

Aus der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Malte Kelm

**Vitamin K Supplementation inhibiert kardiovaskuläre Kalzifizierung in
einem murinen Modell extraossärer Kalzifizierung**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Daniel Scheiber
2016

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Erstgutachter: Priv.-Doz. Dr. med. Ralf Westenfeld

Zweitgutachterin: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Judith Haendeler

Für Leonard und Heike

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Publikationen in wissenschaftlichen Fachzeitschriften:

1. **Scheiber, D.**, Veulemans V., Horn P., Chatrou M.L., Potthoff, S.A., Kelm, M., Schurgers, L.J. and Westenfeld, R.: “High-dose menaquinone-7 supplementation reduces cardiovascular calcification in a murine model of extraosseous calcification”

Nutrients 2015, 7, 6991-7011; doi:10.3390/nu7085318 (Scheiber et al., 2015)

Posterpräsentationen:

1. Veulemans V., **Scheiber D.**, Horn P., Stern D., Vorpahl M., Chatrou M., Potthoff S., Schurgers L., Kelm M., Westenfeld R.: „Vitamin K (VK) supplementation rescues procalcifying aortic mRNA changes in a murine model of chronic kidney disease”

Posterpräsentation auf der 78. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie - Herz- und Kreislaufforschung e.V. (DGK), Mannheim, 11.04. - 14.04.2012

2. Veulemans V., **Scheiber D.**, Horn P., Stern D., Vorpahl M., Chatrou M., Potthoff S., Schurgers L., Kelm M., Westenfeld R.: „Vitamin K supplementation rescues procalcific vascular mRNA alterations in a rat model of chronic kidney disease”
Posterpräsentation auf dem Kongress der European Society of Cardiology (ESC), München, 25.08. - 29.08.2012

3. **Scheiber D.**, Veulemans V., Horn P., Chatrou M., Potthoff S., Kelm M., Schurgers L., Westenfeld R.: „Vitamin K₂ supplementation reduces cardiovascular calcification in a murine model of extraosseous calcification”
Posterpräsentation auf dem Kongress der European Society of Cardiology (ESC), London, 29.08. - 02.09.2015

1 Zusammenfassung

Hintergrund

Extraossäre Kalzifizierung beschreibt die Mineralisation von Kalziumphosphat außerhalb des Knochens. Physiologische Alterungsprozesse sowie eine Vielzahl von Erkrankungen (Niereninsuffizienz, Diabetes mellitus, etc.) sind charakterisiert durch vermehrte extraossäre Kalzifizierung. Von besonderem Interesse sind Verkalkungen des kardiovaskulären Systems mit den Prädilektionsstellen an Herzklappen und Gefäßsystem, da diese mit gesteigerter Morbidität und Mortalität verbunden sind. Analog der physiologischen Knochenbildung ist die vaskuläre Kalzifizierung ein aktiv regulierter, zellvermittelter Prozess im Zusammenspiel von Aktivatoren und Inhibitoren der Kalzifizierung. Matrix Gla Protein (MGP) ist ein potenter lokaler Kalzifizierungsinhibitor. Synthetisiert innerhalb der Tunica media bedarf er zwingend einer Vitamin K vermittelten Karboxylierungsreaktion um seine kalzifizierungsinhibitorische Wirkung zu entfalten, analog der Aktivierung von Gerinnungsfaktoren.

Hypothese

Eine prophylaktische Vitamin K Supplementation inhibiert extraossäre Kalziumablagerungen in einem murinen Kalzifizierungsmodell.

Methoden

Durch operative subtotale Nephrektomie und phosphatreiche Diät induzierten wir bei männlichen Wistar Ratten eine extraossäre Kalzifizierung. Als Kontrollgruppen dienten scheinoperierte Tiere mit normaler Nierenfunktion. Jeweils die Hälfte der Interventions- und Kontrolltiere erhielt eine Vitamin K Supplementation, bzw. eine Standardernährung, so dass wir insgesamt 4 Gruppen über 12 Wochen verfolgten (n=42; Kontrollgruppen: Co + Co-K₂; Interventionsgruppen: CKD + CKD-K₂). Wir analysierten die kardiovaskuläre Kalzifizierung (Histologie, Atomabsorptionsspektrometrie), die Alteration des MGP-Stoffwechsels (Immunhistochemie, PCR) sowie Auswirkungen der Interventionen auf die kardiovaskuläre Funktion (Echokardiographie, Vitalparameter, Histologie).

Ergebnisse

Wie erwartet induzierten operative Nephrektomie und phosphatreiche Diät eine aortale (1,3 fach; $p < 0,05$) sowie myokardiale Kalzifizierung (2,4 fach; $p < 0,05$). Parallel dazu entwickelten Tiere der CKD Gruppe erhöhte Ablagerungen alkalischer Phosphatase in aortalen Gewebeproben (2,2 fach; $p < 0,05$), einem Marker zur Osteoblastencharakterisierung. Die Vitamin K Supplementation inhibierte bei Tieren der Interventionsgruppe CKD-K₂ die Entstehung aortaler und myokardialer Kalzifizierung, sowie erhöhter Konzentrationen für alkalische Phosphatase. Vitamin K Supplementation führte in den Kontroll- und Interventionsgruppen zu einer deutlich gesteigerten Expression des MGP-Gens (11,4 fach; $p < 0,05$). Tiere beider Interventionsgruppen (CKD + CKD-K₂) entwickelten eine arterielle Hypertonie. Zudem beobachteten wir strukturelle kardiovaskuläre Alterationen mit einer myokardialen Hypertrophie (Septumdurchmesser 1,6 fach; $p < 0,001$) und einer erhöhten Anzahl von Strangbrüchen der elastischen Fasern in der arteriellen Tunica media (3,4 fach; $p < 0,001$) in beiden Interventionsgruppen, die durch die Vitamin K Supplementation nicht beeinflusst wurden.

Schlussfolgerung

Eine Vitamin K Supplementation schützt in einem Tiermodell der extraossären Verkalkung vor kardiovaskulärer Kalzifizierung. Potentielle Mechanismen des protektiven Vitamin K Effektes umfassen die Inhibition einer sekundären Verkalkung geschädigter kardiovaskulärer Gewebe, vermittelt über eine Aktivierung des Kalzifizierungsinhibitors MGP, sowie eine direkte Induktion der lokalen MGP Genexpression.

2 Abkürzungsverzeichnis

AAS	Atom-Absorptions-Spektrometrie
bmp-2	bone morphogenic protein-2
CKD	<i>Chronic Kidney Disease</i>
cm	Zentimeter
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DBD	Diastolischer Blutdruck
dH₂O	Destilliertes Wasser
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
g	Gramm
g/dl	Gramm pro Deziliter
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GGCX	Gamma-Glutamat-Karboxylase
GLA	Carboxyglutaminsäure
Hb	Hämoglobin
HF	Herzfrequenz
Hkt	Hämatokrit
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KH₂	Vitamin K-Hydroquinone
KHK	Koronare Herzkrankheit
KO	Vitamin K-Epoxid
m/s	Meter pro Sekunde
MAD	Arterieller Mitteldruck
mg	Milligramm
mg/dl	Milligramm pro Deziliter
ml/min	Milliliter pro Minute
mmol/l	Millimol pro Liter
NAD(P)H	reduzierte Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
nM = nmol	Nanomolar
nmol/l	Nanomol pro Liter
ns	nicht signifikant
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
RANKL	receptor activator of nuclear factor- κ B-Ligand
RunX2	runx related transcription factor 2
s/min	Schläge pro Minute
SBD	Systolischer Blutdruck
SEM	Standardfehler
TBS/ TBST	<i>Tris Buffered Saline/ Tris Buffered Saline + Tween 20%</i>
t-ucMGP	<i>total uncarboxylated Matrix Gla Protein</i>
TVA	Tierversuchsanstalt
VK	Vitamin K
VK₁	Vitamin K ₁ (Phyllochinone)
VK₂	Vitamin K ₂ (Menaquinone)
VKOR	Vitamin K Epoxid Reduktase
VSMC	<i>Vascular smooth muscle cells</i> = glatte Gefäßmuskelzellen

3 Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	I
2 Abkürzungsverzeichnis.....	II
3 Inhaltsverzeichnis.....	III
4 Einleitung.....	1
4.1 Kardiovaskuläre Kalzifizierung - Einführung	1
4.2 Kardiovaskuläre Kalzifizierung - Pathophysiologie	3
4.3 Chronische Niereninsuffizienz als Modell der kardiovaskulären Kalzifizierung	6
4.3.1 Epidemiologie und Pathophysiologie der chronischen Niereninsuffizienz.....	6
4.3.2 Kardiovaskuläre Erkrankungen bei CKD	7
4.3.3 Pathophysiologie der kardiovaskulären Kalzifizierung im Modell der CKD	8
4.3.3.1 Physikochemische Kalzifizierung	8
4.3.3.2 Biologische Kalzifizierung.....	10
4.3.4 Murine Modelle der CKD zur Induktion von kardiovaskulärer Kalzifizierung	15
4.4 Innovative Therapiestrategien - Kalzifizierungshemmung durch Vitamin K	
Supplementation.....	16
4.4.1 Vitamin K Mangelzustände und vaskuläre Kalzifizierung.....	16
4.4.2 Vitamin K Zyklus.....	17
4.4.3 Vitamin K-abhängige Proteine.....	19
4.4.4 Direkter Vitamin K ₂ Einfluss auf die Genexpression	21
4.5 Zielsetzung der Arbeit	22
5 Material und Methoden	24
5.1 Materialliste.....	24
5.2 Versuchstiere	27
5.2.1 Genehmigung des Tierversuchsprojektes	27
5.2.2 Tierstamm und Tierhaltung	28
5.2.3 Tierkohorten und Studiendesign	28
5.3 Tierexperimenteller Untersuchungsablauf.....	29
5.2.1 Gewichtsbestimmung.....	31
5.2.2 Vitalparameterbestimmung	31
5.2.3 Blutentnahme und Probenasservierung.....	32
5.2.4 Operationsmethoden.....	32
5.2.4.1 5/6-Nephrektomie	32
5.2.4.2 Sham-Operation.....	33
5.2.5 Finalversuch	33

5.2.5.1	24-Stunden-Sammelurin	33
5.2.5.2	Echokardiographie.....	34
5.2.5.3	Blutentnahme und Organasservierung.....	34
5.2.6	Probenaufarbeitung.....	35
5.2.6.1	Blutbildbestimmung und Rheologie.....	35
5.2.6.2	Klinische Chemie mit Bestimmung der Elektrolyte und Retentionsparameter in Serum und Urin.....	35
5.2.6.3	Bestimmung von Plasma -ucMGP; cMGP.....	36
5.2.6.4	Bestimmung der Kalziumkonzentration im Gewebe mittels Atomabsorptionsspektrometrie.....	36
5.2.6.5	Histologie.....	36
5.2.6.6	Immunhistochemie	38
5.2.6.7	Mikroskopische Auswertung.....	39
5.2.7	RNA-Isolation und qRT-PCR.....	40
5.2.8	Statistische Auswertung der erhobenen Daten	40
6	Ergebnisse.....	41
6.1	Überlebenskurve der Versuchsgruppen.....	41
6.2	Induktion der experimentellen Niereninsuffizienz	41
6.3	Kalzifizierung	46
6.4	Strukturelle Gefäßveränderungen bei Niereninsuffizienz und Vitamin K ₂ Supplementation.....	51
6.5	Kardiale Funktion.....	53
6.6	Quantitative mRNA Analyse	56
7	Diskussion.....	62
7.1	Eine Vitamin K ₂ Supplementation inhibiert die Entstehung der kardiovaskulären Kalzifizierung.....	62
7.1.1	CKD Effekt.....	62
7.1.2	Extraossäre Kalzifizierung	64
7.2	Vitamin K ₂ aktiviert den Kalzifizierungsinhibitor MGP	72
7.3	Einfluss von Vitamin K ₂ Supplementation und Niereninsuffizienz auf die Genexpression relevanter Aktivatoren und Inhibitoren der extraossären Kalzifizierung.....	74
7.4	Schlussfolgerung	79
8	Verzeichnisse.....	81
8.1	Abbildungsverzeichnis.....	81
8.2	Tabellenverzeichnis.....	81
8.3	Literaturverzeichnis	82

9	Appendix	93
9.1	Versuchsprotokolle.....	93
8.1.1	Dehydratation und Paraffineinbettung der Gewebeprobe.....	93
8.1.2	Hämatoxylin-Eosin Färbung.....	93
8.1.3	Von-Kossa Färbung	94
8.1.4	Anti-cMGP/ -ucMGP Färbung.....	94
8.1.5	SM22 α Färbung.....	95
8.1.6	Elastiva van Giesson Färbung	96
8.1.7	Ki67/ DAPI-Immunofluoreszenz.....	96
8.1.8	RNA-Isolation und qRT-PCR.....	97
8.1.8.1	RNA-Isolation	97
8.1.8.2	RNA - Konzentration und Qualitätskontrolle	98
8.1.8.3	cDNA-Synthese.....	98
8.1.8.4	RT-PCR.....	99
10	Danksagung	102
11	Erklärung.....	103

4 Einleitung

4.1 Kardiovaskuläre Kalzifizierung - Einführung

Die meisten Menschen entwickeln im Laufe ihres Lebens progressive Kalziumablagerungen in den Gefäßwänden der großen Arterien. Allison et al. 2004 wiesen in einer Studie an 650 asymptomatischen Probanden mittels Computertomographie Kalziumablagerungen in den großen Gefäßbetten von über 80% der teilnehmenden Männer über 70 Jahre, sowie bei über 60% der Frauen der selben Altersgruppe nach (Allison et al., 2004). Die vaskuläre Kalzifizierung gilt als eigenständiger kardiovaskulärer Risikofaktor, der mit einer gesteigerten Morbidität und Mortalität einhergeht (Vliegenthart et al., 2005).

Kalziumablagerungen in der Aorta führen pathophysiologisch zu einer reduzierten Volumendehnbarkeit des Gefäßes, die Grundlage der als Windkesselfunktion beschriebener Fähigkeit großer Kapazitätsgefäße, durch elastische Rückstellkräfte den pulsatilen Auswurf des linken Ventrikels zu einem kontinuierlichen Blutstrom umzuwandeln (Demer, 1991). Die reduzierte Gefäßelastizität führt über einen Anstieg der Pulswellengeschwindigkeit zu einer verfrühten Pulswellenreflektion mit erhöhtem systolischen Blutdruck, bei gleichzeitig reduzierten diastolischen Blutdruckwerten, resultierend in einer gesteigerten Blutdruckamplitude mit erhöhter Pulsamplitude (London, 2003) (Abb. 1). Die erhöhte Pulsamplitude hat auf distinkte Wege negative Auswirkungen auf das kardiovaskuläre System. Hohe systolische Druckwerte in Aorta und linken Ventrikel führen zu gesteigerter Herzarbeit, erhöhtem Sauerstoffverbrauch und linksventrikulärer Hypertrophie (London, 2003, London et al., 2005). Gleichzeitig mündet der reduzierte diastolische Blutdruck in einer verminderten diastolischen Koronarperfusion. Tatsächlich sind hoher systolischer Blutdruck sowie gesteigerter Pulsdruck, niedriger diastolischer Blutdruck und linksventrikuläre Hypertrophie etablierte Risikofaktoren für kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität (Madhavan and Alderman, 1994, Witteman et al., 1994).

Kalziumablagerungen in den Koronararterien reduzieren die vasomotorische Reagibilität der Gefäße (Wang et al., 2006). Zudem beeinflussen Kalziumablagerungen abhängig von ihrer Größe und Verteilungsmuster die Stabilität von arteriosklerotischen Plaques und können das Risiko einer Plaqueruptur mit der Gefahr einer resultierenden akuten Ischämie erhöhen (Hoshino et al., 2009).

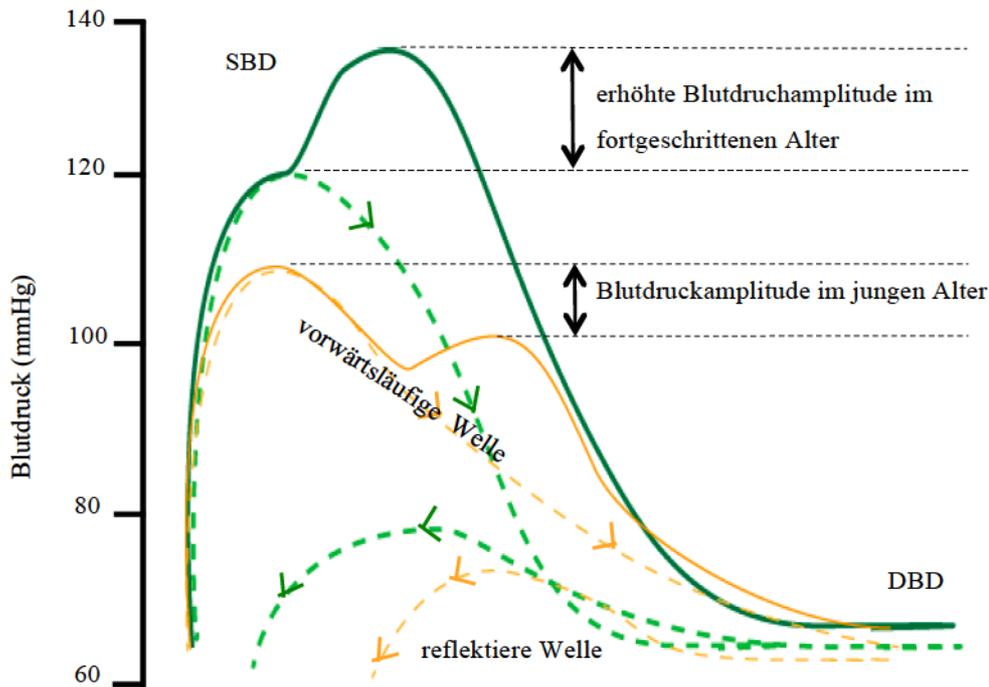


Abb. 1 Vergleich der Blutdruckkurven von Patienten jüngeren und fortgeschrittenen Alters

Darstellung der Blutdruckkurven für Patienten jüngeren (gelb hinterlegt) und fortgeschrittenen (grün hinterlegt) Alters. Die Blutdruckkurve setzt sich zusammen aus dem tatsächlichen Transport der Blutsäule plus einer zeitgleich generierten Pulswelle, welche sich mit deutlich erhöhter Geschwindigkeit in die Peripherie fortpflanzt, dort reflektiert wird und sich mit der initial erzeugten Welle addiert (schwarze Pfeile). Im höheren Alter ist die Pulswellengeschwindigkeit auf Grund des fortschreitenden Elastizitätsverlustes der Gefäßwände erhöht, die Pulswellengeschwindigkeit steigt, es kommt zu früheren Pulswellenreflexionen resultierend in einer systolischen Blutdrucksteigerung.

mmHg = Millimeter Quecksilbersäule; SBD = systolischer Blutdruck; DBD = diastolischer Blutdruck

Von besonderer klinischer Relevanz sind Kalziumablagerungen an den Herzklappen, die auch bei asymptomatischen Patienten mit einem erhöhten Risiko für kardiale Ereignisse sowie einer deutlich erhöhten Mortalität verbunden ist (Abb. 2) (Otto et al., 1997). Degenerative, kalzifizierende Veränderungen der Aortenklappe sind die häufigste Ursache der Aortenklappenstenose, des häufigsten Herzklappenfehlers in den Industrienationen (Thaden et al., 2014). Auch nach erfolgter Therapie mit einem biologischen Aortenklappenersatz stellt die Re-Kalzifizierung des Klappenersatzes die Hauptursache für ein Versagen des Klappenprothese dar (Wu et al., 2013).

Im nachfolgenden Abschnitt werden kurz die pathophysiologischen Grundlagen der extraossären Kalzifizierung erläutert.

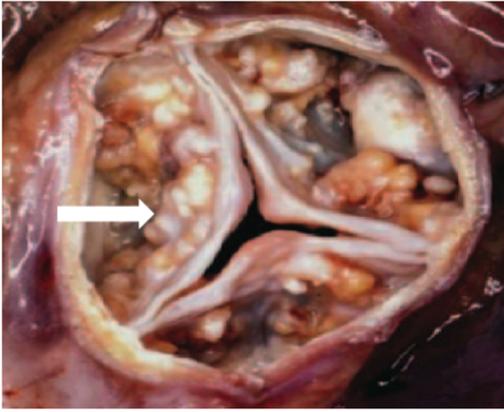


Abb. 2 Kalzifizierte Aortenklappe

Makroskopische Ansicht einer kalzifizierten Aortenklappe. Der weiße Pfeil deutet auf Kalzifizierungsnoduli.

Modifiziert aus (Demer and Tintut, 2008)

4.2 Kardiovaskuläre Kalzifizierung - Pathophysiologie

Extraossäre Kalzifizierung galt lange Zeit als passiver Vorgang der Präzipitation von Kalzium- und Phosphationen infolge eines übersättigten Löslichkeitsprodukts dieser Ionen im Serum (Ketteler et al., 2006). Studien aus den 90er Jahren, beispielsweise von Towler et al. 1998 revidierten diese Sichtweise im Sinne einer aktiven Regulation der kalzifizierenden Prozesse (Towler et al., 1998). Heute wird die vaskuläre Kalzifizierung als aktiv regulierter, zellvermittelter Prozess verstanden, der sich durch die Interaktion von Kalzifizierungsinduktoren und -Inhibitoren auszeichnet. Dabei konnten eine Vielzahl unterschiedlicher Mechanismen identifiziert werden, welche die Kalzifizierung der arteriellen Gefäßwände begünstigen. Demer et al. 2014 kategorisierten die häufigsten Ätiologien der vaskulären Kalzifizierung unter Vernachlässigung seltener Ursachen wie Pharmaka, Gifte und Tumorhyperkalzämie in drei Hauptkategorien: Inflammatorische Kalzifizierung der arteriellen Tunica intima, metabolisch bedingte Kalzifikation der arteriellen Tunica media sowie unterschiedlich geartete genetische Dispositionen. Die unterschiedlichen Ätiologien sind dabei keinesfalls isoliert als Ursache der vaskulären Kalzifizierung in einem Individuum zu betrachten, vielmehr ist von einer Überlappung unterschiedlicher Genesen auszugehen, sodass bei vielen Patienten Kalziumablagerungen sowohl in der arteriellen Tunica intima als auch der arteriellen Tunica media nachzuweisen sind (Demer and Tintut, 2014).

Als Ausgangspunkt der vaskulären Kalzifizierung gelten entsprechend den bekannten Mechanismen der desmalen Ossifikation membrangebundene Matrixvesikel, welche durch Freisetzung verschiedener Stoffe in Abwesenheit von Kalzifizierungsinhibitoren die

Nukleation von Kalziumphosphationen begünstigen (Anderson, 1984, Demer and Tintut, 2014).

Dabei beschleunigen Faktoren, die eine Apoptose der glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC = *vascular smooth muscle cell*) hervorrufen die vaskuläre Kalzifizierung. Im Rahmen der vaskulären Kalzifizierung produzieren VSMC eine Vielzahl mineralisations-regulierender Proteine, die den Kalzifizierungsprozess beeinflussen. Einige dieser Proteine sind Bestandteil der physiologischen Knochenentstehung, so dass einige Autoren von einer Transdifferenzierung der VSMC zu einem ostoblastären Phänotyp berichten (Shanahan et al., 2011, Toussaint and Kerr, 2007).

Intimakalzifizierung entsteht im Zusammenhang mit Arteriosklerose in Folge einer chronischer Entzündungsreaktion, hervorgerufen durch die Akkumulation oxidierter Lipide (Abedin et al., 2006, Demer and Tintut, 2008, Aikawa et al., 2007). New et al. zeigen in einer Studie, dass von inflammatorischen Zellen freigesetzte Matrixvesikel, beispielsweise Makrophagen, als Ausgangspunkt der Mineralisation gesehen werden können (New et al., 2013). Die erhöhte Mortalität der betroffenen Patienten resultiert aus der fortgeschrittenen Atherosklerose, die mit Ischämien aufgrund von Gefäßstenosen oder Gefäßverschlüssen einhergehen kann (London et al., 2005).

Mediakalzifizierung entsteht unabhängig von Lipidablagerungen und Inflammation in Form diffuser Kalziumkristallablagerungen entlang der elastischen Fasern der arteriellen Tunica media (London, Marchais et al. 2005; Chatrou et al., 2012). Die Kalzifizierung der arteriellen Tunica media ist typisch für chronisch nierenkranke Patienten, sowie bei Typ 2 Diabetikern (Reaven and Sacks, 2005, Okuno et al., 2007). Zudem lässt sich die Kalzifizierung der arteriellen Tunica Media als Begleiterscheinung des fortschreitenden Alterungsprozesses beobachten, wahrscheinlich als Konsequenz der mit zunehmendem Alter akkumulierenden Risikofaktoren (Insulinresistenz, Nierenfunktionseinschränkung, Atherosklerose) im Wechselspiel mit der genetischen Prädisposition (Demer and Tintut, 2008). Der kalzifikationsbedingte Elastizitätsverlust der arteriellen Gefäßwände ist mit einer gesteigerten kardiovaskulären Mortalität assoziiert (London et al., 2003).

Trotz der dargestellten Unterschiede hinsichtlich Ätiologie und Vorkommen der vaskulären Kalzifizierung von Tunica intima und Tunica media gelten die zu Grunde liegenden Pathomechanismen für beide Formen der Gefäß- sowie bei der valvulären Kalzifizierung (Wu et al., 2013). Auch in der klinischen Routine ist eine klare Differenzierung zwischen Intimakalzifizierung und Mediakalzifizierung schwierig, da nur histologisch valide zwischen beiden Formen unterschieden werden kann. Generell stehen

zur Detektion von vaskulärer sowie valvulärer Kalzifizierung verschiedene Techniken zur Verfügung (Floege et al., 2004) (Tabelle 1).

Tabelle 1 Untersuchungstechniken zur Detektion von vaskulärer - sowie valvulärer Kalzifizierung

Vaskuläre sowie valvuläre Kalzifizierung werden mit Hilfe verschiedener Untersuchungstechniken detektiert, welche sich hinsichtlich Nachweisstärke, der Möglichkeit zur Quantifizierung der Kalklast, sowie der Möglichkeit zur Differenzierung von Tunica intima und Tunica media Kalzifizierung unterscheiden.

+++ = sehr gut geeignet; ++ = gut geeignet; + = ausreichend geeignet; (+) = fraglich geeignet, - = nicht geeignet. Modifiziert aus (Floege et al., 2004)

	Vaskuläre Kalzifizierung	Differenz- ierung Intima - Media Kalzifi- zierung	Valvuläre Kalzifizierung	Quantifi- zierung
Histologie	+++	+++	+++	+
Intravaskulärer Ultraschall	+++	++	-	+++
Atomabsorptionsspektrometrie	+++	-	+++	+++
Konventionelles Röntgen	++	(+)	(+)	(+)
Ultraschall/ Echokardiographie	+	(+)	++	(+)
Elektronenstrahl CT/ Multisection-Spiral CT	++	-	++	++

In der vorliegenden Studie untersuchten wir den Einfluss einer Vitamin K₂ (VK₂) Supplementation auf die Entstehung von kardiovaskulärer Kalzifizierung in einem tierexperimentellen Kalzifizierungsmodell der Niereninsuffizienz. Wie oben dargestellt ermöglicht die Niereninsuffizienz, prototypische Kalzifizierungsvorgänge des Alterns und anderer Erkrankungen im Zeitraffer zu untersuchen.

Im folgenden Abschnitt werden zunächst die Grundlagen der chronischen Niereninsuffizienz (CKD = *chronic kidney disease*) sowie der engen, wechselseitigen Beziehung von kardialen und renalen Erkrankungen thematisiert. Im anschließenden Abschnitt werden die Pathomechanismen der CKD-induzierten Kalzifizierung des kardiovaskulären Systems näher beleuchtet.

4.3 Chronische Niereninsuffizienz als Modell der kardiovaskulären Kalzifizierung

4.3.1 Epidemiologie und Pathophysiologie der chronischen Niereninsuffizienz

Die amerikanische Nierenstiftung (*National Kidney Foundation*) definiert CKD als persistierenden Nierenschaden über einen Zeitraum von mindestens drei Monaten infolge struktureller und/ oder funktioneller renaler Schädigungen. Allgemeiner wird jeder mindestens dreimonatige Abfall der glomerulären Filtrationsrate (GFR) unter 60 ml/min/1,73m² -unabhängig von der Diagnose einer Nierenschädigung- ebenfalls als CKD bezeichnet. Entsprechend der GFR wird der Schweregrad der CKD in 5 Stadien eingeteilt (Tabelle 2) (2002).

Tabelle 2 Stadieneinteilung der chronischen Niereninsuffizienz (*National Kidney Foundation KDOQI - Kidney Disease Outcome Quality Initiative - Leitlinien*) (2002)

Die National Kidney Foundation klassifiziert die CKD anhand der GFR in 5 Stadien

Stadium	Beschreibung	GFR (ml/min/1,73m ²)
0	Erhöhtes Risiko für Niereninsuffizienz	≥90
1	Nierenschaden mit normaler GFR	≥90
2	Nierenschaden mit milder GFR-Einschränkung	60-89
3	Moderate GFR- Einschränkung	30-59
4	Schwere GFR- Einschränkung	15-29
5	Nierenversagen	<15 (oder Dialyse)

GFR = glomeruläre Filtrationsrate; ml = Milliliter; min = Minute; m² = Quadratmeter

Bereits ab einer Nierenfunktionseinschränkung im Stadium CKD 3 können deutlich erhöhte kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität detektiert werden, die sich mit weiterem Verlust der Niereinfunktion aggravieren (Go et al., 2004). Tatsächlich haben Dialysepatienten im Alter von 35 Jahren eine Lebenserwartung im Bereich eines 80 jährigen Nierengesunden (1997). In Deutschland litten im Jahr 2002 etwa 57000 Patienten an einer terminalen Niereninsuffizienz, jährlich kommen 11000 Patienten dazu (Meguid El Nahas and Bello, 2005, 2002). Ursächlich für die Ausbreitung der CKD gelten die demographische Entwicklung sowie die Zunahme der CKD-prädisponierenden Erkrankungen, insbesondere des Diabetes mellitus (Khwaja et al., 2007).

Ungeachtet der zu Grunde liegenden Ätiologie mündet ein Nephronverlust jenseits einer kritischen Grenze in einer unumkehrbaren Progression der Erkrankung zum terminalen Nierenversagen (Taal and Brenner, 2006). Verantwortlich für diese Progression ist das Zusammenwirken verschiedener kompensatorischer Mechanismen in den verbliebenen gesunden Nephronen. Wichtige Risikofaktoren, die das Auftreten einer CKD begünstigen, sind hohes Alter, Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie und Proteinurie.

Kardiovaskuläre Erkrankungen und CKD weisen eine hohe Koinzidenz auf und beschleunigen den jeweils gegenseitigen Krankheitsprogress, ein Umstand, der den Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit bildet und Gegenstand des folgenden Abschnittes ist (Sarnak and Levey, 2000, Levin et al., 2001, McClellan et al., 2004).

4.3.2 Kardiovaskuläre Erkrankungen bei CKD

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind die führende Todesursache bei Patienten mit CKD, unabhängig vom Grad der Nierenschädigung (2002). Verglichen mit der Normalbevölkerung haben Dialysepatienten ein zehn- bis dreißigfach erhöhtes Risiko an einer kardiovaskulären Erkrankung zu versterben (Sarnak et al., 2003). Ein Grund des hohen kardiovaskulären Risikos von CKD-Patienten sind die Überschneidungen der für beide Erkrankungen prädisponierenden Risikoprofile: So sind Adipositas, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Dyslipidämie und Rauchen anerkannte Risikofaktoren für beide Erkrankungen (Taal and Brenner, 2006). Zusätzlich zu diesen Risikofaktoren sind CKD-Patienten anderen kardiovaskulären Risikofaktoren ausgesetzt, die in der Pathogenese des chronischen Nierenleidens begründet sind. Deshalb gilt die CKD heute als eigenständiger Risikofaktor für die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen (McCullough et al., 2011, McCullough et al., 2007). Auch beim Auftreten akuter kardiovaskulärer Ereignisse wie beispielsweise dem Herzinfarkt stellen Patienten mit Niereninsuffizienz eine Hoch-Risiko-Gruppe dar, für die besondere Behandlungspfade existieren (Hamm et al., 2011). Tatsächlich verdoppeln sich bei Patienten mit einer GFR unter 60 mL/min per 1,73 m² die Risiken für Koronare Herzkrankheit (KHK), die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK), für Schlaganfälle, Vorhofflimmern und Herzinsuffizienz (Gansevoort et al., 2013).

Ein besonderes Kennzeichen der kardiovaskulären Erkrankungen bei Niereninsuffizienz ist die gesteigerte Neigung zur Bildung von Kalziumablagerungen in den Gefäßwänden. Tatsächlich findet man bei Patienten mit Niereninsuffizienz exzessiv gesteigerte Kalzifizierungen in sämtlichen Kompartimenten des kardiovaskulären Systems (Blutgefäße,

Myokard, Herzklappen) verglichen mit Nierengesunden (Giachelli, 2009). Dabei korreliert das Ausmaß der Kalzifizierung mit der kardiovaskulären Mortalität und der Gesamtmortalität der Patienten (Blacher et al., 2001).

Im folgenden Abschnitt wird die Pathophysiologie der kardiovaskulären Kalzifizierung näher erläutert.

4.3.3 Pathophysiologie der kardiovaskulären Kalzifizierung im Modell der CKD

4.3.3.1 Physikochemische Kalzifizierung

Das Kalzium-Phosphat-Produkt im Serum

Erhöhte Serumphosphatspiegel sowie ein erhöhtes Serum-Kalzium-Phosphat-Produkt korrelieren mit der Entstehung einer Kalzifizierung der arteriellen Gefäßwände und repräsentieren unabhängige Risikofaktoren für die kardiovaskuläre- und die Gesamtmortalität terminal niereninsuffizienter Patienten (Young et al., 2005, Goodman et al., 2000). CKD-Patienten zeigen infolge der eingeschränkten tubulären Phosphatexkretion, aber auch infolge einer Freisetzung aus dem Knochen bzw. durch Aufnahme mit der Nahrung, eine gestörte systemische Kalzium- und Phosphathomöostase. Verstärkt werden diese Vorgänge durch Änderungen des Vitamin-D/Parathormon Knochenstoffwechsel im Rahmen der fortschreitenden Niereninsuffizienz. Die in der Niere stattfindende 1- α -Hydroxylase-abhängige Hydroxylierung von 25-Hydroxyvitamin-D zu 1,25-Dihydroxyvitamin-D (Calcitriol) ist bei zunehmender Niereninsuffizienz eingeschränkt (Toussaint and Kerr, 2007). Calcitriol steigert die Serumkonzentration des Kalziums sowohl durch die gesteigerte Kalziumresorption aus Darm und Knochen, als auch durch die reduzierte renale Kalzium-Ausscheidung (Shanahan et al., 2011). Die aus dem Calcitriolmangel resultierende Hypokalzämie ist gemeinsam mit steigenden Phosphatspiegeln ein starker Stimulus für die Ausschüttung von Parathormon (PTH) aus der Glandula Parathyroidea. Kalzium-Phosphat wird aus Knochengewebe freigesetzt. Die mit zunehmender Niereninsuffizienz zunehmende Phosphatretention führt zu einer weiteren Steigerung der PTH-Sekretion. Es entsteht ein sekundärer Hyperparathyreoidismus mit erhöhtem Knochenumsatz (Shanahan et al., 2011, Toussaint and Kerr, 2007). Ein erhöhtes Kalzium-Phosphat-Produkt wirkt auf multiplen Ebenen prokalzifizierend (Ketteler et al., 2006).

Die phosphatinduzierte vaskuläre Kalzifizierung

Hohe Phosphatspiegel tragen über verschiedene Mechanismen zur Entstehung von Kalziumablagerungen in der arteriellen Tunica media bei (Abb. 3). Wichtig in diesem Zusammenhang ist die Hyperphosphatämie-induzierte Differenzierung von VSMC zu einem osteochondrogenetischen Phänotyp (Kendrick and Chonchol, 2011). Werden humane VSMC *in-vitro* hohen Phosphatkonzentrationen ausgesetzt, resultiert eine gesteigerte Expression von Genen aus dem physiologischen Knochenstoffwechsel, wie der Alkalischen Phosphatase und Osteopontin. Im Gegenzug ist eine Reduktion der Expressionslevel typischer VSMC Gene zu beobachten, insbesondere des $SM\alpha$ -actin und $SM22\alpha$ (Sui et al., 2013, Steitz et al., 2001, Chen et al., 2002). Phosphatinduzierte phänotypische Differenzierung und Kalzifizierung sind abhängig von der Aktivität des Typ III Natrium-abhängigen Phosphat-Kotransporters (PiT-1), der in VSMC nachgewiesen wurde (Lau et al., 2010). Jono et al. zeigten in einer *in-vitro* Studie an humanen VSMC, dass eine kompetitive Hemmung des natriumabhängigen Phosphat-Kotransporters die phosphatinduzierte phänotypische Differenzierung der Zellen inhibieren kann (Jono et al., 2000a).

Ein weiterer Mechanismus der phosphatinduzierten vaskulären Kalzifizierung ist die Hyperphosphatämie-bedingte Apoptose von VSMC. Kultivierte humane VSMC zeigten bei Exposition gegenüber hohen Phosphatkonzentrationen eine dosisabhängig gesteigerte Kalzifizierung und Apoptoserate (Son et al., 2006). Abgeschnürte Apoptosekörperchen können Mineralstoffe binden und fördern die Entstehung der vaskulären Kalzifizierung. Apoptoseinduzierende Faktoren beschleunigen zudem das Fortschreiten der vaskulären Kalzifizierung, indem sie die Anzahl kalzifikationsinhibierender Zellen verringern (Proudfoot et al., 2000, Shanahan et al., 2011).

In Knochengewebe besteht ein Gleichgewicht zwischen der Ablagerung von Mineralien durch Osteoblasten und der Resorption dieser kalzifizierten Matrix durch Osteoklasten, ein Remodelling oder im Knochenmetabolismus „*Coupling*“ genannt. Ein ähnliches Gleichgewicht für Mineralablagerung und Resorption wird von manchen Autoren auch für Gefäßwände beschrieben. Störungen dieses Gleichgewichts könnten zur vaskulären Kalzifizierung führen (Massy et al., 2008). Kalzifizierte Gefäßwände enthalten neben den beschriebenen osteoblasten-ähnlichen Zellen auch Monozyten und Makrophagen, die in der Lage sind, zu einem osteoklasten-ähnlichen Phänotyp zu differenzieren (Doherty et al., 2002). Erhöhte Phosphatkonzentrationen inhibieren *in-vitro* die Differenzierung von Monozyten und Makrophagen zu osteoklasten-ähnlichen Zellen durch Inhibitor eines

RANKL (receptor activator of nuclear factor- κ B-Ligand) induzierten Signalweges (Mozar et al., 2008). Erhöhte Phosphatkonzentrationen könnten daher über eine reduzierte Osteoklastenaktivität und -differenzierung die vaskuläre Kalzifizierung beschleunigen (Kendrick and Chonchol, 2011).

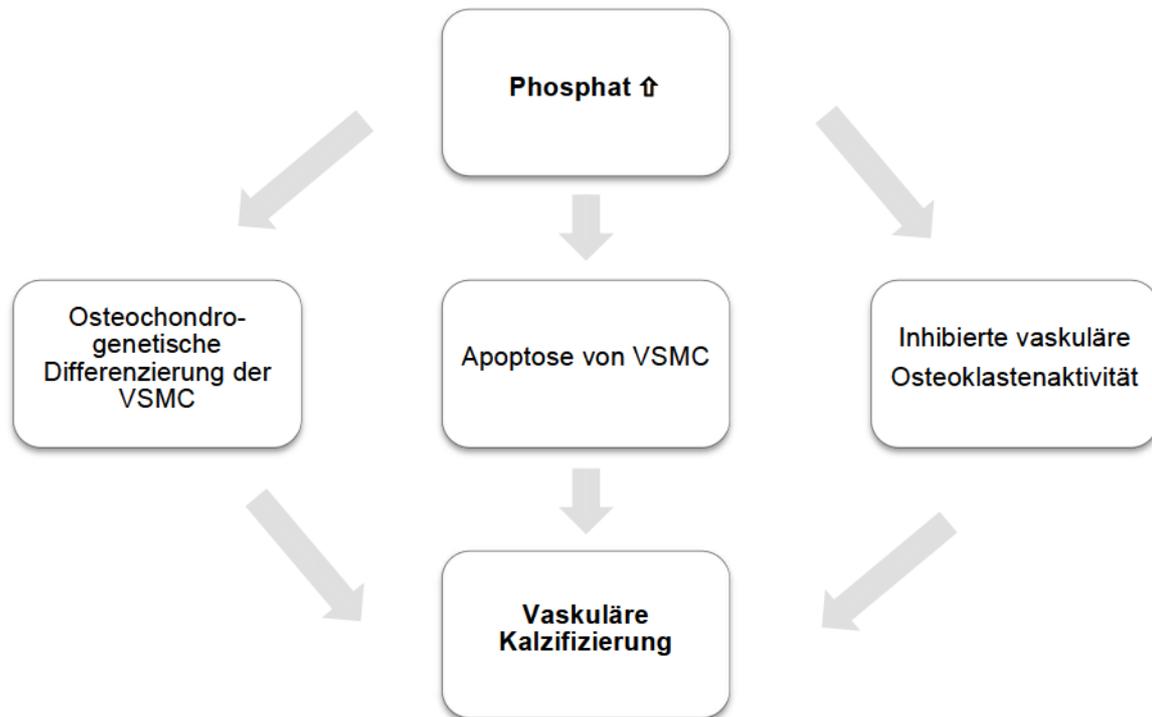


Abb. 3 Mechanismen der phosphatinduzierten vaskulären Kalzifizierung

Erhöhte Phosphatkonzentrationen führen über osteochondrogenetische Differenzierung der VSMC, Apoptose von VSMC und über eine inhibierte vaskuläre Osteoklastenaktivität zu gesteigerter vaskulärer Kalzifizierung. VSMC = *vascular smooth muscle cells* = glatte Gefäßmuskelzellen
modifiziert aus (Kendrick and Chonchol, 2011)

4.3.3.2 Biologische Kalzifizierung

Aktivatoren der kardiovaskulären Kalzifizierung

BMP-2

BMP-2 (*bone morphogenic protein-2*) ist ein wichtiges regulatorisches Molekül der Osteoblastendifferenzierung und Mineralisation im Knochenstoffwechsel und spielt eine bedeutende Rolle bei der Entstehung der vaskulären Kalzifizierung (Li et al., 2008). Bostrom et al. konnten bereits 1993 eine Expression von BMP-2 auf Genebene in humanen atherosklerotischen Plaques nachweisen (Bostrom et al., 1993), während im Rahmen von *in-vitro* Studien durch Inkubation vaskulärer Zellen mit BMP-2 eine verstärkte Tendenz zur Verkalkung und osteogenetische Transdifferenzierung zu beobachten war (Zebboudj et al., 2003). Li et al. konnten 2008 zeigen, dass BMP-2 nur unter erhöhten

Phosphatkonzentrationen einen prokalzifizierenden Effekt aufzuweisen scheint. Zu erklären ist dieses Phänomen über eine BMP-2-assoziierte Steigerung der zellulären Phosphataufnahme mit Induktion des Typ III Natrium-abhängigen Phosphattransporter PiT-1. Hieraus resultiert eine osteochondrogenetische Transdifferenzierung der VSMC mit einer gesteigerter Expression des für die Osteoblastendifferenzierung und Knochenentwicklung wichtigen Transkriptionsfaktors *runt related transcription factor 2* (RunX2), sowie einer sinkenden Expression für SM22 α (Li et al., 2008).

