

Diplomarbeit

Entwicklungsgrundlage der arteriellen  
Mediaverkalkung

eingereicht von

Roxana Wimmer

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktorin der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Abteilung für Angiologie/ Univ. Klinik für Innere Medizin

unter der Anleitung von

Ass.-Prof. Priv.-Doz. Dr. med. univ. Philipp Eller, MBA

## Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 26.07.2014

Roxana Wimmer eh

# Danksagung

Der Beginn dieser Arbeit ist das gleichzeitige Ende meines Studiums.

Ein Studium, das ich auf Rat eines guten Menschen begonnen habe. Einen Menschen, den ich in einer Reihe von Zufällen im richtigen Moment getroffen habe. An dieser Stelle möchte ich mich bei ihr herzlich bedanken. Ohne sie wäre ich nicht auf diese für mich anfangs wahnsinnige Idee gekommen, Medizin zu studieren. Doch sie behielt Recht. Mehr und mehr habe ich mich in der Medizin mit meinen Interessen und Leidenschaften wieder gefunden. Sie glaubt auch weiterhin an mich, wenn Zweifel und Sorge meine Wegstrecke pflastern. Deshalb möchte ich ihr danken. Sie hat den Anstoß für mein Studium gegeben.

Die wichtigste Person, der mein absoluter Dank gebührt, ist meine Mutter. Sie steht zu mir, sie ermutigt und fördert mich wo sie kann und über ihre Grenzen hinaus. Steh ich an der Wand, reißt du sie ein. Worte reichen in dem Fall nicht aus. Ich danke dir Mama für alles was du tust und bist! Ohne dich wäre ich nie, was ich bin und sein werde.

Vielen Dank gebührt auch Dr. Alexander Kirsch. Danke, Alex, für dein geduldiges Wesen, deine stets freundliche Art und deine Freude an deiner Arbeit, die all deine Mitmenschen ansteckt. Ich wünsche Dir wirklich alles erdenklich Gute für deinen weiteren Lebensweg und hoffe, dass Dir alles in Erfüllung geht, was du Dir wünschst.

Vielen Dank auch an Katharina Artinger, Ida Aringer und Corinna Schabhüttl, die mir viel geholfen haben und bei Fragen immer zur Seite standen.

Als letztes möchte ich meinen beiden Betreuern Ass.-Prof. Priv.-Doz. Dr.med.univ. Philipp Eller und Ass.-Prof.<sup>in</sup> Priv.-Doz.<sup>in</sup> Dr.<sup>in</sup> med.univ. Kathrin Eller für die tolle Betreuung und Unterstützung danken!

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	VIII
Abstract.....	IX
1. Einleitung.....	1
1.1 Aufgaben der Niere.....	1
1.2 Chronische Nierenerkrankung (CKD).....	2
1.2.1 Definition.....	2
1.2.2 Parameter zur Bestimmung der Nierenfunktion.....	2
1.2.2.1 GFR.....	2
1.2.2.2 Serumkreatinin.....	4
1.2.2.3 CKD-EPI Formel.....	5
1.2.2.4 Albuminurie.....	6
1.2.3 Einteilung und Prognose.....	6
1.2.4 Epidemiologie.....	8
1.2.5 Ursachen.....	9
1.2.6 Mortalität.....	10
1.2.7 Pathophysiologie der chronischen Niereninsuffizienz.....	12
1.2.8 Dialyse.....	13
1.2.9 Klinik.....	13
1.2.9.1 Natrium- und Wasserhaushalt.....	13
1.2.9.2 Sympathikusaktivierung.....	13
1.2.9.3 RAAS System.....	14
1.2.9.4 Kalium.....	17
1.2.9.5 Kalzium- und Phosphat.....	18
1.2.9.5.1 Kalzium.....	18
1.2.9.5.2 Phosphat.....	19
1.2.9.5.3 Löslichkeitsprodukt.....	19
1.2.9.5.4 Hormone des Kalzium- und Phosphathaushalts.....	20
1.2.9.5.4.1 Parathormon.....	20
1.2.9.5.4.2 Vitamin D <sub>3</sub> .....	21

1.2.9.5.4.3 Calcitonin.....	21
1.2.9.5.4.4 FGF23/Klotho.....	22
1.2.9.5.4.4.1 FGF 23.....	22
1.2.9.5.4.4.2 FGF23-Klotho-Rezeptorkomplex.....	24
1.2.9.5.4.4.3 Klotho.....	24
1.2.9.6 Mineral bone disorder (MBD).....	25
1.2.9.7 Metabolische Azidose.....	27
1.2.9.8 Urämie.....	31
1.2.9.9 Chronische Inflammation.....	32
1.2.9.10 Anämie.....	33
1.3. Gefäßverkalkung in der chronischen Niereninsuffizienz.....	35
1.3.1 Histologischer Gefäßaufbau.....	35
1.3.2 VSMC.....	36
1.3.2.1 Ossifikation und Gefäßverkalkung.....	38
1.3.3 Atherosklerose.....	38
1.3.3.1 Epidemiologie der Atherosklerose.....	38
1.3.3.2 Pathophysiologie der Atherosklerose.....	39
1.3.4 Mediasklerose.....	40
1.3.4.1 Epidemiologie der Mediasklerose.....	40
1.3.4.2 Histopathologie der Mediasklerose.....	41
1.3.4.3 Pathophysiologie.....	41
1.3.4.3.1 Kalzium- und Phosphathaushalt.....	41
1.3.4.3.2 Metabolische Azidose.....	42
1.3.4.3.3 Urämie.....	43
1.3.4.3.4 Chronische Inflammation.....	43
1.3.4.3.5 Verlust von Kalzifizierungsinhibitoren.....	44
1.3.4.3.6 Die Rolle der glatten Muskelzellen.....	44
1.3.4.3.6.1 Osteochondrogene Differenzierung glatter Muskelzellen.....	44
1.3.4.3.6.1 Apoptose glatter Muskelzellen.....	45
1.3.4.3.7 Regression der Gefäßverkalkung.....	46

2. Methoden.....	47
2.1 Mausexperimente.....	47
2.2 Massenspektrometrie.....	48
2.3 Myographie.....	49
2.4 Array.....	49
2.5 cDNA Synthese, qRT-PCR.....	50
2.6 Histochemie und Immunhistochemie.....	52
2.6.1 Alizarin Red S Färbung.....	52
2.6.2 Vcam1 Färbung.....	52
2.7 Zellkultur.....	54
2.7.1 Splitten.....	55
2.8 Statistik.....	55
3. Ergebnisse.....	56
4. Diskussion.....	60

## Abkürzungsverzeichnis/Glossar

A.	Arteria
ABI	Ankle-Brachialis Index
ACE	Angiotensin-Converting-Enzyme
AB-Komplex	Avidin-Biotin-Komplex
ACR	Albumine to creatinine ratio
ALP	Alkalische Phosphatase
AT II	Angiotensin II
ATP	Adenosintriphosphat
BHS	Blut-Harn-Schranke
BMP-2	bone morphogenic protein 2
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	Kalziumphosphat
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
Casq-1	Calsequestrin-1
CKD	Chronic kidney disease, chronische Niereninsuffizienz
CKD-EPI	CKD- Epidemiology Collaboration
Cl	Chlor
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
Col3a1	Kollagen Typ II $\alpha$ 1 Isoform
CRP	C-reaktives Protein
Ct	cycle of threshold
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFR	estimated glomerular filtration rate, geschätzte glomeruläre Filtrationsrate
EPO	Erythropoetin
ESRD	end stage renal disease, terminale Niereninsuffizienz

EUTox	European Uremic Toxin Work Group
EZM	Extrazellulärmatrix
EZR	Extrazellularraum
FGF 23	Fibroblast growth factor 23
H+	Wasserstoffion, Proton
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Bikarbonat
HE	Hämatoxylin-Eosin
HPD	Hochphosphatdiät
HRP	Horseradish Peroxidase, Meerrettich-Peroxidase
ICP-MS	induktiv-gekoppelte Plasma-Massenspektrometrie
IHC	Immunhistochemie
IZR	Intrazellularraum
JGA	Juxtaglomerulärer Apparat
K	Kalium
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KDIGO	Kidney Disease Outcomes Quality Initiative
KF	Filtrationskoeffizient
KL	Löslichkeitsprodukt
LDL	low density lipoprotein
Mb	Myoglobin
MBD	Mineral bone disease
MDRD	Modification of Diet Renal Disease
MGP	Matrix Gla Protein
mM	Milimol
mRNA	messenger RNA
MS	Mediasklerose
m/z	Masse/Ladungsquotienten
Na	Natrium
NaPi	Natrium- Phosphat-Kotransporter
OPG	Osteoprotegerin
OPN	Osteopontin

OT	Objektträger
P	Phosphat
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	phosphate buffered saline, phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PiT	inorganic Phosphate Transporter
Peff	effektiver Filtrationsdruck
PAI-1	Plasminogen- Aktivator- Inhibitor 1
PG	Prostaglandin
PSS	physiologische Salzlösung
PTH	Parathormon
qRT-PCR	quantitative Real Time PCR
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron System
RANKL	Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand
RIN	RNA integrity number
RNA	Ribonukleinsäure
ROD	renal osteodystrophy, renale Dystrophie
ROS	reactive oxygen species, reaktive Sauerstoffspezies
SCD	Standard-Diät
SCr	Serumkreatinin
T2D	Diabetes mellitus Typ 2
TGF- $\beta$	transforming growth factor $\beta$
TRPV	transient receptor potential vanilloid
u.a.	unter anderem
VC	vascular calcification, Gefäßveralkung
Vcam1	vascular cell adhesion protein-1, vaskuläres Adhäsionsprotein 1
z.B.	zum Beispiel

## Abbildungsverzeichnis und -erklärung

<b>Abb. 1</b> <i>Kreatin Biosynthese</i> .....	3
Kreatin entsteht aus der Reaktion aus Arginin und Glycin, dessen Zwischenprodukte in Leber und Niere metabolisiert werden. Das Endprodukt Kreatin liegt gebunden an Phosphor im Muskel vor.	
<b>Abb. 2</b> <i>Chemische Reaktionsgleichung Kreatin-Phosphat ↔ Kreatin</i> .....	3
Bei Abspaltung des Phosphats durch die Kreatinkinase (CK) wird ATP als Energielieferant frei. Die CK liegt im Zytosol, als auch in den Mitochondrien vor. Im Zytosol arbeitet sie auf Energiebedarf und setzt ATP frei, in den Mitochondrien wird Kreatin in seine Speicherform rephosphoryliert.	
<b>Abb. 3</b> <i>Graphische Darstellung von SCr im mg/dl zur GFR(ml/min)</i> .....	4
Ein besteht ein nichtlinearer Zusammenhang zwischen dem SCr und der GFR.	
<b>Abb. 4</b> <i>Prognose der CKD anhand des CGA-Staging aus KDIGO 2012</i> .....	6
Die einzelnen Zellen geben das relative Risiko wieder. grün = niedriges Risiko, gelb = mittleres Risiko, orange = hohes Risiko, rot = sehr hohes Risiko.	
<b>Abb. 5 A)</b> <i>Zusammenhang der eGFR und dem Mortalitätsrisiko</i>	
<b>B)</b> <i>Zusammenhang der eGFR und dem Auftreten kardiovaskuläre Ereignisse.</i>	
<i>Daten altersstandardisiert</i> .....	8
<b>Abb. 6</b> <i>Diagnoseverteilung bei Patienten zu Therapiebeginn aus Quasi-Niere</i>	
<i>Jahresbericht 2006</i> .....	9
<b>Abb. 7</b> <i>Inzidenz von Diabetespatienten mit ESRD</i> .....	9
<b>Abb. 8</b> <i>Lebenserwartung anhand der eGFR</i> .....	10
<b>Abb. 9</b> <i>Kardiovaskuläres Morbiditätsrisiko nach Alter, ethnischer Herkunft, Geschlecht.</i>	
<i>Im Vergleich Normalbevölkerung und Dialysepatienten</i> .....	11
Kardiovaskuläre Mortalität bezeichnet hier das Sterben aufgrund von Arrhythmien, Kardiomyopathie, plötzlicher Herzstillstand, Myokardinfarkt, Herzinsuffizienz i.R. von Atherosklerose und Lungenödem.	
<b>Abb. 10</b> <i>Berechnung der GFR</i> .....	12
<b>Abb. 11 a)</b> <i>schematische Darstellung eines Glomerulum</i>	
<b>b)</b> <i>Semidünnschnitt eines Nierenkörperchens</i> .....	14
<b>Abb. 12</b> <i>Schematische Darstellung des RAAS- Systems</i> .....	16
<b>Abb. 13</b> <i>Verteilung des Körperkalziums</i> .....	18
<b>Abb. 14</b> <i>Löslichkeitsprodukt von <math>Ca_3(PO_4)_2</math></i> .....	19
<b>Abb. 15</b> <i>Kalzium- und Phosphathaushalt- die Haupteinflussfaktoren</i> .....	20

<b>Abb. 16</b> <i>Stimuli der FGF23 Sekretion</i> .....	23
<b>Abb. 17</b> <i>Berechnung der Anionenlücke</i> .....	27
<b>Abb. 18</b> <i>Ursachen für eine normocholärmische Azidose</i> .....	28
<b>Abb. 19</b> <i>Ursachen für eine hypercholärmische Azidose</i> .....	28
<b>Abb. 20</b> <i>Metabolische Azidose und ihr möglicher Einfluss auf Protein-Energie Mangelernährung</i> .....	29
<b>Abb. 21</b> <i>Metabolische Azidose und ihr Einfluss auf den Knochenstoffwechsel</i> .....	31
<b>Abb. 22</b> <i>Prozentzahl an Männern und Frauen mit einem Serumferritin &lt; 100 ng/ml oder einer Transferritinsättigung(TSAT) &lt; 20% nach Creatinin-Clearance</i> .....	33
<b>Abb. 23</b> <i>Farbliche Darstellung der unterschiedlichen Ursprünge der VSMC</i> .....	36
<b>Abb. 24</b> <i>Pathophysiologie und Stadieneinteilung einer atherosklerotischen Läsion</i> .....	39
<b>Abb. 25</b> <i>Durchschnittliche Zusammensetzung eines progressiven atherosklerotischen Koronarplaque mit 75%iger Stenose in der histologischen Darstellung</i> .....	39
<b>Abb. 26</b> <i>Schematische Darstellung eines induktiv-gekoppelten Plasma-Massenspektrometers (ICP-MS)</i> .....	48
<p>Ionisiertes Argon wird mit dem zu analysierenden Material soweit erhitzt (5000°C), bis sich Plasma bildet. Im Hochvakuumsystem werden die Ionen nach ihrem Masse/Ladungsquotienten (m/z) getrennt und qualitativ, sowie quantitativ detektiert.</p>	
<b>Abb. 27</b> <i>Vergrößertes Bild eines DNA-Microarrays</i> .....	49
<p>Der Array beinhaltet das gesamte Genom der Maus. Die Farben geben die Aktivität der Genabschnitte wieder.</p>	
<b>Abb. 28</b> <i>Prinzip der <math>\Delta \Delta C_t</math> Methode</i> .....	51
<b>Abb. 29</b> <i>Schematische Darstellung der Färbung mittels ABC-Komplex</i> .....	52
<b>Abb. 30</b> <i>Lichtmikroskopische Aufnahme der wachsenden glatten Muskelzellen</i> .....	54
<b>Abb. 31</b> <i>Alizarin Red S Färbung färbt Kalciumablagerungen in Tunica media der abdominalen Aorta</i> .....	56
<p>Die Aorta der DBA/2 Mäuse auf HPD (14 Tage) wurde mit Alizarin Red S gefärbt. Dabei wiesen die thorakalen Abschnitte (A, B) keinerlei Kalziumablagerungen auf, während im abdominalen Abschnitt Zeichen der Mediakalzifizierung auftraten. Der Maßstab für Abb. A und B ist 200µm und 50µm für Abb. C und D.</p>	
<b>Abb. 32</b> <i>Chemische und funktionelle Analyse der Aortenabschnitte der DBA/2N Mäuse auf HPD und SCD im Vergleich</i> .....	57
<p>Mit Hilfe der induktiv-gekoppelten Massenspektrometrie wurde der Kalzium- und Phosphatgehalt der thorakalen und abdominalen Aorta der Mäuse auf SCD (schwarze Balken) und HPD (weiße Balken) verglichen (n=10) (Abb. A und B).</p>	

Die funktionelle Auswirkung der Mediasklerose auf die Gefäßkontraktilität wurde mittels der Myographie ermittelt (n=7 je Gruppe). Es wurden jeweils die thorakalen und abdominalen Aortenabschnitte pro Gruppe verglichen (Abb. C und D).

\* p-Wert < 0.05

\*\* p-Wert < 0.01

\*\*\* p-Wert < 0.001

**Abb. 33** *Genexpressionsprofil im Vergleich auf SCD und HPD* .....58

Hierarchisches Dendrogramm der unterschiedlichen Genexpression in abdominalen und thorakalen Aorta unter Standarddiät (SCD) und Hochphosphatdiät (HDP).

**Abb. 34** *Transkriptionsprofil von Vcam1 im Vergleich auf SCD und HPD* .....59

Werte aus RT-PCR im Balkendiagramm mit Angabe des Standardfehlers. Hochsignifikante Hochregulierung von VCAM1 im abdominalen Abschnitt (B) im Vergleich zum thorakalen Abschnitt (A).

**Abb. 35** *Immunhistochemische VCAM1 Färbung* .....59

## Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1</b> <i>KDIGO Diagnosekriterien der chronischen Nierenerkrankung 2012</i> .....	2
<b>Tab. 2</b> <i>Serumkreatininwerte nach Geschlecht und ethnischer Herkunft</i> .....	4
<b>Tab. 3</b> <i>Berechnung der GFR nach CKD-EPI</i> .....	5
<b>Tab. 4</b> <i>Einteilung der CKD nach ACR</i> .....	7
<b>Tab. 5</b> <i>Einteilung der CKD nach GFR</i> .....	7
<b>Tab. 6</b> <i>Mittlere Konzentration der Elektrolyte und Nicht-Elektrolyte im menschlichen Blutplasma</i> .....	27
<b>Tab. 7</b> <i>Nahrungszusammensetzung SCD und HPD</i> .....	47
<b>Tab. 8</b> <i>Serumwerte am Tag 5: HPD-gefütterte Mäuse wiesen im Vergleich zu SCD-Mäuse signifikant erhöhte Harnstoff- und Phosphatwerte auf</i> .....	56

## Zusammenfassung

### Entwicklungsgrundlage der arteriellen Mediaverkalkung

**Hintergrund:** Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz weisen ein erhöhtes Ausmaß an Gefäßverkalkung auf, welches mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko vergesellschaftet ist. Dieser Kalzifizierungsprozess in diesem Patientengut betrifft vor allem die Tunica muscularis bzw. die glatten Muskelzellen dieser Schicht. Es scheint ein aktiv regulierter Vorgang zu sein, der Ähnlichkeiten mit der Osteogenese zeigt. Dabei spielt die Herkunft der glatten Muskelzellen eine entscheidende Rolle.

**Methoden:** 8 Wochen alte DBA/2N Mäuse erhielten in einem Beobachtungsintervall von 5-14 Tagen entweder eine Standard-Diät (SCD) oder eine Hochphosphatdiät (HPD). Anschließend wurde die Aorta der Mäuse entnommen und mittels Massenspektrometrie, Myographie, Array, qRT-PCR, Histochemie und Immunhistochemie analysiert und die Ergebnisse statistisch ausgewertet.

**Ergebnisse:** Die DBA/2N Mäuse auf HPD entwickelten am fünften Tag des Beobachtungszeitraums eine Niereninsuffizienz und wurden urämisch (Harnstoff  $197 \pm 24 \text{ mg/dL}$ , Phosphat  $197 \pm 24 \text{ mmol/L}$ ). Die Mäuse auf SCD wiesen keine derartigen Veränderungen auf (Harnstoff  $53 \pm 5 \text{ mg/dL}$ , Phosphat  $18.6 \pm 1,5 \text{ mmol/L}$ ). In der Alazarin Red S Färbung wies die abdominale im Gegensatz zur thorakalen Aorta der Mäuse auf HPD Ablagerungen in der Tunica media auf. In der Massenspektrometrie zeigte sich ein signifikant erhöhter Kalzium- und Phosphatgehalt der abdominalen Aorta (Kalzium  $29,4 \pm 10,1 \mu\text{g/mg}$ , Phosphat  $7,4 \pm 0,4 \mu\text{g/mg}$ ), der sich auch auf funktioneller Ebene in der Myographie widerspiegelte, wobei die abdominale Aorta einen signifikant geringeren Spannungsaufbau zeigte. Mittels einer Arrayanalyse und der Bestätigung der Ergebnisse mittels qRT-PCR zeigte sich eine Herunterregulierung kontraktile Proteine (Myoglobin, Calsequestrin-1 und Kollagen Typ II  $\alpha 1$  Isoform) und einer Hochregulierung von Runx-2 und Vcam 1.

**Fazit:** Auf den gleichen Reiz einer phosphatreichen Diät reagiert der Abschnitt der abdominalen Aorta mit einer stärkeren Mediakalzinose als der thorakale. Die mesenchymale Herkunft der glatten Muskelzellen der abdominalen Aorta scheint die Zellen anfälliger für die Entwicklung von Kalzifizierungen zu machen als der Ursprung der thorakalen glatten Muskelzellen aus der Neuralleiste.

## Abstract

### Mechanism of vascular calcification in patients with CKD

**Background:** Vascular calcification is common in patients with chronic kidney disease and is associated with a particular high cardiovascular mortality. The vascular smooth muscle cells seem to be actively involved in the process of vascular calcification which has similarities to osteogenesis. Therefore, we analysed the development of media calcification in different arterial segments such as the abdominal aorta, which derives from the mesenchyme, and the thoracic aorta, which mostly derives from the neuronal crest.

**Methods:** 8-week old DBA/2N mice were fed over 5 to 14 days with standard chow or high-phosphat diet. The aorta was obtained and analysed by inductively coupled mass spectrometry, myography, microarray, quantitative Real Time-PCR, histochemistry and immunohistochemistry, respectively.

**Results:** The DBA/2N mice fed with high-phosphate diet developed kidney failure and uremia on the fifth day of the observation interval (urea  $197\pm 24$ mg/dL, phosphorus  $197\pm 24$ mmol/L;) Mice on standard chow did not show these changes (urea  $53\pm 5$ mg/dL, phosphorus  $18.6\pm 1,5$ mmol/L) whereas mice on SCD did not show any pathologic changes (urea  $53\pm 5$ mg/dL, phosphorus  $18.6\pm 1,5$ mmol/L). The abdominal aorta from the mice on high-phosphate diet showed a clear phenotype of media calcification in the Alizarin Red staining. The inductive coupled mass spectrometry demonstrated significantly higher calcium and phosphorus contents of the abdominal aorta and the vascular wire myography experiments showed an impaired contraction of the abdominal aorta. The transcriptional profile of the abdominal aorta revealed a down-regulation of contractile proteins (myoglobin, calsequestrin-1, collagen type III  $\alpha 1$  isoform) and an up-regulation of Runx-2 and Vcam1.

**Conclusion:** The thoracic and abdominal aorta responded in different ways to high-phosphate diet. The abdominal aorta developed significantly more media calcification when compared to the thoracic aorta. Together, the embryological origin of the vascular smooth muscle cells seems to play an important role in the development of media calcification.

## 1. Einleitung

Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz weisen eine stark erhöhte kardiovaskuläre Mortalitätsrate auf. Bereits 1974 hat man mit dem Begriff „accelerated atherosclerosis“ versucht diesem Phänomen einen Namen zu geben. Der Begriff der Mönckeberg'schen Mediasklerose wurde hingegen bereits 1903 an diabetischen Patienten geprägt, die ebenso wie Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ein erhöhtes Risiko für eine Sklerose und Verkalkung der Tunica media aufweisen. In den letzten Jahren wurde zunehmend klar, dass die Gefäßverkalkung keine passive Präzipitation von Mineralien, sondern ein aktiver Prozess ist, in dem die glatten Muskelzellen (VSMC) der Tunica media eine Hauptrolle spielen (1–4). In folgender Arbeit wird die Pathophysiologie der chronischen Niereninsuffizienz mit besonderem Augenmerk auf potenziell kalzifizierenden Risikofaktoren näher beleuchtet und die pathophysiologischen Unterschiede zwischen der Atherosklerose und der (urämischen) Mediasklerose herausgearbeitet, die sowohl Risikofaktoren, zeitlichen und räumliche Prädilektionsstellen und klinische Endpunkte betreffen. Formal wird vorzugsweise die männliche Form verwendet (z.B. der Patient). Dies ist nicht als besondere Auf-/Abwertung dem einen oder anderen Geschlecht, sondern lediglich als eine Form der Ausdrucksweise zu sehen.

### 1.1 Aufgaben der Niere

Die Niere ist in ihrer Grundform ein über viele Stufen der Evolution erhaltenes Organsystem, welches essentiell für die Homöostase ist. Ihre Aufgaben sind komplexer als die eines reinen Ausscheidungsorgans. Sie reguliert den Wasser-, Säure-Basen- und Elektrolythaushalt und damit die Zusammensetzung und das Volumen des Extrazellularraums. Als endokrines Organ produziert sie Erythropoietin (EPO) und metabolisiert 25-Hydroxycholecalciferol (Kalzidiol) zu  $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -Cholecalciferol (Kalzitriol). Sie nimmt durch das Renin-Angiotensin-Aldosteron System (RAAS-System) bzw. Kinin-Kallikrein System Einfluss auf die Blutdruckregulation, sowie auf den Knochenstoffwechsel. Als Ausscheidungsorgan reinigt sie das Blut von wasserlöslichen, harnpflichtigen Substanzen, Endprodukte des Eiweißmetabolismus. Eine verminderte Funktion der Niere hat eine starke Auswirkung auf den Gesamtorganismus (5).

## 1.2 Chronische Nierenerkrankung (CKD)

### 1.2.1 Definition

Eine Definition der chronischen Nierenerkrankung (CKD) erfolgte 2002 durch die National Kidney Foundation (NKF) im Rahmen der Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (KDOQI). Bis dato gilt diese Definition mit zum Teil kleinen Modifikationen (6–8). Man spricht von einer chronischen Nierenerkrankung, wenn seit  $\geq 3$  Monaten funktionelle Einschränkungen oder strukturelle Nierenschädigungen bestehen, die, seit der Definition der KDIQO Guidelines 2012, auch eine gesundheitliche Relevanz haben (9). Dabei muss die Ursache nicht bekannt sein, um die Diagnose zu stellen, da unterschiedliche Ätiologien zum letztendlichen Zustandsbild der chronischen Nierenerkrankung führen (siehe Tab. 1).

<b>Criteria for CKD (either of the following present for &gt;3 months)</b>	
Markers of kidney damage (one or more)	Albuminuria (AER $\geq 30$ mg/24 hours; ACR $\geq 30$ mg/g [ $\geq 3$ mg/mmol]) Urine sediment abnormalities Electrolyte and other abnormalities due to tubular disorders Abnormalities detected by histology Structural abnormalities detected by imaging History of kidney transplantation
Decreased GFR	GFR $< 60$ ml/min/1.73 m <sup>2</sup> (GFR categories G3a-G5)

Abbreviations: CKD, chronic kidney disease; GFR, glomerular filtration rate.

Tab. 1 KDIGO Diagnosekriterien der chronischen Nierenerkrankung 2012

### 1.2.2 Parameter zur Bestimmung der Nierenfunktion

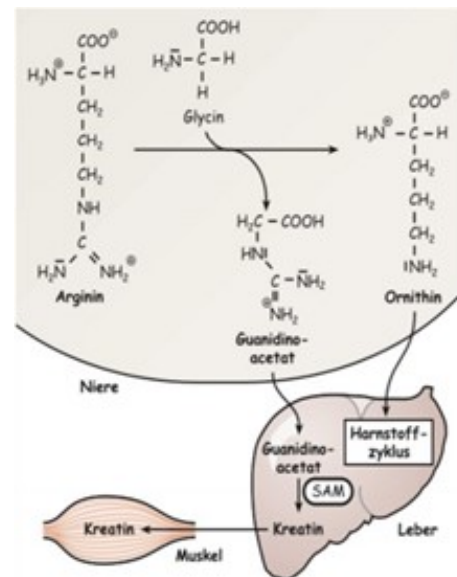
#### 1.2.2.1 GFR

Die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) gibt das Plasmavolumen an, das innerhalb einer festgelegten Zeiteinheit von einer bestimmten Substanz gereinigt wird (10). Dabei ist sie unter anderem von einer hohen Anzahl an Glomeruli und einem hohen renalen Blutfluss (20% des Herzzeitvolumens) abhängig (11). Der Normalwert der GFR eines jungen, gesunden Erwachsenen liegt in Abhängigkeit bestimmter Faktoren bei 125 mL/min/1.73 m<sup>2</sup> Körperoberfläche (9). Mittels exogener, d.h. von außen zugeführten oder endogener, d.h. körpereigener Stoffen kann die GFR bestimmt werden. Der Goldstandard ist die direkte Messung mittels der Inulin-Clearance. Inulin ist ein exogener Marker, der im Glomerulum frei filtriert wird und im Tubulussystem weder resorbiert, sezerniert, metabolisiert, noch synthetisiert oder gespeichert wird (12). Das ausgeschiedene Inulin entspricht der gefilterten Harnmenge. Die Bestimmung ist komplex und aufwendig. Im klinischen Alltag

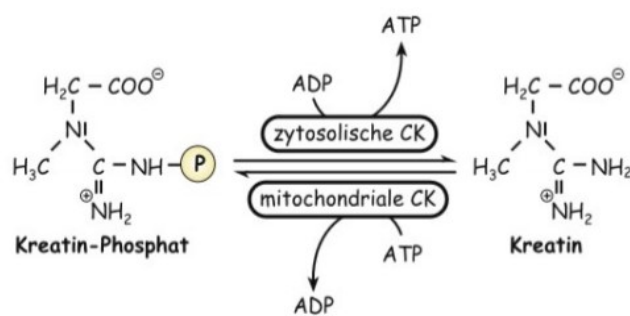
wird die rechnerische Annäherung der GFR mittels endogener Marker bevorzugt, die direkte Messung bei Bedarf als Bestätigung der Ergebnisse durchgeführt.

Die GFR wird mittels dem endogenen Serummarker Kreatinin (SCr) rechnerisch geschätzt.

Es wird im Körper annähernd konstant gebildet und wird, wie Inulin, im Glomerulum frei filtriert und im Tubulussystem nicht rückresorbiert. Kreatinin entsteht aus Kreatin, welches über Zwischenprodukte aus Arginin und Glycin in der Niere und Leber entsteht. Kreatin liegt als Energielieferant von ATP, gebunden an Phosphor im Muskel gespeichert vor. Sein Abfallprodukt Kreatinin wird nur über die Niere ausgeschieden (siehe Abb.1 und 2) (13). Der Kreatininwert ist abhängig von der Muskelmasse, demnach auch dem Geschlecht und dem Alter, der Mobilität, der Eiweißaufnahme, als auch der ethnischen Herkunft (14). Diese Kenntnis ist wichtig, um zu verstehen, dass unterschiedliche Referenzwerte bestehen, als auch dass der Kreatininwert nur dann verlässlich auf die GFR schließen lässt, wenn der Patient keine plötzliche Änderung seines Stoffwechsellmilieus aufweist, Nahrung mit konstantem Eiweißgehalt zu sich nimmt, sowie seine Muskelmasse konstant bleibt.



*Biochemie des Menschen: Das Lehrbuch für das Medizinstudium. Auflage: 5., korrigierte Auflage. Stuttgart: Thieme; 2012, Seite 590*



*Abb. 2 Chemische Reaktionsgleichung Kreatin-Phosphat ↔ Kreatin aus Horn F. Biochemie des Menschen: Das Lehrbuch für das Medizinstudium. Auflage: 5., korrigierte Auflage. Stuttgart: Thieme; 2012*

### 1.2.2.2 Serumkreatinin

Die geschätzten Normwerte (s. Einflussfaktoren oben), sind der Tabelle zu entnehmen (15).

	Serumkreatininwert in mg/dL	
Männer	1.13	
Frauen	0.93	
schwarze nicht-HispanoamerikanerInnen	Männer: 1.25	Frauen: 1.01
weiße nicht-HispanoamerikanerInnen	Männer: 1.16	Frauen: 0.97
HispanoamerikanerInnen	Männer: 1.07	Frauen: 0.86

Tab. 2 Serumkreatininwerte nach Geschlecht und ethnischer Herkunft. Data from Jones CA, McQuillan GM, Kusek JW. Serum creatinine levels in the US population: Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Kidney Dis* 1998; 32:992

Zwischen dem Serumkreatininwert und der GFR besteht ein nichtlinearer Zusammenhang.

Bleiben die oben genannten Faktoren konstant,

so steigt das SCr erst an, wenn die GFR um etwa 50% vermindert ist. Eine Früherkennung anhand des Serumkreatinins ist somit nicht möglich (siehe Abb. 3) (16). Bei Patienten mit mildem Krankheitsverlauf, siehe Einteilung unten, bedeutet eine geringe Änderung des SCr einen starken Abfall der GFR, während ein hoher Anstieg des SCr bei Patienten mit fortgeschrittener

Nierenerkrankung mit einer kleinen Abnahme der GFR einhergeht. Der geringe Anstieg der Serumkreatininwerte bei GFR Werte >50mL/min/1.73m<sup>2</sup>

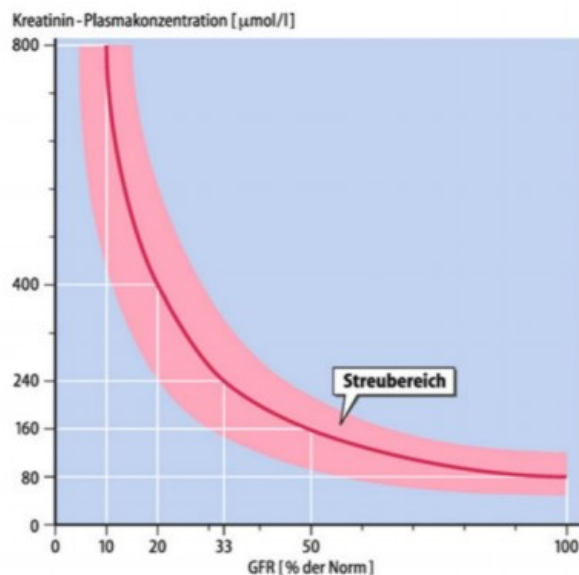


Abb.3 Graphische Darstellung von SCr im mg/dl zur GFR(ml/min) aus Schmidt RF, Lang F, Heckmann M. *Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie*. Auflage: 31. Aufl. 2011. Heidelberg: Springer; 2010. 979 p. S. 660

entsteht durch eine gesteigerte Sekretion von Kreatinin im proximalen Tubulussystem, der einen initialen Anstieg maskiert. Sobald der Serumkreatininwert  $\geq 2\text{mg/dL}$  übersteigt, ist dieser pathway ausgelastet (17).

### 1.2.2.3 CKD-EPI Formel

Um nun die GFR abzuschätzen wurden Formeln etabliert, die sich auf den Kreatiningehalt im Serum beziehen. Die Formel nach CKD Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) (2009) ist als Weiterentwicklung der Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) (1999) zu sehen, die vor allem bei einem GFR Wert  $> 60\text{mL/min/1.73m}^2$  der MDRD Formel vorzuziehen ist (siehe Tab. 3) (7,18,19). Sie schätzt die GFR genauer, kann das Erkrankungsstadium besser zuordnen und gibt exaktere Prävalenzdaten wieder (18,20,21). Wie Eingangs schon erwähnt, ist der Serumkreatininwert von unterschiedlichen Faktoren, sog. non- GFR determinants beeinflusst. Deshalb sind die Formeln nicht universell anwendbar. Bei diabetischen Patienten mit einer hohen GFR (22), bestimmten ethnische Gruppen (z.B. Asiaten in den USA lebend), Schwangeren und Menschen mit ungewöhnlichen Habitus, Muskelbau und Gewicht (krankhafte Fettleibigkeit, Bodybuilder, Amputationen, chronisch Erkrankte) ist eine Messung einer Abschätzung vorzuziehen (23) Dennoch liefern die Formeln genauere Werte, als die alleinige Messung des SCr (24).

Race and Sex	Serum Creatinine $\mu\text{mol/L}$ (mg/dL)	Equation
Black		
Female	$\leq 62$ ( $\leq 0.7$ )	$\text{GFR} = 166 \times (\text{Scr}/0.7)^{-0.329} \times (0.993)^{\text{Age}}$
	$> 62$ ( $> 0.7$ )	$\text{GFR} = 166 \times (\text{Scr}/0.7)^{-1.209} \times (0.993)^{\text{Age}}$
Male	$\leq 80$ ( $\leq 0.9$ )	$\text{GFR} = 163 \times (\text{Scr}/0.9)^{-0.411} \times (0.993)^{\text{Age}}$
	$> 80$ ( $> 0.9$ )	$\text{GFR} = 163 \times (\text{Scr}/0.9)^{-1.209} \times (0.993)^{\text{Age}}$
White or other		
Female	$\leq 62$ ( $\leq 0.7$ )	$\text{GFR} = 144 \times (\text{Scr}/0.7)^{-0.329} \times (0.993)^{\text{Age}}$
	$> 62$ ( $> 0.7$ )	$\text{GFR} = 144 \times (\text{Scr}/0.7)^{-1.209} \times (0.993)^{\text{Age}}$
Male	$\leq 80$ ( $\leq 0.9$ )	$\text{GFR} = 141 \times (\text{Scr}/0.9)^{-0.411} \times (0.993)^{\text{Age}}$
	$> 80$ ( $> 0.9$ )	$\text{GFR} = 141 \times (\text{Scr}/0.9)^{-1.209} \times (0.993)^{\text{Age}}$

CKD-EPI = Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration; GFR = glomerular filtration rate.

