

Aus dem Institut/der Klinik für Innere Medizin – Nephrologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Untersuchungen zur Expression von Proteinen des oxidativen
Stress und der antioxidativen Abwehr bei Patienten mit
terminaler Niereninsuffizienz

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Lea N. Barrie
aus Calgary, Alberta, Kanada

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. M. Tepel
2. Prof. Dr. med. M. Barenbrock
3. Priv.-Doz. Dr. med. O. Süss

Datum der Promotion: 29.01.2010

Gewidmet meinen Eltern und Kiste

INHALT

1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG 7

1.1 DIE NIERENERSATZTHERAPIE BEI PATIENTEN MIT TERMINALER NIERENINSUFFIZIENZ	7
1.1.1 PRINZIP DER HÄMODIALYSE	8
1.2 OXIDATIVER STRESS: ALLGEMEINE PRINZIPIEN.....	9
1.2.1 FREIE RADIKALE	9
1.2.2 BIOLOGISCHE EFFEKTE DURCH ROS.....	11
1.2.3 DAS ANTIOXIDATIVE SYSTEM.....	13
1.3 PROTEINE DES OXIDATIVEN STRESS UND DER ANTIOXIDATIVEN ABWEHR	14
1.3.1 DIE SUPEROXIDDISMUTASEN	14
1.3.2 DIE GLUTATHIONPEROXIDASE	15
1.3.3 DIE NAD(P)H-QUINONE OXIDOREDUKTASE	16
1.3.4 DAS IGFBP1.....	17
1.4 OXIDATIVER STRESS UND NIERENINSUFFIZIENZ: PATHOPHYSIOLOGISCHE GRUNDLAGEN	18
1.4.1 DIE CHRONISCHE INFLAMMATION UND OXIDATIVER STRESS	18
1.4.2 URÄMIE ASSOZIIERTE FAKTOREN	20
1.4.3 HD -ASSOZIIERTE FAKTOREN	21
1.5 FRAGESTELLUNG	23

2.0 MATERIAL UND METHODEN 24

2.1 STUDIENAUFBAU UND –DURCHFÜHRUNG.....	24
2.2 ISOLIERUNG VON MONOZYTEN AUS VOLLBLUT	24
2.3 IN-CELL-WESTERN ASSAY.....	27
2.3.1 PRINZIP DES IN-CELL WESTERN ASSAYS	27
2.3.2 DURCHFÜHRUNG DES IN-CELL WESTERN ASSAYS	27
2.4 MESSUNG DER ANTIOXIDATIVEN GESAMTKAPAZITÄT DES PLASMAS	29
2.4.1 PRINZIP DES TOTAL ANTIOXIDANT STATUS ASSAY (TAOS).....	29
2.4.2 DURCHFÜHRUNG DES TOTAL ANTIOXIDANT STATUS ASSAYS	29
2.5 PROTEINASSAY NACH BRADFORD.....	30
2.5.1 PRINZIP DES PROTEINASSAY NACH BRADFORD	30
2.5.2 DURCHFÜHRUNG DES PROTEINASSAY NACH BRADFORD	31
2.6 MATERIAL	31
2.6.1 ARBEITSGERÄTE	31
2.6.2 ARBEITSUTENSILIEN	32
2.6.3 CHEMIKALIEN	32
2.7 STATISTIK	35

3.0 ERGEBNISSE 37

3.1 PATIENTENCHARAKTERISIERUNG	37
3.2 BRADFORDASSAY	40
3.3 DIE EXPRESSION OXIDATIV UND ANTIOXIDATIV WIRKENDER PROTEINE BEI NIERENINSUFFIZIENTEN PATIENTEN MIT UND OHNE NIERENERSATZTHERAPIE UND GESUNDEN PROBANDEN.....	41
3.3.1 SOD1	42
3.3.2 SOD2	44
3.3.3 GPX	46
3.3.4 KORRELATIONSANALYSE DER PROTEINE SOD1, SOD2 UND GPX BEI CHRONISCH NIERENINSUFFIZIENTEN PATIENTEN OHNE NIERENERSATZTHERAPIE	48

3.3.5 NQO1	49
3.3.6 IGFBP1	52
3.4 ERGEBNISSE DER MESSUNG DER ANTIOXIDATIVEN GESAMTKAPAZITÄT DES PLASMAS.....	54
<u>4.0 DISKUSSION</u>	<u>59</u>
4.1 DIE EXPRESSION DER ANTIOXIDATIVEN PROTEINE SOD1 UND SOD2 BEI NIERENINSUFFIZIENTEN PATIENTEN MIT UND OHNE NIERENERSATZTHERAPIE UND GESUNDEN PROBANDEN	60
4.2 DIE EXPRESSION DES ANTIOXIDATIVEN PROTEINS GPX BEI NIERENINSUFFIZIENTEN PATIENTEN MIT UND OHNE NIERENERSATZTHERAPIE UND GESUNDEN PROBANDEN	64
4.3 KORRELATIONSANALYSE DER PROTEINE SOD1, SOD2 UND GPX BEI CHRONISCH NIERENINSUFFIZIENTEN PATIENTEN OHNE NIERENERSATZTHERAPIE	65
4.4 DIE EXPRESSION DES PROTEINS NQO1 BEI NIERENINSUFFIZIENTEN PATIENTEN MIT UND OHNE NIERENERSATZTHERAPIE UND GESUNDEN PROBANDEN.....	66
4.5 DIE EXPRESSION DES PROTEINS IGFBP1 BEI NIERENINSUFFIZIENTEN PATIENTEN MIT UND OHNE NIERENERSATZTHERAPIE UND GESUNDEN PROBANDEN	69
4.6 DIE ANTIOXIDATIVE GESAMTKAPAZITÄT DES PLASMAS BEI NIERENINSUFFIZIENTEN PATIENTEN MIT UND OHNE NIERENERSATZTHERAPIE UND GESUNDEN PROBANDEN	70
<u>5.0 ZUSAMMENFASSUNG.....</u>	<u>73</u>
<u>6.0 LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>75</u>
<u>7.0 DANKSAGUNGEN.....</u>	<u>84</u>
<u>8.0 LEBENS LAUF</u>	<u>85</u>
<u>9.0 SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG.....</u>	<u>86</u>

Abkürzungsverzeichnis

ABTS	(2,2-Azino-di-[3-ethylbenz-thiazoloin-sulphonat])
AGE	Advanced Glycosylation End Products
AP-1	aktivator Protein-1
AT-1	Angiotensin 1
CNI	chronische Niereninsuffizienz
CRP	c-reaktives Protein
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DT3	1,2-dithiol-3-thione
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
GPX	Glutathionperoxidase
GSSG	Glutathiondisulfid (oxidiertes Glutathion)
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HD	Hämodialyse
Hkt	Hämatokrit
IGF	Insulin like growth Factor
IGFBP1	Insulin like growth Factor 1
IL-6	Interleukin 6
iNO	inducible Nitric Oxide
KHK	koronare Herzerkrankung
LDL	low density Lipoprotein
MCP-1	Monocyte Chemoattraktant Protein-1
MPO	Myeloperoxidase
NAD(P)H	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat +H
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid +H
NF-KB	Nuclear factor-KB
nNOS	neuronal Nitric Oxide Synthase
NQO1	NAD(P)H:quinone oxidoreduktase 1
PDGF	platelet derived growth factor
PMNL	polymorphonukleare Monozyten
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Rotationen pro Minute
SOD1	Superoxiddismutase 1 (Cu/ZnSOD)
SOD2	Superoxiddismutase 2 (MnSOD)
VEGF	vascular endothelial growth factor

1. Einleitung und Fragestellung

1.1 Die Nierenersatztherapie bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz

Die chronische Niereninsuffizienz ist definiert als eine irreversible Abnahme des Glomerulumfiltrates bei progressivem Untergang funktionsfähigen Nierengewebes und geht damit mit der Verminderung der glomerulären, tubulären und endokrinen Funktion beider Nieren einher. In Abhängigkeit von den Retentionswerten verläuft die chronische Niereninsuffizienz in vier Stadien, die fließend ineinander übergehen.

Die Niereninsuffizienz beginnt zunächst mit einem symptomlosen, kompensierten Dauerstadium bei noch normalen Retentionswerten im Serum, aber leicht eingeschränkter Kreatininclearance. Dem schließt sich das Stadium der kompensierten Retention an, auch Azotämie genannt. Hier kommt es zu einer Erhöhung des Serum-Kreatinins auf bis zu 6 mg/dl. Es folgt das Stadium der dekompenzierten Retention (Präurämie), mit einer Serum-Kreatininerhöhung >6 mg/dl. Das Terminalstadium der Niereninsuffizienz ist gekennzeichnet durch einen weiteren Anstieg des Serum-Kreatinins mit urämischen Symptomen trotz Ausschöpfung konservativer Maßnahmen. In diesem Stadium ist eine Nierenersatztherapie für das weitere Überleben des Patienten erforderlich.

Eine weitere Klassifizierungsmöglichkeit der Niereninsuffizienz ist die anhand der glomerulären Filtrationsrate. Dabei wird die Niereninsuffizienz in fünf Schweregrade eingeteilt.

Die Prävalenz der chronischen Nierenersatztherapie lag 2006 bei 808 Dialysepatienten pro Million Einwohner gemeldet. Bundesweit sind das 66508 Dialysepatienten. Die Hämodialyse wurde mit 87.5% am häufigsten therapeutisch angewandt und ist auch heute das eindeutig führende Verfahren. Es wurden 39 Patienten pro Million Einwohner mehr als im Vorjahr betreut, das entspricht einem Anstieg der Zahl der Dialysepatienten von 4.9% [QuaSiNiere, Juli 2006].

Die Inzidenz der terminalen Niereninsuffizienz lag 2006 bei 213 pro eine Million Einwohner. Zu den häufigsten Ursachen der terminalen Niereninsuffizienz gehört der Diabetes mellitus (zu 24% Typ II, zu 4% Typ I), gefolgt von Glomerulonephritis (19%) und der vaskulären Nephropathie (17%).

Unabhängig der zugrunde liegenden Ursache der terminalen Niereninsuffizienz hat sie ein Versagen der in- und exkretorischen Nierenfunktion und einen Verlust der homöostatischen Nierenfunktion zur Folge. Es kommt zu toxischen Organschäden durch die retenierten harnpflichtigen Substanzen. Diese sind Folge der Urämie und manifestieren sich insbesondere im Herz-Kreislaufsystem, im zentralen und peripheren Nervensystem, im Blut und in Blutbestandteilen. Durch Versagen der inkretorischen Nierenfunktion kommt es zur renalen Anämie, zum sekundären Hyperparathyreoidismus mit renaler Osteopathie sowie zum renalen Hypertonus.

1.1.1 Prinzip der Hämodialyse

Die Hämodialyse ist das weltweit am häufigsten angewandte Behandlungsverfahren bei der chronischen Niereninsuffizienz. Das Blut des Patienten wird einem geeigneten Gefäßanschluss entnommen und im Dialysator mit einer geeigneten Spüllösung in Kontakt gebracht. Der Stoffaustausch in der Dialyse erfolgt durch Diffusion und in geringem Maße durch Konvektion. Je nach Konzentrationsgradienten und Membraneigenschaften erfolgt der diffusive Stoffaustausch vom Blut ins Dialysat und umgekehrt, aber die Anzahl der Substanzen, deren Nettotransfer von der Dialysierflüssigkeit ins Blut positiv ist, ist auf wenige Moleküle wie Elektrolyte und Puffer (z.B. Bicarbonat oder Calcium) begrenzt.

Nach europäischen und US-amerikanischen Richtlinien sollte immer dann mit einer Dialysetherapie begonnen werden, wenn die GFR weniger als $15\text{ml}/\text{min}/1.73\text{m}^2$ beträgt und eines oder mehrere der folgenden Symptome oder Zeichen der Urämie vorhanden sind:

- keine konservative Möglichkeit, den Hydratationsstatus oder den Blutdruck zu kontrollieren
- zunehmende Verschlechterung des Ernährungszustandes

Auf jeden Fall sollte die Dialyse begonnen werden bevor die GFR auf $6\text{ml}/\text{min}/1.73\text{m}^2$ abgefallen ist, auch wenn eine optimale Behandlung im Stadium 5 der chronischen Niereninsuffizienz umgesetzt werden kann und keine Beschwerden bestehen [Hörl et al., 2004].

1.2 Oxidativer Stress: Allgemeine Prinzipien

Die Fähigkeit aerober Organismen, Sauerstoff zur vollständigen Oxidation von Nahrungsmitteln zur Energiegewinnung zu nutzen, stellt ohne Zweifel eine der wichtigsten Voraussetzungen für die Entstehung höherer Lebensformen dar. Allerdings bringt der Umgang mit Sauerstoff beträchtliche Gefahren mit sich. Der Terminus ‚oxidativer Stress‘ beschreibt eine Stoffwechsellage, die durch eine Auslenkung des Fließgleichgewichtes zwischen Oxidantien auf der einen Seite und dem Netzwerk der antioxidativen Verteidigung auf der anderen Seite, zugunsten der Oxidantien charakterisiert ist [Tepel et al., 2002].

1.2.1 Freie Radikale

Als freie Radikale gelten Atome oder Moleküle, die ein oder mehrere ungepaarte Elektronen aufweisen, und infolge dessen eine ausgeprägte Reaktivität besitzen. Einige wichtige Vertreter sind das Superoxid- ($O_2^{\cdot-}$), Hydroxyl- (OH^{\cdot}), oder Stickoxyradikal (NO^{\cdot}). Als reaktive Sauerstoffspezies werden auch reaktive Sauerstoffverbindungen ohne Radikalcharakter, wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Singulett-Sauerstoff und hypochlorige Säure bezeichnet [Niess et al., 2002; Cai et al., 2000; Tepel et al., 2003].

Tabelle 1: Beispiele für radikalische und nicht-radikalische ROS; R: Alkylrest

radikalische ROS	nicht radikalische ROS
Superoxidanion ($O_2^{\cdot-}$)	Wasserstoffperoxid (H_2O_2)
Hydroxylradikal (OH^{\cdot})	Alkylhydroperoxid (ROOH)
Alkoxyradikale (RO^{\cdot})	Hypochlorige Säure (HOCl)
Alkylperoxyradikale (ROO^{\cdot})	Peroxynitrit ($ONOO^{\cdot}$)

Als Bildungsquellen für ROS gelten sowohl exogene Noxen als auch endogene Vorgänge.

Quellen exogener Radikale sind UV-Strahlung, Röntgenstrahlen, Elektromog, Schwermetalle, Ozon und verschiedene Umweltgifte. Hitze und Ansäuerung scheinen ebenfalls oxidativen Stress zu verursachen. Durch zunehmende Belastungen sowohl der Umwelt als auch des Körpers (Sport, psychischer Stress, Rauchen, Überernährung) stehen wir daher zunehmend unter oxidativem Stress [Gosslau et al., 2002].

Quellen endogener ROS Produktion sind vielseitig. Die Sauerstoffspezies werden zum Teil kontinuierlich gebildet, auch unter physiologischen Bedingungen. Das bedeutet, dass von oxidativem Stress im engeren Sinne erst gesprochen werden kann, wenn es zu einer Imbalance von Sauerstoffradikalbildung und antioxidativen Schutzmechanismen gekommen ist.

Hauptbildungsorte der ROS Bildung in vivo sind beispielsweise zirkulierende Zellen wie Monozyten, Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten. Sie nutzen die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies zur Abwehr von Bakterien. Neutrophile Granulozyten erzeugen in einem als ‚oxidative burst‘ bezeichneten Prozess mit Hilfe einer membranständigen NADH-Oxidoreduktase oder NAD(P)H-Oxidase extrazellulär Superoxid, das bakterizid wirkt [Niess et al., 2002; Cai et al. 2000; Tepel et al., 2003; Dechamps-Latscha et al., 2001; Löffler 2003].

Auch ortständige vaskuläre Zellen (Gefäßendothelzellen, glatte Muskelzellen) und renale Zellen (Mesangialzellen, Tubuluszellen, glomerulären Epithelzellen) sind Quellen für ROS. Es konnte gezeigt werden, dass in atherosklerotischen Läsionen, wie auch in Glomeruli bei verschiedenen Glomerulonephritiden, durch eine Akkumulation von Angiotensin II und oxidativ modifizierten ‚low-density‘ Lipoproteinen die Bildung von O_2^- durch Aktivierung der membranständigen NAD(P)H-Oxidase induziert wird [Galle und Wanner, 2004]. Weitere Studien haben gezeigt, dass auch gesunde Gefäßendothelien und glatte Muskelzellen auf Stimulation (unter anderem mit Thrombin, PDGF und Lactosylkeramide) eine erhöhte ROS Produktion durch NAD(P)H-Oxidase Aktivität aufweisen [Cai und Harrison 2000]. Für das vaskuläre und renale System scheint die NAD(P)H-Oxidase als Bildungsquelle für ROS eine führende Rolle zu spielen.

Auch die mitochondriale Atmungskette übernimmt einen großen Teil der ROS Produktion in vivo, weil die ROS Produktion ein unvermeidbares Übel der Elektronentransportkette ist. Es wird vermutet, dass von 1-3 % des in der mitochondrialen Atmungskette reduzierten Sauerstoffes durch Einelektronen-Reduktion von molekularem Sauerstoff das Superoxidradikal $O_2^{\cdot-}$ gebildet wird. Danach kann durch Zweielektronen-Reduktion mit anschließender Protonierung H_2O_2 entstehen [Tepel et al., 2003; Halliwell, Gutteridge 2000 und 2007].

Das Superoxidanion ($O_2^{\cdot-}$) wird im Organismus aber nicht nur in der Atmungskette, sondern auch durch Enzyme gebildet, die O_2 zu $O_2^{\cdot-}$ reduzieren. Ein Beispiel ist die Xanthin-Oxidase, die die Reaktion von Hypoxanthin zu Xanthin katalysiert. Auch Hämproteine und andere Elektronentransportketten (wie in Cytochrom p450-Enzymen

oder in den Mitochondrien) gelten als wichtige Quellen für $O_2^{\cdot-}$. Superoxidanionen entstehen außerdem auch durch Autooxidationen reduzierter Zwischenprodukte des Stoffwechsels wie Semichinone, Flavine, Glutathion und andere Thiole, sowie Hämoglobin und andere Komplexe von Übergangsmetallen.

Wasserstoffperoxid (H_2O_2) wird durch enzymabhängige Prozesse gebildet. Unter anderem generieren die Monoamin-Oxidase, die Glucose-Oxidase und die Superoxiddismutase H_2O_2 . H_2O_2 ist ein vielseitiges ROS, weil es in der Lage ist, die Plasmamembran zu überqueren und den intrazellulären Hydroxylradikalgehalt durch die Bildung von hochreaktivem OH^{\cdot} zu erhöhen und somit die Peroxidation von Membranlipiden, die Aggregation von Proteinen und die Schädigung der DNA zu initiieren. Über die Myeloperoxidase (MPO) der Neutrophilen kann aus Wasserstoffperoxid auch hypochlorige Säure entstehen. Diese wiederum kann mit einem weiteren H_2O_2 Molekül zu Singulett-Sauerstoff und Wasser reagieren [Wali, 2004]. OH^{\cdot} gilt als die reaktivste Sauerstoffspezies und kann in vielen biologisch relevanten Systemen entstehen, wie in der durch Schwermetallionen (Kupfer/Eisen) katalysierten Haber-Weiss-Reaktion aus dem Superoxidanion ($O_2^{\cdot-}$) und H_2O [Scandalios, 1993]. Die Teilreaktion, die durch Eisenionen katalysiert wird, wird auch als Fentonreaktion bezeichnet.

Reaktive Sauerstoffspezies sind also Nebenprodukte normaler metabolischer Zellprozesse. Sie sind in geringen Konzentrationen für eine intakte Zellfunktion als Mediatoren physiologischer Zellabläufe unentbehrlich. Sie spielen eine Rolle als second messenger bei verschiedenen Signaltransduktionswegen, bei der Regulation der Genexpression verschiedener Proteine, bei der zellulären Abwehr von Bakterien und stellen einen essentiellen Kofaktor für die katalytische Aktivität verschiedener Enzyme dar. Allerdings können Sauerstoffradikale auch Zellen des Wirtsorganismus schädigen.

1.2.2 Biologische Effekte durch ROS

ROS können Schäden an Biomolekülen jeder Art hinterlassen. Die besondere Toxizität freier Radikale liegt in ihrer hohen Reaktivität begründet. Sie können prinzipiell mit allen für die lebende Zelle vitalen Molekülen reagieren, und in deren Folge kommt es zu metabolischen und strukturellen Veränderungen, die möglicherweise zum Zelluntergang führen. Die biologischen Wirkungen freier Radikale hängen vom Ort der Bildung der

radikalischen Spezies, von ihrer Lebensdauer, von der Natur des Reaktionspartners und von der Kapazität antioxidativer Mechanismen ab.

Beispielsweise spielen Lipide in Organismen eine wichtige Rolle als Bestandteil von Zellmembranen. Deshalb kann eine starke oxidative Schädigung der Lipide zu schwerwiegenden pathologischen Folgen führen: die Oxidation von Membranlipiden führt zur Einschränkung der Membranfluidität und -permeabilität und der Kommunikation mit anderen Zellen, z. B. des zellulären Immunsystems. Die Expression von Rezeptoren und Membranantigenen wird behindert. Die Signaltransduktion verliert an Effizienz und die Lebensdauer der Zelle sinkt [Bieger, 2001; Gosslau et al., 2002; Halliwell und Gutteridge, 2007]. Besonders beachtenswert ist die Oxidation lipidlöslicher Lipide wie des LDL-Moleküls. Oxidiertes LDL wird über einen Scavengerrezeptor bevorzugt von Makrophagen aufgenommen und fördert die Bildung von Schaumzellen im Rahmen des artherosklerotischen Umbaus von Gefäßen. Im Rahmen der Pathophysiologie der Artherosklerose berichten mehrere Gruppen von Akkumulationen von oxidativ modifiziertem LDL und Angiotensin II in artherosklerotischen Läsionen, wie auch in Glomeruli bei verschiedenen Glomerulonephritiden. Für beide Substanzen ist nachgewiesen worden, dass sie an glatten Muskelzellen, vaskulären Endothelzellen, glomerulären Epithelzellen, Mesangialzellen und Tubuluszellen die Bildung von $O_2^{\bullet-}$ durch Aktivierung der membranständigen NAD(P)H-Oxidase induzieren [Hörl und Wanner, 2004; Galle et al., 2003; Galle, 2004]. Die zusätzliche Bildung von $O_2^{\bullet-}$ ist im Gefäßsystem von besonderer Relevanz, weil die Interaktion von $O_2^{\bullet-}$ zur Inaktivierung von NO führt (einem potenten Vasodilatator).

Auch Proteine werden durch oxidativen Stress geschädigt. Es sind besonders Methionin-, Histidin- und Tryptophanreste, aber auch die Thiol-Gruppen der Cysteine empfindlich gegenüber ROS. Die Oxidation von Proteinen ist vor allem mit der Schädigung von Enzymen, Signalmolekülen oder Rezeptoren verknüpft, die zur Funktionseinbuße von Zellen und Organellen beitragen. Beispielsweise führen Schäden an DNA-Reperaturenzymen zu erhöhten oxidativen Schäden an der DNA, wodurch diese nicht repariert werden kann. Oxidativ veränderte Proteine können vom Immunsystem als ‚fremd‘ erkannt werden. Allergien und Autoimmunerkrankungen können die Folge sein [Bieger, 2001; Halliwell und Gutteridge, 2007].

Die Nukleinsäuren (DNA und RNA) werden ebenfalls durch oxidativen Stress geschädigt. Dabei kommt es zu Einzel- und Doppelstrangbrüchen, Bildung von DNA-DNA-, DNA-Protein- und DNA-Lipid-Addukten als auch zur Entstehung von Basenmodifikationen. Die Strangbrüche entstehen durch oxidative Modifikation der Ribose [Gosslau et al, 2002]. Insgesamt wird beim Gesunden mit bis zu 10 000 DNA Schäden pro Tag pro Zelle gerechnet, die unter normalen Bedingungen effizient durch DNA-Reparaturenzyme beseitigt werden [Bieger, 2001]. Am häufigsten entstehende Basenmodifikationen sind 8-Hydroxyguanosin, 5-Hydroxymethyluracil und Thyminglykol. Als Folge der erhöhten Mutagenität kommt es zu einem steigenden Krebsrisiko.

Oxidative Veränderungen spielen eine Rolle in der Pathogenese zahlreicher Krankheiten, beispielsweise bei Diabetes, Herz-Kreislauf- und neurodegenerativen Erkrankungen, chronisch inflammatorischen Erkrankungen, Amyloidose, Autoimmunprozessen, Transplantatabstoßungsreaktionen, Apoptose, Respiratory Distress Syndrome und Krebserkrankungen [Cai et al., 2000; Fridlyand et al., 2006; Himmelfarb et al., 2002; Wardel, 2005; Tepel et al., 2002]. Um dieser potentiellen Gefährdung entgegenzuwirken, verfügen alle aerob lebenden Zellen über ein vielfältiges Arsenal enzymatischer und nicht-enzymatischer Schutzmechanismen, den Antioxidantien.

1.2.3 Das Antioxidative System

Als Antioxidans definierten Halliwell und Gutteridge 1990 jede Substanz, die, wenn sie in geringen Konzentrationen im Vergleich zu der Konzentration eines oxidierbaren Substrates präsent ist, die Oxidation dieses Substrates signifikant verzögert oder verhindert [Halliwell et al., 1990].

