



Aus der Klinik für Innere Medizin II der Universität Rostock
Sektion für Nephrologie
Professor Dr. med. S. Mitzner

**In-vitro Versuche zur Entfernbarekeit von Furansäure, Indoxylsulfat
und Pentosidin im Plasma von chronischen Hämodialysepatienten
mittels Albumindialyse**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von
Nina Zeh
aus Berlin

Rostock 2009

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Steffen Mitzner, Direktor der Abteilung Nephrologie, Klinik für Innere Medizin, Universität Rostock
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Bernd Drewelow, Direktor des Institutes für Klinische Pharmakologie, Universität Rostock
3. Gutachter: Prof. Dr. med. Hans-H. Neumayer, Direktor der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Nephrologie, Charité Berlin

Datum der Einreichung: 26.10.2009

Datum der Verteidigung: 09.02.2011

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	9
1.1	<i>Urämisches Syndrom und Urämietoxine</i>	9
1.2	<i>Albumingebundene Urämietoxine.....</i>	10
1.3	<i>Albumindialyse.....</i>	21
1.4	<i>Ziel der Arbeit.....</i>	23
2	Patienten, Material und Methoden	25
2.1	<i>Patientenplasma und Plasmapool</i>	25
2.2	<i>Versuchsmaterialien</i>	25
2.3	<i>Versuchsaufbau.....</i>	26
2.4	<i>Versuchsreihen und -anzahl.....</i>	30
2.5	<i>Versuchsablauf und Probenabnahmen</i>	32
2.6	<i>Untersuchungen bei Raumtemperatur</i>	32
2.7	<i>Meßmethoden.....</i>	33
2.8	<i>Mathematische Auswertung.....</i>	35
2.9	<i>Statistische Auswertung</i>	37
3	Ergebnisse.....	38
3.1	<i>Erste Versuchsreihe mit Furansäure (CMPF) und Pentosidin</i>	38
3.2	<i>Zweite Versuchsreihe mit Furansäure(CMPF) und Indoxylsulfat</i>	43
3.3	<i>Leerwerte und Single-Pass Effekt</i>	56
3.4	<i>Untersuchungen bei Raumtemperatur</i>	56
4	Diskussion	58
5	Zusammenfassung	69
6	Summary.....	71

7	Literaturverzeichnis	73
8	Anhang.....	93
8.1	1. <i>Versuchsreihe mit Furansäure (CMPF) und Pentosidin.....</i>	93
8.2	2. <i>Versuchsreihe mit Furansäure (CMPF) und Indoxylsulfat</i>	96

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AD	Albumindialyse
Alb	Albumin
AGEs	Advanced Glycation Endproducts
AUC	Area Under the Curve
BS	Bindungsstelle
CAPD	Continuos Ambulatory Peritoneal Dialysis
CFU-E	Colony-Forming-Units, Erythroid
Cl	Clearance
C _{Max}	Höchste veröffentlichte urämische Serumkonzentration
CMPF	3-Carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionsäure
CN	Normale Serumkonzentration
CU	Urämische Serumkonzentration
d	Tag
D	Dalton
D _A	Probenabnahmeport Dialysatausgang
D _E	Probenabnahmeport Dialysateingang
dl	Deziliter
EUTox	European Work Group on Uremic Toxins
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EM	Entfernte Menge
ESAO	European Society for Artificial Organs
g	Gramm
h	Stunde
HD	Hämodialyse
HDL	High Density Lipoprotein
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
I.E.	Internationale Einheiten
IS	Indoxylsulfat
K _A	Bindungskoeffizient
MARS	Molecular Adsorbent Recirculating System

min	Minute
M-CSF	Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor
MW	Mittelwert
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
nmol	Nanomol
OAT	Organischer Säure-/Anionentransporter
PAH	P-Amino-Hippursäure
PCR	Protein Catabolic Rate, Maß für Proteinabbau
P _E	Probenabnahmeport Plasmaeingang
RT	Raumtemperatur
s	Standardabweichung
t	Zeitpunkt
Tab.	Tabelle
TGFβ1	Transforming Growth Factor
TIMP-1	Tissue Inhibitor of Metalloproteinases
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volumen
ZD	Zunahme im Dialysat
μmol	Micromol

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	: Konzentrationen von wichtigen proteingebundenen urämischen Substanzen im normalen und urämischen Serum [3]	12
Tabelle 2	: Versuchsübersicht.....	31
Tabelle 3	: CMPF-Konzentration in $\mu\text{mol/l}$ im Plasma: Mittelwerte $\pm s$	46
Tabelle 4	: Indoxylsulfatkonzentration in $\mu\text{mol/l}$ im Plasma zu den abgenommenen Zeitpunkten: Mittelwerte \pm Standardabweichung.....	51
Tabelle 5	: Leerwerte und 0 min in $\mu\text{mol/l}$, MW $\pm s$	56
Tabelle 6	: Ergebnisse - Untersuchungen bei Raumtemperatur, Mittelwerte $\pm s$	57
Tabelle 7	: Albumin (g/dl) im Plasma.....	93
Tabelle 8	: Albumin (g/dl) im Dialysat	93
Tabelle 9	: Pentosidin (nmol/l) im Plasma	94
Tabelle 10	: Pentosidin (nmol/l) im Dialysat.....	94
Tabelle 11	: Wilcoxon-Test zur Überprüfung von Unterschieden von Pentosidin und Albumin vor und nach der Dialyse (4 h) im Plasma.....	95
Tabelle 12	: Entfernte Menge von Pentosidin in nmol/l aus dem Plasma nach 4 Stunden Dialysedauer	95
Tabelle 13	: CMPF ($\mu\text{mol/l}$) im Plasma	95
Tabelle 14	: CMPF ($\mu\text{mol/l}$) im Dialysat	95
Tabelle 15	: Wilcoxon-Test zur Überprüfung von Unterschieden von CMPF vor und nach der Dialyse im Plasma	96
Tabelle 16	: Entfernte Menge von CMPF in μmol aus dem Plasma.....	96
Tabelle 17a/b:	Albumin (g/dl) im Plasma.....	96
Tabelle 18a/b:	Albumin (g/dl) im Dialysat	97
Tabelle 19a/b:	CMPF ($\mu\text{mol/l}$) im Plasma.....	99
Tabelle 20a/b:	CMPF ($\mu\text{mol/l}$) im Dialysat	100
Tabelle 21	: Statistischer Vergleich entfernte Menge im Plasma und Zunahme im Dialysat von CMPF nach 6 Stunden Dialysedauer	101
Tabelle 22a/b:	Indoxylsulfat ($\mu\text{mol/l}$) im Plasma.....	101
Tabelle 23a/b:	Indoxylsulfat ($\mu\text{mol/l}$) im Dialysat	102
Tabelle 24	: Statistischer Vergleich entfernte Menge im Plasma und Zunahme im Dialysat von Indoxylsulfat nach 6 Stunden Dialysedauer	103
Tabelle 25	: Statistischer Vergleich Molares Verhältnis von CMPF und Indoxylsulfat zu Albumin zum Zeitpunkt 0 Minuten in der zweiten Versuchsreihe	104
Tabelle 26	: Statistischer Vergleich Molares Verhältnis von CMPF und Indoxylsulfat zu Albumin zum Zeitpunkt 360 Minuten in der zweiten Versuchsreihe	104

Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Humanes Serumalbumin mit Bindungsstelle (BS) 1 und 2 und den daran bindenden endogenen Substanzen und Medikamenten.....</i>	<i>11</i>
<i>Abbildung 2: Strukturformel 3-Carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionsäure (CMPF).....</i>	<i>12</i>
<i>Abbildung 3: Strukturformel Indoxylsulfat (IS).....</i>	<i>15</i>
<i>Abbildung 4: Strukturformel Pentosidin.....</i>	<i>19</i>
<i>Abbildung 5: Prinzip der Albumindialyse, schematische Darstellung.....</i>	<i>22</i>
<i>Abbildung 6: Schematische Darstellung des Versuchaufbaus mit den 2 Einzelkreisläufen im Gegenstromprinzip.....</i>	<i>27</i>
<i>Abbildung 7: Hohlfaserdialysator mit einer Gesamtaustauschfläche von 0,65 m².....</i>	<i>28</i>
<i>Abbildung 8: Polyamid-Hohlfasermembran (Querschnitt, 1:250), Elektronenmikroskop, Universität Rostock.....</i>	<i>29</i>
<i>Abbildung 9: Polyamid-Hohlfasermembran (Querschnitt, 1:2000), Elektronenmikroskop, Universität Rostock.....</i>	<i>29</i>
<i>Abbildung 10: Versuchsaufbau Albumin- und Hämodialyse.....</i>	<i>30</i>
<i>Abbildung 11: Molares Verhältnis (MV) von CMPF zu Albumin im Plasma, Mittelwerte ± Standardabweichung.....</i>	<i>39</i>
<i>Abbildung 12: Molares Verhältnis (MV) von Pentosidin zu Albumin im Plasma, Mittelwerte ± Standardabweichung.....</i>	<i>41</i>
<i>Abbildung 13: Gesamtmenge von CMPF und Pentosidin im Dialysat nach 4 Stunden Dialysedauer.....</i>	<i>42</i>
<i>Abbildung 14: Albuminkonzentration im Plasma, Mittelwerte ± Standardabweichung.....</i>	<i>44</i>
<i>Abbildung 15: Albuminkonzentration im Dialysat.....</i>	<i>45</i>
<i>Abbildung 16: Molares Verhältnis (MV) von CMPF zu Albumin im Plasma.....</i>	<i>47</i>
<i>Abbildung 17: CMPF-Konzentration im Dialysat.....</i>	<i>48</i>
<i>Abbildung 18: Clearance von CMPF über 6h Dialysedauer in ml/min.....</i>	<i>49</i>
<i>Abbildung 19: Entfernte Menge und Zunahme von CMPF nach 6 h.....</i>	<i>50</i>
<i>Abbildung 20: Molares Verhältnis (MV) von Indoxylsulfat zu Albumin im Plasma.....</i>	<i>52</i>
<i>Abbildung 21: Indoxylsulfatkonzentration im Dialysat.....</i>	<i>53</i>
<i>Abbildung 22: Clearance von Indoxylsulfat über 6 h in ml/min.....</i>	<i>54</i>
<i>Abbildung 23: Entfernte Menge und Zunahme von Indoxylsulfat nach 6 Stunden Dialyse.....</i>	<i>55</i>

1 Einleitung

1.1 Urämisches Syndrom und Urämietoxine

Die verminderte Elimination ausscheidungspflichtiger Stoffwechsellendprodukte durch eine gestörte Nierenfunktion verursacht eine Akkumulation dieser Substanzen im Blut. Das daraus resultierende klinische Bild wird urämisches Syndrom genannt. Die Retentionsstoffe, die für dieses Bild verantwortlich gemacht werden, stellen die Urämietoxine dar. Nur wenige dieser Urämietoxine erfüllen die Kriterien für die Definition als urämisches Toxin vollständig.

1.1.1 Definition von Urämietoxinen

Per Definitionem müssen folgende Bedingungen für ein urämisches Toxin gegeben sein: 1) Die Substanz sollte chemisch identifiziert sein, und eine angemessene Quantifizierungsmethode sollte zur Verfügung stehen; 2) die absoluten Gewebs- und Plasmakonzentrationen sollten im urämischen Patienten höher sein als im Gesunden und 3) eine höhere Konzentration dieses Stoffes sollte mit spezifischen urämischen Symptomen einhergehen, die bei einer Reduktion der Substanzkonzentration verschwinden oder nachlassen; 4) weiterhin sollten die Stoffwechsellvorgänge, die zu den klinischen Veränderungen führen, In-vivo, Ex-vivo oder In-vitro Experimenten mit 5) vergleichbaren Konzentrationen wie denen, die im urämischen Patienten vorliegen, geprüft worden sein [1, 2]. Diesen Anforderungen können die Substanzen, die beim urämischen Syndrom akkumulieren, meist nur teilweise gerecht werden. Den Zusammenhang zwischen erhöhter Konzentration und damit verbundenen spezifischen Urämiesymptomen nachzuweisen, wird durch die Tatsache erschwert, dass sich die Entfernung dieser Stoffe als schwierig gestaltet. Daher lassen sich kaum bestimmte Toxine spezifischen Symptomen zuordnen. Weiterhin liegt nahe, dass erst das Zusammenwirken einer Vielzahl von Retentionsstoffen die multiplen urämischen Symptome verursacht. Durch die European Uremic Work Group on Uremic Toxins (EUTox), welche eine Initiative der European Society for Artificial Organs (ESAO) darstellt, wurde eine Datenbank entwickelt, die im Internet einzusehen ist [3]. In dieser Datenbank werden derzeit ca. 90 urämische Toxine aufgelistet. Es ist möglich, für jedes dieser aufgelisteten Toxine, die aus der Literatur

entstammenden und auf dieser Homepage zusammengefassten Werte für das Molekulargewicht, die durchschnittliche normale und die urämische Konzentration sowie die höchste jemals gemessene Konzentration abzufragen [4] (Tabelle 1).

1.2 Albumingebundene Urämietoxine

1.2.1 Einteilung

Urämietoxine werden allgemein aufgrund ihres Molekulargewichtes in drei Gruppen unterteilt: 1) Stoffe mit einem niedrigen Molekulargewicht bis 300 Dalton; dazu gehören vor allem die wasserlöslichen Substanzen. 2) Stoffe mit einem mittleren Molekulargewicht von 300-12000 Dalton; in dieser Gruppe sind hauptsächlich Peptide enthalten. 3) Substanzen mit einem hohen Molekulargewicht über 12000 Dalton [1, 5]. Trotz dieser Klassifikation sollten einige Substanzen mit einem niedrigem Molekulargewicht gesondert betrachtet werden, da sie im Plasma des Patienten in stark albumingebundener Form vorliegen und sich somit nicht wie die wasserlöslichen Substanzen mit niedrigem Molekulargewicht verhalten [1, 5]. Zu diesen albumingebundenen Urämietoxinen gehören unter anderem 3-Carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionsäure (CMPF), Pentosidin, Indoxylsulfat, *p*-Cresol, Phenol, Hippursäure und Homocystein [6]. Aufgrund ihrer hohen Proteinbindung können die Substanzen nicht effektiv durch herkömmliche Dialyseverfahren entfernt werden und akkumulieren daher im chronischen Dialysepatienten. Wie gut ein urämisches Toxin durch extrakorporale Methoden eliminiert werden kann, hängt unter anderem von der Stärke der Albuminbindung ab. Diese wird durch den Bindungskoeffizienten (K_A) beschrieben, der für jeden der albumingebundenen Stoffe unterschiedlich sein kann. Der Koeffizient stellt den Quotienten aus der Assoziations- und Dissoziationskonstante für eine Substanz dar. Weiterhin hängt das Zusammenspiel zwischen dem urämischem Toxin und dem Albuminmolekül von der Bindungsstelle ab. Am Albuminmolekül sind mehrere Bindungsstellen bekannt, die sich gegenseitig beeinflussen können [7-10]. Die große Mehrheit der Substanzen bindet an zwei wichtigen Bindungsstellen, Bindungsstelle 1 in der Subdomäne 2A und Bindungsstelle 2 in der Subdomäne 3A (Abbildung 1).

Humanes Serum Albumin

Transportprotein für endogene Substanzen und Medikamente

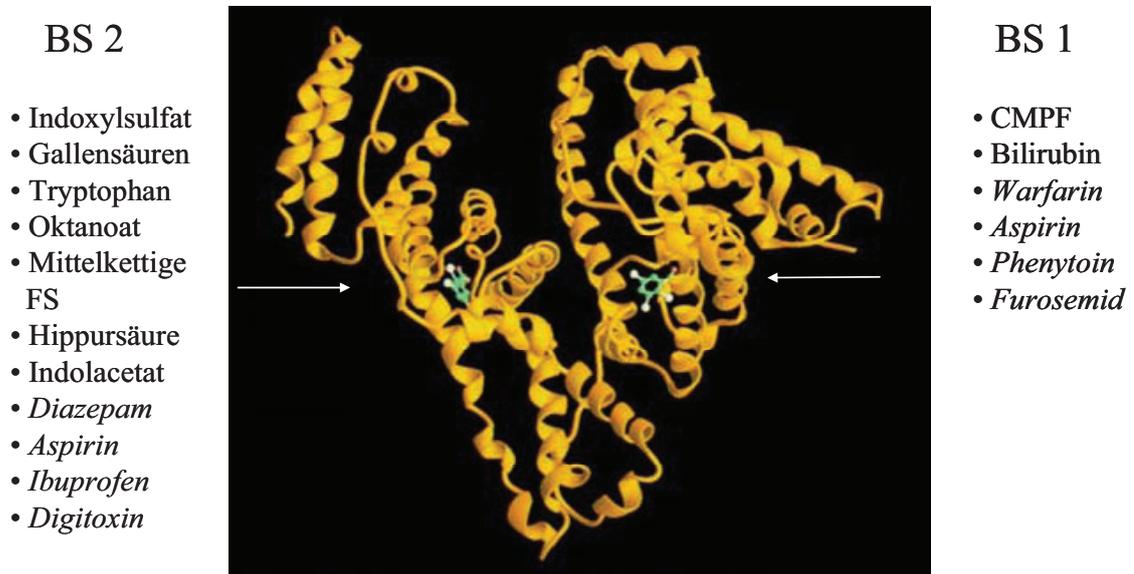


Abbildung 1: Humanes Serumalbumin mit Bindungsstelle (BS) 1 und 2 und den daran bindenden endogenen Substanzen und *Medikamenten*

FS=Fettsäuren, CMPF=3-Carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionsäure

In Abhängigkeit von der jeweiligen Bindungsstelle können sie verschiedene Effekte und Interaktionen mit anderen albumingebundenen Substanzen im Körper aufweisen [11]. Die genauen Sekretionsmechanismen in der gesunden Niere und der Akkumulationsmechanismus in der Urämie sind für viele der urämischen Toxine noch nicht geklärt. Sie werden aber für eine Vielzahl von Symptomen verantwortlich gemacht. Eine Reduktion des vermuteten Toxins sollte daher mit einer Reduktion der urämischen Symptome einhergehen und eventuell auch das Überleben der Patienten verbessern [12].

Tabelle 1: Konzentrationen von wichtigen proteingebundenen urämischen Substanzen im normalen und urämischen Serum [3]

Name	Molekulargewicht	CN ($\mu\text{mol/l}$)	CU ($\mu\text{mol/l}$)	CMax ($\mu\text{mol/l}$)	Substanzart
CMPF	240	32,1	254,2	391,7	Furan
IS	251	2,4	211,2	940,2	Indol
<i>p</i> -Cresol	108	5,7	186,1	376,9	Phenol
Pentosidin	342	0,15	2,6	8,7	AGEs

CN=normale Serumkonzentration, CU=urämische Serumkonzentration, CMax=höchste jemals veröffentlichte urämische Serumkonzentration, CMPF=3-Carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionsäure, IS=Indoxylsulfat, AGEs= Advanced Glycation Endproducts

1.2.2 3-Carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionsäure (CMPF)

3-Carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionsäure - im Folgenden auch CMPF und Furansäure genannt - wurde 1979 von Spitteller und Spitteller im Humanurin entdeckt und konnte später im Blut isoliert und nachgewiesen werden [13, 14] (Abbildung 2). Liebich stellte 1984 erstmals erhöhte Plasmaspiegel von CMPF im urämischen Plasma fest [15]. Der biochemische Ursprung von CMPF konnte bis heute noch nicht nachgewiesen werden, aber es ist bekannt, dass einige Furanfettsäuren, die mögliche Präkursoren von CMPF darstellen, aus der Nahrung stammen, zum Beispiel von Fisch, Gemüse und Obst [16, 17]. CMPF entsteht im menschlichen Organismus unter anderem als Spaltprodukt von langkettigen Fettsäuren aus Nahrungsfetten [18]. Außerdem wurde über die Möglichkeit berichtet, dass CMPF aus ungesättigten Fettsäuren im Körper selbst produziert werden könnte [17]. Chemisch stellt CMPF eine schwache organische Säure mit stark lipophilen Eigenschaften dar, die im Blut zu 99,5% an Albumin gebunden transportiert wird [19, 20].

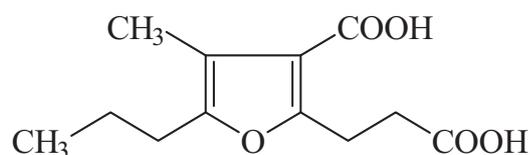


Abbildung 2: Strukturformel 3-Carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionsäure (CMPF)

CMPF gehört mit einem Molekulargewicht von 240 Dalton zu den urämischen Retentionsstoffen mit einem niedrigen Molekulargewicht [21] und wird über die gesunde Niere unverändert in unkonjugierter Form durch aktive tubuläre Sekretion über das Transportsystem für organische Anionen ausgeschieden [22]. Studien an Nierenrindenschnitten von Ratten konnten zeigen, dass P-Amino-Hippursäure (PAH) konzentrationsabhängig und kompetitiv die Aufnahme von CMPF inhibiert [23], und es ist zudem bekannt, dass PAH und Probenecid die Clearance von CMPF reduzieren [23-25]. Weiterhin zeigte eine Patientenuntersuchung, dass die renale Clearance von Furansäure niedrig war. Bei gesunden Probanden betrug sie 0,40 ml/min versus 0,05 ml/min in urämischen Patienten [26]. Deguchi et al. fanden in einer neueren Studie heraus, dass ein organischer Anionentransporter (OAT 3) an der basolateralen Membran der proximalen Tubuli für die renale Elimination von CMPF verantwortlich ist [27]. Die tägliche CMPF-Menge im Urin des Gesunden beträgt ca. 1 mg [19, 26, 28, 29].

Die hohe Albuminbindung verhindert eine Entfernung von CMPF über herkömmliche Entgiftungsverfahren. Über den Albumin-Bindungskoeffizienten finden sich in der Literatur unterschiedliche Angaben, in einer neueren Studie beschrieben Sakai et al. einen CMPF-Bindungskoeffizienten von $K_1=103.5 \times 10^6 M^{-1}$ [11]. In einer alten Veröffentlichung wurde der Bindungskoeffizient für den primären Bindungsort noch mit einem deutlich niedrigeren Wert ($K_1=4,8 \times 10^6 M^{-1}$) angegeben [30]. Dieser Koeffizient ist pH-aber nicht temperaturabhängig und befindet sich als primärer Bindungsort an der Bindungsstelle 1 am Albuminmolekül [11, 30-33] (Abbildung 1).

1.2.3 Effekte von CMPF

CMPF wird für eine Reihe von Veränderungen und Symptomen, die beim urämischen Syndrom auftreten, verantwortlich gemacht. Aufgrund der hohen Affinität für Albumin kann CMPF andere organische Säuren und Medikamente aus ihrer Albuminbindung verdrängen [11, 20, 30, 34-37]. CMPF beeinflusst dabei vor allem die Substanzen, die - wie die Furansäure selbst - an der Bindungsstelle 1 des Albuminmoleküls binden, wie die Medikamente Furosemid ($K_1=2,6 \times 10^4 M^{-1}$), Salicylat ($K_1=1.9 \times 10^5 M^{-1}$), Warfarin ($K_1=3,3 \times 10^5 M^{-1}$) und Phenytoin ($K_1=6 \times 10^3 M^{-1}$) (Abbildung 1). Ein Beispiel für die Verdrängung von endogenen Stoffen aus der Albuminbindung stellt der Blutfarbstoff Bilirubin dar, da die Bilirubin-Bindungskapazität ($K_1=9,5 \times 10^7 M^{-1}$) durch Anwesen-

heit von Furansäure im Plasma von HD-Patienten verringert wird [33, 38, 39]. Dies zeigt, dass exogene und endogene Substanzen, die sich an der gleichen Bindungsstelle wie die Furansäure anlagern und eine niedrigere Assoziationskonstante als CMPF haben, leicht aus ihrer Bindung mit dem Albuminmolekül verdrängt werden.

Es wird vermutet, dass CMPF in einer Reihe weiterer pathologischer Veränderungen im urämischen Syndrom eine Rolle spielt. So soll die Furansäure bei der Entstehung der Anämie, die beim chronischen Nierenversagen beobachtet wird, einen entscheidenden Faktor darstellen [40]. Niwa konnte durch In-vitro Versuche einen inhibitorischen Effekt von CMPF auf die Erythrozytenvorstufe CFU-E zeigen [28]. Später wurde über eine negative Korrelation zwischen der Serumkonzentration von CMPF und der Hämoglobinkonzentration in urämischen Patienten berichtet [41]. Die Anämie war außerdem bei den Patienten weniger ausgeprägt, die mit Verfahren behandelt wurden, die eine effizientere Entfernung von CMPF als die konventionelle Hämodialyse zeigten. Zu diesen Behandlungsmethoden zählen die Peritonealdialyse (CAPD) und die Hämodialyse mit einer proteindurchlässigen Membran [28, 40, 42].

Eine andere Wirkung von CMPF besteht in der Störung der Schilddrüsenfunktion. In einer Studie an Rattenhepatozyten, die mit Konzentrationen von CMPF inkubiert wurden, die normalerweise im Serum bei urämischen Patienten vorkommen, inhibierte die Furansäure den zellulären Transport von T4 und damit die Dejodination von T4 zu T3, die man in diesen Zellen quantitativ bestimmen konnte. Dieser Effekt wurde auch für Indoxylsulfat und Hippursäure beschrieben, obwohl deren Effekt 4- und 10- Mal niedriger war als der von CMPF. Weiterhin gilt CMPF als ein möglicher Auslöser für den niedrigen T3-Gesamtspiegel und die Störung der T4-Serumbindung bei urämischen Patienten [43, 44].

Außerdem soll die Furansäure für die neurologischen Symptome, die in der Urämie auftreten, mitverantwortlich sein. Costigan et al. fanden eine Beziehung zwischen der Schwere der neurologischen Störung und der Plasmakonzentration von CMPF [45]. Es wird vermutet, dass CMPF aufgrund seiner Struktur den Transport von organischen Säuren an der Blut-Hirn-Schranke inhibieren kann [41]. Weiterhin wurde berichtet, dass die organischen Säuretransporter, die für die renale Elimination von CMPF verantwortlich sein sollen, auch an der Blut-Hirn-Schranke existieren [46, 47].

Die hemmende Wirkung an den organischen Säuretransportern in der Niere verdeutlicht eine weitere Eigenschaft von CMPF. Wie erwähnt, wird CMPF durch aktive tubuläre

Sekretion renal eliminiert. Dies führt dazu, dass CMPF die Ausscheidung anderer organischer Säuren und Medikamente kompetitiv inhibiert [20, 23].

Einige molekulare Mechanismen sprechen für eine Zelltoxizität von CMPF. Es wurde berichtet, dass CMPF eine Inhibition der hepatischen Gluthation-S-transferase verursacht und die mitochondriale Atmung behindert [48]. Dieser hemmende Effekt wurde an Mitochondrien von Mäuselebern demonstriert. Er war dosisabhängig und ab einer Konzentration von 0.2 mmol/L nachzuweisen, welche mit den CMPF-Serumspiegeln bei urämischen Patienten vergleichbar ist [49]. Sun et al. beschrieben außerdem einen störenden Einfluss von CMPF auf den Metabolismus von Erythromycin in Rattenhepatozyten. Es konnte in dieser aktuellen Studie eine direkte Reduktion der Aufnahme von Erythromycin in die Hepatozyten nachgewiesen werden, was auf eine Interaktion mit dem organischen Säuretransporter (OAT) 2 schließen lässt [50-53]. Des Weiteren wird durch CMPF die Aufnahme von Medikamenten wie Digoxin in humane Hepatozyten gehemmt [54].

1.2.4 Indoxylsulfat

Indoxylsulfat (IS) wird in der Leber aus Indol synthetisiert, welches im Darm durch die intestinale Bakterienflora aus Tryptophan entsteht (Abbildung 3) [55, 56]. Indol kommt außerdem in Pflanzen und Kräutern vor. Eine Sulfotransferase katalysiert die Umwandlung von Indol in Indoxylsulfat in der Leber [57].

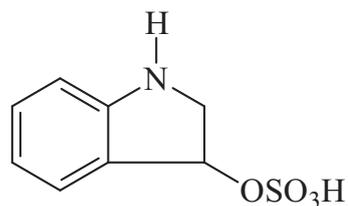


Abbildung 3: Strukturformel Indoxylsulfat (IS)

Wie die Furansäure gehört Indoxylsulfat zur Gruppe der urämischen Toxine mit einem niedrigen Molekulargewicht. Aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaften wird Indoxylsulfat im Blut an Albumin gebunden transportiert und akkumuliert im Plasma wenn sich die Nierenfunktion verschlechtert (Tabelle 1) [58-61]. Es wurde über eine positive

Korrelation zwischen der Indoxylsulfatkonzentration im Blut mit der Zeit, die ein Patient an der Hämodialyse verbracht hat, und dem Proteinabbau (PCR) unter Dialyse berichtet [61]. Ungefähr 60 mg Indoxylsulfat werden pro 24 h im Urin ausgeschieden [62]. Die renale Elimination findet über aktive Sekretion im proximalen Tubulus durch das System für organische Anionentransporter statt [63]. Studien an Ratten zeigten, dass die Eliminationsrate von Indoxylsulfat verglichen mit der von CMPF höher war [24]. Lesaffer et al. berichteten von einer Indoxylsulfat-Reduktion durch Hämodialyse von 35% versus einer CMPF-Reduktion von 22%. Dabei brachte der Einsatz einer High-Flux-Membran keinen Vorteil, jedoch konnten De Smet et al. in einer neuen Studie eine signifikante Elimination von Indoxylsulfat durch Verwendung einer großporigen, Albumin-durchlässigen Super-Flux-Membran vorweisen [42, 64, 65].

1.2.5 Effekte von Indoxylsulfat

Wie CMPF kann Indoxylsulfat die Wirkung von Medikamenten und organischen Säuren durch Competition an den Proteinbindungsstellen des Albumins beeinflussen [59, 66, 67]. Verglichen mit CMPF und Hippursäure ist CMPF dabei der potenteste Inhibitor [37, 39, 68]. Im Gegensatz zu CMPF bindet Indoxylsulfat an die Bindungsstelle 2 am Albuminmolekül [32, 39, 69] (Abbildung 1). Der Albuminbindungskoeffizient wird mit $K_I = 16,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ für den primären Bindungsort angegeben und liegt damit deutlich niedriger als der Koeffizient von CMPF ($K_I = 103,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) [11]. Dasgupta beschrieb, dass Indoxylsulfat die Interaktion von ausgeprägt proteingebundenen Medikamenten im urämischen Plasma verändert. Dabei nahm die Konzentration an freiem Digitoxin, das im normalen Plasma in Anwesenheit von Valproinsäure ansteigt, mit Zugabe von Valproinsäure im urämischen Plasma ab. Als inhibierend wirkende Substanz wurde Indoxylsulfat identifiziert [70].

