

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

DISSERTATION

Beitrag urämischer Mediatoren zur Genese
kardiovaskulärer Erkrankungen bei Patienten mit
chronischer Niereninsuffizienz

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Mona Köhler

aus Berlin

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. rer. nat. J. Jankowski
 2. Prof. Dr. med K. Kisters
 3. Priv.-Doz. Dr. med. S. Herget-Rosenthal

Datum der Promotion: 29.01.2010

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die chronische Niereninsuffizienz	1
1.1.1	Pathophysiologie der chronischen Niereninsuffizienz.....	2
1.1.2	Stadien der chronischen Niereninsuffizienz	2
1.2	Urämie	4
1.2.1	Das urämische Syndrom.....	4
1.2.2	Urämische Mediatoren.....	5
1.3	Kardiovaskuläre Erkrankungen bei chronischer Niereninsuffizienz.....	7
1.4	Mechanismen der kardiovaskulären Komplikationen bei chronischer Niereninsuffizienz	9
1.4.1	Bluthochdruck	10
1.4.2	Arteriosklerose.....	10
1.4.3	Dyslipidämie, Inflammation und oxidativer Stress	12
1.4.4	Endotheliale Dysfunktion, Stickoxid (NO) und Asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA)	13
1.4.5	Veränderte Gefäßregulation.....	14
2	Zielsetzung der Arbeit	18
3	Material und Methoden	19
3.1	Material	19
3.1.1	Geräte.....	19
3.1.2	Puffer	19
3.1.3	Urämische Mediatoren.....	20
3.1.4	Charakterisierung der verwendeten Ratten.....	21
3.2	Methoden und Auswertung	21
3.2.1	Präparation zur Isolierung der Rattenniere	21
3.2.2	Das Perfusionssystem der isolierten perfundierten Niere.....	22
3.2.3	Äquilibrierung des Systems, Testung der Niere auf Funktionstüchtigkeit und Vorbereitung der Proben.....	23
3.2.4	Dosis-Wirkungskurven vasokonstriktorischer urämischer Mediatoren.....	23
3.2.5	Dosis-Wirkungskurven dilatatorischer urämischer Mediatoren	24
3.2.6	Untersuchung der Rezeptorspezifität der vasoaktiven Nukleoside	25

3.2.7	Auswertung und statistische Analyse	26
4	Ergebnisse.....	27
4.1	Wirkung urämischer Mediatoren auf den Perfusionsdruck im Nierenperfusionstest .	27
4.1.1	Nicht-peptidische urämische Mediatoren	27
4.1.2	Peptidische urämische Mediatoren	29
4.2	Dosis-Wirkungskurven vasokonstriktorischer urämischer Mediatoren.....	30
4.2.1	1-Methyladenosin	31
4.2.2	Endothelin-1	32
4.2.3	Methylguanidin-HCl.....	32
4.2.4	Neuropeptid Y	33
4.2.5	p-Kresol	34
4.2.6	Phenol	35
4.2.7	Uridin.....	36
4.3	Dosis-Wirkungskurven dilatatorischer urämischer Mediatoren.....	37
4.3.1	Adrenomedullin	37
4.3.2	Atriales natriuretisches Peptid (ANP).....	38
4.3.3	Harnstoff.....	38
4.3.4	Hydrochinon	39
4.3.5	Kaliumindoxylsulfat	40
4.3.6	p-Kresolsulfat	40
4.4	Vergleich der vasoaktiven Potenzen	41
4.5	Untersuchung der Rezeptorspezifität der vasoaktiven Nukleoside.....	42
4.5.1	Hemmung des A ₁ -Rezeptors.....	42
4.5.2	Unspezifische Hemmung des P ₂ -Rezeptors.....	44
5	Diskussion	47
5.1	Urämische Mediatoren mit vasokonstriktorischem Effekt.....	49
5.1.1	1-Methyladenosin	49
5.1.2	Endothelin-1	50
5.1.3	Methylguanidin-HCl.....	50
5.1.4	Neuropeptid Y	51
5.1.5	Uridin.....	51
5.2	Urämische Mediatoren mit vasodilatatorischem Effekt.....	52
5.2.1	Adrenomedullin	52
5.2.2	Atriales natriuretisches Peptid	53

5.2.3	Harnstoff.....	53
5.2.4	Hydrochinon.....	54
5.2.5	Kaliumindoxylsulfat.....	55
5.2.6	p-Kresol, p-Kresolsulfat und Phenol.....	56
5.3	Ausblick.....	58
6	Zusammenfassung.....	59
7	Literatur- und Quellenverzeichnis.....	61
8	Abkürzungen.....	72
9	Lebenslauf.....	76
10	Danksagung.....	77
11	Erklärung.....	78

1 Einleitung

1.1 Die chronische Niereninsuffizienz

Die Anzahl der Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (CNI) ist deutschland-, europa- und weltweit ansteigend [1,2] und stellt ein bedeutendes Gesundheitsproblem im klinischen Alltag dar. Das chronische Nierenversagen ist die Folge einer irreversiblen Verringerung der glomerulären, tubulären und endokrinen Funktionen beider Nieren [3]. Laut der „Kidney Disease Outcome Quality Initiative“ (K/DOQI) der „National Kidney Foundation“ (NKF) ist die CNI definiert als eine strukturelle oder funktionelle Störung der Nieren mit oder ohne Einschränkung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) für mindestens 3 Monate. Ferner besteht eine chronische Niereninsuffizienz bei einer $GFR < 60 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ über mindestens 3 Monate, mit oder ohne Nachweis eines Nierenschadens, sowie nach erfolgter Nierentransplantation. Als funktionelle Störung gelten hierbei Auffälligkeiten in der radiologischen Diagnostik oder in der Laboranalytik von Blut und Urin, wie zum Beispiel der Anstieg von urämischen Mediatoren im Blut, Proteinurie, oder das Auftreten von Erythrozyten und Erythrozytenzylindern im Urinsediment [4].

Ungefähr 1.783.000 Patienten weltweit leiden an einer CNI im Terminalstadium und mindestens 10-mal mehr Patienten befinden sich in einem Vorstadium zur Nierenersatzbehandlung [1]. In Deutschland wird die Anzahl der dialysepflichtigen Patienten auf 66.000 geschätzt [1]. Die häufigste Ursache der terminalen Niereninsuffizienz bei Dialysepatienten ist in 28% der Fälle die diabetische Nephropathie [2]. Als weitere ursächliche Faktoren folgen primäre und sekundäre Glomerulopathien, vaskuläre (hypertensive) Nephropathien, chronisch tubulo-interstitielle Erkrankungen, sowie polyzystische Nierenerkrankungen. In 10% der Fälle ist die Genese der CNI unbekannt [2].

Die therapeutische Option der Nierenersatzbehandlung durch Dialyse oder Transplantation bedeutet nicht nur eine deutliche Einschränkung der Lebensqualität jedes einzelnen Patienten sondern auch eine enorme volkswirtschaftliche Belastung. Die finanzielle Last durch die Behandlung dieser Population mit den gegenwärtig gebräuchlichen Verfahren ist sowohl für die Patienten als auch für die Gesamtbevölkerung überproportional hoch. Für Deutschland entstehen durch die Dialyse Kosten zwischen 33.000 und 68.000 Euro pro Patientenjahr [5]. Hinzugerechnet werden müssen die Kosten für ein hinzugewonnenes qualitätsbereinigtes

Lebensjahr (QALY), sowie diejenigen, welche durch Folgeerkrankungen der chronischen Niereninsuffizienz, wie zum Beispiel kardiovaskuläre Erkrankungen, entstehen. Eine einmalige Nierentransplantation kostet 70.000 bis 75.000 Euro und im weiteren Verlauf der Folgebehandlung entstehen Kosten von 15.000 bis 20.000 Euro jährlich [5].

1.1.1 Pathophysiologie der chronischen Niereninsuffizienz

Eine chronische Niereninsuffizienz entwickelt sich über Monate oder Jahre mit progredienter Abnahme der Anzahl funktionsfähiger Nephrone. Diese Funktionseinschränkung geschieht unabhängig von den ursächlichen Faktoren der Nierenerkrankung. Für die Aufrechterhaltung der Nierenrestfunktion kommt es in den verbliebenen gesunden Glomeruli zu einer kompensatorischen intraglomerulären Drucksteigerung mit Hyperfiltration [6]. Diese kann durch das Vorhandensein einer arteriellen Hypertonie zusätzlich erheblich verstärkt werden [3]. Ein wesentlicher Vermittler dieser glomerulären Hyperfiltration ist das Peptidhormon Angiotensin II. Über eine Interaktion mit dem Angiotensin-Rezeptor bewirkt es eine vermehrte Produktion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, die eine Verstärkung der glomerulären Hypertonie und Hyperplasie bewirken. Darüber hinaus bewirkt Angiotensin II eine erhöhte glomeruläre Permeabilität mit Verlust der glomerulären Siebfunktion, was eine Proteinurie zu Folge hat. Als direktes Nephrotoxin führt die Proteinurie im weiteren Verlauf durch vermehrte Entzündungsvorgänge und oxidativen Stress zur progressiven Sklerosierung der überlasteten Restnephrone und konsekutiven Entwicklung von Schrumpfnieren. Für den Gesamtorganismus hat die chronische Niereninsuffizienz folgende lebenswichtigen Veränderungen zur Folge [3]:

- 1) Versagen der exkretorischen Nierenfunktion
- 2) Störungen im Wasser-, Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushalt
- 3) Abnahme der inkretorischen Nierenfunktion: Verminderte Sekretion von Erythropoetin, Renin, aktivem Vitamin D und Prostaglandinen
- 4) Toxische Organschäden durch die retinierten harnpflichtigen Substanzen

1.1.2 Stadien der chronischen Niereninsuffizienz

Anhand der klinisch geschätzten glomerulären Filtrationsrate erfolgt eine internationale Einteilung in 5 Stadien (**Tabelle 1**) [4]. Bei jungen Erwachsenen beträgt die GFR rund $120 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ Körperoberfläche. Im Stadium 1 liegt noch eine GFR $\geq 90 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ vor, allerdings mit Nachweis einer Nierenschädigung oder

Risikofaktoren für eine chronische Niereninsuffizienz. Von einer Nierenschädigung mit milder Niereninsuffizienz und einer GFR von 60-89 ml/min/1,73 m² spricht man im Stadium 2. Liegt eine GFR <60 ml/min/1,73 m² über einen Zeitraum von 3 Monaten vor, wird die Niereninsuffizienz unabhängig von anderen Nierenerkrankungen als chronisch bezeichnet. Es wird hier zwischen der mittelschweren Niereninsuffizienz im Stadium 3 (GFR 30-59 ml/min/1,73 m²) und der schweren Niereninsuffizienz im Stadium 4 mit einer GFR von 15-29 ml/min/1,73 m² unterschieden. Zu diesem Zeitpunkt sind weniger als 60% des Nierengewebes noch funktionsfähig, was eine Retention harnpflichtiger Substanzen zur Folge hat. Schließlich kommt es im Stadium 5 zum Nierenversagen (GFR <15 ml/min/1,73 m²) mit urämischen Symptomen, was eine Nierenersatztherapie erforderlich macht. Die K/DOQI-Richtlinien empfehlen die Abschätzung der Nierenfunktion mit Hilfe der kostengünstigen „Modification of Diet in Renal Disease“ (MDRD)-Formel zu berechnen. Diese Bestimmung ist ab einer GFR <60 ml/min/1,73 m² der Insulin-clearance als Goldstandard der Nierenfunktionsbestimmung im Ergebnis am nächsten [6].

Im Stadium 1-2 der chronischen Niereninsuffizienz kann eine genauere glomeruläre Filtrationsrate der Niere durch Bestimmung von Cystatin C im Serum errechnet werden [7]. Während das Serumkreatinin erst bei einer GFR unter 75 ml/min/1,73 m² ansteigt, wird Cystatin C bereits bei einer GFR unter 88 ml/min/1,73 m² auffällig. Cystatin C ist ein 13 kDa großes Protein, das von nahezu allen kernhaltigen Zellen im menschlichen Körper unabhängig von Alter, Muskelmasse oder Ernährungsgewohnheiten gebildet wird. Es wird vollständig glomerulär filtriert, in den Zellen des proximalen Tubulus metabolisiert und nicht ins Tubulussystem zurücksezerniert [6].

Tabelle 1: Stadien der chronischen Niereninsuffizienz gemäß der „National Kidney Foundation“ [4]

Stadium	Bezeichnung	GFR (ml/min/1,73 m ²)
1	Nierenschädigung mit normaler oder erhöhter GFR	120 ≥ GFR ≥ 90
2	Nierenschädigung mit milder Einschränkung der GFR	60–89
3	Moderater Rückgang der GFR	30–59
4	Schwerer Rückgang der GFR	15–29
5	Nierenversagen	<15

1.2 Urämie

Die Urämie, deutsch Harnvergiftung, bezeichnet die Erhöhung der Konzentration harnpflichtiger Substanzen im Blut, wie sie bei akuter oder chronischer Niereninsuffizienz auftritt [8]. Außer zur Zunahme von Harnstoff kommt es dabei zur Akkumulation von Stoffwechselabbauprodukten, die unter nicht-pathologischen Bedingungen von den Nieren mit dem Urin ausgeschieden werden. Während der Harnstoff ein biochemisch ziemlich inaktives Stoffwechselendprodukt ist, weisen mehrere der übrigen Retentionsprodukte überwiegend toxische biologische oder biochemische Aktivität im Organismus auf. Sie werden daher pauschal als urämische Mediatoren oder „Urämie-Toxine“ bezeichnet. Vor allem diese Substanzen sind dafür verantwortlich, dass der Zustand der Urämie bedeutende Auswirkungen auf viele Organsysteme im menschlichen Organismus hat. Das Gesamtbild aller als Folge einer Urämie auftretenden Symptome wird auch als urämisches Syndrom bezeichnet [9].

1.2.1 Das urämische Syndrom

Urämie tritt klinisch im Terminalstadium einer Niereninsuffizienz auf. Die Symptome sind sehr unterschiedlich und können im Verlauf der Krankheit fast jedes Organsystem betreffen. Im Bereich der Atmungsorgane kann es zum Lungenödem und zur Pleuritis, am Herzen zu Herzrhythmusstörungen und einer urämischen Perikarditis [10] und im Verdauungstrakt zu gastrointestinalen Blutungen und Entzündungen kommen. Desweiteren wird im Blutbild eine „renale Anämie“ [11] beobachtet, und Veränderungen im Gerinnungsstatus wie Thrombozytopathie und Thrombozytopenie können zu hämorrhagischen Diathesen führen [12]. Ferner kommt es im Verlauf einer chronischen Niereninsuffizienz zu Myopathien, zur Osteomalazie und starkem Juckreiz der Haut [13]. Die Patienten fallen aufgrund der bakteriellen Zersetzung des Harnstoffs in der Mundhöhle durch einen urämischen Fötör auf und sind von verschiedenen Formen der Stoffwechselstörungen betroffen, wie z.B. Hyperlipidämie, Kohlenhydratintoleranz und sekundärem Hyperparathyroidismus. Da urämische Mediatoren auch neurotoxisch wirken, können eine Vielzahl neurologischer Symptome als Folge der Urämie auftreten. Polyneuropathien sind in diesem Zusammenhang auf Schädigungen im peripheren Nervensystem zurückzuführen. Zusätzlich werden im zentralen Nervensystem als häufige Beschwerden die urämische Enzephalopathie, Schlafstörungen, Krampfanfälle und das urämische Koma beschrieben [3,6,8].

1.2.2 Urämische Mediatoren

In einem Review von Cohen und Kollegen werden 76 urämische Mediatoren beschrieben. Diese werden in Nicht-Peptid Verbindungen (**Tabelle 2**) und Peptid Verbindungen (**Tabelle 3**) unterteilt [14]. Die angegebene Maximalkonzentration c_{\max} bezieht sich auf die höchste je bei chronisch niereninsuffizienten Patienten gemessene Konzentration der jeweilige Substanz [15] und ist der Ausgangswert für die Berechnung der im Ergebnisteil der vorliegenden Dissertation verwendeten Konzentrationen.

Tabelle 2: Urämische Mediatoren: Nicht-Peptid Verbindungen [14,15]

#	Urämischer Mediator	c_{\max} [g/l]	Molekulargewicht [g/mol]
1	1-Methyladenosin	2,2e-4	281,3
2	1-Methylguanosin	8,9e-5	297,3
3	2-Methylresorcinol	3,2e-4	140,1
4	α -N-Acetylariginin	4,6e-3	216,2
5	ADMA	9,9e-3	275,2
6	Arabitol	3,3e-2	152,1
7	β -Guanidinopropionsäure	6,5e-5	131,1
8	Benzylalkohol	1,9e-2	108,1
9	Cytidin	1,7e-3	243,2
10	Dimethylglycin	1,0e-3	103,1
11	Erythriol	3,7e-2	174,1
12	γ -Guanidinobutansäure	1,8e-3	145,2
13	Guanidin.HCl	1,3e-3	95,5
14	Guanidinessigsäure	6,9e-4	117,1
15	Guanidinosuccinat	4,7e-2	175,1
16	Harnstoff	4,6	60,1
17	Harnsäure	1,5e-1	190,1
18	Hippursäure	4,7e-1	179,2
19	Hydrochinon	2,9e-4	110,1
20	Hypoxanthin	5,3e-3	136,1
21	Indol-3-Essigsäure	9,1e-3	175,2
22	Kaliumindoxylsulfat	2,8e-1	251,3
23	Kreatinmonohydrat	2,7e-1	149,2
24	Kretinin	2,4e-1	113,1
25	Kynurenin	9,5e-4	208,2
26	Kynureninsäure	9,5e-3	189,2
27	L-Homocysteinthiolakton.HCl	3,0e-2	153,6
28	Malondialdehyd.tetrabutylammonium	3,4e-3	313,5
29	Mannitol	7,6e-2	182,2
30	Melatonin	4,4e-7	232,3
31	Methylguanidin-HCl	2,7e-3	109,6
32	Myoinositol	2,3e-1	180,2
33	N2,N2-Dimethylguanosin	4,2e-4	311,3
34	N4-Acetylcytidin	2,2e-4	285,3
35	Natriumoxalat	1,2e-2	134,0
36	Orotsäure	3,9e-2	156,1
37	Orotidin	4,7e-2	288,2
38	p-Kresol	4,1e-2	108,1
39	p-OH Hippursäure	3,2e-2	195,2

#	Urämischer Mediator	c _{max} [g/l]	Molekulargewicht [g/mol]
40	Phenol	1,1e-2	94,1
41	Pseudouridin	8,7e-2	244,2
42	Putrescin	1,3e-4	161,1
43	Quinolinsäure	3,3e-3	167,1
44	SDMA	1,2e-3	275,2
45	Sorbitol	7,3e-3	182,2
46	Spermidin	1,9e-4	254,6
47	Spermin	6,7e-5	202,3
48	Threitol	5,7e-3	122,1
49	Thymin	1,1e-2	126,1
50	Uracil	4,5e-4	112,1
51	Uridin	3,3e-2	244,2
52	Xanthin	3,4e-3	152,1
53	Xanthosin	2,2e-4	244,2

Abkürzungen: ADMA: asymmetrisches Dimethylarginin; SDMA: symmetrisches Dimethylarginine

Tabelle 3: Urämische Mediatoren: Peptid Verbindungen [14,15]

#	Urämischer Mediator	c _{max} [g/l]	Molekulargewicht [g/mol]
54	Adrenomedullin	8,1e-8	6029
55	Angiogenin	1,6e-3	14400
56	Atriales natriuretisches Peptid	4,4e-7	3080
57	β2-Mikroglobulin	1,0e-1	11800
58	β-Endorphin	4,9e-7	3465
59	Cystatin C	2,0e-2	13000
60	Delta schlafinduzierendes Peptid	3,3e-6	848
61	Endothelin	1,3e-7	2492
62	Hyaluronsäure	1,8e-3	25000
63	Interleukin 1β	1,7e-4	17000
64	Interleukin 6	3,3e-7	26000
65	Kappa Ig leichte Ketten	2,9e-1	25896
66	Komplement Faktor D	2,6e-2	24466
67	Lambda Ig leichte Ketten	3,3e-1	25000
68	Leptin	4,9e-4	16000
69	Methionin-Enkephalin	7,6e-8	574
70	Neuropeptid Y	1,2e-7	4272
71	Pankreozymin	1,3e-7	12670
72	Parathormon 1-34	2,4e-6	4118
73	Retinolbindendes-Protein	3,7e-1	21200
74	Tumor Nekrose Faktor α (TNF α)	4,1e-7	26000

Seit dem Jahr 2003 ist die Liste der **Tabelle 2** und **3** durch die Aufnahme von neu identifizierten Substanzen erweitert worden [9]. Diese urämischen Mediatoren sind im Folgenden aufgelistet (**Tabelle 4**), können aber auf Grund der noch unveröffentlichten c_{max} Konzentrationen in der hier vorliegenden Arbeit im Weiteren nicht berücksichtigt werden.

Tabelle 4: Seit 2003 neu gelistete urämische Mediatoren [9]

Urämische Mediatoren
Adiponectin
Basic fibroblast growth Faktor
Calcitonin gene-related Peptid
Desacylghrelin
Dimethylguanosin
Dinucleosid Polyphosphat
Ghrelin
Guanylin
8-OH-2'-deoxyguanosin
Inosin
Interleukin 18
Motilin
<i>N</i> -Methyl-2-pyridon-5-carboxamid
Nitrosodimethylamin
Nitrosomethylamin
Octopamin
Orexin A
Phenylethylamin
Phenylethylamin
Substanz P
Thiocyanat
Uroguanylin
Vasoaktives intestinales Peptid

1.3 Kardiovaskuläre Erkrankungen bei chronischer Niereninsuffizienz

Im Jahre 1974 beobachteten Lindner und Kollegen erstmals eine beschleunigte Arteriosklerose bei Dialysepatienten, was einen bis dahin unbekanntem Zusammenhang zwischen den kardiovaskulären Erkrankungen und der chronischen Niereninsuffizienz aufzeigte [16]. Als klassische kardiovaskuläre Risikofaktoren der chronischen Niereninsuffizienz sind in diesem Zusammenhang insbesondere Alter [17], männliches Geschlecht, familiäre Disposition, arterieller Hypertonus [18,19], Diabetes mellitus [20,21], Dyslipidämie [22,23], Rauchen [24,25], körperliche Inaktivität und die Menopause zu erwähnen. Ferner spielen spezielle kardiovaskuläre Risikofaktoren, die mit der chronischen Niereninsuffizienz direkt assoziiert sind, eine entscheidende Rolle (**Tabelle 5**).

Tabelle 5: Kardiovaskuläre Risikofaktoren [26,27]

Nicht klassische kardiovaskuläre Risikofaktoren der CNI
Albuminurie bzw. Proteinurie
Lipoprotein (a) und Lipoproteinmodifikationen
Hyperhomocysteinämie
Malnutrition
Reaktive Sauerstoffspezies und Inflammation
Anämie
Ca ²⁺ -PO ₄ -Stoffwechselstörungen
Fetuin-A-Mangel
Aktivität des RAA-Systems
Urämie- und dialyseassoziierte Faktoren
Andere (z.B. urämische Mediatoren)

Die chronische Niereninsuffizienz ist einer der bedeutsamsten Risikofaktoren für das Auftreten von kardiovaskulären Erkrankungen und kardiovaskulären Todesfällen. Im Vergleich zum Durchschnitt der Bevölkerung ist die jährliche Sterberate von Dialyse-Patienten um ein zehnfaches erhöht [28]. Bei Patienten im **Stadium 1** der chronischen Niereninsuffizienz beträgt die jährliche kardiovaskuläre Mortalität 1% und liegt damit ein Drittel über dem Bevölkerungsdurchschnitt (0,28%). Das Risiko dieser Patientengruppe, in Zukunft an einer kardiovaskulären Erkrankung zu versterben, ist um ein vielfaches höher als jemals das **Stadium 5** der chronischen Niereninsuffizienz mit der erforderlichen Nierenersatzbehandlung zu erreichen [29]. Eine neuerliche Metaanalyse von 85 in Originalarbeiten angegebenen Studien mit insgesamt mehr als 550.000 Teilnehmern über einen Zeitraum von 18 Jahren (von 1986 bis einschließlich 2003) bestätigte eindeutig den Zusammenhang zwischen einer Nierenfunktionsstörung und kardiovaskulären Erkrankungen, unabhängig von geographischen Faktoren [30]. Eine weitere Studie von Go und Kollegen aus dem Jahr 2004 mit mehr als einer Millionen erwachsener Patienten zeigt ebenfalls einen unabhängig abgestuften Zusammenhang zwischen einer erniedrigten GFR und dem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen, Todesfälle und Hospitalisationen und unterstreicht ferner den Stellenwert der Urämie sowohl in der Klinik als auch für das Gesundheitswesen überhaupt [31].