Nicht-enzymatische Antioxidantien umfassen eine stetig wachsende Anzahl unterschiedlicher Moleküle und Verbindungen wie beispielsweise die Vitamine A, E, C oder Caratinoide, bioorganische Moleküle wie Harnsäure, Glutathion-Derivate, Bilirubin, Transferrin und synthetische Radikalfänger wie Butylhydroxytoluen (BHT), Dimethylsulfoxid (DMSO) oder Enzym-Mimetika. Im Gegensatz zu den enzymatischen Antioxidantien werden nicht-enzymatische Antioxidantien durch das Abfangen von Radikalen immer auch selbst radikalisch. So konnte beispielsweise für den physiologischen Hauptgegenspieler der Lipidperoxidation, α -Tocopherol (Vitamin E),

gezeigt werden, dass radikalisch gewordenes α -Tocopherol durch Ascorbinsäure (Vitamin C) oder Glutathion wieder in seinen ursprünglichen stabilen Zustand überführt werden kann und erneut als Antioxidans zur Verfügung steht [Niess et al., 2002; Löffler, Petrides, 2003; Dissemond, 2001; Wiswedel et al., 2005; Manning et al., 2005; Wali, 2004].

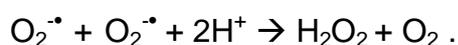
Unter den enzymatischen Antioxidatien werden klassischerweise drei Enzymgruppen verstanden: die Superoxiddismutasen, die Katalasen, und die Glutathion (GSH) Peroxidasen. Sie bilden im Falle ausreichender Enzymaktivitäten die erste Verteidigungslinie gegen ROS. Daneben gibt es eine Vielfalt an weiteren Enzymen, die mit Oxidantien reagieren und diese entschärfen. Im Folgenden werden die für diese Arbeit relevanten Proteine im Detail behandelt.

1.3 Proteine des oxidativen Stress und der antioxidativen Abwehr

1.3.1 Die Superoxiddismutasen

Die erste Superoxiddismutase wurde 1939 von Mann und Keilin aus Rindererythrozyten isoliert. Wegen seines Kupfergehaltes und seiner Lokalisation wurde es als ‚Erythrocyperin‘ bezeichnet. In den folgenden Jahren fand man identische Kupferproteine in allen Geweben und Körperorganen, wobei die biologische Bedeutung des Proteins lange Zeit ungewiss blieb. Wegen seines hohen Kupfergehaltes vermutete man eine Rolle als Kupfertransportprotein. Interessanterweise fand man das ‚Erythrocyperin‘ ausschließlich im Gewebe von Aerobiern. Durch diese Beobachtung wurde erstmals ein Bezug des Proteins zum Sauerstoff hergestellt [Nohl, 1981]. 1969, 30 Jahre später, gelang es McCord und Fridovich die Funktion des Proteins als katalytisches Enzym nachzuweisen [McCord, 1969].

Die Superoxiddismutase katalysiert die Dismutation von $O_2^{\bullet -}$ zu Wasserstoffperoxid, welches wiederum durch Katalase und Glutathionperoxidase in physiologischen Konzentrationen gehalten wird [Rister, 1982]:



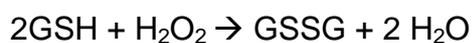
Diese Reaktion läuft auch spontan und unter physiologischen Bedingungen ab, jedoch beschleunigt die SOD die dismutative Reaktion der Superoxidanione gegenüber der Spontandismutation um mehr als das zehntausendfache [Nohl, 1981]. Durch diesen Geschwindigkeitsvorteil verhindert SOD die Reaktion von $O_2^{\bullet -}$ mit NO, was zur Bildung von Peroxynitrit, einem sehr potenten Oxidationsmittel, führen würde [Christen, 2005]. Durch dieses Auflösen von Superoxidanionen im Wettbewerb mit NO unterstützt SOD die Aktivität von NO.

Es sind drei Isoformen der SOD im Menschen bekannt. Allen ist gemeinsam, dass sie die erste Verteidigungslinie gegen das Superoxidanion stellen.

Zwei Isoformen von SOD enthalten in ihrem katalytischen Zentrum Kupfer und Zink, entweder in intrazellulären, zytoplasmatischen Kompartimenten (SOD1) oder extrazellulär im menschlichen Plasma und in der Lymph- und Zerebrospinalflüssigkeit (SOD3). Die SOD3 wurde kürzlich entdeckt und ist das am wenigsten charakterisierte Mitglied der SOD-Familie. Die Mangan-SOD (SOD2) ist die mitochondriale Form der SOD. Sie existiert als Homotetramer mit einer molekularen Masse von ca. 23 000 Da [Barra, 1984] und ist auf Chromosom 6 kodiert. Die SOD1 befindet sich im Cytoplasma menschlicher Zellen. Es ist ein Homodimer mit einer molekularen Masse von 32 000 Da, welches auf Chromosom 21 lokalisiert ist [Zelko, 2002].

1.3.2 Die Glutathionperoxidase

Ein weiteres zentrales Enzym zur Verteidigung gegen ROS ist die Glutathionperoxidase (GPx). 1957 von Mills entdeckt, katalysiert sie die Reduktion von aggressivem H_2O_2 durch das Glutathion (GSH, ein aus Cystein, Glycin und Glutamat bestehendes Tripeptid) in harmloses Wasser.



Oxidiertes GSSG und reduziertes GSH bilden ein Redoxsystem, wobei die reduzierte Form (GSH) überwiegt. Durch die GSH-Reduktase erfolgt die Regeneration der oxidierten Form in einer NADPH-abhängigen Reaktion [Müller-Esterl, 2004]. Der Zyklus kann neu beginnen und somit kann eine Belastung der Zelle mit Hydroperoxiden durch die Glutathionperoxidase-Reaktion abgefangen werden. Die breite Substratspezifität der GPx erlaubt die Reduktion praktisch aller organischen Hydroperoxide, beispielsweise

solcher mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren (Lipidperoxiden) oder der Nukleinsäure-Basen [Sies, 1989; Flohé, 1971].

Die GPx hat ein Molekulargewicht von etwa 84 000 Da. Bemerkenswert ist, dass es ein kovalent gebundenes Selenatom (Se) in Form von Selenocystein enthält. Selen ist für die Aktivität des Enzyms essentiell. Die GPx kommt in fünf verschiedenen Formen vor: cytosolische GPx (cGPx), gastro-intestinale GPx (GI-GPx), plasmatische GPx (pGPx), Phospholipid GPx (PH-GPx) und Sperma Nuclei GPx (snGPx) [Behne und Kyriakopoulos, 2001].

1.3.3 Die NAD(P)H-quinone Oxidoreduktase

Die NAD(P)H-quinone Oxidoreduktase (NQO1) ist ein Homodimer, welches pro 31 kDa Untereinheit ein Molekül FAD enthält und sich zu >90% im Zytosol befindet.

1958 von Ernster und Navazio entdeckt, spielt diese obligate zwei Elektronen-Reduktase eine katalytische Rolle in der Reduktion einer Vielfalt von Substraten, unter anderem Quinone, Quinon-imine und Nitro-Verbindungen [Ross et al., 2000] und ist hiermit in erster Linie ein wichtiges chemoprotektives Enzym.

NQO1 reduziert Quinone zu Hydroquinonen und umgeht dabei die Produktion von Semiquinonen, welche ROS produzieren und zur Depletion zellulärer Thiol-Gruppen führen [Talalay und Dinkova-Kostova, 2004]. Hydroquinone sind für den Organismus ungefährlicher als Quinone und Semiquinone und ihre Ausscheidung erfolgt einfacher. NQO1 ist charakterisiert durch die Fähigkeit NADH oder NAD(P)H als reduzierende Kofaktoren zu nutzen und durch seine Inhibition durch Dicumarol [Siegel et al., 2004; Ross et al., 2000]. Neben der Funktion als Entgiftungsenzym hat es bei der Aufrechterhaltung des oxidativen Gleichgewichtes ebenfalls eine wichtige Funktion. Es wird vermutet, dass NQO1 den Spiegel bestimmter endogener Antioxidantien aufrechterhält, indem es diese (nach Oxidation) zurück in ihre aktive, reduzierte Form bringt. Beispielsweise sind Ubiquinon (Co-Enzym Q) und α -Tocopherol-Quinon zwei sehr wichtige lipidlösliche Antioxidantien, die in-vitro Substrate der NQO1 sind [Ross, 2000; Nioi et al., 2004].

Co-Enzym Q hat neben seiner Rolle in der Elektronentransportkette eine Funktion als Antioxidans und ist in den meisten Zellmembranen in seiner reduzierten Form (Ubiquinol) verteilt. NQO1 kann Ubiquinon zu Ubiquinol reduzieren und dieser Vorgang wird als protektiv gegen die Lipidperoxidation angesehen.

Greifen freie Radikale α -Tocopherol an, so entsteht α -Tocopherol-Quinon, dessen reduzierte Form hochpotente antioxidative Aktivität aufweist. NQO1 katalysiert die Reduktion von α -Tocopherol-Quinon zu α -Tocopherol-Hydroquinon und schützt somit gegen Schädigung der Plasmamembran [Nioi et al., 2004; Talalay et al., 2004].

1.3.4 Das IGFBP1

Das Insulin-like Growth Factor (IGF)-Binding Protein 1 kann im Gegensatz zu den anderen hier besprochenen Proteinen nicht als Protein der antioxidativen Abwehr eingestuft werden, sondern wird als Protein des oxidativen Stress behandelt. IGF-Bindungsproteine sind eine Gruppe von sechs Serumproteinen, die IGF-1 binden und damit seinen Stoffwechselumsatz, seinen Transport und seine Bioverfügbarkeit regulieren. Nur freies, ungebundenes IGF-1 ist biologisch aktiv, weshalb ein Überschuss an IGFBPs zur Modulation physiologischer Effekte des IGF führt. Bis heute sind sechs IGFBPs bekannt. Von ihnen trägt IGFBP1 mit nur 15% zur Bindungskapazität von IGF bei, ist aber der determinierende Faktor für freies IGF-1 und das einzige IGFBP, welches eine streng regulierte Expression aufweist [Rutkute et al., 2007].

Die IGFBP1 wurde 1988 als erstes Mitglied der IGFBP Familie charakterisiert, hat ein Molekulargewicht von 35 kDa und wird auf Chromosom 7 kodiert [Powell, 2000]. Die Produktion von IGFBP1 ist streng reguliert: durch Insulin wird sie inhibiert, durch Glukokortikoide und cAMP wird sie hochgefahren, aber auch unter anderem durch Hyperglykämie und Hypoxie. Somit wird IGFBP1, anders als IGFBP2 bis -6, auch metabolisch reguliert [Stephans et al., 2005]. Bemerkenswert ist, dass IGFBP1 auch durch inflammatorische Stimuli stark hochreguliert wird und zur Aufrechterhaltung des inflammatorischen, katabolischen Zustandes selber beiträgt, indem es der anabolen Funktion des IGF-1 entgegen wirkt [Rutkute et al., 2007]. Verschiedene Studien zeigen, dass oxidativer Stress/ ROS eine direkte Rolle in der Hochregulation der Produktion von IGFBP1 spielt. So konnten beispielsweise Rutkute und Nikolova-Karakashian zeigen, dass die Erschöpfung der GSH Reserven im Alter zu einer erhöhten Produktion von IGFBP1 führt [Rutkute et al., 2007]. Patel et al. konnten zeigen, dass H_2O_2 die Expression von IGFBP1 signifikant erhöht [Patel et al., 2002]. Lang et al. zeigten ebenfalls, dass H_2O_2 , NO und Peroxynitrit die IGFBP1 Produktion erhöhen [Lang et al., 1999].

1.4 Oxidativer Stress und Niereninsuffizienz: Pathophysiologische Grundlagen

Kardiovaskuläre Ereignisse stellen eine der Hauptursachen für das hohe Mortalitätsrisiko von Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion. Vor allem bei terminaler, dialysepflichtiger Niereninsuffizienz steigt das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse massiv an. Etwa die Hälfte der Todesfälle dürfte auf kardiovaskuläre Ursachen zurückgehen. Die Hospitalisierungen von Dialysepatienten sind zu über einem Drittel auf kardiovaskuläre Ursachen zurückzuführen [Van der Giet et al., 2006] und auch junge niereninsuffiziente Patienten weisen rapide voranschreitende vaskuläre Veränderungen auf [Maroti et al., 2004]. Studien zeigen, dass sogar eine milde Einschränkung der Nierenfunktion mit einer höheren Inzidenz an Herz-Kreislauf-Erkrankungen assoziiert ist. Zum Zeitpunkt der ersten Dialysesitzung zeigen 75% der Patienten eine Linksherzhypertrophie, 40% leiden an einer KHK [Annuk et al., 2005]. Aber warum ist das so?

Der terminal nierenkranke Patient ist einer Vielfalt endogener und exogener Faktoren ausgesetzt, die in ihrer Summe zu einer chronischen inflammatorischen Reaktion beitragen und das kardiovaskuläre Risiko erhöhen. Gemeinsam ist diesen endogenen und exogenen Faktoren die Induktion von oxidativem Stress [Hörl et al., 2004].

Diese Faktoren umfassen:

- die chronische Inflammation
- Urämie assoziierte Faktoren
- HD assoziierte Faktoren

Hierbei steht eine Steigerung der Produktion von ROS einer verminderten Elimination dieser durch Veränderungen der physiologischen Antioxidantien gegenüber.

1.4.1 Die chronische Inflammation und oxidativer Stress

Da oxidativer Stress und chronische Inflammation gemeinsame Merkmale der chronischen Niereninsuffizienz sind und 30-50% der Prädialyse- und Hämodialyse- sowie auch der Peritonealdialysepatienten erhöhte serologische Entzündungsmarker aufweisen [Himmelfarb et al., 2002; Gordan et al., 2004], ist vielfach untersucht worden, inwieweit diese assoziiert sind. Die Resultate sind beeindruckend.

Die Expression einer Fülle von Genen, die eine Entzündungsreaktion hervorrufen, wie Zytokine, Chemokine, Adhensionsmoleküle, Zytokinrezeptoren, iNO Synthase, Lipoxygenasen, Zyklooxygenasen und Wachstumsfaktoren, ist von den Transkriptionsfaktoren NF-KB (nuclear factor-KB) und aktivator Protein-1 (AP-1) abhängig. Diese wiederum werden durch oxidativen Stress hochreguliert und ihre Aktivität kann zum größten Teil durch lipophile Antioxidantien (Tocopherole und Phenolsäuren) verhindert werden [Morena et al. 2005; Gordan et al., 2004]. Auch IL-6 und CRP werden über NF-KB in inflammatorischen Zellen gesteuert. CRP und IL-6 werden seit längerer Zeit als prädiktiver Marker kardiovaskulärer Morbidität und Mortalität bei urämischen Patienten betrachtet. So zeigten Nguyen-Khoa et al. eine positive Korrelation zwischen erhöhtem Plasma CRP und plasma thiobarbituric acid reaction substance (TBARS) als Marker für Lipidperoxidation bei Dialysepatienten. Außerdem konnte eine negative Korrelation zwischen der Plasma CRP-Konzentration und der Plasma α -Tocopherol-Konzentration gezeigt werden, konsistent mit der Hypothese, dass Inflammation die Konzentration der Antioxidantien erschöpft. Locatelli et al. berichten von einer Assoziation zwischen F_2 -Isoprostanen (einem Biomarker für oxidativen Stress) und CRP bei Dialysepatienten, sowie von einer signifikant positiven Korrelation zwischen Proteinen der akuten Phase und Biomarker des oxidativen Stress [Himmelfarb et al., 2002].

Die renale Grunderkrankung per se ist hochgradig an einem inflammatorischen Prozess beteiligt, wie die inverse Beziehung zwischen CRP, IL-6 und Kreatinin-Clearance zeigt [Morena et al, 2005].

Monozyten spielen bei der Produktion von ROS eine besondere Rolle, da sie hier sowohl eine Opfer- als auch eine Täterrolle übernehmen. Wie polymorphonukleare Leukozyten (PMNL), die bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ‚geprimed‘ sind, sind auch Monozyten bei diesen Patienten ‚aktiviert‘ und leiten eine Kaskade der ROS Produktion über die NADPH-Oxidase ein. Zusätzlich sind Monozyten in der Lage, die proinflammatorischen Zytokine Interleukin 1 und 6 und Tumornekrosefaktor- α zu generieren [Witko-Sarsat et al., 2003]. Sela et al. konnten zeigen, dass der Grad des PMNL-priming positiv mit dem Grad der Niereninsuffizienz korreliert [Sela et al., 2005]. Die Aktivierung von PMNL und Monozyten ist ein anerkanntes Merkmal bei Dialysepatienten und repräsentiert möglicherweise einen wichtigen Reaktionsweg für Gewebsschädigung und LDL-Oxidation in vivo. Interessanterweise könnte die MPO Sekretion dieser Zellen durch die Promotion der endothelialen Dysfunktion zu

kardiovaskulären Ereignissen beitragen, da MPO die NO-abhängige Relaxation der glatten Muskelzellen attenuiert. ‚Geprimte‘ Monozyten (die MPO sekretieren) könnten eine wichtige Verbindung zwischen oxidativem Stress, Inflammation und endothelialer Dysfunktion bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz sein.

1.4.2 Urämie assoziierte Faktoren

Die chronische Urämie ist im Laufe der letzten Jahre als Zustand erhöhten oxidativen Stress erkannt worden. Ein verminderter antioxidativer Schutz bei urämischen Patienten zeigt sich z.B. durch das erhöhte Serumratio von oxidiertem zu totalem Ascorbat, von oxidiertem zu reduziertem Glutathion und von oxidiertem zu reduziertem Serumalbumin [Inagi et al., 1999].

Aus biochemischer Sicht ist der urämische oxidative Stress charakterisiert als ein Zustand der Akkumulation reaktiver Aldehyd- und oxidiertes Thiolgruppen mit der Depletion reduzierter Thiolgruppen, welche bei der antioxidativen Abwehr besonders wichtig sind. Als Konsequenz des verschlechterten renalen Katabolismus und der verschlechterten renalen Funktion akkumulieren urämische Mediatoren der Oxidation, wodurch es zur Endotheldysfunktion und der Progression der Artherosklerose kommt [Lahera et al 2006].

Mehrere Gruppen haben gezeigt, dass urämisches Plasma im Vergleich zum Plasma gesunder Kontrollen eine zehnfach höhere Konzentration an totalen Carbonyl-Verbindungen aufweist. Diese repräsentieren die Konzentration reaktiver Aldehyde, die eine wichtige Rolle bei der Formation von AGE (Advanced Glycosylation End Products), bei der Pathogenese vaskulärer Erkrankungen, als Mediator von Entzündungsreaktionen und bei der Modifikation von LDL-Cholesterin eine Rolle spielen [Himmelfarb et al., 2002].

Zusätzlich zur Akkumulation reaktiver Aldehyde ist die Depletion reduzierter Thiolgruppen bei Urämikern charakteristisch und trägt zum oxidativen Milieu bei. Thiole fungieren sowohl intrazellulär als auch extrazellulär als Redoxpuffer. Besonders im extrazellulären Raum sind reduzierte Thiolgruppen essentiell, da hier traditionelle antioxidative Enzyme wie Katalase, SOD, Glutathion oder GPx gar nicht oder nur in geringen Mengen vorhanden sind. Protein-assoziierte Thiolgruppen und antioxidativ wirkende Vitamine übernehmen die Führungsrolle der extrazellulären antioxidativen Verteidigung. Bei urämischen Patienten ist dieses System gestört.

Himmelfarb et al. berichten, dass bei urämischen Patienten sowohl Thiolgruppen der Plasmaproteine als auch die ‚low molecular weight‘ Aminothiole Zystein, Homozystein und Zysteinylglycin in hohem Maße im oxidierten Zustand vorliegen [Himmelfarb et al., 2002].

Die die Urämie begleitende renale Anämie ist ein weiterer Faktor, der zu oxidativem Stress und kardiovaskulären Ereignissen beiträgt. Erythrozyten sind in der Lage, Glutathion ins Plasma abzugeben [Löffler, Petrides 2007] und sind somit hocheffektive und hochmobile Radikalfänger. Sie sind außerdem maßgeblich am ‚Recycling‘ von Vitamin C beteiligt, da sie Dehydroascorbat zu Ascorbat reduzieren können [Mendiratta et al., 1998]. Die renale Anämie trägt somit zum Ungleichgewicht von Oxidantien und Antioxidantien bei. Siems et al. konnten zeigen, dass oxidativer Stress bei der chronischen Niereninsuffizienz mit dem Grad der renalen Anämie korreliert [Siems, 2005]. Mehrere Gruppen konnten zeigen, dass die vorsichtige Korrektur der renalen Anämie zu einer Reduktion des oxidativen Stress und damit auch des kardiovaskulären Risikos, beiträgt [Siems, 2005; Lahera, 2006].

Durch die Oxidation von Retentionsstoffen (z.B. Zytokine, Phosphate, Oxalate, Urea, Parathormon und β_2 -Mikroglobulin), können diese in ihrer Pathogenität gesteigert werden. Als Beispiel sind Homozystein und Zystein zu nennen. Beide sind bei urämischen Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen vermehrt vorhanden. Das Ausmaß ihrer Oxidation bei der Urämie korreliert mit ihrer Plasmakonzentration, was suggeriert, dass diese Retentionsstoffe im urämischen Milieu vermehrt oxidiert werden. In vitro Studien haben gezeigt, dass Zystin, die oxidierte Form von Zystein, glatte Muskelzellen zur Produktion von ROS aktiviert [Himmelfarb et al., 2002]. Die Hyperhomozysteinämie hat einen größeren prädiktiven Wert für kardiale Ereignisse als die traditionellen Risikofaktoren. In Abhängigkeit von der Höhe der Homozysteinwerte besteht ein 2.8-fach erhöhtes, relatives Risiko [Hörl et al., 2004].

1.4.3 HD -Assoziierte Faktoren

Auch die Hämodialyse trägt zum oxidativen Stress bei.

Die hämodialytische Entfernung von Stoffen, die für die antioxidative Verteidigung von Bedeutung sind, ist mehrfach untersucht worden. Vitamin C (Ascorbat) ist eines der wichtigsten wasserlöslichen Antioxidantien und wird aufgrund seiner geringen Molekülgröße und seiner Wasserlöslichkeit durch die Dialyse entfernt [Jackson, 1995].

Morena et al. konnten zeigen, dass ca. 66mg Vitamin C pro Dialysesitzung verloren gehen [Morena et al., 2005] - ein beträchtlicher Anteil, wenn man bedenkt, dass die Vitamin C-Einnahme bei Dialysepatienten bei 60-200mg/d liegt [Hörl et al., 2004]. Auch Selen, ein essentieller Kofaktor der Glutathionperoxidase, ist nach einer Dialysesitzung vermindert [Bogye et al., 2000; Koenig et al., 1997]. Verschiedene Gruppen konnten zeigen, dass auch der Plasmazinkspiegel bei niereninsuffizienten Patienten insbesondere mit, aber auch ohne Nierenersatztherapie, im Vergleich zu gesunden Kontrollen stark vermindert ist [Zima et al., 1998; Mahajan et al., 1982]. Zink ist, als Bestandteil des Zytosols der CuZn-SOD (SOD1), für die enzymatische Abwehr von oxidativen Stress unentbehrlich.

Die Bioinkompatibilität des Dialysesystems ist für die Generation von ROS von Bedeutung. Mehrere Gruppen haben gezeigt, dass die durch die Dialysemembran induzierte Makrophagenaktivierung zur massiven ROS Produktion führt. Auch die Diffusion bakterieller Produkte (z. B. Lipopolysaccharide, LPS) vom Dialysat in den Blutkreislauf können direkt oder indirekt die ROS Produktion der neutrophilen Granulozyten stimulieren [Morena et al., 2000; Ward et al., 2003; Decamps-Latscha et al., 2001].

Die bei Dialysepatienten vorgefundene Fehl- oder Mangelernährung trägt ebenfalls zur Inflammation bei und damit zur Generierung von oxidativem Stress bzw. ist häufig eine Folge der Inflammation und Katabolie. Die Ätiologie der Mangelernährung bei diesen Patienten ist vielseitig. Begünstigende Faktoren, die direkt mit dem dialytischen Procedere zusammenhängen, sind Bioinkompatibilität und Nährstoffverluste durch das Dialysat. Die enge Beziehung zwischen Mangelernährung, Inflammation und vaskulären Veränderungen ist als MIA-Syndrom (Malnutrition, Inflammation and Artherosclerosis) bekannt und ist ein bei der Hämodialyse häufig vorkommendes Syndrom [Tonbul et al., 2006].

Ein weiterer dialyseinduzierter Faktor, der zu oxidativem Stress beitragen kann, ist die chronische Keimexposition durch die lange Verweildauer des Dialysesesshunts und die daraus resultierende Immunantwort.

1.5 Fragestellung

Die Balance zwischen Proteinen des oxidativen Angriffs und der antioxidativen Verteidigung ist bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz in mehrerer Hinsicht gestört. Dies wird verursacht durch den chronisch inflammatorischen Zustand aufgrund der renalen Grunderkrankung, durch Urämie-assoziierte Faktoren und durch HD-assoziierte Faktoren. Die Konsequenz des oxidativen Stress ist für den niereninsuffizienten Patienten eine höhere Morbidität und Mortalität an Herz-Kreislaufkrankungen.

Die genauen Zusammenhänge zwischen dem vermehrten oxidativen Stress bei terminaler Niereninsuffizienz und Entzündungsvorgängen, der Retention von Urämietoxinen und der Nierenersatztherapie sind bisher wenig geklärt. Insbesondere Untersuchungen zum Einfluss der Hämodialysetherapie an sich ergeben kein klares Bild. So ist weiterhin unklar, ob mit Beginn der chronischen Hämodialyse der oxidative Stress zu- oder abnimmt.

Diese Arbeit untersucht, inwieweit die Niereninsuffizienz und die Hämodialyse Auswirkungen auf den oxidativen Stress und die Expression von Proteinen des oxidativen Angriffs und der antioxidativen Abwehr bei terminal niereninsuffizienten Patienten hat. Hierfür werden proteinbiochemisch das Blut von Hämodialysepatienten zu Beginn und am Ende der Hämodialyse untersucht, und die Konzentrationen der Proteine SOD1, SOD2, GPx, IGFBP1 und NQO1 mit der von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ohne Nierenersatztherapie und gesunden Kontrollen verglichen. Außerdem wird die antioxidative Kapazität des Plasmas bei allen Gruppen gemessen und verglichen. Die zu klärenden Fragen lauten:

- Inwiefern beeinflusst die HD-Therapie die Expression der Enzyme SOD1, SOD2, GPx, IGFBP1 und NQO1?
- Wie verhalten sich die Expressionen dieser Enzyme im Vergleich zu chronisch niereninsuffizienten Patienten ohne Nierenersatztherapie und gesunden Probanden?
- Inwiefern beeinflusst die HD-Therapie die totale antioxidative Kapazität des Plasmas?
- Ist die antioxidative Kapazität des Plasmas der HD Patienten im Vergleich zu chronisch niereninsuffizienten Patienten und gesunden Probanden verändert?

