

#### **4. Diskussion**

Nitroxid spielt eine wichtige physiologische Rolle beim Erhalt von Funktion und Integrität des Gefäßes. Mehrere Studien konnten im Zustand des chronischen Nierenversagens eine reduzierte NO – Produktion nachweisen (Thuraisingham et al., 2002; MacAllister et al., 1994; Vallance et al., 1992). Dafür scheinen verschiedene Mechanismen verantwortlich zu sein, die entweder zu einer beschleunigten Degradation oder zu einer reduzierten Produktion führen (Vallance et al., 1992; MacAllister et al., 1994). Unter Berücksichtigung der wichtigen Funktion, die NO für den Erhalt der strukturellen und funktionellen Integrität des Gefäßes hat, kann eine Einschränkung der verfügbaren NO – Menge ein wichtiger Schritt auf dem Weg zu den strukturellen und funktionellen Veränderungen sein, die im Zustand des chronischen Nierenversagens beobachtet werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine inhibierende Wirkung des Blutplasmas von Patienten im chronischen Nierenversagen auf die iNOS - Expression gezeigt werden. Durch chromatographische Methoden konnte in der Arbeitsgruppe PAA als endogener Inhibitor der NO – Produktion durch iNOS aus dem Blutplasma chronisch nierenkranker Patienten isoliert werden. Eine Hemmung der iNOS – Funktion kann weitreichende Folgen haben, weil eine verminderte NO – Produktion durch die endotheliale Isoform als Kompensationsmechanismus zu einer gesteigerten iNOS – Aktivität führt (Hecker et al., 1999).

Die Wirkungen von PAA auf die iNOS – Synthese und somit auf die verfügbare NO – Menge waren Gegenstand dieser Untersuchung.

Nach Zugabe von PAA in unterschiedlichen Konzentrationen zu IFN $\gamma$  und LPS – stimulierten Monozyten aus dem menschlichen Blut kam es zu einer Senkung der iNOS – mRNA – Synthese. Dieser Effekt ist konzentrationsabhängig und lässt sich auch in Zellen der murinen Makrophagenzelllinie RAW 264.7 beobachten. Die im Plasma von Dialysepatienten durchschnittlich gefundenen Konzentrationen von PAA entsprachen mit 3,49 +/- 0,33 mmol/l (Jankowski et al, 2003) denen, die für einen signifikanten Rückgang der Syntheserate nötig waren.

Dieser Einfluss des PAA ist substanzspezifisch und nicht Ausdruck z.B. einer allgemeinen Toxizität. Andere Metabolite aus dem Phenylalaninstoffwechsel wie

Phenylethylamin, Homogentisinsäure oder Phenylalanin hatten auf die iNOS – Synthese keine Auswirkung.

Diese Hemmung der iNOS – Synthese mit der damit verbundenen Reduktion der verfügbaren NO – Menge im Gefäß bei Dialysepatienten hat aus mehreren Gründen eine erhebliche pathophysiologische Bedeutung für die vaskulären und hämodynamischen Veränderungen beim chronischen Nierenversagen.

Verschiedene Arbeiten konnten zeigen, dass es beim chronischen Nierenversagen zu einer ganzen Reihe von strukturellen und vor allem funktionellen Veränderungen der Gefäßbahn kommt, die zu einer erhöhten kardiovaskulären Sterblichkeit solcher Patienten beitragen. Diese Veränderungen sind heterogener Natur und umfassen die Atherosklerose mit der Entwicklung von Plaques in der Gefäßwand, die Arteriosklerose, sowie hämodynamische Veränderungen, die das Gefäß schädigen. Insbesondere eine Volumenüberladung durch Flüssigkeitsretention, AV – Shunts und Anämie induziert eine Dilatation der Arterienlumens und eine Wandhypertrophie (London 2001).

Schon 1974 vermuteten Lindner et al., dass es beim chronischen Nierenversagen zu einer beschleunigten Atherosklerose kommt (Lindner et al., 1974). Seither konnte dies durch eine Reihe von Studien bestätigt und überdies mit einer reduzierten iNOS – Expression in Verbindung gebracht werden (Raine et al., 1992; London et Druke, 1997).

