodialysis on dendritic cell subsets and basal and LPS-stimulated cytokine production*. Nephrol Dial Transplant, 2010. **25**(3): p. 737-46.
- 97. Fearn, A. and N.S. Sheerin, *Complement activation in progressive renal disease*. World J Nephrol, 2015. **4**(1): p. 31-40.
- 98. Meier, P., et al., *Early T cell activation correlates with expression of apoptosis markers in patients with end-stage renal disease.* J Am Soc Nephrol, 2002. **13**(1): p. 204-12.
- 99. Winterberg, P.D. and M.L. Ford, *The effect of chronic kidney disease on T cell alloimmunity*. Curr Opin Organ Transplant, 2017. **22**(1): p. 22-28.
- 100. Yoon, J.W., et al., *Naive and central memory T-cell lymphopenia in end-stage renal disease*. Kidney Int, 2006. **70**(2): p. 371-6.
- Hendrikx, T.K., et al., *End-stage renal failure and regulatory activities of* CD4+CD25bright+FoxP3+ T-cells. Nephrol Dial Transplant, 2009. 24(6): p. 1969-78.
- 102. Bouts, A.H., et al., *Children with chronic renal failure have reduced numbers of memory B cells*. Clin Exp Immunol, 2004. **137**(3): p. 589-94.
- 103. Vaziri, N.D., et al., *Effect of uremia on structure and function of immune system*. J Ren Nutr, 2012.
 22(1): p. 149-56.
- 104. Vaziri, N.D., et al., *Disintegration of colonic epithelial tight junction in uremia: a likely cause of CKD-associated inflammation*. Nephrol Dial Transplant, 2012. **27**(7): p. 2686-93.
- 105. Vaziri, N.D., et al., Uremic plasma impairs barrier function and depletes the tight junction protein constituents of intestinal epithelium. Am J Nephrol, 2012. **36**(5): p. 438-43.
- 106. Andersen, K., et al., Intestinal Dysbiosis, Barrier Dysfunction, and Bacterial Translocation Account for CKD-Related Systemic Inflammation. J Am Soc Nephrol, 2017. **28**(1): p. 76-83.
- 107. McIntyre, C.W., et al., *Circulating endotoxemia: a novel factor in systemic inflammation and cardiovascular disease in chronic kidney disease.* Clin J Am Soc Nephrol, 2011. **6**(1): p. 133-41.
- 108. Sandek, A., et al., *The emerging role of the gut in chronic heart failure*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2008. **11**(5): p. 632-9.
- 109. Krack, A., et al., *The importance of the gastrointestinal system in the pathogenesis of heart failure*. Eur Heart J, 2005. **26**(22): p. 2368-74.
- 110. Niebauer, J., et al., *Endotoxin and immune activation in chronic heart failure: a prospective cohort study.* Lancet, 1999. **353**(9167): p. 1838-42.
- 111. Ursell, L.K., et al., *Defining the human microbiome*. Nutr Rev, 2012. 70 Suppl 1: p. S38-44.
- 112. Savage, D.C., *Microbial ecology of the gastrointestinal tract*. Annu Rev Microbiol, 1977. **31**: p. 107-33.
- 113. Ley, R.E., D.A. Peterson, and J.I. Gordon, *Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine*. Cell, 2006. **124**(4): p. 837-48.
- 114. Wing, M.R., et al., *Gut microbiome in chronic kidney disease*. Exp Physiol, 2016. **101**(4): p. 471-7.
- 115. O'Hara, A.M. and F. Shanahan, *The gut flora as a forgotten organ*. EMBO Rep, 2006. **7**(7): p. 688-93.
- Schloss, P.D. and J. Handelsman, *Status of the microbial census*. Microbiol Mol Biol Rev, 2004.
 68(4): p. 686-91.
- 117. Mariat, D., et al., *The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age*. BMC Microbiol, 2009. **9**: p. 123.