Eine computertomographische Untersuchung von Koronararterien durch Goodman und Kollegen im Jahre 2000 belegt weiterhin einen Zusammenhang zwischen Nierenfunktionsstörungen und Arteriosklerose. Die Untersuchungsergebnisse ergaben in der Gruppe der 20 bis 30 Jahre alten Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz, im Gegensatz

zur Kontrollgruppe, Ablagerungen von Kalkplaques, die in einer weiteren Kontrolluntersuchung nach 20 Monaten eine deutliche Progression zeigten [32].

Dabei fällt der Einfluss der bereits erwähnten klassischen atherogenen Risikofaktoren wie Bluthochdruck und Diabetes Mellitus bei Dialysepatienten deutlich weniger ins Gewicht als in der Normalbevölkerung. Als mögliche Ursache dafür ist der positive Einfluss einer gesünderen Ernährung, in Form einer diätischen Proteinrestriktion, in der betroffenen Population in Betracht zu ziehen. Bestandteil der Diskussion ist ferner der nachteilige Einfluss der Hyperhomocysteinämie, der urämischen Mediatoren, des oxidativen Stress, sowie der Kalkablagerungen in den Koronararterien. Auch die Kombination dieser und anderer zusätzlicher Faktoren kommt als Ursache in Frage [33]. In Studien mit nicht-dialysierten CNI-Patienten wird deutlich, dass eine Korrektur der klassischen und einiger nicht-klassischer Risikofaktoren die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer kardiovaskulären Erkrankung nicht mindert. Einer kanadischen Studie zufolge kann bei Patienten mit sechs sechsständigen Dialysen im Vergleich zu Patienten mit drei dreistündigen Dialysen die linksventrikuläre Herzmasse und der Blutdruck verringert werden. In der Gruppe mit der geringeren Anzahl an Dialysen hatte die linksventrikuläre Herzmasse sogar zugenommen und der Blutdruck war angestiegen [34]. Aus diesen Gründen ist die CNI *per se* als herausragender Risikofaktor für kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität anzusehen. Sämtliche dieser Beobachtungen führten zu der Hypothese, dass Faktoren, die mit der Urämie spezifisch in Verbindung stehen, insbesondere die urämischen Mediatoren, zur Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen beitragen können.

1.4 Mechanismen der kardiovaskulären Komplikationen bei chronischer Niereninsuffizienz

Schon eine geringe Einschränkung der GFR oder eine Mikroalbuminurie innerhalb der Normwerte ist mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse verbunden [35]. Für diesen Zusammenhang wird die endotheliale Dysfunktion als ein primärer pathophysiologischer Mechanismus diskutiert [36]. Viele der klassischen und nicht-klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren (**Tabelle 5**), die bekanntermaßen einen Einfluss auf die endotheliale Dysfunktion haben, finden sich ebenfalls im Zusammenhang mit der chronischen Niereninsuffizienz. Hierzu gehören Diabetes mellitus, Übergewicht, Bluthochdruck und die Niereninsuffizienz *per se*, die zu einer Aktivierung des Renin-

Angiotensin-Systems, zu oxidativem Stress, zu niedriggradigen Entzündungen und zu einer Dyslipidämie führen [36].

1.4.1 Bluthochdruck

Ein erhöhter Blutdruck ist ein bedeutsamer Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz. Als relevanter Mechanismus wird hier die Natriumretention und Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems angesehen [37]. Ebenfalls spielt die Aktivierung des sympathischen Nervensystems eine Rolle. Die Entdeckung des blutdrucksenkenden Enzyms Renalase hat die Komplexität der Blutdruckregulation erweitert [38]. Es wird hauptsächlich im Glomerulus und in proximalen Tubuluszellen der Niere gebildet und sowohl in das Blut als auch den Primärharn sezerniert. Das Enzym metabolisiert als Oxidase Katecholamine [7]. Bei urämischen Patienten ist die Renalasesekretion zum Teil stark eingeschränkt und trägt dadurch zur Bluthochdruckentstehung bei.

Als Folge der Blutdruckerhöhung mit zunehmender Verschlechterung der Nierenfunktion unterliegt das arterielle Gefäßsystem einem speziellen Remodeling, das zu einer verminderten Elastizität der Arterien und zur Zunahme von Turbulenzen innerhalb des Blutflusses führt [39]. Für den Transport des gleichen Blutvolumens werden höhere Druckpulse mit schnelleren Strömungsgeschwindigkeiten benötigt, die wiederum dazu führen, dass die Pulswellen zu einem früheren Zeitpunkt wieder reflektiert werden. Im weiteren Verlauf führt der erhöhte systolische Blutdruck am Herzen zu einer linksventrikulären Dysfunktion, sowie der verminderte diastolische Blutdruck in der Peripherie zu einer Reduktion der Koronarreserve und Kapillardichte. Schließlich kann es zu einem Myokardinfarkt kommen, der die Pumpleistung des Herzens weiter schwächen wird [39].

1.4.2 Arteriosklerose

Sklerosierung der Koronararterien tritt bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz bei einer durchschnittlichen GFR von 33 ml/min doppelt so häufig auf wie in der gesunden Kontrollgruppe [40]. Von der Kalzifizierung sind sämtliche Gefäßabschnitte betroffen, insbesondere jedoch die Tunica Media. Eine besondere, dialysebedingte vaskuläre Verkalkung ist die kalzifizierende urämische Arteriopathie, auch Kalziphylaxie genannt. Sie zeigt sich bei kleinen und mittelgroßen Arterien sowie Arteriolen durch die Verkalkung der Tunica Media mit Proliferation der Tunica Intima und, dadurch induziert, thrombotischen

Prozessen. Bei einem Verschluss dieser Gefäße entstehen Hautläsionen bis hin zu lebensbedrohlichen Hautnekrosen und akralen Gangränen [41].

Die Plasmakonzentrationen von Kalzium und Phosphat bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz unterliegen erheblichen Schwankungen. Das Präzipitieren des Kalziumphosphats bei erhöhten extrazellulären Kalzium- und Phosphat-Konzentrationen trägt zur Bildung ektopischer Kalkmetastasen bei. Erhöhte Phosphatkonzentrationen induzieren über Aktivierung des Cbfa-1 Gens die osteogene Transformation von Gefäßmuskelzellen in osteoblasten-ähnliche Zellen, die die Fähigkeit zur Hydroxyapatitbildung besitzen [42,43,44]. Erhöhte Werte des urämischen Mediators Leptin begünstigen bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ebenfalls die Bildung von Kalkplaques. Über seine Rezeptoren im Hypothalamus induziert Leptin eine verstärkte sympathische Aktivität, die die β -adrenergen Rezeptoren der Osteoblasten aktiviert [45]. Leptin bewirkt weiterhin eine Differenzierung von Stammzellen in Osteoprogenitorzellen im Knochenmark und kann die Kalkbildung in Gefäßmuskelzellen induzieren [46].

Für die Gegenregulation der Gefäßverkalkung sind das systemisch wirkende Fetuin A und die lokal wirkenden hemmenden Faktoren Matrix-Gla-Protein (MGP) und Pyrophosphat bedeutsam. Hierbei scheint Fetuin A die größte Bedeutung zu haben. Es wird in der Leber produziert und zirkuliert anschließend im Blut, wo es mit Kalzium und Phosphat stabile kolloidale Kalziproteinkomplexe bildet. Ein erniedrigter Fetuin A-Spiegel bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ist mit verstärktem Auftreten von Gefäßverkalkungen und kardiovaskulärer Mortalität verbunden [47,48]. Das Matrix-Gla-Protein wird über eine Vitamin K-abhängige γ -Carboxylierung aktiviert und im Plasma mit Hilfe von Fetuin A transportiert. Ein Fehlen des MGP führt bei Mäusen zu spontanen Verkalkungen von Gefäßen und Knorpeln [49]. Jono und Kollegen haben beschrieben, dass MGP Konzentrationen im Blut negativ mit Gefäßverkalkungen der Koronararterien beim Menschen korrelieren [50]. Weiterhin können erhöhte Pyrophosphat (PP_i)-Konzentrationen die Bildung von Hydroxyapatit und Kalk verhindern. Kalkablagerungen bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz können deshalb auch auf die erhöhte Aktivität der membrangebundenen gewebeunspezifischen alkalischen Phosphatase zurückzuführen sein, die PP_i zu Phosphat degradiert. Verminderte Konzentrationen an PP_i können bei Urämiepatienten aber auch als Folge ihrer Eliminierung während der Dialyse aufgrund seiner guten Wasserlöslichkeit auftreten. Auch dies kann zu einer beschleunigten Gefäßverkalkung beitragen [51].

1.4.3 Dyslipidämie, Inflammation und oxidativer Stress

Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz haben aufgrund von Mangelernährung oft erniedrigte Plasmaskonzentrationen von Albumin, Präalbumin und Transferrin und weisen zunehmende Zeichen von Entzündung auf, was u.a. zu erhöhten CRP-Werte (C-reaktives-Protein) führt [52]. Mit der chronischen Niereninsuffizienz sind darüber hinaus weitere Erkrankungen wie Diabetes mellitus und arterieller Hypertonus assoziiert, bei denen ebenfalls latente Entzündungsreaktionen ablaufen.

Ebenfalls werden Veränderungen in der Zusammensetzung der Blutlipide mit chronischer Inflammation und renaler Dysfunktion in Verbindung gebracht [53]. Es kommt zu einer Verminderung der Plasmakonzentrationen von Apolipoprotein A-I und High-Density-Lipoprotein-Cholesterin (HDL). Das HDL schützt als Antioxidans das Endothel vor Einflüssen proinflammatorischer Zytokine. Im Gegensatz dazu kommt es zu einem Anstieg der Plasmawerte von Apolipoprotein C-III, Intermediate-Density-Lipoprotein-Cholesterin (IDL), Triglyzeriden, Low-Density-Lipoprotein-Cholesterin (LDL) sowie Chylomikronresten. Der ungünstige Effekt des LDL auf das kardiovaskuläre Gefäßsystem zeigt sich u.a. durch Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems, durch Stimulation der Xanthinoxidase sowie durch verminderte endotheliale Bioverfügbarkeit von Stickoxid (NO) [7]. Bei niereninsuffizienten Patienten mit zusätzlichen kardiovaskulären Komplikationen kann der pharmakologische Einsatz von Statinen die Proteinurie und die damit einhergehende fortschreitende Niereninsuffizienz leicht reduzieren [54].

Bei 30 bis 50% der Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz sind erhöhte Werte von Entzündungs- und Gerinnungsparametern wie CRP, Fibrinogen, Interleukin 6, TNF α , Faktor VIIc, Faktor VIIIc, Plasmin-Antiplasmin-Komplex, D-Dimer und der Adhäsionsmoleküle VCAM-1 und ICAM-1 nachweisbar [55,56]. Weiter verstärkt wird die Entzündungsreaktion durch die bereits erwähnten Komorbiditäten wie z.B. Diabetes mellitus und arterieller Hypertonus, sowie durch oxidativen Stress, Infektionen und Hämodialysefaktoren [57]. Die zugrundeliegenden Mechanismen in diesem Zusammenhang sind bisher nicht aufgeklärt. Die erhöhten Entzündungsparameter werden jedoch mit vermehrtem oxidativem Stress und der Akkumulation von urämischen Mediatoren in Verbindung gebracht, welche im weiteren Verlauf zur endothelialen Dysfunktion mit Fortschreiten der Arteriosklerose führen [7].

Die Aktivierung der reduzierten Form von Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD(P)H), der Xanthinoxidase, der endothelialen NO-Synthase, der Myeloperoxidase (MPO) sowie der

mitochondrialen Oxidase stehen ebenfalls im Zusammenhang mit erhöhtem oxidativen Stress bei Urämiepatienten. Im Gefäßsystem kommt der NAD(P)H-Oxidase, die hier durch Angiotensin II und andere weitere Mediatoren stimuliert wird die größte Bedeutung zu [58]. Ein Polymorphismus in der Promotorregion des MPO Gens führt zu einer verminderten Expression der Myeloperoxidase. Bei den betroffenen CNI-Patienten treten dadurch kardiovaskuläre Komplikationen seltener auf [59]. Bei Urämiepatienten wird während der Hämodialyse aktiviertes MPO aus Leukozyten freigesetzt und trägt auf diesem Wege zur Entstehung von Endothelschäden bei.

1.4.4 Endotheliale Dysfunktion, Stickoxid (NO) und Asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA)

Eine Schädigung der Endothelfunktion ist ein frühes Kennzeichen der essentiellen Hypertonie und ein initialer Faktor, der zur Ausbildung einer Arteriosklerose führt. Eine verminderte GFR und eine erhöhte Eiweißausscheidung werden ebenfalls mit einer endothelialen Dysfunktion in Verbindung gebracht [60]. Die verminderte Bioverfügbarkeit von Stickoxid (NO) und der damit verbundene verstärkte oxidative Stress in den Endothelzellen, ist möglicherweise ein zentraler Faktor, der zur niereninsuffizienz-assoziierten endothelialen Dysfunktion beiträgt [61].

Der urämische Mediator Asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) ist ein kompetitiver Hemmer der NO-Synthase und wird über die Niere ausgeschieden [62]. ADMA sowie der strukturell verwandte urämische Mediator Symmetrisches Dimethylarginin (SDMA) kommen über einen kationischen Aminosäure- γ^+ -Transporter in die Endothelzelle. Dieser ist mit der Caveolin-gebundenen NO-Synthase kolokalisiert. Erhöhte ADMA Konzentrationen können über eine Verminderung des L-Arginin Transports die Synthese von NO in der Zelle reduzieren [7]. Die Infusion von ADMA bei gesunden Versuchspersonen führt zu einer kurzzeitigen Verminderung der Auswurfraction des Herzens und über einen erhöhten systemischen Gefäßwiderstand zu einer Steigerung des Blutdrucks [63]. Ob endogene ADMA-Konzentrationen soweit ansteigen können, dass sie die Synthese von NO *in vivo* hemmen, ist noch nicht ausreichend geklärt. Als gesichert gilt jedoch der Zusammenhang zwischen erhöhten ADMA Konzentrationen und endothelialer Dysfunktion, Arteriosklerose [64], erhöhten Plasmakonzentrationen von Katecholaminen [65] und den sich hieraus ergebenden kardiovaskulären Komplikationen sowie der erhöhten Mortalität bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz [66].

1.4.5 Veränderte Gefäßregulation

Die Durchblutungsregulation ist das Ergebnis zahlreicher konkurrierender Einflüsse auf den Muskeltonus der arteriellen Widerstandsgefäße. Hierbei sind neurogene, myogene, humoral-hormonale und endothelvermittelte Mechanismen beteiligt und wirken synergistisch, gelegentlich auch antagonistisch auf den Gefäßtonus ein.

Die nervale Durchblutungsregulation erfolgt hauptsächlich durch die Freisetzung von Noradrenalin aus terminalen Varikositäten nach Erregung postganglionärer sympathischer Neurone. Ebenfalls werden die Kotransmitter Adenosin-5'-triphosphat (ATP) und Neuropeptid Y freigesetzt und reagieren mit den entsprechenden postsynaptischen Rezeptoren [67]. Bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz erfolgt über ein aktiviertes sympathoadrenerges System eine Durchblutungsabnahme durch Konstriktion der arteriellen Widerstandsgefäße.

Die Beeinflussung der Gefäßtonus über myogene Reaktionen wird auch als Bayliss-Effekt bezeichnet. Bei rascher Erhöhung des transmuralen Drucks kommt es zu einer Vasokonstriktion in den terminalen Arterien und Arteriolen um die Durchblutung in den nachgeschalteten Organen möglichst konstant zu halten [68].

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System ist ein Beispiel für die hormonelle Durchblutungsregulation und bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ebenfalls aktiviert [7]. Die Peptidase Renin wird u.a. durch Blutdruckabfall oder Na^+ -Verlust enzymatisch aus Prorenin freigesetzt und spaltet aus Angiotensinogen das Dekapeptid Angiotensin I ab. Im weiteren Verlauf spaltet das im Blutgefäßsystem vorhandene Angiotensin Converting Enzyme (ACE) ein Dipeptid ab und es entsteht das zirkulierende Oktapeptid Angiotensin II (AngII). AngII beeinflusst als potenter Vasokonstriktor u.a. durch die Freisetzung von Aldosteron aus der Nebennierenrinde und Katecholaminen aus dem Nebennierenmark die Homöostase des Kreislaufs. Die Art und Weise wie konstriktorische und dilatatorische Systeme gegenseitig beeinflussen wird in diesem Zusammenhang durch das Angiotensin Converting Enzyme verdeutlicht. Diese Peptidase spaltet ebenfalls Bradykinin, einen der stärksten endothelabhängigen Vasodilatoren des Kininsystems, in inaktive Fragmente [67, 68].

Das Stickstoffmonoxid (NO), vor Identifizierung auch „endothelium derived relaxing factor“ (EDRF) genannt, ist der am besten untersuchte endothelvermittelte Mechanismus der Gefäßregulation. Das kurzlebige Radikal wird in Endothelzellen aus der Vorstufe L-Arginin gebildet. Über die Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase in der glatten Gefäßmuskulatur

führt NO zu einer Senkung der Ca^{2+} -Konzentration und der damit verbundenen Erschlaffung der glatten Muskulatur. Die Freisetzung von NO erfolgt nicht nur durch Stimulation von Rezeptoren, sondern führt bereits unter Ruhebedingungen durch eine kontinuierliche basale NO-Freisetzung zu einer Gegenregulation der sympathisch-adrenergisch vermittelten Vasokonstriktion [67]. Die Aktivität des Stickstoffmonoxids und weiterer vasodilatatorischer Systeme ist bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz vermindert.

Obwohl eine konstriktorische und/oder dilatatorische Wirkung einzelner urämischer Mediatoren auf die Durchblutungsregulation von Gefäßen bereits bekannt ist, steht eine systematische Untersuchung aller urämischen Mediatoren auf ihre Vasoaktivität noch aus.

In **Tabelle 6** sind weitere vasoaktive Substanzen und Faktoren zusammen mit ihren Rezeptoren und Wirkungen auf den Gefäßtonus aufgelistet.

Tabelle 6: Vasoaktive Substanzen und Faktoren

Substanz	Urämischer Mediator	Rezeptor	Wirkung	Literatur
Azetylcholin	nein	M ₁ M ₂ M ₃	dilatatorisch Sympatikotonusverminderung dilatatorisch	70, 71
Adenosin	nein	A ₁ A _{2A} A _{2B}	konstriktorisch (Niere) dilatatorisch dilatatorisch	72, 73
Adenosin-5'-tetraphosphat (A _{p4})	nein	P _{2X1}	konstriktorisch	74
Adiuretin (Vasopressin)	nein	V ₁	konstriktorisch	75, 76
ADMA	ja		dilatatorisch	53, 63
Adrenalin	nein	α ₁ α ₂ β ₁ β ₂	konstriktorisch Sympatikotonusverminderung dilatatorisch dilatatorisch	70
Adrenomedullin	ja	AM CGRP ₁ lösliche Guanylat- cyclase	dilatatorisch dilatatorisch dilatatorisch	77, 78
Amylin	nein	CGRP ₁	dilatatorisch	78
Angiotensin II	nein	AT ₁ AT ₂	konstriktorisch dilatatorisch	79, 80
Angiotensin 1-7	nein	Mas	dilatatorisch	79, 80
Atriales natriuretisches Peptid (ANP)	ja	NPR-A	dilatatorisch	81, 82, 83
Adenosin-5'-triphosphat (ATP)	nein	P _{2X1} P _{2Y1} P _{2Y2}	konstriktorisch dilatatorisch dilatatorisch	73, 74
Bradykinin	nein	B ₁ B ₂	konstriktorisch/dilatatorisch dilatatorisch	84, 85
Calcitonin gene-related peptid (CGRP)	ja	CGRP ₁	dilatatorisch	79
C-Typ natriuretisches Peptid (CNP)	nein	NPR-B	dilatatorisch	82, 83
Dihydroxyeikosatriensäure (DHET)	nein	TP	dilatatorisch	86
Dopamin	nein	D ₁ D ₃ D ₄	dilatatorisch (Niere) dilatatorisch/konstriktorisch (Niere) dilatatorisch/konstriktorisch (Niere)	70, 87
Endothelin 1, 2 und 3	ja	ET _A ET _{B1} ET _{B2}	konstriktorisch dilatatorisch konstriktorisch	83, 88
Endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF)	nein		dilatatorisch	89, 90
Epoxyeikosatriensäure (EET)	nein	TP	dilatatorisch	86
Histamin	nein	H ₁	dilatatorisch	70, 91
Kapsaizin	nein	VR ₁	dilatatorisch über vermehrte Ausschüttung von CGRP und Substanz P	92, 93
Intermedin	nein	RAMP/CL	dilatatorisch	94, 95

Substanz	Urämischer Mediator	Rezeptor	Wirkung	Literatur
Leukotriene LTC ₄ , LTD ₄ und LTE ₄	nein	CysLT ₁ CysLT ₂	konstriktorisch konstriktorisch	96, 97
Neuropeptid Y	ja	Y ₁ Y ₂	konstriktorisch Sympatikotonusverminderung	98, 99
Noradrenalin	nein	α ₁ α ₂ β ₁ β ₂	konstriktorisch Sympatikotonusverminderung dilatatorisch dilatatorisch	70
Peptid YY	nein	Y ₁ Y ₂	konstriktorisch Sympatikotonusverminderung	98
Parathormon (PTH)	ja	PTHr ₁ lösliche Guanylat- cyclase	dilatatorisch dilatatorisch	100, 101
Parathormon ähnliches Protein (PTHrP)	nein	PTHr ₁	dilatatorisch	100
Prostaglandin D ₂ , E ₂ und I ₂	nein	DP EP ₂ EP ₃ IP	dilatatorisch dilatatorisch konstriktorisch dilatatorisch	89, 102
Serotonin (5-HT)	nein	5-HT _{1A} 5-HT _{1B} 5-HT _{2A} 5-HT _{2B} 5-HT ₄ 5-HT ₇	dilatatorisch dilatatorisch konstriktorisch dilatatorisch dilatatorisch dilatatorisch	103, 104
Stickstoffmonoxid (NO)	nein	lösliche Guanylat- cyclase	dilatatorisch	89
Substanz P	ja	NK ₁	dilatatorisch	105, 106
Thromboxan A ₂	nein	TP	konstriktorisch	89, 102
Uridin adenosin tetraphosphat (Up ₄ A)	nein	P _{2X1} P _{2Y2} P _{2Y4}	konstriktorisch konstriktorisch konstriktorisch	107
Urotensin II	nein	GPR14	konstriktorisch	108
Vasoaktives intestinales Peptid (VIP)	ja	VPAC ₁	dilatatorisch	109

2 Zielsetzung der Arbeit

In den letzten Jahren zeichnet sich zunehmend die Bedeutung der chronischen Niereninsuffizienz bei kardiovaskulären Erkrankungen und kardiovaskulären Todesfällen ab. Als Folge der reduzierten Urinexkretion akkumulieren zweifelsfrei eine Vielzahl urämischer Mediatoren im Organismus. Nur für einige wenige dieser urämischen Mediatoren konnte bereits ein pathologischer kardiovaskulärer Effekt im Organismus aufgezeigt werden. Die zugrundeliegenden pathophysiologischen Mechanismen sind in diesem Zusammenhang bisher nur teilweise aufgeklärt.