\* Expressed for specified race, sex, and serum creatinine level. To convert GFR from mL/min per 1.73 m<sup>2</sup> to mL/s per 1.73 m<sup>2</sup>, multiply by 0.0167. We derived equation coefficients from pooled development and internal validation data sets.

The CKD-EPI equation, expressed as a single equation, is  $\text{GFR} = 141 \times \min(\text{Scr}/\kappa, 1)^{\alpha} \times \max(\text{Scr}/\kappa, 1)^{-1.209} \times 0.993^{\text{Age}} \times 1.018$  [if female]  $\times 1.159$  [if black], where Scr is serum creatinine,  $\kappa$  is 0.7 for females and 0.9 for males,  $\alpha$  is -0.329 for females and -0.411 for males, min indicates the minimum of Scr/ $\kappa$  or 1, and max indicates the maximum of Scr/ $\kappa$  or 1. In this table, the multiplication factors for race and sex are incorporated into the intercept, which results in different intercepts for age and sex combinations.

Tab. 3 Berechnung der GFR nach CKD-EPI aus Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF 3rd, Feldman HI, u. a. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med.* 5. Mai 2009;150(9):604–12

### 1.2.2.4 Albuminurie

Eine Proteinurie beschreibt eine vermehrte Exkretion von Proteinen im Harn. Bis zu 150mg/24h sind im Harn physiologisch. Man unterscheidet zwischen klein- und hochmolekularen Proteinen. Albumin wird mit seinem Molekulargewicht von 69 kDa (13) zu den hochmolekularen Proteinen gezählt. Liegt eine vermehrte Albuminausscheidung vor, so ist das ein pathognomisches Zeichen für einen glomerulären Schaden. Die Albuminkonzentration im Urin kann von unterschiedlichen Faktoren beeinflusst werden, wohingegen Kreatinin über den Tag kontinuierlich ausgeschieden wird. Kreatinin ist der Referenzwert auf den das ausgeschiedene Albumin hin normalisiert wird. Um die Schädigung zu quantifizieren wird von den KDIGO Guidelines 2012 die Messung der Albumin/Kreatininratio im Harn (ACR) in mg/mmol oder mg/g empfohlen. Übersteigt dieser Wert 30mg/g in der ACR, so schließt man auf eine gesteigerte Permeabilität der Blut-Harn-Schranke. Die ACR Messung einer zufälligen Urinprobe ist vergleichbar mit einer 24h Messung der Albuminexkretion im Harn (24).

### 1.2.3 Einteilung und Prognose

Die Einteilung nach KDIGO Guidelines richtet sich nach der Ursache der Nierenschädigung, der GFR und der Albuminurie (Abb.4). Ist die Ursache bekannt, so kann eine spezifische Therapie der Grunderkrankung die Prognose entscheidend beeinflussen. Die GFR und die Albuminurie wirken weitgehend als unabhängige prognostische Faktoren, die Gesamt mortalität, die Mortalität aufgrund kardiovaskulärer Ereignisse und die Progression der Erkrankung betreffend (25,26). Es ergibt sich folgende Matrix, das sog CGA-Staging (siehe Abb. 4). Dabei sind den einzelnen Zellen Farben zugeordnet, die das relative Risiko künftiger Ereignisse bzw. Komplikationen widerspiegeln.

**Prognosis of CKD by GFR and Albuminuria Categories: KDIGO 2012**

				Persistent albuminuria categories Description and range		
				A1	A2	A3
				Normal to mildly increased	Moderately increased	Severely increased
				<30 mg/g <3 mg/mmol	30-300 mg/g 3-30 mg/mmol	>300 mg/g >30 mg/mmol
GFR categories (ml/min/1.73 m <sup>2</sup> ) Description and range	G1	Normal or high	≥90			
	G2	Mildly decreased	60-89			
	G3a	Mildly to moderately decreased	45-59			
	G3b	Moderately to severely decreased	30-44			
	G4	Severely decreased	15-29			
	G5	Kidney failure	<15			

Abb.4 Prognose der CKD anhand des CGA-Staging aus Levey AS, de Jong PE, Coresh J, El Nahas M, Astor BC, Matsushita K, u. a. The definition, classification, and prognosis of chronic kidney disease: a KDIGO Controversies Conference report. *Kidney Int.* Juli 2011;80(1):17–28.

In den vertikalen Spalten ist die Albuminurie in ACR aufgetragen. Die Albuminurie wird in drei Grade unterteilt (siehe Tab. 4)

Category	AER (mg/24 hours)	ACR (approximate equivalent)		Terms
		(mg/mmol)	(mg/g)	
A1	<30	<3	<30	Normal to mildly increased
A2	30-300	3-30	30-300	Moderately increased*
A3	>300	>30	>300	Severely increased**

Abbreviations: AER, albumin excretion rate; ACR, albumin-to-creatinine ratio; CKD, chronic kidney disease.  
 \*Relative to young adult level.  
 \*\*Including nephrotic syndrome (albumin excretion usually >2200 mg/24 hours [ACR >2220 mg/g; >220 mg/mmol]).

Tab. 4 Einteilung der CKD nach ACR aus KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease.

Das Auftreten einer Albuminurie geht mit einem Fortschreiten der Erkrankung einher. Die GFR-Rate verschlechtert sich doppelt so schnell bei einer Albuminurie >300 mg/g im Vergleich zu einer Albuminexkretion im physiologischen Bereich (27,28).

Bei einer 8-fachen Erhöhung der Albuminexkretion erhöht sich das Risiko einer terminalen Niereninsuffizienz (end-stage renal disease, ESRD) um das 3-fache (26). Mit der Progression der Erkrankung steigt das relative Risiko für Komplikationen. Die ausgeschiedene Albuminmenge korreliert mit dem Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse (29). Die Mortalität erhöht sich bei einer 8-fache Erhöhung der Albuminexkretion um 40% (26).

Die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) gilt als der Wert, der am Besten mit der Nierenfunktion, sowohl im gesunden, wie auch krankem Zustand, korreliert (23,30). Anhand der GFR Abschätzung werden fünf Grade unterschieden (siehe Tab. 5).

GFR category	GFR (ml/min/1.73 m <sup>2</sup> )	Terms
G1	≥90	Normal or high
G2	60-89	Mildly decreased*
G3a	45-59	Mildly to moderately decreased
G3b	30-44	Moderately to severely decreased
G4	15-29	Severely decreased
G5	<15	Kidney failure

Abbreviations: CKD, chronic kidney disease; GFR, glomerular filtration rate.  
 \*Relative to young adult level  
 In the absence of evidence of kidney damage, neither GFR category G1 nor G2 fulfill the criteria for CKD.

Tab. 5 Einteilung der CKD nach GFR aus KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease.

Dabei steigt das Mortalitätsrisiko mit einer GFR-Abnahme von  $<15\text{mL}/\text{min}/1.73\text{m}^2$  um 47% und das Risiko einer Progression zu ESRD um das 6-fache (25).

Vor allem innerhalb der chronischen Niereninsuffizienz des dritten Grades kommt es zu einem besonderen Anstieg der Sterblichkeitsrate, daher wird es in Stadium 3a und 3b unterteilt. Wie in Abb. 5 sichtbar, steigt das relative Risiko innerhalb der Gruppe von mittlerem (3a) zu hohem relativen Risiko (3b) für kardiovaskuläre Ereignisse, sowie vorzeitiges Sterben.

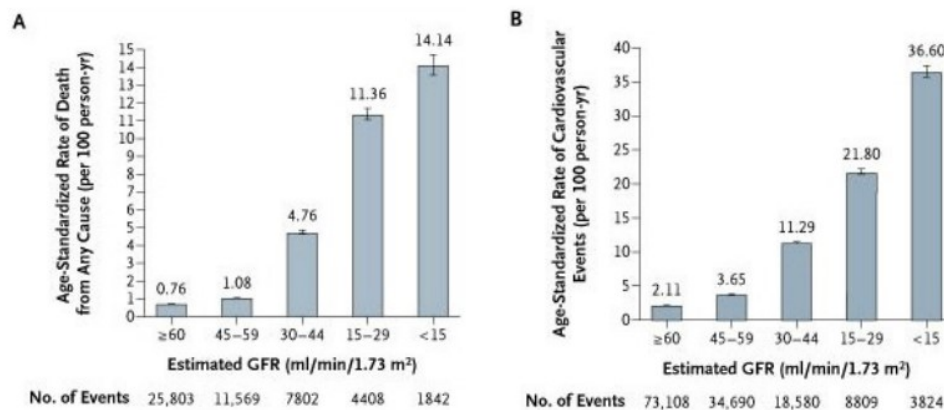


Abb. 5 A) Zusammenhang der eGFR und dem Mortalitätsrisiko B) Zusammenhang der eGFR und dem Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse. Daten altersstandardisiert aus Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu C. Chronic Kidney Disease and the Risks of Death, Cardiovascular Events, and Hospitalization. *N Engl J Med.* 2004;351(13):1296–305

Im Stadium 5 wird die Erkrankung als end-stage renal disease (ESRD) bezeichnet. Harnpflichtige Substanzen akkumulieren im Blut, man spricht von einem urämischen Syndrom. Ein Nierenersatzverfahren (Dialyse, Transplantation) sichert das Überleben des Patienten.

## 1.2. 4 Epidemiologie

Die chronische Nierenerkrankung wird als ein weltweit schwerwiegendes Gesundheitsproblem betrachtet und betrifft 10-16% der Erwachsenenpopulation in Asien, Europa und den USA (6,8,31–34).

Nach der Framingham Offspring Studie liegt die Anzahl der Neuerkrankten in den USA bei 9,4% (Beobachtungszeitraum 18,5 Jahre, 2585 Teilnehmer, Messung nach MDRD eGFR  $<59\text{mL}/\text{min}/1,73\text{m}^2$ ) (35).

### 1.2.5 Ursachen

Dabei führen unterschiedliche Erkrankungen zum gleichen Definitionsbild der chronischen Nierenerkrankung (siehe Abb. 6).

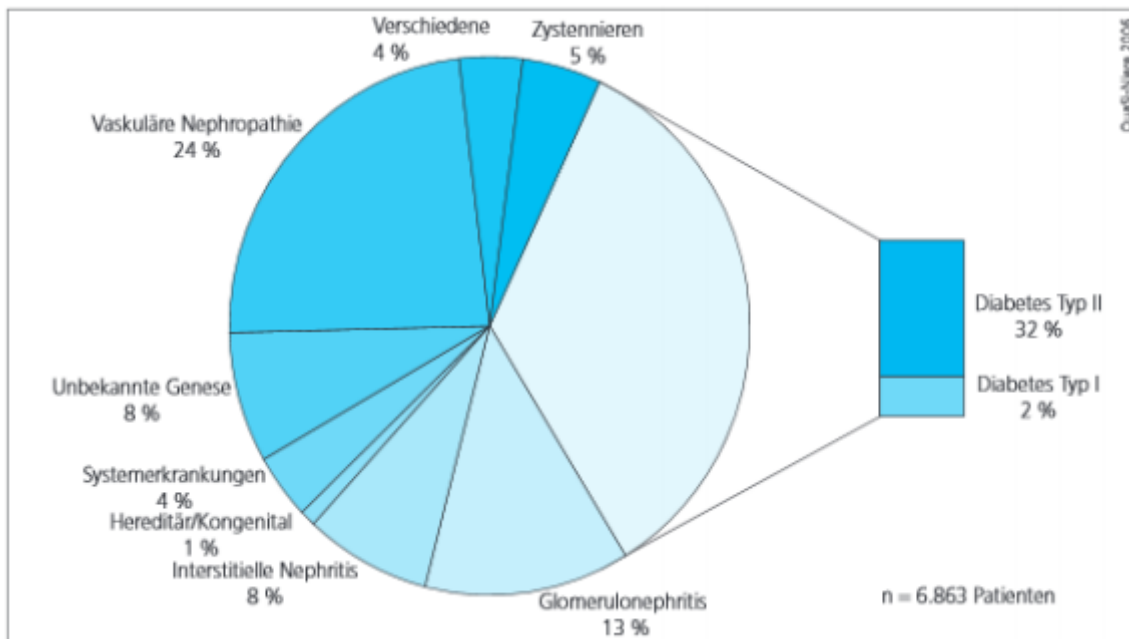


Abb. 6 Diagnoseverteilung bei Patienten zu Therapiebeginn aus Quasi-Niere Jahresbericht 2006

Die weltweit stärksten Ursachen für die Entwicklung einer ESRD stellen Hypertension und die diabetische Nephropathie dar (siehe Abb. 6). Während die anderen Ursachen in ihrer Prävalenz über die letzten Jahre stabil blieben, steigt die Inzidenzrate von Diabetespatienten, die in amerikanische ESRD-Programme aufgenommen werden (siehe Abb. 7) (36).

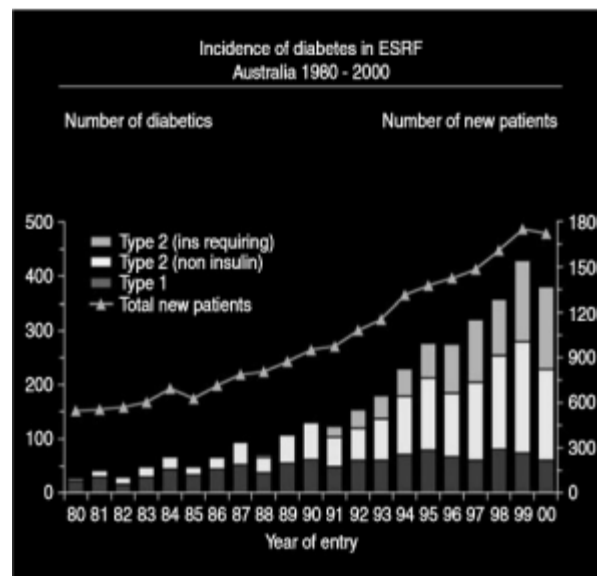


Abb. 7 Inzidenz von Diabetespatienten mit ESRD aus Atkins RC. The epidemiology of chronic kidney disease. *Kidney Int.* April 2005;67(S94):S14–S18.

## 1.2.6 Mortalität

Die chronische Nierenerkrankung geht mit einer erhöhten Mortalität einher, die Lebenserwartung nimmt mit verminderter GFR ab (siehe Abb. 8) (37). Studien zeigen, dass das Mortalitätsrisiko bei chronischer Niereninsuffizienz 5fach höher ist als die Wahrscheinlichkeit des Fortschreitens der Erkrankung in ein terminales dialysepflichtiges Nierenversagen (ESRD) (38).

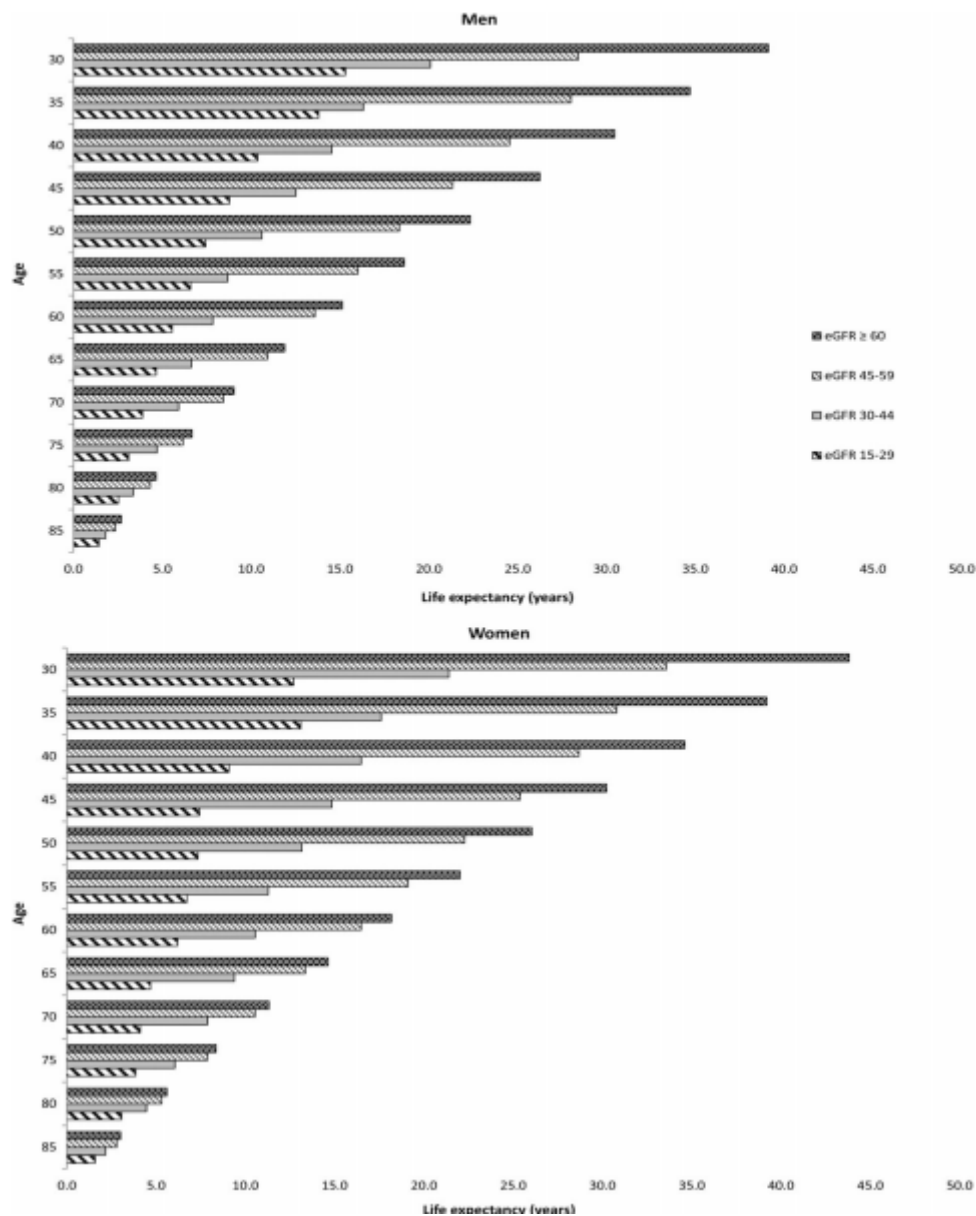


Abb. 8 Lebenserwartung anhand der eGFR aus Turin TC, Tonelli M, Manns BJ, Ravani P, Ahmed SB, Hemmelgarn BR. *Chronic kidney disease and life expectancy. Nephrol Dial Transplant.* 8. Januar 2012;27(8):3182–6

Dabei sind es vor allem kardiovaskuläre Komplikationen, an denen Patienten versterben. Die Hauptursachen der CKD (Diabetes und Hypertension), als auch die sich entwickelnden metabolischen Veränderungen im Rahmen der CKD sind Hochrisikofaktoren für die Entwicklung kardiovaskulärer Komplikationen. Das Mortalitätsrisiko bei Patienten im Stadium G5 (ESRD) ist um das 10-20fache gegenüber der Normalbevölkerung erhöht (39,40).

Dieser Zusammenhang ist unabhängig vom Alter am Dialysebeginn und steigt mit zunehmender Dialyседauer (Abb. 9). Die kardiovaskuläre Gesamtmortalität pro Jahr liegt bei 9,7% bei Peritonealdialyse und 9,5% bei Hämodialyse (41).

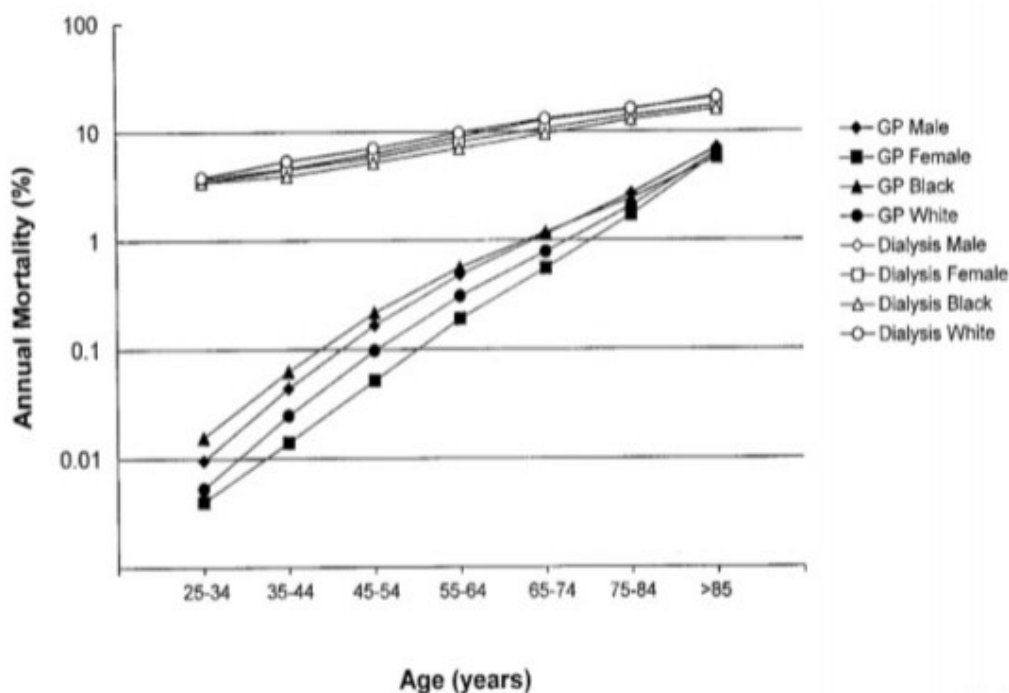


Abb.9 Kardiovaskuläres Morbiditätsrisiko nach Alter, ethnischer Herkunft, Geschlecht. Im Vergleich Normalbevölkerung und Dialysepatienten aus Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. *Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found. November 1998;32(5 Suppl 3):S112–119*

Um die Pathomechanismen dieser hohen kardiovaskulären Morbidität und Mortalität der Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz besser zu verstehen, haben wir eine tierexperimentelle Studie an Mäusen mit einer Niereninsuffizienz durchgeführt und dabei ein besonderes Augenmerk auf die Veränderungen an den arteriellen Gefäßen gelegt.

### 1.2.7 Pathophysiologie der chronischen Niereninsuffizienz

Unterschiedliche Ätiologien scheinen in eine gemeinsame Endstrecke zu führen, bei der es zu einer Schädigung des Nephrons, der Funktionseinheit der Niere, kommt. Die verbleibenden gesunden Glomeruli übernehmen kompensatorisch die Filterfunktion (42). Die GFR Abnahme fällt nur gering aus. Dabei fließt pro Zeiteinheit ein höheres Volumen durch die verbleibenden Glomeruli (Hyperfiltration). Mit dem höheren intrakapillären Volumen erhöht sich der intrakapilläre Druck, da der Querschnitt des Kapillarlumens als konstant gesehen werden kann. Das bedeutet, dass der effektive Filtrationsdruck in den verbleibenden Glomeruli erhöht ist. Es kommt zur Druckdiurese.

$$\text{GFR} = \text{Filtrationskoeffizient (KF)} \cdot \text{effektiver Filtrationsdruck}(P_{\text{eff}})$$

*Abb.10 Berechnung der GFR*

Die aufgrund des Drucks resultierende Kraft, die auf die Blut-Harn-Schranke (BHS) wirkt, ist erhöht und schädigt die Schranke. Das Glomerulum versucht dem Druckaufbau autoregulatorisch entgegen zu wirken. Durch autonome myogene Vasokonstriktion (Bayliss-Effekt) im Vas afferens wird der Kapillarlumendurchmesser kleiner und die Geschwindigkeit des Blutflusses erhöht sich (Kontinuitätsgesetz für inkompressible Fluide, Venturi Effekt). Durch die erhöhte GFR mit konsekutiver Zunahme der Filtrationsfraktion erhöht sich die in der Macula densa gemessene  $\text{Na}^+$ - $\text{Cl}^-$ -Konzentration. Es kommt im Abschnitt des Vas afferens zur Vasokonstriktion (tubuloglomerulärer Feedbackmechanismus). Das Renin-Angiotensin-Aldosteron System wird aktiviert, sobald der Blutdruck unter den der myogenen Autoregulation fällt. Die folgenden Abschnitte des Vas efferens, die die Grundlage der Versorgung und des Gegenstromprinzips sind, weisen einen geringeren hydrostatischen Druck auf. Der Osmolaritätsgradient, der Antrieb der Harnkonzentrierung und der Reabsorptionsprozesse, wird ausgewaschen. Es kommt zur Hypoxie des Nierenmarks. Mit fortschreitender Zeit verliert das Vas afferens die Fähigkeit der myogenen Vasokonstriktion, der Druck und das passierende Blutvolumen fließen ungehindert durch das Glomerulum und schädigen weiter das Endothel. Die Poren der BHS erweitern sich, die Permeabilität steigt, hochmolekulare Proteine werden filtriert. Das Interstitium, als auch das Tubulussystem wandeln sich im Rahmen eines inflammatorischen Prozesses fibrotisch um und es kommt zum Remodelling (43,44).

Im Stadium G4-G5 der chronischen Niereninsuffizienz treten erstmals klinische Symptome auf, wobei der histomorphologische Prozess schon weitaus früher beginnt.

### **1.2.8 Dialyse**

Als Nierenersatztherapie stehen die Hämodialyse, die Hämofiltration, die Peritonealdialyse und die Nierentransplantation zur Verfügung. Die Entscheidung, ob ein Ersatzverfahren nötig ist, hängt dabei nicht von einem bestimmten Kreatinin-Wert ab. Vielmehr sind es konservativ nicht kontrollierbare Symptome im Rahmen der CKD wie Hyperhydratation oder Hypertension, Beeinträchtigung kognitiver Fähigkeiten oder eine Verschlechterung des Ernährungszustandes trotz diätischer Maßnahmen. Diese treten vor allem bei einer GFR Rate von 5-10ml/min/1,73m<sup>2</sup> (G5, ESRD) auf. Eine Nierentransplantation sollte in Betracht gezogen werden, wenn sich die GFR bereits im Stadium G5 befindet und sich die Nierenfunktion innerhalb der nächsten 6-12 Monate nachweislich progressiv verschlechtern wird (9).

### **1.2.9 Klinik**

#### **1.2.9.1 Natrium- und Wasserhaushalt**

Die fraktionelle Ausscheidung von Natrium steigt exponentiell mit der Abnahme der GFR. Ab einer Filtrationsrate von 10-20ml/Min (ESRD) ist diese Funktion erschöpft (10). Es kommt zur Retention von Na<sup>+</sup>. Der Na<sup>+</sup>-Gehalt macht mit seiner Konzentration von 140mmol/l etwa die Hälfte der Gesamtosmolarität des Extrazellulärraums (EZR) aus und bestimmt somit maßgeblich sein Volumen (45). Durch die Ansammlung von Na im EZR und somit steigender Osmolarität shiftet kompensatorisch Wasser aus dem Intrazellulärraum (IZR) in den EZR. Es kommt zu Volumensexpansion im intravasalen und interstitiellen Raum mit Hypertension und Ödembildung (46).

#### **1.2.9.2 Sympathikusaktivierung**

Patienten mit CKD weisen höhere Plasmakonzentrationen an Katecholaminen und eine erhöhte Sensitivität gegenüber Noradrenalin auf (47–49). Die Plasmakonzentrationen von Noradrenalin korrelieren dabei mit dem Gesamtüberleben und dem Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse (50). Ursachen könnten unter anderem Natriumretention, sowie eine gesteigerte Reninausschüttung sein (51). Das urämische Stoffwechsellmilieu als Ursache für die gesteigerte Aktivität konnte nicht bewiesen werden, denn auch nach akuter

Nierenschädigung und renaler Ischämie war eine gesteigerte Aktivität zu beobachten (52,53). Bei Patienten unter Nierenersatztherapie, bei denen die Urämie im Blut nicht mehr nachweisbar war, nahm die Sympathikusaktivität dennoch nicht ab (54). Die Sympathikusaktivierung führt zu einer Zunahme der Hypertension mit konsekutiver linksventrikulärer Hypertrophie (55). Die linksventrikuläre Hypertrophie ist wiederum ein Risikofaktor für die Entwicklung von Arrhythmien, einem plötzlichen Herztod, einer Herzinsuffizienz und einem Myokardinfarkt (56,57). Die Aktivierung hat synergistische Effekte auf die Progression der Erkrankung. Sie steigert den Blutdruck und im weiteren Verlauf die Proteinurie mit konsekutiver interstitiellen Fibrose und Glomerulosklerose (58).

### 1.2.9.3 RAAS System

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron System, kurz RAAS-System, ist ein Regelkreis, der regulierend auf den Gefäßwiderstand und Salz- und Wasserhaushalt eingreift (5). Die Aktivität des Systems wird durch die Natriumkonzentration im Harn definiert, welche wiederum mit dem Volumenhaushalt korreliert. Es gibt keine festgelegten Plasmawerte für Renin, Angiotensin II (AT II) oder Aldosteron (59). Neben dem systemischen Renin-Angiotensin-System gibt es auch lokale, gewebeabhängige Angiotensin II Bildungsorte, deren systemischer Einfluss noch unklar ist (60). Renin ist ein Enzym, das hauptsächlich von den juxtaglomerulären Zellen im Vas afferens freigesetzt wird. Sie sind neben dem extraglomerulären Mesangium und der Macula densa ein Teil des juxtaglomerulären Apparats (JGA) der Niere (Abb. 11) (61).

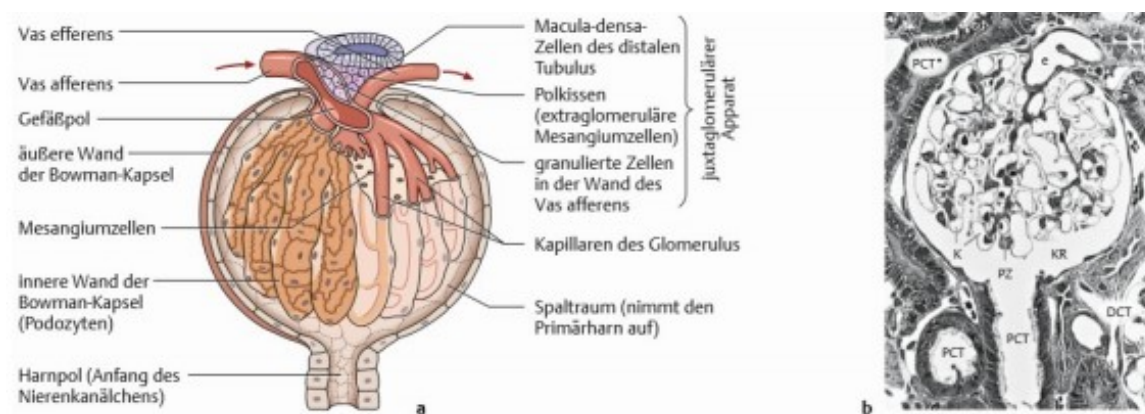


Abb. 11 a) schematische Darstellung eines Glomerulum b) Semidünnschnitt eines Nierenkörperchens (Ratte, Färbung Hämatoxylin-Säurefuchsin, 300-fache Vergrößerung) aus Behrends J, Bischofberger J, Deutzmann R. Duale Reihe: Physiologie. Auflage: 1. Stuttgart: Thieme; 2009. S. 295

Stimuli für die Freisetzung sind ein verminderter Nierenperfusionsdruck, eine erhöhte NaCl- Konzentration gemessen durch die Macula densa und eine erhöhte Sympathikusstimulation. Durch einen negativen Feedbackmechanismus wird die Reninfreisetzung durch Angiotensin II (AT<sub>1</sub> und AT<sub>2</sub> Rezeptor) direkt gehemmt (62). Messpunkte befinden sich an der afferenten Arteriole, den kardiopulmonalen Barorezeptoren und den Zellen der Macula densa (59).

Renin wandelt das vor allem in der Leber gebildete Angiotensinogen in Angiotensin I um. Angiotensin I wird durch das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) in Angiotensin II umgewandelt. Neben der Umwandlung von AT I zu AT II inaktiviert ACE Bradykinin (siehe Abb. 12) (63). AT II bindet an vier Rezeptoren, wobei die zwei folgenden näher besprochen werden: AT<sub>1</sub>- und AT<sub>2</sub>-Angiotensinrezeptor (Abb. 12) (64).

Der AT<sub>1</sub>- Rezeptor kommt im Gewebe am häufigsten vor. Durch die Bindung von AT II kommt es zu den typischen Effekten mit Vasokonstriktion der Gefäße und konsekutiver Erhöhung des peripheren Widerstands. In der Niere wird vermehrt Na<sup>+</sup> und Wasser zurückgehalten, indem im proximalen Tubulusabschnitt durch endokrine, autokrine und parakrine Prozesse Na<sup>+</sup> retiniert wird und die Nebennieren zur Aldosteronsynthese stimuliert werden. Die Sympathikusaktivität wird gesteigert und die Reninsekretion wird mittels negativem Feedback gehemmt (65,66).

Aldosteron wird hauptsächlich in der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde gebildet. Es ist ein Steroidhormon und bindet an einen intrazellulären Rezeptor, der direkt mit der DNA interagiert. In der Niere bedingt Aldosteron eine erhöhte Expression der Gene, die für die basolateralen Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPasen und luminalen Na<sup>+</sup> - und K<sup>+</sup>- Kanäle kodieren. Na<sup>+</sup> wird verstärkt rückresorbiert, K<sup>+</sup> und H<sup>+</sup> im distalen Tubulus vermehrt ausgeschieden (13,59,67,68).

Die Funktion des AT<sub>2</sub>- Rezeptors ist noch unklar. Man geht davon aus, dass er trotz seiner geringen postnatalen Expression vasodilatatorisch, antiproliferativ und proapoptotisch wirkt. Der Rezeptor fördert unter anderem die Apoptose von glatten Muskelzellen und vermindert die regenerative, neointimale Angiogenese (69).

Die Aktivierung des RAAS-Systems spielt eine zentrale Rolle in der Progression der chronischen Nierenerkrankung. Die Niere ist zum einen der Aktivator des RAAS-Systems, gleichzeitig schädigt sie sich selbst durch seine Aktivierung. Die durch AT II

hervorgerufene Vasokonstriktion mit konsekutivem Hypertonus betrifft auch die afferente und efferente Glomeruluskapillare. Es erhöht sich der intrakapilläre Druck. Es kommt zur Druckdiurese und folglich zur Schädigung der Blut-Harn-Schranke (70). Die Proteinurie fördert das fibrotische Remodelling (71). Die Verwendung von AT<sub>1</sub>- Rezeptorblocker bzw. ACE- Hemmer hat renoprotektive Wirkung (72).

AT II hat weiters fibroproliferative und proinflammatorische Wirkung, die den fibrotischen Remodellingprozess in der Niere, durch u.a. das Ausschütten von Chemokinen oder die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS), fördern (73).

Aldosteron scheint ein unabhängiger Faktor im Prozess des fibrotischen Remodellings in der Niere zu sein. Im Herzen ist bereits bekannt, dass eine exzessive Aldosteronproduktion nach einem Herzinfarkt die Myokardfibrosierung fördert (74). In der Niere scheint Aldosteron durch Signalwege des transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) die Kollagensynthese hoch zu regulieren und proliferativ auf Fibroblasten zu wirken (75). Die aldosteron-abhängige Bildung von ROS und demnach von oxidativem Stress in den proximalen Tubuluszellen fördert deren Apoptose (76), AT II und Aldosteron steigern die Bildung des Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1(PAI-1), einem Mediator der Glomerulosklerose und interstitiellen Fibrose (77).

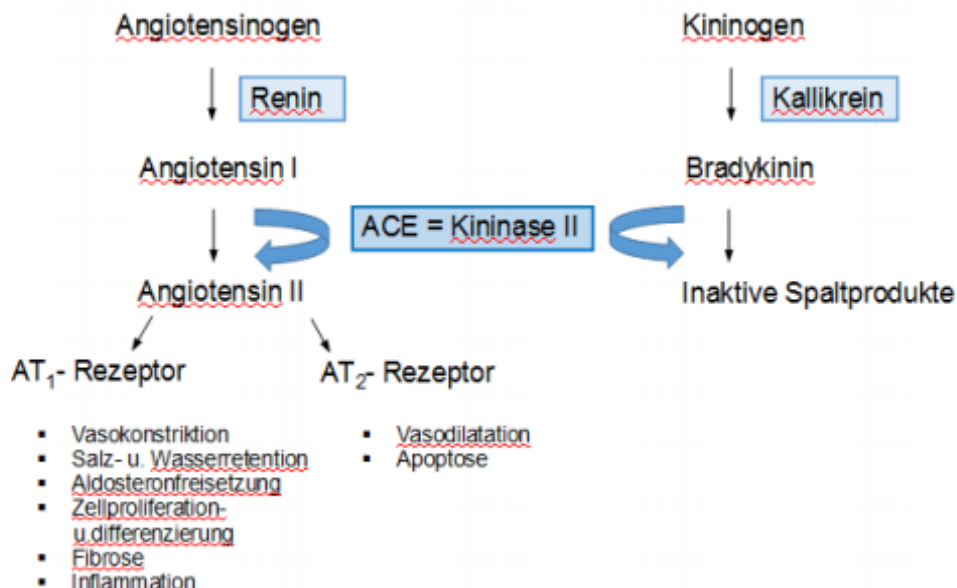


Abb. 12 Schematische Darstellung des RAAS- Systems

### 1.2.9.4 Kalium

Während Natrium vorwiegend extrazellulär vorkommt, befindet sich sein Gegenspieler Kalium ( $K^+$ ) zu 98% intrazellulär. Im Blutplasma befinden sich lediglich 0,4% des Körperkaliums, welches 3,5-5,5mmol/l entspricht. Aufgenommen wird Kalium über die Nahrung, ausgeschieden wird es zu 90% renal und zu 10% fäkal. Während der Nahrungsaufnahme wird Insulin freigesetzt. Insulin stimuliert die  $Na^+K^+$ -ATPase zur erhöhten  $K^+$ -Aufnahme. Ein Stimulus, der den  $K^+$ -Shift vom EZR in den IZR bewirkt. In der Niere wird  $K^+$  frei filtriert und im proximalen Tubulus durch parazellulären Transport, sowie im dicken aufsteigenden Ast der Henle Schleife durch den  $Na^+K^+2Cl^-$  Kotransporter fast gänzlich rückresorbiert. Das ausgeschiedene  $K^+$  entspricht weitestgehend der Leistung der aldosteron-abhängigen  $K^+$ -Ausscheidung im Sammelrohr. Die Aldosteronsynthese steigt schon bei gering gradigen extrazellulären  $K^+$ -Konzentrationsänderungen und kann die renale Ausscheidung von durchschnittlich 65mmol/Tag auf 500mmol/Tag steigern.

