

Aus der Klinik für Nephrologie und Endokrinologie
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Wirkung von Acetylcystein auf Plasma-
Homocysteinspiegel, oxidativen Stress, Pulsdruck und
Endothelfunktion bei Hämodialyse-Patienten

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von Christiane Wieczorek
aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. M. Tepel
2. Prof. Dr. med. M. Hausberg
3. Priv.-Doz. Dr. med. R. Vetter

Datum der Promotion: 14. Juni 2009

meinen Eltern

I. INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	8
1.1	TERMINALE NIERENINSUFFIZIENZ.....	9
1.1.1	<i>Prävalenz und Konsequenz</i>	9
1.1.2	<i>Ursachen</i>	10
1.2	ENDOTHEL.....	11
1.2.1	<i>Physiologie des Endothels</i>	11
1.2.2	<i>Endotheliale Dysfunktion</i>	12
1.2.3	<i>Arteriosklerose</i>	15
1.2.4	<i>Pulsdruck und Pulswellenanalyse</i>	17
1.3	HOMOCYSTEIN.....	18
1.3.1	<i>Metabolismus</i>	19
1.3.2	<i>Homocystein als Risikofaktor</i>	21
1.4	REAKTIVE SAUERSTOFFRADIKALE.....	23
1.4.1	<i>Definition und Eigenschaften</i>	23
1.4.2	<i>Die NAD(P)H-Oxidasen</i>	24
1.5	ACETYLCYSTEIN.....	25
1.6	FRAGESTELLUNG.....	28
2	Material und Methoden	29
2.1	PATIENTEN.....	29
2.2	BIOCHEMISCHE MESSUNGEN.....	30
2.2.1	<i>Messgeräte</i>	30
2.2.2	<i>Reagenzien</i>	30
2.2.3	<i>Puffer</i>	31
2.2.4	<i>Isolation der mononukleären Leukozyten</i>	31
2.2.5	<i>Messung der reaktiven Sauerstoffradikale in vitro</i>	32
2.2.6	<i>Messung des Superoxidanions in vitro</i>	32
2.2.7	<i>Messung des Plasma-Homocysteinspiegels</i>	34
2.3	PULSDRUCK.....	36
2.3.1	<i>Messgerät</i>	36
2.3.2	<i>Ermittlung der Messwerte</i>	36
2.4	FINGERPHOTOPLETHYSMOGRAPHIE.....	36
2.4.1	<i>Messgeräte</i>	36

2.4.2	<i>Ermittlung der Messwerte</i>	36
2.5	STATISTIK	39
2.5.1	<i>Programme</i>	39
2.5.2	<i>Auswertung</i>	39
3	Ergebnisse	40
3.1	BIOCHEMISCHE AUSWIRKUNGEN	43
3.1.1	<i>Bildung von intrazellulären reaktiven Sauerstoffradikalen</i>	43
3.1.2	<i>Bildung von Superoxid-Radikalen</i>	48
3.1.3	<i>Plasma-Homocysteinspiegel</i>	51
3.2	HÄMODYNAMISCHE AUSWIRKUNGEN	54
3.2.1	<i>Pulsdruck</i>	54
3.2.2	<i>Fingerphotoplethysmographie</i>	56
4	Diskussion	60
4.1	AUSBLICK	65
5	Zusammenfassung	66
6	Literatur	68
7	Danksagung	84
8	Lebenslauf	85
9	Erklärung	87

II. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACC	N-acetyl-L-cystein, Acetylcystein
ACE	<i>engl.:</i> Angiotensin-converting Enzyme
ADMA	asymmetrisches Dimethylarginin
AT1	Angiotensin I
ATP	Adenosin-tri-phosphat
cGMP	zyklisches Guanosin-monophosphat
CRP	C-reaktives Protein
CSE-Hemmer	Cholesterin-Synthese-Enzym-Hemmer
DCFDA	2,7,-Dichlorofluorescein-diacetat
DPI	Diphenyleneiodonium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDRF	<i>engl.:</i> endothelium derived relaxing factor
HBSS	<i>engl.:</i> Hank's balanced salt solution
Hcy	Homocystein
HD	Hämodialyse
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
LDL	<i>engl.:</i> low density lipoprotein
MCP-1	monocyte chemotractant protein 1
Min	Minuten
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure, <i>engl.:</i> messenger ribonucleine-acid
NAD(P)H	reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid(-Phosphat)
NO	Stickoxid
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung

PBMC	<i>engl.</i> : peripheral blood mononuclear cells, mononukleäre Leukozyten
PD	Pulsdruck
PEAF	<i>engl.</i> : platelet endothelial adhesion factor
PEF	<i>engl.</i> : platelet endothelial factor
PGI ₂	Prostaglandin I ₂
PMA	Phorbolmyristat-acetat
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffradikale, <i>engl.</i> : reactive oxygen species
RP-HPLC	Umkehrphase-Hochdruckflüssigkeitschromatographie, <i>engl.</i> : reversed phase
RR _{dia}	diastolischer Blutdruck nach Riva-Rocci
RR _{sys}	systolischer Blutdruck nach Riva-Rocci
SAM	S-adenosylmethionin

1 Einleitung

Die Erfindung der Hämodialyse durch Georg Haas 1924 sowie die Wegbereitung zur modernen Hämodialyse durch Willem Kolff in den 1940er Jahren waren die entscheidenden technologischen Entwicklungen zur Behandlung von Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz. Trotz stetiger Weiterentwicklung und Routine-Anwendung, die einer Vielzahl von Menschen - 66 508 im Jahr 2006 in der Bundesrepublik Deutschland (Frei und Schober-Halstenberg 2008) - ein Leben mit ihrer Krankheit ermöglichen, sind wichtige Fragen noch ungelöst.

So zeigen Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz eine erhöhte kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität, die einer Kumulation verschiedener Risikofaktoren zugeschrieben wird (Locatelli et al. 2000; Parfrey 2000). Etwa 50 % der Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz sterben aufgrund von kardiovaskulären Ereignissen wie zum Beispiel Myokardinfarkt oder cerebralem Insult (Foley et al. 1998; Herzog et al. 1998; Tonelli et al. 2006). Die kardiovaskuläre Mortalität ist 15-30 mal höher als in der altersentsprechenden Bevölkerung (Foley et al. 1998; Parfrey und Foley 1999).

Viele kardiovaskuläre Risikofaktoren, die einen Einfluss insbesondere auf die Endothelfunktion haben, werden regelmäßig im Zusammenhang mit einer chronischen Niereninsuffizienz gefunden. Erkrankungen wie Diabetes, Adipositas und arterielle Hypertonie, sowie das Vorliegen einer renalen Dysfunktion per se, führen zu einer Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems mit erniedrigtem Reninspiegel und Natriumretention mit daraus resultierender Verstärkung einer arteriellen Hypertonie (Guyton und Coleman 1999). Des Weiteren findet sich vermehrter oxidativer Stress, ein erhöhter Spiegel asymmetrischen Dimethylarginins (ADMA), geringgradige Entzündungsreaktionen mit erhöhten zirkulierenden Zytokinen sowie eine Dyslipidämie. Weitere Komplikationen sind eine durch verminderte Erythropoetinsynthese verursachte renale Anämie und eine Urämie, darunter ein erhöhter Plasma-Homocysteinspiegel wegen verminderter Filtrationsleistung der Niere mit einer Retention harnpflichtiger Substanzen. Diese pathophysiologischen Mechanismen sind im Zusammenhang mit Niereninsuffizienz und kardiovaskulären Erkrankungen von entscheidender Bedeutung für die Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion (Amann et al. 2006).

Der erhöhte Plasma-Homocysteinspiegel bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz fand in den letzten Jahren eine erhöhte Aufmerksamkeit. Bereits 1969 vermutete McCully einen Zusammenhang zwischen einem erhöhten Plasma-Homocysteinspiegel und Arteriosklerose. In verschiedenen Studien konnte ein Zusammenhang von Plasma-Homocysteinspiegel und kardiovaskulären Ereignissen hergestellt werden (Loscalzo 2006). Ein Ansatzpunkt zur Verbesserung der Prognose für Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz stellt daher möglicherweise eine Senkung des pathologischen Plasma-Homocysteinspiegels dar.

1.1 Terminale Niereninsuffizienz

1.1.1 Prävalenz und Konsequenz

Als Niereninsuffizienz wird die eingeschränkte Fähigkeit der Nieren bezeichnet, harnpflichtige Substanzen auszuscheiden. Generell wird der Verlauf der Niereninsuffizienz in vier Stadien eingeteilt, wobei der Übergang zwischen diesen fließend ist. Zunächst findet sich eine eingeschränkte Niereninsuffizienz (Stadium I) mit symptomloser Reduktion der glomerulären Filtrationsrate von normalerweise mehr als 120 ml/min auf 70-120 ml/min. Bei weiterer Abnahme der glomerulären Filtrationsrate auf 20-70 ml/min und kompensierter Retention mit Anämie und Osteopathie mit einem Serum-Kreatininspiegel von 1,5-4 mg/dl spricht man von einer leichten Niereninsuffizienz (Stadium II). Bei der schweren Niereninsuffizienz (Stadium III) kommen eine kompensierte metabolische Azidose, Salz-Wasser-Retention, eine Polyneuropathie und eine Gonadendysfunktion hinzu. Außerdem findet sich ein sekundärer Hyperparathyreoidismus bei reaktiver Hyperplasie der Nebenschilddrüse aufgrund der niereninsuffizienzbedingten Hyperphosphatämie, die glomeruläre Filtrationsrate sinkt auf 5-20 ml/min bei einem Serum-Kreatininspiegel von 4-7 mg/dl. Die terminale Niereninsuffizienz (Stadium IV) schließlich bezeichnet eine Urämie mit dekompenzierter Azidose, die mit einer glomerulären Filtrationsrate <5 ml/min und einem Serum-Kreatininspiegel >7 mg/dl eine Nierenersatztherapie unumgänglich machen. Hierzu stehen verschiedene Formen der Dialysebehandlung sowie die Nierentransplantation zur Verfügung.

In Deutschland lag die Prävalenz der terminalen Niereninsuffizienz und daraus resultierender chronischer Nierenersatztherapie am Stichtag 31.12.2006 bei 1 114 pro Mio. Einwohner, in absoluten Zahlen bei 91 718, für Dialysebehandlung bei 808 pro Mio. Einwohner (66 508), 732 davon in Hämodialysebehandlung (63 307). Die Prävalenz der Nierentransplantierten lag bei 306 pro Mio. Einwohner (25 210). Neuaufgenommen in chronische Nierenersatztherapie wurden 17 548 Patienten, die Inzidenz im Jahr 2006 lag damit bei 213 pro Mio. Einwohner. Die Mortalität unter den Patienten in chronischer Nierenersatztherapie lag bei 12 130 Patienten (13,2 %) im Jahre 2006 (Frei und Schober-Halstenberg 2008).

1.1.2 Ursachen

Als Ursache der chronischen Niereninsuffizienz kommen vaskuläre, glomeruläre und tubulointerstitielle Nierenerkrankungen unterschiedlicher Genese sowie Infektionen und angeborene oder erworbene Strukturdefekte in Frage. Diabetes mellitus und arterielle Hypertonie mit daraus resultierender hypertensiver Nephropathie waren 2006 in Deutschland zusammen für etwa 60 % der Fälle von neu aufgetretener terminaler Niereninsuffizienz verantwortlich. Bei etwa 10% der Fälle von dialysepflichtiger chronischer Niereninsuffizienz bleibt die Ursache ungeklärt (Frei und Schober-Halstenberg 2008).

Bei vielen Formen von renalen Erkrankungen kommt es zu einer Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems. Zu den Mechanismen, durch die das Renin-Angiotensin-System bei Niereninsuffizienz aktiviert werden kann, zählt die Adaptierung an den Verlust von Nierengewebe, der Änderungen der Hämodynamik bewirkt. Angiotensin I bindet an den AT1-Rezeptor und stimuliert so die Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen (*engl.* reactive oxygen species, ROS) durch die NAD(P)H-Oxidase und andere Enzymsysteme. Sauerstoffradikale dienen in physiologischen Prozessen als Botenstoffe. Eine pathologische Hochregulation von Angiotensin I führt über die Bildung von Superoxidanionen zu einer endothelialen Dysfunktion, die zu Gefäßumbau und Gefäßwachstum beiträgt (Touyz 2004). Außerdem hat es eine Hochregulierung von Entzündungsmediatoren zur Folge. Hierzu zählen Zytokine, Chemokine, Adhäsionsmoleküle und Superoxide. Diese befördern eine Dysfunktion des Endothels, welche sich letztendlich in Gefäßumbau und dem Fortschreiten von Atherosklerose manifestiert (Schiffrin 2004).

1.2 Endothel

Das Endothel ist eine Einzelzellschicht, die sämtliche Blutgefäße des menschlichen Gefäßsystems auskleidet und eine makromolekulare Barriere zwischen intraluminalen Raum und der subendothelialen Zone, die aus extrazellulärer Matrix und glatten Gefäßmuskelzellen besteht, darstellt. Im Folgenden sollen kurz die physiologische Bedeutung sowie vor allem die Folgen einer Dysfunktion des Endothels beschrieben werden.

1.2.1 Physiologie des Endothels

Das Endothel spielt mit der Bildung einer antithrombogenen Oberfläche, der Kontrolle des trans- und perizellulären Stofftransportes und der Produktion einer Vielzahl von Mediatoren eine entscheidende Rolle in der physiologischen Funktion der Gefäße (Bombeli et al. 1997; Cines et al. 1998). Einen essentiellen Beitrag zur Gefäßfunktion leistet das Endothel durch die Regulation des Gefäßtonus. Es setzt sowohl relaxierende, zum Beispiel Stickstoffmonoxid (NO) und Prostaglandin I₂ (Prostacyclin), als auch kontrahierende Mediatoren wie Endothelin und PAF (*engl.*: platelet-activating factor) frei. Diese Mediatoren haben außerdem Einfluß auf die Gefäßstruktur, Koagulation, Fibrinolyse und Entzündungsreaktionen (Cines et al. 1998).

Stickstoffmonoxid (NO, auch *engl.*: „Endothelium derived relaxing factor“, EDRF) ist eines der wichtigsten Signalmoleküle bei der Regulation der Gefäßfunktion (Rubanyi 1993). Bei vermehrter Bildung aus der Aminosäure L-Arginin und Freisetzung im Endothel gelangt es durch Diffusion in glatte Gefäßmuskelzellen. Dort bindet es an die zytoplasmatische Guanylatcyclase, die zyklisches Guanosin-monophosphat (cGMP) aus Guanosin-triphosphat bildet. Der cGMP-Spiegel steigt. Dies bewirkt eine cGMP vermittelte Vasorelaxation über die cGMP-Kinase (Koeppen et al. 2004), die vermehrt in glatten Gefäßmuskelzellen, in Thrombozyten und dem Kleinhirn vorhanden ist. Die cGMP-Kinase induziert über zwei Mechanismen eine Vasodilatation. Zum einen phosphoryliert sie Kaliumkanäle der Plasmamembran, es kommt zu einem Kaliumionen-Ausstrom, zur Hyperpolarisation der glatten Gefäßmuskelzellen und dem Verschluss spannungsabhängiger Calciumkanäle. Hierdurch vermindert sich durch Reduktion des Calciumioneneinstroms die intrazelluläre Calciumionenkonzentration (Archer et al. 1994; Sausbier et al. 2000). Zum anderen kommt es durch Phosphorylierung des Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptors am sarkoplasmatischen

Retikulum zu einer verminderten Freisetzung von Calciumionen aus den intrazellulären Speichern (Schlossmann et al. 2000) sowie im Gegenzug zu einer verstärkten Speicherung von Calciumionen, was ebenfalls zur Reduktion der zytosolischen Calciumionenkonzentration beiträgt. Beide Mechanismen haben also durch Verringerung der cytoplasmatischen Calcium-Konzentration eine Auswirkung auf den Calcium-abhängigen Kontraktionsmechanismus der glatten Gefäßmuskulatur. Als Folge der NO-Freisetzung kommt es somit zur Vasodilatation (Jaggar et al. 2000).

Die endotheliale Dysfunktion zeigt auf molekularer Ebene vor allem eine Störung des endothelialen L-Arginin-NO-Stoffwechsels (Kelm et al. 1999).

1.2.2 Endotheliale Dysfunktion

Unter einer endothelialen Dysfunktion versteht man die Unfähigkeit des Gefäßendothels, die physiologischen Mechanismen zur Regulation des Gefäßradius, der Blutgerinnung, der Produktion antiinflammatorischer Zytokine oder der morphologischen Regulation der Gefäße in einer angemessenen Weise zu leisten (Gimbrone 1995; Kelm et al. 1999). Es handelt sich hierbei also um eine funktionelle Störung der Gefäßregulation, bei der die Struktur der Endothelzellen noch intakt ist. Gelingt es, die schädigenden Einflüsse auf das Gefäßendothel rechtzeitig auszuschalten, ist eine vollständige Wiederherstellung und Normalisierung der Endothelfunktion möglich. Hieraus ergibt sich die dringende Notwendigkeit zur frühzeitigen Diagnostik und Therapie einer endothelialen Dysfunktion (Nakanishi et al. 2002; Bonetti et al. 2003).

Endotheliale Dysfunktion zeigt sich unter anderem in einer verminderten Fähigkeit des Endothels, auf einen adäquaten Reiz hin mit einer NO-Freisetzung zur Vasodilatation zu reagieren. Ein entsprechendes experimentelles Korrelat zeigt sich in der Reaktion eines Gefäßes mit funktionseingeschränktem Endothel auf Acetylcholin (Jayakody et al. 1985). Acetylcholin wirkt über vaskuläre muscarinerge Rezeptoren sowohl vasokonstriktorisch als auch unter physiologischen Bedingungen durch eine Aktivierung der endothelialen NO-Synthase vasodilatatorisch. Unter physiologischen Bedingungen überwiegen die vasodilatatorischen Einflüsse (Rubanyi 1993). Kommt es unter pathophysiologischen Bedingungen zu einer Schädigung des Endothels und in deren Folge zu einer inadäquaten NO-Freisetzung, kehrt sich die physiologische

vasodilatatorische Wirkung von Acetylcholin in eine über den muskarinergen Mechanismus vermittelten vasokonstriktorische um (Jayakody et al. 1985; Freiman et al. 1986; Ludmer et al. 1986). Dieser Mechanismus konnte *in vivo* durch Experimente an hypercholesterinämischen Hasen und Affen mit endothelialer Dysfunktion bestätigt werden (Jayakody et al. 1985; Freiman et al. 1986). Entsprechende Beobachtungen zeigen sich auch bei Menschen mit koronarer Herzkrankheit (Ludmer et al. 1986; Golino et al. 1991), Arteriosklerose (Zeiger et al. 1993), Herzinsuffizienz (Fish et al. 1988), Diabetes (Stehouwer et al. 1997), Hypercholesterinämie (Cai und Harrison 2000), terminaler Niereninsuffizienz oder Hypertonie (Moncada und Higgs 1991; Cai und Harrison 2000), bei deren Ätiologie unter anderem eine endotheliale Dysfunktion pathogenetisch eine Rolle spielt. Ein Mechanismus ist hierbei eine verminderte Bioverfügbarkeit des NO infolge von oxidativen Veränderungen durch das Superoxid-Anion (O_2^-), welches bei endothelialer Dysfunktion vermehrt in der Gefäßwand gebildet wird.

Die oxidativen Veränderungen des NO bewirken eine verminderte Fähigkeit zur Dilatation (Rubanyi und Vanhoutte 1986; Harrison 1997). Bei einer Vielzahl von Erkrankungen, wie den oben genannten, scheinen unter anderem diese oxidativen Veränderungen als pathogenetischer Mechanismus eine wesentliche Rolle zu spielen (Dhalla et al. 2000). An hypercholesterinämischen Hasen wurde gezeigt, dass diese eine hochgradige Einschränkung der endothelabhängigen Vasodilatation besitzen, die auf einen Mangel an NO hindeutet. Die NO-Produktion des Endothels ist dabei jedoch nicht eingeschränkt, da es als Kompensationsmechanismus zu einer bis dreifach gesteigerten Freisetzung von Nitrogenoxiden (NO und seine oxidierten Produkte) kommen kann. (Minor et al. 1990). Die oxidativen Reaktionen bewirken eine Inaktivierung des NO-Moleküls, das entweder in vasoinactive Nitrogenoxide (Nitrate oder Nitrite) oder das vasokonstriktorisch wirkende Peroxynitrit umgewandelt wird. Unter Therapie mit antioxidativ wirkenden Substanzen (Tocopherole, CSE-Hemmer) konnte die endothelabhängige Vasorelaxation deutlich verbessert werden (Levine et al. 1996; Ting et al. 1996; Solzbach et al. 1997).

Bei NO-Mangel kommt es außerdem zu einem Ungleichgewicht zwischen koagulierenden und antikoagulierenden Mediatoren wie NO, PGI_2 und PAF sowie wachstumshemmenden und wachstumsfördernden Substanzen (Rubanyi 1993).

Endotheliale Dysfunktion (Wever et al. 1999; Vaziri 2002; Endemann und Schiffrin 2004; Stehouwer 2004; Passauer et al. 2005) und der Umbau von Blutgefäßen (Foley et al. 1996) spielen nicht nur in der Genese vaskulärer Komplikationen bei Patienten mit terminalem Nierenversagen eine entscheidende Rolle, sondern auch in der Aufrechterhaltung eines erhöhten Blutdrucks.

Eine Unausgewogenheit der endothelialen Funktion führt zu Arteriosklerose (Schiffrin et al. 2007). Endotheliale Dysfunktion sowohl in kleinen wie in großen Arterien tritt bei chronischer Niereninsuffizienz auf (Endemann und Schiffrin 2004). Mikroalbuminurie, ein Marker glomerulärer Hyperfiltration, konnte mit einer beeinträchtigten Endothelfunktion in Verbindung gebracht werden. Möglicherweise stellt sie sogar eine ihrer Manifestationen dar und trägt selbst zur renalen Dysfunktion bei (Stehouwer und Smulders 2006). Experimentelle Ergebnisse lassen vermuten, dass mikrovaskuläre endotheliale Dysfunktion zu den Mechanismen gehört, die zum Fortschritt einer Niereninsuffizienz führen (Fujihara et al. 1995). Dies wiederum kann die endotheliale Dysfunktion verschlimmern und zu einer Beschleunigung der Atherogenese führen. Es wurde postuliert, dass glomeruläre endotheliale Dysfunktion selbst eine frühe Auswirkung essentieller Hypertonie sei, die der Blutdruckerhöhung vorausgehe. Endotheliale Dysfunktion wiederum kann laut Hoorn Studie (Stam et al. 2006) bereits bei leichter Niereninsuffizienz zu einer erhöhten kardiovaskulären Mortalität beitragen. Das gemeinsame Auftreten einer beeinträchtigten Endothelfunktion, geringgradiger Entzündungsreaktion und Dyslipidämie gepaart mit einer Niereninsuffizienz könnte die Beschleunigung der Arteriosklerose und im Zusammenspiel mit arterieller Hypertonie die hohe Prävalenz von koronarer Ischämie und kardiovaskulären Ereignissen bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz erklären (Schiffrin et al. 2007).

Neben Faktoren wie erhöhtem Plasma-Homocysteinspiegel (Selhub et al. 1995), reaktiven Sauerstoffradikalen (Barry-Lane et al. 2001), erhöhten Plasmakonzentrationen an LDL und seiner chemisch modifizierten Derivate, Diabetes mellitus (Kunjathoor et al. 1996), Hypertonie (Gress et al. 2000), genetischen Faktoren oder möglicherweise auch infektiösen Agentien, wie zum Beispiel *Clamydia pneumoniae* (Blanchard et al. 1993), stellt die endotheliale Dysfunktion einen wesentlichen Mechanismus der Arterioskleroseentstehung dar. Sie verstärkt atherogene Prozesse

wie die Adhäsion und Gefäßwandpermeabilität von Leukozyten oder Thrombozyten an die Intima (Sachais 2001).

1.2.3 Arteriosklerose

Kardiovaskuläre Erkrankungen, insbesondere als Begleiterkrankungen einer arteriosklerotischen Grunderkrankung, stellen heute weiterhin die häufigste Todesursache in der Europäischen Union dar (Statistisches Bundesamt 2006). Die Arteriosklerose ist eine entzündliche Gefäßerkrankung, die in verschiedenen Stadien abläuft, die durch spezifische zelluläre und nichtzelluläre Prozesse unterhalten werden (Ross 1999). Sie bezeichnet im Gegensatz zur endothelialen Dysfunktion eine strukturelle Veränderung von Intima und Endothelzellschicht, im Verlauf kommt es zu irreversiblen Umbauten und Schädigungen der Gefäßwand. Bei 30 bis 50 % der Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz finden sich erhöhte Serumspiegel inflammatorischer Marker wie C-reaktives Protein (CRP) (Vaziri et al. 1998; Jofre et al. 2006).

Spezielle Bereiche innerhalb des arteriellen Gefäßsystems, wie z.B. Gefäßabzweigungen, Bifurkationen oder Kurven verursachen charakteristische Veränderungen innerhalb des Blutflusses mit Ausbildung einer verstärkten turbulenten Strömung. In diesen Regionen, an denen niedriger und schwankender endothelialer Scherstress auftritt, bilden sich bevorzugt atherosklerotische Läsionen. Niedriger endothelialer Scherstress moduliert endotheliale Genexpression durch komplexe Mechanorezeptions- und Mechanotransduktionsprozesse, die zu einer Änderung des Expressionsmusters von Zellen der Gefäßwand in einen atherogenen endothelialen Phänotyp führt, wodurch die Bildung von frühen atherosklerotischen Plaques induziert wird (Chatzizisis et al. 2007).