Inhibitoren der kardiovaskulären Kalzifizierung

Matrix Gla Protein (MGP)

Das Matrix Gla Protein (Gla = Carboxyglutaminsäure) ist ein hochpotenter Inhibitor der vaskulären Kalzifizierung. Seine wichtigste Funktion ist die lokale Kalzifikationsinhibierung am Ort seiner Synthese, der arteriellen Tunica Media (Schurgers et al., 2008b). Luo et al. 1997 zeigten, dass die gezielte Deletion des MGP-Gens in Mäusen zu einer massiven Kalzifizierung der arteriellen Tunica Media führt. Alle betroffenen Tiere verstarben innerhalb von sechs bis acht Wochen nach der Geburt durch die Ruptur der kalzifizierten Gefäße (Luo et al., 1997). Schädigungen des MGP-Gens mit resultierend pathologischer Kalzifizierungsneigung kommen auch bei Menschen vor: Das Keutel-Syndrom ist eine äußerst seltene autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung, die aufgrund von Genmutationen im MGP-Gen mit der Produktion funktionsunfähigen MGP einhergeht (Meier et al., 2001, Munroe et al., 1999). Betroffene Patienten leiden an diffusen Knorpelkalzifizierungen, peripheren Pulmonalarterienstenosen und tracheobronchialen Einengungen (Hur et al., 2005, Meier et al., 2001).

Price et al. beschrieben 1983 zum ersten mal das Matrix Gla Protein als ein aus Rinderknochengewebe isoliertes Protein (Price et al., 1983). In der folgenden Zeit wurde eine entsprechende endogene MGP-Synthese auch für Knorpel-, Lungen-, Herz-, Nierengewebe, Arterien und kalzifizierte atherosklerotische Plaques nachgewiesen (Price et al., 1983, Shanahan et al., 1994, Fraser and Price, 1988). MGP ist ein ca. 14 kDa (Kilodalton) kleines, sekretorisches Protein und besteht aus 84 Aminosäuren, die auf Chromosom 12 codiert werden. (p13.1-p12.3). Es ist 3,9kb (Kilobasen) lang und besteht aus vier Exons und drei Introns (Schurgers et al., 2008a).

Es werden zwei unterschiedliche Wege der posttranslationalen MGP-Modifikation unterschieden: Die Vitamin K-abhängige Gamma-Glutamat-Karboxylierung an fünf von neun Glutamatresten des Proteins durch das Enzym Gamma-Glutamat-Karboxylase

(GGCX) (Berkner and Runge, 2004), sowie die Phosphorylation von drei der fünf vorhandenen Serinreste durch das Enzym Golgi-Casein-Kinase (Wajih et al., 2004). Folglich werden karboxyliertes (Gla; c), unkarboxyliertes (Glu; uc), sowie phosphoryliertes (p) und dephosphoryliertes (dp) MGP unterschieden. Die Auswirkungen der Phosphorylierung des MGP sind bisher nicht vollständig verstanden. Zusammenhänge zwischen Phosphorylierungsgrad und der Sekretion des Proteins in den Extrazellularraum werden vermutet (Wajih et al., 2004).

Murshed et al. 2004 beobachteten, dass nur das Vitamin K (VK)-abhängig karboxylierte MGP in der Lage ist, vaskuläre Kalzifizierung zu inhibieren (Murshed et al., 2004). Es konnte gezeigt werden, dass eine verminderte MGP-Karboxylierung in menschlichen Arterien mit Verkalkungen der Intima und Media assoziiert ist (Schurgers et al., 2005). Karboxyliertes MGP bindet wachsende Hydroxyapatit-Kristalle und verhindert hierdurch ihre weitere Wachstumsprogression (O'Young et al., 2011, Price et al., 1998). Darüber hinaus soll cMGP durch Blockierung von BMP-2 die bei vaskulärer Kalzifizierung auftretende Differenzierung von VSMC zu osteoblastenähnlichen Zellen verhindern (London et al., 2005, Schurgers et al., 2008a, Bostrom et al., 2001), während unkarboxyliertes MGP BMP-2 nicht zu binden vermag (Wallin et al., 2000). Vitronectin, ein Protein der arteriellen extrazellulären Matrix, kann ebenfalls Bindungen mit MGP eingehen, vermutlich resultierend in einer kalzifikationsinhibierenden Wirkung auf die unmittelbare Umgebung (Schurgers et al., 2008a). Zellkulturstudien zeigten, dass humane VSMC unter physiologischen Bedingungen MGP-enthaltende Matrixvesikel abschnüren, die eine spontane Ablagerung von Kalzium und Phosphat inhibieren können (Reynolds et al., 2004).

Bezüglich der MGP-Proteinsynthese in kalzifizierten Geweben lassen sich in der Literatur unterschiedliche Beobachtungen feststellen. Viele Untersuchungen zeigen eine deutlich aktivierte MGP-Proteinsynthese in kalzifizierten Geweben im Vergleich zu gesundem Gewebe, einhergehend mit nachweisbar gesteigerten MGP-Proteinkonzentrationen. Der Anstieg der MGP-Synthese wird dabei als Kompensationsmechanismus auf einen gesteigerten Bedarf an kalzifizierungsinhibierenden Mechanismen verstanden. Beim nachgewiesenen MGP handelt es sich in erster Linie um inaktives, unkarboxyliertes MGP (Schurgers et al., 2008a, Dhore et al., 2001, Schurgers et al., 2005, Shanahan et al., 1994). Da eine gesteigerte ucMGP-Konzentration im kalzifizierten Areal durch Vitamin K-abhängige Karboxylierung ein stark kalzifikationsinhibierendes Potential entfalten könnten, drängt sich die Frage nach einer kalzifizierungsinhibierenden Therapie durch

Vitamin K-Supplementation auf. Andere Arbeitsgruppen wiesen hingegen eine geringere MGP-Genexpression für kalzifizierte Gewebe nach (Tyson et al., 2003, Mori et al., 1998). Bei nachgewiesener, kalzifizierungsinhibierender Funktion des MGP (s.o.) stellt sich die Frage nach Aktivierungsmechanismen der MGP-Proteinsynthese im Rahmen der vaskulären Kalzifizierung.

MGP lässt sich zwar im Plasma nachweisen, trotzdem vermögen artifiziell therapeutische Erhöhungen der systemischen Plasma-MGP-Konzentrationen nicht die Gefäßverkalkung zu unterdrücken (Murshed et al., 2004). Anders als der systemisch wirkende Kalzifikationsinhibitor Fetuin-A wirkt MGP nur lokal am Ort seiner Synthese direkt innerhalb der Gefäßwand. Murshed et al. 2004 konnten diese These belegen, indem sie in einem murinen MGP-Gen-Knockout Modell die Synthese des MGP-Gens einerseits in der Leber, resultierend in hohen MGP-Plasmaspiegeln, andererseits in den VSMC neu induzierten. Die durch das MGP-Gen-Knockout Modell hervorgerufene vaskuläre Kalzifizierung der Tiere konnte durch die Neuinduktion der lokalen MGP-Synthese in den VSMC, nicht jedoch durch gesteigerte MGP-Plasmalevel reduziert werden.

Neuere Studien zeigen jedoch einen diagnostischen Wert für zirkulierende MGP Spezies. So korrelieren niedrige dp-cMGP-Plasma-Level bei Dialysepatienten mit einem gesteigerten Mortalitätsrisiko (Schlieper et al., 2011, Chatrou et al., 2012). Hohe dp-ucMGP-Level korrelieren im Zusammenhang mit chronischer Herzinsuffizienz, Aortenklappenstenosen und chronischer Niereninsuffizienz mit der Krankheitsprogression und sind somit ein Marker für einen ungünstigen Krankheitsverlauf (Schurgers et al., 2010, Ueland et al., 2010, Ueland et al., 2011). Darüber hinaus spiegeln dp-ucMGP-Plasmakonzentrationen die Vitamin K-Verfügbarkeit im Organismus und der arteriellen Gefäßwand wieder, wobei ein Vitamin K-Defizit mit gesteigerten dp-ucMGP Werten einhergeht. Dp-ucMGP Werte können dabei durch Vitamin K Supplementation applikationsdauer- und dosisabhängig reduziert werden. (Cranenburg et al., 2010a, Westenfeld et al., 2012, Shea et al., 2011).

Periostin

Aus dem Knochenmark abgeleitete mesenchymale Stammzellen sezernieren Periostin, ein weiteres Vitamin-K-abhängig gamma-karboxyliertes Protein. Periostin kann als Sekretionsfaktor der extrazellulären Matrix im Rahmen von Gewebe-Remodelling ubiquitär exprimiert werden. Es scheint bei einer Vielzahl von Erkrankungen mit erhöhtem Zellumsatz der extrazellulären Matrix und Fibrosierung einschließlich

Herzklappendegeneration/-stenose, KHK, Niereninsuffizienz und Tumorleiden involviert zu sein (Hakuno et al., 2010, Hixson et al., 2011, Sen et al., 2011b, Kudo et al., 2006): Es konnte mehrfach in Tiermodellen sowie humanen Studien gezeigt werden, dass Periostin im Zuge einer linksventrikulären Hypertrophie induziert wird und somit ein Vermittler myokardialen Remodellings sein könnte (Oka et al., 2007, Stansfield et al., 2009, Pohjolainen et al., 2012). Die Bedeutung des Periostin im Zusammenhang mit vaskulärer Kalzifizierung ist bislang unklar.

Fetuin-A

Fetuin-A (α 2-Schmid Heremans Glykoprotein) ist ein von Hepatozyten gebildetes Serumprotein und gilt als wichtiger zirkulierender, systemischer Inhibitor der vaskulären Kalzifizierung (Ketteler et al., 2003b). Dialysepatienten zeigen im Vergleich zum gesunden Patientenkollektiv reduzierte Fetuin-A Serumspiegel, wobei eine Abnahme der Fetuin-A Serumlevel mit einer erhöhten kardiovaskulären- und Gesamtmortalität assoziiert ist (Ketteler et al., 2003a). Fetuin-A ist ein negativ-akute-Phase Protein, dessen Serumspiegel im Rahmen einer akuten Entzündung sinken (Lebreton, Joisel et al. 1979). Da die Pathophysiologie der CKD eng mit dem Auftreten akuter und chronischer Entzündungen verbunden ist, kann die Entstehung vaskulärer Kalzifizierung im Rahmen der CKD zumindest teilweise über inflammationsbedingt absinkende Fetuin-A Serumspiegel erklärt werden. Der Extrazellularraum weist ein Potential zur Inhibierung spontaner Hydroxyapatitablagerungen auf. Diese ablagerungsinhibierende Funktion wird zu einem großen Teil Fetuin-A zugesprochen (Ketteler et al., 2006, Heiss et al., 2003b). Fetuin-A Moleküle bilden mit Kalzium- und Phosphationen sogenannte Kalziproteinpartikel und verhindern somit die Präzipitation dieser Ionen im Gewebe (Heiss et al., 2003a). Auch die phänotypische Differenzierung von VSMC zu osteoblastenähnlichen Zellen wird durch Fetuin-A teilweise inhibiert. Transdifferenzierende Zellen nehmen Fetuin-A auf. Die für die Pathogenese der Kalzifizierung wichtige Bildung und Kalzifizierung von Matrixvesikeln wird inhibiert. Westenfeld et al. wiesen 2009 an Fetuin-A/ Apolipoprotein E (ApoE)-defizienten Mäusen den kalzifizierungsinhibierenden Effekt von Fetuin-A für Weichteilgewebe und Gefäßwände nach (Westenfeld et al., 2009).

Osteopontin (OPN)

Osteopontin ist ein saures, phosphoryliertes Glykoprotein mit bekannter regulatorischer Bedeutung für die Knochenmineralisation. Speer et al. zeigten 2002 in einem murinen *in-vivo* Modell die induzierbare kalzifizierungsinhibierende Funktion des Proteins. MGP- und OPN-defiziente Mäuse entwickelten eine deutlich ausgeprägtere Kalzifizierung als rein MGP-defiziente Mäuse (Speer et al., 2002). Phosphoryliertes OPN inhibiert die vaskuläre Kalzifizierung durch verschiedene Pathomechanismen (Jono et al., 2000b, Scatena et al., 2007): Es bindet Hydroxyapatitkristalle und verhindert somit ihr weiteres Wachstum (Steitz et al., 2002, Hunter et al., 1994). Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass OPN durch Veränderungen des pH-Wertes, eine gesteigerte Makrophagenrekrutierung und Phagozytose zur aktiven Auflösung bereits formierter Kalziumphosphatablagerungen führt (Steitz et al., 2002).

4.3.4 Murine Modelle der CKD zur Induktion von kardiovaskulärer Kalzifizierung

Ziel der vorliegenden Studie ist die Evaluation des Einflusses der Vitamin K₂ Supplementation auf die Entstehung von kardiovaskulärer Kalzifizierung *in vivo*. In Anbetracht der hohen Prävalenz der kardiovaskulären Kalzifizierung bei chronisch nierenkranken Patienten, entschieden wir uns, entsprechende Untersuchungen in einem murinen Modell der chronischen Niereninsuffizienz zur Generierung von extraossären Kalziumablagerungen durchzuführen. Hierfür stehen verschiedene experimentelle Ansätze zur Verfügung. Das Modell der 5/6-Nephrektomie ist dabei die gängigste Methode zur Induktion einer chronischen Niereninsuffizienz im murinen Modell (Perez-Ruiz et al., 2006). Nach unilateraler Nephrektomie werden die beiden Pole der verbliebenen Niere durch chirurgische Resektion (Shimamura and Morrison, 1975), oder durch gezielte Ligation der versorgenden Arterien (Purkerson et al., 1976) ausgeschaltet. Beide Operationstechniken weisen charakteristische Vor- und Nachteile auf. Bei der chirurgischen Entfernung der Nierenpole kann die Größe des ausgeschalteten Areals exakt gewählt werden, resultierend in einer homogenen Funktionseinschränkung (Perez-Ruiz et al., 2006). Da die Niere ein stark durchblutetes Organ ist, ist eine Resektion von Nierenparenchym jedoch mit einem hohen Blutungs- und Mortalitätsrisiko verbunden (Boudet et al., 1978). Im Vergleich ist die Ligation der nierenpolversorgenden Arterien risikoärmer. Durch die hohe interindividuelle Variabilität der versorgenden Arterien liefert diese Technik jedoch inhomogene Ergebnisse bezüglich des zu erwartenden ischämischen

Areals (Liu et al., 2003). Aufgrund genannter Limitationen der gängigen Methoden der 5/6-Nephrektomie, entschieden wir uns in der vorliegenden Studie für eine Operationsmethode nach Perez-Ruiz et al. 2006 (Perez-Ruiz et al., 2006). Bei dieser Operationstechnik werden die Pole der verbleibenden Niere durch Ligation funktionsunfähig gemacht. Diese Methode vereint die Ergebnishomogenität der chirurgischen Resektion mit dem geringeren Mortalitätsrisiko der Ligaturtechnik.

El-Abbadi et al. 2009 zeigten in einem murinen Modell der chronischen Niereninsuffizienz eine deutliche Zunahme der vaskulären Kalzifizierung durch alimentäre Supplementation hoher Phosphatkonzentrationen (El-Abbadi et al., 2009). Auf Grundlage dieser Beobachtungen verwandten wir additiv zur chirurgischen 5/6-Nephrektomie eine Phosphat-Supplementation in den CKD-Gruppen.

4.4 Innovative Therapiestrategien - Kalzifizierungshemmung durch Vitamin K Supplementation

Vaskuläre Kalzifizierung tritt insbesondere im fortgeschrittenen Alter auf und ist verbunden mit einer erheblich gesteigerten kardiovaskulären Morbidität und Mortalität (Allison et al., 2004). Bisher existiert keine spezifische Therapie zur Bekämpfung einer entstehenden oder bereits ausgebildeten kardiovaskulären Kalzifizierung (Wu et al., 2013). Ziel der vorliegenden Studie war die Evaluation der alimentären Vitamin K Supplementation als innovative Therapiestrategie zur Inhibierung der Entstehung von extraossären Kalkablagerungen in einer zu kardiovaskulärer Kalzifizierung prädisponierender Stoffwechsellage.

4.4.1 Vitamin K Mangelzustände und vaskuläre Kalzifizierung

Nur Vitamin-K-abhängig karboxyliertes MGP (cMGP) wirkt kalzifizierungsinhibierend (Murshed et al., 2004). Vitamin-K-Mangelzustände sind aufgrund des breiten Einsatzes von Vitamin-K-Antagonisten zur oralen Antikoagulation ein häufiges Phänomen. Price et al. 1998 zeigten in einem murinen Modell, dass die Supplementation hoher Dosen des Vitamin-K-Antagonisten Warfarin mit einer aggravierten vaskulären und valvulären Kalzifizierung einhergeht (Price et al., 1998). Auch bei Patienten mit langjähriger Therapie mit Vitamin K Antagonisten wurde, verglichen mit einem Kontrollkollektiv, eine verstärkte vaskuläre Kalzifizierung, sowie ein progredienter Abfall der GFR beobachtet (Rennenberg et al., 2010, Bohm et al., 2015). Die vaskuläre Kalzifizierung ist bei Patienten mit fortgeschrittener CKD- und bei Hämodialysepatienten besonders häufig (s.o.). In

diesen Patientengruppen konnte ebenfalls ein persistierender Vitamin-K Mangel, sowie erhöhte Plasmaspiegel des biologisch inaktiven ucMGP festgestellt werden (Holden et al., 2010, Pilkey et al., 2007b, Schurgers et al., 2010). Die geringere Aufnahme von Vitamin K durch die Nahrung könnte eine Erklärung für reduzierte Vitamin K-Level bei CKD Patienten sein (Kopple et al., 2000). Westenfeld et al. wiesen in einer 2012 publizierten Studie ein funktionelles Vitamin-K₂ Defizit bei Hämodialysepatienten nach. Darüber hinaus konnten sie zeigen, dass eine tägliche Supplementation von Vitamin K₂ die Plasmaspiegel von ucMGP zu senken vermag (Westenfeld et al., 2012). Ausgehend von diesen Beobachtungen erscheint die Supplementation von Vitamin-K zur Prophylaxe einer drohenden Kalzifizierung und Regression bereits bestehender vaskuläre Kalzifizierung eine sinnvolle Therapieoption.

Im Rahmen der aktuell durchgeführten, prospektiven VitaVasK-Studie wird der Einfluss einer Vitamin K₁ Supplementation (1080µg/d) auf die Progression der vaskulären und valvulären Kalzifizierung bei Hämodialysepatienten mit vorbestehender vaskuläre Kalzifizierung untersucht. Von besonderem Interesse, bisher jedoch nicht untersucht, sind die Auswirkungen einer prophylaktischen Vitamin K₂-Supplementation in einem zu kardiovaskulärer Kalzifizierung neigenden Stoffwechselsituation. Diese Fragestellung ist Thema der vorliegenden Studie. In den nachfolgenden Abschnitten sollen Vorkommen, Aufnahme und die Bedeutung des Vitamin K für den menschlichen Organismus näher erläutert werden.

4.4.2 Vitamin K Zyklus

Das fettlösliche Vitamin K dient als wichtiger Kofaktor des Enzyms Gamma-Glutamyl-Carboxylase und ist von besonderer Bedeutung für die Aktivierung der Gerinnungsfaktoren II, VII, IX, X, sowie der gerinnungshemmenden Proteine C und S. Eine weitere wichtige Funktion des Vitamin K ist die posttranslationale Aktivierung von Proteinen des Knochen- und vaskulären Metabolismus (Furie and Furie, 1992, Shearer, 1995, Vermeer, 1990). Vitamin K ist ein essentieller Mikronährstoff und muss mit der Nahrung aufgenommen werden. Die empfohlene Tagesdosis beträgt 90µg für Frauen und 120µg für Männer (Gonnet et al., 2010). Bakterien der menschlichen Darmflora produzieren langkettige Vitamin K-Moleküle. Ihr Beitrag zum Vitamin K-Status des Körpers ist nicht abschließend geklärt (Conly and Stein, 1992, Schurgers and Vermeer, 2000). Mit der Nahrung werden zwei verschiedene Vitamin K Formen aufgenommen: Vitamin K₁ (VK₁) und Vitamin K₂ (VK₂). Vitamin K₁ (Phylloquinone) ist in grünen

Pflanzen enthalten. Es ist eng mit der Chloroplastenmembran verbunden und kann im menschlichen Darm nur schlecht resorbiert werden (Gijsbers et al., 1996, Schurgers and Vermeer, 2000). Trotz der eingeschränkten Resorption stellt Vitamin K₁ die größte Vitamin K-Nahrungsquelle des menschlichen Organismus dar (Booth et al., 1993, Bolton-Smith et al., 2000). Vitamin K₂ beschreibt als Oberbegriff die Gruppe der Menaquinone. Menaquinone werden anhand der Länge ihrer aliphatischen Seitenkette klassifiziert. Unterschiedliche Menaquinone werden mit dem Kürzel MK-n bezeichnet. „n“ beschreibt die Anzahl der Isoprenoid-Reste in dieser Kette (Schurgers et al., 2007b). In der vorliegenden Studie wurde MK-7 aufgrund seiner langen Halbwertszeit und guten Bioverfügbarkeit als Vitamin K₂-Quelle verwendet. Bezüglich der Dosierung der Vitamin K₂ Supplementation orientierten wir uns an den Erfahrungen vorausgegangener Studien unserer Arbeitsgruppe (Kruger et al., 2013, Schurgers et al., 2007a, Spronk et al., 2003). Menaquinone werden von Bakterien produziert und sind in großen Mengen in fermentierten Lebensmitteln wie Käse und Sauerkraut enthalten (Schurgers and Vermeer, 2000). Nach der enteralen Resorption werden Phyllochinone hauptsächlich durch triglycerid-reiche Lipoproteine (TRL), langkettige Menaquinone hauptsächlich durch LDL (Lipoproteine niedriger Dichte) transportiert. Beide Formen gelangen über das Lymphsystem mit dem Ductus thoracicus in den Blutkreislauf und werden rezeptorvermittelt in ihren Zielzellen aufgenommen (Shearer and Newman, 2008). Phyllochinone werden in extrahepatischen Geweben zu Menaquinone-4 umgewandelt (Okano et al., 2008). Menachinone haben im Vergleich zu Phyllochinonen eine höhere Affinität für das Enzym GGCX. Sie stellen den bevorzugten Kofaktor der Proteinkarboxylierung (Buitenhuis et al., 1990).

Ob sich Vitamin K₁ und Vitamin K₂ gleich gut für eine mögliche Supplementationstherapie eignen ist bislang unklar. Der menschliche Körper scheint substituiertes Vitamin K₁ und Vitamin K₂ ähnlich gut zu resorbieren. Da zudem Vitamin K₁ in Vitamin K₂ umgewandelt werden kann, sehen einige Autoren beide Formen des Vitamins als mögliche Substanz für eine Supplementationstherapie an (Schurgers, 2013). Jedoch zeigen die Ergebnisse von Geleijnse et al. 2004 (Rotterdamstudie) und Beulens et al. 2009 nur für die alimentäre Supplementation von Vitamin K₂ positive kardiovaskuläre Effekte. In beiden Studien konnten keine entsprechenden Effekte für Vitamin K₁ nachgewiesen werden, sodass wir uns in der vorliegenden Studie für die orale Supplementation von Vitamin K₂ entschieden (Beulens et al., 2009, Geleijnse et al., 2004). Aktuell untersuchen verschiedene Arbeitsgruppen in prospektiven Studien an Patienten sowohl den Einfluss einer

Substitutionstherapie mit Vitamin K₁ als auch mit unterschiedlichen Menaquinonen auf die Entwicklung von kardiovaskulärer Kalzifizierung (Brandenburg et al., 2015).

4.4.3 Vitamin K-abhängige Proteine

Die Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X, sowie die Proteine C und S werden durch Vitamin-K abhängige Karboxylierung in der Leber aktiviert. Die Bedeutung des Vitamins für die Blutgerinnung ist nicht zuletzt durch die breite therapeutische Anwendung von Vitamin K-Antagonisten zur Antikoagulation allgemein bekannt und wird hier nicht weiter ausgeführt. Zur Zeit sind vierzehn Vitamin K-abhängige Proteine bekannt (Chatrou et al., 2011). Neben den erwähnten Gerinnungsfaktoren ist das bereits vorgestellte Matrix Gla Protein ein wichtiger Vertreter dieser Gruppe (Tabelle 3).

Das Matrix Gla Protein ist ein bedeutender lokaler Inhibitor der vaskulären Kalzifizierung. Vitamin K (VK) ist Kofaktor des Enzyms GGCX und ist für die Bildung des karboxylierten, kalzifizierungsinhibierenden cMGP essentiell. Am Beispiel der MGP-Aktivierung soll der Vitamin K-abhängige Reaktionsmechanismus der GGCX vorgestellt werden (Abb. 4).

In der Nahrung enthaltenes Vitamin K liegt als Quinone vor und wird im Gewebe durch das Enzym Vitamin K-Oxidoreduktase und in der Leber zusätzlich durch eine NAD(P)H-abhängige Quinone-Reduktase zu Vitamin K-Hydroquinone (KH₂) reduziert. KH₂ dient als Kofaktor des Enzyms GGCX. GGCX karboxyliert im endoplasmatischen Retikulum unter Sauerstoff- und Kohlenstoffdioxidverbrauch, sowie durch gleichzeitige Oxidation von KH₂ zu Vitamin K-Epoxid (KO) ucMGP zum bioaktiven cMGP (Berkner and Runge, 2004, Chatrou et al., 2012). Um die beschriebene Reaktion aufrecht zu erhalten, benötigt der Körper große Mengen an KH₂, die in erster Linie durch die erneute Nutzung des entstandenen KO bereitgestellt werden. Ein Vitamin K-Molekül kann somit einige tausend Glutamatreste karboxylieren (Chatrou et al., 2012). Dieser Mechanismus wird durch die Vitamin K Epoxid Reduktase (VKOR) katalysiert (Suttie, 1985). Vitamin K-Antagonisten, wie beispielsweise Phenprocoumon oder Warfarin, blockieren die VKOR, resultierend in stark verminderten KH₂ Konzentrationen. Aufgrund des Substratmangels ist die Aktivität der GGCX-katalysierten Reaktionen erheblich reduziert (Stafford, 2005). Die NAD(P)H-abhängige Quinone-Reduktase wird durch Warfarin bloß sehr gering inhibiert. Bei entsprechender Vitamin K-Supplementation kann somit auch während einer Warfarintherapie eine suffiziente Karboxylierung hepatischer Vitamin K-abhängiger Proteine erreicht werden (Berkner and Runge, 2004). Da das Enzym in der Leber

ein- hundert mal aktiver ist als in arteriellen Gefäßwänden, lässt sich der Warfarineffekt zwar in der Leber, nicht aber in arteriellen Gefäßwänden antagonisieren (Wallin et al., 1999b). Da die VKOR in VSMC etwa drei mal aktiver ist als in Hepatozyten, beeinflusst eine durch Vitamin K Antagonisten induzierte VKOR-Blockierung die VSMC zudem verhältnismäßig stärker als die Hepatozyten (Wallin et al., 1999a).

Tabelle 3 Vitamin K-abhängige Proteine

Übersicht über die aktuell bekannten Vitamin K-abhängigen Proteine mit jeweiligem Ort der γ -Karboxylierung und der Funktion des Proteins im Stoffwechsel.

VK-abhängiges Protein in		Ort der γ -Kerboxylierung	Funktion
Koagulation	Faktor II	Leber; vereinzelt	Koagulation, Inflammation
	Faktor VII	extrahepatisch	
	Faktor IX	Leber	Koagulation
	Faktor X		
Antikoagulation	Protein C	Leber	Koagulation, antiinflammatorisch
	Protein S	Leber, Endothelzellen	Koagulation, antiinflammatorisch; Phagozytose; Apoptose
	Protein Z	Leber	Faktor X Inaktivierung
Andere VK-abhängige Proteine	MGP	Knochen, Knorpel; Gefäßwand; Makrophagen	Inhibitor der Vasculären Kalzifizierung
	Gas-6	VSMC; Endothelzellen	Zellproliferation
	Osteocalcin	Osteoblasten	Extrazelluläres Matrix Protein des Knochens
	TGF- α inducible Protein	Meisten Weichteilgewebe	Protein der extrazellulären Matrix
	Gla-rich Protein		Mineralisationsregulation
	Proline rich Gla- Proteins		Unbekannt
	Transmembran Gla-Proteins Periostin	Meisten Weichteilgewebe; Mesenchymales Knochenmark; Stromazellen; Kardiomyocyten	Unbekannt

VK = Vitamin K; MGP = Matrix Gla Protein; TGF = *transforming growth factor* = transformierender Wachstumsfaktor; VSMC = *vascular smooth muscle cells*; GLA = Carboxyglutaminsäure
Modifiziert aus (Chatrou et al., 2011)

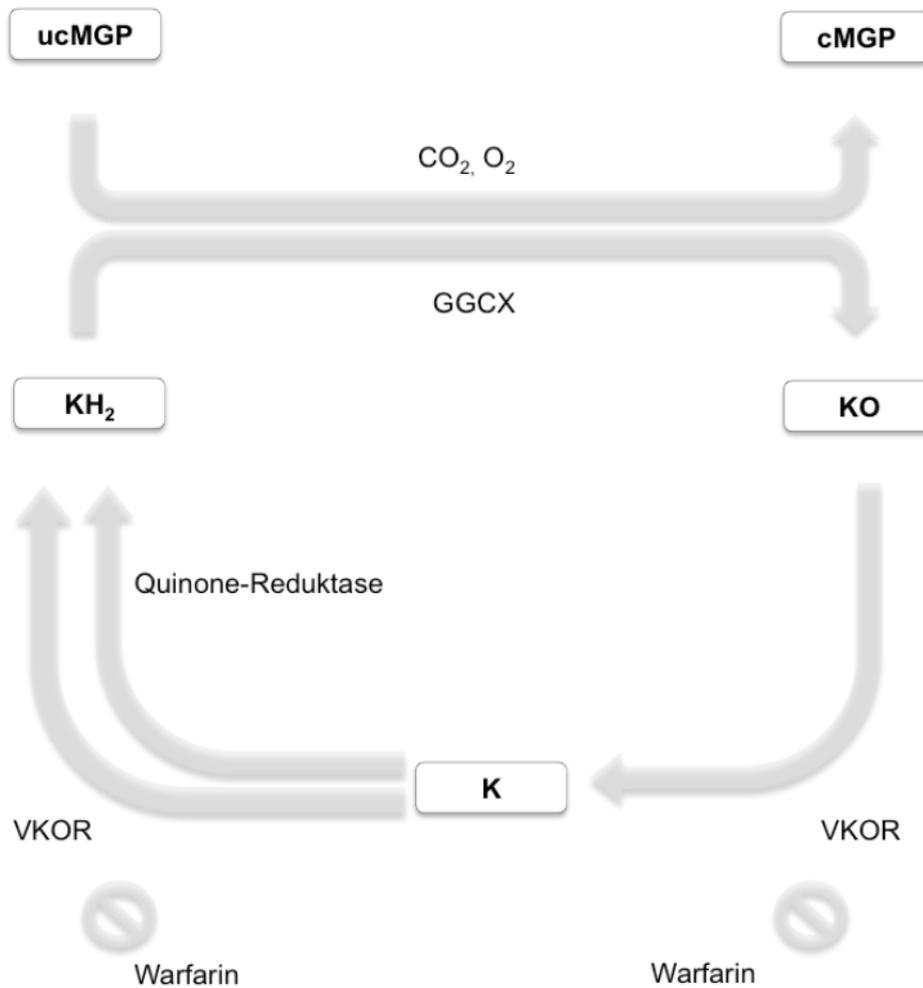


Abb. 4 Vitamin K-abhängiger Reaktionsmechanismus der GGCX am Beispiel der MGP-Aktivierung

Karboxylierung von ucMGP zu cMGP (unkarboxyliertes/ karboxyliertes Matrix Gla Protein). Die Gamma-Glutamyl-Karboxylase (GGCX) benötigt für die Reaktion Vitamin K Hydrochinone (KH₂), Kohlenstoffdioxid (CO₂) und Sauerstoff (O₂). KH₂ wird zu Vitamin K Epoxid (KO) oxidiert. Das Enzym Vitamin K Oxidoreduktase (VKOR) katalysiert KO zu KH₂. Die Quinonform des Vitamin K (K) stellt einen Zwischenschritt dieser Reaktion dar. Die Therapie mit Warfarin inhibiert die VKOR. In der Leber vorkommende NAD(P)H (reduzierte Nikotinamidadenindinukleotidphosphat)-abhängige Quinon-Reduktase reduziert K auch unter Warfarintherapie zu KH₂.

Modifiziert aus (Berkner and Runge, 2004)

4.4.4 Direkter Vitamin K₂ Einfluss auf die Genexpression

Neben der beschriebenen Bedeutung von Vitamin K für die posttranslationale Gamma-Karboxylierung von Proteinen ist seit einiger Zeit auch bekannt, dass Vitamin K einen direkten Einfluss auf die Transkription bestimmter Gene ausüben kann. Tabb et al. (2003) wiesen in einer Zellkulturstudien zum Knochenmetabolismus Vitamin K₂-induzierte Steigerungen der Genexpressionslevel für die Proteine Alkalische Phosphatase (ALP), Osteopontin (OPN), Matrix Gla Protein (MGP) und OPG (Osteoprotegerin) nach. Weiterhin konnte in der gleichen Studie gezeigt werden, dass der Vitamin K₂ induzierte

Effekt auf die Genexpression über die Bindung und Aktivierung des nukleären Steroid- und Xenobioticezeptor SXR vermittelt wird (Tabb et al., 2003, Carrie et al., 2004). SXR ist ein nukleärer Rezeptor, der als Reaktion auf verschiedene Stimuli die Transkription verschiedener Gene reguliert (Blumberg et al., 1998b). In kultivierten VSMC resultiert der Zusatz von Vitamin K₂ in einer gesteigerten Genexpression für das Enzym NAD(P)H-abhängige Quinone-Reduktase und verminderten Genexpressionsspiegeln für Osteoprotegerin. Eine gesteigerte Genexpression der Quinone-Reduktase ermöglicht eine höhere Reduktionskapazität des Vitamin K Zyklus. Für die Synthese von cMGP steht mehr KH₂ zur Verfügung. Osteoprotegerin bindet als Fangrezeptor RANKL, ein wichtiges Protein der Osteoklastenaktivierung. Eine verminderte Osteoprotegerin-Genexpression resultiert in einer gesteigerten Osteoklastenaktivität in der Gefäßwand (Wallin et al., 2008). Eine gesteigerte Osteoklastenaktivierung wirkt kalzifikationsinhibierend (s.o.). Die genregulatorischen Auswirkungen einer Vitamin K₂-Supplementation wurden bisher jedoch nur *in vitro* untersucht.

4.5 Zielsetzung der Arbeit

Mit zunehmendem Alter steigt bei einer Vielzahl der Menschen das Vorkommen von Kalzium-Phosphat Ablagerungen im kardiovaskulären System, vergesellschaftet mit einer höheren Inzidenz kardiovaskulärer Erkrankungen wie der arteriellen Hypertonie, koronarer Herzkrankheit und Apoplex. Das Fortschreiten der kardiovaskulären Kalzifizierung gilt als unabhängiger Prädiktor für kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität.

Neben den symptomatischen Therapieansätzen zur Behandlung von Folgeerkrankungen der kardiovaskulären Kalzifizierung existieren zum jetzigen Zeitpunkt keine kausalen Therapieoptionen um den Krankheitsprogress zu stoppen.

Das essentielle Vitamin K₂ aktiviert durch posttranslationale Karboxylierung MGP als bedeutenden gefäßwandständigen Kalzifizierungsinhibitor. Ergebnisse aus verschiedenen Zellkulturstudien deuten darüber hinaus auf einen direkten Einfluss von Vitamin K₂ auf das Expressionsniveau verschiedener Gene des Gefäßwandstoffwechsels hin. Die kalzifikationsinhibierenden Eigenschaften des Vitamin K₂, gepaart mit dem Fehlen von Nebenwirkungen, machen es zu einer vielversprechenden Therapieoption im Kampf gegen die kardiovaskuläre Kalzifizierung.

Folgende Hypothesen untersuchten wir mit Hilfe eines murinen Modells der chronischen Niereninsuffizienz in Kombination mit einer phosphatreichen Diät zur Induktion einer kardiovaskulären Kalzifizierung:

1. Eine Vitamin K₂ Substitution inhibiert die Entstehung der vaskulären Kalzifizierung.
2. Vitamin K₂ aktiviert den Kalzifizierungsinhibitor MGP.
3. Vitamin K₂ Supplementation beeinflusst die Genexpression wichtiger kalzifizierungsregulatorischer Proteine innerhalb der arteriellen Gefäßwand.

5 Material und Methoden

5.1 Materialliste

Tabelle 4 Chemikalien/ Lösungen/ Gase/ Puffer

Alphabetische Anordnung der verwendeten Chemikalien/ Lösungen/ Gase/ Puffer

Produkt	Hersteller
2-Propanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Acetone	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Albumin Fraktion V	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Betaisadona® (Polyvidon iod) Lösung	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Citronensäure ≥99,5 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Citronensäure-Monohydrat, 0,2%	Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn, Deutschland
DAB Substrate	Roche Diagnostics, Indianapolis, USA
DAPI	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Entellan®	Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn, Deutschland
EnVision™ G 2 Doublestain System, Rabbit/Mouse (DAB+/Permanent Red) Eosin G 0,5%	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
FLUKA Eukitt® quick-hardening mounting medium	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Formaldehyd-Lös. 10 % gepuffert	Otto Fischer GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Deutschland
HCl c(HCl) = 0.5 mol/l (0.5 N)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Heparin-Natrium-5000-ratiopharm®	Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
Isofluran 1,5%	Actavis Deutschland GmbH & Co. KG, München, Deutschland
KP Haematoxylin	Klinipath BV, Duiven, Niederlande
KP-ImsolMount aqueous mounting medium	Klinipath BV, Duiven, Niederlande
Mayer's Hämalau	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid ≥99,5 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Nuclear Fast Red Solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Paraffin 50-52 °C reinst, für die Histologie	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Paraformaldehyd, reinst, DAC Polyoxymethylen	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
PBS-Puffer pH 7,3	SERAG-WIESSNER KG, Naila, Deutschland
Polyvinylpyrrolidon (PVP) - Lösung	Mechatronics Instruments BV, Hoorn, Niederlande
Resorcin-Fuchsin-Lösung nach Weigert	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Silbernitrat	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Sodium thiosulfate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

Tissue-Tek® Cryomold® Molds	Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, Niederlande
Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound	Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, Niederlande
Triton® X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Trizma® base	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Trizma® hydrochloride	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
van Gieson Lösung	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Wasserstoffperoxid 30%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Weigerts Eisenhämatoxylin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Xylol (Isomere)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 5 Futter/ Medikamente/ Operationsmaterial

Alphabetische Anordnung der verwendeten Futter/ Medikamente/ Operationsmaterial

Produktname	Hersteller
Bepanthen Augen-und Nasensalbe (Dexpanthenol)	Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland
Chirurgische Instrumente	Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland
Diät: Phosphat- und VK ₂ - reich: 1,2% Phosphor, 0,6% Calcium, 0,5mg/kg VK ₁ , 100mg/kg VK ₂	Sniff-Spezialdiäten GmbH Soest
Diät: Phosphatreich: 1,2% Phosphor, 0,6% Calcium, 0,5mg/kg VK ₁ , Kein VK ₂	Sniff-Spezialdiäten GmbH Soest
Diät: Standard: 0,36% Phosphor, 0,6% Calcium, 0,5mg/kg VK ₁ , kein VK ₂	Sniff-Spezialdiäten GmbH Soest
Diät: VK ₂ -reich Standard: 0,36% Phosphor, 0,6% Calcium, 0,5mg/kg VK ₁ , 100mg/kg VK ₂	Sniff-Spezialdiäten GmbH Soest
DOMITOR® (Medetomidin) 0,5mg/ml (10ml)	Pfizer Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland
KETANEST S® (Esketaminhydrochlorid) 5 mg/ml (5 ml)	Pfizer Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland
Mersilene 3-0	Ethicon Products, Norderstedt, Deutschland
RIMADYL® (Carprofen) 50mg/ml	Pfizer Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland
Vicryl 4-0	Ethicon Products, Norderstedt, Deutschland

Tabelle 6 Kits

Alphabetische Anordnung der verwendeten Kits

Produktname	Hersteller
Calcium Colorimetric Assay Kit	BioVision Inc., Callifornia, Usa
QuantiTect Reverse Transcription Kit	QIAGEN Deutschland Holding GmbH, Hilden, Deutschland
RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit	QIAGEN Deutschland Holding GmbH, Hilden, Deutschland
Rneasy Mini Kit	QIAGEN Deutschland Holding GmbH, Hilden, Deutschland
TaqMan® Gene Expression Assays	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
Vector® NovaRED™ SUBSTRATE KIT FOR PEROXIDASE	Vector Laboratories LTD., Peterborough, United Kingdom

Tabelle 7 Verbrauchs- und sonstige Materialien

Alphabetische Anordnung der Verbrauchs- und sonstiger Materialien

Produktname	Hersteller
Eppendorf Reference	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Es-kompressen Steril 10x10 cm 8fach	Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland
Hypodermic Needle-Pro® EDGE™ Safety Device 27g x 1/2"	Smiths Medical UK, Ashford, United Kingdom
Injekt® Solo	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
MiniCollect® EDTA Röhrchen	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Omnifix®-F, Feindosierungsspritzen, 1 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Pasteurpipetten aus Glas 2ml, Ø1,0mm	BRAND GMBH + CO KG, Werthheim, Deutschland
Safe-Lock Eppendorf Tubes, 0.5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Wattestäbchen steril	Noba Verbandmittel Danz GmbH und Co KG, Wetter, Deutschland

Tabelle 8 Geräte

Alphabetische Anordnung der verwendeten Geräte

Produktname	Hersteller
Agilent Bioanalyser 2100	Agilent Technologies, Boblingen, Germany
AnimalBloodCounter	Scil animal care company GmbH, Viernheim, Deutschland
Applied Biosystems 7500 Fast Real Time PCR System	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
CPA225D Analysenwaage	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Histobath	Leica Mikrosysteme GmbH, Wetzlar, Deutschland
Histoembedder	Leica Mikrosysteme GmbH, Wetzlar, Deutschland
Leica 2035 Biocut	Leica Mikrosysteme GmbH, Wetzlar, Deutschland
Leica CM 3050S	Leica Mikrosysteme GmbH, Wetzlar, Deutschland
Leica DFC 425C	Leica Mikrosysteme GmbH, Wetzlar, Deutschland
Leica DM4000 M RL	Leica Mikrosysteme GmbH, Wetzlar, Deutschland
Leica MS5	Leica Mikrosysteme GmbH, Wetzlar, Deutschland
Menzel Gläser Superforst Plus 25x75x1,0mm	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Mikro 200R	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland
Nanodrop 1000	Thermo Scientific, Wilmington, USA
S35"Fine" Microtome Blades	FEATHER Safety Razor Co., Ltd., Osaka, Japan
Softron BP98A (Softron BP98A, Softron Co Ltd, Tokyo)	Softron Co Ltd, Tokyo, Japan
Vivid i	GE Healthcare, Buckinghamshire, England

Tabelle 9 Antikörper Immunhistochemie

Alphabetische Anordnung der verwendeten Antikörper

Produktname	Hersteller
anti cMGP Primary Antibody	Vascular Products BV, Maastricht, Niederlande
anti ucMGP Primary Antibody	Vascular Products BV, Maastricht, Niederlande
Anti-Ki67 antibody (ab15580) (Rb)	Abcam, Cambridge, United Kingdom
Anti-SM22 α antibody (ab14106) (Rb)	Abcam, Cambridge, United Kingdom
Dako Dual Endogenous Enzyme Block	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 488)	Abcam, Cambridge, United Kingdom
Goat polyclonal Secondary Antibody to Mouse IgG - H&L (HRP) (ab6789)	Abcam, Cambridge, United Kingdom
Goat polyclonal Secondary Antibody to Rabbit IgG - H&L (HRP) (ab6721)	Abcam, Cambridge, United Kingdom
Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunoglobulins/AP	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins P0161	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Rabbit anti-Mouse IgG H&L (HRP) secondary antibody (ab97046)	Abcam, Cambridge, United Kingdom

Tabelle 10 Primer qRT-PCR

Alphabetische Anordnung der verwendeten qRT-PCR Primer

Produktname	Hersteller
BMP-2 (Rn0148649_m1)	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
GGCX (Rn01420880_m1)	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
MGP (Rn01459200_m1)	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
OPN (Rn01449972_m1)	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Periostin (Rn01494626_m1)	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
SM22 α (Rn00580659_m1)	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
VKORC1 (Rn01507644_m1)	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

Tabelle 11 Software

Alphabetische Aufzählung der verwendeten Software

Produktname	Hersteller
EndNote X7	Thomson Reuters, New York, USA
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA
Image J	National Institutes of Health, USA
REST	QIAGEN Deutschland Holding GmbH, Hilden, Deutschland

5.2 Versuchstiere

5.2.1 Genehmigung des Tierversuchsprojektes

Alle Tierbehandlungen erfolgten nach Genehmigung des beantragten Versuchsvorhabens nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV). Die Tierversuchsstudie mit dem

Aktenzeichen 87-51.04.2010.A275 wurde unter Beachtung des Deutschen Tierschutzgesetzes (TSchG, Neubekanntmachung 18. Mai 2006, Inkrafttreten der letzten Änderung 15. Dezember 2010) und in enger Zusammenarbeit mit den Tierärzten der Tierversuchsanstalt (TVA) der Heinrich-Heine Universität (HHU) Düsseldorf durchgeführt.