Verschiedene Forschungsgruppen berichteten, dass die organischen Anionentransporter (OAT) 1 und 3 für die renale Ausscheidung von Indoxylsulfat verantwortlich sind [27, 71-74]. Da diese Transporter nicht spezifisch für Indoxylsulfat sind, können andere anionische und potenziell nephrotoxische Retentionsstoffe in den proximalen Tubuluszellen akkumulieren [20, 46, 75].

Weiterhin ist es wahrscheinlich, dass Indoxylsulfat eine wichtige Rolle bei der zentralnervösen Dysfunktion, die beim chronischen Nierenversagen auftritt, spielt. Es wurde

festgestellt, dass OAT 3 beim Transport von Indoxylsulfat aus dem Gehirn ins Blut beteiligt ist. Da außerdem Neurotransmitter und Medikamente den Weg über diesen Transporter nutzen, könnte es in der Urämie durch kompetitive Hemmung am OAT 3 zur Akkumulation dieser Stoffe im Gehirn kommen [47, 76]. Weiterhin fanden sich neuerdings Hinweise, dass Indoxylsulfat bei der Down-Regulation von OAT 1- und OAT 3-Rezeptoren in der Urämie beteiligt sein könnte [77].

Außerdem soll auch Indoxylsulfat ähnlich der Furansäure für die Hemmung der Schilddrüsenfunktion verantwortlich sein. Lim et al. berichteten, dass Indoxylsulfat wie CMPF die Dejodination von Thyroxin in gezüchteten Hepatozyten inhibieren konnte [43].

Versuche an urämischen Ratten zeigten, dass die orale Gabe von Indoxylsulfat oder dessen Vorstufe Indol die glomeruläre Sklerose und das Fortschreiten des chronischen Nierenversagens beschleunigte [58, 78]. Es fiel auf, dass Indoxylsulfat die Genexpression von TGF- β 1 (Transforming Growth Factor) stimulierte und damit die Produktion von TIMP-1 (Tissue Inhibitor of Metalloproteinases) und Pro- α 1-Kollagen erhöhte, was mit einer Verschlechterung der Nierenfunktion und einer Zunahme der renalen Fibrose einherging [79]. Zudem wurde beobachtet, dass sich durch Indoxylsulfat die Infiltration von Monozyten in den Nieren steigerte [80]. Die intrazellulären Mechanismen, die zur Nephrotoxizität von Indoxylsulfat beitragen, wurden außerdem in einer Studie an renalen proximalen Tubulus-Zelllinien untersucht. Dabei fiel auf, dass die Produktion freier Radikale in diesen Zellen durch Indoxylsulfat dosisabhängig gesteigert wurde und durch Antioxidantien und Probenecid inhibiert werden konnte [81, 82]. Weitere Untersuchungen an diesen Zellreihen ergaben, dass Faktoren, die die tubulointerstitielle Fibrose fördern, durch Indoxylsulfat vermehrt gebildet werden [83]. Dou et al. konnten den pro-oxidativen Effekt von Indoxylsulfat an humanen, endothelialen Umbilikalvenenzellen nachweisen [82]. Es zeigte sich, dass das Gleichgewicht von pro- zu antioxidativen Stoffen in den Zellen durch Indoxylsulfat gestört wurde. So lagen unter Indoxylsulfat deutlich niedrigere Spiegel des als Zellschutz wirkende Antioxidans Glutathion bei erhöhter Produktion freier Radikale vor. Weiterhin korrelierten die Plasmaspiegel von Indoxylsulfat positiv mit denen von Pentosidin, das als Marker für oxidativen Stress bewertet wird (1.2.7) [61, 84].

Mehrere Studien kamen zu dem Ergebnis, dass die erhöhte Indoxylsulfatkonzentration im urämischen Plasma durch Zugabe des oralen Adsorbens AST-120 (Kremezin[®]),

welches Indol im Intestinum bindet und dessen Exkretion in den Fezes stimuliert, reduziert werden kann [85]. Es wurde beschrieben, dass die Gabe von AST-120 zusätzlich den glomerulären Sklerose-Index in urämischen Ratten verringerte [58, 86-88]. Klinische Patientenstudien zeigten ferner, dass das Fortschreiten des chronischen Nierenversagens durch AST-120 verlangsamt wurde [85, 89, 90]. Miyazaki et al., die auf eine erhöhte Genexpression von TGF- β 1 und anderen Fibrose-stimulierenden Faktoren hingewiesen hatten, beschrieben einen Rückgang derselben unter der Gabe von AST-120 [91, 92].

Dou et al. konnten darüber hinaus in einer neueren Untersuchung belegen, dass die epitheliale Proliferation unter dem Einfluss von Indoxylsulfat gestört wird und zu einer verlangsamt epithelialen Wundregeneration führt. Dies wurde an humanen Umbilikalvenenzellen gezeigt, die mit Konzentrationen von Indoxylsulfat inkubiert wurden, die bei urämischen Patienten auftreten [93].

Die Bedeutung der endothelialen Dysfunktion unter erhöhten Indoxylsulfatkonzentrationen wurde durch Taki et al. hinsichtlich Faktoren, die mit der Entstehung von Arteriosklerose assoziiert sind, betrachtet. Es wurden arteriosklerotische Marker von 224 Dialysepflichtigen Patienten auf eine Beziehung zu Indoxylsulfat untersucht. Wie schon beschrieben, korrelierten die Spiegel von Indoxylsulfat und Pentosidin. Des Weiteren zeigten sich Unterschiede zwischen den Gruppen mit hohem oder niedrigem Indoxylsulfat Spiegel hinsichtlich weiterer arteriosklerotischer Faktoren wie Kreatinin, HDL-Cholesterol und des Ernährungsstatus, gemessen an der Proteinabbaurate (PCR) [84, 94]. Adijiang et al. wiesen in einem Rattenmodell nach, dass Indoxylsulfat die Expression von Osteoblasten-spezifischen Proteinen induzierte und sowohl die aortale Wandverdickung wie auch die Kalzifizierung der Aorta signifikant förderte [95]. Dies lässt eine Beteiligung von Indoxylsulfat an der Pathogenese von arteriosklerotischen Veränderungen bei Hämodialysepatienten vermuten.

1.2.6 Pentosidin

Pentosidin gehört zu der Gruppe der so genannten Glykosilierungsendprodukten, die im Englischen als Advanced Glycation Endproducts (AGEs) bezeichnet werden (Abbildung 4). Diese Substanzen entstehen durch eine nicht-enzymatische Reaktion zwischen reduzierenden Zuckern wie Glukose, Fruktose, Maltose oder Laktose und der

Aminogruppe von Proteinen. Der irreversible Prozess, der zur Bildung der AGEs führt, wird Maillard-Reaktion genannt [96]. Dabei bildet sich zunächst ein Glykosylamin, das sich über das offenkettige Aldimin zu einer Aminoketose, dem Amadori-Produkt, umlagert. Die weitere Reaktion führt in komplizierten Kaskaden über verschiedene Intermediate zu einer Vielfalt von stabilen Endprodukten wie zum Beispiel dem Pentosidin [97].

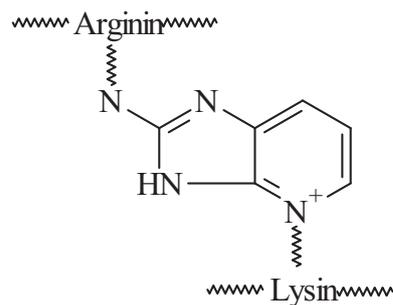


Abbildung 4: Strukturformel Pentosidin

Die Plasmakonzentrationen von Pentosidin sind bei diabetischen sowie urämischen Patienten - mit oder ohne Diabetes mellitus - verglichen mit Gesunden stark erhöht [98-103] (Tabelle 1). Man stellte fest, dass die Konzentrationen von Pentosidin bei Patienten mit rheumatoider Arthritis, atopischer Dermatitis oder mit der Alzheimer Krankheit ebenfalls erhöht sind [104-108]. Weiterhin korreliert der Pentosidinspiegel mit dem Alter - dies trifft allerdings beim urämischen Patienten nicht zu [98, 109]. Im Plasma wird Pentosidin, bis auf eine kleine Fraktion von freiem Pentosidin, fast ausschließlich an Albumin gebunden transportiert [101]. Die Akkumulation von freiem Pentosidin wurde infolge einer reduzierten glomerulären Filtration gesehen [110]. Albumingebundenes Pentosidin kann durch die Hämodialyse nicht entfernt werden und akkumuliert daher im Patientenplasma [111-113]. In einer neuen Studie wurde festgestellt, dass kein Unterschied zwischen einer High- und einer Low-Flux Membran hinsichtlich der Entfernbarkeit von Pentosidin besteht [112]. Wie schon für Indoxylsulfat beschrieben, führte der Einsatz einer Super-Flux-Membran, die mit einem Albuminverlust einhergeht, hingegen zu einer Reduktion des Pentosidins [42]. Yamamoto et al. entwickelten neuerdings zudem eine Adsorbermembran, die Substanzen wie reaktive Carbonylverbindungen binden und somit die Formation von AGEs deutlich verringern konnte [114].

Andere Untersuchungen konnten zeigen, dass sich erhöhte Pentosidinspiegel nach Nierentransplantation normalisierten [115, 116]. Man nimmt an, dass eine sehr starke Verbindung zwischen dem Pentosidin und dem Albuminmolekül besteht, eine Aussage entsprechend dem Albuminbindungskoeffizienten, der für CMPF und Indoxylsulfat bestimmt wurde, ist in der Literatur für das Pentosidin derzeit noch nicht vorhanden.

1.2.7 Effekte von Pentosidin

Sehr häufig gehen mit der Proteinglykosylierung Änderungen der Proteinstruktur, der Halbwertszeit oder auch der Funktion einher [117]. Die Bildung der AGEs und darunter Pentosidin, als einer der bekanntesten Vertreter, werden daher für eine Reihe von pathologischen Effekten im chronischen HD-Patienten verantwortlich gemacht. Auf Makrophagen und Endothelzellen sind in letzter Zeit spezifische Rezeptoren für AGEs gefunden worden, die zur Großfamilie der Immunglobuline gehören und die möglicherweise an Reaktionen beteiligt sind, die zu Veränderungen der Gefäße und des Immunsystems führen [118-121]. Da eine erhöhte Konzentration von AGEs in arteriosklerotischen Läsionen gefunden wurde, vermutet man einen Zusammenhang zwischen AGEs und Arteriosklerose [84, 122-125]. Zoccali et al. beschrieben zwar, dass Pentosidin weder mit der Intima-Media-Dicke noch mit der Anzahl von arteriosklerotischen Plaques korreliert, hingegen jedoch eine Verbindung der Pentosidinspiegel zur Herzgeometrie besteht [126, 127]. In neueren Studien erhärtet sich der Verdacht, dass die AGEs einen Einfluss auf die Entstehung von arteriosklerotischen Erkrankungen haben. So wurde gezeigt, dass der abdominale Aorta-Kalzifikationsindex, der als Marker für die Schwere von Arteriosklerose gilt und nichtinvasiv per Computertomographie erhoben werden kann, positiv mit der Plasma-Pentosidinkonzentration bei Hämodialyse-Patienten korreliert [128]. Suliman et al. veröffentlichten in einer Untersuchung aus dem Jahr 2006 eine Beziehung der Intima-Media-Dicke in den Karotiden von Dialysepflichtigen Patienten mit dem Spiegel an Pentosidin im Plasma. Die Plaques in den Karotiden wurde sonographisch bestimmt und korrelierten mit der Höhe des Pentosidins [129]. Zudem zeigte sich ein Zusammenhang hoher Pentosidin-Gewebsspiegel mit der diastolischen Dysfunktion [130]. Dies lässt vermuten, dass Pentosidin eine Rolle bei der Pathogenese von kardiovaskulären Erkrankungen spielt [131]. Des Weiteren gaben Koyama et al. in einer aktuellen Veröffentlichung den Pentosidin-Serumspiegel als

unabhängigen, prognostischen Risikofaktor für Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz an, der für die Risikostratifizierung dieser Patienten an Bedeutung gewinnen vermag [131-134].

Pentosidin und AGEs könnten an den Langzeitkomplikationen, die durch erhöhte Spiegel von proinflammatorischen Zytokinen hervorgerufen werden, mit verantwortlich sein. Es wird über eine Beziehung zwischen der Plasmakonzentration von Interleukin 18 und M-CSF (Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor) und dem Pentosidinlevel berichtet [113]. Reznikov et al. zeigten, dass AGEs die Synthese und die Freisetzung von Interleukin 1 und Tumornekrosefaktor in Anwesenheit niedriger Konzentrationen von Endotoxinen erhöhen [135]. AGEs könnten so also an systemischen und lokalen Entzündungsprozessen beteiligt sein [136]. Dies zeigten auch Suliman et al. in einer Kohortenstudie von 191 Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz. Die bei diesen Patienten erhöhten Plasmaspiegel von Pentosidin korrelierten - im Gegensatz zu Indoxylsulfat - signifikant mit den Entzündungsparametern und mit dem Status der Malnutrition dieser Patienten, waren jedoch kein geeigneter Prädiktor für die Mortalität der Patienten [61, 137].

Eine Reihe von Studien hat die Bedeutung von Pentosidin als Marker für die oxidative Belastung beim chronischen Nierenversagen belegt [108, 138-140]. Die Urämie wird als ein Zustand von Stress beschrieben, der durch die erhöhte Oxidation von Kohlenhydraten und Lipiden verursacht wird und von der Formation von kleinen reaktiven Carbonyl-Präkursoren gefolgt wird. Der erhöhte oxidative Stress führt dabei zu einer beschleunigten Bildung von AGEs im urämischen Serum [141].

1.3 Albumindialyse

Klinischer Bedarf besteht für die Entwicklung effektiver Verfahren zur Reduktion der albumingebundenen Urämietoxine. Die positiven Erfahrungen mit dem MARS[®]-Verfahren (Molecular Adsorbent Recirculating System), einer extrakorporalen Leberersatztherapie für die Entfernung von proteingebundenen Lebertoxinen mittels Albumindialyse, legte den Einsatz einer vergleichbaren Anwendung im Bereich der albumingebundenen urämischen Toxine nahe [142-153]. Das MARS[®]-System stellt ein Blutreinigungsverfahren dar, das die selektive Entfernung frei gelöster und albumingebundener Stoffe aus dem Blut ermöglicht und dabei gleichzeitig den Verbleib von Albumin und

anderen wichtigen Proteinen in ihrer physiologischen Konzentration im Patientenplasma sichert. Durch die treibende Kraft des Konzentrationsgradienten kommt es zur Ablösung der gebundenen Toxine vom Albumin des Patienten und zum Durchtritt durch die Membran. Auf der Dialysatseite der Membran fließt eine Spüllösung mit einer hohen Konzentration freier Albuminmoleküle entlang, welche die Toxine im Dialysat binden (Abbildung 5).

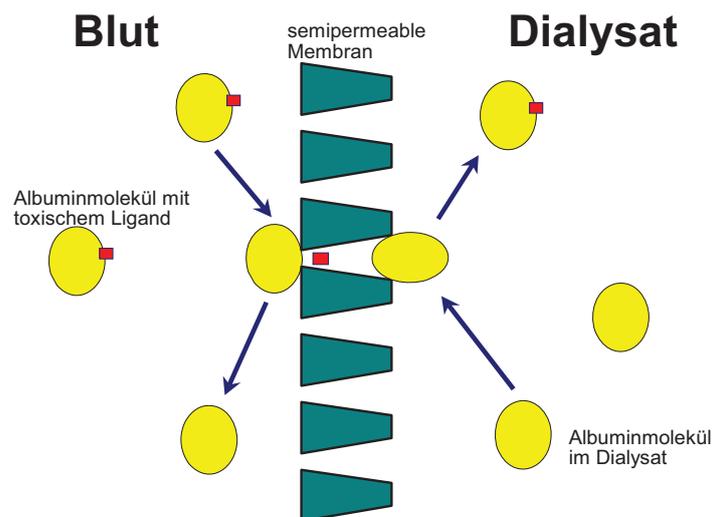


Abbildung 5: Prinzip der Albumindialyse, schematische Darstellung

Die herkömmlichen Dialyseverfahren bei der Behandlung der terminalen Niereninsuffizienz konzentrieren sich auf die Entfernung von wasserlöslichen, niedermolekularen Substanzen. Nichtsdestotrotz werden viele der bekannten Effekte in der Urämie, Komponenten mit unterschiedlichen physiologischen Charakteristiken zugeschrieben. Von diesen spielen die eiweißgebundenen Stoffe eine wichtige Rolle. In einer Patientenstudie wurden erstmals Untersuchungen zur Entfernbarkeit der Furansäure mittels Albumindialyse bei chronischen Hämodialysepatienten durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Furansäure prinzipiell durch das Albumindialyseverfahren entfernbar und nach der Dialyse mit einer Polyamidmembran im Dialysat nachzuweisen war [154]. Diese Beobachtung wird durch weitere Untersuchungen der Forschungsgruppe um Mitzner et al. unterstützt, die vermuten lassen, dass der Einsatz einer Albuminlösung auf der Dialysatseite zu einer Reduktion von proteingebundenen Urämietoxinen im Plasma führt [155-159]. Weiterhin zeigten In-vitro Versuche von Abe et al. die Möglichkeit zur Entfernung von Indoxylsulfat und *p*-Cresol aus urämischem Patientenplasma mittels einer

Albuminlösung [160].

Angesichts der Tatsache, dass die beschriebenen urämischen Toxine multiple unerwünschte Effekte beim chronischen Hämodialysepatienten hervorrufen und sich ihre Eliminierung durch herkömmliche Mittel bisher als äußerst schwierig gestaltet, ist die Entwicklung neuer Verfahren zur Entfernung dieser Giftstoffe von klinischer Relevanz.

1.4 Ziel der Arbeit

Studien konnten zeigen, dass die Elimination albumingebundener urämischer Toxine aus dem Plasma chronischer Hämodialysepatienten mittels eines neuartigen Blutreinigungsverfahrens, der Albumindialyse, prinzipiell möglich ist [157, 159, 160]. Ziel dieser Arbeit war zu untersuchen, ob und in welchem Ausmaß die proteingebundenen Urämietoxine CMPF, Indoxylsulfat und Pentosidin mittels Albumindialyse aus dem Plasma von urämischen Patienten entfernbar sind.

Fragestellungen:

- Sind die urämischen Plasmaspiegel der Toxine CMPF, Indoxylsulfat und Pentosidin im Plasmapool von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz erhöht?
- Können diese Toxine mittels der Albumindialyse In-vitro effektiver entfernt werden als mit der konventionellen Hämodialyse?
- Besteht ein Vorteil im Einsatz einer 20%-igen versus einer 10%-igen Albuminkonzentration in der Albumindialyse?
- Besteht ein natürlicher Zerfall der betrachteten urämischen Toxine bei Raumtemperatur und Lichteinfluss über die Zeit?
- Gibt es eine Affinität von den Toxinen zur Gefäßwand der Aufbewahrungsbehälter?
- Lassen sich Aussagen für die klinische Relevanz dieser Anwendung aus den Versuchen ableiten?

Dazu sollten folgende Aufgaben bearbeitet werden:

- Sammeln und Poolen von Plasma von Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz
- Aufbau eines In-vitro Kreislaufsystems für die Dialyseversuche

- In-vitro Versuche mit konventioneller Substitutionslösung, 10%-iger und 20%-iger Albuminlösung
- Messung der CMPF-, Indoxylsulfat- und Pentosidinkonzentrationen im Plasma und im Dialysat

In einer ersten Versuchsreihe sollte zuerst die Frage geklärt werden, ob sich die stark albumingebundenen Urämietoxine CMPF und Pentosidin prinzipiell durch die Albumindialyse aus dem Plasma entfernen lassen. Die zweite Versuchsreihe sollte Informationen darüber geben, in welchem Rahmen die betrachteten urämischen Toxine CMPF und Indoxylsulfat mit 10%-iger bzw. 20%-iger Albuminkonzentration durch die Dialyse eliminiert werden können.

2 Patienten, Material und Methoden

2.1 Patientenplasma und Plasmapool

Das für die Messung von Albumin, CMPF, Pentosidin und Indoxylsulfat notwendige Plasma wurde aus dem Blut von 250 Dialysepatienten aus drei verschiedenen Dialysepraxen in Rostock gewonnen. Die terminalen Niereninsuffizienzpatienten befanden sich zum Zeitpunkt der Probenabnahme in einem stabilen Gesundheitszustand und waren seit mindestens einem halben Jahr regelmäßig an der Hämodialyse. HIV-, Hepatitis B- und C-positive Patienten wurden von den Blutabnahmen aus Sicherheitsgründen ausgeschlossen. Pro Patient wurden 18 ml EDTA-Blut vor Dialysebeginn gewonnen, bei 4-8°C gelagert und innerhalb von 24 h bei 4000 U/min für 15 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Plasma abpipettiert und in 50 ml fassende Polypropylen-Behälter bei -80°C eingefroren. Nach Abschluss der Samplingphase, die ein Jahr betrug, wurden die Proben im Wasserbad aufgetaut und in einem sterilen Glasbehälter gepoolt. Zur Antikoagulation wurde der Plasmapool mit 10000 IE/Liter unfraktioniertem Heparin versehen und in 250 ml fassende Glasbehälter, die mit einem Silikonverschluss für die späteren Dialysekreisläufe ausgestattet waren, aufgeteilt. Dazu wurden 150 ml Plasma in die Glasbehälter abgefüllt und bei -80°C bis zur Durchführung der Versuche eingefroren. In einem Teil der Experimente wurden 170 ml Plasma benutzt.

2.2 Versuchsmaterialien

Geräte:

- BP 10-1A Pumpe (Gambro, Schweden)
- ISM 915 A Pumpe (Ismatec, Schweiz)
- ISM 898 Pumpe (Ismatec, Schweiz)
- Zentrifuge 5810 R (Eppendorf AG, Hamburg)

Verbrauchsmaterialien:

- 9,0 ml S-Monovetten, EDTA (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht)
- 50 ml Polypropylen-Röhrchen (Greiner Bio One, Frickenhausen)
- 500 ml Glasflasche mit Gummiverschluss

-
- 250 ml Glasflasche GL 45 mit Silikonverschluss, (Schott AG, Mainz)
 - Dialysator: MARS Flux 0.6 (0.65 m²), (Teraklin, Rostock)
 - Blutschlauchsystem FA 514-SNBBVM, 8 mm Durchmesser (Fresenius Medical Care AG, Bad Homburg)
 - Einwegnadeln (B. Braun AG, Melsungen), Einwegspritzen (BD Discardit II, Heidelberg)
 - 1,7 ml Safe - Lock Reaktionsgefäße, (Eppendorf AG, Hamburg)

Lösungen:

- Heparin-Natrium-250000 (Ratiopharm GmbH, Ulm)
- Kontrollversuche-Hämodialyse: Substitutionslösung zur Hämofiltration SH 04 (B. Braun, Melsungen AG)
- Albumindialyseversuche: Human Albumin 20% (Grifols, Langen), für 10%-ige Albuminkonzentration in 0,9%-ige NaCl Lösung (B. Braun AG, Melsungen) aufgelöst im Verhältnis 1:2

2.3 Versuchsaufbau

Der Versuchsaufbau bestand aus zwei geschlossenen Kreislaufsystemen, die in gegensätzlicher Richtung an einer semipermeablen Membran vorbei zirkulierten (Gegenstromprinzip): der Plasmakreislauf, der aus dem gepoolten Patientenplasma bestand und der Dialysatkreislauf, in dem entweder eine herkömmliche Substitutionslösung zur Hämofiltration oder eine 10 %-ige bzw. 20 %-ige Albuminlösung zirkulierte. Auf der Plasmaseite befand sich ein Probenabnahmeport (P_E) vor dem Dialysator. Auf der Dialyseseite waren zwei Abnahmeports für die Probenabnahme vorhanden, einer vor (D_E) und einer nach dem Dialysator (D_A) (Abbildung 6 und Abbildung 10).

Plasmakreislauf

Dialysatkreislauf

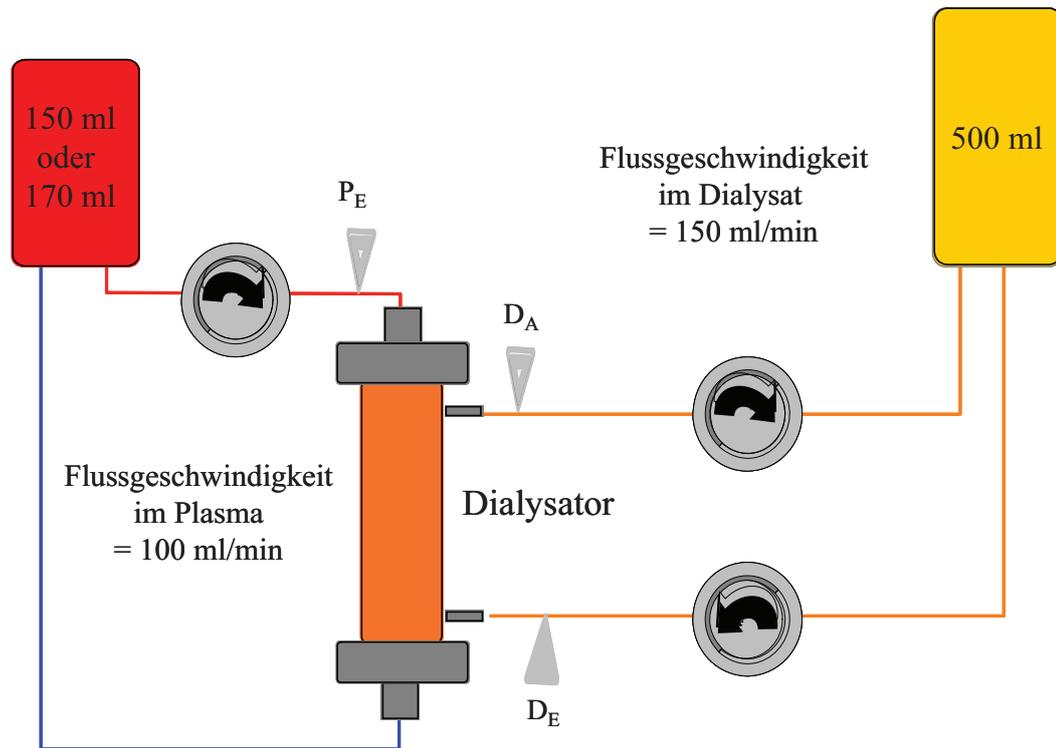


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus mit den 2 Einzelkreisläufen im Gegenstromprinzip

P_E = Abnahmeport Plasmaeingang, D_E/D_A = Abnahmeport Dialysatein/-ausgang

Für die Plasmaseite der Kreislaufversuche wurde je einer der bei -80°C eingefrorenen Glasbehälter bei Kühlschranktemperatur langsam aufgetaut und vor Versuchsbeginn auf Raumtemperatur gebracht. Auf der Dialysatseite kamen verschiedene Lösungen mit je 500 ml pro Versuch zum Einsatz, die unmittelbar vor den Versuchen vorbereitet wurden. Die Kontrollversuche, die eine herkömmliche Hämodialyse imitieren sollten, wurden mit einer Substitutionslösung zur Hämodialyse durchgeführt. Dabei zirkulierten 500 ml dieser Lösung auf der Dialysatseite. Für die Albumindialyseversuche wurde 20%-iges Humanalbumin verwendet. Für die Versuche mit 10%-igem Albumin wurde das 20%-ige Humanalbumin mit einer isotonen Kochsalzlösung im Verhältnis 1:2 gemischt. Die beiden Kreisläufe zirkulierten in räumlich getrennten, geschlossenen Systemen und waren nur durch einen Polyamid-Hohlfasermembran-Dialysator mit einer Gesamtaustauschfläche von $0,65\text{ m}^2$ miteinander verbunden (Abbildung 7).



Abbildung 7: Hohlfaserdialysator mit einer Gesamtaustauschfläche von 0,65 m²

Das Patientenplasma im Plasmakreislauf wurde mit Hilfe einer Rollerpumpe mit einer Geschwindigkeit von 100 ml/min bewegt. Die Geschwindigkeit auf der Dialysatseite betrug 150 ml/min und wurde zur Vermeidung von Ultrafiltration durch die Verwendung von zwei Pumpen, eine vor und eine nach dem Dialysator, gewährleistet (Abbildung 6 und Abbildung 10).

Das Patientenplasma wurde durch die Hohlfaserkapillaren des Dialysators geleitet, während das Dialysat in der Gegenrichtung außen an den Kapillaren vorbeiströmte. Abbildung 8 und Abbildung 9 zeigen elektronenmikroskopische Vergrößerungen von einer Polyamid-Hohlfasemembran mit dem typischen asymmetrischen Aufbau. Auf der Plasmaseite finden sich sehr feine, poröse Strukturen, auf der Dialysatseite ist der Aufbau offenporig und trabekelartig. Dieser Aufbau wird als die „finger-type“ Struktur bezeichnet und ermöglicht das tiefere Eindringen von Albuminmolekülen auf der Dialysatseite.