Die frühesten Läsionen (auch „fatty streak“ genannt) können schon bei Kindern und Jugendlichen beobachtet werden (Napoli 1997). Sie sind Ausdruck einer reinen inflammatorischen Gefäßwandreaktion, die mikroskopisch aus wandständigen Makrophagen und T-Lymphozyten besteht (Stary et al. 1994). Eine große Anzahl von verschiedenen Adhäsionsmolekülen, wie z.B. der „platelet-endothelial-adhesion factor“ (PEAF) und Selektine, die als Rezeptoren dienen, werden in diesen Bereichen vermehrt exprimiert. Die Liganden dieser Rezeptoren befinden sich auf der Oberfläche von

Monozyten und T-Lymphozyten, welche die pathophysiologisch bedeutende Anhaftung dieser Entzündungszellen an das Endothel steuern. Moleküle, die für die Migration von Leukozyten durch das Endothel bedeutsam sind, wie zum Beispiel „platelet endothelial factor“ (PEF), wirken zusammen mit chemotaktisch wirkenden Molekülen wie oxidativ-modifiziertem LDL, um Zellen der Immunabwehr in die Gefäßwand zu leiten. Durch die Endothelläsion bildet sich ein Ungleichgewicht zwischen pro- und antikoagulatorischen Eigenschaften des Gefäßes, wobei die prokoagulatorischen Eigenschaften dominieren. Zusätzlich werden vermehrt vasoaktive Moleküle, Zytokine und Wachstumsfaktoren gebildet. Kann der inflammatorische Einfluss nicht vom Immunsystem neutralisiert werden, bleibt er für unbestimmte Zeit bestehen (Stary et al. 1994).

Im weiteren Verlauf werden Mukopolysaccharide, Lipoproteine, Fibrinogen und Albumin eingelagert und glatte Gefäßmuskel- und Bindegewebszellen durch Wachstumsfaktoren zur Proliferation angeregt. Diese wachsen in das inflammatorische Gebiet hinein. Es kommt zu einer gesteigerten Kollagen- und Elastinsynthese (Fibrose, Elastose). Diese Phase der atherosklerotischen Veränderung wird als intermediäre Läsion bezeichnet. Die Läsion kann in der Folgezeit die Gefäßwand so sehr verdicken, dass es zu einer Einengung des Lumens kommt, die jedoch in der Anfangsphase durch vasodilatatorische Einflüsse durch das Endothel kompensiert werden kann (Glagov et al. 1987). Diese Phase wird als Umbauphase bezeichnet. Die hauptsächlichsten Entzündungszellen, die histologisch in einer derartigen Läsion nachweisbar sind, sind Makrophagen und spezifische Subtypen von T-Lymphozyten (Jonasson et al. 1986). Die Aktivierung von Makrophagen und T-Lymphozyten führt zu einer fortgesetzten verstärkten Freisetzung von Entzündungsmediatoren, wie beispielsweise hydrolytischen Enzymen, Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren (Libby et al. 1996; Raines und Ross 1996).

Die Folge sind weitere Schädigungen der Gefäßwand in Form von Kalzifikationen, Ulzerationen bis hin zur Ausbildung von fokalen Nekrosen (Falk et al. 1996). Diese Kombination aus Akkumulation von mononukleären Zellen, ihrer Migration und eine anschließende Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen führt zu einer Vergrößerung der Läsion und Formierung einer fibrotischen Kappe, die dem Entzündungskern aus Fetteinlagerung und Nekrose aufliegt. Eine solche Läsion wird als fortgeschrittene oder komplizierte Läsion bezeichnet. Aktivierte Makrophagen sezernieren Metalloproteinasen

und andere hydrolytische Enzyme, die die fibrotische Kappe der atherosklerotischen Läsion durch Matrixabbau verdünnen. Eine Ruptur oder Ulzeration dieser fibrösen Kappe kann zu der spontanen Bildung eines Thrombus auf dieser Läsion und letztendlich zu einem Verschluss des Gefäßes führen. Eine vollständige und gute Ausbildung der fibrösen Kappe führt zu einer Stabilisierung der arteriosklerotischen Plaques. Im Endstadium der Arteriosklerose führt die Gefäßlumeneinengung zur kompletten Stenose des betroffenen Gefäßes und in deren Folge zu einer absoluten Ischämie des nachgeschalteten Versorgungsgebietes (Stary et al. 1995).

Bei Patienten mit Arteriosklerose kommt es infolge der Umbauten der Gefäßwand, die mit einem Verlust an Elastizität und Gefäßcompliance einhergehen, zu einem Anstieg des Pulsdrucks (Marchais et al. 1993).

1.2.4 Pulsdruck und Pulswellenanalyse

Als Pulsdruck wird die Differenz von systolischem und diastolischem Blutdruck bezeichnet. Eine beeinträchtigte Endothelfunktion ist mit Abnormalitäten der arteriellen Pulswellenreflexion verbunden, die zu einem erhöhten Pulsdruck beiträgt. Der Pulsdruck selbst ist als ein wichtiger Prädiktor (Safar et al. 2002) und unabhängiger Risikofaktor (Klassen et al. 2002) kardiovaskulärer Mortalität bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz bekannt.

Durch Hervorrufen einer endothelabhängigen Vasodilatation lässt sich die Endothelfunktion beurteilen. Hierbei nimmt die Gefäßcompliance zu und ist somit durch einfache, nichtinvasive und reproduzierbare digitale Pulswellenanalyse darstellbar (Takazawa et al. 1998; Millasseau et al. 2000). Endothelabhängige Vasodilatation bezeichnet die von endogenen, also durch lokal aus dem Endothel freigesetzte Substanzen hervorgerufene Relaxation glatter Gefäßmuskulatur. Unter diesen Substanzen spielt NO wie oben erwähnt eine entscheidende Rolle. Eine endothelabhängige Vasodilatation kann durch Scherstress, Neurotransmitter, Hormone oder auch ischämische Metabolite hervorgerufen werden.

Bei der nichtinvasiven Provokation einer endothelabhängigen Vasodilatation wird die Methode der reaktiven Hyperämie (Celermajer et al. 1992) angewendet. Hierbei kommt es nach temporärer Unterbindung des Blutflusses an einem Unterarm zu einer Ischämie

distal der Stauung. Dies führt einer reaktiven Hyperämie mit Erhöhung des Scherstresses und einer vermehrten Bildung von NO aus der Aminosäure L-Arginin (Govers und Rabelink 2001; Corretti et al. 2002). Daraus resultieren Veränderungen der Blutströmung mit Wirkung auf die mechanorezeptiven Eigenschaften des Endothels. Es kommt zu einer endothelabhängigen, flussvermittelten Vasodilatation (Scherkraftvermittelte Vasodilatation, flussabhängige Vasodilatation; (Moens et al. 2005)). Neben NO wirken noch andere vasodilatatorische Substanzen wie Prostaglandin I₂, Acetylcholin und Endothelin (Joannides et al. 1995; Pyke und Tschakovsky 2005). Außerdem kommt es durch ischämische Metabolite wie ATP, Kalium oder Adenosin sowie durch Absinken des pH-Wertes zu einer Verstärkung der Wirkung (Doshi et al. 2001). Die Vasodilatation der reaktiven Hyperämie wird also nicht ausschließlich von der lokalen NO-Bioverfügbarkeit im Endothel vermittelt. Dennoch hat sich die beschriebene Methode dank dem einfachen und nichtinvasiven Vorgehen zur Beurteilung der endothelabhängigen Vasodilatation durchgesetzt.

Die Messung dieser endothelabhängigen Vasodilatation mittels Fingerphoto-plethysmographie und die Pulswellenanalyse anhand der zweiten Ableitung ihrer Wellenform wurde unter anderem von Takazawa et al. (1998) beschrieben. Hierbei erhalten die Maxima und Minima jeweils eine Bezeichnung (a-e), aus ihren Absolutwerten werden Quotienten gebildet.

Hierbei steht der ab-Quotient für die Steifheit der großen Arterien, der ad-Quotient repräsentiert den spätsystolischen Druckanstieg in der Aorta und damit die periphere Pulswellenreflektion. Somit erlaubt die Pulswellenanalyse eine Einschätzung der Funktion der Aorta sowie peripherer Vasokonstriktion und Vasodilatation.

1.3 Homocystein

Zusätzlich zu den Thiolgruppen der Proteine finden sich im Plasma ebenfalls niedrigmolekulare thiolhaltige Komponenten, sogenannte Aminothiole, die größtenteils von schwefelhaltigen Aminosäuren abgeleitet werden. Diese Plasmaaminothiole, unter ihnen Homocystein, Cystein und Glutathion, funktionieren als ein wichtiges extrazelluläres Redox-System. Plasmaaminothiole sind bei Urämie zum großen Teil oxidiert, während die Hämodialyse den Redoxstatus wiederherstellt (Himmelfarb et al.

2002). Homocystein (2-Amino-4-mercaptobuttersäure, $\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$; siehe Abbildung 1.1) ist bis auf eine zusätzliche Methylengruppe in der Kohlenstoffkette identisch mit Cystein.

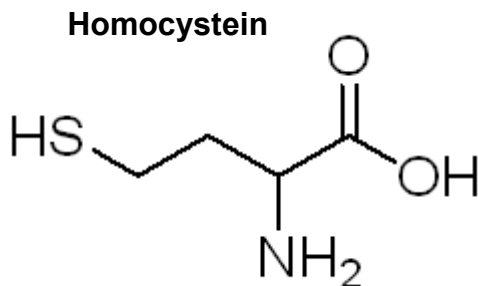


Abbildung 1.1 Strukturformel des Homocysteins (Sigma-Aldrich)

Homocystein wirkt im Gegensatz zu Glutathion atherogen mittels seiner Effekte auf die Endothelfunktion, darunter die Inhibition von Fibrinolyse an der Zelloberfläche und die Beeinträchtigung endothelabhängiger Vasorelaxation, die Initiation inflammatorischer Prozesse, Aktivierung glatter Gefäßmuskelzellen sowie hämostatische Aktivierung (Tsai et al. 1994; Loscalzo 1996; D'Angelo und Selhub 1997; Hajjar 2001). Veränderungen des Plasma-Homocysteinspiegels wurden in zahlreichen klinischen Studien mit Gefäßerkrankungen in Verbindung gebracht (McCully 1969; Boushey et al. 1995; Graham et al. 1997; Nygard et al. 1997).

1.3.1 Metabolismus

Bei Hämodialyse-Patienten sind sowohl Homocystein als auch seine Metaboliten Methylmalonsäure und Cystathionin deutlich erhöht, was auf einen stark gestörten Homocystein-Metabolismus hinweist (Herrmann et al. 2001).

Homocystein ist ein wichtiges Zwischenprodukt im Methioninstoffwechsel. Methionin, eine essentielle Aminosäure, wird in neugebildete Proteine eingebaut und bildet mit ATP das S-adenosylmethionin, eine Schwefelverbindung. Die aktivierte Methylgruppe von S-adenosylmethionin (SAM) wird durch Transmethylierung an viele mögliche Empfänger-moleküle weitergegeben. Ein Beispiel hierfür ist die Reaktion, die Guanidinoacetat zu Kreatinin methyliert, wofür in etwa die Hälfte des gesamten verfügbaren S-adenosylmethionin benötigt wird (Perna et al. 1999). Als weiteres Beispiel sei eine von Protein-carboxyl-transferase katalysierte Reaktion genannt, die in

der Reparatur beschädigter Membranproteine eine Rolle spielt. S-adenosylmethionin-abhängige Enzyme sind zum Beispiel Cathechol-O-methyltransferase und Norepinephrin-methyltransferase, die Adrenalin (syn. Epinephrin) bildet, das eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Blutkreislaufs spielt. DNA- und RNA-Methyltransferasen benötigen ebenfalls die aktivierte Methylgruppe des S-adenosylmethionins (Perna et al. 1999). Homocystein ist somit ein wichtiges Zwischenprodukt im Methioninstoffwechsel. Methionin wird benötigt für die erfolgreiche Initiation der Translation von mRNA zu Proteinen (Stryer 2003). Das in Verbindung von Homocystein mit ATP entstehende S-adenosylmethionin ist das entscheidende Substrat für Methylierungsprozesse in der Zelle. Methylierungsprozesse haben, wie oben geschildert, wichtige Funktionen in der Regulation von Proteinaktivitäten. Außerdem spielen Methylierungsprozesse der DNA und DNA-bindender Proteine wie z.B. der Histone eine herausragende Rolle bei der Regulation der zelltypspezifischen Genregulation (Bird 2002).

Das demethylierte Produkt von S-adenosylmethionin ist S-adenosylhomocystein, ein natürlicher kompetitiver Inhibitor der Transmethylierung mittels sogenannter Produktinhibition. Diese Inhibition findet normalerweise nicht in nennenswertem Ausmaß statt, da die hochgradig toxische Verbindung rechtzeitig in Homocystein und Adenosin hydrolysiert wird. S-adenosylmethionin ist also der einzige Homocysteinvorläufer in einer reversiblen Reaktion, die von einem Hydrolyseenzym, nämlich der S-adenosylhomocystein-hydrolase, katalysiert wird. Dies ist *in vivo* ausgesprochen wichtig, denn für den Fall einer Akkumulation von Homocystein verlangsamt sich die Hydrolyse, was zu einem Aufbau von schädlichem S-adenosylhomocystein führt, mit der folgenden Inhibition von Transmethylierungsprozessen (Perna et al. 1999).

Homocystein selbst kann über zwei verschiedene Wege verändert werden, Transsulfurierung oder Remethylierung. Diese Aufteilung ist abhängig von der Methioninaufnahme und der S-adenosylmethionin-Konzentration. Die Transsulfurierung führt Homocystein dem Abbau über Cystathionin (mittels Cystathionin- β -synthase) zu Cystein oder anderen schwefelhaltigen Komponenten wie Glutathion, Taurin, H_2S , SO_4 -Gruppen) zu. Zwei Cofaktoren spielen in der Transsulfurierung eine Rolle, Vitamin B_6 für die Cystathionin- β -synthase und Cystathioninase, und Vitamin B_{12} bei der

Remethylierung. Die Remethylierung beinhaltet einen Weg zur Methioninbildung, der insbesondere in Zeiten eines Methioninmangels von Bedeutung ist (Perna et al. 1999).

1.3.2 Homocystein als Risikofaktor

Ein erhöhter Plasma-Homocysteinspiegel - Normbereich $< 12.0 \mu\text{mol/l}$; (Clarke 1998) - stellt bei Nierengesunden einen eigenständigen und unabhängigen Risikofaktor für eine erhöhte kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität dar (McCully 1969; Dennis et al. 1997; Ray und Harvey 1998; Refsum et al. 1998; Aguilar et al. 2004; Ebbesen 2004). Bei Patienten mit chronischer terminaler Niereninsuffizienz ist ein erhöhter Plasma-Homocysteinspiegel als Risikofaktor für eine erhöhte kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität umstritten (Perna et al. 2004). Es gibt sowohl Studien, die eine Rolle als Risikofaktor bestätigen (Moustapha et al. 1998; Carluccio et al. 2002; Fella et al. 2003), als auch Anzeichen für einen umgekehrten Zusammenhang, das bedeutet eine Korrelation zwischen niedrigem Plasma-Homocysteinspiegel und erhöhtem kardiovaskulärem Risiko (Kalantar-Zadeh et al. 2003; Kalantar-Zadeh et al. 2004). Als Ursachen für eine Hyperhomocysteinämie wird neben angeborenen Anomalitäten der am Homocysteinstoffwechsel beteiligten Enzyme, diätetischen Defiziten (Vitamin B₆-, Vitamin B₁₂-, Folsäuremangel), metabolen und systemischen Bedingungen (Hypothyreose, systemischer Lupus erythematodes) sowie einer medikamenten-assoziierten Erhöhung des Plasma-Homocysteinspiegels (Methotrexat, L-Dopa, Theophyllin u.a.) die chronische terminale Niereninsuffizienz beschrieben (Perna et al. 1999). Bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz wurde eine signifikante Erhöhung des Plasma-Homocysteinspiegels gegenüber dem Normwert bei Gesunden von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt (Bachmann et al. 1995; Moustapha et al. 1997; Koulouridis et al. 2001; Carluccio et al. 2002; Chuang et al. 2003). Die Ursache dieser Hyperhomocysteinämie blieb bislang ungeklärt, ist allerdings wahrscheinlich in einer Verminderung der Plasma-Clearance und des Abbaus und weniger in einer erhöhten Produktion zu sehen (Guttormsen et al. 1997). Die Veränderung der Plasma-Clearance von Homocystein bei Niereninsuffizienz ist nicht nur durch die verminderte glomeruläre Filtrationsrate bedingt (Anwar et al. 2001), sondern auch durch die unter diesen Umständen vorliegenden Urämietoxine als Enzyminhibitoren (Arnadottir et al. 2002). Zum Beispiel gibt es Anzeichen dafür, dass ein hoher Sulfat-Spiegel, hervorgerufen durch eine inadäquate Nierenfunktion, in einem veränderten Homocystein-Metabolismus bei Hämodialyse-Patienten eine Rolle spielt (Brunetti et al. 2001). Die

Inhibition des Enzyms Folat-Konjugase durch urämisches Serum wurde berichtet (Livant et al. 1994). Für den Fall, dass dialysable Urämie-Toxine eine größere Rolle in der Pathogenese der Hyperhomocysteinämie bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz spielen, würden durch die Senkung ihrer Plasmaspiegel die Bedingungen für den Homocystein-Metabolismus verbessert. Von verschiedenen Arbeitsgruppen (Biasioli et al. 1998; Arnadottir et al. 1999; Arnadottir et al. 2002) wurde in der postdialytischen Phase eine kurzfristige Stabilisierung des Plasma-Homocysteinspiegels beobachtet, was für ein Zusammenspiel von dialysablen Substanzen und der Entfernung des Homocysteins spricht.

Eine Erhöhung des Plasma-Homocysteinspiegels bei erhöhtem arteriellen Blutdruck wurde berichtet (Lim und Cassano 2002). Die Akkumulation von Homocystein stellt einen kardiovaskulären Risikofaktor dar, der unabhängig vom oxidativen Stress ist (Carluccio et al. 2002). Ein erhöhter Plasma-Homocysteinspiegel führt seinerseits zu einem erhöhten oxidativen Stress. Dieser ist mitverantwortlich für die endotheliale Dysfunktion, die bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz beobachtet wurde (Himmelfarb et al. 2002).

Ein weiterer Pathomechanismus der Hyperhomocysteinämie stellt die Beeinflussung der epigenetischen Kontrolle der Genexpression dar. Eine toxische Wirkung von Homocystein kann zum Beispiel in einer Makromolekül-Hypomethylierung bestehen (Ingrosso et al. 2003).

Es wurden bereits verschiedene Versuche unternommen, einen erhöhten Plasma-Homocysteinspiegel zu senken. Hierbei wurden vor allem Vitamin B₆ (Pyridoxin), Vitamin B₁₂ (Cobalamin), Folsäure oder Folinsäure oral verabreicht (Clarke 1998). Bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz senkte die Gabe von Folsäure oder Folinsäure den Gesamt-Plasma-Homocysteinspiegel um Werte zwischen 32% und 46% (Sunder-Plassmann et al. 2000; Ducloux et al. 2002). Die einmalige prädialytische Gabe von 1200 mg N-Acetylcystein *per os* führte zu einer 16% Reduktion des Plasma-Homocysteinspiegels (Bostom et al. 1996). Ein positiver Effekt auf die kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität durch Senkung des Plasma-Homocysteinspiegels mittels Vitamin B₆ und B₁₂ ist allerdings umstritten (Sunder-Plassmann et al. 2008). Selbst

hohe Dosen von Folsäure konnten allerdings den erhöhten Plasma-Homocysteinspiegel nicht auf ein normales Niveau senken (Sunder-Plassmann et al. 2000).

1.4 Reaktive Sauerstoffradikale

Neben Homocystein spielt auch sogenannter oxidativer Stress mit seinen Auswirkungen auf die Gefäßfunktion und als Marker gestörter Endothelfunktion bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz eine wichtige Rolle (Schiffrin 2004). Oxidativer Stress wird durch reaktive Sauerstoffradikale hervorgerufen.

1.4.1 Definition und Eigenschaften

Zu den reaktiven Sauerstoffradikalen (engl. *reactive oxygen species* = ROS) gehören freie Radikale wie das Superoxid-Anion ($O_2^{\cdot-}$), das hochreaktive Hydroxyl-Radikal ($OH\cdot$), das Peroxylradikal ($LOO\cdot$) und das Alkoxyradikal ($LO\cdot$) von Lipiden. Außerdem zählen noch stabile molekulare Oxidantien wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Lipidhydroperoxid (LOOH), Ozon (O_3) und die hypochlorige Säure (OCl^-) sowie angeregte Sauerstoffmoleküle (Singulett-Sauerstoff 1O_2) dazu.

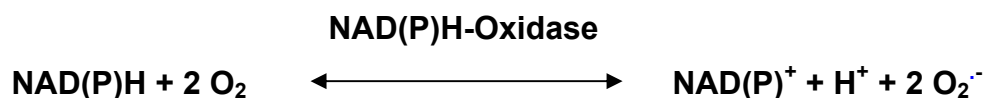
Im Organismus entstehen reaktive Sauerstoffradikale in den Mitochondrien als Nebenprodukt der Zellatmung durch Monoaminoxidasen und in der Atmungskette an Komplex I und an Komplex III. Auch Immunzellen sind im Falle von Abwehrreaktionen gegen Viren und Bakterien eine Quelle von Sauerstoffradikalen, welche die Mikroorganismen schädigen sollen (Kishida und Klann 2007). Die meisten Zellen innerhalb des Gefäßes bilden Sauerstoffradikale und werden von diesen reguliert. Zu ihnen zählen glatte Muskelzellen (Suh et al. 1999), Endothelzellen (Bayraktutan et al. 1998), Fibroblasten (Suh et al. 1999) und Makrophagen (Radeke et al. 1991).

Die einzelnen Sauerstoffradikale dienen in physiologischen Prozessen als sogenannte *second messenger* (engl. für sekundäres Botenmolekül). Die Konzentration von reaktiven Sauerstoffradikalen innerhalb des Gefäßsystems kann durch eine Reihe von vasoaktiven Hormonen, zum Beispiel Angiotensin II (Fukui et al. 1995; Rajagopalan et al. 1996; Ushio-Fukai et al. 1996; Laursen et al. 1997), innerhalb von Millisekunden erhöht werden (Griendling et al. 1994; Marumo et al. 1997; Bhunia et al. 1998; De Keulenaer et al. 1998; Irani und Goldschmidt-Clermont 1998). Enzyme regulieren den

Metabolismus der reaktiven Sauerstoffradikale. Zum Beispiel katalysiert die Superoxiddismutase die Überführung des Sauerstoffanions in die stabilere Form des Wasserstoffperoxids, das im weiteren Verlauf durch die Enzyme Katalase und Glutathionperoxidase zu Wasser abgebaut wird. Eine strikte Regulation von Bildung und Metabolisierung der reaktiven Sauerstoffradikale führt dazu, dass es zu einer raschen Konzentrationsänderung kommen kann, was eine weitere entscheidende Eigenschaft von *second messengern* darstellt.

1.4.2 Die NAD(P)H-Oxidasen

Das führende Enzymsystem für die Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) in den Zellen der Blutgefäße (glatte Muskelzellen, Endothelzellen, Fibroblasten und Makrophagen) sind in diesem Zusammenhang die NADH/NADPH-Oxidasen (Griendling et al. 1994; Mohazzab et al. 1994; Pagano et al. 1995; Rajagopalan et al. 1996). Diese Zellmembran-assoziierten Enzyme katalysieren die Reduktion eines Sauerstoffmoleküls, wobei es zu einer Übertragung eines Elektrons kommt. Als Elektronendonoren dienen hierbei NADH oder NADPH.



Die vaskulären NAD(P)H-Oxidasen sind Transmembranproteine und verfügen über unterschiedliche Wirkungsmechanismen zur Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen. Die NAD(P)H-Oxidase der neutrophilen Granulozyten benötigt intrazelluläres NADH oder NADPH und katalysiert den Elektronentransport über die Zellmembran auf extrazellulären molekularen Sauerstoff. Dabei entstehen jeweils extrazelluläre reaktive Sauerstoffradikale. Die NADH/NADPH-Oxidasen in Fibroblasten und Endothelzellen zeigen den gleichen Mechanismus (Meier et al. 1991; Zulueta et al. 1995). In glatten Gefäßmuskelzellen hingegen werden reaktive Sauerstoffradikale überwiegend intrazellulär gebildet (Griendling et al. 1994; Zafari et al. 1998). Somit stellen die NADPH-Oxidasen der einzelnen Zellen eine Enzymfamilie mit unterschiedlichen Wirkmechanismen aber einheitlicher Funktion dar. Superoxid-Anionen werden in Endothelzellen, glatten Gefäßmuskelzellen und Fibroblasten innerhalb von wenigen Minuten bis Stunden gebildet (Ohara et al. 1993; Griendling et al. 1994; Pagano et al.

1995; Pagano et al. 1998). Die Bildung und Freisetzung reaktiver Sauerstoffradikale bei neutrophilen Granulozyten setzt hingegen innerhalb von Millisekunden ein. Trotz der unterschiedlichen Funktionsweise der NAD(P)H-Oxidasen einzelner Zellarten können alle NAD(P)H-Oxidasen durch Diphenylen-Iodonium (DPI), einem Inhibitor von flavinhaltigen Oxidasen (Griendling und Ushio-Fukai 1998), gehemmt werden.

1.5 Acetylcystein

Wie in den vorangehenden Kapiteln beschrieben, tragen oxidative Veränderungen auf verschiedenen Ebenen wesentlich zur Entstehung endothelialer Dysfunktionen bei. Therapien mit Antioxidanzien können dieser Entwicklung entgegenwirken. So konnte gezeigt werden, dass eine antioxidative Therapie die Inzidenz von kardiovaskulären Ereignissen bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz reduziert (Gordon und Himmelfarb 2004). Hierbei kamen sowohl Vitamin E (Boaz et al. 2000) als auch Acetylcystein (ACC), ein thiolhaltiges Antioxidanz (Tepel et al. 2003), zur Anwendung.

Acetylcystein ($C_5H_9NO_3S$), chemisch korrekt N-acetyl-L-cystein, ist das synthetische Derivat der Aminosäure L-Cystein (siehe Abbildung 1.2).