5.2.2 Tierstamm und Tierhaltung

Die tierexperimentellen Untersuchungen, die dieser Studie zugrunde liegen, wurden an 42 männlichen Wistar-Ratten durchgeführt, welche in der hiesigen TVA gezüchtet wurden. Die Tiere traten im Alter von ca. 12 Lebenswochen mit einem Gewicht von je etwa 300g in das Studienprotokoll ein. Die Haltung erfolgte in der TVA der HHU unter konstanten Bedingungen mit einer Raumtemperatur von 22-24°C, 60-80% Lufttemperatur und einem künstlich geschaffenen 12 stündigen Tag - Nacht - Rhythmus entsprechend der Haltungsbedingungen für Labortiere. Futter und Wasser standen *ad libitum* zu Verfügung.

5.2.3 Tierkohorten und Studiendesign

Die Aufteilung des Kollektivs (42 männliche Wistar-Ratten) erfolgte rein zufällig auf vier unterschiedliche Studiengruppen, die sich hinsichtlich Behandlung und Nahrung wie folgt unterscheiden (Tabelle 12):

Tabelle 12 Benennung der vier Versuchsgruppen

Benennung der Versuchsgruppen	Durchgeführte Intervention
Co	Sham-OP + Standarddiät
Co - K ₂	Sham-OP + Vitamin K ₂ -reiche Diät
CKD	5/6-Nephrektomie + phosphatreiche Diät
CKD - K ₂	5/6-Nephrektomie + Vitamin K ₂ - und phosphatreiche Diät

Alle Diäten wurden von sniff-Spezialdiäten GmbH Soest bezogen und basierten auf der optimalen Standardernährung für Ratten (AIN 93G). Die Tiere der verschiedenen Kohorten erhielten die unterschiedlichen Nahrungen erst eine Woche nach Abschluss des zweizeitigen operativen Procederes, um eine ausreichende postoperative Rehabilitation zu gewährleisten. Bis zu diesem Zeitpunkt stand allen Tieren die normale Standarddiät zur Verfügung. Tiere der Interventionsgruppen (CKD und CKD-K₂) erhielten im Unterschied zu den Kontrollgruppen (Co und Co-K₂) eine phosphatreiche Nahrung. Der Kalziumgehalt

wurde hingegen in allen Gruppen konstant gehalten. Alle Diäten enthielten unabhängig von der Vitamin K₂-Konzentration einen niedrigen Vitamin K₁-Anteil, um durch Vermeidung einer Vitamin K₁-Depotwirkung (siehe Erläuterungen in der Einleitung) den alleinigen Effekt der Vitamin K₂-Behandlung erfassen zu können. In Erwartung höherer Mortalitätsraten und dem Ziel, zum Versuchende annähernd gleichstarke Gruppen zu erhalten, wurden den Interventionsgruppen mehr Tiere zugeteilt als den Kontrollgruppen. Tabelle 13 zeigt eine Übersicht über Behandlung und Diät der verschiedenen Kollektive:

Tabelle 13 Versuchsgruppen: Diäten und Interventionen

Dargestellt werden die unterschiedlichen Versuchsgruppen mit den jeweils eingeschlossenen Tieren sowie den unterschiedlichen Diäten

Kontrollgruppen (Sham-OP)	
Co (n=10)	Co-K₂ (n=10)
Standarddiät: 0,36% Phosphor 0,6% Calcium 0,5mg/kg VK ₁ Kein VK ₂	VK ₂ -reiche Standarddiät: 0,36% Phosphor 0,6% Calcium 0,5mg/kg VK ₁ 100mg/kg VK ₂
Interventionsgruppen (5/6-Nephrektomie)	
CKD (n=11)	CKD-K₂ (n=11)
Phosphatreiche Diät: 1,2% Phosphor 0,6% Calcium 0,5mg/kg VK ₁ Kein VK ₂	Phosphat- und VK ₂ -reiche Diät: 1,2% Phosphor 0,6% Calcium 0,5mg/kg VK ₁ 100mg/kg VK ₂

Mg = Milligramm; kg = Kilogramm; VK₁ = Vitamin K₁; VK₂ = Vitamin K₂

5.3 Tierexperimenteller Untersuchungsablauf

Alle Ratten durchliefen zeitversetzt ein dreimonatiges Versuchsprotokoll (Abb. 5/ Tabelle 14), in dem zu definierten Zeitpunkten die Versuchsmessungen und Interventionen durchgeführt wurden. Versuchsbeginn für eine neue Tiergruppe war jeweils der Vortag der ersten Operation. Blutdruck und Puls wurden im Labor der Klinik für Nephrologie des Universitätsklinikums Düsseldorf (UKD) mittels Tailcuff-Methode bestimmt. Die retroorbitale Blutentnahme und Nachbetreuung der Tiere erfolgte in den Tierversuchsräumen des Kardiologischen Labors, Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie (UKD). Die hierbei erhobenen Parameter stellten Bezugspunkte für unsere weiteren Beobachtungen dar und wurden im weiteren Versuchsaufbau wiederholt bestimmt.

Alle Tiere wurden unabhängig von der Art des Eingriffs (Sham-Op vs. 5/6-Nephrektomie) einer zweizeitigen Operation unterzogen. Im Rahmen der ersten operativen Intervention erfolgte einerseits eine Sham (Schein)-Operation beider Kontrollgruppen und andererseits

die komplette rechtsseitige Nephrektomie in den Interventionsgruppen. Im zweiten operativen Intervall folgte eine erneute Sham-Operation der Kontrollgruppen, sowie die funktionelle 2/3 Nephrektomie links in den Interventionsgruppen. Postoperativ wurden in regelmäßigen Abständen (Zeitpunkt +3/+8 Wochen des Studienprotokolls) die zu Protokollbeginn erhobenen Parameter erneut bestimmt. Diese Messungen wurden im Laufe des zweitägigen Finalversuchs wiederholt. Während der gesamten Versuchsdauer wurden die Tiere mindestens zweimal wöchentlich visitiert und gewogen. Dabei wurde besonders auf Veränderungen in Aussehen und Verhalten hinsichtlich der festgesetzten Abbruchkriterien geachtet (Tabelle 15). Zu einem vorzeitigen Versuchsabbruch kam es in drei Fällen. Abgeschlossen wurde das Versuchsprotokoll nach 12 Wochen Laufzeit mit einem zweitägigen Finalversuch, an dessen ersten Tag aus jeder Kohorte jeweils 4 Tiere für die Gewinnung von 24-Stunden-Sammelurin in metabolische Käfige gesetzt wurden. Zusätzlich erfolgte eine echokardiographische Untersuchung aller Tiere der jeweiligen Kohorten. Am zweiten Tag des Finalversuchs wurden die Ratten durch vollständigen Blutentzug in Vollnarkose getötet und Blut und Organe zur weiteren Analytik asserviert.

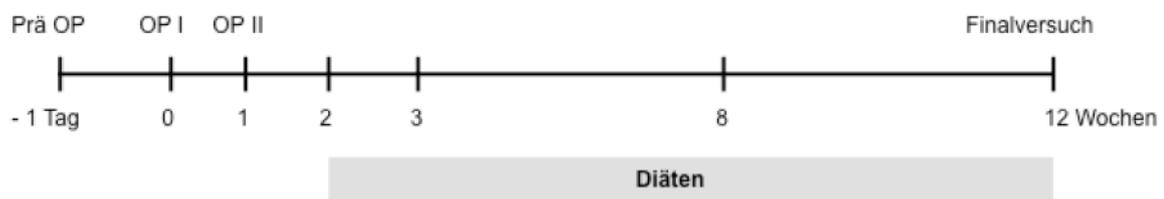


Abb. 5 Zeitplan Tierversuch

Tiere aller Versuchsgruppen durchliefen zeitversetzt das dargestellte Versuchsprotokoll. Alle Versuchsmessungen und Interventionen wurden zu definierten Zeitpunkten durchgeführt.

Tabelle 14 Tierexperimenteller Untersuchungsablauf

Dargestellt werden die verschiedenen Zeitpunkte des Versuchsprotokolls mit den jeweils durchgeführten Interventionen

Zeitpunkt	Intervention
Präoperativer Tag	Gewicht, Vitalparameter, Blutentnahme
Startpunkt: OP I	Interventionsgruppe: komplette rechtsseitige Nephrektomie Kontrollgruppe: Sham OP I
+ 1 Woche: OP II	Interventionsgruppe: linksseitige 2/3-Nephrektomie Kontrollgruppe: Sham OP II
+ 2 Wochen	Beginn der Diäten
+ 3 Wochen	Gewicht, Vitalparameter, Blutentnahme
+ 8 Wochen	Gewicht, Vitalparameter, Blutentnahme
+ 12 Wochen: Finalversuch	1. Tag: 24h Sammelurin, Echokardiographie 2. Tag: Gewicht, Vitalparameter, Blutentnahme, Organentnahme

Tabelle 15 Abbruchkriterien Tierversuch

Abbruchkriterien:
Deutlich reduzierter Allgemeinzustand
Gewichtsverlust über 15% des Ausgangsgewichtes
Relevante Exsikkose durch mangelnde Flüssigkeitsaufnahme
Medikamentös nicht zu beherrschende Schmerzen mit Schonhaltung
Klinische Zeichen einer generalisierten Entzündungsreaktion (Sepsis)

5.2.1 Gewichtsbestimmung

Alle Ratten wurden zu Versuchsbeginn gewogen. In der sich anschließenden Versuchslaufzeit wurde bei allen Tieren zweimal wöchentlich das Gewicht bestimmt. Eine abschließende Gewichtskontrolle erfolgte am letzten Versuchstag.

5.2.2 Vitalparameterbestimmung

Die Bestimmung des systolischen und diastolischen Blutdrucks sowie der Herzfrequenz erfolgte nicht invasiv mittels Schwanzmanschetten-Plethysmographie (Tailcuff-Methode). Die Tiere wurden hierzu zwecks Abschirmung einzeln in einen Restrainer gesetzt, welcher auf einer Wärmeplatte (38°C) platziert wurde, um die Körpertemperatur zu erhalten und eine generelle Vasokonstriktion zu verhindern. Die Blutdruckmessung erfolgte nach entsprechenden Adaptationszeiten der Tiere. Es wurde jeweils aus zehn Messungen der Mittelwerte gebildet, um eine Annäherung an die realen Blutdruckverhältnisse zu

gewährleisten. Aus den ermittelten Daten wurde zusätzlich der arterielle Mitteldruck berechnet. Die Messungen wurden unter Berücksichtigung eines circadianen Rhythmus immer um die gleiche Zeit in den Morgenstunden durchgeführt.

5.2.3 Blutentnahme und Probenasservierung

Für die retroorbitale Blutentnahme wurden die Tiere für kurze Zeit einer Inhalationsnarkose mit 1,5-prozentigem Isofluran unterzogen. Der retroorbitale Venenplexus wurde mit einer dünnen Glaskapillare (Ø1,0mm) punktiert. Um eventuelle zirkadiane Schwankungen der Messwerte zu vermeiden, erfolgten die Blutentnahmen jeweils zur gleichen Tageszeit. Das gewonnene Blut wurde zur Durchführung verschiedener Analysen aufgeteilt und entsprechend weiterverarbeitet. Die Proben wurden entweder sofort analysiert (Blutbild) oder in Flüssigstickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

5.2.4 Operationsmethoden

5.2.4.1 5/6-Nephrektomie

Alle Operationen wurden unter sterilen Bedingungen im Operationsbereich der TVA der HHU Düsseldorf durchgeführt. Zur Analgosedierung wurde eine intraperitoneale Injektion von Ketamin S (100mg/kg Körpergewicht) und Medetomidin (0,2mg/kg KG) durchgeführt. Durch diese Kombination konnte eine Narkose der Ratten mit guter Analgesie und Muskelrelaxation bei nur leichter Atemdepression erzielt werden, sodass die Eingriffe unter suffizienter Spontanatmung und Verzicht auf eine Intubation stattfanden. Vor Operationsbeginn wurden das Operationsfeld (Abdomen) rasiert, mit Betaisodonalösung desinfiziert und die Tiere in Rückenlage auf dem Operationstisch fixiert. Um einer Unterkühlung der Tiere entgegenzuwirken lagen sie einem Wärmekissen auf. Die Augen wurden zum Schutz vor Austrocknung mit Bepanthen-Augensalbe benetzt. Tiere der Interventionsgruppen wurden in zwei Eingriffen einer 5/6-Nephrektomie unterzogen. Im ersten Schritt wurde die rechte Niere komplett entfernt, während bei dem zweiten Eingriff jeweils der obere und untere Pol der linken Niere, entsprechend dem oberen und unteren Drittel, mit einem nicht resorbierbaren Faden (Mersilene 3.0) legiert wurde.

Hierzu wurden zu Beginn des Eingriffs nach Überprüfung der Analgesie und Narkosetiefe Bauchdecke, Bauchmuskulatur und Peritoneum mittels einer ca. 3-4 cm langen medianen Längslaparotomie eröffnet. Um einen guten Zugang zur Niere zu erhalten, wurde der Darm zur jeweiligen Gegenseite ausgelagert und zum Schutz vor Austrocknung in feuchte, sterile

Kompressen gehüllt. Für die totale Nephrektomie rechts wurde die rechte Niere vorsichtig unter Schonung der Nebenniere mithilfe steriler Wattestäbchen dekapuliert. Hilusgefäße und Ureter wurden freipräpariert und mithilfe eines nicht resorbierbaren Fadens (Mersilene 3.0) legiert. Nach Durchtrennung der Hilusgefäßen und des Ureters distal der Ligatur konnte die Niere unter Belassung eines Gefäßstumpfes abgesetzt werden. Nach Prüfung der Ligatur auf Bluttrockenheit wurde der Darm zurückverlagert. Bauchmuskulatur sowie Hautschnitt wurden mit resorbierbarem Nahtmaterial (Vicryl 4.0) in Einzelknopfnahntechnik zweischichtig verschlossen. Nach einer Woche Regenerationszeit wurden die Ratten erneut operiert. Bei gleichen Vorbereitungen und Zugangsweg wurde die linke Niere unter Schonung der Nebenniere freipräpariert. Der obere und untere Nierenpol wurden mit einer Schlinge aus nicht resorbierbarem Material (Mersilene 3.0) unter möglichst starkem Zug, ohne dabei das Nierenparenchym zu verletzen, mechanisch legiert. Somit soll eine Ischämie und Reduktion des Nierenparenchyms erreicht werden. Anschließend wurde der Operationssitus entsprechend der ersten Operation verschlossen. Nach Abschluss der Operation erhielten alle Tiere Carprofen (5mg/kg KG) zur Analgesie. Postoperativ wurden die Ratten bis zum vollständigen Erwachen unter Wärmelampen in getrennten Käfigen gehalten. An den ersten beiden postoperativen Tagen wurden alle Ratten täglich visitiert und erhielten Carprofen (5mg/kg KG) zur Schmerztherapie.

5.2.4.2 Sham-Operation

Das Protokoll der Sham-Operation der Kontrolltiere unterschied sich insofern von der 5/6-Nephrektomie, dass nach gleichen Vorbereitungen und Zugangswegen lediglich das jeweilige Nierenlager und perirenale Fettgewebe mit Hilfe steriler Wattestäbchen mobilisiert wurde. Anschließend erfolgte ein zweizeitiger Wundverschluss. Ziel der Sham-OP war es, den Einfluss der Operation als Stressfaktor auf die späteren Messungen zu kontrollieren. Die Nachbetreuung der Tiere erfolgte entsprechend der Interventionsgruppen.

5.2.5 Finalversuch

5.2.5.1 24-Stunden-Sammelurin

Am ersten Tag des Finalversuchs wurden aus jeder Gruppe insgesamt 4 Tiere zur Gewinnung des 24-Stunden-Sammelurins einzeln in metabolische Käfige gesetzt. Die erhaltenen Urinproben wurden bei -80°C eingefroren und an das Zentrallabor des UKD übermittelt.

5.2.5.2 Echokardiographie

Technische Daten und Handling

Die Echokardiographie erfolgte nach zwölfwöchigem Versuchsprotokoll am ersten Finalversuchstag mittels Vivid i, GE Healthcare und einem 12 MHz Linearschallkopf. Die durch eine 1,5% Isofluran-Inhalationsnarkose narkotisierten Tiere wurden zur Optimierung des echokardiographischen Bildes an Thorax und Abdomen rasiert und zum Schutz vor Auskühlung auf einer Wärmeplatte fixiert. EKG-Elektroden wurden an den Extremitäten befestigt.

Parametererhebung

Mit Hilfe von 2-D-Echokardiographischen Bildern und Messungen im M-Mode wurden verschiedene strukturelle und funktionelle Aspekte der Herzen untersucht.

In parasternal kurz und lang angeloteten Achsen wurde auf Papillarmuskelebene die linksventrikuläre, interventrikuläre und linksventrikulär-posteriore Wanddicke bestimmt. Der maximale Druckgradient und die Flussgeschwindigkeit über der Aortenklappe wurden ausgehend von einer suprasternalen Achse gemessen. Um eine möglichst genaue Annäherung an die realen Werte zu erhalten, wurden die Messungen über 5 Herzzyklen aufgezeichnet. Die Datenerhebung wurde je fünfmal wiederholt. Die linksventrikuläre Funktion wurde durch die Bestimmung folgender Parameter genauer analysiert:

- linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser (LVEDD)
- linksventrikulärer endsystolischer Durchmesser (LVESD)
- linksventrikuläres endsystolisches Volumen (LVESV)
- systolische interventrikuläre Wanddimension (LVISS)
- diastolische interventrikuläre Wanddimension (LVISD)

Ausgehend von diesen Daten konnten weitere Parameter errechnet werden:

- Verkürzungsfraction (fractional shortening = FS): $FS(\%) = [(LVEDD - LVESD) / LVEDD] \times 100$
- Ejektionsfraction (EF): $EF(\%) = [(LVEDV - LVESV) / LVEDV] \times 100$
- Schlagvolumen (SV): $SV = LVEDV - LVESV$.

5.2.5.3 Blutentnahme und Organasservierung

Für die abschließende Asservierung biologischen Materials wurden die Ratten einer Überdosierung von Ketamin und Medetomidin unterzogen und mit dem Rücken auf einer Wärmeplatte fixiert. Das Abdomen wurde durch eine mediane Laparotomie eröffnet.

Anschließend erfolgte eine Blutentnahme mittels direkter Punktion der Vena cava inferior. Das gewonnene Blut wurde entsprechend der sich anschließenden Untersuchungen asserviert. Nach Eröffnung des Thorax der Ratte erfolgte die Perfusion von Gefäßsystem und Organen mit eiskaltem kalzium- und magnesiumfreiem PBS via Kanülierung des linken und rechten Herzens. Die Vena cava inferior wurde zuvor kurz vor Eintritt in das rechte Atrium durchtrennt. Die Perfusion wurde eingestellt, sobald makroskopisch eine komplette Entblutung der Organe zu beobachten war. Dann erfolgte die Bergung, Gewichtsbestimmung und Aufbereitung der verschiedenen Organe für weitere Arbeitsschritte. Für die Anfertigung von Kryoschnitten wurde Gewebe in TissueTek auf Trockeneis fixiert und dann bei -80°C im Gefrierschrank gelagert. Zur Erstellung von Paraffinschnitten wurde Gewebe in zehnpromtente Formaldehydlösung (zehnfaches Volumen des Eigengewichts) über mindestens 24h gelagert. Alle weiteren Gewebe, die für weitere Untersuchungen konserviert werden sollten, wurden in Flüssigstickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

5.2.6 Probenaufarbeitung

5.2.6.1 Blutbildbestimmung und Rheologie

Die Bestimmung der Hämoglobin- und Hämatokritwerte erfolgte mittels des AnimalBloodCounter, Scil animal care company GmbH, der TVA der HHU Düsseldorf. Je $20\mu\text{l}$ des retroorbital entnommenen Vollblutes wurden durch Überführung in EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)-beschichtete Minitubes antikoaguliert und noch am gleichen Tag zur Parameterbestimmung in die TVA verbracht.

5.2.6.2 Klinische Chemie mit Bestimmung der Elektrolyte und Retentionsparameter in Serum und Urin

Pro Blutabnahmezeitpunkt wurden jeder Ratte ca. $400\mu\text{l}$ Vollblut zur Bestimmung von Elektrolyten und Retentionsparametern entnommen. Die Blutproben wurden nach Entnahme 30 Minuten bei Raumtemperatur in einem $1,5\text{ml}$ Reaktionsgefäß zur Gerinnung gelagert und anschließend bei 10000 RPM zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und erneut zentrifugiert. Das somit gewonnene Serum wurde bei -80°C gelagert und zusammen mit den im Finalversuch gewonnenen 24-Stunden-Sammelurin an das Zentralinstitut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik des UKD übergeben. Dort erfolgte die Analyse der Proben.

Folgende Parameter wurden hierbei erhoben:

Serumchemie:

- Kalzium (mmol/l)
- Phosphat (mmol/l)
- Kreatinin (mg/dl)
- Harnstoff (mg/l)
- Gesamteiweiß (GE) (g/dl)

24-Stunden-Sammelurin:

- Kalzium (mg/24h)
- Phosphat (mg/24h)
- Kreatinin (mg/dl)
- Harnstoff (mg/dl)
- Gesamteiweiß (GE) (g/dl)

Aus den gewonnenen Daten wurde die Kreatininclearance berechnet.

$$\text{Creatinin-Clearance (ml/min)} = \frac{\text{Urin-Kreatinin (mg/dl)} \times \text{Volumen (ml)}}{\text{Serum-Kreatinin (mg/dl)} \times \text{Sammelzeit (min)}}$$

5.2.6.3 Bestimmung von Plasma -ucMGP; cMGP

Die Bestimmungen der Plasma -uc/ -cMGP-Werte erfolgte durch die freundliche Unterstützung von L.J. Schurgers, PhD und seiner Arbeitsgruppe am Kardiovaskulärem Forschungsinstitut der Universität Maastricht (CARIM).

5.2.6.4 Bestimmung der Kalziumkonzentration im Gewebe mittels Atomabsorptionsspektrometrie

Die Messung der Kalziumkonzentration in Gewebeproben von Myokard, Aorta und Niere aller Versuchstiere erfolgte durch die freundliche Unterstützung von L.J. Schurgers, PhD und seiner Arbeitsgruppe in dem Kardiovaskulären Forschungsinstitut der Universität Maastricht (CARIM).

5.2.6.5 Histologie**5.2.6.5.1 Herstellung Paraffinschnitte**

Im Rahmen der Organentnahme des Finalversuchs wurden je Ratte ca. ein Drittel des verbliebenen linken kranialen Nierenanteils und ein von der Aortenklappenebene bis zur proximalen Aorta ascendens reichender Teil der Herzbasis zur Erstellung paraffinfixierter, histologischer Schnitte entnommen. Um der postmortalen Autolyse vorzubeugen, wurden die Gewebe unmittelbar nach der Entnahme für 24 Stunden in zehnpromzentiger Formaldehydlösung fixiert.

Die Einbettung der Organe mit flüssigem Paraffin erfolgte mit Hilfe des Leica/Jung Histoembedders. Nach Erkalten des Paraffins (mindestens 24h) waren die entstandenen Blöcke schnittfähig. Mit einem Rotationsmikrotom wurden 5µm dicke Gewebeschnitte

produziert. Die Schnitte wurden in ein beheiztes Wasserbad überführt und auf Objektträger gezogen. Die bei Raumtemperatur getrockneten Objektträger wurden im Rahmen anschließender Fragestellungen unterschiedlichen histologischen und immunohistochemischen Untersuchungen unterzogen.

5.2.6.5.2 *Anfertigung Kryoschnitte*

Für die Anfertigung von Kryoschnitten wurden 2mm der proximalen Aorta ascendens und eine transversale, mitventrikuläre Herzprobe direkt nach der Organentnahme mit eiskalter PBS-Lösung gespült und auf Trockeneis in Tissue Tek fixiert. Die Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C aufbewahrt. Mit einem Kryomikrotom wurden $7\mu\text{m}$ dicke Kryoschnitte angefertigt und auf Objektträger übertragen. Bis zur immunhistochemischen Färbung der Präparate wurden die Objektträger bei -80°C gelagert.

5.2.6.5.3 *Hämatoxylin-Eosin Färbung*

Zur strukturellen Übersicht wurden konventionelle Hämatoxylin-Eosin Färbungen der paraffinfixierten Organen Herz und Niere, sowie den zuvor angefertigten Kryoschnitten der Aorta ascendens gemäß nachfolgendem Protokoll angefertigt (s. Appendix). Basophile Substanzen, wie die im Zellkern enthaltene DNA, werden durch Hämatoxylin blau dargestellt. Eosin hingegen färbt azidophile Substanzen, beispielsweise Zellplasmaproteine, rot.

5.2.6.5.4 *Histologische Kalzium-Bestimmung: Von-Kossa Färbung*

Die Von-Kossa Färbung wird zur histologischen Quantifizierung von Kalziumablagerungen in Geweben genutzt. Es handelt sich um eine indirekte Nachweismethode für Kalziumionen. Das positive Färbergebnis mit einer braunschwarzen Färbung der entsprechenden Gewebestrukturen beruht auf der Reaktion von Kalziumphosphaten und Kalziumkarbonaten. Bei der Inkubation der Schnitte mit Silber-Nitrat-Lösung werden Kalziumionen durch Silberionen ersetzt. Kalziumphosphat ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) wird zu Silberphosphat (Ag_3PO_4), Kalziumkarbonat (CaCO_3) wird zu Silberkarbonat (Ag_2CO_3). Die Behandlung der Schnitte mit starkem Licht reduziert die entstandenen Silbersalze zu Metallen, wodurch die Farbreaktion entsteht. Zur Darstellung der Zellkerne wurde eine Gegenfärbung mit Kernechtrot durchgeführt. Dabei stellen sich Zellkerne rot und zytoplasmatische Strukturen rosa dar. Die Von-Kossa Färbung wurde an paraffinfixierten Schnittpräparaten des verbliebenen kranialen Drittels der linken Niere und an einem von der Aortenklappenebene bis zur proximalen Aorta ascendens reichenden Teil der Herzbasis durchgeführt.

5.2.6.6 *Immunhistochemie*

Mit Hilfe von immunhistochemischen Färbungen lassen sich Proteine in histologischen Schnittpräparaten durch die Verwendung von Antikörpern detektieren, lokalisieren, sowie anhand des morphologischen Gesamtbildes interpretieren.

In einem ersten Schritt binden spezifische, mono- oder polyklonale Primärantikörper an bestimmte Epitope der Zielproteine. Der entstandene Primärantikörper-Antigen-Komplex kann in weiteren Schritten visualisiert werden. Es wird eine direkte von einer indirekten Nachweismethode unterschieden. Bei der direkten Nachweismethode ist der Primärantikörper mit Markermolekülen konjugiert, die eine Farbreaktion ermöglichen. Die indirekte Nachweismethode zeichnet sich durch zusätzlich zwischengeschaltete immunologische oder chemische Reaktionen aus, die eine Signalverstärkung ermöglichen. Häufig werden Markermolekül-gekoppelte Sekundärantikörper benutzt, die spezifisch gegen den verwendeten Primärantikörper gerichtet sind. Fluoreszierende Farbstoffe und Enzyme stellen die gebräuchlichsten Markermoleküle dar. Für die in dieser Studie durchgeführten immunhistochemischen Färbungen wurde eine indirekte Nachweismethode mit enzymgekoppeltem Sekundärantikörper gewählt. Das gekoppelte Markermolekül (Meerrettichperoxidase=HRP) katalysiert in einem weiteren Schritt die Farbreaktion eines substituierten Chromogens. Damit die detektierte Farbreaktion möglichst spezifisch das Vorkommen des Zielproteins darstellt, müssen unspezifische Antikörperbindungen und Farbeinlagerungen minimiert werden.

5.2.6.6.1 *Carboxyliertes und uncarboxyliertes MGP*

Der Nachweis von cMGP und ucMGP in Kryoschnitten der proximalen Aorta ascendens erfolgte mit murinen anti-c/ucMGP Primärantikörpern des Departments für Biochemie der Universität Maastricht nach einem dort etablierten Protokoll. Zur Detektion des Primärantikörper-Antigen-Komplexes diente ein HRP-konjugierter Kaninchen-anti-Maus Sekundärantikörper. HRP katalysierte die Farbreaktion des Vector NovaRED Substrate Kits. Vector NovaRED produziert ein rotes Reaktionsprodukt. Um eine unspezifische Farbreaktion durch im Gewebe enthaltene endogene Peroxidasen auszuschließen, wurden die Proben mit Wasserstoffperoxid inkubiert. Zur Darstellung weiterer Strukturen wurde eine Hämatoxylin-Gegenfärbung durchgeführt, bei der Zellkerne kräftig blau, übrige Gewebe schwach graublau dargestellt werden. Zur Evaluation der Primärantikörperspezifität und zur Sicherstellung valider Reaktionsergebnisse wurden zeitgleich Negativkontrollen durchgeführt. Dafür wurde einige Kryoschnitten während der Primärantikörperinkubation nicht mit Primärantikörpern inkubiert, sondern ausschließlich

mit TBST + 1%BSA. Somit dürfte in diesen Proben keine Farbreaktion zu beobachten sein.

5.2.6.6.2 SM22 α Färbung

Die Quantifizierung der glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) in Kryoschnitten der proximalen Aorta ascendens erfolgte durch die immunhistochemische Färbung von SM22 α . Das Protein SM22 α ist strukturverwandt zu Calponin und dem Drosophila Muskelprotein mp20. Seine genaue Funktion ist bisher nicht bekannt. SM22 α wird zur spezifischen Detektion glatter Muskelzellen genutzt. Es ist ein intrazelluläres Protein, welches im gesamten Zytoplasma der glatten Gefäßmuskelzelle vorkommt und entlang der Aktinfilamente lokalisiert ist. Zur Visualisierung der spezifischen Primärantikörperbindung wurde ein HRP-konjugierter Sekundärantikörper verwendet. HRP katalysiert die Oxidation von Diaminobenzidin (DAB) zu einem braunen Präzipitat. Eine Kerngegenfärbung wurde mit Mayers Hämalaun durchgeführt und liefert eine blaue Farbreaktion.

5.2.6.6.3 Alkalische Phosphatase

Die Bestimmungen der Alkalischen Phosphatase in Kryoschnitten aus den Aorten der Versuchsgruppen (Co, Co-K₂, CKD, CKD-K₂) nach zwölfwöchiger Versuchslaufzeit erfolgte durch die freundliche Unterstützung von L.J. Schurgers, PhD und seiner Arbeitsgruppe am Kardiovaskulärem Forschungsinstitut der Universität Maastricht (CARIM).

5.2.6.6.4 Elastica van Gieson

Die Darstellung der elastischen Fasern der aortalen Tunica media erfolgte mittels Elastica van Gieson Färbung in kryofixierten Gewebeschnitten der aortalen Gewebeproben der Versuchsgruppen (Co, Co-K₂, CKD, CKD-K₂) nach zwölfwöchiger Versuchslaufzeit. Anschließend erfolgte die Quantifizierung von Faserbruchstellen als Zeichen eines präkalzifizierenden Milieus.

5.2.6.6.5 Ki67/DAPI-Immunofluoreszenz

Um die Zellproliferationsrate in den kryofixierten Gewebeschnitten der aortalen Gewebeproben aller Versuchsgruppen (Co, Co-K₂, CKD, CKD-K₂) nach zwölfwöchiger Versuchslaufzeit zu untersuchen, führten wir eine Immunfluoreszenzfärbung mit Hilfe des Zellproliferationsmarkers Ki67 und DAPI als Zellkernfärbung durch.

5.2.6.7 Mikroskopische Auswertung

Alle histologisch- und immunhistochemisch gefärbten Organpräparate wurden mit Hilfe des Leica DM4000 M RL Mikroskops, der Mikroskopkamera Leica DFC 425C und der Bildbearbeitungssoftware ImageJ ausgewertet. Positive Färbeergebnisse wurden dabei

prozentual zur Gesamtfläche, in mm² oder entsprechend festgelegter Skalen quantifiziert. Es wurden stets sämtliche Gesichtsfelder eines Präparates ausgewertet. Für Präparate der gleichen Färbung wurden die Geräteeinstellungen stets konstant gehalten.

5.2.7 RNA-Isolation und qRT-PCR

Ein besonderes Augenmerk wurde auf die Auswirkungen der verschiedenen tierexperimentellen Versuchsprotokolle auf die Expressionsniveaus der Gene für MGP, SM22 α , OPN, GGCX, VKOR1, und Periostin gelegt. Zu diesem Zweck wurden Proben von Herz, Aorta und Niere in mehreren Schritten aufbereitet, sodass eine Quantifizierung der mRNA Level bestimmter Gene mittels qRT-PCR möglich war. Ein ausführliches Versuchsprotokoll ist dem Appendix der vorliegenden Arbeit zu entnehmen.

5.2.8 Statistische Auswertung der erhobenen Daten

Statistische Analysen der erhobenen Daten wurden mit dem Statistikprogramm Graphpad Prism 5 durchgeführt. Die in den einzelnen Tieren ermittelten Werte wurden entsprechend den vier verschiedenen Interventionsgruppen zu Mittelwerten zusammengefasst. Abweichungen vom Mittelwert wurden mit dem Standardfehler (SEM=*standard error of the mean*) angegeben. Erhobene Werte der verschiedenen Kohorten wurden mittels einfaktorieller ANOVA auf signifikante Unterschiede getestet. Bei mehrfach wiederholten Messungen wurde eine zweifaktorielle ANOVA durchgeführt. Mit Hilfe der Bonferroni Korrektur konnte gezeigt werden, zwischen welchen Gruppen signifikante Unterschiede auftraten. Hierbei wurde ein zweiseitiges Signifikanzniveau unter 5% als signifikant betrachtet, sowie Zufallswahrscheinlichkeiten zwischen 5 und 10% als Trend gewertet.

6 Ergebnisse

6.1 Überlebenskurve der Versuchsgruppen

Während der zwölfwöchigen Versuchslaufzeit verstarben im Rahmen der operativen Eingriffe und weiteren Interventionen in der Versuchsgruppe Co 20%, in der CKD-Gruppe 27% und in der CKD-K₂ Gruppe 18% der Tiere. Kein Tier der Kontrollgruppe Co-K₂ verstarb während der Versuchslaufzeit. Bezüglich des Überlebens zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen (Abb. 6).

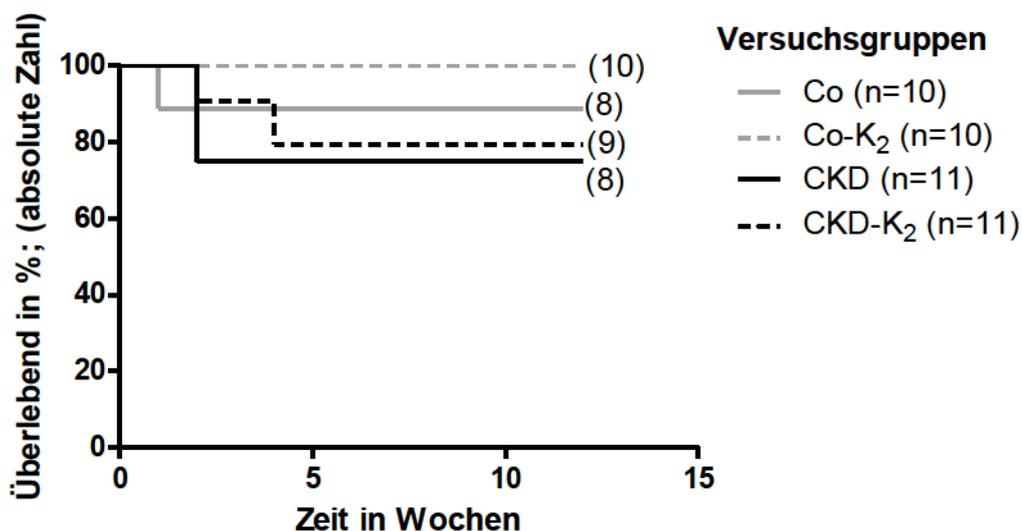


Abb. 6 Überlebenskurven der Versuchsgruppen (Co, Co-K₂, CKD, CKD-K₂) über die Versuchslaufzeit von 12 Wochen in Prozent.

Darstellung der absoluten Versuchsgruppengröße zu Beginn der Versuchslaufzeit sowie zum Zeitpunkt 12 Wochen in Klammern. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Überlebenskurven der einzelnen Versuchsgruppen.

6.2 Induktion der experimentellen Niereninsuffizienz

Die chronische Niereninsuffizienz beim Menschen zeichnet sich durch typische klinische sowie laborchemische Veränderungen aus. In der vorliegenden Studie induzierten wir bei Tieren der Interventionsgruppen CKD und CKD-K₂ durch operative 5/6-Nephrektomie sowie Supplementation einer phosphatreichen Diät eine chronische Niereninsuffizienz, um die Entstehung von kardiovaskulärer Kalzifizierung zu provozieren. Im Rahmen des Versuchsablaufs untersuchten wir die Tiere der Versuchsgruppen zu Versuchsbeginn sowie nach drei, acht und zwölf Wochen mit besonderem Fokus auf niereninsuffizienz-typische Veränderungen. Da die chronische Niereninsuffizienz mit Malassimilation und Kachexie einhergeht, wurde das Gewicht der Versuchstiere engmaschig überwacht. Alle der zu Versuchsbeginn nicht adulten Ratten nahmen während der Versuchslaufzeit

signifikant an Gewicht zu (Co Versuchsbeginn: $308 \pm 4\text{g}$ vs. Co 12 Wochen, $451 \pm 13\text{g}$, $p < 0,001$; CKD Versuchsbeginn: $302 \pm 2\text{g}$ vs. CKD 12 Wochen, $407 \pm 7\text{g}$, $p < 0,001$). Tiere der Interventionskollektive CKD und CKD-K₂ zeigten verglichen mit den Kontrollkollektiven eine signifikant geringere Gewichtszunahme (Co 12 Wochen: $451 \pm 13\text{g}$ vs. CKD 12 Wochen, $407 \pm 7\text{g}$, $p < 0,01$) (Abb. 7/ Tabelle 18).

