

Aus der Klinik für Pädiatrie
mit Schwerpunkt Nephrologie
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Oxidativer Stress und Veränderungen der arteriellen Struktur und Funktion
bei jungen Hämodialysepatienten**

Zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Shalah Faraj
aus Al – Salaimaiyah / Irak

Datum der Promotion: 30.05.2015

Inhaltsverzeichnis

1	Abstrakt	6
2	Einleitung	9
2.1	Allgemeine Einleitung	9
2.2	Parameter des Lipidstoffwechsels	9
2.3	Parameter der Lipidoxidation	10
2.4	Parameter der Antioxidation	11
2.5	Arterielle Struktur und Funktion	14
2.6	Zielsetzung der Arbeit	15
2.7	Fragestellung	15
3	Material und Methoden	16
3.1	Patienten	16
3.2	Kontrollen	17
3.3	Labormethoden	17
3.3.1	Blutproben	17
3.3.2	Lipoproteinanalyse mittels Ultrazentrifugation:	17
3.3.3	Apolipoprotein B	21
3.3.4	Konjugierte Diene	22
3.3.5	Oxidierter LDL	24
3.3.6	Verhältnis aus reduziertem und oxidiertem Glutathion (GSH/GSSG)	27
3.3.7	Superoxid-Dismutase	29
3.3.8	Glutathion-Peroxidase	31
3.4	Nichtinvasive Gefäßparameter	34
3.4.1	Messung der Intima-Media-Dicke	34
3.4.2	Plethysmographie	36
3.5	Statistik	38
4	Ergebnisse	39
4.1	Basaldaten der Patienten und Kontrollen	39

4.2	Lipidstoffwechsel und Lipidoxidation.....	40
4.2.1	Triglyzeride und Cholesterin.....	40
4.2.2	Apolipoprotein B (Apo B).....	41
4.2.3	Oxidierter low-density Lipoproteine (LDL).....	42
4.2.4	Konjugierte Diene	43
4.2.5	Verhältnis aus reduziertem und oxidiertem Glutathion (GSH/GSSG)	44
4.2.6	Glutathion-Peroxidase (GPx) und Superoxid-Dismutase (SOD).....	45
4.2.7	Parameter des roten Blutbildes.....	46
4.2.8	Weitere Risikofaktoren	47
4.3	Gefäß-Funktions-Parameter	48
4.3.1	Intima-Media-Dicke (IMT)	48
4.3.2	Venöse Okklusions-Plethysmographie	49
4.4	Zusammenhänge.....	50
4.4.1	Korrelationsanalyse	50
4.4.2	Regressionsanalyse.....	51
5	<i>Diskussion</i>.....	52
5.1	Lipidstoffwechsel und Lipidoxidation.....	52
5.2	Gefäß-Funktions-Parameter	56
6	<i>Zusammenfassung</i>.....	57
7	<i>Literaturverzeichnis</i>.....	58
8	<i>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</i>	63
8.1	Abbildungsverzeichnis	63
8.2	Tabellenverzeichnis	64
9	<i>Eidesstattliche Versicherung</i>	65
10	<i>Lebenslauf</i>	67
11	<i>Publikationen und Präsentationen</i>	69
12	<i>Danksagung</i>.....	70

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Langname
ACI	Aortakalzifikationsindex
AGE	advanced glycation end products
ANOVA	analysis of variance
AOPP	advanced oxidation protein products
ApoB	Apolipoprotein B
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	area under the curve (Fläche unter der Kurve)
CD	konjugierte Diene
CKD	chronic kidney disease (chronische Nierenerkrankung)
CNI	chronische Niereninsuffizienz
CRP	C-reaktives Protein
CVD	cardiovascular disease (kardiovaskuläre Erkrankung)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure bzw. Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay (antikörperbasiertes Nachweisverfahren)
ESRD	end stage renal disease (Endstadium einer chronischen Nierenerkrankung)
FMD	flow-mediated dilatation (fluss-vermittelte Dilatation)
Glc-6-P-Dehydrogenase	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
GPx	Glutathion-Peroxidase
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid
GSSG/GSH	Verhältnis von oxidiertem zu reduziertem Glutathion
Hb	Hämoglobin
Hcy	Homocystein
HD	Hämodialyse
HDL	high-density lipoproteins
HPLC	high-performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
IMT	intima media thickness (Intima-Media-Dicke)
LDL	low-density lipoproteins
Lp(A)	Lipoprotein a

Abkürzung	Langname
mAb-4E6	spezifische monoklonale Antikörper
NaCl	Natriumchlorid
NADPH/H+	reduzierte Form von Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NAPDH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
n.s.	nicht signifikant
OxLDL	oxidized low-density lipoproteins
P	probability (Wahrscheinlichkeit)
PIPF	postischemic peak flow (postischämischer Spitzenfluss)
R1	Tris-Puffer
R2	Anti-Human-Apolipoprotein B-Antikörper
R ²	Bestimmtheitsmaß
ROS	reactive oxygen species
SOD	superoxide dismutase
TAC	totale antioxidative Kapazität
TC	Gesamtcholesterin
TFA	Trifluoressigsäuer
tHcy	totales Serumhomocystein
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
VLDL	very low-density lipoproteins

1 Abstrakt

Einleitung

Patienten mit einer dialysepflichtigen Niereninsuffizienz haben im Vergleich zur gesunden Normalbevölkerung ein deutlich erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen. Diese stellen bei Hämodialysepatienten die Haupttodesursache dar. Insbesondere ist das relative Risiko bei jungen HD-Patienten (Alter 25-34 Jahre) am stärksten erhöht. Es ist anzunehmen, dass die pathologischen Mechanismen, die zu den beobachteten Gefäßveränderungen führen, schon in jungen Jahren einsetzen. Studien bei jungen HD-Patienten, die keine signifikanten Komorbiditäten aufzeigen, könnten das Verständnis für die Entstehung und Entwicklung der vaskulären Veränderungen bei der Urämie verbessern.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Ausmaß der oxidativen Veränderungen der Lipide und Lipoproteine bei Hämodialysepatienten in jungem Erwachsenenalter und ein möglicher Zusammenhang dieser Veränderungen mit Markern der morphologischen und funktionellen Gefäßveränderungen untersucht. Dabei wurden die erhobenen Messwerte mit den Werten alters- und geschlechts-gemachter gesunder Kontrollen verglichen.

Methodik

Wir führten eine alters- und geschlechts-gemachte Fall-Kontroll-Querschnittsstudie bei 25 jungen HD-Patienten (Alter 18-40 Jahre) durch, die keinen Diabetes bzw. andere Komorbiditäten aufwiesen. Ausgewählte oxidative Stressmarker wurden analysiert und mit validierten Surrogatparametern der vaskulären Struktur und Funktion in Zusammenhang gesetzt.

Ergebnisse

Während die oxidierten LDL bei den Patienten und gesunden Probanden gleich waren, zeigten sich die konjugierten Diene in der VLDL-Fraktion bei den HD-Patienten signifikant höher als bei den Kontrollen (20 ± 6 vs. 12 ± 5 $\mu\text{mol/l}$; $p < 0,0001$). In der LDL-Fraktion hingegen zeigte sich kein signifikanter Unterschied (16 ± 6 vs. 18 ± 6 $\mu\text{mol/l}$). Die Aktivität der Superoxid-Dismutase war bei den HD-Patienten deutlich erniedrigt (1.117 ± 151 vs. 1.299 ± 88 U/g Hb; $p < 0,0001$). Hingegen zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Aktivität der Glutathion-Peroxidase. Das Verhältnis von oxidiertem zu reduziertem Glutathion (GSSG/GSH-Ratio) als Ausdruck des oxidativen Stresses war bei den HD-Patienten signifikant höher als bei den gesunden Probanden ($0,25 \pm 0,18$ vs. $0,13 \pm 0,04$; $p = 0,005$). Die hämodialysierten Patienten hatten einen signifikant höheren Durchmesser der Intima-Media (IMT) der Arteria carotis communis als die gesunden Kontrollen ($0,72 \pm 0,18$ vs. $0,62 \pm 0,08$ mm, $p = 0,0007$).

Der postischämische Peak-Flow bei der Plethysmographie (PIPF) in Prozent des Ruheblutflusses war bei den HD-Patienten deutlich niedriger als bei den gesunden Kontrollen (632 ± 319 vs. $1.057 \pm 543\%$ des Ruheflusses; $P = 0,0005$).

Kein Marker des oxidativen Stresses konnte einen unabhängigen Zusammenhang mit IMT oder PIPF zeigen oder bei der multivariaten Regressionsanalyse einen signifikanten Diskriminator zwischen den Patienten und Kontrollen darstellen.

Schlussfolgerung

In dieser Studie, die ausschließlich an jungen Hämodialysepatienten durchgeführt wurde, zeigten Marker des oxidativen Stresses lediglich einen eingeschränkten klinischen Nutzen in der Einschätzung des Risikoprofils für kardiovaskuläre Komplikationen.

Abstract

Introduction

Patients with chronic kidney disease (CKD) treated by dialysis are at high risk for cardiovascular complications. Cardiovascular disease (CVD) is the leading cause of death in patients (age 25-34 years) treated with hemodialysis (HD) and the relative increase in CVD risk is highest in young patients.

Studies in young hemodialysis patients without significant comorbidities might increase the understanding of incipient vascular pathology in uremia. We investigated whether a specific pattern of oxidative stress markers with potential prognostic significance could be identified in this population.

Methods

We performed a cross-sectional matched case control study of 25 young hemodialysis patients (age 18–40 years) without known comorbidity factors. Patients were matched pairwise to healthy controls, and markers of oxidative stress were analyzed for associations with surrogate parameters of vascular structure and function.

Results

Oxidized low-density lipoproteins (OxLDL) were similar in patients and controls whereas conjugated dienes were higher in the very low-density lipoprotein (VLDL) fraction (20 ± 6 vs. 12 ± 5 $\mu\text{mol/l}$; $p < 0,0001$), but not in the low-density lipoprotein (LDL) fraction (16 ± 6 vs. 18 ± 6 $\mu\text{mol/l}$). Superoxide dismutase (SOD) activity was lower in patients (1.117 ± 151 vs. 1.299 ± 88 U/g Hb; $p < 0,0001$), but there was no difference in glutathione peroxidase (GPx) activity. Oxidative stress expressed as the ratio of oxidized and reduced glutathione (GSSG/GSH) was

higher in patients ($0,25\pm 0,18$ vs. $0,13\pm 0,04$; $p = 0,005$). Intima media thickness (IMT) of the common carotid artery ($0,72\pm 0,18$ vs. $0,62\pm 0,08$ mm; $p = 0,0007$) was significantly higher, and postischemic peak flow (PIPF) measured by venous occlusion plethysmography as a percentage of the flow at rest was severely lower among patients (632 ± 319 vs. $1.057\pm 543\%$ of basal flow; $p = 0,0005$). None of the markers of oxidative stress was independently associated with IMT or PIPF or a significant discriminator between patients and controls by multivariate regression.

Conclusion

In this study of exclusively young patients on hemodialysis, oxidative stress markers were of limited clinical value in identifying young patients at risk for vascular complications. Further studies are needed in this special population to establish suitable methods for identifying patients at risk for CVD.

2 Einleitung

2.1 Allgemeine Einleitung

Patienten mit einer dialysepflichtigen Niereninsuffizienz haben bekannterweise ein erhöhtes Risiko für Gefäßkomplikationen.^{1,2} Kardiovaskuläre Ereignisse stellen mit etwa 50% dieser Patientengruppe die Haupttodesursache dar. Die Mortalität durch eine kardiovaskuläre Erkrankung liegt bei erwachsenen Patienten unter Nierenersatztherapie bei etwa 9% pro Jahr. Dabei ist das Risiko im Vergleich zur Normalbevölkerung um das 30-fache erhöht.³⁻⁶ Insbesondere ist das relative Risiko bei jungen Hämodialysepatienten zwischen 25-34 Jahren am stärksten erhöht und zwar um das 700-fache.⁴ Es ist anzunehmen, dass die pathologischen Mechanismen, die zu den beobachteten Gefäßveränderungen führen, schon in jungen Jahren einsetzen.^{7,8} Die Forschung sucht deshalb in den letzten Jahren zunehmend nach frühzeitigen Markern der Herz- und Gefäßerkrankungen, um gefährdete Patienten frühzeitig zu identifizieren. Es stehen mittlerweile verschiedene Verfahren der nicht-invasiven Gefäßdiagnostik zur Verfügung. Insbesondere sind hier die Messung der Intima-Media-Dicke der Arteria carotis communis^{9,10}, Arteria femoralis^{7,11,12} und der brachialis, Flow-Mediated Dilatation (FMD)¹³, Pluswellengeschwindigkeit¹⁴, Aortakalzifikationsindex (ACI)^{15,16} sowie die Plethysmographie^{12,17,18} zu nennen.

Seit langem ist bekannt, dass oxidativer Stress und oxidativ veränderte Lipoproteine ein hohes atherogenes Potential besitzen.¹⁹ Es hat sich nicht nur gezeigt, dass oxidativer Stress einen Einfluss auf die Progression verschiedener Nierenerkrankungen hat,^{20,21} sondern auch, dass bei Dialysepatienten die ausgeprägte Bildung oxidierender Radikale („reactive oxygen species“ = ROS) bei jeder Dialysebehandlung^{22,23} mit einer Verminderung der wichtigen antioxidativen Systeme verbunden ist²⁴⁻²⁶. Die Messung der Serumkonzentration von Produkten der Lipidoxidation, wie beispielsweise des Malondialdehyds bei Patienten unter Hämodialyse erbrachte unterschiedliche Ergebnisse.^{27,28} Bisher gibt es jedoch nur eine begrenzte Anzahl von Untersuchungen, die validierte Parameter der Lipidoxidation mit validierten Parametern der Gefäßfunktion bzw. Gefäßstruktur verglichen haben, insbesondere gibt es nur wenige Arbeiten an Jugendlichen und jungen Erwachsenen.

2.2 Parameter des Lipidstoffwechsels

Apolipoproteine stellen den Proteinbestandteil der Lipoproteine dar. Die Lipoproteine werden nach ihrer ultrazentrifugalen Fraktionsdichte eingeteilt. Lipoproteine sehr geringer Dichte (very

low-density Lipoproteins, VLDL) werden in der Leber synthetisiert. Diese Partikel enthalten vor allem Triglyzeride und Cholesterin. In Gegenwart der Lipoproteinlipase werden die Triglyzeride hydrolysiert und LDL-Partikel mit einem hohen Cholesterinanteil gebildet.

Der Hauptbestandteil der Lipoproteine geringer Dichte (LDL) ist das Apoprotein B. Die LDL-Partikel stellen ca. ein Drittel Cholesterin für die peripheren Zellen bereit. Die anderen beiden Drittel werden in der Leber abgebaut. Die LDL-Aufnahme in allen Geweben erfolgt über LDL-Rezeptoren. Erhöhte Apolipoprotein B- (ApoB-) Spiegel werden in der Schwangerschaft, bei Hypercholesterinämie, LDL-Rezeptorstörungen, Gallenwegsobstruktion, Hyperlipidämie Typ II und nephrotischem Syndrom beobachtet. Dagegen treten erniedrigte Apolipoprotein-B-Spiegel bei Lebererkrankungen, α - β -Lipoproteinämie, Sepsis und Östrogeneinnahme auf. Ein niedriger ApoB-Spiegel korreliert mit einem geringeren Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen.^{29 30,31}

2.3 Parameter der Lipidoxidation

Die Umwandlung von LDL (low-density lipoproteins) zu oxidierten LDL wird heutzutage für ein Schlüsselereignis in der Initialisierung und Beschleunigung der Entwicklung früher atherosklerotischer Läsionen gehalten. Experimentelle Untersuchungen haben gezeigt, dass oxidierte LDL ein wesentlich höheres atherogenes Potential besitzen als native LDL.³²⁻³⁶ Oxidierte LDL können in Makrophagen in atherosklerotischen Läsionen, nicht jedoch in gesunden Arterien nachgewiesen werden.³⁷ Oxidierte LDL induzieren die Aufnahme von Cholesterin in die Makrophagen und ihre Umwandlung in Lipid-beladene Schaumzellen durch Akkumulation von Cholesterinestern.³⁸ Außerdem könnte die Anregung der Proliferation glatter Muskelzellen durch oxidierte LDL eine Rolle spielen.³⁹ Ein Zusammenhang zwischen der Oxidation von LDL und der Atherogenese wurde durch Experimente wahrscheinlich, die einen schädigenden Einfluss der oxidierten LDL auf Endothelzellen nachwiesen.⁴⁰ Für Antioxidantien, wie Vitamin E, konnte wiederum ein protektiver Effekt nachgewiesen werden.^{41,42}

Holvoet und seine Mitarbeiter konnten in prospektiven Studien nachweisen, dass erhöhter Plasmaspiegel oxidiertes LDL einen wichtigen Prädiktor für eine spätere Erkrankung an einer koronaren Herzkrankheit darstellt.^{43,44} Außerdem zeigte die Arbeitsgruppe, dass Patienten mit akuten Koronarsyndromen höhere Plasmaspiegel an Malonyldialdehyd-modifizierten LDL aufwiesen als Patienten mit stabiler Angina. Dies wurde als Ausdruck einer erhöhten Instabilität der atherosklerotischen Plaques gedeutet.⁴⁵ Zur Bestimmung der oxidierten LDL wurden ein kompetitiver ELISA mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper (mAb-4E6) verwendet.

Bei der Oxidation der Fettsäureketten entstehen zunächst die sogenannten konjugierten Diene. Hierbei handelt es sich um eine Bindungskombination in der Kohlenstoffkette, bei der einer Doppelbindung nach einer Einfachbindung erneut eine Doppelbindung folgt ($C=C-C=C$). Diese LDL-Oxidationsprodukte können durch die Oxidation eines Farbstoffes und die anschließende Messung der Extinktion quantitativ nachgewiesen werden.^{46,47} Problematisch ist hierbei, dass auch andere Substanzen im Plasma oxidative Eigenschaften besitzen. Um die gemessene oxidative Kapazität möglichst auf die LDL-Fraktion zu zentrieren, muss eine Isolierung der LDL erfolgen. Hierzu steht eine gut etablierte Methode mittels Ultrazentrifugation zur Verfügung.⁴⁸

2.4 Parameter der Antioxidation

Glutathion (GSH) und Glutathiondisulfid (GSSG) sind wichtige intrazelluläre Thiole. Die Änderung der GSH/GSSG Ratio wird häufig benutzt, um den oxidativen Stress abzuschätzen,⁴⁹ dem Zellen ausgesetzt sind. Dabei spielt GSH eine wichtige Rolle als Radikal-Fänger und schützt somit die Zelle vor oxidativer Schädigung. Dabei wird GSH zu GSSG oxidiert und von der Glutathionreduktase „recycled.“ GSH ist ein wichtiges Co-Enzym der Glutathion Peroxidase Aktivität.

Superoxid-Dismutase ist eine kupferhaltige Oxidoreduktase, die in einem Redoxsystem reaktive Sauerstoffspezies, wie das Superoxidanion eliminiert und somit eine wichtige Rolle bei den Reparaturvorgängen der Zellen spielt.