2.0 Material und Methoden

2.1 Studienaufbau und –durchführung

In der hier vorliegenden Arbeit sollte proteinbiochemisch der Nachweis für die Expression antioxidativer Proteine bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz, sowohl vor als auch nach der Hämodialyse (HD), im Vergleich zu Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ohne Nierenersatztherapie (CNI) und gesunden Kontrollpersonen erbracht werden. Die hierzu angewandten Methoden waren die Monozytenisolierung aus dem Vollblut aller Probanden, der In-Cell-Western-Assay und die Berechnung der Proteinkonzentration mittels spektrophotometrischem Assay sowie die Messung der antioxidativen Gesamtkapazität des Plasmas mittels photometrischem Assay.

Zu den Einschlusskriterien gehörten neben der Volljährigkeit (Alter > 18 Jahre), beiderlei Geschlecht, Zustimmungsfähigkeit sowie die schriftliche und mündliche Zustimmung (informed consent). Ausschlusskriterien waren fehlende Zustimmung und Alter unter 18 Jahren.

Die Untersuchung wurde durch die zuständige Ethikkommission der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin geprüft und genehmigt.

2.2 Isolierung von Monozyten aus Vollblut

Monozyten sind bei der Untersuchung von oxidativem Stress und Entzündungsvorgängen bei terminal niereninsuffizienten Patienten von Bedeutung. Es konnte gezeigt werden, dass sie bei Patienten mit verschiedenen Graden der Niereninsuffizienz eine Rolle bei der Produktion und Freisetzung von Sauerstoffradikalen (reactive oxygen species, ROS) und proinflammatorischen Mediatoren spielen, welche mit Hypertension, akzelerierter Artherosklerose und endothelialer Dysfunktion assoziiert sind.

Aus dem arteriellen Schenkel des Hämodialysesystems wurden 20 ml Vollblut von Dialysepatienten in eine heparinisierte Einmalspritze entnommen. Für die Dialyse wurde eine biokompatible Poylsulfonmembran (F8, Fresenius Medical Care, Bad Homburg,

Deutschland) benutzt. Das Standarddialysat beinhaltet 1.75 mmol Calcium und enthält Bicarbonat. Kt/V , d.h. der Quotient aus dem Plasmaanteil, der während der Hämodialysebehandlung von Harnstoff gereinigt wird und dem Harnstoffverteilungsvolumen, wurde gemäß der Daugirdas-Formel

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

[R = Harnstoff-Reduktionsrate; t = Dialysedauer (h); UF = Volumen des Ultrafiltrats (l); W = Dialyse-Abschlussgewicht (kg)] bestimmt.

Bei den gesunden Probanden und den Kontrollpatienten (niereninsuffiziente Patienten, die keine Nierenersatztherapie erhielten, CNI), wurden 20 ml Blut mittels heparinierter Einmalspritze und Kanüle aus dem venösen System, meist über die *V. cubiti*, entnommen.

Zunächst wurde das Blut 10 Minuten bei 2000 Rotationen pro Minute (rpm) zentrifugiert, wodurch es in Hämatokrit und Plasma aufgeteilt wurde. Von jedem Probanden wurden jeweils ca. 1,5 ml Plasma bei -80°C eingefroren und aufbewahrt. Das restliche Plasma wurde verworfen. Die verbleibenden Blutzellen (der Hämatokrit, Hkt) wurden mit HBSS (Hank's Balanced Salt Solution; in mmol/l NaCl 136, KCl 5.4, KH_2PO_4 0.44, Na_2HPO_4 0.34, D-Glukose 5.6, CaCl_2 1.0, MgCl_2 1.0, Hepes 10, pH 7.4) im Verhältnis von 1:1 versetzt und gemischt. Dieses Zellgemisch wurde anschließend auf Histopaque® 1077 aufgetragen. Histopaque ist ein Zentrifugationsmedium, das Polysucrose und Natriumdiatrizoat enthält und zur Dichte-Gradienten Zentrifugation benutzt wird. Zellen haben die Eigenschaft, in einem starken Zentrifugationsfeld zu sedimentieren und sich entsprechend ihrer Größe entlang eines linearen Gradienten anzuordnen, der hier durch das Histopaque® erzeugt wurde. Hierdurch konnten bei der anschließenden 15-minütigen Zentrifugation (bei 2100 rpm) die Zellen des Hämatokrits nach ihrem spezifischen Dichtegradienten aufgeteilt werden. Es entstanden nach der Zentrifugation drei Zellschichten, die mit dem bloßen Auge sichtbar waren: unter dem Histopaque® die Erythrozyten, darüber eine Schicht, die hauptsächlich Granulozyten enthielt, und in der obersten Schicht eine milchig-weiße Platte aus mononukleären Zellen (Lymphozyten, ‚natürliche‘ Killerzellen, Monozyten und Makrophagen). Darüber befand sich Plasma. Dieses Verhalten wird in **Abbildung 1** verdeutlicht.

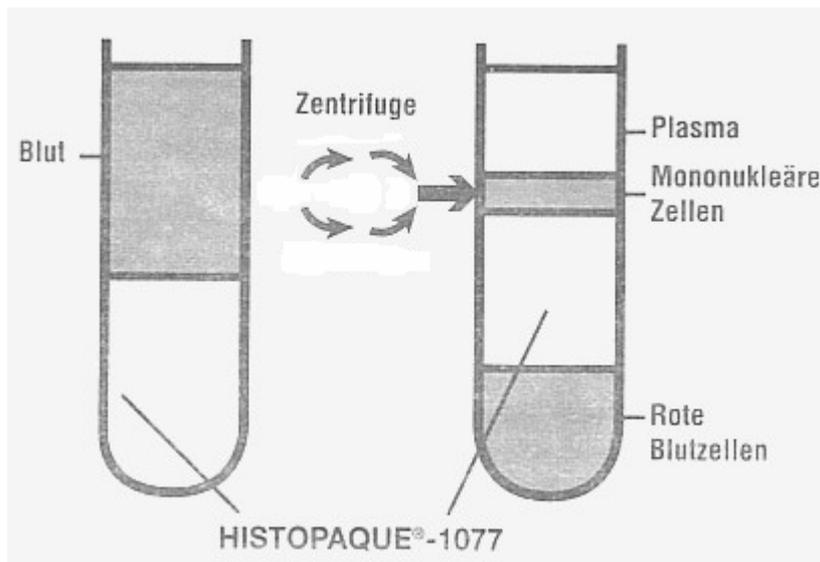


Abbildung 1: Dichtegradientenzentrifugation mit Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich®)

Es wurden nur die Zellen des mononukleären Rings abpipettiert, mit HBSS versetzt und erneut zentrifugiert. Nach dem Dekantieren des Überstandes blieb eine Ansammlung von mononukleären Zellen an der Basis des Zentrifugenröhrchens übrig, welche mit 1,5 ml HBSS resuspendiert wurde. Nun erfolgte die Trennung der CD14 positiven Monozyten und Makrophagen von den übrigen Zellen mittels Dynabeads®. Diese besitzen gegen CD14 gerichtete monoklonale Antikörper, die an superparamagnetische Polystyrenkügelchen gebunden sind. Das bedeutet, dass sie spezifisch über eine Glykosylphosphatidylverbindung an die Oberfläche von CD14 positiven Zellen binden. Es gibt durchschnittlich ca. 10 000 Leukozyten pro μl Blut, davon sind 5-10% Monozyten. Demnach sind 1×10^3 Monozyten/ μl bzw. 20×10^6 Monozyten in 20ml Vollblut enthalten.

Nach einer einstündigen Inkubation mit Dynabeads® konnten die Monozyten und Makrophagen mit Hilfe eines Magneten von den übrigen, oben genannten Zellen getrennt und zur weiteren Verarbeitung verwendet werden. Bei optimaler Handhabung lassen sich 95% aller vorhandenen Monozyten isolieren, unter suboptimalen Bedingungen 80%.

2.3 In-Cell-Western Assay

Um zu beweisen, dass sich die Expression der zu untersuchenden Proteine zwischen den Patientengruppen unterscheidet, wurde mit den vorher isolierten Monozyten ein spezielles Verfahren durchlaufen, der In-Cell-Western Assay.

Dieses immunzytochemische Verfahren basiert auf Antigen-Antikörper Reaktionen und dient dem Nachweis von Proteinen. Dies geschieht durch Quantifizierung von intrazellulären Proteinen, die fluoreszierende Antikörper gebunden haben. Der Proteinnachweis erfolgt direkt in der Zelle. Hierdurch unterscheidet sich der In-Cell-Western Assay vom klassischen Western Blot auf Gel-Basis, der eine elektrophoretische Auftrennung der Proteinmoleküle nutzt.

2.3.1 Prinzip des In-Cell Western Assays

Die gewonnenen Zellen wurden permeabel gemacht und auf einer Platte fixiert. Es folgten Inkubationen mit einem primären und einem sekundären Antikörper. Der primäre Antikörper haftet an das nachzuweisende Protein. Der sekundäre Antikörper, welcher mit Infrarot-Farbstoffen konjugiert ist, bindet an den haftenden primären Antikörper. Die spätere Messung der Fluoreszenz des sekundären Antikörpers erlaubt einen Rückschluss auf die Menge des gebundenen Zielproteins. Die Fluoreszenzmessung erfolgte durch den Odyssey Infrared Imager von LI-COR. Dieser verfügt über zwei voneinander getrennte Fluoreszenzkanäle und kann deshalb simultan zwei unterschiedliche Zielstrukturen messen, z. B. Zielprotein und Referenzprotein.

2.3.2 Durchführung des In-Cell Western Assays

Die isolierten Monozyten wurden mit 3.5% Formaldehydlösung auf einer 96-Well Platte fixiert und mittels 0.1% Triton X-100 Lösung permeabel gemacht. Über Nacht wurden die Zellen mit Blockpuffer inkubiert. Dann wurden die Zellen fünf Minuten mit Tween Waschlösung gewaschen, wodurch eine Verminderung von Hintergrundfluoreszenzen erreicht werden sollte. Es folgte eine zweistündige Inkubation mit verschiedenen primären Antikörpern. Einer richtet sich jeweils gegen das zu untersuchende Zielprotein, der andere gegen das Referenzprotein. Das Referenzprotein ist ein Protein, welches in

konstanter Menge in den Zellen exprimiert wird. Es erlaubt durch den quantitativen Vergleich mit dem Zielprotein Rückschlüsse über die Expression des Zielproteins und dient als Kontrolle für den regelrechten Ablauf des Experiments. Als Referenzprotein diente beta-Aktin. Beta-Aktin ist als dünnes Filament Bestandteil des Zytoskeletts jeder Zelle und bildet mit anderen Aktinfilamenten u. a. eine kortikale Schicht unterhalb der Zellplasmamembran, welche Wechselwirkungen mit der extrazellulären Matrix vermitteln, an Zell-Zell-Kontakten beteiligt sind und für die Motilität von Zellen verantwortlich sind.

Primäre Antikörper waren für die NADPH-Quinone-Oxidoreduktase (NQO1) und das Insulin-like Growth Factor Binding Protein 1 (IGFBP1) goat anti human-NQO1- und -IGFBP1-Antikörper. Für die Superoxiddismutasen 1 und 2 (SOD1 und SOD2) und die Glutathionperoxidase (GPx) waren die primären Antikörper sheep anti human-SOD1-, -SOD2- und -GPx-Antikörper. Für beta-Aktin wurde rabbit anti-human-Antikörper als primärer Antikörper benutzt. Die Antikörper wurden auf 1:1000 mit einem 1:1-Gemisch aus Blockpuffer und HBSS verdünnt. Nach der Inkubation erfolgte unter Schütteln erneut ein Waschvorgang mit Tween Waschlösung (4 x 5 min), um ungebundenen primäre Antikörper zu entfernen. Bei jedem Wasch- und Dekantierschritt wurde die Platte auf einen Magneten gelegt, um sicher zu stellen, dass die Polystyrenkügelchen mit den Monozyten nicht verloren gingen. Im nächsten Schritt wurde mit sekundären Antikörpern (sowohl für das Zielprotein als auch für das Referenzprotein) die verschiedenen infrarot-Fluorophoren besaßen, in der Verdünnung 1:1000 für eine Stunde inkubiert. Diese waren: für NQO1 und IGFBP1 Alexa Fluor® 680 donkey anti-goat IgG, und für beta-Actin sheep anti-rabbit IRDye 800; für SOD1, SOD2 und GPx Alexa Fluor® 680 donkey anti-sheep IgG und für beta-Actin goat anti-rabbit IRDye 800.

Nach einem weiteren 20-minütigen Waschzyklus konnte nun die Quantifizierung der Proben erfolgen. Die Zellen wurden mit Blockpuffer resuspendiert. Dies gewährleistete genauere Messergebnisse, da das Zusammenhaften der Zellen hierdurch aufgehoben wurde. Es erfolgte die Fluoreszenzmessung des Zielproteins bei 700nm bei einer Exzitationswellenlänge von 680nm und die Messung der Emission des Referenzproteins bei 800nm bei einer Exzitationswellenlänge von 780nm. Die Auswertung der jeweiligen Zielprotein-Fluoreszenz erfolgte im Vergleich zur Fluoreszenz von beta-Actin. Die gemessene Fluoreszenz eines jeden Wells wurde in sogenannte ‚Counts‘ angegeben. Für jede zu untersuchende Probe sind zur Sicherung genauer Messergebnisse mehrere Hintergrundmessungen gemacht worden. Diese

waren Messungen der Fluoreszenz der Polystyrenkugeln und Monozyten, die mit einem sekundären Antikörper inkubiert worden sind, aber nicht mit einem primären. Damit wurden die ‚Counts‘ von ungebundenen, fluoreszierenden sekundären Antikörpern, die das Ergebnis verfälschen würden, erfasst und diese ‚Counts‘ wurden von dem Messergebnis der zu untersuchenden Proteine subtrahiert. So konnte eine genauere Quantifizierung des zu untersuchenden Proteins gewährleistet werden. Dies wurde für das Zielprotein als auch für das Referenzprotein durchgeführt, wonach der Quotient aus beiden gebildet wurde.

2.4 Messung der antioxidativen Gesamtkapazität des Plasmas

Um die antioxidative Gesamtkapazität des Plasmas der HD Patienten sowie der Kontrollgruppen ‚Gesund‘ und ‚CNI‘ zu erfassen, wurde ein ‚Total Antioxidant Status Assay‘ durchgeführt.

2.4.1 Prinzip des Total Antioxidant Status Assay (TAOS)

Der Total Antioxidant Status Assay beruht auf der Fähigkeit der Antioxidantien in jeder Probe, hier Plasma, die Oxidation von ABTS (2,2-Azino-di-[3-ethylbenz-thiazolinsulphonat]) zu $ABTS^{\bullet+}$ durch Metmyohämoglobin, eine Peroxidase, zu verhindern. Die Menge an $ABTS^{\bullet+}$, die produziert wird, kann bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen werden. Unter diesen Voraussetzungen supprimieren die Antioxidantien der Probe die bei 600nm gemessene Absorbance in einem Ausmaß, das proportional zu der Konzentration der Antioxidantien ist.

2.4.2 Durchführung des Total Antioxidant Status Assays

Das verwendete Plasma wurde bei der Isolierung der Monozyten gewonnen und für die Messungen aufbewahrt (s. 2.1). Der Assay wurde auf einer lichtdurchlässigen 96 Well-Platte durchgeführt. Nach einem festgelegten Pipettierschema wurden in jedes Well Chromogen, welches als Peroxidase diente, oder Substrat (stabilisiertes H_2O_2) vorgelegt und 5 Minuten inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von der zu messenden Plasmaprobe zum Chromogen. Es folgte die Messung der Initial-Absorption (A_0), welche für die spätere Bestimmung von ΔA nötig war. Anschließend wurde auf das

Chromogen-Plasmagemisch inkubiertes Substrat zugegeben. Nach einer dreiminütigen Inkubationszeit erfolgte die Messung der Absorption (A).

Demnach ließ sich die antioxidative Konzentration einer Plasmaprobe wie folgt errechnen:

$$\text{Antioxidative Konzentration (mM)} = \frac{1.70 \text{ mM} * (\Delta A \text{ Leermessung} - \Delta A \text{ Probe})}{(\Delta A \text{ Leermessung} - \Delta A \text{ Standard})}$$

- *1.70 mM = antioxidative Konzentration des Standards
- $\Delta A = A - A_0$

2.5 Proteinassay nach Bradford

Um weitere Bezugsgrößen für den Vergleich zwischen den bei den Dialysepatienten und den beiden Kontrollgruppen zu untersuchenden Proteine zu beziehen und um die Zuverlässigkeit des Referenzproteins beta-Aktin zu überprüfen, wurde ein weiteres Assay verwendet, das Bradford Proteinassay. Dieses ist eines der gebräuchlichsten Methoden zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen. Der Bradford Test ist eine photometrische Methode zur quantitativen Bestimmung von Proteinen, die sehr sensitiv ist (im Bereich Mikrogramm pro Milliliter).

2.5.1 Prinzip des Proteinassay nach Bradford

Der Test beruht auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 an Seitenketten von Proteinen, sowohl mit den kationischen als auch mit den nichtpolaren, hydrophoben Seitenketten, in saurer Lösung unter Bildung von Komplexen. Durch die Bindung wird das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 auf 595 nm verschoben. Das Absorptionsspektrum der ungebundenen, kationischen, rotgefärbten Form hat sein Absorptionsmaximum bei ca. 465-470nm. Durch die Bildung von Komplexen mit den Proteinen wird der Farbstoff in seiner blauen, unprotonierten, anionischen Sulfatform stabilisiert, mit einem Absorptionsmaximum von 595 nm. Da der Extinktionskoeffizient des Farbstoff-Protein-Komplexes viel höher ist als der des freien Farbstoffes, kann die Zunahme der Absorption bei 595 nm mit hoher Empfindlichkeit gegen das freie Farbreagenz photometrisch gemessen werden und ist ein Maß für die Proteinkonzentration in der Lösung. Hiermit konnte man die Reliabilität des Referenzproteins beta-Aktin bestimmen, denn die Ergebnisse des Bradford Assays

konnten mit denen des In-Cell-Western verglichen werden, bzw. sollten beide Assays ähnliche Ergebnisse liefern.

2.5.2 Durchführung des Proteinassay nach Bradford

Nach Isolierung von Monozyten mittels DynaBeads® und Aufnahme in HBSS waren diese für die Weiterverarbeitung im Assay bereit. Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 wurde auf Raumtemperatur aufgewärmt. Es wurden zwei Verdünnungsreihen angesetzt, eine Standard-Verdünnungsreihe mit bovinem Serumalbumin und eine Probenverdünnungsreihe mit den isolierten Monozyten. Als Verdünnungsmedium wurde HBSS verwendet. Die Verdünnungsreihen wurden doppelt bzw. dreifach auf die Platten aufgetragen, um mögliche Fehlerquellen zu erkennen bzw. auszuschließen. Außerdem wurden zusätzlich zu den Verdünnungsreihen immer Wells mit reinen Beads in HBSS aufgetragen und vermessen. Anschließend erfolgte die Zugabe des Farbstoffes. Es folgte eine Inkubation der Platte bei Raumtemperatur für 5 Minuten. Danach wurde im Spektrophotometer bei 595 nm Wellenlänge die Proteinkonzentration der Proben erfasst.

Zur Auswertung der Messergebnisse wurde aus den Standardwerten eine Standardkurve erstellt. Mittels dieser Standardkurve konnte die unbekannte Proteinkonzentration jeder Probe erfasst werden. Standardkurven mit dem Linearbereich von 1,25 bis 10µg/ml waren für die Bestimmung der Proteinkonzentration am besten geeignet.

2.6 Material

2.6.1 Arbeitsgeräte

Feinwaage	Sartorius®, Göttingen, Deutschland
Fluoreszenzmesser	Odyssey® Infrared Imaging System, LI-COR®, Lincon, USA
Magnet für Reaktionsgefäße	DYNAL MPC® - S, DYNAL® Biotech, Oslo, Norwegen
Magnetplatten für Mikrotiterplatten	DYNAL MPC®, Oslo, Norwegen

Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortexer	Vibrofix VF 1 Electronic, IKA®, Staufen, Deutschland
Zentrifuge 417R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 541R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Spektrophotometer	Multiscan Ascent Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finnland
Mikrotiterplattenschüttler	IKA®, MTS 2/4 digital, Staufen, Deutschland

2.6.2 Arbeitsutensilien

Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pasteurpipetten	Alpha Laboratories Ltd., Eastleigh, Hampshire, UK
50 ml Röhrchen	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
96-Well-Platten (klar) (TAOS)	Nunc®, Roskilde, Dänemark
96- Well-Platten (dunkel)(ICW)	Nunc®, Roskilde, Dänemark
Kanülen für Blutentnahme	Vacutainer Systems, Becton Dickinson S.A., Madrid, Spanien
Vacutainerröhrchen (10ml) für Blutentnahme	BD Vacutainer Systems, Plymouth, UK

2.6.3 Chemikalien

Je nach Methode sind die verwendeten Chemikalien im Folgenden tabellarisch aufgelistet.

Monozytenisolierung aus Vollblut

Histopaque®-1077

Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA

Dynabeads® M450 CD14

DYNAL® Biotech ASA, Oslo,
Norwegen

HBSS Puffer (Hanks Balanced Salt Solution)

eigene Herstellung(Tab. 2)

Tabelle 2: Zusammensetzung des HBSS-Puffers

	mmol/l
NaCl ₂	136,00
KCl	5,40
KH ₂ PO ₄	0,44
Na ₂ HPO	0,34
D-Glucose	5,60
CaCl ₂	1,00
MgCl ₂	1,00
HEPES	10,00

*Der pH-Wert wurde mit 1 M Natronlauge (NaOH) auf 7,4 titriert.

** Sämtliche Chemikalien zur Herstellung von HBSS-Puffer sind von den Firmen Sigma-Aldrich®(St. Louis, USA) und FLUKA Chemika (Buchs, Schweiz)

In-Cell Western Assay

Sämtliche Chemikalien für den In-Cell Western Assay stammen von den Firmen LICOR® (Bad Homburg, Deutschland), AUG. HEDINGER (Stuttgart, Deutschland) Chemikalien und SIGMA-ALDRICH® (St. Louis, USA).

Tabelle 3: Fixierlösung

5ml		ml
HBSS(+Ca ₂₊)		4.5
Formaldehyd	35%	0.5

Tabelle 4: Tween Waschlösung

10 ml		ml
HBSS (+Ca ₂₊)		9,95
Tween 20	20%	0.05

Tabelle 5: Triton Waschlösung

50 ml		ml
HBSS(+Ca ₂₊)		49,5
Triton X-100	10%	0,5

Tabelle 6: Antikörper

Protein	Primäre Antikörper	Verdünnung	Firma
NQ01	goat anti human NQ01	1:1000	Santa-Cruz Biotechnology, CA., USA
IGFBP1	goat anti human IGFBP1	1:1000	Santa-Cruz Biotechnology, CA., USA
SOD1	sheep anti human SOD1	1:1000	Abcam Ltd., Cambridge, UK
SOD2	sheep anti human SOD2	1:1000	Abcam Ltd., Cambridge, UK
GPx	sheep anti human GPx	1:1000	Abcam Ltd., Cambridge, UK
nNOS	goat anti human NOS1	1:1000	Abcam Ltd., Cambridge, UK
Beta-Actin	rabbit anti human beta Actin	1:1000	Abcam Ltd., Cambridge, UK
Sekundäre Antikörper			
NQ01 IGFBP1 nNOS	donkey anti sheep IgG (Alexa Flour®680)	1:1000	Invitrogen Molecular Probes, Eugene, USA
SOD1 SOD2 GPx	donkey anti goat IgG (Alexa Flour®680)	1:1000	Invitrogen Molecular Probes, Eugene, USA
Beta-Actin	sheep anti rabbit (IR Dye 800)	1:1000	Rockland Inc., Hamburg, Deutschland
	goat anti rabbit (IR Dye 800)	1:1000	Rockland Inc., Hamburg, Deutschland

Tabelle 7: Bestimmung der antioxidativen Gesamtkapazität**

HBSS-Puffer

Chromogen	Metmyohämoglobin und ABTS® (2,2-Azino-di-[3-ethylbenzol-thiazolinsulphonate])
Substrat Standard	stabilisiertes H ₂ O ₂ 1.5 mM 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylsäure

**Alle Chemikalien für diese Messungen stammten vom Total Antioxidant Status Assay Kit von Calbiochem® (EMD Biosciences, Inc. Darmstadt, Deutschland).

Tabelle 8: Proteinassay nach Bradford**

1x Farbstoff	Coomassie Brilliant Blue G-250
BSA Standard	bovines Serumalbumin

**Alle Chemikalien für diese Messungen stammten vom Quick Start Bradford Protein Assay Kit 1 der Firma Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA.