NO - Metabolismus und Pathogenese der Atherosklerose sind eng miteinander verknüpft (Nathan et Xie, 1994). NO hat Einfluss auf die Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Endotheloberfläche. Nach Infusion von NO - Inhibitoren konnte eine verstärkte Leukozytenadhäsion bei Katzen beobachtet werden. Dieser Effekt konnte durch die Gabe von L - Arginin und eines Antikörpers gegen den Leukozytenadhäsionskomplex CD11b/CD18 aufgehoben werden (Kubes et al., 1991). Des Weiteren behindert NO die Chemotaxis des Monozyten über einen cGMP - abhängigen Mechanismus (Bath, 1993). Eine verminderte NO – Produktion führt über die Aktivierung von NF $\kappa$ b zu einer gesteigerten VCAM – 1 Expression auf der endothelialen Oberfläche (Endemann et Schiffrin, 2004). VCAM – 1 bindet Monozyten und T – Lymphozyten, wichtige initiale Schritte in der Entwicklung atherosklerotischer

Läsionen. Eine ausreichende NO – Synthese hemmt im Gegenschluss Leukozytenadhäsion und -chemotaxis als wichtige Schritte der Pathogenese der Atherosklerose. Zusätzlich wird die ADP - induzierte Plättchenaggregation über einen cGMP - abhängigen Mechanismus gehemmt (Mellion et al., 1981). NO behindert also einen wichtigen Schritt in der Pathogenese der Atherosklerose, nämlich die Adhäsion inflammatorischer Zellen und deren Migration in den subintimalen Raum.

Außerdem inhibiert NO die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen (Garg et Hassid, 1989 A). Dies stellt ebenfalls einen wichtigen Schritt in der Pathogenese der Atherosklerose dar.

Rikitake und Mitarbeiter konnten zudem zeigen, dass eine NO – Freisetzung aus VSMC durch iNOS die Oxidation von LDL im subintimalen Raum behindert. Oxidiertes LDL wirkt als chemotaktischer Faktor für Monozyten, ist verantwortlich für die Bildung von Schaumzellen und hat einen schädigenden Einfluss auf Endothelzellen (Rikitake et al., 1998).

Ein weiterer wichtiger Punkt in der Entwicklung atherosklerotischer Läsionen ist die Proliferation eingewanderter Makrophagen (Villaschi et Spagnolli, 1983). Die Arbeitsgruppe von Cayatte konnte zeigen, dass eine reduzierte NO – Bioverfügbarkeit eine wesentliche Rolle in der Entwicklung atherosklerotischer Läsionen spielt (Cayatte et al., 1994). Eine reduzierte NO – Bioverfügbarkeit führt über eine Behinderung der Apoptose zu einer Makrophagenproliferation (Moeslinger et Spieckermann, 2001). Die durch PAA induzierte Senkung der NO – Menge kann also auch zu einer voranschreitenden Atherosklerose beitragen, weil Makrophagen in der Gefäßwand einer verminderten Apoptose unterliegen.

Eine reduzierte NO – Bioverfügbarkeit beim chronischen Nierenversagen könnte demzufolge mit einer beschleunigten Atherosklerose assoziiert sein. Es scheint jedoch so, dass nicht nur die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen beschleunigt ist, vielmehr unterscheiden sich diese Läsionen in der Gefäßwand auch in ihrem Aufbau von atherosklerotischen Läsionen, die in nicht chronisch nierenerkrankten Patienten auftreten. So konnten Savage et al. eine deutlich stärkere Kalzifikation der Plaques bei Dialysepatienten im Vergleich zu „normalen“ atherosklerotischen Plaques nachweisen (Savage et al., 1998).

Aber nicht nur die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen kann durch eine verringerte NO – Bioverfügbarkeit vorangetrieben werden. NO spielt eine wichtige Rolle

bei der Auslösung und/oder Vermittlung der komplexen Veränderungen der renalen Hämodynamik in der Progression des chronischen Nierenversagens spielt (Aiello et al., 1999; Dumont et al., 2001).