- 118. Qin, J., et al., *A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing*. Nature, 2010. **464**(7285): p. 59-65.
- Eckburg, P.B., et al., *Diversity of the human intestinal microbial flora*. Science, 2005. 308(5728): p. 1635-8.
- 120. Ursell, L.K., et al., *The interpersonal and intrapersonal diversity of human-associated microbiota in key body sites*. J Allergy Clin Immunol, 2012. **129**(5): p. 1204-8.
- Dominguez-Bello, M.G., et al., Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. 107(26): p. 11971-5.
- 122. Zoetendal, E.G., et al., *The host genotype affects the bacterial community in the human gastronintestinal tract.* Microbial ecology in health and disease, 2001. **13**(3): p. 129-134.
- 123. Huurre, A., et al., *Mode of delivery effects on gut microbiota and humoral immunity*. Neonatology, 2008. **93**(4): p. 236-40.
- 124. Goodrich, J.K., et al., *Human genetics shape the gut microbiome*. Cell, 2014. **159**(4): p. 789-99.
- 125. Wu, G.D., et al., *Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes*. Science, 2011.
 334(6052): p. 105-8.
- 126. Kang, S.S., et al., *Diet and exercise orthogonally alter the gut microbiome and reveal independent associations with anxiety and cognition*. Mol Neurodegener, 2014. **9**: p. 36.
- 127. Ley, R.E., et al., *Obesity alters gut microbial ecology*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(31): p. 11070-5.
- 128. Yatsunenko, T., et al., *Human gut microbiome viewed across age and geography*. Nature, 2012. **486**(7402): p. 222-7.
- 129. Festi, D., et al., *Gut microbiota and metabolic syndrome*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(43): p. 16079-94.
- 130. Hooper, L.V., et al., *Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine*. Science, 2001. **291**(5505): p. 881-4.
- 131. Macfarlane, S. and G.T. Macfarlane, *Regulation of short-chain fatty acid production*. Proc Nutr Soc, 2003. **62**(1): p. 67-72.
- 132. Vinolo, M.A., et al., *Regulation of inflammation by short chain fatty acids*. Nutrients, 2011. **3**(10): p. 858-76.
- 133. Cukrowska, B., et al., *Specific antibody and immunoglobulin responses after intestinal colonization of germ-free piglets with non-pathogenic Escherichia coli O86*. Immunobiology, 2001. **204**(4): p. 425-33.
- Kraehenbuhl, J.P. and M. Corbett, *Immunology. Keeping the gut microflora at bay.* Science, 2004. 303(5664): p. 1624-5.
- 135. Kamada, N. and G. Nunez, *Regulation of the immune system by the resident intestinal bacteria*. Gastroenterology, 2014. **146**(6): p. 1477-88.
- 136. Kelsall, B., *Recent progress in understanding the phenotype and function of intestinal dendritic cells and macrophages.* Mucosal Immunol, 2008. **1**(6): p. 460-9.
- 137. Mikulic, J., et al., Secretory IgA in complex with Lactobacillus rhamnosus potentiates mucosal dendritic cell-mediated Treg cell differentiation via TLR regulatory proteins, RALDH2 and secretion of IL-10 and TGF-beta. Cell Mol Immunol, 2017. **14**(6): p. 546-556.
- 138. Izcue, A., J.L. Coombes, and F. Powrie, *Regulatory T cells suppress systemic and mucosal immune activation to control intestinal inflammation*. Immunol Rev, 2006. **212**: p. 256-71.
- 139. Cong, Y., et al., *Bacterial-reactive T regulatory cells inhibit pathogenic immune responses to the enteric flora.* J Immunol, 2002. **169**(11): p. 6112-9.
- 140. Feng, T., C.O. Elson, and Y. Cong, *Treg cell-IgA axis in maintenance of host immune homeostasis with microbiota*. Int Immunopharmacol, 2011. **11**(5): p. 589-92.
- 141. Gensollen, T., et al., *How colonization by microbiota in early life shapes the immune system*. Science, 2016. **352**(6285): p. 539-44.
- 142. Kozakova, H., et al., *Colonization of germ-free mice with a mixture of three lactobacillus strains enhances the integrity of gut mucosa and ameliorates allergic sensitization*. Cell Mol Immunol, 2016. **13**(2): p. 251-62.
- 143. Ukena, S.N., et al., *Probiotic Escherichia coli Nissle 1917 inhibits leaky gut by enhancing mucosal integrity*. PLoS One, 2007. **2**(12): p. e1308.
- 144. Ewaschuk, J.B., et al., *Secreted bioactive factors from Bifidobacterium infantis enhance epithelial cell barrier function.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2008. **295**(5): p. G1025-34.
- 145. Macpherson, A.J. and T. Uhr, *Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria*. Science, 2004. **303**(5664): p. 1662-5.