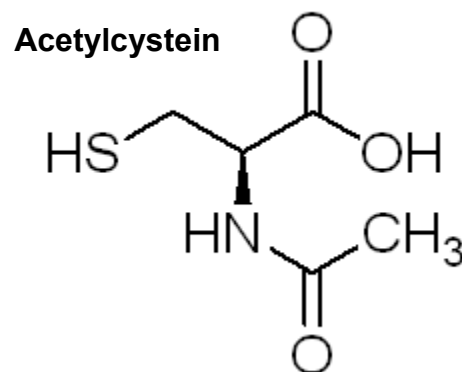


Abbildung 1.2 Strukturformel des N-acetyl-L-cysteins (Sigma-Aldrich)

Die Plasmahalbwertszeit von Acetylcystein beträgt nach intravenöser Gabe 6-40 min. Bei oraler Gabe unterliegt Acetylcystein einem fast vollständigen first-pass-Effekt und ist im Plasma kaum nachweisbar (Borgstrom et al. 1986; Olsson et al. 1988; Bridgeman et al. 1991; Moldeus und Cotgreave 1994). Intravenös appliziertes Acetylcystein bindet unter Bildung von Disulfidbrücken an Plasma- und Gewebeproteine (Harada et al. 2001)

und lässt sich nur in geringen Mengen ungebunden nachweisen. Die gebundenen Proteine werden so vor Peroxiden und reaktiven Sauerstoffradikalen geschützt (Sochman et al. 1990). So erklärt sich auch der entzündungshemmende Effekt von Acetylcystein, denn durch Bindung an Proteine kann es zu einer Zellmembranstabilisierung kommen, wodurch die Freisetzung von Entzündungsmediatoren reduziert wird (Allegra et al. 1991). Acetylcystein besitzt desweiteren einen mukolytischen Effekt, der auf dem reduktiven Aufbrechen von Disulfidverbindungen zwischen mukösen Glykopeptiden beruht (Sheffner 1966).

Seine antioxidative Wirkung *in vivo* entfaltet Acetylcystein auf direktem wie auf indirektem Weg. Durch Reaktion mit Hydroxylradikalen, Superoxidanionen oder Wasserstoffperoxid (Aruoma et al. 1989) inaktiviert es diese und wirkt so direkt antioxidativ. Hierbei bildet sich Acetylcysteindisulfid (Moldeus und Cotgreave 1994). Die direkte antioxidative Wirkung wurde allerdings bisher weitgehend *in vitro* beobachtet, ihre Bedeutung *in vivo* ist noch nicht abschließend geklärt. Der indirekte Effekt beruht auf einer Induktion der Glutathionsynthese. Das Glutathionsystem spielt eine Schlüsselrolle in der Abwehr oxidativer Schäden (Reed 1990; Shan et al. 1990). Für die Bildung von Glutathion wird neben Glycin und Glutamat auch Cystein benötigt, welches den limitierenden Faktor darstellt und dessen Sulfhydrylgruppe die antioxidative Wirkung ermöglicht. Durch Deacetylierung entsteht aus Acetylcystein L-cystein zur Glutathionsynthese (Nakano et al. 1995; Pastor et al. 1997; Skrzydlewska und Farbiszewski 1999). So konnte in Ratten eine Steigerung der renalen intrazellulären Glutathionkonzentration durch Acetylcystein gezeigt werden (Scaduto et al. 1991).

Außerdem scheint Acetylcystein durch eine Stabilisierung von Stickoxid vasodilatierend zu wirken (Salom et al. 1998; Girouard et al. 2003). Hierbei wird Stickoxid (NO) durch Aufnahme der Sulfhydrylgruppe des Acetylcysteins zu S-nitrositol, einer stabileren Verbindung mit stärker aktivierendem Effekt auf die Guanylatcyclase (Loscalzo 1985). Indirekte Hinweise auf diese Wirkweise geben ein verstärkter renaler vasodilatativer Effekt von Acetylcholin in Anwesenheit von Acetylcystein (Conesa et al. 2001) sowie eine verbesserte renale Funktion beim vasokonstriktorisches hepato-renalen Syndrom (Holt et al. 1999). Ein anderer Effekt könnte in einer Inhibition des Angiotensin-converting Enzyme (ACE) liegen, der ebenfalls durch die Sulfhydrylgruppe gesteuert würde (Boesgaard et al. 1993).

Bei Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion ist die intravenöse Gabe von Acetylcystein zur Vermeidung einer kontrastmittelinduzierten Nephropathie verbreitet. Als ein möglicher Mechanismus dafür wird die Reduktion des intrazellulären oxidativen Stresses durch Acetylcystein diskutiert (Tepel und Zidek 2002; Drager et al. 2004).

Neben der Vermeidung der kontrastmittelinduzierten Nephropathie bei Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion konnte auch eine Verminderung der kardiovaskulären Morbidität und Mortalität durch Acetylcystein nachgewiesen werden (Tepel et al. 2003; Ivanovski et al. 2005). Der genaue Mechanismus ist nicht bekannt, auch hier wird die Wirkung von Acetylcystein auf den intrazellulären oxidativen Streß diskutiert (Drager et al. 2004; Ivanovski et al. 2005).

1.6 Fragestellung

Hyperhomocysteinämie, endotheliale Dysfunktion, Abnormalitäten in der arteriellen Pulswellenreflexion und erhöhter Pulsdruck tragen sämtlich zu einer erhöhten kardiovaskulären Morbidität bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz bei. Prävention und Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen sind somit ein Hauptanliegen in der Behandlung von Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz (Schiffrin et al. 2007).

Unter einer Hämodialyse sinkt der Plasma-Homocysteinspiegel um etwa 28%. Es wurden Überlegungen angestellt, dass die Gabe von Acetylcystein während einer Hämodialyse den erhöhten Plasma-Homocysteinspiegel bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz signifikant verbessern könnte (Arnadottir et al. 1999).

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob Acetylcystein mit dem bekannten Atherogen Homocystein interagiert.

1. Kommt es durch eine kontinuierliche Applikation von ACC während der Hämodialyse zu einer Senkung des postdialytischen Plasma-Homocysteinspiegels?
2. Kommt es in der Folge zu einer Verbesserung der Hämodynamik, zeigen sich Auswirkungen auf Pulsdruck und Pulswellenreflexion?
3. Ist ein möglicher Effekt auf den Plasma-Homocysteinspiegel auch noch vor der nächsten Dialysesitzung zu beobachten?
4. Beeinflusst die Applikation von Acetylcystein die Bildung intrazellulärer reaktiver Sauerstoffradikale in mononukleären Lymphozyten, insbesondere des Superoxidanions?

2 Material und Methoden

Die Effekte einer intravenösen Gabe von Acetylcystein (ACC) auf den Plasma-Homocysteinspiegel, den Pulsdruck, die Endothelfunktion und reaktive Sauerstoffradikale unter Hämodialyse bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz wurden während einzelner Standard-Hämodialysesitzungen in einer prospektiven, randomisierten, placebokontrollierten Studie untersucht.

2.1 Patienten

In die Studie wurden zwanzig Patienten mit chronischer terminaler Niereninsuffizienz eingeschlossen. Als Einschlusskriterien galten neben einer dialysepflichtigen chronischen terminalen Niereninsuffizienz Volljährigkeit und Zustimmungsfähigkeit. Schwere Leberfunktionseinschränkungen oder eine Unverträglichkeit von Acetylcystein wurden als Ausschlusskriterium gewertet. Keiner der Patienten erhielt eine Substitution mit Folsäure, Folinsäure, Vitamin B6 (Pyridoxin) oder Vitamin B12 (Cobalamin). Alle Patienten wurden routinemäßig dreimal in der Woche durchschnittlich 4 Stunden hämodialysiert, wobei neben einer biokompatiblen Polysulphonmembran (F8, Fresenius Medical Care, Bad Homburg, Deutschland) eine Bikarbonat-basierte Hämodialyselösung mit 1.75 mmol/l Calcium (BiCart, Gambro, Stockholm, Schweden) verwendet wurde. Die Kt/V Werte, das heißt die Menge an Plasma, die von Harnstoff gereinigt wurde, geteilt durch das Harnstoffverteilungsvolumen, wurden anhand der Daugirdas-Formel

$$Kt/V = -\ln(R - 0.008 \times t) + (4 - 3.5 \times R) \times UF / W$$

(R = Harnstoff-Reduktionsrate; t = Dialysedauer [h]; UF = Volumen des Ultrafiltrats [l]; W = Dialyse-Abschlussgewicht [kg]) (Daugirdas 1993) gemessen und errechnet.

Um eine vergleichbare Plasmakonzentration von ACC zu erreichen, wurde den Patienten das Acetylcystein intravenös appliziert. Jeder Patient erhielt während einer einzelnen Hämodialysesitzung 5g ACC in 5%-iger Glukoselösung auf 40 ml über die Dauer von vier Stunden als Spritzenpumpe (Perfusor, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland), dies entspricht 1,25 g ACC/h beziehungsweise 10 ml/h. Als

Placebokontrolle wurden während einer weiteren Hämodialysesitzung 40 ml 5%-ige Glucoselösung als Spritzenpumpe verabreicht. ACC oder Glukose für die Placebokontrolle wurden an zwei aufeinander folgenden, regelmäßigen Hämodialysetagen gegeben, die Patienten wurden nach dem Zufallsprinzip einer Reihenfolge für die Gabe von ACC oder der Placebokontrolle zugeordnet. In der Studie war keine längerfristige Gabe von ACC vorgesehen. Das Studienprotokoll wurde von der zuständigen Ethikkommission der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin genehmigt und alle Patienten stimmten nach mündlicher und schriftlicher Aufklärung einer Teilnahme an der Studie schriftlich zu.

2.2 Biochemische Messungen

2.2.1 Messgeräte

Zentrifuge Heraeus, Hanau, Deutschland

Fluoreszenzphotospektrometer F2000 Hitachi Ltd., Tokyo, Japan

Fluoreszenzphotospektrometer Labsystems OY, Helsinki, Finnland
(Fluoroskan Ascent FL)

2.2.2 Reagenzien

DCFDA Molecular probes, Invitrogen, Carlsbad,
(2,7,-Dichlorofluorescein-Diacetat) Kalifornien, USA

DPI Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri, USA
(Diphenyleneiodonium-chlorid)

Histopaque®-1077 Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

Lucigenin Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri, USA
(N,N'-Dimethyl-9,9'-biacridinium dinitrat)

PMA Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri, USA
(4 α -Phorbol 12-myristat 13-acetat)

2.2.3 Puffer

Hank's balanced salt solution (HBSS) (Sigma Aldrich; St. Louis, Missouri, USA)

<i>Phosphat-gepufferte Salzlösung</i> (PBS)	140 mM NaCl, 10 mM KCl, 6,4 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O, 2 mM KH ₂ PO ₄
---	--

2.2.4 Isolation der mononukleären Leukozyten

Bei allen 20 Patienten wurde sowohl bei ACC-Gabe als auch bei der Kontrolle unmittelbar vor und am Ende der Hämodialysesitzung 20ml venöses Blut aus der arteriovenösen Fistel entnommen und zur Gerinnungshemmung mit 1ml Heparin-Natrium (Merck, Darmstadt, Deutschland) versetzt. Durch umgehende Zentrifugation bei 1400 U/min bei Raumtemperatur für 10 min wurden Blutzellen und Plasma separiert. Das Plasma wurde bei -20°C tiefgefroren und zur Homocysteinbestimmung verwendet (siehe 2.2.7). Mononukleäre Leukozyten wurden nach folgendem Schema isoliert (Tepel et al. 1995):

Zur Dichtegradienten-Zentrifugation wurden die verbliebenen Blutzellen mit HBSS auf das doppelte Volumen verdünnt und über Histopaque®-1077 geschichtet. Histopaque® ist ein Polysucrose- und Natriumdiatrizoat-haltiges Zentrifugationsmedium und weist eine Dichte von $\rho=1077$ mg/ml auf. Durch die Zentrifugation bilden sich entsprechend der den Zellen eigenen spezifischen Dichte verschiedene Schichten mit Erythrozyten, Granulozyten, mononukleären Leukozyten und verbliebenem Plasma. Mittels einer Zentrifugation bei 2000 U/min für 10 min bei Raumtemperatur wurden die mononukleären Leukozyten von den übrigen Blutzellen getrennt.

Der milchig-trübe Ring, der von den mononukleären Leukozyten gebildet wird, wurde mittels einer Pipette aufgenommen und mit HBSS versetzt und erneut bei 2000 U/min für fünf Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die verbliebenen Zellen mit HBSS resuspendiert.

2.2.5 Messung der reaktiven Sauerstoffradikale *in vitro*

Intrazelluläre reaktive Sauerstoffradikale wurden mittels eines Fluoreszenz-Photospektrometers (F-2000, Hitachi Ltd., Tokyo, Japan) unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes 2,7,-Dichlorofluorescein-diacetat (DCFDA) gemessen. Hiermit kann die relative Menge von intrazellulären reaktiven Sauerstoffradikalen, u.a. Wasserstoffperoxid, bestimmt werden.

Die in HBSS gelösten mononukleären Leukozyten wurden über 15 min lichtgeschützt mit DCFDA (10 μ M) inkubiert und anschließend bei 2000 U/min für fünf Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zentrifugat mit 4 ml HBSS resuspendiert und auf vier 10x10 mm Quarzglasküvetten (Hellma, Müllheim, Deutschland) verteilt. In zwei Küvetten befanden sich lediglich die mononukleären Leukozyten nach Inkubation mit dem Farbstoff. Zur Stimulation der Bildung von Sauerstoffradikalen wurden in eine Küvette 10 μ l Phorbolmyristat-acetat (PMA) hinzugegeben und in eine weitere Küvette 10 μ l Diphenylen-Iodonium-chlorid (DPI) zur Hemmung der Radikalbildung. Nach 0, 10, 20 und 30 Minuten wurden die Proben fluoreszenz-photospektrometrisch (F2000) in einem Intervall von 2 Hz über 60 Sekunden bei einer Exzitationswellenlänge von 488nm und einer Emissionswellenlänge von 534nm gemessen.

2.2.6 Messung des Superoxidanions *in vitro*

Superoxid-Radikale in den mononukleären Leukozyten wurden mittels Lucigenin-Chemilumineszenz und eines Fluoreszenz-Photospektrometers (Fluoroskan Ascent FL) gemessen.

Bei der Lucigenin Chemilumineszenz handelt es sich um eine Methode zur Messung der Superoxidanionen (O_2^-) in mononukleären Leukozyten. Der Stoff Lucigenin geht nach spezifischer Reaktion mit Superoxidradikalen in einen elektronisch angeregten Zustand über, beim anschließenden Übergang in den Grundzustand wird Energie in Form eines Lichtsignals (Photonen) im Bereich von 519 nm freigesetzt (Lee et al. 2003).

Für eine Messung wurden je Probe 50 μ l der in HBSS gelösten mononukleären Leukozyten zusammen mit 100 μ l PBS und 1 μ l Lucigenin (5 μ M) individuell in Vertiefungen einer Lochplatte (insgesamt 12, zusätzlich 3 Nullkontrollen nur mit Puffer

und Lucigenin) gegeben und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte eine Zugabe von 1µl Diphenylen-Iodonium-chlorid (DPI) zur Inhibition und 1µl Phorbolmyristat-acetat (PMA) zur Stimulation der Bildung von Sauerstoffradikalen in jeweils drei Vertiefungen, in drei weitere Vertiefungen wurden 1µl DPI und 1µl PMA als Kontrolle gegeben.

Tabelle 2.1 Pipettierschema für die Lucigeninmessung

100µl PBS 1µl Lucigenin	100µl PBS 1µl Lucigenin	100µl PBS 1µl Lucigenin
50µl mononukleäre Leukozyten 100µl PBS 1µl Lucigenin	50µl mononukleäre Leukozyten 100µl PBS 1µl Lucigenin	50µl mononukleäre Leukozyten 100µl PBS 1µl Lucigenin
50µl mononukleäre Leukozyten 100µl PBS 1µl Lucigenin 1µl DPI	50µl mononukleäre Leukozyten 100µl PBS 1µl Lucigenin 1µl DPI	50µl mononukleäre Leukozyten 100µl PBS 1µl Lucigenin 1µl DPI
50µl mononukleäre Leukozyten 100µl PBS 1µl Lucigenin 1µl PMA	50µl mononukleäre Leukozyten 100µl PBS 1µl Lucigenin 1µl PMA	50µl mononukleäre Leukozyten 100µl PBS 1µl Lucigenin 1µl PMA
50µl mononukleäre Leukozyten 100µl PBS 1µl Lucigenin 1µl DPI 1µl PMA	50µl mononukleäre Leukozyten 100µl PBS 1µl Lucigenin 1µl DPI 1µl PMA	50µl mononukleäre Leukozyten 100µl PBS 1µl Lucigenin 1µl DPI 1µl PMA

Die Emission wurde mittels eines Fluoreszenz-Photospektrometers (Fluoroskan Ascent FL) bei einer Wellenlänge von 519nm gemessen und über 20 min mittels eines Computerprogrammes aufgezeichnet. Anschließend wurde das Integral der Messkurve errechnet. Die Werte der jeweils drei Vertiefungen mit gleichem Inhalt wurden gemittelt und als Messwert definiert.

2.2.7 Messung des Plasma-Homocysteinspiegels

Die Messung der Plasma-Homocysteinspiegel erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. R. Riezler, Severi-Med, Münster.

Der Plasma-Homocysteinspiegel wurde mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC für engl.: *high performance liquid chromatography*) mit Fluoreszenz-Detektion bestimmt (Vester und Rasmussen 1991; Himmelfarb et al. 2002).

Hierbei handelt es sich um ein Säulen-Flüssigkeits-Chromatographieverfahren. Bei diesem Trennverfahren wird die Probenflüssigkeit mittels einer flüssigen Phase (Eluent) unter hohem Druck über die stationäre Phase (Trennsäule) transportiert. Unter Ausnutzung der unterschiedlichen Polarität der zu trennenden Substanzen lässt sich so eine Aufspaltung der Probe in ihre verschiedenen Bestandteile und eine Quantifizierung der enthaltenen Substanzen vornehmen. Beim Transport über die stationäre Phase verweilen die Substanzen je nach Polarität unterschiedlich lange in der Trennsäule, einzelne Stoffe haben unterschiedliche sogenannte Retentionszeiten.

Ist die stationäre Phase polarer als die mobile Phase, so spricht man von einer Normalphasen-Verteilungs-Chromatographie. Die üblichere Methode ist die *Reversed-Phase* (RP, engl.: Umkehrphase)-Chromatographie, bei der eine unpolare stationäre Phase verwendet wird, wobei die Elutionskraft mit steigender Polarität sinkt. Die stationäre Phase der RP-HPLC wird hergestellt, indem man mit langkettigen Kohlenwasserstoffen substituierte Silane mit Silicagel reagieren lässt. Hierdurch wird die Polarität umgekehrt, die eigentlich polare Oberfläche des Silicagels wird mit einer unpolaren Schicht aus Alkanen überzogen. Als mobile Phase werden meist Mischungen aus Wasser oder Puffer und Acetonitril oder Methanol eingesetzt.

Trennungen, bei denen die Zusammensetzung der Mobilien Phase während der gesamten Zeit gleich bleibt, werden als isokratische Trennungen bezeichnet, bei Gradiententrennungen wird während der Analyse die Polarität des Fließmittelgemisches verändert.

Am Ende der Trennsäule erfolgt die Detektion mittels Fluoreszenz-Spektrometer. Die Elutionskurve im Chromatogramm stellt das Ergebnis der Stofftrennung dar. Sie stellt die Abhängigkeit für die Menge (Konzentration) der eluierten Substanzen von der Zeit

dar. Die Gesamtretentionszeit ist abhängig vom Aufenthalt in der stationären Phase, aber auch von der Durchflußzeit der mobilen Phase.

Zur Bestimmung des Plasma-Homocysteins wurde zunächst das Plasma durch umgehende Zentrifugation bei 1400 U/min bei Raumtemperatur für 10 min von den Blutzellen getrennt. Das Plasma wurde zunächst bis zur Durchführung der Messungen in Plastikröhrchen bei -20°C tiefgefroren. Zur Messung wurden die Proben mit einem internen Standard versetzt, zur reduktiven Freisetzung aus Protein- und Disulfidbindungen wurde eine Tri-n-butyl-phosphin-Lösung verwendet. Das Ausfällen der Proteine erfolgte mittels Perchlorsäure. Nach dem Zusatz von 7-Fluor-benzofurazan-4-sulfonsäure-Ammoniumsalz, einem thiol-spezifischen Fluoreszenz-reagenz erfolgte die Auftrennung der Probe durch *Reversed-Phase*-Hochdruckflüssigkeitschromatographie. Als Eluent wurde ein Acetatpuffer verwendet. Die Fluoreszenzintensität wurde bei einer Extinktionswellenlänge von 385 nm und einer Emissionswellenlänge von 515 nm gemessen.

2.3 Pulsdruck

2.3.1 Messgerät

M 5 Professional, OMRON Medizintechnik, Mannheim, Deutschland

2.3.2 Ermittlung der Messwerte

Der Pulsdruck bezeichnet die Blutdruckamplitude, also die Differenz zwischen systolischem und diastolischem Blutdruck und beschreibt somit die Druckwelle, die mit jeder Herzaktion durch das Gefäßsystem läuft.

Unmittelbar vor und am Ende der Hämodialysesitzung wurde bei jedem Patienten eine Blutdruckmessung vorgenommen. Der Pulsdruck wurde wie folgt errechnet:

$$PD = RR_{\text{sys}} - RR_{\text{dia}}$$

(**PD** = Pulsdruck [mmHg], **RR_{sys}** = systolischer Blutdruck nach Riva-Rocci [mmHg],

RR_{dia} = diastolischer Blutdruck nach Riva-Rocci [mmHg])

2.4 Fingerphotoplethysmographie

2.4.1 Messgeräte

Pulsoximeter	Vitanguard VG3000; Getemed, Teltow, Deutschland
Sensor	LNOP-Adt SpO ₂ sensor; Masimo Corporation, Irvine, Kalifornien, USA

2.4.2 Ermittlung der Messwerte

Zur Charakterisierung der Pulswellen während einer Hämodialysesitzung wurde eine Analyse der zweiten Ableitung der Wellenform des Photoplethysmogramms angewendet.

Bei der Fingerphotoplethysmographie können die Pulswellen kontinuierlich während der gesamten Hämodialysesitzung ohne Auswirkungen auf die Hämodynamik, die Hämodialyse oder den Patienten aufgezeichnet werden. Die Messungen wurden mit einem Vitanguard VG3000 Monitor mittels eines Sensors an Digitus III der kontralateral zum vaskulären Hämodialysezugang gelegenen Hand durchgeführt. Die Transmission wurde mit einer Rate von 32 pro Sekunde gemessen, auf einen Rechner übertragen und dort mittels einer in der Arbeitsgruppe, in der die vorliegende Arbeit durchgeführt

wurde, entwickelten Software analysiert. Für jeden Messpunkt wurden jeweils zehn gemessene Impulse gemittelt und zweifach abgeleitet (GraphPad Prism 3.0, GraphPad Software, San Diego, Kalifornien, USA).

Die zweite Ableitung der digitalen Pulswelle bestand aus mehreren unterschiedlichen Spitzen, wie in Abbildung 2.1 gezeigt. Der Quotient aus erstem (a) und zweitem Maximum (b), der ab-Quotient, und der Quotient aus erstem und viertem Maximum (d), der ad-Quotient, wurden errechnet. Für die Berechnungen wurden die Absolutwerte verwendet. Die initialen ab- beziehungsweise ad-Quotienten, die vor Beginn der Hämodialysesitzung gemessen wurden, wurden als Ausgangswerte (100%) verwendet.

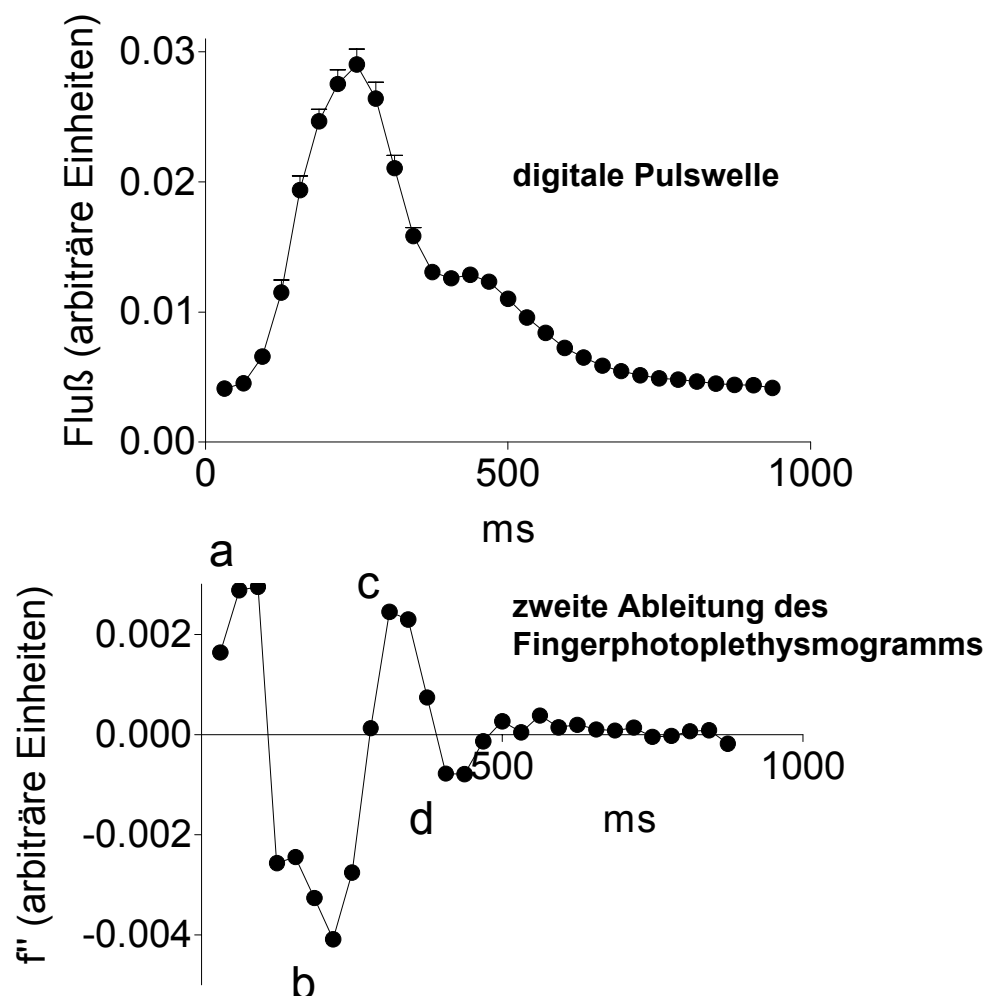


Abbildung 2.1 Beispielhafte Darstellung einer digitalen Pulswelle im und ihrer zweite Ableitung mit Kennzeichnung der verschiedenen Maxima: a = initiale positive Welle, b = frühe negative Welle (früher systolischer Anteil), c = wiederansteigende Welle, d = wiederabfallende Welle (spätsystolischer Anteil), e = diastolische Welle (Bezeichnung nach Takazawa et al. 1998)

Um die Charakteristika von endothelabhängiger, flussvermittelter Vasodilatation in der Fingerphotoplethysmographie darzustellen, wurden gesunde Probanden während einer reaktiven Hyperämie - eine Methode zur Untersuchung der Endothelfunktion - untersucht. Pulswellen während einer durch die Lösung eines Staus am ipsilateralen Arm hervorgerufenen reaktiven Hyperämie wurden analysiert.