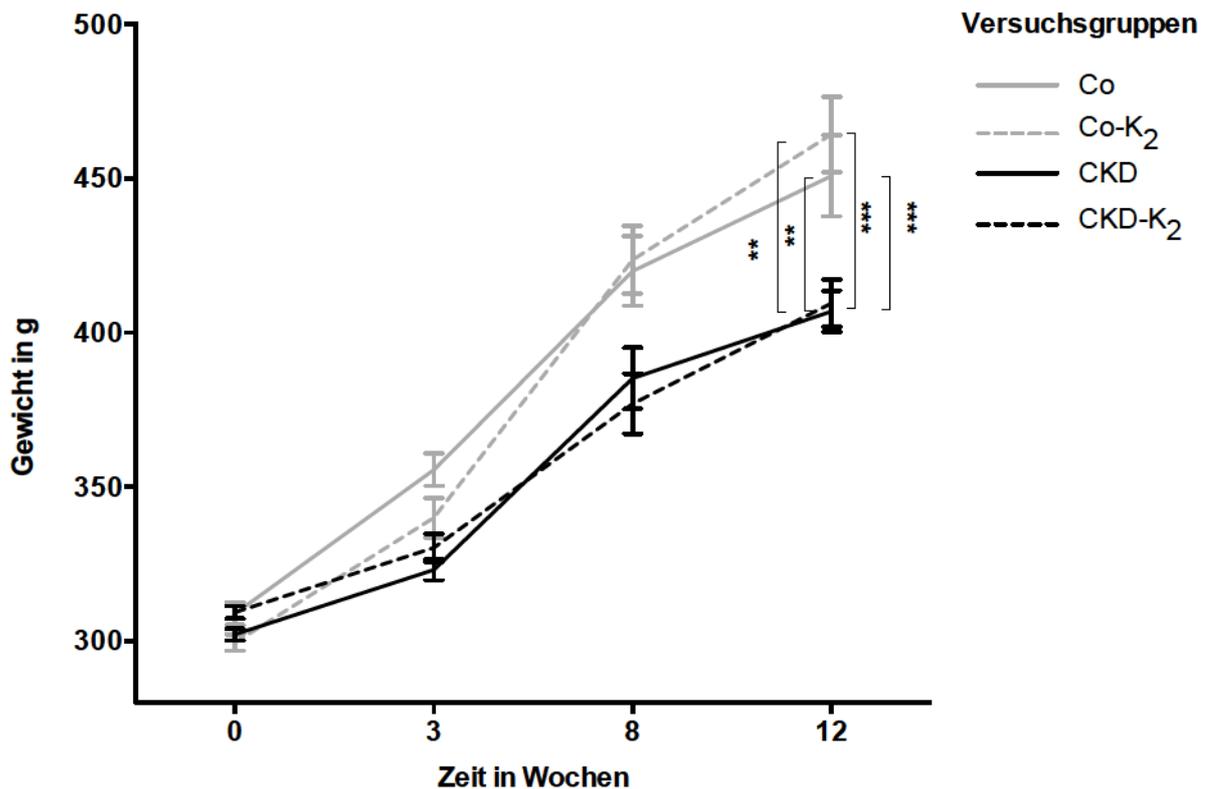


Abb. 7 Entwicklung des Körpergewichts der Versuchsgruppen als Mittelwert \pm Standardfehler (Co, Co-K₂, CKD, CKD-K₂) in zwölf Wochen Versuchslaufzeit in Gramm (g).

Die zu Versuchsbeginn nicht adulten Ratten nahmen während der zwölfwöchigen Versuchslaufzeit signifikant an Gewicht zu. Nach zwölfwöchiger Versuchslaufzeit zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen dem Körpergewicht der Interventionsgruppen CKD und CKD-K₂ gegenüber den Kontrollgruppen Co und Co-K₂.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Zur Erfassung der Nierenfunktion untersuchten wir wichtige Harnretentionsparameter im Serum aller Tiere. Dabei zeigten Tiere der Interventionsgruppen CKD und CKD-K₂ nach zwölf Wochen Versuchslaufzeit verglichen mit den Kontrollgruppen Co und Co-K₂ zum Zeitpunkt zwölf Wochen mehr als 50% höhere Serumkreatininkonzentrationen (CKD Zeitpunkt 12 Wochen: $0,5 \pm 0,1\text{ mg/dl}$ vs. Co Zeitpunkt 12 Wochen: $0,3 \pm 0\text{ mg/dl}$, $p < 0,001$) (Abb. 8). Im Vergleich zu den Ausgangswerten verdoppelten sich die Serumkreatininkonzentrationen der Interventionsgruppen CKD und CKD-K₂ in der

zwölfwöchigen Versuchslaufzeit (CKD Zeitpunkt 12 Wochen: $0,5 \pm 0,1$ mg/dl vs. CKD Versuchsbeginn: $0,2 \pm 0$, $p < 0,001$; CKD-K₂ Zeitpunkt 12 Wochen: $0,5 \pm 0$ mg/dl vs. CKD-K₂ Versuchsbeginn: $0,2 \pm 0$, $p < 0,001$) (Tabelle 16). Dem entsprechend zeigte sich bei Tieren der Interventionsgruppen CKD und CKD - K₂ eine etwa 50% Reduktion der Kreatin clearance verglichen zu Tieren der Kontrollgruppe Co (CKD Zeitpunkt 12 Wochen: $1,7 \pm 0,2$ ml/min vs. Co Zeitpunkt 12 Wochen $3,2 \pm 0,6$, $p < 0,05$; CKD-K₂ Zeitpunkt 12 Wochen: $1,8 \pm 0,1$ ml/min vs. Co Zeitpunkt 12 Wochen $3,2 \pm 0,6$, $p < 0,05$) (Tabelle 17). Für die Serum Harnstoffkonzentrationen beobachteten wir signifikant gesteigerten Werte bei den Interventionsgruppen CKD und CKD-K₂ zum Zeitpunkt 12 Wochen verglichen mit den Kontrollgruppen zum gleichen Zeitpunkt (CKD Zeitpunkt 12 Wochen: $51 \pm 2,9$ mg/dl vs. Co Zeitpunkt 12 Wochen: $40 \pm 2,2$ $p < 0,001$; CKD-K₂ Zeitpunkt 12 Wochen: $50 \pm 1,9$ mg/dl vs. Co Zeitpunkt 12 Wochen: $40 \pm 2,2$ $p < 0,01$) (Tabelle 17).

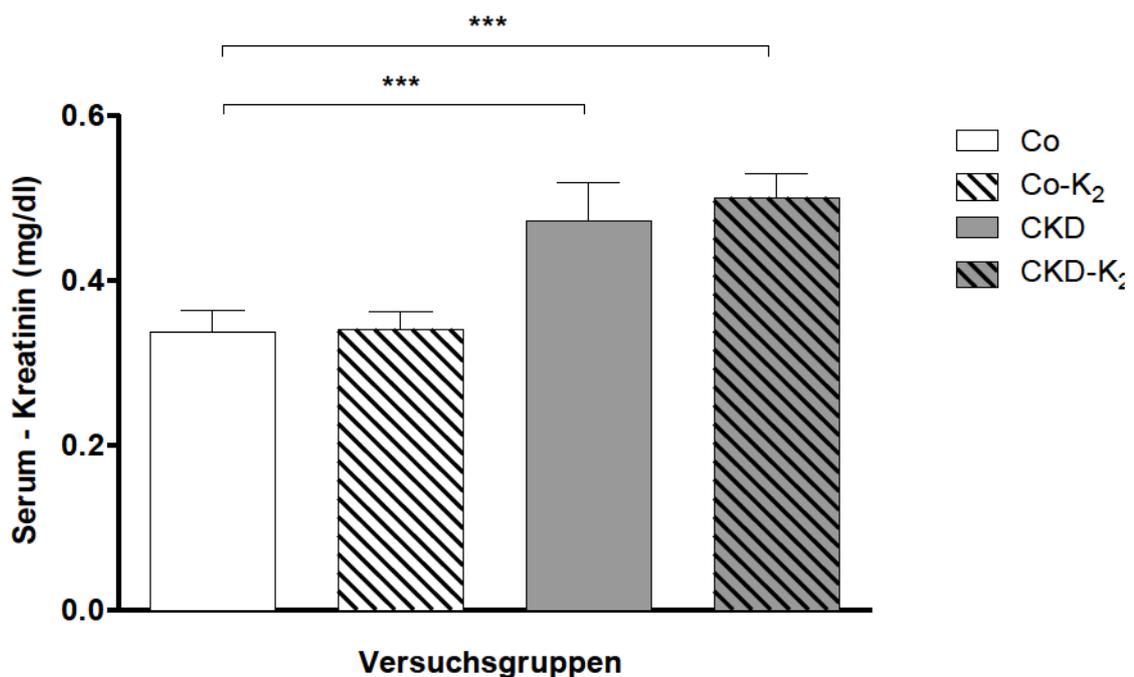


Abb. 8 Serum-Kreatinin Konzentrationen der Versuchsgruppen als Mittelwert \pm Standardfehler (Co, Co-K₂, CKD, CKD-K₂) nach zwölfwöchiger Versuchslaufzeit in Milligramm pro Deziliter (mg/dl).

Nach zwölfwöchiger Versuchslaufzeit zeigten Tiere der Interventionsgruppen CKD und CKD-K₂ signifikant höhere Serum-Kreatinin Konzentrationen gegenüber den Kontrollgruppen Co und Co-K₂.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Tabelle 16 Serumparameter der Versuchsgruppen (Co, Co-K₂, CKD, CKD-K₂) zu Versuchsbeginn sowie nach zwölfwöchiger Versuchslaufzeit.

Die Interventionsgruppen CKD und CKD-K₂ entwickelten signifikant höherer Serumkreatininwerte und Harnstoffkonzentrationen gegenüber den Kontrollgruppen zum Zeitpunkt 12 Wochen. Die Interventionsgruppe CKD entwickelte nach zwölfwöchiger Versuchslaufzeit eine signifikante Hyperphosphatämie verglichen mit den übrigen Versuchsgruppen. Hämoglobinwert und Hämatokrit aller Versuchsgruppen veränderten sich im Rahmen der Versuchslaufzeit nicht relevant. Entsprechende Beobachtungen wurden für die Plasmakonzentrationen des gesamten unkarboxylierten Matrix Gla Proteins (*total uncarboxylated Matrix Gla Protein* = t-ucMGP) gemacht.

	Co	Co-K ₂	CKD	CKD-K ₂
Kalzium (mmol/l)				
Versuchsbeginn	2.5 ± 0	2.5 ± 0	2.6 ± 0	2.5 ± 0
12 Wochen	2.5 ± 0	2.5 ± 0	2.4 ± 0.1	2.4 ± 0
Kreatinin (mg/dl)				
Versuchsbeginn	0.3 ± 0	0.2 ± 0	0.2 ± 0	0.2 ± 0
12 Wochen	0.3 ± 0	0.3 ± 0	0.5 ± 0	0.5 ± 0
Harnstoff (mg/dl)				
Versuchsbeginn	41 ± 2,0	32 ± 1.0	39 ± 1.8	37 ± 1.6
12 Wochen	40 ± 2.2	42 ± 1.3	51 ± 2.9	50 ± 1.9
Gesamteiweiß (g/dl)				
Versuchsbeginn	5.5 ± 0.1	5.2 ± 0.1	5.6 ± 0.1	5.6 ± 0.1
12 Wochen	5.8 ± 0.1	5.1 ± 0.1	5.3 ± 0.1	5.3 ± 0.1
Phosphat (mmol/l)				
12 Wochen	1.8 ± 0.1	1.6 ± 0.1	2.2 ± 0.2	1.8 ± 0.1
Hb (g/dl)				
Versuchsbeginn	15.7 ± 0.4	16.4 ± 0.3	16.4 ± 0.3	15.4 ± 0.4
12 Wochen	15.0 ± 0.5	15.5 ± 0.2	15.5 ± 0.2	15.5 ± 0.1
Hkt (%)				
Versuchsbeginn	45.9 ± 1.2	48.1 ± 1.0	46.8 ± 1.0	46.6 ± 0.9
12 Wochen	45.8 ± 1.3	47.9 ± 0.9	44.0 ± 1.5	45.0 ± 0.3
t-ucMGP (nmol/l)				
Versuchsbeginn	5601 ± 200,9	6482 ± 269,9 ^a	5667 ± 426,0	5462 ± 336,4
12 Wochen	5781 ± 404,2	4983 ± 193,9	4661 ± 328,3	4914 ± 404,5

a) ** vs. Co-K₂ Zeitpunkt 12 Wochen

p* < 0.05, *p* < 0.01, ****p* < 0.001

mmol/l = Millimol pro Liter; mg/dl = Milligramm pro Deziliter; g/dl = Gramm pro Deziliter; Hb = Hämoglobin; Hkt = Hämatokrit; t-ucMGP = total uncarboxylated Matrix Gla Protein; nmol/l = Nanomol pro Liter

Die Analyse der Hämoglobin und Hämatokritwerte zu den Zeitpunkten null, drei, acht und zwölf Wochen ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Eine für die CKD zu erwartende Anämie mit reduzierten Hämoglobin- und Hämatokritwerten blieb in den Interventionsgruppen aus. Auch bezüglich der t-ucMGP Plasmakonzentrationen beobachteten wir keinen Unterschied zwischen den Versuchsgruppen (Tabelle 16).

5/6-Nephrektomie und phosphatreiche Diät bei Tieren der Interventionsgruppen nahmen deutlich Einfluss auf den Phosphathaushalt der Tiere. Die Phosphatausscheidung über den Urin war bei Tieren der Interventionsgruppen CKD und CKD-K₂ mehr als dreifach gesteigert verglichen mit Tieren der Kontrollgruppen (CKD 12 Wochen, 63 ± 7,1 mmol/l/24h vs. Co 12 Wochen: 15 ± 2,9 mmol/l/24h, *p* < 0,001; CKD-K₂ 12 Wochen, 63 ±

6,7 mmol/l/24h vs. Co-K₂ 12 Wochen: 19 ± 3,8 mmol/l/24h, $p < 0,001$) (Abb. 9/ Tabelle 17).

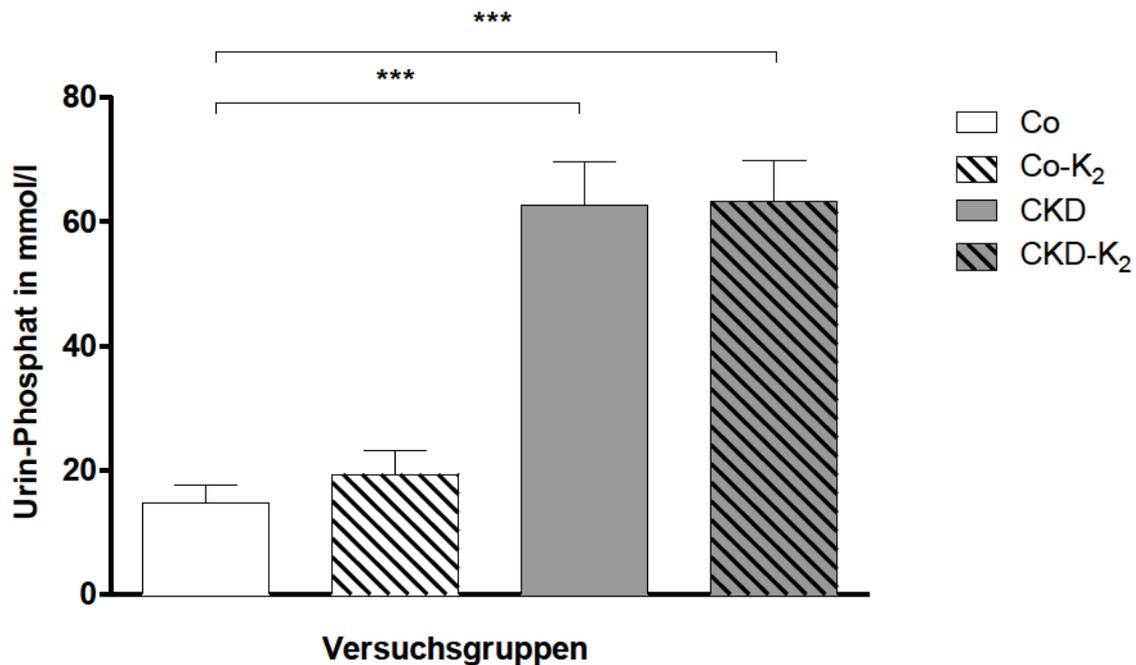


Abb. 9 Urinphosphatausscheidung im 24-Stunden-Sammelurin der Versuchsgruppen als Mittelwert ± Standardfehler (Co, Co-K₂, CKD, CKD-K₂) nach zwölfwöchiger Versuchslaufzeit in Millimol pro Liter (mmol/l).

Nach zwölfwöchiger Versuchslaufzeit zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen der Phosphatausscheidung im 24-Stunden-Sammelurin der Interventionsgruppen CKD und CKD-K₂ gegenüber den Kontrollgruppen Co und Co-K₂.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Tabelle 17 Kreatinin-Clearance und Urinparameter

Nach zwölfwöchiger Versuchslaufzeit wurde bei jeweils vier Tieren je Versuchsgruppe 24-Stunden-Sammelurin gewonnen. Zusammen mit den erhobenen Serumkonzentrationen für Kreatinin konnte die Kreatinin Clearance errechnet werden (Formel siehe Methodenteil).

	Co	Co-K ₂	CKD	CKD-K ₂
Kreatinin Clearance (ml/min)				
12 Wochen	3,2 ± 0,6	2,5 ± 0,2	1,7 ± 0,2	1,8 ± 0,1
Kalzium (mg/24h)				
12 Wochen	2,1 ± 0,5	1,6 ± 0,3	2,4 ± 0,8	2,4 ± 0,5
Phosphatausscheidung (mg/24h)				
12 Wochen	33,1 ± 1	23,6 ± 3,6	82,8 ± 29,9	59,8 ± 7,5
Kreatinin (mg/dl)				
12 Wochen	102 ± 22,3	102 ± 12,2	75 ± 17,1	69 ± 16,7
Harnstoff (mg/dl)				
12 Wochen	4025 ± 1043	3280 ± 370,7	2424 ± 562,3	2050 ± 499,7

ml/min = Milliliter pro Minute; mg = Milligramm

Dabei zeigten sich bei Tieren der CKD Gruppe im Vergleich zu den Kontrollgruppen Co und Co-K₂, als auch gegenüber der Vitamin K₂ substituierten Interventionsgruppe CKD-K₂ signifikant höhere Serumphosphatwerte (Abb.10).

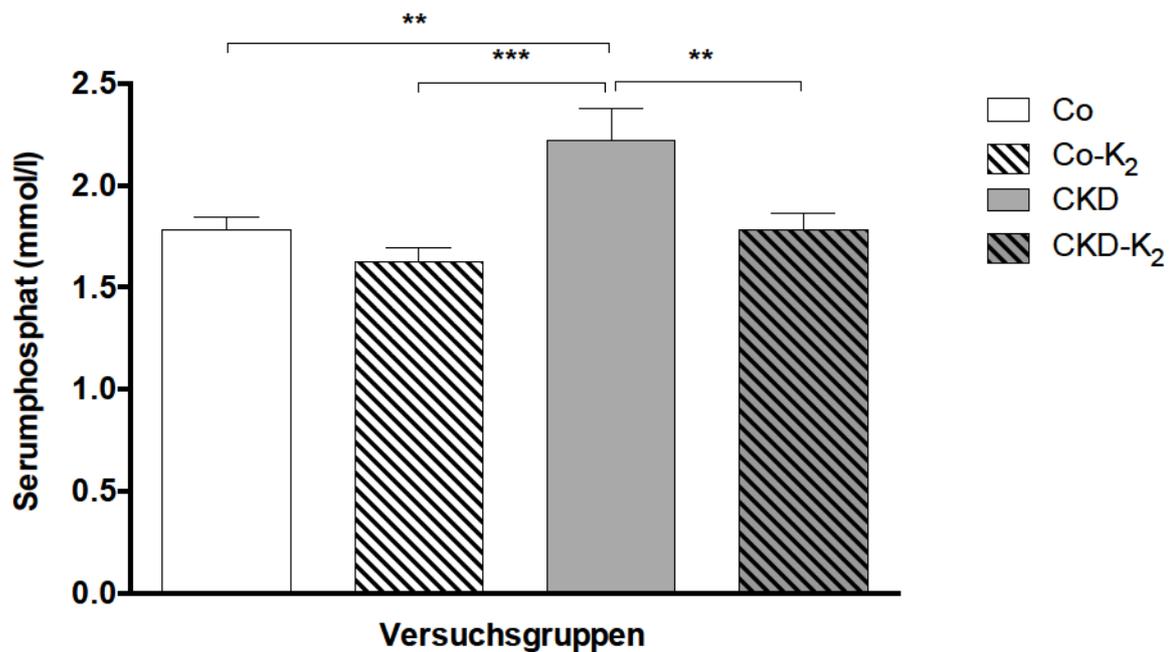


Abb. 10 Serum-Phosphat Konzentrationen der Versuchsgruppen als Mittelwert \pm Standardfehler (Co, Co-K₂, CKD, CKD-K₂) nach zwölfwöchiger Versuchslaufzeit in Millimol pro Liter (mmol/l).

Nach zwölfwöchiger Versuchslaufzeit zeigten Tiere der Interventionsgruppen CKD signifikant höhere Serum-Phosphat Konzentrationen gegenüber den Kontrollgruppen Co, Co-K₂ sowie gegenüber der Vitamin K₂ substituierten Interventionsgruppe CKD-K₂.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

6.3 Kalzifizierung

Extraossäre Kalziumablagerungen wurden mit Hilfe der Atom-Absorptions-Spektrometrie (AAS), immunhistochemischer Färbung von alkalischer Phosphatase sowie der Von-Kossa Färbung analysiert.

Die biochemische Kalziummessung in aortalen Gewebeproben mittels AAS ergab für Tiere der Versuchsgruppe CKD etwa um 30% gesteigerte Kalziumkonzentrationen gegenüber der Kontrollgruppe Co-K₂ (Co-K₂ Zeitpunkt 12 Wochen: $0,19 \pm 0,01 \mu\text{g Ca/mg}$ Trockengewicht vs. CKD Zeitpunkt 12 Wochen: $0,24 \pm 0,01 \mu\text{g Ca/mg}$ Trockengewicht, $p < 0,05$). Gegenüber der Kontrollgruppe Co zeigte sich eine tendenziell erhöhte Kalziumlast der CKD-Versuchstiere. Tiere der Vitamin K₂ supplementierten CKD-K₂ Versuchsgruppe entwickelten keine gesteigerten Kalziumkonzentrationen verglichen mit den Kontrollgruppen (Abb. 11).

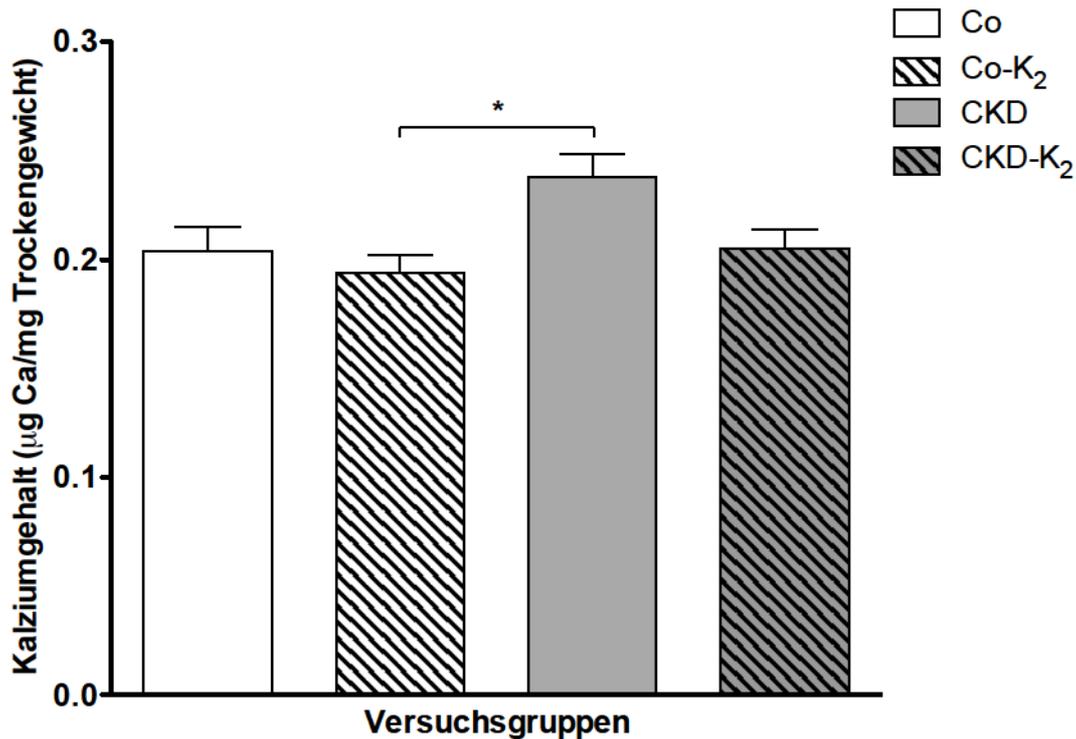


Abb. 11 Aortale Kalzifizierung: Atom-Absorptions-Spektrometrische Quantifizierung des Kalziumgehaltes von aortalen Gewebeproben der Versuchsgruppen als Mittelwert \pm Standardfehler (Co, Co-K₂, CKD, CKD-K₂) nach zwölfwöchiger Versuchslaufzeit in Mikrogramm Kalzium pro mg Trockengewicht ($\mu\text{g Ca/mg Trockengewicht}$).

Die Interventionsgruppe CKD weist im Vergleich zur Kontrollgruppe Co-K₂ einen signifikant höheren Kalziumgehalt auf. Verglichen mit der Co Gruppe zeigt sich ein tendenziell höherer Kalziumgehalt der CKD Gruppe ($p = 0,14$).

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Die immunhistochemische Färbung der alkalischen Phosphatase, einem Marker kalzifizierender Zellen in kryofixierten Schnittpräparaten aortaler Gewebeproben ergab für Versuchstiere der CKD-Gruppe ein signifikant stärkeres Färberesultat (ALP-Produktscore CKD Zeitpunkt 12 Wochen: $1,1 \pm 0,77$ vs. Co Zeitpunkt 12 Wochen: $0,3 \pm 0,21$, $p < 0,01$). Vitamin K₂ supplementierte CKD-K₂ Versuchstiere entwickelten keinen signifikant gesteigerten ALP-Produktscore (Abb. 12).

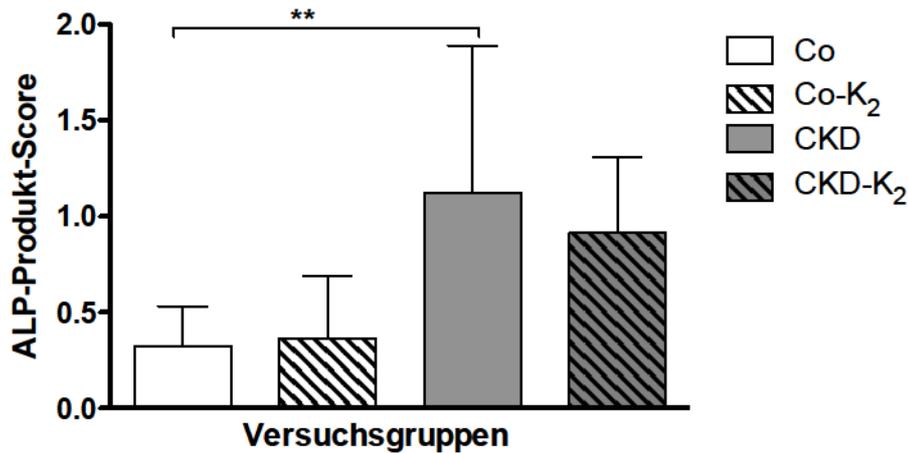


Abb. 12 Alkalische Phosphatase (ALP): Positives immunhistochemisches Färbereale für ALP als Produktscore berechnet aus ALP-positivem Färbereale \times -intensität der untersuchten kryofixierten Schnittpräparate aus den Aorten der Versuchsgruppen als Mittelwert \pm Standardfehler (Co, Co-K₂, CKD, CKD-K₂) nach zwölfwöchiger Versuchslaufzeit.

Die Interventionsgruppe CKD zeigte gegenüber der Kontrollgruppe Co ein signifikant höheren ALP Produktscore.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Für myokardiale Gewebeproben zeigten sich entsprechende Tendenzen mit etwa 2,4fach höheren Kalziumkonzentrationen bei Tieren der Interventionsgruppe CKD verglichen zur Kontrollgruppe Co (Co Zeitpunkt 12 Wochen: $8,86 \pm 0,31 \mu\text{g Ca/mg Trockengewicht}$ vs. CKD Zeitpunkt 12 Wochen: $21,35 \pm 5,21 \mu\text{g Ca/mg Trockengewicht}$, $p < 0,05$). Für Tiere der CKD-K₂ Gruppe konnten keine signifikant gesteigerten Kalziumkonzentrationen gegenüber den Kontrollgruppen nachgewiesen werden (Abb. 13).

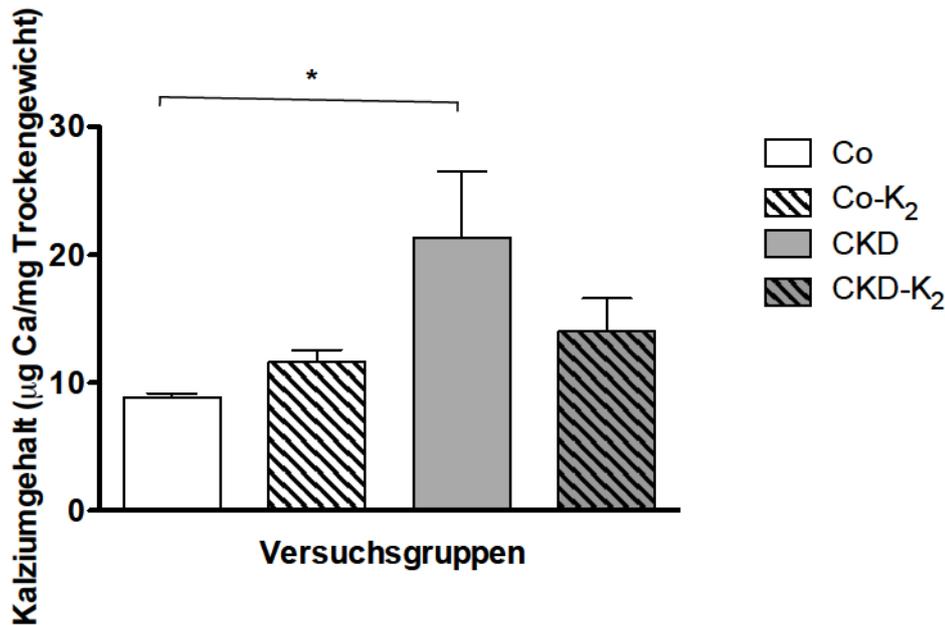


Abb. 13 Myokardiale Kalzifizierung: Atom-Absorptions-Spektrometrische Quantifizierung des Kalziumgehaltes von myokardialen Gewebeprobe(n) der Versuchsgruppen als Mittelwert \pm Standardfehler (Co, Co-K₂, CKD, CKD-K₂) nach zwölfwöchiger Versuchslaufzeit in Mikrogramm Kalzium pro mg Trockengewicht (µg Ca/mg Trockengewicht).

Die Interventionsgruppe CKD weist im Vergleich zur Kontrollgruppe Co einen signifikant höheren Kalziumgehalt auf.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Mikroskopisch wiesen wir mit Hilfe der Von-Kossa Färbung eine nierentubuli- und gefäßwand-assoziierte Kalzifizierung des verbliebenen Nierengewebes der 5/6-nephrektomierten Interventionsgruppen CKD und CKD-K₂ nach (Von-Kossa positives Färbearéal in %: Co Zeitpunkt 12 Wochen: $0,02 \pm 0,02\%$ vs. CKD Zeitpunkt 12 Wochen: $0,96 \pm 0,23\%$; $p < 0,01$) (Abb. 14).

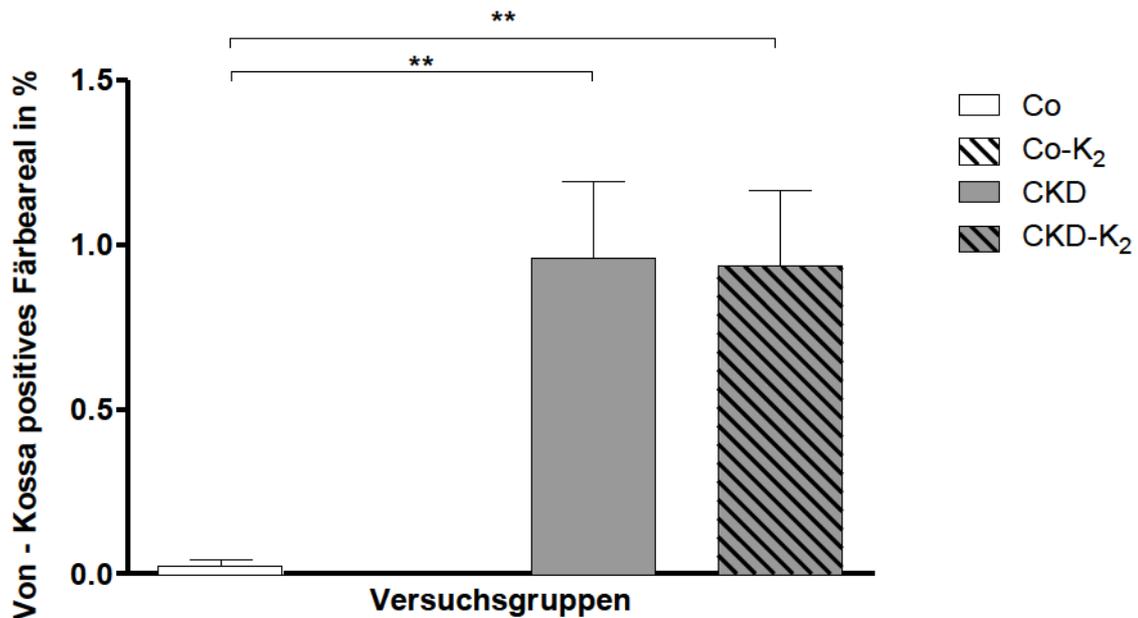


Abb. 14 Renale Kalzifizierung: Von-Kossa positives Färbeareal in Prozent der Gesamtfläche der untersuchten paraffinfixierten Schnittpräparate aus den Nieren der Versuchsgruppen als Mittelwert \pm Standardfehler (Co, Co-K₂, CKD, CKD-K₂) nach zwölfwöchiger Versuchslaufzeit. Die Von-Kossa Färbung dient dem indirekten histologischen Nachweis von Kalziumablagerungen in Geweben.

Die Interventionsgruppen CKD und CKD-K₂ zeigten gegenüber den Kontrollgruppen Co und Co-K₂ ein signifikant größeres Von-Kossa positives Färbeareal.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Das Nierengewebe der Kontrollgruppen zeigte ebenso wie die untersuchten aortalen und myokardialen Gewebeproben aller Versuchsgruppen keine mikroskopisch sichtbaren Kalziumablagerungen (Abb. 15).

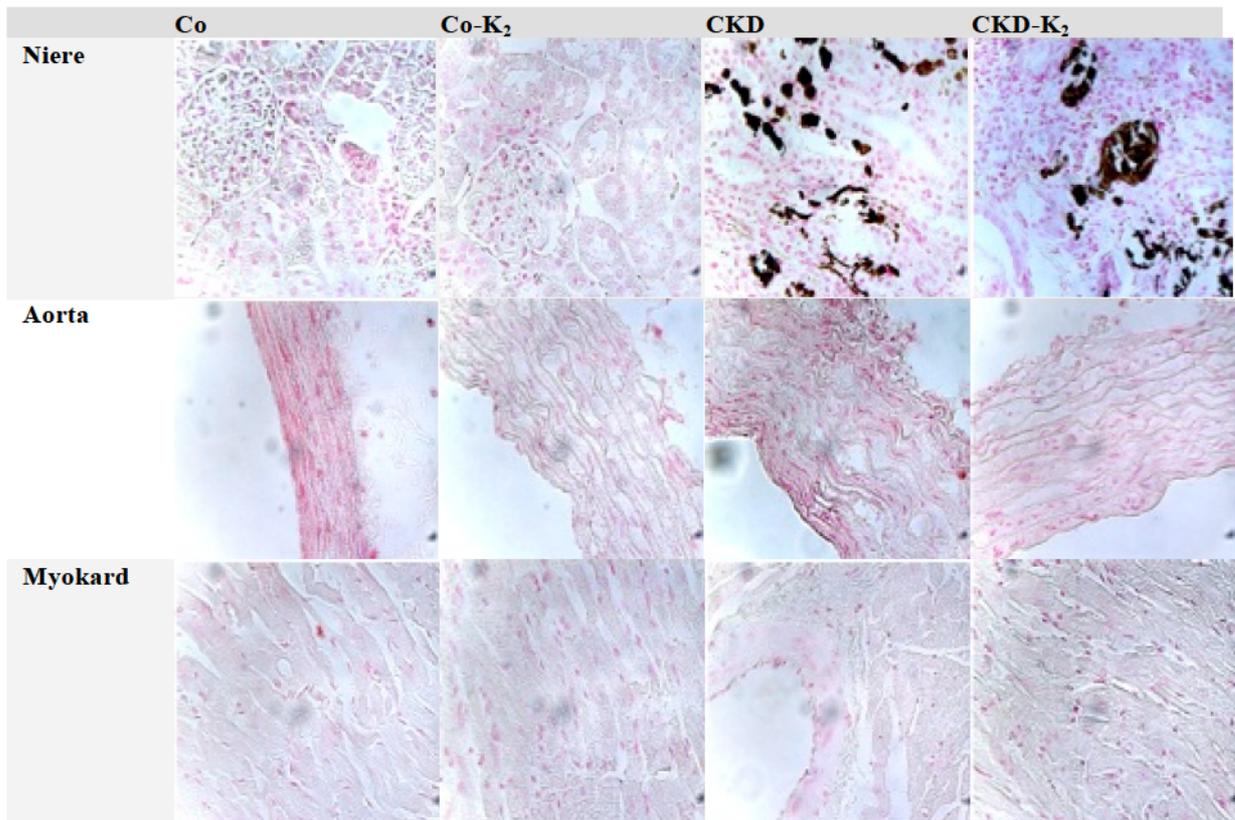


Abb. 15 Repräsentative Ausschnitte der histologischen Von-Kossa Färbung zur Darstellung von Kalziumablagerungen in paraffinfixierten Schnittpräparaten der Organe Niere, Aorta und Myokard der Versuchsgruppen (Co, Co-K₂, CKD, CKD-K₂). Vergrößerung: 40x; Gegenfärbung: Kernechtrot.

In der Von-Kossa Färbung zeigte sich eine mikroskopische nierentubuli- und gefäßwandassoziierte Kalzifizierung des verbliebenen Nierengewebes der 5/6-nephrektomierten Interventionsgruppen CKD und CKD-K₂. Die histologischen Schnittpräparate der Kontrollgruppen Co und Co-K₂ sowie die Schnittpräparate von Aorta und Myokard der Interventionsgruppen zeigte kein Von-Kossa positives Färbeergebnis.

6.4 Strukturelle Gefäßveränderungen bei Niereninsuffizienz und Vitamin K₂ Supplementation

Zur Untersuchung struktureller Auswirkungen der durchgeführten Interventionen auf die Gefäßwände der Versuchstiere untersuchten wir mittels Immunhistochemie verschiedene Proteine der Gefäßwandmatrix.

Die Elastica van Gieson Färbung zur Quantifizierung von Bruchstellen der elastischen Fasern in der Tunica Media als Zeichen einer Schädigung der arteriellen Gefäßwand ergab signifikant mehr Bruchstellen bei den niereninsuffizienten Versuchstieren im Vergleich zu den Kontrollgruppen (Strangbrüche pro Blickfeld bei 40-facher Vergrößerung: Co $0,9 \pm 0,30$ vs. CKD $3,0 \pm 0,8$; $p < 0,001$) (Abb. 16).

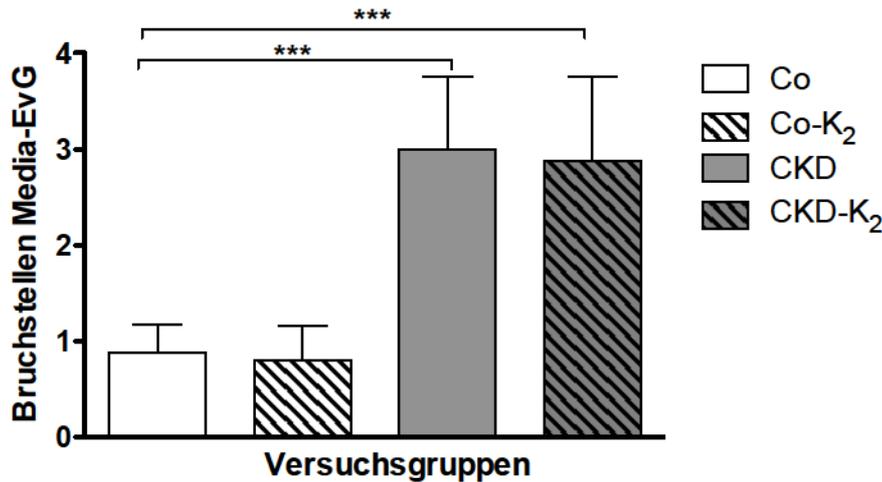


Abb. 16 Darstellung der elastischen Fasern der aortalen Tunica Media mittels Elastica van Gieson Färbung und Quantifizierung der Bruchstellen dieser Fasern pro Gesichtsfeld. Vergrößerung: 40 fach.

Untersucht wurden aortale Gewebeproben der Versuchsgruppen (Co, Co-K₂, CKD, CKD-K₂) nach zwölfwöchiger Versuchslaufzeit. Die Interventionsgruppe CKD und CKD-K₂ wiesen im Vergleich zu den Kontrollgruppen Co und Co-K₂ signifikant mehr Strangbrüche pro Gesichtsfeld der elastischen Fasern in der arteriellen Tunica media auf.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Die Immunfluoreszenzfärbung von Ki67/DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) zeigte eine erhöhte Zellproliferationsrate bei den CKD-Gruppen verglichen mit den Kontrollgruppen (Co $0,00 \pm 0,00\%/mm^2$ vs. CKD $3 \pm 1,4\%/mm^2$, $p < 0,001$) (Abb. 17). Die Untersuchung der Genexpression von SM22 α , einem Protein der gesunden glatten Gefäßmuskulatur, ergab keine deutlichen Unterschiede zwischen den Gruppen.