- 146. Petersen, C. and J.L. Round, *Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease*. Cell Microbiol, 2014. **16**(7): p. 1024-33.
- 147. Chow, J. and S.K. Mazmanian, *A pathobiont of the microbiota balances host colonization and intestinal inflammation*. Cell Host Microbe, 2010. **7**(4): p. 265-76.
- 148. Takiishi, T., C.I.M. Fenero, and N.O.S. Camara, *Intestinal barrier and gut microbiota: Shaping our immune responses throughout life.* Tissue Barriers, 2017. **5**(4): p. e1373208.
- 149. Hsiao, E.Y., et al., *Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders*. Cell, 2013. **155**(7): p. 1451-63.
- 150. Khor, B., A. Gardet, and R.J. Xavier, *Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease*. Nature, 2011. **474**(7351): p. 307-17.
- 151. Everard, A., et al., *Cross-talk between Akkermansia muciniphila and intestinal epithelium controls diet-induced obesity.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(22): p. 9066-71.
- 152. Kostic, A.D., et al., *Fusobacterium nucleatum potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment*. Cell Host Microbe, 2013. **14**(2): p. 207-15.
- 153. Maes, M., et al., *Depression and sickness behavior are Janus-faced responses to shared inflammatory pathways.* BMC Med, 2012. **10**: p. 66.
- 154. Palleja, A., et al., *Recovery of gut microbiota of healthy adults following antibiotic exposure*. Nat Microbiol, 2018. **3**(11): p. 1255-1265.
- 155. Ayres, J.S., N.J. Trinidad, and R.E. Vance, *Lethal inflammasome activation by a multidrug*resistant pathobiont upon antibiotic disruption of the microbiota. Nat Med, 2012. **18**(5): p. 799-806.
- 156. Hooper, L.V., D.R. Littman, and A.J. Macpherson, *Interactions between the microbiota and the immune system*. Science, 2012. **336**(6086): p. 1268-73.
- 157. Vaziri, N.D., et al., *Chronic kidney disease alters intestinal microbial flora*. Kidney Int, 2013.
 83(2): p. 308-15.
- 158. Anders, H.J., K. Andersen, and B. Stecher, *The intestinal microbiota, a leaky gut, and abnormal immunity in kidney disease.* Kidney Int, 2013. **83**(6): p. 1010-6.
- 159. Lupp, C., et al., *Host-mediated inflammation disrupts the intestinal microbiota and promotes the overgrowth of Enterobacteriaceae.* Cell Host Microbe, 2007. **2**(2): p. 119-129.
- 160. Himmelfarb, J. and T.A. Ikizler, *Hemodialysis*. N Engl J Med, 2010. **363**(19): p. 1833-45.
- 161. Weiner, J., 3rd, et al., *Biomarkers of inflammation, immunosuppression and stress with active disease are revealed by metabolomic profiling of tuberculosis patients.* PLoS One, 2012. **7**(7): p. e40221.
- 162. Stearns-Kurosawa, D.J., et al., *The pathogenesis of sepsis*. Annu Rev Pathol, 2011. **6**: p. 19-48.
- 163. Schepers, E., G. Glorieux, and R. Vanholder, *The gut: the forgotten organ in uremia?* Blood Purif, 2010. **29**(2): p. 130-6.
- 164. Mulay, S.R., et al., *Calcium oxalate crystals induce renal inflammation by NLRP3-mediated IL-Ibeta secretion.* J Clin Invest, 2013. **123**(1): p. 236-46.
- 165. Mulay, S.R., et al., Oxalate-induced chronic kidney disease with its uremic and cardiovascular complications in C57BL/6 mice. Am J Physiol Renal Physiol, 2016. **310**(8): p. F785-F795.
- 166. Hess, B., et al., *High-calcium intake abolishes hyperoxaluria and reduces urinary crystallization during a 20-fold normal oxalate load in humans*. Nephrol Dial Transplant, 1998. **13**(9): p. 2241-7.
- 167. Morozumi, M. and Y. Ogawa, *Impact of dietary calcium and oxalate ratio on urinary stone formation in rats.* Mol Urol, 2000. **4**(4): p. 313-20.
- 168. van Herck, H., et al., Orbital sinus blood sampling in rats as performed by different animal technicians: the influence of technique and expertise. Lab Anim, 1998. **32**(4): p. 377-86.
- 169. Bryant, C.D., *The blessings and curses of C57BL/6 substrains in mouse genetic studies*. Ann N Y Acad Sci, 2011. **1245**: p. 31-3.
- 170. The European Parliament and the Council, *On the protection of animals used for scientific purposes*. Directive 2010/63/EU 10.12.2018; Available from: https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:en:PDF.
- 171. Rathkolb, B., et al., *Blood Collection from Mice and Hematological Analyses on Mouse Blood*. Curr Protoc Mouse Biol, 2013. 3(2): p. 101-19.
- 172. Hulett, H.R., et al., *Cell sorting: automated separation of mammalian cells as a function of intracellular fluorescence*. Science, 1969. **166**(3906): p. 747-9.
- 173. Sheridan, B.S. and L. Lefrancois, *Isolation of mouse lymphocytes from small intestine tissues*. Curr Protoc Immunol, 2012. **99**(1): p. 3-19.
- 174. Schmid, M., A.K. Wege, and U. Ritter, *Characteristics of "Tip-DCs and MDSCs" and Their Potential Role in Leishmaniasis.* Front Microbiol, 2012. **3**: p. 74.