Die NO – Freisetzung durch iNOS sorgt im dicken aufsteigenden Schenkel der Henle – Schleife für eine Aufrechterhaltung des medullären Blutflusses und der Oxygenierung des Blutes (Ito, 1995). Die Effekte von Angiotensin II auf die Natriumreabsorption im proximalen Tubulus werden durch NO antagonisiert, die tubuläre Na<sup>+</sup> - K<sup>+</sup> ATPase wird inhibiert (Morrissey et al., 1994) und dadurch eine Natriurese induziert. Eine reduzierte NO – Verfügbarkeit führt demzufolge zu einer gesteigerten Natriumretention. Dies kann die ohnehin schon beeinträchtigte Flüssigkeitsausscheidung mit Überwässerung des Körpers verstärken. Eine Flüssigkeitsretention wird als wichtiger Faktor bei der Entwicklung der kardiovaskulären Veränderungen im chronischen Nierenversagen angesehen (Foley et al., 1998).

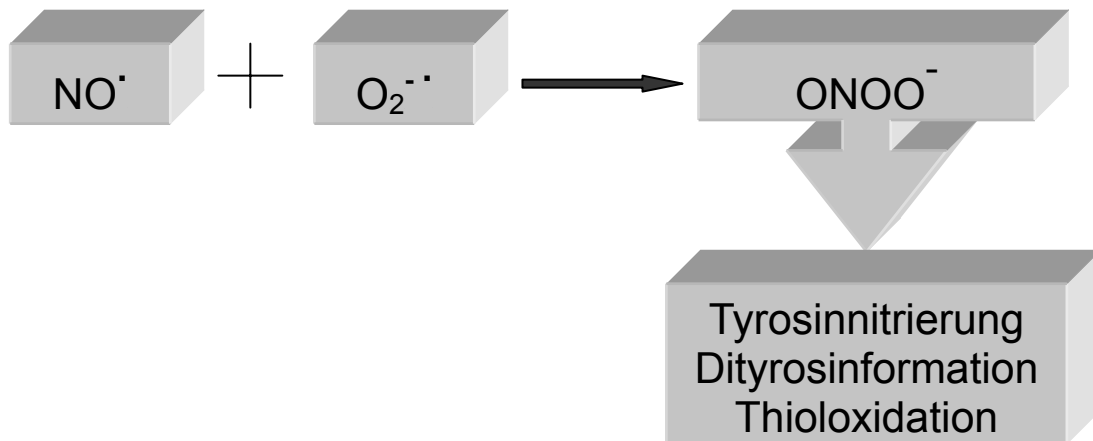
Neben diesen protektiven Effekten kann NO allerdings, insbesondere in den Mengen, in denen es durch die Wirkung der iNOS produziert wird, auch schädigende Effekte auf das Gefäß haben. Neben der Wirkung als Antioxidans z.B. für LDL kann das Radikal NO auch als Oxidans wirken.

Diese Wirkung beruht im Wesentlichen auf der Reaktion mit reaktiven Sauerstoffspezies. Einer der wichtigsten Reaktionsmechanismen hierbei ist die Bildung von Peroxynitrit aus NO und O<sup>2-</sup>. Peroxynitrit ist ein weit stärkeres Oxidans als das Superoxid – Ion. Zudem reagieren NO und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu NO<sup>2-</sup>. Dieses wird durch die Myeloperoxidase in NO<sub>x</sub> umgewandelt (Hazen et al., 1999).

Sowohl NO<sub>x</sub> als auch ONOO<sup>-</sup> induzieren die Proteinnitrierung, einen wichtigen Mechanismus des oxidativen Schadens (Leeuwenburgh et al., 1997; Eiserich et al., 1998). Außerdem werden die antioxidativen Eigenschaften von Endothelzellen durch die Oxidation freier Thiole vermindert, wie in Abbildung 15 dargestellt (Gewaltig et al., 2002). Tatsächlich konnte die Arbeitsgruppe um Luoma durch immunhistochemische Untersuchungen einen erhöhten Gehalt von Nitrotyrosinresten in atherosklerotischen Läsionen zeigen (Luoma et al., 1999).