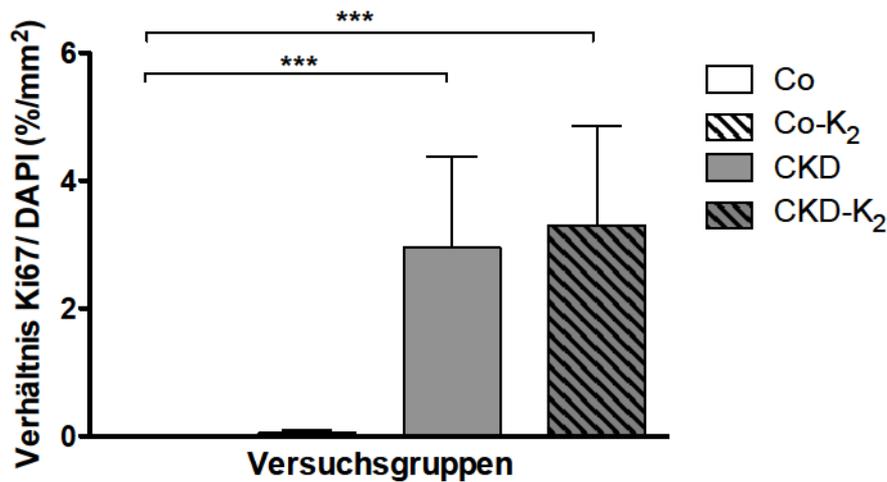


Abb. 17 Positives immunhistochemisches Färbeergebnis für den Zellproliferationsmarker Ki67 in Prozent (%) pro DAPI-positiven Färbearealen als Zellkerndarstellung in Quadratmillimeter (mm²).

Untersucht wurden kryofixiert Schnittpräparate der Aorta der Versuchsgruppen (Co, Co-K₂, CKD, CKD-K₂) nach zwölfwöchiger Versuchslaufzeit. Die Interventionsgruppen CKD und CKD-K₂ zeigten gegenüber den Kontrollgruppen Co und Co-K₂ ein signifikant größeres Ki67 positives Färbeareale je Quadratmillimeter positiver DAPI-Färbung.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Die immunhistochemischen Färbungen von uc- und cMGP in paraffinfixierten Aortenringen aller Tiere ergaben kein positives Färbeergebnis.

6.5 Kardiale Funktion

Die 5/6-nephrektomierten Interventionsgruppen CKD und CKD-K₂ entwickelten im Versuchsverlauf eine arterielle Hypertonie mit zum Zeitpunkt 12 Wochen etwa 15-20 mmHg signifikant höheren systolischen und diastolischen Blutdruckwerten verglichen mit den Kontrollgruppen Co und Co-K₂ (Co 12 Wochen: 121,4 ± 2,1 mmHg vs. CKD 12 Wochen: 142,1 ± 7,6 mmHg, $p < 0,05$; Co-K₂ 12 Wochen: 125,5 ± 3,6 mmHg vs. CKD-K₂ 12 Wochen: 148,2 ± 9,1 mmHg, $p < 0,01$) (Abb. 18/ Tabelle 18).

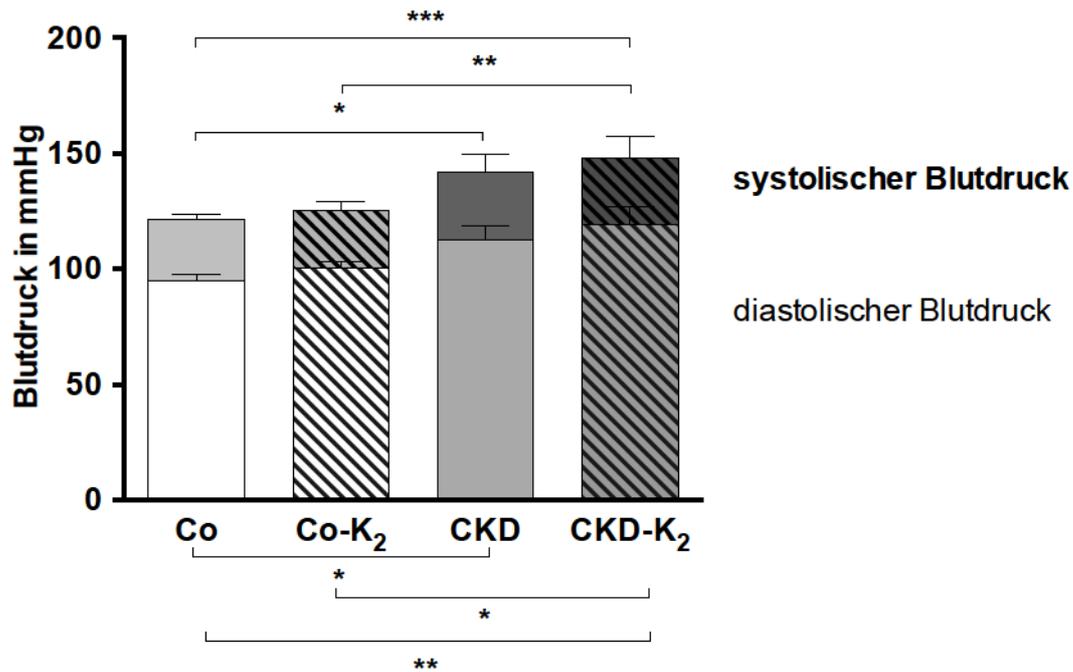


Abb. 18 Systolische und diastolische Blutdruckwerte der Versuchsgruppen. Werte in Mittelwert \pm Standardfehler (Co, Co-K₂, CKD, CKD-K₂) zum Zeitpunkt 12 Wochen in Millimeter Quecksilbersäule (mmHg).

Nach zwölfwöchiger Versuchslaufzeit zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den systolischen und diastolischen Blutdruckwerten der Interventionsgruppen CKD und CKD-K₂ gegenüber den Kontrollgruppen Co und Co-K₂.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Tabelle 18 Blutdruck/ Herzfrequenz/ Gewicht

Zu Versuchsbeginn sowie nach 3, 8 und 12 wöchiger Versuchslaufzeit wurden bei allen Tieren folgende Parameter erhoben: Systolischer Blutdruck (SBD), diastolischer Blutdruck (DBD), arterieller Mitteldruck (MAD), Herzfrequenz (HF) und Gewicht. Dargestellt sind die Werte zu Versuchsbeginn sowie nach 12 Wochen.

	Co	Co-K ₂	CKD	CKD-K ₂
SBD (mmHg)				
Versuchsbeginn	121 \pm 2.3	128 \pm 3.0	127 \pm 5.7	115 \pm 3.4
12 Wochen	121 \pm 2.1	126 \pm 3.6	142 \pm 7.6	148 \pm 9.1
DBD (mmHg)				
Versuchsbeginn	94 \pm 1.8	98 \pm 3.1	100 \pm 5.2	89 \pm 3.9
12 Wochen	95 \pm 2.9	101 \pm 2.6	112 \pm 6.2	119 \pm 7.8
MAD (mmHg)				
Versuchsbeginn	103 \pm 1.9	108 \pm 2.9	109 \pm 4.1	89 \pm 3.9
12 Wochen	104 \pm 2.5	109 \pm 2.8	122 \pm 6.5	122 \pm 8.5
HF (s/min)				
Versuchsbeginn	355 \pm 5.5	372 \pm 4.0	366 \pm 11.0	348 \pm 5.9
12 Wochen	390 \pm 12.0	389 \pm 11.8	407 \pm 12.2	374 \pm 12.0
Gewicht (g)				
Versuchsbeginn	309 \pm 3.5	300 \pm 2.7	305 \pm 2.0	309 \pm 2.1
12 Wochen	451 \pm 13.1	464 \pm 12.2	407 \pm 6.8	410 \pm 7.7

mmHg = Millimeter Quecksilbersäule; s/min = Schläge pro Minute; g = Gramm

Nach zwölfwöchiger Versuchslaufzeit wurden im Rahmen des Finalversuchs alle Tiere echokardiographisch untersucht. Tiere der Interventionsgruppen CKD und CKD-K₂ entwickelten gegenüber Tieren der Kontrollgruppen Co und Co-K₂ eine signifikante konzentrische Herzmuskelhypertrophie mit durchschnittlich etwa 50% höheren diastolischen Durchmessern des interventrikulären Septums (Co 12 Wochen: $0,08 \pm 0,01\text{cm}$ vs. CKD 12 Wochen: $0,12 \pm 0,01\text{cm}$, $p < 0,01$; Co-K₂ 12 Wochen: $0,09 \pm 0,01\text{cm}$ vs. CKD-K₂ 12 Wochen: $0,13 \pm 0,01\text{cm}$, $p < 0,05$) (Abb. 19/ Tabelle 19). Ohne signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen blieben Messungen der kardialen Kontraktilität (EF, FS, SV, Pmean Ao, Pmax Ao, Vmax Ao), sowie Messungen der systolischen und diastolischen linksventrikulären Wanddicke (LVPWS/LVPWD) (Tabelle 19).

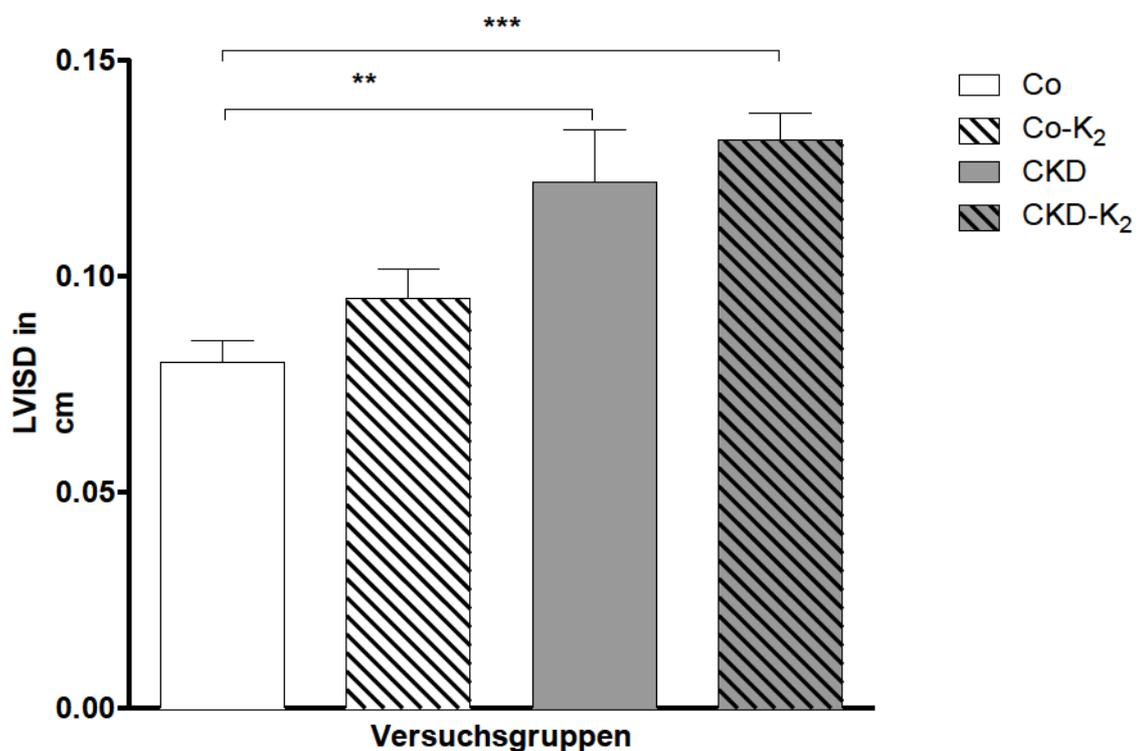


Abb. 19 Echokardiographisch ermittelte diastolische Durchmesser des interventrikulären Septums (LVISD) der Versuchsgruppen als Mittelwert \pm Standardfehler (Co, Co-K₂, CKD, CKD-K₂) nach zwölfwöchiger Versuchslaufzeit in Zentimetern (cm).

Nach zwölfwöchiger Versuchslaufzeit entwickelten Tiere der Interventionsgruppen CKD und CKD-K₂ signifikant größere diastolische interventrikuläre Septumdurchmesser gegenüber den Kontrollgruppen Co und Co-K₂.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Tabelle 19 Echokardiographie

Nach zwölfwöchiger Versuchslaufzeit wurden bei allen Tieren folgende echokardiographische Parameter erhoben: Linksventrikulärer Enddiastolischer Durchmesser (LVEDD), Linksventrikulärer Endsystolischer Durchmesser (LVESD), systolischer Durchmesser des interventrikulären Septums (LVISS), diastolischer Durchmesser des interventrikulären Septums (LVISD), diastolische Dimension der linksventrikulären Hinterwand (LVPWS), Linksventrikuläre Funktion (LVF), Verkürzungsfunktion (FS), Schlagvolumen (SV), Druckgradient über der Aortenklappe (Pmax Ao).

	Co	Co- K ₂	CKD	CKD- K ₂
LVEDD (cm)				
12 Wochen	0.6 ± 0.02	0.6 ± 0.03	0.7 ± 0.03	0.6 ± 0.02
LVESD (cm)				
12 Wochen	0.3 ± 0.02	0.3 ± 0.03	0.3 ± 0.03	0.3 ± 0.03
LVISS (cm)				
12 Wochen	0.2 ± 0.01	0.2 ± 0.01	0.3 ± 0.01	0.3 ± 0.02
LVISD (cm)				
12 Wochen	0,1 ± 0,01	0,1 ± 0,01	0,1 ± 0,01	0,1 ± 0,01
LVPWS (cm)				
12 Wochen	0.3 ± 0.01	0.3 ± 0.01	0.3 ± 0.02	0.3 ± 0.02
LVF (%)				
12 Wochen	86 ± 2.3	83 ± 3.5	84 ± 2.8	84 ± 3.4
FS (%)				
12 Wochen	52 ± 2.8	48 ± 3.4	50 ± 3.0	53 ± 6.7
SV (ml/min)				
12 Wochen	0.4 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.0
Pmax Ao (mmHg)				
12 Wochen	9 ± 1.8	8 ± 0.9	7 ± 0.8	9 ± 0.4
Vmax Ao (m/s)				
+ 12 Wochen	1.5 ± 0.1	1.4 ± 0.1	1.5 ± 0.1	1.5 ± 0.0

cm = Zentimeter; mmHG = Millimeter Quecksilbersäule; m/s = Meter pro Sekunde

6.6 Quantitative mRNA Analyse

Zur Analyse der Auswirkung von CKD-Induktion sowie der Fütterung der Vitamin K₂-reichen Diät verglichen wir prototypische Aktivatoren und Inhibitoren der extraossären Kalzifizierung der aortalen Gefäßwand auf mRNA Ebene. Wir stellten das mRNA Repertoire der CKD- und Co-Versuchsgruppe gegenüber, um den genregulatorischen Einfluss der induzierten Niereninsuffizienz zu ermitteln. Dabei ergaben sich etwa mit dem Faktor -2 tendenziell geringere MGP-Genexpressionslevel für die CKD-Versuchsgruppe (MGP-Genexpression: CKD vs. Co: -2,18 ± 0,34 - fache Induktion, ns) und mit dem Faktor -3 signifikant geringere Expressionslevel des für glatte Gefäßmuskelzellen spezifischen SM22 α in dieser Gruppe (SM22 α -Genexpression: CKD vs. Co: -2,97 ± 0,25 - fache Induktion, $p < 0,01$). Demgegenüber fanden wir eine gesteigerte mRNA Expression für Periostin (Periostin-Genexpression: CKD vs. Co: 1,26 ± 0,33-fache Induktion, ns) und BMP-2 (BMP-2-Genexpression: CKD vs. Co: 1,72 ± 1,53-fache Induktion, ns) in der CKD-Versuchsgruppe. Bei der Analyse der mRNA-Expressionslevel für GGCX, dem entscheidenden Enzym für die Erzeugung von kalzifizierungsinhibitorisch wirksamen cMGP, und VKORC, einem wichtigen Enzym des Vitamin K-Zyklus zeigten, sich leicht

reduzierte Expressionslevel in der CKD-Versuchsgruppe verglichen mit Tieren der Co-Gruppe (GGCX-Genexpression: CKD vs. Co: $-1,14 \pm 0,11$ - fache Induktion, ns; VKOR-Genexpression: CKD vs. Co: $-1,49 \pm 0,20$ -fache Induktion, ns) (Abb. 20).

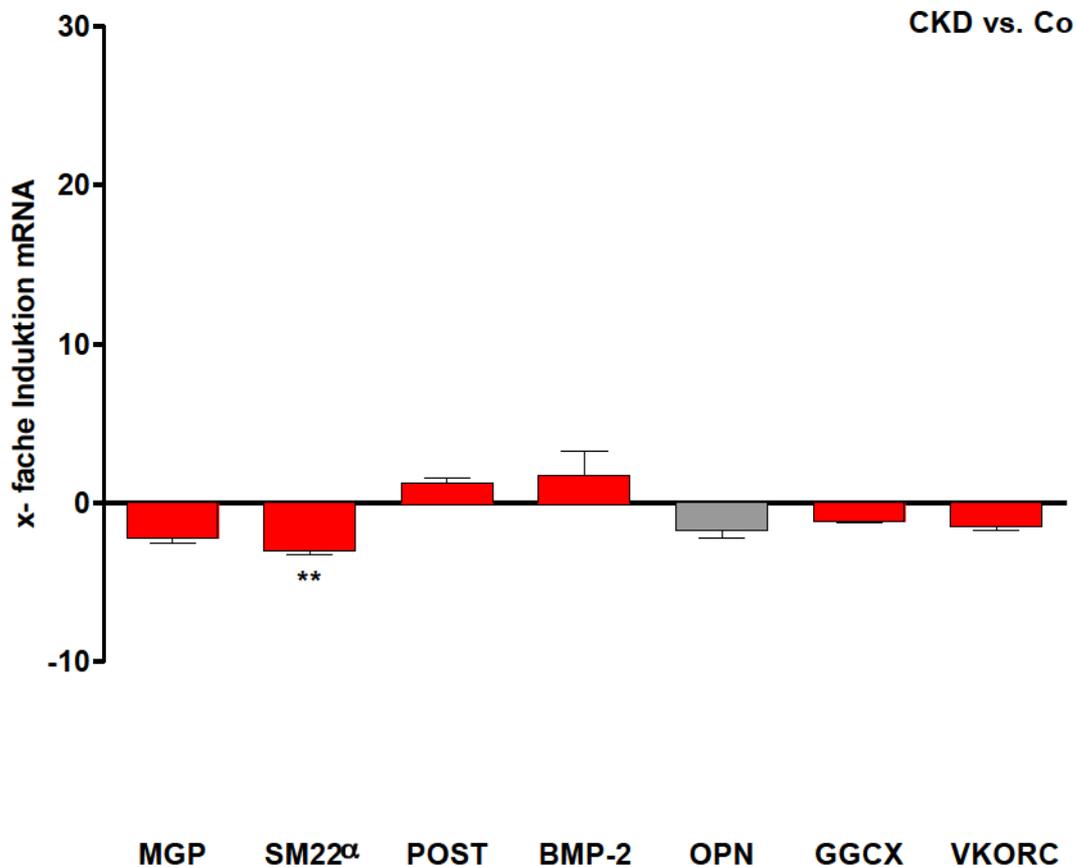


Abb. 20 Einfluss der Niereninsuffizienz auf die aortale Genexpression: Relative Genexpression der CKD Interventionsgruppe als x-fache mRNA Induktion im Verhältnis zur Genexpression der Co Kontrollgruppe.

Untersucht wurden die mRNA Expressionslevel für das Matrix Gla Protein (MGP), SM22 α , Periostin (POST), BMP-2, Osteopontin (OPN), γ -Glutamatkarboxylase (GGCX) und Vitamin K - Epoxidreduktase (VKOR) als x-faches der mRNA Induktion in aortalen Gewebeproben nach zwölfwöchiger Versuchslaufzeit. Rot dargestellt sind Veränderungen der Genexpression im Sinne eines erhöhten Risikos für die Entstehung von vaskulärer Kalzifizierung. Die Bedeutung des grau dargestellten Osteopontins ist nicht endgültig verstanden. Die CKD Interventionsgruppe weist im Verhältnis zur Co Gruppe signifikant reduzierte SM22 α -mRNA Konzentrationen, sowie tendenziell geringere MGP mRNA Konzentrationen auf. Dieses signalisiert, wie auch tendenziell gesteigerte Periostin und BMP-2 Konzentrationen, ein potentiellen erhöhtes Risiko für die Entstehung von vaskulärer Kalzifizierung.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Im Vergleich der mRNA-Konzentrationen der Co-K₂ Versuchsgruppe mit Tieren der Co-Gruppe zur Analyse des genregulatorischen Effektes der alimentären Vitamin K₂-Supplementation, beobachteten wir gegenläufige Effekte: Die Expression des MGP-Gens war in der Vitamin K₂ substituierten Kontrollgruppe signifikant und mehr als zehnfach

gesteigert gegenüber Tieren der Co Gruppe (MGP-Genexpression: Co - K₂ vs. Co: 11,4 ± 11,97-fache Induktion, $p < 0,05$). Eine geringe Steigerung um den Faktor 3,75 konnte auch für die SM22 α -Genexpressionslevel gemessen werden (SM22 α -Genexpression: Co-K₂ vs. Co: 3,75 ± 3,16-fache Induktion, ns). Die Expressionslevel des Periostin-Gens zeigten sich in der Co-K₂ Kontrollgruppe um den Faktor -6 signifikant niedriger als in der Co-Versuchsgruppe (Periostin-Genexpression: Co - K₂ vs. Co: -6,08 ± 0,13-fache Induktion, $p < 0,01$). Die mRNA-Level des BMP-2 Gens waren in der Co-K₂ Versuchsgruppe tendenziell niedriger als bei Tieren der Co-Gruppe (BMP-2-Genexpression: Co-K₂ vs. Co: -2,15 ± 0,38-fache Induktion, ns). Die Expressionslevel von GGCX (GGCX-Genexpression: Co-K₂ vs. Co: -1,41 ± 0,51-fache Induktion, ns) und VKORC (VKOR-Genexpression: Co-K₂ vs. Co: -1,97 ± 0,36-fache Induktion, ns) der Co-K₂ Gruppe zeigten keine relevanten Abweichungen zur Con I Gruppe (Abb. 21).

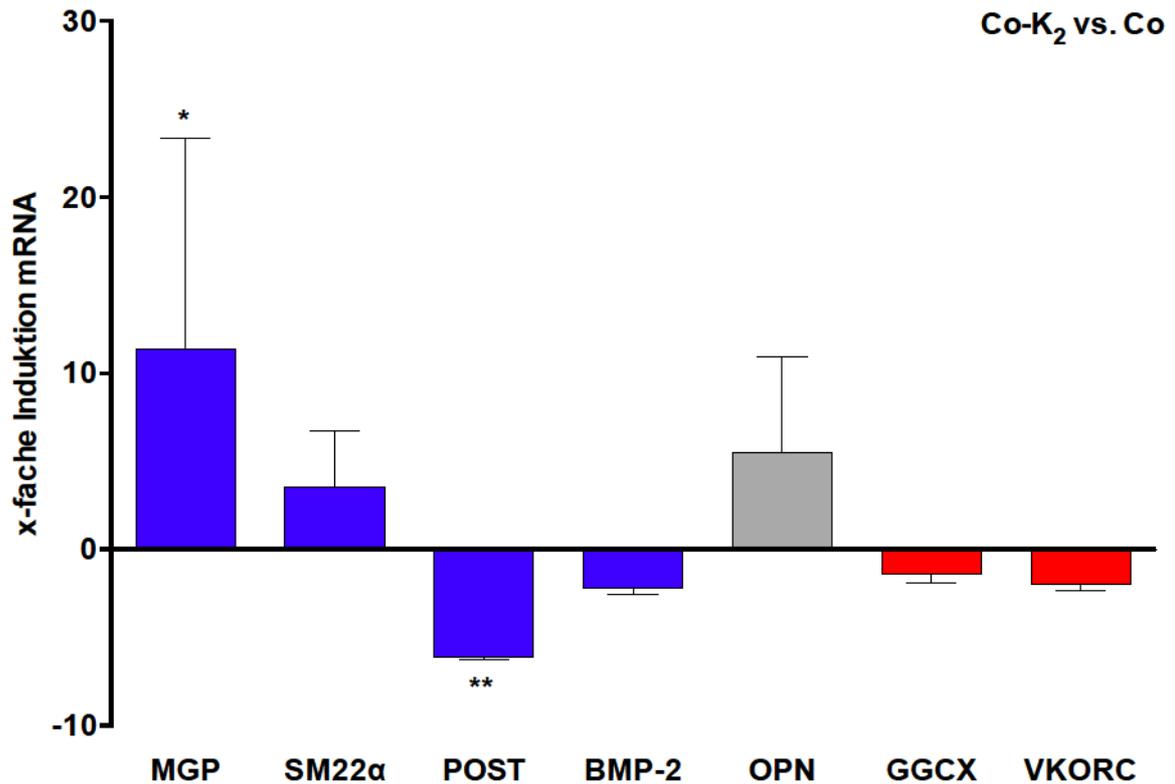


Abb. 21 Einfluss der Vitamin K₂ Supplementationsa auf die aortale Genexpression: Relative Genexpression der Co-K₂ Kontrollgruppe als x-fache mRNA Induktion im Verhältnis zur Genexpression der Co Kontrollgruppe.

Untersucht wurden die mRNA Expressionslevel für das Matrix Gla Protein (MGP), SM22α, Periostin (POST), BMP-2, Osteopontin (OPN), γ-Glutamatkarboxylase (GGCX) und Vitamin K-Epoxidreduktase (VKOR) als x-faches der mRNA Induktion in aortalen Gewebeproben nach zwölfwöchiger Versuchslaufzeit. Blau dargestellt sind Veränderungen der Genexpression im Sinne eines Schutzes vor vaskulärer Kalzifizierung. Rot dargestellt sind Kalzifizierungs-fördernde Veränderungen. Die Bedeutung des grau dargestellten Osteopontins ist nicht endgültig verstanden. Die Vitamin K₂ substituierte Kontrollgruppe Co-K₂ weist im Verhältnis zur Co Gruppe signifikant gesteigerte MGP-mRNA Konzentrationen, sowie signifikant geringere Periostin mRNA Konzentrationen auf. Dieses signalisiert, wie auch tendenziell gesteigerte SM22α und reduzierte BMP-2 Konzentrationen, einen potentiellen Schutz vor vaskulärer Kalzifizierung.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Die CKD-Induktion in der CKD Versuchsgruppe sowie die Supplementation von Vitamin K₂ bei Tieren der Co-K₂ Gruppe führte verglichen mit der Co-Gruppe zu erheblichen Veränderungen des mRNA Repertoires der untersuchten Aorten. Von besonderem Interesse ist die Beobachtung, dass CKD-Induktion und Vitamin K₂-Supplementation einen gegensätzlichen Effekt auf die mRNA Konzentrationen von MGP, SM22α, Periostin und BMP-2 zeigten. Entscheidend für die These: „Vitamin K₂ Supplementation beeinflusst die Genexpression wichtiger kalzifizierungsregulatorischer Proteine innerhalb der arteriellen Gefäßwand.“ sind die Beobachtungen der Genexpressionslevel in der CKD-K₂-

Versuchsgruppe. Tiere dieser Versuchsgruppe erhielten zwei Wochen nach Versuchsbeginn eine alimentäre Vitamin K₂ Supplementation. Die Analyse der mRNA Konzentrationen für MGP, SM22 α , Periostin, BMP-2, GGCX und VKORC in dieser Versuchsgruppe zeigte ein deutliches Überwiegen der genregulatorischen Effekte durch Vitamin K₂-Supplementation gegenüber den genregulatorischen Effekte durch CKD-Induktion. Verglichen mit der Co-Gruppe zeigten Tiere der CKD-K₂ Versuchsgruppe um mehr als den Faktor 9 signifikant gesteigerte MGP-Genexpressionslevel (MGP-Genexpression: CKD-K₂ vs. Co: $9,22 \pm 9,89$ -fache Induktion, $p < 0,05$) und eine leicht gesteigerte Expression des SM22 α Gens (SM22 α -Genexpression: CKD-K₂ vs. Co: $1,70 \pm 1,48$ -fache Induktion, ns). Die Genexpressionslevel für Periostin (Periostin-Genexpression: CKD-K₂ vs. Co: $-3,56 \pm 0,22$ -fache Induktion, ns) und BMP-2 (BMP-2-Genexpression: CKD - K₂ vs. Co: $-1,21 \pm 0,67$ - fache Induktion, ns) präsentierten sich in diesem Kollektiv niedriger als in der Kontrollgruppe Con I. Die mRNA Expression von GGCX (GGCX-Genexpression: CKD-K₂ vs. Co: $-1,15 \pm 0,58$ -fache Induktion, ns) und VKORC (VKOR-Genexpression: CKD-K₂ vs. Co: $-1,95 \pm 0,34$ - fache Induktion, ns) der CKD-K₂ Gruppe zeigte keine relevanten Abweichungen zur Co Gruppe.

Diese interventionsbedingten Änderungen der Genexpressionslevel in der CKD-K₂ Versuchsgruppe ähneln denen der Co-K₂ Gruppe. Die bei Tieren der CKD Gruppe beobachtete Änderungen der Genexpressionslevel für die genannten Gene spiegelten sich in der CKD-K₂ Gruppe nicht wieder (Abb.22).

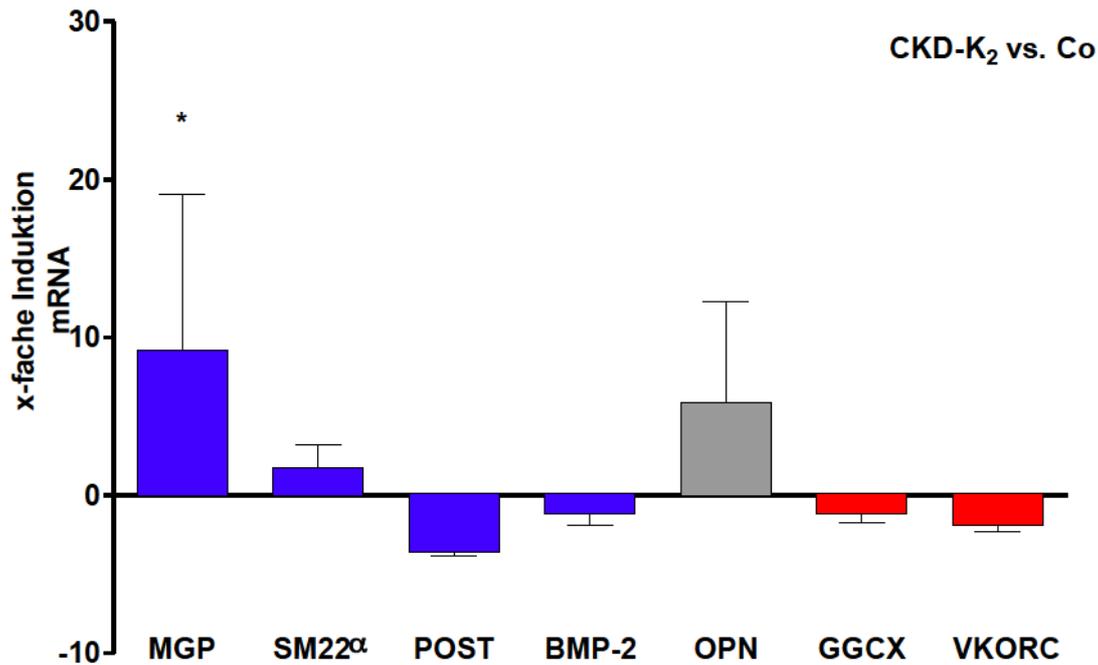


Abb. 22 Einfluss der Vitamin K₂ Supplementation auf die aortale Genexpression bei Niereninsuffizienz: Relative Genexpression der CKD-K₂ Kontrollgruppe als x-fache mRNA Induktion im Verhältnis zur Genexpression der Co Kontrollgruppe.

Untersucht wurden die mRNA Expressionslevel für das Matrix Gla Protein (MGP), SM22 α , Periostin (POST), BMP-2, Osteopontin (OPN), γ -Glutamatkboxylase (GGCX) und Vitamin K-Epoxidreduktase (VKOR) als x-faches der mRNA Induktion in aortalen Gewebeproben nach zwölfwöchiger Versuchslaufzeit. Blau dargestellt sind Veränderungen der Genexpression im Sinne eines Schutzes vor vaskulärer Kalzifizierung. Rot dargestellt sind Kalzifizierungs-fördernde Veränderungen. Die Bedeutung des grau dargestellten Osteopontins ist nicht endgültig verstanden. Die Vitamin K₂ substituierte Interventionsgruppe CKD-K₂ weist im Verhältnis zur Co Gruppe signifikant gesteigerte MGP-mRNA Konzentrationen, sowie tendenziell gesteigerte SM22 α mRNA Konzentrationen auf. Dieses signalisiert, wie auch tendenziell reduzierte Periostin und BMP-2 Konzentrationen einen potentiellen Schutz vor vaskulärer Kalzifizierung.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Entgegen Beschreibungen der Literatur konnte keine Steigerung, sondern eine reduzierte Expression des OPN-Gens in der CKD Gruppe verglichen mit der Co Gruppe beobachtet werden. Die Vitamin K₂ substituierten Versuchsgruppen Co-K₂ und CKD-K₂ hingegen zeigten im Vergleich zur Co Gruppe eine tendenzielle Steigerung der Genexpressionslevel für OPN.

Die Genexpression des für die Osteoblastendifferenzierung und Knochenentwicklung wichtigen Transkriptionsfaktor RunX2 konnte in der Realtime-PCR nicht nachgewiesen werden.

7 Diskussion

Extraossäre Kalziumablagerungen stellen einen entscheidenden pathophysiologischen Faktor in der Entstehung vieler kardiovaskulärer Erkrankungen dar. Sie gehen einher mit einer erheblich gesteigerten kardiovaskulären Morbidität und Mortalität. Ziel unserer Untersuchung war die Evaluation des therapeutischen Nutzens einer prophylaktischen oralen Vitamin K₂ Supplementation in einem murinen Modell der kardiovaskulären Kalzifizierung zur Verhinderung extraossärer Verkalkungen.

7.1 Eine Vitamin K₂ Supplementation inhibiert die Entstehung der kardiovaskulären Kalzifizierung

7.1.1 CKD Effekt

5/6 Nephrektomie und phosphatreiche Diät resultierten bei Tieren der Interventionsgruppen CKD und CKD-K₂ in etwa 50% erhöhten Serumkreatinin- und Blut-Harnstoff-Stickstoffkonzentrationen verglichen zu den Tieren der Kontrollgruppen. Auch die Kreatinin-Clearance, als Surrogatmarker der GFR, zeigte sich in diesen Gruppen signifikant erniedrigt. Die Entwicklung dieser Parameter erlaubt die Feststellung einer erfolgreich induzierten chronischen Niereninsuffizienz. Das Ausmaß der induzierten Nierenschädigung sei orientierend an den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen diskutiert: Shobeiri et al. 2010 (Shobeiri et al., 2010) verglichen in einem Review verschiedene murine Modelle zur Induktion einer vaskulären Kalzifizierung. Dabei verglichen sie unterschiedliche Protokolle der 5/6 Nephrektomie mit der Induktion von vaskulärer Kalzifizierung durch eine orale Supplementation von Adenin. Entsprechend der humanen CKD-Progression geht die Nierenschädigung im murinen Modellen einher mit gesteigerten Plasmakreatinin- und Blut-Harnstoff-Stickstoffkonzentrationen sowie einer Hyperphosphatämie (Shobeiri et al., 2010).

Shoberie beschreibt für 5/6 nephrektomierte Ratten unterschiedlicher Protokolle acht Wochen nach dem letzten operativen Eingriff einen durchschnittlichen Anstieg der Serumkreatininlevel um den Faktor 2,2 verglichen mit Kontrolltieren. Die Kreatininkonzentrationen unserer Interventionsgruppen CKD und CKD-K₂ unterschied sich nach zwölfwöchiger Versuchslaufzeit mit dem Faktor 1,4 geringer von den Kontrollgruppen. Entsprechende Tendenzen lassen sich bezüglich der Blut-Harnstoff-Stickstoffkonzentrationen und Kreatinin-Clearance beobachten. Sowohl in Arbeitsgruppen

mit ähnlichen Versuchsprotokollen (Jara et al., 2000), als auch in Gruppen mit alternativen Methoden zur CKD-Induktion, beispielsweise durch Adenin-Supplementation (Shobeiri et al., 2010), entwickelten die Versuchstiere durchschnittlich höhere Kreatinin und Blutharnstoff-Stickstoffkonzentrationen als in unserem Modell. Dabei lassen sich die abweichenden Resultate verglichen zu Adenin-Supplementationsprotokollen auf eine fortwährende Nierenschädigung durch einen direkt nephrotoxischen Effekt der kontinuierlichen Adenin-Fütterung zurückführen. Auch die Reduktion der Kreatinin-Clearance als Folge der 5/6 Nephrektomie ist in den genannten Studien ausgeprägter als in unserem Versuch (Jara et al., 2000, Fleck et al., 2006).

Der Vergleich der Nierenfunktionsparameter offenbart die erfolgreiche Induktion einer milden Nierenschädigung in unserem Versuchsaufbau. Ursächlich hierfür ist die von uns gewählte Technik der 5/6 Nephrektomie nach Perez-Ruiz et al. 2006, bei der nach kompletter Nephrektomie rechts die linksseitige 2/3 Nephrektomie durch Ligation des oberen und unteren Nierenpols vollzogen wird (Perez-Ruiz et al., 2006). Die von Shobeiri et al. 2010 verglichenen Protokolle der 5/6 Nephrektomie, sowie die erwähnten Protokolle von Jara et al. 2000 und Appentoth et al. 2006 bedienten sich einer chirurgischen Resektion der Nierenpole oder einer Infarzierung der nierenpolversorgenden Äste der Arteria renalis durch Embolisation oder Ligation (Shobeiri et al., 2010, Fleck et al., 2006, Jara et al., 2000). Durch unilaterale Nephrektomie und Ligation der verbliebenen Nierenpole erzeugten auch Perez-Ruiz et al. nach achtwöchiger Versuchslaufzeit eine vergleichsweise milde Niereninsuffizienz. So unterschieden sich Plasmakreatininwerte mit einem Kreatininanstieg von etwa 50% und die Kreatinin-Clearance mit einer Abnahme von etwa 50% zwar signifikant von den Kontrolltieren, dieser Unterschied war jedoch deutlich geringer als bei den bereits genannten Arbeiten (Perez-Ruiz, Ros-Lopez et al. 2006).

Erwartungsgemäß entwickelte sich die Gewichtszunahme der bei Versuchsbeginn nicht ausgewachsenen Ratten in den Interventionsgruppen signifikant langsamer als bei den Kontrolltieren. Eine reduzierte Gewichtsentwicklung als Folge der 5/6 Nephrektomie wurde bereits von vielen Arbeitsgruppen beobachtet, beispielsweise sei die Arbeit von Fleck et al. 2006 genannt (Fleck et al., 2006). Malnutrition ist eine häufige Beobachtung bei niereninsuffizienten Patienten. Sie gilt als Folge einer chronischen Inflammation und ist verbunden mit einem Progress bestehender Infektionen, Herzinsuffizienz und Atherosklerose (Pecoits-Filho et al., 2002).

Die Untersuchungen der Hämoglobin- und Hämatokritwerte aller Tiere ergab keine für die fortgeschrittene Niereninsuffizienz typische Anämie mit reduzierten Hämoglobin- und

Hämatokritwerten (Kazmi, Kausz et al. 2001). El-Achkar et al. zeigten in einer groß angelegten epidemiologischen Studie den Zusammenhang zwischen GFR und dem Auftreten einer Anämie. Dabei konnte eine Anämie lediglich bei 7,9% der Patienten mit CKD Stadium III, jedoch bei 50% der Patienten mit CKD Stadium IV und V nachgewiesen werden (El-Achkar et al., 2005). Die konstanten Hämoglobin- und Hämatokritwerte aller Versuchstiere unserer Untersuchung unterstützt die Beobachtung einer diskreten induzierten chronischen Niereninsuffizienz.

Zusammenfassend initiierten wir in der vorliegenden Studie eine milde Niereninsuffizienz und schufen in den Interventionsgruppen somit zusammen mit der Supplementation einer phosphatreichen Diät eine zu kardiovaskulärer Kalzifizierung prädisponierte Stoffwechsellage. Es gilt zu beachten, dass die Vitamin K₂ Supplementation in der CKD-K₂ Versuchsgruppe keinen Einfluss auf die Entstehung einer Niereninsuffizienz mit entsprechenden Folgeschäden nahm.

7.1.2 Extraossäre Kalzifizierung

Niereninsuffizienz und phosphatreiche Diät induzierten bei Tieren der Interventionsgruppe CKD die Entstehung von extraossärer Kalzifizierung. Diese wiesen wir in aortalen Gewebeproben mittels Atomabsorptions-Spektrometrie nach, einem sensitiven Verfahren zur Erfassung von extraossären Kalziumablagerungen (Ng et al., 2011, Kieffer et al., 2000).

Die immunhistochemische Färbung der alkalischen Phosphatase in aortalen Gewebeschnitten ergab ein signifikant stärkeres Färberesultat in der niereninsuffizienten Versuchsgruppe CKD verglichen zur Kontrollgruppe (Abb.12). Die alkalische Phosphatase gilt als phänotypischer Marker für Osteoblasten (Shioi et al., 2002, Whyte et al., 1996). Ihr gehäuftes Auftreten in den Gewebeproben der CKD-Versuchsgruppe weist auf eine Transdifferenzierung der VSMC zu Osteoblasten-ähnlichen Zellen hin, die vielfach für die Entstehung extraossärer Kalziumablagerungen beschrieben ist (Kendrick and Chonchol, 2011).