- 175. Lai, L., et al., *Mouse cell surface antigens: nomenclature and immunophenotyping*. J Immunol, 1998. **160**(8): p. 3861-8.
- 176. Rosas, M., et al., *The myeloid 7/4-antigen defines recently generated inflammatory macrophages and is synonymous with Ly-6B.* J Leukoc Biol, 2010. **88**(1): p. 169-80.
- 177. Levitt, D.G. and M.D. Levitt, *Human serum albumin homeostasis: a new look at the roles of synthesis, catabolism, renal and gastrointestinal excretion, and the clinical value of serum albumin measurements.* Int J Gen Med, 2016. **9**: p. 229-55.
- 178. Wong, J., E. Vilar, and K. Farrington, *Endotoxemia in end-stage kidney disease*. Semin Dial, 2015. **28**(1): p. 59-67.
- 179. Chirgwin, J.M., et al., *Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease*. Biochemistry, 1979. **18**(24): p. 5294-9.
- 180. Vogelstein, B. and D. Gillespie, *Preparative and analytical purification of DNA from agarose*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(2): p. 615-9.
- 181. Besarab, A., W.H. Horl, and D. Silverberg, *Iron metabolism, iron deficiency, thrombocytosis, and the cardiorenal anemia syndrome*. Oncologist, 2009. **14**(Suppl 1): p. 22-33.
- Berg, R.D., *Bacterial translocation from the gastrointestinal tract*. Trends Microbiol, 1995. 3(4): p. 149-54.
- Bogdanos, D.P., B. Gao, and M.E. Gershwin, *Liver immunology*. Compr Physiol, 2013. 3(2): p. 567-98.
- 184. Bronte, V. and M.J. Pittet, *The spleen in local and systemic regulation of immunity*. Immunity, 2013. **39**(5): p. 806-18.
- 185. Kolaczkowska, E. and P. Kubes, *Neutrophil recruitment and function in health and inflammation*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(3): p. 159-75.
- 186. Suryavanshi, M.V., et al., *Hyperoxaluria leads to dysbiosis and drives selective enrichment of oxalate metabolizing bacterial species in recurrent kidney stone endures.* Sci Rep, 2016. **6**: p. 34712.
- Collins, A.J., et al., US Renal Data System 2013 Annual Data Report. Am J Kidney Dis, 2014.
 63(1 Suppl): p. A7.
- Meijers, B., et al., Intestinal Barrier Function in Chronic Kidney Disease. Toxins (Basel), 2018.
 10(7).
- 189. Kesper, M.S., *Systemische Entzündung bei chronischer Niereninsuffizienz Die Rolle der Darmflora.* 2016, Ludwig-Maximilians-Universität München. (med. Diss.).
- 190. Vaziri, N.D., J. Yuan, and K. Norris, *Role of urea in intestinal barrier dysfunction and disruption of epithelial tight junction in chronic kidney disease.* Am J Nephrol, 2013. **37**(1): p. 1-6.
- 191. Lau, W.L. and N.D. Vaziri, *The Leaky Gut and Altered Microbiome in Chronic Kidney Disease*. J Ren Nutr, 2017. **27**(6): p. 458-461.
- 192. Vaziri, N.D., *CKD impairs barrier function and alters microbial flora of the intestine: a major link to inflammation and uremic toxicity.* Curr Opin Nephrol Hypertens, 2012. **21**(6): p. 587-92.
- 193. Kalantar-Zadeh, K., et al., *Food intake characteristics of hemodialysis patients as obtained by food frequency questionnaire.* J Ren Nutr, 2002. **12**(1): p. 17-31.
- 194. Fouque, D., et al., Dietary trends and management of hyperphosphatemia among patients with chronic kidney disease: an international survey of renal care professionals. J Ren Nutr, 2014. 24(2): p. 110-5.
- 195. Jakobsson, H.E., et al., *Short-term antibiotic treatment has differing long-term impacts on the human throat and gut microbiome.* PLoS One, 2010. **5**(3): p. e9836.
- 196. Fricke, W.F., et al., *Human microbiota characterization in the course of renal transplantation*. Am J Transplant, 2014. **14**(2): p. 416-27.
- Sud, K. and V. Sakhuja, *The gastrointestinal tract in uremia*. J Assoc Physicians India, 1997. 45(11): p. 833-4.
- 198. Yilmaz, M.I., et al., *Renal anemia of inflammation: the name is self-explanatory*. Blood Purif, 2011. **32**(3): p. 220-5.
- 199. David, V., C. Francis, and J.L. Babitt, *Ironing out the cross talk between FGF23 and inflammation*. Am J Physiol Renal Physiol, 2017. **312**(1): p. F1-F8.
- 200. Cafiero, C., et al., *Inflammation induces osteoclast differentiation from peripheral mononuclear cells in chronic kidney disease patients: crosstalk between the immune and bone systems.* Nephrol Dial Transplant, 2018. **33**(1): p. 65-75.
- 201. Honda, H., et al., *Obese sarcopenia in patients with end-stage renal disease is associated with inflammation and increased mortality.* Am J Clin Nutr, 2007. **86**(3): p. 633-8.