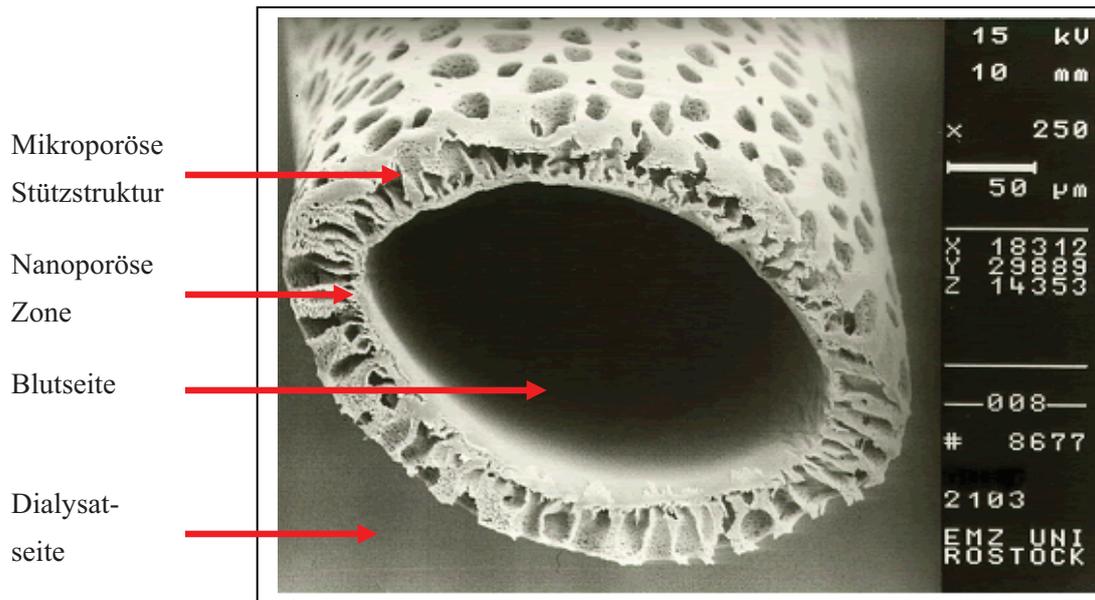


Abbildung 8: Polyamid-Hohlfasermembran (Querschnitt, 1:250), Elektronenmikroskop, Universität Rostock

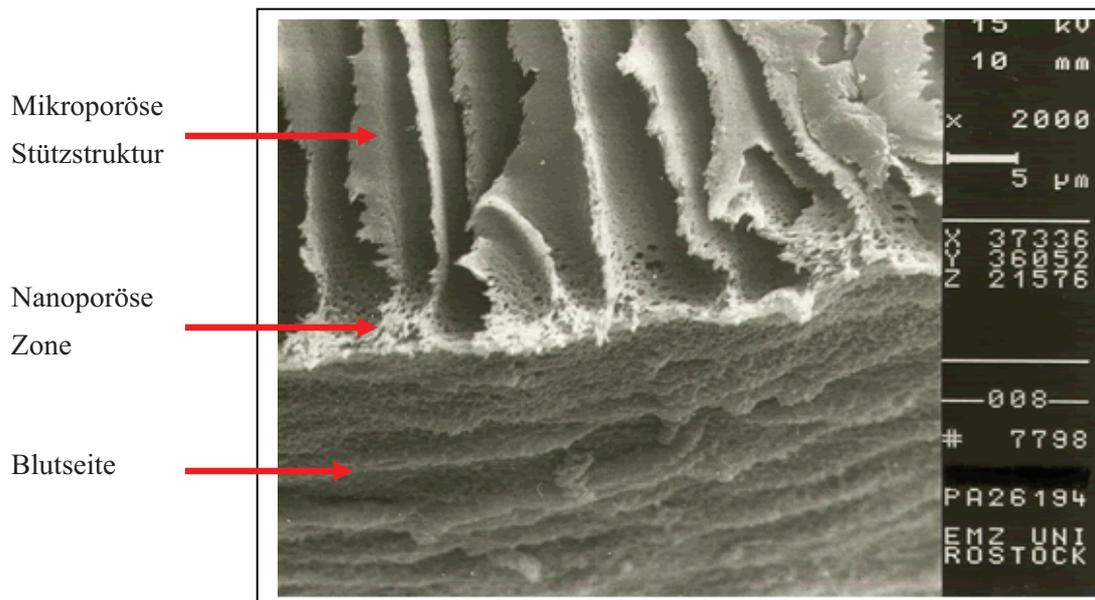


Abbildung 9: Polyamid-Hohlfasermembran (Querschnitt, 1:2000), Elektronenmikroskop, Universität Rostock



Abbildung 10: Versuchsaufbau Albumin- und Hämodialyse

2.4 Versuchsreihen und -anzahl

Die Versuche wurden in eine erste und eine zweite Versuchsreihe unterteilt. In der ersten Reihe, die einer Vorstudie entspricht, wurde in 3 Versuchen mit der herkömmlichen Hämodialyse und in 3 Versuchen mit der Dialyse mit 10%-iger Albuminkonzentration die Entfernbarkeit der sehr stark albumingebundenen urämischen Toxine CMPF und Pentosidin über 4 Stunden untersucht (n=6, Versuch 1-6).

In einer zweiten Versuchsreihe wurden für die Messung von CMPF und Indoxylsulfat je 4 Versuche mit der herkömmlichen Hämodialyse, der Albumindialyse mit 10% Albumin und mit 20% Albumin durchgeführt (n=12). Die Versuchszeit wurde bei dieser Versuchsreihe auf 6 Stunden verlängert (Versuch 7-18).

Albumin wurde bei beiden Versuchsreihen im Plasma und im Dialysat gemessen. Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die Versuche der ersten und der zweiten Versuchsreihe.

Tabelle 2: Versuchsübersicht

Versuch	Gruppe	Dauer (h)	V (ml)	Alb	Pentosidin	CMPF	IS
1	HD	4	150	x	x	x	
2	HD	4	150	x	x	x	
3	HD	4	150	x	x	x	
4	AD10%	4	150	x	x	x	
5	AD10%	4	150	x	x	x	
6	AD10%	4	150	x	x	x	
7	HD	6	150	x		x	x
8	HD	6	150	x		x	x
9	HD	6	150	x		x	x
10	AD10%	6	150	x		x	x
11	AD10%	6	150	x		x	x
12	AD10%	6	150	x		x	x
13	AD20%	6	170	x		x	x
14	AD20%	6	170	x		x	x
15	AD20%	6	170	x		x	x
16	AD10%	6	170	x		x	x
17	AD20%	6	170	x		x	x
18	HD	6	170	x		x	x

HD=Hämodialyse, AD10%/20%=Albumindialyse mit 10%-igem- bzw. 20%-igem humanem Serumalbumin, Alb=Albumin, V=Volumen, CMPF=3-Carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropion-säure, IS=Indoxylsulfat, x=durchgeführte Probenabnahmen und Messungen

2.5 Versuchsablauf und Probenabnahmen

2.5.1 Versuchsablauf

Vor dem Füllen der Kreislaufsysteme wurden Proben aus den Plasma- und Dialysat-Glasflaschen (Leerwerte) für die Messung von Albumin, CMPF, Indoxylsulfat und Pentosidin gewonnen. Dann wurden zuerst der Dialysatkreislauf und der Dialysator mit dem Dialysat aufgefüllt. In einem weiteren Schritt wurde der Blutkreislauf und der Dialysator mit dem gepoolten Patientenplasma befüllt. Anschließend wurde der Versuch mit den beschriebenen Flussraten auf der Plasma- und Dialysatseite begonnen.

2.5.2 Probenabnahmen

Für die Messung von Albumin, CMPF, Indoxylsulfat und Pentosidin wurde je 1 ml Plasma oder Dialysat pro Probenabnahme benötigt. Es wurden Proben zu verschiedenen Zeitpunkten des Versuchs aus den Abnahmeports entnommen. Die Proben wurden in Eppendorfbehälter bei -80°C bis zur Analyse eingefroren.

2.5.3 Abnahmezeitpunkte

In der ersten Versuchsreihe wurden Proben für die Bestimmung von Albumin, CMPF und Pentosidin nach Füllen der Kreislaufsysteme (0 min) unmittelbar vor Beginn des Versuchs und nach 4 Stunden (240 min) Versuchsdauer abgenommen. Bei der zweiten Versuchsreihe mit CMPF und Indoxylsulfat wurden die Probenabnahmen nach Füllen der Systeme 0 min, 15 min, 30 min, 60 min, 120 min, 240 min und 360 min durchgeführt. Weitere Proben bei 180 min und 300 min konnten infolge Materialmangels nicht bei allen Versuchen abgenommen werden, sind jedoch im Anhang bei der Auflistung der Einzelversuche mit angegeben.

2.6 Untersuchungen bei Raumtemperatur

Während der zweiten Versuchsreihe wurden Untersuchungen zur Haltbarkeit der urämischen Toxine durchgeführt. Dazu wurden zu Beginn der Versuche 7, 8 und 9 Proben aus dem Plasma abgenommen und bei Raumtemperatur in Eppendorfbehältern über die

Zeit von 6 Stunden stehengelassen (RT 6 h), um einen natürlichen Zerfall der Urämietoxine durch Temperatur, Licht oder andere Prozesse auszuschließen. Anschließend wurden Albumin, CMPF und Indoxylsulfat in diesen Kontrollproben unter den gleichen Bedingungen wie die während des Versuchs abgenommenen Proben bestimmt.

2.7 Meßmethoden

Die Konzentrationsbestimmung von Albumin wurde im Forschungslabor Nephrologie der Universitätsklinik Rostock durchgeführt. Die Messungen von CMPF, Indoxylsulfat und Pentosidin erfolgten in der Abteilung für Klinische Forschung der Universitätsklinik Rostock.

2.7.1 Meßmethode für Albumin

Albumin wurde nach der Bromcresol-Methode photometrisch am Cobas Mira (Labor und Technik, E. Lehmann, Berlin) bestimmt.

2.7.2 Meßmethode für CMPF

Zur Probenpräparation wurden die Plasmaröhrchen 5 Minuten lang bei 100°C erhitzt und 1 Stunde lang bei 40000 U/min zentrifugiert. Bis zur Analyse wurden die Proben bei -80°C aufbewahrt. Die HPLC-Meßmethode wurde nach einer Methode von Mabuchi modifiziert [34, 161].

Das Elutionssystem bestand aus Acetonitril-Wasser-Heptafluorbuttersäure (40/60/0,1 v/v/v). Es wurden je Probe 20 µl über einen Auto Injektor (SIL-6B, Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg) injiziert. Die Trennung erfolgte auf einer 250-4/Hypersil 120-5 ODS Trennsäule (120Å-5µm, 250 x 4mm) von Macherey-Nagel (MN GmbH, Düren). Die Elution erfolgte isokratisch bei einer Flussrate von 0,6 ml/min und einer UV-Absorption bei 270 nm (UV-Detector SPD-6AV, Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg). Die Identifikation des CMPF-Peaks beruhte auf einer Referenzsubstanz (Quelle: Dr. Dr. H. G. Wahl, Universität Tübingen) mit externer Standardmethode und einer CO-Chromatographie. Die Auswertung erfolgte über eine Höhenberechnung (Shimadzu Class VP Chromatographie Datasystem, Version 4.3).

2.7.3 Meßmethode für Indoxylsulfat

Die Methode für die HPLC-Messung von der Gesamtindoxylsulfat-Konzentration im Plasma, welche die freie und die proteingebundene Fraktion beinhaltet, wurde nach einer Methode von Niwa modifiziert [59].

Für die Probenvorbereitung wurden die Röhrchen für 5 Minuten bei 100°C erhitzt und nach Zentrifugation bei 40000 U/min für 1 Stunde bis zur Probenanalyse bei -80°C gelagert. Es wurden je 20 µl Probenvolumen über einen Auto-Injektor (SIL-6B, Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg) in den Chromatographen injiziert. Die Trennung erfolgte auf einer 250/4 Hypersil 120-5 ODS-Säule (Macherey-Nagel GmbH, Düren). Zur Elution mit einem Eluenten wurde eine isokratische Flussrate von 0,7 ml/min und eine UV-Absorption bei 280 nm gewählt. Das Eluent bestand aus 80/20 v/v 0,2 molarer Essigsäure/Acetonitril bei einem pH von 6,5 mit Triethylamin.

Die Identifikation fand mittels des 3-Indoxylsulfat-Kaliumsalzes der Firma Fluka (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Schweiz) statt. Die Auswertung erfolgte durch eine externe Standardmethode mittels Berechnung von Höhen.

2.7.4 Meßmethode für Pentosidin

Die HPLC-Meßmethode für Pentosidin wurde nach einer Methode von Takahashi modifiziert [162]. Das Prinzip dieser Methode beruht auf einer Säulenschalttechnik mit zwei Säulen. Dabei wird die zu bestimmende Probe zuerst über eine Vorsäule mit dem Eluenten A - aus Wasser-Acetonitril (50) und Heptafluorbuttersäure (30 mmol/L) bestehend - geleitet. Währenddessen wird die eigentliche Trennsäule mit dem Eluenten B, der aus Wasser-Acetonitril (200) und Heptafluorbuttersäure (30 mmol/L) zusammengesetzt ist, gespült. Nachdem die Pentosidinfraktion die Vorsäule passiert hat, wird sie über die nachfolgende Trennsäule geleitet und weiter separiert. Bis zur nächsten Probeninjektion wird währenddessen die Vorsäule wieder mit dem Eluenten A gewaschen und konditioniert.

Es wurde eine Bestimmung des gesamten Pentosidins durchgeführt. Sowohl die freie als auch die proteingebundene Form sind in der Messung enthalten. Für die Hydrolyse wurden die Plasmaröhrchen mit 6 molarer Salzsäure 1 h lang auf 110°C erhitzt. Die Gradiententrennung mit den 2 verschiedenen Eluenten (A und B) fand mittels HPLC unter Fluoreszenzdetektion statt. Die Wellenlänge betrug 335 nm für die Extinktion und

385 nm für die Emission. Für die Kalibrierung der HPLC-Methode stand eine Standardlösung mit definierter Konzentration zur Verfügung (Quelle: Monnier, V.M., Inst. Of Pathology, Case Western Reserve University, Cleveland, OH 44 106). Die Flussrate betrug 0,4 ml/min. Die Trennsäule bestand aus CC 150/4,6 Nucleosil 100-5 C18 (Macherey-Nagel GmbH, Düren). Die Vorsäule stammte von der Firma TosoHaas: TSKgel PW precolumn, 4,6 mm x 3,5 cm (TosoHaas, Montgomeryville, PA USA). Über einen Auto-Injektor (SIL-6B, Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg) wurden je 20 µl Probenvolumen injiziert. Die Auswertung erfolgte über eine Höhenberechnung der Peaks.

2.8 Mathematische Auswertung

Die Berechnung des Molaren Verhältnisses (MV) wurde durchgeführt, um mögliche Plasmaperverschiebungen von einer Kreislaufseite auf die andere und damit verbundene Konzentrationsänderungen (Ultrafiltration) auszuschließen. Das Molekulargewicht für Albumin wurde dabei mit 66500D angenommen [9].

Folgende Formeln bestimmen das Molare Verhältnis (MV) zwischen Toxin und Albumin (Alb):

Molares Verhältnis für CMPF

$$MV = \frac{CMPF(\mu mol / l) \times 66500(g / mol)}{Alb(g / l) \times 10^6}$$

Molares Verhältnis für Indoxylsulfat:

$$MV = \frac{IS(\mu mol / l) \times 66500(g / mol)}{Alb(g / l) \times 10^6}$$

Molares Verhältnis für Pentosidin:

$$MV = \frac{Pentosidin(nmol / l) \times 66500(g / mol)}{Alb(g / l) \times 10^9}$$

Weiterhin wurden Berechnungen zur entfernten Menge (EM) der urämischen Toxine im Plasma, zur Zunahme dieser Substanzen im Dialysat (ZD) und zur Clearance (CI) ange- stellt.

Die entfernte Menge (EM) im Plasma wurde nach folgender Formel berechnet. Dabei stellt P_t die Plasmakonzentration zum Zeitpunkt t und V das Volumen dar:

$$EM(\mu\text{mol}) = (P_{t_1}(\mu\text{mol}/l) - P_{t_2}(\mu\text{mol}/l)) \times V_{\text{Plasma}}(l)$$

Die Zunahme im Dialysat (ZD) wurde durch die folgende Formel ausgedrückt wobei De_t die Dialysatkonzentration am Dialysateingang zum Zeitpunkt t beschreibt und V das Volumen angibt:

$$ZD(\mu\text{mol}) = (De_{t_2}(\mu\text{mol}/l) - De_{t_1}(\mu\text{mol}/l)) \times V_{\text{Dialysat}}(l)$$

Die Clearance (CI) („Klärfähigkeit“) ist ein Maß für die Entfernbarekeit einer Substanz in einer bestimmten Zeiteinheit. In der üblichen medizinischen Deutung entspricht die renale Clearance einer Substanz dem fiktiven Plasmavolumen, das pro Zeiteinheit in der Niere von dieser Substanz gereinigt („gecleart“) wird.

Die Clearance (CI), die durch nachfolgende Formeln berechnet wird, beschreibt die Elimination einer Substanz bezogen auf die Plasmakonzentration dieser Substanz und wird durch den Quotienten aus der entfernten Menge (EM) und der „Area under the Curve“ (AUC) ausgedrückt:

$$CI(\text{ml}/\text{min}) = \frac{EM(\mu\text{mol})}{AUC\left(\frac{\mu\text{mol}}{l} \times \text{min}\right) \times 1000}$$

Die „Area Under the Curve“ (AUC) wurde wie unten gezeigt bestimmt. P gibt die Plasmakonzentration zum Zeitpunkt t an [163]:

$$AUC\left(\frac{\mu\text{mol}}{l} \times \text{min}\right) = ((t_2 - t_1(\text{min})) \times P_{t_2}(\mu\text{mol}/l)) + \left(\frac{((t_2 - t_1(\text{min})) \times (P_{t_1} - P_{t_2}(\mu\text{mol}/l)))}{2}\right)$$

2.9 Statistische Auswertung

Die statistischen Daten für alle Untersuchungen wurden mittels MS EXCEL (Windows, Version 2003) und SPSS (Statistik-Programm-System für die Sozialwissenschaften, Version 13.0 für Windows) erhoben.

Die arithmetischen Mittelwerte (MW) sind jeweils mit der einfachen Standardabweichung ($\pm s$) angegeben. Beim arithmetischen Mittelwert handelt es sich um die Summe der Messwerte geteilt durch deren Anzahl. Die Standardabweichung ist die Quadratwurzel aus der Varianz - der Summe der quadrierten Abweichungen aller Messwerte vom Mittelwert, geteilt durch Anzahl (n) der Beobachtungen minus eins (n-1).

Für unabhängige Stichproben, zum Beispiel für die Untersuchung der Konzentrationsverläufe in zwei verschiedenen Versuchsgruppen über die Zeit, wurde der Mann-Whitney U-Test genutzt. Dieser Test stellt ein parameterfreier (unbekannte Verteilung) Rangsummentest dar. Zur Darstellung von Unterschieden vor und nach den Versuchen innerhalb einer Gruppe wurde der parameterfreie Wilcoxon-Test verwendet, da hier gepaarte (abhängige) Stichproben vorlagen. Parameterfreie Tests wurden gewählt, weil bei den Versuchen eine unbekante Verteilung vorlag, die Homogenität der Daten nicht gewährleistet und die Versuchsanzahl niedrig war.

Von statistischer Signifikanz wurde ausgegangen bei einem $p < 0,05$.

3 Ergebnisse

Es werden die Werte und die statistischen Ergebnisse für die erste und die zweite Versuchsreihe aufgeführt. Die Einzeldaten sind jeweils den aufgeführten Tabellen im Anhang zu entnehmen. Zur Erklärung der mathematischen Berechnungen und der Statistikbegriffe wird auf die Formeln und Definitionen unter 2.8 und 2.9 verwiesen. Für die graphischen Darstellungen der Versuchsergebnisse wurde primär das Molare Verhältnis (MV) von Toxin zu Albumin gewählt, um eventuelle Ultrafiltrationseinflüsse zu eliminieren. Für die Hämodialysegruppe im Dialysat konnte das Molare Verhältnis nicht bestimmt werden, da die Albuminkonzentration für diese Gruppe 0 war und sich somit kein Quotient bilden ließ.

3.1 Erste Versuchsreihe mit Furansäure (CMPF) und Pentosidin

Die Ergebnisse für Albumin, CMPF und Pentosidin werden im Folgenden dargestellt. Angegeben wurden die Mittelwerte \pm Standardabweichung ($MW \pm s$) für die Hämodialyse- und die Albumindialysegruppe mit 10%-igem Albumin. Jede dieser Gruppen bestand aus 3 Einzelversuchen. In der ersten Versuchsreihe werden die Probenentnahmen zu den Zeitpunkten 0 min und 240 min ausgewertet.

3.1.1 Albumin

Der statistische Vergleich der Albuminwerte im Plasma zeigte keine Unterschiede zwischen der Hämodialyse- und der Albumindialysegruppe. In beiden Gruppen ergab sich ein, allerdings nicht-signifikanter, Anstieg der Albuminkonzentrationen über die Versuchszeit (Tabelle 7 und Tabelle 11 im Anhang). Auf der Dialysatseite war bei den Hämodialyse-Versuchen mit Substitutionslösung kein Albumin über eine Versuchsdauer von 4 Stunden messbar. Bei den Albumindialyseversuchen mit einer 10%-igen Albuminlösung variierten die Albuminwerte von maximal 10,92 g/dl bis minimal 9,14 g/dl (Tabelle 8 im Anhang).

3.1.2 CMPF im Plasma

Nach vier Stunden Hämodialyse bzw. Albumindialyse ergibt sich eine signifikante Abnahme von CMPF in den Albumindialyseversuchen, aber nicht in den Hämodialyseversuchen (Abbildung 11, Tabelle 13 im Anhang). Der Mann-Whitney U-Test für unabhängige Stichproben zeigte einen statistisch signifikanten Unterschied beim Vergleich der Hämodialyse- versus Albumindialysegruppe (Abbildung 11). Der Vergleich der CMPF-Werte vor und nach der Dialyse nach Wilcoxon erbrachte keine statistische Signifikanz (Tabelle 15 im Anhang).

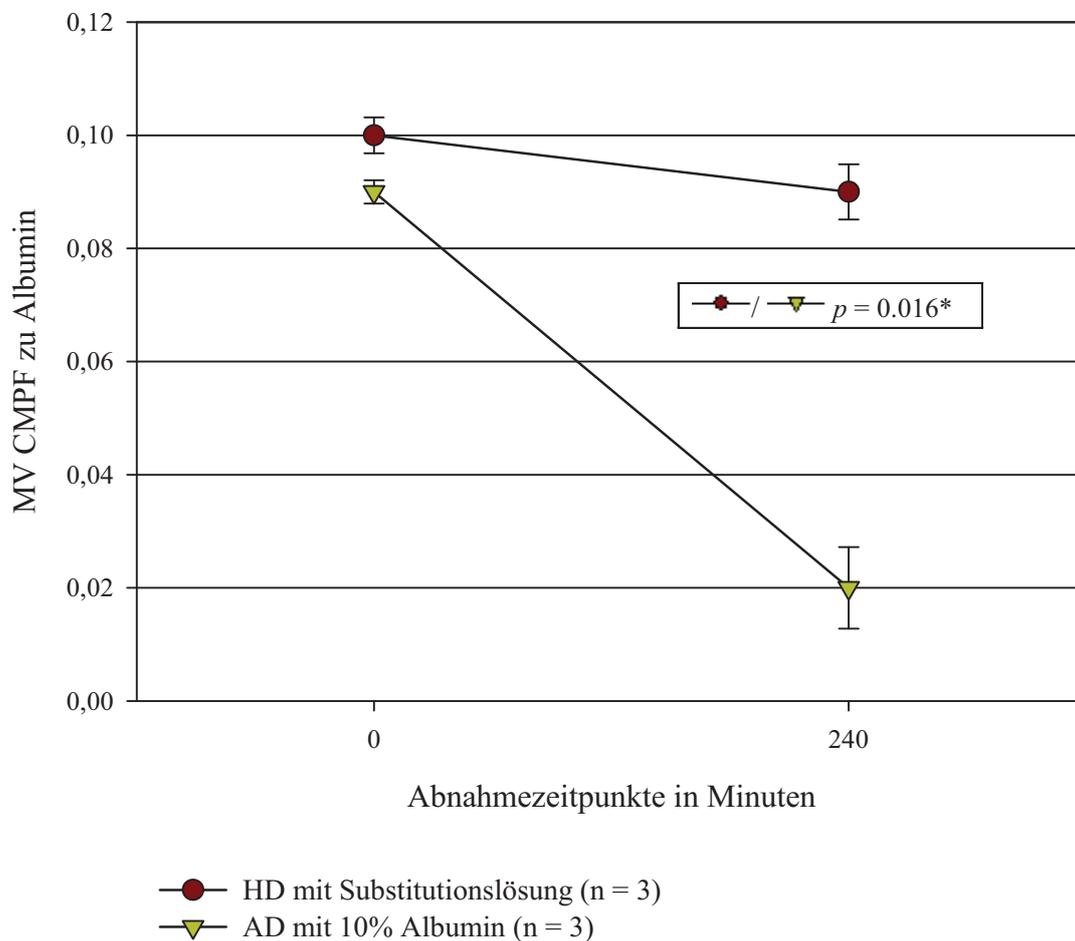


Abbildung 11: Molares Verhältnis (MV) von CMPF zu Albumin im Plasma, MW \pm s
HD=Hämodialyse, AD=Albumindialyse, CMPF=3-Carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropion-
säure, n=Versuchszahl

Es wurde des Weiteren die entfernte Menge von CMPF aus dem Plasma nach vier Stunden Dialyse berechnet. Bei der Hämodialyse wurde eine geringe CMPF-Zunahme von ca. 1 μmol am Ende der Dialyse nachgewiesen, was sich in einem negativen Wert ausdrückt. Unter der Albumindialyse wurden hingegen 6 μmol CMPF aus dem Plasma entfernt ($p=0,05$) (Tabelle 16 im Anhang).

3.1.3 Pentosidin im Plasma

Da die Ausgangswerte für die Hämodialysegruppe verglichen mit der 10% Albumindialysegruppe nahezu signifikant unterschiedlich waren ($p=0.05$), wurden nur abhängige Stichproben der jeweiligen Versuchsgruppe auf Unterschiede vor und nach der Dialyседauer von 4 Stunden untersucht (Abbildung 12, Tabelle 9 im Anhang). Mit dem parameterfreien Wilcoxon-Test zeigten sich auch für das Molare Verhältnis weder für die Hämodialyse- noch für die Albumindialysegruppe bedeutende Differenzen (Abbildung 12, Tabelle 11 im Anhang).

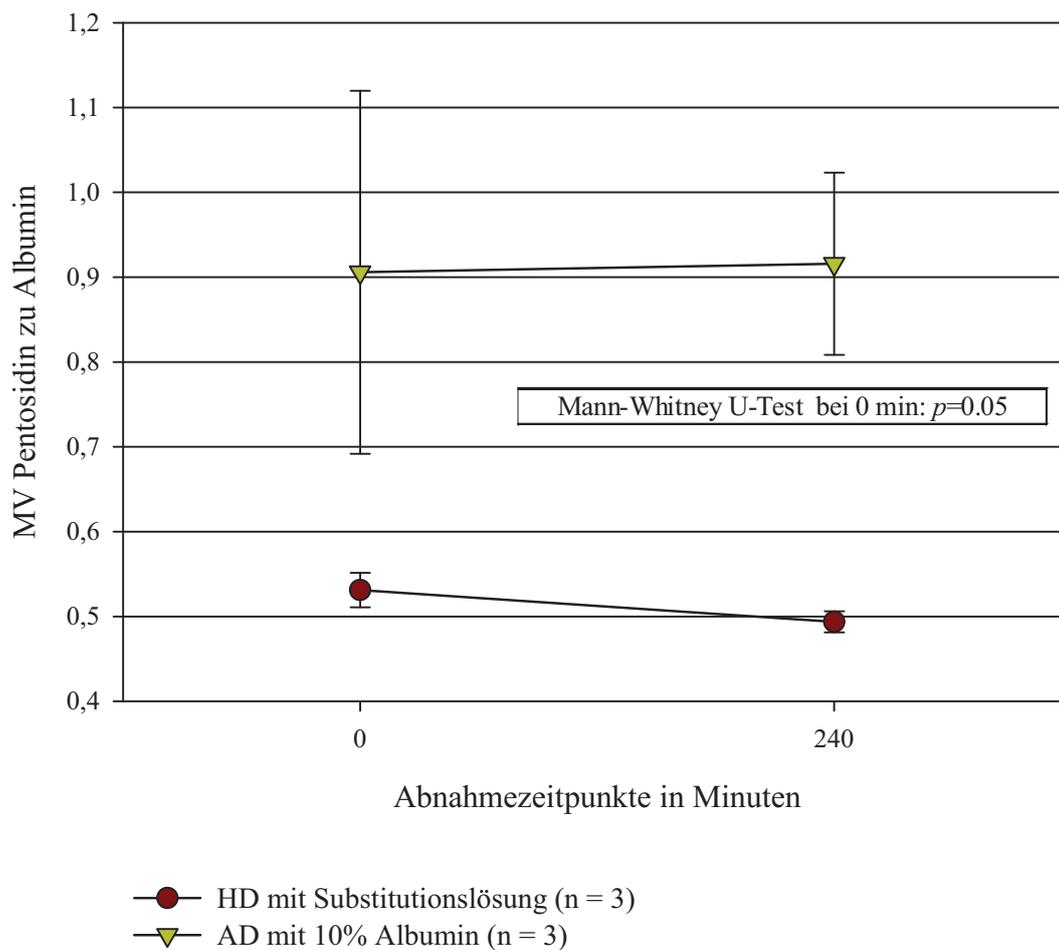


Abbildung 12: Molares Verhältnis (MV) von Pentosidin zu Albumin im Plasma, MW \pm s
 HD=Hämodialyse, AD=Albumindialyse, n=Versuchszahl

Wie für CMPF wurde auch für Pentosidin die entfernte Menge aus dem Plasma berechnet. Das Ergebnis zeigt, dass weder unter Hämodialyse noch unter Albumindialyse Pentosidin aus dem Plasma entfernt wurde. Es ist jedoch ein Anstieg der Pentosidinkonzentration nach vier Stunden Dialyse zu verzeichnen (Tabelle 12 im Anhang).

3.1.4 Pentosidin und CMPF im Dialysat

Um eine eventuelle Adsorption des Toxins an die Membran vom Durchtritt durch die Dialysatormembran zu unterscheiden, wurde die Gesamtmenge des Toxins im Dialysat vor und nach der Hämo- beziehungsweise Albumindialyse untersucht (Tabelle 10 und Tabelle 14 im Anhang). Dabei zeigte sich, dass vor und nach der Hämodialyse kein

CMPF im Dialysat detektierbar war, wohingegen bei den Albumindialyseversuchen ein statistisch signifikanter Anstieg der Gesamtmenge von CMPF von ca. 5,4 μmol im Dialysat zu verzeichnen war (Abbildung 13). Die Pentosidinmenge nahm weder unter Hämodialyse noch unter Albumindialyse im Dialysat signifikant zu oder ab (Abbildung 13).