2.7 Statistik

In der hier vorliegenden Arbeit wurden Veränderungen der Proteine SOD1, SOD2, GPx, NQO1 und IGFBP1 zu Beginn und am Ende der Hämodialyse untersucht und mit der Aktivität derselben Proteine bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ohne Nierenersatztherapie sowie mit gesunden Kontrollprobanden verglichen. Die statistische Auswertung und graphische Darstellung der erhobenen Daten erfolgte mithilfe des Computerprogramms GraphPad prism 5.0 (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA). Alle Daten sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM (Standardfehler des Mittelwertes). Um signifikante Unterschiede zwischen den proteinbiochemisch erhobenen Daten vor und nach der Hämodialyse sowie zwischen den einzelnen Kontrollgruppen (HD-Patienten, CNI-Patienten, und gesunde Probanden) darzustellen wurden der nicht parametrische, gepaarte Wilcoxon Test, der nicht parametrische, ungepaarte Mann-Whitney Test sowie der Kruskal-Wallis Test verwendet. Um Zusammenhänge zwischen der Expression des untersuchten Proteins und klinischen/laborchemischen Daten zu erkennen, wurde korrelationsanalytisch

vorgegangen. Die Korrelation überprüft die Wichtigkeit eines geprüften Zusammenhangs. In der hier vorliegenden Arbeit wurde der Korrelationskoeffizient r_s nach Spearman bestimmt. Dieser beruht auf den Rangplätzen der Daten. Je näher der Betrag r_s an 1 ist, desto stärker ist die geprüfte Beziehung der untersuchten Variable. Wenn r_s positiv ist, spricht man von gleichsinnigem Zusammenhang, bei negativen Werten für r_s spricht man von gegensinnigem Zusammenhang.

3.0 Ergebnisse

3.1 Patientencharakterisierung

Für die hier vorliegende Arbeit wurden das Blut und das Blutplasma dreier Probandengruppen proteinbiochemisch untersucht.

Die erste Gruppe bestand aus 75 Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz, die dreimal wöchentlich über im Mittel 4 Stunden eine Hämodialysetherapie bekamen.

Diese Patienten waren 67 ± 13 Jahre alt und unterlagen seit 29 ± 40 Monaten (Mittelwert \pm SEM) der Hämodialysetherapie.

Als Kontrollen dienten zwei unterschiedliche Gruppen.

Die erste bestand aus 55 Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (CNI). Alle Stadien der chronischen Niereninsuffizienz, von Stadium 1 bis Stadium 5, wurden in diesem Patientenkollektiv vertreten. Diese Patienten waren im Mittel 65 ± 17 Jahre alt und entsprachen somit dem Alter der Dialysepatienten.

Die zweite Kontrollgruppe bestand aus 31 gesunden Probanden, die im Mittel 27 ± 5 Jahre alt waren.

Die klinischen und laborchemischen Charakteristika der Probanden werden im folgendem in den Tabellen 9 - 11 dargestellt.

Tabelle 9: Klinische Charakterisierung der Dialysepatienten (HD-Patienten) und der CNI Kontrollpatienten (Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ohne Nierenersatztherapie) als Mittelwert \pm SEM

Charakteristika	Mittelwerte \pm SEM	
	HD - Patienten	CNI
Anzahl	75	55
Alter (Jahre)	67 \pm 13	65 \pm 17
Frauenanteil (%)	31%	34%
Dauer der Einzeldialyse (Stunden)	4 \pm 1	--
Hämodialysetherapie seit (Monate)	29 \pm 40	--
Körpergewicht (kg)	73 \pm 15	76 \pm 15
Body mass Index (BMI) (kg/m ²)	25 \pm 4	26 \pm 4
Raucher (Absolutwert) (%)	27 (36%)	3 (30%)
Bluthochdruck (Absolutwert) (%)	8 (11%)	11 (20%)
Diabetes mellitus (Absolutwert) (%)	27 (36%)	9 (16%)
KHK (Absolutwert) (%)	38 (51%)	41 (74.5%)
pAVK (Absolutwert) (%)	17 (23%)	4 (40%)
Insult (Absolutwert) (%)	7 (1%)	2 (20%)
Tumor (Absolutwert) (%)	12 (16%)	0 (0%)

Tabelle 10: Laborchemische Charakterisierung der Hämodialysepatienten und der CNI Kontrollpatienten (Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ohne Nierenersatztherapie) als Mittelwert \pm SEM

Charakteristika	Hämodialysepatienten		CNI-Patienten
	Vor HD	Nach HD	
Anzahl	75		55
Ultrafiltration/Körpergewicht 100xl/kg (%)	2.3 \pm 0.2	--	--
Kt/V	1.0 \pm 0.3	--	--
Hämatokrit (%)	31 \pm 0.05	33 \pm 0.14	34 \pm 11
Leukozyten (/nl)	9 \pm 5	9 \pm 5	9 \pm 4
Hämoglobin (g/dl)	10 \pm 2	11 \pm 1	12 \pm 2
Thrombozyten (/nl)	231 \pm 94	228 \pm 89	252 \pm 104
Serum-Kreatinin (mg/dl)	6.1 \pm 0.3	3.2 \pm 0.2	2 \pm 2
Serum-Harnsäure (mg/dl)	6 \pm 2	3 \pm 1	8 \pm 3
Serum Harnstoff (mg/dl)	83 \pm 41	32 \pm 21	78 \pm 63
Gesamt-Eiweiß (g/l)	6 \pm 1	6 \pm 1	7 \pm 1
Serum Natrium (mmol/l)	136 \pm 5	137 \pm 4	139 \pm 4
Serum Kalium (mmol/l)	5 \pm 1	4 \pm 1	4 \pm 1
Serum Calcium (mmol/l)	2.2 \pm 0.03	2.5 \pm 0.0	2 \pm 0
Serum Phosphat (mmol/l)	1.7 \pm 1	1 \pm 0.1	1 \pm 0
hsCRP*	4 \pm 6		4 \pm 8

*hoch sensitives C-reaktives Protein

Tabelle 11 :Klinische Charakterisierung der gesunden Kontrollprobanden in Mittelwert \pm SEM

Charakteristika	
Anzahl	31
Alter	25 \pm 4
Frauenanteil (Absolutwert) (%)	19 (61%)
BMI (kg/m ²)	21 \pm 3
Raucher (Absolutwert) (%)	10 (32%)
Einnahme von Vitaminpräparaten (Absolutwert) (%)	1 (6%)

3.2 Bradfordassay

Um die Reliabilität des Referenzproteins beta-Actin zu überprüfen und um mögliche Fehlerquellen auszuschließen, wurde zur Kontrolle ein Bradford-Assay durchgeführt. Der Bradford-Assay ist eine der gebräuchlichsten kalorimetrischen Methoden zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen. Der Test beruht auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine in saurer Lösung unter Bildung von Komplexen. Durch die Bindung wird das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 auf 595 nm verschoben. Anhand von Eichkurven lassen sich so Proteinkonzentrationen von wenigen mg in Flüssigkeiten bestimmen. Dieser Test erlaubte eine gute Kontrolle für die Reliabilität des Referenzproteins beta-Actin, da die Ergebnisse der beiden Testverfahren einen signifikanten Zusammenhang aufweisen sollten.

In dieser Arbeit wurden stichprobenartig Plasmaproben von Patienten, die zuvor im In-Cell Western Assay für das Protein nNOS analysiert worden sind, für das Bradfordassay ausgewählt. Drei Probandengruppen, vor Hämodialyse, nach Hämodialyse und Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ohne Nierenersatztherapie (CNI) wurden untersucht. Hierbei wurden die Ergebnisse des In-Cell-Westerns (mit Zielprotein/Referenz, hier also nNOS/beta-Actin) mit denen des Bradfordassays (mit Zielprotein/Proteinkonzentration, hier nNOS/im Bradfordassay gemessene Proteinkonzentration als Referenz) in einer Korrelationsanalyse nach Spearman korreliert. Es konnte in allen untersuchten Gruppen ein signifikanter Zusammenhang der Ergebnisse beider Assay Verfahren nachgewiesen werden.

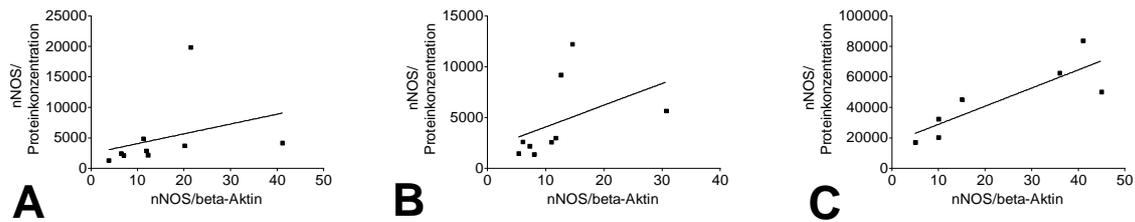


Abbildung 2: Korrelationsanalyse nach Spearman für den Zusammenhang der Testergebnisse des In-Cell-Western Assay und des Bradford-Assay bei Patienten vor(A) und nach (B) der Hämodialysesitzung und für CNI Patienten(C) für das Protein nNOS. Stichprobengröße vor HD n=9, nach HD n=10, CNI n=7. A, B und C zeigen einen signifikanten Zusammenhang zwischen den Ergebnissen des Bradford-Assays und des In-Cell-Western Assays. Dargestellt sind die Regressionsgerade und der Korrelationskoeffizient nach Spearman.

A Regressionsgerade $y = 161.29 \pm 180.52$ Spearman $r_s = 0.70$, $*p < 0.05$

B Regressionsgerade $y = 214.59 \pm 169.54$, Spearman $r_s = 0.78$, $*p < 0.05$

C Regressionsgerade $y = 1193.41 \pm 338.35$, Spearman $r_s = 0.88$, $**p < 0.01$

Hiermit ist die Reliabilität des Referenzproteins beta-Actin als zuverlässig festgestellt worden.

3.3 Die Expression oxidativ und antioxidativ wirkender Proteine bei niereninsuffizienten Patienten mit und ohne Nierenersatztherapie und gesunden Probanden

In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Expression von Proteinen, die als klassische Antioxidantien angesehen werden, von Proteinen, die in ihrer weiteren Funktion antioxidativ wirken und von Proteinen, die eine oxidative Wirkung zeigen, bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz vor und nach der Hämodialyse analysiert und mit der Proteinexpression zweier unterschiedlicher Kontrollgruppen verglichen. Hierfür wurde fluorezensspektrophotometrisch in isolierten Monozyten aus dem Blut der Probanden der intrazelluläre Gehalt an den Proteinen gemessen. Untersucht wurden die Superoxiddismutasen 1 und 2 (SOD1 bzw. SOD2), die Gluthationperoxidase (GPx), die NAD(P)H:quinone oxidoreduktase 1 (NQO1) und das Insulin-like Growth Factor Binding Protein 1 (IGFBP1). Als Referenzprotein wurde beta-Actin untersucht. Dabei wurden die Unterschiede des intrazellulären Gehaltes dieser Proteine zu Beginn und am Ende der Dialyse betrachtet und mit dem intrazellulären Gehalt dieser Proteine bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ohne Nierenersatztherapie (CNI Patienten) sowie mit

gesunden Kontrollprobanden verglichen. Das hierfür verwendete Untersuchungsverfahren war das In-Cell-Western Assay (Odyssey Infrared Imaging System, Licor GmbH, Bad Homburg). Im Folgenden werden die Ergebnisse der durchgeführten Messungen für jedes untersuchte Protein einzeln aufgeführt. Dabei wurde immer die Expression der oben genannten Proteine bei Patienten zu Beginn der Hämodialyse mit den Expressionen dieser Proteine am Ende der Hämodialyse, bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ohne Nierenersatztherapie und bei gesunden Probanden verglichen. Danach folgt in jedem Abschnitt die Gegenüberstellung der CNI Patienten mit den gesunden Probanden.

3.3.1 SOD1

Während der vierstündigen Hämodialyse kam es zu einem signifikanten Abfall im intrazellulären Gehalt von SOD1. Die SOD1 Expression zeigte eine signifikante Verminderung von 39.96 ± 64.3 (arbiträre Einheiten, $n=21$) zu Beginn der HD auf 18.4 ± 10.4 (arbiträre Einheiten) am Ende der HD (46% des Ausgangswertes) ($p < 0.01$).

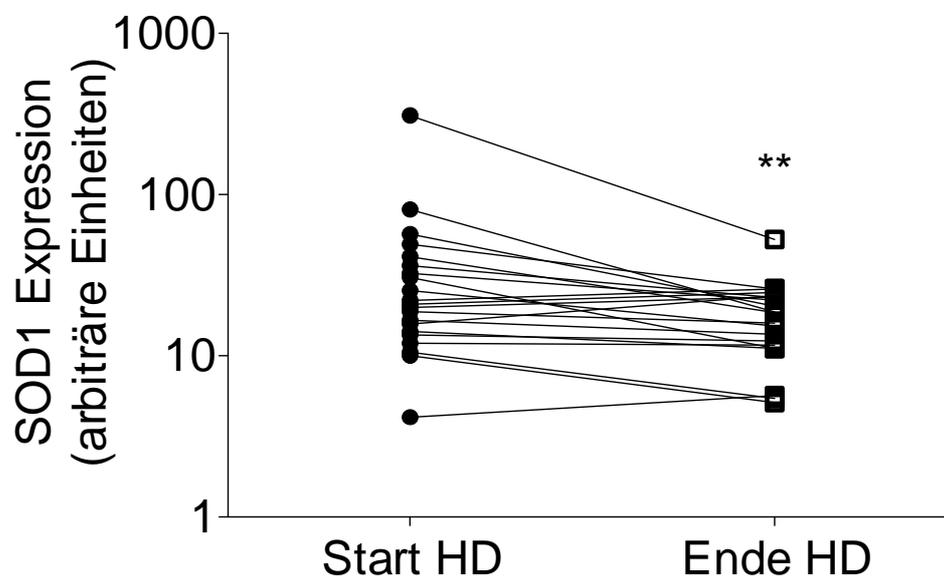


Abbildung 3: Veranschaulichung der Expression von SOD1 zu Beginn (Kreise) und am Ende (Rechtecke) der Hämodialyse bei $n=21$ Patienten als Mittelwert \pm SEM. Die Abbildung zeigt eine signifikante Abnahme des SOD1 Gehalts im Verlauf der Hämodialyse ($n=21$; $**p < 0.01$).

Bei dem Vergleich der Gruppen SOD1 vor HD (39.12 ± 58.99 arbiträre Einheiten; $n=26$) zum Gesamtkollektiv der CNI (chronische Niereninsuffizienz) Patienten ($n=35$) zeigte sich einen minimalen, nicht signifikant niedrigeren SOD1 Gehalt bei den CNI Patienten (34.5 ± 22.6 , arbiträre Einheiten). Des Weiteren wurden die verschiedenen Stadien der Niereninsuffizienz (St. 1-2, 36.4 ± 17.3 arbiträre Einheiten, $n=18$; St. 3-4, 20.3 ± 12.3 arbiträre Einheiten, $n=8$; St. 5, 46.82 ± 38.11 arbiträre Einheiten, $n=6$) SOD1 vor HD gegenübergestellt. Hier fand sich kein signifikanter Unterschied.

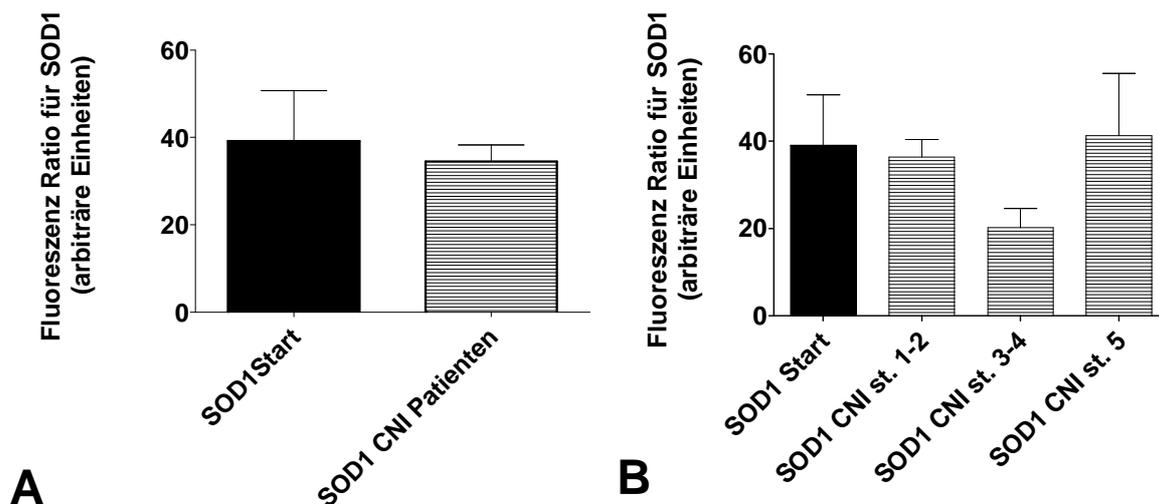


Abbildung 4: Darstellung der Expression von SOD1 bei Patienten vor der Hämodialyse mit dem Gesamtkollektiv der CNI Patienten (**A**) und mit den einzelnen Stadien der Niereninsuffizienz (**B**) als Mittelwert \pm SEM. Diese Abbildung zeigt, dass es beim Vergleich der Patienten zu Beginn der Dialyse ($n=26$) mit dem Gesamtkollektiv der CNI Patienten ($n=35$) und mit den einzelnen Stadien der Niereninsuffizienz (St. 1-2 $n=18$; St. 3-4 $n=8$; St. 5 $n=6$) keinen signifikanten Unterschied gab ($p=n.s.$).

Der Vergleich von SOD1 vor HD mit den gesunden Probanden ($n=13$) zeigte eine niedrigere SOD1 Expression bei den gesunden Probanden (20.70 ± 14.5 , arbiträre Einheiten), dieser Unterschied war aber nicht signifikant.

Der Vergleich zwischen den CNI-Patienten und den gesunden Probanden zeigte eine signifikant weniger SOD1 Expression bei den gesunden Probanden (20.7 ± 14.5 , arbiträre Einheiten) gegenüber den CNI-Patienten (34.5 ± 22.6 , arbiträre Einheiten) ($p<0.05$). Dies wird in **Abbildung 5** verdeutlicht.

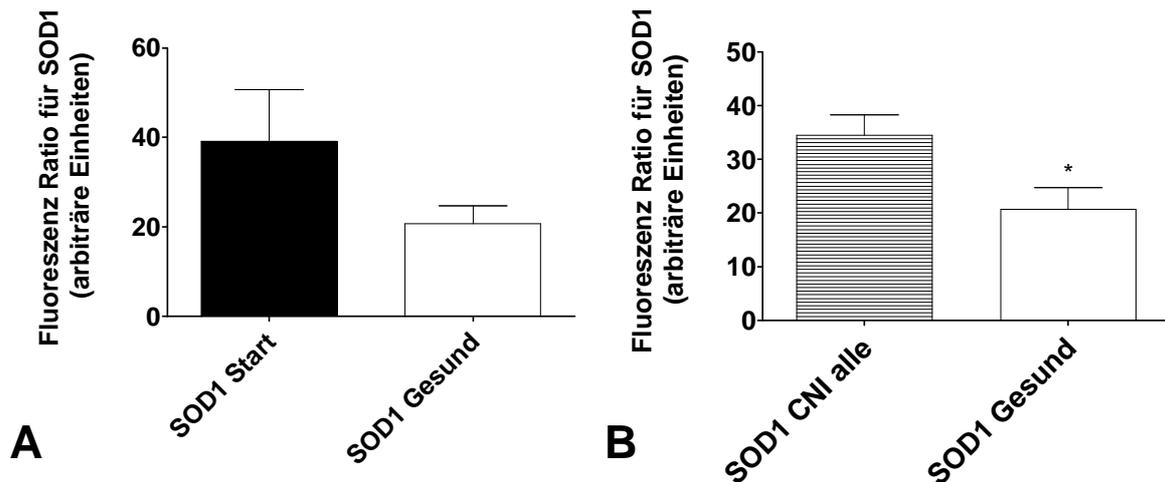


Abbildung 5 : Darstellung der SOD1 Expression als Mittelwert \pm SEM. **A** zeigt der Vergleich der Patienten zu Beginn der Dialyse (n=26) mit gesunden Probanden (n=13, p= n.s.). **B** zeigt die signifikant vermehrte Expression von SOD1 bei den CNI Patienten (n = 35) im Vergleich zu gesunden Probanden (*p<0.05)

Diese Ergebnisse zeigen, dass es in isolierten Monozyten im Verlauf der Hämodialysebehandlung zu einer Abnahme der SOD1 Expression kommt. Des Weiteren wird deutlich, dass die SOD1 Expression bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz höher ist als bei gesunden Probanden.

3.3.2 SOD2

Der Vergleich der SOD2 Expression bei Dialysepatienten (n=21) ergab zwischen den Patienten vor HD (45.54 ± 37.35 , arbiträre Einheiten) und nach HD (54.59 ± 75.76 , arbiträre Einheiten) eine erhöhte, aber nicht signifikante Expression von SOD2 nach Beendigung der Hämodialyse.

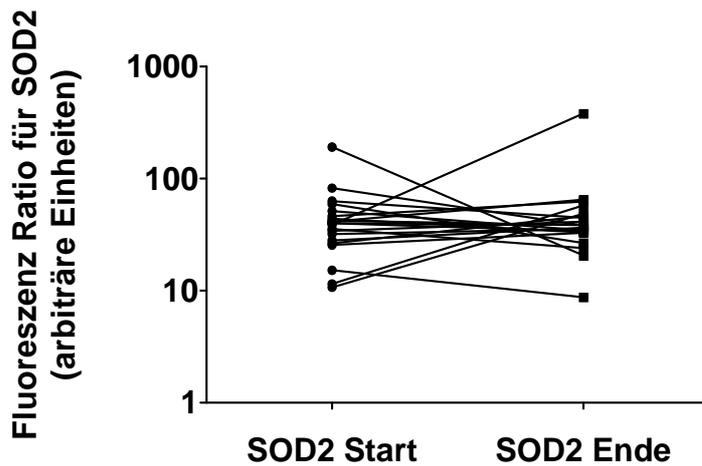


Abbildung 6 : Darstellung der Expression von SOD2 als Mittelwert \pm SEM. Diese Abbildung zeigt eine nicht signifikant verminderte Expression von SOD2 bei Patienten zu Beginn der Hämodialyse (SOD2 Start) im Vergleich zu denen am Ende der Hämodialyse (SOD2 Ende) (n= 21, p=n.s.)

Die Gegenüberstellung der Patienten vor HD (n= 26) (51.34 ± 42.01 , arbiträre Einheiten) mit allen Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (n=35) ergab einen minimalen, aber nicht signifikanten Anstieg des SOD2 Gehaltes bei den CNI Patienten (56.83 ± 37.65 , arbiträre Einheiten).

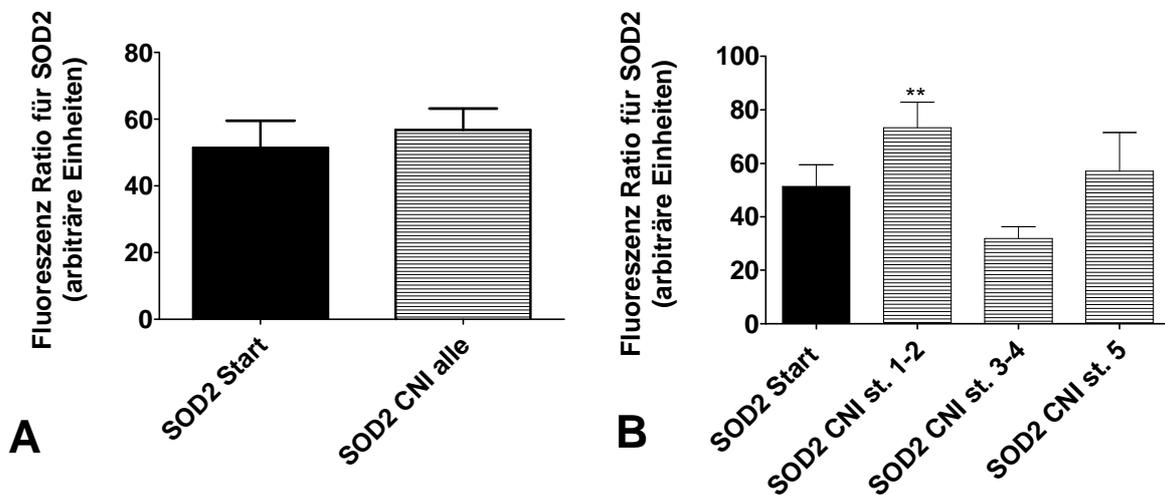


Abbildung 7: Verbirdlichung der Expression von SOD2 als Mittelwert \pm SEM. **A** zeigt die SOD2 Expression zu Beginn der Hämodialyse (n= 26) im Vergleich zum Gesamtkollektiv der CNI Patienten (n=35). Hier ergab sich kein signifikanter Unterschied (p=n.s.). In **B** wird die SOD2 Expression zu Beginn der Hämodialyse mit der Expression von SOD2 in den Niereninsuffizienz Stadien 1-2 (n=18), 3-4 (n=8), und 5 (n=6) verbirdlicht. Ein signifikant höherer SOD2 Gehalt bei den CNI Patienten im Stadium 1-2 (*p<0.05) lässt sich hier beobachten.

CNI Patienten im Stadium 1-2 (73.40 ± 40.17 , arbiträre Einheiten, $n=18$) wiesen eine signifikant höhere Expression an SOD2 ($*p<0.05$) auf als die Gruppe vor HD (51.34 ± 42.01 , arbiträre Einheiten). Eine Signifikanz zwischen den CNI Patienten in den Stadien 3-4 (31.96 ± 12.22 , arbiträre Einheiten, $n=8$) und 5 (57.10 ± 35.35 , arbiträre Einheiten, $n=5$) und den Patienten zu Beginn der Dialyse ergab sich nicht. Bei dem Vergleich der SOD2 Patienten zu Beginn der Hämodialyse mit den gesunden Probanden ($n=13$) konnte eine signifikant höhere SOD2 Expression bei letzterer nachgewiesen werden (94.71 ± 70.58 , arbiträre Einheiten) ($*p<0.05$). Eine signifikant geringere SOD2 Expression im Vergleich zu den gesunden Probanden zeigte auch die Gruppe chronisch niereninsuffizienter Patienten (56.83 ± 37.65 , arbiträre Einheiten; $n=35$) ($p<0.05$).