- 202. Dungey, M., et al., *Inflammatory factors and exercise in chronic kidney disease*. Int J Endocrinol, 2013. **2013**: p. 569831.
- 203. de Mutsert, R., et al., Association between serum albumin and mortality in dialysis patients is partly explained by inflammation, and not by malnutrition. J Ren Nutr, 2009. **19**(2): p. 127-35.
- 204. Lau, W.L., K. Kalantar-Zadeh, and N.D. Vaziri, *The Gut as a Source of Inflammation in Chronic Kidney Disease*. Nephron, 2015. **130**(2): p. 92-8.
- 205. Malaponte, G., et al., *IL-1beta, TNF-alpha and IL-6 release from monocytes in haemodialysis patients in relation to dialytic age.* Nephrol Dial Transplant, 2002. **17**(11): p. 1964-70.
- 206. Schindler, R., et al., *Short bacterial DNA fragments: detection in dialysate and induction of cytokines.* J Am Soc Nephrol, 2004. **15**(12): p. 3207-14.
- 207. Arizono, K., et al., *Use of ultrapure dialysate in reduction of chronic inflammation during hemodialysis.* Blood Purif, 2004. **22**(Suppl 2): p. 26-9.
- 208. Gesualdo, L., et al., *Cytokines and bioincompatibility*. Nephrol Dial Transplant, 1998. **13**(7): p. 1622-6.
- 209. Memoli, B., et al., *Changes of serum albumin and C-reactive protein are related to changes of interleukin-6 release by peripheral blood mononuclear cells in hemodialysis patients treated with different membranes.* Am J Kidney Dis, 2002. **39**(2): p. 266-73.
- 210. Nassar, G.M., *Preventing and treating inflammation: role of dialysis access management*. Semin Dial, 2013. **26**(1): p. 28-30.
- 211. Kshirsagar, A.V., et al., *Periodontal disease adversely affects the survival of patients with end-stage renal disease*. Kidney Int, 2009. **75**(7): p. 746-51.
- 212. Ori, Y., et al., *Cytokine secretion and markers of inflammation in relation to acidosis among chronic hemodialysis patients.* Blood Purif, 2013. **35**(1-3): p. 181-6.
- 213. Aveles, P.R., et al., Association between biomarkers of carbonyl stress with increased systemic inflammatory response in different stages of chronic kidney disease and after renal transplantation. Nephron Clin Pract, 2010. **116**(4): p. c294-9.
- 214. Ruiz, S., et al., *Targeting the transcription factor Nrf2 to ameliorate oxidative stress and inflammation in chronic kidney disease*. Kidney Int, 2013. **83**(6): p. 1029-41.
- 215. Cobo, G., B. Lindholm, and P. Stenvinkel, *Chronic inflammation in end-stage renal disease and dialysis*. Nephrol Dial Transplant, 2018. **33**(suppl_3): p. iii35-iii40.
- 216. Lee, C.T., et al., Association between C-reactive protein and biomarkers of bone and mineral metabolism in chronic hemodialysis patients: a cross-sectional study. J Ren Nutr, 2009. **19**(3): p. 220-7.
- 217. Velasquez, M.T., et al., *Gut Microbiota and Cardiovascular Uremic Toxicities*. Toxins (Basel), 2018. **10**(7): p. 287.
- 218. Vanholder, R., et al., *Review on uremic toxins: classification, concentration, and interindividual variability.* Kidney Int, 2003. **63**(5): p. 1934-43.
- 219. Ermer, T., et al., *Oxalate, inflammasome, and progression of kidney disease*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2016. **25**(4): p. 363-71.
- 220. Takir, M., et al., Lowering Uric Acid With Allopurinol Improves Insulin Resistance and Systemic Inflammation in Asymptomatic Hyperuricemia. J Investig Med, 2015. 63(8): p. 924-9.
- 221. Cohen, S.D., et al., *Cytokine patterns and survival in haemodialysis patients*. Nephrol Dial Transplant, 2010. **25**(4): p. 1239-43.
- 222. Park, J.T., et al., *Leptin/adiponectin ratio is an independent predictor of mortality in nondiabetic peritoneal dialysis patients.* Perit Dial Int, 2013. **33**(1): p. 67-74.
- 223. Kalocheretis, P., et al., Strong correlation of B2-microglobulin (B2-m) with procalcitonin (PCT) in the serum of chronic hemodialysis patients: a role for infections in the dialysis-related amyloidosis? Ren Fail, 2008. **30**(3): p. 261-5.
- 224. Stinghen, A.E., et al., *Uremic Toxicity of Advanced Glycation End Products in CKD*. J Am Soc Nephrol, 2016. **27**(2): p. 354-70.
- 225. Evenepoel, P., et al., *Uremic toxins originating from colonic microbial metabolism*. Kidney Int Suppl, 2009(114): p. S12-9.
- 226. Fukagawa, M. and Y. Watanabe, *Role of uremic toxins and oxidative stress in chronic kidney disease*. Ther Apher Dial, 2011. **15**(2): p. 119.
- 227. Meijers, B.K. and P. Evenepoel, *The gut-kidney axis: indoxyl sulfate, p-cresyl sulfate and CKD progression*. Nephrol Dial Transplant, 2011. **26**(3): p. 759-61.
- 228. Wu, I.W., et al., *p*-Cresyl sulphate and indoxyl sulphate predict progression of chronic kidney disease. Nephrol Dial Transplant, 2011. **26**(3): p. 938-47.