Diese Wirkungen von NO und seinen Reaktionsprodukten könnten auch eine Erklärung dafür sein, dass das iNOS – Defizit in apoE/iNOS – Doppel – knockout – Mäusen, einem Modell für iNOS – Defizit und Atherosklerose protektiv auf die Entwicklung einer

Atherosklerose wirkt (Kuhlencordt et al., 2001).



**Abbildung 15:** Biologische Wirkungen von Peroxynitrit.

Auf der anderen Seite wirkt NO aber auch als ein Induktor der endothelialen Ferritinsynthese (Recalcati et al., 1998). Ferritin ist in der Lage, die Superoxid – Anion - Bildung zu verhindern (Balla et al., 1992). Damit im Zusammenhang steht auch die gesteigerte Expression der Häm – Oxygenase I durch NO. Das aus der Zersetzung von Häm durch die Aktivität dieses Enzyms freigesetzte Eisen ist für die Translation der Ferritin – mRNA essentiell. Durch die Aktivität der Häm – Oxygenase kommt es ausserdem zu einer gesteigerten Bilirubinbildung. Bilirubin ist ein Radikalfänger, der Superoxid inaktivieren kann. Das daneben synthetisierte CO aktiviert überdies die lösliche Guanylcyclase und kann damit zu einer Gefässrelaxation beitragen.

Die NO – Synthese durch iNOS hat also Auswirkungen auf die Atherosklerose in zweierlei Hinsicht. Allerdings scheint aber als Summenwirkung der protektive Effekt zu überwiegen. Dafür spricht unter anderem, dass eine gesteigerte L – Arginin – Zufuhr und damit die Anhebung der Substratkonzentration der iNOS die Bildung atherosklerotischer Läsionen reduziert (Cooke et al., 1992). Andererseits führt eine Inhibierung der NO - Synthese zu einer gesteigerten Plaquebildung (Cayatte et al., 1994).

Der Mechanismus der PAA – vermittelten iNOS – Inhibierung ist im Detail unklar. PAA wird offenbar in für eine intrazelluläre Wirkung ausreichenden Mengen durch die Zellmembran aufgenommen. Die Promoterregion des iNOS – Gens enthält mehrere

Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor NF –  $\kappa$ B sowie für das Jun/Fos – Heterodimer. LPS und IL – 1 $\beta$  führen über die Aktivierung von NF –  $\kappa$ B zu einer gesteigerten iNOS – Expression in murinen Makrophagen, VSMC und mesangialen Zellen (Xie et al., 1994). Die Arbeitsgruppe um Pahan konnte einen inhibierenden Effekt von Natrium - Phenylacetat und Lovastatin auf die LPS – induzierte iNOS – Expression nachweisen (Pahan et al., 1997). Es konnte gezeigt werden, dass die Farnesylierung verschiedener Proteine ein Schlüsselschritt in der iNOS – Aktivierungskaskade ist. Die Behinderung der Farnesylierung verschiedener Proteine wie p21<sup>ras</sup> durch Lovastatin und Natrium - Phenylacetat führte zu einer Down – Regulation der iNOS – Expression. PAA scheint also in die in ihrer Gänze nicht verstandene Signalkette zur iNOS – Induktion einzugreifen.

Die vorliegenden Erkenntnisse haben Implikationen für die iNOS - Expression in 2 Zelltypen, nämlich VSMC und Monozyten. Da die iNOS – Expression in beiden Zelltypen durch dieselben experimentellen Prozeduren beeinflusst werden kann, lassen sich die beschriebenen Effekte auf VSMC extrapolieren (Akyurek et al, 1996; Hattori et al., 2003; Behr – Roussel et al., 2000; Russell et al., 1995; Hunter et al., 1999; Clark et al., 1996). Eine veränderte iNOS – Aktivität ist für die Entwicklung einer Atherosklerose von pathogenetischer Relevanz (Li et Glass, 2002).

Der gezeigte inhibitorische Effekt von PAA auf die iNOS – Expression kann relevant für die klinischen Umstände beim Nierenversagen im Endstadium sein: die Plasmakonzentrationen von PAA bei Patienten im chronischen Nierenversagen im Endstadium sind vergleichbar denen, die eine komplette Unterbrechung der iNOS – Expression in isolierten Monozyten verursachen.