Die Aktivität der basolateralen  $Na^+K^+$ -ATPase erhöht sich, zusätzlich kommt es zu einer vermehrten Bildung von apikalen  $Na^+$ - und  $K^+$ -Transportkanälen. Dieser Prozess ist wie oben bereits erwähnt hormonell, aber auch pH-abhängig reguliert. Bei einer erhöhten extrazellulären Protonenkonzentration (Azidose) kommt es zu einer  $K^+$ -Retention. Die extrazelluläre  $K^+$ -Konzentration wird in strengen Grenzen gehalten, da das Kaliumkonzentrationsgefälle zwischen IZR und EZR die Basis des Ruhemembranpotenzials und damit auch Aktionspotenzials ist. Kleinste Änderungen im Kaliumhaushalt haben bereits Auswirkungen auf das Erregungspotential der Zelle. Eine Störung im  $K^+$ -Haushalt ist eng mit dem Säure-Base Haushalt vergesellschaftet, da  $K^+$  und  $H^+$  gegeneinander zwischen IZR und EZR ausgetauscht werden können. Da  $K^+$  das osmotisch wirksamste Kation der IZR ist, bestimmt seine Konzentration wesentlich das Zellvolumen.

Eine Veränderung der  $K^+$ -Plasmaspiegel bei Patienten mit CKD tritt meist erst in späteren Stadien (ESRD) auf. Ausnahmen sind u.a. der hyporeninämische Hypoaldosteronismus, Diabetes, metabolische Azidose oder tubulointestitielle Erkrankungen, die vor allem den distalen Nephronabschnitt betreffen. Bei einer Verminderung der GFR überwiegt die Hyperkaliämie (>5,5mmol/l) gegenüber der Hypokaliämie. Hyperkaliämie führt zu einer erhöhten Erregbarkeit der Zellen. Besonders am Herzen führt dies zu Herzrhythmusstörungen, die bis zum Herzstillstand führen können (13,45,59,78,79).

## 1.2.9.5 Kalzium-und Phosphat

### 1.2.9.5.1 Kalzium

99% des Körperkalziums ( $\text{Ca}^{2+}$ ) liegt an Phosphat gebunden im Knochen vor (Kalziumphosphat,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ). Die restlichen 1% verteilen sich auf den Extra- und Interzellularraum. Im Blut liegt  $\text{Ca}^{2+}$  in drei verschiedenen Formen vor (Abb. 13).

Fast 40% des Plasma- $\text{Ca}^{2+}$  sind an Proteine (z.B. Albumin, Fetuin) gebunden, ca. 14% sind an niedermolekulare, organische Stoffe als Komplex gebunden und 47% liegen frei (ionisiert) vor. Rund 60% des  $\text{Ca}^{2+}$  sind diffusibel, d.h. sie können in das Interstitium eintreten.

Insgesamt entsprechen 1% 2,2-2,6mmol/l im

Blutplasma, wobei dieser physiologische Bereich streng reguliert wird und nur geringen Schwankungen unterliegt. Nur 47% davon sind frei und somit regulierbar.

$\text{Ca}^{2+}$  hat eine Reihe an Aufgaben im Körper. Als Kalziumphosphat ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) baut es Knochen und Zähne auf. Gleichzeitig dient der Knochen als mobilisierbarer Speicher für  $\text{Ca}^{2+}$ .  $\text{Ca}^{2+}$  aktiviert die Blutgerinnung der Aktivierung und ist essentiell für die Muskelkontraktion.  $\text{Ca}^{2+}$  ist zudem ein wichtiger zweiter Botenstoff (second messenger) in der Zellsignaltransduktion.

Aufgenommen wird Kalzium zu 30% durch den Kalzitriol-abhängigen Transportmechanismus im Duodenum und zu 8-23% durch passive Diffusion im Dünndarm (Ileum). Ausgeschieden wird  $\text{Ca}^{2+}$  renal und fäkal. In der Niere wird  $\text{Ca}^{2+}$  parathormonabhängig im distalen Tubulus rückresorbiert bzw. ausgeschieden. Den an der Kalziumausscheidung bedeutenderen Anteil hat der unregulierte Verlust über die Faeces (13,78,80,81).

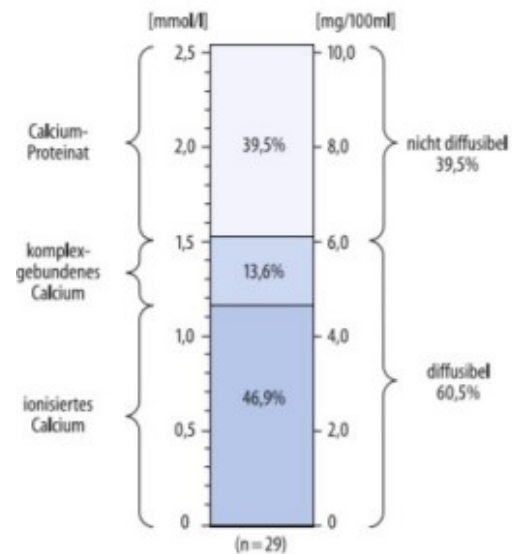


Abb. 13 Verteilung des Körperkalziums aus Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC. Biochemie und Pathobiochemie. Auflage: 8., völlig neu bearb. Aufl. 2007. Heidelberg: Springer; 2006.

### 1.2.9.5.2 Phosphat

85% des Körperphosphats (P) kommt gebunden an  $\text{Ca}^{2+}$  in Knochen und Zähnen vor (siehe oben). 14% verteilen sich in Form von Phosphorester, Phosphorproteine und freien Phosphationen in Zellmembranen und Bindegewebe. Die restlichen 1% befinden sich in der Extrazellulärflüssigkeit, wobei P frei und anorganisch vorliegt.

Im Gegensatz zur Plasma- $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration unterliegt die Plasma-P-Konzentration größeren Schwankungen mit einem physiologischen Bereich von 1-2mmol/l.

Phosphat baut als Kalziumphosphat den Knochen auf. Zusätzlich kommt Phosphat praktisch in jeder Zelle vor. Unter anderem als Bestandteil der Nukleinsäure (DNA/RNA), des Adenosintriphosphats, der Phospholipiden der Zellmembran und des sekundären Signalstoffs zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP). Im Blut und Urin wirkt P als Puffer. Insgesamt hat P im Blut durch sein vor allem intrazelluläres Vorkommen nur eine geringe Pufferkapazität. Im Urin stellt es das wichtigste Puffersystem dar.

Anorganisches Phosphat wird im Jejunum resorbiert. Über 90% des Plasmaphosphats wird in der Niere filtriert, wobei 80% wieder über einen  $\text{Na}^+$ -P-Kotransporter (NaPi) rückresorbiert werden. P wird in Form von  $\text{HPO}_4^{2-}$  im Kotransport mit  $\text{Na}^+$  mittels spezifischer Transporter im proximalen Tubulus resorbiert. Die Anzahl der Transporter ist hormonell reguliert durch Parathormon (PTH), Kalzitriol, Fibroblast Growth Factor-23 (FGF23) bzw. dessen Korezeptor Klotho.

Da P im Blut, im Gegensatz zu  $\text{Ca}^{2+}$ , vor allem in seiner freien Form vorliegt, entspricht die gefilterte Menge der Plasma-P-Konzentration. Auf Änderung der Plasma-P-Konzentration kann die Niere somit rasch reagieren und stellt den wichtigsten Regulator in der Phosphathomöostase dar (13,78,82).

### 1.2.9.5.3 Löslichkeitsprodukt

Die freie  $\text{Ca}^{2+}$  und P- Konzentration im Blutplasma hängen über ein gemeinsames Löslichkeitsprodukt ( $K_L$ ) zusammen. Steigt die Phosphatkonzentration vermindert sich die Konzentration an freien, ionisierten  $\text{Ca}^{2+}$  im Blut (Abb. 14) (13).

$$K_L = [\text{Ca}^{2+}]^3 \cdot [\text{PO}_4^{3-}]$$

Abb. 14 Löslichkeitsprodukt von  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$

### 1.2.9.5.4 Hormone des Kalzium- und Phosphathaushalts

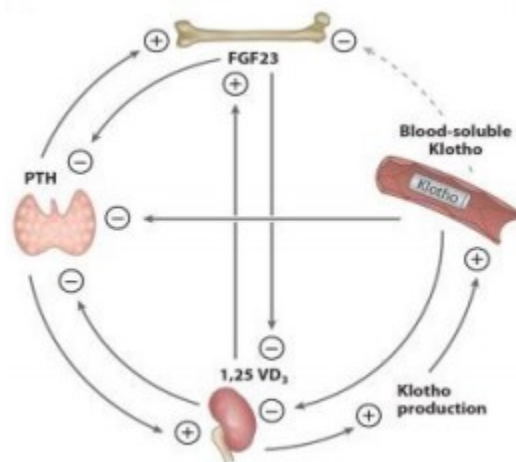


Abb. 15 Kalzium- und Phosphathaushalt- die Haupteinflussfaktoren aus Hu MC, Shiizaki K, Kuro-o M, Moe OW. Fibroblast growth factor 23 and Klotho: physiology and pathophysiology of an endocrine network of mineral metabolism. *Annu Rev Physiol.* 2013;75:503–33

#### 1.2.9.5.4.1 Parathormon

Parathormon (PTH) ist ein Peptidhormon, gebildet in den Epithelkörperchen der Nebenschilddrüse (Glandula parathyroidea). Messen  $\text{Ca}^{2+}$  sensitive Rezeptoren der Epithelzellen ein Absinken des freien  $\text{Ca}^{2+}$ , so wird vermehrt PTH gebildet. Ein alleiniger Anstieg des freien Phosphats führt auch ohne Änderung des Serum- $\text{Ca}^{2+}$  oder Kalzitriols zu einer vermehrten Synthese von PTH (83–85). Wie das freie Phosphat gemessen wird ist jedoch unklar. Angenommen wird, dass Anstieg des freien Serumphosphors zu einem erniedrigten Serum- $\text{Ca}^{2+}$  führt (siehe Kapitel 1.2.9.5.3 Löslichkeitsprodukt) (86).

PTH stimuliert den Knochenabbau, hemmt die renale Phosphatrückresorption (fördert die Phosphaturie), erhöht die FGF23 Synthese und erhöht die  $\text{Ca}^{2+}$  Resorption im Darm durch Interaktion mit dem Vitamin D-Haushalt. Dabei besteht ein negativer Feedbackmechanismus zwischen FGF23 und PTH, sowie Kalzitriol und PTH (Abb. 15).

In der Niere wird dieser Effekt durch Hemmung des  $\text{Na}^+$ -P Transporters erreicht.

PTH ist lediglich für eine rasche Gegenregulierung bei einer Hypo- $\text{Ca}^{2+}$  sinnvoll. Da es primär das  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Knochen mobilisiert, wird im Zuge der PTH Ausschüttung Vitamin D vermehrt synthetisiert (13,78,82).

#### 1.2.9.5.4.2 Vitamin D<sub>3</sub>

*Synonyme: Kalzitriol, Cholecalciferol, 1α,25 Dihydroxy-Cholecalciferol, 1α,25 Dihydroxy-Vitamin D<sub>3</sub>*

Kalzitriol gehört zu den Steroidhormonen. Seine Biosynthese beginnt in der Leber aus Cholesterin. Hier wird Cholesterin durch die Cholesterin-Dehydrogenase in 7-Dehydrocholesterin umgewandelt. In der Haut entsteht unter Einfluss von UV-Strahlung Cholecalciferol. Nach einer erneuten Passage durch die Leber und der Umwandlung zu 25-Hydroxy-Cholecalciferol (Calcidiol) wird das Produkt in der Niere durch die 1α-Hydroxylase zu 1α,25 Dihydroxy-Cholecalciferol (Kalzitriol) aktiviert.

Sekretionsstimuli für die Vitamin D-Synthese sind ein erhöhter PTH und ein erniedrigter Ca<sup>2+</sup> und Phosphatspiegel im Plasma. Dabei besteht ein Wechselspiel mit PTH. Ein erhöhtes PTH ist zwar ein Sekretionsreiz, ein erhöhter Vitamin D Spiegel senkt den PTH Spiegel.

Kalzitriol bindet an einen intrazellulären Vitamin D Rezeptor, der im Zellkern die Transkription bestimmter Gene beeinflusst. Im Darm ermöglicht Kalzitriol die Absorption von Ca<sup>2+</sup> und Phosphat durch die Synthese von Transportkanälen (TRPV5/6, Calbindin D und Na<sup>+</sup>-P-Kotransporter). In der Niere erhöht es die Ca<sup>2+</sup>-Resorption im proximalen Tubulus und beschleunigt die PTH-abhängige Ca<sup>2+</sup>-Rückresorption. Im Knochen induziert Kalzitriol die Bildung von Osteocalcin in Kombination mit Vitamin K. Es fördert den Einbau von Ca<sup>2+</sup> und damit die Knochenmineralisation (13,78,87). Weiters stimuliert Kalzitriol die Bildung von Klotho. Die 1α-Hydroxylase wird nicht nur in der Niere gebildet, sondern wurde auch in Geweben der Prostata, der Brust, des Darms, der Lunge, der β-Zellen des Pankreas, der Schilddrüse, als auch in Monozyten gefunden. Das extrarenal gebildete Kalzitriol hat vor allem autokrine/ parakrine Aufgaben, die u.a. das Zellwachstum und die -proliferation, sowie die Modulation von immunologischen Prozessen betreffen (Abb. 15) (88).

Kalzitriol wird durch die 24 Hydroxylase zur wasserlöslichen Calcitriolensäure abgebaut. Eine erhöhte Phosphat-Plasmakonzentration steigert die Aktivität, PTH senkt sie (89,90).

#### 1.2.9.5.4.3 Calcitonin

Calcitonin ist ein Peptidhormon und wird in den C-Zellen der Schilddrüse (Glandula thyroidea) gebildet. Es kann als direkter Gegenspieler des PTH gesehen werden, dessen Sekretionsstimulus die Hyperkalzämie ist. In der Niere wirkt es synergistisch zu PTH. Es

steigert die Phosphatausscheidung und erhöht die  $\text{Ca}^{2+}$ -Resorption. Im Knochen wirkt es jedoch als Antagonist zu PTH, indem es die Osteoklastenaktivität herunter reguliert. Es fördert die Knochenmineralisation (Abb. 15) (13,78).

#### **1.2.9.5.4.4 FGF23/Klotho**

##### **1.2.9.5.4.4.1 FGF 23**

Die Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (FGF) erfüllen wichtige Aufgaben in der Entwicklung und im Metabolismus des Menschen (91,92). Der Fibroblasten-Wachstumsfaktor-23 (FGF 23) gehört gemeinsam mit FGF19/ (FGF15) und FGF21 einer Subfamilie der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren an. Diese Subfamilie zeichnet sich durch ihre vor allem endokrinen Eigenschaften und ihre hormonelle Wirkung aus (91,93). FGF23 spielt dabei u.a. eine wichtige Rolle im Phosphatstoffwechsel (94).

FGF23 zeigt darüber hinaus Eigenschaften eines CKD Biomarkers und Prognosefaktors (95). FGF23 wird schon in frühen Stadien der CKD exprimiert (G2) und korreliert dosisabhängig mit der Progression der CKD (96–99). Weiters gilt FGF23 als unabhängiger Risikofaktor für einen erhöhten left ventricular mass index und geht signifikant mit einer erhöhten Prävalenz an linksventrikulärer Hypertrophie einher (100). Beide Faktoren beeinflussen die kardiovaskuläre Mortalität. Im ersten Jahr der Hämodialysetherapie korreliert FGF 23 positiv mit der Mortalitätsrate (101). Unklar ist, ab welchem definierten Schwellenwert FGF23 als erhöht bezeichnet werden kann (95).

FGF23 wird hauptsächlich im Knochen von den Osteozyten und Osteoblasten, von den endothelialen Zellen der venösen Sinusoide des Knochenmarks, aber auch vom Thymus gebildet (92,102). Unterschiedliche Stimuli, wie u.a. eine erhöhte Plasma-P-Konzentration, eine erhöhte PTH- und Kalzitriolkonzentration, ein erniedrigtes Serum- $\text{Ca}^{2+}$  und auch niedriges Klotho führen zu einer vermehrten FGF23 Synthese (Abb. 15, Abb. 16) (82,103–105).

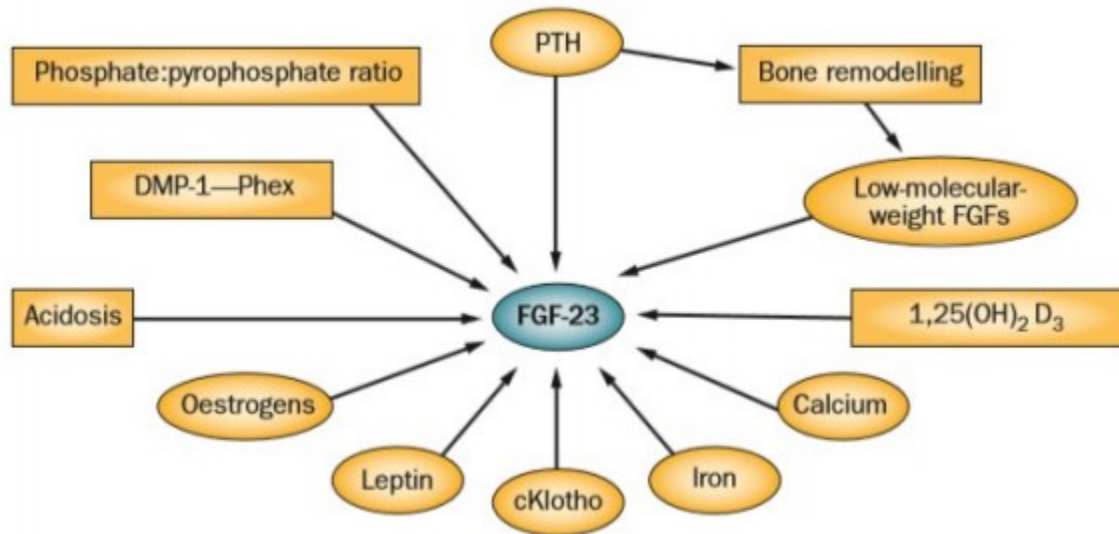


Abb. 16 Stimuli der FGF23 Sekretion aus Silver J, Naveh-Many T. FGF-23 and secondary hyperparathyroidism in chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol.* November 2013;9(11):641–9.

Die Modulation der FGF23 Plasmakonzentration ist jedoch komplex. Während i.v. Injektionen von Phosphat keinen FGF23 Anstieg nach sich zogen, zeigen sich diese Effekte bei anhaltender phosphatreicher Ernährung (106–108). Dabei ist unklar, wie und wodurch die Phosphatkonzentration im Körper bestimmt wird (95). Die Plasma-P-Konzentration als Stimulus allein genügt nicht. Eine möglicher Stimulus ist das Verhältnis von anorganischem Phosphat zu Pyrophosphat im Knochen (109). PTH wirkt, trotz seiner konsekutiven Erhöhung des Kalzitriolspiegels, auch direkt als unabhängiger Faktor der FGF23 Synthese (110–112). PTH erhöht zeit- und konzentrationsabhängig die Bildung von FGF23 mRNA (113). Dies geschieht aber nur, wenn sich durch den PTH-Anstieg eine Normokalzämie einstellt. Bleibt eine Hypokalzämie  $<4\text{mg/dl}$  bestehen, dann folgt kein Anstieg der FGF23 Synthese (114).

Erhöhte FGF23 Spiegel sind auch mit Osteomalazie und Rachitis assoziiert (115). Die vermehrte Expression führt zu einer verminderten Phosphatresorption in der Niere (und einer vermehrten Phosphaturie) durch Hemmung des  $\text{Na}^+$ -P-Kotransporters (NaPi-2a, NaPi-2c) im proximalen Tubulus (116–118). Gleichzeitig hemmt FGF23 die Hydroxylierungsprozesse im Vitamin D Metabolismus sowohl in der Leber, als auch in der Niere und fördert den Abbau von Vitamin D, indem es die Aktivität der 24-Hydroxylase steigert (117,119–121). Weiters inhibiert FGF23 die PTH Synthese, indem es in der Schilddrüse die Expression der  $\text{Ca}^{2+}$  sensitiven Rezeptoren, als auch die der Vitamin D

Rezeptoren erhöht, sowie die Zellproliferation hemmt (122,123). Die Expression von Klotho wird in der Schilddrüse ebenfalls durch FGF23 gesteigert (122).

#### **1.2.9.5.4.4.2 FGF23-Klotho-Rezeptorkomplex**

Um dieser Wirkungen zu entfalten bindet FGF23 an den membranständigen Rezeptor der FGF-Familie. Die Bindung der endokrinen FGF Subfamilie an ihren Rezeptor (FGFR) ist jedoch nur von geringer Affinität, denn den endokrinen FGFs fehlt die heparin-bindende Domäne. Diese ist zwar von Vorteil um die Sekretion zu fördern, andererseits wird es sich negativ auf das Bindungsvermögen aus (124–126). Bedingt durch diese geringe Bindungsaffinität benötigt FGF23  $\alpha$ -Klotho als Korezeptor (124,127). FGFR und  $\alpha$ -Klotho bilden einen Komplex (klotho fibroblast growth factor receptor 1 complex) (109), der FGF23 nun mit einer höheren Affinität bindet als eines der Faktoren es allein würde (128). Dennoch scheint FGF23 auch unabhängig zu wirken, indem es die Osteoblastendifferenzierung, sowie die Knochenmineralisierung hemmt (129). Eine direkte Wirkung von FGF23 ohne Klotho auf den Phosphatstoffwechsel konnte bisher nicht festgestellt werden (130).

#### **1.2.9.5.4.4.3 Klotho**

Das Klotho Gen kodiert jeweils für drei Typ-I Transmembranproteine ( $\alpha$ -Klotho,  $\beta$ -Klotho,  $\gamma$ -Klotho), die einen extra, sowie intrazellulären Teil besitzen. Sie werden gewebeabhängig exprimiert und bilden mit unterschiedlichen FGF Komplexe. Da die meisten Gewebe FGFR exprimieren, bestimmt die gewebeabhängige Expressierung von Klotho die endokrine Aktivität der FGF (131,132). FGF23 bildet mit  $\alpha$ -Klotho einen Komplex.

$\alpha$ -Klotho wird in der Niere und in der Schilddrüse exprimiert und hemmt beispielsweise die PTH Sekretion (122). In der Niere wird  $\alpha$ -Klotho vor allem in Zellen des distalen Tubulussystems, exprimiert (133,134). Obwohl es den Anschein hat, dass die meiste FGF23 Wirkung im proximalen Tubulus stattfindet, wird dort  $\alpha$ -Klotho vergleichsweise wenig exprimiert (135). Mögliche Erklärungsmodelle könnten ein direkter Signalweg durch FGF23 im proximalen Tubulus sein, sodass schon wenige FGF23-Klotho Komplexe ausreichen und/oder FGF23 und Klotho gehen den Komplex im distalen Tubulus ein und wirken über parakrine Faktoren auf den proximalen Tubulus zurück (125,136). Stimuli für die renale Klothoexpression ist eine erhöhte CYP27b1 Aktivität (kodiert für die  $\alpha$ -Hydroxylase), so u.a. eine phosphatreiche Diät (137).

Klotho kodiert zwar für ein Typ-I Transmembranprotein, doch kann Klotho durch alternatives Spleißen auch als lösliches Protein synthetisiert werden. Weiters kann  $\alpha$ -Klotho, im Gegensatz zu  $\beta$ -Klotho und  $\gamma$ -Klotho, seine extrazelluläre Domäne in die Zirkulation abgeben und ist im Blut, im Urin und in der zerebrospinalen Flüssigkeit detektierbar (125). In seiner zirkulierenden Form hat Klotho regulatorische Funktionen und wirkt als glykanmodifizierendes Enzym (125). Es erhöht unter anderem die  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{K}^{+}$  Aufnahme und vermindert die P-Resorption, indem es die Endozytose der Rezeptoren inhibiert bzw. stimuliert (138–140). Durch Interaktion mit Insulin, Insulinwachstumsfaktor-1 (IGF-1) und TGF- $\beta$  oder ihren Rezeptoren hemmt Klotho ihre Aktivität und wirkt so u.a. der renalen Fibrosierung entgegen (141). Dabei ist unklar welchen Rezeptor und welche Signalkaskade das zirkulierende Klotho verwendet (125). Den Einfluss von Klotho auf den Kalzium- und Phosphathaushalt zeigt sich insbesondere bei Klotho knock-out Mäusen (Klotho<sup>-/-</sup>). Sie weisen eine Hochregulierung der  $\alpha$ -Hydroxylase und eine Herunterregulierung der 24-Hydroxylase auf und demnach hohe Kalzitriolplasmaspiegel (142). Das Überangebot an Kalzitriol scheint sich verschlechternd auf den bestehenden Alterungsprozess auszuwirken und fördert die ektope Kalzifizierung (143). In Wildtypmäusen führt eine Vitamin D Gabe zu einer Hochregulierung der renalen Klotho Expression (144).

### 1.2.9.6 Mineral bone disorder (MBD)

Die chronische Nierenerkrankung ist gekennzeichnet durch Störungen im Kalzium- und Phosphathaushalt mit einem begleitenden Ungleichgewicht der regulierenden Hormone, welche schon in frühen Stadien der CKD auftreten.

Im klinischen Bild imponieren Frakturen, Osteoporose und Osteomalazie. Die Patienten weisen vermehrt Gefäßverkalkungen auf, die zu einem erhöhten kardiovaskulären Risiko beitragen (145–147). Diese Veränderungen im Rahmen der CKD werden als Chronic Kidney Disease- Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD) bezeichnet und beschreiben die im Rahmen der CKD auftretende Komplikationen: renale Osteodystrophie (ROD) und ektope (vaskuläre) Kalzifizierung. Unterschiedliche CKD Stadien weisen eine unterschiedlichen Schweregrad der CKD-MBD auf (9,148). Die ROD ist ein Sammelbegriff für unterschiedliche ossäre Veränderungen, so u.a. für die hyperparathyreote Osteopathie („high-turnover“), die gemischte Knochenläsion, die

Osteomalazie und die adynome Knochenerkrankung (10). Die häufigste Form in CKD Patienten ist die hyperparathyreote Osteopathie (149).

Im Stadium 3 der CKD ist die Niere nicht mehr fähig Phosphat in ausreichenden Mengen auszuscheiden. Die FGF23 medierte Ausscheidung von Phosphat erfolgt durch die Hemmung der Na/Pi Kotransporter NaPi2a und NaPi2 c im proximalen Tubulus (150,151). Bedingt durch die Hyperphosphatämie wird zudem vermehrt PTH synthetisiert und die Nebenschilddrüsenzellproliferation angeregt (152). Es entwickelt sich ein sekundärer Hyperparathyreoidismus (9).

Die FGF23 Synthese wird zum einen durch die Hyperphosphatämie selbst, als auch durch das gesteigerte PTH- und Kalzitriolsynthese stimuliert. Dennoch ist ein Anstieg des FGF23 vor einem Anstieg des PTH zu verzeichnen (99). Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass schon geringe Mengen an PTH ausreichen, um einen FGF23 Anstieg zu bewirken (109), eine andere dass mit zunehmender Progression der CKD die Expression von Klotho sinkt und die Niere eine Resistenz gegenüber dem zirkulierenden FGF23 entwickelt (153,154). Die gesteigerte FGF23 Aktivität führt zu keiner Supprimierung der PTH Produktion im Sinne eines negativen Feedbackmechanismus. Die Hauptzellen der Nebenschilddrüsen werden im Laufe der Erkrankung gegenüber FGF23 resistent (155). Die Hyperphosphatämie bleibt bestehen.

Vor einer Erhöhung des PTHs tritt eine Erniedrigung der Kalzitriolplasmakonzentration auf (156). Studien zeigen, dass diese Erniedrigung durch FGF23 ausgelöst wird (157). Gleichzeitig stimuliert die niedrige Kalzitriolkonzentration, vielmehr der niedrige  $\text{Ca}^{2+}$ -Serumspiegel, die PTH Synthese (149,158).

Insgesamt stellt sich in einer hormonellen Dysbalance eine positive Phosphorbilanz im Körper ein. Der überschüssige Phosphor wird nun nicht mehr nur im Knochen, sondern auch in Weichteilen und dem Gefäßsystem abgelagert (159).

### 1.2.9.7 Metabolische Azidose

Das Säure-Basen Gleichgewicht wird sowohl respiratorisch durch die Lunge, als auch metabolisch durch die Niere reguliert.

Hinweis auf eine metabolische Azidose sind ein niedriger pH Wert <7.36 und eine niedrige Bikarbonatkonzentration ( $[HCO_3^-]$ ) im Serum (10,160). Man unterscheidet hauptsächlich zwei Formen der metabolischen Azidose, die durch Berechnung der Anionenlücke unterschieden werden: vergrößerte Anionenlücke liegt bei normochlorämischer Azidose, eine normale Anionenlücke bei hyperchlorämischer Azidose vor (10). Die Anionenlücke berechnet sich aus der Differenz der häufigsten messbaren Kationen und Anionen und beträgt normalerweise ca. 12mmol/l (Abb. 17) (161).

$$\text{Anionenlücke (mmol/l)} = [Na^+] - ([Cl^-] + [HCO_3^-])$$

Abb. 17 Berechnung der Anionenlücke

Die angegebenen Kationen und Anionen sind lediglich Vertreter und geben nicht die gesamte Menge an Anionen und Kationen im Blut wieder (Tab. 6). Kalium, ein weiteres Kation, wird in dieser Formel beispielsweise außer Acht gelassen, da es vor allem intrazellulär vorkommt (16). Eine metabolische Azidose mit vergrößerter Anionenlücke entsteht, wenn zusätzliche, nicht gemessene Säuren im Blut zu einem Abfall von  $HCO_3^-$  führen. Solche zusätzlichen Säuren können beispielsweise Ketonkörper und Acetylsalicylat sein (Abb. 18) (5,10). Bei einer metabolischen Azidose mit normaler Anionenlücke kommt es auch zu einem  $HCO_3^-$  Abfall, der jedoch durch eine hohe Chloridkonzentration  $[Cl^-]$  ausgeglichen wird (Abb. 19).

	g/l	mval/l	mmol/kg Plasmawasser
<b>Elektrolyte</b>			
<i>Kationen</i>			
Natrium	3,27	142	152
Kalium	0,16	4	4
Kalzium	0,10	5	3
Magnesium	0,03	3	1,6
Insgesamt		154	
<i>Anionen</i>			
Chlorid	3,65	103	110
Bikarbonat	1,65	27	29
Phosphat	0,10	2	1
Sulfat	0,05	1	1
Organische Säuren		5	
Proteine	65-80	16	
Insgesamt		154	
<b>Nichtelektrolyte</b>			
Glukose	0,7-1,1		5
Harnstoff	0,40		7

Tab. 6 Mittlere Konzentration der Elektrolyte und Nicht-Elektrolyte im menschlichen Blutplasma aus Schmidt RF, Lang F, Heckmann M. Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie. Auflage: 31. Aufl. 2011. Heidelberg: Springer; 2010. 979 p. S. 479

CAUSES OF HIGH-ANION-GAP METABOLIC ACIDOSIS	
Lactic acidosis	Toxins
Ketoacidosis	Ethylene glycol
Diabetic	Methanol
Alcoholic	Salicylates
Starvation	Propylene glycol
	Pyroglutamic acid
	Renal failure (acute and chronic)

Abb. 18 Ursachen für eine normocholämische Azidose aus Jameson JL, Loscalzo J. Harrison's Nephrology and Acid-Base Disorders. Auflage: 0002. New York: Mcgraw Hill Medical; 2013. S. 46

CAUSES OF NON-ANION-GAP ACIDOSIS
I. Gastrointestinal bicarbonate loss
A. Diarrhea
B. External pancreatic or small-bowel drainage
C. Ureterosigmoidostomy, jejunal loop, ileal loop
D. Drugs
1. Calcium chloride (acidifying agent)
2. Magnesium sulfate (diarrhea)
3. Cholestyramine (bile acid diarrhea)
II. Renal acidosis
A. Hypokalemia
1. Proximal RTA (type 2)
2. Distal (classic) RTA (type 1)
B. Hyperkalemia
1. Generalized distal nephron dysfunction (type 4 RTA)
a. Mineralocorticoid deficiency
b. Mineralocorticoid resistance (autosomal dominant PHA I)
c. Voltage defect (autosomal dominant PHA I and PHA II)
d. Tubulointerstitial disease
III. Drug-induced hyperkalemia (with renal insufficiency)
A. Potassium-sparing diuretics (amiloride, triamterene, spironolactone)
B. Trimethoprim
C. Pentamidine
D. ACE-Is and ARBs
E. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs
F. Cyclosporine and tacrolimus

Abb. 19 Ursachen für eine hypercholämische Azidose aus Jameson JL, Loscalzo J. Harrison's Nephrology and Acid-Base Disorders. Auflage: 0002. New York: Mcgraw Hill Medical; 2013. S. 49

Bei Patienten mit fortgeschrittener CKD bildet sich eine Azidose als Ergebnis einer verminderten Bildung von Bicarbonat und der Retention von H<sup>+</sup> Ionen aus. Beide Formen der metabolischen Azidose können auftreten. Bei ca. 20% der Patienten können die Parameter des Säure-Basenhaushalts sogar im Normalbereich liegen, selbst wenn die GFR Rate bereits um 20% abgefallen ist (162).

Die Regulation des pH-Werts ist für die Funktion von Enzymen, für die tertiäre Proteinfaltung und die Funktionsweise von Hormonen elementar wichtig (163). Folgen einer metabolischen Azidose wirken sich neben der Atmung, dem Herzen und dem Nervensystem auf den Ernährungszustand und den Knochenstoffwechsel aus (79,160). Metabolische Azidosen führen in der Regel zu einer respiratorischen Gegenregulation. Es kommt je nach Schwere der metabolischen Azidose zu einer vertieften regelmäßigen Atmung, die sogenannte Kussmaulatmung. Weiters zeigen sich Herzrhythmusstörungen und zerebrale Störungen wie Kopfschmerz, Lethargie, Somnolenz bis hin zum Koma (5,10).

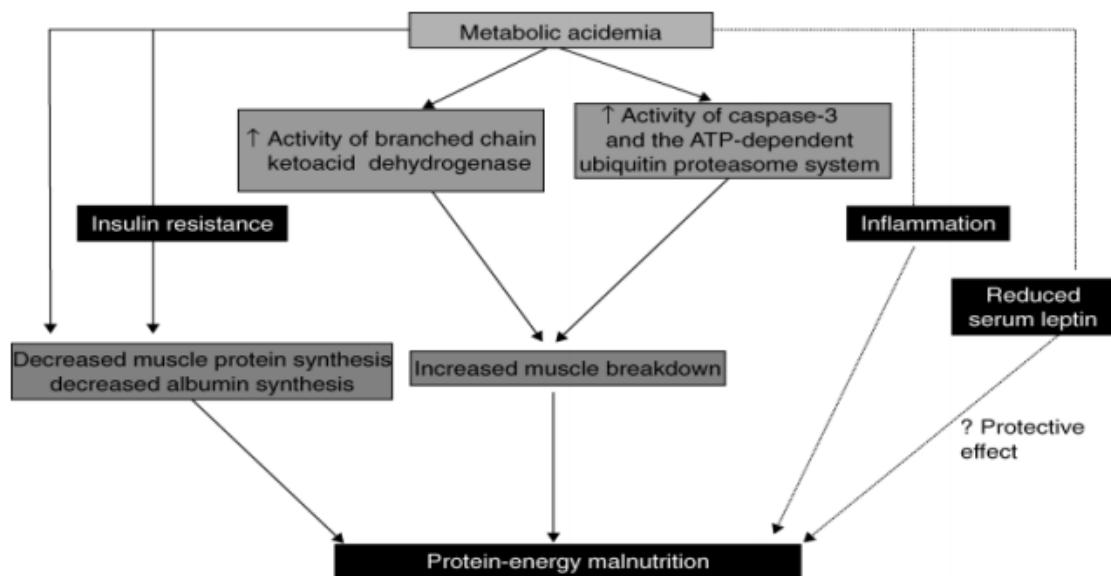


Abb. 20 Metabolische Azidose und ihr möglicher Einfluss auf Protein-Energie Mangelernährung aus Mehrotra R, Kopple JD, Wolfson M. Metabolic acidosis in maintenance dialysis patients: Clinical considerations. *Kidney Int.* Dezember 2003;64(S88):S13–S26.