- 229. Bammens, B., et al., *Free serum concentrations of the protein-bound retention solute p-cresol predict mortality in hemodialysis patients.* Kidney Int, 2006. **69**(6): p. 1081-7.
- 230. Koeth, R.A., et al., Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. Nat Med, 2013. **19**(5): p. 576-85.
- 231. Missailidis, C., et al., Serum Trimethylamine-N-Oxide Is Strongly Related to Renal Function and Predicts Outcome in Chronic Kidney Disease. PLoS One, 2016. **11**(1): p. e0141738.
- 232. Tang, W.H., et al., *Gut microbiota-dependent trimethylamine N-oxide (TMAO) pathway* contributes to both development of renal insufficiency and mortality risk in chronic kidney disease. Circ Res, 2015. **116**(3): p. 448-55.
- 233. Chemouny, J.M., et al., *Modulation of the microbiota by oral antibiotics treats immunoglobulin A nephropathy in humanized mice*. Nephrol Dial Transplant, 2018.
- 234. Andrade-Oliveira, V., et al., *Gut Bacteria Products Prevent AKI Induced by Ischemia-Reperfusion*. J Am Soc Nephrol, 2015. **26**(8): p. 1877-88.
- 235. Sterling, K.A., et al., *The immunoregulatory function of vitamin D: implications in chronic kidney disease*. Nat Rev Nephrol, 2012. **8**(7): p. 403-12.
- 236. Okada, R., et al., *Pro-/anti-inflammatory cytokine gene polymorphisms and chronic kidney disease: a cross-sectional study.* BMC Nephrol, 2012. **13**: p. 2.
- 237. Fritz, J.V., et al., *From meta-omics to causality: experimental models for human microbiome research*. Microbiome, 2013. **1**(1): p. 14.
- 238. Al-Asmakh, M. and F. Zadjali, *Use of Germ-Free Animal Models in Microbiota-Related Research*. J Microbiol Biotechnol, 2015. **25**(10): p. 1583-8.
- 239. Bishara, A., et al., *High-quality genome sequences of uncultured microbes by assembly of read clouds*. Nat Biotechnol, 2018. (epub ahead of print).
- 240. Sam, Q.H., M.W. Chang, and L.Y. Chai, *The Fungal Mycobiome and Its Interaction with Gut Bacteria in the Host.* Int J Mol Sci, 2017. **18**(2): p. 330.
- 241. Seelig, M.S., *Mechanisms by which antibiotics increase the incidence and severity of candidiasis and alter the immunological defenses.* Bacteriol Rev, 1966. **30**(2): p. 442-59.
- 242. Zmora, N., et al., *Personalized Gut Mucosal Colonization Resistance to Empiric Probiotics Is Associated with Unique Host and Microbiome Features*. Cell, 2018. **174**(6): p. 1388-1405.
- 243. Suez, J., et al., *Post-Antibiotic Gut Mucosal Microbiome Reconstitution Is Impaired by Probiotics and Improved by Autologous FMT*. Cell, 2018. **174**(6): p. 1406-1423.
- 244. Pamer, E.G., *Fecal microbiota transplantation: effectiveness, complexities, and lingering concerns.* Mucosal Immunol, 2014. 7(2): p. 210-4.
- 245. Abrahamsson, T.R., et al., *Low gut microbiota diversity in early infancy precedes asthma at school age*. Clin Exp Allergy, 2014. **44**(6): p. 842-50.
- 246. Cahenzli, J., et al., *Intestinal microbial diversity during early-life colonization shapes long-term IgE levels*. Cell Host Microbe, 2013. **14**(5): p. 559-70.