Eine Blutdruckmanschette wurde oberhalb der Ellenbeuge platziert und für fünf Minuten auf 240 mmHg aufgepumpt, um eine vorübergehende Ischämie und die daraus folgende Erweiterung der nachgeschalteten Widerstandsgefäße durch Autoregulationsmechanismen hervorzurufen. Die nachfolgende Lösung der Manschette induziert einen kurzen Zustand schnellen Blutflusses, erhöht den Scherstress und die endothelabhängige NO-Produktion und daher die endothelabhängige Vasodilatation.

Die Fingerphotoplethysmographie wurde bei sieben gesunden Probanden durchgeführt, die keinerlei Medikamente einnahmen und an keinerlei Erkrankungen litten, und die ab- und ad-Quotienten wurden anhand der zweiten Ableitung der Pulswelle des Photoplethysmogramms ermittelt. Die gesunden Probanden erhielten kein N-Acetylcystein. Zur Untersuchung endothelunabhängiger Vasodilatation wurden 0,4 mg Nitroglycerin sublingual verabreicht.

2.5 Statistik

2.5.1 Programme

GraphPad Instat GraphPad Software, San Diego, Kalifornien, USA

GraphPad Prism 3.0 GraphPad Software, San Diego, Kalifornien, USA

SPSS für Windows, Version 11.5 SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA

2.5.2 Auswertung

Die Daten werden, sofern nicht anders gekennzeichnet, als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Eine Schätzung der Probengröße wurde im Vorhinein vorgenommen (GraphPad Instat). Hierbei wurde eine Standardabweichung von 8 $\mu\text{mol/L}$ für den Plasma-Homocysteinspiegel bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz angenommen. Bei einer angenommenen mittleren Differenz von 9 $\mu\text{mol/L}$ wurden mindestens 17 Patienten benötigt, um für die Studie eine Potenz von 90% zu erreichen. Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (ACC vs. Placebo) wurden mittels des nonparametrischen, gepaarten Rangsummentests nach Wilcoxon-Mann-Whitney analysiert (GraphPad Prism 3.0). Multivarianzanalysen wurden mit SPSS für Windows, Version 11.5, durchgeführt. Zweiseitige p-Werte unterhalb von 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

Durch endotheliale Dysfunktion entstehende Gefäßschädigungen sind eine wichtige negative Folgeerscheinung terminaler Niereninsuffizienz und tragen entscheidend zu damit verbundener erhöhter Morbidität und Mortalität betroffener Patienten bei. Ein Faktor bei der Entstehung arteriosklerotischer Läsionen ist erhöhter oxidativer Stress durch vermehrte Produktion reaktiver Sauerstoffradikale. Die Gabe von Acetylcystein als Radikalfänger hat sich als erfolgreicher Weg gezeigt, das Niveau an Sauerstoffradikalen zu senken. Darüber hinaus stellt sich die Frage, ob und inwieweit Acetylcystein einen positiven - senkenden - Einfluß auf einen bei terminaler Niereninsuffizienz erhöhten Plasma-Homocysteinspiegel hat, welcher ebenfalls mit arteriosklerotischer Veränderungen einhergeht und einen eigenständigen Risikofaktor darstellt.

In Rahmen dieser Arbeit wurden die Auswirkungen einer intravenösen ACC-Gabe während der Routine-Dialyse von zwanzig Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz auf den Homocysteinspiegel *in vivo* sowie den Pulsdruck, die Endothelfunktion und reaktive Sauerstoffradikale in einer prospektiven, randomisierten, placebokontrollierten Studie untersucht.

Die klinischen Charakteristika der zwanzig Patienten sind in Tabelle 3.1 dargestellt.

Tabelle 3.1 Klinische Charakteristika der Patienten

Dialysator	F8
Alter [Jahre]	70 ± 11
Patienten gesamt davon Frauen	20 6 (30%)
BMI (vor HD)	21 ± 4
Gewicht vor HD [kg]	66 ± 14
Serum-Kreatinin [mol/l]	541 ± 168
Serum-Harnstoff [mmol/l]	17 ± 6
Gesamteiweiß [g/l]	64 ± 7
Serum-Calcium [mmol/l]	2,3 ± 0,2
Serum-Phosphat [mmol/l]	1,3 ± 0,5

Nierenerkrankungen:	
Diabetische Nephropathie	6 (30%)
Nephrosklerose	3 (15%)
Tubulointerstitielle Nephritis	1 (5%)
Polyzystische Nierenerkrankung	2 (10%)
Andere bzw. unbekannt	8 (40%)
Länge der Hämodialyse [Monate]	28 ± 54

Unter Kontrollbedingungen und unter Gabe von Acetylcystein wurden Hämodialysesitzungen nach einer grundsätzlich gleichen Prozedur durchgeführt. Nur geringfügig abweichende Kt/V-Werte (Placebo $1,1 \pm 0,3$; Acetylcystein $1,2 \pm 0,2$; $p=0,38$), Ultrafiltrationsvolumina (Placebo $2,2 \pm 1,2$ L; Acetylcystein $2,5 \pm 1,1$ L; $p=0,50$), Hämatokrit vor der Hämodialysesitzung (Placebo $0,28 \pm 0,02$; Acetylcystein $0,29 \pm 0,01$; $p=0,32$) und Serumproteinkonzentrationen vor der Hämodialysesitzung (Placebo $104 \pm 10\%$; Acetylcystein $107 \pm 17\%$; $p=0,62$) bestätigen die Äquivalenz der Prozeduren. Eine Übersicht über die klinischen und biochemischen Daten der zwanzig Patienten bei Placebokontrolle und Acetylcysteingabe findet sich in Tabelle 3.2.

Infolge der intravenösen Gabe von Acetylcystein mittels einer Spritzenpumpe während einer Hämodialysesitzung wurden keinerlei klinische Nebenwirkungen bei den zwanzig untersuchten Patienten beobachtet. Dies steht in Übereinstimmung mit einer früher in der Arbeitsgruppe, aus der die vorliegende Arbeit hervorging, durchgeführten Studie, bei der Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz Acetylcystein oral über einen durchschnittlichen Zeitraum von 14,5 Monaten verabreicht wurde (Tepel et al. 2003). Damals berichteten 5 Patienten (8%) von gastrointestinalen Beschwerden wie Übelkeit, Erbrechen oder Diarrhoe während der Behandlung mit Acetylcystein, es wurden jedoch keine schwerwiegenden Nebenwirkungen beobachtet. Als Nebenwirkung von N-Acetylcystein können Hypotension, Angioödem oder ein Bronchospasmus beobachtet werden, auch von anaphylaktischen Reaktionen wurde berichtet (Mant et al. 1984). Allerdings zeigte keiner der Patienten in der aktuellen Studie während der Hämodialysesitzung oder in zeitlichem Zusammenhang mit der Gabe von Acetylcystein

eine der genannten Nebenwirkungen. Dies ist wahrscheinlich auf die langsame, kontinuierliche Gabe während der Hämodialysesitzung zurückzuführen.

Tabelle 3.2 Die klinischen und biochemischen Daten von 20 Patienten bei Placebo- und ACC-Gabe

	Placebo	ACC
Puls vor HD [1/min]	73 ± 3	80 ± 5
Puls nach HD [1/min]	82 ± 4 /min	87 ± 5 /min
RR _{sys} vor HD	149 ± 5 mmHg	154 ± 5 mmHg
RR _{sys} nach HD	150 ± 6 mmHg	148 ± 6 mmHg
RR _{dia} vor HD	72 ± 3 mmHg	68 ± 3 mmHg
RR _{dia} nach HD	70 ± 3 mmHg	72 ± 4 mmHg
Gewichtsabnahme [kg]	-1,81 ± 0,31	-1,98 ± 0,21
Gewichtsabnahme [%]	3 ± 0	-2,89 ± 0,25
Ultrafiltration [ml]	2484,70 ± 250,55	2786,6 ± 235,89
Flußrate [ml/min]	244,67 ± 8,39	251 ± 6,37
Kt/V	1,09 ± 0,07	1,18 ± 0,06
Hämoglobin [g/dl]	9,09 ± 0,51	9,28 ± 0,40
Hämatokrit [Vol. %]	0,28 ± 0,02	0,29 ± 0,01
Leukozyten [10 ³ /µl]	9,64 ± 1,07	11,94 ± 1,08
Thrombozyten [G/l]	303,87 ± 40,02	319,54 ± 40,78

3.1 Biochemische Auswirkungen

Bei zwanzig Patienten wurden die Effekte von Acetylcystein auf den Plasma-Homocysteinspiegel mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie mit Fluoreszenzdetektion untersucht. Desweiteren wurde bei fünfzehn von diesen Patienten mit einem Fluoreszenz-Photospektrometer die Bildung von intrazellulären reaktiven Sauerstoffradikalen in mononukleären Leukozyten analysiert. In einer weiteren Messung wurde ebenfalls in mononukleären Leukozyten dieser fünfzehn Patienten anhand von Lucigenin-Chemilumineszenz speziell die Bildung von Superoxid-Radikalen, einer Untergruppe der intrazellulären reaktiven Sauerstoffradikale, bestimmt. Mittels *in vitro* Gaben von Phorbolmyristataacetat (PMA), einem Verstärker der Radikalbildung, oder Diphenylen-Iodonium (DPI), einem Hemmstoff der Radikalbildung, sollte der Einfluß von Acetylcystein auf die Radikalbildung präziser beobachtet werden.

3.1.1 Bildung von intrazellulären reaktiven Sauerstoffradikalen

Mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes 2,7,-Dichlorofluorescein-diacetat (DCFDA) wurde die intrazelluläre Konzentration reaktiver Sauerstoffradikale im Fluoreszenzspektrometer gemessen. Die gemessene Fluoreszenz zum Messzeitpunkt 0 min (Startzeitpunkt) wurde jeweils als 100% Fluoreszenz betrachtet und die Fluoreszenz an den späteren Messpunkten (10, 20 und 30 min) zu ihr in Beziehung gesetzt. Unter Placebogabe wurde nach 10 Minuten eine Abschwächung der gemessenen Fluoreszenz auf 76 ± 7 % des Ausgangswertes vor und 73 ± 7 % des Ausgangswertes nach Hämodialyse gemessen. Die Bildung von intrazellulären reaktiven Sauerstoff-Radikalen vor und nach Hämodialyse unterscheidet sich damit nicht signifikant ($p=0,36$). Bei Gabe von Acetylcystein sanken die Fluoreszenzwerte auf 65 ± 8 % vor und 66 ± 6 % nach der Hämodialyse, dieser Unterschied ist jedoch ebenfalls nicht signifikant (siehe Abbildung 3.1, $n=15$, $p=0,39$).

Auch im weiteren Verlauf findet sich zu späteren Messzeitpunkten kein signifikanter Unterschied in der Bildung von intrazellulären reaktiven Sauerstoffradikalen (20 min: 194 ± 19 % vs. 165 ± 17 %, $p=0,28$; 30 min: 309 ± 30 % vs. 296 ± 36 % $p=0,52$; siehe Abbildung 3.2).

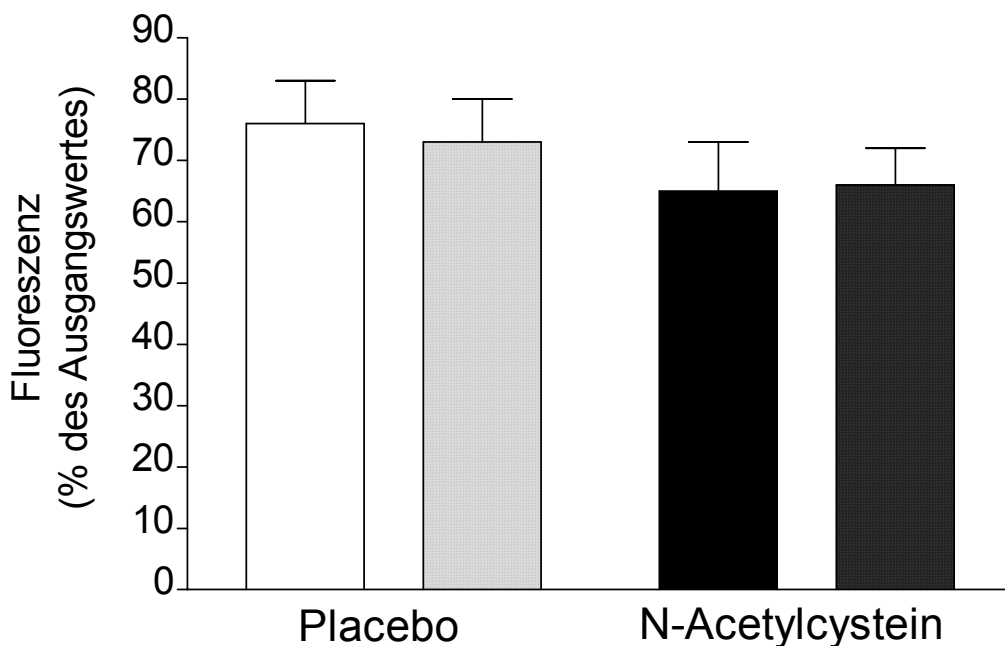


Abbildung 3.1 Vergleich der Bildung intrazellulärer reaktiver Sauerstoffradikale in mononukleären Leukozyten gemessen vor (uni) und nach (gepunktet) der Hämodialysesitzung zum Meßzeitpunkt 10 Minuten; weiß: Placebokontrolle ($76 \pm 7 \%$ vs. $73 \pm 7 \%$; $p=0,36$), schwarz: Acetylcysteingabe ($65 \pm 8 \%$ vs. $66 \pm 6 \%$; $p=0,39$; $n=15$)

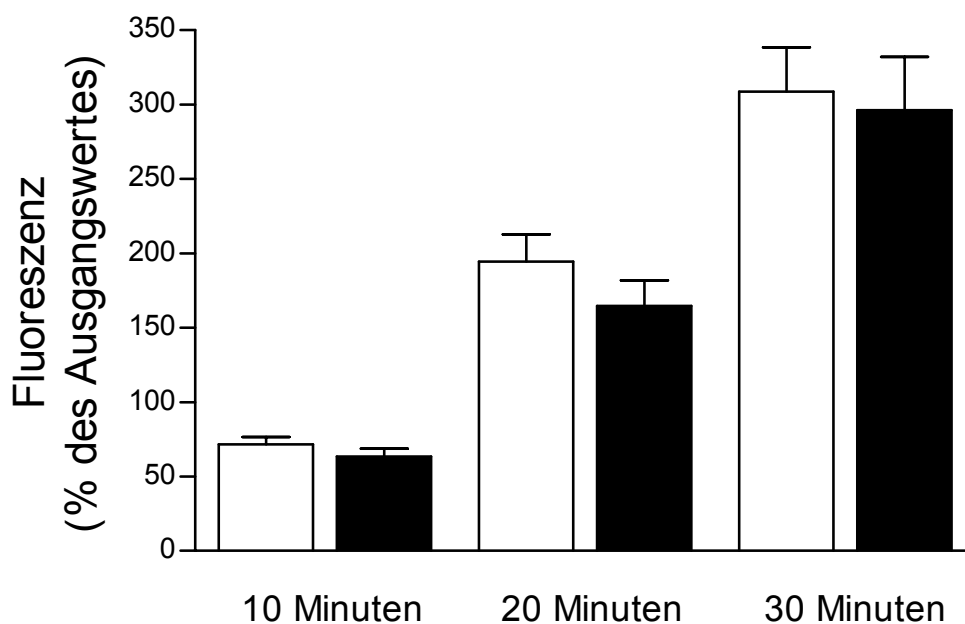


Abbildung 3.2 Verlauf der Bildung intrazellulärer reaktiver Sauerstoffradikale in mononukleären Leukozyten nach Hämodialyse bei Placebokontrolle (weiß; $73 \pm 7 \%$; $194 \pm 19 \%$; $309 \pm 30 \%$) und Acetylcystein (schwarz; $66 \pm 6 \%$; $165 \pm 17 \%$; $296 \pm 36 \%$) gemessen unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes 2,7,-Dichlorfluorescein-diacetat (DCFDA) im Fluoreszenzspektrometer ($n=15$)

Die *in vitro* Gaben von Phorbolmyristat-Acetat (PMA), und Diphenylen-Iodonium (DPI), einem Hemmstoff der Radikalbildung, zeigten die erwarteten Auswirkungen auf die Bildung von intrazellulären reaktiven Sauerstoffradikalen (siehe Abbildung 3.3 und Tabelle 3.3).

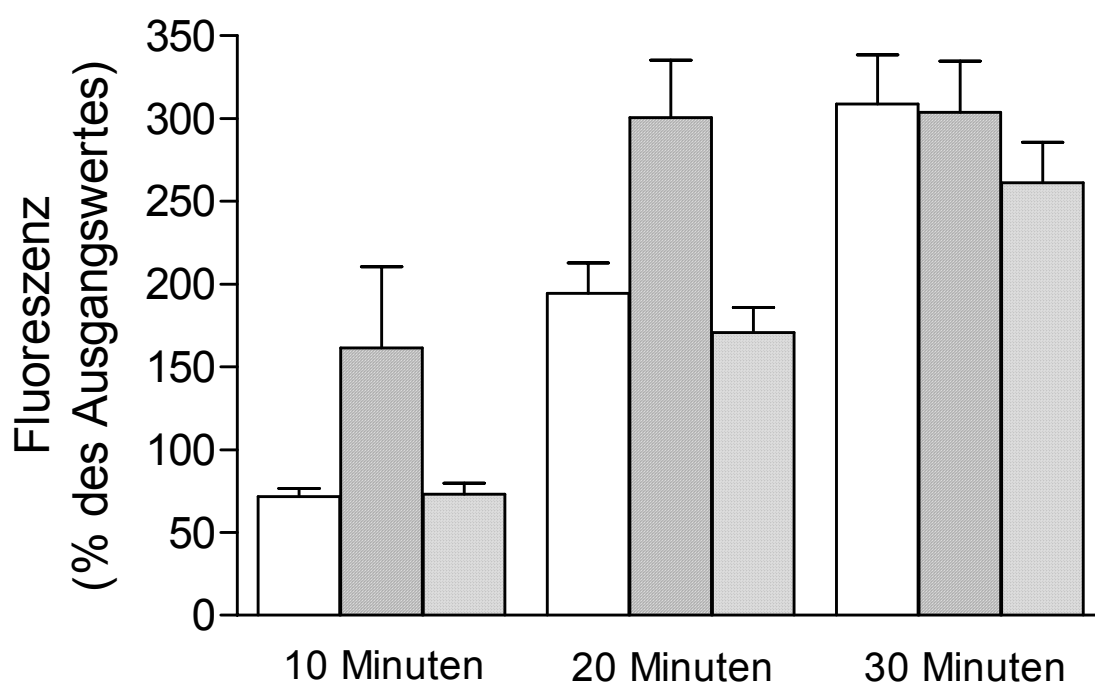


Abbildung 3.3 Bildung intrazellulärer reaktiver Sauerstoffradikale nach Hämodialyse unter Placebobedingungen bei mononukleären Leukozyten ohne Stimulation (weiß) sowie unter Zugabe von Phorbolmyristatacetat (PMA) (gestreift) und Diphenylen-Iodonium (DPI) (gepunktet) *in vitro* im Messverlauf nach 10, 20 und 30 Minuten gemessen unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes 2,7,-Dichlorofluorescein-diacetat (DCFDA) im Fluoreszenz-Spektrometer

Tabelle 3.3 Anstieg der Bildung intrazellulärer reaktiver Sauerstoffradikale im Zeitlichen Verlauf, Angaben in Prozent des Ausgangswertes, n = 15

	Placebo			ACC		
	10 min	20 min	30 min	10 min	20 min	30 min
Mononukleäre Leukozyten	73 ± 7	194 ± 19	309 ± 30	66 ± 6	165 ± 17	296 ± 36
PMA	162 ± 37	305 ± 35	305 ± 31	170 ± 32	316 ± 46	354 ± 53
DPI	67 ± 7	162 ± 15	246 ± 25	69 ± 7	140 ± 14	211 ± 21

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bei Messung der Proben nach Hämodialyse zwischen Placebokontrolle und nach Gabe von Acetylcystein (PMA ohne ACC 162 ± 37 %, mit ACC 170 ± 32 %, $p=0,46$; DPI ohne ACC 67 ± 7 %, mit ACC 69 ± 7 %, $p=0,95$ nach 10 Minuten; $n=15$) (siehe Abbildungen 3.4 und 3.5 sowie Tabelle 3.3).

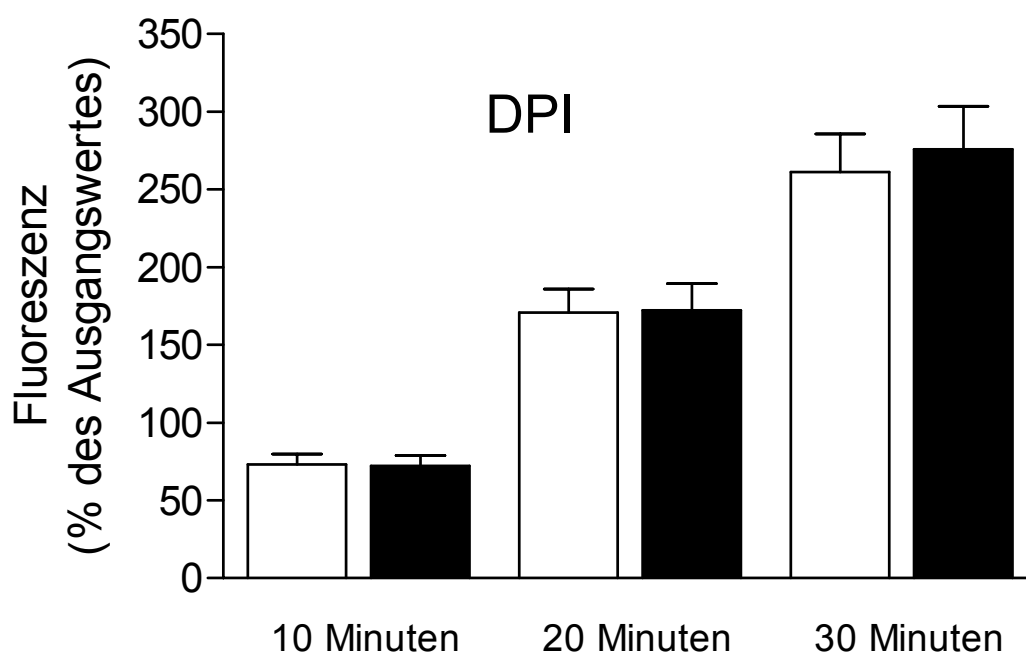


Abbildung 3.4 Bildung intrazellulärer reaktiver Sauerstoffradikale nach Hämodialyse unter Placebobedingungen (weiß) und Acetylcysteingabe (schwarz) bei mononukleären Leukozyten unter Zugabe von Diphenylen-Iodonium (DPI) *in vitro* im Messverlauf nach 10, 20 und 30 Minuten gemessen unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes 2,7,-Dichlorofluoresceindiacetat (DCFDA) im Fluoreszenz-Spektrometer

Insgesamt konnte also keine signifikante Veränderung der Bildung von intrazellulären reaktiven Sauerstoffradikalen und Superoxid-Radikalen in mononukleären Leukozyten beobachtet werden.

Bei der *in vitro* Gabe von Phorbolmyristataacetat (PMA) zeigte sich unter Behandlung der Patienten mit Acetylcystein ein offenbar verstärktes Ansprechen der mononukleären Leukozyten mit Zunahme der Bildung von intrazellulären reaktiven Sauerstoffradikalen (siehe Abbildung 3.5 und Tabelle 3.4, $n = 15$).

