

Katharina Victoria Nissle

Dr. med.

## **Benfotiamin vermindert die Schädigung humaner Podozyten bei Inkubation mit Glukose und Glukosedegradationsprodukten aus Peritonealdialyselösungen *in vitro***

Fach: Nephrologie

Doktorvater: Prof. Dr. med. Vedat Schwenger

In glukosehaltigen Peritonealdialyselösungen (engl. *peritoneal dialysis fluid*, PDF) entstehen während Lagerung und Hitzesterilisierung in Abhängigkeit von Temperatur, Zeit und pHWert toxische Glukosedegradationsprodukte (GDP). Neben einer lokalen, d.h. peritonealen Schädigung, werden diese auch während der intraperitonealen Verweildauer des Dialysats in den systemischen Kreislauf resorbiert und können somit zumindest potentiell zu einer additiven Organschädigung, z.B. der Nieren führen. Diese hoch reaktiven GDP reagieren mit Aminosäuren verschiedener Proteine zu fortgeschrittenen Glykierungsendprodukten (engl. *advanced glycation end-products*, AGE). Die Modifikation zellulärer und extrazellulärer Proteine durch GDP und AGE verändert die Eigenschaften dieser Proteine und führt, ebenso wie die direkte Interaktion von AGE mit zellulären Rezeptoren, zur Schädigung von Zellen und Geweben.

Aufbauend auf diesen Kontext konnte tierexperimentell gezeigt werden, dass eine hohe GDP-Konzentration im verwendeten PDF mit einer schnelleren Abnahme der Restnierenfunktion assoziiert ist. Diese wiederum spielt für das Überleben von Peritonealdialysepatienten eine wichtige Rolle. Aus diesem Grund kommt Strategien nicht nur zum Erhalt des Peritoneums, sondern auch der Restnierenfunktion bei Peritonealdialysepatienten eine große klinische Bedeutung zu.

Eine potentielle therapeutische Option bietet Benfotiamin, ein lipidlösliches Thiaminderivat, das durch Aktivierung des Enzyms Transketolase mindestens 4 Wege der Zellschädigung durch hohe Glukosekonzentrationen, unter anderem die AGE-Entstehung, blockiert.

Ziel dieser Dissertationsschrift war es daher, den protektiven Effekt von Benfotiamin auf renales Gewebe, hier am Beispiel von humanen Podozyten, *in vitro* auf die Toxizität durch hohe Glukosekonzentrationen und GDP aus Peritonealdialyselösungen zu untersuchen.

Differenzierte Podozyten einer immortalisierten humanen Podozytenzelllinie wurden für 48h mit einem glukosefreien Kontrollpuffer, Kontrollpuffer unter Zusatz von 2,5% Glukose und einer Peritonealdialyselösung mit einem Glukosegehalt von 2,5% im Verhältnis von 2:1 mit Zellkulturmedium, jeweils mit und ohne Zusatz von 50  $\mu$ M Benfotiamin, inkubiert.

Als möglicher Pathomechanismus der Podozytenschädigung durch Glukose und PDF wurde die Expression von AGE und des AGE-Rezeptors RAGE mittels Immunfluoreszenz und Western Blot untersucht. Um die proinflammatorische Signalkaskade zu untersuchen wurde die Aktivierung und die mit dieser verbundene Relokalisation des Transkriptionsfaktors NF  $\kappa$ B in der Immunfluoreszenzfärbung herangezogen. Die Apoptoserate der Podozyten als Marker für Zellverlust wurde anhand der Kondensation und Fragmentierung der Zellkerne in der Immunfluoreszenzfärbung bestimmt. Veränderungen der zellulären Architektur der Podozyten wurden durch Immunfluoreszenzfärbungen der Proteine Nephritin, Podocin,  $\alpha$ -Aktinin und ZO-1 sowie des Aktinzytoskeletts untersucht, außerdem wurden Western Blots der Proteine  $\alpha$ -Aktinin und ZO-1 verwendet, um quantitative Veränderungen der Proteinexpression zu darzustellen. Abschließend wurde mittels Scratch Assays die Migrationsfähigkeit der Podozyten als Marker für einen potentiellen Funktionsverlust der Zellen untersucht.

Benfotiamin führte zu einer signifikanten Reduktion der AGE-Expression bei Inkubation mit hohen Glukosekonzentrationen, eine Inkubation mit PDF führte ebenfalls zu einer Abnahme der AGE-Expression. Außerdem reduzierte Benfotiamin die Expression des AGE-Rezeptors RAGE bei Inkubation mit Glukose und PDF. Auch die Aktivierung des inflammationsassoziierten Transkriptionsfaktors NF  $\kappa$ B durch Glukose war durch Benfotiamin deutlich vermindert, bei Inkubation mit PDF zeigte sich eine (statistisch nicht signifikante) Tendenz zur Reduktion der NF  $\kappa$ B-Aktivierung. Im Rahmen dieser Arbeit konnte des Weiteren gezeigt werden, dass Benfotiamin die Relokalisation des

schlitzmembranassoziierten Proteins Podocin, die Verlagerung des Aktinzytoskeletts von stress-fiber-artig nach kortikal sowie die Disruption und Verminderung der ZO1-Expression der Podozyten durch Glukose und PDF reduzierte. Außerdem führte Zugabe von Benfotiamin zu einer geringeren Apoptoserate sowie zum Erhalt der bei Inkubation mit Glukose und PDF verringerten Zellmigration humaner Podozyten *in vitro*.

Somit unterstützen die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse die Hypothese, dass Benfotiamin die Podozytenschädigung durch hohe Glukosekonzentrationen, GDP und AGE verhindert. Dies könnte ein Ansatz zur Protektion der Podozyten als wichtiger Bestandteil des glomerulären Filters und somit der (residualen) Nierenfunktion sowohl bei Peritonealdialysepatienten als auch bei Patienten mit Diabetes mellitus sein.