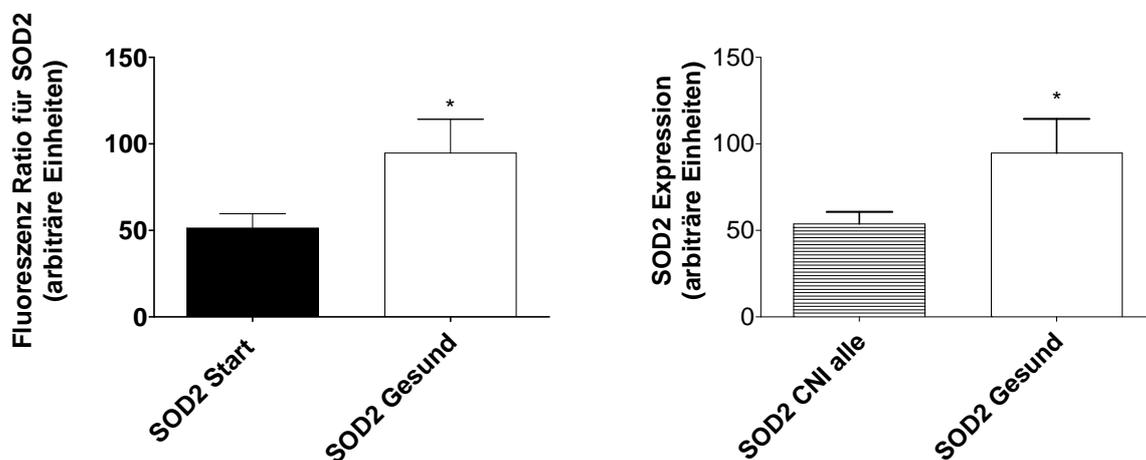


Abbildung 8: Darstellung der SOD2 Expression als Mittelwert \pm SEM. Die rechte Graphik zeigt eine signifikant höhere SOD2 Expression bei gesunden Probanden ($n= 13$, offener Balken) im Vergleich zu niereninsuffizienten Patienten zu Beginn der Hämodialyse ($n= 26$, gefüllter Balken) ($*p<0.05$). Die linke Graphik verbildlicht, dass die gesunden Probanden eine höhere Expression an SOD2 als die Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ohne Hämodialyse ($n= 35$, liniertes Balken) aufweisen ($p<0.05$).

3.3.3 GPx

Bei der Analyse der Expression von GPx bei Patienten zu Beginn (49.86 ± 34.46 , arbiträre Einheiten) ($n= 22$) und am Ende der Hämodialyse (52.38 ± 81.52 , arbiträre Einheiten) konnte keine signifikante Veränderung der GPx Expression im Verlauf der Dialyse festgestellt werden.

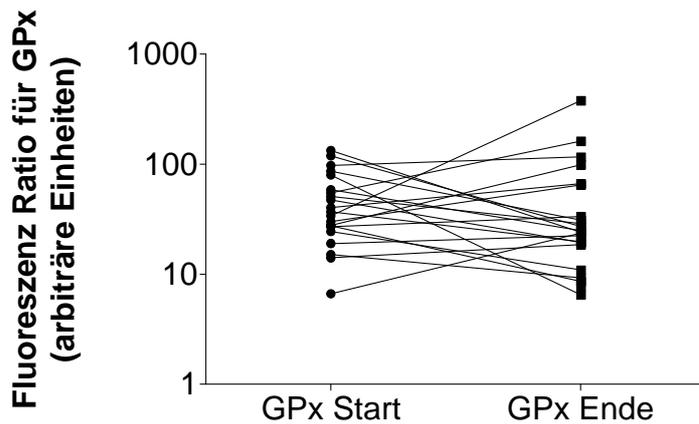


Abbildung 9: Darstellung der Expression von GPx als Mittelwert \pm SEM bei Patienten vor (GPx Start) und nach (GPx Ende) der Hämodialyse (n=22). Diese Abbildung zeigt, dass es keinen signifikanten Unterschied in der GPx Expression im Verlauf der vierstündigen Dialyse gibt (p=n.s.).

Der Vergleich der Patienten zu Beginn der Dialyse mit dem Gesamtkollektiv chronisch niereninsuffizienter Patienten (50.60 ± 39.89 , arbiträre Einheiten) (n=35) und mit den Niereninsuffizienzstadien 1-2 (56.73 ± 37.13 , arbiträre Einheiten) (n=18), 3-4 (42.21 ± 37.42 , arbiträre Einheiten) (n=8) und 5 (37.72 ± 26.92 , arbiträre Einheiten) (n=6) ergab keine signifikanten Unterschiede.

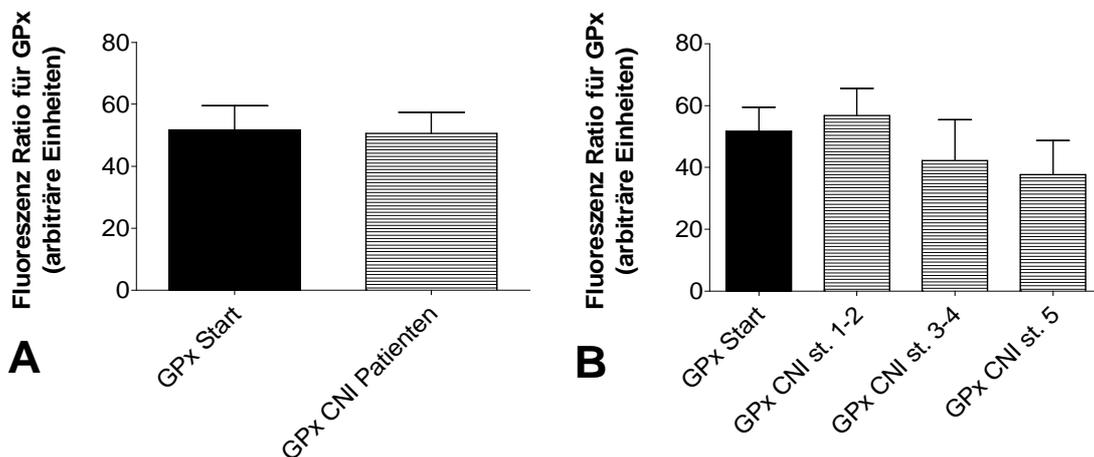


Abbildung 10: Darstellung der Expression von GPx als Mittelwert \pm SEM. **A** Der Vergleich zwischen den Patienten zu Beginn der Hämodialyse (n= 22) und den CNI Patienten (n=35) zeigt keinen signifikanten Unterschied (p=n.s.). **B** zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen Patienten vor der Hämodialyse und in den CNI Stadien 1-2 (n=18), 3-4 (n=8) und 5 (n=6) (p=n.s.)

Der Vergleich der Hämodialysepatienten und der chronisch niereninsuffizienten Patienten mit den gesunden Probanden (32.12 ± 24.52 , arbiträre Einheiten) (n=12) ergab einen minimalen, nicht signifikanten Abfall der GPx Expression bei den gesunden Probanden.

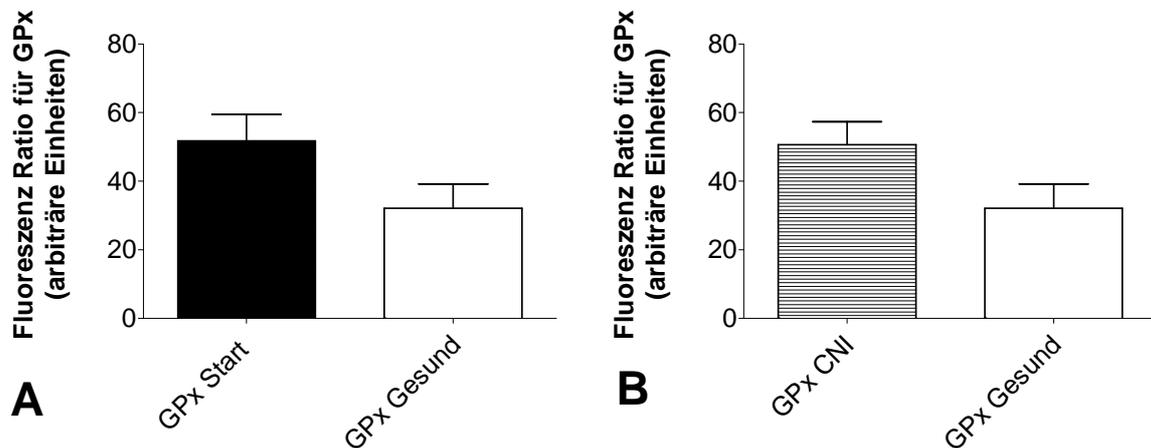


Abbildung 11: Darstellung der Expression von GPx als Mittelwert \pm SEM. **A** und **B** zeigen keinen signifikanten Unterschied in der Expression von GPx zu Beginn der Hämodialyse (n=22) oder bei den CNI Patienten (n= 35) im Vergleich zu den gesunden Probanden (n=12) (p=n.s.)

3.3.4 Korrelationsanalyse der Proteine SOD1, SOD2 und GPx bei chronisch niereninsuffizienten Patienten ohne Nierenersatztherapie

Um zu analysieren, ob Korrelationen zwischen klinischen und laborchemischen Parametern und der Expression von SOD1, SOD2 und GPx bestanden, wurde eine Korrelationsanalyse nach Spearman durchgeführt. Hierfür wurde der Zusammenhang zwischen der Expression dieser Proteine mit den Variablen GFR, Alter, CRP, Urea, Harnsäure, Phosphat, Eiweiß, und Leukozyten untersucht.

Es ergab sich ein signifikant inverser Zusammenhang zwischen der SOD1 Expression bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz und dem C-reaktiven Protein (Spearman $r_s = -0.44$, $p < 0.05$, $n = 25$). Für die Expression von SOD2 im Zusammenhang mit CRP zeigte sich ein annähernd signifikantes Ergebnis (Spearman $r_s = -0.35$, $p = 0.07$, $n = 25$). Für die Expression von GPx im Zusammenhang mit CRP ergab sich keine Korrelation.

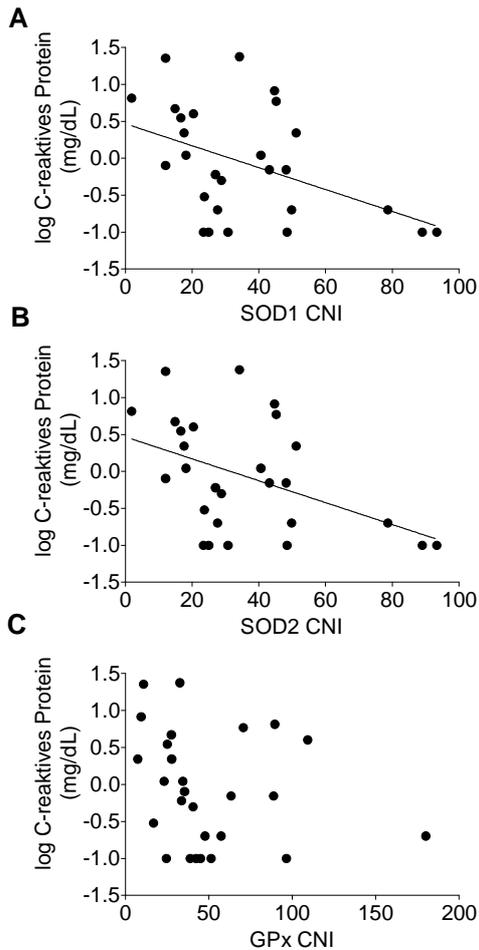


Abbildung 12: Korrelationsanalyse nach Spearman für SOD1, SOD2 und GPx bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz ohne Nierenersatztherapie.

A Signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression von SOD1 und dem C-reaktiven Protein. Dargestellt ist die Regressionsgerade $y=2.85x \pm 0.87$ und der Korrelationskoeffizient nach Spearman (Spearman $r_s = -0.44$, $p < 0.05$) **B** zeigt ein grenzwertig signifikantes Ergebnis für die Expression von SOD2 und CRP. Dargestellt ist die Regressionsgerade $y=2.85x \pm 0.86$ und der Korrelationskoeffizient nach Spearman (Spearman $r_s = -0.35$, $p = 0.07$). **C** zeigt, dass es keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der GPx Expression und dem C-reaktiven Protein gibt.

3.3.5 NQO1

Bei der Untersuchung des Proteins NQO1 stellte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Patienten am Anfang der Hämodialyse (3.83 ± 1.52 , arbiträre Einheiten) ($n=22$) zu denen am Ende dieser heraus (3.48 ± 2.46 , arbiträre Einheiten).

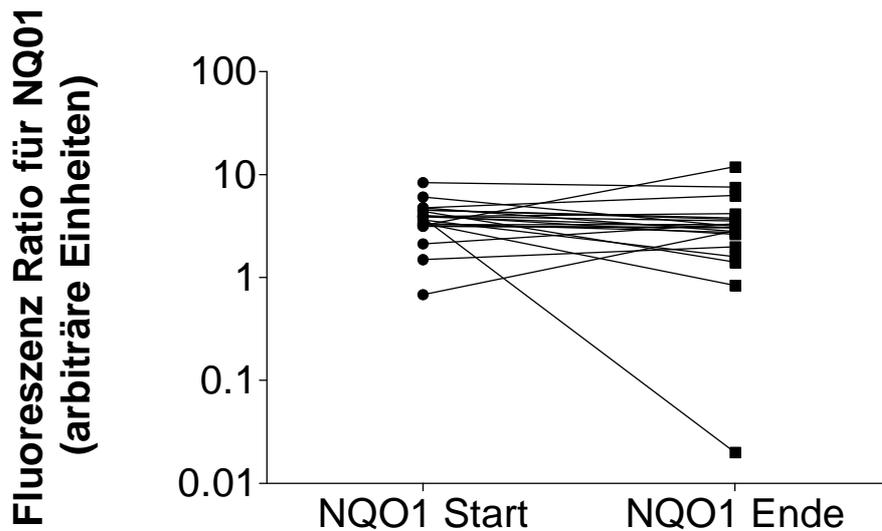


Abbildung 13: Darstellung der Expression von NQO1 als Mittelwert \pm SEM. In dieser Abbildung zeigt sich keine signifikante Veränderung in der NQO1 Expression im Verlauf der Hämodialyse (n=22, p=n.s.).

Der Vergleich zwischen den Patienten vor HD (3.73 ± 1.48 arbiträre Einheiten) (n=24) mit den CNI Patienten (7.63 ± 4.93 , arbiträre Einheiten) (n=22) zeigte einen signifikant vermehrten intrazellulären Gehalt an NQO1 bei den CNI Patienten (**p<0.01).

Der Vergleich der Patienten vor HD mit den unterschiedlichen Stadien der Niereninsuffizienz ergab folgende Resultate: mit steigendem Grad der Niereninsuffizienz stieg der intrazelluläre Gehalt an NQO1 an.

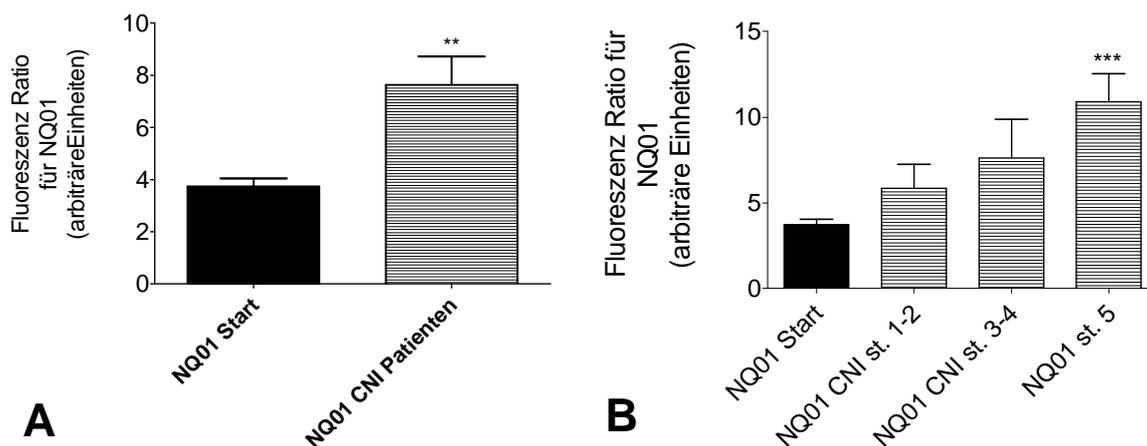


Abbildung 14: Darstellung der NQO1 Expression als Mittelwert \pm SEM.

A Beim Vergleich der Patienten zu Beginn der Dialyse (n=24) mit den Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ohne Dialysetherapie (n=22) wurde ein signifikant höherer NQO1 Gehalt bei den CNI Patienten festgestellt (**p<0.01). **B** zeigt einen deutlichen Anstieg des intrazellulären Gehalts an NQO1 mit steigendem Grad der Niereninsuffizienz.

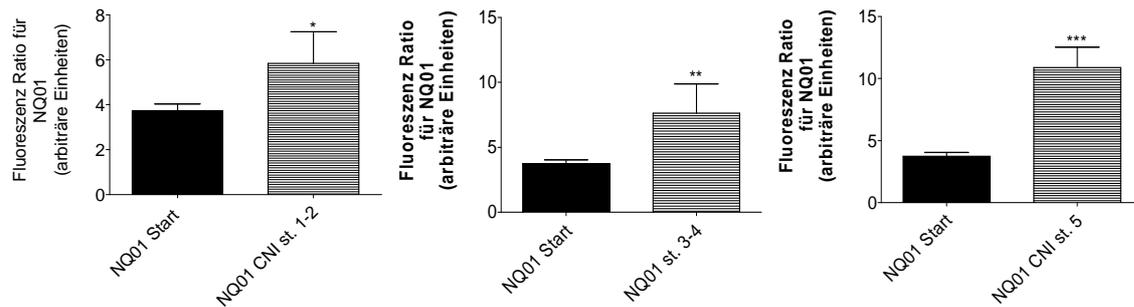


Abbildung 15: Darstellung der NQO1 Expression als Mittelwert \pm SEM. Es werden (von links nach rechts) die Patienten zu Beginn der Hämodialyse (n=24) mit den unterschiedlichen Stadien der Niereninsuffizienz (St. 1-2 (links) (n=8), St. 2-3 (mitte) (n=4), St. 5 (rechts) (n=4)) verbildlicht. *p<0.05, ** p<0.01, ***p<0.0001

Die **Abbildungen 14 und 15** zeigen, dass die Patienten zu Beginn der HD im Vergleich zum Gesamtkollektiv der CNI Patienten und den Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz in den unterschiedlichen Stadien intrazellulär signifikant weniger NQO1 aufweisen. Stadium 1-2 erwies eine Expression von 5.85 ± 3.96 , Stadium 3-4: 7.62 ± 4.52 , und Stadium 5: 10.89 ± 3.30 (arbiträre Einheiten).

Der Vergleich der HD Patienten am Anfang der Dialyse mit den gesunden Kontrollprobanden (n=16) zeigte eine leichte, aber nicht signifikante Erhöhung der Expression von NQO1 bei den gesunden Probanden (4.36 ± 3 , arbiträre Einheiten). Die Gegenüberstellung der gesunden Probanden mit den CNI Patienten (insgesamt) lieferte eine höhere Expression von NQO1 bei den CNI Patienten.

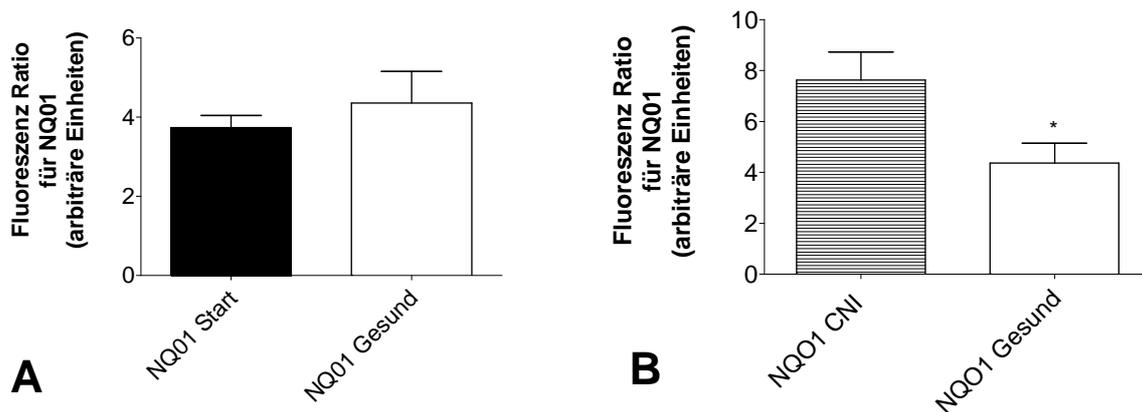


Abbildung 16: Darstellung der NQO1 Expression als Mittelwert \pm SEM. **A** zeigt kein signifikanter Unterschied der Proteinexpression zwischen Patienten am Anfang der Dialyse (n=24) und gesunden Probanden (n=16)(p=n.s.). **B** zeigt eine signifikant weniger NQO1 Expression bei gesunden Probanden als bei den CNI Patienten (n= 20, *p<0.05).

3.3.6 IGFBP1

Im Verlauf der vierstündigen Dialysebehandlung zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Expression von IGFBP1 zu Beginn (8.05 ± 7.45 , arbiträre Einheiten) (n= 23) und am Ende dieser (8.09 ± 11.84 , arbiträre Einheiten).

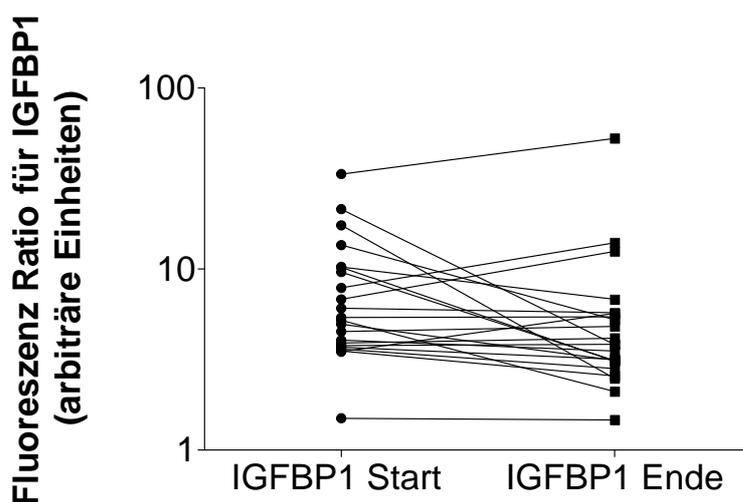


Abbildung 17: Darstellung der Expression von IGFBP1 als Mittelwert \pm SEM. Diese Abbildung zeigt, dass es unter der Hämodialyse zu keiner signifikanten Veränderung bei der Expression von IGFBP1 kommt (n=23, p=n.s.).

Beim Vergleich zwischen den Dialysepatienten zu Beginn der Hämodialyse (n=24) mit den CNI Patienten (11.33 ± 6.61, arbiträre Einheiten) (n=21) offenbarte sich eine signifikant vermehrte Expression von IGFBP1 bei den CNI Patienten (*p<0.05). Der Vergleich zwischen den einzelnen Stadien der Niereninsuffizienz mit den Patienten vor der Hämodialyse ergab jedoch nur eine signifikante Erhöhung der IGFBP1 Expression im Stadium 5 der Niereninsuffizienz (11.26 ± 2.32, arbiträre Einheiten) (n=5) (*p<0.05), nicht jedoch für die Stadien 1-2 (12.45 ± 9.19, arbiträre Einheiten) (n=8) oder die Stadien 3-4 (13.44 ± 6.65, arbiträre Einheiten) (n=4).

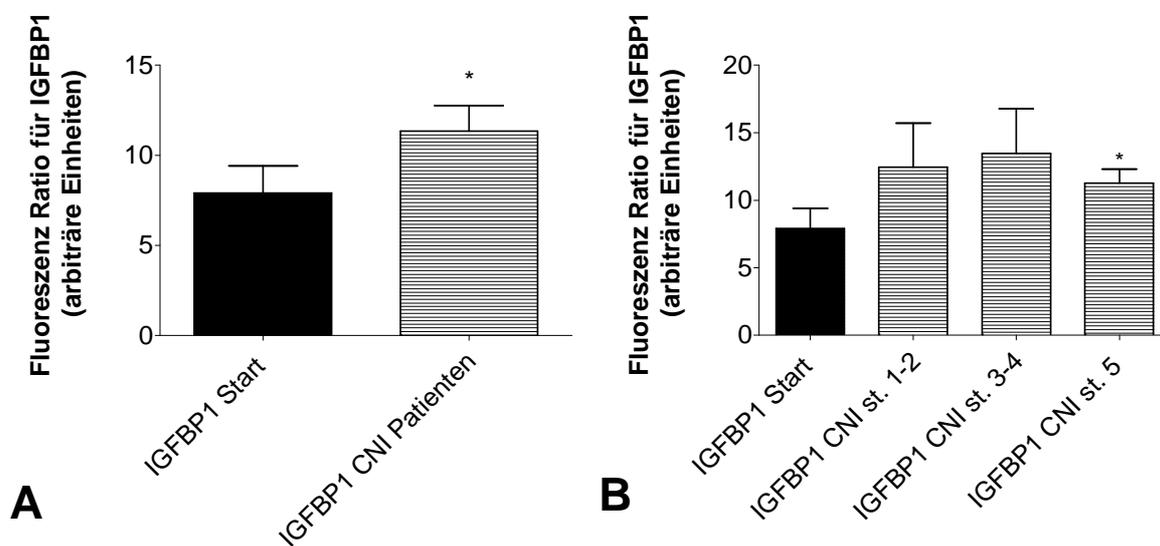


Abbildung 18: Darstellung der IGFBP1 Expression als Mittelwert ± SEM. Vergleich der Expression von IGFBP1 zu Beginn der Hämodialysesitzung mit dem Gesamtkollektiv der CNI Patienten (**A**), und den Patienten in den einzelnen Stadien der Niereninsuffizienz (**B**). **A** zeigt eine signifikant vermehrte Expression von IGFBP1 bei den CNI Patienten. (n=21, *p<0.05). **B** zeigt eine signifikant erhöhte Expression bei chronisch niereninsuffizienten Patienten im Stadium 5 (n=5, *p<0.05).