Tabelle 3.4 Bildung intrazellulärer reaktiver Sauerstoffradikale nach Hämodialyse bei *in vitro* Gabe von Phorbolmyristatacetat (PMA), Angaben in Prozent des Ausgangswertes, n = 15

	Placebo	ACC	p-Wert
10 min	161,9 ± 37,22	170 ± 32	0,46
20 min	305 ± 35	316 ± 46	< 0,01
30 min	305 ± 31	354 ± 53	< 0,01

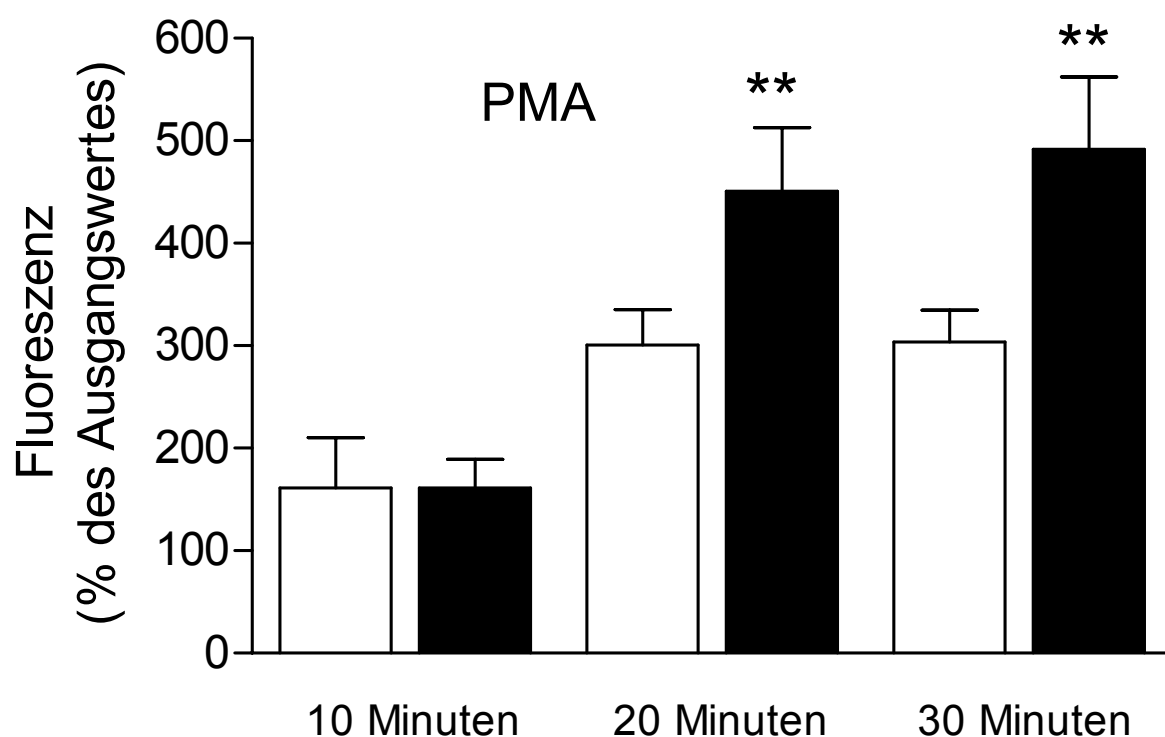


Abbildung 3.5 Bildung intrazellulärer reaktiver Sauerstoffradikale nach Hämodialyse unter Placebobedingungen (weiß) und Acetylcysteingabe (schwarz) bei mononukleären Leukozyten unter Zugabe von Phorbolmyristatacetat (PMA) *in vitro* im Messverlauf nach 10, 20 und 30 Minuten gemessen unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes 2,7,-Dichlorofluoresceindiacetat (DCFDA) im Fluoreszenz-Spektrometer, n = 15

3.1.2 Bildung von Superoxid-Radikalen

Durch Lucigenin-Chemilumineszenz lassen sich spezifisch Superoxidanionen (O_2^-) einer Probe messen. Im Rahmen dieser Reaktion werden Photonen freigesetzt, die bei einer Wellenlänge von 519nm gemessen und über 20 Minuten mittels eines Computerprogrammes aufgezeichnet werden. Die Werte von jeweils drei gleichen Ansätzen wurden gemittelt und als Messwert definiert, die Fluoreszenzwerte werden in arbiträren (willkürlichen) Einheiten angegeben.

Unter Placebogabe schien die Bildung von Superoxid-Radikalen vor und nach Hämodialyse zwar unterschiedlich, war aber nicht signifikant ($1,9 \pm 1,2$ bzw. $0,4 \pm 0,7$ Einheiten, $p=0,44$). Bei der Gabe von Acetylcystein während einer Hämodialysesitzung verhielt sich die Bildung von Superoxid-Radikalen vor und nach der Hämodialysesitzung entsprechend ($1,3 \pm 1,3$ bzw. $0,2 \pm 0,8$ Einheiten, $p=0,42$). Es lagen keine signifikanten Unterschiede zwischen Placebo- und Acetylcysteingabe vor (siehe Abbildung 3.6; $p=0,75$ vor HD bzw. $p=0,89$ nach HD).

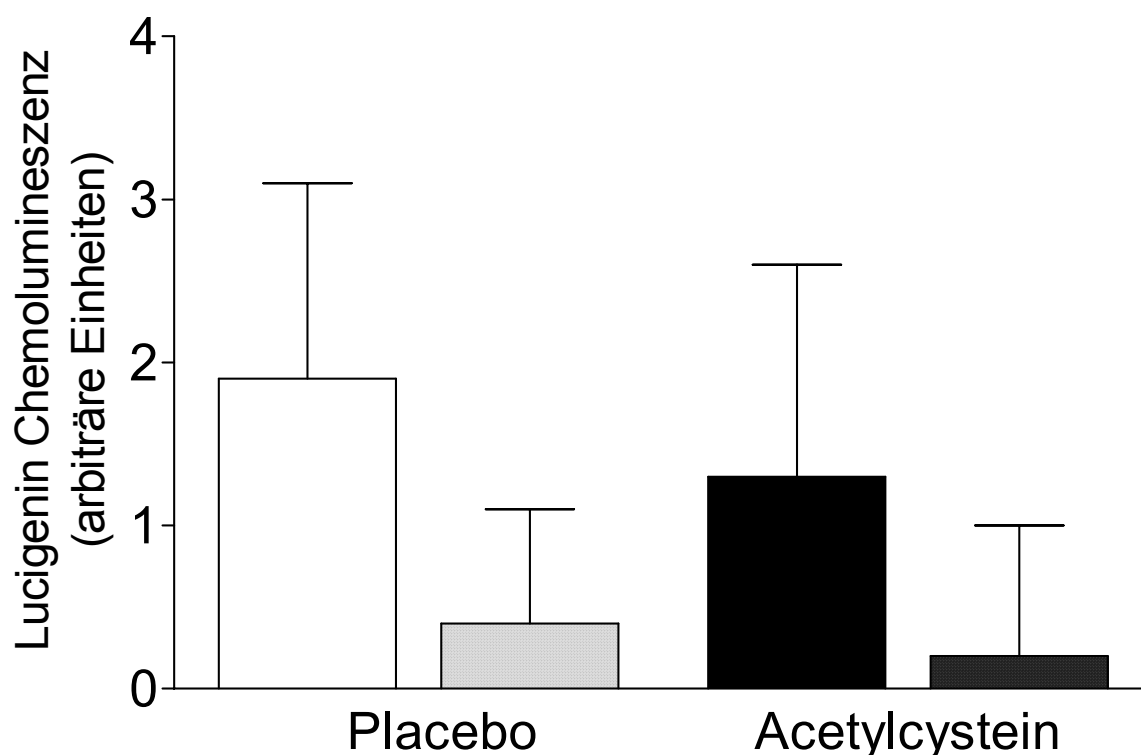


Abbildung 3.6 Superoxid-Radikalbildung unter Placebokontrolle (weiß) und Acetylcysteingabe (schwarz) jeweils vor (uni) und nach (gepunktet) Hämodialyse gemessen mit Lucigenin-Chemolumineszenz

Wie bereits bei der Messung der intrazellulären Sauerstoffradikale (siehe Abschnitt 3.1.1) gezeigt, fanden sich auch nach spezifischer Messung der Superoxidanionen bei Gabe von Phorbolmyristat-Acetat (PMA) oder Diphenylen-Iodonium (DPI) *in vitro* zwar die erwarteten Auswirkungen auf die Bildung von Superoxid-Radikalen, jedoch keine signifikanten Unterschiede der Proben zwischen Placebokontrolle und Acetylcystein-Gabe nach Hämodialyse (PMA ohne ACC $0,0 \pm 0,93$ Einheiten, mit ACC $1,1 \pm 1,19$ Einheiten, $p=0,63$; DPI ohne ACC $0,37 \pm 0,91$ Einheiten, mit ACC $-0,77 \pm 0,86$ Einheiten, $p=0,28$; $n=15$)(siehe Abbildung 3.7-3.9).

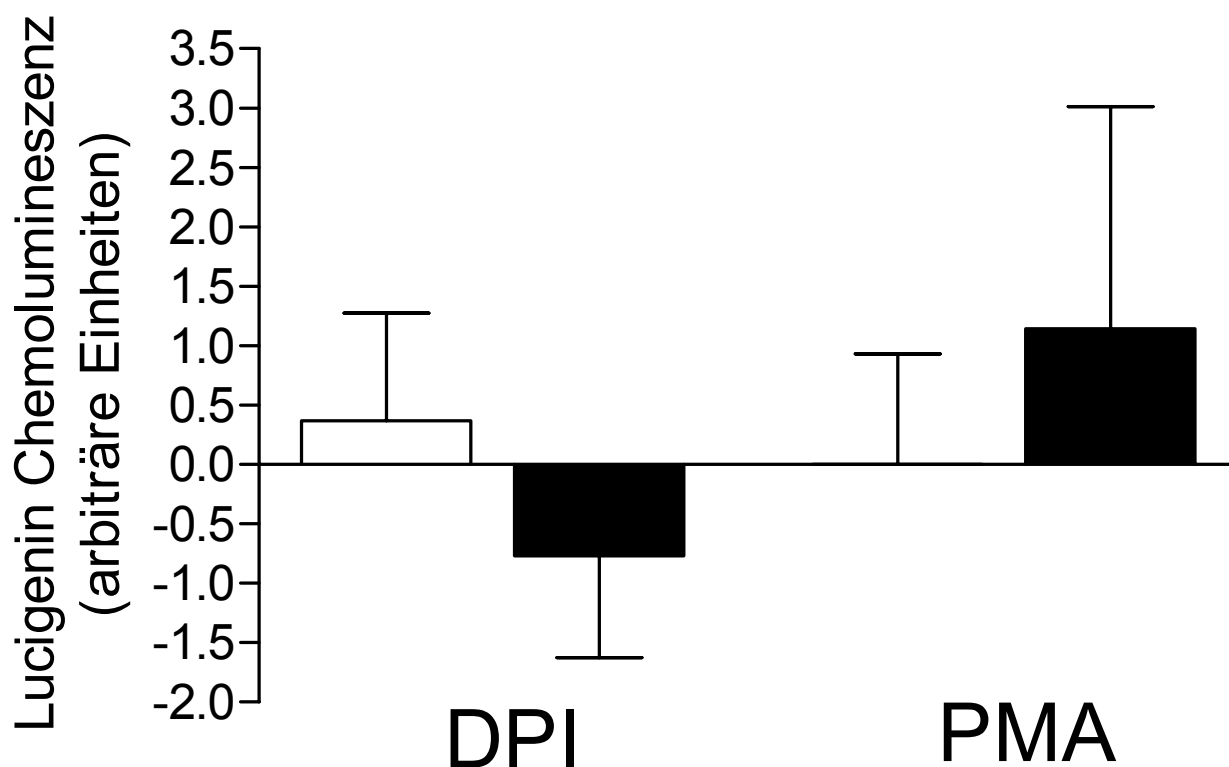


Abbildung 3.7 Superoxid-Radikalbildung unter Placebokontrolle (weiß) und Acetylcysteingabe (schwarz) nach Hämodialyse gemessen mit Lucigenin-Chemolumineszenz bei mononukleären Leukozyten unter Zugabe von Diphenylen-Iodonium (DPI) oder Phorbolmyristat-Acetat (PMA) *in vitro*

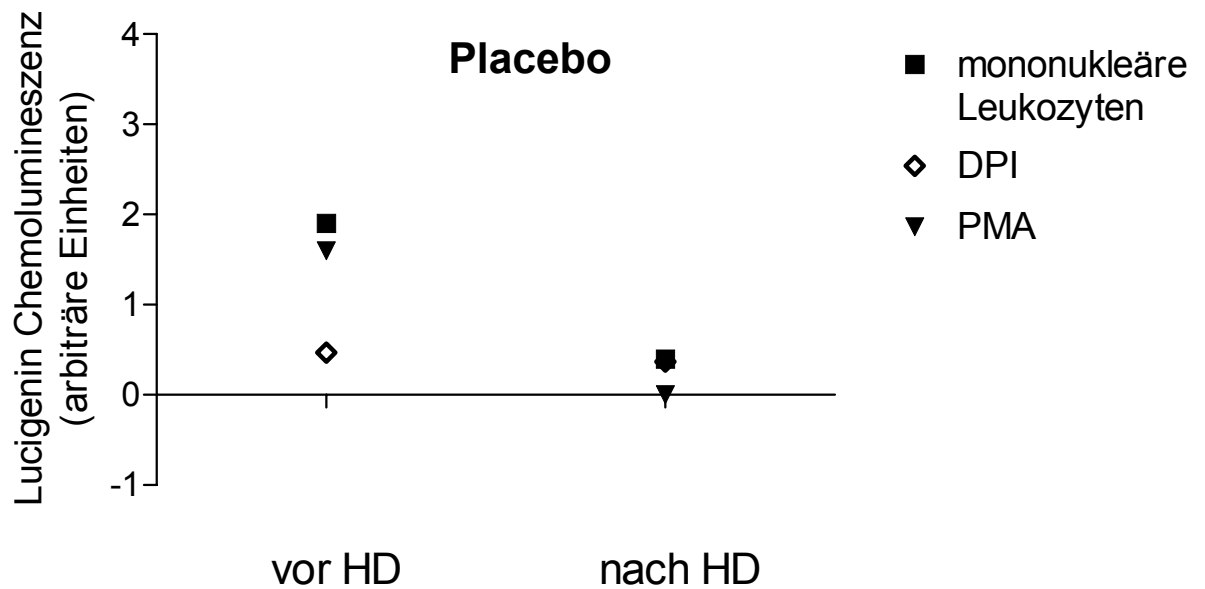


Abbildung 3.8 Superoxid-Radikalbildung unter Placebokontrolle vor und nach Hämodialyse (HD) gemessen mit Lucigenin-Chemolumineszenz bei mononucleären Leukozyten und unter Zugabe von Phorbolmyristat-Acetat (PMA) oder Diphenylen-Iodonium (DPI) *in vitro*

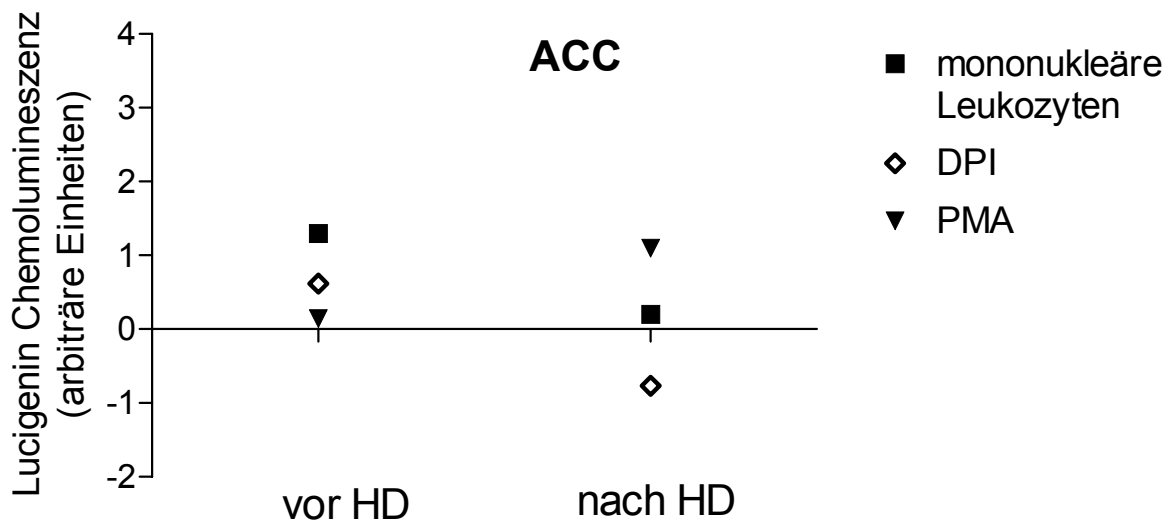


Abbildung 3.9: Superoxid-Radikalbildung unter Acetylcysteingabe vor und nach Hämodialyse (HD) gemessen mit Lucigenin-Chemolumineszenz bei mononucleären Leukozyten und unter Zugabe von Phorbolmyristat-Acetat (PMA) oder Diphenylen-Iodonium (DPI) *in vitro*

3.1.3 Plasma-Homocysteinspiegel

Der Plasma-Homocysteinspiegel von zwanzig Patienten wurde mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit Fluoreszenz-Detektion bestimmt. Die Fluoreszenzintensität wurde bei einer Extinktionswellenlänge von 385 nm und einer Emissionswellenlänge von 515 nm gemessen.

Zunächst wurden die Effekte der *in vivo*-Gabe von Acetylcystein während einer Standard-Hämodialysesitzung auf den Plasma-Homocysteinspiegel untersucht. Unter Kontrollbedingungen (Placebogabe) sank der Plasma-Homocysteinspiegel von $19,8 \pm 9,2 \mu\text{mol/L}$ auf $11,9 \pm 7,8 \mu\text{mol/L}$ ($p < 0,05$) nach einer Hämodialysesitzung. Unter der Gabe von Acetylcystein sank der Plasma-Homocysteinspiegel von $20,1 \pm 8,5 \mu\text{mol/L}$ auf $2,2 \pm 1,2 \mu\text{mol/L}$ ($p < 0,05$) nach einer Hämodialysesitzung. Die Reduktion des Plasma-Homocysteinspiegels war unter Gabe von Acetylcystein signifikant größer als unter Placebo-Gabe ($p < 0,01$; siehe Abbildung 3.10, $n=20$).

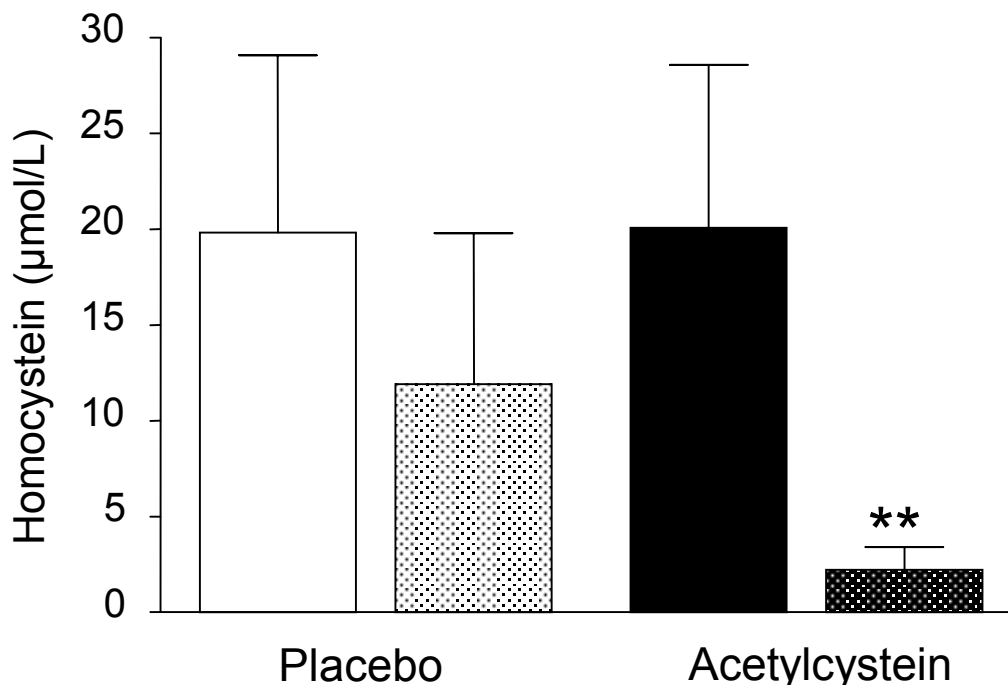


Abbildung 3.10 Reduktion des Plasma-Homocysteinspiegels durch Hämodialyse (uni = vor Hämodialyse, gepunktet = nach Hämodialyse) unter Placebokontrolle (weiß) und Gabe von Acetylcystein (schwarz)

Während also der Plasma-Homocysteinspiegel unter Kontrollbedingungen durch Hämodialyse auf $58 \pm 22\%$ des Ausgangswertes gesenkt werden konnte, ermöglichte die Gabe von Acetylcystein während der Hämodialysesitzung eine Absenkung auf $12 \pm 7\%$ des Ausgangswertes. Dies stellt eine signifikante Verbesserung dar ($p < 0,01$ Acetylcystein versus Placebokontrolle). Damit konnte der Plasma-Homocysteinspiegel unter Acetylcysteingabe während einer Hämodialysesitzung bei allen an der Studie beteiligten Patienten auf vollständig normale Werte gesenkt werden (Referenzbereich $< 12,0 \mu\text{mol/l}$; (Clarke 1998)), was unter Placebogabe nicht der Fall war (siehe Tabellen 3.5 und 3.6)

Tabelle 3.5

Plasma-Homocysteinspiegel (Hcy)
unter Placebogabe

Hcy vor HD	Hcy nach HD	Hcy nach/vor
29,82	13,13	44%
15,08	6,08	40%
15,01	7,57	50%
14,33	7,81	55%
26,95	13,67	51%
23,25	15,93	69%
4,37	1,18	27%
41,45	27,4	66%
17,23	11,37	66%
15,51	nicht analysiert	
4,79	3,83	80%
15,16	7,82	52%
8,57	5,66	66%
19,06	0,66	3%
19,4	13,66	70%
22,85	14,94	65%
18,91	14,51	77%
23,04	10,98	48%
34,16	20,65	60%
27,53	29,76	108%

Tabelle 3.6

Plasma-Homocysteinspiegel
unter Acetylcysteingabe

Hcy vor HD	Hcy nach HD	Hcy nach/vor
11,39	2,85	25%
17,77	nicht analysiert	
18,84	0,12	1%
19,94	1,76	9%
28,06	2,26	8%
30,99	2,02	7%
11,44	0,14	1%
32,88	3,6	11%
16,76	4,18	25%
25,76	2,23	9%
5,99	1,1	18%
13,18	1,41	11%
5,45	0,81	15%
17,06	nicht analysiert	
13,83	3,74	27%
26,39	3,65	14%
25,55	2,16	8%
18,89	2,18	12%
27,0	2,70	10%
34,28	3,56	10%

Eine weitere Datenanalyse der fünfzehn Patienten mit Kt/V-Werten über 1,2 zeigte einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Harnstoffverhältnis vor und nach Hämodialyse und dem Homocysteinverhältnis vor und nach Hämodialyse ($y=0,14x+26,8$; $r^2= 0,20$; $p=0,01$). Hierdurch wurde bestätigt, dass die Abnahme des Homocysteins von der Dialyse-Dosis abhängt. Das Harnstoffverhältnis vor und nach Hämodialyse war nicht signifikant unterschiedlich zwischen Acetylcystein- und Placebogruppe.

Der positive Effekt von Acetylcystein auf den Homocysteinspiegel konnte sogar noch zwei Tage nach der Gabe beobachtet werden. Zu diesem Zeitpunkt lag der Plasma-Homocysteinspiegel unter Kontrollbedingungen bei $134 \pm 65\%$ des zu Beginn der vorhergehenden Hämodialysesitzung gemessenen Wertes. Im Gegensatz dazu lag der Plasma-Homocysteinspiegel zwei Tage nach der intravenösen Gabe von Acetylcystein unter der Hämodialysesitzung bei $88 \pm 36\%$ des ursprünglich gemessenen Wertes ($p<0,05$).

3.2 Hämodynamische Auswirkungen

Im Rahmen der durchgeführten Studie traten während der beobachteten Standarddialyseprozeduren keinerlei klinische Nebenwirkungen wie Hypotonie oder Arrhythmien auf, die Einfluss auf die Auswertung hämodynamischer Parameter hätten haben können.

3.2.1 Pulsdruck

Um zu untersuchen, ob die beobachtete Normalisierung des Plasma-Homocysteinspiegels bei Patienten mit chronischer terminaler Niereninsuffizienz hämodynamische Auswirkungen zeigte, wurden unmittelbar vor und am Ende der Hämodialysesitzung bei jedem Patienten (n=20) eine Herzfrequenz- und Blutdruckmessung vorgenommen. Der Pulsdruck errechnet sich als Differenz aus systolischem und diastolischem Blutdruck. Die Veränderungen von Herzfrequenz, systolischem und diastolischem Blutdruck sowie des Pulsdrucks sind in Tabelle 3.7 dargestellt.

Tabelle 3.7 Veränderungen von Herzfrequenz, systolischem (RR_{sys}) und diastolischem (RR_{dia}) Blutdruck und Pulsdruck infolge der Dialysesitzung (HD) unter Placebo- und Acetylcysteingabe. Jeweils Mittelwerte aller gemessenen Patienten (n=20) mit Standardabweichung

	Placebokontrolle	Acetylcystein
RR_{sys} vor HD [mmHg]	149 ± 5	154 ± 5
RR_{sys} nach HD [mmHg]	150 ± 6	148 ± 6
RR_{dia} vor HD [mmHg]	72 ± 3	68 ± 3
RR_{dia} nach HD [mmHg]	70 ± 3	72 ± 4
Pulsdruck vor HD [mmHg]	77 ± 4	86 ± 4
Pulsdruck nach HD [mmHg]	80 ± 5	75 ± 5
Pulsdruck nach/vor HD [%]	108 ± 8	89 ± 5
Herzfrequenz vor HD [1/min]	73 ± 3	80 ± 5
Herzfrequenz nach HD [1/min]	82 ± 4	87 ± 5

Während einer Hämodialysesitzung unter Kontrollbedingungen war keine signifikante Veränderung des Pulsdrucks zu beobachten. Dieser stieg leicht von 77 ± 4 auf 80 ± 5 mmHg. Unter Gabe von Acetylcystein hingegen sank der Pulsdruck signifikant von 86 ± 4 mmHg zu Beginn auf 75 ± 5 mmHg am Ende der Hämodialysesitzung ab ($p < 0,05$).

Um festzustellen, ob ein Zusammenhang zwischen der Reduktion des Homocysteinspiegels und einer Senkung des Pulsdrucks existiert, wurden die Daten der einzelnen Patienten, d.h. aller Patienten sowohl aus der Kontroll- als auch aus der ACC-Gruppe, statistisch analysiert. Es zeigte sich, dass die Reduktion des Plasma-Homocysteinspiegels in beiden Gruppen signifikant mit einer Reduktion des Pulsdrucks korreliert ($p < 0,05$, siehe Abbildung 3.11).