7. Abkürzungsverzeichnis

Auf im deutschen Sprachgebrauch übliche, allgemeine Abkürzungen sowie IUPAC-Bezeichnungen und SI-Einheiten, wird hier aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet.

ABC	Avidin-Biotin-Complex
ACE	engl. angiotensin-converting enzyme
ACR	Albumin-zu-Kreatinin-Verhältnis
APC	Allophycocyanin
APCs	Antigen-präsentierende Zellen
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	engl. cluster of differentiation
CFU	engl. colony forming units
CKD	Chronische Nierenkrankheit (engl. chronic kidney disease)
CTL	Zytotoxische T-Zelle
CVD	Kardiovaskuläre Erkrankung (engl. cardiovascular disease)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	engl. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ESRD	Endstadium der CKD (engl. end-stage renal disease)
FACS	Durchflusszytometrie (engl. <i>fluorescence-activated cell sorting</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocvanat
FMT	Fäkale Mikrobiotatransplantation
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
HE	Hämatoxylin-Eosin
I-Kontrolle	Inteverntionskontrollgruppe
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
KDIGO	engl Kidney Disease: Improving Global Outcomes
LAL	Limulus-Amöbozyten-Lysat
LB	engl. lvsogenv broth
LPS	Lipopolysaccharid
MCH	Mittleres korpuskuläres Hämoglobin
MCV	Mittleres korpuskuläres Volumen
MHC	engl. major histocompatibility complex
PAS	engl. Periodic Acid-Schiff
PBS	engl. phosphate buffer solution
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein Complex
PTX	Pentraxin
RNA	Ribonukleinsäure
SEM	engl. standard error of the mean
sIgA	Sekretorisches Immunglobulin A
ThC	T-Helfer-Zelle
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	Regulatorische T-Zelle
ZO	Zonula occludens

8. Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Immundysfunktion bei chronischer Nierenerkrankung Welchen Einfluss hat die bakterielle Darmflora?