Auch der Vergleich zwischen den Dialysepatienten vor der Hämodialyse mit den gesunden Probanden (7.29 ± 4.57, arbiträre Einheiten) ergab keinen signifikanten Unterschied.

Der Vergleich zwischen allen CNI Patienten und den gesunden Probanden (7.29 ± 4.57, arbiträre Einheiten) (n= 17) zeigte, dass letztere signifikant weniger IGFBP1 aufweisen (*p<0.05).

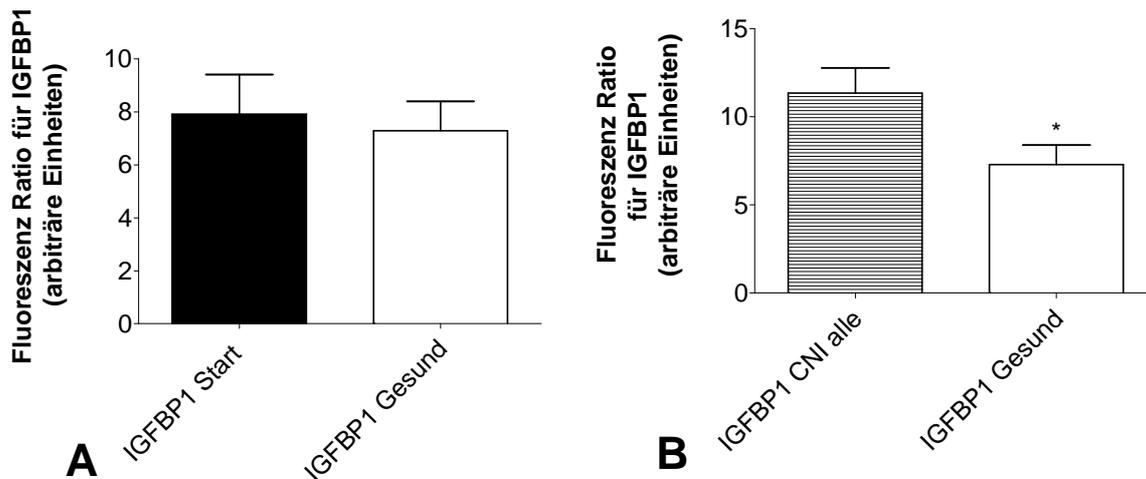


Abbildung 19: Darstellung der Expression von IGFBP1 als Mittelwert \pm SEM. **A:** kein signifikanter Unterschied in der Expression von IGFBP1 zwischen Patienten zu Beginn der Hämodialysesitzung und gesunden Probanden. **B:** signifikant geringere Expression des Proteins bei gesunden Kontrollen verglichen mit dem Gesamtkollektiv der CNI Patienten.

3.4 Ergebnisse der Messung der antioxidativen Gesamtkapazität des Plasmas

Um die antioxidative Gesamtkapazität des Plasmas der Dialysepatienten sowie der Kontrollgruppen zu erfassen, wurde ein Total Antioxidant Status Assay durchgeführt. Dieser beruht auf der Fähigkeit der Antioxidantien in jeder Probe (hier: Plasma) die Oxidation von ABTS zu $ABTS^{\bullet+}$ durch eine Peroxidase zu verhindern. Die Menge an $ABTS^{\bullet+}$, die produziert wird, kann bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen werden. Unter diesen Voraussetzungen supprimieren die Antioxidantien der Probe die bei 600nm gemessene Absorbanz in einem Ausmaß, das proportional zu der Konzentration der Antioxidantien ist.

In dieser Arbeit wurden die untersuchten Gruppen analysiert und untereinander verglichen, um deren Gehalt an Antioxidantien im Plasma zu erfassen.

Die Analyse der antioxidativen Gesamtkapazität des Plasmas zeigte, dass es im Verlauf der Hämodialyse zu einer hochsignifikanten Abnahme der antioxidativen Kapazität unter Dialysebedingungen kommt. Zu Beginn der Hämodialyse betrug die Konzentration der Antioxidantien im Plasma 0.81 ± 0.26 mM, am Ende 0.59 ± 0.24 mM. Dies bedeutet einen Abfall um 73% des Ausgangswerts (Dialysebeginn).

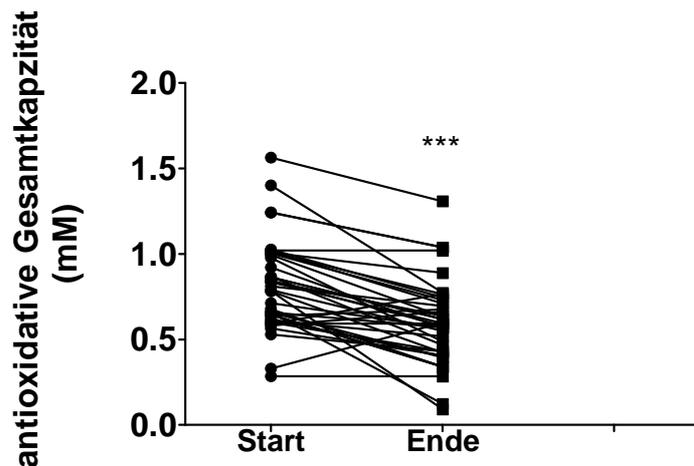


Abbildung 20: Darstellung der antioxidativen Gesamtkapazität des Plasmas in mM als Mittelwert \pm SEM bei Dialysepatienten zu Beginn (Start) und am Ende (Ende) der HD. Zu erkennen ist eine deutliche Abnahme der antioxidativen Kapazität am Ende der Hämodialyse (n= 41, ***p=0.0001).

Weiterhin wurden die Patienten am Anfang der Hämodialyse (0.79 ± 0.27 mM, n=46) mit Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz verglichen.

Es ergab sich kein signifikanter Unterschied der Plasmaantioxidantien bei der Gegenüberstellung zum Gesamtkollektiv der CNI Patienten (0.78 ± 0.27 mM, n=37). Der Vergleich zu den Patienten in verschiedenen Stadien der Niereninsuffizienz zeigte eine signifikant verminderte antioxidative Kapazität im Stadium 1-2 der Niereninsuffizienz (0.71 ± 0.33 mM, n=18, *p<0.05). Im Stadium 3-4 (0.80 ± 0.18 mM, n=11, p=n.s.) und Stadium 5 (0.83 ± 0.13 mM, n=5, p=n.s.) zeigte sich kein signifikanter Unterschied im antioxidativen Fassungsvermögen des Plasmas.

Die Gegenüberstellung der Patienten zu Beginn der Hämodialyse zu den gesunden Probanden ergab eine signifikant verminderte antioxidative Kapazität des Plasmas (0.71 ± 0.14 mM, n=35, *p<0.05) der gesunden Probanden.

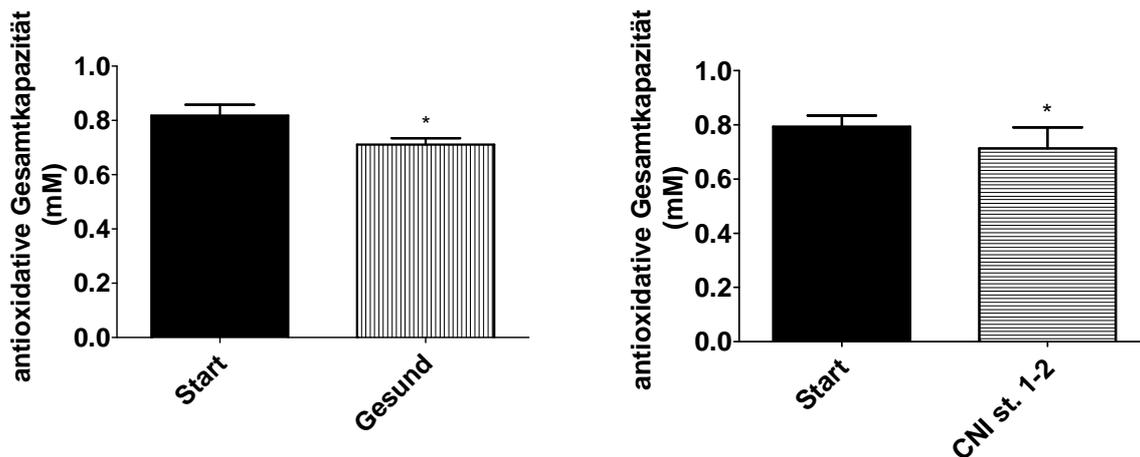


Abbildung 21: Darstellung der antioxidativen Gesamtkapazität des Plasmas in mM als Mittelwert \pm SEM. Die linke Abbildung zeigt den signifikant verminderten antioxidativen Gehalt des Plasmas bei gesunden Probanden ($n=35, *p<0.05$) (offener Balken) im Vergleich zu den Patienten zu Beginn der HD ($n=44$) (gefüllter Balken). Die rechte Abbildung stellt den Vergleich der Patienten zu Beginn der HD mit den CNI Patienten im Stadium 1-2 (linierter Balken) dar. Auch hier ist die antioxidative Gesamtkapazität signifikant niedriger bei den CNI Patienten im Stadium 1-2 ($n=18, *p<0.05$).

Um festzustellen, ob es Unterschiede am Ende der Hämodialyse im Vergleich mit den Kontrollgruppen gab, wurden auch diese Gruppen gegenübergestellt.

Es zeigte sich ein signifikant vermindertes Gehalt an Antioxidantien am Ende der HD (0.70 ± 0.44 mM, $n=44$) im Vergleich zu der Gesamtzahl der CNI Patienten (0.78 ± 0.27 mM, $n=37, *p<0.05$).

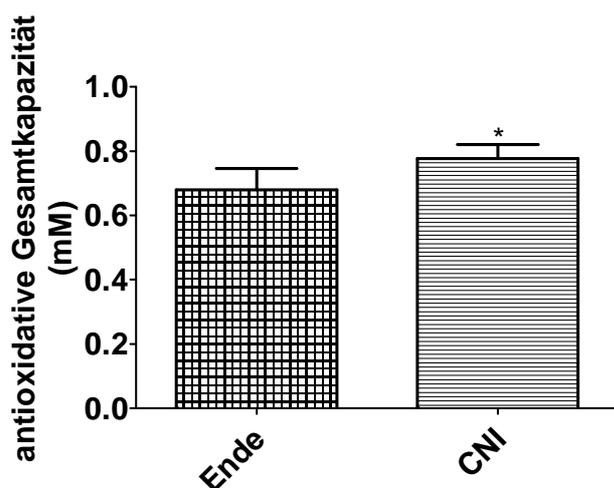


Abbildung 22: Darstellung der antioxidativen Gesamtkapazität des Plasmas in mM als Mittelwert \pm SEM. Zu erkennen ist ein signifikant höherer Gehalt an Antioxidantien im Plasma der chronisch niereninsuffizienten Patienten (CNI Patienten, liniertes Balken, rechts) ($n=37, *p<0.05$) als bei den Patienten am Ende der Hämodialysebehandlung (gemusterter Balken, links) ($n=44$).

Während es keinen signifikanten Unterschied der Patienten am Ende der HD zu Patienten mit CNI im Stadium 1-2 gab, eruierte sich im Plasma der Patienten im Stadium 3-4 ($0.80 \pm 0.18 \text{ mM}$) ($p < 0.05$) und im Stadium 5 ($0.83 \pm 0.13 \text{ mM}$) ($p < 0.05$) eine signifikant höhere antioxidative Kapazität.

Der Vergleich zwischen den gesunden Probanden mit den Dialysepatienten am Ende der Hämodialyse ergab eine signifikant höhere antioxidative Kapazität im Plasma der gesunden Probanden ($0.71 \pm 0.14 \text{ mM}$) als bei den Patienten am Ende der Dialyse.

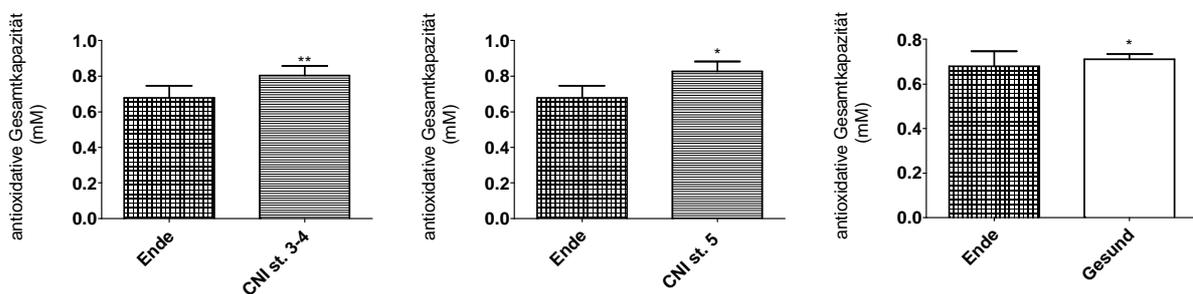


Abbildung 23: Darstellung der antioxidativen Gesamtkapazität des Plasmas in mM als Mittelwert \pm SEM. Diese Abbildung zeigt die signifikanten Unterschiede im Verhalten der antioxidativen Gesamtkapazität des Plasmas bei der Gegenüberstellung der Patienten am Ende der HD (gemusterter Balken, $n=44$) mit den CNI Patienten im Stadium 3-4 (links, liniertes Balken, $n=11$) und Stadium 5 (mitte, liniertes Balken, $n=5$) und mit den gesunden Probanden (rechts, offener Balken, $n=35$). Zu erkennen ist ein verminderter Gehalt an Plasmaantioxidantien bei den Patienten am Ende der HD im Vergleich zu Patienten in den Niereninsuffizienzstadien 1-2 und 3-4 als auch zu den gesunden Probanden. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Im letzten Schritt dieser Analyse wurden die gesunden Probanden ($0.71 \pm 0.14 \text{ mM}$, $n=35$) mit den Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ohne Nierenersatztherapie verglichen.

Bei dem Vergleich der gesunden Probanden mit der Gesamtzahl der Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ohne Nierenersatztherapie ergab sich ein höherer, aber nicht signifikanter Gehalt der Plasmaantioxidantien bei den CNI Patienten ($0.78 \pm 0.27 \text{ mM}$, $n=37$). Der Vergleich zu den CNI Patienten, unterteilt in den unterschiedlichen Stadien der Niereninsuffizienz, ergab weder für das CNI Stadium 1-2 ($0.71 \pm 0.33 \text{ mM}$, $n=18$), noch für das CNI Stadium 3-4 (0.80 ± 0.18 , $n=11$) einen signifikanten Unterschied. Beim Vergleich zum Stadium 5 der chronischen Niereninsuffizienz zeigte

sich jedoch ein signifikanter Anstieg des Gehaltes an Plasmaantioxidantien auf 0.83 ± 0.13 mM (n=5).

Es konnte gezeigt werden, dass die antioxidative Gesamtkapazität des Plasmas in Verlauf der vierstündigen Hämodialyse signifikant abnimmt. Des Weiteren zeigte sich eine verminderte antioxidative Kapazität bei Patienten im Stadium 1-2 der chronischen Niereninsuffizienz und bei gesunden Kontrollen, verglichen mit Patienten zu Beginn der Hämodialyse.

Patienten am Ende der Hämodialyse wiesen im Vergleich zu allen CNI Patienten ein niedrigeres antioxidatives Fassungsvermögen auf, auch im Vergleich zu hohen Stadien der Niereninsuffizienz. Im Vergleich zu gesunden Probanden wiesen die Patienten am Ende der HD weniger Antioxidantien im Plasma auf.

Vergleicht man den Gehalt der Antioxidantien im Plasma von gesunden Menschen mit Patienten vor und nach der HD, so wiesen erstere einen höheren, letztere einen geringeren Gehalt an Antioxidantien im Plasma auf. Beim Vergleich mit Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ohne Nierenersatztherapie zeigen nur Patienten im Stadium 5 einen signifikant höheren Gehalt der Plasmaantioxidantien im Vergleich zu Gesunden.

4.0 Diskussion

Reaktive Sauerstoffspezies sind Nebenprodukte verschiedener Stoffwechselfvorgänge und werden in vielen unterschiedlichen Zellarten vorgefunden. Kommt es jedoch zu einem Ungleichgewicht zwischen der Bildung freier Radikale und der Konzentration antioxidativ wirkender Enzymsysteme, so entsteht oxidativer Stress.

Oxidativer Stress ist an der Pathogenese einer Vielzahl von Erkrankungen beteiligt. Bei der Entstehung der Artherosklerose und der damit assoziierten endothelialen Dysfunktion katalysieren ROS die Formation von oxidiertem LDL, welches durch Makrophagen aufgenommen wird und somit die Bildung aktivierter Schaumzellen initiiert. Zusätzlich zu seiner Rolle bei der Schaumzellbildung verletzt oxidiertes LDL benachbartes Endothel, was zu einer Hochregulation von Endothelin, einer Runterregulation von vasodilatierend wirkendem NO und einer Expression von Adhäsionsmolekülen führt, wobei Letzteres die Migration von Thrombozyten und Monozyten unterstützt [Rigatto et al., 1999]. Oxidativer Stress wird mittlerweile auch als wichtiges Verbindungsglied zwischen Hypertension und Atherosklerose erkannt: Angiotensin II moduliert über seinen Effekt auf das Renin-Angiotensin-System die Hypertension und die Stimulation der AT1-Rezeptoren in der Gefäßwand führt zu der Aktivierung der NADH/NAD(P)H-Oxidase. Das Resultat ist eine gesteigerte ROS Produktion und oxidativer Stress [Madamanchi et al., 2005].

Oxidativer Stress ist bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz verstärkt vorhanden, was durch unterschiedliche Faktoren, wie beispielsweise die ungenügende Entfernung von Urämietoxinen und die Entfernung von Antioxidantien durch die Hämodialyse oder die chronische Inflammation, hervorgerufen wird. Diese Patienten zeigen ein erhöhtes kardiovaskuläres Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko.

Pawlak et al. konnten zeigen, dass es eine positive Korrelation zwischen VEGF (vaskular endothelial growth factor) und MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1), die beide Mediatoren der Atherogenese sind, und oxidativem Stress bei HD Patienten gibt [Pawlak et al., 2004]. Becker et al. zeigten für HD Patienten einen Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und erhöhtem kardiovaskulärem Risikoprofil [Becker et al., 1997].

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Untersuchung des oxidativen Stress bei Hämodialysepatienten, chronisch niereninsuffizienten Patienten ohne Nierenersatztherapie und gesunden Probanden Monozyten verwendet. Monozyten sind bei der Generierung von oxidativem Stress interessant, da sie nicht nur eine Quelle für ROS, sondern auch ihr „Opfer“ sind. Sie stellen im peripheren Blut Vorläufer von mobilen und gewebeständigen Makrophagen dar. Als wichtiger Bestandteil des Immunsystems reagieren sie chemotaktisch auf Entzündungen, nekrotisches Material und Mikroorganismen. Verlassen sie das Blut, so können sie sich an der Bildung atherosklerotischer Plaques beteiligen. Es ist bekannt, dass Zellen des mononuklearen Phagozytensystems, die urämischem Plasma ausgesetzt werden, Thiolgruppen verlieren. Thiolgruppen haben eine wichtige Bedeutung für die Aufrechterhaltung von Redoxgleichgewichten.

Des Weiteren produzieren Monozyten selbst reaktive Sauerstoffradikale, wenn sie aktiviert werden und können wiederum durch oxidativ veränderte Proteine (AOPPs) dabei aktiviert werden [Witko-Sarsat 1998].

Eine zentrale Rolle in der enzymatischen Regulation von oxidativem Stress wird den Superoxiddismutasen 1 und 2 zugeschrieben, welche die Reaktion des Superoxidanions zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff katalysieren, und der Glutathionperoxidase, welche Wasserstoffperoxid und verschiedenste Lipidperoxide zu Wasser und Lipidalkoholen reagieren lässt. Neben diesen klassischen antioxidativen Enzymen wurden die NQO1, die nicht nur als chemoprotektives Enzym, sondern auch bei der Aufrechterhaltung nicht-enzymatischer antioxidativer Systeme eine Rolle spielt, und das IGFBP1, als oxidatives Enzym, in dieser Arbeit untersucht. Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, inwieweit die Niereninsuffizienz einen Einfluss auf diese Proteine in Monozyten hat.

4.1 Die Expression der antioxidativen Proteine SOD1 und SOD2 bei niereninsuffizienten Patienten mit und ohne Nierenersatztherapie und gesunden Probanden

Die Superoxiddismutase wird als klassisches antioxidatives Enzym verstanden. Untersucht wurden zwei Isoformen der SOD: die SOD1, eine Kupfer- und Zink-enhaltende Form, die sich vor allem im Zytosol befindet, und die SOD2, die Mangan-

enthaltende Form, die ausschließlich mitochondrial aufzufinden ist. Die Superoxiddismutasen bilden die erste Verteidigungslinie gegen Angriffe durch das Superoxidanion, indem sie die Dismutation des Superoxidanions zu Sauerstoff und Wasserstoffperoxid katalysieren.

Meine Untersuchungen zu SOD1 ergeben, dass es in isolierten Monozyten im Verlauf der Hämodialysebehandlung zu einer Abnahme der SOD1 Expression kommt. Des Weiteren wird deutlich, dass die SOD1 Expression bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz höher ist als bei gesunden Probanden.

Dagegen ergeben die Untersuchungen zur SOD2 keine signifikanten Veränderungen der Expression im Rahmen der Hämodialyse. Allerdings zeigt sich, dass sowohl die Patienten vor der HD als auch die niereninsuffizienten Patienten ohne Nierenersatztherapie signifikant weniger SOD2 aufweisen als die gesunden Kontrollen. Wie deutet man das gegensätzliche Verhalten dieser Isoformen des gleichen Enzyms? Eine Erklärung beinhaltet die unterschiedliche Induzierbarkeit der Isoformen.

Die Mn-SOD (SOD2) wird durch Zytokine (die wiederum durch die Hämodialyse induziert werden können) induziert [Zelko et al., 2002]. Andererseits wird die SOD2 auch durch Urämietoxine und Eisen stark runterreguliert [Aikiyama et al., 2005]. Das komplizierte Zusammenwirken dieser Faktoren könnte erklären, warum Hämodialysepatienten und chronisch niereninsuffiziente Patienten ohne Nierenersatztherapie weniger SOD2 aufweisen als gesunde Personen.

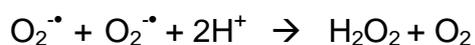
Die SOD1 wird durch eine Reihe physiologischer Zustände reguliert. Durch Hitzeschock, UVB- und X-irradiation, Schwermetalle, Wasserstoffperoxid und NO wird sie hochreguliert, durch Hypoxie runterreguliert [Zelko et al., 2002]. Die Synthese der SOD1 wird jedoch nicht durch Zytokine reguliert. Es könnte sein, dass die Elevation der SOD1 Expression bei chronisch niereninsuffizienten Patienten ohne Nierenersatztherapie an der unzureichenden renalen Elimination liegt. Odland et al. berichten, dass mit ¹²⁵I-markierte SOD1 renal eliminiert wird. Die unzureichende Nierenfunktion könnte Grund für die Elevation der SOD1 Konzentration bei diesen Patienten sein. Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit werden durch Akiyama et al. bestätigt, die eine signifikant höhere SOD1-Aktivität in Leukozyten von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz im Vergleich zu gesunden Kontrollen beobachten [Kelly et al., 2005]. Im Gegensatz dazu zeigten Yilmaz et al. geringere SOD Konzentrationen bei niereninsuffizienten Patienten als bei gesunden Probanden. Zu beachten ist allerdings, dass die Kontrollgruppe in der hier vorliegenden Arbeit mit 27± 5 Jahren im Vergleich zu der von

Yilmaz et al. untersuchten Kontrollgruppe (Altersdurchschnitt: 44 ± 12) relativ jung war, und vermutlich wenig oxidativen Stress hatte. Es konnte gezeigt werden, dass die Fähigkeit, die Transkription von antioxidativen Enzymen unter oxidativem Stress zu erhöhen, vom Alter beeinflusst wird. So berichten Halliwell und Gutteridge, dass ‚altes‘ Lebergewebe subnormale Konzentrationen von Nrf2 aufweist, was die Aktivierung der ‚antioxidant response elements‘ (ARE) beeinträchtigt. ARE sind DNA-Sequenzen, an welche Nrf1 und Nrf2 (nuclear respiratory factors-1 und -2) binden, wenn oxidativer Stress vorhanden ist. Hierdurch wird die Transkription von Genen, die Enzyme wie die SOD1, NQO1, und GPx kodieren, erhöht [Halliwell, Gutteridge 2007; Park, Rho 2002]. Der Altersunterschied zwischen der gesunden Probandengruppe bei Yilmaz et al. und die in der hier vorliegenden Arbeit erklärt vermutlich den Expressionsunterschied von SOD1 bei beiden Gruppen. Der Antrieb der Gentranskription von SOD1 über ‚antioxidant response elements‘ ist bei wenig oxidativem Stress geringer. Lyakhovich et al. konnten zeigen, dass die Aktivität von Nrf2 vom Ratio von oxidierten zu reduzierten Thiolgruppen abhängig ist [Lyakhovich et al., 2006]. So ist die Zellantwort auf oxidativen Stress vom Schweregrad des oxidativen Stress abhängig, und die Zelle kann schnell, adäquat und effektiv ihren Redoxstatus in Balance halten. Dass das Alter einen Einfluss auf oxidativen Stress hat, zeigen verschiedene Studien: die Konzentration des antioxidativ wirkenden Dipeptid Carnosin nimmt beispielsweise mit steigendem Alter ab. Außerdem ist es bekannt, dass ältere Menschen eine Vitamin C reichere Diät benötigen, um gleiche Plasmakonzentrationen wie jüngere Menschen ohne Vitamin C reiche Diät zu erreichen [Halliwell, Gutteridge 2007].