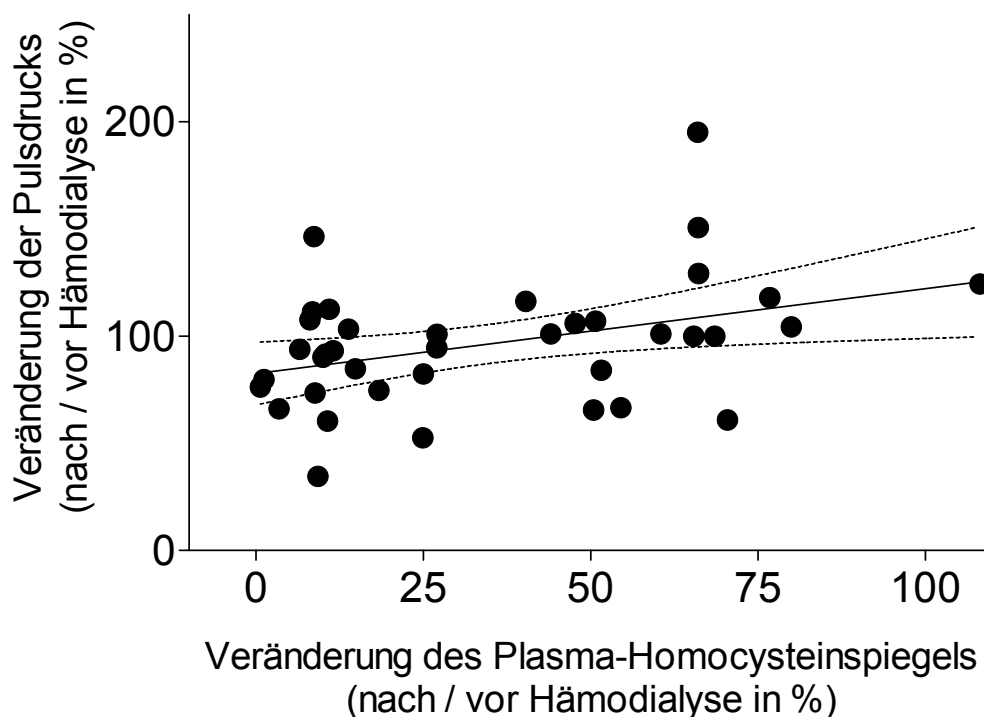


Abbildung 3.11 Korrelation der Reduktion der Plasma-Homocysteinspiegels mit der Reduktion des Pulsdrucks sowohl unter Placebo- als auch unter Acetylcysteingabe. Jeder Punkt stellt die Messwerte eines einzelnen Patienten dar (alle Patienten Placebo und ACC-Gruppe)

Ein Absinken des Plasma-Homocysteinspiegels um 10% ging mit einer Reduktion des Pulsdrucks um 2,5 mmHg einher. Eine Multivarianzanalyse zeigte, dass die

Veränderungen des Pulsdrucks von der Veränderung des Plasma-Homocysteinspiegels abhingen (Regressionskoeffizient 0,504; 95% Konfidenzintervall), wohingegen Kt/V, Ultrafiltrationsvolumen und Veränderungen des Hämatokrits oder der Serumprotein-konzentration keine Auswirkungen hatten.

3.2.2 Fingerphotoplethysmographie

Um Effekte auf die Endothelfunktion in Gegenwart von Acetylcystein festzustellen, wurden Pulswellen während der Hämodialysesitzung mittels Fingerphotoplethysmographie untersucht (s. Kap. 2.4.2). Zur Charakterisierung der Pulswellen während einer Hämodialysesitzung wurde die zweite Ableitung der Wellenform des Photoplethysmogramms analysiert. Der Quotient aus erstem (a) und zweitem Maximum (b), der ab-Quotient (Steifheit der großen Arterien), und der Quotient aus erstem und viertem Maximum (d), der ad-Quotient (periphere Pulswellenreflexion), wurden errechnet. Für die Berechnungen wurden die Absolutwerte verwendet. Die initialen ab-beziehungsweise ad-Quotienten, die vor Beginn der Hämodialysesitzung gemessen wurden, wurden als Kontrollwerte (100%) definiert. Abbildungen 3.12 zeigt die zusammengefassten Daten aller Patienten für die ab-Quotienten und ad-Quotienten aus der zweiten Ableitung der Wellenform des Fingerphotoplethysmogramms.

Während die ab-Quotienten unter Kontrollbedingungen bei Dialyse sanken, stiegen sie unter Gabe von Acetylcystein (p für die Tendenz $<0,01$). Der ad-Quotient, der hauptsächlich die periphere Wellenreflexion charakterisiert, sank während der Hämodialysesitzung unter Kontrollbedingungen, unter Gabe von Acetylcystein stieg er hingegen ebenfalls (p für die Tendenz $<0,01$).

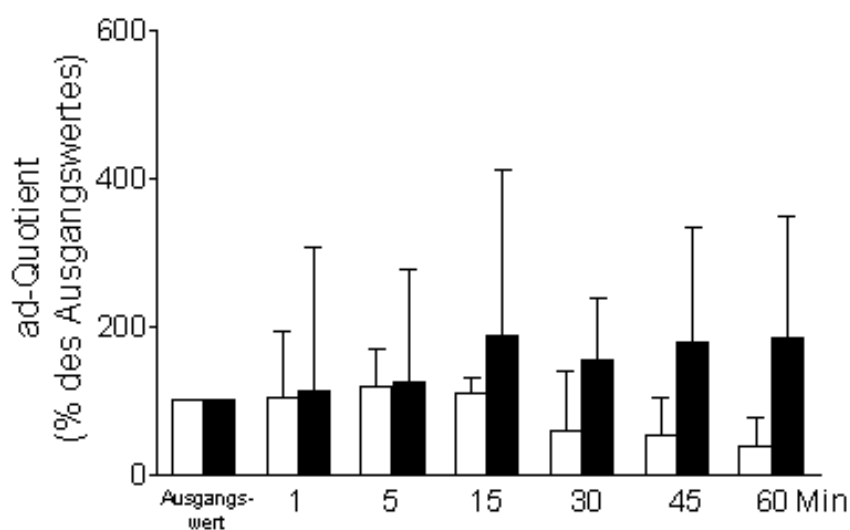
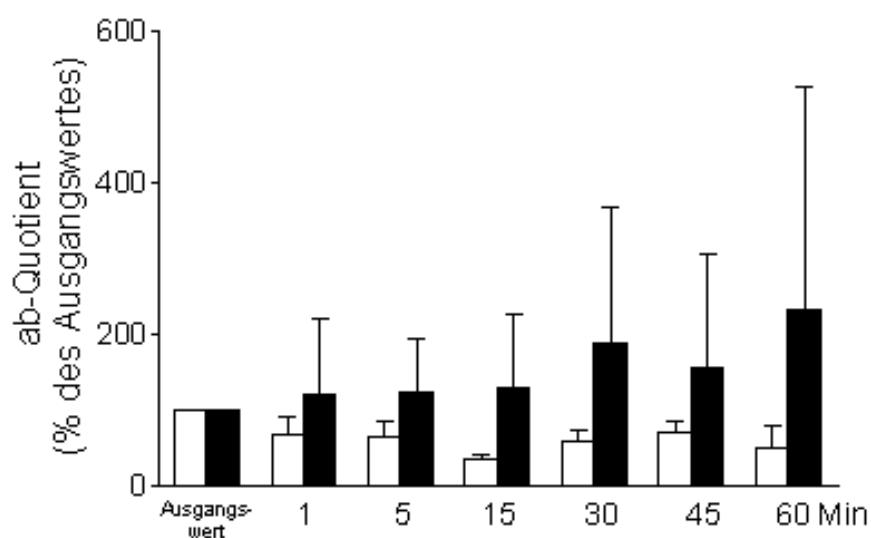


Abbildung 3.12 Zusammengefasste Daten für ab-Quotienten (oben) und ad-Quotienten (unten) aus der zweiten Ableitung der Wellenform des Finger-Photoplethysmogramms unter Placebokontrolle (weiß) und Acetylcystein (schwarz)

Schließlich sollte bewertet werden, ob die Veränderungen der Pulswellen bei Gabe von Acetylcystein eine Verbesserung der Endothelfunktion widerspiegeln. Hierzu wurde eine endothelabhängige flußvermittelte Vasodilatation während einer reaktiven Hyperämie und eine endothelunabhängige Vasodilatation während der Gabe von

Nitroglycerin auf ab-Quotient und ad-Quotient bei gesunden Probanden untersucht. Wie in Abbildung 3.13 gezeigt, verbesserte ACC die endothelabhängige fluvermittelte Vasodilatation (ab-Quotient $146,64 \pm 93,4$, $p < 0,05$; ad Quotient $180,4 \pm 45,5$, $p < 0,05$; $n=7$), also erhöhten sich hier beide Quotienten, nicht aber die endothelunabhngige (ab-Quotient 72 ± 11 , $p < 0,01$; ad-Quotient 2174 ± 441 ; $p < 0,05$; $n=7$), hier sankt der ab-Quotient.

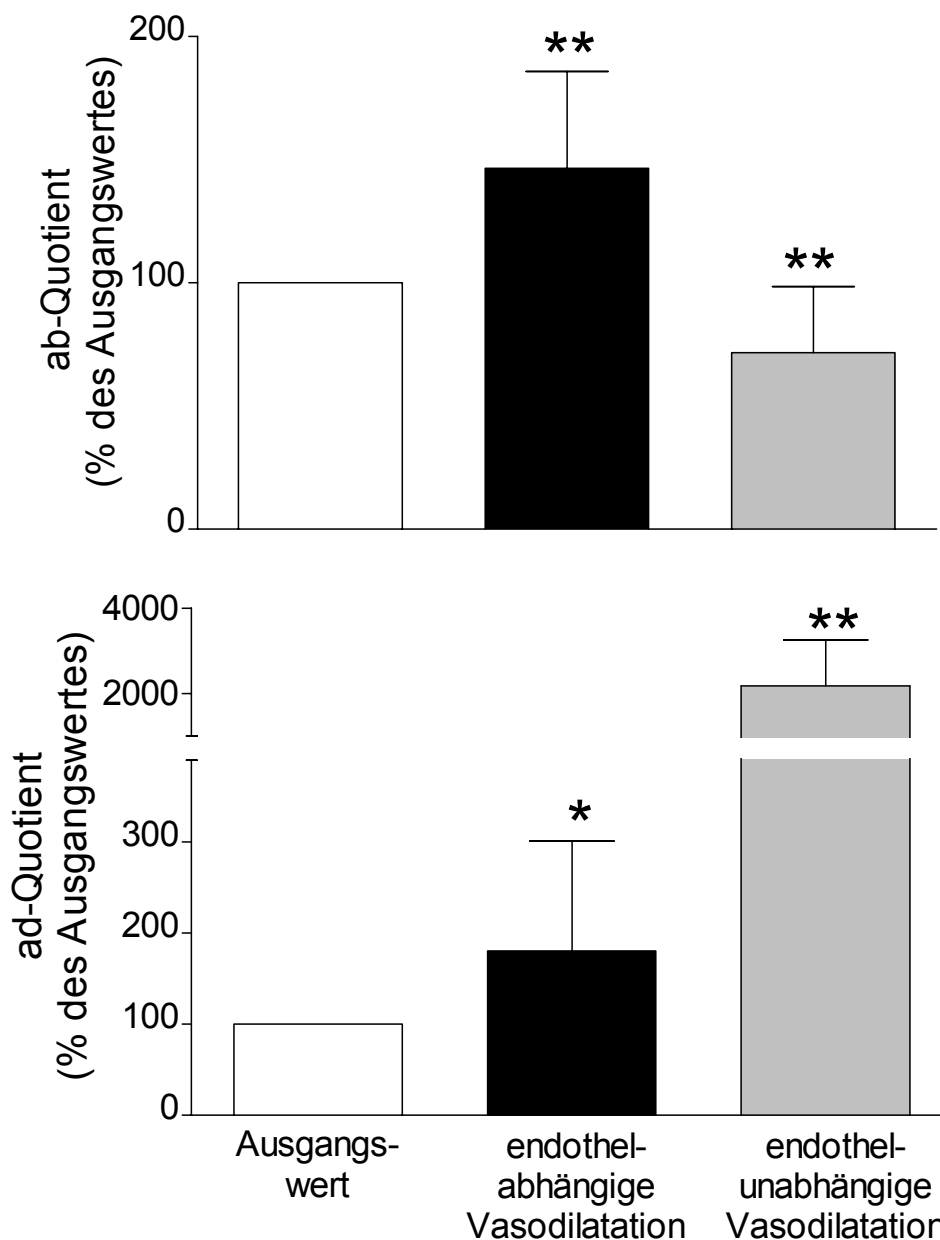


Abbildung 3.13: Veränderung der ab- und ad-Quotienten bei endothelabhängiger fluvermittelter Vasodilatation sowie bei endothelunabhngiger Vasodilatation, $p^* < 0,05$; $p^{**} < 0,01$

Daraus lässt sich folgern, daß die Verbesserung des ab-Quotienten und des ad-Quotienten, wie sie in der vorliegenden Studie bei den Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz unter Gabe von Acetylcystein beobachtet wurde, im Einklang mit einer Verbesserung der Endothelfunktion steht.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde somit eine klinische Verbesserung der endothelialen Funktion unter der intravenösen Gabe von Acetylcystein beobachtet.

4 Diskussion

Bei Patienten mit chronischer terminaler Niereninsuffizienz sind die kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität im Vergleich zur Durchschnittsbevölkerung erhöht (Locatelli et al. 2000; London et al. 2005; Schiffrin et al. 2007). Etwa 50 % der Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz sterben in Folge von kardiovaskulären Ereignissen (Foley et al. 1998; Tonelli et al. 2006). Als unabhängige Risikofaktoren gelten unter anderen eine arterielle Hypertonie sowie erhöhter oxidativer Stress (Schiffrin et al. 2007). Die Rolle eines Plasma-Homocysteinspiegels bei Patienten mit chronischer terminaler Niereninsuffizienz ist umstritten, es gibt hier auch Anzeichen für eine Korrelation zwischen erhöhtem kardiovaskulärem Risiko und niedrigem Plasma-Homocysteinspiegel (Perna et al. 2004). Neuere Studien weisen allerdings darauf hin, dass zwar die Kombination von Entzündungsreaktion und niedrigem Plasma-Homocysteinspiegel eine Erhöhung des kardiovaskulären Risikos birgt, wohingegen sich bei einer Multivarianzanalyse eine Korrelation zwischen erhöhtem Mortalitätsrisiko und erhöhtem Plasma-Homocysteinspiegel zeigt (Suliman et al. 2007).

Ein erhöhter Plasma-Homocysteinspiegel an sich stellt einen wesentlichen Risikofaktor bei der Entstehung endothelialer Dysfunktion und in der Folge erhöhter kardiovaskulärer Morbidität und Mortalität dar (Hajjar 2001; Ebbesen 2004). Um einen erhöhten Plasma-Homocysteinspiegel bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz zu senken, finden sich bisher unterschiedliche Ansätze, wie zum Beispiel die Gabe von Vitamin B6 (Pyridoxin), Vitamin B12 (Cobalamin), Folsäure oder Folinsäure. Allerdings konnten selbst hohe Dosen von Folsäure den erhöhten Plasma-Homocysteinspiegel dieser Patienten nicht auf ein normales Niveau senken (Sunder-Plassmann et al. 2000).

Es existieren verschiedene Studien über die Auswirkungen einer oralen Gabe von Acetylcystein auf den Plasma-Homocysteinspiegel. So senkte die orale Gabe von Acetylcystein den Plasma-Homocysteinspiegel von gesunden Frauen (Roes et al. 2002). Eine weitere Studie zeigte außerdem, dass Hämodialyse-Patienten, die über vier Wochen oral mit Acetylcystein behandelt wurden, einen signifikant um 19% niedrigeren Plasma-Homocysteinspiegel aufwiesen, wohingegen in der Placebogruppe keine

Reduktion zu beobachten war. Die Unterschiede zwischen der Acetylcystein- und der Placebogruppe zeigten einen p -Wert von 0,07 (Friedman et al. 2003).

Die orale Gabe von Acetylcystein kann die Inzidenz von kardiovaskulären Ereignissen bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz signifikant reduzieren (Tepel et al. 2003). Hinsichtlich einer intravenösen Gabe von Acetylcystein wurde gezeigt, dass diese in gesunden Probanden zu einem Absinken des Plasma-Homocysteinspiegels führt (Ventura et al. 1999). Die vorliegende Arbeit ist der erste Bericht über eine intravenöse Anwendung von ACC bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die erhöhte Bildung von intrazellulären reaktiven Sauerstoff-Radikalen und Superoxid-Radikalen in mononukleären Leukozyten bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz von Hämodialyse oder kurzfristiger Gabe von Acetylcystein unbeeinflusst bleibt. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass der direkte antioxidative Effekt von Acetylcystein bisher hauptsächlich *in vitro* nachgewiesen wurde (Aruoma et al. 1989; Moldeus und Cotgreave 1994). Seine indirekt antioxidative Wirkung entfaltet es über eine Induktion der Glutathionsynthese (Scaduto et al. 1991). Um eine Senkung der Sauerstoffradikale *in vivo* zu erreichen, bedarf es möglicherweise einer längerfristige Gabe von Acetylcystein.

Bei der Gabe von Phorbolmyristataacetat (PMA) zeigte sich unter Gabe von Acetylcystein ein offenbar verstärktes Ansprechen der mononukleären Leukozyten mit Zunahme der Bildung von intrazellulären reaktiven Sauerstoffradikalen. Dies traf aber nicht auf die Bildung von Superoxid-Radikalen zu.

Bei der Zellpopulation der mononukleären Leukozyten handelt es sich um eine sehr heterogene Mischung von Zellen des peripheren Blutes. Sie wird auch als PBMC (*engl.*: peripheral blood mononuclear cells) bezeichnet und umfasst sämtliche Zellen des peripheren Blutes bis auf Erythrozyten, Thrombozyten und Granulozyten. Es handelt sich also um kernhaltige lymphatische Zellen wie T-Zellen, B-Zellen, natürliche Killerzellen und Monozyten. Die Eigenschaften der unter dem Begriff der mononukleären Leukozyten zusammengefassten Zellen variieren stark und hängen wesentlich vom Immunstatus des einzelnen Patienten und möglicher vorhandener

Komorbiditäten ab. Es lässt sich also nicht abschließend bewerten, wie die Ergebnisse zur Bildung intrazellulärer Sauerstoffradikale und die Veränderungen unter Einfluss von ACC *in vivo* und PMA *in vitro* zu deuten sind.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die intravenöse Gabe von Acetylcystein während einer Hämodialysesitzung in der Lage ist, den Plasma-Homocysteinspiegel bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz vollständig auf normale Werte abzusenken. Dabei wurde unter intravenöser Gabe von Acetylcystein der Plasma-Homocysteinspiegel deutlich weiter abgesenkt als durch alleinige Hämodialyse (auf $12 \pm 7\%$ statt $58 \pm 22\%$ des Ausgangswertes; $p < 0,01$). Eine Untersuchung der Endothelfunktion mittels Fingerphotoplethysmographie bestätigte darüber hinaus eine deutlich verbesserte Endothelfunktion in Gegenwart von Acetylcystein.

Das beobachtete verstärkte Absinken von Homocystein während der Hämodialyse nach intravenöser Gabe von Acetylcystein ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass Homocystein aus der Proteinbindung abgelöst wird. Auf Grund der geringen molekularen Größe von Homocystein würde somit ein größerer Anteil des dialysablen Homocysteins aus dem Plasma entfernt werden. Das hier gezeigte intradialytische Absinken des Plasma-Homocysteinspiegels resultiert wahrscheinlich aus der Entfernung von ungebundenem Homocystein durch die Dialyse. Eine in anderen Studien beobachtete nach der Hämodialyse fortbestehende Reduktion des Plasma-Homocysteinspiegels wurde der Elimination von Urämie-Toxinen mit inhibitorischer Wirkung auf Enzyme des Homocystein-Metabolismus zugeschrieben (Van Tellingen et al. 2001). Möglicherweise existieren auch noch weitere, bisher unbekannte Effekte des Acetylcysteins auf den Homocystein-Metabolismus, die zu einer Reduktion und Stabilisierung des Plasma-Homocysteinspiegels beitragen, wie Enzyminduktion - bekannt ist eine Induktion der Glutathionsynthese (Scaduto et al. 1991) - oder die Katalyse von Reaktionen.

Die Reduktion und dauerhafte Stabilisierung des erhöhten Plasma-Homocysteinspiegels bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz scheint von großer klinischer Bedeutung zu sein. Zunächst zeigten Dierkes et al. (2000) einen Zusammenhang zwischen Plasma-Homocysteinspiegel und der Mortalität bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz. Eine weitere Studie zeigt, dass das relative Risiko für

kardiovaskuläre Ereignisse um ein Prozent pro μmol Steigerung des Plasma-Homocysteinspiegels zunahm (Moustapha et al. 1997). Die in der hier vorliegenden Arbeit gemessene Senkung des Plasma-Homocysteinspiegels durch intravenöse Gabe von Acetylcystein auf Normalniveau könnte somit eine außerordentliche Bedeutung zur Senkung des kardiovaskulären Risikos bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz haben.

In einer Studie wurde gezeigt, dass eine akute Hyperhomocysteinämie bei gesunden Probanden zu einer Erhöhung des Pulsdrucks, und damit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko, führt (Davis et al. 2001). Des Weiteren wurde stellt ein erhöhter Pulsdruck einen wichtigen Prädiktor für die Mortalität bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz dar (Tozawa et al. 2002), eine Tatsache, die die Wichtigkeit unterstreicht, den Pulsdruck zu senken. Eine erhöhte Steifheit der zentralen Arterien und eine Alteration der Pulswellenreflexion von peripheren Arterien tragen zur Steigerung des Pulsdrucks bei, wie sie bei zunehmendem Alter, arterieller Hypertonie oder terminaler Niereninsuffizienz beobachtet werden. Vor diesem Hintergrund kommt dem Ergebnis der vorliegenden Arbeit, dass eine 10%ige Senkung des Plasma-Homocysteinspiegels bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz mit einer Abnahme des Pulsdrucks um 2,5 mmHg verbunden ist, besondere Bedeutung zu, da hiermit ein weiterer Risikofaktor durch intravenöse ACC Gabe positiv beeinflusst wird.

Die Analyse der zweiten Ableitung der Wellenform des Finger-Photoplethysmogramms ist wiederholt benutzt worden, um die arterielle Pulswellenreflexion zu beurteilen (Takazawa et al. 1998). Mit einer Analyse von Pulswellen, die durch Finger-Photoplethysmographie gewonnen wurden, zeigten (Chowienczyk et al. 1999), dass die von Salbutamol hervorgerufene Endothel-abhängige Vasodilatation durch N^{G} -monomethyl-l-arginin abgeschwächt wurde und bei Diabetes-Patienten mit endothelialer Dysfunktion herabgesetzt war. In der vorliegenden Arbeit wurden charakteristische Verhältnisse, abgeleitet von der zweiten Ableitung der Wellenform des Photoplethysmogramms, genutzt, um die hämodynamischen Veränderungen während einer Hämodialysesitzung zu beschreiben. Die Analyse zeigte eine Verbesserung der Endothelfunktion bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz unter Gabe von Acetylcystein, da das gleiche Muster bei einer Endothel-abhängigen, Fluß-vermittelten Vasodilatation bei gesunden Probanden beobachtet wurde. Die Tatsache, dass

Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz größtenteils an endothelialer Dysfunktion leiden, unterstreicht die Wichtigkeit dieser Ergebnisse (Cai und Harrison 2000; Anavekar und Pfeffer 2004; Amann et al. 2006; Stam et al. 2006).

Verschiedene Mechanismen können für die verbesserte Endothelfunktion unter der Behandlung mit Acetylcystein verantwortlich sein. Zunächst gibt es verschiedene Hinweise, dass erhöhter oxidativer Stress für endotheliale Dysfunktion bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz verantwortlich ist (Himmelfarb et al. 2002). Da wiederholt gezeigt wurde, dass Acetylcystein antioxidative Eigenschaften besitzt (Fishbane et al. 2004), könnte es auf diese Weise die Endothelfunktion verbessern. Ein Einfluss von Acetylcystein auf die Bildung intrazellulärer reaktiver Sauerstoffradikale konnte allerdings in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden.

Homocystein, das selbst mit oxidativem Stress in Verbindung gebracht wird, induziert programmierten Zelltod bei Endothelzellen (Zhang et al. 2004). Des Weiteren erhöht Homocystein den Spiegel an asymmetrischem Dimethylarginin, einem Urämietoxin, das die Endothel-abhängige Vasodilatation beeinträchtigt (Stuhlinger et al. 2001; Holven et al. 2003). In einer weiteren Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Reduktion des Plasmaspiegels von ungebundenem Homocystein mit einer Verbesserung der Endothel-abhängigen Vasodilatation (Chambers et al. 2000). Diese Effekte scheinen auch in der hier vorliegenden Arbeit die gezeigte verbesserte Endothelfunktion zu bedingen.

Zusammengefasst lässt sich also sagen, dass Acetylcystein in den hier vorliegenden Untersuchungen den Plasma-Homocysteinspiegel vollständig normalisiert. Dies war signifikant assoziiert mit einer Verbesserung des Pulsdrucks und der Endothelfunktion, eine Senkung des Plasma-Homocysteinspiegels geht also offensichtlich mit einer Verbesserung der Endothelfunktion und einer hieraus folgenden Reduktion des Pulsdrucks einher. So lässt sich, bei aller Umstrittenheit der Bedeutung von Homocystein auf das kardiovaskuläre Risiko bei Patienten mit chronischer terminaler Niereninsuffizienz, in jedem Fall eine verbesserte Endothelfunktion nach Gabe von Acetylcystein nachweisen. Dies ist ein weiteres Indiz für die Bedeutung der Senkung des Plasma-Homocysteinspiegels bei Patienten mit chronischer terminaler Niereninsuffizienz.

Diese Effekte können die in früheren Publikationen (Sochman et al. 1990; Salom et al. 1998; Boaz et al. 2000; Tepel et al. 2003; Gordon und Himmelfarb 2004) beschriebenen positiven Auswirkungen von Acetylcystein auf die kardiovaskuläre Morbidität bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz erklären. Die intravenöse Gabe von Acetylcystein während der Hämodialyse könnte also eine neuartige, vielversprechende Herangehensweise bedeuten, das Arterioskleroserisiko bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz zu senken.