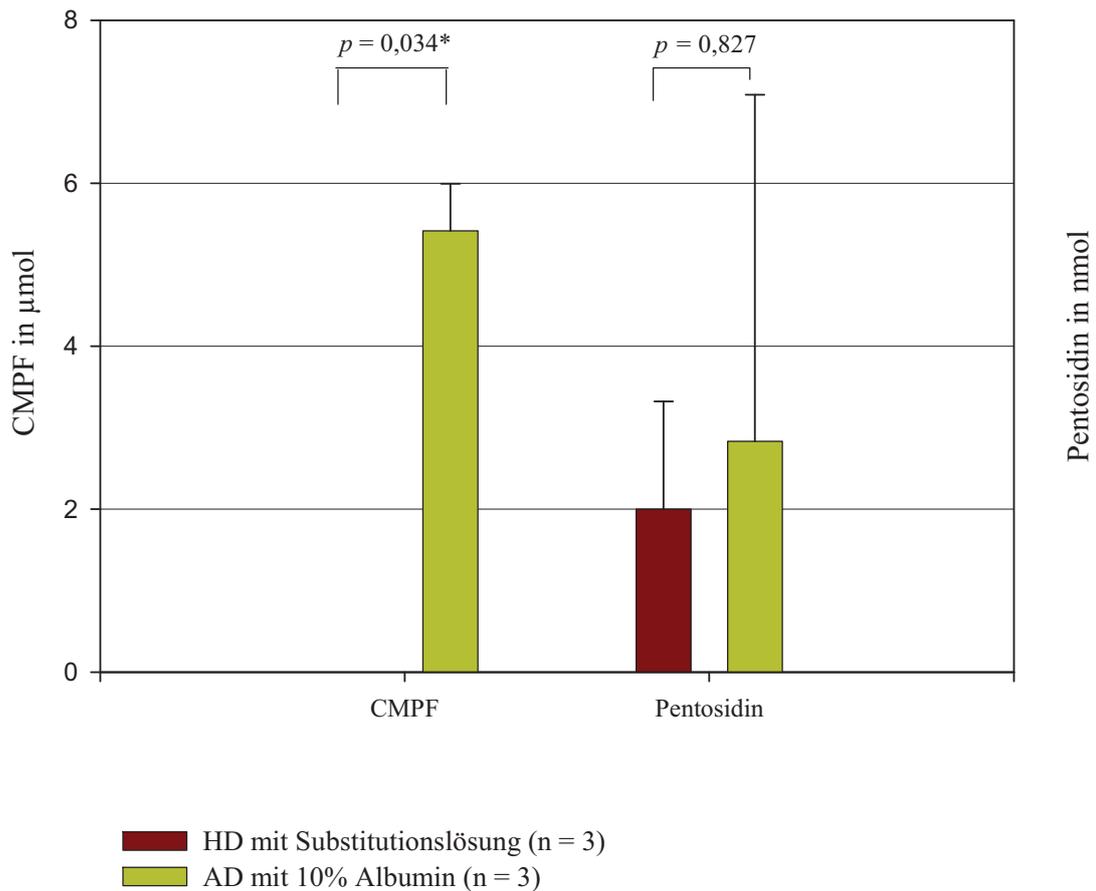


Abbildung 13: Gesamtmenge von CMPF und Pentosidin im Dialysat nach 4 Stunden Dialysedauer, MW \pm s

HD=Hämodialyse, AD=Albumindialyse, CMPF=3-Carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionsäure, n=Versuchszahl

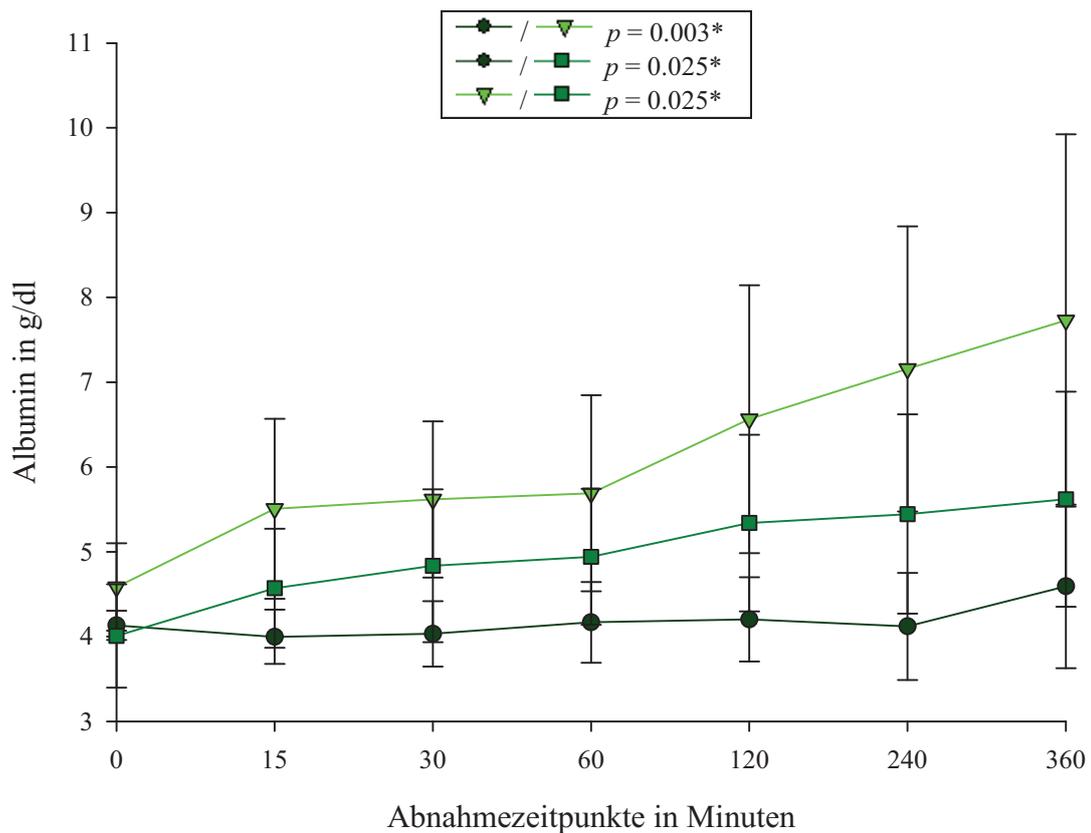
3.2 Zweite Versuchsreihe mit Furansäure (CMPF) und Indoxylsulfat

Es werden die Resultate im Plasma und Dialysat für die zweite Versuchsreihe dargestellt. Angegeben wurden die Mittelwerte \pm Standardabweichung (MW \pm s) für die Hämodialyse-, die 10% Albumindialyse- und die 20% Albumindialysegruppe, wobei jede dieser Gruppen aus 4 Einzelversuchen bestand. Wie in der ersten Versuchsreihe wurden die Werte für Albumin und CMPF angegeben, jedoch wurde in der zweiten Versuchsreihe anstelle von Pentosidin Indoxylsulfat bestimmt. Weiterhin wurden mehr Abnahmezeitpunkte als in der ersten Versuchsreihe ausgewertet (siehe 2.4).

3.2.1 Albumin

3.2.1.1 Albumin im Plasma

Die Abbildung 14 gibt die Albuminkonzentration im Plasma für die einzelnen Gruppen zu dem jeweiligen Abnahmezeitpunkt über 6 Stunden Versuchsdauer wieder. Mit dem parameterfreien Mann-Whitney U-Test wurde auf Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Gruppen über den Zeitverlauf von 6 Stunden geprüft. Dabei ergaben sich zwischen allen Gruppen signifikante Unterschiede im Plasma (Abbildung 14, Tabelle 17 im Anhang).



- HD mit Substitutionslösung (n = 4)
- ▼ AD mit 10% Albumin (n = 4)
- AD mit 20% Albumin (n = 4)

Abbildung 14: Albuminkonzentration im Plasma, MW \pm s

HD=Hämodialyse, AD=Albumindialyse, n=Versuchsanzahl

3.2.1.2 Albumin im Dialysat

Die Ergebnisse für die Albuminkonzentrationen der einzelnen Gruppen auf der Dialysatseite sind in der Abbildung 15 graphisch dargestellt. Angegeben sind dabei die Werte am Dialysateingang (D_E) zu den abgenommenen Zeitpunkten (Tabelle 18 im Anhang). In allen Gruppen ergaben sich keine signifikanten Änderungen über den Versuchszeitraum.

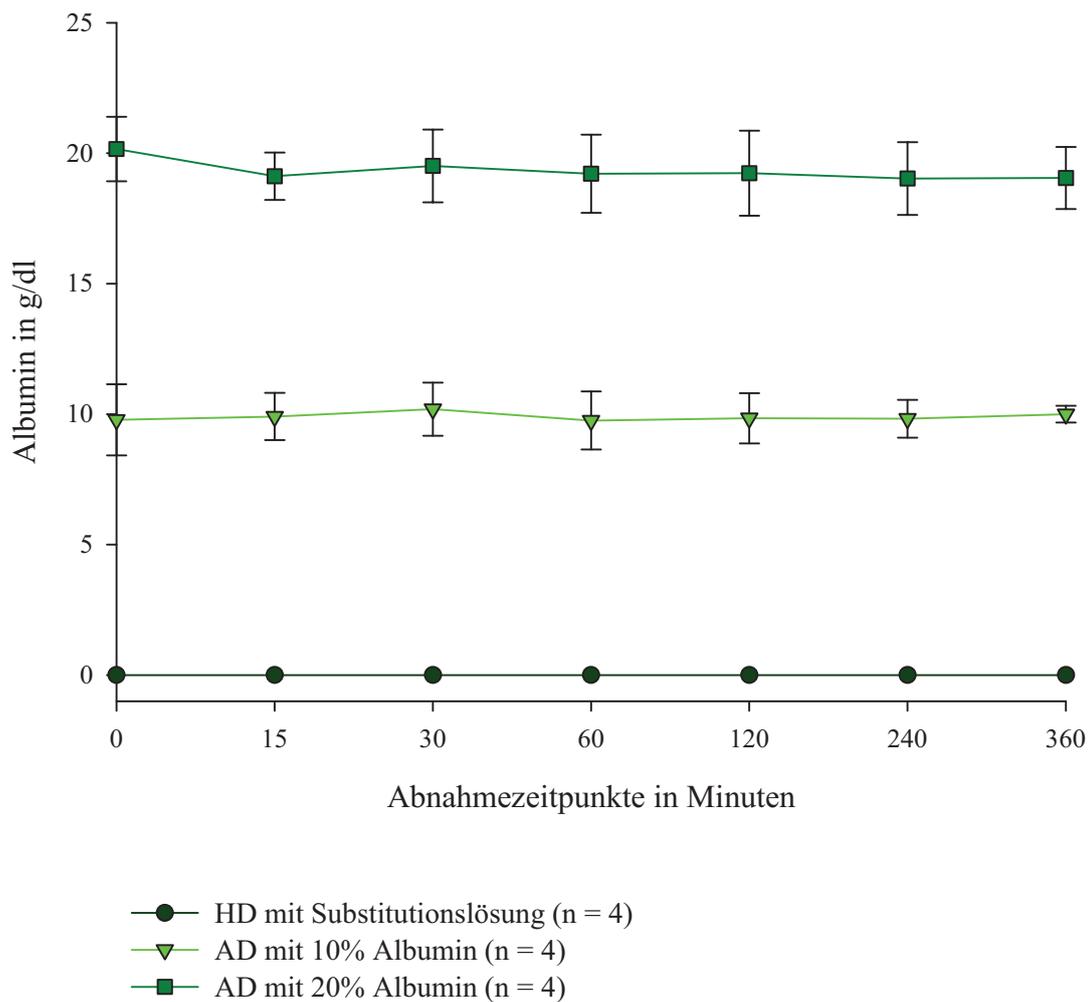


Abbildung 15: Albuminkonzentration im Dialysat, MW \pm s

HD=Hämodialyse, AD=Albumindialyse, n=Versuchsanzahl

3.2.2 CMPF

3.2.2.1 CMPF im Plasma

Die folgende Tabelle enthält die CMPF-Mittelwerte \pm Standardabweichung für jeden Abnahmezeitpunkt der 3 Gruppen auf der Plasmaseite (Tabelle 3). Die Einzelwerte der Versuche sind im Anhang aufgelistet (Tabelle 19, Anhang).

Tabelle 3: CMPF-Konzentration in $\mu\text{mol/l}$ im Plasma: Mittelwerte \pm Standardabweichung

Zeit in Minuten	HD	10% AD	20% AD
0	38,43 \pm 4,94	42,95 \pm 3,34	35,13 \pm 10,99
15	33,70 \pm 2,99	8,23 \pm 2,89	7,25 \pm 5,04
30	32,88 \pm 3,14	5,40 \pm 0,43	3,75 \pm 0,88
60	33,13 \pm 1,88	5,23 \pm 0,43	3,85 \pm 0,86
120	32,08 \pm 2,78	5,50 \pm 0,57	3,98 \pm 0,91
240	32,15 \pm 3,58	5,25 \pm 0,55	4,05 \pm 0,97
360	33,58 \pm 4,01	6,05 \pm 0,91	4,08 \pm 1,27

HD=Hämodialyse, AD=Albumindialyse, CMPF=3-Carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropion-säure

Da die Mittelwerte der Albumine im Plasma zwischen den 3 Gruppen signifikante Unterschiede aufwiesen, wurde für die weitere Betrachtung der Ergebnisse das Molare Verhältnis (MV) berechnet, da hier mögliche Konzentrationsänderungen durch Volumenverschiebung entfallen. Das Molare Verhältnis, das den Quotienten von CMPF und Albumin darstellt, wurde mit der Formel unter 2.8 berechnet. Die Abbildung 16 zeigt den zeitlichen Verlauf des Molaren Verhältnisses für die 3 Gruppen mit Angabe der *p*-Werte. Es ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Hämodialyse- und der 20% Albumindialysegruppe. Hingegen bestanden keine Unterschiede zwischen den beiden Albumindialysegruppen. Im Vergleich der Hämodialyse- und der 10% Albumindialysegruppe war optisch ein deutlicher Abfall der Albumindialysegruppe erkennbar, statistisch signifikant war dieser Abfall jedoch nur im Vergleich der Endpunkte (Tabelle 26 im Anhang). Zum Zeitpunkt 0 Minuten waren alle Gruppen gleich (Tabelle 25).

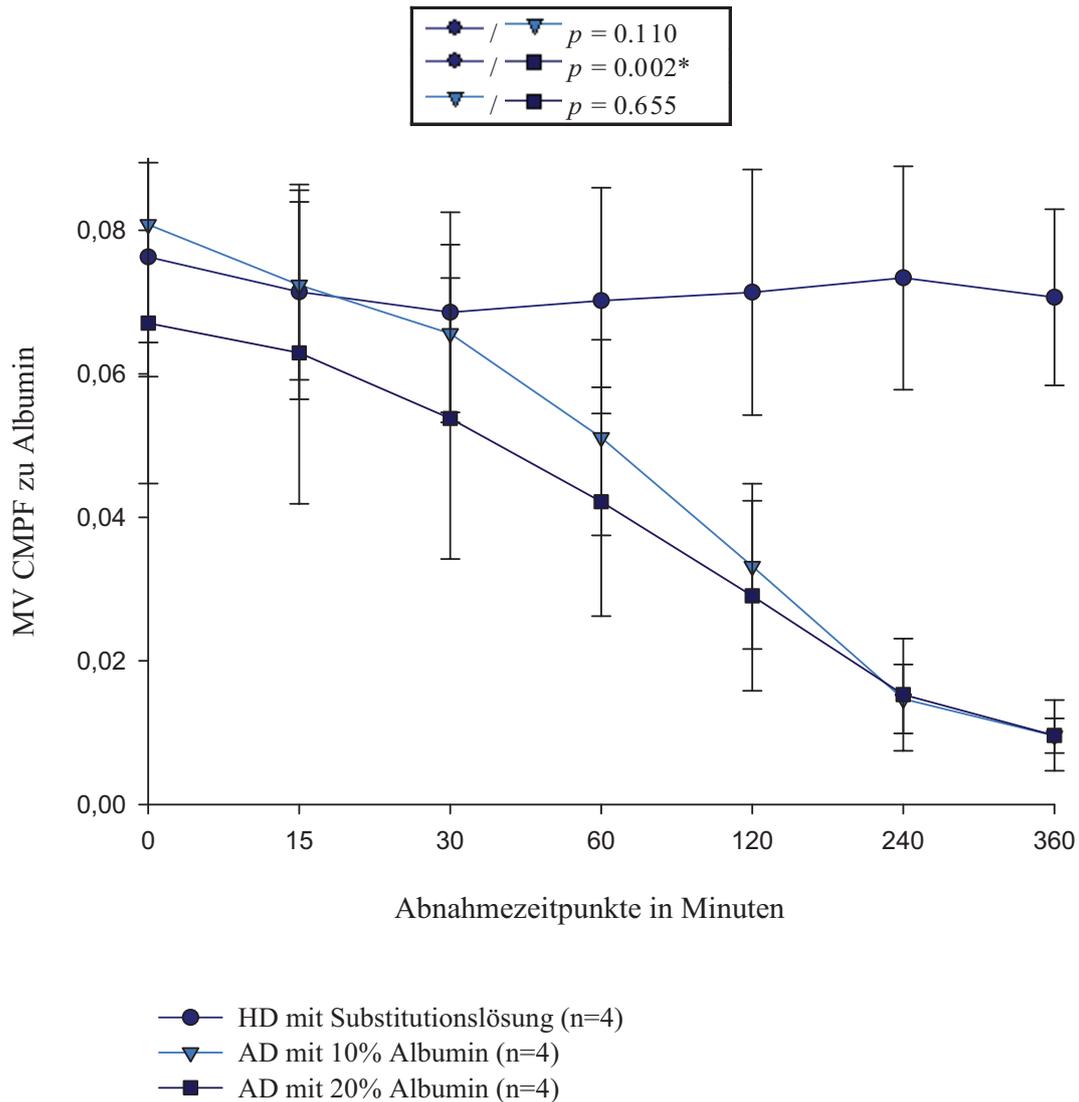


Abbildung 16: Molares Verhältnis (MV) von CMPF zu Albumin im Plasma, MW \pm s
 HD=Hämodialyse, AD=Albumindialyse, CMPF=3-Carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropion-
 säure, n=Versuchszahl

3.2.2.2 CMPF im Dialysat

Die folgende Abbildung stellt die CMPF-Konzentrationen im Dialysat für die verschiedenen Gruppen (n=4 je Gruppe) zu den abgenommenen Zeitpunkten dar (Abbildung 17,

Tabelle 20 im Anhang). Der Vergleich der 3 Gruppen mit dem Mann-Whitney U-Test zeigte signifikante Unterschiede bei den CMPF-Konzentrationen im Dialysat zwischen den Albumin- und der Hämodialysegruppen (Abbildung 17). Die Albumindialysegrup-

pen wiesen untereinander keinen Unterschied auf.

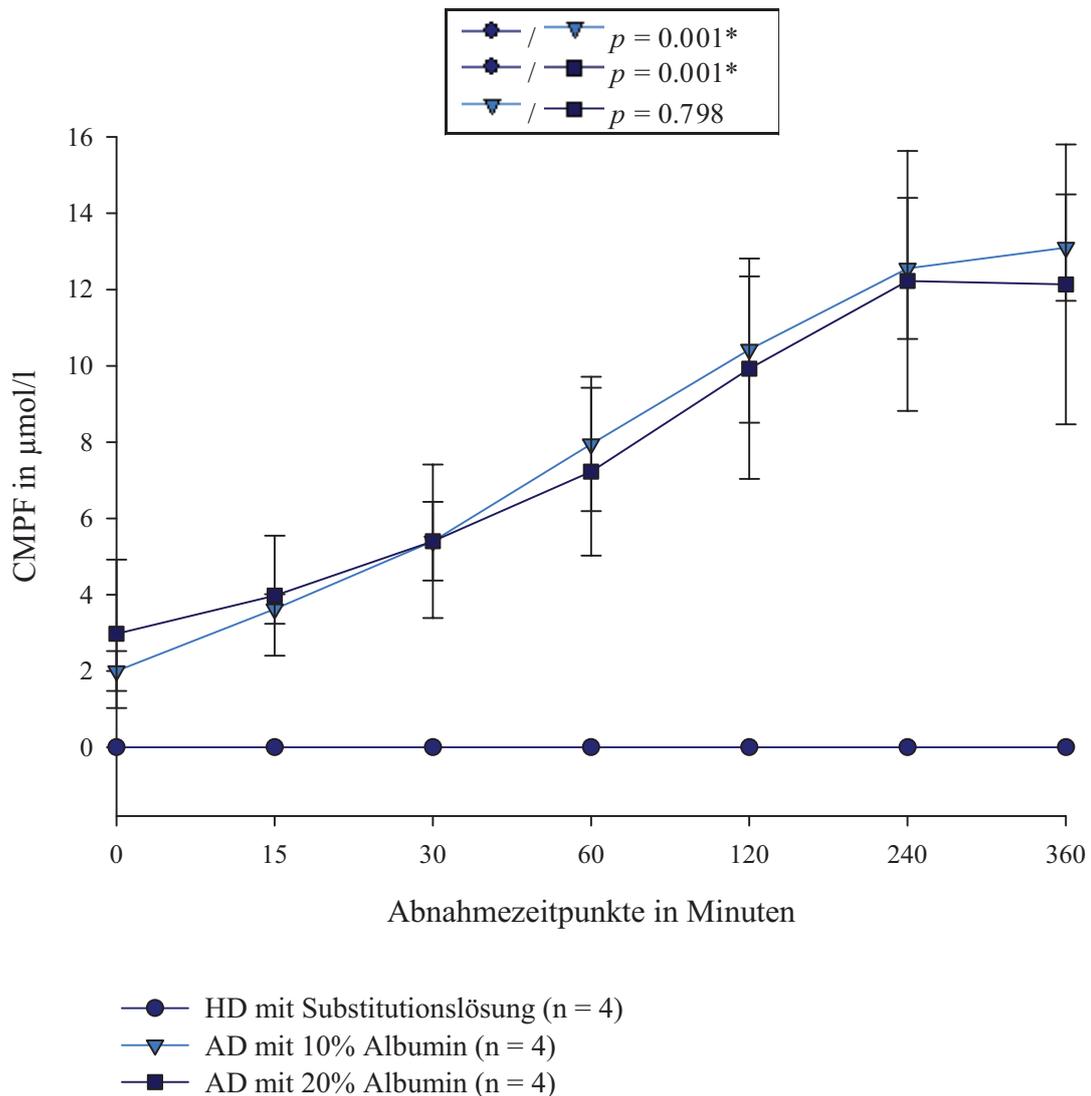


Abbildung 17: CMPF-Konzentration im Dialysat, MW \pm s

HD=Hämodialyse, AD=Albumindialyse, CMPF=3-Carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropion-säure, n=Versuchszahl

3.2.2.3 Clearance von CMPF

Die Clearance von CMPF wurden nach der Formel, die unter 2.8 angegeben ist, berechnet. Dazu wurden für jeden der 12 Einzelversuche 6 Clearance-Werte über die Zeit gemittelt und daraus die Mittelwerte \pm Standardabweichung für die einzelnen Gruppen bestimmt. Weiterhin wurden die gemittelten Clearances der verschiedenen Gruppen mit dem Mann-Whitney U-Test untereinander verglichen. Die statistische Auswertung der

Clearance-Werte erbrachte keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen. Die folgende Abbildung fasst diese Ergebnisse zusammen (Abbildung 18).

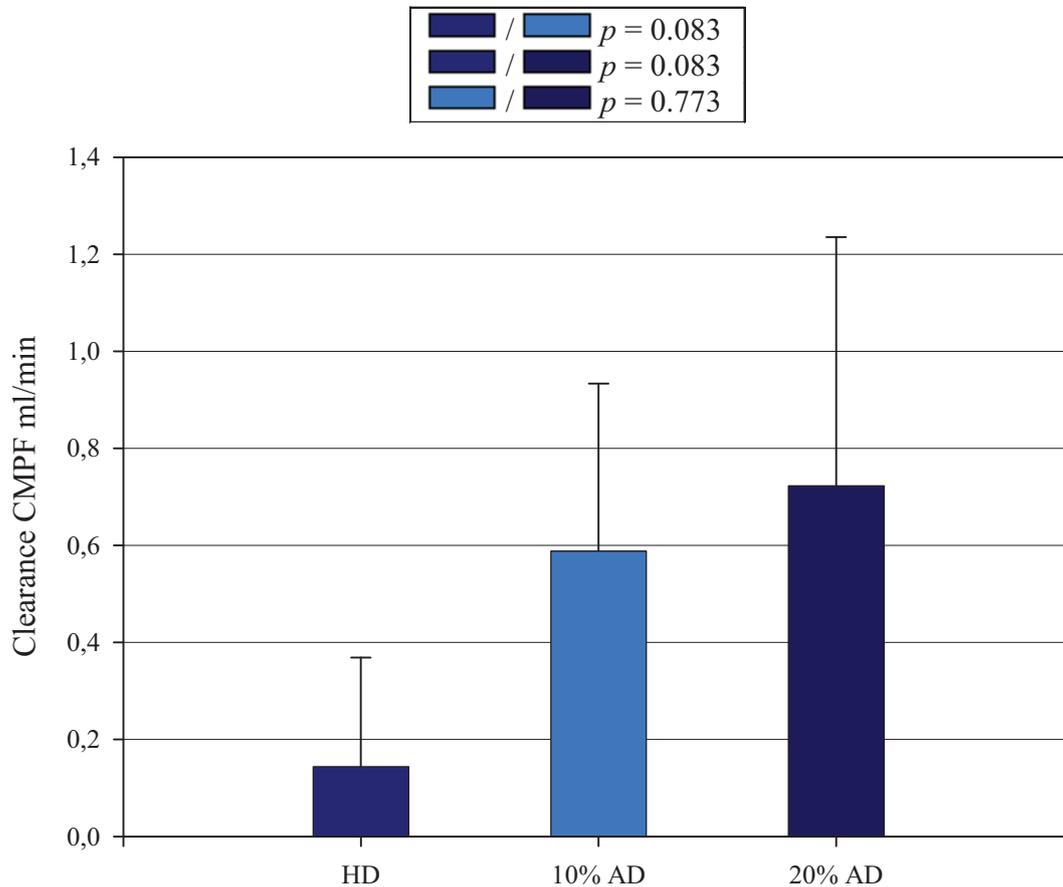


Abbildung 18: Clearance von CMPF über 6h Dialysedauer in ml/min, MW ± s

HD=Hämodialyse, AD=Albumindialyse, CMPF=3-Carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropion-säure, n=3 je Versuchsgruppe

3.2.2.4 CMPF - Entfernte Menge im Plasma und Zunahme im Dialysat nach 6 Stunden Dialysedauer

Folgende Abbildung zeigt die Ergebnisse für die entfernte Menge von CMPF aus dem Plasma gegenüber der Zunahme von CMPF im Dialysat (Abbildung 19). Angegeben sind die Mittelwerte ± Standardabweichung. In der Hämodialysegruppe war CMPF nicht im Dialysat nachweisbar. Die Auswertung der Statistik zeigt signifikant entfernte Mengen von CMPF im Plasma und Zunahmen im Dialysat in den Albumindialysegrup-

pen (Tabelle 21, Anhang).

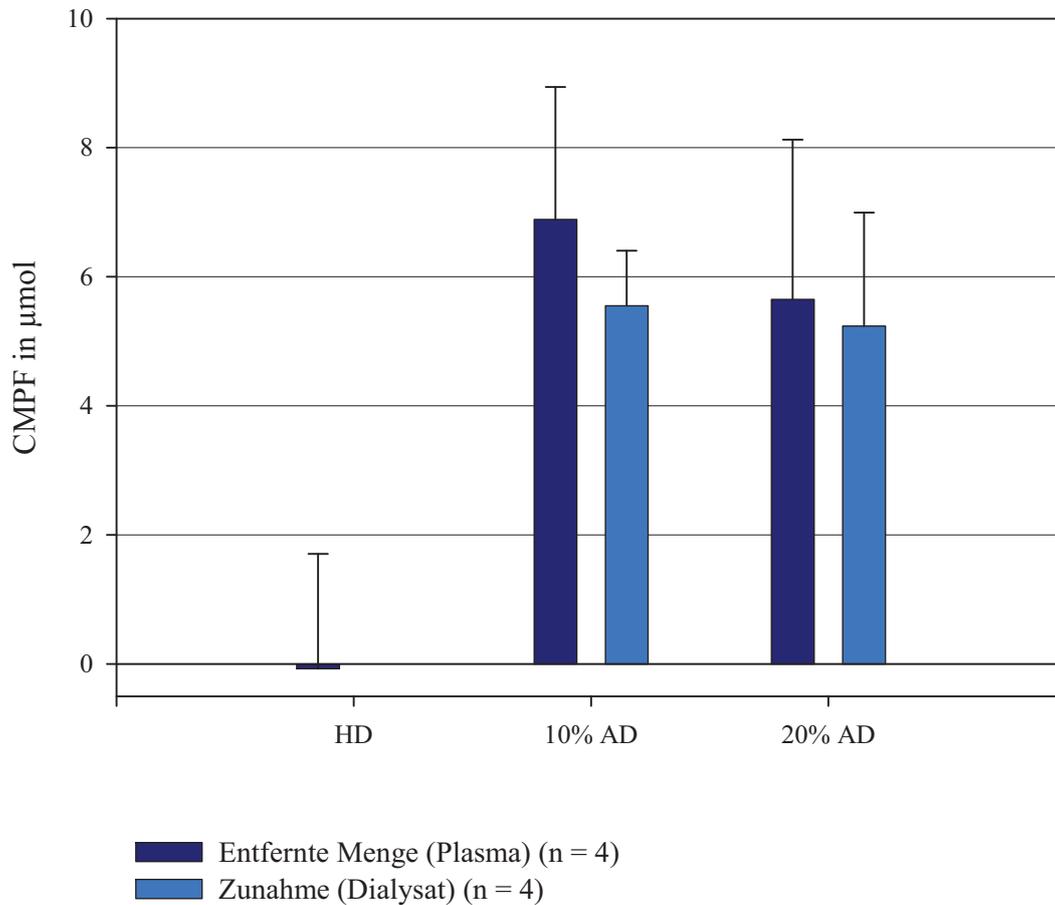


Abbildung 19: Entfernte Menge und Zunahme von CMPF nach 6 h, MW \pm s

HD=Hämodialyse, AD=Albumindialyse, CMPF=3-Carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropion-säure, n=Versuchszahl, *p*-Werte siehe Tabelle 21 im Anhang

3.2.3 Indoxylsulfat

3.2.3.1 Indoxylsulfat im Plasma

In der nachfolgenden Tabelle sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von Indoxylsulfat für die Hämodialyse- und die Albumindialysegruppen mit 10%-iger und 20%-iger Albuminkonzentration zu den abgenommenen Zeiten im Plasma zusammengefasst (Tabelle 4, Tabelle 22 im Anhang).