Eine systematische Untersuchung möglicher Pathomechanismen sämtlicher beschriebener und noch unbekannter urämischer Mediatoren steht bisher aus. Die hier vorgelegten Untersuchungen ordnen sich dem Ziel des internationalen Forschungsverbunds „*European Uremic Toxins Work Group* (EUTox)“ unter, der sich mit der Entwicklung von innovativen diagnostischen, präventiven und therapeutischen Behandlungsansätzen kardiovaskulärer Erkrankungen bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz beschäftigt.

In der vorliegenden Dissertation werden im Rahmen des „EUTox“-Verbundes gegenwärtig identifizierte urämische Mediatoren experimentell auf ihr direktes physiologisches und pathophysiologisches vasoaktives Potential mit Hilfe eines Bioassays systematisch untersucht. Ziel ist es, zusätzlich zu den bereits bekannten, neue vasoaktive urämische Mediatoren zu identifizieren und ihren möglichen Beitrag zu protektiven oder pathologischen Mechanismen der kardiovaskulären Erkrankung bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz aufzuzeigen. Die dadurch gewonnenen Erkenntnisse sollen gemeinsam mit den Ergebnissen weiterer bereits ausgeführter oder noch geplanter *in vitro* Experimente einen Beitrag zur Ursachenforschung sowie neuen therapeutischen Ansätzen der chronischen Niereninsuffizienz und der kardiovaskulären Erkrankungen leisten. Urämische Mediatoren, die sich in diesem Zusammenhang als besonders unvorteilhaft erweisen, könnten als Konsequenz bereits in frühen Stadien der chronischen Niereninsuffizienz durch pharmakologische Interaktionen neutralisiert oder im Stadium der Nierenversagens gezielt während der Dialyse aus dem Blut der Patienten eliminiert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Analysewaage, AS120TM, *OHAUS, USA*

Blockthermostat, Thermostat 5320TM, *Eppendorf AG, Hamburg*

Nierenperfusionssystem, *Hugo Sachs Elektronik (HSE) – Havard Apparatus GmbH, March-Hugstetten*

- Bad-/Umwälzthermostat E 103TM, *LAUDA, Lauda-Königshofen*
- Schlauchpumpe REGLOTM Digital 4 Kanal ISM 834/230 V, *ISMATEC, Wertheim-Mondfeld*
- Beheizte Feuchtkammer Typ 834/8TM mit Luftblasenfalle, *HSE, March-Hugstetten*
- Druckabnehmer ATP 300TM, *HSE, March-Hugstetten*
- Brückenverstärker TAM-D Typ 705/2TM, *HSE, March-Hugstetten*
- Registrierungseinheit HSE-USB DATA ACQUISITION HARDWARETM, *HSE, March-Hugstetten*

pH-Meter, inoLab pH720TM, *WTW, Weilheim*

Pipetten, ReferenceTM, *Eppendorf AG, Hamburg*

Präzisionswaage, Delta Range PC 440TM, *Mettler-Toledo GmbH, Giessen*

Präparierbesteck, Rat Surgical KitTM, *HAVARD APPARATUS, USA*

Reinstwasseranlage, Seralpur DELTA UFTM, *ELGA LabWater, Celle*

3.1.2 Puffer

Sämtliche verwendete Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen. Für das Ansetzen der Lösungen wurde membranfiltriertes Umkehrosmose-Wasser verwendet.

Krebs-Henseleit-Lösung: 137 mM NaCl + 1,1 mM MgCl₂ + 12 mM NaHCO₃ +
2,7 mM KCl + 5,6 mM Glucose + 0,4 mM NaH₂PO₄ +
2,4 mM CaCl₂

PBS: 137 mM NaCl + 2,7 mM KCl + 1,5 mM KH₂PO₄ +
7,7 mM Na₂HPO₄

Puffer für Retinolbindendes-Protein Kontrolle:



3.1.3 Urämische Mediatoren

Für die urämischen Mediatoren wurden folgende Chemikalien verwendet [14,15]: 1-Methyladenosin (M5001 Sigma-Aldrich), 2-Methoxyresorcinol (M267600 Toronto Research Chemicals Inc), α -N-Acetylarginin (A3133 Sigma-Aldrich), ADMA.2HCl (311203 Calbiochem), Adrenomedullin 1-52 human (121700 Calbiochem), Angiogenin human (A6955 Sigma-Aldrich), Atriales natriuretisches Peptid human (A1663 Sigma-Aldrich), β 2-Mikroglobulin (hergestellt von der AG Argilé, Innere Medizin, Ste. Marguerite Hospital, Marseille, Frankreich), β -Endorphin (H 9144 Accurate Chemical & Scientific Corp.), β -Guanidinopropionsäure (G6878 Sigma-Aldrich), Benzylalkohol (B16208 Aldrich), Cholecystokinin (P4429 Sigma-Aldrich), Cystatin C (C8917 Sigma-Aldrich), Cytidin (C4654 Sigma-Aldrich), D-(+)-Arabitol (A3381 Sigma-Aldrich), D-Mannitol (M4125 Sigma-Aldrich), D-Sorbitol (S1876 Sigma-Aldrich), D-Threitol (377619 Aldrich), Delta schlafinduzierendes Peptid (D4067 Sigma-Aldrich), Endothelin 1 human (E7764 Sigma-Aldrich), Erythriol bis-Karbonat (E1381 Sigma-Aldrich), γ -Guanidinobutansäure (G6503 Sigma-Aldrich), Glyoxal (50650 Fluka), Guanidine.HCl (G4505 Sigma-Aldrich), Guanidinoessigsäure (G6002 Sigma-Aldrich), Guanidinosuccinat (G7379 Sigma-Aldrich), Harnsäure (U2875 Sigma-Aldrich), Hippursäure (H6375 Sigma-Aldrich), Hyaluronsäure (53747 Fluka), Hydrochinon (H9003 Sigma-Aldrich), Hypoxanthin (H9636 Sigma-Aldrich), Indol-3-Essigsäure (I2886 Sigma-Aldrich), Interleukin 1 β (I9401 Sigma-Aldrich), Interleukin 6 (I1395 Sigma-Aldrich), Kaliumindoxylsulfat (I3875 Sigma-Aldrich), Kappa leichte Ketten (P016 Nordic Immunological Laboratories), Kinurenin (K8625 Sigma-Aldrich), Komplement Faktor D (C5688 Sigma-Aldrich), Kreatinmonohydrat (841470 Merck), Kreatinin (105206 Merck), Kynureninsäure (K3375 Sigma-Aldrich), L-Homocysteinthiolacton.HCl (H6503 Sigma-Aldrich), Lambda leichte Ketten (P017 Nordic Immunological Laboratories), Leptin (L4146 Sigma-Aldrich), Malondialdehyd.tetrabutylammonium (63287 Fluka), Melatonin (M5250 Sigma-Aldrich), Methionin-Enkephalin (64365 Fluka), Methylglyoxal (M0252 Sigma-Aldrich), Methylguanidin-HCl (M0377 Sigma-Aldrich), myo-Inositol (I5125 Sigma-Aldrich), N2,N2-Dimethylguanosin (D1056 Sigma-Aldrich), N4-Acetylcytidin (A7766 Sigma-Aldrich), N,N-Dimethylglycin (D1156 Sigma-Aldrich), Natriumoxalat (O0136 Sigma-

Aldrich), Neuropeptid Y human (N5017 Sigma-Aldrich), Orotidin (O9505 Sigma-Aldrich), Orotsäure (O2750 Sigma-Aldrich), p-Kresol (C85751 Aldrich), p-Kresolsulfat (hergestellt von der AG Vanholder, Nephrologie, University Hospital, Ghent, Belgien), p-OH-Hippursäure (E2655 Bachem), Parathormon 1-34 human (H4835 Bachem), Phenol (242322 Aldrich), Phenolsulfat (hergestellt von der AG Vanholder, Nephrologie, University Hospital, Ghent, Belgien), Putrescin (P7505 Sigma-Aldrich), Quinolinsäure (P63204 Aldrich), Retinolbindendes-Protein (R9388 Sigma-Aldrich), SDMA.2HCl (311204 Calbiochem), Spermidin trihydrochlorid (S2501 Sigma-Aldrich), Spermin (S3256 Sigma-Aldrich), Taurocyamin (G827500 Toronto Research Chemicals Inc), Thymin (T0376 Sigma-Aldrich), TNF α human (T6674 Sigma-Aldrich), Uracil (U0750 Sigma-Aldrich), Urea (U5378 Sigma-Aldrich), Uridin (U3003 Sigma-Aldrich), Xanthin (X0626 Sigma-Aldrich), Xanthosin (X0750 Sigma-Aldrich).

3.1.4 Charakterisierung der verwendeten Ratten

Zur Organentnahme wurden männliche normotensive vier bis sechs Monate alte Wistar-Kyoto Ratten mit einem durchschnittlichen Gewicht von 300 bis 500 Gramm verwendet. Die Tierversuchsgenehmigungsnummer des Landesamtes für Gesundheit und Soziales Berlin lautet: O 0075/08.

3.2 Methoden und Auswertung

3.2.1 Präparation zur Isolierung der Rattenniere

Die Ratten wurden mittels einer 3-minütigen Inhalationsnarkose mit Isofluran (FORENE[®], Abbott GmbH & Co. KG) und anschließender intraperitonealer Urethan-Injektion (1,5 g pro kg Körpergewicht) anästhesiert. Das Peritoneum wurde durch einen Y-Schnitt vom Unterbauch bis zum Zwerchfellansatz eröffnet und die rechte Niere mit der zugehörigen Arteria renalis und die infrarenale Aorta stumpf vom umliegenden Bindegewebe freipräpariert. Anschließend wurden Ligaturen im infrarenalen Bereich der Aorta abdominalis und an der Arteria renalis gesetzt. Die Aorta proximal der infrarenalen Ligatur wurde abgeklemmt und es folgte eine Inzision der infrarenalen Aorta. Ohne die Zirkulation zu unterbrechen wurde ein Polyethylen-Katheter in die Aorta eingeführt und nach Entfernung der Aortenklemme bis in die rechte Nierenarterie vorgeschoben. Es wurden 250 i.E. Heparin-

Natrium-Lösung (Biochrom AG, Berlin) in die Niere injiziert. Nach Verschließen der Ligaturen wurde das Präparat aus dem Retroperitonealraum explantiert und an das Perfusionssystem angeschlossen.

3.2.2 Das Perfusionssystem der isolierten perfundierten Niere

Die Experimente bedienen sich des bereits 1973 von Hofbauer et al. beschriebenen Modells der isoliert perfundierten Rattenniere [111]. Die isolierte Rattenniere wurde mit konstanter Flussrate von 8 ml/min über eine peristaltische Pumpe mit einem Gemisch aus 95% O₂ und 5% CO₂ begaster und 37°C warmer Krebs-Henseleit-Lösung perfundiert (**Abbildung 1**). Der Perfusionsdruck wurde kontinuierlich von einem Druckabnehmer am Zufluss der A. renalis abgegriffen und das Signal über einen Brückenverstärker an die Registriereinheit weitergeleitet, von der es kontinuierlich aufgezeichnet wurde. Über ein Injektionsventil zwischen der Pumpe und dem Nierenpräparat bestand die Möglichkeit, Substanzen in den Kreislauf einzuschleusen. Hierzu wurde zunächst eine Gefäßschlaufe mit 100 µl der Probenflüssigkeit aufgeladen, von der anschließend 80 µl in das System eingeschaltet wurden.

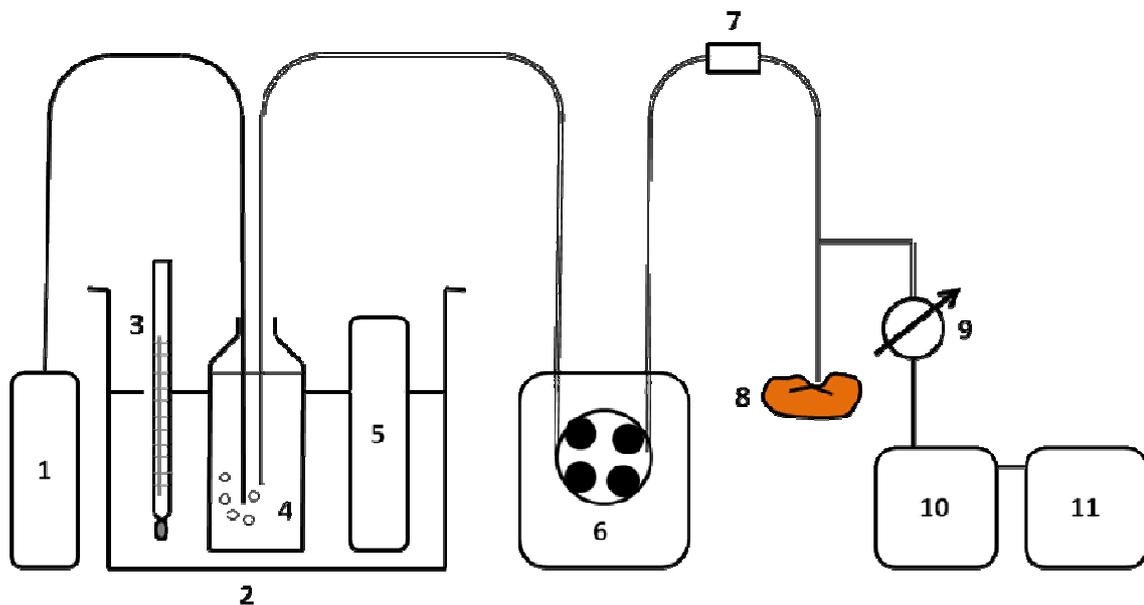


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Perfusionssystems (Illustration adaptiert aus [112])

1	Carbogen (95% O ₂ , 5% CO ₂)	7	Injektionsventil zur Bolusinjektion
2	Wasserbad als Wärmeträger	8	Isolierte perfundierte Rattenniere
3	Thermometer	9	Druckabnehmer
4	Krebs-Henseleit-Lösung, 37°C	10	Brückenverstärker
5	Heizanlage	11	Registrierungseinheit
6	Peristaltische Schlauchpumpe		

3.2.3 Äquilibration des Systems, Testung der Niere auf Funktionstüchtigkeit und Vorbereitung der Proben

Vor Beginn der Versuchsphase wurde die Niere 30 min bei einem Basaldruck im Perfusionssystem von 60 ± 2 mmHg äquilibriert. Die Funktionstüchtigkeit der Niere wurde durch Bolusinjektionen von Angiotensin II 10^{-6} M (**Abbildung 2**) und α, β -meATP 10^{-5} M vor Beginn und am Ende jedes Versuchs überprüft. Vor der Injektion einer Probe wurde solange gewartet, bis sich der Perfusionsdruck wieder stabilisiert hatte. Zur Vorbereitung der Proben wurden anfangs, wie von Cohen et al. beschrieben, 10-fach oder 100-fach höhere Stocklösungen der c_{\max} Konzentrationen der zu testenden Substanzen in Krebs-Henseleit-Lösung hergestellt und bei -20°C gelagert [14]. Hippursäure, Kynureninsäure, Harnsäure, Xanthin und Xanthosin wurden zunächst in 1 M NaOH gelöst und dann mit PBS pH 7,4 verdünnt und einen pH-Wert von 7,4 ($\pm 0,1$) eingestellt. N2,N2-Dimethylguanosin wurde vorab in Dimethylsulfoxid (DSMO) gelöst und die anschließende Verdünnungsreihe mit Krebs-Henseleit-Lösung hergestellt. Die peptidischen urämischen Mediatoren Angiogenin, $\beta 2$ -Mikroglobulin, Kappa leichte Ketten, Komplement Faktor D, Lambda leichte Ketten, Leptin und Retinolbindendes-Protein wurden ebenfalls vor der Injektion auf einen physiologischen pH-Wert von pH 7,4 ($\pm 0,1$) eingestellt. Zusätzlich wurden für diese Substanzen Kontrollen vorbereitet, die dieselbe Zusammensetzung sowie dieselbe finale Konzentration mit Ausnahme des jeweiligen urämischen Mediators besaßen. Die in **Tabelle 2** aufgelisteten urämischen Mediatoren 1-Methylguanosin und Pseudouridin konnten nicht untersucht werden, da diese zurzeit nicht kommerziell erhältlich sind.

3.2.4 Dosis-Wirkungskurven vasokonstriktorischer urämischer Mediatoren

Zunächst wurde ein Screening aller in den **Tabellen 7** und **8** aufgeführten Substanzen durchgeführt, indem jeweils mit der höchsten je bei chronisch niereninsuffizienten Patienten gemessenen Konzentration c_{\max} [14,15] des jeweiligen Mediators im Bolus begonnen wurde. Zusätzlich wurde dann noch die Wirkung der 10- und 100-fachen c_{\max} Konzentration, sowie der Konzentrationen 10^{-4} M und 10^{-3} M untersucht. Dosis-Wirkungskurven wurden für diejenigen urämischen Mediatoren aufgenommen, die bei diesem Screening eine signifikante Vasokonstriktion von $\Delta p \geq +2$ mmHg aufzeigten. Dieser Wert wurde entsprechend dem 3 σ -Kriterium gewählt. Die Aufzeichnung erfolgte beginnend mit der kleinsten Menge 10^{-13} bzw. 10^{-12} mol bis hin zur Dosierung der maximalen Wirkung bzw. bis zur Löslichkeitsgrenze. Zwischen den einzelnen Applikationen wurde mindestens 5 min gewartet

damit die Substanzen wieder aus dem System herausgewaschen wurden. Jede Bolusinjektion wurde mindestens 3mal wiederholt und die dabei registrierten Δp -Werte gemittelt. An diese Meßpunkte wurde mit dem Programm GraphPad Prism eine Ausgleichsfunktion angepasst, die in den jeweiligen Diagrammen als Dosis-Wirkungskurve aufgetragen ist. Aus diesen Funktionen wurde die Dosis für die halbmaximale Wirkung rechnerisch ausgewertet.

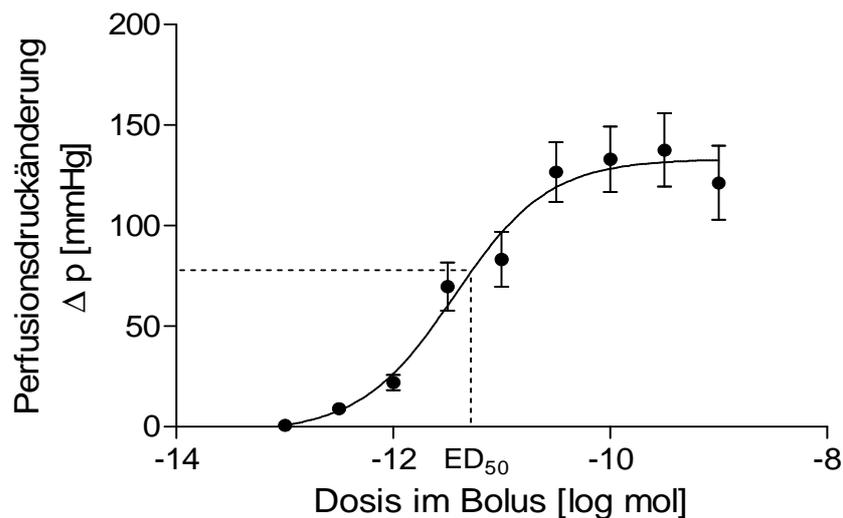


Abbildung 2: Beispiel einer Dosis-Wirkungskurve vasokonstriktorischer Substanzen anhand der Kontrollsubstanz Angiotensin II. Aufgetragen ist die Änderung des Drucks im Perfusionsystem bei Perfusion mit konstantem Fluss, die als Antwort auf die Bolusinjektion der Testsubstanz auftrat. Die Abszisse gibt den Logarithmus der im Bolus enthaltenen Gesamtmenge der Testsubstanz in mol an (vgl. auch **Diskussion**). Die ED₅₀ gibt die Bolusmenge für halbmaximale Wirkung an.

3.2.5 Dosis-Wirkungskurven dilatatorischer urämischer Mediatoren

Zunächst wurde der Basaldruck der isolierten perfundierten Rattenniere durch die Perfusion mit Angiotensin II (200 nM) erhöht und 30min äquilibriert. Die Funktionstüchtigkeit der Niere wurde weiterhin durch Bolusinjektionen von α,β -meATP 10^{-5} M zu Beginn und am Ende der Perfusion mit Angiotensin II überprüft. Zusätzlich wurde Bradykinin 10^{-6} M zur Kontrolle der dilatatorischen Wirkung injiziert (**Abbildung 3**). Die Dosis-Wirkungskurven bei einem erhöhten Basaldruck wurden für diejenigen urämischen Mediatoren erstellt, welche beim vorherigen Screening eine signifikante Vasoaktivität $-\Delta p \geq -|1,5|$ mmHg aufzeigten. Dieser Wert wurde entsprechend dem 3 σ -Kriterium gewählt. Hier wurde die Versuchsreihe mit der kleinsten Menge 10^{-14} bzw. 10^{-12} mol begonnen und bis hin zum Erreichen der Sättigungswerte oder der Löslichkeitsgrenze fortgeführt.

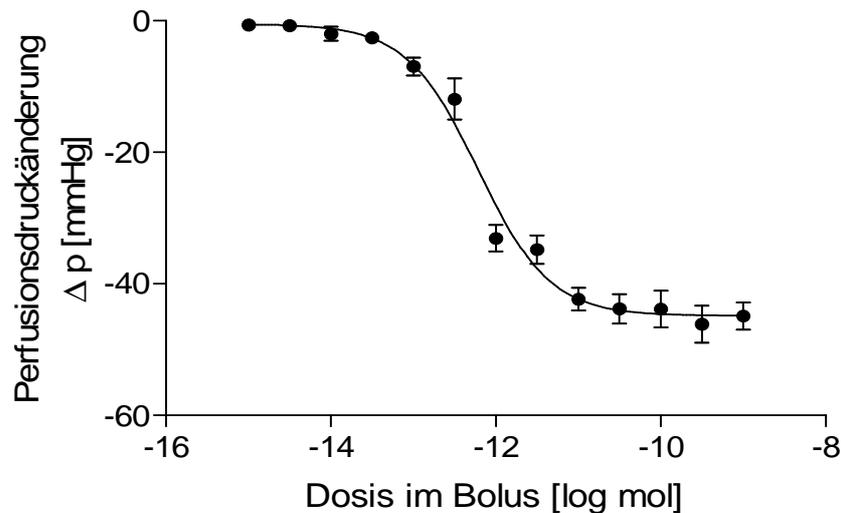


Abbildung 3: Beispiel einer Dosis-Wirkungskurve dilatatorischer Substanzen anhand der Kontrollsubstanz Bradykinin, aufgetragen in den Dosen von 10^{-13} bis 10^{-9} mol.

3.2.6 Untersuchung der Rezeptorspezifität der vasoaktiven Nukleoside

Für die vasokonstriktiven urämischen Mediatoren 1-Methyladenosin, Methylguanidin-HCl und Uridin wurde zusätzlich eine Charakterisierung der pharmakologischen Rezeptoreigenschaften am A_1 - und P_2 -Rezeptor durchgeführt. Zunächst wurden Dosis-Wirkungskurven der drei Nukleoside bei Basaldruck an der isolierten perfundierten Rattenniere durchgeführt. Anschließend wurde die Krebs-Henseleit-Lösung mit dem selektiven A_1 -Rezeptorantagonisten 8-Cyclopentyl-1,3,-dipropylxanthin (DPCPX) $10\mu\text{M}$ versetzt und 30min äquilibriert und die Dosis-Wirkungskurven von 1-Methyladenosin, Methylguanidin-HCl und Uridin wurden erneut durchgeführt. Als Kontrollen dienten in diesem Versuchsaufbau die Adenosinrezeptorunabhängigen vasokonstriktiven Substanzen α,β -meATP 10^{-5} M und Angiotensin II 10^{-6} M, sowie (*R*)N6-phenylisopropyladenosin (*R*-PIA) 10^{-4} M als bekannter A_1 -Rezeptoragonist. In einem weiteren Versuchsansatz wurde die Krebs-Henseleit-Lösung anstatt DPCPX mit dem unspezifischen P_2 -Rezeptorantagonisten Suramin $25\mu\text{M}$ versetzt und 30min äquilibriert. Als Kontrollen diente hier das Purinrezeptorunabhängige Angiotensin II 10^{-6} M, sowie der spezifische P_{2x} -Agonist α,β -meATP 10^{-5} M. Nach der Bolusinjektion von α,β -meATP mußte die vasokonstriktorische Antwort blockiert sein, während sie bei Angiotensin II weiterhin vollständig erhalten sein mußte.