Im Gefolge einer Reihe von biologischen Oxidationen entsteht durch 1-Elektronenreduktion von Sauerstoff das Superoxidradikal O_2^- . Durch zwei Dismutationsreaktionen erfolgt die Metabolisierung des O_2^- . Durch GSH-Peroxidase und GSSG-Reduktase wird H_2O_2 metabolisiert. Die Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase ist die wichtigste einer Reihe von Reaktionen zur NADPH/ H^+ -Regenerierung (Abb. 1 a + b).

Die Glutathion-Peroxidase ist als ein selenhaltiges Enzym ein wichtiger Bestandteil des oxidativen Schutzsystems. Ihre besondere Bedeutung liegt in der Eliminierung von Lipidperoxiden, die durch Protonierung von organischen Dioxy-radikalen entstehen.

Sie katalysiert in den Erythrozyten die Oxidation von Glutathion zu GSSG. Gleichzeitig werden Methämoglobin und entstehende Peroxide reduziert. Die Regeneration von GSH erfolgt durch die NADPH-abhängige Glutathionreduktase (Abb. 2).

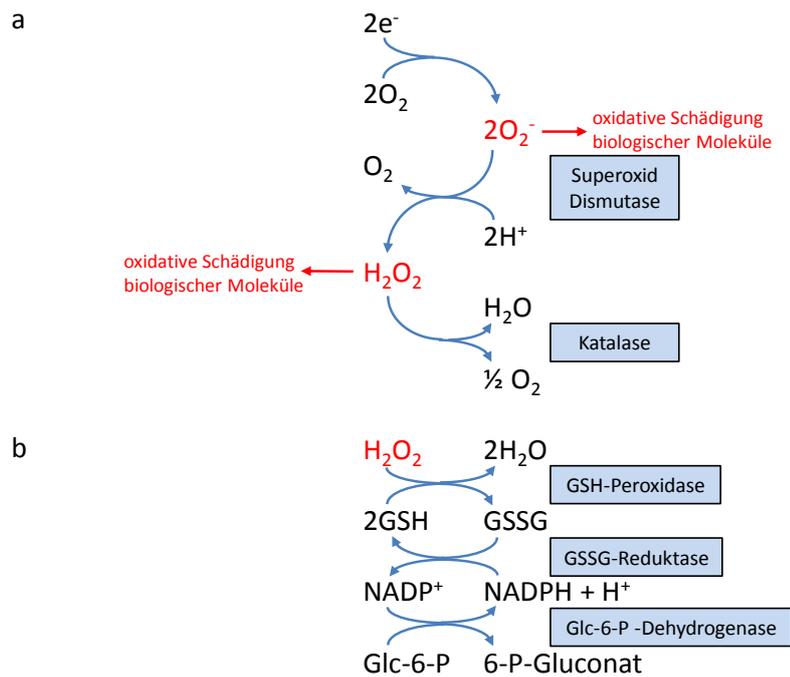


Abbildung 1: Entstehung und Abbau oxidativer Sauerstoffspezies. a: Das Superoxidradikal O_2^- entsteht durch 1-Elektronenreduktion von Sauerstoff im Gefolge einer Reihe von biologischen Oxidationen. Durch zwei Dismutationsreaktionen erfolgt die Metabolisierung des O_2^- . b: Durch GSH-Peroxidase und GSSG-Reduktase wird H_2O_2 metabolisiert. Die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase ist die wichtigste einer Reihe von Reaktionen zur $NADPH/H^+$ -Regulierung (modifiziert nach Löffler Petrides).⁵⁰

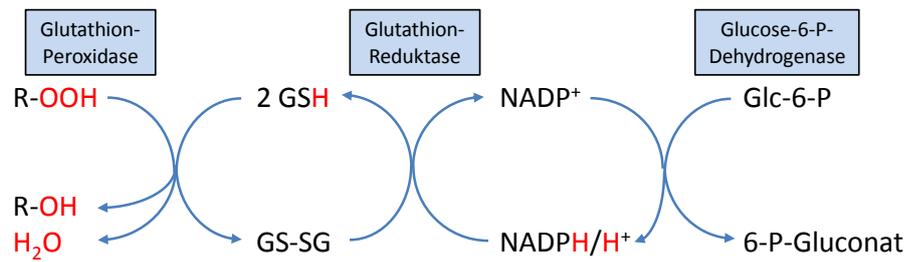


Abbildung 2: Funktion der Glutathion-Peroxidase bei der Eliminierung von Lipidperoxiden. Die Glutathion-Peroxidase reduziert organische Peroxide, z. B. Lipidperoxide. Für die Glutathionregenerierung wird als Hilfsenzym die Glutathion-Reduktase benötigt, für die $NADPH^+$ /Regenerierung beispielsweise die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase. GSH Glutathion, reduziert; GS-SG Glutathiondisulfid (modifiziert nach Löffler Petrides).⁵⁰

2.5 Arterielle Struktur und Funktion

Die Intima-Media-Dicke (Intima-Media-Thickness = IMT) steigt mit zunehmendem Alter an. Eine gleichmäßige Verdickung der inneren Gefäßwände kann als ein normaler Alterungsvorgang gesehen werden. Bei einigen Individuen steigt die Dicke jedoch schneller an als bei anderen. Hämodynamische Faktoren spielen eine entscheidende Rolle für die individuelle Ausprägung der IMT. Verdickungen können eine Antwort der Gefäßwand auf Veränderungen des Flusses, der Spannung und auftretenden Scherkräfte sein, als Maßnahme, um wieder normale Flussvoraussetzungen herzustellen. Natürlich treten in den Gefäßen des Körpers an verschiedenen Stellen, z. B. an Bifurkationen, stärkere Scherkräfte auf als an anderen und damit auch im Laufe der Zeit stärkere Veränderung der IMT. An diesen Lokalisationen bilden sich häufig auch die ersten arteriosklerotischen Veränderungen.

Eine Methode zur Messung des Blutflusses, also eines funktionellen Parameters, ist die venöse Okklusions-Plethysmographie. Mit ihr ist es möglich, den Blutfluss in den unteren Extremitäten in Ruhe und nach einer fünfminütigen Ischämie zu bestimmen. Dabei wird die Tatsache genutzt, dass beim Stauen des venösen Blutflusses die Zunahme des Beinumfangs proportional zum arteriellen Einstrom ist. Hierbei ist nicht nur der maximale Anstieg der Durchblutung, sondern auch die Geschwindigkeit, in der sich die Durchblutung wieder normalisiert, wichtig. Haben die Gefäße durch arteriosklerotische Veränderungen ihre Elastizität eingebüßt bzw. sind die Gefäße bei vorhandenem Stress schon weitgestellt, fehlt die Reserve für einen starken Anstieg der Durchblutung und es dauert länger, bis sich die Durchblutung wieder normalisiert.

2.6 Zielsetzung der Arbeit

Studien bei jungen Hämodialysepatienten, die keine signifikante Komorbidität aufzeigen, könnten das Verständnis für die Initialisierung der vaskulären Veränderungen bei der Urämie verbessern.

Das Ziel dieser Studie war, das Ausmaß der oxidativen Veränderungen der Lipide und Lipoproteine bei Hämodialysepatienten in jungem Erwachsenenalter zu untersuchen und den Zusammenhang dieser Veränderungen mit Markern der morphologischen und funktionellen Gefäßveränderungen zu eruieren. Dabei sollten die erhobenen Messwerte mit den Werten alters- und geschlechts-gemachter gesunder Kontrollen verglichen werden.

2.7 Fragestellung

Die Fragestellung dieser Studie war, herauszufinden, ob ein bestimmtes Muster oxidativer Stressmarker mit einer potenziellen prognostischen Aussagekraft bei jungen, niereninsuffizienten Erwachsenen ermittelt werden kann. Daher führten wir eine alters- und geschlechts-gemachte Fall-Kontroll-Querschnittsstudie bei jungen Hämodialyse-Patienten (Alter 18-40 Jahre) durch, die keinen Diabetes bzw. andere Komorbiditäten aufweisen. Die Hämodialysepatienten waren individuell gesunden Kontrollen zugeordnet. Hierbei wurden oxidative Stressmarker analysiert und mit validierten Surrogatparametern der vaskulären Struktur und Funktion in Zusammenhang gesetzt.

3 Material und Methoden

3.1 Patienten

Um Patienten für die Studie zu gewinnen, wurde zu insgesamt 25 Dialysezentren und –praxen in Berlin Kontakt aufgenommen. Die Patienten wurden nach den folgenden Kriterien eingeschlossen:

- Alter zwischen 18 und 40 Jahren
- Hämodialyse seit mindestens sechs Monaten
- Keine intravenöse Eisengabe seit mindestens sieben Tagen
- Keine familiären Fettstoffwechselstörungen
- Kein manifester Diabetes mellitus
- Kein Alkoholabusus

Von den 63 Hämodialysepatienten in Berlin, die diesen Kriterien entsprachen, waren 25 bereit an der Studie teilzunehmen. Dabei gaben einige Dialysepraxen zwar die Anzahl der in Frage kommenden Patienten an, lehnten eine Teilnahme an Studien jedoch generell ab.

Die Vorstellung der Patienten erfolgte morgens nüchtern (mindestens acht Stunden keine Nahrungsaufnahme, lediglich Trinken von Wasser erlaubt), entweder an Nicht-Dialyse-Tagen oder vor Dialyse an Dialysetagen. Die Einnahme der Blutdruckmedikamente sollte erst nach Durchführung der Untersuchung erfolgen. Auch auf das Rauchen sollte bis nach der Untersuchung verzichtet werden. Eine durchgeführte Eisensubstitution wurde mindestens sieben Tage vor Vorstellungstermin abgesetzt. Jedem Patienten wurden 25 ml Blut abgenommen, danach wurde eine Messung der Intima-Media-Dicke der Arteriae carotides communes sowie eine Venenokklusions-Plethysmographie durchgeführt. Neben den Messwerten wurden Geschlecht, Grundkrankheit, Hypertonus, Medikation (insbes. Lipidsenker, Antihypertensiva und orale Kontrazeptiva) und Rauchverhalten (nie/gelegentlich/stark) ermittelt. Drei der Patienten erhielten eine Therapie mit Lipidsenkern (2 x Atrovastatin, 1 x Fluvastatin).

Vor dem Studienbeginn wurde eine Genehmigung der Ethik-Kommission eingeholt. Den interessierten Patienten wurde ein Informationsblatt ausgehändigt. Die teilnehmenden Patienten gaben vor ihrer Teilnahme eine schriftliche Einverständniserklärung ab.

Die Daten wurden in anonymisierter Form unter Vergabe von Studiencodes erfasst.

3.2 Kontrollen

Die Kontrollgruppe wurde aus freiwilligen Probanden zusammengestellt, die weder an einer Nierenerkrankung noch an einer Erkrankung des Fettstoffwechsels oder des kardiovaskulären Systems litten. Sie wurden auf Geschlecht, Alter, Rauchverhalten und bei den weiblichen Teilnehmern auf Einnahme von Ovulationshemmern mit den Patienten gematcht. Auch die Probanden der Kontrollgruppe wurden morgens nüchtern (minimal acht Stunden Nahrungskarenz) zur Untersuchung einbestellt. Raucher wurden gebeten, am Tag der Untersuchung nicht zu rauchen.

3.3 Labormethoden

3.3.1 Blutproben

Insgesamt wurden ca. 25 ml Blut aus einer peripheren Vene bzw. wenn möglich vor dem Anschluss an die Dialyse aus dem Dialysezugang abgenommen. Entnommen wurden die folgenden Röhrchen:

- 2 x EDTA à 7 ml
- 1 x EDTA à 1,2 ml
- 1 x Lithium-Heparin à 5,5 ml
- 1 x mit Heparin-Natrium präparierte Röhrchen à 4 ml

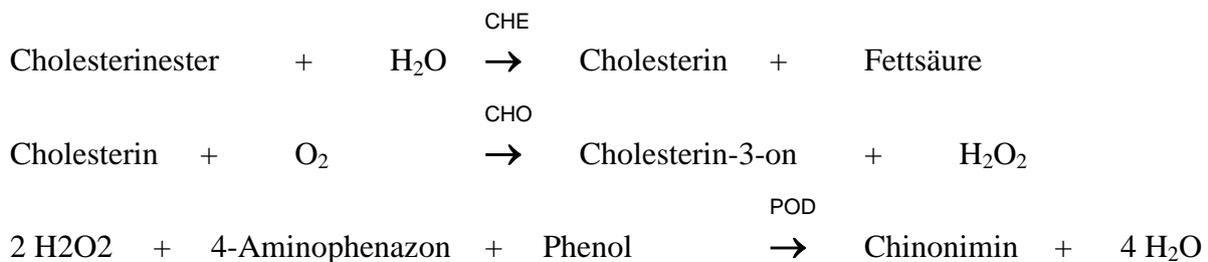
Der Transport der Blutproben erfolgte gekühlt. Die Verarbeitung erfolgte so schnell wie möglich. Der Hämoglobinwert und Hämatokrit wurde zur Bestimmung ins Zentrallabor der Charité gegeben. Die Blutproben für die Bestimmung von SOD/GSH-Px wurden ebenfalls schnell verarbeitet. Die restlichen Blutproben wurden bei 3.000 U/min über 15 Minuten abesert und bei – 80 °C tiefgefroren.

3.3.2 Lipoproteinanalyse mittels Ultrazentrifugation:

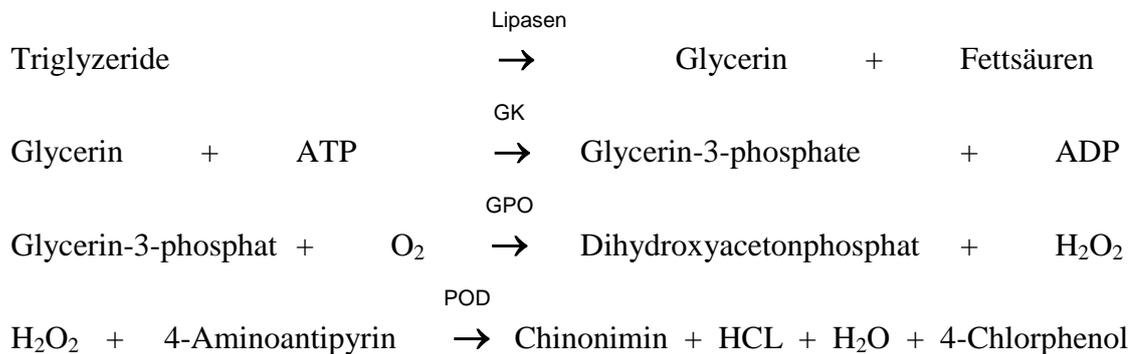
3.3.2.1 Beschreibung:

Durch Einsatz von Mikromethoden zur Auftrennung der Lipoproteinfraktionen sowie anschließender spezifischer enzymatischer Methoden zur Analyse von Cholesterin und Triglyzeriden ist es möglich, die Konzentration und Zusammensetzung der Lipoproteine VLDL, LDL und HDL zu bestimmen.

Die Cholesterinbestimmung erfolgt durch den enzymatischen Farbttest (Cholesterin liquicolor, CHOD-PAP) der Fa. Greiner. Hierbei wird der Cholesterinester durch Cholesterinesterase zu Cholesterin und Fettsäure gespalten und anschließend oxidiert. Das aus Wasserstoffperoxid und 4-Aminophenazon unter Anwesenheit von Phenol und Peroxidase entstehende Chinonimin wird photometrisch gemessen.



Triglyzeride werden durch Lipasen gespalten. In einer Oxidationsreaktion durch eine Peroxidase entsteht aus Wasserstoffperoxid und 4-Aminoantipyrin der Indikator Chinonimin, das photometrisch gemessen werden kann.



3.3.2.2 Notwendige Materialien:

- Polyethylen-Röhrchen
- Ultrazentrifuge (Fa. Beckman Instruments, München)
- Vertikalrotor 60 Ti (Fa. Beckman Instruments, München)
- Spezieller Adapter aus Delrin
- Schneidegerät (Fa. Beckman Instruments, München)
- Mikroliterspritzen Microlab 500 series (Fa. Hamilton, Bonaduz)
- Microtiterplatte, Plate Reader MR 5000 mit 496 nm Filter (Fa. DYNATECH, Canada)
- Revelation: Auswertungs-Software für Micro Plate Reader (Fa. DYNATECH, Canada)

- Mikrotitergefäße (Fa. Sarstedt)
- Shaker-Inkubator (Fa. DYNATECH, Canada)
- Cholesterinreagenz: Phosphatpuffer 100 mmol/l pH 6,5, 4-Aminophenazon 0,25 mmol/l, Phenol 5 mmol/l, Peroxidase 5 KU/l, Cholesterinesterase > 150 U/l, Cholesterinoxidase >100 U/l, Natriumazid 0,05%)
- Cholesterin-Standard-Lösung 200 mg/dl (Fa. Greiner, Deutschland)
- Triglyceridreagenz: PIPES-Puffer 50 mmol/l pH 7,5, 4-Chlorphenol 5 mmol/l, 4-Aminoantipyrin 0,25 mmol/l, Mg-Ionen 4,5 mmol/l, ATP 2 mmol/l, Lipasen \geq 1,3 U/ml, Peroxidase \geq 0,5 U/ml, Glycerokinase \geq 0,4 U/ml, Glycerin-3-phosphat-oxidase \geq 1,5 U/ml
- TG-Standard-Lösung 200 mg/ml (Fa. Human Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH, Deutschland)

3.3.2.3 Durchführung:

Zur Trennung der VLDL von den Lipoproteinen höherer Dichte (LDL, HDL) werden 100 μ l Nüchternserum in 5 x 20 mm Polyethylen-Röhrchen gegeben und mit 100 μ l 0,9% NaCl überschichtet.⁴⁸ Die so bestückten Röhrchen werden dann in einen speziellen Adapter aus Delrin in den Vertikalrotor einplatziert und anschließend vier Stunden bei 45.000 rpm und 4° C zentrifugiert. Danach werden die Röhrchen entnommen und möglichst schnell 9 mm über dem Röhrchenboden mit dem Schneidegerät geschnitten. Die Oberfraktion wird abpipettiert und das noch zurückgebliebene Material mit 50 μ l 0,9% NaCl nachgespült und ebenso zur Oberfraktion hinzugegeben. In gleicher Weise wird die Unterfraktion entnommen und mit 50 μ l 0,9% NaCl nachgespült.

Zur Cholesterinbestimmung werden 5 μ l native Probe und 300 μ l Cholesterinreagenz bzw. 10 μ l Überstand/Unterstand und 250 μ l Cholesterinreagenz mit Hilfe des Microlab Pipettierers in die Mikrotiterplatte pipettiert. Nach sieben Minuten Inkubation bei 37 °C erfolgt die Messung der Extinktion bei 490 nm gegen Reagenzienleerwert mittels eines Plate Readers. Kalibriert wird gegen einen wässrigen Standard der Fa. Greiner.

Die Bestimmung der Triglyceridkonzentration verläuft analog, d. h. es werden 10 μ l Nativmaterial und 300 μ l Triglyceridreagenz bzw. 20 μ l Überstand/Unterstand und 250 μ l Triglyceridreagenz mit Hilfe des Microlab-Pipettierers in die Mikrotiterplatte pipettiert. Nach sieben Minuten Inkubation bei 37 °C erfolgt die Messung der Extinktion bei 490 nm gegen Reagenzienleerwert mittels eines Plate Readers. Kalibriert wird gegen einen wässrigen Standard der Fa. Human.