Die metabolische Azidose hat einen Einfluss auf den Ernährungszustand durch eine sich entwickelnde Dysbalance zwischen Proteinsynthese und- abbau, einer erhöhten Insulinresistenz, der Aufrechterhaltung einer chronischen Inflammation, sowie eine verminderte Serumleptinkonzentration im Blut (Abb.20) (164).

Die metabolische Azidose erhöht die renale Kalziumausscheidung ohne eine kompensatorisch vermehrte intestinale Resorption (165,166).Es kommt einer negativen Kalziumbalance. Kalzium kommt zu 99% an Phosphor gebunden in Knochen und Zähnen vor (13). Ein Kalziumverlust wird durch eine Freisetzung aus Knochen und Zähnen ausgeglichen. Die Azidose induziert eine Knochendemineralisation (Abb. 21) (167). In vitro Studien haben gezeigt, dass im Rahmen einer metabolischen Azidose Kalzium aus

dem Knochen freigesetzt wird (167). Das freigesetzte Kalzium und Phosphat dient als extrazelluläres Puffersystem, um das Säure-Base Gleichgewicht aufrecht zu erhalten (168–171). Ursache sind zum einen eine direkte Schädigung der Knochenoberfläche als auch die Stimulation von Osteoklasten und die Inhibition von Osteoblasten auf Zellebene (172–174). Die Osteoblasten werden stimuliert Prostaglandine (PG) freizusetzen (175). PG sind multifunktionale Regulatoren, die im Knochen sowohl die Resorption durch aktivierte Osteoklasten stimulieren oder inhibieren können. Sie werden nicht ausschließlich von Osteoblasten gebildet, wodurch ihre Bildung und Funktion von vielen verschiedenen Faktoren abhängig sein kann (176,177). In vivo Studien zeigen, dass der Haupteffekt exogener PG, hier vor allem Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), in der Knochenresorption liegt, indem sie Differenzierung und Bildung von Osteoklasten stimulieren (178,179). Dabei korreliert der durch die Azidose induzierte Kalziumausstrom direkt mit der PGE<sub>2</sub> Konzentration (180). Die Inkubation in azidotischem Milieu stimuliert zudem in Osteoblasten die vermehrte Expression von RANKL (180). Ob jedoch eine Korrektur der metabolischen Azidose zu einem gegenteiligen Effekt führt ist bisher unklar.

Die metabolische Azidose hat neben der direkten Wirkung auch auf indirektem Wege Einfluss auf die Knochenmineralisation.

Eine metabolische Azidose führt zur Hyperkalziurie, einer höheren Serumkonzentration an ionisiertem Kalzium (181,182) und einem Anstieg der PTH- Plasmakonzentration (183,184). Die Kombination von metabolischer Azidose und Hyperparathyreoidismus wirkt synergistisch auf den ossären Kalziumabbau (185–187). Zudem wird auch die Signaltransduktion über den PTH Rezeptor im sauren Milieu verstärkt, indem die Konzentration der PTH/PTHrP-Rezeptor mRNA steigt, die Bindung von PTH an seinen Rezeptor verstärkt und die Generierung PTH-abhängigen zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP) gefördert wird (188,189).

Im Rahmen einer metabolischen Azidose ist die Aktivität der 1- $\alpha$ -Hydroxylase im Tubulussystem bei Ratten vermindert. Was dies für das Stoffwechselprodukt 1,25-Dihydroxycholecalciferol im Serum bedeutet ist unklar (190,191). Studien präsentieren unterschiedliche Ergebnisse. So hat das saure Milieu (k)einen Einfluss bzw. nur unter bestimmten Rahmenbedingungen (akute metabolische Azidose) (192–195).

Eine Korrektur der metabolischen Azidose wirkt dem Knochenabbau entgegen (196–200).

Ein niedrige Bikarbonatkonzentration im Serum führt zu einer verminderten eGFR, einer vermehrten Proteinurie und somit zur Progression der Niereninsuffizienz (201,202).

Der respiratorischen Azidose liegt eine andere Pathophysiologie zu Grunde, die zu einer Erhöhung des arteriellen CO<sub>2</sub> Partialdrucks führt und das Säure-Basen Gleichgewicht verschiebt (12). Obwohl auch hier das Stoffwechsellmilieu ein saures ist, kommt es zu keinem Kalziumausstrom aus dem Knochen, weder durch direkte, noch durch indirekte Faktoren (203–207).

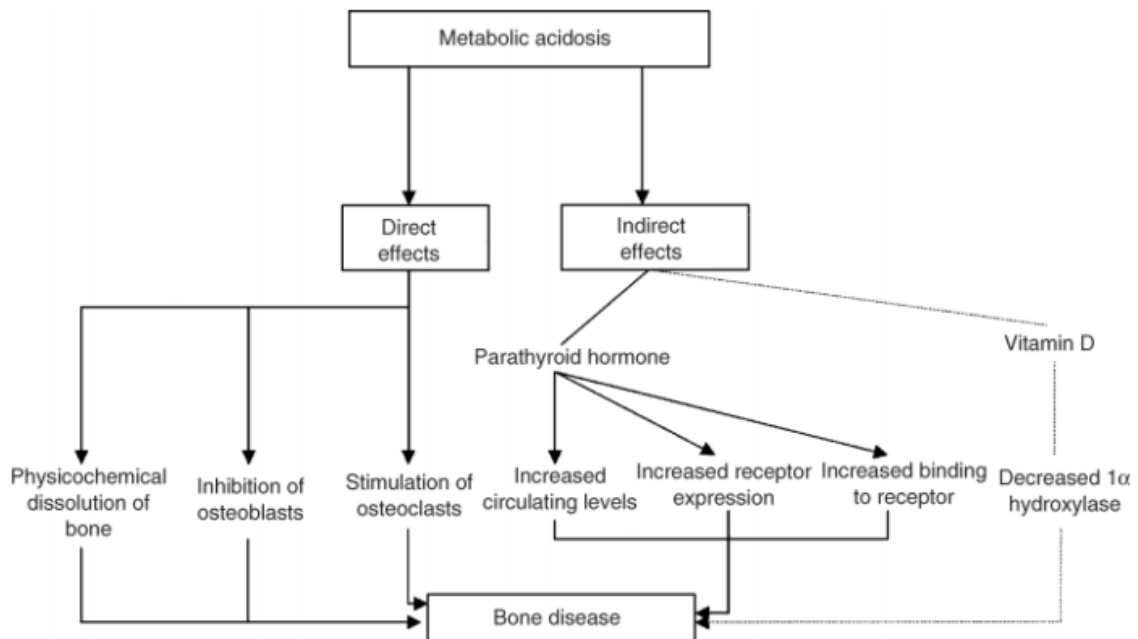


Abb. 21 Metabolische Azidose und ihr Einfluss auf den Knochenstoffwechsel aus Mehrotra R, Kopple JD, Wolfson M. Metabolic acidosis in maintenance dialysis patients: Clinical considerations. *Kidney Int.* Dezember 2003;64(S88):S13–S26

### 1.2.9.8 Urämie

Die Urämie bezeichnet ein metabolisches Zustandsbild, das entsteht, wenn harnpflichtige Substanzen nicht mehr mit dem Urin ausgeschieden werden. Urämie tritt bei Patienten mit CKD auf. Von den harnpflichtigen Substanzen unterscheidet man sogenannte Urämetoxine, die im Gegensatz zu den harnpflichtigen Substanzen, schädlich auf den Körper wirken. Sie akkumulieren im Blut und führen zum Symptomenkomplex des urämischen Syndroms (208). Dabei löst nicht eine Substanz allein die urämischen Symptome aus. Vielmehr ist es ein Zusammenspiel mehrerer (209).

Um als Urämietoxin zu gelten, müssen gewissen Kriterien erfüllt werden. Nur wenige harnpflichtige Substanzen erfüllen all diese Kriterien und können dennoch als toxisch gesehen werden (z.B. Phosphat und Kalium) (209). Eine Einteilung der Retentionsparameter erfolgt nach physikochemischen Verhalten unter Dialysetherapie in kleine, wasserlösliche Verbindungen (nicht-protein gebunden) (z.B. Harnstoff), protein-gebundene Verbindungen (z.B. Homocystein) und mittlere Moleküle (z.B.  $\beta_2$ -Microglobulin, PTH) (208,210). Die European Uremic Toxin Work Group (EUTox) hat 2003 insgesamt 90 verschiedene Retentionswerte beschrieben und nach oben genannter Einteilung klassifiziert (211). Harnstoff und Kreatinin werden meist als typische Retentionswerte genannt.

Das urämische Syndrom umfasst eine Vielzahl von biologisch veränderten Prozessen, so u.a.: Immundysfunktion und Inflammation (212,213), Anämie (214,215), Gefäßwandverkalkungen (216,217), Osteodystrophie (218), Malnutrition (219,220) und Gerinnungsstörungen (221,222).

Neben diesen toxischen Effekten ist das erhöhte kardiovaskuläre Risiko selbst in frühen Stadien der CKD von größter Bedeutung (223). Dabei ist unklar welcher Retentionswert genau dafür verantwortlich ist. Vielmehr resultiert die hohe kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität aus dem Zusammenspiel der durch die Urämie veränderten biologischen Prozesse.

### **1.2.9.9 Chronische Inflammation**

In ESRD Patienten weisen höhere Konzentrationen an Inflammationsmarkern und Zeichen des oxidativen Stresses auf. Viele Faktoren spielen beim Erhalt des chronisches Inflammationsprozesses eine Rolle: Die Ursache der CKD, vor allem Diabetes mellitus (224) oder Hypertension (225,226), Urämietoxine (227–229), die Aktivierung des RAAS-Systems (225,230,231), Infektionen (212) , Eisenüberladung (232,233), verminderte antioxidative Eigenschaft (234,235) und die Dialysebehandlungen (236–238).

Chronische Inflammation spielt auch eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der Atherosklerose (239,240) und ist mit einer hohen kardiovaskulären Mortalität vergesellschaftet (241–243).

### 1.2.9.10 Anämie

Die KDIGO Guidelines von 2012 definieren eine Anämie bei einem CKD Patienten bei einer Hämoglobinkonzentration von  $<13,0$  g/dl (Männer) bzw.  $<12,0$  g/dl (Frauen) (9).

Die Prävalenz der Anämie steigt mit abnehmender GFR Rate und steigender Proteinurie (244,245). Die Ursachen für die Blutarmut sind mannigfaltig und betreffen sowohl eine gestörte Synthese als auch eine verminderte Lebensdauer der Erythrozyten. Es entsteht das typisch klinische Bild mit Blässe, Abgeschlagenheit und Mattigkeit.

Die Niere ist die wichtigste Bildungsstätte von Erythropoetin (EPO). EPO ist ein Wachstumsfaktor für die Bildung der Erythrozyten (45). Im Rahmen der CKD kommt es zu einer verminderten Bildung von EPO bzw. einer Hyposensitivität der Zielzellen im Knochenmark (246,247). Es zeigt sich das Bild einer normozytären, normochromen Anämie.

Eine Analyse des National Health and Nutrition Examination Survey IV ergab, dass rund 50% der CKD Patienten einen absoluten oder relativen Eisenmangel aufweisen, welche mit abnehmender Kreatinin-Clearance zunimmt (Abb. 22 (248).

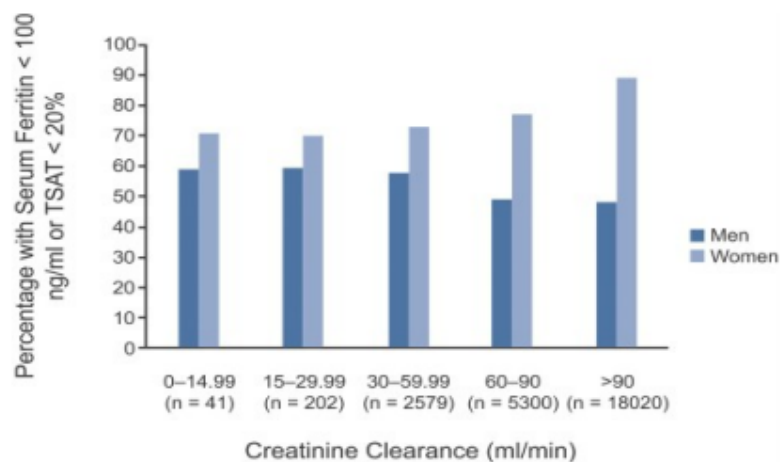


Abb. 22 Prozentzahl an Männern und Frauen mit einem Serumferritin  $< 100$  ng/ml oder einer Transferritinsättigung (TSAT)  $< 20\%$  nach Creatinin-Clearance aus Fishbane S, Pollack S, Feldman HI, Joffe MM. Iron indices in chronic kidney disease in the National Health and Nutritional Examination Survey 1988-2004. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN*. Januar 2009;4(1):57-61.

Die Gründe für den Eisenmangel sind vielfältig. Einerseits spielen die verminderte Eisenaufnahme, die erhöhte Eisenausscheidung (249) und der chronische Inflammationsprozess (Anämie chronischer Erkrankungen) eine Rolle. Andererseits führt die Retention harnpflichtiger Substanzen zu einem urämischen Stoffwechsellmilieu,

welches die mechanischen Eigenschaften der Erythrozytenmembran (Deformität und Fragilität) beeinflusst (250). Die Lebensdauer der Erythrozyten verkürzt sich durch die Sequestration der Milz (251,252). Der sekundäre Hyperparathyreoidismus führt letztlich zu einer Knochenmarksfibrose im Rahmen der renalen Osteopathie, sodass das Knochenmark weniger Raum für die Erythropoese vorfindet (253). Auch können therapeutische Arzneimittel einen Einfluss auf die Blutbildung nehmen (254,255).

Das klassische Bild der Anämie wirkt sich stark auf die Lebensqualität der Patienten aus. Sie fühlen sich müde, abgeschlagen und matt. Klinische Studien belegen, dass sich eine Steigerung des Hämatokrits positiv auf die Lebensqualität, die kognitiven Fähigkeiten und die Muskelkraft auswirken (256–258). Welchen Einfluss die Anämie auf die Gesamtmortalität hat ist unklar. Neben den kausalen Ursachen der Anämie, die die Mortalität beeinflussen, kompensiert das Kreislaufsystem das niedrige Sauerstoffangebot mit erhöhtem kardialen Output und linksventrikulärer Hypertrophie (259). Die linksventrikuläre Hypertrophie ist ein Risikofaktor für erhöhte kardiovaskuläre Mortalität (260,261). Drüeke et al. konnten keine verminderte Rate an kardiovaskulären Ereignisse bei korrigierter Anämie feststellen (262). Weiters hat die Anämiekorrektur keinen Einfluss auf die Progression und Rückbildung einer linksventrikulären Hypertrophie (263,264). Ob die Anämie ein unabhängiger Risikofaktor für die Progression der Erkrankung ist, ist unklar. Der Sauerstoffmangel könnte die Hypoxie im Nierenmark erhöhen, wobei dies zu weiteren fibrotischen Umwandlungen führt (265). Andererseits führt eine Behandlung mit EPO zu Hypertonie mit konsekutiver Druckdiurese und damit zur progressiven Schädigung der Glomeruli (266).

## 1.3. Gefäßverkalkung in der chronischen Niereninsuffizienz

### 1.3.1 Histologischer Gefäßaufbau

Die Gefäßwand ist in drei Schichten aufgebaut. Im Arterienaufbau ist diese Dreischichtung besonders deutlich erkennbar. Die innerste Schicht, die Kontaktfläche von Intravasal- und Extravasalraum, bildet die *Tunica intima*. Sie besteht aus einem einschichtigen Belag platter, polygonaler Zellen (Endothel), einer Basalmembran und einem sog. *Stratum subendotheliale*. Die Basallamina besteht aus Kollagen Typ IV, sog. nicht-fibrillärem Kollagen. Die subendotheliale Schicht enthält kaum Zellen und extrazelluläre Matrix (EZM). Teilweise sind glatte Muskelzellen nachweisbar. Diese entstammen der *Tunica media*. Auf die *Tunica intima* folgt die *Membrana elastica interna*. Diese Schicht wird von den glatten Muskelzellen der *Tunica muscularis* synthetisiert und besteht aus elastischen Fasern. Formal gehört diese der *Tunica intima* an. Die *Membrana elastica interna* ist gefenstert, wodurch Kontakte zwischen *Tunica intima* und *media* bestehen. Die *Tunica media*, auch *muscularis* genannt, besteht aus glatten Muskelzellen (vascular smooth muscle cell, VSMC), die ihre umgebende extrazelluläre Matrix (Kollagen I und III) selbst synthetisieren. Je nach Arterientypus sind mehr oder weniger elastische Fasern eingelagert. Es folgt die *Membrana elastica externa*. Die äußerste Schicht ist die *Tunica externa*, auch Adventitia genannt. Sie besteht aus Bindegewebe mit kollagenen, sowie elastischen Fasern. Diese Schicht dient zum einen der Versorgung des Gefäßes als auch seiner Verankerung im umliegenden Gewebe.

Es gibt zwei Subtypen von Arterien: Arterien vom muskulären Typ und Arterien vom elastischen Typ. Die Unterscheidung erfolgt histomorphologisch. Der Grundaufbau ist ident, doch zeigen sich unterschiedliche Ausprägungsgrade der elastischen Komponente, angepasst an die zu erfüllende Funktion. In einem Arterienabschnitt selbst kann dabei ein wesentlicher Unterschied im Anteil der kollagenen Fasern bzw. glatten Muskelzellen bestehen.

Zu den Arterien vom elastischen Typ gehören u.a. die großen Blutgefäße, die direkt aus dem Herzen entspringen (Aorta ascendens, Truncus pulmonalis), aber auch die ersten Abgänge (A. subclavia, A. vertebralis, Truncus thyrocervicalis), sowie das proximale Segment der A. iliaca communis. Zu den Arterien vom muskulären Typ zählen primär die peripheren Arterien, als auch die Koronararterien. Der Übergang der zwei verschiedenen Typen wird als Arterienstrecke vom hybriden Typ bezeichnet (61,267).

### 1.3.2 VSMC

Durch ihre Fähigkeit zu kontrahieren bzw. zu relaxieren besteht die Hauptfunktion der VSMC in der Regulation des Gefäßtonus. Sie proliferieren nur wenig und weisen eine geringe synthetische Aktivität auf. Sie exprimieren eine Reihe an typischen kontraktilen Proteinen, die eine phänotypische Zuordnung ermöglichen (268,269).

Die VSMC entstammen sieben unterschiedlichen, nicht-überlappenden Gewebetypen ab (Abb. 23), darunter dem Mesoderm (270,271). Dabei ist das Mesenchym in seinem Ursprung nicht konform, sondern weist eine z.T. hohe intraindividuelle Variabilität auf. Dabei können in einer Gefäßstrecke unterschiedliche VSMC-Typen vorkommen. Die VSMC der herznahen Gefäße (*Aorta ascendens*, *Arcus aorticus*, *A. brachiocephalica* (*A. innominata*), *A. subclavia dextra*, *A. carotis communis*) entstammen der Neuralleiste (270).

Die Neuralleiste besteht aus Zellen des Ektoderms, die im Zuge der Neurulation (Bildung des Neuralrohrs) die Verbindung zu ihren Nachbarzellen verlieren und sich zwischen dem Ektoderm und dem Neuralrohr als Neuralleiste ausspannen (272). Die VSMC des Anfangsteils der Aorta (*Bulbus aorticus*) und des *Truncus pulmonalis* entstammen dem sekundärem

Herzfeld (270). Das sekundäre (oder anteriore) Herzfeld beschreibt einen

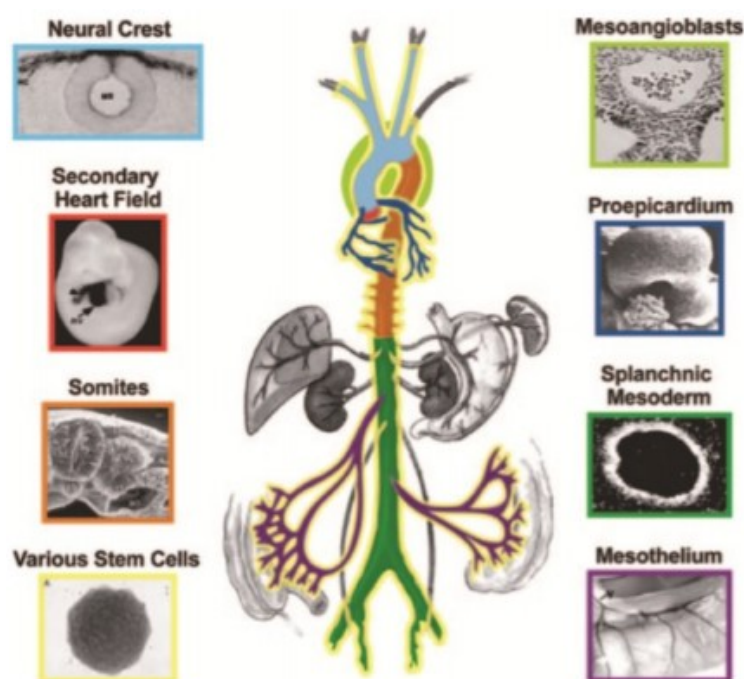


Abb. 23 Farbliche Darstellung der unterschiedlichen Ursprünge der VSMC aus Majesky MW. *Developmental Basis of Vascular Smooth Muscle Diversity. Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 6. Januar 2007;27(6):1248–58.

Mesodermabschnitt um die Schlundbogenarterien, der in der Entwicklung für die Verbindung der Schlundbogenarterien an den arteriellen Pol des Herzens (*Truncus arteriosus*) beteiligt ist (272). Dem Proepikard entstammen die VSMC der Herzkranzgefäße (*Aa. coronariae dextra et sinistra*). Die Herzkranzgefäße entwachsen nicht dem *Bulbus aorticus* (273), sondern verbinden sich erst mit diesem, nachdem sie dem Subepikard

entsprungen sind (274,275). Das Proepikard ist mesodermalen Ursprungs (272). Die VSMC der *Aorta descendens* entwickelt sich in nächster Nähe der Somiten (276). Die Somiten, auch Urwirbel genannt, entspringen am Ende der dritten Entwicklungswoche dem paraxialen Mesoderm. Sie sind ein Zeichen für die erste metamere Gliederung des Körpers (craniocaudal) und bilden zwei Stränge seitlich des Neuralrohrs. Zunächst imponieren sie als kugelförmige Gebilde bis sie sich in der vierten Woche beginnen abzuflachen. Man unterscheidet einen ventromedialen (Sklerotom) von einem dorsolateralen (Dermomyotom) Anteil (272). Dabei entstammen die VSMC vor allem von den Vorläuferzellen des Sklerotoms (276). Die Gliederung bleibt auch in der Bildung der VSMC erhalten. Je Somit entsteht ein bestimmter Vorläufertypus an VSMC (270). Aus der thorakalen Aorta konnte eine weitere Zellart bestimmt werden und zwar die Mesangioblasten. Sie exprimieren sowohl myogene, als auch endotheliale Proteine (277). Sie besitzen die Eigenschaft sich in quergestreifte Muskelzellen, glatte Muskelzellen und andere mesenchymale Gewebe differenzieren zu können, wobei sie im Kreislauf zirkulieren können (277–279) Ab dem Durchtritt durch das Zwerchfell (*Hiatus aorticus*) wird der aortale Anteil als *Aorta descendens* bezeichnet. Sie entspringt dem Seitenplattenmesoderm, welches sich im weiteren Verlauf der Entwicklung in eine Somatopleura (parietales Mesoderm) und Splanchnopleura (viszerales Mesoderm oder splanchnisches Mesoderm) unterteilt (270,272) Weitere Ursprünge können zum einen variabel sein bzw. sind noch unklarer Genese oder kann das Mesothel sein (270). Das Mesothel entstammt dem Mesoderm und bedeckt in Form eines einschichtigen Plattenepithels die meisten inneren Organe (61,270). Gefäße des Intestinums zeigen Expressionsmarker auf, die auf einen Ursprung aus dem Mesothel rückschließen lassen (270,280). VSMC besitzen die Fähigkeiten des „phenotypic switching“. Sie können in jeder Entwicklungsstufe eine Bandbreite an Phänotypen entwickeln. Selbst im adulten Organismus sind die glatten Muskelzellen nicht terminal differenziert (268,281). Stimuli für eine Änderung des Phänotyps, mit konsekutiver Änderung der Genexpression kann u.a. eine Änderung des umgebenden Milieus sein (269,282). Die Reaktion der VSMC auf diese Veränderung ist abhängig vom Ursprungsgewebe. Obwohl der gleiche Reiz gesetzt wird verändern sich die VSMC je nach Ursprungsgewebe (283). Abb. zeigt, dass die VSMC der *Aorta thoracica* (*Bulbus aorticus*, *Aorta ascendens*, *Aorta descendens bis Hiatus aorticus*) von anderen Vorläuferzellen abstammen, als die VSMC der *Aorta abdominalis*.

### **1.3.2.1 Ossifikation und Gefäßverkalkung**

Die Ossifikation beschreibt den Prozess der Bildung von Knochengewebe und unterscheidet sich von der Osteogenese, der Bildung des Knochens. Beide Prozesse sind physiologischer Natur, während eine ektope Kalzifizierung im Weichteilgewebe oder im Gefäßsystem aufgrund von Stoffwechselfdysbalancen (z.B. Hyperlipidämie, Hyperphosphatämie) auftritt. Dennoch ähnelt der Prozess der Osteogenese, wobei es zu einer direkten Ossifikation ohne knorpelige Zwischenstufe kommt. Die vaskuläre Kalzifikation (vascular calcification, VC) ist ein aktiv regulierter Prozess, reguliert von einer Reihe an Signalkaskaden, die zu einer direkten Ossifikation führen (284–287).

### **1.3.3 Atherosklerose**

Die Atherosklerose ist ein inflammatorischer Prozess, in dem es ausgehend von der Tunica intima zu strukturellen Veränderungen der Gefäßwand mit Einlagerung von Lipiden, einer lokalen Gerinnungsaktivierung, Endotheldysfunktion, VSMC Aktivierung und letztlich zu einem fibroproliferativen Remodelling kommt (285,288,289). Die Verkalkung des atherosklerotischen Plaques ist ein spätes Ereignis in der Entstehung der Atherosklerose. Atherosklerose tritt in bestimmten Gefäßabschnitten gehäuft vor und kann mit einer kritischen Einengung des Gefäßlumens einhergehen. Klinisch imponiert die Atherosklerose als periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK), als koronare Herzkrankheit und in Form eines Schlaganfalls (290). Prädilektionsstellen sind die Aufzweigungsstellen des Gefäßsystems (291).

#### **1.3.3.1 Epidemiologie der Atherosklerose**

Die Atherosklerose hat eine steigende Prävalenzrate (292,293) mit einem Anteil von 44% an der Gesamtmortalität in den USA (294). Risikofaktoren wie Rauchen, Fettstoffwechselstörung, Hypertonus, aber auch das Alter das Geschlecht und die ethnische Herkunft bestimmen maßgeblich das Auftreten atherosklerotischer Läsionen (285,295–298). Die Koronararterien bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz weisen vor allem atherosklerotische Läsionen auf (299).

### 1.3.3.2 Pathophysiologie der Atherosklerose

Der Befall der Tunica intima in der Atherosklerose beruht auf einer primären Schädigung des Endothels. Hohe Konzentrationen von Lipoproteinen im Blut wie hohe LDL (low density lipoprotein) Werte führen zu einer lokalen Ablagerung von Lipiden in der Tunica intima. Durch die Ablagerung dieser zum Teil oxidierten LDL und von freiem Cholesterin bzw. Cholesterinester im subendothelialen Raum wird ein Entzündungsprozess in Gang gesetzt und werden proinflammatorische Zytokine und Chemokine freigesetzt. Dadurch wird wiederum das Endothel zur Überexpression von Leukozytenadhäsionsmolekülen (Selektine,

Immunglobulin Superfamilie, Integrine) angeregt. Insbesondere das vascular cell adhesion protein-1 (Vcam1), ein Adhäsionsmolekül aus der Familie der Immunglobulin Superfamilie, hat eine bedeutsame Rolle und rekrutiert Monozyten und T-Lymphozyten aus dem Blut. Die Monozyten differenzieren lokal zu Makrophagen und phagozytieren das LDL in der Gefäßwand über den Scavenger Rezeptor, der keinen negativen Feedbackmechanismus besitzt. Cholesteringefüllte Makrophagen werden auch als Schaumzellen bezeichnet und werden in weiterer Folge oft nekrotisch. Durch den Prozess der Nekrose kommt es zur Freisetzung ihres Inhalts und der Bildung extrazellulärer Lipidflecken, auch fatty streaks genannt.

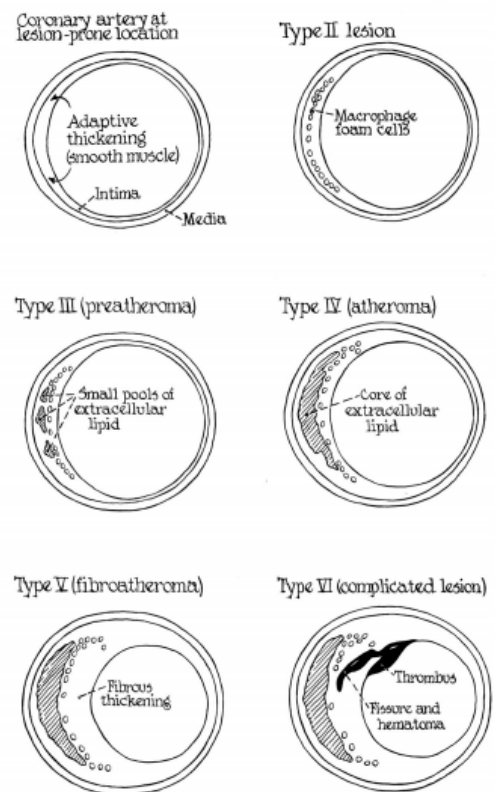


Abb. 24 Pathophysiologie und Stadieneinteilung einer atherosklerotischen Läsion Sary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, u. a. A Definition of Advanced Types of Atherosclerotic Lesions and a Histological Classification of Atherosclerosis A Report From the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American

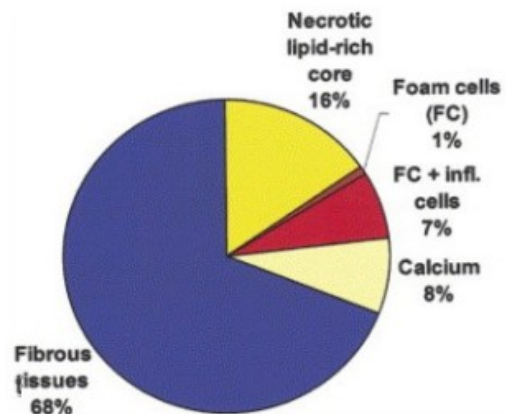


Abb. 25 Durchschnittliche Zusammensetzung eines progressiven atherosklerotischen Koronarplaque mit 75%iger Stenose in der histologischen Darstellung aus Falk E. Pathogenesis of Atherosclerosis. J Am Coll Cardiol. 18. April 2006;47(8s1):C7-C12

Myozyten aus der Tunica muscularis werden stimuliert, wandern ein, wandeln sich in Myofibroblasten um und produzieren extrazelluläre Matrix, um die toxischen Produkte einzuschließen. Diese Reaktion ist primär als Heilungsversuch zu verstehen. Der atherosklerotische Plaque besteht somit aus einem zentralen Lipidkern und einer bindegewebigen Hülle, in die u.a. Monozyten, Leukozyten, aber auch glatte Muskelzellen eingelagert sind. Atherosklerotische Plaques können sekundär auch verkalken (13,285,300–307).

### **1.3.4 Mediasklerose**

*Synonym: Mediakalzinose, Mediaverkalkung*

Die Mediasklerose (MS) beschreibt Verkalkungsprozesse, die in der Tunica media lokalisiert sind (300). Dabei scheinen unterschiedlichen Ätiologien in die gemeinsame Endstrecke der pathologischen Kalzifizierung der Tunica muscularis zu führen. Die Mönckeberg'sche Mediasklerose ist die häufigste Form der MS und ist häufig assoziiert mit Diabetes mellitus Typ 2 (T2D) und terminaler Niereninsuffizienz (ESRD) (308,309).

Die Mediasklerose betrifft vor allem periphere Arterien des muskulären Typs (300,309,310). Die betroffenen Arterien weisen spangenartige Kalkablagerungen auf. Makroskopisch imponieren sie „geriffelt“ in Analogie zu den Trachelspangen (Gänselgurgel-Arterien) (300). Klinisch führt die MS zu einem Elastizitätsverlust der Arterien. Die Gefäßsteifigkeit erhöht den peripheren Widerstand. Um die Versorgung der Organe mit der gleichen Menge Blut zu gewährleisten, muss durch die verhärteten Gefäße und damit erhöhtem Afterload, ein höherer Druck vom Herzen aufgebracht werden. Es entwickelt sich eine systolische Hypertension und linksventrikuläre Hypertrophie (311).

#### **1.3.4.1 Epidemiologie der Mediasklerose**

Diagnostiziert mit Hilfe des ABI (Ankle-Brachialis-Index) liegt die Prävalenz der MS bei ca. 0,5% (309). Der ABI berechnet sich nach dem Quotienten der systolischen Blutdruckmessungen von Knöchel zu Arm. Der Normwert liegt zwischen 0,9 und 1,2 (10). Durch die Mediasklerose kommt es zu einer Versteifung und somit zu einer verminderten Elastizität der Arterien, was zu ABI Werten von  $>1,2$  führt. Typ 2 Diabetiker haben die höchste Prävalenzrate. Typ 2 Diabetiker haben die höchste Prävalenzrate. Bei T2D, die bereits orale Antidiabetika einnehmen, liegt die Prävalenz bei 41,5% (312,313). Laut Herold et al. weisen 90% der Diabetiker eine MS Typ Mönckeberg auf (10). Eine

signifikantes Ausmaß der MS zeigen CKD Patienten bereits bei geringem Anstieg des Serumkreatinins ( $<1,5\text{mg/dl}$ ) (2). Die Prävalenz bei ESRD Patienten liegt bei 27% (309). Dabei steigt die Prävalenz, sobald eine Dialysetherapie begonnen wird (314).

### **1.3.4.2 Histopathologie der Mediasklerose**

Die Mediasklerose ist ein fortschreitender Prozess in dem vier Stadien histopathologisch unterschieden werden können. Im ersten Stadium sind in der Hämatoxylin-Eosin (HE-) Färbung Ablagerungen mit feiner Granulierung in der Tunica media sichtbar. Bei weiterer Betrachtung mittels spezifischer Färbungen kann nachgewiesen werden, dass es sich um  $\text{Ca}^{2+}$ -Ablagerungen handelt. Diese befinden sich intra- und extrazellulär, wobei die intrazellulären Ablagerungen die VSMC betreffen und die extrazellulären aus beschädigten elastischen Fasern und extrazellulärer Matrix (Elastokalzinose) bestehen. Die extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ablagerungen in muskulären Arterien lagern sich der *Membrana elastica interna* an, welche sich im weiteren Verlauf verdicken und eine Platte bilden. Hier findet sich ein histomorphologischer Unterschied zum Knochen, wo die Ablagerungen sich vorzugsweise an Kollagen Typ I ablagern. Im zweiten Stadium bildet sich die Platte über die Grenzen der Media hin aus und betrifft bereits mehr als die Hälfte des Gefäßquerschnitts. Haben sich die Veränderungen bereits auf den ganzen Umfang des Gefäßabschnitts ausgebreitet, so spricht man vom dritten Stadium. Im vierten und letzten Stadium finden sich ossäre Metaplasien mit nachweislicher Formierung von Knochen trabekeln (309,315,316).

### **1.3.4.3 Pathophysiologie**

#### **1.3.4.3.1 Kalzium- und Phosphathaushalt**

Bereits im hohen Normalbereich führen leicht erhöhte Serumphosphatwerte ( $3,5\text{-}4,5\text{mg/dL}$ ) zu einem erhöhten kardiovaskulären und Gesamtmortalitätsrisiko sowohl bei CKD Patienten als auch bei der Normalbevölkerung (317). Dabei korreliert die Hyperphosphatämie mit der Prävalenz und der Progression vaskulärer Verkalkung in CKD, aber auch in nierengesunden Patienten (318–321).