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Kassel, 22.04.2020

Lukas Alfons Konrad

Ort, Datum

Lukas Alfons Konrad

9. Wissenschaftliche Publikationen des Autors

- 1. **Konrad** L, Andersen K, Kesper MS, Kumar SV, Mulay SR, Anders HJ., *The gut flora* modulates intestinal barrier integrity but not progression of chronic kidney disease in hyperoxaluria-related nephrocalcinosis. Nephrol Dial Transplant, 2020. 35(1):86–97.
- 2. Andersen K, Kesper MS, Marschner JA, **Konrad L**, Ryu M, Kumar Vr S, Kulkarni OP, Mulay SR, Romoli S, Demleitner J, Schiller P, Dietrich A, Müller S, Gross O, Ruscheweyh HJ, Huson DH, Stecher B, Anders HJ., *Intestinal Dysbiosis, Barrier Dysfunction, and Bacterial Translocation Account for CKD-Related Systemic Inflammation.* J Am Soc Nephrol, 2017. 28(1): p. 76-83.
- 3. Desai J, Kumar SV, Mulay SR, **Konrad L**, Romoli S, Schauer C, Herrmann M, Bilyy R, Müller S, Popper B, Nakazawa D, Weidenbusch M, Thomasova D, Krautwald S, Linkermann A, Anders HJ., et al., *PMA and crystal-induced neutrophil extracellular trap formation involves RIPK1-RIPK3-MLKL signaling*. Eur J Immunol, 2016. 46(1): p. 223-9.
- 4. Holderied A, Romoli S, Eberhard J, **Konrad LA**, Devarapu SK, Marschner JA, Müller S, Anders HJ., *Glomerular parietal epithelial cell activation induces collagen secretion and thickening of Bowman's capsule in diabetes*. Lab Invest, 2015. 95(3): p. 273-82.

10. Danksagung

Bei der Fertigstellung dieser Arbeit haben mich in direkter und indirekter Weise viele Menschen unterstützt, denen ich hierfür an dieser Stelle danken möchte. Ich danke meinem Doktorvater Hans-Joachim Anders, der das Projekt zielstrebig und hilfsbereit vorangebracht hat und in rekordverdächtiger Reaktionszeit für mich erreichbar war. Auch meiner Betreuerin Kirstin Andersen möchte ich für ihre kompetente Hilfe bei der Einarbeitung in Methoden und ihre Unterstützung bei praktischen Laborarbeiten danken. Unverzichtbar war die technische Unterstützung durch Janina Mandelbaum, Dan Draganovic, und Ewa Radomska sowie durch das Team von Birgit Rathkolb.

Aus dem Laborteam sind außerdem besonders hervorzuheben: Marie Sophie Kesper, deren Forschungsthema ich beerben durfte und mit der ich Frust und Freude über das Gelingen des Projektes teilen konnte. Shrikant Mulay, Julian Marschner, Maciej Lech und Santosh Kumar, die mir bei Problemen mit ihrer Erfahrung tatkräftig und geduldig zur Seite standen.

Dass meine Doktorarbeitszeit zu einer unvergesslichen und oft auch sehr lustigen Zeit geworden ist, habe ich aber vor allem der Vielfalt und dem Teamgeist von Mohsen, John, Martrez, Steffi, Satish, Julia, Dana, Alexander, Anja, Jyaysi, Orestes, Franziska, Tomo, Jonny, Yajuan, Moying, Moritz, Simone, Anais, Maia, Xie, Hannah, Heni, Johannes, Narci, Marc und Nuru zu verdanken. Zu jedem könnte ich Erlebnisse erzählen, die diese Arbeit in ihrem Unterhaltungscharakter deutlich aufwerten, ihrem formalen Charakter hingegen widersprechen würden.

Bevor ich zum Schluss dieser Danksagung komme, möchte ich einen etwas unorthodoxen Dank einschieben. Weil ihr Werk keine wissenschaftlich zitierbare Quelle darstellt, kommt es in den Literaturverzeichnissen und Danksagungen wissenschaftlicher Publikationen viel zu kurz. Danken möchte ich den ungezählten ehrenamtlichen Autoren der Wikipedia, deren Werk mir und vielen anderen unschätzbare Dienste beim schnellen Nachschlagen lexikalischen Wissens, sowie bei der Einarbeitung in Themen, die vom Hauptpfad des eigenen wissenschaftlichen Interesses abführen, leistet.

Zum Schluss möchte ich meiner Frau Katharina danken, die mich trotz der Langwierigkeit der Manuskriptverfassung unendlich geduldig unterstützte, mir den Rücken freihielt und dafür auf viel Familienzeit verzichten musste. Ohne sie läge diese Arbeit heute nicht vor. Danke.