Um das von uns gewählte Tiermodell zum Einfluss der Vitamin K₂ Supplementation auf die Entstehung von kardiovaskulärer Kalzifizierung möglichst nah anzulehnen an die langsame Entwicklung von extraossären Verkalkungen im Rahmen des Alterungsprozesses, sowie Erkrankungen wie Diabetes mellitus oder CKD im Menschen, induzierten wir in den Interventionsgruppen CKD und CKD-K₂ einen moderaten

Kalzifizierungsdruck. Eine ausgeprägte vaskuläre Kalzifizierung mit mikroskopischem Nachweis von Kalziumablagerungen mittels Von-Kossa Färbung, ließ sich in unseren Interventionsgruppen nicht nachweisen. In der Literatur sind verschiedene Protokolle zur Induktion von vaskulärer Kalzifizierung beschrieben. Diese unterscheiden sich neben den Techniken zur Erzeugung eines erhöhten Kalzifizierungsdruckes insbesondere durch unterschiedliche Schweregrade der erzeugten vaskulären Kalziumablagerungen. In der Studie von Kieffer et al. 2000 konnte für alternde Versuchstiere eine beginnende vaskuläre Kalzifizierung mit leicht erhöhten vaskulären Kalziumkonzentrationen in der AAS ohne histologischen Nachweis von Gefäßkalk für zwei Jahre alten Ratten nachgewiesen werden (Kieffer et al., 2000). Andere Autoren wählten wie wir das Modell der 5/6 Nephrektomie in Kombination mit unterschiedlichen Diäten zur Erzeugung von vaskulärer Kalzifizierung. Ejerblad et al. 1979 konnte für 5/6 nephrektomierte Versuchstiere unter phosphatreicher Diät diskrete Kalziumablagerungen nach 12 wöchiger Versuchslaufzeit, sowie ausgeprägte Von-Kossa positiven Gefäßverkalkungen nach 36 Wochen beobachten (Ejerblad et al., 1979). Auf Grund eines guten Kompromisses aus Versuchsdauer und dem erwünschten Resultat einer diskreten Kalzifizierung, entschieden wir uns in der vorliegenden Studie für einen ähnlichen Versuchsaufbau. Viele Arbeiten mit *Knockout*-Tieren, beispielsweise sei die Arbeit von Westenfeld et al. 2009 genannt, in der bei Fetuin-A defizienten Mäusen eine CKD induziert wurde, resultierten in ausgeprägten vaskulären Kalzifizierungen mit deutlichem mikroskopischen Nachweis von Kalkablagerungen (Westenfeld et al., 2009). Welches Ausmaß der im Modell künstlich erzeugte Kalzifizierungsdruck für Gewebe annehmen kann, wird bei der Betrachtung von MGP-defizienten Versuchstieren deutlich, die alle innerhalb kurzer Zeit durch die Ruptur kalzifizierter Gefäße versterben (Luo et al., 1997). Ein solches Modell unterscheidet sich erheblich von der Pathophysiologie der vaskulären Kalzifizierung im Menschen, die Möglichkeit zur Übertragung von Erkenntnissen und Therapiestrategien auf den Menschen sind eingeschränkt. Die Vorteile des von uns gewählten Modelles mögen auch darin bestehen, dass wir in der Lage sind, die Pathomechanismen in den Frühstadien der Kalzifizierung mit chemisch erhöhter Kalziumkonzentration ohne Von-Kossa Positivität zu untersuchen und zu therapieren.

Im myokardialen Geweben der niereninsuffizienten Versuchsgruppe CKD konnten wir analog zur Aorta mittels AAS im Vergleich zur Kontrollgruppe Co signifikant erhöhte Kalziumkonzentrationen nachweisen (Abb. 13). Mikroskopisch ließen sich für

myokardiale Gewebeproben aller Versuchsgruppen keine Von-Kossa positiven Kalziumablagerungen feststellen (Abb. 15). Dies entspricht den Untersuchungen von Kuwahara et al. 2014, die bei 4/5 Nephrektomierten Ratten auch nach 15 wöchiger Versuchslaufzeit keine myokardiale, Von-Kossa positive mikroskopische Verkalkung nachwies (Kuwahara et al., 2014). Entsprechend der diskreten vaskulären Kalzifizierung von alternden Ratten, konnte auch für myokardiale Gewebeproben von 2 Jahre alten Versuchsratten eine beginnende Kalzifizierung mit einigen Von-Kossa positiven Arealen ohne signifikanten Unterschied zu jüngeren Kontrolltieren nachgewiesen werden (Roosens et al., 2012, Kieffer et al., 2000). Aus welchem Grund 5/6 nephrektomierte Versuchstiere in einer Studie von Rahman et al. 2010 nach nur fünfwöchiger Versuchslaufzeit ohne Zusatz einer Kalzifizierungs-induzierenden Diät mikroskopisch deutliche myokardiale Kalziumablagerungen bildeten, ist unklar (Rahman, Kim et al. 2010).

Vitamin K₂ Effekt

Als zentrale Beobachtung der vorliegenden Studie konnten wir für Tiere der Interventionsgruppe CKD-K₂, die sich bei identischem Versuchsprotokoll nur durch die orale Supplementation von Vitamin K₂ von der CKD Gruppe unterschieden, ein Ausbleiben der AAS positiven vaskulären Kalzifizierung sowohl in den untersuchten aortalen als auch myokardialen Gewebe feststellen. Die fehlende Kalzifizierung der CKD-K₂ Gruppe weist auf eine protektive Wirkung der oralen Vitamin K₂ Supplementation vor extraossären Kalziumablagerungen in einer zu vaskulärer Kalzifizierung prädisponierten Stoffwechsellage hin. Damit konnten wir mit der vorliegenden Studie erstmalig für ein murines Modell der operativ induzierten chronischen Niereninsuffizienz den protektiven Einfluss der Vitamin K₂ Supplementation auf die Entstehung von vaskulärer Kalzifizierung nachweisen.

Unsere Ergebnisse unterstützen die Rationale einer prophylaktischen Vitamin K₂-Supplementation bei niereninsuffizienten Patienten zum Schutz vor vaskulärer Kalzifizierung. Da sich für die Supplementation von Vitamin K sowohl im tierexperimentellen Modell, als auch in humanen Substitutionsstudien keine toxischen Effekte beobachten ließen, gilt die Therapie mit Vitamin K als ausgesprochen sicher (Geleijnse et al., 2004, Beulens et al., 2009, Pucaj et al., 2011).

Unsere Ergebnisse unterstützen die Beobachtungen anderer Autoren. Das Matrix Gla Protein ist ein potenter Inhibitor der vaskulären Kalzifizierung, wobei lediglich die Vitamin-K-karboxylierte Form dieses Proteins kalzifizierungsinhibierend wirkt (Murshed

et al., 2004, Schurgers et al., 2008b). Hohe Dosen von Vitamin K Antagonisten führen im murinen Modelle zur Entstehung von vaskulärer Kalzifizierung (Price et al., 1998, Kruger et al., 2013). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die alimentäre Supplementation hoher Mengen Vitamin K in der Lage ist, eine Regression der Marcumar-induzierten vaskulären Kalzifizierung zu bewirken (Schurgers et al., 2007a). Vaskuläre Kalzifizierung tritt besonders ausgeprägt bei Patienten mit chronischen Nierenerkrankungen und Dialysepflichtigkeit auf. Für diese Patientengruppen konnte ein persistierender Vitamin K-Mangel sowie erhöhte Plasmaspiegel des biologisch inaktiven ucMGP festgestellt werden (Pilkey et al., 2007a, Holden et al., 2010, Schurgers et al., 2010). Westenfeld et al. 2012 (Westenfeld et al., 2012) konnten in einer Gruppe von Hämodialysepatienten zeigen, dass die Vitamin K₂-Supplementation die erhöhten dp-ucMGP Plasmaspiegel signifikant senken kann, eine Supplementationstherapie also tatsächlich Einfluss auf den Karboxylierungszustand des MGP nimmt.

Vor diesem Hintergrund war zu erwarten, dass im murinen Modell nicht nur die durch Vitamin K-Antagonisten, sondern auch eine CKD-induzierte vaskuläre Kalzifizierung durch Vitamin K-Supplementation reduziert, beziehungsweise in der Entstehung gehemmt werden kann. Diese Überlegung konnte in der vorliegenden Studie weiter unterstützt werden. Ob sich die Ergebnisse des murinen Modells tatsächlich auf Patienten übertragen lassen, ist Gegenstand der aktuell durchgeführten VitaVasK Studie (EudraCT No.: 2010-021264-14). In Kooperation mit der Abteilung für Nephrologie und Immunologie der RWTH Aachen untersuchen wir in einer Multicenter Studie an 348 Hämodialysepatienten, inwiefern die Vitamin K-Supplementation die Progression von koronarer- sowie aortaler Kalzifizierung beeinflusst (Krueger et al., 2013).

Renale Kalzifizierung

In den renalen Gewebeproben beider Interventionsgruppen CKD und CKD-K₂ konnten wir ausgeprägte Verkalkungen feststellen (Abb. 14). Dabei zeigte sich die Kalzifizierung mikroskopisch insbesondere im Bereich der Nierentubuli. Eine zuvor für aortale und myokardiale Gewebe beschriebene protektive Wirkung der Vitamin K₂ Substitution vor extraossären Kalziumablagerungen konnten wir in der Niere nicht demonstrieren. Die Kalziumablagerungen in den renalen Gewebeproben sind zurückzuführen auf ein gesteigertes Kalziumphosphatprodukt pro Nephron, hervorgerufen durch die phosphatreiche Diät der Interventionstiere, in Verbindung mit der Notwendigkeit einer gesteigerte Phosphatextraktion pro Einzelnephron bei stattgehabter 5/6 Nephrektomie

(Bank et al., 1978, Tsuchiya et al., 2004). Hohe intrarenale Phosphatkonzentrationen der Interventionsgruppen CKD und CKD-K₂ spiegelten sich in einer etwa dreifach gesteigerten renalen Phosphatelimination wieder (Abb. 9). Eine weitere Ursache der intrarenalen Kalziumablagerungen der Interventionsgruppen ist der von Westenfeld et al. nachgewiesene fehlende Einfluss des zirkulierenden Kalzifizierungsinhibitors Fetuin A auf die Entstehung renaler Kalziumablagerungen (Westenfeld et al., 2007). Fraglich ist, ob das von renalen Tubuluszellen exprimierte MGP renale Kalziumablagerungen inhibiert (Khan et al., 2014). Sollte dies der Fall sein, stellt sich die Frage, warum die Vitamin K₂ Supplementation der vorliegenden Studie keinen Einfluss auf die Entstehung der renalen Kalzifizierung nahm.

Serumphosphat

Bezüglich des Phosphathaushaltes der niereninsuffizienten Versuchsgruppen zeigte sich eine interessante Beobachtung. Bei fortgeschrittener Niereninsuffizienz kann Phosphat nur unzureichend renal eliminiert werden (2002). Die entstehende Hyperphosphatämie ist ein wichtiger Einflussfaktor in der Pathogenese der vaskulären Kalzifizierung und verbunden mit einer gesteigerten Morbidität (McCarty and DiNicolantonio, 2014). Da sich bei der induzierten leichten Niereninsuffizienz nach dem Modell von Perez-Ruiz keine manifeste Hyperphosphatämie entwickelt (Perez-Ruiz et al., 2006), erhielten Tiere unserer Interventionsgruppen CKD und CKD-K₂ zusätzlich eine phosphatreiche Diät. Unter dieser Diät entwickelten die niereninsuffizienten Versuchsgruppen eine Phosphaturie mit einer etwa dreifach gesteigerten Phosphatausscheidung verglichen mit den Tieren der Kontrollgruppen (Abb. 9). Dabei zeigten Tiere der CKD Gruppe nach zwölfwöchiger Versuchslaufzeit signifikant höhere Phosphatwerte verglichen zu allen weiteren Versuchsgruppen. Die Versuchsgruppen CKD und CKD-K₂ zeigten nach zwölfwöchiger Versuchslaufzeit nahezu identische Urin-Phosphat Werte. Unter Vitamin K₂ Supplementation entwickelten Tiere der CKD-K₂ Gruppe jedoch signifikant geringere Serumphosphatkonzentrationen. Es stellt sich die Frage, wie bei ähnlicher Phosphatexkretion die geringeren Serumphosphatkonzentrationen der CKD-K₂ Versuchsgruppe verglichen zur CKD-Gruppe zu erklären sind. Denkbar wäre eine anabole Wirkung von Vitamin K₂ auf Proteine des Knochenstoffwechsels, beispielsweise Osteocalcin, mit einem gesteigerten Phosphateinbau in die ossäre Matrix. Ein direkter Einfluss einer Vitamin K₂ Supplementation auf die Serumphosphatkonzentration ist bisher

in der Literatur nicht beschrieben und könnte ein weiterer Mediator des Vitamin K₂ vermittelten Schutzes vor vaskulärer Kalzifizierung darstellen.

Strukturelle/ Funktionelle Alterationen

Induzierte CKD in Kombination mit phosphatreicher Diät führten bei Tieren der CKD Versuchsgruppe zu extraossärer Kalzifizierung. Darüber hinaus beobachteten wir weitere sowohl strukturelle als auch funktionelle Alterationen, welche nicht durch die Vitamin K₂ Supplementation in der Versuchsgruppe CKD-K₂ beeinflusst wurden.

Die CKD ist eng mit dem Auftreten von arterieller Hypertonie assoziiert. 2008 litten 91,4% der im US Renal Data System erfassten Patienten mit fortgeschrittener CKD unter arterieller Hypertonie. Eine frühe Entwicklung der arteriellen Hypertonie im Rahmen der CKD beschleunigt die Progredienz der Niereninsuffizienz und ist assoziiert mit einer schlechten Prognose (2002). Die Tiere der Interventionsgruppen CKD und CKD-K₂ entwickelten in der zwölfwöchigen Versuchslaufzeit eine arterielle Hypertonie mit gegenüber den Kontrollgruppen signifikant erhöhten systolischen und diastolischen Blutdruckwerten. Die pathophysiologische Entwicklung der arteriellen Hypertonie als Folge der CKD beruht auf einem komplexen Zusammenspiel verschiedener, niereninsuffizienz-assoziiertes Stoffwechselalterationen. Wichtige Mechanismen in diesem Zusammenhang sind eine gesteigerte Flüssigkeitsretention (Chobanian et al., 2003), eine Überaktivität des Sympathischen Nervensystems (Neumann et al., 2004) und eine unverhältnismäßig gesteigerte Renin-Sekretion (Bianchi, 2000, 2002). Die Tatsache, dass die Tiere der Interventionsgruppen eine arterielle Hypertonie entwickelten, weist erneut auf die erfolgreich induzierte Niereninsuffizienz hin. Vaskuläre Kalzifizierung ist assoziiert mit arteriellem Elastizitätsverlust, resultierend in gesteigerter Pulswellengeschwindigkeit, gesteigerten systolischen Blutdruckwerten und sinkenden diastolischen Blutdruckwerten (Taddei et al., 2011). Da die orale Substitution von Vitamin K₂ unserer These zufolge vor vaskulärer Kalzifizierung, nicht aber vor der CKD schützt, ist zu erklären, warum zwischen den beiden Interventionsgruppen keinen Unterschied bezüglich der Blutdruckentwicklung vorliegt.

Bei der Induktion der CKD orientierten wir uns an dem bereits beschriebenen Protokoll von Perez-Ruiz et al. 2006, bei dem sich im Unterschied zu der vorliegenden Studie keine arterielle Hypertonie in den 5/6 nephrektomierten Kollektiven entwickelte (Perez-Ruiz et al., 2006). Diese Differenz der Ergebnisse begründet sich am ehesten in der unterschiedlichen Versuchslaufzeit von 12 Wochen in der vorliegenden Studie gegenüber

8 Wochen bei Perez-Ruiz et al., insbesondere vor dem Hintergrund einer im Versuchsverlauf spät auftretenden Entwicklung der hypertonen Blutdruckwerte.

Arterielle Hypertonie induziert in den Gefäßwänden des Organismus Umbauprozesse, welche zu einem Progress der Hypertonie mit zunehmenden Endorganschäden führen (Feihl et al., 2008). Diese Umbauprozesse der Gefäßwand gehen einher mit einem gesteigerten Zellumsatz (Li et al., 2013). Immunhistochemisch konnten wir für die Interventionsgruppen CKD und CKD-K₂ verglichen zu den Kontrollgruppen signifikant stärkere Färberesultate für Ki67, einem Marker proliferierender Zellen, feststellen (17). Dies weist auf stattfindende Umbauprozesse in den Gefäßwänden der Interventionsgruppen hin. Die Vitamin K₂ Supplementation in unserem Versuchsaufbau beeinflusst diese Veränderungen nicht.

In der histologischen Untersuchung aortaler Gewebeproben mittels Elastica van Gieson Färbung zur Analyse der vaskulären Integrität zeigten sich signifikant mehr Strangbrüche in der arteriellen Tunica media beider Interventionsgruppen (CKD; CKD-K₂) verglichen mit Tieren der Kontrollgruppen (Abb. 16) (Ro and Kageyama, 2013). Der Einfluss einer Niereninsuffizienz auf den arteriellen Gefäßwandstoffwechsel mit resultierenden Alterationen in mittels van Gieson Färbung durchgeführten histologischen Untersuchungen wurden unabhängig vom Tiermodell auch für Hämodialysepatienten nachgewiesen (Nayir et al., 2001).

Auch echokardiographisch zeigten sich Auswirkungen der von uns durchgeführten Interventionen. Die linksventrikuläre Hypertrophie ist eine häufige kardiale Manifestation von CKD und arterieller Hypertrophie. Sie ist ein unabhängigen Prädiktor für Morbidität und Mortalität bei Hämodialysepatienten (Levin et al., 1999). Bei niereninsuffizienten Patienten trägt neben der häufig begleitenden arteriellen Hypertonie vor allem die CKD-assoziierte Anämie zur Entwicklung der linksventrikulären Massenzunahme bei (Nardi et al., 2009, Levin et al., 1999). Shobeiri et al. 2013 zeigten für ein murines Modell der Adenin- und phosphatinduzierten CKD die Entstehung von arterieller Hypertonie und linksventrikulärer Hypertrophie (Shobeiri et al., 2013). Im Rahmen des Finalversuchs erhoben wir bei allen Versuchstieren echokardiographische Parameter zur Erfassung struktureller und funktioneller Aspekte der Herzfunktionen (Methoden 5.2.5.2). Die Messung der interventrikulären systolischen- und diastolischen Septumdurchmesser zeigten deutliche Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen, mit einer signifikanten Zunahme des interventrikulären Septumdurchmessers bei Tieren der Interventionsgruppen

CKD und CKD-K₂. Dabei beeinflusste die Vitamin K₂ Supplementation bei Tieren der CKD-K₂ Interventionsgruppe nicht die entstehende Hypertrophie. Eine Hypertrophie des Myokards bei erhaltenen ventrikulären Diametern entsprechend einer konzentrischen Hypertrophie ist eine typische Beobachtung bei Druckbelastungen des Herzens, beispielsweise einer arteriellen Hypertonie (Carabello, 2002). Die übrigen von uns erhobenen Marker einer linksventrikulären Hypertrophie und kardialen Funktionseinschränkung ergaben keine entscheidenden Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Diwan et al. 2014 zeigten für männliche Wistarratten in einem Modell der Adenin-induzierten CKD eine erheblich stärker ausgeprägte konzentrische Hypertrophie mit signifikant reduzierten systolisch- und diastolischen ventrikulären Diametern (Diwan et al., 2014). Dieser Unterschied zwischen den Studien ist auf eine deutlich stärker ausgeprägte Niereninsuffizienz der Adenin-substituierten Versuchstiere von Diwan et al. zurückzuführen mit mehr als 6-fach gesteigerten Kreatininwerten und systolischen Blutdruckwerten um 180mmHg (Diwan et al., 2014).

Die von uns durchgeführten Interventionen induzierten strukturelle sowie funktionelle Alterationen in Tieren beider Interventionsgruppen (CKD; CKD-K₂). Eine entscheidende Beobachtung der vorliegenden Studie ist, dass die Vitamin K₂ Supplementation in einer zu kardiovaskulärer Kalzifizierung prädisponierten Stoffwechsellage die sekundäre Kalzifizierung bereits geschädigter Gewebe inhibiert. Der schädigende Einfluss der Interventionen auf die strukturelle sowie funktionelle Integrität der untersuchten Organismen konnte durch die Vitamin K₂ Supplementation nicht verhindert werden.

Primäres Ziel der durchgeführten Untersuchungen war ein besseres Verständnis des Vitamin K₂ vermittelten Schutzes vor extraossärer Kalzifizierung. Einen mortalitätssenkenden Effekt der Vitamin K₂ Supplementation konnten wir nicht feststellen. Im Rahmen der zwölfwöchigen Versuchslaufzeit verstarben in der Co-K₂ Gruppe 20%, in der CKD-K₂ Gruppe 18% und in der CKD Gruppe 27% der Tiere (Abb. 6). Die beobachtete Mortalität begründet sich in operativen sowie interventionellen Komplikationen und erlaubt keine Rückschlüsse auf eine etwaige mortalitätssenkende Wirkung der Vitamin K₂ Supplementation. Vermutlich ist eine längere Versuchslaufzeit notwendig, um einen Vitamin K₂ vermittelten Überlebensvorteil zu beobachten. Keyzer et al. 2014 beobachteten für nierentransplantierte Patienten eine Korrelation von Vitamin K Defizit und gesteigerter Mortalität (Keyzer et al., 2014). In einer retrospektiven Studie zum

Ernährungsverhalten von über dreitausend CKD-Patienten zeigte sich eine geringere Mortalität bei Patienten mit hohen Vitamin K Serumspiegeln (Cheung et al., 2014). Unklar in diesem Zusammenhang ist, ob die beobachtete reduzierte Mortalität auf einen Vitamin K Effekt zurückzuführen ist, oder ob hohe Vitamin K Werte eine insgesamt ausgewogenere Ernährung der betroffenen Patienten widerspiegelt. Geleijnse et al. 2004 (Rotterdamstudie) und Beulens et al. 2009 wiesen im Zusammenhang mit hoher alimentärer Vitamin-K₂ Zufuhr geringere vaskuläre Kalzifizierung sowie Hinweise auf eine reduzierte KHK-bezogene Mortalität auf (Geleijnse et al., 2004, Beulens et al., 2009). Bezüglich der positiven Auswirkungen einer Vitamin K Supplementation auf die Gesamtmortalität der behandelten Probanden erhoffen wir uns entscheidende Erkenntnisse durch die aktuell durchgeführte VitaVask Studie.

7.2 Vitamin K₂ aktiviert den Kalzifizierungsinhibitor MGP

In der vorliegenden Arbeit inhibierte die orale Supplementation von Vitamin K₂ in einer zu extraossärer Verkalkung prädisponierten Stoffwechsellage die Entstehung von kardiovaskulärer Kalzifizierung. Das Matrix Gla Protein ist in der Vitamin K abhängig karboxylierten Form (cMGP) ein wirksamer Inhibitor der kardiovaskulären Kalzifizierung (Murshed et al., 2004). Das Ziel der immunhistochemischen Färbung von uc- und cMGP in paraffinfixierten Aortenringen aller Tiere war, nachzuweisen, dass die Supplementation von Vitamin K₂ sowohl in einem gesunden Kontrollkollektiv, als auch in einem murinen Modell der CKD zu einer gesteigerten posttranslationalen Karboxylierung von ucMGP zu cMGP führt (Schurgers et al., 2007a). Diese Beobachtung wäre konform mit der zuvor beobachteten ausbleibenden Kalzifizierung der Vitamin K₂ substituierten Tiere der Interventionsgruppe verglichen mit den nicht Vitamin K₂-supplementierten CKD Tieren. Dementsprechend erwarteten wir gesteigerte ucMGP-Konzentrationen bei Tieren der CKD Versuchsgruppe (Sweatt et al., 2003, Schurgers et al., 2005). Trotz zahlreicher Versuche mit Optimierungen des Versuchsprotokolls konnten wir keine positiven Färbeergebnisse für die immunhistochemischen Untersuchungen von uc- und cMGP in den aortalen Gewebeproben erzielen.

Das MGP-Gen wird in gesunden Gefäßwänden in sehr geringem Maße exprimiert (Shanahan et al., 1994, Schurgers et al., 2005). Eine Ursache des negativen Färbeergebnisses der Tiere der Kontrollgruppen könnte demnach in einer zu geringen Sensitivität der gewählten immunhistochemischen Färbung liegen.

In vielen Studien wurde für kalzifizierte Gewebe eine gesteigerte MGP-Proteinsynthese nachgewiesen, einhergehend mit einer Akkumulation von ucMGP an der Seite der

vaskulärer Kalzifizierung (Schurgers et al., 2008a, Dhore et al., 2001, Schurgers et al., 2005, Shanahan et al., 1994). Der Anstieg der Proteinsynthese wird dabei als Kompensationsmechanismus zur zunehmenden Kalzifizierung verstanden. In diesen Studien entwickelte sich die vaskuläre Kalzifizierung jedoch nicht als Folge einer CKD. Die rtPCR Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen eine geringere Expression des MGP-Gens bei Tieren der CKD Versuchsgruppe (Abb. 20). Es stellt sich die Frage, ob die vielfach beschriebene, kompensatorisch gesteigerte Proteinsynthese des MGP-Gens in Anwesenheit von vaskulärer Kalzifizierung im Rahmen einer CKD auf Grund genregulatorischer Einflüssen der CKD auf die Expression des MGP-Gens nicht stattfinden kann. Diese Beobachtung ist konform mit den Untersuchungen von Shanahan et al. 1999, die für arterielle Gefäßwände von Patienten mit Diabetes Mellitus im Vergleich zu einem gesunden Kollektiv geringere MGP-Level feststellten (Shanahan et al., 1999). Auch Mori et al. 1998 sowie Tyson et al. 2003 zeigten eine geringere Genexpression von MGP in kalzifizierten Gefässwänden (Tyson et al., 2003, Mori et al., 1998). So könnte ein Ausbleiben der kompensatorisch gesteigerten protektiven MGP-Proteinsynthese ein weiterer wichtiger Faktor bei der Entstehung von Kalkablagerungen in der arteriellen Tunica media darstellen. Zum Verständnis dieses Zusammenhanges sind zukünftige Untersuchungen zur Aktivierung der MGP-Genexpression nötig.

Vitamin K₂ wirkt kalzifikationsinhibierend über posttranslationale gamma-Karboxylierung und somit Aktivierung des MGP (Murshed et al., 2004). Die Ergebnisse der Plasmaspiegelbestimmungen des gesamt ucMGP unterstützen diese Aussage. Es konnte gezeigt werden, dass die Fütterung von Vitamin K₂ in einem Kontrollkollektiv von gesunden, schein-operierten Wistar-Ratten über einen Zeitraum von 12 Wochen zu einer signifikanten Abnahme der gesamt Plasma ucMGP Werte führte (Tabelle 16). Es ist anzunehmen, dass dieser Rückgang der ucMGP Serumspiegel zugunsten höherer cMGP Serumspiegel stattgefunden hat und diese Entwicklung auf die höhere Bioverfügbarkeit des ucMGP karboxylierenden Vitamin K₂ zurückzuführen ist. Diese Beobachtung entspricht den Ergebnissen von Westenfeld et al. 2012 und Shea et al. 2011, die im Rahmen der Vitamin K₂ Supplementation eine Reduktion der Plasma dp-ucMGP-Level beobachteten (Westenfeld et al., 2012, Shea et al., 2011). Ein wichtiger Unterschied besteht jedoch in der untersuchten MGP-Spezies. In der vorliegenden Studie wurde das gesamt ucMGP analysiert. Westenfeld et al. 2012 und Shea et al. 2011 untersuchten hingegen ausschließlich die dephosphorylierte Form des ucMGP (dp-ucMGP). Craneburg

et al. 2010 sowie Dalmeijer et al 2012, die ebenfalls in gesunden Kohorten den Einfluss der Vitamin K₂ Supplementation auf Plasmaspiegel des gesamt ucMGP analysierten, konnten keine Korrelation bezüglich der beiden Parameter feststellen (Cranenburg et al., 2010a, Dalmeijer et al., 2012). Für die Interventionsgruppen CKD und CKD-K₂ ist ein tendenzieller Rückgang der ucMGP Plasmaspiegel nach zwölfwöchiger Versuchslaufzeit verglichen zu den jeweiligen Basiswerten festzustellen (Tabelle 16). Auch Craneburg et al. 2010 stellte bei terminal niereninsuffizienten Patienten reduzierte gesamt ucMGP Werte fest (Cranenburg et al., 2010b). Diese Beobachtungen stehen im Kontrast zu der bereits beschriebenen Korrelation von dp-ucMGP mit der Progression von CKD und anderen Erkrankungen, sowie seiner potenziellen Funktion als Biomarker für Vitamin K-Mangelzustände (Schurgers et al., 2010, Westenfeld et al., 2012, Ueland et al., 2011, Ueland et al., 2010).

Bisherige Arbeiten zu zirkulierenden MGP-Spezies haben einen beschreibenden Charakter und stellen verschiedene Zusammenhänge bezüglich der zirkulierenden MGP-Spezies und verschiedenen Stoffwechsellagen dar. Solange die genaue Funktion der verschiedenen zirkulierenden MGP-Spezies und ihrer Interaktion mit dem Organismus jedoch nicht vollständig verstanden ist, kann die Aussagekraft von Messungen dieser Parameter nicht abschließend beurteilt werden.

Die wichtigste bekannte Funktion des Matrix Gla Proteins ist die lokale Kalzifikationsinhibierung am Ort seiner Synthese, insbesondere in der arteriellen Tunica Media (Schurgers et al., 2008b).

Inwiefern sich unsere systemischen Beobachtungen eines gesteigerten Vitamin K₂-Angebotes mit vermehrter Karboxylierung und somit Aktivierung von ucMGP auf die lokale Ebene in der arteriellen Media übertragen lassen, bedarf weitere Untersuchungen.

7.3 Einfluss von Vitamin K₂ Supplementation und Niereninsuffizienz auf die Genexpression relevanter Aktivatoren und Inhibitoren der extraossären Kalzifizierung

Niereninsuffizienz

Mit Hilfe der quantitativen Realtime PCR konnten wir Veränderungen der mRNA Expression verschiedener relevanter Aktivatoren und Inhibitoren der Kalzifizierung unter dem Einfluss der Niereninsuffizienz innerhalb der Aorta detektieren. Diese Veränderungen mögen beteiligt sein an der Transformation intakter VSMC zu osteoblastenähnlichen Zellen bei der Pathogenese der vaskulären Kalzifizierung (Kendrick and Chonchol, 2011).

Besonders deutlich wird der CKD Effekt bei der Betrachtung des für glatte Gefäßmuskelzellen spezifischen SM22 α Gens, dessen Expressionslevel in der CKD Versuchsgruppe verglichen mit der Kontrollgruppe auf 30% des Ausgangsniveaus in Kontrolltieren signifikant absank. Diese Beobachtung ist konform zu den Ergebnissen vieler Arbeitsgruppen. El-Abbadi et al. 2009 zeigten beispielsweise für ein murines Modell der phosphatinduzierten CKD geringere arterielle SM22 α Genexpressionslevel (El-Abbadi et al., 2009). Steitz et al. 2001 beobachteten geringere SM22 α Level sowohl bei der *in vitro* Kalzifizierung von VSMC, sowie bei der spontanen vaskulären Kalzifizierung von MGP-Knockout Mäusen (Steitz et al., 2001).

Entsprechend dieser Beobachtungen konnten wir für die CKD Gruppe tendenziell gesteigerte Expressionslevel des Periostin- und des BMP-2 Gens nachweisen. Die Periostin Expression ist assoziiert mit einer Vielzahl von Erkrankungen, die mit einem erhöhte Umsatz der Extrazellulärmatrix einhergehen, wie die CKD (Hakuno et al., 2010, Hixson et al., 2011, Sen et al., 2011b, Kudo et al., 2006). Die Expression des Periostin-Gens korreliert dabei invers mit der Abnahme der Nierenfunktion (Sen et al., 2011a). Bereits Beginn der 90er Jahre konnte eine gesteigerte Expression des BMP-2 Gens in humanen atherosklerotischen Plaques nachgewiesen werden (Bostrom et al., 1993). Ciceri et al. 2013 beobachteten in einem *in vitro* Modell der phosphatinduzierten vaskulären Kalzifizierung gesteigerte BMP-2 Level (Ciceri et al., 2013). Die Betrachtung dieser CKD induzierten Alterationen des Genexpressionsprogramms der VSMC lässt auf den Beginn einer bei vaskulärer Kalzifizierung stattfindenden Transformation von VSMC hin zu osteoblastenähnlichen Zellen schließen.

Die Genexpression des MGP-Gens zeigte unter dem Einfluss der induzierten CKD in der CKD Gruppe verglichen mit Tieren der Kontrollgruppe Co tendenziell geringere Expressionslevel. Es stellt sich die Frage, ob die vielfach beschriebene, kompensatorisch gesteigerte MGP-Synthese in Anwesenheit von vaskulärer Kalzifizierung (Ciceri et al., 2013) im Rahmen einer CKD auf Grund genregulatorischer Einflüssen der CKD auf die Expression des MGP-Gens nicht stattfinden kann. Dieser Pathomechanismus würde neben bereits beschriebenen Ursachen der CKD induzierten vaskulären Kalzifizierung einen weiteren, wichtigen eigenständigen Einflussfaktor darstellen.

Zahlreiche Studien, beispielsweise Shanahan et al. 1994, Schurgers et al. 2005 zeigten immunhistochemisch eine Akkumulation von MGP an atherosklerotischen Plaques (Schurgers et al., 2005, Shanahan et al., 1994). Bei der Analyse arterieller Gefäßwände von Diabetikern, lassen sich im Vergleich zu einem gesunden Kollektiv jedoch geringere

MGP-Level feststellen (Shanahan et al., 1999). Mori et al. 1998 sowie Tyson et al. 2003 zeigten ebenfalls eine geringere Genexpression von MGP in kalzifizierten Gefäßwänden (Tyson et al., 2003, Mori et al., 1998). Die zu Grunde liegende pathophysiologische Ursache der Entstehung von vaskulärer Kalzifizierung unterscheidet sich dabei bei den Autoren. Es scheint demnach eine Vielzahl von Faktoren zu geben, die Einfluss auf die Expression des MGP-Gens nehmen, wobei die CKD einen wichtigen Faktor darstellen könnte. Zur Unterstützung der These, CKD führt zusätzlich zu bereits bekannten Mechanismen über eine Inhibition der VSMC MGP-Genexpression zu vaskulärer Kalzifizierung, sind weitere Untersuchungen nötig. Interessant wäre die Messung der MGP-Genexpressionslevel in arteriellen VSMC von Patienten unterschiedlicher CKD Stadien. Sollte sich die These bestätigen, wären mit zunehmender Ausprägung der CKD sinkende MGP-Genexpressionslevel der VSMC zu erwarten.

Entsprechend der MGP-Genexpressionsanalyse konnten wir für die Genexpression des OPN-Gens in der CKD Gruppe tendenziell geringere Expressionslevel im Vergleich zur Kontrollgruppe Co feststellen (Abb. 20). Auch Osteopontin wird ein kalzifizierungsinhibierender Effekt in der arteriellen Gefäßwand zugesprochen (Speer et al., 2002). Verschiedene Arbeitsgruppen konnten im Zusammenhang mit vaskulärer Kalzifizierung eine gesteigerte OPN-Proteinsynthese nachweisen (Speer et al., 2002, Giachelli et al., 1993). Auch in diesen Arbeiten unterscheidet sich die pathophysiologische Grundlage der induzierten vaskulären Kalzifizierung. Interessanterweise zeigten Nakamura et al. 2006 eine gesteigerte VSMC OPN-Genexpression im Zusammenhang mit terminaler Niereninsuffizienz, die Arbeitsgruppe um Takemoto et al. 2000 konnte eine gesteigerte arterielle OPN-Genexpression im Zusammenhang mit Diabetes mellitus nachweisen (Nakamura et al., 2006). Es bedarf weiterer Untersuchungen zur Klärung der Frage, inwiefern die CKD-Induktion in der vorliegenden Studie zu einer Reduktion der OPN-Genexpression führt und ob diese Reduktion einen Beitrag zur Entstehung von vaskulärer Kalzifizierung leistet. Möglicherweise kann entsprechend der Überlegungen zur MGP-Regulation auch für OPN eine CKD-induzierte Reduktion der Genexpression angenommen werden, ein weiterer Pathomechanismus in der CKD vermittelten Entstehung von extraossären Verkalkungen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in der vorliegenden Studie die Induktion einer Niereninsuffizienz in Kombination mit einer phosphatreichen Diät in Tieren der Interventionsgruppe CKD die Genexpression wichtiger Proteine des Gefäßwandstoffwechsels hin zu einem prokalzifizierenden Milieu beeinflusste.

Vitamin K₂ Supplementation

Durch den Vergleich der Genexpressionslevel von Tieren der Kontrollgruppe Co-K₂ mit Tieren der Co Gruppe, zeigte sich der genregulatorische Einfluss der alimentären Vitamin K₂ Supplementation. Hierbei ließen sich verglichen zum Einfluss der Niereninsuffizienz auf die Genexpression genau entgegengesetzte Entwicklungen betrachten. Die Expression des MGP Gens in den aortalen VSMC stieg in der Vitamin K₂ substituierten Kontrollgruppe verglichen mit den Co Tieren etwa um den Faktor 11 signifikant an (Abb. 21). Eine solche Entwicklung ist in der Literatur für VSMC bisher nicht beschrieben. MGP stellt einen potenten Inhibitor der vaskuläre Kalzifizierung dar (Schurgers et al., 2008b). Eine gesteigerte MGP-Genexpression kann somit als neuer Aspekt des kalzifikationsinhibierenden Potentials einer Vitamin K₂ Supplementation verstanden werden. Tabb et al. 2003 wiesen anhand von Zellkulturstudien zum Knochenstoffwechsel eine gesteigerte MGP-Genexpression durch Vitamin K₂ Supplementation in Osteozyten sowie Osteosarkomzellen nach. Dabei zeigten sie, dass Vitamin K₂ über Aktivierung eines nukleären Rezeptors Einfluss auf die Genexpression ausübt (Tabb et al., 2003). Der Mechanismus des genregulatorischen Einflusses durch Vitamin K₂ soll im folgenden Kapitel näher besprochen werden.

Entsprechend der MGP-Genexpression wurde auch für das SM22 α Gen eine gesteigerte Expression durch Vitamin K₂ Supplementation beobachtet. Auch diese Entwicklung ist in der Literatur bisher nicht beschrieben. Wallin et al. 2008 zeigten jedoch anhand von VSMC *in vitro* tendenziell ähnliche Entwicklungen. In ihrer Untersuchung ging die Vitamin K₂ Supplementation mit einer gesteigerten Expression von Genen einher, die einen kalzifikationsinhibierenden Einfluss auf den Gefäßwandstoffwechsel nehmen (Wallin et al., 2008). Auch eine gesteigerte Expression des für VSMC spezifischen SM22 α Gens scheint in diesem Zusammenhang sehr wahrscheinlich, wurde in der Arbeit von Wallin et al. jedoch nicht untersucht.

Die Entwicklung der Genexpressionslevel für OPN, Periostin und BMP-2 unter Vitamin K₂-Supplementation zeigten verglichen zum CKD-Einfluss auf die Expression der entsprechenden Gene genau entgegengesetzte Entwicklungen mit einer gesteigerten OPN-Genexpression und reduzierten Expressionsleveln für Periostin und BMP-2. Dabei war die Reduktion der Periostin-Genexpression in den Vitamin K₂ substituierten Tieren der Co-K₂

Gruppe in etwa um den Faktor 6 signifikant geringer im Vergleich zur Kontrollgruppe Co (Abb. 21).

Entgegen des prokalzifizierenden Einflusses auf wichtige Gene des Gefäßwandstoffwechsels durch CKD-Induktion, konnte mit der vorliegenden Studie ein kalzifikationsinhibierender Effekt durch Vitamin K₂-Supplementation auf Genexpressionsebene nachgewiesen werden.

Entscheidend für den postulierten Einfluss der Vitamin K₂ Supplementation auf die Genexpression wichtiger Proteine des Gefäßwandstoffwechsels sind die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse in der CKD-K₂ Gruppe. Diese Tiere, die sowohl unter dem Einflussfaktor der CKD-Induktion als auch der alimentären Vitamin K₂-Supplementation standen, zeigten bei der Untersuchung der Genexpressionslevel für MGP, SM22 α , OPN, Periostin und BMP-2 verglichen zur Co Gruppe die gleichen Tendenzen wie die Vitamin K₂ substituierte Co-K₂ Gruppe (Abb. 22). Der protektive Einfluss der Vitamin K₂-Supplementation überwiegt somit deutlich gegenüber den kalzifizierungsfördernden Einflüssen der induzierten milden Niereninsuffizienz.

Somit konnten wir mit unseren Untersuchungen erstmals für ein murines *in vivo* Modell der CKD zeigen, dass Vitamin K₂ neben seiner Funktion als Cofaktor für die Aktivierung des Kalzifizierung-inhibierenden MGP zusätzlich einen direkten Einfluss auf die Genexpression wichtiger Proteine des Gefäßwandstoffwechsels nimmt. Dieser Einfluss auf die Proteinsynthese könnte einen weiteren Mechanismus des Vitamin K₂ vermittelten Schutzes vor kardiovaskulärer Kalzifizierung darstellen.

Die Untersuchungen der Genexpressionslevel für zwei wichtige Proteine des Vitamin K Stoffwechsels, GGCX und VKOR zeigten eine Tendenz zu geringeren Expressionsleveln unter dem Einfluss der CKD, wobei diese Tendenz in der CKD-K₂ Gruppe nicht zu verzeichnen ist (Abb. 22). Ein Mangel an GGCX ginge mit einer reduzierten Fähigkeit des Organismus zur Karboxylierung von MGP einher. Ein VKOR-Mangel würde sich in einem funktionellen Vitamin K-Mangel widerspiegeln (Suttie, 1985). Ob die CKD Einfluss auf diese Proteine nimmt und ob dieser Einfluss möglicherweise durch Vitamin K-Supplementation inhibiert werden kann, ist zum jetzigen Zeitpunkt jedoch Spekulation.