Die extrazelluläre Phosphatkonzentration wird von einer Anzahl an Hormonen reguliert. Im Zuge einer Hyperphosphatämie werden diese aktiviert (siehe Kapitel 1.2.9.5.2. Phosphat). Eine Hyperphosphatämie führt zur myokardialen Hypertrophie, zu einer Progression der Niereninsuffizienz und osteoporoseähnlichen Knochenveränderungen,

jedoch in Abwesenheit von PTH nur selten zur vaskulären Kalzifizierung (322,323). Nach einer Studie von Jono et al. hat eine hohe PTH Konzentration jedoch eine inhibierende Wirkung auf die VC (324). Die Kalzitriolkonzentration steht einem in kontroversen Zusammenhang mit der VC, wobei dies abhängig vom Vitamin D Spiegel und Zelltyp bzw. seinem phänotypischen Differenzierungsgrad zu sein scheint (325–327). FGF23 korreliert schon in frühen CKD Stadien mit dem Ausmaß der arteriellen Kalzifizierung (328,329). Einen Einfluss auf den Verkalkungsprozess selbst scheint FGF23, selbst in Anwesenheit von Klotho, nicht zu haben (330,331). Klotho hat eine inhibierende Funktion auf die Entwicklung der VC, indem es die Phosphataufnahme der VSMC hemmt und protektiv der Endotheldysfunktion entgegenwirkt (332,333). CKD Patienten weisen jedoch verminderte Klothokonzentrationen auf, was die ektope Kalzifizierung fördert (334).

Der Einfluss von Kalzium auf die VC wirkt synergistisch auf den phosphat-induzierten Kalzifizierungsprozess (308). Dabei scheint  $\text{Ca}^{2+}$  im Vergleich zu Phosphat ein potenterer Stimulus für die Mineralisation zu sein (335,336). Die Kalziumaufnahme der VSMC ist abhängig vom phänotypischen Zustand (337,338), der Expressierung von  $\text{Ca}^{2+}$  sensible Rezeptoren und der Expression von spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$  Kanälen (339). VSMC detektieren mittels einem Kalzium messenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Rezeptor die extrazelluläre Kalziumkonzentration. In kalzifizierten Arterienabschnitten von CKD Patienten konnte eine verminderte Expressionsrate dieses Rezeptors nachgewiesen werden (340). Arzneimittel, die die Sensitivität des Rezeptors erhöhen reduzieren die VC (341). Eine Therapie mit Kalziumkanalblockern verbessert die VC und verlangsamt ihre Progression (342,343).

#### **1.3.4.3.2 Metabolische Azidose**

Die Metabolische Azidose nimmt Einfluss auf den Kalzium- und Phosphathaushalt und fördert die Knochendemineralisierung (siehe Kapitel 1.2.9.7 Metabolische Azidose). Im Gefäßsystem schädigt das azidotische Milieu die Gefäßwand und induziert inflammatorische Prozesse, die synergistisch auf eine bestehende VC wirken können (344). Eine induzierende Wirkung der metabolischen Azidose scheint es nicht zu geben. Überraschenderweise hemmt das saure Stoffwechsellmilieu sogar die extraossäre Kalzifizierung (345). Tierexperimentellen Studien weisen in azidotischen Ratten nachweislich weniger arterielle  $\text{Ca}^{2+}$ -Ablagerungen auf (346,347). Mögliche Ursachen könnten ein erhöhtes Löslichkeitsprodukt, eine hemmende Wirkung auf die Ausbildung der

PiT-1 Transporters in VSMC und eine direkte inhibierende Wirkung auf osteoblastendifferenzierte VSMC sein (345,348,349).

### **1.3.4.3.3 Urämie**

Die Urämie beschreibt den Zustand, in dem harnpflichtige Substanzen im Blut retiniert werden, da die Niere ihrer Ausscheidungsfunktion nicht mehr im ausreichendem Maße erfüllen kann. Obwohl z.B. Phosphat und PTH auch als Urämietoxine gelten, ist die Urämie ein metabolisches Mosaik und hat als solches vielfältigere Wirkungen als die alleinig durch Phosphat und PTH induzierten (siehe Kapitel 1.2.9.8 Urämie). VSMC, die im urämischen Milieu inkubiert sind, weisen im Vergleich zum Kontrollmedium erhöhte Ablagerungen auf (350). Das urämische Milieu wirkt unabhängig von der Phosphatkonzentration auf das „phenotypical switching“ der VSMC (351,352). Es nimmt Einfluss auf die Genexpression der VSMC und induziert ihre Mineralisation, indem es die Expression von osteoblastären Proteinen (z.B. Runx2, BMP-2, Osteopontin) fördert. Im urämischen Serum ist Runx2 nachweislich erhöht. Runx2 ist einer der wichtigen, initialen Marker für die osteoblastäre Differenzierung (353,354) und ist auch in kalzifizierten Arterien von Patienten mit CKD nachweisbar (355). Im urämischen Serum sowie kalzifizierten Gefäßabschnitten konnte weiters eine erhöhte Konzentration des bone morphogenic protein 2 (BMP-2) nachgewiesen werden. Dieses wird von VSMC sezerniert und führt zu einer erhöhten Expression von Runx-2 in Osteoblasten und Perizyten (353,356,357). Weiters erhöht es die Osteopontinexpression (OPN), ein weiteres osteoblastäres Protein, das synergistische Effekte auf die Kalzifizierung hat (352).

### **1.3.4.3.4 Chronische Inflammation**

Die terminale Niereninsuffizienz beschreibt einen Zustand chronischer Inflammation. ESRD Patienten weisen erhöhte Konzentrationen an Inflammationsmarkern und Zeichen des oxidativen Stress auf (siehe Kapitel 1.2.9.9 Chronische Inflammation). ROS, ein Marker des oxidativen Stress, stimuliert das „phenotypic switching“ der VSMC in dem es die Expression von Runx 2 erhöht. Der Einfluss auf die Differenzierung scheint abhängig vom Zelltypus zu verlaufen (358). C-reaktives Protein (CRP), ein Akut-Phase-Protein, nimmt Einfluss auf die Genexpression der VSMC und stimuliert ihre Apoptose (359). Dabei sind die VSMC selbst in der Lage CRP zu produzieren und den inflammatorischen Prozess aufrecht zu erhalten (360).

### 1.3.4.3.5 Verlust von Kalzifizierungsinhibitoren

Im Rahmen der ektopen Kalzifizierung kommt es zu einem Verlust von Kalzifizierungsinhibitoren. Dazu gehören u.a. Fetuin-A ( $\alpha$ 2-Heremans-Schmid Glykoprotein), Matrix Gla Protein (MGP) und Osteoprotegerin (OPG) (361).

Fetuin-A ist ein Glykoprotein, das hauptsächlich in der Leber gebildet wird und im Knochen nachweisbar ist (362,363). Es agiert vor allem bei erhöhten Kalzium- und Phosphatwerten als Puffer im Blut (364). Bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz korreliert die niedrige Fetuin-A Konzentration mit der Gefäßverkalkung, erhöhten kardiovaskulären Mortalität (365–367) und fördert die vesikel-mediierte Kalzifizierung (367). MGP scheint primär eine lokale Funktion zu haben, wobei es durch die Regulation von BMP-2 Einfluss auf die VC nimmt (siehe Kapitel 1.3.4.3.3 Urämie) (368). Die Rolle des OPG scheint paradox, da der Kalzifizierungsinhibitor in Patienten unter Hämodialysetherapie vermehrt exprimiert ist und dabei mit der koronaren und aortalen Kalzifizierung positiv korreliert (369). Angenommen wird u.a. das OPG von den osteochondrogen differenzierten VSMC freigesetzt wird, damit die Bindungsmöglichkeiten für osteoklastenähnliche Zellen belegt sind (364).

### 1.3.4.3.6 Die Rolle der glatten Muskelzellen

#### 1.3.4.3.6.1 Osteochondrogene Differenzierung glatter Muskelzellen

Viele Faktoren beeinflussen die VC, wobei es scheint, dass Phosphat eine entscheidende Rolle spielt (82). P gelangt mittels dem  $\text{Na}^+$ -Phosphat Kotransporter ins Innere der Körperzellen. Es gibt drei verschiedene Arten dieses Kotransportes, wobei Typ II vorzugsweise in der Niere exprimiert wird (siehe Kapitel 1.2.9.5.4.4.1 FGF23). Typ III wird ubiquitär im Körper exprimiert und als Aufnahmemöglichkeit überschüssigen Phosphats im Körper betrachtet (370). Man unterscheidet PiT-1 und PiT-2. In VSMC und in der Nebenschilddrüse ist PiT-1 das Haupttransportprotein für den intrazellulären Phosphattransport (134,371–373). Die Phosphataufnahme erfolgt zeit- und dosisabhängig (339). Hohe Phosphatspiegel nehmen Einfluss auf den Phänotyp glatter Muskelzellen. Indem vermehrt Phosphat über den PiT-1 Kotransporter aufgenommen wird, fördert es das „phenotypic switching“. Synergistisch auf die Veränderung des Phänotyps wirkt sich die phosphat-induzierte Elastokalzinose aus (339). Die glatte Muskelzelle verliert ihren kontraktilen und entwickelt einen osteoblastären Phänotyp (374–377). Auf Genebene ist

nachweisbar, dass VSMC unter hyperphosphatämischen Bedingungen weniger kontraktile (SM 22 alpha, SM22 alpha-actin) und vermehrt osteogenetische (OPN, alkalische Phosphatase (ALP), Runx2) Proteine exprimieren (378–382). Die Ergebnisse spiegeln sich in Biopsien kalzifizierender Arterien von Patienten mit Niereninsuffizienz wieder (383,384). Im Vergleich hat  $\text{Ca}^{2+}$  keine induzierende Wirkung in der osteochondrogenen Differenzierung, sondern wirkt synergistisch auf die phosphat-induzierten Wirkungen (339). So wirkt eine erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration z.B. auf eine erhöhte Expression von PiT-1 (385).

#### **1.3.4.3.6.1 Apoptose glatter Muskelzellen**

Hohe Phosphat, als auch hohe Kalziumkonzentrationen fördern nachweislich die Apoptose der VSMC (308). Das veränderte Löslichkeitsprodukt fördert die Bildung von  $\text{Ca}^{2+}$ -P-Nanokristallen, die sich in der extrazellulären Matrix um die VSMC anlagern (386–388). Indem VSMC die Nanokristalle phagozytieren verändern sich die Zellen nekrotisch/apoptotisch. VSMC weisen aufgrund ihrer kontraktiven Fähigkeit eine hohe intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf. Die Nekrose/Apoptose führt zu einem lokalen extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg und zur Freisetzung membranbegrenzter Vesikel (61,389). Der hohe lokale  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg führt zur vermehrten Apoptose/Nekrose (339). Die freigesetzten Vesikel bestehen zum einen aus apoptotischen Zellresten (apoptotic bodies) und aus Matrixvesikeln, die mit Apatit und kalzifizierten Kollagenfibrillen gefüllt sind, und damit analog zum Knochen aufgebaut sind (siehe Kapitel 1.3.4.2 Histopathologie) (390). Indem  $\text{Ca}^{2+}$  die Zusammensetzung der Bestandteile der Matrixvesikel maßgeblich bestimmt, spielt es eine wesentliche Rolle im apoptotischen Kalzifizierungsprozess (391). Normalerweise beinhalten die Vesikel auch Mineralisationsinhibitoren (siehe Kapitel 1.3.4.3.5 Verlust von Kalzifizierungsinhibitoren), die jedoch im veränderten Milieu nur niedrig exprimiert werden (392). Das Hinzugeben von insbesondere Kalziuminhibitoren vermindert die Kalzifizierung dieser Vesikel (339). Die Matrixvesikel werden von umgebenden VSMC aufgenommen, die wiederum den Prozess der Apoptose/Nekrose durchlaufen. Es bildet sich ein zentrale Stelle (Nidus) von der aus eine kalzifizierende Kaskade beginnt (393). Zudem sind die Kristalle selbst ein Dedifferenzierungsstimulus für die VSMC, die daraufhin vermehrt BMP-2 exprimieren. (394).

#### **1.3.4.3.7 Regression der Gefäßverkalkung**

Für die Rückbildung der Gefäßverkalkung sind Monozyten/Makrophagen beteiligt. In ihrer Funktion ähneln sie Osteoklasten (395). Osteoklasten resorbieren mineralisierte Matrix und sind maßgeblich am Remodelling des skelettalen Stützgewebes beteiligt. Blutmonozyten, Makrophagen und Osteoklasten entstehen aus der gleichen Vorläuferzelle. Gemeinsam gehören sie dem mononukleären Phagozytosesystem an (61). In kalzifizierenden Geweben konnte bei monozytären Zellen die Expression von RANKL nachgewiesen werden (396). RANKL gehört der Familie der Tumornekrosefaktoren an und ist der Hauptregulator der osteoklastären Differenzierung (397). In vitro Studien zeigen, dass sich ein phosphatreiches Medium negativ auf die Differenzierung der Monozyten/Makrophagen in einen osteoklastären Phänotyp auswirkt (398), gleichzeitig wirkt es sich hemmend auf die Knochenresorptionsfähigkeit von Osteoklasten aus (399). Die Dysbalance betrifft demnach auch die Faktoren, die entstandene Kalzifikationen beseitigen könnten.

## 2. Methoden

### 2.1 Mausexperimente

Alle Tierversuche wurden vom Österreichischen Bundesministerium für Wissenschaft und Forschung (BMWF-66.010/0047-II/3b/2012) genehmigt und nach den Richtlinien der europäischen Kommission (86/609/EEC) durchgeführt.

Die Mäuse vom Typ Dilute-brown agouti 2 (DBA/2NCr1, kurz auch DBA/2) wurden von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) erworben.

Unterschiedliche Inzucht-Mausstämme reagieren unterschiedlich auf die Exposition mit Spezialdiäten (400). Mäuse vom Typ DBA/2 besitzen eine natürlich vorkommende Spleißvariante im Abcc6 Gen (401), welche sie anfälliger für ektope Verkalkung macht. Für die Tierversuche wurden ausschließlich weibliche Versuchstiere verwendet, da sie in vorherigen Versuchen eine erhöhte Neigung zur Kalzifizierung zeigten (402).

Die Haltung in der Versuchstieranlage an der Medizinischen Universität Graz erfolgte in virus- und antikörperfreien Umgebung. Ein Teil der 8 Wochen alten DBA/2 Mäuse bekam eine Standard-Diät (SCD), der andere Teil wurde auf eine Hochphosphatdiät (HPD) gesetzt. Anschließend beobachteten wir sie über ein Zeitintervall von 5-14 Tagen. Die Spezialdiäten waren wie folgt zusammengesetzt.

Bestandteile	SCD	HPD
Phosphor	7.0g	20.2g
Calcium	10.0g	9.4g
Magnesium	2.2g	0.7g
Vitamin D3	1000IU per kg	500IU per kg

Tab. 7 Nahrungszusammensetzung SCD und HPD

Letztlich wurden die Mäuse unter Anästhesie mittels zervikaler Dislokation getötet, Blut abgenommen und danach die abdominelle und thorakale Aorta entnommen. Im Serum wurden anschließend Harnstoff und Phosphat gemessen (Roche Dignostics, Mannheim, Deutschland).

## 2.2 Massenspektrometrie

Um die Verkalkung der Gefäßwand exakt zu quantifizieren, wurde in Zusammenarbeit mit Univ. Prof Dr. Walter Gössler vom Institut für Analytische Chemie der Karl-Franzens Universität Graz eine induktiv-gekoppelte Plasma-Massenspektrometrie (ICP-MS) (Agilent 7500ce, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) durchgeführt. Bei dem Verfahren wird ionisiertes Argon mit dem zu analysierenden Material soweit erhitzt (5000°C), bis sich die Bestandteile des Gewebes ionisieren. Dieses Plasma wird ins Hochvakuumsystem des Massenspektrometers überführt. Hier werden die Ionen nach ihrem Masse/Ladungsquotienten ( $m/z$ ) getrennt und qualitativ sowie quantitativ detektiert. Selbst kleine Mengen können auf diese Weise exakt nachgewiesen werden.

Dafür wurden die getrockneten aortalen Gewebstücke (n=10 je Gruppe) mit Salpetersäure in einem Mikrowellenofen verdaut (UltraCLAVE III, EMLS, Leutkirch, Deutschland). In 45 Minuten wurde dieser schrittweise auf 250°C erhitzt und diese Temperatur für 45 Minuten gehalten. Nachdem die Proben abgekühlt waren, wurden sie in 50mL Polypropylentubes gegeben. In der ICP-MS wurde die Calcium- und Phosphatkonzentration mit einem Masse/Ladungsverhältnis von 43 für Kalzium und 31 für Phosphor bestimmt. Zur Validierung der Ergebnisse wurde Muskelgewebe vom Rind (RM 8414, NIST, Gaithersburg, ML, USA) als Referenz verwendet.

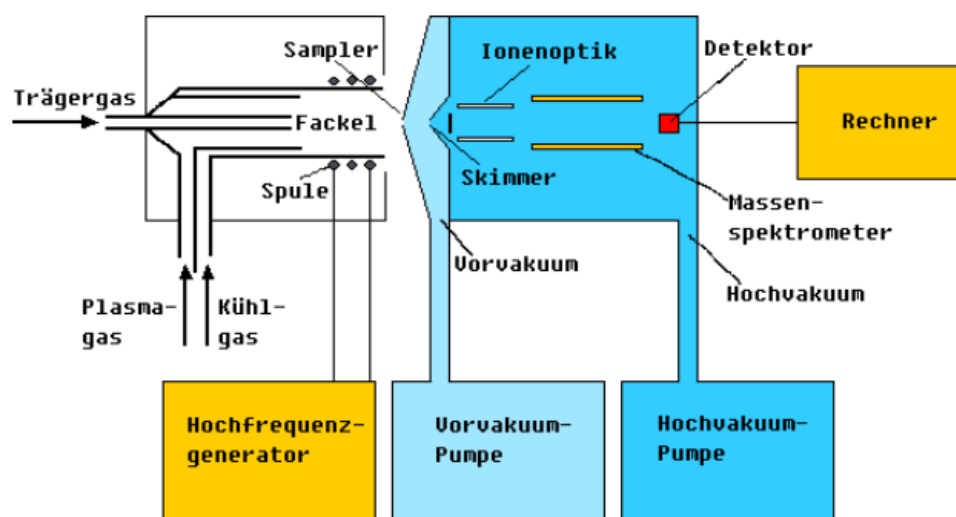


Abb. 26 Schematische Darstellung eines induktiv-gekoppelten Plasma-Massenspektrometers (ICP-MS) aus Was ist ICP-MS? [Internet]. [zitiert 3. Juni 2014]. Verfügbar unter: <http://www.icp-ms.de/wasist.html>

### 2.3 Myographie

Die Myographie ist ein Verfahren, bei dem das zu analysierende Gefäßstück mittels einer depolarisierenden, kaliumreichen Lösung zur Kontraktion stimuliert wird. Dabei detektieren Sensoren die sich aufbauende Spannung. Da das Gewebestück fest verankert ist, ist es ihm nicht möglich, sich zu verkürzen. Die Kontraktion läuft somit isometrisch ab.

Nach neun Tagen auf HPD bzw. SCD wurden die DBA/2 Mäuse unter Anästhesie getötet und die thorakale und abdominale Aorta im Ganzen entnommen (n= 7 Ringe je Gruppe). Nach Entfernung der perivaskulären Adventitia wurde die Aorta in Ringe von ca. 2mm Länge geschnitten und mittels Drähten in eine „small wire myograph chamber“ aufgespannt (Danish MyoTechnology, Aarhus, Dänemark), welche physiologische Salzlösung (PSS) (114mM NaCl, 4.7 mM KCl, 0.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 CaCl<sub>2</sub>, 25mM NaHCO<sub>3</sub> und 11mM D- Glucose, pH 7.4) enthielt. Diese wurde mit 5% CO<sub>2</sub> und 95% O<sub>2</sub> bei 37°C belüftet. Die Drähte führten durch das Lumen des Gefäßes und wurden an einen Kräftemesser zur Messung der isometrischen Spannung angeschlossen (PowerLab, ADInstruments, Spechbach, Deutschland). Nach einer initialen Spannung von 10 mN in den thorakalen und 5mN in den abdominellen Ringen folgte eine Stabilisationszeit von 30min. Anschließend wurde PSS mit 60mM KCl hinzugegeben, was eine isometrische Muskelkontraktion bewirkte. Zur Relaxion wurde PSS Puffer eingesetzt.

### 2.4 Array

Die RNA Isolation aus den aortalen Gewebstücken (n=4 je Gruppe) erfolgte mittels RNeasy Mini Kit(Qiagen, Venlo, Niederlande) nach dem Protokoll der Herstellers. Die Gewebstücke wurden zerkleinert und in RNA Later Puffer mit MagNA Lyzer Green Beads und MagNA Lyzer Tissue Disruptor homogenisiert (Roche, Basel, Schweiz). Die RNA Qualität wurde

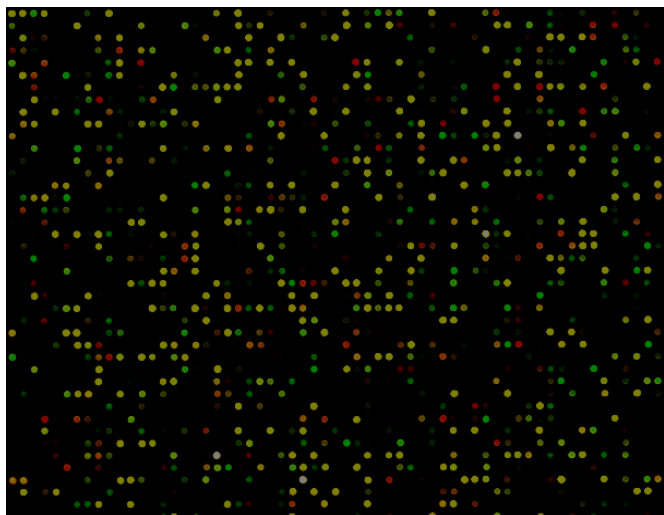


Abb. 27 Mögliches Ergebnis eines DNA-Microarrays aus  
 File:DNA microarray.svg - Wikimedia Commons [Internet].  
 [zitiert 3. Juni 2014]. Verfügbar unter:  
[http://commons.wikimedia.org/wiki/File:DNA\\_microarray.svg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:DNA_microarray.svg)

mittels Bioanalyzer 2100 (Agilent, Foster City, CA) ermittelt. Die RNA Qualität wurde mittels der RNA integrity number (RIN) bestimmt. Es wurden nur Proben mit einem RIN >8 verwendet. Nach dem Herstellerprotokoll wurden 200-250ng RNA in cDNA umgewandelt, amplifiziert und gereinigt (Nugen Applause WT-Amp Plus ST System, NuGEN Technologies, Inc., San Carlos, CA, USA). Anschließend wurden die cDNA mittels Encore Biotin Module fragmentiert, markiert und hybridisiert. Die Durchführung der GeneChip Eukaryotic Poly-A RNA Controls, Hybridization Controls und die GeneChip Hybridization, Wash and Stain Kit (Affymetrix) erfolgten gemäß Herstellerprotokoll. Anschließend wurden die Proben auf den Affymetrix GeneChip Mouse Gene Array 2.0 ST (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) für 18h über Nacht bei 45°C in einem rotierenden (60rpm) GeneChip Hybridisierungsofen 645 hybridisiert. Der Affymetrix GeneChip Mouse Gene Array 2.0 ST wurde genützt, um das Transkriptionsprofil der Proben zu berechnen. Die Arrays wurden nach dem Affymetrix Protokoll in einer Affymetrix GeneChip Station 450 gewaschen und gefärbt. Die Arrays wurden mittels GeneChip Scanner GCS3000 gescannt. Die CEL Dateien mit den Probandaten wurden mit dem robust multi-chip average (RMA) Algorithmus (mit Hintergrundkorrektur, Quantil-Normalisierung in allen Arrays, median basierte Summierung basierend auf den logarithmischen Werten der Expressionswerte) in der Partek Software v.6.5 (Partek Inc, St Louis, MO) standardisiert, um einen Wert für das Expressionslevel der Probe zu generieren. Die resultierenden Daten wurden log<sub>2</sub>-transformiert. Um stark (hinauf-/herunter) regulierte Gene zu definieren, wurde ein mindestens 1,5facher Unterschied und ein Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  festgelegt.

## 2.5 cDNA Synthese, qRT-PCR

Die quantitative Real Time PCR (qRT-PCR) wurde zur Bestätigung der im Array regulierten Expressionswerte durchgeführt. In der qRT-PCR kommt es zur Amplifizierung von bestimmten Nukleinsäuresequenzen. Im Gegensatz zur PCR, ist es bei der RT-PCR möglich in jedem Zyklus eine direkte Quantifizierung der vervielfältigten DNA nachzuvollziehen. Die Quantifizierung erfolgte über einen interkalierenden oder probegebundenen Fluoreszenzfarbstoff im SYBR Green Master Mix und TaqMan gene expression master mix (Life Technologies, Wien, Österreich).

Es wurde das relative Genexpressionslevel von Trp53inp1, Igfbp3, Casq1, Mtmr14, Col3a1 und Vcam1 mittels den Genexpressions-Assays Mm00458142\_g1, Mm01187817\_m1,

Mm00486725\_m1, Mm01184733\_m1, Mm01254476\_m1 und Mm01320970\_m1 ermittelt. Für ihre Amplifikation wurde TaqMan gene expression master mix (all Life Technologies, Wien Österreich) genutzt. Die RNA Isolation aus den aortalen Gewebestücken erfolgte nach obigem Schema. Insgesamt wurden 2µg GesamtRNA mittels Superscript III Transcription Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) und Zufallsprimer (Roche, Basel, Schweiz) in cDNA umgewandelt (reverse Transkription). Die real-time PCR wurde jeweils in Doppelwerten auf einem CF96 real time detection system (BioRad, Vienna, Austria) durchgeführt. Das *Hprt* Gen diente als housekeeping Kontrolle. Folgende Primer wurde verwendet: Forward 5' GCT TCC TCC TCA GAC CGG TTT TTG C 3'; Reverse 5' ATC GCT AAT CAC GAC GCT GGG ACT G 3'. Folgende Primer für das Runx2 Gen wurden verwendet: Forward 5' TCC TAT CTG AGC CAG ATG ACA TCC 3'. Reverse 5' CCG GTC TCC CCC GGG TAC C 3'.

Mit Hilfe der  $\Delta\Delta C_t$  Methode wurde eine relative Quantifizierung durchgeführt, d.h. es wurde die Expression des Zielgen bezogen auf ein nicht reguliertes und konstant exprimiertes Referenzgen (housekeeping gene) bestimmt. Hierzu berechneten wir pro Sample zunächst den Mittelwert beider gemessenen  $C_t$ -Werte. Anschließend berechneten wir den  $\Delta C_t$  Wert (cycle of threshold). Der  $C_t$ -Wert ist der Schwellenwert bei dem sich das gemessene fluoreszierende Signal von der Hintergrundstrahlung abhebt. Somit wurde die Expression des Zielgens auf die des Referenzgens normalisiert. Im nächsten Schritt wurde der Mittelwert der Expressionwerte der Mäuse auf SCD als Referenz verwendet und die berechneten  $\Delta C_t$  Werte auf diesen Referenzwert hin normalisiert ( $\Delta\Delta C_t$  Wert). Im letzten Schritt wurde die  $\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta C_t \text{- Wert}}$  berechnet. Bei dieser Methode geht man von einer optimalen Effizienz der Zyklen aus. Das bedeutet, dass es zu einer Verdopplung der DNA Menge in jedem Zyklus kommt. Der resultierende Wert stellt den Expressionsunterschied zwischen der thorakalen und abdominalen Aortenabschnitte dar, normalisiert zum Referenzgen und bezogen auf die Standardprobe.

$$\Delta C_t = C_t \text{ Zielgen} - C_t \text{ Referenzgen}$$

$$\Delta\Delta C_t = C_t \text{ Zielgen} - C_t \text{ TA/SCD}$$

Abb. 28 Prinzip der  $\Delta\Delta C_t$  Methode

## 2.6 Histochemie und Immunhistochemie

Mit Hilfe der Histochemie lassen sich mittels geeigneter Färbungen Zellkomponenten aufgrund ihrer unterschiedlichen Oberflächeneigenschaften anfärben.

Zum Nachweis von bestimmten Antigenen, z.B. Oberflächenexpressionsmolekülen, bedient man sich der Immunhistochemie. Sie stützt sich auf die Antigen-Antikörper Reaktion. Dabei wird mittels eines 2. Antikörpers, der eine messbare Enzymaktivität oder einen fluoreszierenden Farbstoff trägt, die Bindung eines Antigens an einen 1. Antikörper sichtbar gemacht.

### 2.6.1 Alizarin Red S Färbung

Die Alizarin Red Färbung färbt kalziumreiche Ablagerungen rot an, indem es eine Verbindung mit Kalziumionen eingeht. Es zeigt somit das Ausmaß der Verkalkung, sowie die Lokalisation (403). Die jeweiligen Aortenabschnitte der DBA/2N Mäuse wurden isoliert, von perivaskulärer Adventitia manuell befreit, in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet (über Nacht), sowie mit O.C.T. Compound (Sakura, Sakura Finetek Europe B.V., Alpen an den Rijn, Netherlands) für Gefrierschnitte eingebettet.

Die Paraffinschnitte wurden anschließend entparaffiniert und mit 2% Alizarin Red S Lösung (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) inkubiert (403). Gespült wurde mit einer Aceton und einer Aceton Xylollösung.

### 2.6.2 Vcam1 Färbung

Mittels immunhistologischen Färbung wurde im weiteren Verlauf die Vcam1 Expression farblich dargestellt. Die Paraffinschnitte wurden mit Xylol entparaffiniert und anschließend mit einer absteigenden

Alkoholreihe (je 2min 95%, 70%, 50%, 30% Ethanol) rehydriert.

Die Schnitte wurden in einer mit Antigen demaskierenden Lösung gefüllten Küvette bei 120°C für 30min und anschließend bei 85°C für 20 Sekunden gekocht. Nachdem die Objektträger (OT) mit Leitungswasser gespült wurden, wurden sie in eine

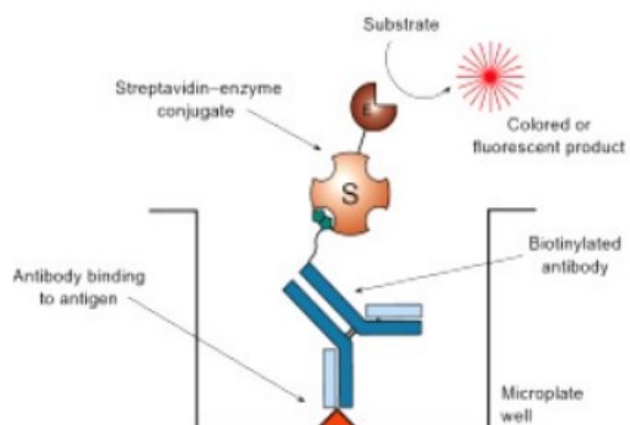


Abb. 29 Schematische Darstellung der Färbung mittels ABC-Komplex aus Hermanson GT. *Bioconjugate Techniques*. Academic Press; 2013. p. 467

phosphatgepufferten Kochsalzlösung (PBS) gefüllte Küvette gegeben. Anschließend folgte eine Umrandung mit einem Fettstift (Dako-Pen, Aachen, Deutschland). Es folgte das Blocken mit immunhistochemischer staining solution, bestehend aus 20% fetalem Kälberserum (FCS Sigma-Aldrich Chemie), 10% Ziegenserum (Sigma-Aldrich Chemie) und 70% PBS, für 1h bei Raumtemperatur. Ziel des Blockens ist es, unspezifische Bindungsstellen zu besetzen und besonders diejenigen, die ein Bestreben haben Ziegenantikörper zu binden.

Anschließend wurden die Objektträger mit dem Vector Avidin/Biotin Blocking Kit (1 Tropfen/Objektträger) für insgesamt 30 Minuten inkubiert (15 Minuten Avidin, 2x1 Minute in PBS gewaschen, 15 Minuten Biotin, 2x1 Minuten in PBS gewaschen). Avidin bindet an den mit Biotin gekoppelten 2. Antikörper. Um ein möglichst störfreies Ergebnis zu erzielen, sollen alle Bindungsstellen mit Affinität zu Avidin in diesem Schritt blockiert werden.

Dann wurden die Objektträger mittels 2% Gelatine Waschlösung (0.8 g Gelatine, 100 mL destilliertes Wasser, 300 mL PBS) einmal für 2 Minuten beschichtet.

Im nächsten Schritt wurde der 1. Antikörper, Anti-Maus Vcam1 Antikörper (Kaninchen) (EPR5047; Abcam, Cambridge, UK) aufgetragen (200µl/Schnitt, 1:200 Verdünnung mit IHC staining solution) und für 2h bei Raumtemperatur inkubiert. Er bindet an ein Epitop des gesuchten Proteins.

Die Objektträger wurden daraufhin drei Mal für 5 Minuten in PBS gewaschen, der 2. Antikörper, ein biotinylierter Anti-Ratte IgG Antikörper (Ziege) (Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, PA, USA) wurde aufgetragen (200µl/ alle OT) und für 45 Minuten in einer feuchten Kammer mit Deckel inkubiert. Der 2. Antikörper ist gegen den ersten Antikörper gerichtet, d.h. er stammt aus einer Ziege, die mit Kaninchen immunisiert wurde.

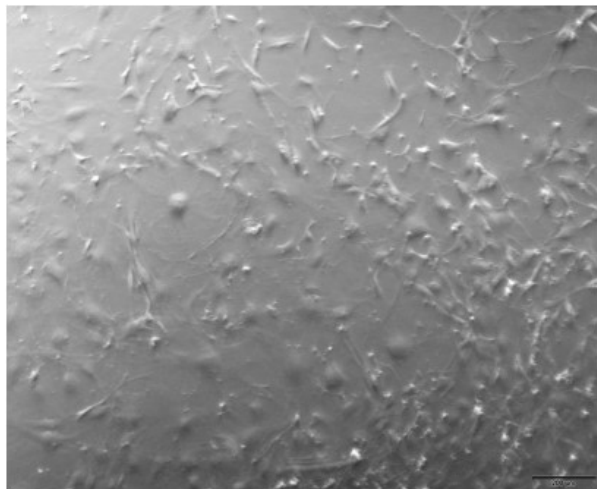
In der Zwischenzeit wurde der AB-Komplex (Avidin-Biotin-Komplex) aus einem Vectastain ABC Kit (Elite PK-6100 Standard, Vector Laboratories Inc.) vorbereitet. Hierzu fügte man 10µl Lösung A in 1000µl PBS und in diese Lösung 10µl Lösung B hinzu.

Anschließend wurden die Objektträger für 10 Minuten in PBS gewaschen und 200µl des hergestellten Avidin-Biotin Komplexes pro Objektträger aufgetragen. Bei Raumtemperatur wurden die Objektträger für 45 Minuten inkubiert.

Der Avidin-Biotin Komplex besteht aus Avidin und Biotin. Avidin ist ein tetrameres Glykoprotein und besitzt vier Bindungsstellen mit hoher Affinität zu Biotin. Biotin ist ein wasserlösliches Vitamin (Vitamin H). Avidin bildet einen Komplex mit dem biotinylierten 2. Antikörper. Dabei ist Avidin selbst mit dem Enzym Horseradish Peroxidase (HRP) konjugiert. Die Enzymaktivität sorgt für eine messbare Signalverstärkung. Danach wurde mit Gill's Hematoxylin Nr. 3 (Sigma Aldrich) gegengefärbt.

## 2.7 Zellkultur

Die Aorta wurde aus den DBA/2N Mäusen entnommen und vom perivaskulären Binde- und Fettgewebe befreit. Anschließend wurden sie mit einem Skalpell in Ringe von 2mm Dicke geteilt und in PBS von Blutresten gesäubert. Im nächsten Schritt wurden sie je nach Herkunft (thorakal/abdominal) in die jeweilige Petrischalen platziert, bedeckt von einem Tropfen Nährmedium DMEM/F12(Dulbecco's Modified Eagle



*Abb. 30 Lichtmikroskopische Aufnahme der wachsenden glatten Muskelzellen*

Medium, 20% fetales Kälberserum, 2% Penicillin/ Streptomycin, 4,5g/L Glukose Fisher Scientific ) und für 3h bei 37° C bei einer Atmosphäre von 100% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> in den Inkubator (Forma™ Series II 3110 Water-Jacketed CO<sub>2</sub> Incubators) gegeben. Mittels Lichtmikroskop wurde das Anheften des Rings am Boden der Schale beobachtet. Anschließend wurden jeweils 3ml des Mediums hinzugefügt und die Proben bei o.g. Verhältnissen in den Inkubator gegeben. Ein Wechsel des Kulturmediums erfolgte alle 2-3 Tage. Die Begutachtung erfolgte regelmäßig unter dem Lichtmikroskop. Bei ausreichendem Zellwachstum wurden die Kulturen im Verhältnis 1:2 gesplittet (subkultiviert).

### 2.7.1 Splitten

Nach Absaugen des Mediums wurde 2mL erwärmtes (37°C), steriles Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS) hinzugefügt. Dieses wurde wieder abgesaugt und 1mL einer Lösung (1:10 Verdünnung von 0,05%Trypsin /0,02 % EDTA in DPBS) für 2

Minuten bei 37°C in den Inkubator gegeben. Anschließend wurde die Trypsination durch die Applikation von 2mL Nährmedium DMEM/F12 gestoppt. Anschließend wurden die Zellen bei 300g für 5 Minuten in 15mL Falcon Tubes bei Raumtemperatur zentrifugiert (Centrifuge 5810R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Der Kulturmediumüberstand wurde verworfen und die Zellen in 1mL Nährmedium resuspendiert. Im letzten Schritt wurde die Mediummenge auf 3mL aufgefüllt und die Zellen im Verlauf lichtmikroskopisch beobachtet.