3.2.7 Auswertung und statistische Analyse

Die vasoaktiven Gefäßreaktionen wurden als Perfusionsdrucksveränderungen Δp in mmHg registriert. Jede Bolusinjektion wurde mindestens 3mal wiederholt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Für die Substanzen, die einen signifikanten Effekt zeigten, wurden zusätzlich Dosis-Wirkungskurven aufgenommen. Statistische Signifikanz wurde durch Verwendung des T-Tests für unverbundene Stichproben ermittelt. Unterschiede wurden ab $p \leq 0,05$ als signifikant, ab $p \leq 0,01$ als hochsignifikant definiert.

4 Ergebnisse

4.1 Wirkung urämischer Mediatoren auf den Perfusionsdruck im Nierenperfusionstest

Nach der Äquilibration mit Krebs-Henseleit-Lösung (siehe Abschnitt 3.2.3) stellte sich im Perfusionssystem ein Basaltonus von 60 ± 2 mmHg ein. Dieser senkte sich während der weiteren Perfusion innerhalb der ersten Stunde um 10–15 mmHg und in der zweiten um weitere 6 mmHg. Die Reagibilität, d.h. die Amplitude der Druckantwort auf die Bolusinjektion der vasoaktiven Referenzsubstanzen Angiotensin II (**Abbildung 2**) und α, β -meATP veränderte sich während dieser Zeit nicht.

4.1.1 Nicht-peptidische urämische Mediatoren

Insgesamt wurden 53 nicht-peptidische urämische Mediatoren auf ihre vasoaktive Wirkung an der isolierten perfundierten Rattenniere getestet (**Tabelle 7**). Eine hoch signifikante vasokonstriktorische Wirkung bei der Konzentration c_{\max} im Bolus zeigte sich für Uridin. Ferner wies Harnstoff bei c_{\max} eine signifikante dilatatorische Wirkung auf. Bei den übrigen nicht-peptidischen urämischen Mediatoren konnte keine Vasoaktivität beobachtet werden. Für die Substanzen Hippursäure, Kreatinmonohydrat, Kreatinin, Myoinositol, Natriumoxalat, Orotsäure und Orotidin konnte die Testung der 100-fachen c_{\max} Konzentration nicht durchgeführt werden, da hier die Löslichkeitsgrenze bereits überschritten wird.

Tabelle 7: Nicht-peptidische Mediatoren: Druckänderung Δp im Perfusionssystem bei Bolusinjektion des jeweiligen Mediators mit der Konzentration c_{\max} im Bolus. Angegeben sind die Mittelwerte (MW) aus mindestens 3 Registrierungen mit ihren Standardabweichungen (SEM).

Urämischer Mediator	Δp [mmHg]	
	MW	SEM
1-Methyladenosin	0,2	0,1
2-Methylresorcinol	0,8	0,4
α -N-Acetylarginin	0,5	0,3
ADMA	0,4	0,1
Arabitol	0,1	0,1
β -Guanidinopropionsäure	0,3	0,2
Benzylalkohol	0,7	0,2
Cytidin	0,5	0,3

Urämischer Mediator	Δp [mmHg]	
	MW	SEM
Dimethylglycin	0,4	0,2
Erythriol	0,3	0,1
γ -Guanidinobutansäure	0,5	0,2
Glyoxal	1,0	0,5
Guanidin.HCl	0,3	0,0
Guanidinessigsäure	0,5	0,4
Guanidinosuccinat	0,6	0,4
Harnstoff	-0,4	0,1
Harnsäure	0,2	0,1
Harnsäure Kontrolle	0,4	0,3
Hippursäure	0,2	0,2
Hippursäure Kontrolle	0,1	0,1
Hydrochinon	0,6	0,3
Hypoxanthin	0,4	0,2
Indol-3-Essigsäure	0,6	0,3
Kaliumindoxylsulfat	0,3	0,1
Kreatinmonohydrat	0,3	0,1
Kreatinin	0,3	0,0
Kynurenin	0,3	0,1
Kynureninsäure	0,2	0,0
Kynureninsäure Kontrolle	0,2	0,0
L-Homocysteinthiolakton.HCl	0,3	0,1
Malondialdehyd.tetrabutylammonium	0,5	0,2
Mannitol	0,5	0,2
Melatonin	0,6	0,3
Methylglyoxal	0,4	0,1
Methylguanidin-HCl	0,5	0,2
Myoinositol	0,6	0,3
N2,N2-Dimethylguanosin	-0,1	0,3
N2,N2-Dimethylguanosin Kontrolle	0,3	0,2
N4-Acetylcytidin	0,4	0,1
Natriumoxalat	0,3	0,1
Orotsäure	0,3	0,1
Orotidin	0,6	0,3
p-Kresol	0,3	0,1
p-OH Hippursäure	0,3	0,1
Phenol	1,3	0,5
Putrescin	0,6	0,2
Quinolinsäure	0,2	0,1
SDMA	0,4	0,1
Sorbitol	0,3	0,1
Spermidin	0,4	0,1
Spermin	0,2	0,0
Taurocyamin	0,3	0,1
Threitol	0,3	0,0
Thymin	0,4	0,1
Uracil	0,6	0,4
Uridin	3,9	0,5
Xanthin	0,3	0,2
Xanthin Kontrolle	0,5	0,2
Xanthosin	0,2	0,0
Xanthosin Kontrolle	0,2	0,1

4.1.2 Peptidische urämische Mediatoren

Das vasoaktive Potential 21 peptidischer urämischer Mediatoren wurde ebenfalls für die jeweilige c_{\max} Konzentration im Bolus ausgewertet (**Tabelle 8**). Aufgrund der bedeutenden Unterschiede in den Molekülgrößen der einzelnen peptidischen urämischen Mediatoren konnte das weitere Screening nicht einheitlich mit den Konzentrationen 10^{-4} M und 10^{-3} M durchgeführt werden. Für Delta schlafinduzierendes Peptid und Methionin-Enkephalin wurden die Konzentrationen 10^{-4} M und 10^{-3} M, für β 2-Mikroglobulin, β -Endorphin, Cholezystokinin und Parathyreoid Hormon die Konzentrationen 10^{-5} M und 10^{-4} M, für Adrenomedullin, Atriales natriuretisches Peptid, Cystatin C, Hyaluronsäure, Kappa leichte Ketten, Lambda leichte Ketten, Leptin, Neuropeptid Y und Retinolbindendes-Protein die Konzentrationen 10^{-6} M und 10^{-5} M sowie für Angiogenin, Endothelin-1, Interleukin 1 β , Interleukin 6, Komplement Faktor D und TNF α die Konzentrationen 10^{-7} M und 10^{-6} M injiziert.

Tabelle 8: Peptidische Mediatoren: Druckänderung Δp im Perfusionssystem bei Bolusinjektion des jeweiligen Mediators mit der Konzentration c_{\max} im Bolus. Angegeben sind die Mittelwerte (MW) aus mindestens 3 Registrierungen mit ihren Standardabweichungen (SEM).

Urämischer Mediator	Δp [mmHg]	
	MW	SEM
Adrenomedullin	0,2	0,2
Angiogenin	0,2	0,3
Angiogenin Kontrolle	0,3	0,1
Atriales natriuretisches Peptid	-0,1	0,1
β 2-Mikroglobulin	0,4	0,1
β 2-Mikroglobulin Kontrolle	1,0	0,3
β -Endorphin	0,5	0,2
Cholezystokinin	1,1	0,1
Cystatin C	0,2	0,2
Delta schlafinduzierendes Peptid	0,6	0,2
Endothelin	0,4	0,1
Hyaluronsäure	0,9	0,2
Interleukin 1 β	0,1	0,2
Interleukin 6	0,2	0,1
Kappa leichte Ketten	1,1	0,3
Kappa leichte Ketten Kontrolle	0,8	0,2
Komplement Faktor D	-1,2	0,1
Komplement Faktor D Kontrolle	1,4	0,3
Lambda leichte Ketten	2,2	0,7
Lambda leichte Ketten Kontrolle	0,6	0,3
Leptin	0,0	0,1
Leptin Kontrolle	0,3	0,3
Methionin-Enkephalin	0,4	0,2
Neuropeptid Y	0,5	0,3
Parathyreoid Hormon	1,1	0,5
Retinolbindendes-Protein	-0,5	0,1
Retinolbindendes-Protein Kontrolle	-1,8	0,4
TNF α	0,2	0,1

4.2 Dosis-Wirkungskurven vasokonstriktorischer urämischer Mediatoren

Die Dosis-Wirkungskurven vasokonstriktorischer urämischer Mediatoren wurden für diejenigen urämischen Mediatoren durchgeführt, die beim Screening einen Anstieg des Perfusionsdrucks von $\Delta p \geq 2$ mmHg bedingten. Diese Kriterien trafen auf die urämischen Mediatoren 1-Methyladenosin, Endothelin, Methylguanidin-HCl, p-Kresol, Phenol und Uridin zu.

4.2.1 1-Methyladenosin

1-Methyladenosin wurde für die Erstellung einer Dosis-Wirkungskurve ausgewählt, da es im Screening bei einer Konzentration von 10^{-3} M zu einem signifikanten Anstieg des Perfusionsdrucks von $4,9 \pm 1,1$ mmHg führte. Die Dosis-Wirkungskurve des 1-Methyladenosins (**Abbildung 4**) wurde beginnend mit der kleinsten Menge 10^{-12} mol bis zur maximalen Konzentration von 10^{-6} mol durchgeführt und zeigte einen sigmoidalen Verlauf. Die maximale Wirkung von $31,8 \pm 2,4$ mmHg wurde durch die Bolusinjektion mit einer Dosis von 10^{-6} mol erreicht. Der ED_{50} -Wert betrug $-7,4 \pm 0,2$ log mol.

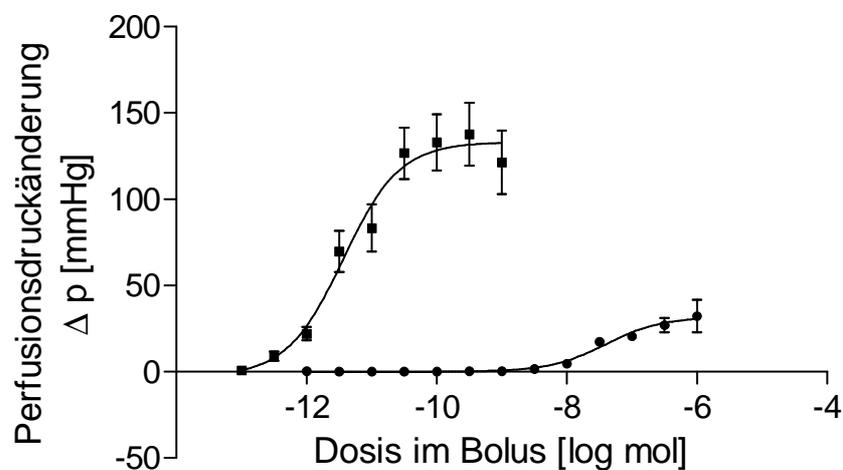


Abbildung 4: Effekt von 1-Methyladenosin (●) im Vergleich zur Kontrollsubstanz Angiotensin II (■) auf den Perfusionsdruck der isolierten perfundierten Rattenniere. Jedes Symbol entspricht dem Mittelwert von mindestens 3 Einzelmessungen.

4.2.2 Endothelin-1

Endothelin-1 zeigte im Screening bei einer Konzentration von 10^{-6} M eine signifikante vasokonstriktorische Perfusionsdruckveränderung von $113,7 \pm 31,3$ mmHg. Der Verlauf der aufgezeichneten Dosis-Wirkungskurve (**Abbildung 5**) ist sigmoidal. Das Maximum von $161,1 \pm 12,4$ mmHg wurde bei einer Dosis von 5×10^{-10} mol erreicht und der ED_{50} -Wert betrug $-10,4 \pm 0,2$ log mol.

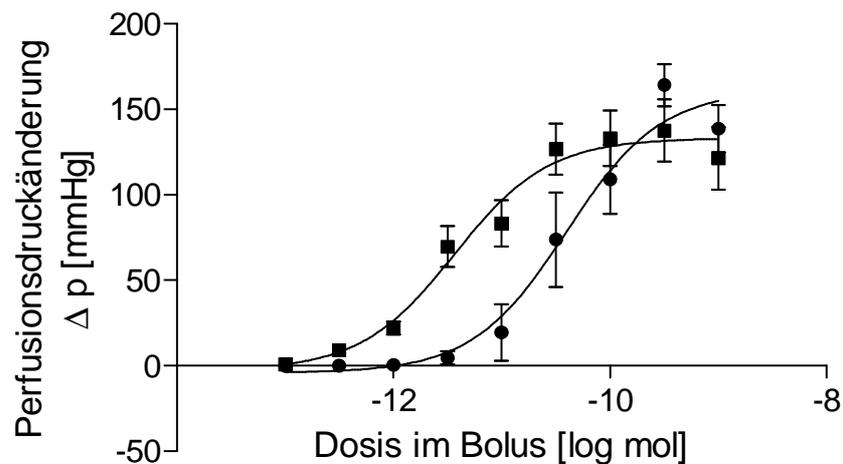


Abbildung 5: Effekt von Endothelin-1 (●) im Vergleich zur Kontrollsubstanz Angiotensin II (■) auf den Perfusionsdruck der isolierten perfundierten Rattenniere. Jedes Symbol entspricht dem Mittelwert von mindestens 3 Einzelmessungen.

4.2.3 Methylguanidin-HCl

Beim Screening erwies sich die 100-fache c_{max} Konzentration des Methylguanidin-HCl als hoch signifikant vasokonstriktorisch mit einem Anstieg des Perfusionsdrucks von $2,3 \pm 0,3$ mmHg. Die erstellte Dosis-Wirkungskurve (**Abbildung 6**) zeigt ein Maximum von $114,5 \pm 6,6$ mmHg bei einer Dosis von 5×10^{-5} mol. Der ED_{50} -Wert der sigmoidalen Kurve betrug $-5,8 \pm 0,1$ log mol.

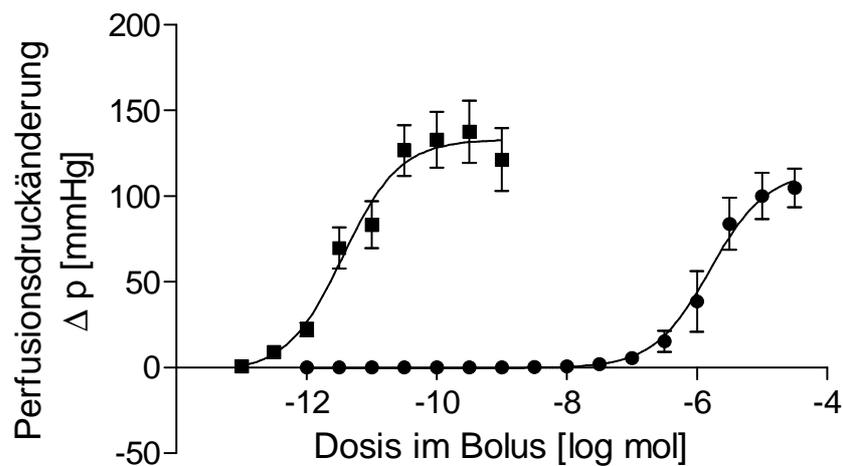


Abbildung 6: Effekt von Methylguanidin-HCl (●) im Vergleich zur Kontrollsubstanz Angiotensin II (■) auf den Perfusionsdruck der isolierten perfundierten Rattenniere. Jedes Symbol entspricht dem Mittelwert von mindestens 3 Einzelmessungen.

4.2.4 Neuropeptid Y

Die Konzentration von 10^{-6} M zeigte beim Screening für Neuropeptid Y eine signifikante Vasokonstriktion von $24,2 \pm 4,8$ mmHg. Die Dosis-Wirkungskurve des Neuropeptids Y (**Abbildung 7**) wurde beginnend mit der kleinsten Menge 10^{-13} mol bis zur maximalen Dosis von 10^{-9} mol durchgeführt und zeigte einen sigmoidalen Verlauf. Das Maximum der Wirkung von $81,3 \pm 8,3$ mmHg wurde bei einer Dosis von 5×10^{-10} mol erreicht und der ED_{50} -Wert betrug $-10,3 \pm 0,2$ log mol.

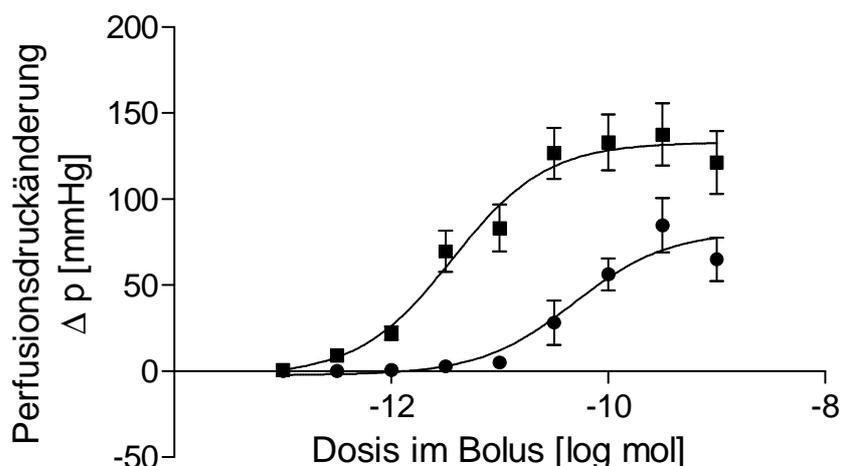


Abbildung 7: Effekt von Neuropeptid Y (●) im Vergleich zur Kontrollsubstanz Angiotensin II (■) auf den Perfusionsdruck der isolierten perfundierten Rattenniere. Jedes Symbol entspricht dem Mittelwert von mindestens 3 Einzelmessungen.

4.2.5 p-Kresol

Die Dosis-Wirkungskurve von p-Kresol (**Abbildung 8**) wurde bis zum Erreichen der Löslichkeitsgrenze bei einer Dosis von 10^{-5} mol durchgeführt. Im Verlauf zeigte sich kein Sättigungsplateau, so dass ein entsprechender ED_{50} -Wert für p-Kresol nicht berechnet werden konnte. Zuvor hatte sich bei Screening für p-Kresol ein signifikanter Anstieg des Perfusionsdrucks bei der 100-fachen c_{max} Konzentration von $4,5 \pm 0,7$ mmHg gezeigt. Zusätzlich wurde eine Dosis-Wirkungskurve mit p-Kresolsulfat aufgezeichnet. P-Kresolsulfat ist das konjugierte Produkt von p-Kresol, das überwiegend im humanen Plasma von gesunden Probanden und Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz nachzuweisen ist [112]. Bei einer Dosis von 10^{-6} mol zeigte sich hier ein hochsignifikanter dilatatorischer Effekt von $-1,8 \pm 0,3$ mmHg, so dass für p-Kresolsulfat zusätzlich eine Dosis-Wirkungskurve bei erhöhtem Basalperfusionsdruck (**Abbildung 16**) durchgeführt wurde.

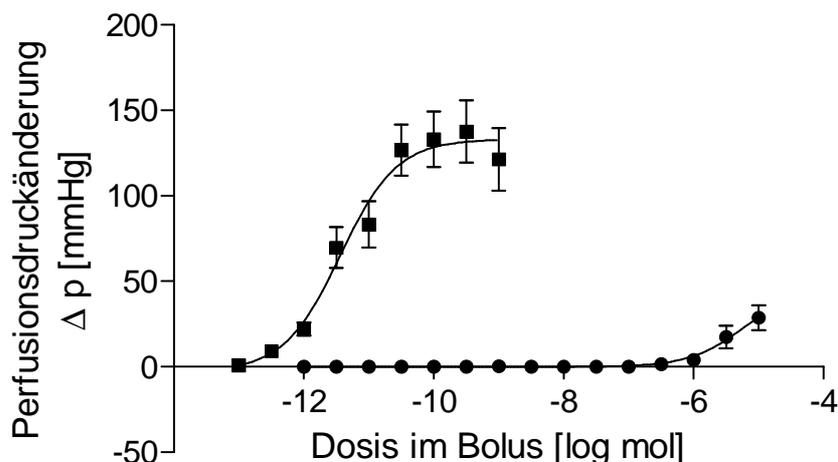


Abbildung 8: Effekt von p-Kresol (●) im Vergleich zur Kontrollsubstanz Angiotensin II (■) auf den Perfusionsdruck der isolierten perfundierten Rattenniere. Jedes Symbol entspricht dem Mittelwert von mindestens 3 Einzelmessungen.

4.2.6 Phenol

Während des zuvor durchgeführten Screenings zeigte Phenol bei der 10-fachen c_{\max} Konzentration einen hoch signifikanten Anstieg des Perfusionsdrucks auf $7,5 \pm 0,5$ mmHg. Dis anschließend durchgeführte Dosis-Wirkungskurve (**Abbildung 9**) zeigte einen sigmoidalen Verlauf. Das Maximum von $25,1 \pm 1,6$ mmHg wurde bei einer Dosis von 10^{-5} mol erreicht und der ED_{50} -Wert betrug $-6,3 \pm 0,1$ log mol. Da nicht Phenol sondern überwiegend das konjugierte Produkt Phenolsulfat und zum Teil auch Phenolglucuronid im humanen Plasma von gesunden Probanden und Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz nachzuweisen ist [112], wurde zusätzlich eine Dosis-Wirkungskurve des urämischen Mediators Phenolsulfat durchgeführt. Diese zeigte keine Vasoaktivität (**Abbildung 9**).

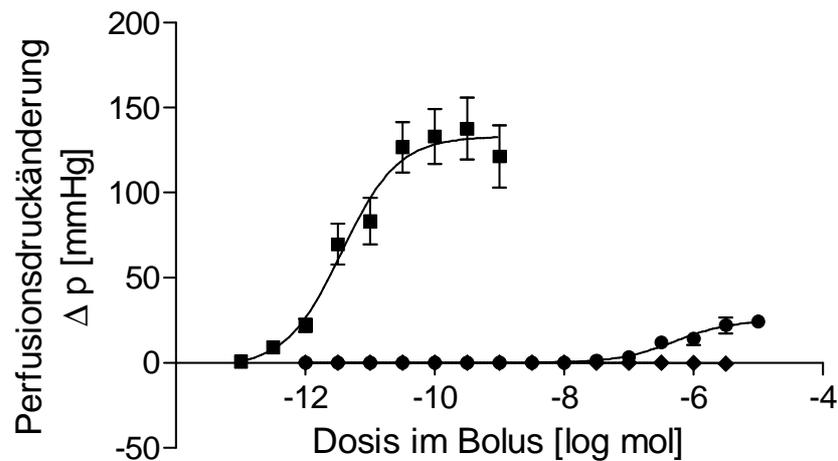


Abbildung 9: Effekt von Phenol (●) und Phenolsulfat (◆) im Vergleich zur Kontrollsubstanz Angiotensin II (■) auf den Perfusionsdruck der isolierten perfundierten Rattenniere. Jedes Symbol entspricht dem Mittelwert von mindestens 3 Einzelmessungen.

4.2.7 Uridin

Die Dosis-Wirkungskurve (**Abbildung 10**) von Uridin verlief sigmoidal. Das Maximum von $55,1 \pm 4,8$ mmHg wurde bei einer Dosis von 5×10^{-7} mol erreicht und der ED_{50} -Wert betrug $-7,9 \pm 0,2$ log mol. Zuvor zeigte sich beim Screening von Uridin eine hoch signifikante Perfusionsdruckänderung von $3,9 \pm 0,5$ mmHg nach der Injektion der c_{max} Konzentration.

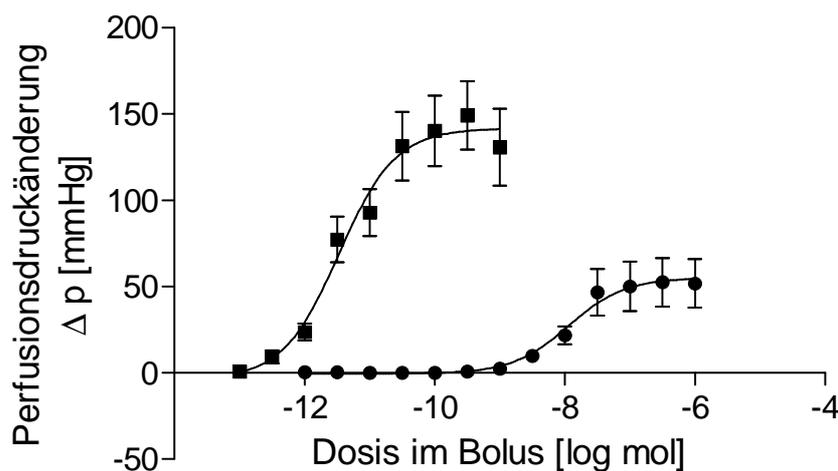


Abbildung 10: Effekt von Uridin (●) im Vergleich zur Kontrollsubstanz Angiotensin II (■) auf den Perfusionsdruck der isolierten perfundierten Rattenniere. Jedes Symbol entspricht dem Mittelwert von mindestens 3 Einzelmessungen.

4.3 Dosis-Wirkungskurven dilatatorischer urämischer Mediatoren

Die Dosis-Wirkungskurven bei einem erhöhten Basaldruck wurden für solche urämischen Mediatoren erstellt, die beim vorherigen Screening einen Abfall des Perfusionsdrucks $-\Delta p \geq -1,5$ mmHg zeigten. Dieser Wert wurde entsprechend dem 3σ -Kriterium gewählt. Nach der Erhöhung des Basaldrucks der isolierten perfundierten Niere durch die Perfusion mit Angiotensin II (200 nM) und der anschließenden Äquilibration stellte sich ein Perfusionsdruck von 100 ± 4 mmHg ein. Diesen Kriterien folgend, wurden Dosis-Wirkungskurven für Adrenomedullin, Atriales natriuretisches Peptid, Harnstoff, Hydrochinin, Kaliumindoxylsulfat und p-Kresolsulfat ermittelt.

4.3.1 Adrenomedullin

Da es im Screening bei einer Konzentration von 10^{-6} M zu einer signifikanten Absenkung des Perfusionsdrucks von $-1,9 \pm 0,4$ mmHg führte, wurde Adrenomedullin für die Erstellung einer Dosis-Wirkungskurve bei erhöhtem Basalperfusionsdruck (**Abbildung 11**) ausgewählt. Der Kurvenverlauf verlief sigmoidal. Das Minimum von $-38,9 \pm 1,8$ mmHg wurde bei einer Dosis von 5×10^{-10} mol erreicht und der ED_{50} -Wert betrug $-10,7 \pm 0,2$ log mol.

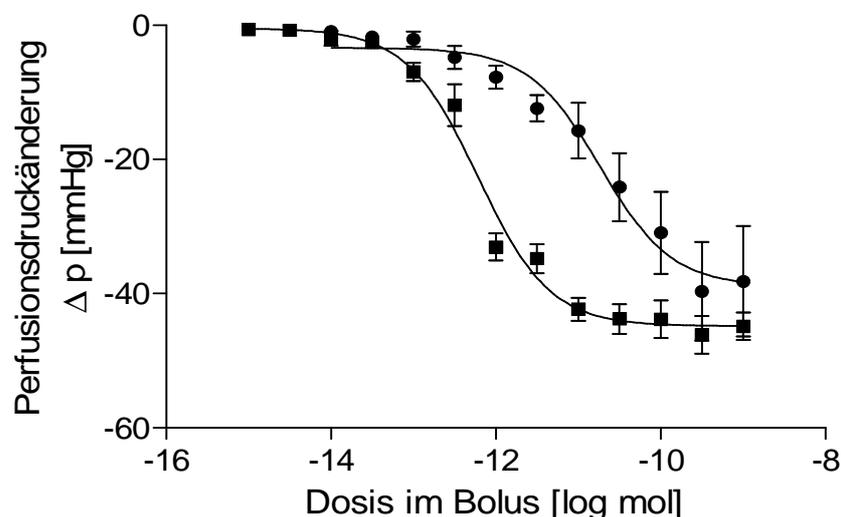


Abbildung 11: Effekt von Adrenomedullin (●) im Vergleich zur Kontrollsubstanz Bradykinin (■) auf den Perfusionsdruck der isolierten perfundierten Rattenniere. Jedes Symbol entspricht dem Mittelwert von mindestens 3 Einzelmessungen.

4.3.2 Atriales natriuretisches Peptid (ANP)

ANP zeigte im Screening bei einer Konzentration von 10^{-5} M eine hoch signifikante Verringerung des Perfusionsdrucks um $-4,8 \pm 0,8$ mmHg. Die Dosis-Wirkungskurve bei erhöhtem Basalperfusionsdruck (**Abbildung 12**) verlief sigmoidal. Das Minimum von $-33,1 \pm 2,4$ mmHg wurde bei einer Dosis von 5×10^{-9} mol erreicht und der ED_{50} -Wert betrug $-10,2 \pm 0,2$ log mol.

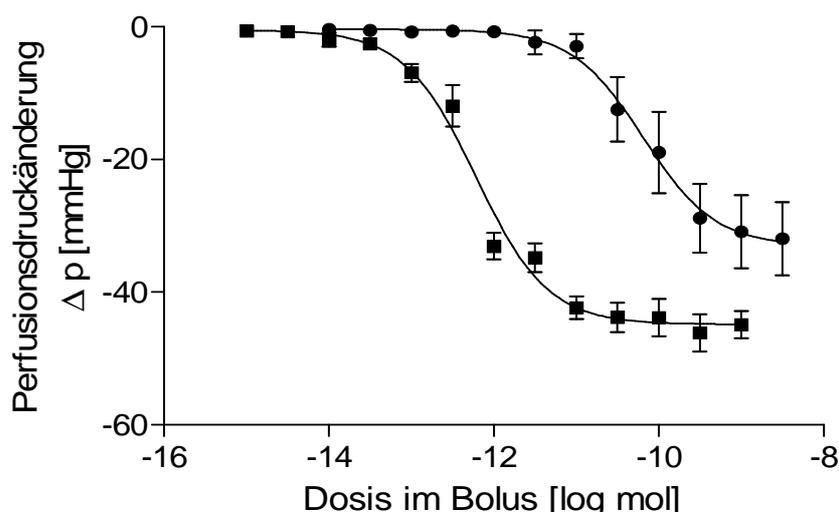


Abbildung 12: Effekt von ANP (●) im Vergleich zur Kontrollsubstanz Bradykinin (■) auf den Perfusionsdruck der isolierten perfundierten Rattenniere. Jedes Symbol entspricht dem Mittelwert von mindestens 3 Einzelmessungen.

4.3.3 Harnstoff

Bei einer 10-fachen c_{\max} Konzentration zeigte Harnstoff im Screening eine signifikante Vasodilation von $-3,3 \pm 0,7$ mmHg und wurde im Folgenden für die Erstellung einer Dosis-Wirkungskurve bei erhöhtem Basalperfusionsdruck (**Abbildung 13**) ausgewählt. Der Kurvenverlauf verlief sigmoidal. Das Minimum von $22,7 \pm 0,9$ mmHg wurde bei einer Dosis von 5×10^{-4} mol erreicht und der ED_{50} -Wert betrug $-4,5 \pm 0,1$ log mol.

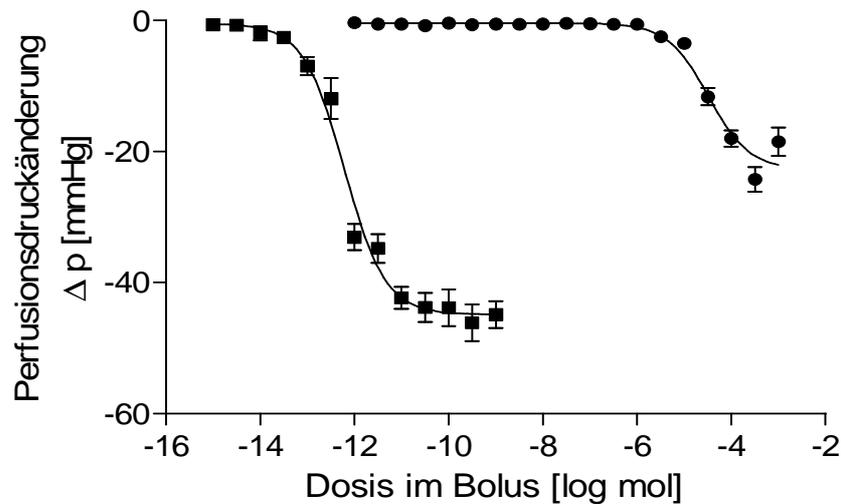


Abbildung 13: Effekt von Harnstoff (●) im Vergleich zur Kontrollsubstanz Bradykinin (■) auf den Perfusionsdruck der isolierten perfundierten Rattenniere. Jedes Symbol entspricht dem Mittelwert von mindestens 3 Einzelmessungen.

4.3.4 Hydrochinon

Hydrochinon zeigte im Screening bei einer 100-fachen c_{\max} Konzentration einen signifikanten Abfall der Perfusionsdrucks von $-1,6 \pm 0,1$ mmHg auf. Der Verlauf der anschließend durchgeführten Dosis-Wirkungskurve bei erhöhtem Basalperfusionsdruck (**Abbildung 14**) war sigmoidal und erreichte sein Minimum von $-17,6 \pm 1,8$ mmHg bei einer Dosis von 5×10^{-7} mol. Der ED_{50} -Wert betrug $-8,0 \pm 0,2$ log mol.

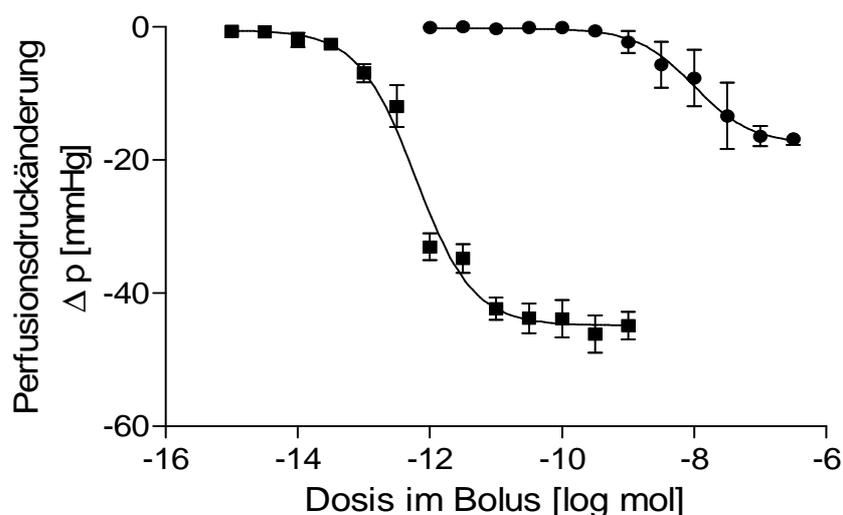


Abbildung 14: Effekt von Hydrochinon (●) im Vergleich zur Kontrollsubstanz Bradykinin (■) auf den Perfusionsdruck der isolierten perfundierten Rattenniere. Jedes Symbol entspricht dem Mittelwert von mindestens 3 Einzelmessungen.

4.3.5 Kaliumindoxylsulfat

Kaliumindoxylsulfat zeigte im Screening eine hoch signifikante Absenkung des Perfusionsdrucks von $-3,6 \pm 0,6$ mmHg bei einer 100-fachen c_{\max} Konzentration. Die Dosis-Wirkungskurve von Kaliumindoxylsulfat (**Abbildung 15**) wurde bis zum Erreichen der Löslichkeitsgrenze bei einer Dosis von 10^{-5} mol durchgeführt. Im Verlauf zeigte sich kein Sättigungsplateau, so dass ein entsprechender ED_{50} -Wert für Kaliumindoxylsulfat nicht berechnet werden konnte.

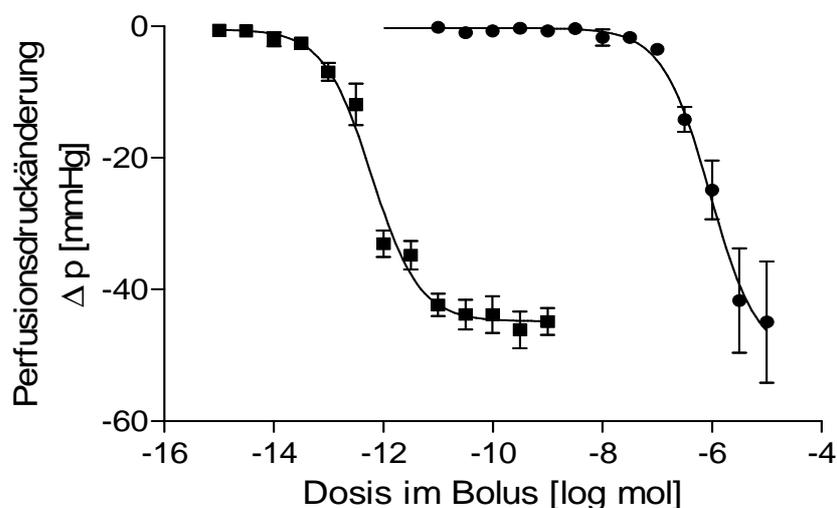


Abbildung 15: Effekt von Kaliumindoxylsulfat (●) im Vergleich zur Kontrollsubstanz Bradykinin (■) auf den Perfusionsdruck der isolierten perfundierten Rattenniere. Jedes Symbol entspricht dem Mittelwert von mindestens 3 Einzelmessungen.

4.3.6 p-Kresolsulfat

Die Dosis-Wirkungskurve von p-Kresolsulfat (**Abbildung 16**) wurde zusätzlich zu der Dosis-Wirkungskurve von p-Kresol (**Abbildung 8**) durchgeführt, da im humanen Plasma überwiegend p-Kresolsulfat als konjugiertes Produkt von p-Kresol vorliegt [112]. Der Kurvenverlauf bei erhöhtem Basaldruck verlief linear, so dass ein entsprechender ED_{50} -Wert für p-Kresolsulfat nicht berechnet werden konnte.

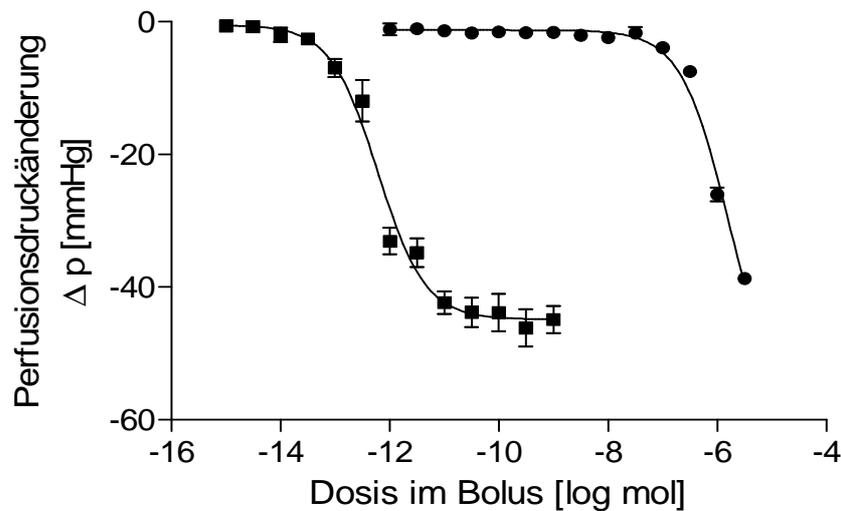


Abbildung 16: Effekt von p-Kresolsulfat (●) im Vergleich zur Kontrollsubstanz Bradykinin (■) auf den Perfusionsdruck der isolierten perfundierten Rattenniere. Jedes Symbol entspricht dem Mittelwert von mindestens 3 Einzelmessungen.

4.4 Vergleich der vasoaktiven Potenzen

Die ED_{50} -Werte sowohl der vasokonstriktorisches als auch der dilatatorischen urämischen Mediatoren (**Tabelle 9**) weisen eine erhebliche Spannweite auf. Ebenfalls variierten die erreichten Maximalkonzentrationen beträchtlich und es findet sich keine einheitliche Dosis der einzelnen Substanzen, die zum Vergleich der vasoaktiven Potenzen herangezogen werden kann. Die Auflistung der ED_{50} -Werte zeigt, dass die vasoaktiven urämischen Mediatoren anhand der Ergebnisse in zwei Gruppen zu unterteilen sind. Einen ED_{50} -Wert um -10 log mol besitzen Neuropeptid Y, Endothelin-1, Adrenomedullin und ANP. Die übrigen urämischen Mediatoren weisen einen ED_{50} -Wert von -8 bis -4 log mol auf.

Tabelle 9: Übersicht der ED₅₀-Werte vasokonstriktorischer und dilatatorischer urämischer Mediatoren, angegeben in Mittelwert (MW) ± Varianzbreite (SEM)

Urämische Mediatoren vasokonstriktorisch	ED₅₀-Wert (log mol)
Angiotensin II (Kontrolle)	-11,4±0,2
Endothelin-1	-10,4±0,2
Neuropeptid Y	-10,3±0,2
Uridin	-7,9±0,2
1-Methyladenosin	-7,4±0,2
Phenol	-6,3±0,1
Methylguanidin-HCl	-5,8±0,1
p-Kresol	Wert konnte nicht bestimmt werden ⁺
Urämische Mediatoren vasodilatatorisch	ED₅₀-Wert (log mol)
Bradykinin (Kontrolle)	-12,2±0,1
Adrenomedullin	-10,7±0,2
ANP	-10,2±0,2
Hydrochinon	-8,0±0,2
Harnstoff	-4,5±0,1
Kaliumindoxylsulfat	Wert konnte nicht bestimmt werden ⁺
p-Kresolsulfat	Wert konnte nicht bestimmt werden ⁺

⁺ Die Dosis-Wirkungskurve dieses urämischen Mediators verläuft linear.

Bei einem Vergleich der maximalen Wirkung der vasoaktiven Substanzen mit einem ED₅₀-Werte um -10 log mol bei einer Bolusinjektion von 10⁻⁹ mol, zeigt Endothelin-1 ein höheres vasokonstriktorisches Potential als Neuropeptid Y und Adrenomedullin ein stärkeres dilatatorisches Potential als ANP.

Für die zweite Gruppe ergibt der Vergleich der Maximalantworten bei einer Bolusinjektion von 10⁻⁶ mol folgende Wirkungsrangfolge für die vasokonstriktorischen Mediatoren: Uridin > Methylguanidin-HCl > 1-Methyladenosin > Phenol > p-Kresol. Die dilatatorische Wirkungsrangfolge lautet: p-Kresolsulfat > Kaliumindoxylsulfat > Hydrochinon > Harnstoff.

4.5 Untersuchung der Rezeptorspezifität der vasoaktiven

Nukleoside

4.5.1 Hemmung des A₁-Rezeptors

Die Hinzugabe des spezifischen A₁-Rezeptorantagonisten DPCPX (10µM) zur Perfusionslösung hatte keine Auswirkung auf den Basaldruck der isolierten perfundierten Niere. Auch

die vasokonstriktorische Antwort auf die Bolusinjektion der Kontrollsubstanzen α,β -meATP und Angiotensin II blieb weiterhin vollständig erhalten. Die Bolusinjektion von *R*-PIA führte jedoch zu keiner vasokonstriktorischen Antwort. Für den urämischen Mediator 1-Methyladenosin (**Abbildung 17a**) führte die Blockierung des A_1 -Rezeptor zur einer deutlichen Rechtsverschiebung des Dosis-Wirkungskurve. Bei einer Dosis von 10^{-6} mol bestand in Anwesenheit von DPCPX noch eine Restantwort von 5 mmHg. Die Dosis-Wirkungskurve des Methylguanidin-HCl's (**Abbildung 17b**) zeigte in Anwesenheit des DPCPX eine um 30 mmHg geringere maximale Druckantwort. Die Dosis-Wirkungskurven des urämischen Mediators Uridin (**Abbildung 17c**) zeigte hingegen nach Zugabe des spezifischen A_1 -Rezeptorantagonists eine vollständige Blockade der zuvor aufgezeichneten vasokonstriktorischen Wirkung.

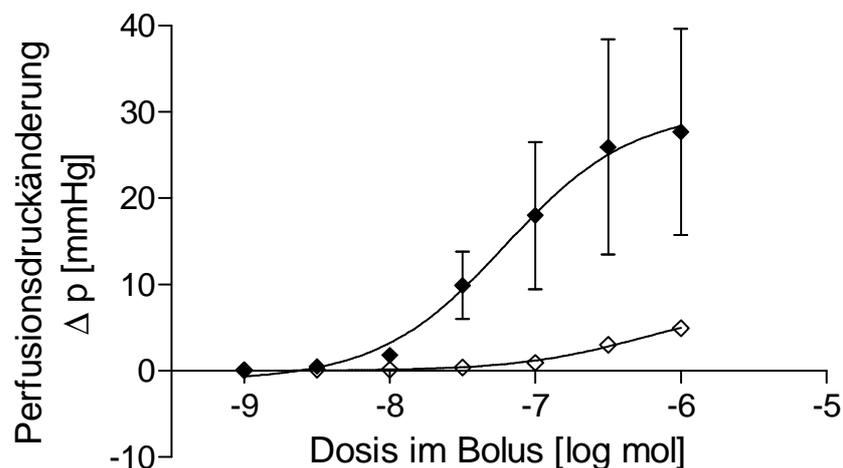


Abbildung 17a: Dosis-Wirkungskurve des 1-Methyladenosins in Abwesenheit (◆) und Anwesenheit (◇) des A_1 -Antagonisten DCPCX auf den Perfusionsdruck der isolierten perfundierten Rattenniere. Jedes Symbol entspricht dem Mittelwert von mindestens 3 Einzelmessungen.

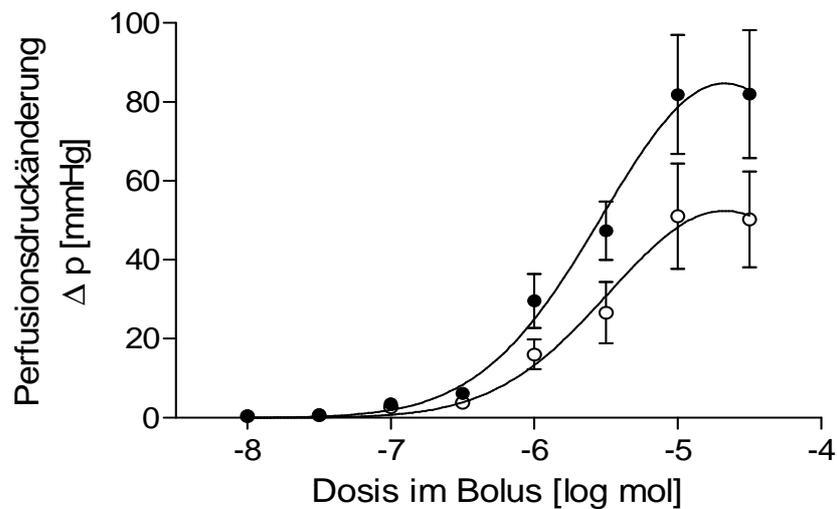


Abbildung 17b: Dosis-Wirkungskurve des Methylguanidins-HCl in Abwesenheit (●) und Anwesenheit (○) des A_1 -Antagonisten DCPCX auf den Perfusionsdruck der isolierten perfundierten Rattenniere. Jedes Symbol entspricht dem Mittelwert von mindestens 3 Einzelmessungen.