Mechanismus des Vitamin K₂ Einflusses auf die Genregulation

Auf welche Weise Vitamin K₂ in VSMC Einfluss auf die Genexpression der oben genannten Gene nimmt, ist in der Literatur bisher nicht beschrieben. Der für viele

Stoffwechselprozesse wichtige nukleäre Fremdstoff- und Steroidrezeptor SXR (steroid and xenobiotic receptor) (Blumberg et al., 1998a) könnte in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle spielen. Zellkulturstudien von Tabb et al. 2003 (Tabb et al., 2003) konnten für verschiedene Osteosarkom-Zelllinien nachweisen, dass SXR dosisabhängig durch Vitamin K₂ aktiviert wird. Diese Aktivierung resultiert zum Teil durch transkriptionelle Regulation in einer gesteigerten Genexpression der Gene für MGP, OPN, OPG und ALP. Tabb et al. 2003 zeigten darüber hinaus, dass die beschriebene Steigerung der Genexpression durch Vitamin K₂ Supplementation in primären Osteozyten, die aufgrund der vollständigen Abschaltung des SXR-Gens kein SXR exprimieren, nicht stattfindet. Somit kann für SXR eine wichtige Rolle bei der Vermittlung des genregulatorischen Effektes durch Vitamin K₂ angenommen werden. Besonders in Leberzellen und Zellen des Intestinaltraktes ist SXR stark exprimiert und steht im Zusammenhang mit der Aktivierung von CYP-Enzymen und ATP-bindenden Transportern (Tabb et al., 2003, Willson and Kliewer, 2002, Xie and Evans, 2001). Auch in verschiedenen Prozessen des Gefäßwandstoffwechsels konnte eine hohe Bedeutung des SXR nachgewiesen werden (Bauer et al., 2004, Hagedorn et al., 2007). Ob der Rezeptor auch im Zusammenhang der Vitamin K₂ vermittelten Genregulation in VSMC eine wichtige Rolle spielt, ist in zukünftigen Arbeiten zu eruieren. Wäre dies der Fall, so stellt sich die Frage, welche weiteren Faktoren einen Einfluss auf den beschriebenen Mechanismus haben und wie die unterschiedlichen Regulationsmuster unserer Arbeit im Vergleich zur Studie von Tabb et al. 2003 zu erklären sind.

7.4 Schlussfolgerung

Mit der vorliegenden Studie konnten wir für ein murines Modell die protektive Wirkung der alimentären Vitamin K₂-Supplementation auf die Entwicklung von kardiovaskulärer Kalzifizierung in einer zu extraossären Kalkablagerungen prädisponierter Stoffwechsellage belegen. Insbesondere auf Grund einer fehlenden Toxizität stellt die Vitamin K₂-Supplementation eine attraktive Möglichkeit zur Prophylaxe von kardiovaskulären Kalziumablagerungen dar. Der Mechanismus des Vitamin K₂ vermittelten Schutzes vor vaskulärer Kalzifizierung präsentiert sich multifaktoriell. In der vorliegenden Studie zeigte sich neben der Vitamin K₂ vermittelten Aktivierung des MGP, einem potenten lokalen Inhibitor der vaskulären Kalzifizierung, ein direkter Einfluss der Vitamin K₂ Supplementation auf das Expressionsmuster verschiedener Aktivatoren und Inhibitoren der extraossären Kalzifizierung innerhalb der Gefäßwand.

Es ist besonders zu betonen, dass die Vitamin K₂ Supplementation in der vorliegenden Studie weder vor der Entwicklung einer Niereninsuffizienz schützte, noch typische Begleiterscheinungen des chronischen Nierenschadens, beispielsweise arterielle Hypertonie und kardiale Hypertrophie, verhindern konnte. Die orale Vitamin K₂ Supplementation inhibierte jedoch die sekundäre Kalzifizierung der bereits geschädigten Gewebe.

Inwiefern das Ergebnis dieses vielversprechenden murinen Modells in die klinische Praxis transferiert werden kann, ist bisher nicht untersucht. Im Rahmen der VitaVask Studie untersuchen wir in einer von der European Renal Association geförderten prospektiven Multizenterstudie den Einfluss einer Vitamin K Supplementation auf die Progression von vaskulärer Kalzifizierung bei Hämodialysepatienten.

Darüber hinaus werden weiterführende Studien benötigt, um die pathophysiologischen Mechanismen des Vitamin K₂ vermittelten Schutzes vor kardiovaskulärer Kalzifizierung näher zu verstehen.

8 Verzeichnisse

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Vergleich der Blutdruckkurven von Patienten jüngerer und fortgeschrittenen Alters.....	2
Abb. 2	Kalzifizierte Aortenklappe.....	3
Abb. 3	Mechanismen der phosphatinduzierten vaskulären Kalzifizierung.....	10
Abb. 4	Vitamin K-abhängiger Reaktionsmechanismus der GGX am Beispiel der MGP-Aktivierung.....	21
Abb. 5	Zeitplan Tierversuch.....	30
Abb. 6	Überlebenskurven der Versuchsgruppen.....	41
Abb. 7	Entwicklung des Körpergewichts der Versuchsgruppen.....	42
Abb. 8	Serum-Kreatinin Konzentrationen der Versuchsgruppen.....	43
Abb. 9	Urinphosphatausscheidung im 24-Stunden-Sammelurin der Versuchsgruppen.....	45
Abb. 10	Serum-Phosphat Konzentrationen der Versuchsgruppen.....	46
Abb. 11	Aortale Kalzifizierung: Atom-Absorptions-Spektrometische Quantifizierung des Kalziumgehaltes von aortalen Gewebeproben der Versuchsgruppen.....	47
Abb. 12	Alkalische Phosphatase (ALP): Positives immunhistochemisches Färbeareal für ALP.....	48
Abb. 13	Myokardiale Kalzifizierung: Atom-Absorptions-Spektrometische Quantifizierung des Kalziumgehaltes von myokardialen Gewebeproben der Versuchsgruppen.....	49
Abb. 14	Renale Kalzifizierung: Von-Kossa positives Färbeareal in Prozent.....	50
Abb. 15	Repräsentative Ausschnitte der histologischen Von-Kossa Färbung.....	51
Abb. 16	Darstellung der elastischen Fasern der aortalen Tunica Media mittels Elastica van Gieson Färbung und Quantifizierung der Bruchstellen dieser Fasern.....	52
Abb. 17	Positives immunhistochemisches Färbeergebnis für den Zellproliferationsmarker Ki67 in Prozent (%) pro DAPI-positiven Färbearealen.....	53
Abb. 18	Systolische und diastolische Blutdruckwerte der Versuchsgruppen.....	54
Abb. 19	Echokardiographisch ermittelte diastolische Durchmesser des interventrikulären Septums (LVISD) der Versuchsgruppen.....	55
Abb. 20	Einfluss der Niereninsuffizienz auf die aortale Genexpression.....	57
Abb. 21	Einfluss der Vitamin K ₂ Supplementation auf die aortale Genexpression.....	59
Abb. 22	Einfluss der Vitamin K ₂ Supplementation auf die aortale Genexpression bei Niereninsuffizienz:.....	61

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Untersuchungstechniken zur Detektion von vaskulärer - sowie valvulärer Kalzifizierung.....	5
Tabelle 2	Stadieneinteilung der chronischen Niereninsuffizienz.....	6
Tabelle 3	Vitamin K-abhängige Proteine.....	20
Tabelle 4	Chemikalien/ Lösungen/ Gase/ Puffer.....	24
Tabelle 5	Futter/ Medikamente/ Operationsmaterial.....	25
Tabelle 6	Kits.....	25

Tabelle 7	Verbrauchs- und sonstige Materialien	26
Tabelle 8	Geräte.....	26
Tabelle 9	Antikörper Immunhistochemie.....	27
Tabelle 10	Primer qRT-PCR.....	27
Tabelle 11	Software	27
Tabelle 12	Benennung der vier Versuchsgruppen.....	28
Tabelle 13	Versuchsgruppen: Diäten und Interventionen	29
Tabelle 14	Tierexperimenteller Untersuchungsablauf.....	31
Tabelle 15	Abbruchkriterien Tierversuch	31
Tabelle 16	Serumparameter der Versuchsgruppen.....	44
Tabelle 17	Kreatinin-Clearance und Urinparameter.....	45
Tabelle 18	Blutdruck/ Herzfrequenz/ Gewicht.....	54
Tabelle 19	Echokardiographie.....	56

8.3 Literaturverzeichnis

1997. Causes of death. USRDS. United States Renal Data System. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*, 30, S107-17.
2002. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*, 39, S1-266.
- ABEDIN, M., LIM, J., TANG, T. B., PARK, D., DEMER, L. L. & TINTUT, Y. 2006. N-3 fatty acids inhibit vascular calcification via the p38-mitogen-activated protein kinase and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma pathways. *Circulation research*, 98, 727-9.
- AIKAWA, E., NAHRENDORF, M., FIGUEIREDO, J. L., SWIRSKI, F. K., SHTATLAND, T., KOHLER, R. H., JAFFER, F. A., AIKAWA, M. & WEISSLEDER, R. 2007. Osteogenesis associates with inflammation in early-stage atherosclerosis evaluated by molecular imaging in vivo. *Circulation*, 116, 2841-50.
- ALLISON, M. A., CRIQUI, M. H. & WRIGHT, C. M. 2004. Patterns and risk factors for systemic calcified atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 24, 331-6.
- ANDERSON, H. C. 1984. Mineralization by matrix vesicles. *Scan Electron Microsc*, 953-64.
- BANK, N., SU, W. S. & AYNEDJIAN, H. S. 1978. A micropuncture study of renal phosphate transport in rats with chronic renal failure and secondary hyperparathyroidism. *Journal of Clinical Investigation*, 61, 884-94.
- BAUER, B., HARTZ, A. M. S., FRICKER, G. & MILLER, D. S. 2004. Pregnane X receptor up-regulation of P-glycoprotein expression and transport function at the blood-brain barrier. *Molecular Pharmacology*, 66, 413-419.
- BERKNER, K. L. & RUNGE, K. W. 2004. The physiology of vitamin K nutriture and vitamin K-dependent protein function in atherosclerosis. *J Thromb Haemost*, 2, 2118-32.
- BEULENS, J. W. J., BOTS, M. L., AT SMA, F., BARTELINK, M. L. E. L., PROKOP, M., GELEIJNSE, J. M., WITTEMAN, J. C. M., GROBBEE, D. E. & VAN DER SCHOUW, Y. T. 2009. High dietary menaquinone intake is associated with reduced coronary calcification. *Atherosclerosis*, 203, 489-493.
- BIANCHI, G. 2000. Hypertension in chronic renal failure and end-stage renal disease patients treated with haemodialysis or peritoneal dialysis. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 15 Suppl 5, 105-10.
- BLACHER, J., GUERIN, A. P., PANNIER, B., MARCHAIS, S. J. & LONDON, G. M. 2001. Arterial calcifications, arterial stiffness, and cardiovascular risk in end-stage renal disease. *Hypertension*, 38, 938-42.
- BLUMBERG, B., SABBAGH, W., JR., JUGUILON, H., BOLADO, J., JR., VAN METER, C. M., ONG, E. S. & EVANS, R. M. 1998a. SXR, a novel steroid and xenobiotic-sensing nuclear receptor. *Genes Dev*, 12, 3195-205.

- BLUMBERG, B., SABBAGH, W., JUGUILON, H., BOLADO, J., VAN METER, C. M., ONO, E. S. & EVANS, R. M. **1998b**. SXR, a novel steroid and xenobiotic-sensing nuclear receptor. *Genes & Development*, 12, 3195-3205.
- BOHM, M., EZEKOWITZ, M. D., CONNOLLY, S. J., EIKELBOOM, J. W., HOHNLOSER, S. H., REILLY, P. A., SCHUMACHER, H., BRUECKMANN, M., SCHIRMER, S. H., KRATZ, M. T., YUSUF, S., DIENER, H. C., HIJAZI, Z. & WALLENTIN, L. **2015**. Changes in Renal Function in Patients With Atrial Fibrillation: An Analysis From the RE-LY Trial. *J Am Coll Cardiol*, 65, 2481-93.
- BOLTON-SMITH, C., PRICE, R. J., FENTON, S. T., HARRINGTON, D. J. & SHEARER, M. J. **2000**. Compilation of a provisional UK database for the phyloquinone (vitamin K1) content of foods. *The British journal of nutrition*, 83, 389-99.
- BOOTH, S. L., SADOWSKI, J. A. & WEIHRAUCH, J. L. **1993**. Development of a Revised Provisional Table on the Vitamin-K1 (Phylloquinone) Content of Foods. *Faseb Journal*, 7, A287-A287.
- BOSTROM, K., TSAO, D., SHEN, S., WANG, Y. & DEMER, L. L. **2001**. Matrix GLA protein modulates differentiation induced by bone morphogenetic protein-2 in C3H10T1/2 cells. *The Journal of biological chemistry*, 276, 14044-52.
- BOSTROM, K., WATSON, K. E., HORN, S., WORTHAM, C., HERMAN, I. M. & DEMER, L. L. **1993**. Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions. *Journal of Clinical Investigation*, 91, 1800-9.
- BOUDET, J., MAN, N. K., PILS, P., SAUSSE, A. & FUNCK-BRENTANO, J. L. **1978**. Experimental chronic renal failure in the rat by electrocoagulation of the renal cortex. *Kidney international*, 14, 82-6.
- BRANDENBURG, V. M., SCHURGERS, L. J., KAESLER, N., PUSCHE, K., VAN GORP, R. H., LEFTHERIOTIS, G., REINARTZ, S., KOOS, R. & KRUGER, T. **2015**. Prevention of vasculopathy by vitamin K supplementation: Can we turn fiction into fact? *Atherosclerosis*, 240, 10-16.
- BUITENHUIS, H. C., SOUTE, B. A. & VERMEER, C. **1990**. Comparison of the vitamins K1, K2 and K3 as cofactors for the hepatic vitamin K-dependent carboxylase. *Biochimica et biophysica acta*, 1034, 170-5.
- CARABELLO, B. A. **2002**. Concentric versus eccentric remodeling. *J Card Fail*, 8, S258-63.
- CARRIE, I., PORTOUKALIAN, J., VICARETTI, R., ROCHFORD, J., POTVIN, S. & FERLAND, G. **2004**. Menaquinone-4 concentration is correlated with sphingolipid concentrations in rat brain. *Journal of Nutrition*, 134, 167-172.
- CHATROU, M. L., REUTELINGSPERGER, C. P. & SCHURGERS, L. J. **2011**. Role of vitamin K-dependent proteins in the arterial vessel wall. *Hamostaseologie*, 31, 251-7.
- CHATROU, M. L., WINCKERS, K., HACKENG, T. M., REUTELINGSPERGER, C. P. & SCHURGERS, L. J. **2012**. Vascular calcification: the price to pay for anticoagulation therapy with vitamin K-antagonists. *Blood Rev*, 26, 155-66.
- CHEN, N. X., O'NEILL, K. D., DUAN, D. & MOE, S. M. **2002**. Phosphorus and uremic serum up-regulate osteopontin expression in vascular smooth muscle cells. *Kidney international*, 62, 1724-1731.
- CHEUNG, C. L., SAHNI, S., CHEUNG, B. M., SING, C. W. & WONG, I. C. **2014**. Vitamin K intake and mortality in people with chronic kidney disease from NHANES III. *Clin Nutr*.
- CHOBANIAN, A. V., BAKRIS, G. L., BLACK, H. R., CUSHMAN, W. C., GREEN, L. A., IZZO, J. L., JR., JONES, D. W., MATERSON, B. J., OPARIL, S., WRIGHT, J. T., JR. & ROCCELLA, E. J. **2003**. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension*, 42, 1206-52.
- CICERI, P., ELLI, F., BRENNA, I., VOLPI, E., ROMAGNOLI, S., TOSI, D., BRAIDOTTI, P., BRANCACCIO, D. & COZZOLINO, M. **2013**. Lanthanum Prevents High Phosphate-Induced Vascular Calcification by Preserving Vascular Smooth Muscle Lineage Markers. *Calcif Tissue Int*.
- CONLY, J. M. & STEIN, K. **1992**. Quantitative and qualitative measurements of K vitamins in human intestinal contents. *Am J Gastroenterol*, 87, 311-6.
- CRANENBURG, E. C., KOOS, R., SCHURGERS, L. J., MAGDELEYNS, E. J., SCHOONBROOD, T. H., LANDEWE, R. B., BRANDENBURG, V. M., BEKERS, O. & VERMEER, C. **2010a**. Characterisation and potential diagnostic value of circulating matrix Gla protein (MGP) species. *Thromb Haemost*, 104, 811-22.
- CRANENBURG, E. C. M., KOOS, R., SCHURGERS, L. J., MAGDELEYNS, E. J., SCHOONBROOD, T. H. M., LANDEWE, R. B., BRANDENBURG, V. M., BEKERS, O. & VERMEER, C. **2010b**. Characterisation and potential diagnostic value of circulating matrix Gla protein (MGP) species. *Thrombosis and Haemostasis*, 104, 811-822.
- DALMEIJER, G. W., VAN DER SCHOUW, Y. T., MAGDELEYNS, E., AHMED, N., VERMEER, C. & BEULENS, J. W. **2012**. The effect of menaquinone-7 supplementation on circulating species of matrix Gla protein. *Atherosclerosis*, 225, 397-402.

- DEMER, L. L. **1991**. Effect of calcification on in vivo mechanical response of rabbit arteries to balloon dilation. *Circulation*, 83, 2083-93.
- DEMER, L. L. & TINTUT, Y. **2008**. Vascular calcification: pathobiology of a multifaceted disease. *Circulation*, 117, 2938-48.
- DEMER, L. L. & TINTUT, Y. **2014**. Inflammatory, metabolic, and genetic mechanisms of vascular calcification. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 34, 715-23.
- DHORE, C. R., CLEUTJENS, J. P., LUTGENS, E., CLEUTJENS, K. B., GEUSENS, P. P., KITSLAAR, P. J., TORDOIR, J. H., SPRONK, H. M., VERMEER, C. & DAEMEN, M. J. **2001**. Differential expression of bone matrix regulatory proteins in human atherosclerotic plaques. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 21, 1998-2003.
- DIWAN, V., SMALL, D., KAUTER, K., GOBE, G. C. & BROWN, L. **2014**. Gender differences in adenine-induced chronic kidney disease and cardiovascular complications in rats. *Am J Physiol Renal Physiol*, 307, F1169-78.
- DOHERTY, T. M., UZUI, H., FITZPATRICK, L. A., TRIPATHI, P. V., DUNSTAN, C. R., ASOTRA, K. & RAJAVASHISTH, T. B. **2002**. Rationale for the role of osteoclast-like cells in arterial calcification. *FASEB J*, 16, 577-82.
- EJERBLAD, S., ERIKSSON, I. & JOHANSSON, H. **1979**. Uraemic arterial disease. An experimental study with special reference to the effect of parathyroidectomy. *Scand J Urol Nephrol*, 13, 161-9.
- EL-ABBADI, M. M., PAI, A. S., LEAF, E. M., YANG, H. Y., BARTLEY, B. A., QUAN, K. K., INGALLS, C. M., LIAO, H. W. & GIACHELLI, C. M. **2009**. Phosphate feeding induces arterial medial calcification in uremic mice: role of serum phosphorus, fibroblast growth factor-23, and osteopontin. *Kidney international*, 75, 1297-307.
- EL-ACHKAR, T. M., OHMIT, S. E., MCCULLOUGH, P. A., CROOK, E. D., BROWN, W. W., GRIMM, R., BAKRIS, G. L., KEANE, W. F. & FLACK, J. M. **2005**. Higher prevalence of anemia with diabetes mellitus in moderate kidney insufficiency: The Kidney Early Evaluation Program. *Kidney international*, 67, 1483-8.
- FEIHL, F., LIAUDET, L., LEVY, B. I. & WAEBER, B. **2008**. Hypertension and microvascular remodelling. *Cardiovasc Res*, 78, 274-85.
- FLECK, C., APPENROTH, D., JONAS, P., KOCH, M., KUNDT, G., NIZZE, H. & STEIN, G. **2006**. Suitability of 5/6 nephrectomy (5/6NX) for the induction of interstitial renal fibrosis in rats--influence of sex, strain, and surgical procedure. *Exp Toxicol Pathol*, 57, 195-205.
- FLOEGE, J., HARRINGTON, J. T., KETTELER, M., DRUEKE, T., GOLDSMITH, D., HEIDENREICH, S., SHANAHAN, C. & LONDON, G. **2004**. When man turns to stone: Extrasosseous calcification in uremic patients. *Kidney international*, 65, 2447-2462.
- FRASER, J. D. & PRICE, P. A. **1988**. Lung, heart, and kidney express high levels of mRNA for the vitamin K-dependent matrix Gla protein. Implications for the possible functions of matrix Gla protein and for the tissue distribution of the gamma-carboxylase. *The Journal of biological chemistry*, 263, 11033-6.
- FURIE, B. & FURIE, B. C. **1992**. Molecular and cellular biology of blood coagulation. *The New England journal of medicine*, 326, 800-6.
- GANSEVOORT, R. T., CORREA-ROTTER, R., HEMMELGARN, B. R., JAFAR, T. H., HEERSPINK, H. J., MANN, J. F., MATSUSHITA, K. & WEN, C. P. **2013**. Chronic kidney disease and cardiovascular risk: epidemiology, mechanisms, and prevention. *Lancet*, 382, 339-52.
- GELEIJNSE, J. M., VERMEER, C., GROBBEE, D. E., SCHURGERS, L. J., KNAPEN, M. H., VAN DER MEER, I. M., HOFMAN, A. & WITTEMAN, J. C. **2004**. Dietary intake of menaquinone is associated with a reduced risk of coronary heart disease: the Rotterdam Study. *J Nutr*, 134, 3100-5.
- GIACHELLI, C. M. **2009**. The emerging role of phosphate in vascular calcification. *Kidney international*, 75, 890-7.
- GIACHELLI, C. M., BAE, N., ALMEIDA, M., DENHARDT, D. T., ALPERS, C. E. & SCHWARTZ, S. M. **1993**. Osteopontin is elevated during neointima formation in rat arteries and is a novel component of human atherosclerotic plaques. *Journal of Clinical Investigation*, 92, 1686-96.
- GIJSBERS, B. L., JIE, K. S. & VERMEER, C. **1996**. Effect of food composition on vitamin K absorption in human volunteers. *The British journal of nutrition*, 76, 223-9.
- GO, A. S., CHERTOW, G. M., FAN, D., MCCULLOCH, C. E. & HSU, C. Y. **2004**. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *The New England journal of medicine*, 351, 1296-305.
- GONNET, M., LETHUAUT, L. & BOURY, F. **2010**. New trends in encapsulation of liposoluble vitamins. *J Control Release*, 146, 276-90.
- GOODMAN, W. G., GOLDIN, J., KUIZON, B. D., YOON, C., GALES, B., SIDER, D., WANG, Y., CHUNG, J., EMERICK, A., GREASER, L., ELASHOFF, R. M. & SALUSKY, I. B. **2000**. Coronary-artery calcification in young adults with end-stage renal disease who are undergoing dialysis. *The New England journal of medicine*, 342, 1478-83.

- HAGEDORN, K. A., COOKE, C. L., FALCK, J. R., MITCHELL, B. F. & DAVIDGE, S. T. **2007**. Regulation of vascular tone during pregnancy: a novel role for the pregnane X receptor. *Hypertension*, 49, 328-33.
- HAKUNO, D., KIMURA, N., YOSHIOKA, M., MUKAI, M., KIMURA, T., OKADA, Y., YOZU, R., SHUKUNAMI, C., HIRAKI, Y., KUDO, A., OGAWA, S. & FUKUDA, K. **2010**. Periostin advances atherosclerotic and rheumatic cardiac valve degeneration by inducing angiogenesis and MMP production in humans and rodents. *Journal of Clinical Investigation*, 120, 2292-306.
- HAMM, C. W., BASSAND, J. P., AGEWALL, S., BAX, J., BOERSMA, E., BUENO, H., CASO, P., DUDEK, D., GIELEN, S., HUBER, K., OHMAN, M., PETRIE, M. C., SONNTAG, F., UVA, M. S., STOREY, R. F., WIJNS, W. & ZAHGER, D. **2011**. ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute coronary syndromes (ACS) in patients presenting without persistent ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*, 32, 2999-3054.
- HEISS, A., DUCHESNE, A., DENECKE, B., GROTZINGER, J., YAMAMOTO, K., RENNE, T. & JAHNEN-DECHENT, W. **2003a**. Structural basis of calcification inhibition by alpha 2-HS glycoprotein/fetuin-A. Formation of colloidal calciprotein particles. *The Journal of biological chemistry*, 278, 13333-41.
- HEISS, A., DUCHESNE, A., DENECKE, B., GROTZINGER, J., YAMAMOTO, K., RENNE, T. & JAHNEN-DECHENT, W. **2003b**. Structural basis of calcification inhibition by alpha(2)-HS glycoprotein/fetuin-A - Formation of colloidal calciprotein particles. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 13333-13341.
- HIXSON, J. E., SHIMMIN, L. C., MONTASSER, M. E., KIM, D. K., ZHONG, Y., IBARGUEN, H., FOLLIS, J., MALCOM, G., STRONG, J., HOWARD, T., LANGEFELD, C., LIU, Y., ROTTER, J. I., JOHNSON, C. & HERRINGTON, D. **2011**. Common variants in the periostin gene influence development of atherosclerosis in young persons. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 31, 1661-7.
- HOLDEN, R. M., MORTON, A. R., GARLAND, J. S., PAVLOV, A., DAY, A. G. & BOOTH, S. L. **2010**. Vitamins K and D Status in Stages 3-5 Chronic Kidney Disease. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 5, 590-597.
- HOSHINO, T., CHOW, L. A., HSU, J. J., PERLOWSKI, A. A., ABEDIN, M., TOBIS, J., TINTUT, Y., MAL, A. K., KLUG, W. S. & DEMER, L. L. **2009**. Mechanical stress analysis of a rigid inclusion in distensible material: a model of atherosclerotic calcification and plaque vulnerability. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 297, H802-10.
- HUNTER, G. K., KYLE, C. L. & GOLDBERG, H. A. **1994**. Modulation of Crystal-Formation by Bone Phosphoproteins - Structural Specificity of the Osteopontin-Mediated Inhibition of Hydroxyapatite Formation. *Biochemical Journal*, 300, 723-728.
- HUR, D. J., RAYMOND, G. V., KAHLER, S. G., RIEGERT-JOHNSON, D. L., COHEN, B. A. & BOYADJIEV, S. A. **2005**. A novel MGP mutation in a consanguineous family: review of the clinical and molecular characteristics of Keutel syndrome. *Am J Med Genet A*, 135, 36-40.
- JARA, A., FELSENFELD, A. J., BOVER, J. & KLEEMAN, C. R. **2000**. Chronic metabolic acidosis in azotemic rats on a high-phosphate diet halts the progression of renal disease. *Kidney international*, 58, 1023-1032.
- JONO, S., MCKEE, M. D., MURRY, C. E., SHIOI, A., NISHIZAWA, Y., MORI, K., MORII, H. & GIACHELLI, C. M. **2000a**. Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circulation research*, 87, E10-7.
- JONO, S., PEINADO, C. & GIACHELLI, C. M. **2000b**. Phosphorylation of osteopontin is required for inhibition of vascular smooth muscle cell calcification. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 20197-20203.
- KENDRICK, J. & CHONCHOL, M. **2011**. The role of phosphorus in the development and progression of vascular calcification. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*, 58, 826-34.
- KETTELER, M., BONGARTZ, P., WESTENFELD, R., WILDBERGER, J. E., MAHNKEN, A. H., BOHM, R., METZGER, T., WANNER, C., JAHNEN-DECHENT, W. & FLOEGE, J. **2003a**. Association of low fetuin-A (AHSG) concentrations in serum with cardiovascular mortality in patients on dialysis: a cross-sectional study. *Lancet*, 361, 827-33.
- KETTELER, M., SCHLIEPER, G. & FLOEGE, J. **2006**. Calcification and cardiovascular health - New insights into an old phenomenon. *Hypertension*, 47, 1027-1034.
- KETTELER, M., WANNER, C., METZGER, T., BONGARTZ, P., WESTENFELD, R., GLADZIWA, U., SCHURGERS, L. J., VERMEER, C., JAHNEN-DECHENT, W. & FLOEGE, J. **2003b**. Deficiencies of calcium-regulatory proteins in dialysis patients: a novel concept of cardiovascular calcification in uremia. *Kidney international. Supplement*, S84-7.

- KEYZER, C. A., VERMEER, C., JOOSTEN, M. M., KNAPEN, M. H., DRUMMEN, N. E., NAVIS, G., BAKKER, S. J. & DE BORST, M. H. **2014**. Vitamin K Status and Mortality After Kidney Transplantation: A Cohort Study. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*.
- KHAN, A., WANG, W. & KHAN, S. R. **2014**. Calcium oxalate nephrolithiasis and expression of matrix GLA protein in the kidneys. *World J Urol*, 32, 123-30.
- KHWAJA, A., EL KOSSI, M., FLOEGE, J. & EL NAHAS, M. **2007**. The management of CKD: A look into the future. *Kidney international*, 72, 1316-1323.
- KIEFFER, P., ROBERT, A., CAPDEVILLE-ATKINSON, C., ATKINSON, J. & LARTAUD-IDJOUADIENE, I. **2000**. Age-related arterial calcification in rats. *Life Sci*, 66, 2371-81.
- KOPPLE, J. D., GREENE, T., CHUMLEA, W. C., HOLLINGER, D., MARONI, B. J., MERRILL, D., SCHERCH, L. K., SCHULMAN, G., WANG, S. R., ZIMMER, G. S. & STUDY, M. D. R. D. **2000**. Relationship between nutritional status and the glomerular filtration rate: Results from the MDRD Study. *Kidney international*, 57, 1688-1703.
- KRUEGER, T., SCHLIEPER, G., SCHURGERS, L., CORNELIS, T., COZZOLINO, M., JACOBI, J., JADOU, M., KETTELER, M., RUMP, L. C., STENVINKEL, P., WESTENFELD, R., WIECEK, A., REINARTZ, S., HILGERS, R. D. & FLOEGE, J. **2013**. Vitamin K1 to slow vascular calcification in haemodialysis patients (VitaVasK trial): a rationale and study protocol. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*.
- KRUGER, T., OELENBERG, S., KAESLER, N., SCHURGERS, L. J., VAN DE SANDT, A. M., BOOR, P., SCHLIEPER, G., BRANDENBURG, V. M., FEKETE, B. C., VEULEMANS, V., KETTELER, M., VERMEER, C., JAHNEN-DECHENT, W., FLOEGE, J. & WESTENFELD, R. **2013**. Warfarin induces cardiovascular damage in mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 33, 2618-24.
- KUDO, Y., OGAWA, I., KITAJIMA, S., KITAGAWA, M., KAWAI, H., GAFFNEY, P. M., MIYAUCHI, M. & TAKATA, T. **2006**. Periostin promotes invasion and anchorage-independent growth in the metastatic process of head and neck cancer. *Cancer Res*, 66, 6928-35.
- KUWAHARA, M., BANNAI, K., SEGAWA, H., MIYAMOTO, K. & YAMATO, H. **2014**. Cardiac remodeling associated with protein increase and lipid accumulation in early-stage chronic kidney disease in rats. *Biochimica et biophysica acta*, 1842, 1433-43.
- LAU, W. L., FESTING, M. H. & GIACHELLI, C. M. **2010**. Phosphate and vascular calcification: Emerging role of the sodium-dependent phosphate co-transporter PiT-1. *Thromb Haemost*, 104, 464-70.
- LEVIN, A., DJURDJEV, O., BARRETT, B., BURGESS, E., CARLISLE, E., ETHIER, J., JINDAL, K., MENDELSSOHN, D., TOBE, S., SINGER, J. & THOMPSON, C. **2001**. Cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease: getting to the heart of the matter. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*, 38, 1398-407.
- LEVIN, A., THOMPSON, C. R., ETHIER, J., CARLISLE, E. J. F., TOBE, S., MENDELSSOHN, D., BURGESS, E., JINDAL, K., BARRETT, B., SINGER, J. & DJURDJEV, O. **1999**. Left ventricular mass index increase in early renal disease: Impact of decline in hemoglobin. *American Journal of Kidney Diseases*, 34, 125-134.
- LI, S., WANG, X., LI, Y., KOST, C. K., JR. & MARTIN, D. S. **2013**. Bortezomib, a proteasome inhibitor, attenuates angiotensin II-induced hypertension and aortic remodeling in rats. *Plos One*, 8, e78564.
- LI, X., YANG, H. Y. & GIACHELLI, C. M. **2008**. BMP-2 promotes phosphate uptake, phenotypic modulation, and calcification of human vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*, 199, 271-7.
- LIU, Z. C., CHOW, K. M. & CHANG, T. M. **2003**. Evaluation of two protocols of uremic rat model: partial nephrectomy and infarction. *Ren Fail*, 25, 935-43.
- LONDON, G. M. **2003**. Cardiovascular calcifications in uremic patients: clinical impact on cardiovascular function. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 14, S305-9.
- LONDON, G. M., GUERIN, A. P., MARCHAIS, S. J., METIVIER, F., PANNIER, B. & ADDA, H. **2003**. Arterial media calcification in end-stage renal disease: impact on all-cause and cardiovascular mortality. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 18, 1731-40.
- LONDON, G. M., MARCHAIS, S. J., GUERIN, A. P. & METIVIER, F. **2005**. Arteriosclerosis, vascular calcifications and cardiovascular disease in uremia. *Current opinion in nephrology and hypertension*, 14, 525-31.
- LUO, G., DUCY, P., MCKEE, M. D., PINERO, G. J., LOYER, E., BEHRINGER, R. R. & KARSENTY, G. **1997**. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature*, 386, 78-81.
- MADHAVAN, S. & ALDERMAN, M. H. **1994**. Relation of Pulse Pressure and Blood-Pressure Reduction to the Incidence of Myocardial-Infarction - Reply. *Hypertension*, 24, 368-368.

- MASSY, Z. A., MENTAVERRI, R., MOZAR, A., BRAZIER, M. & KAMEL, S. **2008**. The pathophysiology of vascular calcification: are osteoclast-like cells the missing link? *Diabetes Metab*, 34 Suppl 1, S16-20.
- MCCARTY, M. F. & DINICOLANTONIO, J. J. **2014**. Bioavailable dietary phosphate, a mediator of cardiovascular disease, may be decreased with plant-based diets, phosphate binders, niacin, and avoidance of phosphate additives. *Nutrition*, 30, 739-47.
- MCCLELLAN, W. M., LANGSTON, R. D. & PRESLEY, R. **2004**. Medicare patients with cardiovascular disease have a high prevalence of chronic kidney disease and a high rate of progression to end-stage renal disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, 15, 1912-1919.
- MCCULLOUGH, P. A., JURKOVITZ, C. T., PERGOLA, P. E., MCGILL, J. B., BROWN, W. W., COLLINS, A. J., CHEN, S. C., LI, S., SINGH, A., NORRIS, K. C., KLAG, M. J. & BAKRIS, G. L. **2007**. Independent components of chronic kidney disease as a cardiovascular risk state - Results from the Kidney Early Evaluation Program (KEEP). *Archives of Internal Medicine*, 167, 1122-1129.
- MCCULLOUGH, P. A., STEIGERWALT, S., TOLIA, K., CHEN, S. C., LI, S. Y., NORRIS, K. C., WHALEY-CONNELL, A. & INVESTIGATORS, K. **2011**. Cardiovascular Disease in Chronic Kidney Disease: Data from the Kidney Early Evaluation Program (KEEP). *Current Diabetes Reports*, 11, 47-55.
- MEGUID EL NAHAS, A. & BELLO, A. K. **2005**. Chronic kidney disease: the global challenge. *Lancet*, 365, 331-40.
- MEIER, M., WENG, L. P., ALEXANDRAKIS, E., RUSCHOFF, J. & GOECKENJAN, G. **2001**. Tracheobronchial stenosis in Keutel syndrome. *Eur Respir J*, 17, 566-9.
- MORI, K., SHIOI, A., JONO, S., NISHIZAWA, Y. & MORII, H. **1998**. Expression of matrix Gla protein (MGP) in an in vitro model of vascular calcification. *FEBS letters*, 433, 19-22.
- MOZAR, A., HAREN, N., CHASSERAUD, M., LOUVET, L., MAZIERE, C., WATTEL, A., MENTAVERRI, R., MORLIERE, P., KAMEL, S., BRAZIER, M., MAZIERE, J. C. & MASSY, Z. A. **2008**. High extracellular inorganic phosphate concentration inhibits RANK-RANKL signaling in osteoclast-like cells. *J Cell Physiol*, 215, 47-54.
- MUNROE, P. B., OLGUNTURK, R. O., FRYNS, J. P., VAN MALDERGEM, L., ZIEREISEN, F., YUKSEL, B., GARDINER, R. M. & CHUNG, E. **1999**. Mutations in the gene encoding the human matrix Gla protein cause Keutel syndrome. *Nat Genet*, 21, 142-4.
- MURSHED, M., SCHINKE, T., MCKEE, M. D. & KARSENTY, G. **2004**. Extracellular matrix mineralization is regulated locally; different roles of two gla-containing proteins. *J Cell Biol*, 165, 625-30.
- NAKAMURA, H., HONDA, H., INADA, Y., KATO, N., KATO, K., KITAZAWA, K. & SUGISAKI, T. **2006**. Osteopontin expression in vascular smooth muscle cells in patients with end-stage renal disease. *Ther Apher Dial*, 10, 273-7.
- NARDI, E., PALERMO, A., MULE, G., CUSIMANO, P., COTTONE, S. & CERASOLA, G. **2009**. Left ventricular hypertrophy and geometry in hypertensive patients with chronic kidney disease. *J Hypertens*, 27, 633-41.
- NAYIR, A., BILGE, I., KILICASLAN, I., ANDER, H., EMRE, S. & SIRIN, A. **2001**. Arterial changes in paediatric haemodialysis patients undergoing renal transplantation. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 16, 2041-7.
- NEUMANN, J., LIGTENBERG, G., KLEIN, II, KOOMANS, H. A. & BLANKESTIJN, P. J. **2004**. Sympathetic hyperactivity in chronic kidney disease: pathogenesis, clinical relevance, and treatment. *Kidney international*, 65, 1568-76.
- NEW, S. E., GOETTSCHE, C., AIKAWA, M., MARCHINI, J. F., SHIBASAKI, M., YABUSAKI, K., LIBBY, P., SHANAHAN, C. M., CROCE, K. & AIKAWA, E. **2013**. Macrophage-derived matrix vesicles: an alternative novel mechanism for microcalcification in atherosclerotic plaques. *Circulation research*, 113, 72-7.
- NG, K., HILDRETH, C. M., PHILLIPS, J. K. & AVOLIO, A. P. **2011**. Aortic stiffness is associated with vascular calcification and remodeling in a chronic kidney disease rat model. *Am J Physiol Renal Physiol*, 300, F1431-6.
- O'YOUNG, J., LIAO, Y., XIAO, Y., JALKANEN, J., LAJOIE, G., KARTTUNEN, M., GOLDBERG, H. A. & HUNTER, G. K. **2011**. Matrix Gla protein inhibits ectopic calcification by a direct interaction with hydroxyapatite crystals. *J Am Chem Soc*, 133, 18406-12.
- OKA, T., XU, J., KAISER, R. A., MELENDEZ, J., HAMBLETON, M., SARGENT, M. A., LORTS, A., BRUNSKILL, E. W., DORN, G. W., 2ND, CONWAY, S. J., ARONOW, B. J., ROBBINS, J. & MOKKENTIN, J. D. **2007**. Genetic manipulation of periostin expression reveals a role in cardiac hypertrophy and ventricular remodeling. *Circulation research*, 101, 313-21.
- OKANO, T., SHIMOMURA, Y., YAMANE, M., SUHARA, Y., KAMAO, M., SUGIURA, M. & NAKAGAWA, K. **2008**. Conversion of phylloquinone (Vitamin K1) into menaquinone-4 (Vitamin

- K2) in mice: two possible routes for menaquinone-4 accumulation in cerebra of mice. *The Journal of biological chemistry*, 283, 11270-9.
- OKUNO, S., ISHIMURA, E., KITATANI, K., FUJINO, Y., KOHNO, K., MAENO, Y., MAEKAWA, K., YAMAKAWA, T., IMANISHI, Y., INABA, M. & NISHIZAWA, Y. **2007**. Presence of abdominal aortic calcification is significantly associated with all-cause and cardiovascular mortality in maintenance hemodialysis. *American Journal of Kidney Diseases*, 49, 417-425.
- OTTO, C. M., BURWASH, I. G., LEGGET, M. E., MUNT, B. I., FUJIOKA, M., HEALY, N. L., KRAFT, C. D., MIYAKE-HULL, C. Y. & SCHWAEGLER, R. G. **1997**. Prospective study of asymptomatic valvular aortic stenosis. Clinical, echocardiographic, and exercise predictors of outcome. *Circulation*, 95, 2262-70.
- PECOITS-FILHO, R., LINDHOLM, B. & STENVINKEL, P. **2002**. The malnutrition, inflammation, and atherosclerosis (MIA) syndrome -- the heart of the matter. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 17 Suppl 11, 28-31.
- PEREZ-RUIZ, L., ROS-LOPEZ, S., CARDUS, A., FERNANDEZ, E. & VALDIVIELSO, J. M. **2006**. A forgotten method to induce experimental chronic renal failure in the rat by ligation of the renal parenchyma. *Nephron. Experimental nephrology*, 103, e126-30.
- PILKEY, R. M., MORTON, A. R., BOFFA, M. B., NOORDHOF, C., DAY, A. G., SU, Y., MILLER, L. M., KOSCHINSKY, M. L. & BOOTH, S. L. **2007a**. Subclinical vitamin K deficiency in hemodialysis patients. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*, 49, 432-9.
- PILKEY, R. M., MORTON, A. R., BOFFA, M. B., NOORDHOF, C., DAY, A. G., SU, Y. H., MILLER, L. M., KOSCHINSKY, M. L. & BOOTH, S. L. **2007b**. Subclinical vitamin K deficiency in hemodialysis patients. *American Journal of Kidney Diseases*, 49, 432-439.
- POHJOLAINEN, V., RYSA, J., NAPANKANGAS, J., KOOBI, P., ERARANTA, A., ILVES, M., SERPI, R., PORSTI, I. & RUSKOAHO, H. **2012**. Left ventricular periostin gene expression is associated with fibrogenesis in experimental renal insufficiency. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 27, 115-22.
- PRICE, P. A., FAUS, S. A. & WILLIAMSON, M. K. **1998**. Warfarin causes rapid calcification of the elastic lamellae in rat arteries and heart valves. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 18, 1400-7.
- PRICE, P. A., URIST, M. R. & OTAWARA, Y. **1983**. Matrix Gla protein, a new gamma-carboxyglutamic acid-containing protein which is associated with the organic matrix of bone. *Biochemical and biophysical research communications*, 117, 765-71.
- PROUDFOOT, D., SKEPPER, J. N., HEGYI, L., BENNETT, M. R., SHANAHAN, C. M. & WEISSBERG, P. L. **2000**. Apoptosis regulates human vascular calcification in vitro: evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies. *Circulation research*, 87, 1055-62.
- PUCAJ, K., RASMUSSEN, H., MOLLER, M. & PRESTON, T. **2011**. Safety and toxicological evaluation of a synthetic vitamin K2, menaquinone-7. *Toxicol Mech Methods*, 21, 520-32.
- PURKERSON, M. L., HOFFSTEN, P. E. & KLAHR, S. **1976**. Pathogenesis of the glomerulopathy associated with renal infarction in rats. *Kidney international*, 9, 407-17.
- REAVEN, P. D. & SACKS, J. **2005**. Coronary artery and abdominal aortic calcification are associated with cardiovascular disease in type 2 diabetes. *Diabetologia*, 48, 379-85.
- RENNENBERG, R. J. M. W., VAN VARIK, B. J., SCHURGERS, L. J., HAMULYAK, K., TEN CATE, H., LEINER, T., VERMEER, C., DE LEEUW, P. W. & KROON, A. A. **2010**. Chronic coumarin treatment is associated with increased extracoronary arterial calcification in humans. *Blood*, 115, 5121-5123.
- REYNOLDS, J. L., JOANNIDES, A. J., SKEPPER, J. N., MCNAIR, R., SCHURGERS, L. J., PROUDFOOT, D., JAHNEN-DECHENT, W., WEISSBERG, P. L. & SHANAHAN, C. M. **2004**. Human vascular smooth muscle cells undergo vesicle-mediated calcification in response to changes in extracellular calcium and phosphate concentrations: a potential mechanism for accelerated vascular calcification in ESRD. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 15, 2857-67.
- RO, A. & KAGEYAMA, N. **2013**. Pathomorphometry of ruptured intracranial vertebral arterial dissection: adventitial rupture, dilated lesion, intimal tear, and medial defect. *J Neurosurg*, 119, 221-7.
- ROOSENS, B., BALA, G., DROOGMANS, S., HOSTENS, J., SOMJA, J., DELVENNE, E., SCHIETTECATE, J., DELVENNE, P., LAHOUTTE, T., VAN CAMP, G. & COSYNS, B. **2012**. Occurrence of cardiovascular calcifications in normal, aging rats. *Exp Gerontol*, 47, 614-9.
- SARNAK, M. J. & LEVEY, A. S. **2000**. Epidemiology, diagnosis, and management of cardiac disease in chronic renal disease. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 10, 169-180.