Die SOD1 Expression hat sich unter dem Einfluss der Hämodialyse um 46% vermindert. Dies könnte zwei Ursachen haben. Bekanntermaßen führt die Dialyse zu einem Verlust von für die SOD1 wichtigen Spurenelementen. Insbesondere Zink spielt hier eine große Rolle. So konnten Mahajan et al. zeigen, dass Hämodialysepatienten einen Zinkmangel aufweisen, der sich insbesondere auf eine Abnahme im leukozytären Zinkgehalt (Leukozyten sind reich an Zink) auswirkt, jedoch auch im Plasma dieser Patienten nachzuweisen ist [Mahajan et al., 1982]. Zink ist als wichtiger Kofaktor der SOD1 (Cu/Zn SOD) essentiell für die Funktion dieses Enzymes. Yilmaz et al. berichten, dass Patienten in allen Stadien der Niereninsuffizienz weniger SOD-Aktivität und einen geringeren Gehalt an den Spurenelementen Zink und Kupfer aufweisen als gesunde Kontrollen. Sie konnten eine Verschlimmerung dieser Veränderungen mit Abfall der GFR beobachten [Yilmaz et al., 2006]. Der häufig bei Dialysepatienten beobachtete

niedrigere Plasmazinkspiegel ist vom intradialytischen Verlust, vom Dialysat und von möglicherweise bestehenden gastrointestinalen Problemen abhängig [Zima et al., 1998]. Der Bedarf an Spurenelementen wie Zink, Kupfer, Selen und Mangan, die wichtige Kofaktoren antioxidativer Enzymsysteme sind, ist bei Langzeithämodialysepatienten noch nicht klar definiert, sicher ist aber, dass besonders bei niereninsuffizienten Patienten ein besonderer Bedarf dieser Spurenelemente besteht.

Eine andere Erklärung für den starken Abfall des SOD1 ist die, dass die Dialyse durch eine zusätzliche ROS-Belastung oxidativen Stress auslöst, der zu einer Depletion des SOD1 Gehaltes führt. Auf mittelstark ausgeprägten oxidativen Stress (zum Beispiel während körperlicher Belastung) reagiert der Organismus zunächst mit einer Überexpression der SOD. Besteht der Stress weiter fort und kommt es zu massiver Bildung toxischer ROS wird die SOD zerstört und die Konzentrationen sinken [Levine et al., 1996; Mena et al., 1992]. Von einer übermäßigen Bildung reaktiver Sauerstoffspezies durch Kontakt der Leukozyten mit der Dialysemembran und Biokompatibilität des Dialysesystems ist in der Literatur vielfach berichtet worden, und verschiedene Gruppen berichten von erhöhten ROS Konzentrationen schon ab der ersten Stunde einer Dialysesitzung [Srinivasa Rao et al., 2001]. Obwohl eine einzelne Dialysesitzung die SOD1 als antioxidatives Enzym aktivieren könnte, ohne neue SOD zu produzieren, könnte diese Protektion nur marginal sein. Eine Langzeitstrategie der Zellen könnte in der de novo Synthese von SOD liegen. Allerdings kann, paradoxerweise, eine übermäßig erhöhte SOD-Konzentration gefährlich sein, da sie in diesem Fall die Grundlage für eine übermäßige Produktion von Wasserstoffperoxid bilden kann, gemäß der Formel



Somit können hohe Konzentrationen an SOD zum oxidativen Stress beitragen, da Wasserstoffperoxid selber ein sehr vielseitiges ROS ist.

Die Wichtigkeit der getrennten Betrachtung der SOD-Isoformen wird durch Mendez et al. deutlich. Sie berichten von der unterschiedlichen Auswirkung von SOD1- und SOD2-Defiziten an der glatten Gefäßmuskulatur, hauptsächlich verursacht durch die Kompartimente, in denen die Isoformen lokalisiert sind. Dies wird von Madamanchi et al. bestätigt, die zeigen, dass die Superoxidanion Produktion der glatten Gefäßmuskulatur

bei SOD2-Defizit höher war als bei SOD1 Defizit [Mendez et al., 2005], und dies, obwohl die SOD1 50-80% der totalen SOD ausmacht.

Im Gegensatz zu meinen Ergebnissen zeigten Ozben et al. dass es bei niereninsuffizienten Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen einen generellen Abfall erythrozytärer SOD Konzentrationen gibt, und dass HD Patienten signifikant weniger SOD Konzentrationen aufweisen als niereninsuffiziente Patienten ohne Nierenersatztherapie und als gesunde Probanden [Ozben et al., 2002]. Matkovics et al. zeigen, dass die SOD1 Expression der Erythrozyten bei Patienten vor der Hämodialyse abnimmt, und nach der HD normalisiert wird [Matkovics et al., 1988]. Dass für diese Studien Erythrozyten verwendet worden sind, könnte die unterschiedlichen Ergebnisse erklären.

Schettler et al. berichten von den Nachteilen der Verwendung von Erythrozyten bei Untersuchungen zu oxidativem Stress. Da Erythrozyten frei von DNA und RNA sind, können antioxidative Enzyme nicht von ihnen reguliert werden, wohingegen Monozyten (die hier verwendet worden sind) DNA enthalten und somit die Expression antioxidativer Enzyme regulieren können [Schettler et al, 1998].

4.2 Die Expression des antioxidativen Proteins GPX bei niereninsuffizienten Patienten mit und ohne Nierenersatztherapie und gesunden Probanden

Die Gluthationperoxidase katalysiert die Reduktion von aggressivem H_2O_2 durch das Glutathion in harmloses Wasser.

Meine Untersuchungen haben keinen Unterschied in der Expression der GPx im Verlauf der Dialyse gezeigt. Auch beim Vergleich von Patienten vor HD mit chronisch niereninsuffizienten Patienten ohne Nierenersatztherapie und gesunden Kontrollen ist keine signifikante Veränderung der Proteinexpression zu erkennen, obwohl die gesunden Probanden eine niedrigere GPx Expression zeigen.

Während Draï et al. keine Veränderung von GPx in Erythrozyten von HD Patienten im Vergleich zu Kontrollen fanden, berichten sie von einer signifikant verminderten GPx Expression im Plasma der gleichen Patienten [Draï et al., 2001]. Dagegen konnten Schettler et al. zeigen, dass es in Granulozyten von Dialysepatienten während der HD zu keiner Veränderung der GPx-mRNA kommt, aber dass die GPx Aktivität (auf Proteinebene) bei diesen Patienten im Laufe der HD-Therapie erhöht ist. Des Weiteren

war im Vergleich zu gesunden Kontrollen die GPx Aktivität erniedrigt bei HD Patienten [Schettler et al., 2003]. Die Vielzahl der unterschiedlichen Befunde zu GPx unterstreicht die Wichtigkeit des zu betrachtenden Zelltyps bei Untersuchungen zu antioxidativen Enzymen. In der vorliegenden Arbeit sind Monozyten untersucht worden. In Zusammenhang mit dem kardiovaskulären Risiko von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ist das sinnvoll, weil diese Zellen beispielsweise in atherosklerotischen Läsionen akkumulieren. Außerdem konnte gezeigt werden, dass bei Mangel an antioxidativen Enzymen die Anzahl der Makrophagen in atherosklerotischen Läsionen steigt [Quehenberger, 2005; Torzewski et al., 2007]. Für die hier vorliegende Arbeit hat sich ergeben, dass es in isolierten Monozyten zu keiner signifikanten Veränderung der GPx Expression im Verlauf der Hämodialysebehandlung (49.86 ± 34.46 vs. 52.38 ± 81.52 , arbiträre Einheiten) kommt. Auch zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bei den chronisch niereninsuffizienten Patienten ohne Nierenersatztherapie oder den gesunden Probanden im Vergleich mit den HD Patienten.

4.3 Korrelationsanalyse der Proteine SOD1, SOD2 und GPx bei chronisch niereninsuffizienten Patienten ohne Nierenersatztherapie

In der in dieser Arbeit durchgeführten Korrelationsanalyse zwischen klinischen und laborchemischen Parametern und der Expression von SOD1, SOD2 und GPx, zeigt sich, dass es einen signifikant inversen Zusammenhang zwischen der SOD1 Expression bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz und dem C-reaktiven Protein gibt. Für die Expression von SOD2 im Zusammenhang mit CRP zeigte sich ein annähernd signifikant inverses Ergebnis.

In der Literatur berichten zahlreiche Autoren von einem engen Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und Markern der chronischen Inflammation [Himmelfarb et al., 2002; Gordan et al., 2004; Morena et al. 2005; Sela et al., 2005].

Das C-reaktive Protein ist ein wanderndes, kohlenhydratfreies Akute-Phase-Protein, das als empfindlicher aber unspezifischer Indikator für entzündliche Prozesse und Gewebsschädigung geeignet ist. Es konnte gezeigt werden, dass sogar kleine Veränderungen der CRP-Konzentration (bis zu 3 mg/l) mit einem erhöhten Risiko an kardiovaskulären Ereignissen assoziiert sind [Nguyen-Khoa et al., 2001]. CRP wird hauptsächlich in der Leber synthetisiert, wobei es unter Kontrolle verschiedener

Zytokine steht. CRP lässt sich aber auch in frühen Stadien der Arteriosklerose in Plaques in Kolokalisation mit atherogenen Lipiden nachweisen. Verschiedene Eigenschaften von CRP wurden beschrieben, die zur Unterhaltung einer entzündlichen Reaktion beitragen können: es bindet an geschädigte Zellen und aktiviert das Komplementsystem im infarzierten Myokard. Es bindet an atherogene Lipidpartikel und induziert die Aggregation von LDL- und VLDL. Es stimuliert die Bildung von Tissue Factor durch Monozyten und fördert somit die Thrombenbildung. Somit ist es denkbar, dass CRP selbst eine kausale, proinflammatorische Rolle spielt. Dem CRP wird eine aktive Rolle in der Pathogenese der Arteriosklerose zugeordnet, z.B. wird die Expression des AT₁-Rezeptors in glatten Gefäßmuskelzellen durch CRP induziert, was zu erhöhter O₂⁻-Bildung und Zellproliferation führt und den Gefäßtonus beeinflusst [Galle, 2004]. Nguyen-Khoa et al. konnten zeigen, dass es eine positive Korrelation zwischen erhöhtem Plasma CRP und Marker der Lipidperoxidation bei Hämodialysepatienten gibt. Zusätzlich fand diese Gruppe eine inverse Korrelation zwischen dem Plasma CRP und Plasma α -Tocopherol Konzentrationen [Nguyen-Khoa et al., 2001]. Himmelfarb et al. berichten von einer positiven Korrelation zwischen Plasma F₂-Isoprostanen (einem Marker für oxidativen Stress) und Plasma CRP. Die hier vorliegende Arbeit hat eine signifikante, inverse Korrelation zwischen dem Plasma CRP und der SOD1 Expression in isolierten Monozyten gezeigt, das heißt, dass ein Abfall des CRP mit einem Anstieg der SOD1 Konzentration einhergeht. Auch für SOD2 konnte eine annähernd signifikant inverse Korrelation gezeigt werden. Dies ist konsistent mit der Hypothese, dass chronische Inflammation zu einer Depletion antioxidativer Reserven führt [Yeun, Kaysen 2000; Spittel et al. 2001]. Diese Beobachtungen unterstützen die Vermutung, dass es in der chronischen Urämie einen engen Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und Inflammation gibt, welche gemeinsam starke Auswirkungen auf das antioxidative System haben.

4.4 Die Expression des Proteins NQO1 bei niereninsuffizienten Patienten mit und ohne Nierenersatztherapie und gesunden Probanden

Die NQO1 wird nicht als klassisches antioxidatives Enzym bewertet, trägt aber zur Aufrechterhaltung des Spiegels bestimmter endogener Antioxidantien bei, indem es diese (nach Oxidation) zurück in ihre aktive, reduzierte Form bringt. Beispielsweise ist

Coenzym Q ein wichtiges antioxidatives Substrat der NQO1 und trägt effizienter zum antioxidativen Schutz von LDL bei als α -Tocopherol [Beyer et al., 1996].

In der vorliegenden Arbeit kam es im Verlauf der Dialyse zu keiner Veränderung der Expression von NQO1. Der Vergleich zwischen den Patienten vor HD und den Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ohne Nierenersatztherapie ergab, dass Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz einen höheren Gehalt an NQO1 aufweisen und dass die Expression von NQO1 in Monozyten mit steigendem Grad der Niereninsuffizienz steigt. Dieses Patientenkollektiv zeigte auch eine höhere Expression an NQO1 als gesunde Probanden. Nicht signifikant war der Vergleich der Patienten vor HD mit den gesunden Kontrollen. Dass die NQO1 durch oxidativen Stress induziert wird, wurde schon von mehreren Gruppen berichtet [Siegel et al., 2004; Lyakhovic et al., 2006; Ross et al., 2000]. Lyn-Cook et al. weisen darauf hin, dass ein NF-KB response Element, was die Induktion von Proteinen der akuten Phase steuert, auch an der Enzyminduktion beteiligt ist [Lyn-Cook et al., 2006]. Die hier vorliegenden Ergebnisse indizieren, dass die NQO1 Expression mit dem Grad der Niereninsuffizienz steigt. Dass niereninsuffiziente Patienten ohne Blutreinigungsverfahren einem höheren Maß an oxidativem Stress ausgesetzt sind als gesunde Personen, ist in vielen Studien anhand gesteigerter Biomarker von oxidativem Stress bei diesen Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden gezeigt worden [Witko-Sarsat et al., 1996; Himmelfarb et al., 2002]. Die vorliegende Arbeit zeigt auch, dass chronisch niereninsuffiziente Patienten ohne Nierenersatztherapie eine höhere Expression von NQO1 haben als gesunde. Verschiedene Gruppen haben gezeigt, dass mit steigendem Grad der Niereninsuffizienz der oxidative Stress steigt. Zum Beispiel zeigen Karamouzis et al. eine progressive Zunahme an F_2 -Isoprotanen, eines der zuverlässigsten Marker des oxidativen Stress, mit steigendem Grad der Niereninsuffizienz. Dounousi et al. bestätigen eine Zunahme des oxidativem Stress mit der Progression des Nierenversagens [Karamouzis, 2008; Dounousi, 2006].

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit zeigen, im Einklang mit ähnlichen Untersuchungen, dass oxidativer Stress eine entscheidende Rolle bei der Expression von NQO1 hat, und weisen zusätzlich darauf hin, dass der Grad der Expression von NQO1 von dem Grad des oxidativen Stress abhängt.

Interessanterweise konnten Zhu et al. zeigen, dass die Inkubation von Tubuluszellen mit steigender Konzentration von 1,2-dithiol-3-thione (D3T, einer Gruppe von Thiosulfatabkömmlingen) denen aufgrund ihrer Fähigkeit, die Expression von Phase II -

und antioxidativen Enzymen zu induzieren, chemotherapeutische und chemoprotektive Eigenschaften zugeschrieben werden, zu einer stufenweise Erhöhung von NQO1 führt. Des Weiteren konnte eine dosisabhängige Zunahme der NQO1 Expression durch Ascorbinsäure gezeigt werden. Ascorbinsäure kann auch eine prooxidative Wirkung haben [Elbekai et al., 2006; Rietjens et al., 2002]. Diese hohe Induzierbarkeit der NQO1 Expression unterstreicht die Wichtigkeit dieses Enzyms bei der Abwehr gegen ROS [Zhu et al., 2008]. Die Relevanz von NQO1 als Radikalfänger wird der von SOD untergeordnet, da die Reaktionsrate mit dem Superoxidradikal weit unter der von SOD liegt. Es muss jedoch bedacht werden, dass die Signifikanz dieses Enzyms als Radikalfänger nicht allein von der Reaktionsrate, sondern auch von ihrer zellulären Konzentration abhängig ist. Hohe Konzentrationen dieses Enzyms könnten die langsamere Reaktionsrate mit dem Superoxidradikal kompensieren [Siegel et al., 2004]. Van Horssen et al. konnten eine erhöhte NQO1 Expression in Makrophagen und in aktiven und chronisch aktiven demyelinisierten MS Läsionen zeigen, was möglicherweise durch die ROS Produktion der Makrophagen induziert wird und als protektiver Mechanismus gegen ROS-verursachte Zelltoxizität gesehen wird [van Horssen et al., 2006].

Allerdings zeigen die hier vorliegenden Ergebnisse auch, dass Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ohne Nierenersatztherapie eine höhere Expression an NQO1 haben als Patienten vor der HD und dass es keinen Unterschied zwischen der Expression dieses Enzyms bei Patienten vor HD und gesunden Kontrollen gibt. Witko-Sarsat et al. haben gezeigt, dass HD Patienten viel höhere Biomarker des oxidativen Stress aufweisen als niereninsuffiziente Patienten ohne HD und gesunde Kontrollen [Witko-Sarsat et al., 1996]. Es wäre also zu erwarten, dass die HD Patienten, die, den verschiedenen Autoren zufolge, den höchsten Maß an oxidativem Stress unterliegen, eine höhere NQO1 Expression haben.

Somit kann die NQO1 Induktion nicht nur vom Ausmaß des oxidativen Stress abhängen. Gegenläufig sind Urämie abhängige Mechanismen denkbar. Als Beispiel geht die Urämie mit erhöhten Plasma Glyoxal Konzentrationen einher. Glyoxal ist ein hoch reaktives α -Dicarbonyl Intermediate, was unter oxidativem Stress entsteht. Glyoxal ist in der Lage, Seitenketten von Proteinen zu modifizieren, und dadurch die Funktion dieser zu beeinträchtigen bzw. zu deaktivieren [Jabeen et al., 2006]. Möglicherweise ist die

Beeinträchtigung der NQO1 durch Glyoxal oder ähnliche Urämietoxine bei Dialysepatienten für eine verminderte Expression dieses Proteins verantwortlich. Möglich wäre auch eine oxidative Zerstörung von NQO1 durch das höhere Maß an oxidativen Stress bei diesen Patienten. Das komplexe Zusammenwirken vieler Faktoren bei der Expression von Antioxidantien wird an diesem Beispiel deutlich. Ross et al. berichten 2000, dass die NQO1 eine zwiespältige Rolle in Betracht auf ROS spielen kann: NQO1 reduziert Quinone zu Hydroquinonen und umgeht damit die Bildung potentiell toxischer Semiquinone. Allerdings sind nicht alle Hydroquinone redox-stabil. Redox-labile Hydroquinone können mit molekularem Sauerstoff reagieren und Semiquinone, die ROS bilden, entstehen lassen.

4.5 Die Expression des Proteins IGFBP1 bei niereninsuffizienten Patienten mit und ohne Nierenersatztherapie und gesunden Probanden

Das IGFBP1 ist nicht an der antioxidativen Abwehr beteiligt, sondern kann als oxidierendes Protein angesehen werden. Es ist das erste in einer Familie von sechs IGFBPs und regelt die freie IGF1 Konzentration. Somit moduliert IGFBP1 viele physiologische Effekte von IGF, unter anderem Zellwachstum, -lebenszeit, -proliferation, -differenzierung, -motilität und -glukoseaufnahme. Die IGFBP1 Produktion wird beim Menschen durch Sepsis und inflammatorische Stimuli hochreguliert [Rutkute et al., 2007]. Unter normalen Umständen inhibiert Insulin die Transkription von IGFBP1. Überschüssiges IGFBP1 trägt unter inflammatorischen Bedingungen zur Aufrechterhaltung des inflammatorischen, katabolischen Zustandes selber bei, indem es der anabolen Funktion des IGF-1 entgegen wirkt [Rutkute et al., 2007]. Verschiedene Studien zeigen, dass oxidativer Stress / ROS eine direkte Rolle in der Hochregulation der Produktion von IGFBP1 spielt. Freies IGF-1 wirkt protektiv gegen oxidativen Stress und Apoptose, welche durch hohe Konzentrationen von Glucose in mesangialen Zellen induziert wird [Rabkin et al., 2004]. IGFBP1 wirkt dem entgegen und unterhält somit oxidativen Stress.

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass sich die IGFBP1 Expression im Verlauf der Dialysebehandlung nicht verändert.

Beim Vergleich zwischen den Dialysepatienten zu Beginn der Hämodialyse mit den chronisch niereninsuffizienten Patienten ohne Nierenersatztherapie offenbarte sich bei

letzteren eine signifikant vermehrte Expression von IGFBP1. Dieses Ergebnis wird von Powell et al. bestätigt, die von erhöhtem IGFBP1 im Serum chronisch niereninsuffizienter Patienten berichten. Sie berichten auch von einer inversen Korrelation zwischen der GFR und dem Serumspiegel von IGFBP1, was suggeriert, dass eine verminderte GFR zu erhöhten Spiegeln von IGFBP1 führt [Powell et al., 2000]. In der hier vorliegenden Arbeit zeigte der Vergleich zwischen den einzelnen Stadien der Niereninsuffizienz mit den Patienten vor der Hämodialyse jedoch nur eine signifikante Erhöhung der IGFBP1 Expression im Stadium 5 der Niereninsuffizienz, was trotzdem mit dem Ergebnis von Powell übereinstimmt.

Auch der Vergleich zwischen allen CNI Patienten und den gesunden Probanden zeigte eine erhöhte Produktion der IGFBP1 Expression bei den chronisch niereninsuffizienten Patienten.

Patel et al. konnten zeigen, dass H_2O_2 die inhibierende Wirkung von Insulin auf die IGFBP1 Expression blockiert. Lang et al. bestätigen dies und berichten von weiteren ROS, die die IGFBP1 Expression erhöhen [Patel et al, 2002; Lang et al., 1999]. Somit scheint oxidativer Stress eine regulierende Rolle bei der IGFBP1 Expression zu spielen.

4.6 Die antioxidative Gesamtkapazität des Plasmas bei niereninsuffizienten Patienten mit und ohne Nierenersatztherapie und gesunden Probanden

Der menschliche Organismus verfügt nicht nur über enzymatische, sondern auch über nicht enzymatische Antioxidantien. Diese umfassen eine Reihe von wasserlöslichen Antioxidantien und an Lipide bzw. an Lipoprotein gebundene lipidlösliche Antioxidantien, z. B. Glutathion, Harnsäure, Albumin, Cystein, Vitamin C, Tocopherol, Ubichinon und eine Gruppe verschiedener hämbindender Proteine wie z.B. Haptoglobin und Hämopexin. Als Radikalfänger kommen verschiedene Plasmakomponenten in Betracht, wovon die wichtigsten Vitamin C, Vitamin E, Harnsäure und Protein-SH-Gruppen sind. Die hier vorliegende Arbeit hat untersucht, wie sich die antioxidative Gesamtkapazität des Plasmas von Hämodialysepatienten, chronisch niereninsuffizienten Patienten ohne Nierenersatztherapie und gesunden Probanden verhält.

Es konnte gezeigt werden, dass die antioxidative Gesamtkapazität des Plasmas im Verlauf der vierstündigen Hämodialyse signifikant abnimmt. Es zeigte sich eine geringere antioxidative Kapazität bei Patienten im Stadium 1-2 der chronischen

Niereninsuffizienz und bei gesunden Kontrollen, verglichen mit Patienten zu Beginn der Hämodialyse.

Patienten am Ende der Hämodialyse weisen im Vergleich zu allen CNI Patienten ein niedrigeres antioxidatives Fassungsvermögen auf, auch im Vergleich zu hohen Stadien der Niereninsuffizienz. Im Vergleich zu gesunden Probanden wiesen die Patienten am Ende der HD weniger Antioxidantien im Plasma auf.

Vergleicht man den Gehalt der Antioxidantien im Plasma von gesunden Menschen mit Patienten vor und nach der HD, so wiesen erstere einen höheren, letztere einen geringeren Gehalt an Antioxidantien im Plasma auf. Beim Vergleich mit Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ohne Nierenersatztherapie zeigen nur Patienten im Stadium 5 einen signifikant höheren Gehalt der Plasmaantioxidantien im Vergleich zu Gesunden.

In der Literatur findet man Ergebnisse, die mit meinen übereinstimmen. So berichten Clermont et al. von einer tiefen Störung des extrazellulären Redoxsystems im Verlauf der chronischen Niereninsuffizienz mit und ohne Hämodialyse [Clermont et al., 2000]. Ujhelyi et al. berichten, dass die hohe Radikalfängerkapazität des Plasmas von HD Patienten vor der HD mit hohen Harnsäurespiegeln verbunden ist. Sie berichten von einer signifikanten Abnahme der totalen antioxidativen Kapazität des Plasmas nach der Hämodialyse, und von dem erhöhten antioxidativen Effekt vom Plasmultrafiltrat von chronisch niereninsuffizienten Patienten ohne HD auf die oxidative Modifikation von LDL im Vergleich zu gesunden Kontrollen [Ujhelyi et al., 2006]. Harnsäure entsteht bei der Oxidation von Hypoxanthin und Xanthin aus dem Abbau von Nukleinsäuren und ist der wichtigste wasserlösliche Radikalfänger des Blutplasmas, wobei seine antioxidative Wirkung in der direkten Aufnahme der überzähligen Elektronen und damit der Oxidation zu Allantoin beruht. Sie hemmt effektiv die Lipidperoxidation durch Inaktivierung der Peroxylradikale, fängt Superoxid, Hydroxylradikale und Hypochlorsäure. Zusätzlich bildet Harnsäure Komplexe mit Kupfer- und Eisenionen, dies hemmt die Fenton-Reaktion sowie die Eisen-katalysierten Oxidationsvorgänge durch Vitamin C. Die Dialysebehandlung führt durch die Reinigung des Blutes von Harnsäure zum Verlust einer wichtigen wasserlöslichen antioxidativen Komponente des Blutplasmas. Allerdings muss erwähnt werden, dass erhöhte Harnsäurespiegel keinen adäquaten antioxidativen Schutz bieten können, wenn es Defizite in anderen antioxidativen Systemen gibt, insbesondere bei Vitamin C Defiziten. Es konnte gezeigt werden, dass nach der

Entfernung von Harnsäure (durch Urikase), 30% der antioxidativen Kapazität des Plasmas erhalten bleibt. Dies suggeriert das Vorhandensein weiterer wichtiger Antioxidantien im Plasma [Ujhelyi et al., 2006].