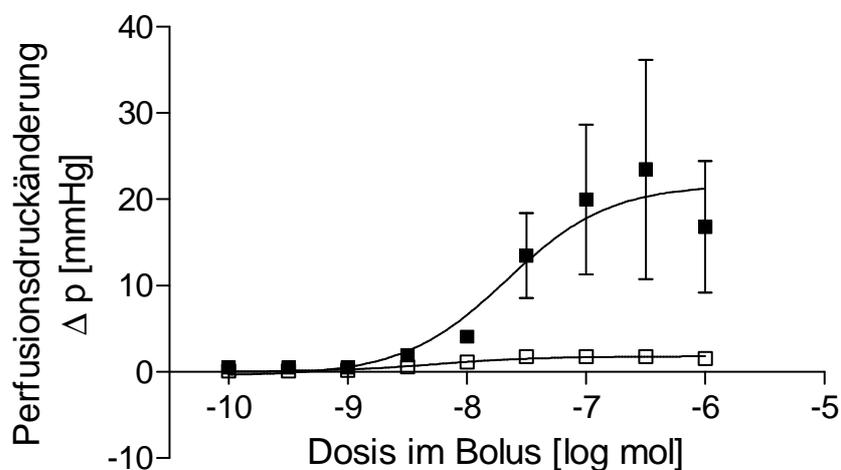


Abbildung 17c: Dosis-Wirkungskurve des Uridins in Abwesenheit (■) und Anwesenheit (□) des A_1 -Antagonisten DCPCX auf den Perfusionsdruck der isolierten perfundierten Rattenniere. Jedes Symbol entspricht dem Mittelwert von 3 mindestens Einzelmessungen.

4.5.2 Unspezifische Hemmung des P_2 -Rezeptors

Nach Hinzugabe von Suramin in einer Konzentration von $25\mu\text{M}$ in die Perfusions-Lösung und nachfolgender Äquilibration erhöhte sich der Basaldruck der isolierten perfundierten Niere um 9 ± 3 mmHg. Unter diesen Bedingungen führte die Bolusinjektion der Kontrollsubstanz α,β -meATP zu keiner vasokonstriktorischen Antwort, während sie bei

Angiotensin II weiterhin vollständig erhalten war. Die Dosis-Wirkungskurven der Nukleoside 1-Methyladenosin, Methylguanidin-HCl und Uridin wurden vor und nach der Zugabe des unspezifischen P₂-Rezeptorblockers durchgeführt. Für 1-Methyladenosin (**Abbildung 18a**) verliefen die beiden Dosis-Wirkungskurven bis zu einer Dosis von 5×10^{-6} mol annähernd gleich. Bei der Dosis von 10^{-6} mol zeigte sich nach Zugabe von Suramin ein um 5 mmHg geringer Mittelwert der Einzelmessungen im Vergleich zur Abwesenheit des Rezeptorblockers. Die Dosis-Wirkungskurven des Methylguanidins-HCl (**Abbildung 18b**) in Abwesenheit und Anwesenheit des Suramins ergaben keine bedeutenden Unterschiede. Für Uridin zeigen die Dosis-Wirkungskurven (**Abbildung 18c**) hingegen, dass es nach Suraminzugabe zur früheren und stärkeren Vasokonstriktion des urämischen Mediators kam.

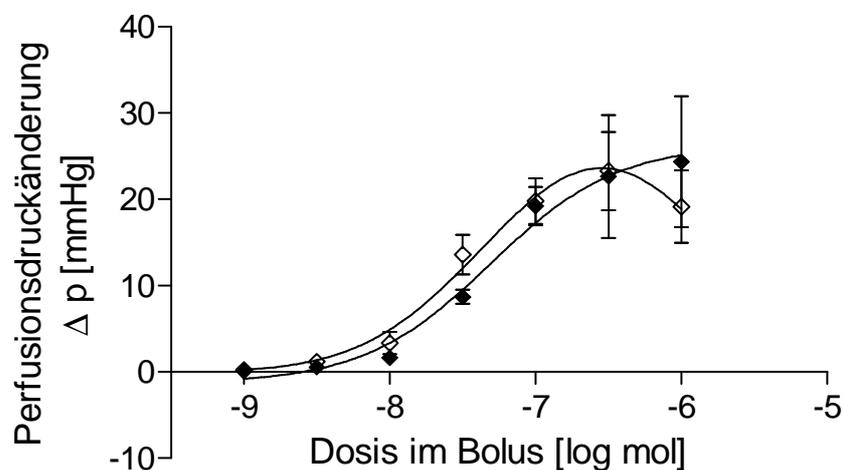


Abbildung 18a: Dosis-Wirkungskurve des 1-Methyladenosins in Abwesenheit (◆) und Anwesenheit (◇) des unspezifischen P₂-Antagonisten Suramin auf den Perfusionsdruck der isolierten perfundierten Rattenniere. Jedes Symbol entspricht dem Mittelwert von mindestens 3 Einzelmessungen.

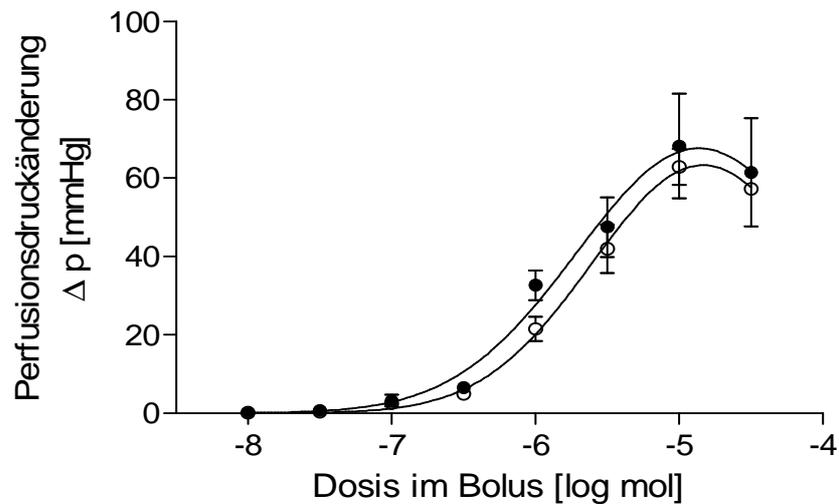


Abbildung 18b: Dosis-Wirkungskurve des Methylguanidins-HCl in Abwesenheit (●) und Anwesenheit (○) des unspezifischen P_2 -Antagonisten Suramin auf den Perfusionsdruck der isolierten perfundierten Rattenniere. Jedes Symbol entspricht dem Mittelwert von mindestens 3 Einzelmessungen.

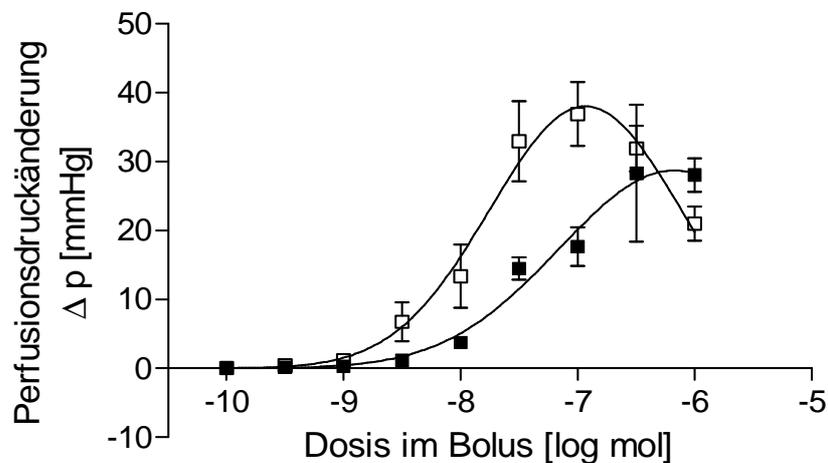


Abbildung 18c: Dosis-Wirkungskurve des Uridins in Abwesenheit (■) und Anwesenheit (□) des unspezifischen P_2 -Antagonisten Suramin auf den Perfusionsdruck der isolierten perfundierten Rattenniere. Jedes Symbol entspricht dem Mittelwert von mindestens 3 Einzelmessungen.

5 Diskussion

Die chronische Niereninsuffizienz führt im Verlauf ihrer Stadien nicht nur zum terminalen Nierenversagen sondern auch zu einer zusätzlichen Schädigung weiterer Organsysteme wie z.B. des Herz-Kreislaufsystems. Als Folge der reduzierten Urinexkretion werden viele unterschiedliche Mediatoren im menschlichen Organismus zurückgehalten, die zur Entstehung eines urämischen Syndroms beitragen [9]. Die genauen zugrundeliegenden pathophysiologischen Mechanismen sind in diesem Zusammenhang bisher nur teilweise und unvollständig untersucht. Eine Aufklärung der Pathomechanismen, die die urämischen Mediatoren entfalten, ist aber ausschlaggebend für die Entwicklung neuer Präventions- sowie Therapiestrategien für Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz. Bisher wurde der Schwerpunkt der wissenschaftlichen Untersuchungen zu dieser Fragestellung auf die Untersuchung einzelner urämischer Mediatoren gelegt. Ein neuer Ansatz des internationalen Forschungsverbunds „*European Uremic Toxins Work Group (EUTox)*“ ist die systematische Untersuchung möglicher Pathomechanismen sämtlicher beschriebener und noch unbekannter urämischer Mediatoren. Im Rahmen dieses Projektes wurden in der hier vorliegenden Arbeit 74 gegenwärtig identifizierte urämische Mediatoren systematisch auf ihr vasoaktives Potential mit Hilfe eines Bioassays untersucht. Als Bioassay diente der Nierenperfusionstest (**Abbildung 1**).

Die Ergebnisse zeigen an der isolierten, das heißt ex situ perfundierten Rattenniere einen vasokonstriktiven Effekt der urämischen Mediatoren 1-Methyladenosin, Endothelin-1, Methylguanidin-HCl, Neuropeptid Y, Phenol, p-Kresol und Uridin, sowie einen vasodilatativen Effekt von Adrenomedullin, Atriales natriuretisches Peptid, Harnstoff, Hydrochinon, Kaliumindoxylsulfat und p-Kresolsulfat. Diese vasoaktiven urämischen Mediatoren werden in den folgenden Abschnitten einzeln diskutiert.

Für die Beantwortung der klinisch wichtigen Frage, ob ein bestimmter Mediator bei einer bestimmten Konzentration eine pathophysiologisch bedeutsame vasoaktive Wirkung hat, ist ein direkter Vergleich der an urämischen Patienten gefundenen c_{\max} -Werte (vgl. **Tabelle 2** und **3**) mit den hier aufgenommenen Dosis-Wirkungskurven nicht möglich. In dem hier benutzten experimentellen Aufbau (**Abbildung 1**) wurde mit dem Bolusvolumen eine absolute Dosis des Mediators über das Injektionsventil in das Perfusionssystem eingeschleust. Bei einem Bolusvolumen von 80 μl und einer Mediatorkonzentration im Bolus von 10^{-6} M

wären das z.B. 8×10^{-11} mol. Wie hoch damit dann die Konzentration am Ort der Wirkung, also an den reagiblen Gefäßzellen war, lässt sich in absoluten Einheiten nicht sagen, weil der Verdünnungsfaktor im System nicht bekannt ist. Insofern ist es konsequent, auf der Abszisse der Dosis-Wirkungskurven nur die injizierte Menge in mol anzugeben. Da der Verdünnungsfaktor von der Injektionsstelle bis zum Präparat bei konstantem Fluss aber immer der gleiche sein dürfte, kann angenommen werden, dass bei Veränderung der Konzentrationen im Bolus sich die Konzentrationen am Wirkort proportional verändern. Die Abszisse entspricht damit also, bis auf den unbekanntem Verdünnungsfaktor, einer Konzentrations-Achse.

Entscheidend für die Aussagekraft des hier benutzten Assays ist, dass die Perfusionsbedingungen für alle geprüften Substanzen gleich waren. Dies bedeutet im wesentlichen, dass immer dasselbe Bolusvolumen, dieselben Schlauchdurchmesser und die gleiche Flussrate benutzt wurde. Da dies der Fall war, lassen sich die Wirkungen verschiedener Mediatoren auch quantitativ vergleichen.

Bei dieser Vorgehensweise liegt es nahe, die „vasoaktive Potenz“ bisher nicht untersuchter Mediatoren mit der eines gut untersuchten physiologisch bedeutsamen Mediators als Standardsubstanz zu vergleichen, für den sogar die Wirkung bei definierter Konzentration im Gesamtsystem bekannt ist.

Als klinisch bedeutsamer sehr potenter Vasokonstriktor wurde daher Angiotensin II (AngII) in der vorliegenden Arbeit als Referenz eingesetzt (**Abbildung 2**). Die AngII-Plasmakonzentration liegt bei gesunden, normotensiven Patienten im Bereich von 31×10^{-12} M [114]. Der ED_{50} -Wert des AngII lag in dem verwendeten Bioassay der isolierten perfundierten Rattenniere bei $-11,4 \pm 0,2$ log mol (**Tabelle 9**). Bei den hier zum Vergleich herangezogenen c_{max} Konzentrationen der urämischen Mediatoren handelt es sich um die höchsten je bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz gemessenen Werte. Diese Konzentrationen waren der Ausgangswert aller bisher durchgeführten Untersuchungen und sollten auch allen noch folgenden systematischen Studien möglicher Pathomechanismen urämischer Mediatoren zugrunde gelegt werden.

Tabelle 9 zeigt, dass die hier ermittelten ED_{50} -Werte sowohl der vasokonstriktorisch als auch der vasodilatatorisch wirksamen Mediatoren um mindestens eine bis zwei, überwiegend aber mehrere Zehnerpotenzen über denen der physiologisch wichtigen Mediatoren AngII, bzw. Bradykinin lagen. Prinzipiell offen muss aber gegenwärtig die Frage bleiben, in wie weit die

hier sowohl im Vergleich der Substanzen untereinander als auch die in Bezug auf die absoluten Dosen gewonnenen Werte an der Rattenniere auf den Menschen übertragbar sind.

5.1 Urämische Mediatoren mit vasokonstriktorischem Effekt

5.1.1 1-Methyladenosin

1-Methyladenosin ist ein an der N¹-Position mit einem Methyl-Rest substituiertes Adenosinanalogen, das als Bestandteil von Ribonukleinsäuren in eukaryonten Zellen vorkommt. Olsson und Kollegen zeigten durch die Untersuchung der Wirkung von 69 unterschiedlichen Adenosinanaloga auf die koronare Vasoaktivität bei Hunden, dass die N¹-Substitution des Adenosins eine deutliche Abschwächung der vasoaktiven Potenz bewirkt [114]. Die vasodilatorische Potenz des 1-Methyladenosins betrug hier weniger als 5% der von Adenosin. Eine Vasoaktivität von 1-Methyladenosin in der Niere wurde zuvor noch nicht untersucht. Die große strukturelle Ähnlichkeit zum Adenosin lässt jedoch vermuten, dass die beobachtete Vasokonstriktion ebenfalls über eine Interaktion mit A₁-Rezeptoren erfolgt. Deren Aktivierung würde an der Niere zu mehreren unterschiedlichen Effekten führen, wie Vasokonstriktion der afferenten Arteriolen, Verminderung der glomerulären Filtrationsrate, Hemmung der Reninsekretion und Freisetzung von Neurotransmittern. Dass bei der in dieser Arbeit nachgewiesenen Vasoaktivität des 1-Methyladenosins A₁-Rezeptoren tatsächlich eine wesentliche Rolle spielen, belegen die in **Abbildung 17a** (Abschnitt 4.5.1) gezeigten Experimente. In Gegenwart des spezifischen A₁-Rezeptorantagonisten 8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (DPCPX) war die vasokonstriktorisches Antwort deutlich gehemmt [74]. Neben der Diskussion der Vasoaktivität des 1-Methyladenosins im Allgemeinen ist die Einordnung der vorliegenden urämischen Plasmakonzentrationen für die Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz bedeutsam. Die Differenzen zwischen der Plasmakonzentration von Angiotensin II und der c_{max} Konzentration von 1-Methyladenosin liegt in dem Bereich von 0,4 x 10⁴. Die Differenz der ED₅₀-Werte (**Tabelle 9**) von Angiotensin II und 1-Methyladenosin beträgt einen Faktor von etwa 10⁴. Aus den erörterten Tatsachen lässt sich Schlussfolgern, dass die urämischen Konzentrationen des 1-Methyladenosins vermutlich nicht im aufsteigenden Abschnitt seiner Dosis-Wirkungskurve liegen und hierdurch keinen direkten pathophysiologischen vasoaktiven Effekt bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ausüben.

5.1.2 Endothelin-1

Endothelin (ET) wurde erstmals 1988 von Yanagisawa und Kollegen aus dem Kulturmedium isolierter Schweineaortenzellen isoliert [116]. Derzeit werden mit ET-1, ET-2 und ET-3 drei Isoformen unterschieden. Das im menschlichen Gefäßsystem vorherrschende Endothelin-1 besitzt eine 10mal größere vasokonstriktorische Potenz als Angiotensin II. Es entfaltet seine Wirkung vor allem über ET_A-Rezeptoren auf glatten Gefäßmuskelzellen. Der ET_B-Rezeptor erkennt die drei Isoformen annähernd gleich gut, ist aber im Vergleich zum ET_A-Rezeptor weniger zahlreich vorhanden. Die Stimulation des ET_B-Rezeptors bewirkt an glatten Gefäßmuskelzellen eine Vasokonstriktion und an Endothelzellen, über eine Freisetzung von NO, eine Vasodilatation [71]. Das Endothelinsystem ist an der Entstehung einer Vielzahl kardiovaskulärer Erkrankungen wie arterieller Hypertension, primärer pulmonaler Hypertension, Arteriosklerose, Herzinsuffizienz und koronarer Herzerkrankung beteiligt. Bei Patienten mit essentieller Hypertension kann durch Gabe des unselektiven ET_A/ET_B-Rezeptor-Antagonisten Bosentan eine signifikante Blutdrucksenkung bewirkt werden. Ferner kann die hämodynamische Situation von Patienten mit Herzinsuffizienz durch die Gabe von Bosentan verbessert werden [71,84].

Die c_{\max} Konzentration für Endothelin-1 beträgt 52×10^{-12} M und liegt damit leicht höher als die Plasmakonzentration von Angiotensin II gesunder Probanden. Die ED₅₀-Werte dieser Substanzen (**Tabelle 9**) unterscheiden sich jedoch um eine 10er Potenz. Der Abstand der ED₅₀-Werte ist größer als der Abstand zwischen den zuvor betrachteten Konzentrationen. Dieser Vergleich lässt vermuten, dass von den urämischen Konzentrationen des Endothelins-1 bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz kein direkter pathophysiologischer vasoaktiver Effekt zu erwarten ist.

5.1.3 Methylguanidin-HCl

Methylguanidin ist eine Guanidinverbindung, die eine strukturelle Ähnlichkeit mit konstitutiven und indizierbaren NO-Synthase-Inhibitoren besitzt. 1994 bestätigten MacAllister und Kollegen für hohe Konzentrationen von Methylguanidin (1000 µM) eine hemmende Wirkung auf die NO-Synthase in vorkontrahierten humanen Venen (Vena saphena) [117]. Zusätzlich wird vermutet, dass weitere Mechanismen, wie Hemmung der Na⁺-K⁺-ATPase, Katecholaminfreisetzung aus terminalen Nervenendigungen, sowie Hemmung der Monoaminoxidase oder Diaminoxidase den Gefäßtonus beeinflussen [117].

Für die Wirkung von Methylguanidin-HCl in der Niere liegen gegenwärtig noch keine Daten vor.

Für Methylguanidin-HCl im Vergleich zu Angiotensin II ist die Differenz der beschriebenen Plasmakonzentrationen größer als die Differenz der jeweiligen ED₅₀-Werte (**Tabelle 9**). Für Angiotensin II ist bekannt, dass es bereits bei der Plasmakonzentration gesunder Probanden einen vasokonstriktoreischen Effekt vermittelt. Diese Konzentration des Angiotensins II muss sich ebenso wie die urämische Konzentration des Methylguanidin-HCl im aufsteigenden Abschnitt seiner Dosis-Wirkungskurve befinden. Demzufolge ist diesem urämischen Mediator ein pathophysiologisch relevanter direkter vasoaktiver Effekt bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz zuzuschreiben.

5.1.4 Neuropeptid Y

Neuropeptid Y (NPY) ist ein aus 36 Aminosäuren bestehender Neurotransmitter mit großer Verbreitung im zentralen und peripheren Nervensystem [99,100]. Im sympathischen Nervensystem kommt NPY in größeren Vesikeln als Ko-Transmitter von Noradrenalin vor und wird bei Stimulation zusätzlich freigesetzt. Über sowohl auf arteriellen als auch venösen glatten Gefäßmuskelzellen vorkommenden postsynaptischen Y₁-Rezeptoren wird eine langanhaltende Vasokonstriktion erreicht. Darüberhinaus kann NPY die vasokonstriktive Wirkung von Noradrenalin und Angiotensin II potenzieren. Präsynaptische Y₂-Rezeptoren führen über eine negative Rückkopplung zur verminderten Ausschüttung von Noradrenalin und Verminderung des Sympathikustonus [99,100].

Die c_{max} Konzentration des urämischen Mediators Neuropeptid Y beträgt 27×10^{-12} M und ist damit leicht niedriger als die Angiotensin II Plasmakonzentration gesunder Probanden von 31×10^{-12} M. Die ED₅₀-Werte dieser Substanzen (**Tabelle 9**) unterscheiden sich jedoch um etwas mehr als eine Größenordnung, so dass von den urämischen Konzentrationen des Neuropeptids Y bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz kein direkter vasoaktiver Effekt zu erwarten ist.

5.1.5 Uridin

Uridin ist wie Adenosin ein beim Menschen endogen synthetisiertes Nukleosid. Yilmaz und Kollegen untersuchten 2008 erstmalig die Auswirkung einer intravenösen Gabe von Uridin bei normotensiven Ratten [119]. Zuvor war als Hauptagonisten am A₁-Rezeptor nur Adenosin und der Adenosin-Metabolit Inosin bekannt [73], sowie einige synthetisch hergestellte

unselektive A_1 -Rezeptoragonisten wie z.B. 5'-N-ethylcarboxamidoadenosin (NECA) und selektive A_1 -Rezeptoragonisten wie z.B. (*R*)*N*6-phenylisopropyladenosin (*R*-PIA) [74]. Uridin bewirkte eine dosis-abhängige Absenkung des Blutdrucks sowie der Herzfrequenz. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt auf das kardiovaskuläre System hauptsächlich über periphere A_1 -Rezeptoren vermittelt wird. Am Herzen wirken A_1 -Rezeptoragonisten negativ chronotrop, dromotrop und inotrop [74]. Die Blutdrucksenkung ist das Resultat der eintretenden Bradykardie bei gleichzeitig verminderter Kontraktionskraft des Herzens. In der Klinik wird deshalb zur raschen Kupierung paroxysmaler supraventrikulärer Tachykardien Adenosin intravenös als Bolusinjektion appliziert und der negativ-dromotrope Effekt ausgenutzt [71]. In der Niere vermitteln A_1 -Agonisten hingegen eine Vasokonstriktion der afferenten Arteriolen, eine Verminderung der glomerulären Filtrationsrate, sowie der Hemmung der Reninsekretion und der Freisetzung von Neurotransmittern [74].

Die Differenz der Plasmakonzentrationen des Angiotensin II und der c_{\max} Konzentration des Uridins ist doppelt so groß wie die Differenz der entsprechenden ED_{50} -Werte. Dementsprechend ist zu vermuten, dass urämische Konzentrationen des Uridins bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz einen direkten pathophysiologischen Effekt haben.

5.2 Urämische Mediatoren mit vasodilatatorischem Effekt

5.2.1 Adrenomedullin

Das aus 52 Aminosäuren bestehende Peptid Adrenomedullin (AM) wurde 1993 erstmalig von Kitamura und Kollegen aus Phäochromozytomzellen isoliert [79]. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass dieser urämische Mediator von Endothelzellen sowie glatten Muskelzellen im Nebennierenmark, Lunge und den Nieren synthetisiert wird. Das aktive Fragment AM_{13-52} besitzt sowohl vasodilative als auch hypotensive Eigenschaften [80]. Ein von Haynes und Kollegen durchgeführter Nierenperfusionstest mit Rattennieren konnte diese Ergebnisse bestätigen [118]. Die Vasodilation der Gefäße erfolgt über die Aktivierung von CGRP- und AM-Rezeptoren. Zusätzlich kann in einigen Geweben die Gefäßrelaxation NO-abhängig und durch Interaktion mit einem K^+ -Kanal entstehen. Grundsätzlich betrachtet ist das Verständnis der zusammenspielenden Faktoren hier jedoch nach wie vor unvollständig [80].

Die Differenz der ED_{50} -Werte in den Dosis-Wirkungskurven des Adrenomedullin und des Angiotensins II liegt höher, als die Differenz der Plasmakonzentrationen. Hieraus ergibt sich,

dass für die urämischen Konzentrationen des Adrenomedullin kein direkter pathophysiologischer vasoaktiver Effekt bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz zu erwarten ist.

5.2.2 Atriales natriuretisches Peptid

Natriuretische Peptide spielen eine besondere Rolle in der Regulation der kardiovaskulären Hämostase über die Aufrechterhaltung des Blutdrucks und des extrazellulären Blutvolumens [71]. Bei den vier bisher isolierten natriuretischen Peptiden handelt es sich um atriales natriuretische Peptid (ANP), brain natriuretisches Peptid (BNP), C-Typ natriuretisches Peptid (CNP) und Dendroaspis-Typ natriuretisches Peptid (DNP) [83]. ANP besteht aus 28 Aminosäuren und wird aufgrund von Dehnungsreizen aus Myocyten der Herzvorhöfe freigesetzt. In den Nieren besitzt ANP einen diuretischen, natriuretischen und vasodilatativen Effekt und wirkt als Gegenspieler zu den vasokonstriktiven Peptiden Angiotensin II und Endothelin, sowie des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems. Hier bewirkt das Peptid eine erhöhte glomeruläre Filtration über eine Vasodilation der afferenten Arteriolen und eine Vasokonstriktion der efferenten Arteriolen. Desweiteren kommt es in den proximalen und distalen Tubuli zu einer Hemmung der Na^+ -Reabsorption und der Renin- und Aldosteron-Synthese. In den Sammelrohren antagonisiert ANP die Wirkung von Adiuretin [84]. Man unterscheidet drei Haupttypen von natriuretischen peptidischen Rezeptoren: NPR-A, NPR-B und NPR-C. NPR-A und NPR-B weisen eine strukturelle Ähnlichkeit auf und führen bei Aktivierung zu einer erhöhten Produktion von cGMP. Der NPR-A Rezeptor bindet vor allem ANP und BNP und vermittelt über diesen Mechanismus die kardiovaskulären und renalen Effekte [84].

Die Abstände zwischen den betrachteten Plasmakonzentrationen und den ED_{50} -Werten des ANP und Angiotensins II sind annähernd identisch. Demzufolge ist davon ausgehen, dass die urämischen Konzentrationen des Atriales natriuretischen Peptids bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz eine geringe vasoaktive Wirkung aufzeigen.

5.2.3 Harnstoff

Harnstoff ist der urämische Mediator mit der höchsten netto Konzentration bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz [14,15]. Es handelt sich hierbei um das Hauptendprodukt des Eiweiß- und Aminosäurestoffwechsels im humanen Organismus. Als Biomarker wird

Harnstoff zur Beurteilung der Nierenfunktion und Nierenersatztherapie herangezogen. Eine erfolgreiche Entfernung dieses Biomarkers während der Hämodialyse korreliert mit einem Überlebensvorteil für Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz [120]. Interessanterweise gibt es nur wenige Studien, die einen biochemischen oder pathophysiologischen Effekt für Harnstoff in den für diese Patienten relevanten Konzentrationen aufzeigen. Von Lim und Kollegen konnte gezeigt werden, dass Harnstoff den NaK₂Cl₁ Kotransporter in humanen Erythrozyten sowie weitere Transportwege, die das Zellvolumen betreffen, hemmt [121]. In einer weiteren *in vitro* Studie führte Harnstoff zu einem verminderten L-Arginin Transport sowie einer verminderten Aktivität der NO-Synthase. Diese Ergebnisse konnten aber in einer anschließenden *in vivo* Untersuchung an Ratten nicht bestätigt werden [120]. Im Nierenmark werden die supraphysiologischen Konzentrationen des Harnstoffs durch Methylamine kompensiert [122]. Dieser protektive Effekt könnte bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ebenfalls eine Rolle spielen, da Methylamine auch zu den urämischen Mediatoren gehören. Desweiteren ist Harnstoff zusätzlich ein Ausgangsprodukt für weitere urämische Mediatoren wie den Guanidinen mit ihren direkten pathophysiologischen Effekten bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz. Bei bilateral nephrektomierten Ratten bedingte die an drei aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführte intraperitoneale Injektion von Harnstoff eine Atrophie des Thymus und der Milz. Ferner verkürzte sich die Überlebenszeit dieser Versuchstiere signifikant, so dass vermutet wird, dass die zusätzliche Gabe von Harnstoff die bereits bestehenden toxischen Effekte eines akuten urämischen Syndroms noch zusätzlich verstärken [123]. Hohe Plasmakonzentrationen des urämischen Mediators Harnstoff führen ebenfalls zu einem Anstieg der Plasmaosmolalität und hierdurch zu einer hypertonen Hyperhydratation des Extrazellarraums. Diese Tatsache könnte einen bedeutenden Beitrag zum vasodilatatorischen und toxischen urämischen Effekt des Harnstoffs leisten [123].

Die Differenz der ED₅₀-Werte in den Dosis-Wirkungskurven des Harnstoffs und des Angiotensins II ist geringer, als die Differenz der Plasmakonzentrationen. Hieraus ergibt sich, dass für die hohen urämischen Konzentrationen des Harnstoffs ein direkter pathophysiologischer Effekt bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz zu erwarten ist.

5.2.4 Hydrochinon

Der urämische Mediator Hydrochinon ist ein zweifach hydroxyliertes Phenol. Die Hydroxylgruppen befinden sich in para-Stellung (1,4-Dihydroxybenzol). Es handelt sich hierbei um ein starkes Reduktionsmittel, das durch Oxidation in Chinon überführt wird:

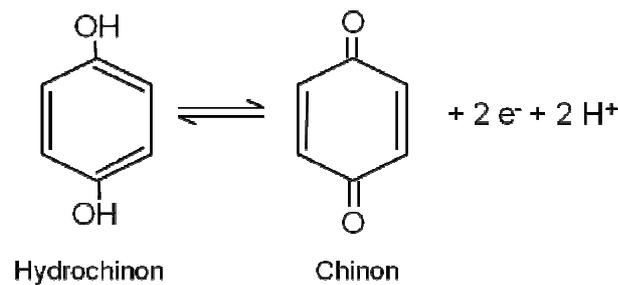


Abbildung 19: Chemische Redoxreaktion des urämischen Mediators Hydrochinon.

In der Naturheilkunde findet die antimikrobielle Wirkung des Hydrochinons zur Behandlung von Harnwegsinfektionen Verwendung. Die Verabreichung von Bärentraubenblätterttee führt zur Metabolisierung von Arbutin zu Hydrochinon, das spezifisch an den Membranen des harnableitenden Systems eine bakterio-statische Wirkung besitzt [124]. Studien zur Bedeutung urämischer Konzentrationen des Hydrochinons an weiteren Enzymsystemen, Zellarten oder Organsystemen konnten nicht gefunden werden.

Die Differenz der ED₅₀-Werte in den Dosis-Wirkungskurven des Hydrochinon und des Angiotensins II ist geringer, als die Differenz der Plasmakonzentrationen. Hieraus ergibt sich, dass für die hohen urämischen Konzentrationen des Hydrochinons ein direkter pathophysiologischer Effekt bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz zu erwarten ist. Bei dieser Reaktion spielen vermutlich die bei der chemischen Redoxreaktion (**Abbildung 19**) entstehenden Wasserstoffradikale eine bedeutende Rolle.

5.2.5 Kaliumindoxylsulfat

Der urämische Mediator Indoxylsulfat wird im menschlichen Organismus aus Nahrungsproteinen gebildet. Zunächst wird durch die intestinale Bakterienflora aus Tryptophan Indol synthetisiert, das in einem weiteren Schritt in der Leber zu Indoxylsulfat metabolisiert wird [125]. Niwa und Kollegen zeigten an teilnephrektomierten Ratten, dass ein Zusammenhang zwischen Indoxylsulfat und einer beschleunigten Entwicklung von chronischer Niereninsuffizienz besteht [126]. Die Gabe von Indoxylsulfat bedingte eine verminderte Nierenfunktion und eine verstärkte glomeruläre Sklerose in dem verbliebenen Restnierengewebe. Darüberhinaus hemmt Indoxylsulfat die Endothelzellproliferation und die Wundheilung und leistet damit einen Beitrag zur endothelialen Dysfunktion, die bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz verstärkt beobachtet wird. Ebenfalls wird ein Zusammenhang zwischen Indoxylsulfat und beschleunigter Arteriosklerose bei Patienten mit

chronischer Niereninsuffizienz vermutet, wie Yamamoto und Kollegen über die Stimulation der Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen durch Indoxylsulfat in Ratten zeigen konnten [127]. Ferner weist der urämische Mediator Indoxylsulfat ein nephrotoxisches Potential in den Tubuluszellen des Nierensystems auf [128]. Die Aufnahme des Indoxylsulfats in die tubulären Zellen erfolgt über basolaterale organische Aniontransporter (OATs), gefolgt vom Weitertransport über luminaire OATs in das Lumen des Tubulussystems. Während des transepithelialen Transports kommt es zu einer Akkumulation des Indoxylsulfats in den Tubuluszellen und einer folgenden Funktionsverminderung [128].

Die hier aufgenommene Dosis-Wirkungskurve (**Abbildung 15**) des urämischen Mediators Indoxylsulfat zeigte bis zum Erreichen der Löslichkeitsgrenze bei einer Dosis von 10^{-5} mol einen linearen Verlauf. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass es sich in diesem Fall ebenfalls um eine nephrotoxische Wirkung handelt. Die Einordnung der vorliegenden urämischen Plasmakonzentration für Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ist aber nicht möglich, da der lineare Kurvenverlauf keinen ED_{50} -Wert zum Vergleich mit der Dosis-Wirkungskurve einer Referenzsubstanz berechnen lässt.

5.2.6 p-Kresol, p-Kresolsulfat und Phenol

p-Kresol ist ein stark proteingebundenes volatiles Phenol mit einem Molekulargewicht von 108 kDa. In *in vitro* Versuchen konnten bereits eine Vielzahl toxischer Effekte dieses urämischen Mediators nachgewiesen werden, wie z.B. eine Hemmung der Immunantwort von aktivierten polymorphkernigen Leukozyten und eine verminderte Reaktion von Endothelzellen auf die Wirkung von inflammatorischen Zytokinen [129]. Ein vasoaktiver Effekt konnte bisher nicht nachgewiesen werden. p-Kresol wird - wie auch Phenol - im Dünndarm mit Hilfe der Bakterienflora aus der Aminosäure Tyrosin synthetisiert. Hierbei sind die aeroben Bakterien, wie z.B. *Enterobacteriaceae* und *Streptococcus*, für die Produktion von Phenol und die anaeroben Bakterien, wie z.B. *Clostridium* und *Bacteroides*, für die Herstellung von p-Kresol verantwortlich. Anschließend erfolgt während des Transports durch die intestinale Mukosa durch eine zytosolische Sulphotransferase eine Sulfatierung und zu einem geringeren Teil eine Glucuronidierung zu p-Kresolsulfat und p-Kresolglucuronid bzw. Phenolsulfat und Phenolglucuronid [113,129]. 2005 zeigten de Loor und Kollegen erstmalig, dass nicht p-Kresol und Phenol sondern ihre konjugierten Produkte im humanen Plasma von gesunden Probanden und Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz nachzuweisen sind. Bei den meisten Analyseverfahren war zur

Deproteinierung der Plasmaprobe zunächst eine starke Azidifizierung oder Erhitzung durchgeführt worden. Dieser Schritt kann jedoch ebenfalls zu einer Hydrolyse der p-Kresol- und Phenolkonjugate führen [113], so dass die hydrolysierten Produkte fälschlicherweise ebenfalls als unkonjugiertes p-Kresol bzw. Phenol detektiert wurden.

An der isolierten perfundierten Niere zeigte die Dosis-Wirkungskurve des Phenols einen vasokonstriktiven Effekt. Die zusätzlich für Phenolsulfat aufgenommene Dosis-Wirkungskurve wies hingegen keine Vasoaktivität auf (**Abbildung 9**). Bei der Sulfatierung des Phenols im Organismus handelt es sich um eine Phase-II-Reaktion der Biotransformation für Fremdstoffe. Über eine Koppelung mit polaren, negativ geladenen endogenen Molekülen erfolgt eine Detoxifizierung, sowie eine schnellere renale und biläre Ausscheidung. Da Phenol im Plasma überwiegend als Phenolsulfat vorhanden ist und Phenolsulfat keine vasoaktive Wirkung besaß, kann man vermuten, dass von den urämischen Konzentrationen dieses Mediators kein direkter pathophysiologischer vasoaktiver Effekt für Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz zu erwarten ist. Es muß aber auch berücksichtigt werden, dass es durch Sulfatasen in diversen Zellsystemen zur Dekonjugation des Phenolsulphat vorkommen könnte und demzufolge auch das Phenol als zusätzlicher urämischer Mediator in Erwägung zu ziehen ist.

Interessanter erscheint in diesem Zusammenhang die Betrachtung der gegensätzlichen Ergebnisse für p-Kresol und p-Kresolsulfat. Hier kam es an der isolierten perfundierten Niere nach der Injektion von p-Kresol zu einer Vasokonstriktion (**Abbildung 8**) während p-Kresolsulfat eine Vasodilation (**Abbildung 16**) bewirkte. Der Verlauf dieser beiden Dosis-Wirkungskurven verlief bis zum Erreichen der Löslichkeitsgrenze linear und lässt demzufolge vermuten, dass es sich um einen toxischen Effekt der urämischen Mediatoren handelt. Untersuchungen mit p-Kresolsulfat wurden erstmals 2007 von Schepers und Kollegen durchgeführt [129]. Diese zeigten ebenfalls widersprüchliche Ergebnisse, wie die verstärkte Bildung von freien Radikalen von zuvor nicht stimulierten Leukozyten durch das p-Kresolsulfat. Im gleichen Versuchsansatz führte p-Kresol hingegen zu keiner Radikalbildung. Ferner zeigte sich bei zuvor aktivierten Leukozyten nach einer Inkubation mit p-Kresol eine hemmende Wirkung auf die Radikalbildung, welche wiederum durch p-Kresolsulfat nicht bestätigt werden konnte.

Die Einordnung der Plasmakonzentrationen des p-Kresols und p-Kresolsulfats für Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ist in diesem Zusammenhang nicht möglich, da der lineare

Kurvenverlauf keinen ED_{50} -Wert zum Vergleich mit der Dosis-Wirkungskurve einer Referenzsubstanz berechnen läßt.

5.3 Ausblick

Diverse bereits ausgeführte oder noch geplante *in vitro* Experimente der EUTox-Gruppe beschäftigen sich mit der Auswirkung urämischer Mediatoren auf verschiedenartige Enzymsysteme, Zellarten und Organsysteme. Dieser Ansatz wird zusätzlich zu den bereits bekannten neue pathophysiologische Mechanismen der urämischen Mediatoren aufzeigen. Durch eine Zusammenführung dieser Ergebnisse kann eine Klassifizierung der urämischen Mediatoren entsprechend ihrer pathophysiologischen Bedeutung für Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz erreicht werden. Urämische Mediatoren, die sich in diesem Zusammenhang als besonders unvorteilhaft erweisen, könnten als Konsequenz bereits in frühen Stadien der chronischen Niereninsuffizienz durch pharmakologische Interaktionen neutralisiert oder im Stadium der Nierenversagens gezielt während der Dialyse aus dem Blut der Patienten eliminiert werden. Basierend auf der Erfahrung aus den zusammengetragenen *in vitro* Studien, müssen sich *in vivo* Untersuchungen anschließen, um einen therapeutischen Gewinn für die Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz aufzuzeigen. Desweiteren könnten sich aus den vorhandenen Daten Hinweise auf neue mehr spezifische Biomarker für eine beginnende Niereninsuffizienz ergeben, die es ermöglichen würden, eine Diagnose zukünftig bereits in einem früheren Stadium der Erkrankung zu stellen.

Zur Fortsetzung der hier vorliegenden Arbeit müssen ferner die bereits neu identifizierten aber auf grund ihrer noch unveröffentlichten c_{max} Konzentrationen nicht berücksichtigten urämischen Mediatoren (**Tabelle 4**) an der isolierten perfundierten Niere getestet werden. Auch sollte ein Schwerpunkt auf die Isolierung und Identifizierung weiterer bisher unbekannter urämischer Mediatoren gelegt werden, sowie auf die Bestimmung ihrer jeweiligen Konzentrationen bei gesunden Probanden und Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz.

6 Zusammenfassung

Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz leiden häufig an begleitend auftretenden Schädigungen des kardiovaskulären Gefäßsystems. Mitverantwortlich für diese Symptome, die bisweilen entscheidende Komplikationen bei der Therapie zur Folge haben, sind insbesondere urämische Mediatoren, die aufgrund der verminderten Urinexkretion der erkrankten Niere im Blut akkumulieren.

In der vorliegenden Dissertation wurden 74 gegenwärtig identifizierte urämische Mediatoren mit Hilfe eines Bioassays experimentell auf ihr vasoaktives Potential untersucht. Als Bioassay diente der Perfusionstest an der isolierten Rattenniere. Ziel war es, durch die systematische vergleichende Untersuchung bisher unbekannte vasoaktive urämische Mediatoren zu identifizieren und ihre pathophysiologische Bedeutung für Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz einzuordnen.

Die Ergebnisse zeigten einen vasokonstriktorischen Effekt der urämischen Mediatoren 1-Methyladenosin, Endothelin-1, Methylguanidin-HCl, Neuropeptid Y, Phenol, p-Kresol und Uridin, sowie einen vasodilatatorischen Effekt von Adrenomedullin, Atriales natriuretisches Peptid, Harnstoff, Hydrochinon, Kaliumindoxylsulfat und p-Kresolsulfat. Für 1-Methyladenosin, Harnstoff, Hydrochinon, Kaliumindoxylsulfat, Methylguanidin-HCl, Phenol, p-Kresol, p-Kresolsulfat und Uridin konnte erstmalig ein vasoaktiver Effekt an der isolierten perfundierten Rattenniere nachgewiesen werden. Die Dosis-Wirkungskurven von Kaliumindoxylsulfat, p-Kresol und p-Kresolsulfat zeigten einen linearen Verlauf. Die Dosis-Wirkungskurven aller weiteren vasoaktiven urämischen Mediatoren verliefen sigmoidal.

Besonders bemerkenswert ist die gegensätzliche Vasoaktivität des p-Kresols, das bei einer Dosis von 5×10^{-5} mol vasokonstriktorisch wirkte ($\Delta p +17,4$ mmHg) und seines sulfatierten Derivats p-Kresolsulfat, das bei gleicher Dosis vasodilatatorisch wirkte ($\Delta p -38,7$ mmHg). Die relativen Wirkungsstärken der urämischen Mediatoren lassen sich für Substanzen mit ähnlichem ED_{50} -Wert durch die Injektion eines Testbolus immer derselben Menge vergleichen. Für die vasokonstriktorischen Mediatoren mit einer ED_{50} von -6 ± 2 log mol und einen Bolus von 10^{-6} mol ergab sich folgende Reihenfolge: Uridin (51,8 mmHg) > Methylguanidin-HCl (38,7 mmHg) > 1-Methyladenosin (32,3 mmHg) > Phenol (14,2 mmHg) > p-Kresol (4,0 mmHg). Die dilatatorische Wirkungsrangfolge lautet: p-Kresolsulfat

(-26,0 mmHg) > Kaliumindoxylsulfat (-24,9 mmHg) > Hydrochinon (-16,9 mmHg) > Harnstoff (-0,6 mmHg).

Zusätzlich wurden für die Nukleoside 1-Methyladenosin, Methylguanidin-HCl und Uridin pharmakologische Rezeptoruntersuchungen durchgeführt. Diese zeigten für 1-Methyladenosin und Uridin, dass die vasokonstriktorische Wirkung an der isolierten perfundierten Rattenniere überwiegend über A₁-Rezeptoren vermittelt wird. P₂-Rezeptoren scheinen hingegen nicht an der vasokonstriktorischen Wirkung dieser urämischen Mediatoren beteiligt zu sein.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass urämische Mediatoren durch Einflussnahme auf die Gefäßregulation einen Beitrag zu kardiovaskulären Erkrankungen bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz leisten. Durch eine Zusammenführung dieser Ergebnisse mit weiteren bereits ausgeführten und noch geplanten *in vitro* Experimente an verschiedenartigen Enzymsystemen, Zellarten und Organsystemen besteht nun die Möglichkeit, besonders unvorteilhafte urämische Mediatoren zu identifizieren. Das erweiterte Verständnis der Wirkungsweisen urämischer Mediatoren trägt so dazu bei, Behandlungen von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz zielgenauer zu machen und Begleiterscheinungen wie die kardiovaskulären Erkrankungen zu minimieren.