Mikropräzipitation zur Analyse der HDL:

Sowohl die Unterfraktion als auch das Nativplasma können mittels selektiver Präzipitation Apolipoprotein B-haltiger Lipoproteine (LDL) aufgetrennt werden.⁵¹ Dazu wird das Präzipitationsreagenz wie folgt angesetzt:

Es werden 61g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ auf 100 ml aufgefüllt. 70 ml Aqua dest. werden zu 4,8 g Phosphorwolframsäure gegeben. Anschließend wird der pH-Wert der Lösung durch Zugabe von 1 mol NaOH auf 7,0 eingestellt und die Lösung auf 100 ml aufgefüllt.

10 μ l vom Präzipitationsreagenz, das sich aus 5 ml Phosphorwolframsäure und 1 ml $MgCl_2$ zusammensetzt, werden in ein spezielles Mikrotitergefäß gegeben. 100 μ l Serum bzw. Unterfraktion werden hinzu pipettiert, gut gemischt und zehn Minuten bei Raumtemperatur belassen. Anschließend werden die so vorbereiteten Mikrotitergefäße 30 Minuten bei 2.500 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand kann für weitere Untersuchungen, insbesondere Cholesterin und Triglyzeride, verwendet werden.

Aufgrund der jeweiligen Verdünnungen werden die im Überstand gemessenen Fraktionen mit 1,31 multipliziert und entsprechen dann den Konzentrationen in den VLDL.

Die Messwerte im Unterstand werden mit dem Verdünnungsfaktor 1,69 multipliziert und entsprechen den Konzentrationen in LDL+HDL. Die nach Mikropräzipitation des Überstandes gemessenen Werte werden mit 1,86 multipliziert und geben die Konzentrationen in der HDL-Fraktion wieder. Die Konzentrationen in den LDL werden als Differenz aus den HDL- und (HDL+LDL)-Werten ermittelt.

Die Zuverlässigkeit der Lipoproteinfraktionierung wird mittels der Wiederfindungsrate (r) für Cholesterin und Triglyzeride kontrolliert. Dazu wird folgende Formel benutzt:

$$r = (C_{\text{oben}} \times 1,31 + C_{\text{unten}} \times 1,69) / C_{\text{gesamt}}$$

C_{oben} , C_{unten} und C_{gesamt} entsprechen den jeweils im Über-, Unterstand und Nativserum gemessenen Konzentrationen.

Es werden nur Analysen mit der Recovery zwischen 0,90 und 1,20 akzeptiert, um die Zuverlässigkeit der Wiederfindungsrate zu gewährleisten.

Die Cholesterin- und Triglyceridkonzentrationen werden mit Hilfe der Revelation Auswertungs-Software aus den gemessenen Extinktionen anhand der Standardkurve abgelesen.

Diese vorliegende Lipoproteinanalyse mittels Ultrazentrifugation und die enzymatische Bestimmung basiert auf den Vorarbeiten von Kohlmeier nach geringer Modifikation in unserem Forschungslabor.^{51,52}

3.3.3 Apolipoprotein B

3.3.3.1 Beschreibung:

Apolipoprotein B ist der Hauptbestandteil des Proteinanteils der LDL. Die Messung erfolgt mit dem Tina-quant[®] Test (Apo B Version 2) der Firma Roche (Roche Modular P).

3.3.3.2 Notwendige Materialien:

Gelieferte Materialien:

- R1: TRIS-Puffer (Trishydroxymethylaminomethan: 50 mmol/l, pH 8, PEG 4,2%, Detez, Konservierungsmittel)
- R2: Anti-Human-Apolipoprotein B-Antikörper (Schaf), abhängig vom Titer, TRIS-Puffer: 100 mmol/l, pH 8, Konservierungsmittel

Zusätzlich benötigte Materialien:

- Messgerät Roche Modular P und geräteinterne Auswertungs-Software (Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland)
- Kalibrations- und Kontrollmaterial
- NaCl 0,9%

3.3.3.3 Durchführung:

Die Bestimmung von Apo B beruht auf einem immunologischen Trübungstest.

Die Li-Heparin-Proben (Apolipoprotein B-Antigen) werden mit R1 gepuffert und anschließend R2 Apolipoprotein B-Antikörper dazugegeben. Es entsteht ein Antigen-Antikörper-Komplex, der nach Agglutination bei 340 nm und 37 C° nach zehn Minuten turbidimetrisch im Autoanalyser Roche Modular P gemessen wird. Die Auswertung erfolgt mit Hilfe geräteinterner Auswertungs-Software.⁵³

3.3.4 Konjugierte Diene

3.3.4.1 Beschreibung:

Die konjugierten Diene werden nach der Methode von Ahotupa et al. bestimmt.⁴⁷ Dabei erfolgt die Auftrennung der Lipoprotein-Fractionen mit einer modifizierten Ultrazentrifugationsmethode nach Schumaker und Kollegen.⁵⁴

3.3.4.2 Notwendige Materialien:

A. Stammlösung ‚schwer‘ (1,346 g/ml):

NaCl	76,5 g
KBr	177,0 g (erst lösen)
EDTA (10%)	2,5 ml
NaAzid (5%)	2,0 ml
/ad 500 ml; pH 7,1	

B. Stammlösung ‚leicht‘ (1,005 g/ml):

NaCl	4,38 g
EDTA (10%)	2,5 ml
NaAzid (5%)	2,0 ml
/ad 500 ml	

C. Herstellung der Dichtegradient-Lösung:

Dichte	Stammlösung ‚leicht‘	Stammlösung ‚schwer‘
[g/ml]	[g]	[g]
1,006	30,18	0,1171
1,019	30,18	1,728
1,063	30,18	8,274
1,240	10,06	29,84

3.3.4.3 Durchführung

Auftrennung der Lipoprotein-Fractionen mittels Ultrazentrifugation:

Es wird Plasma aus EDTA-Blut in der Zentrifuge bei 3.000 rpm über 15 Minuten gewonnen. Wenn eine sofortige Verarbeitung nicht möglich ist, wird das Plasma bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

Nach Auftauen der Proben werden 2 ml Plasma mit 0,65 g KBr versetzt, um die Plasmadichte auf 1,210 mmol/l einzustellen.

Zur Überschichtung des Plasmas wird ein 10 ml Polyethylen-Röhrchen verwendet. In dieses werden 2 ml von der 1,240 M Lösung mittels einer Eppendorf-Pipette einpipettiert. Anschließend werden 2 ml Plasma mittels 200 μl Eppendorf-Pipette langsam darüber geschichtet. Ebenso werden jeweils darüber 2,5 ml von der 1,063 M, 3,0 ml von der 1,019 M und 2 ml von der 1,006 M Dichtegradient-Lösung zupipettiert. Die so bestückten Röhrchen werden vertikal im Rotor einplatziert und in der Ultrazentrifuge (Beckmann L8–60 M) bei 40.000 rpm über 22 Stunden bei $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert.

Nach Entnahme des Rotors aus der Ultrazentrifuge werden die Röhrchen unmittelbar herausgenommen. VLDL setzt sich oben als ein trüber Ring ab und wird mittels einer Eppendorf-Pipettenspitze im Kreis vorsichtig abgezogen und in ein Eppendorf-Röhrchen einpipettiert. Die Flüssigkeit zwischen VLDL- und LDL-Ring wird abgezogen und verworfen.

Im nächsten Schritt wird der LDL-Ring, der sich gelblich abhebt, abpipettiert und ebenso in ein Eppendorf-Röhrchen gegeben.

Die so gewonnenen VLDL- und LDL-Proben werden in einen Dialyseschlauch (Dialysemembran, Medicell International, Ltd) einpipettiert. Dieser wird an beiden Enden verschlossen und in einem Dialysepuffer (beinhaltet 8,76 g/l NaCl und 0,1 g/l EDTA) mit Vortex unter viermaliger Erneuerung des Puffers jeweils für 4-5 Stunden dialysiert. Dieser Vorgang dient der Entfernung des initial zugesetzten KBr.

Bestimmung der konjugierten Diene:

Aus dem Dialysat werden jeweils 100 μl entnommen und zu einem Chloroform-Methanol-Gemisch (2:1) gegeben und bei 10.000 g über fünf Minuten zentrifugiert. In dem Röhrchen bilden sich zwei Phasen.

Die untere Phase wird mittels einer 100 μl Pipettenspitze abgezogen und in einem neuen Röhrchen unter vorsichtiger Einleitung von Stickstoffgas getrocknet.

Im nächsten Schritt werden die soliden Stoffe mit 400 μl Cyclohexan in Lösung gebracht, um die photometrische Messung zu ermöglichen.

Das Photometer (Helios γ Lambda) wird mit reinem Cyclohexan kalibriert.

Die in Cyclohexan gelöste Probe wird in eine Glas-Küvette umgefüllt und ihre Absorption bei 234 nm gemessen.

Aus der gemessenen Extinktion wird mit Hilfe des Lambert-Beersches Gesetzes unter Berücksichtigung des molaren Extinktionskoeffizienten ($2,95 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) die Konzentration der konjugierten Diene in der VLDL- bzw. LDL-Fraktion bestimmt.

3.3.5 Oxidierte LDL

3.3.5.1 Beschreibung:

Die Messung erfolgt mit dem Mercodia „oxidized LDL ELISA“ (Firma Mercodia AB, Sylveniusgatan, Uppsala/Schweden) für die quantitative Messung von oxidierten low-density Lipoproteinen. Mit dieser Methode zeigten Holvoet und Kollegen, dass oxidierte LDL im Plasma mit einem kompetitiven ELISA unter Verwendung des spezifischen von der Maus stammenden monoklonalen Antikörper mAb-4E6 gemessen werden konnten.^{44,45} Dieser mAb-4E6 ist direkt gegen separate Antigen-Determinanten auf dem oxidierten Apolipoprotein B Molekül gerichtet. Beim Mercodia Testkit wird derselbe Antikörper verwendet. Dabei handelt es sich um einen solid phase two-site ELISA. Er beruht auf einer direkten Sandwich-Technik mit zwei monoklonalen Antikörpern. Dabei ist der erste, spezifisch gegen oxidierte LDL gerichtete Antikörper (mAb-4E6) an die feste Phase in den Test-wells gebunden. Der zweite Antikörper ist gegen Apolipoprotein B gerichtet und mit einer Peroxidase konjugiert. Die Reaktion dieser Peroxidase mit Tetramethylbenzidin führt zu einer Färbung, deren Intensität spektrometrisch (DYNATECH MR 5000) bei 450 nm gemessen wird.

Anzahl der Tests: 96 Test-wells pro Platte (für 40 Patienten, zwei Kontrollen und sechs Standardproben, jeweils in doppelter Ausführung).

Die Sensitivität des Tests beträgt $< 1 \text{ mU/l}$. Der Intra/Inter-Test-Fehler liegt bei $< 8\%$ / $< 6\%$.

Das Kit wird bei $2-8^\circ \text{C}$ aufbewahrt und ist nach Öffnen einen Monat haltbar.

3.3.5.2 Notwendige Materialien:

A. Im Kit enthalten:

Antikörper

- Anti-oxidiertes LDL Mikrotitrations-Strips (8 wells pro Streifen), 1 Platte = 96 wells
- Anti-ApoB Konjugat-Lösung (lichtsensibel) 1 Fläschchen à 1,2 ml

Standard- und Kontroll-Proben (nach Rekonstitution vier Tage bei 2-8 °C haltbar)

- Oxidierte LDL-Standards (lyophilisiert), 4 Fläschchen
- Oxidierte LDL-Standards (Standard 0): 1 ml
- Oxidierte LDL-Kontrollen lyophilisiert (low und high Konzentrationen auf den Fläschchen)

Pufferlösungen

- Proben-Puffer, 2 Flaschen à 100 ml
- Assay-Puffer, 1 Fläschchen à 12 ml
- Konjugat-Puffer, 1 Fläschchen à 12 ml

Sonstiges

- Enzyme konjugat, 11 Fläschchen à 1,2 ml
- Waschlösungs-Konzentrat, 1 Fläschchen à 40 ml
- Peroxidase-Substrat (TMB), 1 Fläschchen à 22 ml
- Stop-Lösung (1 M H₂SO₄), 1 Fläschchen à 7 ml

B. Nicht im Kit enthalten:

- Mikropipette mit Einmalspitzen
- Mehrkanalpipetten 50 ,100,200, 1000 µl
- Becherglas 1000 µl
- Saugfähiges Papier
- Re-destilliertes Wasser
- Test-Röhrchen 3,5 ml
- DYNATECH Plate-Reader mit 450 nm Filter
- Revelation, Auswertungssoftware für Microplate Reader, DYNATECH, Canada)
- Platten-Schüttler (Fa. DYNATECH, Canada)
- Waschvorrichtung für Mikrotitrations-Platten

3.3.5.3 Durchführung

25 µl frisches Patientenplasma werden wie folgt verdünnt: Im ersten Schritt werden zu den 25 µl Plasma 2000 µl Proben-Puffer gegeben. Es ergibt sich einen Verdünnungsfaktor von 1:81. Diese

Reaktionslösung ist stabil für einen Tag. Im zweiten Schritt werden aus der so verdünnten Lösung 25 µl entnommen und wiederum mit 2000 µl Proben-Puffer verdünnt. Insgesamt beträgt der Verdünnungsfaktor 1:6561. Die Stabilität der Lösung ist bei 2-8 °C für vier Tage gegeben. Jede Messung erfolgt in Doppelbestimmung. Für jeden Durchlauf wird eine Standardkurve erstellt.

Von den verdünnten Proben werden 25 µl mit 100 µl Assay-Puffer zusammen in die Test-wells gegeben und zwei Stunden auf dem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Die Testfelder werden sechsmal mit jeweils 350 µl Waschlösung gewaschen, und nach jedem Waschen abgesaugt ohne den Plattenboden und Ränder zu berühren. Nach dem letzten Waschen wird die Platte über saugfähigem Papier ausgeklopft. Auf diese Weise werden die nicht gebundenen Stoffe herausgelöst.

Für die nächste Inkubationsrunde wird vor dem Testanfang eine gebrauchsfertige Konjugat-Lösung wie folgt hergestellt: Pro Streifen werden 100 µl Anti-ApoB Konjugat-Lösung mit 1 ml Konjugat-Puffer gemischt. Diese Lösung ist bis zu vier Wochen nach Herstellung bei 2-8°C haltbar.

Die Platte wird nun mit dieser Lösung, 100 µl pro well, auf dem Schüttler eine Stunde lang bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgt erneuert sechsmaliges Waschen mit jeweils 350 µl Waschlösung sowie Absaugen nach jedem Waschen. Nach dem letzten Waschen wird die Platte wie zuvor über saugfähigem Papier ausgeklopft.

In einem weiteren Schritt werden 200 µl Peroxidase-Substrat hinzugegeben und 15 Minuten ohne Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Hierbei kommt es zu einer Gelbfärbung.

Abschließend wird die Platte mit 50 µl Stop-Lösung über 15 Sekunden auf dem Schüttler inkubiert und dann gemessen.

Die Absorption der einzelnen Test-wells wird nun im DYNATECH Plate Reader mit 450 nm Filter gemessen.

Zur Berechnung der Konzentrationswerte aus den Absorptionswerten wird zunächst mit Hilfe der Auswertungs-Software „Revelation“ eine Standardkurve (Konzentration vs. Absorption) mit den Werten der mitgemessenen Standard-Proben erstellt. Die Probenkonzentrationen werden anschließend vom Programm mit Hilfe dieser Kurve berechnet und vom Gerät ausgegeben.

3.3.6 Verhältnis aus reduziertem und oxidiertem Glutathion (GSH/GSSG)

Diese Messung basiert auf einer Arbeit von Afzal et al.⁵⁵ Hier wurde eine einfache und valide HPLC-UV-Methode zur direkten Bestimmung von GSH und GSSG in kleinen Plasmaproben angewandt. Bei dieser Messung ist die vorherige Bildung von Derivaten nicht mehr notwendig.

3.3.6.1 Beschreibung

Das Glutathion (GSH) und Glutathiondisulfid (GSSG) sind biologisch wichtige intrazelluläre Thiole. Veränderungen des GSH/GSSG-Quotienten werden häufig benutzt um den oxidativen Stress abzuschätzen, dem die Zellen ausgesetzt sind. GSH spielt eine wichtige Rolle beim Abbau freier Radikale und schützt die Zellen vor verschiedenen toxischen Produkten des Sauerstoff-Stoffwechsels. Ein ständiges Angebot von reduziertem Glutathion ist notwendig um Schäden an Zellmembranen durch die spontane Oxidation von SH-Gruppen zu beheben.

Gleichzeitig ist GSH ein wichtiges Co-Enzym der Glutathion-Peroxidase und es schützt SH-Gruppen von Proteinen vor Oxidation. Bei diesen Reaktionen wird GSH zu GSSG oxidiert und durch Glutathion-Reduktase zu GSH regeneriert.

Auf diese Weise werden die Konzentrationen der Produkte der Lipid-Peroxidation in der Zelle reguliert, so dass der GSH/GSSG-Quotient ein Indikator des oxidativen Stresses ist.⁴⁹ Des Weiteren ist GSH ein essentieller Co-Faktor vieler Enzyme und ist an vielen Zellfunktionen, wie beispielsweise der Regulation von Protein- und DNA-Synthese beteiligt.

GSH und GSSH wurden durch verschiedene Methoden gemessen. Am häufigsten kommt eine Methode zum Einsatz, die GSH, GSSG und deren Derivate mittels UV-Analyse misst.⁵⁶⁻⁵⁸ Eine fluoreszenzoptische Methode ist ebenfalls verfügbar.⁵⁹ In vielen Arbeiten wurde die Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (high-performance liquid chromatography = HPLC) zur Quantifizierung von GSH und GSSG eingesetzt, wobei ein Phosphatpuffer mit einem komplexeren elektrochemischen Nachweis zum Einsatz kommt.^{60,61}

Als weiteres Verfahren ist eine Ionenaustauscher-Chromatographie beschrieben worden.⁶²

Es stehen zwar verschiedene Methoden für die Bestimmung von GSH und GSSG zur Verfügung, aber diese haben Nachteile wie die Notwendigkeit der Bildung von Derivaten zur Messung; die Unfähigkeit gleichzeitig GSH und GSSG adäquat zu messen und die fehlende Sensitivität bei kleinen Proben.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Methode ist eine einfache und valide HPLC-UV-Methode, die zur direkten Bestimmung von GSH und GSSG in kleinen Plasmaproben eingesetzt werden kann. Die vorherige Bildung von Derivaten ist nicht mehr notwendig.⁵⁵

3.3.6.2 Notwendige Materialien

Instrumente und Geräte:

- HPLC-Gradienten-Pumpe Merck L-6200A (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland)
- UV-Vis Detector, L-4250
- Auto sampler Merck AS-4000
- Systemsteuerungs- und Auswertungs-Software Chromeleon 6.3 (Fa. Dionex, Idstein, Deutschland)
- RP-18-Säule YMC-Pack ODS-AQ 250 x 4,0 mm i.d. (Fa. YMC Europe GmbH, Schermbeck, Deutschland)

Reagenzien und Zubehör:

- HPLC-ACN-Gradient Grad (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Trifluoracidsäure mind. 98% (Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- Reverse-phase (RP) Sep-Pak Kartuschen für die Extraktion der soliden Phase (SPE-Kartuschen), Discovery DSC 10 (Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- Metaphosphorsäure verdünnt (33,5%) (Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- Eichgrade: Glutathione reduced min. 99% , Glutathione oxidized form approx. 98% (Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

3.3.6.3 Durchführung

Standardpräparation

2 mM Lösung von GSH und GSSG wird in 0,1% Trifluor-Essigsäure (TFA) gegeben. Jede Standardprobe wird mehrfach verdünnt um die Standardkurve zu erstellen. 20 µl der verdünnten Proben werden auf eine C-18 Säule injiziert. Dabei verwendet man eine mobile Phase des Acetonitril: (0,1%) TFA (30:70) mit einer Durchflussrate 1.0 ml/min.

Probenvorbereitung:

0,2 ml Plasma werden 1:2 mit Metaphosphorsäure gemischt, um die Oxidation von GSH zu GSSG zu hemmen. Die Lösung wird bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert und anschließend fünf Minuten bei 10.000 g zentrifugiert. Der Überstand durchfließt die C-18 Sep-Pak-Kartusche, die einer Vorwäsche mit Methanol unterzogen wurde. Die Kartusche wird mit

0,1% TFA ausgewaschen und in eine C-18 Säule (ODS) für HPLC-Analyse injiziert (Acetonitril 0,1%, TFA 30:70, mit 1,0 ml/min Durchflussrate).

HPLC-Separation:

Diese Methode bedarf keiner vorherigen Bildung von Derivaten des Glutathions. GSH und GSSG werden von der Säule ausgewaschen und bei einer Wellenlänge von 210 nm gemessen. Die Retentionszeit des reduzierten und oxidierten Glutathions wird jeweils bei 2,8 und 4,1 Minuten registriert. Die Nachweisgrenze des GSH liegt bei 100 pmol mit einer akzeptablen Genauigkeit. Die ‚recovery‘/Wiederfindungsrate bei zugesetztem GSH und GSSG beträgt 97-100%. Die Zugabe von frischer Standardlösung von GSH oder GSSG zu Proben führt zu einer entsprechenden Vergrößerung der Peak-Fläche, ohne zu einer Veränderung von Peak-Form, Retentionszeit oder Peak-Fläche des jeweils anderen Thiols zu führen.

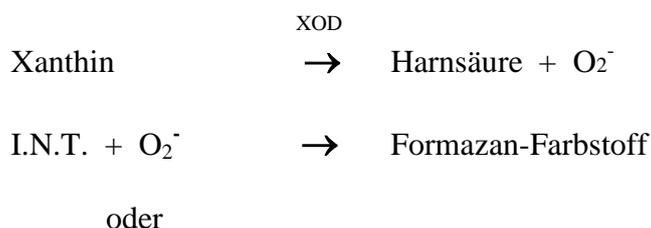
Ergebnisse:

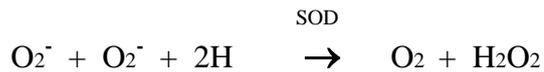
Die Quantifizierung der gemessenen Absorptionen erfolgt durch Ablesen aus der erstellten Standardkurve.

3.3.7 Superoxid-Dismutase

3.3.7.1 Beschreibung:

Die Superoxid-Dismutase (SOD) beschleunigt die Umwandlung von Superoxidanionen (O_2^-), hochreaktiven und zerstörend wirkenden Radikalen, die sich bei oxidativen Energieprozessen bilden, zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und O_2 . Diese Methode benutzt Xanthin und Xanthin-Oxidase (XOD), um Superoxidanionen zu erzeugen, welche mit 2-(Iodophenyl)-3-(4-Nitrophenol)-5-phenyltetrazolium-chlorid (I.N.T.) zu einem roten Formazan-Farbstoff reagieren. Die SOD-Aktivität wird dann vom Grad der Hemmung dieser Reaktionen gemessen. Eine Einheit (U) SOD ist die Menge, die unter den gegebenen Testbedingungen eine fünfzigprozentige Hemmung der Reduktionsrate von I.N.T. verursacht.⁶³





3.3.7.2 Notwendige Materialien

Im Kit enthalten:

- Gemischtes Substrat (Xanthin 0,05 mmol/l; I.N.T. 0,025 mmol/l)
- Puffer (CAPS 40 mmol/l pH 10,2; EDTA 0,94 mmol/l)
- Xanthin-Oxidase: 80 U/l
- Standard (verschiedene Werte)

Nicht im Kit enthalten:

- Verdünnungsmittel (0,01 mol/l Phosphatpuffer, pH 7,0)
- RANSOD-Kontrolle (RANDOX, Kat. Nr. SD 126)

3.3.7.3 Durchführung:

Es werden Heparin- oder EDTA-Vollblutproben verwendet.

Probenvorbereitung: Es wird 0,5 ml der Vollblutprobe bei 3.000 rpm über zehn Minuten zentrifugiert und das Plasma entfernt. Die Erythrozyten werden viermal mit 3 ml 0,9 prozentiger NaCl-Lösung gewaschen und nach jedem Waschen zehn Minuten bei 3.000 rpm zentrifugiert. 0,5 ml der zentrifugierten und gewaschenen Erythrozyten werden mit 0,5 ml destilliertem Wasser aufgefüllt, gemischt und bei +4 °C für 15 Minuten stehen gelassen. Danach werden die Proben bei –80 °C eingefroren. Vor Weiterbearbeitung werden diese schonend in/auf Eis aufgetaut.

Das Lysat wird mit 0,01 mol/l Phosphat Puffer pH 7,0 verdünnt, so dass die Hemmung zwischen 30% und 60% fällt. Eine 25-fache Verdünnung des Lysats wird für Humanseren (End-Verdünnungsfaktor 100) durchgeführt.

Den Inhalt eines Fläschchens gemischten Substrates mit 20 ml des gebrauchsfertigen Puffers lösen. Diese Lösung ist zehn Tage bei 2-8 °C haltbar. Der Flascheninhalt der Xanthin-Oxidase wird in 10 ml Aqua bidest. gelöst. Die Haltbarkeit beträgt zwei Wochen bei 2-8 °C. Der mitgelieferte Standard wird mit 10 ml Aqua bidest. gelöst und nach vorgegebenem Schema mit Ransod-Verdünnungsmittel verdünnt, um eine Standardkurve zu erstellen.

In Küvetten mit 1 cm Schichtdicke und 1 ml Volumen werden jeweils 12,5 µl der verdünnten Proben bzw. der Standards pipettiert. Es werden jeweils 425 µl gemischtes Substrat

hinzugegeben. Nach guter Durchmischung werden 62,5 µl Xanthin-Oxidase hinzugegeben und erneut gemischt. Die Absorptionsmessung erfolgt bei einer Wellenlänge von 505 nm. Die Messung erfolgt bei 37 °C gegen Luft. Nach 30 Sekunden wird die Anfangsabsorption A_1 abgelesen. Die Endabsorption A_2 wird nach drei Minuten abgelesen.

Berechnung:

$$(A_2 - A_1) / 3 = \Delta A \text{ Standard oder Probe/min}$$

Verdünnungsmittelrate (S1 Rate) = ungehemmte Reaktionsrate \approx 100%

Alle Standardraten und verdünnte Proberaten werden in Prozent konvertiert und von 100% subtrahiert, um die prozentuale Hemmung zu erhalten.

$$(100 - \Delta A \text{ Standard/min} \times 100) / \Delta A \text{ S1/min} = \% \text{ Hemmung}$$

$$(100 - \Delta A \text{ Probe/min} \times 100) / \Delta A \text{ S1/min} = \% \text{ Hemmung}$$

Die prozentuale Hemmung jeden Standards wird gegen Log_{10} (Standardkonzentration in SOD U/ml) aufgetragen.

$$\text{SOD U/ml des Vollblutes} = \text{SOD U/ml der Standardkurve} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Konvertierung:

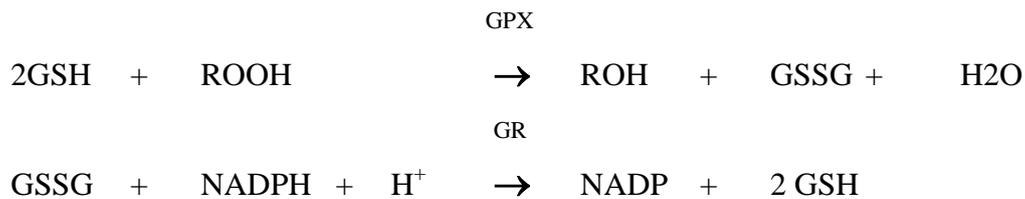
$$\text{SOD U/g Hämoglobin} = \text{SOD U/ml} / \text{g Hämoglobin/ml} = \text{SOD U/g Hämoglobin}$$

3.3.8 Glutathion-Peroxidase

3.3.8.1 Beschreibung:

Die Glutathion-Peroxidase katalysiert in vitro die Oxidation von reduziertem Glutathion und spielt damit eine wichtige Rolle in der Entgiftung von Hydrogen-Peroxid.

Diese hier angewandte Bestimmungsmethode basiert auf der Vorarbeit von Paglia und Valentine.⁶⁴ Glutathion-Peroxidase (GPX) katalysiert die Oxidation von Glutathion (GSH) zu Cumol-Hydroperoxid. In Anwesenheit von Glutathion-Reduktase (GR) und NADPH wird das oxidierte Glutathion (GSSG) sofort wieder in die reduzierte Form umgewandelt, dabei wird NADPH zu NADP oxidiert.



3.3.8.2 Notwendige Materialien:

Im Kit enthalten:

- Reagenz (Glutathion 4 mmol/l, Glutathion-Reduktase > 0,5 U/l, NADPH 0,34 mmol/l)
- Puffer (Phosphat-Puffer 0,05 mol/l pH 7,2, EDTA 4,3 mmol/l)
- Cumol-Hydroperoxid (0,18 mmol/l)
- Verdünnungsmittel

Nicht im Kit enthalten:

- Ransel Kontrolle (RANDOX, Kat. Nr. SC 692)
- Destilliertes Wasser
- Drabkin's Reagenz (RANDOX, Kat. Nr. MS 181)

3.3.8.3 Durchführung:

Ein Fläschchen Drabkin's Reagenz wird mit 480 ml destilliertem Wasser verdünnt (doppelt konzentriert) und die Lösung im Dunkeln gelagert. Sie ist maximal sechs Monate oder bis zum Verfallsdatum bei +15 bis +25 °C haltbar.

0,05 ml Heparin-Vollblut werden mit 1 ml Verdünnungsmittel verdünnt. Nach fünfminütiger Inkubation wird 1 ml des doppelt konzentrierten Drabkin's Reagenz dazugegeben und gut gemischt. Durch das Verdünnungsmittel wird Glutathion-Peroxidase in die reduzierte Form überführt. Dies verhindert ihre rasche Inaktivierung durch das Zyanid des Drabkin's Reagenz. Die sonstigen Peroxidasen im menschlichen Vollblut werden durch das zugesetzte Zyanid gehemmt, damit sie bei der folgenden Messung nicht zu falsch positiven Werten führen.⁶⁵

Die Proben werden innerhalb von 20 Minuten nach Zugabe der Drabkin's Reagenz getestet. Der Inhalt eines Fläschchens ‚Reagenz‘ (siehe 3.3.8.2) wird mit dem entsprechenden Volumen des gebrauchsfertigen Puffers gelöst. Die Lösung ist 48 Stunden bei +2 bis +8 °C oder acht Stunden bei +15 bis +25 °C haltbar. 10 µl Cumol-Hydroperoxid werden mit 10 ml Aqua bidest. verdünnt

und gut gemischt. Die Lösung wird kräftig geschüttelt, da sich die Cumole schwer auflösen. Das so hergestellte Konzentrat ist bei +2 bis +8 °C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.

Der Inhalt eines Fläschchens Verdünnungsmittel wird in 200 ml Aqua dest. aufgelöst. Die Haltbarkeit des Verdünnungsmittels beträgt vier Wochen bei +2 bis +8 °C oder drei Tage bei 15 bis 25 °C.

In Küvetten mit 1 cm Schichtdicke und 1 ml Volumen werden jeweils 10 µl verdünnte Probe bzw. Aqua dest. für den Reagenzien Leerwert pipettiert. Es werden zusätzlich 500 µl Reagenz und 20 µl Cumol dazugegeben. Die Absorptionsmessung erfolgt bei einer Wellenlänge von 340 nm. Die Messungen werden bei 37°C gegen Luft durchgeführt. Die Lösungen werden gut durchmischt und nach einer Minute die Anfangsextinktion des Reagenzienleerwerts und der Proben abgelesen. Zwei weitere Ablesungen erfolgen in Abständen von jeweils einer Minute.

Berechnung:

Der Reagenzleerwert wird vom Probenwert subtrahiert. Die Glutathion-Peroxidase-Konzentration wird mit folgender Formel unter Berücksichtigung der durchgeführten Verdünnungen berechnet:

$$\text{U/l des Hämolyats} = 8412 \times \Delta E \text{ 340 nm/Minute}^{53}$$

Folgende Parameter wurden im Institut für Labormedizin und Pathobiochemie der Charité, Berlin nach standardisierten Labormethoden bestimmt:

Hämoglobin und Hämatokrit wurden aus EDTA-Blutproben mittels photometrischer Fluss-Cytometrie (XE 2100, Sysmex, Kobe, Japan) bestimmt.

C-reaktives Protein und Lp(a) wurden in Plasma mittels immunoturbidimetrisches Assay (CRP-Dynamic, Invicon, München, am Modular P Analyser und Lp(a), Roche, am Integra 400 Analyser, Roche, Mannheim) gemessen.

Die Messung des Gesamthomocysteins erfolgte aus Plasma mittels Chemilumineszenz-Immunoassay (Centaur, Siemens, Bad Nauheim, Deutschland).

3.4 Nichtinvasive Gefäßparameter

3.4.1 Messung der Intima-Media-Dicke

3.4.1.1 Beschreibung

Die Intima-Media-Dicke (Intima-Media-Thickness = IMT) steigt mit zunehmendem Alter an. Eine gleichmäßige Verdickung der inneren Gefäßwände kann als ein normaler Alterungsvorgang gesehen werden. Bei einigen Individuen steigt die Dicke jedoch schneller an, als bei anderen. Hämodynamische Faktoren spielen eine entscheidende Rolle für die Ausprägung der IMT. Verdickungen können eine Antwort der Gefäßwand auf Veränderungen des Flusses, der Spannung und auftretenden Scherkräfte sein, als Maßnahme, um wieder normale Flussvoraussetzungen herzustellen. Natürlich treten in den Gefäßen des Körpers an verschiedenen Stellen, z. B. an Bifurkationen, stärkere Scherkräfte auf, als an anderen und damit auch stärkere Veränderung der IMT im Laufe der Zeit. An diesen Lokalisationen bilden sich häufig auch die ersten arteriosklerotischen Veränderungen, je nachdem, ob hohe Spiegel an atherogenen Lipoproteinen vorliegen.

3.4.1.2 Durchführung

Die Untersuchung wurde mit einem Ultraschallgerät der Firma Hitachi (EUB 525 Computersonograph) und mit einem 7,5 MHz Trapez-Linear Schallkopf durchgeführt. Zur Untersuchung wird das im Gerät angebotene Einstellungsmuster für die Darstellung der Arteria carotis gewählt. Der Patient bzw. Proband liegt während der Untersuchung mit leicht überstrecktem Kopf auf dem Rücken. Der Kopf wird mit einem Winkelkissen um 45° in die der Untersuchungsseite entgegengesetzten Richtung gedreht. Die Darstellungen der Arterien erfolgen im B-Modus. Die Untersuchungen werden mit einem Photodrucker (Mitsubishi P91i) dokumentiert. Gleichzeitig erfolgt eine Aufzeichnung auf einem S-VHS Videorecorder (JVC). Längsschnittaufnahmen der Arteriae carotides communes und der Arteriae carotides internae werden jeweils in zwei Ebenen (anterolateral/lateral) und im Zoom-Modus (2,5fache Vergrößerung) aufgezeichnet. Die Messungen erfolgen in der Diastole. Die Messstelle liegt etwa 1 cm unterhalb des Bulbus caroticus (Abb. 3). Auf beiden Halsseiten werden jeweils vier Messungen der IMT an der schallkopffernen Wand durchgeführt. Deutlich erkennbare Plaques werden nicht in die Messung mit einbezogen. Zur Messung der IMT werden Messpunkte an die Lumen-Intima- und Media-Adventitia-Grenzschicht gesetzt. Der sogenannte „Grenzzonenreflex“, ein physikalisch bedingtes Artefakt, liefert hierbei eine charakteristische

Echostruktur. Eine homogene echoarme Zwischenschicht wird von echoreichen Außen- und Innenschichten begrenzt. Die Innenschicht entspricht in etwa der Lumen-Intima-Grenzschicht. Der Abstand zwischen den beiden Grenzschichten entspricht der Intima-Media-Dicke. Dieser Abstand wird mit einem integrierten Messprogramm berechnet. Für jeden Patienten wird ein Mittelwert aus den drei Messungen beider Seiten berechnet. Bei einem gesunden Probanden ist eine $IMT < 0,8$ mm zu erwarten. In der Querschnittsaufnahme wird zusätzlich der innere Querdurchmesser der Arterien ermittelt.^{66,67}

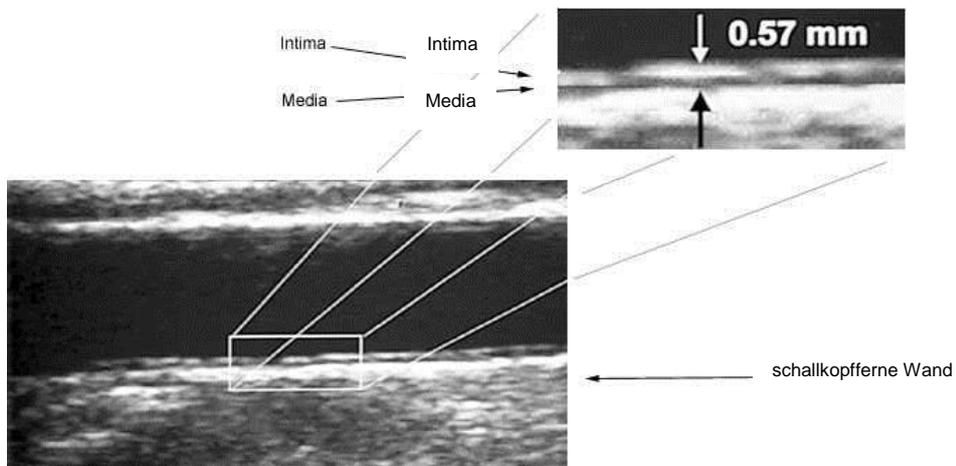


Abbildung 3: Arteria carotis communis: die Intima-Media-Dicke wird an der schallkopffernen Gefäßwand etwa 1 cm proximal des Bulbus caroticus gemessen. Übernommen aus⁶⁸

3.4.2 Plethysmographie

3.4.2.1 Beschreibung

Durch die venöse Okklusions-Plethysmographie kann der Blutfluss im Arm oder im Bein mittels Volumenzunahme der zu messenden Extremität bei kurzzeitiger und temporärer Unterbrechung des Venenflusses gemessen werden.⁶⁹ Ermittelt wird der Blutfluss in der jeweiligen Extremität in ml/100 ml Körpergewebe/min. Die Messungen wurden mit einem Compactus-Gerät (Gutmann-Medizinelektronik, Deutschland) durchgeführt.

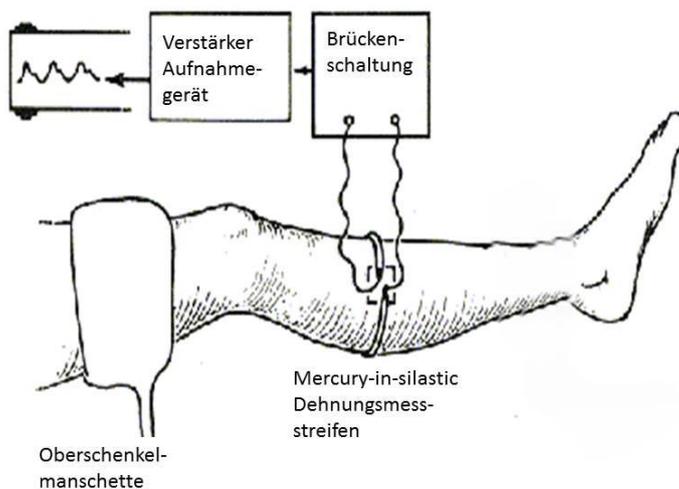


Abbildung 4: Versuchsaufbau der venösen Okklusions-Plethysmographie am Bein. Modifiziert nach Sumner DS, 1985.⁶⁹

3.4.2.2 Durchführung

Beide Unterschenkel werden in Herzniveau und nicht aufliegend gelagert. Eine pneumatische venöse Okklusionsmanschette wird um den Oberschenkel angelegt und an ein automatisches Aufblasgerät angeschlossen. Ein mit Quecksilber gefüllter dehnbarer Gummi-Messschlauch (mercury strain gauge) wird an die breiteste Stelle des Unterschenkels angelegt (Abb. 4). Nach der Kalibrierung wird die Okklusionsmanschette auf 60 mmHg für wenige Sekunden aufgeblasen, um den venösen Fluss zu unterbinden und die Ausgangswerte (Ruhewerte) des Blutflusses zu erhalten (Abb. 5 a). Zur Ermittlung der endothelabhängigen Gefäßfunktion wird eine fünfminütige Ischämie in der Extremität produziert. Dazu wird die Blutdruckmanschette oberhalb der Messstelle fünf Minuten lang auf 50 mmHg über den systolischen Blutdruck aufgepumpt, um jeglichen Blutfluss zu verhindern. Nach Ablassen der Manschette entsteht eine reaktive Hyperämie. Die durch die endothelabhängigen Veränderungen des Blutflusses folgende Hyperämie im Unterschenkel wird nach einem standardisierten Protokoll gemessen. Nach der

Dauer der Ischämie wird die Manschette abgelassen und danach erneut für wenige Sekunden auf 60 mmHg aufgeblasen, um den arteriellen Unterschenkel-Blutfluss zu messen. Diese Messung wird dann alle zehn Sekunden insgesamt fünfmal wiederholt (Abb. 5 b).¹²

Die folgenden Parameter werden ermittelt:

- der postischämische Spitzenfluss (postischemic peak flow) während der reaktiven Hyperämie in ml/100 ml/min und in Prozent des basalen UBF (Unterschenkelblutfluss)
- Die unter der Kurve liegende Fläche (area under the curve = AUC)

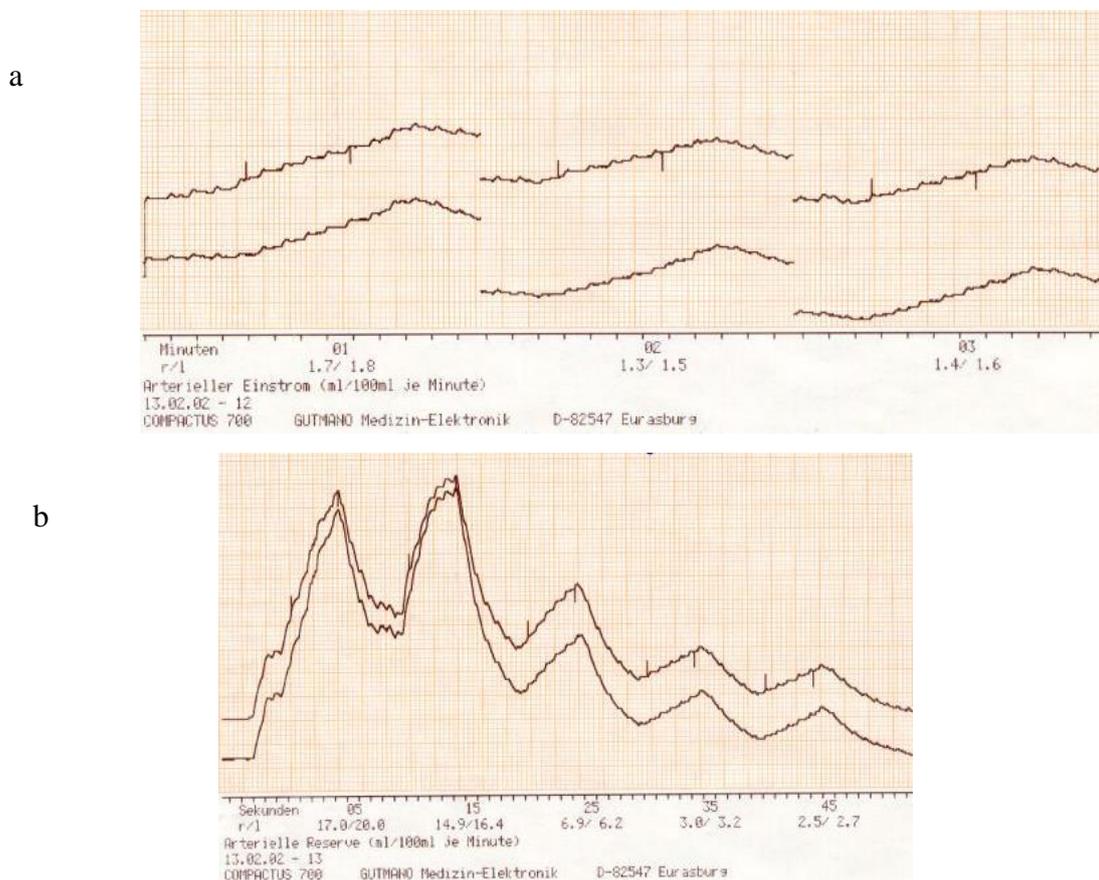


Abbildung 5: Typische Registrierung des postischämischen Flusses an den unteren Extremitäten beim Gesunden: (a) Ruhedurchblutung, (b) reaktive Hyperämie nach fünf Minuten andauernder Ischämie. (Gerät: Compactus, Gutmann-Medizintechnik, Deutschland)

3.5 Statistik

Die Auswertung erfolgte mit dem SAS-Programmpaket (v 8.0) und SigmaPlot.

Inter-Gruppenvergleiche wurden mit einer nicht-parametrischen ANOVA nach Kruskal-Wallis, gefolgt von einem Duncan-Test für multiple Bereiche untersucht.

Vergleiche zwischen den beiden Methoden (ELISA/konjugierte Diene) wurden mit einem Wilcoxon-Test für Paardifferenzen gerechnet.

Für univariate Analysen der klinischen Parameter mit den vaskulären Endpunkten als Endpunkt wurde der Spearman Rangkorrelationskoeffizient berechnet. Multiple lineare Regression mit schrittweiser Selektion wurde verwendet, um Korrelationen der gemessenen Variablen mit den vaskulären Endpunkten zu analysieren. Der diskriminative Wert der klinischen Variablen wurde mittels multipler logistischer Regression bestimmt.

4 Ergebnisse

4.1 Basaldaten der Patienten und Kontrollen

In den folgenden Tabellen sind die Grundkrankheiten der teilnehmenden Hämodialysepatienten und die klinischen Basaldaten der HD-Patienten und Kontrollprobanden aufgeführt:

Tabelle 1: Grundkrankheiten der an der Studie teilnehmenden Hämodialysepatienten

Grundkrankheiten	Anzahl der Patienten	Prozent
Glomeruläre Erkrankungen	8	32 %
Uropathie, Nierenhypo/-dysplasie	8	32 %
Vaskulitis	3	12 %
Polyzystische Nierenerkrankung	1	4 %
Renale Amyloidose	1	4 %
Unbekannt	4	16 %

Tabelle 2: Klinische Basaldaten von Hämodialysepatienten und Kontrollgruppe
[Mittelwert \pm SD]

Charakteristika	HD-Patienten	gesunde Kontrollen
Geschlecht (männlich / weiblich)	17 / 8	17 / 8
Alter [Jahre] +/-SD	30,8 \pm 5,3	30,9 \pm 5,7
Spannweite	(18,6 - 39,7)	(18,7 - 40,4)
Körpergröße [cm] +/-SD	172,1 \pm 8,0	177,5 \pm 10,6
Gewicht [kg] +/-SD	69,7 \pm 16,5	73,6 \pm 13,1
Body mass Index [kg/m ²] +/-SD	23,6 \pm 6,4	23,2 \pm 2,8
Hypertonus (Ja / Nein)	13 / 12	0 / 25
Rauchen (Ja / Nein)	11 / 14	11 / 14
[pack years] +/-SD	3,8 \pm 6,4	2,4 \pm 3,5
Ovulationshemmer (Ja / Nein)	2 / 6	2 / 6
Lipidsenker (Ja / Nein)	3 / 22	0 / 25
Dialysedauer [Jahre] +/-SD	4,1 \pm 3,5	0

HD = Hämodialyse; **m/w** = männlich/weiblich; () = Die Zahlen in runden Klammern geben den Bereich an;

SD = Standardabweichung

4.2 Lipidstoffwechsel und Lipidoxidation

4.2.1 Triglyzeride und Cholesterin

Die Serumspiegel der Triglyzeride waren bei den urämischen Patienten signifikant höher als bei den gesunden Kontrollen (186 ± 77 vs. 120 ± 50 mg/dl; $p = 0,0007$). Dies lag hauptsächlich an einer Erhöhung in der VLDL-Fraktion (124 ± 67 vs. 71 ± 46 mg/dl; $p = 0,0004$). Die Triglyzeride im Unterstand (LDL- und HDL-Fraktion) zeigten keinen signifikanten Unterschied (76 ± 53 vs. 60 ± 12 mg/dl; $p = \text{n.s.}$) (Abb. 6).

Beim Gesamtcholesterin (164 ± 37 vs. 167 ± 34 mg/dl; $p = \text{n.s.}$) sowie beim Cholesterin in der LDL-Fraktion (85 ± 28 vs. 89 ± 22 mg/dl; $p = \text{n.s.}$) zeigten sich keine Unterschiede, wobei bei den Patienten die Werte in der VLDL-Fraktion erhöht (47 ± 22 vs. 34 ± 14 mg/dl; $p = 0,01$) und in der HDL-Fraktion erniedrigt waren (39 ± 8 vs. 52 ± 9 mg/dl; $p < 0,0001$) (Abb. 6).

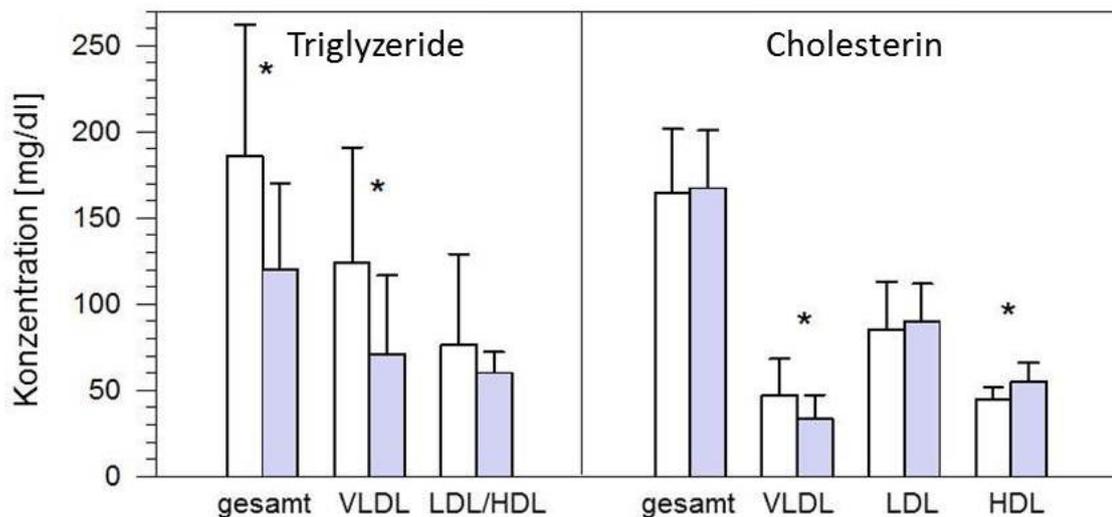


Abbildung 6: Konzentrationen von Triglyzeriden und Cholesterin in den Lipoproteinfraktionen bei Hämodialysierten (weiß) im Vergleich zu gesunden Kontrollen (grau). * = signifikante Unterschiede ($p < 0,05$)

4.2.2 Apolipoprotein B (Apo B)

Das Gesamt-Apo B war bei Hämodialysepatienten und gesunden Kontrollen vergleichbar. (73 ± 20 vs. 70 ± 20 mg/dl; $p = \text{n.s.}$) (Abb. 7). Bei Berechnung mit Hilfe der Cholesterinkonzentrationen in den Fraktionen zeigte sich bei den Patienten eine signifikante Erhöhung der Apo B in der VLDL-Fraktion (20 ± 8 vs. 13 ± 6 mg/dl; $p < 0,0001$). In der LDL- (38 ± 14 vs. 38 ± 13 mg/dl; $p = \text{n.s.}$) und in der HDL-Fraktion (17 ± 4 vs. 19 ± 3 mg/dl; $p = \text{n.s.}$) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (Abb. 7).

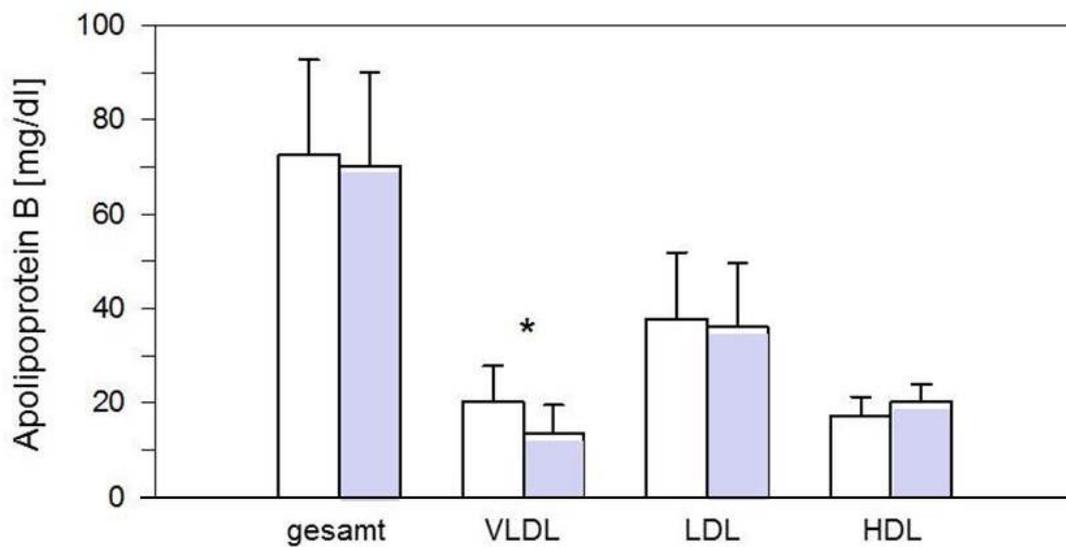


Abbildung 7: Konzentrationen von Apolipoprotein B in den Lipoproteinfraktionen bei Hämodialysierten (weiß) im Vergleich zu gesunden Kontrollen (grau).

* = signifikanter Unterschied ($p < 0,05$)

4.2.3 Oxidierte low-density Lipoproteine (LDL)

Die oxidierten Lipoproteine waren bei den Hämodialysepatienten tendenziell höher als bei den gesunden Kontrollen, der Unterschied war jedoch nicht signifikant (47 ± 14 vs. 40 ± 16 U/l; $p = 0,18 = \text{n.s.}$; Abb. 8).

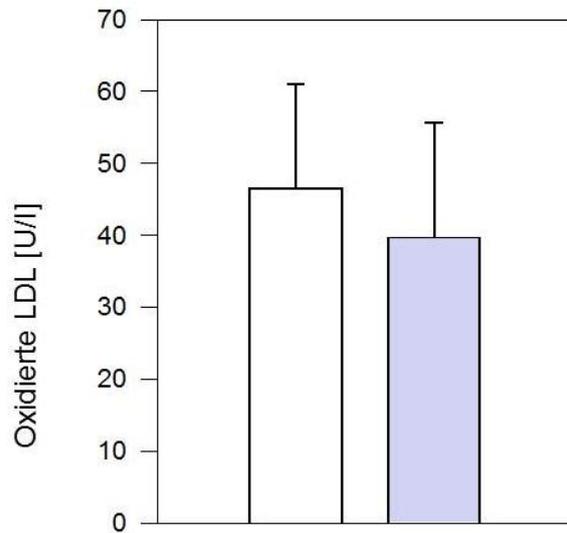


Abbildung 8: Konzentrationen der oxidierten low-density Lipoproteine (LDL) bei Hämodialysierten (weiß) im Vergleich zu gesunden Kontrollen (grau). Unterschied nicht signifikant ($p = 0,18$).

4.2.4 Konjugierte Diene

Die konjugierten Diene in der VLDL-Fraktion waren bei den Hämodialysepatienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen erhöht (20 ± 6 vs. 12 ± 5 $\mu\text{mol/l}$; $p < 0,0001$). In der LDL-Fraktion hingegen zeigte sich kein signifikanter Unterschied (16 ± 6 vs. 18 ± 6 $\mu\text{mol/l}$, $p = 0,297 = \text{n.s.}$; Abb. 9).

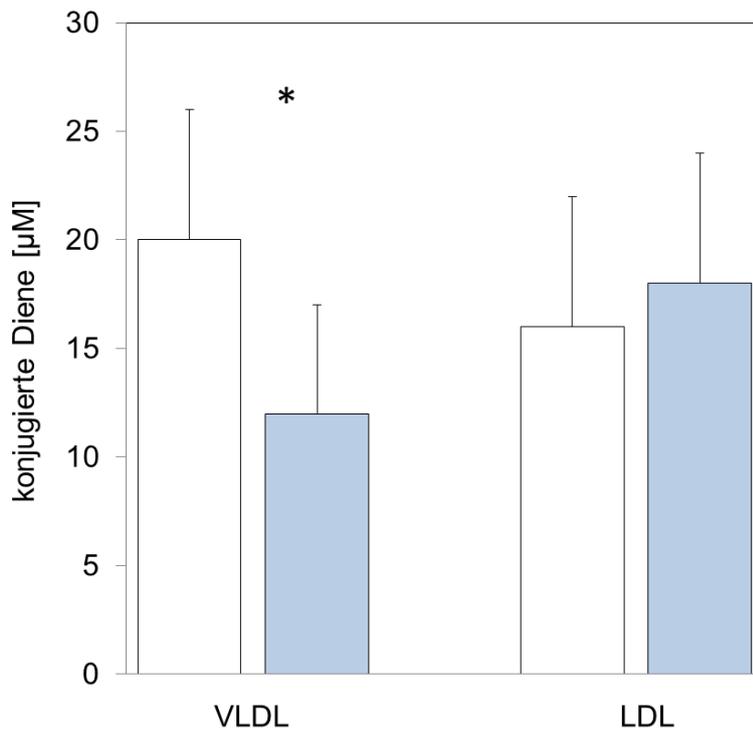


Abbildung 9: Konzentrationen der konjugierten Diene in der VLDL- und LDL-Fraktion bei Hämodialysierten (weiß) im Vergleich zu gesunden Kontrollen (grau). * = signifikanter Unterschied ($p < 0,05$).

4.2.5 Verhältnis aus reduziertem und oxidiertem Glutathion (GSH/GSSG)

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den GSH-Konzentrationen ($274,9 \pm 89,5$ vs. $235,6 \pm 50,2$ $\mu\text{g/ml}$; $p = 0,154$). Die oxidierte Form von Glutathion (GSSG) war bei den Hämodialysepatienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen signifikant erhöht ($60,4 \pm 33,5$ vs. $29,8 \pm 7,8$ $\mu\text{g/ml}$; $p < 0,0001$; Abb. 10).

Die GSSG/GSH-Ratio war bei den Hämodialysepatienten signifikant höher als bei den gesunden Probanden ($0,25 \pm 0,18$ vs. $0,13 \pm 0,04$; $p = 0,005$).

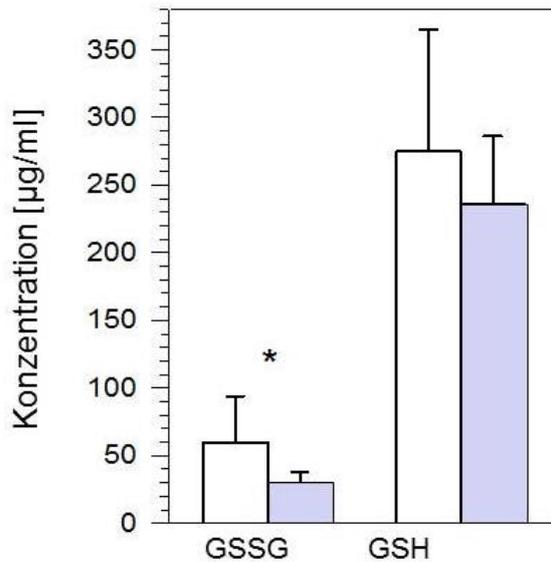


Abbildung 10: Konzentrationen von GSSG und GSH bei Hämodialysierten (weiß) im Vergleich zu gesunden Kontrollen (grau). * = signifikanter Unterschiede ($p < 0,05$)

4.2.6 Glutathion-Peroxidase (GPx) und Superoxid-Dismutase (SOD)

Während die Aktivität der GPx keinen Unterschied bei den Hämodialysepatienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen zeigte (32 ± 10 vs. 33 ± 7 U/g Hb; $p = 0,539 = \text{n.s.}$), war die Aktivität der SOD in der terminalen Niereninsuffizienz deutlich reduziert (1.117 ± 151 vs. 1.299 ± 88 U/g Hb; $p < 0,0001$; Abb. 11)

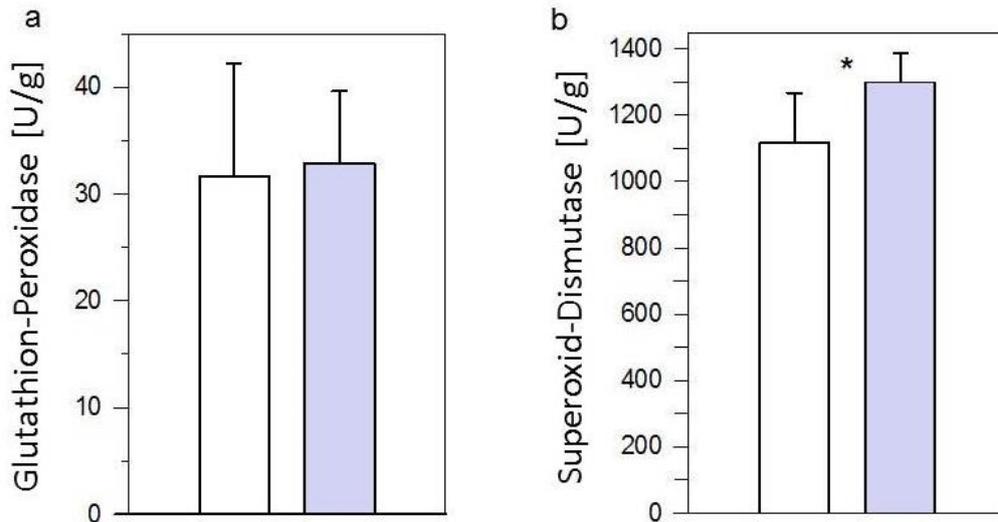


Abbildung 11: Aktivität der Glutathion-Peroxidase (a) und Superoxid-Dismutase (b) bezogen auf den Hämoglobingehalt des Blutes bei hämodialysierten Patienten (weiß) im Vergleich zu gesunden Kontrollen (grau). * = signifikanter Unterschied ($p < 0,05$).

4.2.7 Parameter des roten Blutbildes

Sowohl das Hämoglobin ($12,6 \pm 1,5$ vs. $15,1 \pm 1,2$ g/dl; $p < 0,0001$) als auch der Hämatokritwert (38 ± 5 vs. 44 ± 3 ; $p = 0,0005$) waren bei den hämodialysierten Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen signifikant erniedrigt (Abb. 12).

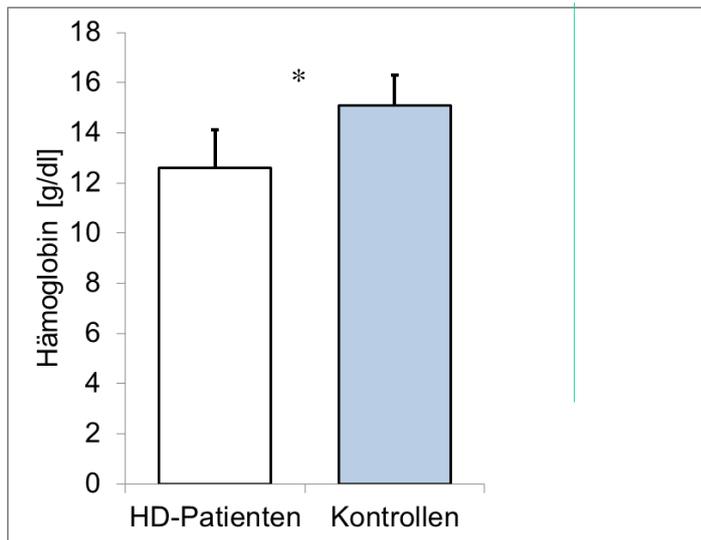


Abbildung 12: Hämoglobingehalt bei den Hämodialysepatienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen. HD=Hämodialyse; * = signifikanter Unterschied ($p < 0,05$).

4.2.8 Weitere Risikofaktoren

Das C-reaktive Protein CRP war bei den urämischen Patienten signifikant höher als bei den gesunden Kontrollen ($0,30 \pm 0,31$ vs. $0,15 \pm 0,02$ mg/dl; $p < 0,0001$; Abb. 13). Auch die Homocystein-Konzentration zeigte bei den Hämodialysepatienten eine signifikante Erhöhung im Vergleich zu den gesunden Kontrollen ($27,1 \pm 12,0$ vs. $11,6 \pm 2,9$ μ mol/l; $p < 0,0001$).

Der Serum-Lipoprotein (a)-Spiegel war bei den terminal niereninsuffizienten Patienten und gesunden Kontrollen vergleichbar ($10,3 \pm 18,1$ mg/dl vs. $9,4 \pm 12,8$ mg/dl; $p = 0,93 = \text{n.s.}$).

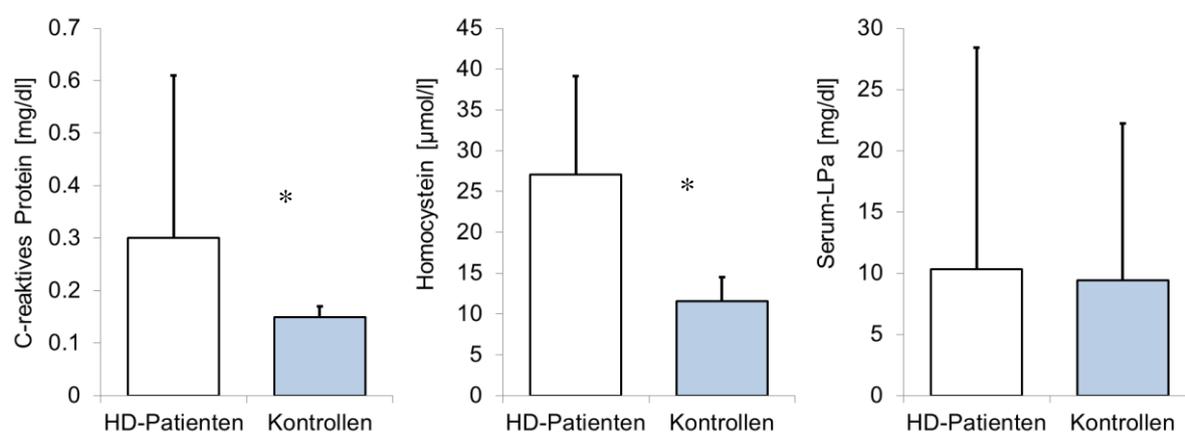


Abbildung 13: C-reaktives Protein-, Homocystein- und Lipoprotein (a) (Serum-LPa)-Spiegel bei hämodialysierten (HD)-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen. * = signifikanter Unterschied ($p < 0,05$).

4.3 Gefäß-Funktions-Parameter

4.3.1 Intima-Media-Dicke (IMT)

Die Hämodialysierten-Patienten hatten eine signifikant höhere IMT der Arteria carotis als die gesunden Kontrollen ($0,72 \pm 0,18$ vs. $0,62 \pm 0,08$ mm, $p < 0,01$; Abb. 14).

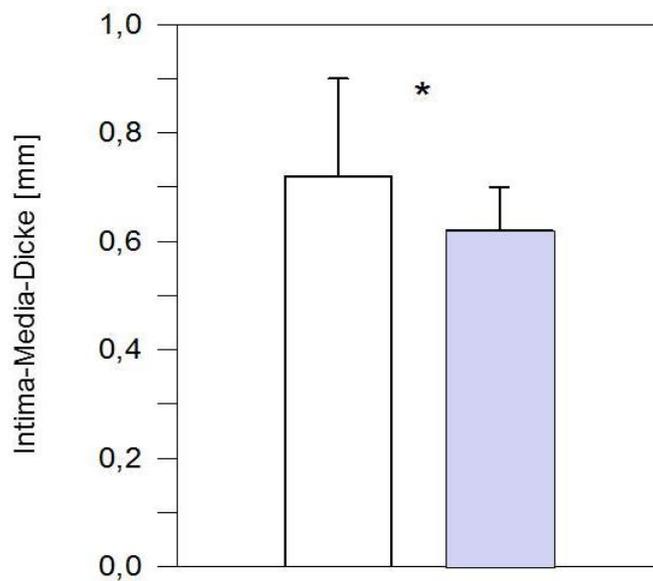


Abbildung 14: Intima-Media-Dicke der Arteria carotis (Mittelwert aus beidseitiger Messung) bei Hämodialysierten (weiß) im Vergleich zu gesunden Kontrollen (grau). * = signifikanter Unterschied ($p < 0,05$).

4.3.2 Venöse Okklusions-Plethysmographie

Der postischämische Spitzenfluss (PIPF) in Prozent des Ruheblutflusses war bei den Hämodialysepatienten niedriger als bei den gesunden Kontrollen (632 ± 319 vs. $1.057 \pm 543\%$, $p < 0,0005$; Abb. 15).

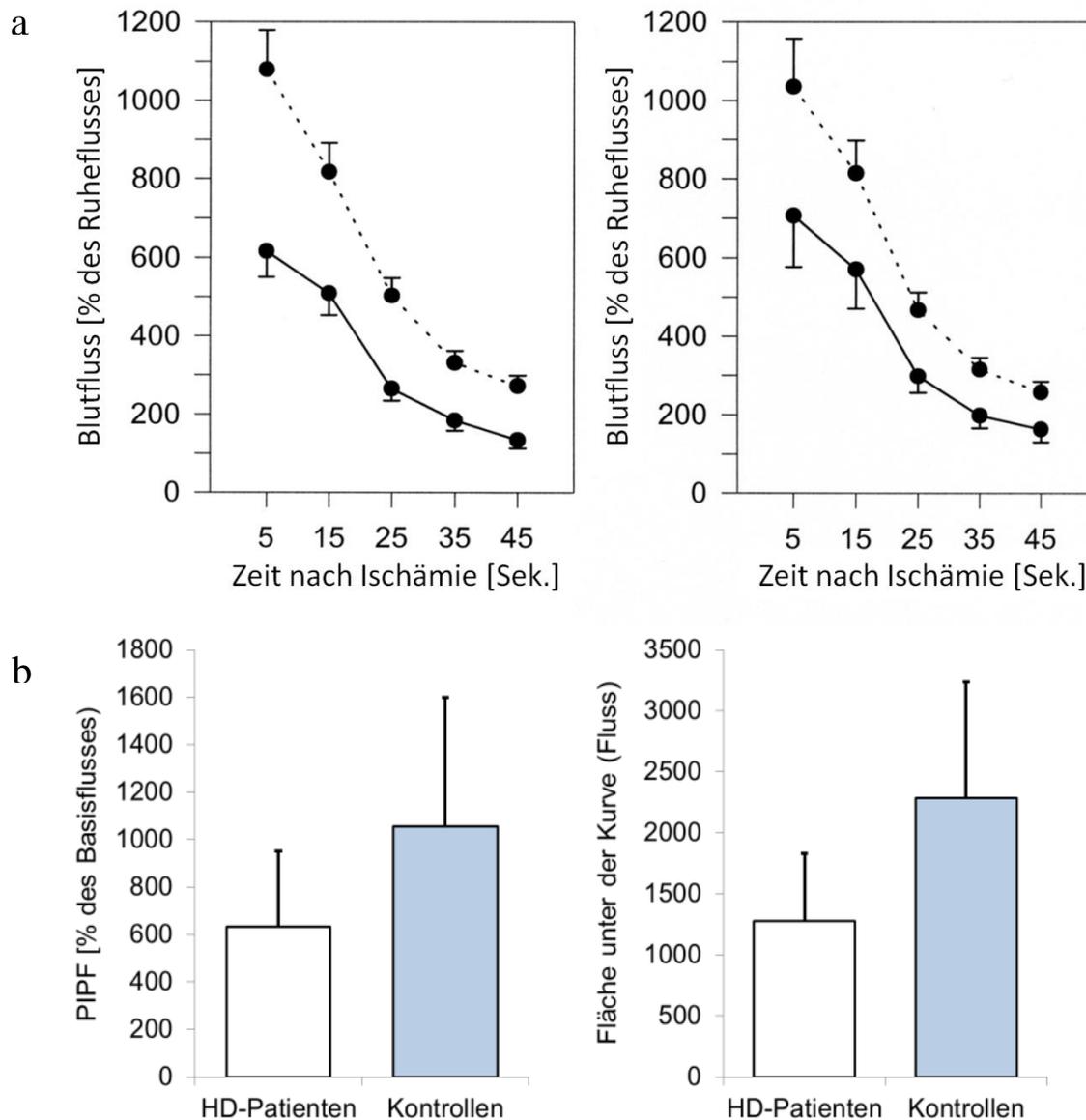


Abbildung 15: (a): Postischämischer Fluss des rechten und linken Beines in Prozent des Ruheflusses bei Hämodialysepatienten (durchgezogene Linie) im Vergleich zu gesunden Kontrollen (gestrichelte Linie). (b): Postischämischer Spitzenfluss in Prozent des Ruheflusses (links), sowie Fläche unter der Flusskurve (AUC; rechts); * = signifikante Unterschiede ($p < 0,05$).

4.4 Zusammenhänge

4.4.1 Korrelationsanalyse

Die Intima-Media-Dicke korrelierte in der univariaten Analyse signifikant mit mehreren Faktoren (Tab. 3). Daneben waren sowohl der PIPF als auch die Fläche unter der Flusskurve signifikant mit der Zeit seit Dialysebeginn, dem HDL-Cholesterin, der SOD, dem Hämoglobin und dem totalen Serumhomocystein korreliert.

Tabelle 3: Univariante Korrelationsanalyse*, Patienten und Kontrollen zusammen analysiert (n=50).

Risikofaktoren	IMT	PIPF	AUC
Alter	+0,44		
Packungsjahre (Zigaretten)	+0,29		
Zeit seit Dialysebeginn	+0,33	-0,46	-0,49
Triglyzeride (gesamt)	+0,34		-0,29
VLDL Triglyzeride	+0,36		-0,30
Cholesterin (gesamt)	+0,33		
VLDL Cholesterin			
LDL Cholesterin	+0,32		
HDL Cholesterin		+0,48	+0,54
Apo B (gesamt)	+0,31		
CD in VLDL	+0,44	-0,30	
Ox-LDL	+0,35		
SOD		+0,38	+0,38
GSH	+0,44		
tHcy	+0,42	-0,51	-0,59
Hb	-0,31	+0,39	+0,39
CRP			-0,42

*Spearman's Rangkorrelationskoeffizienten für signifikante univariante Korrelationen ($p < 0,05$); AUC = Fläche unter der Flusskurve (engl. Area under the curve (AUC)); CD = konjugierte Diene; CRP = C-reaktives Protein; GSH = reduziertes Glutathion; Hb = Hämoglobin; IMT = Intima-Media-Dicke; OxLDL = oxidierte low-density Lipoproteine; PIPF = postischämischer Spitzenfluss (engl. Postischemic peak flow); SOD = Superoxid-Dismutase; tHcy = totales Serumhomocystein; VLDL/LDL/HDL = very low-/ low-/ high-density lipoproteins.

4.4.2 Regressionsanalyse

In einem multivariaten Regressionsmodell verblieben nur das Alter, das Hämoglobin, das Gesamtcholesterin und die Zeit seit Dialysebeginn als unabhängige Prädiktoren im Modell (Tab. 4). Bezüglich des Endpunktes PIPF verblieben nur HDL Cholesterin und Hämoglobin im Modell, bezüglich des Endpunktes „Fläche unter der Flusskurve“ dagegen HDL Cholesterin und CRP (Tab. 4).

Um die oxidativen Stressmarker auf ihre klinische Signifikanz zu testen, prüften wir ihren diskriminativen Wert durch logistische Regression. Das tHcy-Niveau war mit großem Abstand der beste Diskriminator mit einer Odds Ratio von 276,0; zum Vergleich war die Odds Ratio von OxLDL 0,48. Wenn tHcy als erste Variable bei dem multivariaten Regressionmodell aufgenommen wurde, konnte durch keine weitere Variable das Modell verbessert werden.

Tabelle 4: Ergebnisse der multiplen linearen Regressionsanalyse

Endpunkt	Prädiktor	Effekt	Partielles R ²	p
<i>Intima-Media-Dicke</i>	Alter	Positiv	0,23	0,0004
	Hb	Negativ	0,15	0,0017
	Cholesterin (gesamt)	Positiv	0,07	0,02
	Zeit seit Dialysebeginn	Positive	0,05	0,047
			*0,50	
<i>Postischämischer Spitzenfluss</i>	HDL Cholesterin	Positiv	0,30	<0,0001
	Hb	Positiv	0,04	0,09
			*0,34	
<i>Fläche unter der Flusskurve (AUC)</i>	HDL Cholesterin	Positiv	0,38	<0,0001
	C-reaktives Protein	Negativ	0,04	0,09

*kumulatives R²; Hb = Hämoglobin; HDL = high-density lipoproteins;

AUC = area under the curve

5 Diskussion

Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, dass junge Hämodialysepatienten Anzeichen von oxidativem Stress aufweisen. Im Vergleich zu gesunden Kontrollen zeigen die Patienten eine signifikante Erhöhung in Ox-LDL/LDL-Cholesterinratio, konjugierten Dienen in VLDL-Fraktion, in GSSG/GSH-Verhältnis sowie eine erniedrigte Aktivität des antioxidativen Enzyms SOD.

5.1 Lipidstoffwechsel und Lipidoxidation

Bei der Studienplanung wurden Patienten mit Diabetes mellitus Typ I/II ausgeschlossen. Diese Patienten haben in früheren Arbeiten gezeigt, dass sie unabhängig von ihrer Niereninsuffizienz glykolysierte LDL-Partikel im Serum haben, die eine erhöhte Oxidationsanfälligkeit besitzen und somit in der Entstehung der Atherosklerose eine wichtige Rolle spielen können.^{70,71} Außerdem zeigen Hämodialysepatienten mit Diabetes mellitus im Vergleich zu Patienten ohne Diabetes mellitus eine erhöhte Mortalitätsrate, die hauptsächlich auf einer sechsfach höheren kardiovaskulären und auf einer dreifach höheren infektiösen Mortalität beruht.⁷²

Das OxLDL ist ein stark atherogenes Lipoprotein, welches die arterielle Funktionsstörung und den arteriellen Umbau durch vielfältige Wirkungsmechanismen begünstigt.⁷³ In der vorliegenden Arbeit zeigt sich, dass der Plasmaspiegel von LDL, OxLDL- und Apo B keinen signifikanten Unterschied zwischen den Patienten und den gesunden Kontrollen aufweist. Lediglich das Verhältnis OxLDL/LDL-Cholesterin ist signifikant erhöht, jedoch nicht die OxLDL/Apo B-Ratio. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu etlichen früheren Arbeiten, welche ein erhöhtes OxLDL bei Patienten mit einer Niereninsuffizienz feststellten, darunter auch die Arbeit von Holvoet et al..⁷⁴ Sie fanden heraus, dass der OxLDL-Spiegel, welcher mit demselben Assay gemessen wurde, bei den Hämodialysepatienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen um das Fünffache erhöht war. Da das Alter der Patienten in dieser Arbeit zwischen 58-65 und im Durchschnitt bei 61 Jahren lag, kann dies eine mögliche Erklärung hierfür sein. Dieses Ergebnis könnte auch die Beobachtungen von Takenaka et al. bestätigen, die lediglich eine Erhöhung in OxLDL bei älteren jedoch nicht bei jüngeren Dialysepatienten fanden und eine positive Korrelation zwischen OxLDL-Spiegel und dem Alter zeigen konnten.⁷⁵

Holvoet und seine Kollegen haben nachgewiesen, dass oxidierte LDL im Plasma mit einem kompetitiven ELISA gemessen werden können. Hierbei wurde ein spezifischer monoklonaler Antikörper verwendet (mAb-4E6). Dieser Antikörper ist direkt gegen separate Antigen-Determinanten auf dem oxidierten Apolipoprotein B-Molekül (Apo B-100) gerichtet.^{43,44}

In unserer Studie kam derselbe Antikörper in einem sandwich ELISA zum Einsatz, um die oxidierte LDL quantitativ im Plasma nachzuweisen.

Eine belgische Arbeitsgruppe setzte den gleichen monoklonalen Antikörper zur Messung von OxLDL bei Patienten mit ESRD im Vergleich zu gesunden Kontrollen ein und gab die Ergebnisse als prozentualen OxLDL-Anteil an. Sie fand einen signifikant erhöhten Prozentsatz der OxLDL im Plasma bei den ESRD-Patienten im Vergleich zu den Kontrollen, der die Atherosklerose widerspiegeln könnte.⁷⁶

Eine Arbeitsgruppe aus Japan untersuchte den OxLDL-Spiegel bei Peritonealdialyse-(n=18) und Hämodialysepatienten (n=24) als Kontrollen. Sie fand einen signifikant höheren OxLDL-Spiegel bei PD- im Vergleich zu HD-Patienten. Gesamtcholesterin, Triglyzeride und LDL-Cholesterin waren bei den PD-Patienten ebenfalls erhöht. Die PD-Patienten mit Diabetes mellitus oder mit einer ischämischer Herzerkrankungen zeigten außerdem einen signifikant höheren OxLDL-Spiegel als andere Patienten.⁷⁷

In vielen Arbeiten wurde nicht der OxLDL an sich, sondern die immunologische Reaktion gegen modifizierte LDL-Partikel bestimmt. Hierbei wurde der Titer von anti-OxLDL-Antikörper gemessen. Es konnte eine signifikant negative Korrelation zwischen anti-OxLDL-Antikörper und der Intima-Media-Dicke der Femoralarterie gefunden werden. Diese Studie von Shoji et al. konnte zeigen, dass der anti-OxLDL-Titer als ein unabhängiger Faktor mit der IMT bei ESRD negativ korreliert. Diese Ergebnisse unterstützen die Auffassung, dass die Immunität gegen OxLDL eine anti-atherogene Rolle spielt.⁷⁸

In der vorliegenden Arbeit waren die konjugierten Diene in der VLDL-Fraktion bei den Hämodialysepatienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen signifikant erhöht. In der LDL-Fraktion hingegen zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Die Entstehung von konjugierten Dienen ist eine vorzeitige Erscheinung in der Lipidperoxidation und der Plasma-LDL-Spiegel reflektiert die Menge der zirkulierenden OxLDL-Partikel.⁴⁶ Ein erhöhter Spiegel konjugierter Diene, wie er in der vorliegenden Studie gefunden wurde, trägt zur Atherogenität von VLDL-

Partikeln in der Urämie bei. Die konjugierten Diene der VLDL korrelieren positiv mit der IMT und negativ mit der PIPF. Ähnliche Ergebnisse wurden von Annuk et al. berichtet. Diese Arbeitsgruppe fand einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Plasmaspiegel der konjugierten Diene und einem erniedrigten Blutfluss des Unterarmes, welcher durch Endothel-abhängige Vasodilatation gemessen wurde.⁷⁹ Im Gegensatz dazu, konnten Bolton et al. keine Korrelation zwischen LDL-Oxidationsmarkern und endothelealer Funktionsstörung finden.⁸⁰

In der vorliegenden Studie ist das Verhältnis an oxidiertem zu reduziertem Glutathion (GSSG/GSH) erhöht sowie die Aktivität der Superoxid-Dismutase (SOD) reduziert. Dies zeigt einen Mangel des antioxidativen Immunsystems an. Dahingegen gibt es sowohl bei den Patienten als auch bei den gesunden Kontrollen keinen signifikanten Unterschied in der Aktivität der Glutathion-Peroxidase (GPx). Dieser Befund bestätigt frühere Beobachtungen bei Hämodialysepatienten.^{81,82} Dahingegen haben andere Studien über widersprüchliche Ergebnisse berichtet, zum Beispiel eine komplette Aufhebung der GPx-Aktivität bei Hämodialysepatienten.²⁰

Diese diskrepanten Ergebnisse könnten zum Teil durch altersabhängige Veränderungen erklärt werden. Antioxidative Enzyme der Erythrozyten zeigen einen signifikant negativen Zusammenhang mit dem Alter der Patienten.⁸³

Daher könnten in unserer Studie eine leicht erniedrigte Aktivität von SOD und die normale Aktivität von GPx durch das relativ junge Alter der Patienten bedingt sein.

Eine Arbeit von Nguyen-Khoa et al. konnte zeigen, dass diese beiden Enzyme bei 31 erwachsenen Hämodialysepatienten mit einem durchschnittlichen Alter von 64 Jahren stark vermindert waren.⁸²

Der Vergleich von Studien wird durch etliche patienten-abhängige Variablen begrenzt, z. B. das Stadium der Niereninsuffizienz, die Art der Behandlung (Hämodialyse vs. Peritonealdialyse) und das Management der Anämie mit Erythropoetin, Eisenpräparaten und Vitaminen.⁸⁴ In unserer Studie wurde darauf geachtet, dass der Einfluss dieser Variablen möglichst gering gehalten wird. Dies ließ sich verwirklichen, indem wir lediglich junge Hämodialysepatienten eingeschlossen haben sowie die Einnahme von Eisen- und Vitaminpräparaten vor der Untersuchung pausieren ließen. Der Hb-Wert dieser Patienten war im niedrig-normalen Referenzbereich.

GSH und GSSH wurden durch verschiedene Methoden gemessen. Am häufigsten kommt eine Methode zum Einsatz, die GSH, GSSG und deren Derivate mittels UV-Analyse misst.⁵⁶⁻⁵⁸

Eine fluoreszenzoptische Methode ist ebenfalls verfügbar.⁵⁹ In vielen Arbeiten wurde die Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (high-performance liquid chromatography, HPLC) zur Quantifizierung von GSH und GSSG eingesetzt, wobei ein Phosphatpuffer mit einem komplexeren elektrochemischen Nachweis zum Einsatz kommt.^{60,61}

Als weiteres Verfahren ist eine Ionenaustauscher-Chromatographie beschrieben worden.⁶⁰⁻⁶²

Es stehen zwar verschiedene Methoden für die Bestimmung von GSH und GSSG zur Verfügung, aber diese haben Nachteile, wie die Notwendigkeit der Bildung von Derivaten zur Messung, die Unfähigkeit gleichzeitig GSH und GSSG adäquat zu messen und die fehlende Sensitivität bei kleinen Proben.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Methode ist eine einfache und valide HPLC-UV-Methode, die zur direkten Bestimmung von GSH und GSSG in kleinen Plasmaproben eingesetzt werden kann. Die vorherige Bildung von Derivaten ist nicht mehr notwendig.⁵⁵

Andere Methoden zur Bestimmung des antioxidativen Status im Plasma und in LDL-Partikel sind der total peroxy radical-trapping antioxidant potential (TRAP) Assay und die totale antioxidative Kapazität (TAC). Die Gruppe von Nguyen-Khao aus Paris konnte in einer Studie mit Hämodialysepatienten (n=23) und gesunden (n=22) Kontrollen zeigen, dass der TRAP-Assay bei den Hämodialysepatienten keine zuverlässige Bestimmung des antioxidativen Status erlaubt, da die erhöhten Plasmaspiegel von Harnsäure, Triglyzeriden und verschiedenen Markern des oxidativen Stresses bei Hämodialyse die in dem Assay enthaltenen Peroxylradikale stören können.⁸⁵

5.2 Gefäß-Funktions-Parameter

In unserer Studie zeigen die Patienten ebenfalls frühzeitige Anzeichen von pathologischen Veränderungen der Arterien einschließlich einer signifikanten Erhöhung der IMT der Arteria carotis communis, welche als Surrogatparameter für Atherosklerose sowohl bei der Normalbevölkerung als auch bei den Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz zu deuten ist.^{9,10}

Die Patienten zeigen tiefgreifende Störungen der Endothelfunktion, welche als vierzigprozentige Verminderung der vaskulären Reaktivität nach Ischämie zu sehen ist. Frühere Arbeiten haben in der Tat gezeigt, dass Störungen der Endothelfunktion als ein Merkmal für beginnende chronische Niereninsuffizienz zu deuten sind.⁸⁶

Unsere Arbeitsgruppe hat bereits im Vorfeld ähnliche Ergebnisse bei jungen Erwachsenen mit terminaler Niereninsuffizienz seit der Kindheit erheben können.¹⁷ Es ist zu erwähnen, dass nach unseren Erfahrungen eine Plethysmographie an den Beinen häufig viel praktikabler ist, als Messungen an den Unterarmen, da sich die Hämodialysepatienten häufig mehreren Shunt-Operationen an den Unterarmen unterziehen mussten.

6 Zusammenfassung

Es gelang uns, die laborchemische Methodik für die Messung einer Reihe von oxidativen Stressmarkern zu etablieren. Wir führten die Arbeit mit 25 jungen Hämodialysepatienten und 25 gesunden Kontrollen durch. Als Parameter diente eine Auswahl an laborchemischen Untersuchungen des Lipidstoffwechsels (VLDL, LDL, HDL, Apolipoprotein B, Lp(a)), der Lipidoxidation (konjugierte Diene, oxidierte LDL) sowie Antioxidation (GSH/GSSG, Superoxid-Dismutase und Glutathion-Peroxidase). Mehrere dieser Laborparameter zeigten einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Hämodialysepatienten und gesunden Kontrollen.

Zur Beurteilung früher vaskulärer Veränderungen führten wir die sonographische Messung der Intima-Media-Dicke der Arteriae carotides communes und die Plethysmographie der Beingefäße durch, mit dem Ziel, diese mit den oxidativen Stressparametern zu korrelieren. Sowohl die Intima-Media-Dicke als auch die Plethysmographie zeigten signifikante Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen, was für das Vorliegen einer subklinischen Arteriopathie bzw. einer endothelialen Dysfunktion spricht. Vermutlich wegen der geringen Zahl an Hämodialysepatienten und gesunden Kontrollen konnten jedoch keine Laborparameter identifiziert werden, die in der multivariaten Analyse statistisch signifikant mit den Parametern der Gefäßveränderungen (IMT, Plethysmographie) assoziiert waren.

Eine weitere mögliche Limitation unserer Studie liegt in der Auswahl der zu messenden Oxidationsparameter. Neben den von uns untersuchten Markern existieren zahlreiche weitere Untersuchungsmethoden zur Quantifizierung oxidativer Prozesse, z. B. die Bestimmung von OxLDL-Antikörpern, advanced glycation end products (AGEs), advanced oxidation protein products (AOPP) oder DNA-Oxidation. Wir können nicht ausschließen, dass diese Oxidationsparameter eventuell zusätzliche nützliche Informationen hätten liefern können.⁸⁷

Da junge Dialysepatienten mit hoher Wahrscheinlichkeit von Behandlungsstrategien zur Senkung des kardiovaskulären Risikos profitieren können, ist es von großer Bedeutung, weitere Studien für diese junge Bevölkerungsgruppe durchzuführen, damit anhand geeigneter Parameter eine individuelle Risikoabschätzung bezüglich kardiovaskulärer Erkrankungen vorgenommen werden kann. Für derartige Studien hat unsere Arbeit die Grundlage geschaffen.

7 Literaturverzeichnis

1. Jungers P, Massy ZA, Nguyen Khoa T, et al. Incidence and risk factors of atherosclerotic cardiovascular accidents in predialysis chronic renal failure patients: a prospective study. *Nephrol Dial Transplant* 1997;12:2597-602.
2. Lindner A, Charra B, Sherrard DJ, Scribner BH. Accelerated atherosclerosis in prolonged maintenance hemodialysis. *N Engl J Med* 1974;290:697-701.
3. Meyer KB, Levey AS. Controlling the epidemic of cardiovascular disease in chronic renal disease: report from the National Kidney Foundation Task Force on cardiovascular disease. *J Am Soc Nephrol* 1998;9:S31-42.
4. Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *Am J Kidney Dis* 1998;32:S112-9.
5. London GM, Drueke TB. Atherosclerosis and arteriosclerosis in chronic renal failure. *Kidney Int* 1997;51:1678-95.
6. Ritz E, Deppisch R, Stier E, Hänsch G. Atherogenesis and cardiac death: are they related to dialysis procedure and biocompatibility? *Nephrol Dial Transplant* 1994;9 Suppl 2:165-72.
7. Litwin M, Wühl E, Jourdan C, et al. Altered morphologic properties of large arteries in children with chronic renal failure and after renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:1494-500.
8. Oh J, Wunsch R, Turzer M, et al. Advanced coronary and carotid arteriopathy in young adults with childhood-onset chronic renal failure. *Circulation* 2002;106:100-5.
9. Benedetto FA, Mallamaci F, Tripepi G, Zoccali C. Prognostic value of ultrasonographic measurement of carotid intima media thickness in dialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:2458-64.
10. Kato A, Takita T, Maruyama Y, Kumagai H, Hishida A. Impact of carotid atherosclerosis on long-term mortality in chronic hemodialysis patients. *Kidney Int* 2003;64:1472-9.
11. Ishimura E, Shoji T, Emoto M, et al. Renal insufficiency accelerates atherosclerosis in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Kidney Dis* 2001;38:S186-90.
12. Pannier B, Guerin AP, Marchais SJ, Metivier F, Safar ME, London GM. Postischemic vasodilation, endothelial activation, and cardiovascular remodeling in end-stage renal disease. *Kidney Int* 2000;57:1091-9.
13. Kovacic V, Ljusic D, Dodig J, Radic M, Duplancic D. Influence of haemodialysis on early markers of atherosclerosis. *Nephrology (Carlton)* 2008;13:472-9.
14. DeLoach SS, Appel LJ, Chen J, et al. Aortic pulse pressure is associated with carotid IMT in chronic kidney disease: report from Chronic Renal Insufficiency Cohort. *Am J Hypertens* 2009;22:1235-41.
15. Tsushima M, Terayama Y, Momose A, Funyu T, Ohyama C, Hada R. Carotid intima media thickness and aortic calcification index closely relate to cerebro- and cardiovascular disorders in hemodialysis patients. *Int J Urol* 2008;15:48-51; discussion - 2.
16. Blacher J, Guerin AP, Pannier B, Marchais SJ, London GM. Arterial calcifications, arterial stiffness, and cardiovascular risk in end-stage renal disease. *Hypertension* 2001;38:938-42.
17. Briese S, Wiesner S, Will JC, et al. Arterial and cardiac disease in young adults with childhood-onset end-stage renal disease-impact of calcium and vitamin D therapy. *Nephrol Dial Transplant* 2006;21:1906-14.
18. Guérin AP, Pannier B, Marchais SJ, London GM. Arterial structure and function in end-stage renal disease. *Curr Hypertens Rep* 2008;10:107-11.

19. 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;8:475-86.
20. Ceballos-Picot I, Witko-Sarsat V, Merad-Boudia M, et al. Glutathione antioxidant system as a marker of oxidative stress in chronic renal failure. *Free Radic Biol Med* 1996;21:845-53.
21. Klahr S. Oxygen radicals and renal diseases. *Miner Electrolyte Metab* 1997;23:140-3.
22. Cristol JP, Canaud B, Rabesandratana H, Gaillard I, Serre A, Mion C. Enhancement of reactive oxygen species production and cell surface markers expression due to haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 1994;9:389-94.
23. Himmelfarb J, Lazarus JM, Hakim R. Reactive oxygen species production by monocytes and polymorphonuclear leukocytes during dialysis. *Am J Kidney Dis* 1991;17:271-6.
24. Paul JL, Sall ND, Soni T, et al. Lipid peroxidation abnormalities in hemodialyzed patients. *Nephron* 1993;64:106-9.
25. Richard MJ, Arnaud J, Jurkovitz C, et al. Trace elements and lipid peroxidation abnormalities in patients with chronic renal failure. *Nephron* 1991;57:10-5.
26. Ross EA, Koo LC, Moberly JB. Low whole blood and erythrocyte levels of glutathione in hemodialysis and peritoneal dialysis patients. *Am J Kidney Dis* 1997;30:489-94.
27. Schulz T, Schiffh H, Scheithe R, Hrboticky N, Lorenz R. Preserved antioxidative defense of lipoproteins in renal failure and during hemodialysis. *Am J Kidney Dis* 1995;25:564-71.
28. Taccone-Gallucci M, Lubrano R, Belli A, et al. Lack of oxidative damage in serum polyunsaturated fatty acids before and after dialysis in chronic uremic patients. *Int J Artif Organs* 1989;12:515-8.
29. Millán J, Pintó X, Muñoz A, et al. Lipoprotein ratios: Physiological significance and clinical usefulness in cardiovascular prevention. *Vasc Health Risk Manag* 2009;5:757-65.
30. Brewer HB, Gregg RE, Hoeg JM, Fojo SS. Apolipoproteins and lipoproteins in human an overview. *Clin Chem* 1988;34:B4-8.
31. Thomas L. Labor und Diagnose. TH-Books; 2005:515.
32. Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, et al. Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation* 1995;91:2488-96.
33. Heinecke JW. Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis: qimplications for the oxidized low density lipoprotein hypothesis. *Atherosclerosis* 1998;141:1-15.
34. Steinberg D. Lewis A. Conner Memorial Lecture. Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation* 1997;95:1062-71.
35. Steinberg D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem* 1997;272:20963-6.
36. Witztum JL, Hörkkö S. The role of oxidized LDL in atherogenesis: immunological response and anti-phospholipid antibodies. *Ann N Y Acad Sci* 1997;811:88-96; discussion -9.
37. Ylä-Herttuala S. Is oxidized low-density lipoprotein present in vivo? *Curr Opin Lipidol* 1998;9:337-44.
38. Chisolm GM, Hazen SL, Fox PL, Cathcart MK. The oxidation of lipoproteins by monocytes-macrophages. Biochemical and biological mechanisms. *J Biol Chem* 1999;274:25959-62.
39. Heery JM, Kozak M, Stafforini DM, et al. Oxidatively modified LDL contains olipids with platelet-activating factor-like activity and stimulates the growth of smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1995;96:2322-30.

40. Penn MS, Chisolm GM. Oxidized lipoproteins, altered cell function and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1994;108 Suppl:S21-9.
41. Steinberg D. Clinical trials of antioxidants in atherosclerosis: are we doing the right thing? *Lancet* 1995;346:36-8.
42. Boaz M, Smetana S, Weinstein T, et al. Secondary prevention with antioxidants of cardiovascular disease in endstage renal disease (SPACE): randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2000;356:1213-8.
43. Holvoet P, Stassen JM, Van Cleemput J, Collen D, Vanhaecke J. Oxidized low density lipoproteins in patients with transplant-associated coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:100-7.
44. Holvoet P, Vanhaecke J, Janssens S, Van de Werf F, Collen D. Oxidized LDL and malondialdehyde-modified LDL in patients with acute coronary syndromes and stable coronary artery disease. *Circulation* 1998;98:1487-94.
45. Holvoet P, Perez G, Zhao Z, Brouwers E, Bernar H, Collen D. Malondialdehyde-modified low density lipoproteins in patients with atherosclerotic disease. *J Clin Invest* 1995;95:2611-9.
46. Ahotupa M, Marniemi J, Lehtimäki T, et al. Baseline diene conjugation in LDL lipids as a direct measure of in vivo LDL oxidation. *Clin Biochem* 1998;31:257-61.
47. Ahotupa M, Ruutu M, Mäntylä E. Simple methods of quantifying oxidation products and antioxidant potential of low density lipoproteins. *Clin Biochem* 1996;29:139-44.
48. Kohlmeier M. Simple method for preparing and quantifying very-low-density lipoprotein. *Clin Chem* 1984;30:295-7.
49. Armstrong D, Browne R. The analysis of free radicals, lipid peroxides, antioxidant enzymes and compounds related to oxidative stress as applied to the clinical chemistry laboratory. *Adv Exp Med Biol* 1994;366:43-58.
50. Löffler G, Petrides PE. *Biochemie und Pathobiochemie*. 6. Auflage ed1998.
51. Kohlmeier M, Schlierf G. Effect of storage on HDL-cholesterol measurements. *Clin Chem* 1982;28:396-7.
52. Kohlmeier M. Direct enzymic measurement of glycerides in serum and in lipoprotein fractions. *Clin Chem* 1986;32:63-6.
53. Rifai N, King ME. Immunoturbidimetric assays of apolipoproteins A, AI, AII, and B in serum. *Clin Chem* 1986;32:957-61.
54. Schumaker VN, Puppione DL. Sequential flotation ultracentrifugation. *Methods Enzymol* 1986;128:155-70.
55. Afzal M, Afzal A, Jones A, Armstrong D. A rapid method for the quantification of GSH and GSSG in biological samples. *Methods Mol Biol* 2002;186:117-22.
56. Leroy P, Nicolas A, Thioudellet C, Oster T, Wellman M, Siest G. Rapid liquid chromatographic assay of glutathione in cultured cells. *Biomed Chromatogr* 1993;7:86-9.
57. Ridnour LA, Winters RA, Ercal N, Spitz DR. Measurement of glutathione, glutathione disulfide, and other thiols in mammalian cell and tissue homogenates using high-performance liquid chromatography separation of N-(1-pyrenyl)maleimide derivatives. *Methods Enzymol* 1999;299:258-67.
58. Winters RA, Zukowski J, Ercal N, Matthews RH, Spitz DR. Analysis of glutathione, glutathione disulfide, cysteine, homocysteine, and other biological thiols by high-performance liquid chromatography following derivatization by n-(1-pyrenyl)maleimide. *Anal Biochem* 1995;227:14-21.
59. Browne RW, Armstrong D. Reduced glutathione and glutathione disulfide. *Methods Mol*

- Biol 1998;108:347-52.
60. Lakritz J, Plopper CG, Buckpitt AR. Validated high-performance liquid chromatography-electrochemical method for determination of glutathione and glutathione disulfide in small tissue samples. *Anal Biochem* 1997;247:63-8.
 61. Liu S, Ansari NH, Wang C, Wang L, Srivastava SK. A rapid HPLC method for the quantification of GSH and GSSG in ocular lens. *Curr Eye Res* 1996;15:726-32.
 62. Alpert AJ, Gilbert HF. Detection of oxidized and reduced glutathione with a recycling postcolumn reaction. *Anal Biochem* 1985;144:553-62.
 63. Woolliams JA, Wiener G, Anderson PH, McMurray CH. Variation in the activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase and in the concentration of copper in the blood in various breed crosses of sheep. *Res Vet Sci* 1983;34:253-6.
 64. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967;70:158-69.
 65. Kraus RJ, Ganther HE. Reaction of cyanide with glutathione peroxidase. *Biochem Biophys Res Commun* 1980;96:1116-22.
 66. Guérin AP, London GM, Marchais SJ, Metivier F. Arterial stiffening and vascular calcifications in end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15:1014-21.
 67. Oberseider J, Felten-Keil G, Schuler K, Goebels N, Hamann GF. [Intima media thickness in patients with vertebrobasilar and carotid stenosis/occlusions]. *Ultraschall Med* 1999;20:144-9.
 68. Raitakari OT. Imaging of subclinical atherosclerosis in children and young adults. *Ann Med* 1999;31 Suppl 1:33-40.
 69. Sumner DS. Volume plethysmography in vascular disease: an overview. In: Bernstein EF(ed). *Noninvasive diagnostic techniques in vascular disease*. St. Louis: Mosby, Incorporated; 1985; p. 97-118.
 70. Bowie A, Owens D, Collins P, Johnson A, Tomkin GH. Glycosylated low density lipoprotein is more sensitive to oxidation: implications for the diabetic patient? *Atherosclerosis* 1993;102:63-7.
 71. Witztum JL, Mahoney EM, Branks MJ, Fisher M, Elam R, Steinberg D. Nonenzymatic glycosylation of low-density lipoprotein alters its biologic activity. *Diabetes* 1982;31:283-91.
 72. Charra B, VoVan C, Marcelli D, et al. Diabetes mellitus in Tassin, France: remarkable transformation in incidence and outcome of ESRD in diabetes. *Adv Ren Replace Ther* 2001;8:42-56.
 73. Galle J, Hansen-Hagge T, Wanner C, Seibold S. Impact of oxidized low density lipoprotein on vascular cells. *Atherosclerosis* 2006;185:219-26.
 74. Holvoet P, Donck J, Landeloos M, et al. Correlation between oxidized low density lipoproteins and von Willebrand factor in chronic renal failure. *Thromb Haemost* 1996;76:663-9.
 75. Takenaka T, Takahashi K, Kobayashi T, Oshima E, Iwasaki S, Suzuki H. Oxidized low density lipoprotein (Ox-LDL) as a marker of atherosclerosis in hemodialysis (HD) patients. *Clin Nephrol* 2002;58:33-7.
 76. Van Tits L, De Graaf J, Hak-Lemmers H, et al. Increased levels of low-density lipoprotein oxidation in patients with familial hypercholesterolemia and in end-stage renal disease patients on hemodialysis. *Lab Invest* 2003;83:13-21.
 77. Futatsuyama M, Oiwa T, Komatsu Y. Correlation between oxidized low-density lipoprotein and other factors in patients on peritoneal dialysis. *Adv Perit Dial* 2002;18:192-4.

78. Shoji T, Kimoto E, Shinohara K, et al. The association of antibodies against oxidized low-density lipoprotein with atherosclerosis in hemodialysis patients. *Kidney Int Suppl* 2003;S128-30.
79. Annuk M, Zilmer M, Lind L, Linde T, Fellström B. Oxidative stress and endothelial function in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:2747-52.
80. Bolton CH, Downs LG, Victory JG, et al. Endothelial dysfunction in chronic renal failure: roles of lipoprotein oxidation and pro-inflammatory cytokines. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16:1189-97.
81. Annuk M, Fellström B, Akerblom O, Zilmer K, Vihalemm T, Zilmer M. Oxidative stress markers in pre-uremic patients. *Clin Nephrol* 2001;56:308-14.
82. Nguyen-Khoa T, Massy ZA, De Bandt JP, et al. Oxidative stress and haemodialysis: role of inflammation and duration of dialysis treatment. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16:335-40.
83. Ceballos-Picot I, Trivier JM, Nicole A, Sinet PM, Thevenin M. Age-correlated modifications of copper-zinc superoxide dismutase and glutathione-related enzyme activities in human erythrocytes. *Clin Chem* 1992;38:66-70.
84. Vaziri ND. Oxidative stress in uremia: nature, mechanisms, and potential consequences. *Semin Nephrol* 2004;24:469-73.
85. Nguyen-Khoa T, Massy ZA, Witko-Sarsat V, et al. Critical evaluation of plasma and LDL oxidant-trapping potential in hemodialysis patients. *Kidney Int* 1999;56:747-53.
86. Kaysen GA, Eiserich JP. The role of oxidative stress-altered lipoprotein structure and function and microinflammation on cardiovascular risk in patients with minor renal dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:538-48.
87. Massy ZA, Nguyen-Khoa T. Oxidative stress and chronic renal failure: markers and management. *J Nephrol* 2002;15:336-41.

8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Entstehung und Abbau oxidativer Sauerstoffspezies.

Abbildung 2: Funktion der Glutathionperoxidase bei der Eliminierung von Lipidperoxiden.

Abbildung 3: Arteria carotis communis: die Intima-Media-Dicke wird an der schallkopffernen Gefäßwand etwa 1 cm proximal des Bulbus caroticus gemessen.

Abbildung 4: Versuchsaufbau der Venenokklusions-Plethysmographie am Bein.

Abbildung 5: Typische Registrierung des post-ischämischen Flusses an den unteren Extremitäten beim Gesunden.

Abbildung 6: Konzentrationen von Triglyzeriden und Cholesterin in den Lipoproteinfraktionen bei Hämodialysierten (weiß) im Vergleich zu gesunden Kontrollen (grau).

Abbildung 7: Konzentrationen von Apolipoprotein B in den Lipoproteinfraktionen bei Hämodialysierten (weiß) im Vergleich zu gesunden Kontrollen (grau).

Abbildung 8: Konzentrationen der oxidierten Low-Density-Lipoproteine (LDL) bei Hämodialysierten (weiß) im Vergleich zu gesunden Kontrollen (grau).

Abbildung 9: Konzentrationen der konjugierten Diene in der VLDL- und LDL-Fraktion bei Hämodialysierten (weiß) im Vergleich zu gesunden Kontrollen (grau).

Abbildung 10: Konzentrationen von GSSG und GSH bei Hämodialysierten (weiß) im Vergleich zu gesunden Kontrollen (grau).

Abbildung 11: Aktivität der Glutathion-Peroxidase (a) und Superoxiddismutase (b) bezogen auf den Hämoglobingehalt des Blutes bei Hämodialysierten-Patienten (weiß) im Vergleich zu gesunden Kontrollen (grau).

Abbildung 12: Hämoglobingehalt bei den Hämodialysepatienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen.

Abbildung 13: C-reaktives Protein-, Homocystein- und Lipoprotein (a) (Serum-LPa)-Spiegel bei hämodialysierten (HD)-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen.

Abbildung 14: Intima-Media-Dicke der Arteria carotis (Mittelwert aus beidseitiger Messung) bei Hämodialysierten (weiß) im Vergleich zu gesunden Kontrollen (grau).

Abbildung 15: (a): Postischämischer Fluss des rechten und linken Beines in Prozent des Ruheflusses bei Hämodialysepatienten (durchgezogene Linie) im Vergleich zu gesunden Kontrollen (gestrichelte Linie). (b): Postischämischer Spitzenfluss in Prozent des Ruheflusses (links), sowie Fläche unter der Flusskurve (AUC; rechts)

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Grundkrankheiten der an der Studie teilnehmenden Hämodialysepatienten

Tabelle 2: Klinische Basaldaten von Hämodialysepatienten und Kontrollgruppe

Tabelle 3: Univariate Korrelationsanalyse, Patienten und Kontrollen zusammen analysiert.

Tabelle 4: Ergebnisse der multiplen linearen Regressionsanalyse

9 Eidesstattliche Versicherung

Ich, Shalah Faraj, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „**Oxidativer Stress und Veränderungen der arteriellen Struktur und Funktion bei jungen Hämodialysepatienten**“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§ 156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Frau Shalah Faraj hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Publikation: Nissel R, Faraj S, Sommer K, Henning L, van der Giet M, Querfeld U. Oxidative stress markers in young hemodialysis patients - a pilot study.

Clin Nephrol 2008; 70:135-43.

Beitrag im Einzelnen: Literaturrecherchen, Zusammenfassung studienrelevanter Artikel, Rekrutierung von Studienteilnehmern, Befragung der Patienten und Probanden, Materialgewinnung und Bearbeitung im Labor, Assistenz bei der Durchführung der sonographischen Messungen und der Plethysmographie, Gewinnung und Auswertung von Patienten- und Probandendaten.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

10 Lebenslauf

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

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

11 Publikationen und Präsentationen

Publikation: Nissel R, Faraj S, Sommer K, Henning L, van der Giet M, Querfeld U. Oxidative stress markers in young hemodialysis patients - a pilot study.

Clin Nephrol 2008; 70:135-43.

Vortrag: Nissel R, Faraj S, Sommer K, Querfeld U. Lipoprotein oxidation and vascular changes in patients on hemodialysis.

Perfusion 9:V20, 1. Deutscher Atherosklerosekongress 2004, Leipzig

Vortrag: Nissel R, Sommer K, Faraj S, Querfeld U. Lipoprotein Oxidation in Patients on Hemodialysis.

Pediatr Nephrol 2002; 17:C55, ESPN 2002, Bilbao

Poster: Nissel R, Sommer K, Faraj S, Querfeld U. Lipoproteinoxidation bei Hämodialysepatienten. Nieren und Hochdruckkrankheiten 31/2:55,

33. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft für Pädiatrische Nephrologie. 2002, Essen

12 Danksagung

Für meine Doktorarbeit schulde ich vielen Menschen einen herzlichen Dank, die zum Gelingen dieser Promotionsarbeit ihren Beitrag geleistet haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. U. Querfeld, der mir die Möglichkeit gab, in seiner Arbeitsgruppe mein Promotionsvorhaben zu realisieren. Ich danke ihm für die fundierte wissenschaftliche Betreuung, für die wertvollen Diskussionen und seine Geduld.

Weiterhin möchte ich meinem Doktorbetreuer Herrn Dr. med. Richard Nissel für die umfassende Unterstützung und nützlichen Hinweise insbesondere bei der Erstellung der statistischen Berechnungen und graphischen Darstellungen und für die Durchführung der Carotissonographien sehr herzlich danken.

Ein großer Dank geht ebenso an die Labor-MTA Frau Kerstin Sommer. Ohne ihre weitreichende Laborkompetenz und hilfreichen Anleitungen hätte ich meine Untersuchungen nicht so erfolgreich durchführen können.

Vielen Dank an Herrn Prof. van der Giet und seine Arbeitsgruppe der Medizinischen Klinik für Nephrologie/Charité für die Kooperation insbesondere bei der Bestimmung der GSH/GSSG mittels HPLC-UV-Methode.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Patienten und Probanden für ihre großzügige Blutspende und ihre geduldige Teilnahme an Plethysmographie- und Ultraschalluntersuchungen recht herzlich bedanken.

Allen Kollegen und Mitarbeitern der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Nephrologie der Medizinischen Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu Berlin danke ich für Ihre Unterstützung.

Bei den Mitarbeitern des Zentrallabors der Charité bedanke ich mich sehr für die hervorragende Kooperation bei der Bestimmung von Hb, Hkt, CRP, Homocystein und Lpa.

Ebenfalls bedanke ich mich recht herzlich bei meinen Freundinnen Julia Karstädt, Katerina Mallwitz und Frederike Svehla für Ihre Unterstützung und wertvollen Hinweise.

Sie haben mich immer in meinem Vorhaben bestärkt.

Mein ausdrücklicher Dank richtet sich an Frau Annette Rieth für das abschließende Korrekturlesen des Manuskriptes.

Ich danke meinen Eltern und allen Geschwistern. Ich konnte mich jederzeit auf ihre Unterstützung verlassen. Durch sie ist es mir gelungen, neben Familien- und Berufsleben meine Promotion erfolgreich abzuschließen.

Zuletzt gilt mein Dank meiner Familie. Ich danke meinem Mann Delchar Rammo für seine Unterstützung in jeglicher Hinsicht. Er hat mich durch alle Höhen und Tiefen der letzten Jahre liebevoll und geduldig begleitet. Auch großen Dank an unsere beiden Kinder Briva und Kardo, die mich in der Phase des Schreibens mit ihrer Fröhlichkeit und Lebendigkeit aufgemuntert haben.