Tabelle 4: Indoxylsulfatkonzentration in $\mu\text{mol/l}$ im Plasma zu den abgenommenen Zeitpunkten: Mittelwerte \pm Standardabweichung

Zeit in Minuten	HD	10% AD	20% AD
0	38,43 \pm 4,94	42,95 \pm 3,34	35,13 \pm 10,99
15	33,70 \pm 2,99	8,23 \pm 2,89	7,25 \pm 5,04
30	32,88 \pm 3,14	5,40 \pm 0,43	3,75 \pm 0,88
60	33,13 \pm 1,88	5,23 \pm 0,43	3,85 \pm 0,86
120	32,08 \pm 2,78	5,50 \pm 0,57	3,98 \pm 0,91
240	32,15 \pm 3,58	5,25 \pm 0,55	4,05 \pm 0,97
360	33,58 \pm 4,01	6,05 \pm 0,91	4,08 \pm 1,27

HD=Hämodialyse, AD=Albumindialyse

Für die statistischen Vergleiche der Gruppen wurde das Molare Verhältnis von Indoxylsulfat zu Albumin verwendet. Abbildung 20 zeigt den Verlauf des Molaren Verhältnisses über 6 Stunden. Weiterhin enthält die Abbildung die errechneten p -Werte vom Vergleich der Mittelwerte zwischen den Gruppen mit dem Mann-Whitney U-Test über die Zeit. Es ergaben sich dabei signifikante Unterschiede bei der Betrachtung der Hämodialyse- gegen die Albumindialysegruppe mit 10%-igem Albumin und bei der Hämodialyse- gegen die Albumindialysegruppe mit 20%-igem Albumin. Dagegen bestand kein signifikanter Unterschied bei der Betrachtung der beiden Albumindialysegruppen. Zu Beginn der Versuche zum Zeitpunkt 0 Minuten waren alle Gruppen gleich (Tabelle 25).

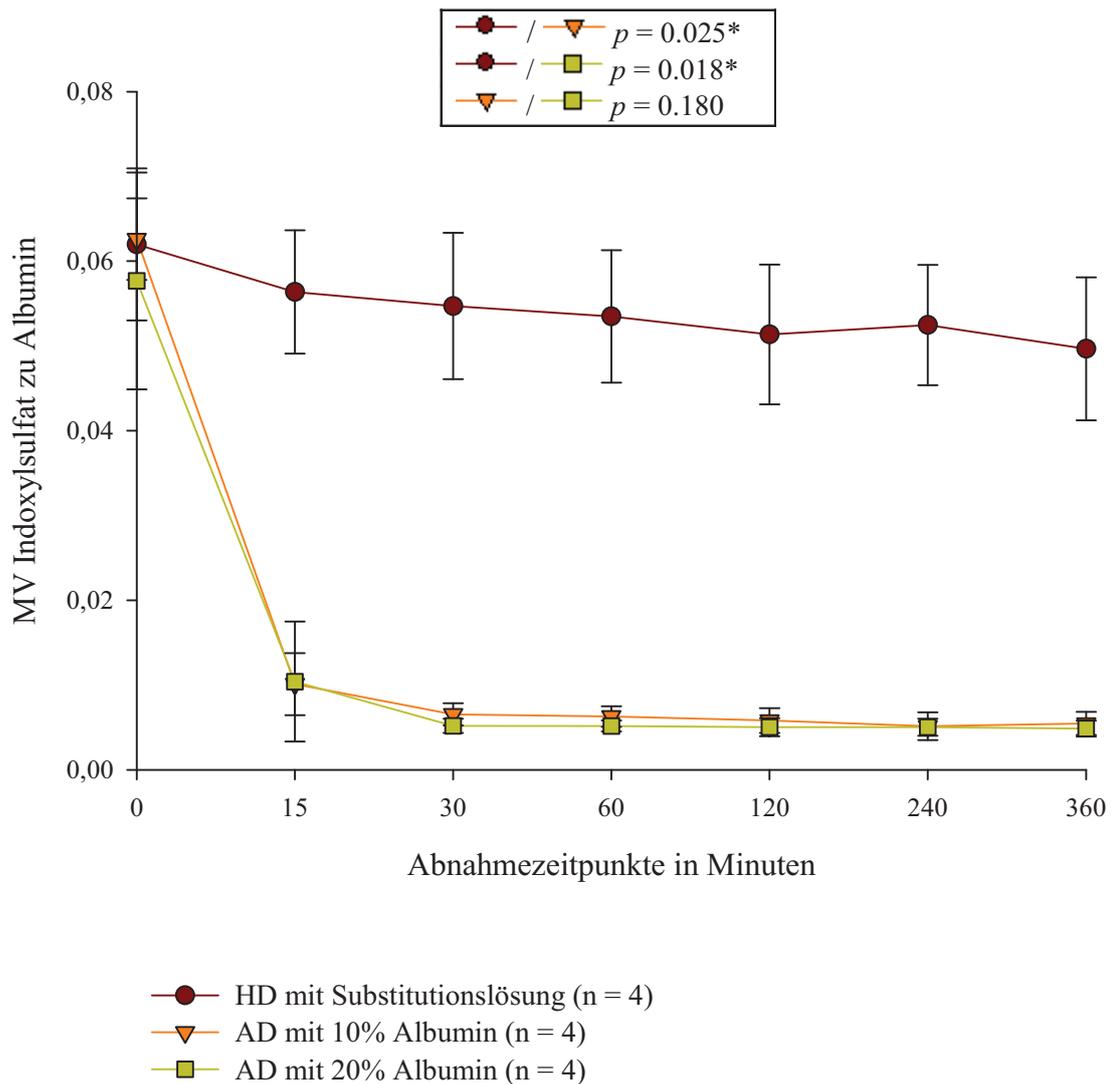


Abbildung 20: Molares Verhältnis (MV) von Indoxylsulfat zu Albumin im Plasma, MW \pm s
 HD=Hämodialyse, AD=Albumindialyse, n=Versuchszahl

3.2.3.2 Indoxylsulfat im Dialysat

Abbildung 21 stellt die Mittelwerte \pm Standardabweichung der Indoxylsulfatkonzentration im Dialysat für die verschiedenen Gruppen (n=4 je Gruppe) zu den abgenommenen Zeitpunkten dar (Tabelle 23, Anhang).

Der Vergleich der 3 Gruppen mit dem Mann-Whitney U-Test erbrachte signifikante Unterschiede bei den Indoxylsulfatkonzentrationen im Dialysat zwischen allen 3 Gruppen (Abbildung 21). Auch bei der Betrachtung des Molaren Verhältnisses ließ sich der Unterschied zwischen der Albumindialysegruppe mit 10%-igem und 20%-igem Albu-

min zeigen. Das Molare Verhältnis für die Hämodialysegruppe konnte nicht dargestellt werden, da die Albuminkonzentration für diese Gruppe 0 war und sich somit kein Quotient aus Indoxylsulfat und Albumin bilden ließ.

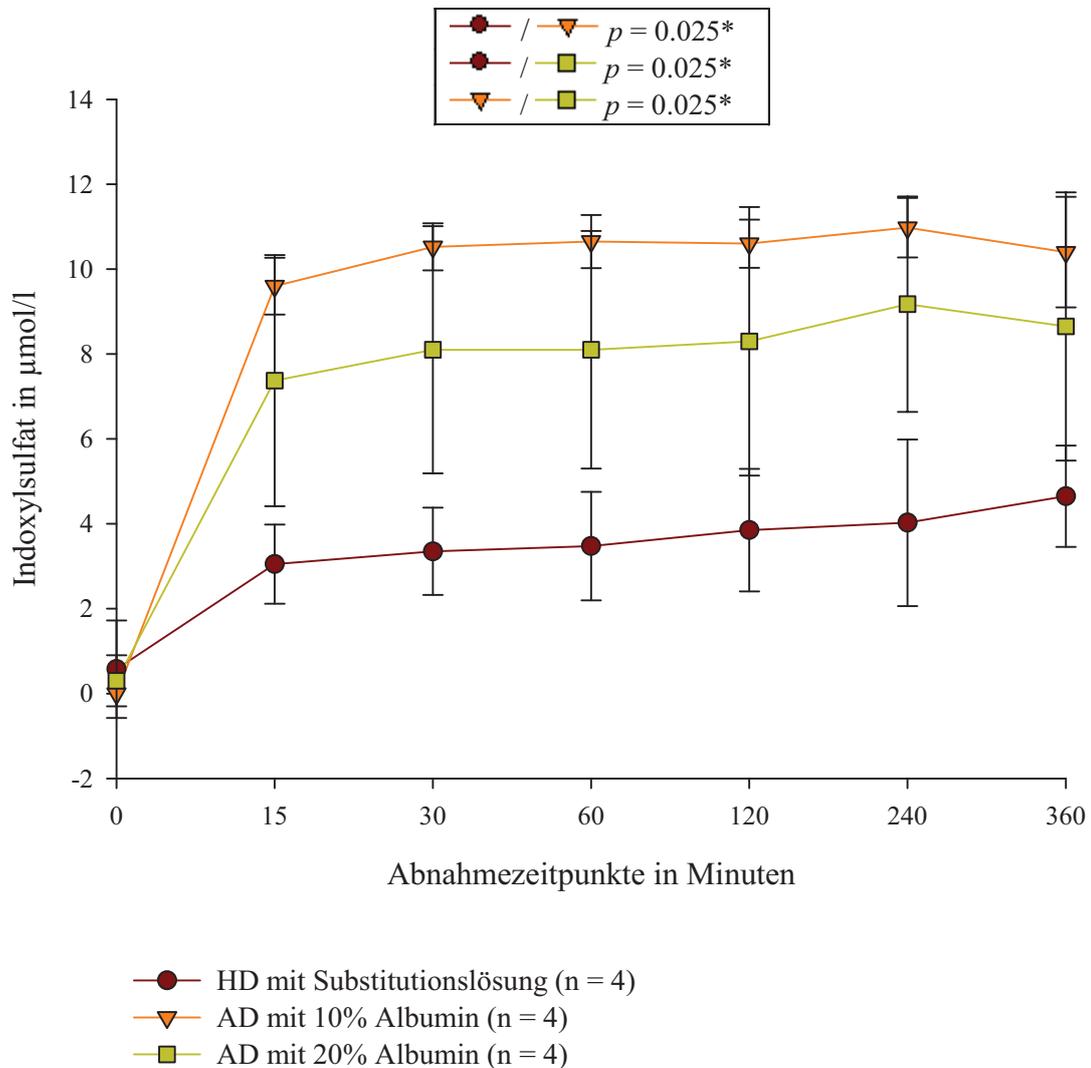


Abbildung 21: Indoxylsulfatkonzentration im Dialysat, MW \pm s

HD=Hämodialyse, AD=Albumindialyse, n=Versuchszahl

3.2.3.3 Clearance von Indoxylsulfat

Die Clearancewerte für Indoxylsulfat wurden nach der Formel, die unter 2.8 angegeben ist, berechnet. Dazu wurden für jeden der 12 Einzelversuche 6 Clearances über die Zeit

gemittelt und daraus die Mittelwerte \pm Standardabweichung für die einzelnen Gruppen bestimmt. Weiterhin wurden die gemittelten Clearances der verschiedenen Gruppen mit dem Mann-Whitney U-Test untereinander verglichen. Dabei stellten sich beim Vergleich der Hämodialyse- mit den beiden Albumindialysegruppen signifikante Unterschiede heraus. Es bestand kein Unterschied bei den Clearance-Werten zwischen den Albumindialysegruppen. Die folgende Abbildung fasst diese Ergebnisse zusammen (Abbildung 22).

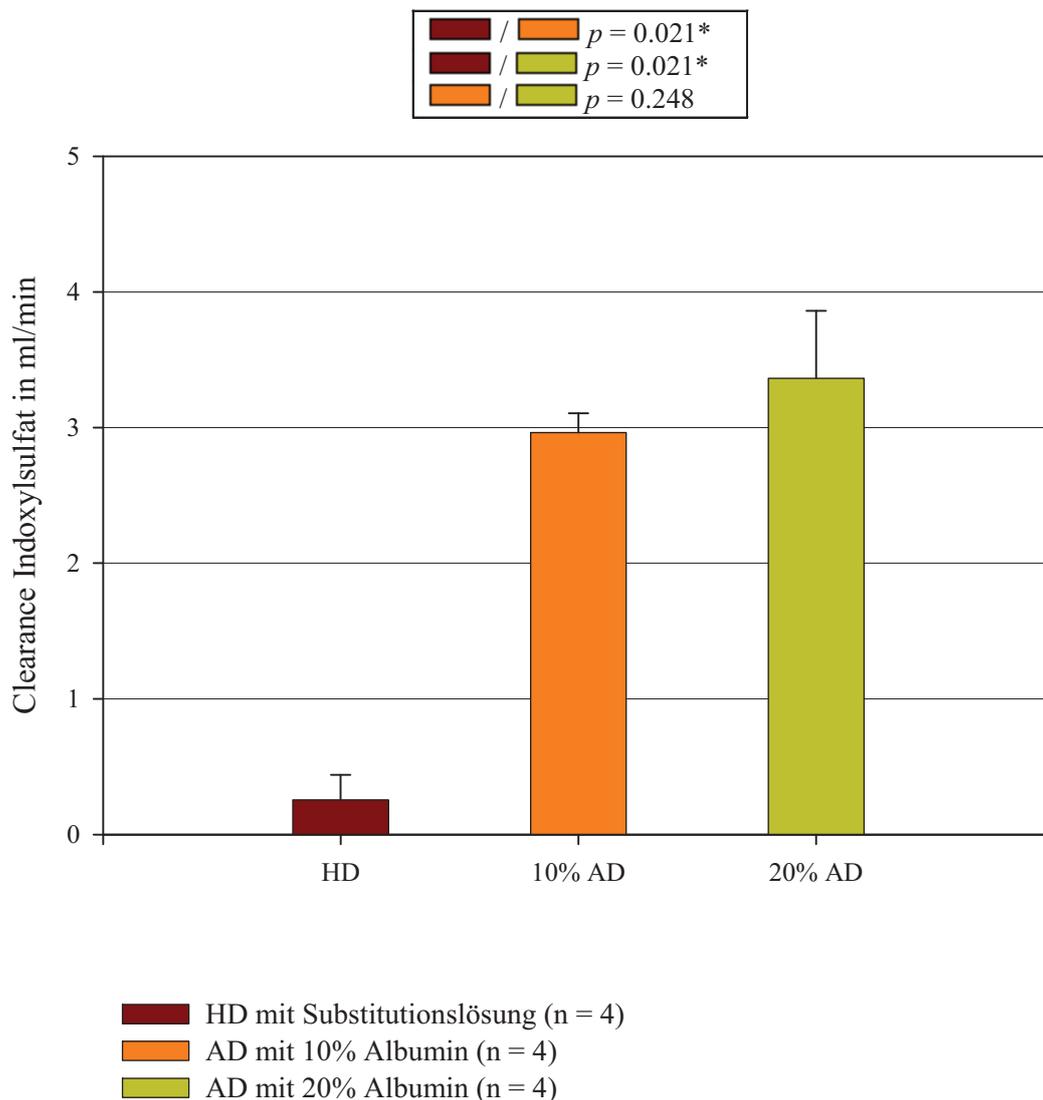


Abbildung 22: Clearance von Indoxylsulfat über 6 h in ml/min, MW \pm s
 HD=Hämodialyse, AD=Albumindialyse, IS=Indoxylsulfat, n=Versuchszahl

3.2.3.4 Indoxylsulfat - Entfernte Menge im Plasma und Zunahme im Dialysat nach 6 Stunden Dialysedauer

Die Werte für die entfernte Menge von Indoxylsulfat aus dem Plasma und die Zunahme an Indoxylsulfat im Dialysat nach 6 Stunden Dialysedauer sind im Folgenden angegeben (Abbildung 23). Die Formeln hierzu sind dem Kapitel 2.8 zu entnehmen. Die statistische Auswertung mit dem Mann-Whitney U-Test zeigte signifikante Änderungen von Indoxylsulfat unter der Albumindialyse verglichen mit der konventionellen Hämodialyse. Die Albumindialysen mit 10%-igem oder 20%-igem Albumin zeigten untereinander hingegen keine Unterschiede (Tabelle 24).

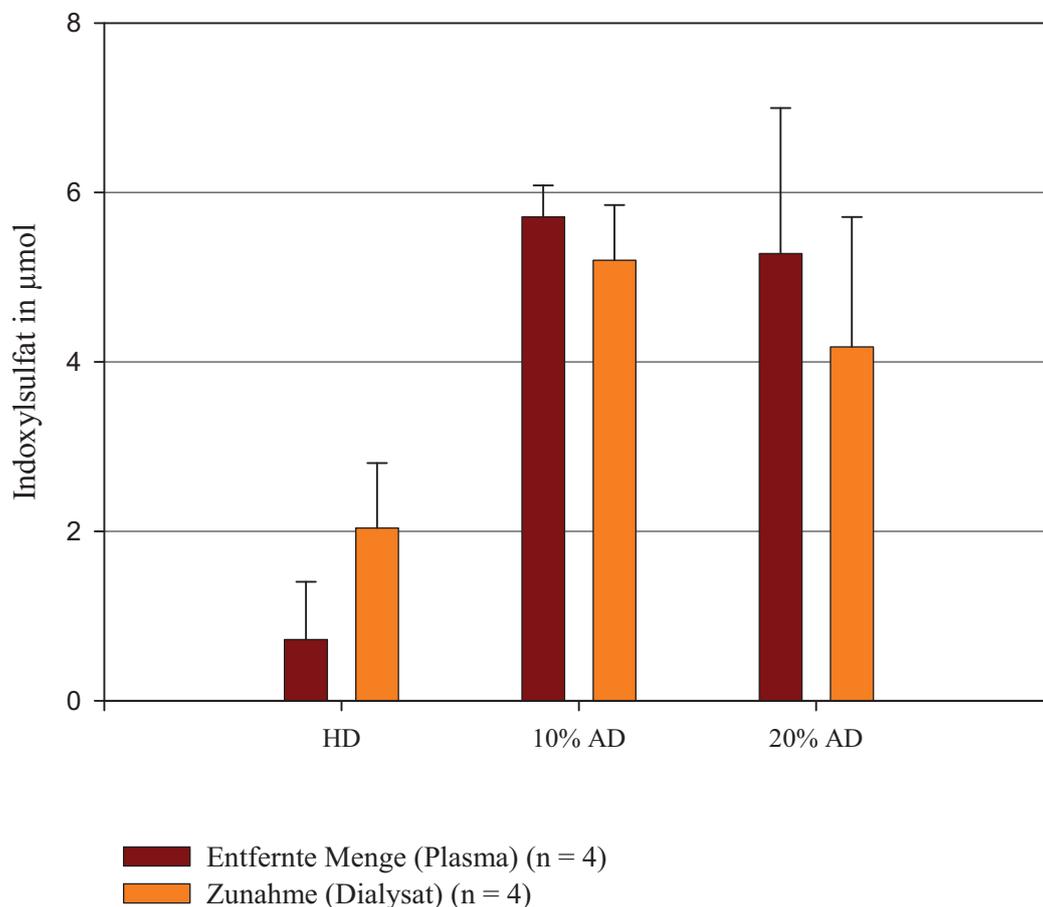


Abbildung 23: Entfernte Menge und Zunahme von Indoxylsulfat nach 6 Stunden Dialyse, MW ± s

HD=Hämodialyse, AD=Albumindialyse, n=Versuchszahl, *p*-Werte siehe Tabelle 24 im Anhang

3.3 Leerwerte und Single-Pass Effekt

Um eventuelle Unterschiede zwischen Ausgangskonzentrationen der Pools auszuschließen, wurde ein Vergleich zwischen den Toxinkonzentrationen vor dem Füllen des experimentellen Systems (Leerwert) und nach dem Füllen bei 0 Minuten (0 min) durchgeführt (Tabelle 5).

Tabelle 5: Leerwerte und 0 min in $\mu\text{mol/l}$, Mittelwerte \pm Standardabweichung

	CMPF (n=18)	IS (n=12)	Pentosidin (n=6)
LW	48,08 \pm 11,09	41,00 \pm 7,19	0,44 \pm 0,19
0 min	51,86 \pm 13,34	38,83 \pm 7,34	0,45 \pm 0,19
<i>p</i> -Wert	0.001*	0.06	0,34

CMPF=3-Carboxy-4-methyl-5-propyl-2-propionfuransäure, IS=Indoxylsulfat, LW=Leerwert, n=Versuchsanzahl

Für Pentosidin und Indoxylsulfat war kein signifikanter Unterschied zwischen dem Leerwert und dem Wert bei 0 Minuten gemäß Wilcoxon-Test feststellbar. Die Auswertung von CMPF zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Messwerten, wobei die Leerwerte niedriger waren als die Werte bei 0 Minuten.

3.4 Untersuchungen bei Raumtemperatur

Für die statistische Auswertung der Versuche bei Raumtemperatur wurde der Leerwert (LW) mit der Konzentration nach 6 Stunden (RT 6 h) mit dem Wilcoxon-Test für abhängige Proben verglichen. Die folgende Tabelle stellt die Ergebnisse mit den dazugehörigen *p*-Werten dar. Es zeigten sich keine statistisch messbare Veränderungen der Toxin- und Albuminkonzentrationen über die Zeit von 6 Stunden (Tabelle 6).

Tabelle 6: Ergebnisse - Untersuchungen bei Raumtemperatur, Mittelwerte \pm Standardabweichung

	Albumin (g/dl)	CMPF ($\mu\text{mol/l}$)	IS ($\mu\text{mol/l}$)
LW	4,32 \pm 0,22	52,23 \pm 0,19	41,07 \pm 3,00
RT 6h	4,29 \pm 0,19	53,60 \pm 1,49	45,20 \pm 3,80
<i>p</i> -Werte	0.285	0.593	0.109

CMPF=3-Carboxy-4-methyl-5-propyl-2-propionfuransäure, IS=Indoxylsulfat, LW=Leerwert, RT=Raumtemperatur

4 Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit sollte geprüft werden, ob und in welchem Ausmaß die Entfernung der albumingebundenen urämischen Toxine CMPF, Indoxylsulfat und Pentosidin mittels Albumindialyse aus dem Plasma von chronischen Hämodialysepatienten möglich ist. Dazu war die Entwicklung eines In-vitro Kreislaufsystems notwendig. Die Albumindialyse wird in Form des MARS[®]-Verfahrens zwar in der klinischen Praxis bei Patienten mit Leberversagen seit Jahren erfolgreich eingesetzt, jedoch gibt es bisher erst eine veröffentlichte Studie, die das Albumindialyse-Verfahren bei chronischen Hämodialysepatienten getestet hat [154]. Daher gibt es nach wie vor viele Fragen, die erst durch In-vitro Versuche geklärt werden sollten, bevor das System im klinischen Alltag Anwendung finden kann. Mit Hilfe des von uns entwickelten In-vitro Kreislaufsystems ist es nun möglich, die Effektivität sowie verschiedene Parameter wie zum Beispiel den Einfluss von Flussgeschwindigkeiten, Albuminkonzentrationen oder Dialysemembranen zu untersuchen. Weiterhin bietet der Einsatz von nativem Patientenplasma bei dem hier angewandten Versuchsaufbau entscheidende Vorteile zu bisherigen Studien mit synthetisch hergestellten Toxin-Albuminverbindungen, weil die klinisch wichtige In-vivo Situation dadurch besser simuliert werden kann.

Es zeigte sich, dass die CMPF-, Indoxylsulfat- und Pentosidinkonzentrationen im gesammelten und gepoolten Plasma von chronischen Hämodialysepatienten im Vergleich zu den aus der Literatur bekannten Plasmakonzentrationen von gesunden Probanden erwartungsgemäß erhöht war. Allerdings waren die Unterschiede - verglichen mit den in der Literatur bisher angegebenen Werten - deutlich geringer ausgeprägt. Dies könnte möglicherweise darauf zurückzuführen sein, dass darauf geachtet wurde, die Blutentnahmen für die Plasmaversuche nur bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz vorzunehmen, die sich in einem relativ guten und stabilen Allgemeinzustand befanden. Es ist in diesem Zusammenhang eine auffällige Uneinheitlichkeit der bisher in der Literatur gemessenen Toxinkonzentrationen zu erwähnen. Gut sichtbar ist dies anhand der EUTox-Datenbank, in der über 300 Publikationen zusammengefasst und die höchsten und niedrigsten jemals gemessenen Werte von urämischen Toxinen veröffentlicht wurden [164]. Dabei zeigte sich eine sehr hohe Varianz der Konzentrationen. Durch die Mittelung der Werte wurde den Normalkonzentrationen ein Mittelwert für die

Toxinkonzentration in der Urämie gegenüber gestellt [165].

Es wurden Versuche zur Frage nach der Stabilität und dem möglichen Zerfall der untersuchten urämischen Substanzen bei Raumtemperatur und unter Lichteinfluss durchgeführt. Da in der Literaturrecherche keine Aussagen zu diesen Fragestellungen zu finden waren, erscheinen uns diese Ergebnisse relevant für die Aufbewahrung und Lagerung der Proben. Es stellte sich heraus, dass kein natürlicher Zerfall über die Zeit von 6 Stunden bei Raumtemperatur und unter Lichteinfluss für die untersuchten Substanzen Albumin, CMPF und Indoxylsulfat messbar war (Tabelle 6). Ebenfalls erstmals in der Literatur lässt sich aus diesen Versuchen außerdem ableiten, dass Albumin, CMPF und Indoxylsulfat keine Affinität für die Wände der verwendeten Aufbewahrungs-Behälter (Eppendorfgefäße) zeigen.

In der durchgeführten ersten Versuchsreihe wurde getestet, ob die urämischen Toxine Pentosidin und CMPF mittels konventioneller Hämodialyse versus 10%-iger Albumindialyse aus dem gepoolten Patientenplasma entfernt werden können. Im Gegensatz zu Indoxylsulfat lagen zu den beiden Substanzen noch keine In-vitro Experimente zur Elimination mittels Albumindialyse vor [160]. Bei diesen Versuchen wurde gezeigt, dass Pentosidin sich weder durch die konventionelle Hämodialyse noch durch die Albumindialyse in der getesteten Konzentration mit 10% Albumin aus dem Patientenplasma entfernen ließ (Abbildung 12). Ebenso wenig kam es bei der Versuchsreihe zu einer Zunahme von Pentosidin im Dialysat nach der Dialysedauer von 4 Stunden. Bei Betrachtung des Molaren Verhältnisses fällt eine Konstanz der Pentosidinwerte über die Dialysedauer in beiden Gruppen auf. Die wesentliche Ursache dafür stellt sehr wahrscheinlich die feste, kovalente Bindung zum Albuminmolekül dar, die das Ablösen des AGEs und den Übertritt auf die andere Seite der Membran des Dialysators verhindert [96]. Ob höhere Albuminkonzentrationen auf der Dialysatseite das Ablösen der Pentosidinmoleküle vom Albumin auf der Plasmaseite ermöglichen würde, wurde in den vorliegenden Versuchen nicht untersucht. Dies halten wir allerdings aufgrund der äußerst ausgeprägten Albuminbindung für wenig wahrscheinlich.

Auffällig bei den Pentosidinversuchen war ein statistisch zwar nicht signifikanter, aber in den Absolutzahlen deutlicher Konzentrationsunterschied von Pentosidin im Plasma sowie im Dialysat zwischen der Hämodialyse- und der Albumindialysegruppe

(Tabellen unter 8.1.2 im Anhang). Eine Ursache für diese Differenz konnte nach Ausschluss von Messfehlern und mehrfachen Doppelbestimmungen nicht gefunden werden. Als Konsequenz daraus wurden die statistischen Auswertungen nur durch abhängige, verbundene Tests nach Wilcoxon durchgeführt, auf einen Vergleich zwischen den Gruppen nach Mann-Whitney U wurde verzichtet (Abbildung 12). Wie schon in der Einleitung beschrieben, gehört Pentosidin zu der Gruppe der so genannten Glykosilierungsendprodukten, die englisch als Advanced Glycation Endproducts (AGEs) bezeichnet werden und die sich durch eine starke, kovalente Bindung auszeichnen. Der Prozess, der zur Bildung der stabilen AGEs führt, wird Maillard-Reaktion genannt [96]. In der Literatur wurden schon einige - mehr oder weniger effektive - Wege beschrieben, die Pentosidin- oder andere AGE-Konzentrationen zu verringern. Eine Möglichkeit stellt die CAPD dar [166]. Weiterhin können Chelatbildner die Formation von AGEs In-vitro effektiv verlangsamen [167]. In der Literatur wird außerdem eine AGE-Diät beschrieben, durch die eine Pentosidinreduktion möglich sein soll [168]. In neueren Versuchen zeigte sich eine bedeutsame Reduktion von albumingebundenem Pentosidin durch den Einsatz von großporigen, protein-leaking Membranen, die mit einem klinisch nicht-relevanten Albuminverlust einhergingen [169].

CMPF ließ sich in den Versuchen der ersten Versuchsreihe zwar statistisch nicht durchweg signifikant, dennoch im Vergleich zum Pentosidin in einem deutlich höheren Ausmaß durch die 10%-ige Albumindialyse aus dem Patientenplasma entfernen. Wie erwartet, vermochte hingegen die Hämodialyse mit konventioneller Substitutionslösung die CMPF-Konzentration im Plasma nicht zu verringern (Abbildung 11). Der Vergleich des Molaren Verhältnisses der Hämodialysegruppe mit dem der Albumindialysegruppe durch den Mann-Whitney U-Test zeigte eine signifikante Abnahme von CMPF im Plasma über die 4 Stunden Dialysedauer ($p=0.016$, Abbildung 11). Trotz der sehr geringen Fallzahl ($n=3$) war die entfernte Menge von CMPF im Plasma nach 4 Stunden Dialysedauer nahezu signifikant erhöht, wenn die Dialyse mit 10%-igem Albumin durchgeführt wurde (Tabelle 16 im Anhang). Die Furansäure erschien hingegen nie messbar im Dialysat bei der konventionellen Hämodialyse mit Substitutionslösung. Im Gegensatz dazu wurde ein deutlicher Anstieg der Furansäuremenge bei der Messung der Gesamtzunahme im Dialysat durch die Albumindialyse verzeichnet (Abbildung 13). Die Untersuchung der Dialysatkonzentration ist im Hinblick auf den Verbleib der Toxine bei der

Dialyse außerordentlich wichtig, um eine eventuelle Adsorption des Toxinmoleküls an der Dialysatormembran von einem reellen Übertritt durch die Membran auf die Dialysatseite zu identifizieren. Im Vergleich von der entfernten Menge von CMPF im Plasma zur Zunahme im Dialysat fällt eine Differenz von ca. 1 μmol auf. Dies legt die Vermutung nahe, dass diese Differenz von CMPF bei der Dialyse an der Membran des Dialysators adsorbiert wurde und nicht mehr ins Dialysat abgegeben wurde (Abbildung 13 und Tabelle 16 im Anhang).

Aus den Versuchen der ersten Versuchsreihe wurde konstatiert, dass die Reduktion von CMPF aus dem Plasma mittels Albumindialyse möglich ist. Die Entfernbarekeit von CMPF wurde daher im Rahmen einer zweiten Versuchsreihe weiter getestet. Als Erklärung dafür, dass die Ergebnisse in der ersten Versuchsreihe für CMPF nicht eindeutig signifikant ausfallen, kommen am ehesten die kleine Versuchsfallzahl mit nur 3 Versuchen und weiterhin die Auswertung mit strengen Statistik-Kriterien unter ausschließlichen Einsatz der parameterfreien Tests in Betracht. Infolge dessen wurde die Fallzahl in der zweiten Versuchsreihe von 3 auf 4 Versuche pro Einheit ausgeweitet.

Wie aus den Ergebnissen der ersten Versuchsreihe ersichtlich, ist - aufgrund der starken, kovalenten Albuminbindung - eine Entfernung von Pentosidin durch die Albumindialyse nicht zu erwarten. Deswegen wurde auf die Durchführung weiterer Versuche mit Pentosidin verzichtet und in der zweiten Versuchsreihe das urämische Toxin Indoxylsulfat bestimmt, das schon in einer früheren In-vitro Studie durch ein Albumindialyseverfahren reduziert werden konnte [160].

In der zweiten Versuchsreihe wurde die Entfernbarekeit von CMPF und Indoxylsulfat durch die Albumindialyse mit 10%-igem und 20%-igem Albumin gegenüber der Hämodialyse mit einer konventionellen Substitutionslösung über eine verlängerte Dialyse-Laufzeit von 6 Stunden gemessen, um die effektivste Dialysezeit zu ermitteln und die optimale Albuminkonzentration zu bestimmen.

In der Auswertung der Ergebnisse für Albumin zeigten sich zwischen den Plasmaalbumin-Konzentrationen signifikante Unterschiede für alle 3 Gruppen (Abbildung 14). Als Ursache hierfür kommen sowohl ein möglicher Übertritt von Albumin aus dem Dialysat ins Plasma wie auch das Phänomen der Ultrafiltration, das unten noch ausführlich

erläutert wird, in Frage. Diese Erklärungen erscheinen uns jedoch aufgrund der kleinen Porengröße der Dialysatormembran, die einen Membranübertritt von Albumin schwierig macht, und den nachgewiesenen konstanten Albuminkonzentrationen im Dialysat als wenig wahrscheinlich. Der Grund für die unterschiedlichen Plasmaalbumin-Werte liegt unserer Meinung nach am ehesten an der Messmethode für Albumin, da hierfür ein Farbstofftest mit Bromcresol-Grün angewendet wurde. Eventuell detektiert der Labor-test für das Albumin vor allem gegen Ende der Versuche mehr Albumin, weil sich höhere Konzentrationen des Test-Farbstoffes an das saubere, freie Albuminmolekül binden können. Dies würde erklären, warum die Plasmakonzentration bei den Albumindialyse-Versuchen, bei denen deutlich mehr Toxinmengen aus dem Plasma entfernt wurden, im Durchschnitt höher liegen als bei den Hämodialysat-Versuchen. Weiterhin erklärt sich der Anstieg des Plasmaalbumins, der am deutlichsten gegen Ende der Versuche in Erscheinung tritt (Abbildung 14).

Als Konsequenz aus den Ergebnissen zur Untersuchung der Plasmaalbumin-Konzentrationen wurde für die weitere Auswertung von CMPF und Indoxylsulfat jeweils das Molare Verhältnis, das den Quotienten von Toxin zu Albumin darstellt, berechnet. Dieser Quotient dient zur bestmöglichen Eliminierung der Ultrafiltration im Kreislaufsystem. Die Ultrafiltration beschreibt ein Phänomen, das durch Druckunterschiede zwischen den zwei Kreisläufen, die durch eine semipermeable Membran getrennt sind, zustande kommt. Der positive Transmembrandruck von der Blutseite hin zum Dialysat führt zu einer „Abpressung“ des Plasmas in das System mit dem niedrigeren Druck auf der Dialysatseite. Ist dieser Effekt ausgeprägt, kann es zu Konzentrationsverschiebungen und damit zur Fehlbestimmung der gemessenen Toxine und des Albumins kommen. Mit der Bestimmung des Quotienten aus Toxin zu Albumin wird versucht, diesem Effekt weitgehend entgegenzuwirken, da die semipermeable Membran für die Albuminmoleküle undurchlässig ist und somit die Albuminmenge auf beiden Seiten des Dialysators stabil bleibt. Es wurden außerdem verschiedene Maßnahmen bei der Entwicklung des Versuchsaufbaus ergriffen, um die Ultrafiltration im System zu minimieren. Zu erwähnen ist hier der Einsatz von zwei Pumpen auf der Dialysatseite des Kreislaufs (vor und nach der Dialysatorpassage), um stabile, gleichmäßige Druckverhältnisse zu erzielen und einen Druckabfall nach dem Dialysator zu verhindern. Weiterhin wurde die Füllung der Kreisläufe so angepasst, dass zuerst das Niedrigdrucksystem auf der Dialysatseite mit Dialysat gefüllt wurde, bevor auf der Blutseite in einem

zweiten Durchgang das Auffüllen durchgeführt wurde. Auf diese Weise konnte vor allem der Ultrafiltrationseffekt in den ersten Minuten nach dem Start der Versuche verringert werden. Des Weiteren wurde auf der Dialysatseite bei Bedarf eine Kompressionschraube an das Schlauchsystem angebracht, die einen Druckabfall im Dialysatkreislauf verhinderte. Die Darstellung der Ergebnisse wurde - wenn immer möglich - mit dem Molaren Verhältnis vorgenommen, da jedoch bei den Hämodialyse-Versuchen kein Albumin im Dialysat nachweisbar war, wurde hier auf die Absolutzahlen zurückgegriffen.

Die Ergebnisse der zweiten Versuchsreihe veranschaulichen deutlich, dass CMPF und Indoxylsulfat im Patientenplasma durch die Albumindialyse wesentlich effizienter entfernt werden konnten als durch die konventionelle Hämodialyse. Statistisch signifikant spiegelt sich dies für das CMPF im Plasma für die Albumindialyse mit 20%-igem Albumin wider, wohingegen rein optisch die Albumindialysegruppe mit 10%-igem Albumin ein ähnliches Ergebnis wie die Gruppe mit 20%-igem Albumin zeigt. Weiterhin sind die CMPF-Werte im Dialysat für die 10%- und die 20%-Gruppe fast identisch (Abbildung 16 und Abbildung 17).

Indoxylsulfat wurde statistisch relevant durch die Dialyse mit 10%-igem und 20%-igem Albumin aus dem Plasma entfernt, und es bestand kein ersichtlicher Vorteil zwischen der Dialyse der beiden Albuminkonzentrationen (Abbildung 16, Abbildung 20).

Bei beiden Substanzen kam es unter Hämodialyse zu keiner Toxinreduktion über die Dialysedauer von 6 Stunden.

Statistisch betrachtet war zwar eine Reduktion von CMPF durch Dialyse mit 10%-igem Albumin beim Vergleich über die Zeit von 6 Stunden nicht nachweisbar, jedoch ging diese grafisch und in Absolutzahlen mit einer deutlichen Eliminierung von CMPF im Plasma einher. Weiterhin zeigte sich in der Auswertung der CMPF-Endkonzentrationen bei 360 Minuten sowohl für die 10%-ige als auch für die 20%-ige Albumindialysegruppe ein statistischer Unterschied zur Hämodialysegruppe (Tabelle 26 im Anhang). Auffällig bei der Betrachtung der abfallenden Konzentrationen im Plasma unter Albumindialyse ist eine deutlich früher einsetzende und steilere Abnahme von Indoxylsulfat im Zeitverlauf. Während CMPF zwischen 60-120 Minuten um die Hälfte seines Ausgangswertes reduziert wird, ist dies für Indoxylsulfat schon nach 15 Minuten der Fall. Diese Betrachtung könnte auf den niedrigeren Albuminbindungskoeffizienten und

auf eine damit eventuell verbundene leichtere Ablösung vom Albuminmolekül zurückzuführen sein (Indoxylsulfat $K_I = 16,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ versus CMPF: $K_I = 103,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) [11]. Klärungswürdig erscheint, ob für die Entfernung von Indoxylsulfat eine Dialyse von 6 Stunden notwendig ist oder ob nicht schon geringere Dialysezeiten ausreichen würden. Dies ist vor allem im Hinblick auf eine spätere klinische Anwendung wichtig, da sich damit die Belastung für den Patienten verringern würde. Dazu muss man auch die Ergebnisse im Dialysat betrachten.

Bei der Analyse der Dialysat-Ergebnisse ist eine signifikante Zunahme der Urämietoxine Indoxylsulfat und CMPF im Dialysat unter der Albumindialyse zu verzeichnen. Im Gegensatz dazu war CMPF unter der konventionellen Hämodialyse im Dialysat nicht messbar. Die Indoxylsulfat-Werte zeigten einen diskreten Anstieg von 0,6 auf 4,6 $\mu\text{mol/l}$ (Abbildung 17, Abbildung 21).

Für CMPF bestand in der statistischen Auswertung der Albumindialysegruppen keine Differenz zwischen den Versuchen mit 10%-igem und 20%-igem Albumin. Wie in der Abbildung 17 zu sehen ist, sind die beiden Anstiegskurven fast deckungsgleich. Beim Indoxylsulfat hingegen zeigte sich ein signifikant höherer Anstieg von 0 auf durchschnittlich 10,4 $\mu\text{mol/l}$ im Dialysat unter Dialyse mit 10%-igem Albumin. Die Dialyse mit 20%-igem Albumin erschien auf den ersten Blick weniger effizient zu sein (Abbildung 21). Die Ergebnisse der Plasma-Analyse weisen jedoch nahezu keinen Unterschied im Verlauf beider Albumindialyse-Versuchsreihen auf (Abbildung 20). Die Diskrepanz kann durch eine verstärkte Adsorption an die Dialysemembran im 20%-Albumin-Versuch erklärt werden (durch Albuminbeschichtung der dialysatseitigen Membran-Binnen-Struktur als Adsorptionsvermittler). Die Indoxylsulfat-Clearance war zwar im 20%-Versuch am höchsten, die Zunahme ist aber nur graduell und klinisch vermutlich ohne relevanten Effekt (Abbildung 22). Es ist wieder zu beobachten, dass Indoxylsulfat am effektivsten in den ersten 15 bis 30 Minuten der Dialyse entfernt wurde, die längere Versuchsdauer von 6 Stunden hatte auch im Dialysat nicht mehr zu einem Konzentrationsanstieg geführt. Dies bestätigt die Ergebnisse im Plasma und wirft die Frage auf, ob kürzere Dialysezeiten für die Reduktion von Indoxylsulfat ausreichen würden.

Beim CMPF liegt wegen der festen Bindung an Albumin und der resultierenden verzögerten „Dialysierbarkeit“ des Toxins eine sichtlich flachere Anstiegskurve im Dialysat

unter der Albumindialyse vor. Ein Niveau wird - wenn überhaupt - erst nach 240 bis 360 Minuten erreicht. Eventuell könnten also längere Dialysezeiten als 6 Stunden noch zu einem weiteren Konzentrationsanstieg von CMPF im Dialysat führen. Alternativ wäre zu überlegen, die Austauscheffektivität mit offenporigen Membranen zu erhöhen (z.B. High Cut-off Membran, [170]).

Bei der Berechnung der Clearance wurde für CMPF keine statistisch bedeutende Differenz zwischen der Albumin- und der Hämodialyse nachgewiesen, obwohl die Werte für die Albumindialyse mit 0,58 ml/min (10% Albumin) und 0,72 ml/min (20% Albumin) höher ausfielen als für die konventionelle Hämodialyse (0,14 ml/min) (Abbildung 18). Die fehlende statistische Signifikanz könnte durch die hohe Standardabweichung der Werte zu erklären sein.

Im Vergleich mit der Patientenstudie von A. Dillmann fielen unserer Clearance-Raten von CMPF bei der Albumindialyse niedriger aus als die errechneten Durchschnittswerte bei der Albumindialyse an 2 Patienten (Dillmann: 0,92 ml/min bzw. 2,3 ml/min) [154]. Dies könnte unter anderem an der größeren Austauschfläche der Dialysatormembran liegen, die bei der Patientenstudie verwendet wurde. Da in unseren Versuchen ein sehr kleines Volumen dialysiert wurde, musste der kleinstmögliche Dialysator mit nur 0,65 m² Austauschfläche benutzt werden, um einen größeren Volumenverlust im System und die damit verbundenen Druckschwankungen zu verhindern. Bei der klinischen Studie von 2001 war die Austauschfläche mit 1,3 m² doppelt so groß und könnte somit die höheren Clearance-Werte teilweise erklären.

Um den Verbleib der Toxine bei der Dialyse zu bestimmen, wurden Messungen auf der Plasma- und auf der Dialysatseite durchgeführt und sowohl die entfernte Menge aus dem Plasma als auch die Zunahme im Dialysat berechnet. In der Analyse dieser Werte findet man bei beiden untersuchten Toxinen in den Albumindialysegruppen eine Differenz - es zeigt sich, dass weniger Toxin auf der Dialysatseite angekommen ist als im Plasma entfernt wurde (Abbildung 19, Abbildung 23). Für das CMPF trifft dies vor allem auf die Albumindialysegruppe mit 10% zu (Differenz von 1,3 µmol), beim Indoxylsulfat war die Differenz mit 1 µmol bei der Dialyse mit 20%-igem Albumin bedeutender. Diese Unterschiede werden - wie schon bei den Versuchen der ersten Versuchsreihe beschrieben - sehr wahrscheinlich durch die Adsorption des Toxins an der Dialysatormembran verursacht. Das Toxin ist also in der Membran „verloren gegangen“ und

erscheint nicht in der Dialysatmessung. Bei der Analyse von Indoxylsulfat in der Hämodialysegruppe ergibt sich ein gegensätzlicher Trend mit einer höheren Gesamtzunahme im Dialysat als Abnahme im Plasma. Die Ursache hierfür bleibt unklar, liegt aber wahrscheinlich in Unterschieden der Messmethodik begründet (Messung in proteinfreiem Dialysat versus Messung in Albumin-Dialysat).

Bezüglich der optimalen Albumin-Dialysatkonzentration lässt sich auf Basis der vorliegenden Ergebnisse keine abschließende Empfehlung aussprechen. Der Einsatz von 20%-igem Albumin ergibt zwar die höchsten Clearances, aber der Zuwachs gegenüber der 10%-igen Variante ist nur gering und führt zu deutlich höheren Kosten. Zur Feststellung der optimalen Albuminkonzentration sollte sicherlich noch geklärt werden, ob eventuell schon geringere Konzentrationen von 5% oder 2,5% Albumin zu einer wirksamen Toxinreduktion führen würden. Die Optimierung der Albuminkonzentration stellt einen wichtigen Aspekt dar, da ein geringerer Albuminverbrauch auch zu einer bedeutsamen Kostenminimierung führen würde, was vor allem im Hinblick auf eine klinische Anwendung von großer Bedeutung ist. Ein Hinweis darauf, dass zumindest für Indoxylsulfat eine geringere Konzentration von 5% Albumin ausreichen würde, lieferte Abe et al. mit seinen In-vitro Versuchen, die allerdings nicht mit nativem Patientenplasma durchgeführt wurden [160].

Bei der Fehleranalyse der Ergebnisse sind mehrere Faktoren erwähnenswert. Zum einen hat sicherlich die Ultrafiltration, die oben schon beschrieben wurde, einen Einfluss, der sich zum Beispiel anhand des Albuminshiftes mit den unterschiedlichen, ansteigenden Plasmaalbumin-Konzentrationen in der zweiten Versuchsreihe zeigt (Abbildung 14). Dies bestätigt die Aufarbeitung unserer Ergebnisse mit dem Molaren Verhältnis, da der Ultrafiltrationseffekt dadurch weitgehend ausgeglichen wurde. Die Überlegung, ob Albumin aus dem Dialysat ins Plasma übergetreten ist und daher zu einer Erhöhung der Plasmaalbumin-Konzentration geführt hat, ist hingegen zu vernachlässigen, weil sich dieser Übertritt entsprechend dem Konzentrationsgefälle vor allem in der ersten Phase der Dialyse auswirken würde. Außerdem hat der Albuminshift auch bei der Dialyse mit Substitutionslösung stattgefunden, in der kein Albumin nachweisbar war. Weiterhin spricht gegen diese Überlegung, dass es nicht zu einer Abnahme von Albumin im Dialysat kam.

Ein schon erwähntes methodisches Problem stellt die Albuminmessung mit der Bromcresol-Methode dar, da bei dieser Methode mehr Albumin detektiert wird, wenn es in ungebundener Form vorliegt. Dies wird zurzeit von unserer Arbeitsgruppe in einer eigenen Studie weiter untersucht.

Als ein zusätzlich wichtiger Faktor bei der Fehlerbetrachtung ist das kleine Gesamtvolumen zu erwähnen, das bei unseren Versuchen verwendet wurde. Geringe Volumen- oder Druckschwankungen wirkten sich unmittelbar aus und könnten so eventuell zu Fehlbestimmungen geführt haben. Dies käme auch als Erklärung für die große Schwankungsbreite - ersichtlich an der Standardabweichung - bei einigen Ergebnissen in Frage. Weiterhin kommen Abweichungen bei den angewandten HPLC-Methoden zur Toxinbestimmung als potenzielle Fehlerquellen in Betracht. Durch konsequent durchgeführte Doppelbestimmungen wurde jedoch versucht, diese Fehlerquellen zu minimieren. Wie schon beschrieben, wurde ein Grund für die unterschiedlichen Ausgangswerte von Pentosidin auch nach Mehrfachbestimmungen nicht gefunden.

Eine wichtige Frage, die durch unsere Versuchsergebnisse nicht beantwortet werden konnte, ist die klinische Relevanz der Studie. Unbestritten ist, dass die Reduktion albumingebundener Toxine nötig ist, da ihnen - wie in der Einleitung schon ausführlich beschrieben wurde - verschiedenste toxische Wirkungen, die vor allem das Langzeitüberleben der Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz betreffen, zugeschrieben werden [12, 171]. Im Vordergrund stehen für CMPF und Indoxylsulfat die Interaktion mit anderen organischen Säuren und Medikamenten, die sich aus der hohen Affinität zum Albuminmolekül erklärt [39]. Durch diese Wechselwirkung werden unter anderem Medikamente, die um die gleiche Bindungsstelle konkurrieren, freigesetzt und können somit zu unerwünschten und unerwartet hohen Plasmaspiegeln führen [69, 172]. Weiterhin wird auch die hepatische Clearance von Medikamenten in Anwesenheit der urämischen Toxine Indoxylsulfat und CMPF gehemmt [173]. Die Fursäure soll außerdem einen entscheidenden Einfluss auf die Entstehung der Anämie bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz haben [40]. Dazu zeigte eine klinische Studie aus unserer Forschungsgruppe einen möglichen positiven Trend zur Verbesserung der Anämie durch Verwendung der Albumindialyse. Die Zunahme des Hämatokrits scheint im Zusammenhang mit der Reduktion der Fursäure zu stehen [154].

Ein weiterer wichtiger Effekt von Indoxylsulfat besteht in der Induktion von Faktoren,

die eine vaskuläre endotheliale Dysfunktion begünstigen. Da kardiovaskuläre Erkrankungen eine wesentliche Rolle bei Patienten mit terminalem Nierenversagen spielen, wurden diese Effekte besonders gut untersucht. Aktuelle Studien belegen, dass Indoxylsulfat die Kalzifizierung der Aorta begünstigt und durch Proliferation der glatten Muskelzellen zu einer aortalen Wandverdickung führt [174-176].

Weil bisherige Strategien zur Reduktion von urämischen Toxinen mittels oraler Adsorber oder Verwendung von Albumin-durchlässigen Super-Flux Membranen nur partiell erfolgreich und anwendbar waren, ist hinsichtlich der multiplen toxischen Wirkungen die Entwicklung neuer, effektiver Systeme essenziell [42, 177]. Der Einsatz einer Albumindialyse zeigt sich in diesem Zusammenhang für die urämischen Toxine Indoxylsulfat und CMPF erfolgreich. Bevor die Albumindialyse jedoch im klinischen Alltag zur Anwendung kommen kann, müssen noch einige Studien zur Verbesserung des Systems und zur Kostenoptimierung durchgeführt werden.

5 Zusammenfassung

Bei der chronischen, terminalen Niereninsuffizienz kommt es durch Versagen der blutreinigenden Funktion der Niere zur Akkumulation von toxischen Stoffen im Plasma. Die konventionelle Hämodialyse stellt ein effektives Verfahren dar, um die wasserlöslichen, ungebundenen Toxine aus dem Blut von Patienten mit Nierenversagen zu eliminieren. Es ist jedoch seit Jahren bekannt, dass außer den wasserlöslichen Substanzen auch lipophile Stoffe, die an Albumin oder andere Transporterproteine im Blut gebunden vorliegen, beim chronischen Nierenversagen akkumulieren und auf den Patienten in vielfacher Weise toxisch wirken. Diese Substanzen sind durch die konventionelle Hämodialyse nicht oder nur zu einem kleinen Teil entfernbar, und bisher wurden keine ausreichend effektiven Systeme zur Reduktion dieser so genannten urämischen Toxine gefunden. MARS[®], Molecular Adsorbent Recirculating System, ist ein im klinischen Alltag weltweit eingesetztes System, das die albumingebundenen, wasserunlöslichen Stoffe, die sich beim akuten und chronischen Leberversagen im Plasma anreichern, entfernt. Es stellt ein Dialysesystem dar, das anstatt der konventionellen Substitutionslösung eine Albuminlösung im Dialysat enthält. Dieses Albumindialysat zirkuliert in einem geschlossenen Kreislauf durch eine Dialysatormembran, vom Plasma getrennt im Gegenstromprinzip. Aufgrund des Konzentrationsgefälles werden Substanzen, die im Plasma an Albumin oder andere Proteine gebunden sind, vom Trägerstoff abgelöst und passieren durch die Dialysatormembran auf die Seite des Albumindialysates. Dort werden die Substanzen erneut, diesmal an das Albumin im Dialysat gebunden. In einer klinischen Studie mit einem Albumindialysesystem aus dem Jahr 2001 wurde erstmals die mögliche Reduktion von urämischen Toxinen aus dem Plasma von Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz gezeigt [154].

Die Hauptaufgabe der vorliegenden Arbeit bestand darin, zu prüfen, ob und in welchem Umfang urämische Toxine durch die Albumindialyse aus dem Plasma von chronischen Hämodialysepatienten eliminiert werden können. Dafür wurde ein In-vitro Modell entwickelt und Plasma von Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz verwendet, um ein möglichst realitätsgetreues System zu simulieren.

In den durchgeführten Experimenten wurden die urämischen Toxine Pentosidin, Furan-säure und Indoxylsulfat auf ihre Entfernbarkeit aus dem Patientenplasma durch die Albumindialyse untersucht. In einer ersten Versuchsreihe zeigte sich, dass Pentosidin

durch eine 4-stündige Dialyse mit 10%-igem Albumin im Dialysat nicht reduziert werden konnte. Dies wurde auf die starke kovalente Bindung, die Pentosidin zum Albuminmolekül einnimmt, zurück geführt. Die Furansäure ließ sich statistisch zwar nicht signifikant, jedoch in einem deutlich höheren Prozentsatz aus dem Plasma entfernen.

Daher wurde in einer zweiten Versuchsreihe die urämischen Toxine CMPF und Indoxylsulfat über eine Dialysedauer von 6 Stunden untersucht. Es zeigte sich, dass die urämischen Toxine CMPF und Indoxylsulfat zu einem hohen Prozentsatz sowohl durch eine Dialyse mit 10% als auch mit 20% Albumin im Dialysat statistisch signifikant im Patientenplasma verringert werden. In beiden Versuchsreihen wurden dagegen die Toxine Pentosidin, CMPF und Indoxylsulfat durch die konventionelle Hämodialyse nicht entfernt. Weitere Ergebnisse waren, dass die Toxine CMPF und Indoxylsulfat unter dem Einfluss von Licht und Raumtemperatur stabil bleiben und weiterhin keine Affinität für Aufbewahrungsgefäße wie Eppendorf-Behälter aufweisen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das von uns entwickelte In-vitro Dialysesystem die Möglichkeit gewährt, die klinischen Bedingungen anhand des Plasmas von Hämodialysepatienten realitätsgetreu darzustellen und zudem für verschiedenste Fragestellungen eingesetzt werden kann. Weiterhin ist festzuhalten, dass sich die urämischen Toxine CMPF und Indoxylsulfat durch den Einsatz einer Albumindialyse mit 10% oder 20% Albumin im Dialysat - im Gegensatz zur konventionellen Hämodialyse - aus dem Plasma entfernen lassen.

Die klinische Relevanz dieser Ergebnisse ist anhand dieser vorliegenden Arbeit nicht abzuschätzen und sollte unbedingt in der Zukunft in weiteren Studien untersucht werden.

6 Summary

Chronic renal failure is the progressive loss of renal function with accumulation of toxins in the patient's plasma. Conventional haemodialysis represents an effective method to reduce unbound, water soluble toxins in the blood of patients with chronic renal failure. However it is known since years that lipophilic, albumin bound toxins accumulate in the blood and cannot or not efficiently be removed by conventional dialysis causing a variety of symptoms in the patient with chronic renal disease.

Molecular Adsorbents Recirculation System (MARS[®]) describes an extracorporeal liver dialysis system used worldwide since years to clarify blood of toxins bound to albumin in patients with acute or chronic liver failure. It is a dialysis system consisting of an albumin dialysis instead of conventional haemodialysis solution in the dialysate. The albumin dialysate circulates in a closed circuit in reverse flow, separated from the blood through a semi-permeable membrane. Due to the concentration gradient, albumin-bound plasma toxins are released from the molecule and pass the dialysator membrane on the other side. In the albumin solution the toxins are re-bound to the albumin molecule in the dialysate. A clinical study, first published in 2001, showed the possible reduction of uremic toxins in the plasma of patients with chronic renal failure [154].

The main task of the present study was to identify if and in what extent uremic toxins can be removed from the plasma of patients with chronic renal disease using the albumin dialysis system. An in-vitro model was developed and plasma from patients suffering chronic renal failure was used to simulate a system as much true-to-life as possible. The potential elimination by albumin dialysis of the uremic toxins pentosidine, CMPF and indoxyl sulphate was examined in the accomplished experiments. In a first series of experiments pentosidine was shown not to be removable by an albumin dialysis with 10% albumin over a time period of 4 hours, probably due to the strong covalent binding of pentosidine to the albumin molecule. Although not statistically significant, CMPF could be removed in a visibly higher percentage than pentosidine.

Therefore the elimination of CMPF and indoxyl sulphate was examined in a second series of experiments over a time period of 6 hours. The results demonstrated a significant higher removal of CMPF and indoxyl sulphate by albumin dialysis with 10% and 20% albumin in the dialysate. However pentosidine, CMPF and indoxyl sulphate could not be removed neither in the first nor in the second series of experiments by conventional haemodialysis.

Further results show that CMPF and indoxyl sulphate remain stable under the influence of sunlight and ambient temperature and have no affinity to the experimental storage container (Eppendorf-tubes).

In summary it was shown that the in-vitro dialysis system developed by us is an effective device to simulate true-to-life conditions based on use of plasma from patients with chronic renal failure and it can be utilized in all subject related questions. Furthermore it was demonstrated that CMPF and indoxyl sulphate could only be removed by albumin dialysis with 10% or 20% of albumin - there was no reduction of these uremic toxins using the conventional haemodialysis.

Clinical relevance cannot be derived from these results and should be investigated in further prospective studies.

7 Literaturverzeichnis

1. Niwa, T., *Organic acids and the uremic syndrome: protein metabolite hypothesis in the progression of chronic renal failure*. Semin Nephrol, 1996. **16**(3): p. 167-82.
2. Vanholder, R., et al., *New insights in uremic toxins*. Kidney Int Suppl, 2003(84): p. S6-10.
3. <http://www.uremic-toxins.org>, *Homepage der European Uremic Work Group on Uremic Toxins (EUTox)*. zuletzt eingesehen am 30.06.2009.
4. Vanholder, R., et al., *Review on uremic toxins: classification, concentration, and interindividual variability*. Kidney Int, 2003. **63**(5): p. 1934-43.
5. Brunet, P., et al., *Protein-bound uremic retention solutes*. Adv Ren Replace Ther, 2003. **10**(4): p. 310-20.
6. Vanholder, R., R. De Smet, and N. Lameire, *Protein-bound uremic solutes: the forgotten toxins*. Kidney Int Suppl, 2001. **78**: p. S266-70.
7. Aki, H. and M. Yamamoto, *Thermodynamic characterization of drug binding to human serum albumin by isothermal titration microcalorimetry*. J Pharm Sci, 1994. **83**(12): p. 1712-6.
8. Kragh-Hansen, U., *Relations between high-affinity binding sites for L-tryptophan, diazepam, salicylate and Phenol Red on human serum albumin*. Biochem J, 1983. **209**(1): p. 135-42.
9. Peters, T., *All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications*. Academic Press, 1996.
10. Quinlan, G.J., G.S. Martin, and T.W. Evans, *Albumin: biochemical properties and therapeutic potential*. Hepatology, 2005. **41**(6): p. 1211-9.
11. Sakai, T., A. Takadate, and M. Otagiri, *Characterization of binding site of uremic toxins on human serum albumin*. Biol Pharm Bull, 1995. **18**(12): p. 1755-61.
12. Vanholder, R., et al., *Survival of hemodialysis patients and uremic toxin removal*. Artif Organs, 2003. **27**(3): p. 218-23.

-
13. Pfordt, J., Thoma, H, Spitteller G, *Identifizierung, Strukturableitung und Synthese bisher unbekannte Urofuransäuren im menschlichen Blut*. Liebigs Annalen der Chemie, 1981: p. 2298-2308.
 14. Spitteller M., S.G., *Trennung und Charakterisierung saurer Harnbestandteile*. J Chromatogr, 1979. **164**: p. 253-317.
 15. Liebich, H.M. and C. Forst, *Hydroxycarboxylic and oxocarboxylic acids in urine: products from branched-chain amino acid degradation and from ketogenesis*. J Chromatogr, 1984. **309**(2): p. 225-42.
 16. Glass RL, K.T., Sand DM, et al., *Furanoid fatty acids from fish lipids*. Lipids, 1975. **10**: p. 695-702.
 17. Hannemann, K., et al., *The common occurrence of furan fatty acids in plants*. Lipids, 1989. **24**(4): p. 296-8.
 18. Gorst-Allman, C.P., V. Puchta, and G. Spitteller, *Investigations of the origin of the furan fatty acids (F-acids)*. Lipids, 1988. **23**(11): p. 1032-6.
 19. Liebich, H.M., et al., *Hippuric acid and 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionic acid in serum and urine. Analytical approaches and clinical relevance in kidney diseases*. J Chromatogr, 1990. **500**: p. 615-27.
 20. Depner, T.A., *Suppression of tubular anion transport by an inhibitor of serum protein binding in uremia*. Kidney Int, 1981. **20**(4): p. 511-8.
 21. Costigan, M.G., T.L. Gilchrist, and W.E. Lindup, *Synthesis and physicochemical properties of the furan dicarboxylic acid, 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropanoic acid, an inhibitor of plasma protein binding in uraemia*. J Pharm Pharmacol, 1996. **48**(6): p. 635-40.
 22. McTigue, J.J., S.J. Henderson, and W.E. Lindup, *Excretion of the uraemic metabolite 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropanoic acid in human urine*. Nephron, 1990. **55**(2): p. 214-5.
 23. Henderson, S.J. and W.E. Lindup, *Renal organic acid transport: uptake by rat kidney slices of a furan dicarboxylic acid which inhibits plasma protein binding of acidic ligands in uremia*. J Pharmacol Exp Ther, 1992. **263**(1): p. 54-60.
 24. Tsutsumi, Y., et al., *Renal disposition of a furan dicarboxylic acid and other*

- uremic toxins in the rat*. J Pharmacol Exp Ther, 2002. **303**(2): p. 880-7.
25. Costigan, M.G. and W.E. Lindup, *Plasma clearance in the rat of a furan dicarboxylic acid which accumulates in uremia*. Kidney Int, 1996. **49**(3): p. 634-8.
26. Sato, M., et al., *Reduced renal clearance of furancarboxylic acid, a major albumin-bound organic acid, in undialyzed uremic patients*. Nephron, 1996. **74**(2): p. 419-21.
27. Deguchi, T., et al., *Characterization of uremic toxin transport by organic anion transporters in the kidney*. Kidney Int, 2004. **65**(1): p. 162-74.
28. Niwa, T., et al., *Efficient removal of albumin-bound furancarboxylic acid, an inhibitor of erythropoiesis, by continuous ambulatory peritoneal dialysis*. Nephron, 1990. **56**(3): p. 241-5.
29. Mabuchi, H. and H. Nakahashi, *A major endogenous ligand substance involved in renal failure*. Nephron, 1988. **49**(4): p. 277-80.
30. Henderson, S.J. and W.E. Lindup, *Interaction of 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropanoic acid, an inhibitor of plasma protein binding in uraemia, with human albumin*. Biochem Pharmacol, 1990. **40**(11): p. 2543-8.
31. Lim, C.F., et al., *A naturally occurring furan fatty acid enhances drug inhibition of thyroxine binding in serum*. Metabolism, 1993. **42**(11): p. 1468-74.
32. Sakai, T., Yamasaki, K., Sako, T., Kragh-Hansen, U., Suenaga, A. and Otagiri, M., *Interaction Mechanism Between Indoxyl Sulfate, a Typical Uremic Toxin Bound to Site II, and Ligands Bound to Site I of Human Serum Albumin*. Pharmaceutical Research, 2001. **18**(4): p. 520-524.
33. Tsutsumi, Y., et al., *Interaction between two dicarboxylate endogenous substances, bilirubin and an uremic toxin, 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropanoic acid, on human serum albumin*. Pharm Res, 1999. **16**(6): p. 916-23.
34. Mabuchi, H. and H. Nakahashi, *Isolation and characterization of an endogenous drug-binding inhibitor present in uremic serum*. Nephron, 1986. **44**(4): p. 277-81.
35. Mabuchi, H. and H. Nakahashi, *A major inhibitor of phenytoin binding to serum*

- protein in uremia*. Nephron, 1988. **48**(4): p. 310-4.
36. Mabuchi, H. and H. Nakahashi, *Determination of 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropanoic acid, a major endogenous ligand substance in uremic serum, by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection*. J Chromatogr, 1987. **415**(1): p. 110-7.
37. Niwa, T., et al., *Accumulation of furancarboxylic acids in uremic serum as inhibitors of drug binding*. Clin Chim Acta, 1988. **173**(2): p. 127-38.
38. Tsutsumi, Y., et al., *Decreased bilirubin-binding capacity in uremic serum caused by an accumulation of furan dicarboxylic acid*. Nephron, 2000. **85**(1): p. 60-4.
39. Sarnatskaya, V.V., et al., *Effect of protein-bound uraemic toxins on the thermodynamic characteristics of human albumin*. Biochem Pharmacol, 2002. **63**(7): p. 1287-96.
40. Niwa, T., et al., *Efficient removal of albumin-bound furancarboxylic acid by protein-leaking hemodialysis*. Am J Nephrol, 1995. **15**(6): p. 463-7.
41. Costigan, M.G., M. Yaqoob, and W.E. Lindup, *Retention of an albumin-bound furan dicarboxylic acid in patients with chronic renal failure or after a kidney transplant*. Nephrol Dial Transplant, 1996. **11**(5): p. 803-7.
42. De Smet, R., et al., *Effect of the super-flux cellulose triacetate dialyser membrane on the removal of non-protein-bound and protein-bound uraemic solutes*. Nephrol Dial Transplant, 2007. **22**(7): p. 2006-12.
43. Lim, C.F., et al., *A furan fatty acid and indoxyl sulfate are the putative inhibitors of thyroxine hepatocyte transport in uremia*. J Clin Endocrinol Metab, 1993. **76**(2): p. 318-24.
44. Lim, C.F., et al., *Inhibition of thyroxine transport into cultured rat hepatocytes by serum of nonuremic critically ill patients: effects of bilirubin and nonesterified fatty acids*. J Clin Endocrinol Metab, 1993. **76**(5): p. 1165-72.
45. Costigan, M.G., C.A. Callaghan, and W.E. Lindup, *Hypothesis: is accumulation of a furan dicarboxylic acid (3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropanoic acid) related to the neurological abnormalities in patients with renal failure?* Nephron, 1996. **73**(2): p. 169-73.

-
46. Sekine, T., S.H. Cha, and H. Endou, *The multispecific organic anion transporter (OAT) family*. Pflugers Arch, 2000. **440**(3): p. 337-50.
 47. Ohtsuki, S., et al., *Role of blood-brain barrier organic anion transporter 3 (OAT3) in the efflux of indoxyl sulfate, a uremic toxin: its involvement in neurotransmitter metabolite clearance from the brain*. J Neurochem, 2002. **83**(1): p. 57-66.
 48. Mabuchi, H. and H. Nakahashi, *Inhibition of hepatic glutathione S-transferases by a major endogenous ligand substance present in uremic serum*. Nephron, 1988. **49**(4): p. 281-3.
 49. Niwa, T., et al., *Inhibition of mitochondrial respiration by furancarboxylic acid accumulated in uremic serum in its albumin-bound and non-dialyzable form*. Clin Nephrol, 1993. **39**(2): p. 92-6.
 50. Sun, H., et al., *Effects of uremic toxins on hepatic uptake and metabolism of erythromycin*. Drug Metab Dispos, 2004. **32**(11): p. 1239-46.
 51. Faber, K.N., M. Muller, and P.L. Jansen, *Drug transport proteins in the liver*. Adv Drug Deliv Rev, 2003. **55**(1): p. 107-24.
 52. van Montfoort, J.E., et al., *Drug uptake systems in liver and kidney*. Curr Drug Metab, 2003. **4**(3): p. 185-211.
 53. Hagenbuch, B. and P.J. Meier, *Organic anion transporting polypeptides of the OATP/ SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/ SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties*. Pflugers Arch, 2004. **447**(5): p. 653-65.
 54. Tsujimoto, M., et al., *Effects of Uremic Serum and Uremic Toxins on Hepatic Uptake of Digoxin*. Ther Drug Monit, 2008. **Epub ahead of print**.
 55. Krstulovic, A.M. and C. Matzura, *Rapid assay for tryptophanase using reversed-phase high-performance liquid chromatography*. J Chromatogr, 1984. **176**: p. 217-224.
 56. Bueschkens, D.H. and M.E. Stiles, *Escherichia coli variants for gas and indole production at elevated incubation temperatures*. Applied and Environmental Microbiology, 1984. **48**: p. 601-605.

-
57. Banoglu, E. and R.S. King, *Sulfation of indoxyl by human and rat aryl (phenol) sulfotransferases to form indoxyl sulfate*. Eur J Drug Metab Pharmacokinet, 2002. **27**(2): p. 135-40.
58. Niwa, T. and M. Ise, *Indoxyl sulfate, a circulating uremic toxin, stimulates the progression of glomerular sclerosis*. J Lab Clin Med, 1994. **124**(1): p. 96-104.
59. Niwa, T., et al., *Accumulation of indoxyl sulfate, an inhibitor of drug-binding, in uremic serum as demonstrated by internal-surface reversed-phase liquid chromatography*. Clin Chem, 1988. **34**(11): p. 2264-7.
60. Stanfel, L.A., P.F. Gulyassy, and E.A. Jarrard, *Determination of indoxyl sulfate in plasma of patients with renal failure by use of ion-pairing liquid chromatography*. Clin Chem, 1986. **32**(6): p. 938-42.
61. Kato, A., M. Odamaki, and A. Hishida, *Association between blood indoxyl sulfate and carbonyl stress marker in hemodialysis patients*. Clin Nephrol, 2003. **60**(3): p. 161-7.
62. Niwa, T., et al., *Indoxyl sulfate and progression of renal failure: effects of a low-protein diet and oral sorbent on indoxyl sulfate production in uremic rats and undialyzed uremic patients*. Miner Electrolyte Metab, 1997. **23**(3-6): p. 179-84.
63. Deguchi, T., et al., *Pharmacokinetics and tissue distribution of uraemic indoxyl sulphate in rats*. Biopharm Drug Dispos, 2003. **24**(8): p. 345-55.
64. Lesaffer, G., et al., *Urinary excretion of the uraemic toxin p-cresol in the rat: contribution of glucuronidation to its metabolization*. Nephrol Dial Transplant, 2003. **18**(7): p. 1299-306.
65. Lesaffer, G., et al., *Intradialytic removal of protein-bound uraemic toxins: role of solute characteristics and of dialyser membrane*. Nephrol Dial Transplant, 2000. **15**(1): p. 50-7.
66. Tsubakihara, Y., et al., *Effects of the oral adsorbent AST-120 on tryptophan metabolism in uremic patients*. Am J Kidney Dis, 2003. **41**(3 Suppl 1): p. S38-41.
67. De Smet, R., et al., *Study by means of high-performance liquid chromatography of solutes that decrease theophylline/protein binding in the serum of uremic patients*. J Chromatogr A, 1999. **847**(1-2): p. 141-53.

-
68. Takamura, N., T. Maruyama, and M. Otagiri, *Effects of uremic toxins and fatty acids on serum protein binding of furosemide: possible mechanism of the binding defect in uremia*. Clin Chem, 1997. **43**(12): p. 2274-80.
69. Nishio, T., et al., *Influences of haemodialysis on the binding sites of human serum albumin: possibility of an efficacious administration plan using binding inhibition*. Nephrol Dial Transplant, 2008. **23**(7): p. 2304-10.
70. Dasgupta, A., A. Paul, and A. Wells, *Uremic sera contain inhibitors that block digitoxin-valproic acid interaction*. Am J Med Sci, 2001. **322**(4): p. 204-8.
71. Deguchi, T., et al., *Major role of organic anion transporter 3 in the transport of indoxyl sulfate in the kidney*. Kidney Int, 2002. **61**(5): p. 1760-8.
72. Enomoto, A., et al., *Role of organic anion transporters in the tubular transport of indoxyl sulfate and the induction of its nephrotoxicity*. J Am Soc Nephrol, 2002. **13**(7): p. 1711-20.
73. Enomoto, A., et al., *Interactions of human organic anion as well as cation transporters with indoxyl sulfate*. Eur J Pharmacol, 2003. **466**(1-2): p. 13-20.
74. Taki, K., et al., *Accumulation of indoxyl sulfate in OAT1/3-positive tubular cells in kidneys of patients with chronic renal failure*. J Ren Nutr, 2006. **16**(3): p. 199-203.
75. Hasannejad, H., et al., *Interactions of human organic anion transporters with diuretics*. J Pharmacol Exp Ther, 2004. **308**(3): p. 1021-9.
76. Mori, S., et al., *Rat organic anion transporter 3 (rOAT3) is responsible for brain-to-blood efflux of homovanillic acid at the abluminal membrane of brain capillary endothelial cells*. J Cereb Blood Flow Metab, 2003. **23**(4): p. 432-40.
77. Morisaki, T., et al., *Regulation of Renal Organic Ion Transporters in Cisplatin-Induced Acute Kidney Injury and Uremia in Rats*. Pharm Res, 2008.
78. Niwa, T., M. Ise, and T. Miyazaki, *Progression of glomerular sclerosis in experimental uremic rats by administration of indole, a precursor of indoxyl sulfate*. Am J Nephrol, 1994. **14**(3): p. 207-12.
79. Miyazaki, T., et al., *Indoxyl sulfate increases the gene expressions of TGF-beta 1, TIMP-1 and pro-alpha 1(I) collagen in uremic rat kidneys*. Kidney Int Suppl,

1997. **62**: p. S15-22.
80. Miyazaki, T., et al., *Indoxyl sulfate stimulates renal synthesis of transforming growth factor-beta 1 and progression of renal failure*. *Kidney Int Suppl*, 1997. **63**: p. S211-4.
81. Motojima, M., et al., *Uraemic toxins induce proximal tubular injury via organic anion transporter 1-mediated uptake*. *Br J Pharmacol*, 2002. **135**(2): p. 555-63.
82. Dou, L., et al., *The uremic solute indoxyl sulfate induces oxidative stress in endothelial cells*. *J Thromb Haemost*, 2007. **5**(6): p. 1302-8.
83. Motojima, M., et al., *Uremic toxins of organic anions up-regulate PAI-1 expression by induction of NF-kappaB and free radical in proximal tubular cells*. *Kidney Int*, 2003. **63**(5): p. 1671-80.
84. Taki, K., et al., *Oxidative stress, advanced glycation end product, and coronary artery calcification in hemodialysis patients*. *Kidney Int*, 2006. **70**(1): p. 218-24.
85. Taki, K. and T. Niwa, *Indoxyl sulfate-lowering capacity of oral sorbents affects the prognosis of kidney function and oxidative stress in chronic kidney disease*. *J Ren Nutr*, 2007. **17**(1): p. 48-52.
86. Imai, E., et al., *Carbonic adsorbent AST-120 retards progression of renal failure by additive effect with ACEI and protein restriction diet*. *Clin Exp Nephrol*, 2003. **7**(2): p. 113-9.
87. Kobayashi, N., et al., *Effects of oral adsorbent AST-120 (Kremezin) on renal function and glomerular injury in early-stage renal failure of subtotal nephrectomized rats*. *Nephron*, 2002. **91**(3): p. 480-5.
88. Komiya, T., et al., *Possible involvement of nuclear factor-kappaB inhibition in the renal protective effect of oral adsorbent AST-120 in a rat model of chronic renal failure*. *Int J Mol Med*, 2004. **13**(1): p. 133-8.
89. Niwa, T., et al., *The protein metabolite hypothesis, a model for the progression of renal failure: an oral adsorbent lowers indoxyl sulfate levels in undialyzed uremic patients*. *Kidney Int Suppl*, 1997. **62**: p. S23-8.
90. Konishi, K., et al., *AST-120 (Kremezin) initiated in early stage chronic kidney disease stunts the progression of renal dysfunction in type 2 diabetic subjects*.

- Diabetes Res Clin Pract, 2008. **81**(3): p. 310-5.
91. Miyazaki, T., et al., *An oral sorbent reduces overload of indoxyl sulphate and gene expression of TGF-beta1 in uraemic rat kidneys*. Nephrol Dial Transplant, 2000. **15**(11): p. 1773-81.
 92. Shimoishi, K., et al., *An oral adsorbent, AST-120 protects against the progression of oxidative stress by reducing the accumulation of indoxyl sulfate in the systemic circulation in renal failure*. Pharm Res, 2007. **24**(7): p. 1283-9.
 93. Dou, L., et al., *The uremic solutes p-cresol and indoxyl sulfate inhibit endothelial proliferation and wound repair*. Kidney Int, 2004. **65**(2): p. 442-51.
 94. Taki, K., Y. Tsuruta, and T. Niwa, *Indoxyl sulfate and atherosclerotic risk factors in hemodialysis patients*. Am J Nephrol, 2007. **27**(1): p. 30-5.
 95. Adijiang, A., et al., *Indoxyl sulphate promotes aortic calcification with expression of osteoblast-specific proteins in hypertensive rats*. Nephrol Dial Transplant, 2008. **23**(6): p. 1892-901.
 96. Monnier, V.M., et al., *Maillard reaction-mediated molecular damage to extracellular matrix and other tissue proteins in diabetes, aging, and uremia*. Diabetes, 1992. **41 Suppl 2**: p. 36-41.
 97. Löffler, G. and P. Petrides, *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer Verlag, 1998. **6. Auflage**.
 98. Takahashi, M., et al., *Quantification of the cross-link pentosidine in serum from normal and uremic subjects*. Clin Chem, 1993. **39**(10): p. 2162-5.
 99. Stein, G., et al., *Influence of dialysis modalities on serum AGE levels in end-stage renal disease patients*. Nephrol Dial Transplant, 2001. **16**(5): p. 999-1008.
 100. Friedlander, M.A., et al., *Early and advanced glycosylation end products. Kinetics of formation and clearance in peritoneal dialysis*. J Clin Invest, 1996. **97**(3): p. 728-35.
 101. Miyata, T., et al., *Accumulation of albumin-linked and free-form pentosidine in the circulation of uremic patients with end-stage renal failure: renal implications in the pathophysiology of pentosidine*. J Am Soc Nephrol, 1996. **7**(8): p. 1198-206.

-
102. Tsukahara, H., et al., *Formation of advanced glycosylation end products and oxidative stress in young patients with type 1 diabetes*. *Pediatr Res*, 2003. **54**(3): p. 419-24.
 103. Nazratun, N., et al., *Diabetes mellitus exacerbates advanced glycation end product accumulation in the veins of end-stage renal failure patients*. *Vasc Med*, 2006. **11**(4): p. 245-50.
 104. Chen, J.R., et al., *Comparison of the concentrations of pentosidine in the synovial fluid, serum and urine of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis*. *Rheumatology (Oxford)*, 1999. **38**(12): p. 1275-8.
 105. Chen, J.R., et al., *Pentosidine in synovial fluid in osteoarthritis and rheumatoid arthritis: relationship with disease activity in rheumatoid arthritis*. *J Rheumatol*, 1998. **25**(12): p. 2440-4.
 106. Meli, M., et al., *Serum pentosidine as an indicator of Alzheimer's disease*. *J Alzheimers Dis*, 2002. **4**(2): p. 93-6.
 107. Horie, K., et al., *Immunohistochemical localization of advanced glycation end products, pentosidine, and carboxymethyllysine in lipofuscin pigments of Alzheimer's disease and aged neurons*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997. **236**(2): p. 327-32.
 108. Tsukahara, H., et al., *High levels of urinary pentosidine, an advanced glycation end product, in children with acute exacerbation of atopic dermatitis: relationship with oxidative stress*. *Metabolism*, 2003. **52**(12): p. 1601-5.
 109. Sell, D.R., et al., *Cell-associated pentosidine as a marker of aging in human diploid cells in vitro and in vivo*. *Mech Ageing Dev*, 1998. **105**(3): p. 221-40.
 110. Miyata, T., et al., *Renal catabolism of advanced glycation end products: the fate of pentosidine*. *Kidney Int*, 1998. **53**(2): p. 416-22.
 111. Odetti, P., et al., *Chromatographic quantitation of plasma and erythrocyte pentosidine in diabetic and uremic subjects*. *Diabetes*, 1992. **41**(2): p. 153-9.
 112. Klemm, A., et al., *Influence of hemodialysis membrane permeability on serum levels of advanced glycation end products (AGEs) and homocysteine metabolites*. *Clin Nephrol*, 2004. **61**(3): p. 191-7.

-
113. Uchimura, T., et al., *Marked increases in macrophage colony-stimulating factor and interleukin-18 in maintenance hemodialysis patients: comparative study of advanced glycation end products, carboxymethyllysine and pentosidine*. *Nephron*, 2002. **90**(4): p. 401-7.
114. Yamamoto, M., et al., *Carbonyl stress reduction in peritoneal dialysis fluid: development of a novel high-affinity adsorption bead*. *Perit Dial Int*, 2007. **27**(3): p. 300-8.
115. Hricik, D.E., et al., *Effects of kidney or kidney-pancreas transplantation on plasma pentosidine*. *Kidney Int*, 1993. **43**(2): p. 398-403.
116. Miyata, T., et al., *Clearance of pentosidine, an advanced glycation end product, by different modalities of renal replacement therapy*. *Kidney Int*, 1997. **51**(3): p. 880-7.
117. Brownlee, M., A. Cerami, and V. H., *Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications*. *N Engl J Med*, 1988. **318**: p. 1315-1321.
118. Neeper, M., et al., *Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins*. *J Biol Chem*, 1992. **267**: p. 14998-15004.
119. Schmidt, A.M., et al., *Regulation of human mononuclear phagocyte migration by cell surface-binding proteins for advanced glycation end products*. *J Clin Invest*, 1993. **92**: p. 2155-2168.
120. Miyata, T., et al., *Implication of an increased oxidative stress in the formation of advanced glycation end products in patients with end-stage renal failure*. *Kidney Int*, 1997. **51**(4): p. 1170-81.
121. Lai, K.N., et al., *Differential expression of receptors for advanced glycation end-products in peritoneal mesothelial cells exposed to glucose degradation products*. *Clin Exp Immunol*, 2004. **138**(3): p. 466-75.
122. Makita, Z., et al., *Reactive glycosylation endproducts in diabetic uraemia and treatment of renal failure*. *Lancet*, 1994. **343**: p. 1519-22.
123. Hoshino, H., et al., *Quantitation of the crosslinks, pyridinolone, deoxyypyridinolone and pentosidine, in human aorta with dystrophic calcification*. *Atheroscle-*

- rosis, 1995. **112**(1): p. 39-46.
124. Peppas, M., J. Uribarri, and H. Vlassara, *The role of advanced glycation end products in the development of atherosclerosis*. *Curr Diab Rep*, 2004. **4**(1): p. 31-6.
125. Peppas, M., J. Uribarri, and H. Vlassara, *Advanced glycoxidation. A new risk factor for cardiovascular disease?* *Cardiovasc Toxicol*, 2002. **2**(4): p. 275-87.
126. Zoccali, C., et al., *Pentosidine, carotid atherosclerosis and alterations in left ventricular geometry in hemodialysis patients*. *J Nephrol*, 2001. **14**(4): p. 293-8.
127. Zoccali, C., F. Mallamaci, and G. Tripepi, *AGEs and carbonyl stress: potential pathogenetic factors of long-term uraemic complications*. *Nephrol Dial Transplant*, 2000. **15 Suppl 2**: p. 7-11.
128. Kitauchi, T., et al., *Association between pentosidine and arteriosclerosis in patients receiving hemodialysis*. *Clin Exp Nephrol*, 2004. **8**(1): p. 48-53.
129. Suliman, M.E., et al., *Plasma pentosidine and total homocysteine levels in relation to change in common carotid intima-media area in the first year of dialysis therapy*. *Clin Nephrol*, 2006. **66**(6): p. 418-25.
130. Hartog, J.W., et al., *Skin-autofluorescence, a measure of tissue advanced glycation end-products (AGEs), is related to diastolic function in dialysis patients*. *J Card Fail*, 2008. **14**(7): p. 596-602.
131. Takeishi, Y. and Y. Koyama, *Pentosidine and Soluble Receptor for Advanced Glycation End-Product Are Important Prognostic Factors Independent of Renal Function in Heart Failure*. *J Card Fail*, 2008. **14**(7): p. 627-628.
132. Koyama, Y., et al., *High serum level of pentosidine, an advanced glycation end product (AGE), is a risk factor of patients with heart failure*. *J Card Fail*, 2007. **13**(3): p. 199-206.
133. Smit, A.J., et al., *Advanced glycation endproducts in chronic heart failure*. *Ann N Y Acad Sci*, 2008. **1126**: p. 225-30.
134. Koyama, Y., et al., *Soluble Receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a prognostic factor for heart failure*. *J Card Fail*, 2008. **14**(2): p. 133-9.
135. Reznikov, L.L., et al., *Effect of advanced glycation end products on endotoxin-*

- induced TNF-alpha, IL-1beta and IL-8 in human peripheral blood mononuclear cells.* Clin Nephrol, 2004. **61**(5): p. 324-36.
136. Peppas, M., et al., *Glycooxidation and inflammation in renal failure patients.* Am J Kidney Dis, 2004. **43**(4): p. 690-5.
137. Suliman, M.E., et al., *Plasma pentosidine is associated with inflammation and malnutrition in end-stage renal disease patients starting on dialysis therapy.* J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(6): p. 1614-22.
138. Witko-Sarsat, V., et al., *Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure.* J Immunol, 1998. **161**(5): p. 2524-32.
139. Witko-Sarsat, V., et al., *Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia.* Kidney Int, 1996. **49**(5): p. 1304-13.
140. Miyata, T., et al., *Alterations in nonenzymatic biochemistry in uremia: origin and significance of "carbonyl stress" in long-term uremic complications.* Kidney Int, 1999. **55**(2): p. 389-99.
141. Ueda, Y., et al., *Implication of altered redox regulation by antioxidant enzymes in the increased plasma pentosidine, an advanced glycation end product, in uremia.* Biochem Biophys Res Commun, 1998. **245**(3): p. 785-90.
142. Stange, J., et al., *A new procedure for the removal of protein bound drugs and toxins.* Asaio J, 1993. **39**(3): p. M621-5.
143. Stange, J., et al., *Dialysis against a recycled albumin solution enables the removal of albumin-bound toxins.* Artif Organs, 1993. **17**(9): p. 809-13.
144. Mitzner, S.R., et al., *Albumin dialysis using the molecular adsorbent recirculating system.* Curr Opin Nephrol Hypertens, 2001. **10**(6): p. 777-83.
145. Mitzner, S.R., et al., *Improvement of multiple organ functions in hepatorenal syndrome during albumin dialysis with the molecular adsorbent recirculating system.* Ther Apher, 2001. **5**(5): p. 417-22.
146. Mitzner, S., et al., *Improvement in central nervous system functions during treatment of liver failure with albumin dialysis MARS--a review of clinical, biochemical, and electrophysiological data.* Metab Brain Dis, 2002. **17**(4): p. 463-

- 75.
147. Mitzner, S.R., et al., *Improvement of hepatorenal syndrome with extracorporeal albumin dialysis MARS: results of a prospective, randomized, controlled clinical trial*. Liver Transpl, 2000. **6**(3): p. 277-86.
148. Mitzner, S., et al., *Albumin regeneration in liver support-comparison of different methods*. Ther Apher Dial, 2006. **10**(2): p. 108-17.
149. Mitzner, S.R., *Drain the brain: albumin dialysis for intracranial hypertension*. Crit Care Med, 2006. **34**(1): p. 254-5.
150. Mitzner, S.R., *Albumin dialysis: an update*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2007. **16**(6): p. 589-95.
151. Waghlikar, G.D., et al., *Pre-transplant optimization by Molecular Adsorbent Recirculating System in patients with severely decompensated chronic liver disease*. Indian J Gastroenterol, 2007. **26**(3): p. 110-2.
152. Yang, W.S., et al., *Albumin dialysis in critically ill patients: use versus omission of intradialytic heparin*. Artif Organs, 2008. **32**(5): p. 411-6.
153. Tan, H.K., *Molecular adsorbent recirculating system (MARS)*. Ann Acad Med Singapore, 2004. **33**(3): p. 329-35.
154. Dillmann, A., *Untersuchungen zur Entfernbarkeit albumingebundener Toxine am Beispiel der Propylfuransäure mittels Albumindialyse bei chronischen Hämodialysepatienten*. Diss, Universität Rostock, 2001.
155. Mitzner, S., et al., *Removal of protein-bound uremic toxins by albumin dialysis: in vivo results*. Nephrol Dial Transplant 14, 1999. **A201**.
156. Mitzner, S., J. Stange, and R. Schmidt. *Albumin-bound toxins-a group of toxins removable by molecular adsorbents recirculating system (MARS)*. in *2nd International Symposium on Uremic Toxicity*. 1994. Gent, Belgium.
157. Mitzner, S., et al. *Efficient removal of 3-Carboxy-4-Methyl-5-Propyl-2-Furanpropionate (CMPF) and Indoxyl sulfate by albumin dialysis-results of in-vitro experiments*. in *XLI EDTA Congress*. 2004. Lisbon, Portugal.
158. Mitzner, S., et al., *Removal of 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furan-propionic acid (CMPF) and indoxyl sulphate (IS) by albumin dialysis: clinical results*.

- Nephrol Dial Transplant, 2005. **20 Suppl. 5**: p. v330.
159. Mitzner, S., et al., *Albumin-dialysis but not conventional haemodialysis increases the reduced albumin-binding capacity (ABIC) in end-stage renal failure*. Nephrol Dial Transplant 2006, 2006. **21 Suppl.4**: p. 477-8.
160. Abe, T., et al., *A new method for removal of albumin-binding uremic toxins: efficacy of an albumin-dialysate*. Ther Apher, 2001. **5**(1): p. 58-63.
161. Mabuchi, H. and H. Nakahashi, *Profiling of endogenous ligand solutes that bind to serum proteins in sera of patients with uremia*. Nephron, 1986. **43**(2): p. 110-6.
162. Takahashi, M., et al., *Direct quantification of pentosidine in urine and serum by HPLC with column switching*. Clin Chem, 1996. **42**(9): p. 1439-44.
163. Hazra, R., et al., *Single-dose and steady-state pharmacokinetics of tenofovir disoproxil fumarate in human immunodeficiency virus-infected children*. Antimicrob Agents Chemother, 2004. **48**(1): p. 124-9.
164. ESAO, European Uremic Toxin (EUTox) Work Group of the ESAO, www.uremic-toxins.org. zuletzt eingesehen am 30.06.2009.
165. Meert, N., et al., *Inconsistency of reported uremic toxin concentrations*. Artif Organs, 2007. **31**(8): p. 600-11.
166. Dawnay, A., *Renal clearance of glycation adducts: anti-glycation defence in uraemia and dialysis*. Biochem Soc Trans, 2003. **31**(Pt 6): p. 1386-9.
167. Weiss, M.F., et al., *Mechanisms for the formation of glycoxidation products in end-stage renal disease*. Kidney Int, 2000. **57**(6): p. 2571-85.
168. Goldberg, T., et al., *Advanced glycoxidation end products in commonly consumed foods*. J Am Diet Assoc, 2004. **104**(8): p. 1287-91.
169. Tessitore, N., et al., *Effect of protein-leaking BK-F PMMA-based hemodialysis on plasma pentosidine levels*. J Nephrol, 2004. **17**(5): p. 707-14.
170. Haase, M., et al., *Hemodialysis membrane with a high-molecular-weight cutoff and cytokine levels in sepsis complicated by acute renal failure: a phase I randomized trial*. Am J Kidney Dis, 2007. **50**(2): p. 296-304.

-
171. Vanholder, R., et al., *Chronic kidney disease as cause of cardiovascular morbidity and mortality*. Nephrol Dial Transplant, 2005. **20**(6): p. 1048-56.
172. De Smet, R., et al., *Identification by HPLC of uraemic retention solutes decreasing theophylline protein binding*. Nephrol Dial Transplant, 1999. **14 Suppl 4**: p. 11-2.
173. Tsujimoto, M., et al., *Effects of Uremic Serum and Uremic Toxins on Hepatic Uptake of Digoxin*. Ther Drug Monit., 2008. **30**(5): p. 576-582.
174. Tumur, Z. and T. Niwa, *Indoxyl Sulfate Inhibits Nitric Oxide Production and Cell Viability by Inducing Oxidative Stress in Vascular Endothelial Cells*. Am J Nephrol., 2009. **29**(6): p. 551-557.
175. Muteliefu, G., et al., *Indoxyl sulphate induces oxidative stress and the expression of osteoblast-specific proteins in vascular smooth muscle cells*. Nephrol Dial Transplant., 2009. **Ahead of print**.
176. Muteliefu, G., A. Enomoto, and T. Niwa, *Indoxyl sulfate promotes proliferation of human aortic smooth muscle cells by inducing oxidative stress*. J Ren Nutr., 2009. **19**(1): p. 29-32.
177. Fujii, H., et al., *Oral charcoal adsorbent (AST-120) prevents progression of cardiac damage in chronic kidney disease through suppression of oxidative stress*. Nephrol Dial Transplant., 2009. **Ahead of print**.
178. Mitzner, S., Zeh, N., Seidel, P., Dillmann, A. Schmidt, R. *Efficient removal of 3-Carboxy-4-Methyl-5-Propyl-2-Furanpropionate (CMPF) and Indoxyl sulfate by albumin dialysis-results of in-vitro experiments*. in *XLI EDTA Congress*. 2004. Lisbon, Portugal.

Thesen

1. Albumingebundene urämische Toxine akkumulieren im Plasma von Patienten, die unter terminaler Niereninsuffizienz leiden.
2. CMPF, Pentosidin und Indoxylsulfat gehören zu der Gruppe der albumingebundenen Urämietoxine.
3. Albumingebundene urämische Toxine können zu multiplen klinischen Symptomen und typischerweise Langzeit-Komplikationen von chronischen Hämodialysepatienten führen.
4. Die Elimination von Urämietoxinen ist ein wichtiges Ziel bei der Verbesserung der Lebensqualität und Verringerung von Langzeitschäden bei chronischen Hämodialysepatienten.
5. Die Entfernung der albumingebundenen Urämietoxine ist durch die konventionelle Hämodialyse nicht oder nur in geringem Ausmaß möglich.
6. Das In-vitro-Kreislaufsystem mit dem Gegenstromprinzip kann die Effektivität der Albumindialyse versus konventionellen Hämodialyse durch den Einsatz von urämischem Patientenplasma realitätsnah simulieren.
7. Es konnte geklärt werden, dass die urämischen Toxine Indoxylsulfat und CMPF weder eine Affinität zu Eppendorf-Gefäßen noch einen natürlichen Zerfall unter Lichteinfluss und Raumtemperatur über 6 Stunden Versuchsdauer zeigen.
8. Durch die Albumindialyse lassen sich Urämietoxine wie Indoxylsulfat und CMPF effektiver entfernen als durch die konventionelle Hämodialyse.

-
9. Es wurde bestätigt, dass bei der Albumindialyse Adsorptions- und Desorptionsprozesse die Grundlage für den Austausch albumingebundener Toxine über der Dialysatormembran bilden.
 10. Das urämische Toxin Pentosidin lässt sich nicht durch die Albumindialyse entfernen. Dafür ist wahrscheinlich die starke kovalente Bindung des Pentosidins zum Albuminmolekül verantwortlich.
 11. Weiterführende Versuche hinsichtlich der zu erwartenden Reduktion der klinischen Symptome durch die Entfernung der albumingebundenen urämischen Toxine mittels Albumindialyse stehen noch aus und sollten in klinischen Studien geprüft werden.
 12. Die Entwicklung und Weiterentwicklung von Blutreinigungssystemen, die toxisch wirkende Substanzen wie die AGEs aus dem Blut von chronischen Hämodialysepatienten eliminieren können, sollten forciert werden.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben. Die Arbeit ist in der Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt worden.

Bern, 2009

Nina Zeh

Publikationen

The effect of extracorporeal albumin dialysis on plasma phospholipid fatty acids in patients with end stage liver disease Liver Int. 2003;23 Suppl 3:34-8.

Zeh, N., Rossi S.S., Hofmann A.F., Steinbach J.H., Hagey L.R., Oliver D., Stange J., Hassanein T.

Efficient removal of 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionate (CMPF) and indoxyl sulfate by albumin dialysis - results of in-vitro experiments [178]

European Renal Association and the European Dialysis and Transplant Association, XLI Congress, Lisbon, 05.2004

Steffen Mitzner, Nina Zeh, Petra Seidel, Andrea Dillmann and Reinhard Schmidt

Effect of albumin dialysis on albumin bound uremic toxins in plasma of chronic hemodialysis patients - results of in-vitro experiments

6th International Symposium on Albumin Dialysis in Liver Disease, Rostock-Warnemünde, 09.2004

Nina Zeh, Steffen Mitzner, Petra Seidel, Joachim Rychly, Andrea Dillmann and Reinhard Schmidt

Primary myoepithelial carcinoma of the lung – a rare entity

Abstract veröffentlicht in Swiss knife 2006, special edition, Seite 61

N. Zeh, U. Stammberger, M. Gugger, A.E. Dutly, R.A.Schmid (Inselspital Bern)

Enterobius vermicularis associated acute appendicitis

Jahreskongress Schweizerische Gesellschaft für Chirurgie, 28.-30.05.2008, Basel

Abstract veröffentlicht in Swiss knife 2008, special edition, Seite 69

N. Zeh, V. B. Tahami, J. Michel, E.J. Stauffer, B. Egger (Kantonsspital Fribourg)

8 Anhang

8.1 1. Versuchsreihe

8.1.1 Albumin

Tabelle 7: Albumin (g/dl) im Plasma

Versuch	1	2	3	4	5	6
Gruppe	HD	HD	HD	AD10%	AD10%	AD10%
LW	3,6	3,8	4	4,3	3,98	4,13
0	3,79	3,74	3,49	4,34	4,33	4,43
15	x	x	x	4,6	4,35	4,27
30	3,79	4,01	4,02	4,38	4,32	5,02
60	x	x	x	4,58	4,41	5,46
120	x	x	x	5,06	4,58	5,88
180	x	x	x	5,64	4,7	6,4
240	4,8	4,05	4,39	5,64	4,85	5,42

HD=Hämodialyse, AD=Albumindialyse LW=Leerwert, x=keine Probenabnahmen

Tabelle 8: Albumin (g/dl) im Dialysat

Versuch	1	2	3	4	5	6
Gruppe	HD	HD	HD	AD10%	AD10%	AD10%
LW	0	0	0	10,52	10,18	9,89
0 De	0	0	0	10,68	10,34	9,86
15 De	x	x	x	10,64	10,11	9,58
15 Da	x	x	x	10,55	10,83	10,06
30 De	0	0	0	10,24	10,24	9,79
30 Da	0	0	0	10,92	10,03	9,14
60 De	x	x	x	10,49	10,05	9,64
60 Da	x	x	x	9,94	9,54	9,53
120 De	x	x	x	10,25	10,05	9,81
120 Da	x	x	x	10,18	9,59	9,26
180 De	x	x	x	10,27	10,32	9,75
180 Da	x	x	x	10,36	9,62	9,65
240 De	x	x		10,29	9,77	9,79
240 Da	0	0	0	10,19	9,84	10,44

HD=Hämodialyse, AD=Albumindialyse LW=Leerwert, De=Dialysateingang, Da=Dialysatausgang, x=keine Probenabnahmen

8.1.2 Pentosidin

Tabelle 9: Pentosidin (nmol/l) im Plasma

Versuch	1	2	3	4	5	6
Gruppe	HD	HD	HD	AD10%	AD10%	AD10%
LW	292	295	290	667	675	439
0	296	292	291	671	671	462
15	x	x	x	580	642	498
30	x	x	x	609	649	517
60	x	x	x	658	627	558
120	x	x	x	658	780	634
180	x	x	x	674	740	676
240	354	309	319	716	758	704

HD=Hämodialyse, AD=Albumindialyse LW=Leerwert, x=keine Probenabnahmen

Tabelle 10: Pentosidin (nmol/l) im Dialysat

Versuch	1	2	3	4	5	6
Gruppe	HD	HD	HD	AD10%	AD10%	AD10%
LW	22	15	20	146	139	100
0 De	22	16	18	150	134	100
15 De	x	x	x	157	157	116
15 Da	x	x	x	159	156	115
30 De	x	x	x	164	143	111
30 Da	x	x	x	162	163	114
60 De	x	x	x	161	158	109
60 Da	x	x	x	160	127	111
120 De	x	x	x	165	129	112
120 Da	x	x	x	168	119	105
180 De	x	x	x	158	130	109
180 Da	x	x	x	167	134	110
240 De	24	23	21	164	131	106
240 Da	22	23	22	148	136	108

HD=Hämodialyse, AD=Albumindialyse, LW=Leerwert, De=Dialysateingang, Da=Dialysatausgang, x=keine Probenabnahmen

Tabelle 11: Wilcoxon-Test zur Überprüfung von Unterschieden von Pentosidin und Albumin vor und nach der Dialyse (4 h) im Plasma

n=3 je Gruppe	Pentosidin vor - nach	Albumin vor - nach	MV vor - nach
HD	$p=0,109$	$p=0,109$	$p=0,109$
AD 10%	$p=0,109$	$p=0,109$	$p=0,593$

MV=Molares Verhältnis, HD=Hämodialyse, AD=Albumindialyse, n=Versuchsanzahl

Tabelle 12: Entfernte Menge von Pentosidin in nmol/l aus dem Plasma nach 4 Stunden Dialysedauer

	Hämodialyse (n=3)	Albumindialyse (n=3)	p-Wert
MW \pm s	$-5,15 \pm 3,18$	$-19,85 \pm 17,42$	0,127

MW=Mittelwert, s=Standardabweichung, n=Versuchsanzahl

8.1.3 CMPF

Tabelle 13: CMPF ($\mu\text{mol/l}$) im Plasma

Versuch	1	2	3	4	5	6
Gruppe	HD	HD	HD	AD10%	AD10%	AD10%
LW	47,1	52,9	53,8	57,2	54,5	52,3
0	57,3	55,9	55,3	62,6	61,1	57,7
15	52,8	48,3	51,4	57,8	52,3	59,1
30	54,4	54,6	51,4	52,1	49,2	56,1
60	60,9	58,4	56,1	42,7	38,9	50,9
120	65,45	54,2	53,1	26,2	25,5	37,8
180	69,2	50,4	60	21,3	16,1	30,1
240	70,1	57,7	61,4	16,4	12,2	24,7

LW=Leerwert, HD=Hämodialyse, AD=Albumindialyse, CMPF=3-Carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionsäure

Tabelle 14: CMPF ($\mu\text{mol/l}$) im Dialysat

Versuch	1	2	3	4	5	6
Gruppe	HD	HD	HD	AD10%	AD10%	AD10%
LW	0	0	0	0,5	0,5	0,6
0 De	0	0	0	0,5	0,5	0,4
15 De	0	0	0	2,4	1,9	1,8

15 Da	0	0	0	2,7	2,3	2,1
30 De	0	0	0	4,6	3,8	3,2
30 Da	0	0	0	4,8	4,2	3,4
60 De	0	0	0	7	6,8	5,3
60 Da	0	0	0	7,1	6,9	5,7
120 De	0	0	0	9,7	10,7	8,1
120 Da	0	0	0	10	10,7	8,3
180 De	0	0	0	11,4	11,4	8,9
180 Da	0	0	0	11,6	11,5	9,2
240 De	0	0	0	12	12	9,9
240 Da	0	0	0	10,9	12,1	10,3

HD=Hämodialyse, AD=Albumindialyse, LW=Leerwert, De=Dialysateingang, Da=Dialysatausgang,, CMPF=3-Carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionsäure

Tabelle 15: Wilcoxon-Test zur Überprüfung von Unterschieden von CMPF vor und nach der Dialyse im Plasma

n=3 je Gruppe	CMPF	Albumin	MV
	vor - nach	vor - nach	vor - nach
HD	p=0,109	p=0,109	p=0,109
AD 10%	p=0,109	p=0,109	p=0,109

MV=Molares Verhältnis, HD=Hämodialyse, AD=Albumindialyse, LW=Leerwert, CMPF=3-Carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionsäure, n=Versuchszahl

Tabelle 16: Entfernte Menge von CMPF in μmol aus dem Plasma

	Hämodialyse (n=3)	Albumindialyse (n=3)	p-Wert
MW \pm s	-1,04 \pm 0,83	6,40 \pm 1,27	0.05

MW=Mittelwert, s=Standardabweichung, n=Versuchszahl

8.2 2. Versuchsreihe

8.2.1 Albumin

Tabelle 17a/b: Albumin (g/dl) im Plasma

Versuch Gruppe	7	8	9	10	11	12
	HD	HD	HD	AD10%	AD10%	AD10%
LW	4,6	4,1	4,3	4,6	4,2	4,7
0	4,4	4,1	4,1	4,7	4,7	5,1
15	4,3	4,0	3,5	6,6	5,2	6,1

30	4,3	4,1	3,5	6,4	5,3	6,3
60	4,2	4,4	3,5	6,5	5,8	6,5
120	4,2	4,4	3,6	6,7	7,3	8,0
180	x	x	x	x	x	x
240	3,7	4,3	3,6	6,9	8,3	8,5
300	x	x	x	6,8	x	x
360	3,7	4,7	4,1	6,9	9,7	9,3
RT 6 h	4,5	4,2	4,2	x	x	x

HD=Hämodialyse, AD=Albumindialyse, LW=Leerwert, RT 6 h=bei Raumtemperatur nach 6 Stunden, x=keine Probenabnahmen

Tabelle 17a/b: Albumin (g/dl) im Plasma

Versuch	13	14	15	16	17	18
Gruppe	AD20%	AD20%	AD10%	AD10%	AD20%	HD
LW	4,4	4,5	3,1	3,9	3,9	3,9
0	4,5	4,5	3,2	3,9	3,9	4,0
15	4,9	5,2	3,6	4,2	4,6	4,1
30	5,1	5,5	3,5	4,4	5,2	4,3
60	5,3	5,7	3,8	4,0	5,0	4,5
120	5,5	5,8	3,8	4,3	6,2	4,7
180	x	x	x	x	x	x
240	5,7	6,5	3,8	4,9	5,8	5,0
300	5,8	6,9	x	x	x	x
360	5,8	7,0	3,9	5,0	5,8	5,9
RT 6 h	x	x	x	x	x	x

HD=Hämodialyse, AD=Albumindialyse, LW=Leerwert, RT 6 h=bei Raumtemperatur nach 6 Stunden, x=keine Probenabnahmen

Tabelle 18a/b: Albumin (g/dl) im Dialysat

Versuch	7	8	9	10	11	12
Gruppe	HD	HD	HD	AD10%	AD10%	AD10%
LW	0,0	0,0	0,0	9,6	10,9	7,4
0 De	0,0	0,0	0,0	9,5	11,1	8,0
15 De	0,0	0,0	0,0	8,6	10,4	10,1
15 Da	0,0	0,0	0,0	8,6	10,7	11,0
30 De	0,0	0,0	0,0	8,7	10,7	11,0
30 Da	0,0	0,0	0,0	9,7	10,3	10,5
60 De	0,0	0,0	0,0	8,2	9,8	10,7

60 Da	0,0	0,0	0,0	8,9	10,1	10,7
120 De	0,0	0,0	0,0	8,5	10,7	9,8
120 Da	0,0	0,0	0,0	8,8	10,0	10,4
180 De	x	x	x	9,3	10,2	10,7
180 Da	x	x	x	8,9	10,8	10,0
240 De	0,0	0,0	0,0	8,7	10,2	10,1
240 Da	0,0	0,0	0,0	8,9	10,5	10,3
300 De	x	x	x	9,2	11,1	10,5
300 Da	x	x	x	9,2	10,6	10,2
360 De	0,0	0,0	0,0	9,6	10,4	9,9
360 Da	0,0	0,0	0,0	8,5	10,6	10,1

HD=Hämodialyse, AD=Albumindialyse, LW=Leerwert, De=Dialysateingang, Da=Dialysatausgang, x=keine Probenabnahmen

Tabelle 18a/b: Albumin (g/dl) im Dialysat

Versuch	13	14	15	16	17	18
Gruppe	AD20%	AD20%	AD10%	AD10%	AD20%	HD
LW	19,9	20,9	19,6	10,8	18,4	0,0
0 De	21,1	21,2	19,7	10,6	18,6	0,0
15 De	19,2	19,7	19,8	10,6	17,8	0,0
15 Da	20,2	20,1	20,1	10,1	17,2	0,0
30 De	20,0	19,8	20,7	10,4	17,5	0,0
30 Da	19,9	19,9	20,6	9,9	17,2	0,0
60 De	20,1	20,2	19,6	10,4	17,0	0,0
60 Da	18,5	19,9	20,2	10,9	17,6	0,0
120 De	19,9	20,1	20,1	10,4	16,8	0,0
120 Da	19,3	20,8	19,9	10,7	17,1	0,0
180 De	19,1	19,9	x	x	x	x
180 Da	20,1	19,9	x	x	x	x
240 De	18,8	19,8	20,4	10,2	17,2	0,0
240 Da	19,0	18,4	20,1	10,0	17,6	0,0
300 De	19,4	19,8	x	x	x	x
300 Da	19,1	19,5	x	x	x	x
360 De	19,8	19,3	19,8	10,1	17,3	0,0
360 Da	19,6	18,8	20,0	9,9	17,2	0,0

HD=Hämodialyse, AD=Albumindialyse, LW=Leerwert, De=Dialysateingang, Da=Dialysatausgang, x=keine Probenabnahmen

Tabelle 19a/b: CMPF ($\mu\text{mol/l}$) im Plasma

Versuch	7	8	9	10	11	12
Gruppe	HD	HD	HD	AD10%	AD10%	AD10%
LW	50,4	53,8	53,4	48,7	53,9	57,6
0	51,6	53,9	53,9	68,2	57,9	65,7
15	51,8	46,4	42,3	82	64,3	68,8
30	43,9	47,5	41,7	61,4	60,8	64,7
60	44,8	50,9	44,8	43,3	51,9	49,9
120	45,3	52,3	46,1	21,5	36,6	44,8
180	x	x	x	x	x	x
240	43,1	50,9	46,1	9,3	25,9	19,6
300	x	x	?	x	x	x
360	43,4	53,4	47	6,5	17,7	14,1
RT 6 h	54,2	54,7	51,9	x	x	x

HD=Hämodialyse, AD=Albumindialyse, LW=Leerwert, CMPF=3-Carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionsäure, RT 6 h=bei Raumtemperatur nach 6 Stunden, x=keine Probenabnahmen

Tabelle 19a/b: CMPF ($\mu\text{mol/l}$) im Plasma

Versuch	13	14	15	16	17	18
Gruppe	AD20%	AD20%	AD10%	AD10%	AD20%	HD
LW	57,1	56,3	20,2	33,5	30,3	32,4
0	58,4	57,2	20,8	34	31	30,9
15	61,4	57,5	18,6	33,2	41,8	30,6
30	56,2	53,4	14,9	33,5	38,7	31,6
60	45,9	42,7	12	23,5	30	33
120	35,6	29,8	6,6	17,3	26	33,5
180	x	x	x	x	x	x
240	20,9	16,5	3,1	10,2	12,6	37,7
300	16,7	12,5	x	x	x	x
360	13,4	10,7	1,9	7,4	8,5	46,4
RT 6 h	x	x	x	x	x	x

HD=Hämodialyse, AD=Albumindialyse, LW=Leerwert, CMPF=3-Carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionsäure RT 6 h=bei Raumtemperatur nach 6 Stunden, x=keine Probenabnahmen

Tabelle 20a/b: CMPF ($\mu\text{mol/l}$) im Dialysat

Versuch	7	8	9	10	11	12
Gruppe	HD	HD	HD	AD10%	AD10%	AD10%
LW	0	0	0	1,9	1,6	1,7
0 De	0	0	0	2,1	1,6	1,6
15 De	0	0	0	3,9	3,2	3,4
15 Da	0	0	0	4,8	3,4	3,9
30 De	0	0	0	6,9	4,6	5,2
30 Da	0	0	0	7,1	4,9	5,7
60 De	0	0	0	10,4	7	8
60 Da	0	0	0	10,7	7,4	8,3
120 De	0	0	0	12,8	10,4	10,4
120 Da	0	0	0	13,4	10,4	10,3
180 De	x	x	x	14,5	11,6	12,6
180 Da	x	x	x	14,4	11,8	12,4
240 De	0	0	0	14,9	11,9	12,9
240 Da	0	0	0	14,4	12,3	13,1
300 De	x	x	x	x	12,4	13,6
300 Da	x	x	x	x	12,6	13,1
360 De	0	0	0	14,8	12,9	13,3
360 Da	0	0	0	14,6	12,9	13,3

HD=Hämodialyse, AD=Albumindialyse, LW=Leerwert, De=Dialysateingang, Da=Dialysatausgang,, CMPF=3-Carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionsäure

Tabelle 20a/b: CMPF ($\mu\text{mol/l}$) im Dialysat

Versuch	13	14	15	16	17	18
Gruppe	AD20%	AD20%	AD10%	AD10%	AD20%	HD
LW	3,6	1,5	1,5	2,7	5,6	0
0 De	3,5	1,3	1,6	2,7	5,5	0
15 De	5,3	3,1	2,2	4	5,3	0
15 Da	5,5	3,5	2,3	4,1	5,2	0
30 De	6,8	4,5	3	4,9	7,3	0
30 Da	6,9	4,8	3,2	4,8	7,3	0
60 De	9,4	6,9	4,3	6,4	8,3	0
60 Da	9,9	7,3	4,5	6,7	8,4	0
120 De	13,1	10	6,1	8,1	10,5	0

120 Da	13,7	10,3	6,5	8,7	10,4	0
180 De	15,8	11,8	x	x	x	x
180 Da	15,4	12	x	x	x	x
240 De	15,6	12,6	7,5	10,5	13,2	0
240 Da	16,2	12,8	7,6	10,6	13,5	0
300 De	16,6	x	x	x	x	x
300 Da	17,3	13,4	x	x	x	x
360 De	17,3	14,1	7,9	11,4	14,4	0
360 Da	17,4	13,9	7,9	11,4	14,9	0

HD=Hämodialyse, AD=Albumindialyse, LW=Leerwert, De=Dialysateingang, Da=Dialysatausgang, CMPF=3-Carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionsäure, x=keine Probenmessungen

Tabelle 21: Statistischer Vergleich entfernte Menge im Plasma und Zunahme im Dialysat von CMPF nach 6 Stunden Dialysedauer

Statistischer Vergleich	Entfernte Menge CMPF	Zunahme CMPF
HD <-> AD 10%	p=0,021*	p=0,014*
HD <-> AD 20%	p=0,021*	p=0,014*
AD10% <-> AD 20%	p=0,368	p=0,773

HD=Hämodialyse, AD=Albumindialyse, CMPF=3-Carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionsäure

Tabelle 22a/b: Indoxylsulfat ($\mu\text{mol/l}$) im Plasma

Versuch Gruppe	7	8	9	10	11	12
	HD	HD	HD	AD10%	AD10%	AD10%
LW	42,8	37,6	42,8	39,6	45,2	52,4
0	35,5	35,8	45,8	41,3	41,9	47,9
15	35,9	29,3	35,1	6,1	11,7	9,5
30	33,4	28,3	34,7	4,8	5,6	5,8
60	33,1	30,6	33,7	5,6	4,8	5,6
120	31,2	28,6	33,6	5	5,5	6,3
180	x	x	x	x	x	x
240	31,1	28,3	32,3	4,9	5,9	4,7
300	x	x	x	x	x	x
360	30,1	30,2	36,2	5,5	5,8	7,4
RT 6 h	45	41,5	49,1	x	x	x

HD=Hämodialyse, AD=Albumindialyse, LW= Leerwert, RT 6 h=bei Raumtemperatur nach 6 Stunden, x=keine Probenmessungen

Tabelle 22a/b: Indoxylsulfat ($\mu\text{mol/l}$) im Plasma

Versuch	13	14	15	16	17	18
Gruppe	AD20%	AD20%	AD10%	AD10%	AD20%	HD
LW	53,6	37,9	26,9	38,8	37,2	37,2
0	48,7	31,4	22,6	40,7	37,8	36,6
15	6,9	4,8	2,9	5,6	14,4	34,5
30	4,8	4,1	2,8	5,4	3,3	35,1
60	4,8	4,3	2,9	4,9	3,4	35,1
120	5,2	4,1	3,1	5,2	3,5	34,9
180	x	x	x	x	x	x
240	5,3	4,3	3,1	5,5	3,5	36,9
300	x	x	x	x	x	x
360	5,4	4,5	2,9	5,5	3,5	37,8
RT 6 h	x	x	x	x	x	x

HD=Hämodialyse, AD=Albumindialyse, LW= Leerwert, RT 6 h=bei Raumtemperatur nach 6 Stunden, x=keine Probenmessungen

Tabelle 23a/b: Indoxylsulfat ($\mu\text{mol/l}$) im Dialysat

Versuch	7	8	9	10	11	12
Gruppe	HD	HD	HD	AD10%	AD10%	AD10%
LW	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
0 De	2,3	0	0	0	0	0
15 De	2,4	3,8	3,9	9,6	8,9	10,5
15 Da	2,7	3,9	4,1	10,1	8,6	10,5
30 De	3,1	4,1	4,2	10,5	10,3	11,3
30 Da	3,2	4,2	4,2	10,3	10,1	12,1
60 De	3,4	4,3	4,5	10,6	10	11,5
60 Da	3,4	4,3	4,5	10,8	9,9	12,6
120 De	3,9	4,7	5	11	9,8	11
120 Da	4	4,7	4,8	10,9	10,4	11,4
180 De	x	x	x	10,9	9,9	12,2
180 Da	x	x	x	10,5	10,1	12
240 De	4,8	4,9	5,3	10,3	10,5	11,8
240 Da	4,8	4,9	5,4	10,7	10,8	9
300 De	x	x	x	11,1	10,2	10,8

300 Da	x	x	x	9,5	10,8	8,6
360 De	4,9	5,4	5,4	11,2	10,3	8,6
360 Da	5	5,5	5,4	11,3	11,5	9,3

HD=Hämodialyse, AD=Albumindialyse, LW= Leerwert, De=Dialysateingang, Da=Dialysatausgang, x=keine Probenmessungen

Tabelle 23a/b: Indoxylsulfat ($\mu\text{mol/l}$) im Dialysat

Versuch	13	14	15	16	17	18
Gruppe	AD20%	AD20%	AD10%	AD10%	AD20%	HD
LW	0,0	1,2	0,0	2,4	0,0	0,0
0 De	0	1,2	0	0	0	0
15 De	10,9	8,4	6,2	9,4	4	2,1
15 Da	11,5	8,2	6	10,1	4,9	2,1
30 De	11,9	8,8	6,3	10	5,4	2
30 Da	13,6	8,4	6	10,2	5,7	2
60 De	11,9	8,5	6,2	10,5	5,8	1,7
60 Da	12,1	8,4	7,3	10,7	5,9	1,7
120 De	12,8	8,2	6,3	10,6	5,9	1,8
120 Da	11,9	8,9	6,8	11,4	6	1,9
180 De	12,9	8,8	x	x	x	x
180 Da	11,9	9,4	x	x	x	x
240 De	12,1	9,4	9,3	11,3	5,9	1,1
240 Da	12,6	10,9	6,9	11,4	5,8	1,1
300 De	12,6	8,7	x	x	x	x
300 Da	11,6	8,9	x	x	x	x
360 De	12,6	9,8	6,1	11,5	6,1	2,9
360 Da	12	10,2	6,7	11,7	6	3

HD=Hämodialyse, AD=Albumindialyse, LW= Leerwert, De=Dialysateingang, Da=Dialysatausgang, x=keine Probenmessungen

Tabelle 24: Statistischer Vergleich entfernte Menge im Plasma und Zunahme im Dialysat von Indoxylsulfat nach 6 Stunden Dialysedauer

Statistischer Vergleich	Entfernte Menge IS	Zunahme IS
HD <-> AD 10%	$p=0,021^*$	$p=0,020^*$
HD <-> AD 20%	$p=0,021^*$	$p=0,019^*$
AD10% <-> AD 20%	$p=0,564$	$p=0,306$

HD=Hämodialyse, AD=Albumindialyse, IS=Indoxylsulfat

Tabelle 25: Statistischer Vergleich Molares Verhältnis von CMPF und Indoxylsulfat zu Albumin zum Zeitpunkt 0 Minuten in der zweiten Versuchsreihe

Statistischer Vergleich	MV CMPF bei 0 min	MV IS bei 0 min
HD<->AD 10%	$p=0,773$	$p=0,663$
HD<-> AD 20%	$p=0,381$	$p=0,561$
AD 10%<-> AD 20%	$p=0,468$	$p=0,772$

MV=Molares Verhältnis, HD=Hämodialyse, AD=Albumindialyse, CMPF=3-Carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionsäure, IS=Indoxylsulfat

Tabelle 26: Statistischer Vergleich Molares Verhältnis von CMPF und Indoxylsulfat zu Albumin zum Zeitpunkt 360 Minuten in der zweiten Versuchsreihe

Statistischer Vergleich	MV CMPF bei 360 min	MV IS bei 360 min
HD<->AD 10%	$p=0,02^*$	$p=0,021^*$
HD<-> AD 20%	$p=0,02^*$	$p=0,021^*$
AD 10%<-> AD 20%	$p=1,00$	$p=0,564$

MV=Molares Verhältnis, HD=Hämodialyse, AD=Albumindialyse, CMPF=3-Carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionsäure, IS=Indoxylsulfat