## 2.8 Statistik

Eine grobe funktionelle Analyse der Arraydaten wurde unter Zuhilfenahme des Panther-Klassifikationssystem nach Mi *et al.* angefertigt. Die in der thorakalen und abdominalen Aorta bei Spezialdiäten unterschiedlich regulierten Gene mit einem Genexpressionsverhältnis von  $> 0,3$  und einem Bonferroni korrigierten p-Wert  $< 0,05$  wurden für die Pathway Analyse herangezogen. Die Bonferroni Korrektur wurde angewendet um den Fehler 1. Art zu neutralisieren. Der Fehler 1. Art beschreibt die Ablehnung der Nullhypothese, obwohl diese wahr ist. Die Wahrscheinlichkeit, dass er auftritt, liegt je nach Definition bei 5% oder 1% (Signifikanzniveau  $\alpha$ ) und steigt bei mehrfacher Messung in der gleichen Stichprobe an. Um diese Irrtumswahrscheinlichkeit zu reduzieren, teilt man das  $\alpha$ -Niveau durch die Zahl an durchgeführten Tests. Die Wahrscheinlichkeit wird nicht mehr auf die Gesamtzahl der Messungen projiziert, sondern auf alle Einzelergebnisse und schließt damit mögliche falsch positive Ergebnisse aus.

Die biochemischen und myographischen Daten wurden mittels des Kolmogorov-Smirnov Test mit Lilliefors Korrektur auf Normalverteilung getestet. Die Kalzifizierungsdaten von CKD Patienten wurden mittels einer Varianzanalyse (ANOVA) mit darauf folgendem adjustierten Dunn Test auf signifikante Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Gefäßabschnitten getestet. Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurden je nach Verteilung mittels des nicht-parametrischen Mann-Whitney U Tests oder des Student's T Test auf signifikante Unterschiede getestet. Ein p-Wert  $< 0,05$  wurde hierbei als signifikant betrachtet.

### 3. Ergebnisse

Die DBA/2 Mäuse auf HPD entwickelten im Beobachtungsintervall von 5-14 Tagen Nephrokalzinose und Niereninsuffizienz (402). Im Zuge dessen erhöhten sich die Serumwerte von Harnstoff und Phosphat, im Vergleich zu den Mäusen auf SCD, signifikant (Tab. 8).

Serum	SCD	HPD	Anzahl	Signifikanzniveau
Harnstoff	53±5mg/dL	197±24mg/dL	5	p= 0,001
Phosphat	13.3±0.4mmol/L	18.6±1.5mmol/L	5	p=0,02

Tab. 8 Serumwerte am Tag 5 im Vergleich

Die DBA/2 Mäuse auf HPD waren somit urämisch.

Nach 14 Tagen wurde den Mäusen die Aorta entnommen und diese auf Objektträger histochemisch analysiert. In der Kontrollgruppe konnten keine Kalziumablagerungen gefunden werden (nicht dargestellt). In der Gruppe der Mäuse auf HPD wies hingegen der abdominale Anteil der Aorta Kalziumablagerungen auf (Abb. 31C und D), während der thorakale Anteil keine derartigen Veränderungen zeigte (Abb. 31A und B). Dabei war ausschließlich die Tunica media betroffen, während die Tunica intima ausgespart blieb.

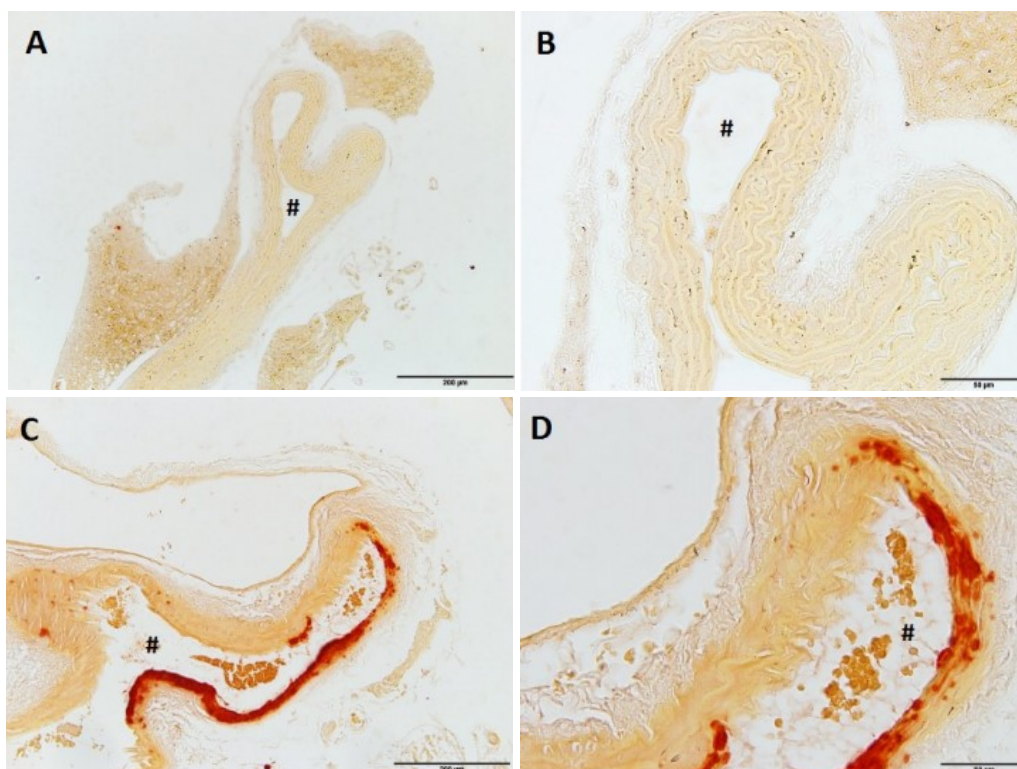


Abb. 31 Alizarin Red S Färbung färbt Kalziumablagerungen in Tunica media der abdominalen

Im nächsten Schritt wurde mittels dem induktiv-gekoppelten Plasma-Massenspektrometer die Kalzium- und Phosphatkonzentration der thorakalen, sowie abdominalen Aorta im Vergleich SCD zu HPD gemessen. Insgesamt ließen sich höhere Phosphatkonzentrationen in den Gewebestücken der Mäuse auf HPD finden. Weiters fand sich ein deutlicher Unterschied im Gehalt an Kalzium ( $5,1 \pm 1,8$  bzw.  $29,4 \pm 10,1 \mu\text{g}/\text{mg}$  Trockengewicht) und Phosphat ( $7,4 \pm 0,4$  bzw.  $18,8 \pm 4,1 \mu\text{g}/\text{mg}$  Trockengewicht) innerhalb der Mäusegruppe auf HPD, wenn man den thorakalen und abdominalen Anteil der Aorta gegenüberstellte. Dieser Unterschied war bei den Mäusen auf SCD nicht nachweisbar (siehe Abb. 32A und B). Um die funktionelle Auswirkung der Mediasklerose auf die Gefäßdehnbarkeit (Compliance) zu messen, wurde eine Myographie durchgeführt. Die glatten Muskelzellen der Tunica media können sich aktiv kontrahieren und somit die Compliance mitregulieren. Die vorherigen Alzarin Red S Färbungen zeigten, dass es genau in dieser Muskelschicht bei den Mäusen auf HPD zu Kalziumablagerungen gekommen war (siehe Abb. 32C und D). Im nächsten Schritt sollte geklärt werden, welchen Einfluss diese Ablagerungen auf die Kontraktilität der glatten Muskelzellen haben. Die DBA/2 Mäuse auf SCD bauten sowohl im thorakalen, als auch abdominalen Abschnitt der Aorta eine ähnlich hohe isometrische Spannung als Reaktion auf 60mM KCl auf. Bei den DBA/2 Mäusen auf HPD hingegen zeigte sich ein signifikanter ( $p < 0,001$ ) Unterschied, wo bei es im Bereich der abdominalen Aorta zu einer deutlichen geringeren Spannungsaufbau kam (siehe Abb. 32C und B).

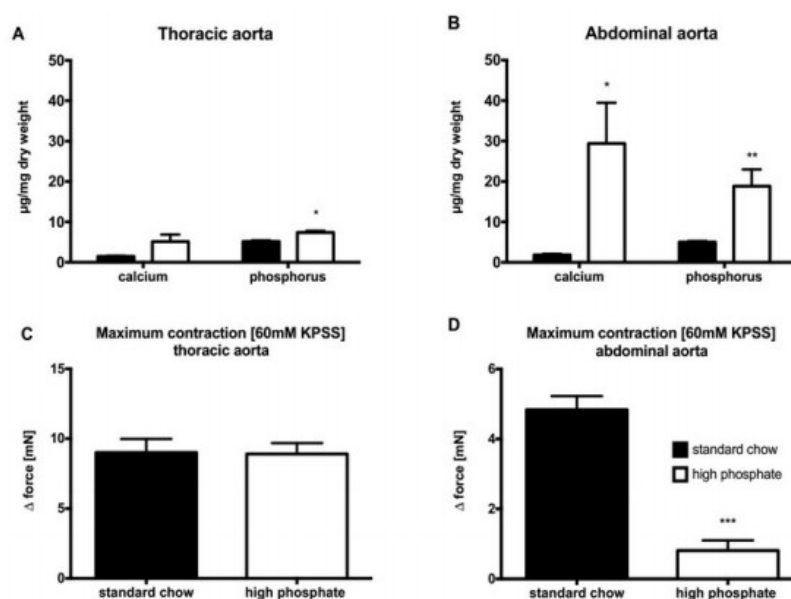


Abb. 32 Chemische und funktionelle Analyse der Aortenabschnitte der DBA/2N Mäuse auf HPD und SCD im Vergleich

Diese Ergebnisse lassen auf eine erniedrigte Compliance aufgrund der morphologischen Veränderungen in der Gefäßwand bei Mediasklerose und somit auf eine zunehmende Steifheit des Gefäßabschnitts schließen.

Somit konnte histomorphologisch, chemisch und funktionell die urämische Mediasklerose nachgewiesen werden, die insbesondere die abdominelle Aorta betraf und die thorakale Aorta weitgehend aussparte.

Im weiteren Verlauf untersuchten wir die molekulargenetischen Veränderungen in der Gefäßwand, die mit der Entstehung der Mediasklerose einhergingen.

Mittels dem Affimetrix mouse gene 2.0 ST array wurde das gesamte transkriptionelle Genprofil der DBA/2 Mäuse auf SCD und HPD entschlüsselt.

Dabei zeigte sich wiederum, dass das Transkriptionsprofil der Gefäßstücke in einem stärkeren Ausmaß durch die Lokalisation (thorakal/abdominal) als durch die verabreichte Nahrung beeinflusst ist.

Die Resultate der Myographie spiegeln sich auch auf Genebene wieder. Der abdominale Anteil der Aorta der Mäuse auf HPD wies beispielsweise eine Herunterregulierung von Myoglobin *Mb*, Calsequestrin-1 *Casq1* und Kollagen Typ III  $\alpha 1$  Isoform *Col3a1* auf, die allesamt essentiell für eine normale Gefäßkontraktion sind.

Die Ergebnisse wurden mittels qRT-PCR bestätigt (Abb. 33A und B).

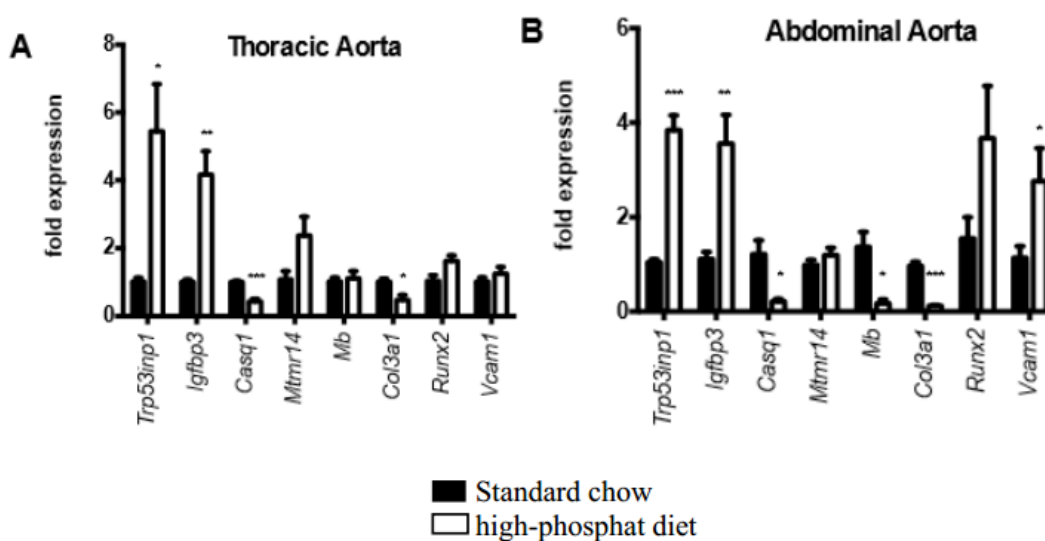


Abb. 33 Genprofil im Vergleich auf SCD und HPD

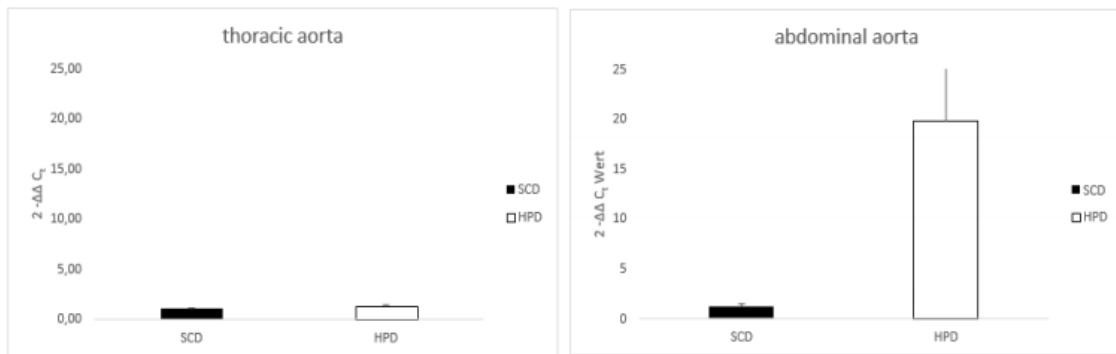


Abb. 34 Transkriptionsprofil von VCAM1 im Vergleich auf SCD und HPD

Die vorherigen Ergebnisse spiegeln sich auch in der immunhistologischen Färbung wieder. Die Abbildungen zeigen Aortenabschnitte von DBA/2 Mäuse auf HPD (Abb.35). Während die Vcam1 Expression im thorakalen Abschnitt auf das Endothel beschränkt ist (Abb. 35A und B), exprimieren die glatten Muskelzellen der Tunica muscularis im abdominalen Teil der Aorta vermehrt Vcam1 (Abb. 35 C und D).

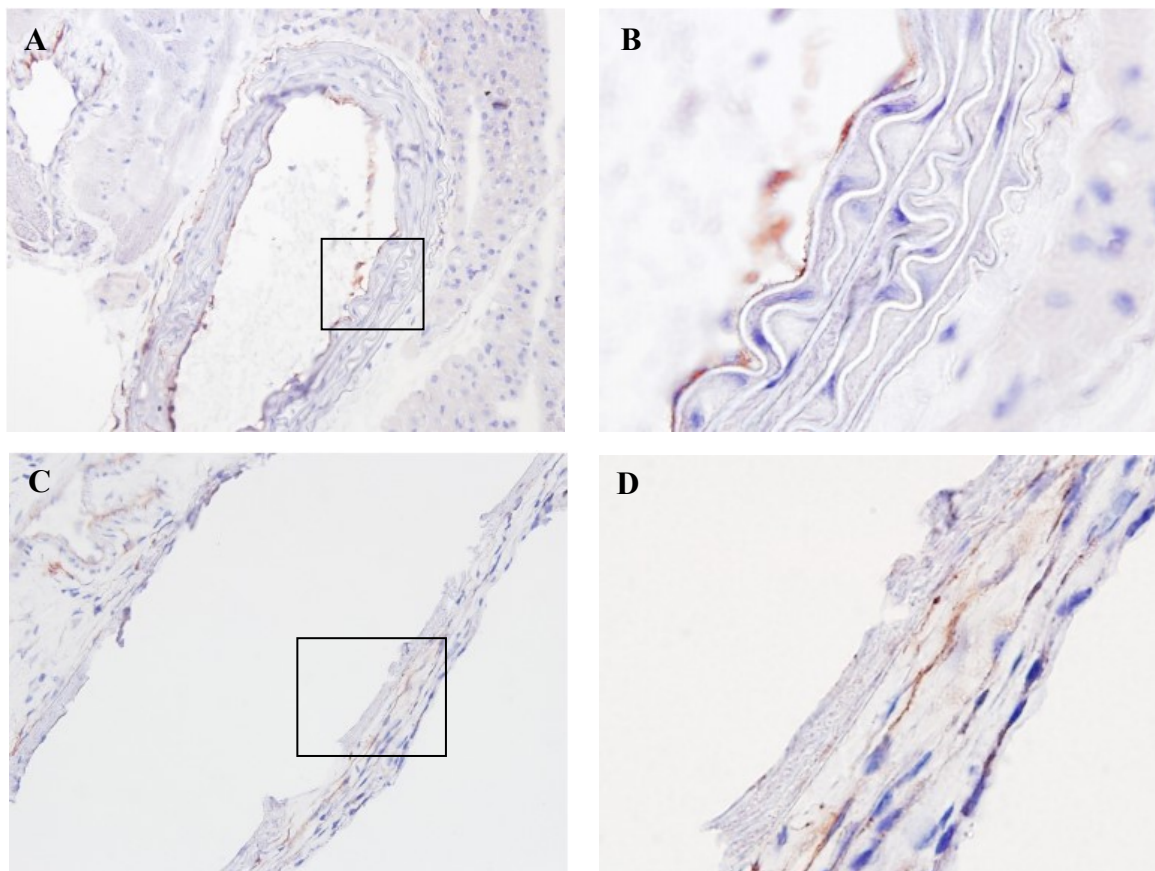


Abb. 35 Immunhistochemische VCAM1 Färbung

## 4. Diskussion

Die Ergebnisse unserer experimentellen Studie zeigen, dass die unterschiedlichen Segmente der Aorta unterschiedlich stark verkalken. Der thorakale und der abdominale Abschnitt der Aorta wurden den gleichen systemischen Reizen einer hohen Phosphatkonzentration und einer Urämie ausgesetzt und dennoch reagierten sie unterschiedlich. Beide Gefäßabschnitte wiesen –verglichen mit Kontrolltieren auf Normaldiät– eine insgesamt höhere Verkalkungsgrad auf. Dieser Verkalkungsgrad war allerdings in der abdominalen Aorta im Vergleich zur thorakalen deutlich höher und spiegelte sich einerseits in einem höheren Gehalt an Kalzium und Phosphat im Trockengewicht der Aorten und andererseits auch in einer deutlich reduzierten Compliance in der vaskulären Myographie wider. Die histologische Aufarbeitung der Aorten zeigte deutlich, dass diese vaskulären Verkalkungen in unserem Tiermodell in der Tunica media und nicht in der Tunica intima liegen und dass somit keine Atherosklerose sondern eine Mediaverkalkung vorliegt. Vorhergehende Studien hatten schon nachgewiesen, dass selbst bei einer chirurgischen Transposition der abdominalen Aorta in den Thorax bzw. einer Transposition der thorakalen Aorta in das Abdomen, der Ursprung des Gefäßes mehr Einfluss auf die Entwicklung einer Gefäßverkalkung hat, als die veränderte anatomische Lage. Der chirurgisch versetzte Gefäßabschnitt zeigte demnach die gleiche Reaktion auf kardiovaskuläre Risikofaktoren, wie an seinem Ursprungsort (404,405). Ob der Kalzifizierungsprozess auch in Form einer Kalzifizierungskaskade Einfluss auf die Umgebung nimmt oder das umgebende Gewebe über gewebespezifische, protektive Faktoren verfügt, ist aus der Studie nicht ersichtlich.

Eine mögliche Erklärung für dieses heterogene Verteilungsmuster der urämischen Mediaverkalkung könnte in der Embryologie liegen. Die glatten Gefäßmuskelzellen stellen ein heterogenes nicht-überlappendes Mosaik dar, das sich in den unterschiedlichen Regionen des Gefäßbaums aus unterschiedlichen embryologischen Ursprüngen entwickelt. Während der Aortenbogen neuroektodermalen Ursprungs ist, entstammt der abdominale Abschnitt der Aorta dem Mesoderm (siehe Kapitel 1.3.2.1 VSMC). Eine chirurgische Transposition dieser Gefäße ändert natürlich nichts am embryologischen Ursprung und an der intrinsischen Neigung der glatten Gefäßmuskelzellen zu Entwicklung einer urämischen Mediaverkalkung, die offensichtlich in der abdominalen Aorta viel höher als in der thorakalen Aorta zu sein scheint. Unsere eigenen Daten und die transplantationschirurgischen Studien von Haimovici et al. legen nahe, dass ein

mesodermaler Ursprung der glatten Gefäßmuskelzellen die Gefäßverkalkung begünstigen kann. Interessanterweise sind auch die VSMC der Koronargefäße mesodermalen Ursprungs, was eine mögliche Erklärung für die hohe Prävalenz kardiovaskulärer Erkrankungen bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz sein könnte.

Auf Gen- und Proteinebene konnten wir in den aortalen Gewebestücken zudem ein deutlich verändertes Expressionsmuster als Reaktion auf eine phosphatreiche Diät nachweisen. So wurde beispielsweise Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 (Trp53inp1) und Insulin-like growth factor-binding protein 3 (Igfbp 3) sowohl im thorakalen und aortalen Segment der Aorta im Vergleich zur Kontrolltieren auf Normaldiät stark erhöht. Die Stress-induzierte Überexpression von Trp53inp1 und Igfbp 3 steht in Zusammenhang mit Zellzyklusarrest und Apoptose (406,407).

Darüber hinaus zeigte abdominale Aorta im Vergleich zur thorakalen Aorta eine stärkere Herunterregulierung der kontraktile Proteine und eine Hochregulierung von Runx 2. Runx 2 ist einer der wichtigsten Marker für die osteoblastäre Differenzierung der glatten Muskelzellen (siehe Kapitel 1.3.4.3.3 Urämie). Dieses Ergebnis zeigt einmal mehr, dass die glatte Gefäßmuskelzellen nicht terminal differenzierte Zellen sind und die Fähigkeit besitzen ihren Phänotyp als Reaktion auf exogene Reize zu verändern. Weiters war die erhöhte Expression von vascular cell adhesion molecule- 1 (Vcam1) sowohl auf Genexpressions-, als auch auf Proteinebene nachweisbar. Vcam1 ist ein Adhäsionsmolekül aus der Familie der Immunglobulin Superfamilie, dass vor allem von Endothelzellen aber auch auf glatten Muskelzellen exprimiert wird. Vcam-1 deutet auf einen entzündlichen Prozess in der Tunica media hin, der in weiterer Folge zur Rekrutierung von Leukozyten und Makrophagen führen kann (siehe Kapitel 1.3.2 Pathophysiologie).

Insgesamt scheint es, dass die glatten Gefäßmuskelzellen der abdominale Aorta im Vergleich zur thorakalen Aorta vermehrt  $\text{Ca}^{2+}$  und Phosphat intrazellulär aufnehmen, was zur Ablagerung von Apatitverbindungen führt. Diese Kristallablagerungen fördern die Apoptose, wodurch sie gleichzeitig in Form von apoptotic bodies in die EZM freigesetzt werden. Diese sind ein Reiz für die Rekrutierung von Leukozyten und Makrophagen zur Beseitigung dieser Kristalle. Gleichzeitig stellen sie jedoch auch einen Stimulus für die Osteoblasten Differenzierung dar (siehe Kapitel 1.3.4.3.6.1 Apoptose glatter Muskelzellen).

Unsere Daten unterstreichen zudem auch die kausale Rolle hoher Phosphatkonzentrationen in der Entstehung der urämischen Mediaverkalkung. Die Regulierung des Kalzium- und

Phosphathaushalts nimmt damit eine elementare Rolle in der Prävention der arteriellen Kalzifizierung bei CKD Patienten ein. Primäres Ziel sollte eine phosphatarme Diät und eine strenge Überwachung des Kalzium- und Phosphatstoffwechsels sein. Inwieweit eine Regression einer bestehenden Mediasklerose und Mediaverkalkung möglich ist, muss in weitergehenden klinischen und experimentellen Studien untersucht werden. Die phänotypische Modulation von glatten Gefäßmuskelzellen mit der Ausbildung von osteoblastären Merkmalen wie eine vermehrte Runx 2 Expression spielt aber offensichtlich in der Entstehung der urämischen Mediaverkalkung eine ganz zentrale Rolle und sollte daher Ansatzpunkt für zukünftige therapeutische Interventionen sein.

## Literaturverzeichnis

1. Boström K, Watson KE, Horn S, Wortham C, Herman IM, Demer LL. Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest.* April 1993;91(4):1800–9.
2. Amann K. Media calcification and intima calcification are distinct entities in chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN.* November 2008;3(6):1599–605.
3. Lindner A, Charra B, Sherrard DJ, Scribner BH. Accelerated Atherosclerosis in Prolonged Maintenance Hemodialysis. *N Engl J Med.* 28. März 1974;290(13):697–701.
4. Hanada S, Ando R, Naito S, Kobayashi N, Wakabayashi M, Hata T, u. a. Assessment and significance of abdominal aortic calcification in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant.* 6. Januar 2010;25(6):1888–95.
5. Arastéh K, Baenkler H-W, Bieber C, Brandt R, Chatterjee T. *Duale Reihe Innere Medizin.* Auflage: 3., überarbeitete Auflage. Stuttgart: Thieme; 2012.
6. National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found.* Februar 2002;39(2 Suppl 1):S1–266.
7. Levey AS, de Jong PE, Coresh J, El Nahas M, Astor BC, Matsushita K, u. a. The definition, classification, and prognosis of chronic kidney disease: a KDIGO Controversies Conference report. *Kidney Int.* Juli 2011;80(1):17–28.
8. Levey AS, Eckardt K-U, Tsukamoto Y, Levin A, Coresh J, Rossert J, u. a. Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int.* Juni 2005;67(6):2089–100.
9. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease.
10. Herold G. *Innere Medizin 2013.* Köln: Herold, Gerd; 2012.

11. Hall JE. Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology. 12th edition. Philadelphia, Pa: Saunders; 2010. 1120 p.
12. Rhoades RA, Bell DR. Medical Physiology: Principles for Clinical Medicine. Lippincott Williams & Wilkins; 2012. 840 p.
13. Horn F. Biochemie des Menschen: Das Lehrbuch für das Medizinstudium. Auflage: 5., korrigierte Auflage. Stuttgart: Thieme; 2012.
14. King AJ, Levey AS. Dietary protein and renal function. J Am Soc Nephrol JASN. Mai 1993;3(11):1723–37.
15. JONES CA, MCQUILLAN GM, KUSEK J. Serum creatinine levels in the US population: Third National Health and Nutrition Examination Survey. Am J Kidney Dis. 1998;32:992–9.
16. Schmidt RF, Lang F, Heckmann M. Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie. Auflage: 31. Aufl. 2011. Heidelberg: Springer; 2010. 979 p.
17. Shemesh O, Golbetz H, Kriss JP, Myers BD. Limitations of creatinine as a filtration marker in glomerulopathic patients. Kidney Int. November 1985;28(5):830–8.
18. Levey AS, Stevens LA. Estimating GFR Using the CKD Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) Creatinine Equation: More Accurate GFR Estimates, Lower CKD Prevalence Estimates, and Better Risk Predictions. Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found. April 2010;55(4):622–7.
19. Matsushita K, Mahmoodi BK, Woodward M, Emberson JR, Jafar TH, Jee SH, u. a. Comparison of risk prediction using the CKD-EPI equation and the MDRD study equation for estimated glomerular filtration rate. JAMA J Am Med Assoc. 9. Mai 2012;307(18):1941–51.
20. Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Coresh J, Manzi J, Landis R, u. a. Development and validation of GFR-estimating equations using diabetes, transplant and weight. Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc. Februar 2010;25(2):449–57.

21. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang Y (Lucy), Castro AF, Feldman HI, u. a. A New Equation to Estimate Glomerular Filtration Rate. *Ann Intern Med.* 5. Mai 2009;150(9):604–12.
22. Gaspari F, Ruggenti P, Porrini E, Motterlini N, Cannata A, Carrara F, u. a. The GFR and GFR decline cannot be accurately estimated in type 2 diabetics. *Kidney Int.* Juli 2013;84(1):164–73.
23. Stevens LA, Levey AS. Measured GFR as a confirmatory test for estimated GFR. *J Am Soc Nephrol JASN.* November 2009;20(11):2305–13.
24. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD-MBD Work Group, KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD), *Kidney Int. Suppl.* August 2009, (113):S1-130.
25. Matsushita K, van der Velde M, Astor BC, Woodward M, Levey AS, de Jong PE, u. a. Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality: a collaborative meta-analysis of general population cohorts. *Lancet.* 12. Juni 2010;375(9731):2073–81.
26. Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with mortality and end-stage renal disease: a collaborative meta-analysis of kidney disease cohorts. *Kidney Int.* Juni 2011;79(12):1331–40.
27. Hunsicker LG, Adler S, Caggiula A, England BK, Greene T, Kusek JW, u. a. Predictors of the progression of renal disease in the Modification of Diet in Renal Disease Study. *Kidney Int.* Juni 1997;51(6):1908–19.
28. Halbesma N, Kuiken D-S, Brantsma AH, Bakker SJL, Wetzels JFM, Zeeuw DD, u. a. Macroalbuminuria Is a Better Risk Marker than Low Estimated GFR to Identify Individuals at Risk for Accelerated GFR Loss in Population Screening. *J Am Soc Nephrol.* 9. Januar 2006;17(9):2582–90.
29. Blecker S, Matsushita K, Köttgen A, Loehr LR, Bertoni AG, Boulware LE, u. a. High-normal albuminuria and risk of heart failure in the community. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found.* Juli 2011;58(1):47–55.

30. Lamb EJ, Stevens PE. Estimating and measuring glomerular filtration rate: methods of measurement and markers for estimation. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. Mai 2014;23(3):258–66.
31. Wen CP, Cheng TYD, Tsai MK, Chang YC, Chan HT, Tsai SP, u. a. All-cause mortality attributable to chronic kidney disease: a prospective cohort study based on 462 293 adults in Taiwan. *Lancet*. 28. Juni 2008;371(9631):2173–82.
32. Chadban SJ, Briganti EM, Kerr PG, Dunstan DW, Welborn TA, Zimmet PZ, u. a. Prevalence of kidney damage in Australian adults: The AusDiab kidney study. *J Am Soc Nephrol JASN*. Juli 2003;14(7 Suppl 2):S131–138.
33. Coresh J, Turin TC, Matsushita K, Sang Y, Ballew SH, Appel LJ, u. a. Decline in Estimated Glomerular Filtration Rate and Subsequent Risk of End-Stage Renal Disease and Mortality. *JAMA J Am Med Assoc*. 3. Juni 2014;
34. Hallan SI, Coresh J, Astor BC, Asberg A, Powe NR, Romundstad S, u. a. International comparison of the relationship of chronic kidney disease prevalence and ESRD risk. *J Am Soc Nephrol JASN*. August 2006;17(8):2275–84.
35. Fox CS, Larson MG, Leip EP, Culeton B, Wilson PWF, Levy D. Predictors of new-onset kidney disease in a community-based population. *JAMA J Am Med Assoc*. 18. Februar 2004;291(7):844–50.
36. Atkins RC. The epidemiology of chronic kidney disease. *Kidney Int*. April 2005;67(S94):S14–S18.
37. Turin TC, Tonelli M, Manns BJ, Ravani P, Ahmed SB, Hemmelgarn BR. Chronic kidney disease and life expectancy. *Nephrol Dial Transplant*. 8. Januar 2012;27(8):3182–6.
38. Keith DS, Nichols GA, Gullion CM, Brown JB, Smith DH. Longitudinal follow-up and outcomes among a population with chronic kidney disease in a large managed care organization. *Arch Intern Med*. 22. März 2004;164(6):659–63.

39. Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found.* November 1998;32(5 Suppl 3):S112–119.
40. Baigent C, Burbury K, Wheeler D. Premature cardiovascular disease in chronic renal failure. *Lancet.* 8. Juli 2000;356(9224):147–52.
41. Controlling the epidemic of cardiovascular disease in chronic renal disease: What do we know? What do we need to know? Where do we go from here? Special report from the National Kidney Foundation Task Force on Cardiovascular Disease. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found.* November 1998;32(5 Suppl 3):S1–199.
42. Hostetter TH, Olson JL, Rennke HG, Venkatachalam MA, Brenner BM. Hyperfiltration in remnant nephrons: a potentially adverse response to renal ablation. *Am J Physiol.* Juli 1981;241(1):F85–93.
43. Hodgkins KS, Schnaper HW. Tubulointerstitial injury and the progression of chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol Berl Ger.* Juni 2012;27(6):901–9.
44. Rodríguez-Iturbe B, García García G. The role of tubulointerstitial inflammation in the progression of chronic renal failure. *Nephron Clin Pract.* 2010;116(2):c81–88.
45. Behrends J, Bischofberger J, Deutzmann R. *Duale Reihe: Physiologie.* Auflage: 1. Stuttgart: Thieme; 2009.
46. Lazarus J, Hampers CL, Merrill JP. Hypertension in chronic renal failure: Treatment with hemodialysis and nephrectomy. *Arch Intern Med.* 1. Juni 1974;133(6):1059–66.
47. Beretta-Piccoli C, Weidmann P, Schiffli H, Cottier C, Reubi FC. Enhanced cardiovascular pressor reactivity to norepinephrine in mild renal parenchymal disease. *Kidney Int.* September 1982;22(3):297–303.
48. Ishii M, Ikeda T, Takagi M, Sugimoto T, Atarashi K, Igari T, u. a. Elevated plasma catecholamines in hypertensives with primary glomerular diseases. *Hypertension.* 7. Januar 1983;5(4):545–51.

49. Levitan D, Massry SG, Romoff M, Campese VM. Plasma catecholamines and autonomic nervous system function in patients with early renal insufficiency and hypertension: effect of clonidine. *Nephron*. 1984;36(1):24–9.
50. Zoccali C, Mallamaci F, Parlongo S, Cutrupi S, Benedetto FA, Tripepi G, u. a. Plasma Norepinephrine Predicts Survival and Incident Cardiovascular Events in Patients With End-Stage Renal Disease. *Circulation*. 19. März 2002;105(11):1354–9.
51. Martínez-Maldonado M. Hypertension in end-stage renal disease. *Kidney Int*. Dezember 1998;54(S68):S67–S72.
52. Karagiannis A, Douma S, Vogiatzis K, Petidis K, Doumas M, Vyzantiadis A, u. a. The relationship between the sympathetic nervous system and the renin-angiotensin system in renovascular hypertension. *Acta Cardiol*. 1994;49(5):425–34.
53. Johansson M, Elam M, Rundqvist B, Eisenhofer G, Herlitz H, Lambert G, u. a. Increased Sympathetic Nerve Activity in Renovascular Hypertension. *Circulation*. 18. Mai 1999;99(19):2537–42.
54. Hausberg M, Kosch M, Harmelink P, Barenbrock M, Hohage H, Kisters K, u. a. Sympathetic Nerve Activity in End-Stage Renal Disease. *Circulation*. 10. August 2002;106(15):1974–9.
55. Kelm M, Schäfer S, Mingers S, Heydthausen M, Vogt M, Motz W, u. a. Left ventricular mass is linked to cardiac noradrenaline in normotensive and hypertensive patients. *J Hypertens*. November 1996;14(11):1357–64.
56. Esler M. The autonomic nervous system and cardiac arrhythmias. *Clin Auton Res Off J Clin Auton Res Soc*. April 1992;2(2):133–5.
57. Taddei S, Nami R, Bruno RM, Quatrini I, Nuti R. Hypertension, left ventricular hypertrophy and chronic kidney disease. *Heart Fail Rev*. November 2011;16(6):615–20.
58. Adamczak M, Zeier M, Dikow R, Ritz E. Kidney and hypertension. *Kidney Int Suppl*. Mai 2002;(80):62–7.

59. MD HGR, MD BMD. Renal Pathophysiology: The Essentials. Third edition. Baltimore, MD: LWW; 2009. 378 p.
60. Paul M, Mehr AP, Kreutz R. Physiology of Local Renin-Angiotensin Systems. *Physiol Rev.* 1. Juli 2006;86(3):747–803.
61. Lüllmann-Rauch R, Paulsen F. Taschenlehrbuch Histologie. Auflage: 4., vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart: Thieme; 2012.
62. Atlas SA. The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. *J Manag Care Pharm JMCP.* Oktober 2007;13(8 Suppl B):9–20.
63. Schmaier AH. The kallikrein-kinin and the renin-angiotensin systems have a multilayered interaction. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol.* 1. Juli 2003;285(1):R1–R13.
64. Stanton A. Therapeutic potential of renin inhibitors in the management of cardiovascular disorders. *Am J Cardiovasc Drugs Drugs Devices Interv.* 2003;3(6):389–94.
65. Carey RM, Siragy HM. Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr Rev.* Juni 2003;24(3):261–71.
66. Quan A, Baum M. Regulation of proximal tubule transport by angiotensin II. *Semin Nephrol.* September 1997;17(5):423–30.
67. Beesley AH, Hornby D, White SJ. Regulation of distal nephron K<sup>+</sup> channels (ROMK) mRNA expression by aldosterone in rat kidney. *J Physiol.* 15. Juni 1998;509(3):629–34.
68. Asher C, Wald H, Rossier BC, Garty H. Aldosterone-induced increase in the abundance of Na<sup>+</sup> channel subunits. *Am J Physiol.* August 1996;271(2 Pt 1):C605–611.

69. Suzuki J, Iwai M, Nakagami H, Wu L, Chen R, Sugaya T, u. a. Role of angiotensin II-regulated apoptosis through distinct AT1 and AT2 receptors in neointimal formation. *Circulation*. 13. August 2002;106(7):847–53.
70. Remuzzi G, Perico N, Macia M, Ruggenenti P. The role of renin-angiotensin-aldosterone system in the progression of chronic kidney disease. *Kidney Int*. Dezember 2005;68(S99):S57–S65.
71. Abbate M, Benigni A, Bertani T, Remuzzi G. Nephrotoxicity of increased glomerular protein traffic. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. Februar 1999;14(2):304–12.
72. Taal MW, Brenner BM. Renoprotective benefits of RAS inhibition: from ACEI to angiotensin II antagonists. *Kidney Int*. Mai 2000;57(5):1803–17.
73. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Suzuki Y, Rupérez M, Egido J. Proinflammatory actions of angiotensins. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. Mai 2001;10(3):321–9.
74. Del Vecchio L, Procaccio M, Viganò S, Cusi D. Mechanisms of disease: The role of aldosterone in kidney damage and clinical benefits of its blockade. *Nat Clin Pract Nephrol*. Januar 2007;3(1):42–9.
75. Remuzzi G, Perico N, Macia M, Ruggenenti P. The role of renin-angiotensin-aldosterone system in the progression of chronic kidney disease. *Kidney Int*. Dezember 2005;68(S99):S57–S65.
76. Patni H, Mathew JT, Luan L, Franki N, Chander PN, Singhal PC. Aldosterone promotes proximal tubular cell apoptosis: role of oxidative stress. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 1. Oktober 2007;293(4):F1065–F1071.
77. Eddy AA. Plasminogen activator inhibitor-1 and the kidney. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 1. August 2002;283(2):F209–F220.
78. Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC. *Biochemie und Pathobiochemie*. Auflage: 8., völlig neu bearb. Aufl. 2007. Heidelberg: Springer; 2006. 1266 p.

79. Jameson JL, Loscalzo J. Harrison's Nephrology and Acid-Base Disorders. Auflage: 0002. New York: Mcgraw Hill Medical; 2013. 326 p.
80. Peacock M. Calcium Metabolism in Health and Disease. Clin J Am Soc Nephrol. 1. Januar 2010;5(Supplement 1):S23–S30.
81. Bootman MD, Collins TJ, Peppiatt CM, Prothero LS, MacKenzie L, De Smet P, u. a. Calcium signalling--an overview. Semin Cell Dev Biol. Februar 2001;12(1):3–10.
82. Kirsch A. Phosphor in der Entstehung der urämischen Mediasklerose. Journal für Mineralstoffwechsel 2014, 21(1): 5-9
83. Kilav R, Silver J, Naveh-Many T. Parathyroid hormone gene expression in hypophosphatemic rats. J Clin Invest. Juli 1995;96(1):327–33.
84. Nielsen PK, Feldt-Rasmussen U, Olgaard K. A direct effect in vitro of phosphate on PTH release from bovine parathyroid tissue slices but not from dispersed parathyroid cells. Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc. September 1996;11(9):1762–8.
85. Almaden Y, Canalejo A, Hernandez A, Ballesteros E, Garcia-Navarro S, Torres A, u. a. Direct effect of phosphorus on PTH secretion from whole rat parathyroid glands in vitro. J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res. Juli 1996;11(7):970–6.
86. Silver J, Naveh-Many T. FGF-23 and secondary hyperparathyroidism in chronic kidney disease. Nat Rev Nephrol. November 2013;9(11):641–9.
87. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. Am J Physiol - Ren Physiol. 1. Juli 2005;289(1):F8–F28.
88. Hewison M, Zehnder D, Chakraverty R, Adams JS. Vitamin D and barrier function: a novel role for extra-renal 1 alpha-hydroxylase. Mol Cell Endocrinol. 27. Februar 2004;215(1-2):31–8.
89. Wu S, Finch J, Zhong M, Slatopolsky E, Grieff M, Brown AJ. Expression of the renal 25-hydroxyvitamin D-24-hydroxylase gene: regulation by dietary phosphate. Am J Physiol - Ren Physiol. 1. Juli 1996;271(1):F203–F208.

90. Tanaka Y, Deluca HF. The control of 25-hydroxyvitamin D metabolism by inorganic phosphorus. *Arch Biochem Biophys*. Februar 1973;154(2):566–74.
91. Itoh N, Ornitz DM. Fibroblast growth factors: from molecular evolution to roles in development, metabolism and disease. *J Biochem (Tokyo)*. Februar 2011;149(2):121–30.
92. Fon Tacer K, Bookout AL, Ding X, Kurosu H, John GB, Wang L, u. a. Research resource: Comprehensive expression atlas of the fibroblast growth factor system in adult mouse. *Mol Endocrinol Baltim Md*. Oktober 2010;24(10):2050–64.
93. Mohammadi M, Olsen SK, Ibrahimi OA. Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation. *Cytokine Growth Factor Rev*. April 2005;16(2):107–37.
94. Fukumoto S, Yamashita T. FGF23 is a hormone-regulating phosphate metabolism—Unique biological characteristics of FGF23. *Bone*. 1. Mai 2007;40(5):1190–5.
95. Wolf M. Forging forward with 10 burning questions on FGF23 in kidney disease. *J Am Soc Nephrol JASN*. September 2010;21(9):1427–35.
96. Pereira RC, Juppner H, Azucena-Serrano CE, Yadin O, Salusky IB, Wesseling-Perry K. Patterns of FGF-23, DMP1, and MEPE expression in patients with chronic kidney disease. *Bone*. Dezember 2009;45(6):1161–8.
97. Jean G, Terrat J-C, Vanel T, Hurot J-M, Lorriaux C, Mayor B, u. a. High levels of serum fibroblast growth factor (FGF)-23 are associated with increased mortality in long haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 9. Januar 2009;24(9):2792–6.
98. Fliser D, Kollerits B, Neyer U, Ankerst DP, Lhotta K, Lingenhel A, u. a. Fibroblast Growth Factor 23 (FGF23) Predicts Progression of Chronic Kidney Disease: The Mild to Moderate Kidney Disease (MMKD) Study. *J Am Soc Nephrol*. 9. Januar 2007;18(9):2600–8.
99. Isakova T, Wahl P, Vargas GS, Gutiérrez OM, Scialla J, Xie H, u. a. Fibroblast growth factor 23 is elevated before parathyroid hormone and phosphate in chronic kidney disease. *Kidney Int*. Juni 2011;79(12):1370–8.

100. Gutiérrez OM, Januzzi JL, Isakova T, Laliberte K, Smith K, Collerone G, u. a. Fibroblast Growth Factor 23 and Left Ventricular Hypertrophy in Chronic Kidney Disease. *Circulation*. 19. Mai 2009;119(19):2545–52.
101. Gutiérrez OM, Mannstadt M, Isakova T, Rauh-Hain JA, Tamez H, Shah A, u. a. Fibroblast growth factor 23 and mortality among patients undergoing hemodialysis. *N Engl J Med*. 7. August 2008;359(6):584–92.
102. Liu S, Zhou J, Tang W, Jiang X, Rowe DW, Quarles LD. Pathogenic role of Fgf23 in Hyp mice. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 1. Juli 2006;291(1):E38–E49.
103. Rodriguez-Ortiz ME, Lopez I, Muñoz-Castañeda JR, Martinez-Moreno JM, Ramírez AP, Pineda C, u. a. Calcium Deficiency Reduces Circulating Levels of FGF23. *J Am Soc Nephrol*. 7. Januar 2012;23(7):1190–7.
104. Liu S, Tang W, Zhou J, Stubbs JR, Luo Q, Pi M, u. a. Fibroblast growth factor 23 is a counter-regulatory phosphaturic hormone for vitamin D. *J Am Soc Nephrol JASN*. Mai 2006;17(5):1305–15.
105. Lavi-Moshayoff V, Wasserman G, Meir T, Silver J, Naveh-Many T. PTH increases FGF23 gene expression and mediates the high-FGF23 levels of experimental kidney failure: a bone parathyroid feedback loop. *Am J Physiol Renal Physiol*. Oktober 2010;299(4):F882–889.
106. Ito N, Fukumoto S, Takeuchi Y, Takeda S, Suzuki H, Yamashita T, u. a. Effect of acute changes of serum phosphate on fibroblast growth factor (FGF)23 levels in humans. *J Bone Miner Metab*. 2007;25(6):419–22.
107. Perwad F, Azam N, Zhang MYH, Yamashita T, Tenenhouse HS, Portale AA. Dietary and serum phosphorus regulate fibroblast growth factor 23 expression and 1,25-dihydroxyvitamin D metabolism in mice. *Endocrinology*. Dezember 2005;146(12):5358–64.
108. Burnett S-AM, Gunawardene SC, Bringhurst FR, Jüppner H, Lee H, Finkelstein JS. Regulation of C-terminal and intact FGF-23 by dietary phosphate in men and women. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. August 2006;21(8):1187–96.

109. Silver J, Naveh-Many T. FGF-23 and secondary hyperparathyroidism in chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol*. November 2013;9(11):641–9.
110. Wesseling-Perry K, Harkins GC, Wang H, Elashoff R, Gales B, Horwitz MJ, u. a. The Calcemic Response to Continuous Parathyroid Hormone (PTH)(1-34) Infusion in End-Stage Kidney Disease Varies According to Bone Turnover: A Potential Role for PTH(7-84). *J Clin Endocrinol Metab*. Juni 2010;95(6):2772–80.
111. Rhee Y, Bivi N, Farrow E, Lezcano V, Plotkin LI, White KE, u. a. Parathyroid hormone receptor signaling in osteocytes increases the expression of fibroblast growth factor-23 in vitro and in vivo. *Bone*. Oktober 2011;49(4):636–43.
112. Lavi-Moshayoff V, Wasserman G, Meir T, Silver J, Naveh-Many T. PTH increases FGF23 gene expression and mediates the high-FGF23 levels of experimental kidney failure: a bone parathyroid feedback loop. *Am J Physiol Renal Physiol*. Oktober 2010;299(4):F882–889.
113. Lavi-Moshayoff V, Wasserman G, Meir T, Silver J, Naveh-Many T. PTH increases FGF23 gene expression and mediates the high-FGF23 levels of experimental kidney failure: a bone parathyroid feedback loop. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 1. Oktober 2010;299(4):F882–F889.
114. Rodriguez-Ortiz ME, Lopez I, Muñoz-Castañeda JR, Martinez-Moreno JM, Ramírez AP, Pineda C, u. a. Calcium Deficiency Reduces Circulating Levels of FGF23. *J Am Soc Nephrol*. 7. Januar 2012;23(7):1190–7.
115. Bai X, Miao D, Li J, Goltzman D, Karaplis AC. Transgenic mice overexpressing human fibroblast growth factor 23 (R176Q) delineate a putative role for parathyroid hormone in renal phosphate wasting disorders. *Endocrinology*. November 2004;145(11):5269–79.
116. Shimada T, Hasegawa H, Yamazaki Y, Muto T, Hino R, Takeuchi Y, u. a. FGF-23 Is a Potent Regulator of Vitamin D Metabolism and Phosphate Homeostasis. *J Bone Miner Res*. 1. März 2004;19(3):429–35.
117. Saito H, Kusano K, Kinosaki M, Ito H, Hirata M, Segawa H, u. a. Human fibroblast growth factor-23 mutants suppress Na<sup>+</sup>-dependent phosphate co-transport activity

- and 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> production. *J Biol Chem.* 24. Januar 2003;278(4):2206–11.
118. Murer H, Hernando N, Forster I, Biber J. Regulation of Na/Pi transporter in the proximal tubule. *Annu Rev Physiol.* 2003;65:531–42.
119. Schiavi SC, Kumar R. The phosphatonin pathway: New insights in phosphate homeostasis. *Kidney Int.* Januar 2004;65(1):1–14.
120. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol.* Juli 2005;289(1):F8–28.
121. Liu S, Tang W, Zhou J, Stubbs JR, Luo Q, Pi M, u. a. Fibroblast growth factor 23 is a counter-regulatory phosphaturic hormone for vitamin D. *J Am Soc Nephrol JASN.* Mai 2006;17(5):1305–15.
122. Ben-Dov IZ, Galitzer H, Lavi-Moshayoff V, Goetz R, Kuro-o M, Mohammadi M, u. a. The parathyroid is a target organ for FGF23 in rats. *J Clin Invest.* Dezember 2007;117(12):4003–8.
123. Canalejo R, Canalejo A, Martinez-Moreno JM, Rodriguez-Ortiz ME, Estepa JC, Mendoza FJ, u. a. FGF23 fails to inhibit uremic parathyroid glands. *J Am Soc Nephrol JASN.* Juli 2010;21(7):1125–35.
124. Goetz R, Ohnishi M, Kir S, Kurosu H, Wang L, Pastor J, u. a. Conversion of a Paracrine Fibroblast Growth Factor into an Endocrine Fibroblast Growth Factor. *J Biol Chem.* 17. August 2012;287(34):29134–46.
125. Hu MC, Shiizaki K, Kuro-o M, Moe OW. Fibroblast growth factor 23 and Klotho: physiology and pathophysiology of an endocrine network of mineral metabolism. *Annu Rev Physiol.* 2013;75:503–33.
126. Goetz R, Beenken A, Ibrahim OA, Kalinina J, Olsen SK, Eliseenkova AV, u. a. Molecular insights into the klotho-dependent, endocrine mode of action of fibroblast growth factor 19 subfamily members. *Mol Cell Biol.* Mai 2007;27(9):3417–28.

127. Itoh N, Ornitz DM. Fibroblast growth factors: from molecular evolution to roles in development, metabolism and disease. *J Biochem (Tokyo)*. Februar 2011;149(2):121–30.
128. Kurosu H, Ogawa Y, Miyoshi M, Yamamoto M, Nandi A, Rosenblatt KP, u. a. Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by klotho. *J Biol Chem*. 10. März 2006;281(10):6120–3.
129. Wang H, Yoshiko Y, Yamamoto R, Minamizaki T, Kozai K, Tanne K, u. a. Overexpression of Fibroblast Growth Factor 23 Suppresses Osteoblast Differentiation and Matrix Mineralization In Vitro. *J Bone Miner Res*. 1. Juni 2008;23(6):939–48.
130. Nakatani T, Sarraj B, Ohnishi M, Densmore MJ, Taguchi T, Goetz R, u. a. In vivo genetic evidence for klotho-dependent, fibroblast growth factor 23 (Fgf23) -mediated regulation of systemic phosphate homeostasis. *FASEB J*. 2. Januar 2009;23(2):433–41.
131. Fon Tacer K, Bookout AL, Ding X, Kurosu H, John GB, Wang L, u. a. Research resource: Comprehensive expression atlas of the fibroblast growth factor system in adult mouse. *Mol Endocrinol Baltim Md*. Oktober 2010;24(10):2050–64.
132. Kuro-o M. Endocrine FGFs and Klothos: emerging concepts. *Trends Endocrinol Metab TEM*. September 2008;19(7):239–45.
133. Nabeshima Y. [Regulation of calcium homeostasis by  $\alpha$ -Klotho and FGF23]. *Clin Calcium*. November 2010;20(11):1677–85.
134. Li S-A, Watanabe M, Yamada H, Nagai A, Kinuta M, Takei K. Immunohistochemical localization of Klotho protein in brain, kidney, and reproductive organs of mice. *Cell Struct Funct*. Dezember 2004;29(4):91–9.
135. Hu MC, Shi M, Zhang J, Pastor J, Nakatani T, Lanske B, u. a. Klotho: a novel phosphaturic substance acting as an autocrine enzyme in the renal proximal tubule. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. September 2010;24(9):3438–50.

136. Farrow EG, Davis SI, Summers LJ, White KE. Initial FGF23-mediated signaling occurs in the distal convoluted tubule. *J Am Soc Nephrol JASN*. Mai 2009;20(5):955–60.
137. Torres P-U, Prié D, Molina-Blétry V, Beck L, Silve C, Friedlander G. Klotho: An antiaging protein involved in mineral and vitamin D metabolism. *Kidney Int*. 28. Februar 2007;71(8):730–7.
138. Chang Q, Hoefs S, van der Kemp AW, Topala CN, Bindels RJ, Hoenderop JG. The beta-glucuronidase klotho hydrolyzes and activates the TRPV5 channel. *Science*. 21. Oktober 2005;310(5747):490–3.
139. Cha S-K, Ortega B, Kurosu H, Rosenblatt KP, Kuro-O M, Huang C-L. Removal of sialic acid involving Klotho causes cell-surface retention of TRPV5 channel via binding to galectin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 15. Juli 2008;105(28):9805–10.
140. Hu MC, Shi M, Zhang J, Pastor J, Nakatani T, Lanske B, u. a. Klotho: a novel phosphaturic substance acting as an autocrine enzyme in the renal proximal tubule. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. September 2010;24(9):3438–50.
141. Doi S, Zou Y, Togao O, Pastor JV, John GB, Wang L, u. a. Klotho inhibits transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) signaling and suppresses renal fibrosis and cancer metastasis in mice. *J Biol Chem*. 11. März 2011;286(10):8655–65.
142. Yoshida T, Fujimori T, Nabeshima Y-I. Mediation of unusually high concentrations of 1,25-dihydroxyvitamin D in homozygous klotho mutant mice by increased expression of renal 1alpha-hydroxylase gene. *Endocrinology*. Februar 2002;143(2):683–9.
143. Razzaque MS, Lanske B. Hypervitaminosis D and premature aging: lessons learned from Fgf23 and Klotho mutant mice. *Trends Mol Med*. Juli 2006;12(7):298–305.
144. Tsujikawa H, Kurotaki Y, Fujimori T, Fukuda K, Nabeshima Y-I. Klotho, a gene related to a syndrome resembling human premature aging, functions in a negative regulatory circuit of vitamin D endocrine system. *Mol Endocrinol Baltim Md*. Dezember 2003;17(12):2393–403.

145. Stehman-Breen C. Osteoporosis and chronic kidney disease. *Semin Nephrol.* Januar 2004;24(1):78–81.
146. Alem AM, Sherrard DJ, Gillen DL, Weiss NS, Beresford SA, Heckbert SR, u. a. Increased risk of hip fracture among patients with end-stage renal disease. *Kidney Int.* Juli 2000;58(1):396–9.
147. Moe S, Drüeke T, Cunningham J, Goodman W, Martin K, Olgaard K, u. a. Definition, evaluation, and classification of renal osteodystrophy: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int.* Juni 2006;69(11):1945–53.
148. Gal-Moscovici A, Sprague SM. Bone Health in Chronic Kidney Disease–Mineral and Bone Disease. *Adv Chronic Kidney Dis.* Januar 2007;14(1):27–36.
149. Raggi P, Kleerekoper M. Contribution of bone and mineral abnormalities to cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN.* Mai 2008;3(3):836–43.
150. Miyamoto K, Segawa H, Ito M, Kuwahata M. Physiological regulation of renal sodium-dependent phosphate cotransporters. *Jpn J Physiol.* April 2004;54(2):93–102.
151. Takahashi F, Morita K, Katai K, Segawa H, Fujioka A, Kouda T, u. a. Effects of dietary Pi on the renal Na<sup>+</sup>-dependent Pi transporter NaPi-2 in thyroparathyroidectomized rats. *Biochem J.* 1. Juli 1998;333 ( Pt 1):175–81.
152. Silver J, Levi R. Regulation of PTH synthesis and secretion relevant to the management of secondary hyperparathyroidism in chronic kidney disease. *Kidney Int.* Juni 2005;67(S95):S8–S12.
153. Koh N, Fujimori T, Nishiguchi S, Tamori A, Shiomi S, Nakatani T, u. a. Severely reduced production of klotho in human chronic renal failure kidney. *Biochem Biophys Res Commun.* 2. Februar 2001;280(4):1015–20.
154. Kuro-o M. Klotho in chronic kidney disease--what's new? *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* Juni 2009;24(6):1705–8.

155. Galitzer H, Ben-Dov IZ, Silver J, Naveh-Many T. Parathyroid cell resistance to fibroblast growth factor 23 in secondary hyperparathyroidism of chronic kidney disease. *Kidney Int.* 16. Dezember 2009;77(3):211–8.
156. Levin A, Bakris GL, Molitch M, Smulders M, Tian J, Williams LA, u. a. Prevalence of abnormal serum vitamin D, PTH, calcium, and phosphorus in patients with chronic kidney disease: results of the study to evaluate early kidney disease. *Kidney Int.* Januar 2007;71(1):31–8.
157. Hasegawa H, Nagano N, Urakawa I, Yamazaki Y, Iijima K, Fujita T, u. a. Direct evidence for a causative role of FGF23 in the abnormal renal phosphate handling and vitamin D metabolism in rats with early-stage chronic kidney disease. *Kidney Int.* November 2010;78(10):975–80.
158. Meir T, Levi R, Lieben L, Libutti S, Carmeliet G, Bouillon R, u. a. Deletion of the vitamin D receptor specifically in the parathyroid demonstrates a limited role for the receptor in parathyroid physiology. *Am J Physiol Renal Physiol.* November 2009;297(5):F1192–1198.
159. Hruska KA, Mathew S, Lund R, Qiu P, Pratt R. Hyperphosphatemia of chronic kidney disease. *Kidney Int.* 30. April 2008;74(2):148–57.
160. Kraut JA, Madias NE. Metabolic acidosis: pathophysiology, diagnosis and management. *Nat Rev Nephrol.* Mai 2010;6(5):274–85.
161. Winter SD, Pearson J, Gabow PA, Schultz AL, Lepoff RB. The fall of the serum anion gap. *Arch Intern Med.* 1. Februar 1990;150(2):311–3.
162. Kraut JA, Kurtz I. Metabolic Acidosis of CKD: Diagnosis, Clinical Characteristics, and Treatment. *Am J Kidney Dis.* 1. Juni 2005;45(6):978–93.
163. Mitch WE. Metabolic and clinical consequences of metabolic acidosis. *J Nephrol.* April 2006;19 Suppl 9:S70–75.
164. Kopple JD, Kalantar-Zadeh K, Mehrotra R. Risks of chronic metabolic acidosis in patients with chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl.* Juni 2005;(95):S21–27.

165. Bleich HL, Moore MJ, Lemann J, Adams ND, Gray RW. Urinary calcium excretion in human beings. *N Engl J Med*. 6. September 1979;301(10):535–41.
166. Lemann J, Litzow JR, Lennon EJ. Studies of the mechanism by which chronic metabolic acidosis augments urinary calcium excretion in man. *J Clin Invest*. August 1967;46(8):1318–28.
167. Bushinsky DA. Net calcium efflux from live bone during chronic metabolic, but not respiratory, acidosis. *Am J Physiol*. Mai 1989;256(5 Pt 2):F836–842.
168. Litzow JR, Lemann J, Lennon EJ. The effect of treatment of acidosis on calcium balance in patients with chronic azotemic renal disease. *J Clin Invest*. Februar 1967;46(2):280–6.
169. Kraut JA, Mishler DR, Singer FR, Goodman WG. The effects of metabolic acidosis on bone formation and bone resorption in the rat. *Kidney Int*. November 1986;30(5):694–700.
170. Lemann J, Litzow JR, Lennon EJ. The effects of chronic acid loads in normal man: further evidence for the participation of bone mineral in the defense against chronic metabolic acidosis. *J Clin Invest*. Oktober 1966;45(10):1608–14.
171. Cochran M, Wilkinson R. Effect of correction of metabolic acidosis on bone mineralisation rates in patients with renal osteomalacia. *Nephron*. 1975;15(2):98–110.
172. Bushinsky DA. Net calcium efflux from live bone during chronic metabolic, but not respiratory, acidosis. *Am J Physiol*. Mai 1989;256(5 Pt 2):F836–842.
173. Bushinsky DA. Acidosis and bone. *Miner Electrolyte Metab*. 1994;20(1-2):40–52.
174. Krieger NS, Bushinsky DA, Frick KK. Cellular mechanisms of bone resorption induced by metabolic acidosis. *Semin Dial*. Dezember 2003;16(6):463–6.
175. Krieger NS, Parker WR, Alexander KM, Bushinsky DA. Prostaglandins regulate acid-induced cell-mediated bone resorption. *Am J Physiol Renal Physiol*. Dezember 2000;279(6):F1077–1082.

176. Raisz LG. Physiologic and pathologic roles of prostaglandins and other eicosanoids in bone metabolism. *J Nutr.* Juli 1995;125(7 Suppl):2024S–2027S.
177. Raisz LG. Bone cell biology: new approaches and unanswered questions. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* Dezember 1993;8 Suppl 2:S457–465.
178. Dietrich JW, Goodson JM, Raisz LG. Stimulation of bone resorption by various prostaglandins in organ culture. *Prostaglandins.* 1975;10(4):231–40.
179. Kawaguchi H, Pilbeam CC, Harrison JR, Raisz LG. The Role of Prostaglandins in the Regulation of Bone Metabolism. *Clin Orthop Relat Res.* April 1995; (313):36-46.
180. Krieger NS, Bushinsky DA, Frick KK. RENAL RESEARCH INSTITUTE SYMPOSIUM: Cellular Mechanisms of Bone Resorption Induced by Metabolic Acidosis. *Semin Dial.* 1. November 2003;16(6):463–6.
181. Batlle D, Itsarayoungyuen K, Hays S, Arruda JA, Kurtzman NA. Parathyroid hormone is not anticalciuric during chronic metabolic acidosis. *Kidney Int.* September 1982;22(3):264–71.
182. Graham KA, Hoenich NA, Tarbit M, Ward MK, Goodship TH. Correction of acidosis in hemodialysis patients increases the sensitivity of the parathyroid glands to calcium. *J Am Soc Nephrol JASN.* April 1997;8(4):627–31.
183. Coe FL, Firpo JJ, Hollandsworth DL, Segil L, Canterbury JM, Reiss E. Effect of acute and chronic metabolic acidosis on serum immunoreactive parathyroid hormone in man. *Kidney Int.* Oktober 1975;8(4):263–73.
184. Bichara M, Mercier O, Borensztein P, Paillard M. Acute metabolic acidosis enhances circulating parathyroid hormone, which contributes to the renal response against acidosis in the rat. *J Clin Invest.* August 1990;86(2):430–43.
185. Bushinsky DA, Nilsson EL. Additive effects of acidosis and parathyroid hormone on mouse osteoblastic and osteoclastic function. *Am J Physiol.* Dezember 1995;269(6 Pt 1):C1364–1370.

186. Bushinsky DA, Frick KK. The effects of acid on bone. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* Juli 2000;9(4):369–79.
187. Beck N, Webster SK. Effects of acute metabolic acidosis on parathyroid hormone action and calcium mobilization. *Am J Physiol.* Januar 1976;230(1):127–31.
188. Disthabanchong S, Martin KJ, McConkey CL, Gonzalez EA. Metabolic acidosis up-regulates PTH/PTHrP receptors in UMR 106-01 osteoblast-like cells. *Kidney Int.* Oktober 2002;62(4):1171–7.
189. Bellorin-Font E, Humpierres J, Weisinger JR, Milanés CL, Sylva V, Paz-Martínez V. Effect of metabolic acidosis on the PTH receptor-adenylate cyclase system of canine kidney. *Am J Physiol.* Oktober 1985;249(4 Pt 2):F566–572.
190. Kraut JA. The role of metabolic acidosis in the pathogenesis of renal osteodystrophy. *Adv Ren Replace Ther.* Januar 1995;2(1):40–51.
191. Mehrotra R, Kopple JD, Wolfson M. Metabolic acidosis in maintenance dialysis patients: Clinical considerations. *Kidney Int.* Dezember 2003;64(S88):S13–S26.
192. Cunningham J, Bikle DD, Avioli LV. Acute, but not chronic, metabolic acidosis disturbs 25-hydroxyvitamin D3 metabolism. *Kidney Int.* Januar 1984;25(1):47–52.
193. Gafter U, Kraut JA, Lee DB, Silis V, Walling MW, Kurokawa K, u. a. Effect of metabolic acidosis in intestinal absorption of calcium and phosphorus. *Am J Physiol.* Dezember 1980;239(6):G480–484.
194. Langman CB. Calcitriol metabolism during chronic metabolic acidosis. *Semin Nephrol.* März 1989;9(1):65–71.
195. Krapf R, Vetsch R, Vetsch W, Hulter HN. Chronic metabolic acidosis increases the serum concentration of 1,25-dihydroxyvitamin D in humans by stimulating its production rate. Critical role of acidosis-induced renal hypophosphatemia. *J Clin Invest.* Dezember 1992;90(6):2456–63.

196. Chu P, Lu KC, Lin YF. Acute correction of metabolic acidosis increases serum procollagen type I carboxyterminal propeptide in patients with chronic renal failure. *J Formos Med Assoc Taiwan Yi Zhi*. November 2001;100(11):748–52.
197. Lin YF, Shieh SD, Diang LK, Lin SH, Chyr SH, Li BL, u. a. Influence of rapid correction of metabolic acidosis on serum osteocalcin level in chronic renal failure. *ASAIO J Am Soc Artif Intern Organs* 1992. September 1994;40(3):M440–444.
198. Movilli E, Zani R, Carli O, Sangalli L, Pola A, Camerini C, u. a. Direct effect of the correction of acidosis on plasma parathyroid hormone concentrations, calcium and phosphate in hemodialysis patients: a prospective study. *Nephron*. März 2001;87(3):257–62.
199. Lu KC, Shieh SD, Li BL, Chu P, Jan SY, Lin YF. Rapid correction of metabolic acidosis in chronic renal failure: effect on parathyroid hormone activity. *Nephron*. 1994;67(4):419–24.
200. Williams AJ, Dittmer ID, McArley A, Clarke J. High bicarbonate dialysate in haemodialysis patients: effects on acidosis and nutritional status. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. Dezember 1997;12(12):2633–7.
201. Shah SN, Abramowitz M, Hostetter TH, Melamed ML. Serum bicarbonate levels and the progression of kidney disease: a cohort study. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found*. August 2009;54(2):270–7.
202. Lee Y-J, Cho S, Kim SR. Association between serum bicarbonate levels and albuminuria in stage 3 and stage 4 chronic kidney disease: a cross-sectional study. *Clin Nephrol*. 2. April 2014;
203. Bushinsky DA. Net calcium efflux from live bone during chronic metabolic, but not respiratory, acidosis. *Am J Physiol*. Mai 1989;256(5 Pt 2):F836–842.
204. Chabala JM, Levi-Setti R, Bushinsky DA. Alteration in surface ion composition of cultured bone during metabolic, but not respiratory, acidosis. *Am J Physiol*. Juli 1991;261(1 Pt 2):F76–84.

205. Bushinsky DA, Sessler NE, Krieger NS. Greater unidirectional calcium efflux from bone during metabolic, compared with respiratory, acidosis. *Am J Physiol.* März 1992;262(3 Pt 2):F425–431.
206. Bushinsky DA, Lam BC, Nespeca R, Sessler NE, Grynopas MD. Decreased bone carbonate content in response to metabolic, but not respiratory, acidosis. *Am J Physiol.* Oktober 1993;265(4 Pt 2):F530–536.
207. Bushinsky DA. Stimulated osteoclastic and suppressed osteoblastic activity in metabolic but not respiratory acidosis. *Am J Physiol.* Januar 1995;268(1 Pt 1):C80–88.
208. Vanholder R, Glorieux G, De Smet R, Lameire N. New insights in uremic toxins. *Kidney Int.* Mai 2003;63(S84):S6–S10.
209. Vanholder R, Smet RD. Pathophysiologic Effects of Uremic Retention Solutes. *J Am Soc Nephrol.* 8. Januar 1999;10(8):1815–23.
210. Vanholder R, Van Laecke S, Glorieux G. What is new in uremic toxicity? *Pediatr Nephrol Berl Ger.* August 2008;23(8):1211–21.
211. Vanholder R, De Smet R, Glorieux G, Argilés A, Baurmeister U, Brunet P, u. a. Review on uremic toxins: classification, concentration, and interindividual variability. *Kidney Int.* Mai 2003;63(5):1934–43.
212. Kaysen GA. The Microinflammatory State in Uremia: Causes and Potential Consequences. *J Am Soc Nephrol.* 7. Januar 2001;12(7):1549–57.
213. Betjes MGH. Immune cell dysfunction and inflammation in end-stage renal disease. *Nat Rev Nephrol.* Mai 2013;9(5):255–65.
214. Abed M, Artunc F, Alzoubi K, Honisch S, Baumann D, Föller M, u. a. Suicidal erythrocyte death in end-stage renal disease. *J Mol Med Berl Ger.* 18. April 2014;
215. Ahmed MSE, Langer H, Abed M, Voelkl J, Lang F. The uremic toxin acrolein promotes suicidal erythrocyte death. *Kidney Blood Press Res.* 2013;37(2-3):158–67.
216. Pencak P, Czerwieńska B, Ficek R, Wyskida K, Kujawa-Szewieczek A, Olszanecka-Glinianowicz M, u. a. Calcification of coronary arteries and abdominal aorta in

- relation to traditional and novel risk factors of atherosclerosis in hemodialysis patients. *BMC Nephrol.* 2013;14:10.
217. *Kidney International* - Abstract of article: High-resolution B-mode ultrasonography in evaluation of atherosclerosis in uremia. *Kidney Int.* September 1995;48(3):820–6.
218. Iwasaki Y, Yamato H, Nii-Kono T, Fujieda A, Uchida M, Hosokawa A, u. a. Uremic toxin and bone metabolism. *J Bone Miner Metab.* 2006;24(2):172–5.
219. Davies SJ, Russell L, Bryan J, Phillips L, Russell GI. Comorbidity, urea kinetics, and appetite in continuous ambulatory peritoneal dialysis patients: their interrelationship and prediction of survival. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found.* August 1995;26(2):353–61.
220. Ginsberg N, Fishbane S, Lynn RI. The effect of improved dialytic efficiency on measures of appetite in peritoneal dialysis patients. *J Ren Nutr.* Oktober 1996;6(4):217–21.
221. Zeck J, Schallheim J, Lew SQ, DePalma L. Whole blood platelet aggregation and release reaction testing in uremic patients. *BioMed Res Int.* 2013;2013:486290.
222. Weigert AL, Schafer AI. Uremic bleeding: pathogenesis and therapy. *Am J Med Sci.* August 1998;316(2):94–104.
223. Biesen WV, Bacquer DD, Verbeke F, Delanghe J, Lameire N, Vanholder R. The glomerular filtration rate in an apparently healthy population and its relation with cardiovascular mortality during 10 years. *Eur Heart J.* 2. Januar 2007;28(4):478–83.
224. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A review. *J Biochem Mol Toxicol.* 1. Januar 2003;17(1):24–38.
225. Pech V, Sikka SC, Sindhu RK, Vaziri ND, Majid DSA. Oxidant stress and blood pressure responses to angiotensin II administration in rats fed varying salt diets. *Am J Hypertens.* Mai 2006;19(5):534–40.

226. Manning RD, Tian N, Meng S. Oxidative stress and antioxidant treatment in hypertension and the associated renal damage. *Am J Nephrol.* August 2005;25(4):311–7.
227. Vaziri ND. Oxidative stress in uremia: nature, mechanisms, and potential consequences. *Semin Nephrol.* September 2004;24(5):469–73.
228. Himmelfarb J, Stenvinkel P, Ikizler TA, Hakim RM. The elephant in uremia: oxidant stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia. *Kidney Int.* November 2002;62(5):1524–38.
229. Simmons EM, Langone A, Sezer MT, Vella JP, Recupero P, Morrow JD, u. a. Effect of renal transplantation on biomarkers of inflammation and oxidative stress in end-stage renal disease patients. *Transplantation.* 27. April 2005;79(8):914–9.
230. Agarwal R. Proinflammatory effects of oxidative stress in chronic kidney disease: role of additional angiotensin II blockade. *Am J Physiol Renal Physiol.* April 2003;284(4):F863–869.
231. Vaziri ND, Rodríguez-Iturbe B. Mechanisms of disease: oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of hypertension. *Nat Clin Pract Nephrol.* Oktober 2006;2(10):582–93.
232. Lim CS, Vaziri ND. Iron and oxidative stress in renal insufficiency. *Am J Nephrol.* Dezember 2004;24(6):569–75.
233. Agarwal R, Vasavada N, Sachs NG, Chase S. Oxidative stress and renal injury with intravenous iron in patients with chronic kidney disease. *Kidney Int.* Juni 2004;65(6):2279–89.
234. Vaziri ND, Dicus M, Ho ND, Boroujerdi-Rad L, Sindhu RK. Oxidative stress and dysregulation of superoxide dismutase and NADPH oxidase in renal insufficiency. *Kidney Int.* Januar 2003;63(1):179–85.
235. Karamouzis I, Sarafidis PA, Karamouzis M, Iliadis S, Haidich A-B, Sioulis A, u. a. Increase in Oxidative Stress but Not in Antioxidant Capacity with Advancing Stages of Chronic Kidney Disease. *Am J Nephrol.* 2008;28(3):397–404.

236. Morena M, Delbosc S, Dupuy A-M, Canaud B, Cristol J-P. Overproduction of reactive oxygen species in end-stage renal disease patients: a potential component of hemodialysis-associated inflammation. *Hemodial Int Int Symp Home Hemodial.* Januar 2005;9(1):37–46.
237. Köken T, Serteser M, Kahraman A, Gökçe C, Demir S. Changes in serum markers of oxidative stress with varying periods of haemodialysis. *Nephrol Carlton Vic.* April 2004;9(2):77–82.
238. Spittle MA, Hoenich NA, Handelman GJ, Adhikarla R, Homel P, Levin NW. Oxidative stress and inflammation in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found.* Dezember 2001;38(6):1408–13.
239. Himmelfarb J, McMonagle E. Manifestations of oxidant stress in uremia. *Blood Purif.* 2001;19(2):200–5.
240. Hörl WH, Cohen JJ, Harrington JT, Madias NE, Zusman CJ. Atherosclerosis and uremic retention solutes. *Kidney Int.* Oktober 2004;66(4):1719–31.
241. Vaziri ND. Roles of oxidative stress and antioxidant therapy in chronic kidney disease and hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* Januar 2004;13(1):93–9.
242. Himmelfarb J, Stenvinkel P, Ikizler TA, Hakim RM. The elephant in uremia: Oxidant stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia. *Kidney Int.* November 2002;62(5):1524–38.
243. Himmelfarb J, Stenvinkel P, Ikizler TA, Hakim RM. The elephant in uremia: Oxidant stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia. *Kidney Int.* November 2002;62(5):1524–38.
244. Astor BC, Muntner P, Levin A, Eustace JA, Coresh J. Association of kidney function with anemia: The third national health and nutrition examination survey (1988-1994). *Arch Intern Med.* 24. Juni 2002;162(12):1401–8.
245. Thomas MC, Tsalamandris C, MacIsaac RJ, Jerums G. The epidemiology of hemoglobin levels in patients with type 2 diabetes. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found.* Oktober 2006;48(4):537–45.

246. Jelkmann W. Biology of erythropoietin. *Clin Investig.* 1994;72(6 Suppl):S3–10.
247. Erslev AJ, Besarab A. Erythropoietin in the pathogenesis and treatment of the anemia of chronic renal failure. *Kidney Int.* März 1997;51(3):622–30.
248. Fishbane S, Pollack S, Feldman HI, Joffe MM. Iron indices in chronic kidney disease in the National Health and Nutritional Examination Survey 1988-2004. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN.* Januar 2009;4(1):57–61.
249. Howard RL, Buddington B, Alfrey AC. Urinary albumin, transferrin and iron excretion in diabetic patients. *Kidney Int.* November 1991;40(5):923–6.
250. Langsdorf LJ, Zydney AL. Effect of uremia on the membrane transport characteristics of red blood cells. *Blood.* 1. Februar 1993;81(3):820–7.
251. Forman S, Bischel M, Hochstein P. Erythrocyte deformability in uremic hemodialyzed patients. *Ann Intern Med.* Dezember 1973;79(6):841–3.
252. Ly J, Marticorena R, Donnelly S. Red blood cell survival in chronic renal failure. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found.* Oktober 2004;44(4):715–9.
253. Massry SG. Pathogenesis of the anemia of uremia: role of secondary hyperparathyroidism. *Kidney Int Suppl.* Dezember 1983;16:S204–207.
254. Marathias KP, Agroyannis B, Mavromoustakos T, Matsoukas J, Vlahakos DV. Hematocrit-lowering effect following inactivation of renin-angiotensin system with angiotensin converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers. *Curr Top Med Chem.* 2004;4(4):483–6.
255. Ersoy A, Kahvecioglu S, Ersoy C, Cift A, Dilek K. Anemia due to losartan in hypertensive renal transplant recipients without posttransplant erythrocytosis. *Transplant Proc.* Juni 2005;37(5):2148–50.
256. Moreno F, Sanz-Guajardo D, López-Gómez JM, Jofre R, Valderrábano F. Increasing the hematocrit has a beneficial effect on quality of life and is safe in selected hemodialysis patients. Spanish Cooperative Renal Patients Quality of Life Study

- Group of the Spanish Society of Nephrology. *J Am Soc Nephrol JASN*. Februar 2000;11(2):335–42.
257. Marsh JT, Brown WS, Wolcott D, Carr CR, Harper R, Schweitzer SV, u. a. rHuEPO treatment improves brain and cognitive function of anemic dialysis patients. *Kidney Int*. Januar 1991;39(1):155–63.
258. Robertson HT, Haley NR, Guthrie M, Cardenas D, Eschbach JW, Adamson JW. Recombinant erythropoietin improves exercise capacity in anemic hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found*. April 1990;15(4):325–32.
259. Collins AJ, Li S, Gilbertson DT, Liu J, Chen S-C, Herzog CA. Chronic kidney disease and cardiovascular disease in the Medicare population. *Kidney Int Suppl*. November 2003;(87):S24–31.
260. Elhendy A, Modesto KM, Mahoney DW, Khandheria BK, Seward JB, Pellikka PA. Prediction of mortality in patients with left ventricular hypertrophy by clinical, exercise stress, and echocardiographic data. *J Am Coll Cardiol*. 1. Januar 2003;41(1):129–35.
261. Al-Ahmad A, Rand WM, Manjunath G, Konstam MA, Salem DN, Levey AS, u. a. Reduced kidney function and anemia as risk factors for mortality in patients with left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol*. Oktober 2001;38(4):955–62.
262. Drüeke TB, Locatelli F, Clyne N, Eckardt K-U, Macdougall IC, Tsakiris D, u. a. Normalization of Hemoglobin Level in Patients with Chronic Kidney Disease and Anemia. *N Engl J Med*. 2006;355(20):2071–84.
263. Roger SD, McMahon LP, Clarkson A, Disney A, Harris D, Hawley C, u. a. Effects of early and late intervention with epoetin alpha on left ventricular mass among patients with chronic kidney disease (stage 3 or 4): results of a randomized clinical trial. *J Am Soc Nephrol JASN*. Januar 2004;15(1):148–56.
264. Levin A, Djurdjev O, Thompson C, Barrett B, Ethier J, Carlisle E, u. a. Canadian randomized trial of hemoglobin maintenance to prevent or delay left ventricular mass growth in patients with CKD. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found*. November 2005;46(5):799–811.

265. Iwano M, Neilson EG. Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. Mai 2004;13(3):279–84.
266. Garcia DL, Anderson S, Rennke HG, Brenner BM. Anemia lessens and its prevention with recombinant human erythropoietin worsens glomerular injury and hypertension in rats with reduced renal mass. *Proc Natl Acad Sci U S A*. August 1988;85(16):6142–6.
267. Drenckhahn D, Benninghoff A. Benninghoff, Drenckhahn, Anatomie mit StudentConsult-Zugang: Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. Band 1: Zelle, Gewebe, ... Verdauungssystem, Harn- und Genitalsystem. Auflage: 17. München u.a.: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH; 2008. 968 p.
268. Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular Regulation of Vascular Smooth Muscle Cell Differentiation in Development and Disease. *Physiol Rev*. 1. Juli 2004;84(3):767–801.
269. Owens GK. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev*. 1. Juli 1995;75(3):487–517.
270. Majesky MW. Developmental Basis of Vascular Smooth Muscle Diversity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 6. Januar 2007;27(6):1248–58.
271. Le Lièvre CS, Le Douarin NM. Mesenchymal derivatives of the neural crest: analysis of chimaeric quail and chick embryos. *J Embryol Exp Morphol*. August 1975;34(1):125–54.
272. Moore K, Persaud TVN, Viebahn C. Embryologie: Entwicklungsstadien - Frühentwicklung - Organogenese - Klinik. Auflage: 5. München u.a.: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH; 2007.
273. Bogers AJ, Gittenberger-de Groot AC, Poelmann RE, Péault BM, Huysmans HA. Development of the origin of the coronary arteries, a matter of ingrowth or outgrowth? *Anat Embryol (Berl)*. 1989;180(5):437–41.
274. Tomanek RJ. Formation of the coronary vasculature during development. *Angiogenesis*. 1. Dezember 2005;8(3):273–84.

275. Conte G, Pellegrini A. On the development of the coronary arteries in human embryos, stages 14–19. *Anat Embryol (Berl)*. 1. Mai 1984;169(2):209–18.
276. Christ B, Huang R, Scaal M. Formation and differentiation of the avian sclerotome. *Anat Embryol (Berl)*. August 2004;208(5):333–50.
277. De Angelis L, Berghella L, Coletta M, Lattanzi L, Zanchi M, Cusella-De Angelis MG, u. a. Skeletal myogenic progenitors originating from embryonic dorsal aorta coexpress endothelial and myogenic markers and contribute to postnatal muscle growth and regeneration. *J Cell Biol*. 15. November 1999;147(4):869–78.
278. Minasi MG, Riminucci M, De Angelis L, Borello U, Berarducci B, Innocenzi A, u. a. The meso-angioblast: a multipotent, self-renewing cell that originates from the dorsal aorta and differentiates into most mesodermal tissues. *Dev Camb Engl*. Juni 2002;129(11):2773–83.
279. Cossu G, Bianco P. Mesoangioblasts--vascular progenitors for extravascular mesodermal tissues. *Curr Opin Genet Dev*. Oktober 2003;13(5):537–42.
280. Wilm B, Ipenberg A, Hastie ND, Burch JBE, Bader DM. The serosal mesothelium is a major source of smooth muscle cells of the gut vasculature. *Dev Camb Engl*. Dezember 2005;132(23):5317–28.
281. Gomez D, Owens GK. Smooth muscle cell phenotypic switching in atherosclerosis. *Cardiovasc Res*. 15. Juli 2012;95(2):156–64.
282. Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular Regulation of Vascular Smooth Muscle Cell Differentiation in Development and Disease. *Physiol Rev*. 1. Juli 2004;84(3):767–801.
283. Topouzis S, Majesky MW. Smooth Muscle Lineage Diversity in the Chick Embryo: Two Types of Aortic Smooth Muscle Cell Differ in Growth and Receptor-Mediated Transcriptional Responses to Transforming Growth Factor- $\beta$ . *Dev Biol*. 15. September 1996;178(2):430–45.

284. Bostrom K, Watson KE, Horn S, Wortham C, Herman IM, Demer LL. Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest.* April 1993;91(4):1800–9.
285. Falk E. Pathogenesis of Atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 18. April 2006;47(8s1):C7–C12.
286. Shanahan CM, Cary NR, Metcalfe JC, Weissberg PL. High expression of genes for calcification-regulating proteins in human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest.* Juni 1994;93(6):2393–402.
287. Moe SM, O’Neill KD, Duan D, Ahmed S, Chen NX, Leapman SB, u. a. Medial artery calcification in ESRD patients is associated with deposition of bone matrix proteins. *Kidney Int.* Februar 2002;61(2):638–47.
288. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature.* 19. Dezember 2002;420(6917):868–74.
289. Mallika V, Goswami B, Rajappa M. Atherosclerosis Pathophysiology and the Role of Novel Risk Factors: A Clinicobiochemical Perspective. *Angiology.* 10. Januar 2007;58(5):513–22.
290. Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in Atherosclerosis: Pathogenic and Regulatory Pathways. *Physiol Rev.* 1. April 2006;86(2):515–81.
291. Tjøtta E. The distribution of atheromatosis in the coronary arteries. *J Atheroscler Res.* 8. Juli 1963;3(4):253–61.
292. Lopez AD, Murray CCJL. The global burden of disease, 1990–2020. *Nat Med.* November 1998;4(11):1241–3.
293. Bonow RO, Smaha LA, Smith SC, Mensah GA, Lenfant C. World Heart Day 2002 The International Burden of Cardiovascular Disease: Responding to the Emerging Global Epidemic. *Circulation.* 24. September 2002;106(13):1602–5.
294. Kannel WB. Overview of atherosclerosis. *Clin Ther.* 1. Januar 1998;20:B2–B17.

295. Faxon DP, Fuster V, Libby P, Beckman JA, Hiatt WR, Thompson RW, u. a. Atherosclerotic Vascular Disease Conference Writing Group III: Pathophysiology. *Circulation*. 6. Januar 2004;109(21):2617–25.
296. Kannel WB. Fifty years of Framingham Study contributions to understanding hypertension. *J Hum Hypertens*. Februar 2000;14(2):83–90.
297. Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in Atherosclerosis: Pathogenic and Regulatory Pathways. *Physiol Rev*. 1. April 2006;86(2):515–81.
298. Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis. the road ahead. *Cell*. 23. Februar 2001;104(4):503–16.
299. Schwarz U, Buzello M, Ritz E, Stein G, Raabe G, Wiest G, u. a. Morphology of coronary atherosclerotic lesions in patients with end-stage renal failure. *Nephrol Dial Transplant*. 2. Januar 2000;15(2):218–23.
300. Böcker W, Denk H, Heitz PU, Moch H, Höfler G, Kreipe H. *Pathologie: mit Zugang zum Elsevier-Portal*. Auflage: 5. München: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH; 2012. 1092 p.
301. Hansson GK, Robertson A-KL, Söderberg-Nauclér C. Inflammation and atherosclerosis. *Annu Rev Pathol*. 2006;1:297–329.
302. Crowther MA. Pathogenesis of Atherosclerosis. *ASH Educ Program Book*. 1. Januar 2005;2005(1):436–41.
303. Cybulsky MI, Gimbrone MA. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science*. 15. Februar 1991;251(4995):788–91.
304. Dansky HM, Barlow CB, Lominska C, Sikes JL, Kao C, Weinsaft J, u. a. Adhesion of Monocytes to Arterial Endothelium and Initiation of Atherosclerosis Are Critically Dependent on Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Gene Dosage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 10. Januar 2001;21(10):1662–7.

305. Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, Zhu S, Chen M, Iiyama M, u. a. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest.* 15. Mai 2001;107(10):1255–62.
306. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med.* 21. April 2005;352(16):1685–95.
307. Schwartz SM, Virmani R, Rosenfeld ME. The good smooth muscle cells in atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep.* September 2000;2(5):422–9.
308. Shroff R, Long DA, Shanahan C. Mechanistic insights into vascular calcification in CKD. *J Am Soc Nephrol JASN.* Februar 2013;24(2):179–89.
309. Lanzer P, Boehm M, Sorribas V, Thiriet M, Janzen J, Zeller T, u. a. Medial vascular calcification revisited: review and perspectives. *Eur Heart J.* 14. Juni 2014;35(23):1515–25.
310. Lachman AS, Spray TL, Kerwin DM, Shugoll GI, Roberts WC. Medial calcinosis of Mönckeberg. A review of the problem and a description of a patient with involvement of peripheral, visceral and coronary arteries. *Am J Med.* Oktober 1977;63(4):615–22.
311. Guerin AP, Blacher J, Pannier B, Marchais SJ, Safar ME, London GM. Impact of Aortic Stiffness Attenuation on Survival of Patients in End-Stage Renal Failure. *Circulation.* 20. Februar 2001;103(7):987–92.
312. Kröger K. [Epidemiology of peripheral arterial disease in Germany. What is evident, what remains unclear?]. *Hämostaseologie.* August 2006;26(3):193–6.
313. Lehto S, Niskanen L, Suhonen M, Rönnemaa T, Laakso M. Medial artery calcification. A neglected harbinger of cardiovascular complications in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* August 1996;16(8):978–83.
314. Shroff RC, McNair R, Figg N, Skepper JN, Schurgers L, Gupta A, u. a. Dialysis Accelerates Medial Vascular Calcification in Part by Triggering Smooth Muscle Cell Apoptosis. *Circulation.* 21. Oktober 2008;118(17):1748–57.

315. Janzen J, Vuong PN. Arterial calcifications: morphological aspects and their pathological implications. *Z Für Kardiologie*. 1. April 2001;90(3):III6–III11.
316. Aikawa E, Aikawa M, Libby P, Figueiredo J-L, Rusanescu G, Iwamoto Y, u. a. Arterial and aortic valve calcification abolished by elastolytic cathepsin S deficiency in chronic renal disease. *Circulation*. 7. April 2009;119(13):1785–94.
317. Kestenbaum B, Sampson JN, Rudser KD, Patterson DJ, Seliger SL, Young B, u. a. Serum phosphate levels and mortality risk among people with chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol JASN*. Februar 2005;16(2):520–8.
318. Goodman WG, Goldin J, Kuizon BD, Yoon C, Gales B, Sider D, u. a. Coronary-Artery Calcification in Young Adults with End-Stage Renal Disease Who Are Undergoing Dialysis. *N Engl J Med*. 2000;342(20):1478–83.
319. Kendrick J, Chonchol M. The Role of Phosphorus in the Development and Progression of Vascular Calcification. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found*. November 2011;58(5):826–34.
320. Giachelli CM. The emerging role of phosphate in vascular calcification. *Kidney Int*. Mai 2009;75(9):890–7.
321. Foley RN, Collins AJ, Herzog CA, Ishani A, Kalra PA. Serum phosphorus levels associate with coronary atherosclerosis in young adults. *J Am Soc Nephrol JASN*. Februar 2009;20(2):397–404.
322. Neves KR, Graciolli FG, Dos Reis LM, Pasqualucci CA, Moysés RMA, Jorgetti V. Adverse effects of hyperphosphatemia on myocardial hypertrophy, renal function, and bone in rats with renal failure. *Kidney Int*. Dezember 2004;66(6):2237–44.
323. Neves KR, Graciolli FG, dos Reis LM, Graciolli RG, Neves CL, Magalhães AO, u. a. Vascular calcification: contribution of parathyroid hormone in renal failure. *Kidney Int*. Juni 2007;71(12):1262–70.
324. Jono S, Nishizawa Y, Shioi A, Morii H. Parathyroid hormone-related peptide as a local regulator of vascular calcification. Its inhibitory action on in vitro calcification

- by bovine vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Juni 1997;17(6):1135–42.
325. Davies MR, Hruska KA. Pathophysiological mechanisms of vascular calcification in end-stage renal disease. *Kidney Int.* August 2001;60(2):472–9.
326. Zittermann A, Schleithoff SS, Koerfer R. Vitamin D and vascular calcification: *Curr Opin Lipidol.* Februar 2007;18(1):41–6.
327. Watson KE, Abrolat ML, Malone LL, Hoeg JM, Doherty T, Detrano R, u. a. Active Serum Vitamin D Levels Are Inversely Correlated With Coronary Calcification. *Circulation.* 16. September 1997;96(6):1755–60.
328. Desjardins L, Liabeuf S, Renard C, Lenglet A, Lemke H-D, Choukroun G, u. a. FGF23 is independently associated with vascular calcification but not bone mineral density in patients at various CKD stages. *Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA.* Juli 2012;23(7):2017–25.
329. Nasrallah MM, El-Shehaby AR, Salem MM, Osman NA, Sheikh EE, Din UASE. Fibroblast growth factor-23 (FGF-23) is independently correlated to aortic calcification in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 8. Januar 2010;25(8):2679–85.
330. Scialla JJ, Lau WL, Reilly MP, Isakova T, Yang H-Y, Crouthamel MH, u. a. Fibroblast growth factor 23 is not associated with and does not induce arterial calcification. *Kidney Int.* Juni 2013;83(6):1159–68.
331. Lindberg K, Olauson H, Amin R, Ponnusamy A, Goetz R, Taylor RF, u. a. Arterial Klotho Expression and FGF23 Effects on Vascular Calcification and Function. *PLoS One.* 2013;8(4)
332. Saito Y, Nakamura T, Ohyama Y, Suzuki T, Iida A, Shiraki-Iida T, u. a. In vivo klotho gene delivery protects against endothelial dysfunction in multiple risk factor syndrome. *Biochem Biophys Res Commun.* 24. September 2000;276(2):767–72.

333. Rakugi H, Matsukawa N, Ishikawa K, Yang J, Imai M, Ikushima M, u. a. Anti-oxidative effect of Klotho on endothelial cells through cAMP activation. *Endocrine*. Februar 2007;31(1):82–7.
334. Hu MC, Shi M, Zhang J, Quinones H, Griffith C, Kuro-o M, u. a. Klotho Deficiency Causes Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol JASN*. Januar 2011;22(1):124–36.
335. Lomashvili K, Garg P, O'Neill WC. Chemical and hormonal determinants of vascular calcification in vitro. *Kidney Int*. April 2006;69(8):1464–70.
336. Shroff RC, McNair R, Skepper JN, Figg N, Schurgers LJ, Deanfield J, u. a. Chronic mineral dysregulation promotes vascular smooth muscle cell adaptation and extracellular matrix calcification. *J Am Soc Nephrol JASN*. Januar 2010;21(1):103–12.
337. Sammels E, Parys JB, Missiaen L, De Smedt H, Bultynck G. Intracellular Ca<sup>2+</sup> storage in health and disease: a dynamic equilibrium. *Cell Calcium*. April 2010;47(4):297–314.
338. House SJ, Potier M, Bisailon J, Singer HA, Trebak M. The non-excitabile smooth muscle: calcium signaling and phenotypic switching during vascular disease. *Pflüg Arch Eur J Physiol*. August 2008;456(5):769–85.
339. Shanahan CM, Crouthamel MH, Kapustin A, Giachelli CM. Arterial calcification in chronic kidney disease: key roles for calcium and phosphate. *Circ Res*. 2. September 2011;109(6):697–711.
340. Molostvov G, James S, Fletcher S, Bennett J, Lehnert H, Bland R, u. a. Extracellular calcium-sensing receptor is functionally expressed in human artery. *Am J Physiol Renal Physiol*. September 2007;293(3):F946–955.
341. Alam M, Kirton JP, Wilkinson FL, Towers E, Sinha S, Rouhi M, u. a. Calcification is associated with loss of functional calcium-sensing receptor in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res*. 2. Januar 2009;81(2):260–8.

342. Motro M, Shemesh J. Calcium channel blocker nifedipine slows down progression of coronary calcification in hypertensive patients compared with diuretics. *Hypertension*. Juni 2001;37(6):1410–3.
343. Fleckenstein-Grün G, Thimm F, Czirfuzs A, Matyas S, Frey M. Experimental vasoprotection by calcium antagonists against calcium-mediated arteriosclerotic alterations. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1994;24 Suppl 2:S75–84.
344. Schindler R. Causes and therapy of microinflammation in renal failure. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. August 2004;19 Suppl 5:V34–40.
345. Mendoza FJ, Lopez I, Montes de Oca A, Perez J, Rodriguez M, Aguilera-Tejero E. Metabolic acidosis inhibits soft tissue calcification in uremic rats. *Kidney Int*. 7. November 2007;73(4):407–14.
346. Lomashvili K, Garg P, O'Neill WC. Chemical and hormonal determinants of vascular calcification in vitro. *Kidney Int*. April 2006;69(8):1464–70.
347. Jara A, Chacón C, Ibaceta M, Valdivieso A, Felsenfeld AJ. Effect of ammonium chloride and dietary phosphorus in the azotaemic rat. Part II—kidney hypertrophy and calcium deposition. *Nephrol Dial Transplant*. 8. Januar 2004;19(8):1993–8.
348. Larsen MJ, Jensen SJ. The hydroxyapatite solubility product of human dental enamel as a function of pH in the range 4.6-7.6 at 20 degrees C. *Arch Oral Biol*. 1989;34(12):957–61.
349. Lomashvili K, Garg P, O'Neill WC. Chemical and hormonal determinants of vascular calcification in vitro. *Kidney Int*. 8. März 2006;69(8):1464–70.
350. Chen NX, O'Neill KD, Duan D, Moe SM. Phosphorus and uremic serum up-regulate osteopontin expression in vascular smooth muscle cells. *Kidney Int*. November 2002;62(5):1724–31.
351. Moe SM, Duan D, Doehle BP, O'Neill KD, Chen NX. Uremia induces the osteoblast differentiation factor Cbfa1 in human blood vessels. *Kidney Int*. März 2003;63(3):1003–11.

352. Chen NX, O'Neill KD, Duan D, Moe SM. Phosphorus and uremic serum up-regulate osteopontin expression in vascular smooth muscle cells. *Kidney Int.* November 2002;62(5):1724–31.
353. Chen NX, Duan D, O'Neill KD, Wolisi GO, Koczman JJ, LaClair R, u. a. The mechanisms of uremic serum-induced expression of bone matrix proteins in bovine vascular smooth muscle cells. *Kidney Int.* 12. Juli 2006;70(6):1046–53.
354. Speer MY, Li X, Hiremath PG, Giachelli CM. Runx2/Cbfa1, but not loss of myocardin, is required for smooth muscle cell lineage reprogramming toward osteochondrogenesis. *J Cell Biochem.* 1. Juli 2010;110(4):935–47.
355. Chen NX, O'Neill KD, Duan D, Moe SM. Phosphorus and uremic serum up-regulate osteopontin expression in vascular smooth muscle cells. *Kidney Int.* November 2002;62(5):1724–31.
356. Zebboudj AF, Shin V, Boström K. Matrix GLA protein and BMP-2 regulate osteoinduction in calcifying vascular cells. *J Cell Biochem.* 1. November 2003;90(4):756–65.
357. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell.* 30. Mai 1997;89(5):747–54.
358. Byon CH, Javed A, Dai Q, Kappes JC, Clemens TL, Darley-Usmar VM, u. a. Oxidative Stress Induces Vascular Calcification through Modulation of the Osteogenic Transcription Factor Runx2 by AKT Signaling. *J Biol Chem.* 30. Mai 2008;283(22):15319–27.
359. Blaschke F, Bruemmer D, Yin F, Takata Y, Wang W, Fishbein MC, u. a. C-Reactive Protein Induces Apoptosis in Human Coronary Vascular Smooth Muscle Cells. *Circulation.* 8. März 2004;110(5):579–87.
360. Calabró P, Willerson JT, Yeh ETH. Inflammatory Cytokines Stimulated C-Reactive Protein Production by Human Coronary Artery Smooth Muscle Cells. *Circulation.* 21. Oktober 2003;108(16):1930–2.

361. M S, R M, K M, O'n K, D D, K J, u. a. Role of calcification inhibitors in the pathogenesis of vascular calcification in chronic kidney disease (CKD). *Kidney Int.* Juni 2005;67(6):2295–304.
362. Triffitt JT, Gebauer U, Ashton BA, Owen ME, Reynolds JJ. Origin of plasma alpha2HS-glycoprotein and its accumulation in bone. *Nature.* 15. Juli 1976;262(5565):226–7.
363. Jahnen-Dechent W, Schäfer C, Heiss A, Grötzinger J. Systemic inhibition of spontaneous calcification by the serum protein alpha 2-HS glycoprotein/fetuin. *Z Für Kardiologie.* 2001;90 Suppl 3:47–56.
364. Moe S, Reslerova M, Ketteler M, O'neill K, Duan D, Koczman J, u. a. Role of calcification inhibitors in the pathogenesis of vascular calcification in chronic kidney disease (CKD). *Kidney Int.* Juni 2005;67(6):2295–304.
365. Wang AY-M, Woo J, Lam CW-K, Wang M, Chan IH-S, Gao P, u. a. Associations of serum fetuin-A with malnutrition, inflammation, atherosclerosis and valvular calcification syndrome and outcome in peritoneal dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 8. Januar 2005;20(8):1676–85.
366. Stenvinkel P, Wang K, Qureshi AR, Axelsson J, Pecoits-Filho R, Gao P, u. a. Low fetuin-A levels are associated with cardiovascular death: Impact of variations in the gene encoding fetuin. *Kidney Int.* Juni 2005;67(6):2383–92.
367. Ketteler M, Bongartz P, Westenfeld R, Wildberger JE, Mahnken AH, Böhm R, u. a. Association of low fetuin-A (AHSG) concentrations in serum with cardiovascular mortality in patients on dialysis: a cross-sectional study. *Lancet.* 8. März 2003;361(9360):827–33.
368. Sweatt A, Sane DC, Hutson SM, Wallin R. Matrix Gla protein (MGP) and bone morphogenetic protein-2 in aortic calcified lesions of aging rats. *J Thromb Haemost JTH.* Januar 2003;1(1):178–85.
369. Nitta K, Akiba T, Uchida K, Otsubo S, Takei T, Yumura W, u. a. Serum osteoprotegerin levels and the extent of vascular calcification in haemodialysis

- patients. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* Juli 2004;19(7):1886–9.
370. Boyer CJ, Baines AD, Beaulieu E, Béliveau R. Immunodetection of a type III sodium-dependent phosphate cotransporter in tissues and OK cells. *Biochim Biophys Acta.* 5. Januar 1998;1368(1):73–83.
371. Kavanaugh MP, Miller DG, Zhang W, Law W, Kozak SL, Kabat D, u. a. Cell-surface receptors for gibbon ape leukemia virus and amphotropic murine retrovirus are inducible sodium-dependent phosphate symporters. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 19. Juli 1994;91(15):7071–5.
372. Miyamoto K, Tatsumi S, Segawa H, Morita K, Nii T, Fujioka A, u. a. Regulation of PiT-1, a sodium-dependent phosphate co-transporter in rat parathyroid glands. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* 1999;14 Suppl 1:73–5.
373. Tatsumi S, Segawa H, Morita K, Haga H, Kouda T, Yamamoto H, u. a. Molecular cloning and hormonal regulation of PiT-1, a sodium-dependent phosphate cotransporter from rat parathyroid glands. *Endocrinology.* April 1998;139(4):1692–9.
374. Chen NX, O'Neill KD, Duan D, Moe SM. Phosphorus and uremic serum up-regulate osteopontin expression in vascular smooth muscle cells. *Kidney Int.* November 2002;62(5):1724–31.
375. Jono S, McKee MD, Murry CE, Shioi A, Nishizawa Y, Mori K, u. a. Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res.* 29. September 2000;87(7):E10–17.
376. Li X, Yang H-Y, Giachelli CM. Role of the sodium-dependent phosphate cotransporter, Pit-1, in vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res.* 14. April 2006;98(7):905–12.
377. Bellows CG, Aubin JE, Heersche JN. Initiation and progression of mineralization of bone nodules formed in vitro: the role of alkaline phosphatase and organic phosphate. *Bone Miner.* Juli 1991;14(1):27–40.

378. Steitz SA, Speer MY, Curinga G, Yang H-Y, Haynes P, Aebersold R, u. a. Smooth Muscle Cell Phenotypic Transition Associated With Calcification Upregulation of Cbfa1 and Downregulation of Smooth Muscle Lineage Markers. *Circ Res.* 12. Juli 2001;89(12):1147–54.
379. Shioi A, Nishizawa Y, Jono S, Koyama H, Hosoi M, Morii H. Beta-glycerophosphate accelerates calcification in cultured bovine vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* November 1995;15(11):2003–9.
380. Speer MY, Li X, Hiremath PG, Giachelli CM. Runx2/Cbfa1, but not loss of myocardin, is required for smooth muscle cell lineage reprogramming toward osteochondrogenesis. *J Cell Biochem.* 1. Juli 2010;110(4):935–47.
381. Jono S, McKee MD, Murry CE, Shioi A, Nishizawa Y, Mori K, u. a. Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res.* 29. September 2000;87(7):E10–17.
382. Montes de Oca A, Madueño JA, Martinez-Moreno JM, Guerrero F, Muñoz-Castañeda J, Rodriguez-Ortiz ME, u. a. High-phosphate-induced calcification is related to SM22 $\alpha$  promoter methylation in vascular smooth muscle cells. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* September 2010;25(9):1996–2005.
383. Shroff RC, McNair R, Figg N, Skepper JN, Schurgers L, Gupta A, u. a. Dialysis accelerates medial vascular calcification in part by triggering smooth muscle cell apoptosis. *Circulation.* 21. Oktober 2008;118(17):1748–57.
384. Ahmed S, O’Neill KD, Hood AF, Evan AP, Moe SM. Calciphylaxis is associated with hyperphosphatemia and increased osteopontin expression by vascular smooth muscle cells. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found.* Juni 2001;37(6):1267–76.
385. Yang H, Curinga G, Giachelli CM. Elevated extracellular calcium levels induce smooth muscle cell matrix mineralization in vitro. *Kidney Int.* Dezember 2004;66(6):2293–9.
386. Schlieper G, Aretz A, Verberckmoes SC, Kruger T, Behets GJ, Ghadimi R, u. a. Ultrastructural Analysis of Vascular Calcifications in Uremia. *J Am Soc Nephrol JASN.* April 2010;21(4):689–96.

387. Shroff RC, McNair R, Figg N, Skepper JN, Schurgers L, Gupta A, u. a. Dialysis accelerates medial vascular calcification in part by triggering smooth muscle cell apoptosis. *Circulation*. 21. Oktober 2008;118(17):1748–57.
388. Sage AP, Lu J, Tintut Y, Demer LL. Hyperphosphatemia-induced nanocrystals upregulate the expression of bone morphogenetic protein-2 and osteopontin genes in mouse smooth muscle cells in vitro. *Kidney Int*. Februar 2011;79(4):414–22.
389. Olszak IT, Poznansky MC, Evans RH, Olson D, Kos C, Pollak MR, u. a. Extracellular calcium elicits a chemokinetic response from monocytes in vitro and in vivo. *J Clin Invest*. Mai 2000;105(9):1299–305.
390. Wada T, McKee MD, Steitz S, Giachelli CM. Calcification of vascular smooth muscle cell cultures: inhibition by osteopontin. *Circ Res*. 5. Februar 1999;84(2):166–78.
391. Kapustin AN, Davies JD, Reynolds JL, McNair R, Jones GT, Sidibe A, u. a. Calcium regulates key components of vascular smooth muscle cell-derived matrix vesicles to enhance mineralization. *Circ Res*. 24. Juni 2011;109(1):e1–12.
392. Reynolds JL, Skepper JN, McNair R, Kasama T, Gupta K, Weissberg PL, u. a. Multifunctional Roles for Serum Protein Fetuin-A in Inhibition of Human Vascular Smooth Muscle Cell Calcification. *J Am Soc Nephrol*. 10. Januar 2005;16(10):2920–30.
393. Shroff RC, McNair R, Skepper JN, Figg N, Schurgers LJ, Deanfield J, u. a. Chronic mineral dysregulation promotes vascular smooth muscle cell adaptation and extracellular matrix calcification. *J Am Soc Nephrol JASN*. Januar 2010;21(1):103–12.
394. Sage AP, Lu J, Tintut Y, Demer LL. Hyperphosphatemia-induced nanocrystals upregulate the expression of bone morphogenetic protein-2 and osteopontin genes in mouse smooth muscle cells in vitro. *Kidney Int*. Februar 2011;79(4):414–22.
395. Bas A, Lopez I, Perez J, Rodriguez M, Aguilera-Tejero E. Reversibility of calcitriol-induced medial artery calcification in rats with intact renal function. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. März 2006;21(3):484–90.

396. Dhore CR, Cleutjens JPM, Lutgens E, Cleutjens KBJM, Geusens PPM, Kitslaar PJEHM, u. a. Differential Expression of Bone Matrix Regulatory Proteins in Human Atherosclerotic Plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 12. Januar 2001;21(12):1998–2003.
397. Mosheimer BA, Kaneider NC, Feistritz C, Sturn DH, Wiedermann CJ. Expression and function of RANK in human monocyte chemotaxis. *Arthritis Rheum.* Juli 2004;50(7):2309–16.
398. Mozar A, Haren N, Chasseraud M, Louvet L, Mazière C, Wattel A, u. a. High extracellular inorganic phosphate concentration inhibits RANK-RANKL signaling in osteoclast-like cells. *J Cell Physiol.* April 2008;215(1):47–54.
399. Kanatani M, Sugimoto T, Kano J, Kanzawa M, Chihara K. Effect of high phosphate concentration on osteoclast differentiation as well as bone-resorbing activity. *J Cell Physiol.* Juli 2003;196(1):180–9.
400. Rutsch F, Nitschke Y, Terkeltaub R. Genetics in Arterial Calcification: Pieces of a Puzzle and Cogs in a Wheel. *Circ Res.* 19. August 2011;109(5):578–92.
401. Meng H, Vera I, Che N, Wang X, Wang SS, Ingram-Drake L, u. a. Identification of *Abcc6* as the major causal gene for dystrophic cardiac calcification in mice through integrative genomics. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 13. März 2007;104(11):4530–5.
402. Kirsch AH, Smaczny N, Riegelbauer V, Sedej S, Hofmeister A, Stojakovic T, u. a. Regulatory T Cells Improve Nephrocalcinosis but Not Dystrophic Cardiac Calcinosis in DBA/2 Mice. *Am J Pathol.* August 2013;183(2):382–90.
403. Gregory CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal Biochem.* 1. Juni 2004;329(1):77–84.
404. Haimovici H, Maier N. Experimental canine atherosclerosis in autogenous abdominal aortic grafts implanted into the jugular vein. *Atherosclerosis.* Mai 1971;13(3):375–84.

405. Haimovici H, Maier N. Fate of aortic homografts in canine atherosclerosis. 3 study of fresh abdominal and thoracic aortic implants into thoracic aorta: Role of tissue susceptibility in atherogenesis. *Arch Surg Chic Ill* 1960. Dezember 1964;89:961–9.
406. Tomasini R, Seux M, Nowak J, Bontemps C, Carrier A, Dagorn J-C, u. a. TP53INP1 is a novel p73 target gene that induces cell cycle arrest and cell death by modulating p73 transcriptional activity. *Oncogene*. 25. Juli 2005;24(55):8093–104.
407. Rajah R, Valentinis B, Cohen P. Insulin-like Growth Factor (IGF)-binding Protein-3 Induces Apoptosis and Mediates the Effects of Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 on Programmed Cell Death through a p53- and IGF-independent Mechanism. *J Biol Chem*. 5. Februar 1997;272(18):12181–8.