4.1 Ausblick

Da die beschriebenen Effekte miteinander in Wechselbeziehung zu stehen scheinen, sind weitere Studien mit unterschiedlichem Studiendesign zur Bestätigung der vorliegenden Ergebnisse und ihrer Bedeutung für die Behandlung von Patienten mit chronischer terminaler Niereninsuffizienz von Nöten. Hierbei muss, neben der Beobachtung eines größeren Patientenkollektives, auch untersucht werden, ob sich über einen längeren Zeitraum positive Effekte hervorrufen lassen und eine Verbesserung der Langzeitprognose bezüglich kardiovaskulärer Morbidität und Mortalität eintritt.

5 Zusammenfassung

Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz sind von einer erhöhten kardiovaskulären Morbidität und Mortalität betroffen. Dies ist auf ein Zusammenspiel verschiedener Risikofaktoren zurückzuführen. Zu den verbreiteten Komorbiditäten wie Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie und Dyslipidämie finden sich ein erhöhter Plasma-Homocysteinspiegel, ein erhöhter oxidativer Stress sowie eine eingeschränkte Endothelfunktion, die unter anderem in einer Verminderung des Pulsdrucks Ausdruck findet.

Eine Verminderung der kardiovaskulären Morbidität und Mortalität durch Acetylcystein konnte bereits gezeigt werden. Acetylcystein ist als Antioxidant bekannt und wird in der Prävention kontrastmittelinduzierter Nephropathie eingesetzt. Auch scheint Acetylcystein durch eine Stabilisierung von Stickoxid vasodilatierend zu wirken.

In der vorliegenden Arbeit sollte überprüft werden, inwieweit durch die intravenöse Applikation von Acetylcystein die Endothelfunktion verbessert sowie der Plasma-Homocysteinspiegel und die Bildung von intrazellulären reaktiven Sauerstoffradikalen in mononukleären Leukozyten beeinflusst wird. Hierzu wurde zwanzig Patienten in einer Placebo-kontrollierten Studie im Cross-over-Design während einer Hämodialysesitzung Acetylcystein intravenös mittels Spritzenpumpe appliziert. Vor und nach Dialyse wurden neben anderen Parametern der Plasma-Homocysteinspiegel und der Pulsdruck ermittelt. Die Produktion intrazellulärer reaktiver Sauerstoffradikale wurde im Fluoreszenz-Photospektrometer unter Verwendung von DCFDA und mittels Lucigenin-Chemolumineszenz gemessen. Des Weiteren wurde vor und nach Dialyse eine Messung der Endothelfunktion mittels Fingerphotoplethysmographie vorgenommen.

Der Plasma-Homocysteinspiegel konnte durch intravenöse Gabe von Acetylcystein während einer Hämodialyse auf $12 \pm 7\%$ des Ausgangswertes abgesenkt werden. Dies stellte gegenüber $58 \pm 22\%$ des Ausgangswertes unter Kontrollbedingungen eine signifikante Verbesserung dar ($p < 0,01$). Bei der Bildung von intrazellulären reaktiven Sauerstoffradikalen in mononukleären Leukozyten zeigte sich keine Veränderung.

Der Pulsdruck konnte unter Acetylcysteingabe ebenfalls signifikant verbessert werden. Während er unter Kontrollbedingungen leicht anstieg, konnte unter Acetylcystein ein Absinken von 86 ± 4 mmHg zu Beginn auf 75 ± 5 mmHg am Ende der Hämodialysesitzung gemessen werden ($p < 0,05$).

Es zeigte sich außerdem ein Zusammenhang von einer Senkung des Plasma-Homocysteinspiegels und den verbesserten Pulsdruckwerten. So ging ein Absinken des Plasma-Homocysteinspiegels um 10% mit einer Reduktion des Pulsdruck um 2,5 mmHg einher.

In der zweiten Ableitung des Fingerphotoplethysmogramms zeigte sich unter Acetylcysteingabe im Gegensatz zur Kontrolle ein Anstieg von ab- und ad-Quotienten, was einer verbesserten Endothelfunktion entspricht.

Die beobachteten Effekte können die bereits gezeigten positiven Auswirkungen von Acetylcystein auf die kardiovaskuläre Morbidität bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz teilweise erklären. Die intravenöse Gabe von Acetylcystein während der Hämodialyse könnte also neue Perspektiven eröffnen, das Arterioskleroserisiko bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz zu senken und Einfluss auf ihre kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität zu nehmen.

6 Literatur

- Aguilar, B., J. C. Rojas and M. T. Collados "Metabolism of homocysteine and its relationship with cardiovascular disease." *J Thromb Thrombolysis*. 2004; 18(2):75-87.
- Allegra, L., N. E. Moavero and C. Rampoldi "Ozone-induced impairment of mucociliary transport and its prevention with N-acetylcysteine." *Am J Med*. 1991; 91(3C):67S-71S.
- Amann, K., C. Wanner and E. Ritz "Cross-talk between the kidney and the cardiovascular system." *J Am Soc Nephrol*. 2006; 17(8):2112-9.
- Anavekar, N. S. and M. A. Pfeffer "Cardiovascular risk in chronic kidney disease." *Kidney Int Suppl*. 2004;(92):S11-5.
- Anwar, W., J. L. Gueant, I. Abdelmouttaleb, C. Adjalla, P. Gerard, G. Lemoel, N. Erraess, A. Moutabarrek and F. Namour "Hyperhomocysteinemia is related to residual glomerular filtration and folate, but not to methylenetetrahydrofolate-reductase and methionine synthase polymorphisms, in supplemented end-stage renal disease patients undergoing hemodialysis." *Clin Chem Lab Med*. 2001; 39(8):747-52.
- Archer, S. L., J. M. Huang, V. Hampl, D. P. Nelson, P. J. Shultz and E. K. Weir "Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase." *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91(16):7583-7.
- Arnadottir, M., A. L. Berg, J. Hegbrant and B. Hultberg "Influence of haemodialysis on plasma total homocysteine concentration." *Nephrol Dial Transplant*. 1999; 14(1):142-6.
- Arnadottir, M., K. Wingren, B. Hultberg and J. Hegbrant "The postdialytic rise in the plasma total homocysteine concentration is delayed." *Blood Purif*. 2002; 20(4):334-7.
- Aruoma, O. I., B. Halliwell, B. M. Hoey and J. Butler "The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid." *Free Radic Biol Med*. 1989; 6(6):593-7.
- Bachmann, J., M. Tepel, H. Raidt, R. Riezler, U. Graefe, K. Langer and W. Zidek "Hyperhomocysteinemia and the risk for vascular disease in hemodialysis patients." *J Am Soc Nephrol*. 1995; 6(1):121-5.
- Barry-Lane, P. A., C. Patterson, M. van der Merwe, Z. Hu, S. M. Holland, E. T. Yeh and M. S. Runge "p47phox is required for atherosclerotic lesion progression in ApoE(-/-) mice." *J Clin Invest*. 2001; 108(10):1513-22.

- Bayraktutan, U., N. Draper, D. Lang and A. M. Shah "Expression of functional neutrophil-type NADPH oxidase in cultured rat coronary microvascular endothelial cells." *Cardiovasc Res.* 1998; 38(1):256-62.
- Bhunia, A. K., T. Arai, G. Bulkley and S. Chatterjee "Lactosylceramide mediates tumor necrosis factor-alpha-induced intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and the adhesion of neutrophil in human umbilical vein endothelial cells." *J Biol Chem.* 1998; 273(51):34349-57.
- Biasioli, S., R. Schiavon, L. Petrosino, L. Cavallini, G. Cavalcanti and E. De Fanti "Dialysis kinetics of homocysteine and reactive oxygen species." *Asaio J.* 1998; 44(5):M423-32.
- Bird, A. "DNA methylation patterns and epigenetic memory." *Genes Dev.* 2002; 16(1):6-21.
- Blanchard, T., R. Bailey, M. Holland and D. Mabey "Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis." *Lancet.* 1993; 341(8848):825.
- Boaz, M., S. Smetana, T. Weinstein, Z. Matas, U. Gafter, A. Iaina, A. Knecht, Y. Weissgarten, D. Brunner, M. Fainaru and M. S. Green "Secondary prevention with antioxidants of cardiovascular disease in endstage renal disease (SPACE): randomised placebo-controlled trial." *Lancet.* 2000; 356(9237):1213-8.
- Boesgaard, S., J. Aldershvile, H. E. Poulsen, S. Christensen, H. Dige-Petersen and J. Giese "N-acetylcysteine inhibits angiotensin converting enzyme in vivo." *J Pharmacol Exp Ther.* 1993; 265(3):1239-44.
- Bombeli, T., M. Mueller and A. Haeberli "Anticoagulant properties of the vascular endothelium." *Thromb Haemost.* 1997; 77(3):408-23.
- Bonetti, P. O., L. O. Lerman and A. Lerman "Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk." *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23(2):168-75.
- Borgstrom, L., B. Kagedal and O. Paulsen "Pharmacokinetics of N-acetylcysteine in man." *Eur J Clin Pharmacol.* 1986; 31(2):217-22.
- Bostom, A. G., D. Shemin, D. Yoburn, D. H. Fisher, M. R. Nadeau and J. Selhub "Lack of effect of oral N-acetylcysteine on the acute dialysis-related lowering of total plasma homocysteine in hemodialysis patients." *Atherosclerosis.* 1996; 120(1-2):241-4.
- Boushey, C. J., S. A. Beresford, G. S. Omenn and A. G. Motulsky "A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes." *Jama.* 1995; 274(13):1049-57.
- Bridgeman, M. M., M. Marsden, W. MacNee, D. C. Flenley and A. P. Ryle "Cysteine and glutathione concentrations in plasma and bronchoalveolar lavage fluid after treatment with N-acetylcysteine." *Thorax.* 1991; 46(1):39-42.

- Brunetti, M., L. Terracina, M. Timio, P. Saronio and E. Capodicasa "Plasma sulfate concentration and hyperhomocysteinemia in hemodialysis patients." *J Nephrol.* 2001; 14(1):27-31.
- Cai, H. and D. G. Harrison "Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress." *Circ Res.* 2000; 87(10):840-4.
- Carluccio, F., W. Siems, G. Stefanelli, O. Sommerburg, T. Grune, E. Riedel and H. Hampl "Homocysteine in chronic renal failure in relation to renal anemia and to oxidative stress parameters 4-hydroxynonenal and malondialdehyde." *Clin Nephrol.* 2002; 58 Suppl 1:S26-30.
- Celermajer, D. S., K. E. Sorensen, V. M. Gooch, D. J. Spiegelhalter, O. I. Miller, I. D. Sullivan, J. K. Lloyd and J. E. Deanfield "Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis." *Lancet.* 1992; 340(8828):1111-5.
- Chambers, J. C., P. M. Ueland, O. A. Obeid, J. Wrigley, H. Refsum and J. S. Kooner "Improved vascular endothelial function after oral B vitamins: An effect mediated through reduced concentrations of free plasma homocysteine." *Circulation.* 2000; 102(20):2479-83.
- Chatzizisis, Y. S., A. U. Coskun, M. Jonas, E. R. Edelman, P. H. Stone and C. L. Feldman "Risk stratification of individual coronary lesions using local endothelial shear stress: a new paradigm for managing coronary artery disease." *Curr Opin Cardiol.* 2007; 22(6):552-64.
- Chowienczyk, P. J., R. P. Kelly, H. MacCallum, S. C. Millasseau, T. L. Andersson, R. G. Gosling, J. M. Ritter and E. E. Anggard "Photoplethysmographic assessment of pulse wave reflection: blunted response to endothelium-dependent beta2-adrenergic vasodilation in type II diabetes mellitus." *J Am Coll Cardiol.* 1999; 34(7):2007-14.
- Chuang, F. R., J. T. Fang, J. B. Chen, C. L. Lin, H. Y. Chen, C. N. Lee, P. H. Wang and C. H. Lee "Hyperhomocysteinemia and the prevalence of symptomatic atherosclerotic vascular disease in Taiwanese chronic hemodialysis patients: a retrospective study." *Ren Fail.* 2003; 25(5):765-74.
- Cines, D. B., E. S. Pollak, C. A. Buck, J. Loscalzo, G. A. Zimmerman, R. P. McEver, J. S. Pober, T. M. Wick, B. A. Konkle, B. S. Schwartz, E. S. Barnathan, K. R. McCrae, B. A. Hug, A. M. Schmidt and D. M. Stern "Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders." *Blood.* 1998; 91(10):3527-61.
- Clarke, R. "Homocysteine and cardiovascular disease. Overview." *J Cardiovasc Risk.* 1998; 5(4):213-5.
- Conesa, E. L., F. Valero, J. C. Nadal, F. J. Fenoy, B. Lopez, B. Arregui and M. G. Salom "N-acetyl-L-cysteine improves renal medullary hypoperfusion in acute renal failure." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2001; 281(3):R730-7.

- Corretti, M. C., T. J. Anderson, E. J. Benjamin, D. Celermajer, F. Charbonneau, M. A. Creager, J. Deanfield, H. Drexler, M. Gerhard-Herman, D. Herrington, P. Vallance, J. Vita and R. Vogel "Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force." *J Am Coll Cardiol*. 2002; 39(2):257-65.
- D'Angelo, A. and J. Selhub "Homocysteine and thrombotic disease." *Blood*. 1997; 90(1):1-11.
- Daugirdas, J. T. "Second generation logarithmic estimates of single-pool variable volume Kt/V: an analysis of error." *J Am Soc Nephrol*. 1993; 4(5):1205-13.
- Davis, K. R., H. Pearson, S. Moat, J. R. Bonham and R. Donnelly "Acute hyperhomocysteinaemia affects pulse pressure but not microvascular vasodilator function." *Br J Clin Pharmacol*. 2001; 52(3):327-32.
- De Keulenaer, G. W., D. C. Chappell, N. Ishizaka, R. M. Nerem, R. W. Alexander and K. K. Griendling "Oscillatory and steady laminar shear stress differentially affect human endothelial redox state: role of a superoxide-producing NADH oxidase." *Circ Res*. 1998; 82(10):1094-101.
- Dennis, V. W., S. Nurko and K. Robinson "Hyperhomocysteinemia: detection, risk assessment, and treatment." *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 1997; 6(5):483-8.
- Dhalla, N. S., R. M. Temsah and T. Netticadan "Role of oxidative stress in cardiovascular diseases." *J Hypertens*. 2000; 18(6):655-73.
- Dierkes, J., U. Domrose, S. Westphal, A. Ambrosch, H. P. Bosselmann, K. H. Neumann and C. Luley "Cardiac troponin T predicts mortality in patients with end-stage renal disease." *Circulation*. 2000; 102(16):1964-9.
- Doshi, S. N., K. K. Naka, N. Payne, C. J. Jones, M. Ashton, M. J. Lewis and J. Goodfellow "Flow-mediated dilatation following wrist and upper arm occlusion in humans: the contribution of nitric oxide." *Clin Sci (Lond)*. 2001; 101(6):629-35.
- Drager, L. F., L. Andrade, J. F. Barros de Toledo, F. R. Laurindo, L. A. Machado Cesar and A. C. Seguro "Renal effects of N-acetylcysteine in patients at risk for contrast nephropathy: decrease in oxidant stress-mediated renal tubular injury." *Nephrol Dial Transplant*. 2004; 19(7):1803-7.
- Ducloux, D., A. Aboubakr, G. Motte, G. Toubin, V. Fournier, J. M. Chalopin, T. Druke and Z. A. Massy "Hyperhomocysteinaemia therapy in haemodialysis patients: folic acid versus folic acid in combination with vitamin B6 and B12." *Nephrol Dial Transplant*. 2002; 17(5):865-70.
- Ebbesen, L. S. "Hyperhomocysteinemia, thrombosis and vascular biology." *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2004; 50(8):917-30.

- Endemann, D. H. and E. L. Schiffrin "Endothelial dysfunction." *J Am Soc Nephrol.* 2004; 15(8):1983-92.
- Falk, R. J., D. T. Moore, S. L. Hogan and J. C. Jennette "A renal biopsy is essential for the management of ANCA-positive patients with glomerulonephritis." *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis.* 1996; 13(3):230-1.
- Fellah, H., M. Feki, M. Hsairi, H. Sanhaji, N. Kaabachi, T. Ben Abdallah, Z. A. Massy, H. Ben Maiz, B. Lacour and A. Mebazaa "Hyperhomocysteinemia and end-stage renal disease: determinants and association with cardiovascular disease in Tunisian patients." *Clin Chem Lab Med.* 2003; 41(5):675-80.
- Fish, R. D., E. G. Nabel, A. P. Selwyn, P. L. Ludmer, G. H. Mudge, J. M. Kirshenbaum, F. J. Schoen, R. W. Alexander and P. Ganz "Responses of coronary arteries of cardiac transplant patients to acetylcholine." *J Clin Invest.* 1988; 81(1):21-31.
- Fishbane, S., J. H. Durham, K. Marzo and M. Rudnick "N-acetylcysteine in the prevention of radiocontrast-induced nephropathy." *J Am Soc Nephrol.* 2004; 15(2):251-60.
- Foley, R. N., P. S. Parfrey, J. D. Harnett, G. M. Kent, D. C. Murray and P. E. Barre "The impact of anemia on cardiomyopathy, morbidity, and mortality in end-stage renal disease." *Am J Kidney Dis.* 1996; 28(1):53-61.
- Foley, R. N., P. S. Parfrey and M. J. Sarnak "Epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease." *J Am Soc Nephrol.* 1998; 9(12 Suppl):S16-23.
- Frei, U. and H.-J. Schober-Halstenberg "Nierenersatztherapie in Deutschland. QuaSi-Niere Jahresbericht 2006/2007." Berlin, Deutschland 2008. <http://www.quasi-niere.de/>
- Freiman, P. C., G. G. Mitchell, D. D. Heistad, M. L. Armstrong and D. G. Harrison "Atherosclerosis impairs endothelium-dependent vascular relaxation to acetylcholine and thrombin in primates." *Circ Res.* 1986; 58(6):783-9.
- Friedman, J., E. Peleg, T. Kagan, S. Shnizer and T. Rosenthal "Oxidative stress in hypertensive, diabetic, and diabetic hypertensive rats." *Am J Hypertens.* 2003; 16(12):1049-52.
- Fujihara, C. K., G. De Nucci and R. Zatz "Chronic nitric oxide synthase inhibition aggravates glomerular injury in rats with subtotal nephrectomy." *J Am Soc Nephrol.* 1995; 5(7):1498-507.
- Fukui, M., Y. Qiao, F. Guo and G. Asano "Cell damage and liberation of nitric oxide synthase in rat heart induced by endotoxin administration." *Nippon Ika Daigaku Zasshi.* 1995; 62(5):469-81.
- Gimbrone, M. A., Jr. "Atherogenesis: current concepts." *Monogr Pathol.* 1995; 37:1-11.

- Girouard, H., C. Chulak, L. Wu, M. Lejossec and J. de Champlain "N-acetylcysteine improves nitric oxide and alpha-adrenergic pathways in mesenteric beds of spontaneously hypertensive rats." *Am J Hypertens*. 2003; 16(7):577-84.
- Glagov, S., E. Weisenberg, C. K. Zarins, R. Stankunavicius and G. J. Kolettis "Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries." *N Engl J Med*. 1987; 316(22):1371-5.
- Golino, P., F. Piscione, J. T. Willerson, M. Cappelli-Bigazzi, A. Focaccio, B. Villari, C. Indolfi, E. Russolillo, M. Condorelli and M. Chiariello "Divergent effects of serotonin on coronary-artery dimensions and blood flow in patients with coronary atherosclerosis and control patients." *N Engl J Med*. 1991; 324(10):641-8.
- Gordon, C. A. and J. Himmelfarb "Antioxidant therapy in uremia: evidence-based medicine?" *Semin Dial*. 2004; 17(5):327-32.
- Govers, R. and T. J. Rabelink "Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase." *Am J Physiol Renal Physiol*. 2001; 280(2):F193-206.
- Graham, I. M., L. E. Daly, H. M. Refsum, K. Robinson, L. E. Brattstrom, P. M. Ueland, R. J. Palma-Reis, G. H. Boers, R. G. Sheahan, B. Israelsson, C. S. Uiterwaal, R. Meleady, D. McMaster, P. Verhoef, J. Witteman, P. Rubba, H. Bellet, J. C. Wautrecht, H. W. de Valk, A. C. Sales Luis, F. M. Parrot-Rouland, K. S. Tan, I. Higgins, D. Garcon, G. Andria and et al. "Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. The European Concerted Action Project." *Jama*. 1997; 277(22):1775-81.
- Gress, T. W., F. J. Nieto, E. Shahar, M. R. Wofford and F. L. Brancati "Hypertension and antihypertensive therapy as risk factors for type 2 diabetes mellitus. Atherosclerosis Risk in Communities Study." *N Engl J Med*. 2000; 342(13):905-12.
- Griendling, K. K., C. A. Minieri, J. D. Ollerenshaw and R. W. Alexander "Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells." *Circ Res*. 1994; 74(6):1141-8.
- Griendling, K. K. and M. Ushio-Fukai "Redox control of vascular smooth muscle proliferation." *J Lab Clin Med*. 1998; 132(1):9-15.
- Guttormsen, A. B., P. M. Ueland, E. Svarstad and H. Refsum "Kinetic basis of hyperhomocysteinemia in patients with chronic renal failure." *Kidney Int*. 1997; 52(2):495-502.
- Guyton, A. C. and T. G. Coleman "Quantitative analysis of the pathophysiology of hypertension. 1969." *J Am Soc Nephrol*. 1999; 10(10):2248-58.
- Hajjar, K. A. "Homocysteine: a sulph'rous fire." *J Clin Invest*. 2001; 107(6):663-4.
- Harada, D., S. Naito, Y. Kawauchi, K. Ishikawa, O. Koshitani, I. Hiraoka and M. Otagiri "Determination of reduced, protein-unbound, and total concentrations of N-

- acetyl-L-cysteine and L-cysteine in rat plasma by postcolumn ligand substitution high-performance liquid chromatography." *Anal Biochem.* 2001; 290(2):251-9.
- Harrison, D. G. "Endothelial function and oxidant stress." *Clin Cardiol.* 1997; 20(11 Suppl 2):II-11-7.
- Herrmann, W., H. Schorr, J. Geisel and W. Riegel "Homocysteine, cystathionine, methylmalonic acid and B-vitamins in patients with renal disease." *Clin Chem Lab Med.* 2001; 39(8):739-46.
- Herzog, C. A., J. Z. Ma and A. J. Collins "Poor long-term survival after acute myocardial infarction among patients on long-term dialysis." *N Engl J Med.* 1998; 339(12):799-805.
- Himmelfarb, J., E. McMenamin and E. McMonagle "Plasma aminothiols oxidation in chronic hemodialysis patients." *Kidney Int.* 2002; 61(2):705-16.
- Himmelfarb, J., P. Stenvinkel, T. A. Ikizler and R. M. Hakim "The elephant in uremia: oxidant stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia." *Kidney Int.* 2002; 62(5):1524-38.
- Holt, S., D. Goodier, R. Marley, D. Patch, A. Burroughs, B. Fernando, D. Harry and K. Moore "Improvement in renal function in hepatorenal syndrome with N-acetylcysteine." *Lancet.* 1999; 353(9149):294-5.
- Holven, K. B., T. S. Haugstad, T. Holm, P. Aukrust, L. Ose and M. S. Nenseter "Folic acid treatment reduces elevated plasma levels of asymmetric dimethylarginine in hyperhomocysteinaemic subjects." *Br J Nutr.* 2003; 89(3):359-63.
- Ingrosso, D., A. Cimmino, A. F. Perna, L. Masella, N. G. De Santo, M. L. De Bonis, M. Vacca, M. D'Esposito, M. D'Urso, P. Galletti and V. Zappia "Folate treatment and unbalanced methylation and changes of allelic expression induced by hyperhomocysteinaemia in patients with uraemia." *Lancet.* 2003; 361(9370):1693-9.
- Irani, K. and P. J. Goldschmidt-Clermont "Ras, superoxide and signal transduction." *Biochem Pharmacol.* 1998; 55(9):1339-46.
- Ivanovski, O., D. Szumilak, T. Nguyen-Khoa, N. Ruellan, O. Phan, B. Lacour, B. Descamps-Latscha, T. B. Drueke and Z. A. Massy "The antioxidant N-acetylcysteine prevents accelerated atherosclerosis in uremic apolipoprotein E knockout mice." *Kidney Int.* 2005; 67(6):2288-94.
- Jaggard, J. H., V. A. Porter, W. J. Lederer and M. T. Nelson "Calcium sparks in smooth muscle." *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000; 278(2):C235-56.
- Jayakody, R. L., M. P. Senaratne, A. B. Thomson and C. T. Kappagoda "Cholesterol feeding impairs endothelium-dependent relaxation of rabbit aorta." *Can J Physiol Pharmacol.* 1985; 63(9):1206-9.

- Joannides, R., W. E. Haefeli, L. Linder, V. Richard, E. H. Bakkali, C. Thuillez and T. F. Luscher "Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo." *Circulation*. 1995; 91(5):1314-9.
- Jofre, R., P. Rodriguez-Benitez, J. M. Lopez-Gomez and R. Perez-Garcia "Inflammatory syndrome in patients on hemodialysis." *J Am Soc Nephrol*. 2006; 17(12 Suppl 3):S274-80.
- Jonasson, L., J. Holm, O. Skalli, G. Bondjers and G. K. Hansson "Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque." *Arteriosclerosis*. 1986; 6(2):131-8.
- Kalantar-Zadeh, K., G. Block, M. H. Humphreys and J. D. Kopple "Reverse epidemiology of cardiovascular risk factors in maintenance dialysis patients." *Kidney Int*. 2003; 63(3):793-808.
- Kalantar-Zadeh, K., G. Block, M. H. Humphreys, C. J. McAllister and J. D. Kopple "A low, rather than a high, total plasma homocysteine is an indicator of poor outcome in hemodialysis patients." *J Am Soc Nephrol*. 2004; 15(2):442-53.
- Kelm, M., H. Preik-Steinhoff, M. Preik and B. E. Strauer "Serum nitrite sensitively reflects endothelial NO formation in human forearm vasculature: evidence for biochemical assessment of the endothelial L-arginine-NO pathway." *Cardiovasc Res*. 1999; 41(3):765-72.
- Kishida, K. T. and E. Klann "Sources and targets of reactive oxygen species in synaptic plasticity and memory." *Antioxid Redox Signal*. 2007; 9(2):233-44.
- Klassen, P. S., E. G. Lowrie, D. N. Reddan, E. R. DeLong, J. A. Coladonato, L. A. Szczech, J. M. Lazarus and W. F. Owen, Jr. "Association between pulse pressure and mortality in patients undergoing maintenance hemodialysis." *Jama*. 2002; 287(12):1548-55.
- Koepfen, M., R. Feil, D. Siegl, S. Feil, F. Hofmann, U. Pohl and C. de Wit "cGMP-dependent protein kinase mediates NO- but not acetylcholine-induced dilations in resistance vessels in vivo." *Hypertension*. 2004; 44(6):952-5.
- Koulouridis, E., M. Tzilianos, A. Katsarou, I. Costimba, E. Klonou, E. Panagiotaki, C. Georgalidis, A. Krokida, N. Delaportas, A. Lachanas, G. Karaliotas and I. Kaliolia "Homocysteine and C-reactive protein levels in haemodialysis patients." *Int Urol Nephrol*. 2001; 33(2):207-15.
- Kunjathoor, V. V., D. L. Wilson and R. C. LeBoeuf "Increased atherosclerosis in streptozotocin-induced diabetic mice." *J Clin Invest*. 1996; 97(7):1767-73.
- Laursen, J. B., S. Rajagopalan, Z. Galis, M. Tarpey, B. A. Freeman and D. G. Harrison "Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension." *Circulation*. 1997; 95(3):588-93.