- SARNAK, M. J., LEVEY, A. S., SCHOOLWERTH, A. C., CORESH, J., CULLETON, B., HAMM, L. L., MCCULLOUGH, P. A., KASISKE, B. L., KELEPOURIS, E., KLAG, M. J., PARFREY, P., PFEFFER, M., RAIJ, L., SPINOSA, D. J. & WILSON, P. W. **2003**. Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease - A statement from the American Heart Association councils on kidney in cardiovascular disease, high blood pressure research, clinical cardiology, and epidemiology and prevention. *Circulation*, 108, 2154-2169.
- SCATENA, M., LIAW, L. & GIACHELLI, C. M. **2007**. Osteopontin - A multifunctional molecule regulating chronic inflammation and vascular disease. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 27, 2302-2309.
- SCHIEBER, D., VEULEMANS, V., HORN, P., CHATROU, M. L., POTTHOFF, S. A., KELM, M., SCHURGERS, L. J. & WESTENFELD, R. **2015**. High-Dose Menaquinone-7 Supplementation Reduces Cardiovascular Calcification in a Murine Model of Extrasosseous Calcification. *Nutrients*, 7, 6991-7011.
- SCHLIEPER, G., WESTENFELD, R., KRUGER, T., CRANENBURG, E. C., MAGDELEYN, E. J., BRANDENBURG, V. M., DJURIC, Z., DAMJANOVIC, T., KETTELER, M., VERMEER, C., DIMKOVIC, N., FLOEGE, J. & SCHURGERS, L. J. **2011**. Circulating nonphosphorylated carboxylated matrix gla protein predicts survival in ESRD. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 22, 387-95.
- SCHURGERS, L. J. **2013**. Vitamin K: key vitamin in controlling vascular calcification in chronic kidney disease. *Kidney international*, 83, 782-4.
- SCHURGERS, L. J., BARRETO, D. V., BARRETO, F. C., LIABEUF, S., RENARD, C., MAGDELEYN, E. J., VERMEER, C., CHOUKROUN, G. & MASSY, Z. A. **2010**. The Circulating Inactive Form of Matrix Gla Protein Is a Surrogate Marker for Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease: A Preliminary Report. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 5, 568-575.
- SCHURGERS, L. J., CRANENBURG, E. C. & VERMEER, C. **2008a**. Matrix Gla-protein: the calcification inhibitor in need of vitamin K. *Thromb Haemost*, 100, 593-603.
- SCHURGERS, L. J., CRANENBURG, E. C. M. & VERMEER, C. **2008b**. Matrix Gla-protein: The calcification inhibitor in need of vitamin K. *Thrombosis and Haemostasis*.
- SCHURGERS, L. J., SPRONK, H. M., SOUTE, B. A., SCHIFFERS, P. M., DEMEY, J. G. & VERMEER, C. **2007a**. Regression of warfarin-induced medial elastocalcinosis by high intake of vitamin K in rats. *Blood*, 109, 2823-31.
- SCHURGERS, L. J., TEUNISSEN, K. J., HAMULYAK, K., KNAPEN, M. H., VIK, H. & VERMEER, C. **2007b**. Vitamin K-containing dietary supplements: comparison of synthetic vitamin K1 and natto-derived menaquinone-7. *Blood*, 109, 3279-83.
- SCHURGERS, L. J., TEUNISSEN, K. J., KNAPEN, M. H., KWAIJTAAL, M., VAN DIEST, R., APPELS, A., REUTELINGSPERGER, C. P., CLEUTJENS, J. P. & VERMEER, C. **2005**. Novel conformation-specific antibodies against matrix gamma-carboxyglutamic acid (Gla) protein: undercarboxylated matrix Gla protein as marker for vascular calcification. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 25, 1629-33.
- SCHURGERS, L. J. & VERMEER, C. **2000**. Determination of phylloquinone and menaquinones in food. Effect of food matrix on circulating vitamin K concentrations. *Haemostasis*, 30, 298-307.
- SEN, K., LINDENMEYER, M. T., GASPERS, A., EICHINGER, F., NEUSSER, M. A., KRETZLER, M., SEGERER, S. & COHEN, C. D. **2011a**. Periostin Is Induced in Glomerular Injury and Expressed de Novo in Interstitial Renal Fibrosis. *American Journal of Pathology*, 179, 1756-1767.
- SEN, K., LINDENMEYER, M. T., GASPERS, A., EICHINGER, F., NEUSSER, M. A., KRETZLER, M., SEGERER, S. & COHEN, C. D. **2011b**. Periostin is induced in glomerular injury and expressed de novo in interstitial renal fibrosis. *Am J Pathol*, 179, 1756-67.
- SHANAHAN, C. M., CARY, N. R., METCALFE, J. C. & WEISSBERG, P. L. **1994**. High expression of genes for calcification-regulating proteins in human atherosclerotic plaques. *Journal of Clinical Investigation*, 93, 2393-402.
- SHANAHAN, C. M., CARY, N. R., SALISBURY, J. R., PROUDFOOT, D., WEISSBERG, P. L. & EDMONDS, M. E. **1999**. Medial localization of mineralization-regulating proteins in association with Monckeberg's sclerosis: evidence for smooth muscle cell-mediated vascular calcification. *Circulation*, 100, 2168-76.
- SHANAHAN, C. M., CROUTHAMEL, M. H., KAPUSTIN, A. & GIACHELLI, C. M. **2011**. Arterial calcification in chronic kidney disease: key roles for calcium and phosphate. *Circulation research*, 109, 697-711.
- SHEA, M. K., O'DONNELL, C. J., VERMEER, C., MAGDELEYN, E. J. P., CROSIER, M. D., GUNDBERG, C. M., ORDOVAS, J. M., KRITCHEVSKY, S. B. & BOOTH, S. L. **2011**. Circulating Uncarboxylated Matrix Gla Protein Is Associated with Vitamin K Nutritional Status, but Not Coronary Artery Calcium, in Older Adults. *Journal of Nutrition*, 141, 1529-1534.
- SHEARER, M. J. **1995**. Vitamin K. *Lancet*, 345, 229-34.

- SHEARER, M. J. & NEWMAN, P. 2008. Metabolism and cell biology of vitamin K. *Thromb Haemost*, 100, 530-47.
- SHIMAMURA, T. & MORRISON, A. B. 1975. A progressive glomerulosclerosis occurring in partial five-sixths nephrectomized rats. *Am J Pathol*, 79, 95-106.
- SHIOI, A., KATAGI, M., OKUNO, Y., MORI, K., JONO, S., KOYAMA, H. & NISHIZAWA, Y. 2002. Induction of bone-type alkaline phosphatase in human vascular smooth muscle cells: roles of tumor necrosis factor-alpha and oncostatin M derived from macrophages. *Circulation research*, 91, 9-16.
- SHOBEIRI, N., ADAMS, M. A. & HOLDEN, R. M. 2010. Vascular calcification in animal models of CKD: A review. *American journal of nephrology*, 31, 471-81.
- SHOBEIRI, N., PANG, J., ADAMS, M. A. & HOLDEN, R. M. 2013. Cardiovascular disease in an adenine-induced model of chronic kidney disease: the temporal link between vascular calcification and haemodynamic consequences. *J Hypertens*, 31, 160-8.
- SON, B. K., KOZAKI, K., IJIMA, K., ETO, M., KOJIMA, T., OTA, H., SENDA, Y., MAEMURA, K., NAKANO, T., AKISHITA, M. & OUCHI, Y. 2006. Statins protect human aortic smooth muscle cells from inorganic phosphate-induced calcification by restoring Gas6-Axl survival pathway. *Circulation research*, 98, 1024-31.
- SPEER, M. Y., MCKEE, M. D., GULDBERG, R. E., LIAW, L., YANG, H. Y., TUNG, E., KARSENTY, G. & GIACHELLI, C. M. 2002. Inactivation of the osteopontin gene enhances vascular calcification of matrix Gla protein-deficient mice: evidence for osteopontin as an inducible inhibitor of vascular calcification in vivo. *J Exp Med*, 196, 1047-55.
- SPRONK, H. M., SOUTE, B. A., SCHURGERS, L. J., THIJSEN, H. H., DE MEY, J. G. & VERMEER, C. 2003. Tissue-specific utilization of menaquinone-4 results in the prevention of arterial calcification in warfarin-treated rats. *Journal of vascular research*, 40, 531-7.
- STAFFORD, D. W. 2005. The vitamin K cycle. *J Thromb Haemost*, 3, 1873-8.
- STANSFIELD, W. E., ANDERSEN, N. M., TANG, R. H. & SELZMAN, C. H. 2009. Periostin is a novel factor in cardiac remodeling after experimental and clinical unloading of the failing heart. *Ann Thorac Surg*, 88, 1916-21.
- STEITZ, S. A., SPEER, M. Y., CURINGA, G., YANG, H. Y., HAYNES, P., AEBERSOLD, R., SCHINKE, T., KARSENTY, G. & GIACHELLI, C. M. 2001. Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification: upregulation of Cbfa1 and downregulation of smooth muscle lineage markers. *Circulation research*, 89, 1147-54.
- STEITZ, S. A., SPEER, M. Y., MCKEE, M. D., LIAW, L., ALMEIDA, M., YANG, H. & GIACHELLI, C. M. 2002. Osteopontin inhibits mineral deposition and promotes regression of ectopic calcification. *Am J Pathol*, 161, 2035-46.
- SUI, Y. B., CHANG, J. R., CHEN, W. J., ZHAO, L., ZHANG, B. H., YU, Y. R., TANG, C. S., YIN, X. H. & QI, Y. F. 2013. Angiotensin-(1-7) inhibits vascular calcification in rats. *Peptides*, 42, 25-34.
- SUTTIE, J. W. 1985. Vitamin K-dependent carboxylase. *Annu Rev Biochem*, 54, 459-77.
- SWEATT, A., SANE, D. C., HUTSON, S. M. & WALLIN, R. 2003. Matrix Gla protein (MGP) and bone morphogenetic protein-2 in aortic calcified lesions of aging rats. *J Thromb Haemost*, 1, 178-85.
- TAAL, M. W. & BRENNER, B. M. 2006. Predicting initiation and progression of chronic kidney disease: Developing renal risk scores. *Kidney international*, 70, 1694-1705.
- TABB, M. M., SUN, A., ZHOU, C., GRUN, F., ERRANDI, J., ROMERO, K., PHAM, H., INOUE, S., MALLICK, S., LIN, M., FORMAN, B. M. & BLUMBERG, B. 2003. Vitamin K2 regulation of bone homeostasis is mediated by the steroid and xenobiotic receptor SXR. *The Journal of biological chemistry*, 278, 43919-27.
- TADDEI, S., NAMI, R., BRUNO, R. M., QUATRINI, I. & NUTI, R. 2011. Hypertension, left ventricular hypertrophy and chronic kidney disease. *Heart Failure Reviews*, 16, 615-620.
- THADEN, J. J., NKOMO, V. T. & ENRIQUEZ-SARANO, M. 2014. The global burden of aortic stenosis. *Prog Cardiovasc Dis*, 56, 565-71.
- TOUSSAINT, N. D. & KERR, P. G. 2007. Vascular calcification and arterial stiffness in chronic kidney disease: implications and management. *Nephrology (Carlton)*, 12, 500-9.
- TOWLER, D. A., BIDDER, M., LATIFI, T., COLEMAN, T. & SEMENKOVICH, C. F. 1998. Diet-induced diabetes activates an osteogenic gene regulatory program in the aortas of low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 30427-30434.
- TSUCHIYA, N., MATSUSHIMA, S., TAKASU, N., KYOKAWA, Y. & TORII, M. 2004. Glomerular calcification induced by bolus injection with dibasic sodium phosphate solution in Sprague-Dawley rats. *Toxicol Pathol*, 32, 408-12.
- TYSON, K. L., REYNOLDS, J. L., MCNAIR, R., ZHANG, Q. P., WEISSBERG, P. L. & SHANAHAN, C. M. 2003. Osteo/chondrocytic transcription factors and their target genes exhibit distinct patterns of expression in human arterial calcification. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 23, 489-494.

- UELAND, T., DAHL, C. P., GULLESTAD, L., AAKHUS, S., BROCH, K., SKARDAL, R., VERMEER, C., AUKRUST, P. & SCHURGERS, L. J. **2011**. Circulating levels of non-phosphorylated undercarboxylated matrix Gla protein are associated with disease severity in patients with chronic heart failure. *Clinical Science*, 121, 119-127.
- UELAND, T., GULLESTAD, L., DAHL, C. P., AUKRUST, P., AAKHUS, S., SOLBERG, O. G., VERMEER, C. & SCHURGERS, L. J. **2010**. Undercarboxylated matrix Gla protein is associated with indices of heart failure and mortality in symptomatic aortic stenosis. *Journal of Internal Medicine*, 268, 483-492.
- VERMEER, C. **1990**. Gamma-carboxyglutamate-containing proteins and the vitamin K-dependent carboxylase. *Biochem J*, 266, 625-36.
- VLIEGENTHART, R., OUDKERK, M., HOFMAN, A., OEI, H. H., VAN DIJCK, W., VAN ROOIJ, F. J. & WITTEMAN, J. C. **2005**. Coronary calcification improves cardiovascular risk prediction in the elderly. *Circulation*, 112, 572-7.
- WAJH, N., BORRAS, T., XUE, W., HUTSON, S. M. & WALLIN, R. **2004**. Processing and transport of matrix gamma-carboxyglutamic acid protein and bone morphogenetic protein-2 in cultured human vascular smooth muscle cells: evidence for an uptake mechanism for serum fetuin. *The Journal of biological chemistry*, 279, 43052-60.
- WALLIN, R., CAIN, D., HUTSON, S. M., SANE, D. C. & LOESER, R. **2000**. Modulation of the binding of matrix Gla protein (MGP) to bone morphogenetic protein-2 (BMP-2). *Thromb Haemost*, 84, 1039-44.
- WALLIN, R., CAIN, D. & SANE, D. C. **1999a**. Matrix gla protein synthesis and gamma-carboxylation in the aortic vessel wall and proliferating vascular smooth muscle cells - A cell system which resembles the system in bone cells. *Thrombosis and Haemostasis*, 82, 1764-1767.
- WALLIN, R., CAIN, D. & SANE, D. C. **1999b**. Matrix Gla protein synthesis and gamma-carboxylation in the aortic vessel wall and proliferating vascular smooth muscle cells--a cell system which resembles the system in bone cells. *Thromb Haemost*, 82, 1764-7.
- WALLIN, R., SCHURGERS, L. & WAJH, N. **2008**. Effects of the blood coagulation vitamin K as an inhibitor of arterial calcification. *Thrombosis Research*, 122, 411-417.
- WANG, L., JEROSCH-HEROLD, M., JACOBS, D. R., JR., SHAHAR, E., DETRANO, R. & FOLSOM, A. R. **2006**. Coronary artery calcification and myocardial perfusion in asymptomatic adults: the MESA (Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis). *Journal of the American College of Cardiology*, 48, 1018-26.
- WESTENFELD, R., KRUEGER, T., SCHLIEPER, G., CRANENBURG, E. C., MAGDELEYNS, E. J., HEIDENREICH, S., HOLZMANN, S., VERMEER, C., JAHNEN-DECHENT, W., KETTELER, M., FLOEGE, J. & SCHURGERS, L. J. **2012**. Effect of vitamin K2 supplementation on functional vitamin K deficiency in hemodialysis patients: a randomized trial. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*, 59, 186-95.
- WESTENFELD, R., SCHAFER, C., KRUGER, T., HAARMANN, C., SCHURGERS, L. J., REUTELINGSPERGER, C., IVANOVSKI, O., DRUEKE, T., MASSY, Z. A., KETTELER, M., FLOEGE, J. & JAHNEN-DECHENT, W. **2009**. Fetuin-A protects against atherosclerotic calcification in CKD. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 20, 1264-74.
- WESTENFELD, R., SCHAFER, C., SMEETS, R., BRANDENBURG, V. M., FLOEGE, J., KETTELER, M. & JAHNEN-DECHENT, W. **2007**. Fetuin-A (AHSG) prevents extraosseous calcification induced by uraemia and phosphate challenge in mice. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 22, 1537-46.
- WHYTE, M. P., WALKENHORST, D. A., FEDDE, K. N., HENTHORN, P. S. & HILL, C. S. **1996**. Hypophosphatasia: levels of bone alkaline phosphatase immunoreactivity in serum reflect disease severity. *J Clin Endocrinol Metab*, 81, 2142-8.
- WILLSON, T. M. & KLIEWER, S. A. **2002**. PXR, CAR and drug metabolism. *Nat Rev Drug Discov*, 1, 259-66.
- WITTEMAN, J. C. M., GROBBEE, D. E., VALKENBURG, H. A., VANHEMERT, A. M., STIJNEN, T., BURGER, H. & HOFMAN, A. **1994**. J-Shaped Relation between Change in Diastolic Blood-Pressure and Progression of Aortic Atherosclerosis. *Lancet*, 343, 504-507.
- WU, M., REMENTER, C. & GIACHELLI, C. M. **2013**. Vascular calcification: an update on mechanisms and challenges in treatment. *Calcif Tissue Int*, 93, 365-73.
- XIE, W. & EVANS, R. M. **2001**. Orphan nuclear receptors: the exotics of xenobiotics. *The Journal of biological chemistry*, 276, 37739-42.
- YOUNG, E. W., ALBERT, J. M., SATAYATHUM, S., GOODKIN, D. A., PISONI, R. L., AKIBA, T., AKIZAWA, T., KUROKAWA, K., BOMMER, J., PIERA, L. & PORT, F. K. **2005**. Predictors and consequences of altered mineral metabolism: the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study. *Kidney international*, 67, 1179-87.

ZEBBOUDJ, A. F., SHIN, V. & BOSTROM, K. **2003**. Matrix GLA protein and BMP-2 regulate osteoinduction in calcifying vascular cells. *J Cell Biochem*, 90, 756-65.

9 Appendix

9.1 Versuchsprotokolle

9.1.1 Dehydratation und Paraffineinbettung der Gewebeproben

- Präparate 30min in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS = *Phosphate Buffered Saline*) waschen
- Dehydratation in aufsteigender Isopropanolreihe
 - 70% Isopropanol für min. 24h bei 4°C
 - 80% Isopropanol
 - 90% Isopropanol
 - 96% Isopropanol
 - 100% Isopropanol

} je 1-2h bei Raumtemperatur
- Xylol-Inkubation (1-2h bei Raumtemperatur) zur Vorbereitung der anschließenden Paraffinfixierung
(→ alle Inkubationen und Waschschrte erfolgten auf einem Probenschüttler)
- Paraffinfixierung für 4 - 6h in flüssigem Paraffin (50-52°C)

9.1.2 Hämatoxylin-Eosin Färbung

- Deparaffinierung:
 - Xylol-Inkubation → 3x5min
 - Isopropanol (100% / 100% / 96% / 80% / 70%) → je 5min
- Rehydratation in destillierem Wasser (dH₂O) → 3x5min
- 5min färben mit Mayers Hämalaun
- Bläuen: 3x5min Leitungswasser
- Azid-Alkohol (1%HCl in 70% Ethanol): Objektträger 2-3x eintauchen bis Pinkfärbung erreicht.
- Waschschrte (3x5min Leitungswasser)
- Ammoniakwasser (1ml NH₄OH in 1l H₂O): Objektträger 5-6x bis zum Eintreten einer dunklen Färbung eintauchen
- Waschschrte (3x5min Leitungswasser)
- 1min färben mit Eosin
- Waschschrte (Objektträger 3-4x in Leitungswasser eintauchen)
- Dehydratation
 - Isopropanol (90% / 96% / 100%) → je 5min

- Xylol-Inkubation → 2x5min
- Konservieren der Schnitte durch Eindeckung mit Eukitt Quick Hardening Mouning Medium

9.1.3 Von-Kossa Färbung

- Deparaffinierung:
 - Xylol-Inkubation → 3x5min
 - Isopropanol (100% / 100% / 96% / 80% / 70%) → je 5min
- Rehydratation in dH₂O → 3x5min
- Inkubation in 5%-Silber-Nitrat-Lösung für 60min unter einer 60 Watt Lampe
- Waschschrift (3x5min in destilliertem Wasser)
- 5% Natrium-Thiosulfat für 5min zur Entfernung von Silber-Protein-Komplexen
- Waschschrift (5min Leitungswasser, anschließend 3x5min dH₂O)
- Gegenfärbung mit Nuclear Fast Red für 5min
- Dehydratation
 - Isopropanol (90% / 96% / 100%) → je 5min
 - Xylol-Inkubation → 2x5min
- Konservieren der Schnitte durch Eindeckung mit Eukitt Quick Hardening Mounting Medium

9.1.4 Anti-cMGP/ -ucMGP Färbung

Tag 1:

- Kryoschnitte 10min auftauen lassen
- Fixierung der Schnitte:
 - Inkubation für 5min in eiskaltem Aceton
 - Trocknung 5min
- Waschschrift: 3x5min mit Tris-gepufferter Salzlösung (TBS = *Tris Buffered Saline*)
- Antigendemaskierung: 10min Inkubation in 0,2% Zitronensäure bei 900 Watt in der Mikrowelle
- Waschschrift: 3x5min TBST (TBS + Tween 20%)
- Blocken der endogenen Peroxidase: 15min Inkubation in 3% H₂O₂ in TBS
- Waschschrift: 3x5min TBST
- Primärantikörperinkubation:
 - Antikörper:
 - cMGP: 0,5mg/ml (Maus)

- ucMGP: 0,91 mg/ml (Maus)
- Konzentration: je 1:100 in TBST + 1% Rinderserumalbumin (BSA = *Bovine Serum Albumin*)
- Inkubation der Schnitte über Nacht bei 4°C
- Erstellung von Negativkontrollen

Tag 2:

- Waschschrift: 3x5min TBST
- Sekundärantikörperinkubation:
 - Antikörper: Kaninchen-anti-Maus (IgG), HRP-konjugiert
 - Konzentration: 1:100 in TBST + 1% BSA für 1h
- Waschschrift: 3x5min TBST
- Vektor NovaRED: 5min
- Waschschrift: 3x5min dH₂O
- Gegenfärbung: 2min Mayes Hämalaun (Klinipath)
- Waschschrift: 10min dH₂O
- Eindecken: Eukitt Quick Hardning Mounting Medium

9.1.5 SM22 α Färbung**Tag 1:**

- Kryoschnitte 10min auftauen lassen
- Fixierung der Schnitte:
 - Inkubation für 5min in eiskaltem Paraformaldehyd
 - Trocknung 5min
- Waschschrift: 3x5min TBS + TritonX-100
- Blockung freier Epitope: 60min bei 40°C in TBST + 1% BSA
- Waschschrift: 3x5min in TBS + TritonX-100
- Blocken der endogenen Peroxidase: 15min Inkubation in 3% H₂O₂ in TBS
- Primärantikörperinkubation:
 - Antikörper: anti-SM22 α (Kaninchen)
 - Konzentration: 1:100 in TBST + 1%BSA
 - Inkubation der Schnitte über Nacht bei 4°C
 - Erstellung einer Negativkontrolle

Tag 2:

- Waschschrift: 3x5min TBST

- Sekundärantikörperinkubation:
 - o Antikörper: Ziege-anti-Kaninchen, HRP-konjugiert
 - o Konzentration: 1:1000 in TBST + 1% BSA für 1h
- Waschschrift: 3x5min TBST
- DAB: 15min
- Waschschrift: 3x5min dH₂O
- Gegenfärbung: 4min Hämatoxylin (Mayers, Applichem)
- Waschschrift: 10min dH₂O
- Eindecken: Eukitt Quick Hardning Mounting Medium

9.1.6 Elastiva van Giesson Färbung

- Kryoschnitte 10min auftauen lassen
- Fixierung der Schnitte:
 - o Inkubation für 5min in eiskaltem Aceton
 - o Trocknung 5min
- Resorcin-Fuchsin Lösung nach Weigert für 1h
- Waschschrift: 3 x 3min in 100% Isopropanol
- Waschschrift: 2 min Leitungswasser
- Eisenhämatoxylin Lösung nach Weigert 10min
- Waschschrift: 10min Leitungswasser
- Van Gieson Lösung 3 min
- Waschschrift: 3 x 70% Isopropanol
- Waschschrift: 90/ 100% Isopropanol je 2x
- Eindecken: Eukitt Quick Hardning Mounting Medium

9.1.7 Ki67/ DAPI-Immunofluoreszenz

Tag 1:

- Kryoschnitte 30min auftauen lassen
- Fixierung der Schnitte:
 - o Inkubation für 5min in eiskaltem Aceton
 - o Trocknung 5min
- Waschschrift: 3x5min TBS + TritonX-100
- Blockung freier Epitope: 60min bei 40°C in TBST + 1% BSA
- Waschschrift: 3x5min in TBS

- Primärantikörperinkubation:
 - o Antikörper: antiKi67 (Kaninchen)
 - o Konzentration: 1:100 in TBST + 1%BSA
 - o Inkubation der Schnitte über Nacht bei 4°C
 - o Erstellung von Negativkontrollen

Tag 2:

- Waschschrift: 3x5min TBST
- Sekundärantikörperinkubation:
 - o Antikörper: Ziege-anti-Kaninchen (IgG), H&L (Alexa Fluor® 488)
 - o Konzentration: 1:100 in TBST + 1% BSA für 1h
- Waschschrift: 3x5min TBST
- DAPI-Gegenfärbung: 1min
- Waschschrift: 3x5min TBST
- Eindecken: Eukitt Quick Hardning Mounting Medium

9.1.8 RNA-Isolation und qRT-PCR**9.1.8.1 RNA-Isolation**

Die Isolation von mRNA aus Gewebeproben von Herz und Aorta erfolgte gemäß des Protokolls des RNeasy Fibrous Tissue Mini Kits. Gewebeproben der Nieren wurden mit Hilfe des RNeasy Mini Kits aufbereitet. Das Protokoll des RNeasy Fibrous Tissue Kit unterscheidet sich durch die zwischenzeitliche Inkubation der Proben mit Proteinase K von dem RNeasy Mini Kit. Die Isolation von mRNA ist in Geweben wie Herz und Aorta durch das reichliche Vorkommen kontraktile Proteine, Kollagene und Bindegewebe erschwert. Proteinase K, eine Serinprotease, spaltet effektiv Peptidbindungen im Sinne einer Exo- und Endopeptidase und erleichtert somit die mRNA-Isolation.

Die bei -80°C gelagerten Organpräparate wurden gewogen und zu zehnfacher Menge des Eigengewichts mit einer Lyse-Pufferlösung, bestehend aus RLT-Puffer und β -Mercaptoethanol, versetzt. In dieser Pufferlösung wurden die Organe mit Hilfe des TissueRuptors homogenisiert und lysiert. Da im Gewebe enthaltene RNasen ebenfalls durch das chaotrope Salz Guanidinthiozyanat des RLT-Puffers lysiert werden, ist die im Homogenat enthaltene RNA für eine gewisse Zeit stabilisiert. Organlysate von Herz und Aorta wurden nach diesem Schritt zehn Minuten lang bei 55°C mit Proteinase K inkubiert. Anschließende Schritte waren für alle Proben identisch. 300 μ l der Homogenate wurden jeweils eins zu eins mit RLT-Puffer verdünnt. Restliche Homogenate wurden für weitere

Untersuchungen bei -80°C konserviert. Durch Zentrifugation (3min, 10000g, RT) wurden verbliebene feste Zellelemente im Homogenat abgetrennt. Der entstehende Überstand wurde mit 700 μl Ethanol (70%) vermischt und auf eine RNeasy Mini Spin Column (MSC) pipettiert. Die MSC wurde in ein 2ml Reaktionsgefäß gestellt. Die Zugabe des Ethanols erhöht die Bindungskapazität der mRNA, sodass diese bei anschließender Zentrifugation (15s, 8000g, RT) besser an die Silica-Membrane der MSC binden. Auf diese Weise wurde die RNA aus dem Homogenat ausgefällt. Nicht an die Säule gebundene Substanzen wurden im Reaktionsgefäß aufgefangen und verworfen. In anschließenden Waschschrritten wurden zuerst 350 μl RW1-Puffer, dann 2x500 μl RPE-Puffer auf MSC mit gebundener mRNA gegeben und zentrifugiert (15s, 8000g, RT). Ziel der Waschschrritte ist die Entfernung von unspezifisch gebundenen Begleitsubstanzen von der Säule. Nach Trocknung der MSC (Zentrifugation: 2min, 8000g, RT) wurde gebundene mRNA mit 30 μl RNase-freiem Wasser eluiert. Das RNase-freie Wasser passiert die Membran bei einer Zentrifugation (1min, 8000g, RT) und löst dabei die gebundene mRNA. Im Reaktionsgefäß unter der MSC findet sich in RNase-freiem Wasser gelöste mRNA. Um einen möglichst großen Anteil der gebundenen mRNA zu lösen, wurde die erhaltene Lösung erneut auf die MSC gegeben und erneut zentrifugiert.

9.1.8.2 RNA - Konzentration und Qualitätskontrolle

Die mRNA-Konzentrationsbestimmung der Eluate erfolgte photometrisch durch Messung der optischen Dichte (OD) mit Hilfe des NanoDrop-Spektrophotometers. Hierzu wurden die Absorptionsspektren von je 1 μl Eluat bei verschiedenen Wellenlängen bestimmt. RNA besitzt ein Absorptionsmaximum bei 260nm. Es gilt folgende Beziehung:

$$c(\mu\text{g RNA/ml}) = A_{260} \times 40$$

Somit entspricht eine Absorptionseinheit (A_{260}) von 1,0 einer mRNA Konzentration von 40 $\mu\text{g/ml}$. Das Absorptionsspektrum von Proteinen beträgt 280nm. Zur Detektion möglicher Proteinkontaminationen der Eluate wurde der Quotient aus den Absorptionsspektren von 260nm zu 280nm bestimmt. Dieser beträgt bei reinen RNA Lösungen etwa 1.9 - 2,1.

Die Integrität der mRNA wurde im Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum der HHU Düsseldorf mit dem Agilent Bioanalyser 2100 untersucht.

9.1.8.3 cDNA-Synthese

Für die qRT-PCR benötigte, einsträngige komplementär DNA (cDNA) wurde mit dem QuantiTect Reverse Transcription Kit aus der zuvor extrahierten mRNA synthetisiert. Alle Schritte wurden gemäß des Herstellerprotokolls durchgeführt. Das im Kit enthaltene

Enzym Reverse Transkriptase (RT) katalysiert Reaktionen, die in der RNA kodierte Informationen auf eine komplementäre DNA umschreiben. Mit Hilfe der RT ist es den RNA-Viren möglich ihr Erbmateriale in DNA umzuschreiben und auf diese Weise das Genom der Wirtszellen zu infizieren. Die RT ist ein multifunktionelles Enzym mit verschiedenen Aktivitäten: Die RNA-abhängige-DNA-Polymerase-Aktivität katalysiert die Synthese eines zur mRNA komplementären DNA Stranges. Der entstehende mRNA-cDNA Hybridstrang wird durch die RNase-H-Aktivität der RT getrennt. Dabei wird nur der angelagerte RNA-Strang hydrolytisch gespalten. In vivo erfolgt zusätzlich die Synthese des zu der cDNA komplementären DNA-Stranges durch die DNA-abhängige-DNA-Polymerase-Aktivität der RT. Diese Reaktion wird von der RT des Kits nicht katalysiert, da die qRT-PCR an einsträngiger cDNA gestartet wird.

Aus den zuvor extrahierten mRNA-Eluaten wurden vor der reversen Transkription genomische DNA-Verunreinigungen entfernt. Dazu wurden 12µl mRNA Eluat (entsprechend 500ng mRNA) mit 2µl gDNA Wipeout Buffer des Kits für 2min bei 42°C inkubiert. Da die vorausgegangene mRNA-Extraktion keine identischen mRNA-Konzentrationen liefert, wurden die mRNA Eluate mit RNase freiem Wasser vermischt, bis alle 12µl Proben 500ng mRNA enthielten.

Für die anschließende reverse Transkription wurde ein Mastermix, bestehend aus 14µl DNA-eliminiertem-mRNA Eluat, 1µl Primer Mix, 4µl Quantiscript RT Puffer und 1µl Quantiscript Reverse Transkriptase hergestellt. Zusätzlich wurde ein Reaktionsansatz ohne RT hergestellt (Pre-RT). Die Synthese eines PCR-Produktes in der Pre-RT-Probe würde eine vorausgegangene genomische DNA-Kontamination der Proben detektieren. Zum Schutze der mRNA vor temperaturbedingter Degradation erfolgten die Arbeitsschritte auf Eis. Mastermix enthaltene Küvetten wurden in einen Thermocycler überführt, in dem die cDNA Synthese für 15min bei 42°C stattfand. Im RT Primermix enthaltene Primer binden an die mRNA und ermöglichen somit die Reaktion der im Kit enthaltenen Reversen Transkriptasen. Im Quantiscript RT-Puffer enthaltene Nukleotidtriphosphate liefern die Grundsteine für die synthetisierten cDNA Stränge. Die Reaktion der RT wurde durch Inkubation der Reagenzien für 3min bei 95°C beendet. Entstandene cDNA wurde in einem Verhältnis von eins zu zehn mit RNase- und DNase freiem Wasser verdünnt und entweder direkt für die qRT-PCR weiterverarbeitet, oder bei -20°C konserviert.

9.1.8.4 RT-PCR

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) erlaubt die Amplifikation bereits kleinster DNA Mengen. Der in einem Thermocycler stattfindende Prozess besteht aus mehreren Zyklen,

in denen die DNA amplifiziert wird. Jeder Zyklus besteht aus drei Reaktionsschritten, die bei definierten Temperaturen stattfinden. Im ersten Schritt wird die doppelsträngige DNA bis zur Denaturation der zwischen den komplementären DNA Strängen befindlichen Wasserstoffbrückenbindungen erhitzt. Anschließend wird die Temperatur im Thermocycler auf einen Wert eingestellt, der die spezifische Anlagerung von Primern an die entstandenen DNA-Einzelstränge ermöglicht. Primer legen Startpunkte für die anschließende Synthese des jeweils komplementären DNA Stranges fest. Im dritten Schritt erfolgt die Strangsynthese durch das Enzym DNA-Polymerase aus in Lösung befindlicher Nukleotidtriphosphate. Die vorliegende DNA-Menge wird auf diese Weise pro PCR-Zyklus verdoppelt. Beruhend auf dieser Technik wurde die quantitative Real Time PCR entwickelt (qRT-PCR). Sie ermöglicht neben der Amplifikation von DNA eine simultane Quantifizierung des entstehenden PCR-Produkts. Somit ist es möglich, die zuvor extrahierte und revers transkribierte mRNA bezüglich der Expressionslevel bestimmter Gene zu untersuchen. Die qRT-PCR wurde entsprechend des Protokolls des Taqman Gene expression assay (Appliedbiosystems) durchgeführt. Dabei binden fluorogene Sonden sequenzspezifisch an ausgesuchte, genkodierende Bereiche des einsträngigen DNA-Matrizenstranges. Nach Anlagerung von Primern an den DNA-Strang kommt es entsprechend der herkömmlichen PCR zur Synthese eines komplementären DNA Abschnitts. Die bereits gebundene, fluorogene Sonde wird dabei durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der AmpliTaq DNA Polymerase abgebaut. Ein entstehendes Fluoreszenzsignal wird vom qRT-Cycler detektiert. Entsprechend der Akkumulation der PCR-Produkte bei zunehmender Zahl der PCR-Zyklen steigt auch das Fluoreszenzsignal der entsprechenden Sonden. Zur Quantifizierung verschiedener Gene sind spezifische Sonden und Primer erhältlich. Das Funktionsprinzip der beschriebenen Technik ist durch den charakteristischen Aufbau der TaqMan PCR Sonden zu erklären. Das 5'-Ende der Sonde ist kovalent mit einem fluoreszierender Reporterfarbstoff (FAM=6-Carboxy-Fluorescein; Ausnahme 18S) verbunden. Dem gegenüber ist ein Quencher-Farbstoff (TAMRA=6-Carboxy-tetramethylrhodamin) über ein Linker-Arm-modifiziertes Nukleotid (LAN) an das 3'-Ende der Sonde gebunden. Die Sonden werden im qRT-Cycler mit einer Wellenlänge von 488nm zur Fluoreszenz angeregt. Aufgrund der räumlichen Nähe von Reporter- und Quencherfarbstoff kommt es durch einen Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET) nach Förster (1948) zur Unterdrückung des Fluoreszenzsignals des Reporters durch das Quenchersignal. Erst die Hydrolyse der Sonde durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der AmpliTaq DNA Polymerase im Rahmen der

Strangsynthese der qRT-PCR hebt die räumliche Nähe von Reporter und Quencher auf. Das Fluoreszenzsignal des Reporters wird detektiert. Da ausschließlich an DNA gebundene Sonden hydrolysiert werden, entspricht das detektierte Fluoreszenzsignal der Akkumulation des PCR-Produkts.

Die Genexpression wurde für MGP, SM22 α , OPN, GGCX, VKOR1, und Periostin untersucht. Die dafür benötigten Primer und Sonden wurden alle von Applied Biosystems bezogen. qRT-PCR wurde mit 96 Well Fast-Platten im 7500 Fast Real-Time PCR System von Applied Biosystems durchgeführt. Für jeden Primer wurde ein jeweiliger Mastermix angefertigt, dem cDNA zugeführt wurde. Für die cDNA Proben jedes Tieres wurden je Primer drei Ansätze pipettiert, um ein möglichst genaues Ergebnis zu erzielen. Zusätzlich wurden bei jeder Probe zwei Wells zur Detektion von Kontaminationen bereitgestellt: Bei der NTC (Non template control) wurde dem Mastermix RNase freies dH₂O statt cDNA zugefügt. In einem zweiten Kontrollwell wurde dem Mastermix eine RNA-Probe zugefügt, bei der in der cDNA Synthese die RT durch RNase freies dH₂O ersetzt wurde (Pre-RT). PCR-Produkte in diesen Wells würden auf Kontaminationen der Proben hinweisen. Auf jede Platte wurde neben den verschiedenen Primern zusätzlich Ribosomales 18S als Referenz- oder Housekeeping Gen der qRT-PCR aufgetragen. Housekeeping Gene werden unabhängig von Zelltyp, Zellzyklus und äußeren Einflüssen in allen Zellen eines Organismus exprimiert und werden bei der qRT-PCR in Relation zu verschiedenen Zielgenen gesetzt. Die Bestimmung der Genexpressionslevel der Zielgene erfolgt somit nicht über die Ermittlung der exakten Kopienzahl der einzelnen Gene, sondern über die Expression im Verhältnis zum konsekutiv exprimierten Housekeeping Gen. Die Expression eines Gens wird in der qRT-PCR über den C_t-Wert (Cycle threshold) ausgedrückt. Der C_t-Wert entspricht der Anzahl an PCR-Zyklen die benötigt werden, bis das entstehende Fluoreszenzsignal einen definierten Schwellenwert überschreitet. Diese Zyklusanzahl ist abhängig von der anfänglich in der Probe enthaltenen Kopienanzahl für das entsprechende Gen. Je höher diese Anzahl, desto geringer ist der C_t-Wert. Die aus der qRT-PCR gewonnenen C_t-Werte der einzelnen Proben wurden in Relation zum konsekutiv exprimierten Housekeeping Gen 18S gesetzt und mit Hilfe des REST© (Relative Expression Software Tool) hinsichtlich signifikanter Unterschiede analysiert.

10 Danksagung

Mein besonderer und größter Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Ralf Westenfeld für die Bereitstellung des Themas und die engagierte Betreuung von Beginn der ersten Vorversuche bis zu den Korrekturen der vorliegenden Arbeit. Seine fachliche Kompetenz, Zielstrebigkeit und Begeisterungsfähigkeit werden mir immer ein Vorbild sein.

Mein besonderer Dank gilt außerdem Frau Dr. med. Verena Veulemans. Mit ihrer intensiven und ausgezeichneten Unterstützung leistete sie einen großen Beitrag zum Gelingen des vorliegenden Projektes.

Frau Anita Kossak danke ich für ihre kompetente Hilfe bei der Durchführung der qRT-PCR.

Herrn Leon J. Schurgers, PhD und Herrn Martijn L.L. Chatrou aus dem Department für Biochemie des Cardiovascular Research Institute der Universität Maastricht danke ich sehr herzlich für eine produktive und freundschaftliche Zusammenarbeit.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Malte Kelm als Direktor der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie für die Möglichkeit einer qualifizierten wissenschaftlichen und klinischen Ausbildung.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir jederzeit unterstützend und motivierend zur Seite stehen.

Mein herzlichster Dank gilt meiner Frau Heike für ihre immerwährende Unterstützung und ihr Verständnis.

11 Erklärung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Düsseldorf, 03.09.2015, Daniel Scheiber

Unterschrift