7 Literatur- und Quellenverzeichnis

- 1) Grassmann A, Gioberge S, Moeller S, Brown G: ESRD patients in 2004: global overview of patient numbers, treatment modalities and associated trends. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20: 2587-2593
- 2) Frei U, Schober-Halstenberg HJ (2008): Bericht über Dialysebehandlung und Nierentransplantation in Deutschland 2006/2007. In: Jahresbericht QUASI NIERE, <http://www.quasi-niere.de>
- 3) Herold G: Innere Medizin 2005. Eigenverlag, Köln 2005
- 4) Kidney Disease Outcome Quality Initiative: K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: Evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis* 2002; 39(2 Suppl 2):S1-246
- 5) Keller F, Dress H, Mertz A, Marckmann G, et al: Geld und Dialyse. *Med Klin (München)* 2007; 102(8):659-664
- 6) Keller CK, Geberth SK: Praxis der Nephrologie. 2. Auflage Springer Verlag, Berlin Heidelberg 2007
- 7) Schiffrin EL, Lipman ML, Mann JF: Chronic kidney disease: effects on the cardiovascular system. *Circulation* 2007;116(1):85-97
- 8) Baenkler HW, Clement U: Innere Medizin. Sonderausgabe. MLP-Finanzdienstleistungen AG, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2001
- 9) Vanholder R, Meert N, Schepers E, Glorieux G, et al: Uremic Toxins: Do We Know Enough to Explain Uremia? *Blood Purif* 2008; 26:77-81
- 10) Rutsky EA, Rostand SG: Treatment of uremic pericarditis and pericardial effusion. *Am J Kidney Dis* 1987; 10:2-8
- 11) Mayer C, Achenbach H, Stumvoll M, Fiedler G: Renale Anämie - eine wichtige Folgeerkrankung der Niere. *Internist* 2006; 47:233-241
- 12) Eberst ME, Berkowitz LR: Hemostasis in renal disease: pathophysiology and management. *Am J Med* 1994; 96:168-179
- 13) Ulrich H, Landthaler M, Hohenleutner U: Dialyseassoziierte Hautveränderungen. *Hautarzt* 2004; 55:485-496

- 14) Cohen G, Glorieux G, Thornalley P, et al: Review on uraemic toxins III: recommendations for handling uraemic retention solutes in vitro - towards a standardized approach for research on uremia. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22:3381-3390
- 15) Vanholder R, De Smet R, Glorieux G, et al: Review on uremic toxins: Classification, concentration, and interindividual variability. *Kidney Int* 2003; 63:1934-1943
- 16) Lindner A, Charra B, Sherrard DJ, et al: Accelerated atherosclerosis in prolonged maintenance hemodialysis. *N Engl J Med* 1974; 290(13):697-701
- 17) Day JC: Population Projections of the United States by Age, Sex, Race, and Hispanic Origin: 1995 to 2050. U.S. Census Bureau, Current Population Reports, P25-1130. Washington, DC: U.S. Government Printing Office; 1996
- 18) Burt VL, Whelton P, Roccella EJ, Brown C, Cutler JA, Higgins M, et al: Prevalence of hypertension in the US adult population. Results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1991. *Hypertension* 1995; 25:305-313
- 19) Klag MJ, Whelton PK, Randall BL, et al: Blood pressure and end-stage renal disease in men. *N Engl J Med* 1996; 334(1):13-18
- 20) Adler AI, Stevens RJ, Manley SE, et al: Development and progression of nephropathy in type 2 diabetes: The United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS 64). *Kidney Int* 2003; 63(1):225-232
- 21) Harris MI, Flegal KM, Cowie CC, Eberhardt MS, Goldstein DE, Little RR, et al: Prevalence of diabetes, impaired fasting glucose, and impaired glucose tolerance in U.S. adults. The Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Diabetes Care* 1998; 21:518-524
- 22) Fox CS, Larson MG, Leip EP, et al: Predictors of new-onset kidney disease in a community-based population. *JAMA* 2004; 291(7):844-850
- 23) Cases A, Coll E: Dyslipidemia and the progression of renal disease in chronic renal failure patients. *Kidney Int Suppl* 2005; 99:S87-S93
- 24) Halimi JM, Giraudeau B, Vol S, et al: Effects of current smoking and smoking discontinuation on renal function and proteinuria in the general population. *Kidney Int* 2000; 58(3):1285-1292

- 25) Briganti EM, Branley P, Chadban SJ, et al: Smoking is associated with renal impairment and proteinuria in the normal population: The AusDiab kidney study. Australian Diabetes, Obesity and Lifestyle Study. *Am J Kidney Dis* 2002; 40(4):704-712
- 26) Sarnak MJ, Levey AS; Cardiovascular Disease and Chronic Renal Disease: A New Paradigm. *Am J Kidney Dis* 2000; 35:S117-131
- 27) Ivens K, Grabensee B: Zusammenhang zwischen kardiovaskulären Erkrankungen und Progression von Nierenerkrankungen. *Nephrologe* 2006; 1:225-232
- 28) Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ: Epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *J Am Soc Nephrol* 1989; 9(Suppl):S16-23
- 29) Gupta R, Birnbaum Y, Uretsky BF: The renal patient with coronary artery disease: Current concepts and dilemmas. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44:1343-1353
- 30) Vanholder R, Massy Z, Argiles A, et al: Chronic kidney disease as cause of cardiovascular morbidity and mortality. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20(6):1048-1056
- 31) Go AS, Chertow GM, Fan D, et al: Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med* 2004; 351:1296-1305
- 32) Goodman WG, Goldin J, Kuizon BD, et al: Coronary-artery calcification in young adults with end-stage renal disease who are undergoing dialysis. *N Engl J Med* 2000; 342(20):1478-1483
- 33) Fleischmann EH, Bower JD, Salahudeen AK: Are conventional cardiovascular risk factors predictive of two-year mortality in hemodialysis patients? *Clin Nephrol* 2001; 56(3):221-230
- 34) Culeton BF, Walsh M, Klarenbach SW, et al: Effect of frequent nocturnal hemodialysis vs conventional hemodialysis on left ventricular mass and quality of life: a randomized controlled trial. *JAMA* 2007; 298(11):1291-1299
- 35) Mann JF, Yi QL, Gerstein HC: Albuminuria as a predictor of cardiovascular and renal outcomes in people with known atherosclerotic cardiovascular disease. *Kidney Int Suppl* 2004; (92):S59-62
- 36) Endemann DH, Schiffrin EL: Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15(8):1983-1992
- 37) Guyton AC, Coleman TG: Quantitative analysis of the pathophysiology of hypertension. 1969. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10(10):2248-2258

- 38) Xu J, Li G, Wang P, et al: Renalase is a novel, soluble monoamine oxidase that regulates cardiac function and blood pressure. *J Clin Invest* 2005; 115(5):1275-1280
- 39) Foley RN, Parfrey PS, Harnett JD, et al: Impact of hypertension on cardiomyopathy, morbidity and mortality in end-stage renal disease. *Kidney Int* 1996; 49(5):1379-1385
- 40) Russo D, Palmiero G, De Blasio AP, et al: Coronary artery calcification in patients with CRF not undergoing dialysis. *Am J Kidney Dis* 2004; 44(6):1024-1030
- 41) Budisavljevic MN, Cheek D, Ploth DW: Calciphylaxis in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7(7):978-982
- 42) Ketteler M, Schlieper G, Floege J: Calcification and cardiovascular health: new insights into an old phenomenon. *Hypertension* 2006; 47(6):1027-1034
- 43) Moe SM, Reslerova M, Ketteler M, et al: Role of calcification inhibitors in the pathogenesis of vascular calcification in chronic kidney disease (CKD). *Kidney Int* 2005; 67(6):2295-2304
- 44) Johnson RC, Leopold JA, Loscalzo J: Vascular calcification: pathobiological mechanisms and clinical implications. *Circ Res* 2006;99 (10):1044-1059
- 45) Takeda S, Elefteriou F, Lévassieur R, et al: Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell* 2002; 111(3):305-317
- 46) Parhami F, Tintut Y, Ballard A, et al: Leptin enhances the calcification of vascular cells: artery wall as a target of leptin. *Circ Res* 2001; 88(9):954-960
- 47) Ketteler M, Wanner C, Metzger T, et al: Deficiencies of calcium-regulatory proteins in dialysis patients: a novel concept of cardiovascular calcification in uremia. *Kidney Int Suppl* 2003; (84):S84-87
- 48) Stenvinkel P, Wang K, Qureshi AR, et al: Low fetuin-A levels are associated with cardiovascular death: Impact of variations in the gene encoding fetuin. *Kidney Int* 2005; 67(6):2383-2392
- 49) Luo G, Ducy P, McKee M, et al: Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* 1997; 386(6620):78-81
- 50) Jono S, Ikari Y, Vermeer C, et al: Matrix Gla protein is associated with coronary artery calcification as assessed by electron-beam computed tomography. *Thromb Haemost* 2004; 91(4):790-794

- 51) Lomashvili KA, Khawandi W, O'Neill WC: Reduced plasma pyrophosphate levels in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16(8):2495-2500
- 52) Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, et al: osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 1998; 12(9):1260-1268
- 53) Stenvinkel P, Heimbürger O, Lindholm B, et al: Are there two types of malnutrition in chronic renal failure? Evidence for relationships between malnutrition, inflammation and atherosclerosis (MIA syndrome). *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15(7):953-960
- 54) Kaysen GA, Eiserich JP: The role of oxidative stress-altered lipoprotein structure and function and microinflammation on cardiovascular risk in patients with minor renal dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15(3):538-548
- 55) Sandhu S, Wiebe N, Fried LF, et al: Statins for improving renal outcomes: a meta-analysis. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17(7):2006-2016
- 56) Jofré R, Rodriguez-Benitez P, López-Gómez JM, et al: Inflammatory syndrome in patients on hemodialysis. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17(12 Suppl 3):S274-280
- 57) Vaziri ND, Oveisi F, Ding Y: Role of increased oxygen free radical activity in the pathogenesis of uremic hypertension. *Kidney Int* 1998; 53(6):1748-1754
- 58) Himmelfarb J, Stenvinkel P, Ikizler TA, et al: The elephant in uremia: oxidant stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia. *Kidney Int* 2002; 62(5):1524-1538
- 59) Touyz RM, Yao G, Quinn MT, et al: p47phox associates with the cytoskeleton through cortactin in human vascular smooth muscle cells: role in NAD(P)H oxidase regulation by angiotensin II. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25(3):512-518
- 60) Pecoits-Filho R, Stenvinkel P, Marchlewska A, et al: A functional variant of the myeloperoxidase gene is associated with cardiovascular disease in end-stage renal disease patients. *Kidney Int Suppl* 2003; (84):S172-176
- 61) Stehouwer CD, Smulders YM: Microalbuminuria and risk for cardiovascular disease: Analysis of potential mechanisms. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17(8):2106-2111

- 62) Wever R, Boer P, Hijmering M, et al: Nitric oxide production is reduced in patients with chronic renal failure. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19(5):1168-1172
- 63) Vallance P, Leiper J: Cardiovascular biology of the asymmetric dimethylarginine: dimethylarginine dimethylaminohydrolase pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24(6):1023-1030
- 64) Kielstein JT, Impraim B, Simmel S, et al: Cardiovascular effects of systemic nitric oxide synthase inhibition with asymmetrical dimethylarginine in humans. *Circulation* 2004; 109(2):172-177
- 65) Kielstein JT, Frölich JC, Haller H, et al: ADMA (asymmetric dimethylarginine): an atherosclerotic disease mediating agent in patients with renal disease? *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16(9):1742-1745
- 66) Mallamaci F, Tripepi G, Maas R, et al: Analysis of the relationship between norepinephrine and asymmetric dimethyl arginine levels among patients with end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15(2):435-441
- 67) Zoccali C, Bode-Böger S, Mallamaci F, et al: Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study. *Lancet* 2001; 358(9299):2113-2117
- 68) Klinker R, Pape HC, Silbernagel S: Physiologie. 5. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2005
- 69) Schmidt RF, Thews G, Lang F: Physiologie des Menschen. 28. Auflage, Springer Verlag, Berlin Heidelberg 2000
- 70) Deetjen P, Speckmann EJ, Heschler J: Physiologie. 4. Auflage, Urban & Fischer Verlag, München 2005
- 71) Forth W, Henschler D, Rummel W: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 8. Auflage, Urban & Fischer Verlag, München 2001
- 72) Eglen RM: Muscarinic receptor subtypes in neuronal and non-neuronal cholinergic function. *Auton Autacoid Pharmacol* 2006; 26(3):219-233
- 73) Fredholm BB, Ijzerman AP, Jacobson KA, et al: International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* 2001; 53(4):527-552
- 74) Ralevic V, Burnstock G: Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev*; 50(3):413-492

- 75) Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynaems JM, et al: International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev* 2006 Sep;58(3):281-341
- 76) Tölle M, Jankowski V, Schuchardt M, et al: Adenosine 5'-Tetraphosphate Is a Highly Potent Purinergic Endothelium-Derived Vasoconstrictor. *Circ Res* 2008 Oct 2
- 77) Streefkerk JO, van Zwieten PA: Vasopressin receptor antagonists: pharmacological tools and potential therapeutic agents. *Auton Autacoid Pharmacol* 2006; 26(2):141-148
- 78) Ali F, Guglin M, Vaitkevicius P, et al: Therapeutic potential of vasopressin receptor antagonists. *Drugs* 2007; 67(6):847-858
- 79) Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, et al: Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 192(2):553-560
- 80) Brain SD, Grant AD: Vascular actions of calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin. *Physiol Rev* 2004; 84(3):903-934
- 81) Rush JW, Aultman CD: Vascular biology of angiotensin and the impact of physical activity. *Appl Physiol Nutr Metab* 2008; 33(1):162-172
- 82) Fyhrquist F, Saijonmaa O: Renin-angiotensin system revisited. *J Intern Med* 2008; 264(3):224-236
- 83) Woodard GE, Rosado JA: Natriuretic peptides in vascular physiology and pathology. *Int Rev Cell Mol Biol* 2008; 268:59-93
- 84) Callera G, Tostes R, Savoia C, et al: Vasoactive peptides in cardiovascular (patho)physiology. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2007; 5(3):531-552
- 85) Sharma JN: Role of tissue kallikrein-kininogen-kinin pathways in the cardiovascular system. *Arch Med Res* 2006; 37(3):299-306
- 86) Regoli D, Jukic D, Gobeil F, et al: Receptors for bradykinin and related kinins: a critical analysis. *Can J Physiol Pharmacol* 1993; 71(8):556-567
- 87) Behm DJ, Ogbonna A, Wu C, et al: Epoxyeicosatrienoic Acids Function as Selective, Endogenous Antagonists of Native Thromboxane Receptors: Identification of a Novel Mechanism of Vasodilation. *J Pharmacol Exp Ther* 2008 Oct 3

- 88) Jose PA, Eisner GM, Felder RA: Renal dopamine receptors in health and hypertension. *Pharmacol Ther* 1998; 80(2):149-182
- 89) Davenport AP: International Union of Pharmacology. XXIX. Update on endothelin receptor nomenclature. *Pharmacol Rev* 2002; 54(2):219-226.
- 90) Tanaka Y, Koike K, Toro L: MaxiK channel roles in blood vessel relaxations induced by endothelium-derived relaxing factors and their molecular mechanisms. *J Smooth Muscle Res* 2004; 40(4-5):125-153
- 91) Félétou M, Vanhoutte PM: Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26(6):1215-1225
- 92) Thurmond RL, Gelfand EW, Dunford PJ: The role of histamine H1 and H4 receptors in allergic inflammation: the search for new antihistamines. *Nat Rev Drug Discov* 2008; 7(1):41-53
- 93) Wang DH: The vanilloid receptor and hypertension. *Acta Pharmacol Sin* 2005; 26(3):286-294
- 94) Vaishnava P, Wang DH: Capsaicin sensitive-sensory nerves and blood pressure regulation. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents* 2003; 1(2):177-188
- 95) Fujisawa Y, Nagai Y, Miyatake A, et al: Roles of adrenomedullin 2 in regulating the cardiovascular and sympathetic nervous systems in conscious rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290(3):H1120-127
- 96) Bell D, McDermott BJ: Intermedin (adrenomedullin-2): a novel counter-regulatory peptide in the cardiovascular and renal systems. *Br J Pharmacol* 2008; 153 Suppl 1:S247-262
- 97) Capra V: Molecular and functional aspects of human cysteinyl leukotriene receptors. *Pharmacol Res* 2004; 50(1):1-11
- 98) Evans JF: Cysteinyl leukotriene receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2002; 68-69:587-5897
- 99) Michel MC, Beck-Sickinger A, Cox H, et al: XVI. International Union of Pharmacology recommendations for the nomenclature of neuropeptide Y, peptide YY, and pancreatic polypeptide receptors. *Pharmacol Rev* 1998; 50(1):143-150
- 100) Grundemar L, Håkanson R: Multiple neuropeptide Y receptors are involved in cardiovascular regulation. Peripheral and central mechanisms. *Gen Pharmacol* 1993; 24(4):785-796

- 101) Esbrit P, Santos S, Ortega A, et al: Parathyroid hormone-related protein as a renal regulating factor. From vessels to glomeruli and tubular epithelium. *Am J Nephrol* 2001; 21(3):179-184
- 102) Rashid G, Bernheim J, Green J, et al: Parathyroid hormone stimulates the endothelial nitric oxide synthase through protein kinase A and C pathways. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22(10):2831-2837
- 103) Coleman RA, Smith WL, Narumiya S: International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol Rev* 1994; 46(2):205-229
- 104) Kaumann AJ, Levy FO: 5-hydroxytryptamine receptors in the human cardiovascular system. *Pharmacol Ther* 2006; 111(3):674-706
- 105) Villalón CM, Centurión D: Cardiovascular responses produced by 5-hydroxytryptamine: a pharmacological update on the receptors/mechanisms involved and therapeutic implications. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2007; 376(1-2):45-63
- 106) Hesse C, Luntz SP, Siedler H, et al: Kinetics and dynamics of the peripheral neurokinin-1 receptor antagonist SLV317 in healthy individuals. *Br J Clin Pharmacol* 2006; 61(4):414-419
- 107) Newby DE, Sciberras DG, Ferro CJ, et al: Substance P-induced vasodilatation is mediated by the neurokinin type 1 receptor but does not contribute to basal vascular tone in man. *Br J Clin Pharmacol* 1999; 48(3):336-344
- 108) Jankowski V, Tölle M, Vanholder R, et al: Uridine adenosine tetraphosphate: a novel endothelium- derived vasoconstrictive factor. *Nat Med* 2005; 11(2):223-227
- 109) Ames RS, Sarau HM, Chambers JK, et al: Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14. *Nature* 1999; 401(6750):282-286
- 110) Henning RJ, Sawmiller DR: Vasoactive intestinal peptide: cardiovascular effects. *Cardiovasc Res* 2001; 49(1):27-37
- 111) Hofbauer KG, Zschiedrich H, Rauh W, et al: Conversion of angiotensin I into angiotensin II in the isolated perfused rat kidney. *Clin Sci* 1973; 44(5):447-456
- 112) Westhoff TH: Inaugural-Dissertation „Pharmakologische Charakterisierung der vasoaktiven Eigenschaften von Adenosin(5')oligophospho-(5')guanosinen und

- Guanosin(5')oligophospho-(5')guanosinen“. Ruhr-Universität Bochum, Herne 2000
- 113) de Loor H, Bammens B, Evenepoel P, et al: Gas chromatographic-mass spectrometric analysis for measurement of p-cresol and its conjugated metabolites in uremic and normal serum. *Clin Chem* 2005; 51: 1535-1538
- 114) Olsson RA, Khouri EM, Bedynek JL Jr, et al: Coronary vasoactivity of adenosine in the conscious dog. *Circ Res* 1979; 45(4):468-478
- 115) Roskamp E., Kaufmann W.: Radioimmunologische Bestimmung von Angiotensin II. *J Mol Med* 1971; 49(15): 876-879
- 116) Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, et al: A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988; 332(6163):411-415
- 117) MacAllister RJ, Whitley GS, Vallance P: Effects of guanidino and uremic compounds on nitric oxide pathways. *Kidney Int* 1994; 45(3):737-742
- 118) Haynes JM, Cooper ME: Adrenomedullin and calcitonin gene-related peptide in the rat isolated kidney and in the anaesthetised rat: in vitro and in vivo effects. *European Journal of Pharmacology* 1995; 280:91-99
- 119) Yilmaz MS, Coskun C, Suzer O, et al: Hypotensive effects of intravenously administered uridine and cytidine in conscious rats: involvement of adenosine receptors. *Eur J Pharmacol* 2008; 584(1):125-136
- 120) Vanholder RC, Glorieux G, De Smet R, et al: Low water-soluble uremic toxins. *Adv Ren Replace Ther* 2003; 10(4):257-269. Review
- 121) Lim J, Gasson C, Kaji DM: Urea inhibits NaK2Cl cotransport in human erythrocytes. *J Clin Invest* 1995; 96(5):2126-2132
- 122) Burg MB, Peters EM, Bohren KM, et al: Factors affecting counteraction by methylamines of urea effects on aldose reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(11):6517-6522
- 123) Levine S, Saltzman A: Are urea and creatinine uremic toxins in the rat? *Ren Fail* 2001; 23(1):53-59
- 124) Kraft K: Erkrankungen der Harnwege (1). *Zeitschrift für Phytotherapie* 2008; 29: 40-42
- 125) Taki K, Tsuruta Y, Niwa T: Indoxyl sulfate and atherosclerotic risk factors in hemodialysis patients. *Am J Nephrol* 2007;27(1):30-35

- 126) Niwa T, Ise M: Indoxyl sulfate, a circulating uremic toxin, stimulates the progression of glomerular sclerosis. *J Lab Clin Med* 1994; 124:96-104.
- 127) Yamamoto H, Tsuruoka S, Ioka T, et al: Indoxyl sulfate stimulates proliferation of rat vascular smooth muscle cells. *Kidney Int* 2006; 69:1780-1785
- 128) Enomoto A, Takeda M, Tojo A, et al: Role of organic anion transporters in the tubular transport of indoxyl sulfate and the induction of its nephrotoxicity. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13(7):1711-1720
- 129) Schepers E, Meert N, Glorieux G, et al: P-cresylsulphate, the main in vivo metabolite of p-cresol, activates leucocyte free radical production. *Nephrol Dial Transplant* (2007) 22: 592-596

8 Abkürzungen

5-HT	Serotonin
α,β -meATP	alpha,beta-methylen-Adenosin-5'-triphosphat
A	Adenosinrezeptor
ACE	engl.: Angiotensin Converting Enzyme
ADMA	asymmetrisches Dimethylarginin
AG	Arbeitsgruppe
AM	Adrenomedullin
AngII	Angiotensin II
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
Ap ₄	Adenosin-5'-tetraphosphat
AT	Angiotensinrezeptor
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
B	Bradykininrezeptor
BNP	engl.: brain natriuretic peptide
Ca ²⁺	Kalzium
Cbfa1	engl.: core binding factor alpha 1
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CGRP	Calcitonin gene-related peptide
c _{max}	höchste je gemessene urämische Konzentration der jeweiligen Substanz
CNI	chronische Niereninsuffizienz
CNP	C-Typ natriuretisches Peptid
CO ₂	Kohlendioxid
CRP	C-reaktives-Protein
D	Dopaminrezeptor
DHET	Dihydroxyeikosatriensäure
DNP	Dendroaspis-Typ natriuretisches Peptid
DP	Prostaglandin D Rezeptor
DPCPX	8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine
ED ₅₀ -Wert	Substanzmenge, die benötigt wird um 50% des Maximalausschlags zu erreichen
EDHF	engl.: Endothelium-derived hyperpolarizing factor
EDRF	engl.: endothelium derived relaxing factor

EET	Epoxyeikosatriensäure
EP	Prostaglandin E Rezeptor
ET	Endothelin
EUTox	engl.: European Uremic Toxins Work Group
g	Gramm
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
H	Histaminrezeptor
HCl	Chlorwasserstoff
HDL	engl.: High-Density-Lipoprotein-Cholesterin
HSE	HUGO SACHS ELETRONIK
ICAM-1	engl.: Inter-Cellular Adhesion Molecule-1
IDL	engl.: Intermediate-Density-Lipoprotein-Cholesterin
i.E.	internationale Einheit
Ig	Immunglobulin
IP	Prostaglandin I Rezeptor
K ⁺	Kalium
KCl	Kaliumchlorid
K/DOQI	engl.: Kidney Disease Outcome Quality Initiative
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
kg	Kilogramm
l	Liter
LDL	engl.: Low-Density-Lipoprotein-Cholesterin
log	Logarithmus
LT	Leukotrien
M	Muscarinrezeptor
m ²	Quadratmeter
MDRD	engl.: Modification of Diet in Renal Disease
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MGP	Matrix-Gla-Protein
min	Minute
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mmol	Millimol

µl	mykroliter
MPO	Myeloperoxidase
Na ⁺	Natrium
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NAD(P)H	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaHCO ₃	Natriumhydrogenkarbonat
NECA	5'-N-ethylcarboxamidoadenosin
NGFN	Nationales Genomforschungsnetz
NK	Neurokininrezeptor
NKF	engl.: National Kidney Foundation
NaN ₃	Natriumazid
NO	Stickstoffmonoxid
NPR	Natriuretischer Peptidrezeptor
NPY	Neuropeptid Y
O ₂	Sauerstoff
OAT	organische Aniontransporter
p	para
P	Purin-Rezeptor
PBS	Phosphatpuffer
PO ₄	Phosphat
PP _i	Pyrophosphat
PTH	Parathormon
PTHR	Parathormonrezeptor
PTHrP	Parathormon ähnliches Protein
QALY	qualitätsbereinigtes Lebensjahr
R-PIA	(<i>R</i>)N ⁶ -phenylisopropyladenosin
RAA	Renin-Angiotensin-Aldosteron
SDMA	symmetrisches Dimethylarginine
SEM	engl.: standard error of the mean
TM	engl.: Trademark
TNFα	Tumor Nekrose Faktor alpha
TP	Thromboxanrezeptor

Up ₄ A	Uridin adenosin tetraphosphat
V	Vasopressinrezeptor
VCAM-1	engl.: vascular cell adhesion molecule-1
VIP	Vasoaktives intestinales Peptid
VR	Vanilloidrezeptor

9 Lebenslauf

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

10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Joachim Jankowski, der mich bei meiner Arbeit beraten und betreut hat. Seine kompetente Anleitung war für mich von großem Wert.

Dank schulde ich auch dem Nationalen Genomforschungsnetz Deutschland (NGFN 01GR0807) für die finanzielle Unterstützung.

Außerdem danke ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Joachim Jankowski für die Unterstützung jeglicher Art und das gute Arbeitsklima.

Herzlichen Dank an Ulrich Hegel, meinen Bruder Lasse Köhler und insbesondere meinen Freund Kolja Hegel für ihre wertvollen Ratschläge.

11 Erklärung

„Ich, Mona Köhler, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: *Beitrag urämischer Mediatoren zur Genese kardiovaskulärer Erkrankungen bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz* 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.“

Berlin, den

.....

Mona Köhler