- Lee, V. M., P. A. Quinn, S. C. Jennings and L. L. Ng "Neutrophil activation and production of reactive oxygen species in pre-eclampsia." *J Hypertens*. 2003; 21(2):395-402.
- Levine, G. N., B. Frei, S. N. Koulouris, M. D. Gerhard, J. F. Keaney, Jr. and J. A. Vita "Ascorbic acid reverses endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease." *Circulation*. 1996; 93(6):1107-13.
- Libby, P., Y. J. Geng, M. Aikawa, U. Schoenbeck, F. Mach, S. K. Clinton, G. K. Sukhova and R. T. Lee "Macrophages and atherosclerotic plaque stability." *Curr Opin Lipidol*. 1996; 7(5):330-5.
- Lim, U. and P. A. Cassano "Homocysteine and blood pressure in the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994." *Am J Epidemiol*. 2002; 156(12):1105-13.
- Livant, E. J., T. Tamura, K. E. Johnston, W. H. Vaughn, S. M. Bergman, J. Forehand and J. Walthaw "Plasma folate conjugase activities and folate concentrations in patients receiving hemodialysis." *J nutr biochem*. 1994; 5(10):504-50.
- Locatelli, F., D. Marcelli, F. Conte, M. D'Amico, L. Del Vecchio, A. Limido, F. Malberti and D. Spotti "Cardiovascular disease in chronic renal failure: the challenge continues. Registro Lombardo Dialisi e Trapianto." *Nephrol Dial Transplant*. 2000; 15 Suppl 5:69-80.
- London, G. M., S. J. Marchais, A. P. Guerin and F. Metivier "Arteriosclerosis, vascular calcifications and cardiovascular disease in uremia." *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2005; 14(6):525-31.
- Loscalzo, J. "N-Acetylcysteine potentiates inhibition of platelet aggregation by nitroglycerin." *J Clin Invest*. 1985; 76(2):703-8.
- Loscalzo, J. "The oxidant stress of hyperhomocyst(e)inemia." *J Clin Invest*. 1996; 98(1):5-7.
- Loscalzo, J. "Homocysteine trials--clear outcomes for complex reasons." *N Engl J Med*. 2006; 354(15):1629-32.
- Ludmer, P. L., A. P. Selwyn, T. L. Shook, R. R. Wayne, G. H. Mudge, R. W. Alexander and P. Ganz "Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries." *N Engl J Med*. 1986; 315(17):1046-51.
- Mant, T. G., J. H. Tempowski, G. N. Volans and J. C. Talbot "Adverse reactions to acetylcysteine and effects of overdose." *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1984; 289(6439):217-9.
- Marchais, S. J., A. P. Guerin, B. Pannier, G. Delavaud and G. M. London "Arterial compliance and blood pressure." *Drugs*. 1993; 46 Suppl 2:82-7.

- Marumo, T., V. B. Schini-Kerth, B. Fisslthaler and R. Busse "Platelet-derived growth factor-stimulated superoxide anion production modulates activation of transcription factor NF-kappaB and expression of monocyte chemoattractant protein 1 in human aortic smooth muscle cells." *Circulation*. 1997; 96(7):2361-7.
- McCully, K. S. "Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis." *Am J Pathol*. 1969; 56(1):111-28.
- Meier, B., A. R. Cross, J. T. Hancock, F. J. Kaup and O. T. Jones "Identification of a superoxide-generating NADPH oxidase system in human fibroblasts." *Biochem J*. 1991; 275 (Pt 1):241-5.
- Millasseau, S. C., F. G. Guigui, R. P. Kelly, K. Prasad, J. R. Cockcroft, J. M. Ritter and P. J. Chowienczyk "Noninvasive assessment of the digital volume pulse. Comparison with the peripheral pressure pulse." *Hypertension*. 2000; 36(6):952-6.
- Minor, R. L., Jr., P. R. Myers, R. Guerra, Jr., J. N. Bates and D. G. Harrison "Diet-induced atherosclerosis increases the release of nitrogen oxides from rabbit aorta." *J Clin Invest*. 1990; 86(6):2109-16.
- Moens, A. L., I. Goovaerts, M. J. Claeys and C. J. Vrints "Flow-mediated vasodilation: a diagnostic instrument, or an experimental tool?" *Chest*. 2005; 127(6):2254-63.
- Mohazzab, K. M., P. M. Kaminski and M. S. Wolin "NADH oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary artery endothelium." *Am J Physiol*. 1994; 266(6 Pt 2):H2568-72.
- Moldeus, P. and I. A. Cotgreave "N-acetylcysteine." *Methods Enzymol*. 1994; 234:482-92.
- Moncada, S. and E. A. Higgs "Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance." *Eur J Clin Invest*. 1991; 21(4):361-74.
- Moustapha, A., A. Naso, M. Nahlawi, A. Gupta, K. L. Arheart, D. W. Jacobsen, K. Robinson and V. W. Dennis "Prospective study of hyperhomocysteinemia as an adverse cardiovascular risk factor in end-stage renal disease." *Circulation*. 1998; 97(2):138-41.
- Moustapha, A., D. B. Ross, B. Bittira, D. Van-Velzen, V. C. McAlister, C. L. Lannon and T. D. Lee "Aortic valve grafts in the rat: evidence for rejection." *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1997; 114(6):891-902.
- Nakanishi, T., Y. Otaki, Y. Hasuike, M. Nanami, R. Itahana, K. Miyagawa, H. Nishikage, M. Izumi and Y. Takamitsu "Association of hyperhomocysteinemia with plasma sulfate and urine sulfate excretion in patients with progressive renal disease." *Am J Kidney Dis*. 2002; 40(5):909-15.

- Nakano, H., K. Boudjema, E. Alexandre, P. Imbs, M. P. Chenard, P. Wolf, J. Cinqualbre and D. Jaeck "Protective effects of N-acetylcysteine on hypothermic ischemia-reperfusion injury of rat liver." *Hepatology*. 1995; 22(2):539-45.
- Napoli, C. "Low density lipoprotein oxidation and atherogenesis: from experimental models to clinical studies." *G Ital Cardiol*. 1997; 27(12):1302-14.
- Nygaard, O., J. E. Nordrehaug, H. Refsum, P. M. Ueland, M. Farstad and S. E. Vollset "Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease." *N Engl J Med*. 1997; 337(4):230-6.
- Ohara, Y., T. E. Peterson and D. G. Harrison "Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production." *J Clin Invest*. 1993; 91(6):2546-51.
- Olsson, B., M. Johansson, J. Gabrielsson and P. Bolme "Pharmacokinetics and bioavailability of reduced and oxidized N-acetylcysteine." *Eur J Clin Pharmacol*. 1988; 34(1):77-82.
- Pagano, P. J., S. J. Chanock, D. A. Siwik, W. S. Colucci and J. K. Clark "Angiotensin II induces p67phox mRNA expression and NADPH oxidase superoxide generation in rabbit aortic adventitial fibroblasts." *Hypertension*. 1998; 32(2):331-7.
- Pagano, P. J., Y. Ito, K. Tornheim, P. M. Gallop, A. I. Tauber and R. A. Cohen "An NADPH oxidase superoxide-generating system in the rabbit aorta." *Am J Physiol*. 1995; 268(6 Pt 2):H2274-80.
- Parfrey, P. S. "Cardiac disease in dialysis patients: diagnosis, burden of disease, prognosis, risk factors and management." *Nephrol Dial Transplant*. 2000; 15 Suppl 5:58-68.
- Parfrey, P. S. and R. N. Foley "The clinical epidemiology of cardiac disease in chronic renal failure." *J Am Soc Nephrol*. 1999; 10(7):1606-15.
- Passauer, J., F. Pistrosch and E. Bussemaker "Nitric oxide in chronic renal failure." *Kidney Int*. 2005; 67(5):1665-7.
- Pastor, A., P. S. Collado, M. Almar and J. Gonzalez-Gallego "Antioxidant enzyme status in biliary obstructed rats: effects of N-acetylcysteine." *J Hepatol*. 1997; 27(2):363-70.
- Perna, A. F., F. Acanfora, E. Satta, C. Lombardi, D. Ingrosso and N. G. De Santo "Hyperhomocysteinemia and cardiovascular disease in uremia: the newest evidence in epidemiology and mechanisms of action." *Semin Nephrol*. 2004; 24(5):426-30.
- Perna, A. F., P. Castaldo, D. Ingrosso and N. G. De Santo "Homocysteine, a new cardiovascular risk factor, is also a powerful uremic toxin." *J Nephrol*. 1999; 12(4):230-40.

- Pyke, K. E. and M. E. Tschakovsky "The relationship between shear stress and flow-mediated dilatation: implications for the assessment of endothelial function." *J Physiol*. 2005; 568(Pt 2):357-69.
- Radeke, H. H., A. R. Cross, J. T. Hancock, O. T. Jones, M. Nakamura, V. Kaefer and K. Resch "Functional expression of NADPH oxidase components (alpha- and beta-subunits of cytochrome b558 and 45-kDa flavoprotein) by intrinsic human glomerular mesangial cells." *J Biol Chem*. 1991; 266(31):21025-9.
- Raines, E. W. and R. Ross "Multiple growth factors are associated with lesions of atherosclerosis: specificity or redundancy?" *Bioessays*. 1996; 18(4):271-82.
- Rajagopalan, S., S. Kurz, T. Munzel, M. Tarpey, B. A. Freeman, K. K. Griendling and D. G. Harrison "Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone." *J Clin Invest*. 1996; 97(8):1916-23.
- Rajagopalan, S., X. P. Meng, S. Ramasamy, D. G. Harrison and Z. S. Galis "Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability." *J Clin Invest*. 1996; 98(11):2572-9.
- Ray, J. G. and D. T. Harvey "Hyperhomocysteinemia as a cause of premature stroke in a young patient." *Arch Phys Med Rehabil*. 1998; 79(3):343-5.
- Reed, D. J. "Glutathione: toxicological implications." *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1990; 30:603-31.
- Refsum, H., P. M. Ueland, O. Nygard and S. E. Vollset "Homocysteine and cardiovascular disease." *Annu Rev Med*. 1998; 49:31-62.
- Roes, E. M., M. T. Raijmakers, W. H. Peters and E. A. Steegers "Effects of oral N-acetylcysteine on plasma homocysteine and whole blood glutathione levels in healthy, non-pregnant women." *Clin Chem Lab Med*. 2002; 40(5):496-8.
- Ross, R. "Atherosclerosis is an inflammatory disease." *Am Heart J*. 1999; 138(5 Pt 2):S419-20.
- Rubanyi, G. M. "The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and diseases." *J Cardiovasc Pharmacol*. 1993; 22 Suppl 4:S1-14.
- Rubanyi, G. M. and P. M. Vanhoutte "Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor." *Am J Physiol*. 1986; 250(5 Pt 2):H822-7.
- Sachais, B. S. "Platelet-endothelial interactions in atherosclerosis." *Curr Atheroscler Rep*. 2001; 3(5):412-6.
- Safar, H., J. J. Mourad, M. Safar and J. Blacher "Aortic pulse wave velocity, an independent marker of cardiovascular risk." *Arch Mal Coeur Vaiss*. 2002; 95(12):1215-8.

- Salom, M. G., P. Ramirez, L. F. Carbonell, E. Lopez Conesa, J. Cartagena, T. Quesada, P. Parrilla and F. J. Fenoy "Protective effect of N-acetyl-L-cysteine on the renal failure induced by inferior vena cava occlusion." *Transplantation*. 1998; 65(10):1315-21.
- Sausbier, M., R. Schubert, V. Voigt, C. Hirneiss, A. Pfeifer, M. Korth, T. Kleppisch, P. Ruth and F. Hofmann "Mechanisms of NO/cGMP-dependent vasorelaxation." *Circ Res*. 2000; 87(9):825-30.
- Scaduto, R. C., Jr., V. H. Gattone, 2nd, L. F. Martin and H. C. Yang "Elevation of renal glutathione enhances ischemic injury." *Ren Physiol Biochem*. 1991; 14(6):259-70.
- Schiffrin, E. L. "Remodeling of resistance arteries in essential hypertension and effects of antihypertensive treatment." *Am J Hypertens*. 2004; 17(12 Pt 1):1192-200.
- Schiffrin, E. L., M. L. Lipman and J. F. Mann "Chronic kidney disease: effects on the cardiovascular system." *Circulation*. 2007; 116(1):85-97.
- Schlossmann, J., A. Ammendola, K. Ashman, X. Zong, A. Huber, G. Neubauer, G. X. Wang, H. D. Allescher, M. Korth, M. Wilm, F. Hofmann and P. Ruth "Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase Ibeta." *Nature*. 2000; 404(6774):197-201.
- Selhub, J., P. F. Jacques, A. G. Bostom, R. B. D'Agostino, P. W. Wilson, A. J. Belanger, D. H. O'Leary, P. A. Wolf, E. J. Schaefer and I. H. Rosenberg "Association between plasma homocysteine concentrations and extracranial carotid-artery stenosis." *N Engl J Med*. 1995; 332(5):286-91.
- Shan, X. Q., T. Y. Aw and D. P. Jones "Glutathione-dependent protection against oxidative injury." *Pharmacol Ther*. 1990; 47(1):61-71.
- Sheffner, A. L. "The mucolytic action of acetylcysteine." *Tuberculo Thorac Dis*. 1966; 23(2):31-3.
- Skrzydowska, E. and R. Farbiszewski "Protective effect of N-acetylcysteine on reduced glutathione, reduced glutathione-related enzymes and lipid peroxidation in methanol intoxication." *Drug Alcohol Depend*. 1999; 57(1):61-7.
- Sochman, J., J. Kolc, M. Vrana and J. Fabian "Cardioprotective effects of N-acetylcysteine: the reduction in the extent of infarction and occurrence of reperfusion arrhythmias in the dog." *Int J Cardiol*. 1990; 28(2):191-6.
- Solzbach, U., B. Hornig, M. Jeserich and H. Just "Vitamin C improves endothelial dysfunction of epicardial coronary arteries in hypertensive patients." *Circulation*. 1997; 96(5):1513-9.
- Stam, F., C. van Guldener, A. Becker, J. M. Dekker, R. J. Heine, L. M. Bouter and C. D. Stehouwer "Endothelial dysfunction contributes to renal function-associated

- cardiovascular mortality in a population with mild renal insufficiency: the Hoorn study." *J Am Soc Nephrol*. 2006; 17(2):537-45.
- Stary, H. C., A. B. Chandler, R. E. Dinsmore, V. Fuster, S. Glagov, W. Insull, Jr., M. E. Rosenfeld, C. J. Schwartz, W. D. Wagner and R. W. Wissler "A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association." *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995; 15(9):1512-31.
- Stary, H. C., A. B. Chandler, S. Glagov, J. R. Guyton, W. Insull, Jr., M. E. Rosenfeld, S. A. Schaffer, C. J. Schwartz, W. D. Wagner and R. W. Wissler "A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association." *Circulation*. 1994; 89(5):2462-78.
- Statistisches Bundesamt "Gesundheitsberichterstattung des Bundes - Gesundheit in Deutschland." 2006. <http://www.gbe-bund.de/>
- Stehouwer, C. D. "Endothelial dysfunction in diabetic nephropathy: state of the art and potential significance for non-diabetic renal disease." *Nephrol Dial Transplant*. 2004; 19(4):778-81.
- Stehouwer, C. D., J. Lambert, A. J. Donker and V. W. van Hinsbergh "Endothelial dysfunction and pathogenesis of diabetic angiopathy." *Cardiovasc Res*. 1997; 34(1):55-68.
- Stehouwer, C. D. and Y. M. Smulders "Microalbuminuria and risk for cardiovascular disease: Analysis of potential mechanisms." *J Am Soc Nephrol*. 2006; 17(8):2106-11.
- Stryer, L. *Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin Oxford 2003.
- Stuhlinger, M. C., P. S. Tsao, J. H. Her, M. Kimoto, R. F. Balint and J. P. Cooke "Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine." *Circulation*. 2001; 104(21):2569-75.
- Suh, Y. A., R. S. Arnold, B. Lassegue, J. Shi, X. Xu, D. Sorescu, A. B. Chung, K. K. Griendling and J. D. Lambeth "Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1." *Nature*. 1999; 401(6748):79-82.
- Suliman, M., P. Stenvinkel, A. R. Qureshi, K. Kalantar-Zadeh, P. Barany, O. Heimbürger, E. F. Vonesh and B. Lindholm "The reverse epidemiology of plasma total homocysteine as a mortality risk factor is related to the impact of wasting and inflammation." *Nephrol Dial Transplant*. 2007; 22(1):209-17.
- Sunder-Plassmann, G., M. Fodinger, H. Buchmayer, M. Papagiannopoulos, J. Wojcik, J. Kletzmayer, B. Enzenberger, O. Janata, W. C. Winkelmayr, G. Paul, M. Auinger, U. Barnas and W. H. Horl "Effect of high dose folic acid therapy on

- hyperhomocysteinemia in hemodialysis patients: results of the Vienna multicenter study." *J Am Soc Nephrol*. 2000; 11(6):1106-16.
- Sunder-Plassmann, G., W. C. Winkelmayr and M. Fodinger "Therapeutic potential of total homocysteine-lowering drugs on cardiovascular disease." *Expert Opin Investig Drugs*. 2000; 9(11):2637-51.
- Sunder-Plassmann, G., W. C. Winkelmayr and M. Fodinger "Approaching the end of the homocysteine hype?" *Am J Kidney Dis*. 2008; 51(4):549-53.
- Takazawa, K., N. Tanaka, M. Fujita, O. Matsuoka, T. Saiki, M. Aikawa, S. Tamura and C. Ibukiyama "Assessment of vasoactive agents and vascular aging by the second derivative of photoplethysmogram waveform." *Hypertension*. 1998; 32(2):365-70.
- Tepel, M., J. Bachmann, H. Schluter and W. Zidek "Diadenosine polyphosphate-induced increase in cytosolic free calcium in vascular smooth muscle cells." *J Hypertens*. 1995; 13(12 Pt 2):1686-8.
- Tepel, M., M. van der Giet, M. Statz, J. Jankowski and W. Zidek "The antioxidant acetylcysteine reduces cardiovascular events in patients with end-stage renal failure: a randomized, controlled trial." *Circulation*. 2003; 107(7):992-5.
- Tepel, M. and W. Zidek "Acetylcysteine and contrast media nephropathy." *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2002; 11(5):503-6.
- Ting, H. H., F. K. Timimi, K. S. Boles, S. J. Creager, P. Ganz and M. A. Creager "Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus." *J Clin Invest*. 1996; 97(1):22-8.
- Tonelli, M., N. Wiebe, B. Culleton, A. House, C. Rabbat, M. Fok, F. McAlister and A. X. Garg "Chronic kidney disease and mortality risk: a systematic review." *J Am Soc Nephrol*. 2006; 17(7):2034-47.
- Touyz, R. M. "Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance?" *Hypertension*. 2004; 44(3):248-52.
- Tozawa, M., K. Iseki, C. Iseki and S. Takishita "Pulse pressure and risk of total mortality and cardiovascular events in patients on chronic hemodialysis." *Kidney Int*. 2002; 61(2):717-26.
- Tsai, J. C., M. A. Perrella, M. Yoshizumi, C. M. Hsieh, E. Haber, R. Schlegel and M. E. Lee "Promotion of vascular smooth muscle cell growth by homocysteine: a link to atherosclerosis." *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91(14):6369-73.
- Ushio-Fukai, M., A. M. Zafari, T. Fukui, N. Ishizaka and K. K. Griendling "p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells." *J Biol Chem*. 1996; 271(38):23317-21.

- Van Tellingen, A., M. P. Grooteman, P. C. Bartels, J. Van Limbeek, C. Van Guldener, P. M. Wee and M. J. Nube "Long-term reduction of plasma homocysteine levels by super-flux dialyzers in hemodialysis patients." *Kidney Int.* 2001; 59(1):342-7.
- Vaziri, N. D. "Pathogenesis of lead-induced hypertension: role of oxidative stress." *J Hypertens Suppl.* 2002; 20(3):S15-20.
- Vaziri, N. D., F. Oveisi and Y. Ding "Role of increased oxygen free radical activity in the pathogenesis of uremic hypertension." *Kidney Int.* 1998; 53(6):1748-54.
- Ventura, P., R. Panini, M. C. Pasini, G. Scarpetta and G. Salvioli "N -Acetyl-cysteine reduces homocysteine plasma levels after single intravenous administration by increasing thiols urinary excretion." *Pharmacol Res.* 1999; 40(4):345-50.
- Vester, B. and K. Rasmussen "High performance liquid chromatography method for rapid and accurate determination of homocysteine in plasma and serum." *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 1991; 29(9):549-54.
- Wever, R., P. Boer, M. Hijmering, E. Stroes, M. Verhaar, J. Kastelein, K. Versluis, F. Lagerwerf, H. van Rijn, H. Koomans and T. Rabelink "Nitric oxide production is reduced in patients with chronic renal failure." *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19(5):1168-72.
- Zafari, A. M., M. Ushio-Fukai, M. Akers, Q. Yin, A. Shah, D. G. Harrison, W. R. Taylor and K. K. Griendling "Role of NADH/NADPH oxidase-derived H₂O₂ in angiotensin II-induced vascular hypertrophy." *Hypertension.* 1998; 32(3):488-95.
- Zeicher, A. M., H. Drexler, B. Saubier and H. Just "Endothelium-mediated coronary blood flow modulation in humans. Effects of age, atherosclerosis, hypercholesterolemia, and hypertension." *J Clin Invest.* 1993; 92(2):652-62.
- Zhang, R., J. Ma, M. Xia, H. Zhu and W. Ling "Mild hyperhomocysteinemia induced by feeding rats diets rich in methionine or deficient in folate promotes early atherosclerotic inflammatory processes." *J Nutr.* 2004; 134(4):825-30.
- Zulueta, J. J., F. S. Yu, I. A. Hertig, V. J. Thannickal and P. M. Hassoun "Release of hydrogen peroxide in response to hypoxia-reoxygenation: role of an NAD(P)H oxidase-like enzyme in endothelial cell plasma membrane." *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1995; 12(1):41-9.

7 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Martin Tepel, der es mir ermöglicht hat, die vorliegende Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen. Ich danke ihm für sein unermüdliches Engagement, seine Einführung in die Labortechniken und seine Geduld.

Herrn Dr. R. Riezler, Münster, danke ich für die Zusammenarbeit im Rahmen der Homocysteinmessungen.

Des weiteren danke ich Frau Dr. Alexandra Scholze für ihre Unterstützung, die kritische Durchsicht dieser Arbeit und viele hilfreiche Anmerkungen.

Auch allen Ärzten, Schwestern und Pflegern der Dialyse der Charité – Campus Benjamin Franklin –, unter ihnen ganz besonders PD Dr. Joachim Beige, heute Klinikum St. Georg, Leipzig, danke ich für ihre Unterstützung.

Mein Dank gilt ebenfalls Dr. Markus Tölle, der nie um ein aufmunterndes Wort verlegen war und mir auch in schwierigen Zeiten hilfreich und freundschaftlich zur Seite stand.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie danken, zuallererst meinen Eltern, die mich bis hierher auf meinem Lebensweg stets unterstützt und gefördert haben, und die es mir überhaupt erst ermöglicht haben, diese Arbeit zu erstellen.

Ich danke meinem Mann Georg für seine Geduld, seinen Zuspruch, sein Interesse und seine konstruktive Kritik, mit denen er entscheidend zu dieser Arbeit beigetragen hat.

Meinen Kindern Anna und Johann danke ich für ruhige Abendstunden, in denen diese Arbeit entstand, während sie friedlich schliefen.

8 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Poster und Publikationen

C. Rinder, J. Beige, W. Zidek, M. Tepel „Reactive oxygen species in hemodialysis patients“ *World Congress of Nephrology*, Berlin 2003

A. Scholze, **C. Rinder**, J. Beige, R. Riezler, W. Zidek, M. Tepel. „Normalisierung der Plasma Homocystein-Konzentration durch Gabe von Acetylcystein während der Hämodialyse“ *Jahreskongress für Nephrologie*, 35. Kongress der Gesellschaft für Nephrologie, 36. Jahrestagung der Schweizerischen Gesellschaft für Nephrologie, 37. Jahrestagung der deutschen Arbeitsgemeinschaft für Klinische Nephrologie, Basel 2004.

A. Scholze, **C. Rinder**, J. Beige, R. Riezler, W. Zidek, M. Tepel, “Acetylcysteine reduces plasma Homocysteine concentration and improves pulse pressure and endothelial function in patients with end-stage renal failure” *Circulation* 2004;109:369-374.

9 Erklärung

„Ich, Christiane Wieczorek, geb. Rinder, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationschrift mit dem Thema: „Wirkung von Acetylcystein auf Plasma-Homocysteinspiegel, oxidativen Stress, Pulsdruck und Endothelfunktion bei Hämodialyse-Patienten“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

22. September 2008

Datum

Unterschrift