Der Verlust vom wasserlöslichen Vitamin C über die Dialysemembran trägt auch zur verminderten antioxidativen Gesamtkapazität des Plasmas bei. Vitamin C ist das wichtigste nutritive wasserlösliche Antioxidans. Es wirkt antioxidativ auf Hydroxylradikale, Wasserstoffperoxid und Hypochlorsäure, indem es mit ihnen reagiert und selbst zu einem kaum schädlichen Ascorbylradikal wird. Es wirkt außerdem indirekt antioxidativ indem es oxidiertes Vitamin E reaktiviert. Morena et al konnten zeigen, dass ca. 66mg Vitamin C pro Dialysesitzung verloren gehen [Morena et al 2005].

Auch Bilirubin wirkt antioxidativ und wird durch die Dialyse entfernt.

Die verminderte antioxidative Kapazität des Plasmas nach der Hämodialyse beruht nach Ujhelyi et al. auf dem intradialytischen Verlust von Vitamin C, Harnsäure, 3-indoxyl-sulfat indoxyl- β -D-Glucuronid, p-Crestol und Phenol [Ujhelyi et al., 2006]. So ist es verständlich, dass die gesunden Kontrollen, deren Plasma diese Substanzen (aufgrund ihrer intakten Nierenfunktion) im Blut nicht im Überschuss haben, ein vermindertes antioxidatives Fassungsvermögen haben als Hämodialysepatienten und chronisch niereninsuffiziente Patienten ohne Nierenersatztherapie, und dass Patienten, die diese überschüssigen Substanzen durch die Hämodialyse entfernt bekommen, an antioxidativer Kapazität verlieren. Zusätzlich zu der Entfernung wichtiger Schutzmechanismen führt die mit der Hämodialyse assoziierten Inflammation und die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten zu einer Produktion von freien Radikalen, die durch Ausschöpfung noch vorhandener Antioxidantien den oxidativen Stress erhöhen.

Meine Untersuchungen haben gezeigt, dass die antioxidative Kapazität des Plasmas von Patienten am Ende der HD unter die von gesunden Kontrollen fällt. Dieser drastische Verlust des wichtigen nicht-enzymatischen antioxidativen Schutzsystems kann eine unmittelbare Gefahr für das vaskuläre Endothel darstellen, wodurch diese Zellen oxidativen Schäden durch freie Radikale ausgesetzt sind. Resultat ist eine erhöhte Rate an Lipidperoxidation und Endothelschäden, die zu einem erhöhten Risiko für Atherosklerose und somit zu kardiovaskulären Ereignissen führen.

Die Ergebnisse der Messungen zur totalen antioxidativen Kapazität des Plasmas führen zu dem Schluss, dass es Störungen im nicht-enzymatischen antioxidativen System von niereninsuffizienten Patienten gibt, mit und ohne HD-Therapie.

5.0 Zusammenfassung

Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz haben trotz ständig verbesserter Nierenersatztherapieverfahren eine verminderte Überlebenschance gegenüber der Normalbevölkerung. Eine wesentliche Rolle spielt dafür die Erhöhung von oxidativem Stress bei diesen Patienten.

Die hier vorliegende Arbeit hat die Expression verschiedener Enzyme des oxidativen Stress und der antioxidativen Abwehr bei Hämodialysepatienten und zweier Kontrollgruppen, bestehend aus Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ohne Nierenersatztherapie und gesunden Probanden, untersucht. Ziel war es, herauszufinden inwieweit die Niereninsuffizienz Auswirkungen auf den oxidativen Stress und die Expression von Proteinen des oxidativen Angriffs (Insulin-like Growth Factor Binding Protein 1, IGFBP1) und der antioxidativen Abwehr (Superoxiddismutase 1 und 2, SOD1 und 2; Glutathionperoxidase, GPx; und die NAD(P)H:quinone oxido-reduktase 1, NQO1) hat.

Die Expression dieser Proteine wurde in Monozyten von Kontrollpersonen und von Patienten vor und nach einer Hämodialysetherapie mit einem In-cell-Western Assay quantifiziert. Darüber hinaus wurde die antioxidative Gesamtkapazität des Plasmas mit einem Total Antioxidant Status Kit gemessen.

Die SOD1 Expression war bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz signifikant höher als bei gesunden Probanden ($34,5 \pm 22,6$ vs. $20,7 \pm 14,5$ arbiträre Einheiten; Mittelwert \pm SEM; $p < 0,05$). Im Verlauf einer Hämodialysebehandlung kam es zu einer signifikanten Verminderung der SOD1 um 46% (von $39,9 \pm 64,9$ auf $18,4 \pm 10,4$; $n=20$; $p < 0,01$). Es ergab sich bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ein signifikant inverser Zusammenhang zwischen der SOD1 Expression und dem C-reaktiven Protein (Korrelation nach Spearman $r_s = -0,44$; $p < 0,05$, $n=25$). Dies weist darauf hin, dass eine chronische Entzündungsreaktion zu einer Verminderung der antioxidativen Proteine führt.

Die SOD2 Expression war bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz signifikant geringer als bei gesunden Probanden ($56,8 \pm 37,6$ vs. $94,7 \pm 70,6$ arbiträre Einheiten; $p < 0,05$).

Die GPx Expression war nicht signifikant unterschiedlich bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz und gesunden Probanden.

Schließlich war die NQO1 Expression signifikant größer bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz im Vergleich mit gesunden Probanden ($7,6 \pm 4,9$ vs. $4,4 \pm 3,0$ arbiträre Einheiten; $p < 0,05$).

Das „oxidative“ Protein IGFBP1 war signifikant stärker exprimiert bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz im Vergleich zu gesunden Probanden ($11,3 \pm 6,6$ vs. $7,3 \pm 4,6$ arbiträre Einheiten; $p < 0,05$), was für den gesteigerten oxidativen Stress ursächlich mitverantwortlich sein kann.

Schließlich zeigte sich, dass die antioxidative Kapazität im Plasma unter einer Hämodialysetherapie signifikant abnahm (0.81 ± 0.26 mM vs. 0.59 ± 0.24 mM).

Die vorliegende Untersuchung zeigt, dass bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz eine Reihe von Veränderungen der Expression von antioxidativen und oxidativen Proteinen auftreten. Diese Veränderungen spielen in ihrer Gesamtheit eine wesentliche Rolle bei dem gesteigerten oxidativen Stress bei chronischer Niereninsuffizienz.

6.0 Literaturverzeichnis

- 1 Akiyama S, Inagaki M, Tsuji M et al. mRNA Study on Cu/Zn Superoxid Dismutase Induction by Hemodialysis Treatment. *Nephron Clin Pract.* 2005;99:107-114
- 2 Annuk M et al. Endothelial function, CRP and oxidative stress in chronic kidney disease. *Journal of Nephrology.* 2005; 18: 721-726
- 3 Barra D, Schinina ME, Simmaco M et al. The primary structure of human liver manganese superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.*1984; 259: 12595-12601
- 4 Becker BN, Himmelfarb J, Henrich WL, Hakim RM. Reassessing the cardiac risk profile in chronic hemodialysis patients: a hypothesis on the role of oxidant stress and other non-traditional cardiac risk factors. *J Am Soc Nephrol.* 1997;8:475-486
- 5 Behne D, Kyriakopoulos A. A hypothesis on the catalytic mechanism of the selenoenzyme thioredoxin reductase. *Journal of Biochemistry.*1998; 332: 591-592
- 6 Bericht über Dialysebehandlung und Nierentransplantation in Deutschland 2006, QuaSiNiere, July 2006.
- 7 Bieger WP. Oxidativer Stress und Alter: eine aktuelle Übersicht. *Der Urologe.* 2001; 41:344-350
- 8 Bogye G, Tompas G, Alfthan G. Selenium Depletion in Hemodialysis Patients Treated with Polysulfane Membranes. *Nephron.* 2000;84:119-123
- 9 Cai H, Harrison D.G. Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases: The Role of Oxidant Stress. *Circulation Research.* 2000; 87: 840-844
- 10 Christen P, Jaussi R. *Biochemie.* Springer Verlag. 4te Auflage, 2005.
- 11 Clermont G, Lecour S, Lahet JJ et al. Alteration in plasma antioxidant capacities in chronic renal failure and hemodialysis patients: a possible explanation for the increased cardiovascular risk in these patients. *Cardiovascular Research.* 2000;47:618-623

- 12 Descamps-Latscha B, Druecke T, Witko-Sarsat V. Dialysis induced oxidative Stress: Biological Aspects, Clinical Consequences, and Therapy. *Seminars in Dialysis*. 2001; 14: 193-199
- 13 Dissemond J. Bedeutung von Sauerstoff in der Genese und Therapie chronischer Wunden. *Hartman Wundforum*. 2001; 2: 16-19
- 14 Dounousi E, Papavasiliou E, Makedou A et al. Oxidative stress is progressively enhanced with advancing stages of CKD. *American Journal of Kidney Disease*. 2006;48(5):752-760
- 15 Draï J, Bannier E, Chazot C et al. Oxidants and antioxidants in long term hemodialysis patients. *Il Farmaco*. 56;2001:463-465
- 16 Elbekai RH, Duke J, El-Kadi AOS. Ascorbic acid differentially modulates the induction of heme oxygenase-1, NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 and glutathione S-transferase Ya by As^{3+} Cd^{2+} and Cr^{6+} . *Cancer Letters*. 2006;xx:1-9
- 17 Flohé L. Die Glutathionperoxidase: Enzymologie und biologische Aspekte. *Klinische Wochenschrift*. 1971; 49: 669-683
- 18 Fridlyand L.E, Philipson L.H. Reaktive species and early manifestation of insulin resistance in type II diabetes. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2006; 8: 136-145
- 19 Galle J, Wanner C. Oxidativer Stress, Inflammation und Atherosklerose. In: Hörl WH, Wanner C, eds. *Dialyseverfahren in Klinik und Praxis Technik und Klinik*. 6te Auflage. Stuttgart, Deutschland: Thieme Verlag. 2004: 402-407
- 20 Galle J, Seibold S, Wanner C. Inflammation in Uremic Patients: What is the Link. *Kidney Blood Pressure Research*. 2003; 26:65-75
- 21 Galle J. Atherosklerose und Arteriitis: die inflammatorische Hypothese: Konsequenzen für die Therapie von kardiovaskulären Erkrankungen. *Herz*. Urban und Vogel, 2004; 1
- 22 Gordan C.A, Himmelfarb J. Antioxidant Therapy in Uremia: Evidence Based Medicine? *Seminars in Dialysis*. 2004;17:327-332
- 23 Gosslau A, Rensing L. Oxidativer Stress, altersabhängige Zellschädigungen und antioxidative Mechanismen. *Zeitschrift für Gerontologie und Geriatrie*. 2002; 35: 139-150

- 24 Halliwell B, Gutteridge J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford Univ. Press. 2000; 3
- 25 Halliwell B, Gutteridge J.M.C. The Antioxidants of Human Extracellular Fluids. Archives of Biochemistry and Biophysics.1990; 280:1-8
- 26 Halliwell B, Gutteridge MC. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press Inc. New York. 2007. 4
- 27 Himmelfarb et al. The elephant in uremia: Oxidant stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia. Kidney International. 2002; 62: 1524-1538.
- 28 Hörl WH, Wanner C. Urämietoxine. In: Hörl WH, Wanner C eds. Dialyseverfahren in Klinik und Praxis Technik und Klinik. 6te Auflage. Stuttgart, Deutschland:Thieme Verlag. 2004; 397-401
- 29 Jabeen R, Saleemuddin M, Petersen J, Mohammad A. Inactivation and modification of superoxide dismutase by glyoxal: Prevention by Antibodies. Biochimie. 2007;89:311-318
- 30 Jackson P, Loughrey CM, Lightbody J, McNamee PT, Young IS. Effect of Hemodialysis on Total Antioxidant Capacity and Serum Antioxidants in Patients with Chronic Renal Failure. Clinical Chemistry. 1995; 41(8):1135-1138
- 31 Karamouzis I, Sarafidis PA, Karamouzis M et al. Increase in Oxidative Stress but Not in Antioxidant Capacity ith Advancing Stages of Chronic Kidney Disease. American Journal of Nephrology. 2008;28:397-404
- 32 Kelly M, Lacour B, Nguyen-Khoa T. Dysregulation of Superoxide Dismutase in Chronic Kidney Disease. Nephron Clinical Practice. 2005;100:103-104
- 33 Koenig JS, Fischer M, Bulant E, Tiran B, Elmadfa I, Druml W. Antioxidant status in patients on chronic hemodialysis therapy: Impact of perenteral selenium supplementation. Wien Klinische Wochenzeitschrift. 1997;109(1):13-19
- 34 Lahera V, Goicoechea M, Garcia de Vinuesa S et al. Oxidative Stress in Uremia:The Role of Anemia Correction. American Society of Nephrology. 2006; 17:174-177.

- 35 Lang C H, Nystrom G J, Frost R A. Regulation of IGF binding Protein-1 in Hep G2 cells by cytokines and reactive oxygen species. *American Physiological Society*. 1999; 276: 719-727
- 36 Levine SA and Kidd PM. Antioxidant adaptation. Its role in free radical pathology. San Leandro, California. Eds A. Biocurrents division, Allergy Research Group, 1996.
- 37 Locatelli F, Canaud B, Eckardt K et al. Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2003;18:1272-1280
- 38 Löffler, Petrides: *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer Verlag, 7 Auflage, 2003
- 39 Lyakhovich VV, Vavilin VA, Zenkov NK, Menschikova EB. Active Defence under Oxidative Stress: The Antioxidant Response Element. *Biochemistry (Moscow)*. 2006; 71: 962-974
- 40 Lyn-Cook BD, Yan-Sanders Y, Moore S et al. Increased levels of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 in pancreatic tissues from smokers and pancreatic adenocarcinomas: A potential biomarker of early damage in the pancreas. *Cell Biol Toxicol*. 2006;22:73-80
- 41 Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative Stress and Vascular Disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 2005; 25:29-38
- 42 Mahajan SK, Prasad AS, Rabbani P, Briggs WA, McDonald FD. Zinc deficiency: a reversible complication of uremia. *American Journal of Clinical Nutrition*. 1982;36:1177-1183
- 43 Manning R, Tian N, Meng S. Oxidative Stress and Antioxidant Treatment in Hypertension and the Associated Renal Damage. *American Journal of Nephrology*. 2005; 25: 311-317
- 44 Maróti Z, Németh I, Sándor T et al. Heme oxygenase 1 expression in young uremic patients on hemodialysis. *Pediatric Nephrology*. 2004; 19: 426-431
- 45 Matkovics B, László A, Varga SI, Gál G, Solymosi T. Changes and Correlations of Antioxidant Enzymes, Lipid Peroxidation and Serum Neutral Lipids Due to Haemodialysis Treatment in Chronic Uraemic

- Patients. *International Urology and Nephrology*.1988;20(5): 559-564
- 46 McCord J M, Fridovich I. Superoxide dismutases: an enzymatic function for erythrocyte superoxide dismutase (hemocuprein). *J Biol Chem*. 1969; 244: 6049-6055
- 47 Mena P, Maynar M, Gutierrez JM et al. Erythrocyte free radical scavenger enzymes in bicycle professional racers. Adaptation to training. *Int J Sports Med* 12:563-566, 1991.
- 48 Mendez JI, Nicholson J, Taylor R. SOD Isoforms and Signaling in Blood Vessels: Evidence for the Importance of ROS Compartmentalization. *Arterioscler, Throm. Vasc. Biol*. 2005; 25:887-888
- 49 Mendiratta S, Qu ZC, May JM. Enzyme-Dependent Ascorbate Recycling in Human Erythrocytes: Role of Thioredoxin Reductase. *Free Radical Biology and Medicine*. 1998; 25(2): 221-228.
- 50 Morena M, Delbosc S, Dupay AM, et al. Overproduction of reactive oxygen species in end stage renal disease patients: a potential component of hemodialysis associated inflammation. *Hemodialysis International*. 2005; 9:37-46.
- 51 Morena M., Cristol JP., Canaud B. Why Hemodialysis Patients are in a Prooxidant State? What Could be done to Correct the Pro/Antioxidant Imbalance. *Blood Purification*. 2000; 18: 191-199
- 52 Müller-Esterl W. *Biochemie; Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler*. Elsevier GmbH. Erste Auflage 2004
- 53 Nguyen-Khoa T, Massy ZA, De Bandt JP et al. Oxidative stress and haemodialysis: role of inflammation and duration of dialysis treatment. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*. 2001;16:335-340
- 54 Niess A.M, Fehrenbach E, Northoff H. Dickhuth H.-H. Freie Radikale und oxidativer Stress bei körperlicher Belastung und Trainingsanpassung – eine aktuelle Übersicht. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin* 2002; 53: 345-352
- 55 Nioi P, Hayes J D. Contribution of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 to protection against carcinogenesis, and regulation of its gene by the Nrf2 basic-region leucine zipper and the arylhydrocarbon receptor basic helix-loop-helix transcription factors. *Mutation Research*. 2004; 555: 149-171

- 56 Nohl, H. Physiologie und Pathophysiologie der Superoxidradikale. Klinische Wochenschrift. 1981; 59: 1081-1091
- 57 Odland B, Appelgren LE, Bayati A, Wolgast M. Tissue distribution of 125I-labelled bovine superoxide dismutase (SOD) in the rat. Pharmacology and Toxicology. 1998;62:5-100
- 58 Ozben T, Dursen E, Süleymanlar G, Dursen B, Yakupoglu G. Effect of Hemodialysis on Oxidant Stress and Antioxidants. Clin Chem Lab Med. 2002; 40(10):1009-1013
- 59 Park EY, Rho HM. The transcriptional activation of the human copper/zinc superoxide dismutase gene by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin through two different regulator sites, the antioxidant responsive element and xenobiotic responsive element. Molecular and Cellular Biochemistry. 2002;24:47-55
- 60 Pawlak K, Pawlak D, Mysliwiec M. Possible New Role of Monocyte Chemoattractant Protein-1 in Hemodialysis Patients with Cardiovascular Disease. American Journal of Nephrology. 2004;24:635-640
- 61 Powell DR, Liu F, Baker BK et al. Effect of chronic renal failure and growth hormone therapy on the insulin-like growth factors and their binding proteins. Pediatr Nephrol. 2000; 14:579-583
- 62 Powell, DR. Effect of chronic renal failure and growth hormone therapy on the insulin-like growth factors and their binding proteins. Pediatric Nephrology. 2000; 14:579-583
- 63 Quehenberger O. Molecular mechanisms regulating monocyte recruitment in atherosclerosis. J Lipid Res. 2005; 46: 1582-1590
- 64 Rabkin R, Schaefer F. New concepts: growth hormone, insulin like growth factor-I and the kidney. Growth Hormone & IGF Research. 2004; 14: 270-276.
- 65 Rietjens I, Boersma MG, de Haan L et al. The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids. Environmental Toxicology and Pharmacology. 2002;11:321-333

- 66 Rister M, Bauermeister K. Superoxid-dismutase und Superoxid-Radikal-Freisetzung bei juveniler rheumatoider Arthritis. *Klinische Wochenschrift*. 1982; 60: 561-565
- 67 Ross D, Kepa JK, Winski SL et al. NAD(P)H:quinone oxidoreduktase 1(NQO1): chemoprotection, bioactivation, gene regulation and genetic polymorphisms. *Chemico- Biological Interactions*. 2000; 129: 77-97
- 68 Rutkute K, Nikolova-Karakashian M.N. Regulation of insulin-like growth factor binding protein-1 expression during aging. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007; 361: 263-269
- 69 Scandalios, J G. Oxygen Stress and Superoxide Dismutases. *Plant Physiology*. 1993; 101: 7-12
- 70 Schettler V, Wieland E, Methe H, Schuff-Werner P, Müller GA. Oxidative Stress during Dialysis: effect on free radical scavenging enzyme (FRSE) activities and glutathione (GSH) concentration in granulocytes. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*. 1998; 13:2588-2593
- 71 Sela S, Shurtz-Swirski R, Cohen-Mazor M et al. Primed Peripheral Polymorphonuclear Leukocyte: A Culprit Underlying Chronic Low-Grade Inflammation and Systemic Oxidative Stress in Chronic Kidney Disease. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2005;16: 2431-2438
- 72 Siegel D, Gustavsen DL, Dehn DL et al. NAD(P)H:quinone oxidoreduktase 1(NQO1):Role as Superoxide Scavenger. *Molecular Pharmacology*. 2004; 65:1238-1247
- 73 Siems W, Carluccio F, Radencovic S, Grüne T, Hampl H. Oxidative Stress in Renal Anemia of Hemodialysis Patients is Mitigated by Epoetin Treatment. *Kidney Blood Pressure Research*. 2005;28:295-301
- 74 Sies H. Oxidative Stress. From Basic Research to Clinical Application. *American Journal of Medicine*. 1991; 3c: 31-38
- 75 Sies H. Zur Biochemie der Thiolgruppe: Bedeutung des Glutathions. *Naturwissenschaften*. 1989; 76: 57-64
- 76 Spittel MA, Hoenich NA, Handelman GJ, Adhikarla R, Homel P, Levin NW. Oxidative stress and inflammation in hemodialysis patients. *American Journal of Kidney Disease*. 2001;38:1408-1413

- 77 Srinivasa Rao PVLN, Dakshinamurty KV, Saibaba KSS et al. Oxidative stress in haemodialysis: immediate changes caused by passage of blood through the dialyser. *Ann Clin Biochem.* 2001; 38:401-405
- 78 Stephens RH, McElduff P, Heald AH et al. Polymorphisms in IGF-Binding Protein 1 Are Associated With Impaired Renal Function in Type 2 Diabetes. *Diabetes.* 2005; 54:3547-3553
- 79 Talalay P, Dinkova-Kostova A.T. Role of Nicotinamid Quinone Oxidoreductase 1 (NQO1) in Protection against Toxicity of Electrophiles and Reactive Oxygen Intermediates. *Methods in Enzymology.* 2004. 382: 355-364.
- 80 Tepel M, Echelmeyer M, Orié N, Zidek W. Increased intracellular reactive oxygen species in patients with end stage renal failure: Effect of hemodialysis. *Kidney International.* 2000;58: 867-872
- 81 Tepel M, van der Giet M, Zidek W. Antioxidative Therapie bei Gefäß- und Nierenerkrankungen. *Medizinische Klinik.* 2002;97:144-151
- 82 Tepel M. Oxidative Stress: does it play a role in the genesis of essential hypertension and hypertension of uraemia? *Nephrol Dial Transplant.* 2003; 18: 1439-1442
- 83 Tonbul HZ, Demir M, Lütfullah A, Yeter E, Süleyman T, Alaattin Y. Malnutrition- Inflammation-Artherosclerosis (MIA) Syndrom Components in Hemodialysis and Peritoneal Dialysis Patients. *Renal Failure.* 2006; 28:287-294
- 84 Torzewski M, Ochsenhirt V, Kleshov AL et al. Deficiency of GPx-1 Accelerates the Progression of Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Atheroscler Thromb Vasc Biol.* 2007; 27:850-857
- 85 Ujhelyi L, Balla G, Jeney V et al. Hemodialysis reduces inhibitory effect of plasma ultrafiltrate on LDL oxidation and subsequent endothelial reactions. *International Society of Nephrology.* 2006;69:144-151
- 86 Van der Giet M, Zidek W. Dialyse und Hypertonie. *Deutsche Medizinische Wochenschrift.* 2006; 131: 2605-2609.
- 87 Wali R.K. Oxidant Stress in End-Stage Renal Disease. *Principals and Practise of Dialysis.* Lippencott Williams & Wilkins, Third Edition 2004; 296-306

- 88 Ward R, McLeish K. Oxidant Stress in Hemodialysis Patients: What are the Determining Factors? *Artificial Organs*. 2003;27(3):230-236
- 89 Wardel E.N. Cellular Oxidative Processes in Relation to Renal Disease. *American Journal of Nephrology*. 2005;25:13-22
- 90 Wiswedel I, Hirsch D, Carluccio F et al. F2-Isoprostanes as biomarkers of lipid peroxidation in patients with chronic renal failure. *BioFactors* 2005; 24: 201-208
- 91 Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillè-Blandin et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney International*. 1996; 49: 1304-1313
- 92 Witko-Sarsat V, Gausson V, Deschamps-Latscha B. Are advanced oxidation protein products potential uremic toxins? *Kidney International*. 2003; 63:11-14
- 93 Yeun JY, Kaysen GA. C-reactive protein, oxidative stress, homocystein and troponin as inflammatory and metabolic predictors of atherosclerosis in ESRD. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*. 2000;9:621-630
- 94 Yilmaz MI, Saglam M, Caglar K et al. The determinants of endothelial dysfunction in CKD: oxidative stress and asymmetric dimethylarginine. *American Journal of Kidney Disease*. 2006; 47: 42-50
- 95 Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide Dismutase Multigene Family: A Comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and the EC-SOD (SOD3) Gene Structures, Evolution and Expression. *Free Radical Biology & Medicine*. 2002; 33: 337-349
- 96 Zima T, Mestek O, Nemecek K et al. Trace Elements in Hemodialysis and Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis Patients. *Blood Purification* 1998;16:253-260

7.0 Danksagungen

An erster Stelle Danke ich Herrn Professor Dr. Martin Tepel für die Möglichkeit, dieses Thema zu bearbeiten.

Weiterhin gilt meinen Dank Fr. Dr. Alexandra Scholze, die mit Ihrer geduldigen Betreuung und hilfreichen Hinweisen mir einen tieferen Einblick in die Thematik ermöglichte.

Katharina Krueger danke ich für die Einführung ins experimentelle Arbeiten.

Anja Jühling danke ich dafür, dass Sie mit mir alle Tücken und Frustrationen des Laboralltags teilte, sodass aus einer Arbeitsgruppenbekanntschaft eine Freundschaft wurde.

Besonderen Dank erhält meine Familie, für Ihre immer währende und liebevolle Unterstützung und die Freunde, die mir in allen Phasen des Schaffens beistanden und so nicht zuletzt auch dazu beitrugen, dass diese Arbeit entstehen konnte.

8.0 Lebenslauf

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

9.0 Selbstständigkeitserklärung

„Ich, Lea Barrie, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:
„Untersuchungen zur Expression von Proteinen des oxidativen Stress und der antioxidativen Abwehr bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift