

Aus der Medizinischen Klinik IV Campus Benjamin Franklin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Quantifizierung von oxidiertem Low-Density-Lipoprotein
im Serum postmenopausaler Frauen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Alexander Rouven Just

aus Dortmund

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

Datum der Promotion: 30.11.2012

I Inhaltsverzeichnis

I	Inhaltsverzeichnis	III
II	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	V
III	Abkürzungsverzeichnis	VI
1	Einleitung und Hintergrund der Arbeit	1
1.1	Bedeutung und Funktion von oxidiertem LDL für die Pathogenese atherosklerotischer Gefäßveränderungen	1
1.2	Zusammensetzung und Stoffwechsel der Lipoproteine	4
1.3	Problematik der Diagnostik atherosklerotischer Gefäßveränderungen	5
1.4	¹ H-NMR-Spektroskopie von Seren	6
2	Problemstellung und Zielsetzung	8
3	Methodik	9
3.1	Patientencharakterisierung	9
3.2	Modifizierter Studienfragebogen	9
3.3	Blutentnahme	10
3.4	Probenvorbereitung	10
3.5	Carotiden-B-Bild-Sonographie zur Intima-Medien-Dicken-Bestimmung.	11
3.6	¹ H-NMR-Spektroskopie der Probandinnenseran	12
3.7	In-vitro Oxidation von nativem LDL	12
3.7.1	Isolation von Lipoproteinen aus humanem Serum	12
3.7.2	Oxidation von LDL	14
3.8	Ermittlung der Kalibrierfunktion	14
3.9	Statistik	15
4	Ergebnisdarstellung	16
4.1	Auswertung der ¹ H-NMR-Spektren	16
4.2	Bestimmung der Serumkonzentration von oxidiertem LDL	18
4.3	Korrelation der Serumkonzentration von oxidiertem LDL mit klinischen Parametern	19
4.3.1	Korrelation mit den Fragebogen-Items	20
4.3.2	Korrelation mit der Intima-Media-Dicke	21
4.3.3	Korrelation mit den Ergebnissen der Blutuntersuchungen	21
5	Diskussion	27
5.1	Diskussion der Methodik	27

5.2	Oxidiertes LDL und Dyslipoproteinämie	28
5.3	Oxidiertes LDL und Diabetes mellitus	30
5.4	Oxidiertes LDL und Nierenfunktionsstörung	34
5.5	¹ H-NMR gestützte Diagnostik von oxidiertem LDL – Ein lohnenswertes Verfahren in der klinischen Labordiagnostik?.....	36
5.5.1	Relevanz von oxidiertem LDL für die klinische Labordiagnostik der Atherosklerose.....	36
5.5.2	Vorteile der ¹ H-NMR-Spektroskopie in der klinischen Labordiagnostik	37
6	Zusammenfassung	38
IV	Literaturverzeichnis.....	VIII
V	Anhang	XVI
VI	Danksagung.....	XXXI
VII	Lebenslauf	XXXII

II Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1:	^1H -NMR-Spektrum ohne Resonanzen von oxidiertem LDL	16
Abbildung 2:	^1H -NMR-Spektrum mit charakteristischen Resonanz- Intensitätsmaxima von oxidiertem LDL	17
Abbildung 3:	Ausschnitt der Kalibrierfunktion für die charakteristische Resonanz von oxidiertem LDL bei 1,17 ppm.	18
Abbildung 4:	Verteilung der Konzentration von oxidiertem LDL in Probandinnen- seren bei der charakteristischen Resonanz 1,17 ppm	19
Abbildung 5:	Korrelation der Konzentration von oxidiertem LDL mit Item 13.12.1	20
Abbildung 6:	Korrelation der Konzentration von oxidiertem LDL mit Triglyceriden	23
Abbildung 7:	Korrelation der Konzentration von oxidiertem LDL mit HDL.....	24
Abbildung 8:	Korrelation der Konzentration von oxidiertem LDL mit HbA _{1c}	24
Abbildung 9:	Korrelation der Konzentration von oxidiertem LDL mit OGTT ₁₂₀	25
Abbildung 10:	Korrelation der Konzentration von oxidiertem LDL mit Harnstoff	25
Abbildung 11:	Änderungen der Insulinrezeptor vermittelten intrazellulären Signalkaskaden bei Insulinresistenz und deren Auswirkung auf die Endothelfunktion	33
Tabelle 1:	Verteilung von behandlungsbedürftigen Serumlipidwerten für Frauen ab dem 50. Lebensjahr nach Dörner	22
Tabelle 2:	Parameter ohne signifikante Korrelation mit oxidiertem LDL	26

III Abkürzungsverzeichnis

Å	Angström (Molekülgröße)
AGE	Advanced Glycation Endproducts
CM	Chylomikronen
CuSO ₄	Kupfersulfat
d	Dichte
D ₂ O	Deuteriumoxid
Da	Dalton
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FID	Free-Induction-Decay (freier Induktionsabfall)
¹ H	Wasserstoffproton
HbA _{1c}	Unterfraktion des Hämoglobin-A ₁ (Glykohämoglobin)
HDL	High-Density-Lipoprotein
IDL	Intermediate-Density-Lipoprotein
IL-1	Interleukin-1
KBr	Kaliumbromid
L-CAT	Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase
LDL	Low-Density-Lipoprotein
LOX-1	Lectin-like oxLDL-Rezeptor-1
LPL	Lipoprotein-Lipase
M	mol / l
MHz	Megahertz
µs	Mikrosekunde
n	number (Anzahl)
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat

NaOH	Natriumhydroxid
NO	Stickstoffmonoxid
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (Kernspinresonanz)
NS	Number of Scans (Anzahl der Pulse)
OGTT	Oraler Glucose Toleranztest
oxLDL	oxidiertes Low-Density Lipoprotein
P ₁	90°-NMR Puls
PBS	Phosphate Buffered Saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
pm	Pikometer
ppm	parts per million (auf der chemischen Phasenverschiebungsskala)
T	Tesla (Voltsekunde/m ²)
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
IMD	Intima-Media-Dicke
TSP	3-Trimethylsilyl-[2,2,3,3- ² H ₄]-Propionsäure
UK	United Kingdom
UV	Ultraviolett
U/min	Umdrehungen pro Minute
VLDL	Very-Low-Density-Lipoprotein
Vol.%	Volumen Prozent

1 Einleitung und Hintergrund der Arbeit

1.1 Bedeutung und Funktion von oxidiertem LDL für die Pathogenese atherosklerotischer Gefäßveränderungen

„Die Atherosklerose ist eine variable Kombination von Intimaveränderungen, bestehend aus herdförmigen Ansammlungen von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut- und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumablagerungen, verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia.“(1)

Diese weiterhin gültige WHO-Definition der Atherosklerose macht die komplexen, im Detail noch nicht genau geklärten Zusammenhänge der Pathogenese der Atherosklerose deutlich. Zugleich unterstreicht sie den kausalen Einfluss von progressiv pathologischen Lipideinlagerungen in den Intima-Media-Bereich der betroffenen Arterienwände.

Nach Eintritt der Menopause steigt die Inzidenz der Atherosklerose insbesondere bei Frauen deutlich an (2) und wird zur führenden Ursache für Morbidität und Mortalität (3). Hierfür sind neben proatherogenen Veränderungen des Lipidprofils und einiger hämostatischer Parameter eine Zunahme entzündlicher und oxidativer Schädigungen der Gefäßwand verantwortlich (4). Dem oxidierten Low-Density-Lipoprotein (oxidiertes LDL) wird für die Initialphase der Atherosklerose eine besondere Bedeutung zugeschrieben (5; 6). Die oxidativen Lipidveränderungen sind über die Rekrutierung von Entzündungszellen und direkte Wirkungen im Gewebe mit der Bildung proinflammatorischer Zytokine verknüpft. Der resultierende chronische Entzündungsprozess führt zu unkontrollierten und aberranten Umbauvorgängen und ist über eine durch Zytokine vermittelte Verstärkung der Bindung von LDL an Endothelzellen und glatte Muskelzellen wiederum an die Lipoproteine geknüpft, so dass hier wechselseitige Abhängigkeiten bestehen (7).

Low- und High-Density-Lipoproteine haben die Eigenschaft aufgrund ihres geringen Moleküldurchmessers von 100 Å bzw. 200 Å (10^4 bzw. 2×10^4 pm) im Gegensatz zu anderen zirkulierenden Lipoproteinen wie Chylomikronen und VLDL, die Endothelschranke frei zu penetrieren. Sie werden von endothelialen Transportvesikeln in den

subendothelialen Raum und von dort mit dem transmuralen Saftstrom weiter in die Gefäßwand transportiert. Die Konzentrationen des LDL und HDL im Gefäßlumen und in der Gefäßwand verhalten sich weitgehend proportional. Ein Konzentrationsanstieg des besonders cholesterinreichen LDL im Blut wird im Rahmen eines gestörten Lipidstoffwechsels auch von einer Vermehrung dieses Lipoproteins in der Gefäßwand begleitet. Da HDL über einen im einzelnen noch nicht geklärten Mechanismus Cholesterin aus Zellen mit Cholesterinüberschuss aufnehmen und dieses der Gallensäurebiosynthese in der Leber zuführen kann, wirkt eine hohe Konzentration von HDL der Entwicklung atherosklerotischer Veränderungen eher entgegen. Ein Konzentrationsanstieg von LDL ist auch mit dessen verlängerter Verweildauer in der Blutzirkulation als auch im vaskulären Interstitium verbunden. Vor allem dieser Teil alternder LDL-Moleküle erfährt oxidative Modifikationen. Oxidiertes LDL entsteht zum großen Teil lokal in der Gefäßwand (8), kann aus Arterienwänden nach der Oxidation freigesetzt werden und ins Serum gelangen (9). Die Frage, inwieweit auch in der Blutbahn oxidiertes LDL zirkuliert, ist nicht abschließend geklärt (10). Gegen eine vorwiegende Entstehung von oxidiertem LDL in der Blutbahn spricht, dass im Plasma zahlreiche Antioxidantien vorhanden sind (Glutathion, Vitamin C und E, β -Karotin, sekundäre Pflanzenstoffe) (11). Diese sollten die Bildung von oxidiertem LDL im Plasma weitgehend verhindern (12). Studien zeigen jedoch, dass auch in der Gefäßwand eine Reihe von Antioxidantien nachgewiesen werden können (11; 12), ohne dass dies offenbar die lokale Entstehung von oxidiertem LDL verhindert (8).

Im vaskulären Interstitium werden die oxidativ modifizierten LDL-Partikel durch ortsständige Makrophagen phagozytiert. Oxidiertes LDL wird vom ubiquitär vorhandenen LDL-Rezeptor nicht erkannt. Die Phagozytose geschieht über den unspezifischen Scavenger-Rezeptor, einem Makrophagenrezeptor, der im Gegensatz zum LDL-Rezeptor nicht Feedback-reguliert ist, so dass ein steigendes Angebot an extrazellulärem oxidiertem LDL keine Hemmung der Aufnahme bewirkt. Die Folge ist eine fortschreitende intrazelluläre Akkumulation von Lipidvakuolen, die zum morphologischen Aspekt der Schaumzell-Makrophagen führt. Die phagozytierten Lipoproteine werden in den Lysosomen der Makrophagen hydrolysiert, wobei die Spaltprodukte der Proteine und Triglyceride weiter metabolisiert werden können. Das aus den Cholesterinestern freigesetzte Cholesterin verhält sich jedoch gegenüber

den lytischen Enzymen der Makrophagen inert. Das durch HDL nicht abtransportierte überschüssige Cholesterin kristallisiert intrazellulär und zerstört daraufhin durch seine spitzen Formationen die Membransysteme der Makrophagen. Es entsteht eine stabile atherosklerotische Plaque mit einer zentralen Nekrosezone und fettigem Detritus, umgeben von noch vitalen makrophagozytären Schaumzellen.

Des Weiteren stimuliert oxidiertes LDL die Plaquemakrophagen zur Produktion proinflammatorischer Zytokine und initiiert damit sklerogene Verstärkerschlaufen, die in einer zunehmenden Stenosierung des Gefäßlumens resultieren. Die sezernierten Zytokinmuster führen zu einer Progression der schon durch proatherogene Risikofaktoren (Diabetes mellitus, Hyperlipidämie, Rauchen) initiierten Endotheldysfunktion. Zentraler Mediator für die Regulationsmechanismen des Endothels ist Stickstoffmonoxid (NO) (13). Oxidiertes LDL sowie das bei Patienten mit Diabetes mellitus häufig vorkommende glykolisierte oxidierte LDL vermindern jedoch die Bioverfügbarkeit von NO durch eine Expressionshemmung der endothelialen Stickoxid-Synthase III (eNOS III) (14). Die Folge ist ein Verlust NO-vermittelter antiatherogener Effekte (15). Endothelialer NO-Mangel und die von Plaquemakrophagen sezernierten Zytokine Interleukin-1 (IL-1) und Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) führen endothelvermittelt zur Störung der Thrombozytenadhäsion und -aggregation. Die endotheliale Gefäßwand wird auf diese Weise von einer anti- zu einer pro-koagulatorischen Schicht und weist damit eine erhöhte Thrombosierungsneigung auf (16). Einen bedeutenden Anteil am Sklerosierungsprozess der Gefäßwand besitzen metabolisch aktive Mediamonozyten (glatte Gefäßmuskelzellen vom m-Phänotyp). Sie entstehen unter Einfluss von NO-Mangel aus der in der normalen Gefäßwand vorhandenen kontraktilen Form der Mediamonozyten (k-Phänotyp) und zeichnen sich durch eine hohe Produktionsrate faserreichen Materials aus (17). Plaquemakrophagen und Endothelzellen führen über die Bildung von Endothelin-1 zudem zu einer Vasokonstriktion des bereits durch die zuvor geschilderten Mechanismen thrombosegefährdeten und zunehmend starren Gefäßlumens (18). Letztlich bewirkt der Wegfall der NO-vermittelten Apoptose-Induktion zunehmend eine Akkumulation von Plaquemakrophagen und durch deren Zytokinproduktion folglich die Progredienz von Endotheldysfunktion und Gefäßwandsklerosierung (19).

1.2 Zusammensetzung und Stoffwechsel der Lipoproteine

Lipoproteine bestehen aus einem mizellären Komplex hydrophober und amphiphiler Lipide sowie stabilisierender und regulatorischer Proteine und stellen ein Transportvehikel für Nahrungslipide und verschiedene, endogen metabolisierte Lipide im Serum dar. Je nach spezifischer Zusammensetzung der Lipidfraktion (Triglyceride, Cholesterinester, Phospholipide, freies Cholesterin) und der Proteinfraction (Apolipoproteine) entstehen Partikel unterschiedlicher Größe, Dichte und metabolischer Funktion. Das Lipoproteinspektrum umfasst die sechs Hauptfraktionen Chylomikronen (CM), Very-low-density-Lipoprotein (VLDL), Intermediate-density-Lipoprotein (IDL), Low-density-Lipoprotein (LDL) und die High-density-Lipoproteine HDL₂ und HDL₃.

Die über die Dünndarmmukosa resorbierten Nahrungslipide gelangen im exogenen Lipidstoffwechselweg in Form von Chylomikronen über die Lymphe in das Blut. Hier werden sie vorwiegend durch die an Skelettmuskulatur und Fettgewebe ortsständige Lipoprotein-Lipase (LPL) hydrolysiert. Die resultierenden Remnants werden schließlich über den LDL-Rezeptor von der Leber aufgenommen. In der Leber werden VLDL aus Triglyceriden, Cholesterinestern, Phospholipiden und den Apolipoproteinen B-100, C und E synthetisiert und venös sezerniert. Intravasal kommt es über den endogenen Lipidstoffwechselweg durch die LPL an Leber, Fettgewebe und Makrophagen zur Reduktion des hohen Triglycerid-Anteils der VLDL und somit zur Delipidierung der VLDL über IDL zu den kleineren und Cholesterinester reichen LDL. Zwei Drittel der LDL im Serum werden über den LDL-Rezeptor hepatisch aufgenommen und weiter metabolisiert. Nur ein geringer Teil der LDL wird vom peripheren Gewebe für den Membranaufbau oder für die Synthese von Steroidhormonen verwertet. Die im Blut verbleibende Menge des LDL wird unabhängig vom LDL-Rezeptor zum Beispiel über Endozytose-Mechanismen der Skelettmuskulatur sowie über Scavenger-Rezeptoren von Makrophagen aufgenommen. Über den nicht Feedback-regulierten Scavenger-Rezeptor gelangen nur modifizierte LDL, darunter vor allem oxidiertes LDL, in die Makrophagen. Dieser Mechanismus kann bei hohen LDL-Serumwerten (> 200 mg/dl; Sättigung aller LDL-Rezeptoren) zur ungebremsten Überladung der Makrophagen mit Cholesterinestern und über den bereits in Kapitel 1.1 dargestellten Weg zur Schaumzellbildung führen (20).

HDL entstehen de novo intrahepatisch oder aus Abbauprodukten der Chylomikronen (surface remnants) und sind durch Apo-A-haltige Lipoproteine gekennzeichnet. Sie spielen eine Schlüsselrolle bei dem reversen Cholesterintransport. Die noch kleinen und dichten HDL₃ absorbieren an den Membranen peripherer Zellen freies Cholesterin, welches durch die Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT) verestert wird. Die HDL₃ gewinnen somit an Masse und reifen zu den größeren HDL₂, welche nun eine geringere Dichte aufweisen. Das Cholesterin gelangt über HDL₂ in VLDL sowie LDL und letztlich nach rezeptorvermittelter Endozytose in die Leber oder in andere Gewebe (21).

1.3 Problematik der Diagnostik atherosklerotischer Gefäßveränderungen

Seit Steinberg et al. 1989 erstmals die Hypothese zur Atheroskleroseentstehung durch oxidativ modifiziertes LDL postulierte (22), konnte in zahlreichen experimentellen Studien zunehmend die Relevanz oxidativer Veränderungen des LDL für die Genese der Atherosklerose gesichert werden. Allerdings existieren bisher nur wenige humane Daten aus epidemiologischen Studien. Grund dafür sind komplizierte und aufwendige Messmethoden für oxidiertes LDL sowie bislang fehlende bildgebende Techniken zur Beurteilung von Frühschädigungen der Gefäßwand, die erst in den letzten Jahren entwickelt wurden (22).

Zur Konzentrationsbestimmung von oxidiertem LDL wurden in der jüngeren Vergangenheit zum einen Assay-Systeme auf der Basis von Antikörpern gegen oxidiertes LDL, zum anderen chromatographische Methoden entwickelt (23; 24). Die Konzentrationsbestimmung von oxidiertem LDL mit diesen Methoden ist aufgrund des hohen experimentellen Aufwands dieser Verfahren und der Notwendigkeit der unmittelbaren Verarbeitung der Proben in Bevölkerungsstudien bisher kaum durchgeführt worden. Daten in Bezug auf den Zusammenhang der Konzentration von oxidiertem LDL mit klinischen Daten zum Gefäßstatus und anderer proatherogener Faktoren standen deshalb aufgrund der notwendigen größeren Probandenzahl bislang aus.

Grundlage dieser Arbeit ist eine neue Methode zur Bestimmung der Konzentration von oxidiertem LDL im Serum durch ¹H-kernspinresonanzspektroskopische Untersuchungen (¹H-NMR-Spektroskopie) nach Jankowski (25). ¹H-NMR-Spektren von Probanden mit schwerer Atherosklerose und Grunderkrankungen wie Diabetes mellitus und Niereninsuffizienz zeigen im Verschiebungsbereich von 1,17 bis

1,20 ppm (parts per million; relativ zu Trimethyl-silylpropionsäure) drei Resonanzen. Diese Resonanzen sind in Kontrollseren gesunder Probanden nicht oder nur in geringerer Intensität nachweisbar. Fraktionierte und aufgetrennte Serumproben zeigen, dass die Resonanzen dem oxidierten LDL zuzuordnen sind. Natives LDL weist bei der $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie keine entsprechenden Resonanzen auf. Wird LDL hingegen oxidiert, so entsteht das charakteristische Muster der drei Resonanzen, das auch im Probandenserum registriert werden kann. Das Muster der im Probandenserum gemessenen Resonanzen lässt sich somit durch Oxidation von nativem LDL reproduzieren.

Die charakteristischen Resonanzen für oxidiertes LDL erlauben eine Quantifizierung der Konzentrationen von oxidiertem LDL im Serum. Zwischen der Konzentration von oxidiertem LDL und der Intensität der Resonanzen findet sich innerhalb des gesamten Bereiches der in den Seren gemessenen Intensitäten ein linearer Zusammenhang. Somit lässt sich die $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie nicht nur zur Detektion von oxidiertem LDL im Serum einsetzen, sondern auch zu dessen Quantifizierung. Weitere Untersuchungsergebnisse hatten gezeigt, dass hohe Konzentrationen von oxidiertem LDL im Serum von Probanden mit koronarer Herzerkrankung und in signifikant geringeren Konzentrationen auch im Serum von gesunden Kontrollpersonen in freier Form auftreten (25).

1.4 $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie von Seren

Mit dem Hinweis auf die umfassende $^1\text{H-NMR}$ -Literatur entfällt an dieser Stelle eine ausführliche Beschreibung der $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie (26-29). Der bedeutende, limitierende Nachteil der $^1\text{H-NMR}$ -Analyse bestand nach Einführung der Methode in der geringen Empfindlichkeit der verfügbaren Spektrometer. Durch Veränderungen in der Geräteausstattung der $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie konnte jedoch eine wesentlich höhere Auflösung und Empfindlichkeit der Spektrometer erreicht werden, hierfür stehen beispielhaft Entwicklungen supraleitender Magnete, der Puls-FT-Technik, leistungsstärkerer Radiofrequenzsender und neuer Probenkopfauslegungen (Lowe, 1957; Ernst, 1962 (30); Hull, 1984).

Nachdem das Hauptanwendungsgebiet der $^1\text{H-NMR}$ -Analyse ursprünglich die Strukturaufklärung von Molekülen in der Chemie war, entwickelt sich die $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie aufgrund der zunehmenden Empfindlichkeit auch zu einer viel

versprechenden Methode zur Untersuchung von Körperflüssigkeiten (31-34). Im Vergleich zu klassischen Analyseverfahren (u.a. chromatographische) weist die $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie dabei einige entscheidende Vorteile auf. So erlaubt sie eine direkte Untersuchung von Körperflüssigkeiten, bei der nur ein geringes Probenvolumen (0,5 ml) notwendig ist. Durch die Analyse wird die Probe nicht zerstört und steht weiteren Untersuchungen zur Verfügung. Die Analysendauer von biochemischen Proben liegt im Minutenbereich und im Gegensatz zu den klassischen biochemischen Analysemethoden, wie enzymatische Bestimmungen oder radioaktives Markieren, ist es mittels der $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie möglich, in biologischen Proben mehrere Substanzen gleichzeitig ohne vorherige Auftrennung zu bestimmen. Wegen der geringen Empfindlichkeit ist die Methode jedoch auf Metabolite beschränkt, die in relativ hohen Konzentrationen vorliegen (10 μMol , abhängig von der verwendeten Feldstärke) (35). Durch die Fülle der Informationen auch unter Einbeziehung weiterer $^1\text{H-NMR}$ -aktiver Kerne kann dieser Nachteil jedoch kompensiert werden. Die Methode ist unspezifisch, so dass auch unerwartete Substanzen oberhalb der Nachweisgrenze detektiert werden. Hinsichtlich der Untersuchung von Medikamentenmetabolismus und klinisch-chemischen Untersuchungen sind in den vergangenen Jahren eine Vielzahl von Anwendungen der $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie beschrieben worden (36; 37). In der Klinik wurde die $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie von Serum und Urin zur Klärung biochemischer Fragestellungen bei Krankheitsbildern wie Diabetes mellitus und angeborenen Stoffwechselstörungen eingesetzt. Ferner fand die Methode bereits Verwendung zur Therapiekontrolle bei Stoffwechselerkrankungen (37, 38; 39).

2 Problemstellung und Zielsetzung

Die Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems haben eine herausragende Bedeutung für Morbidität und Mortalität in der westlichen Welt (40). Es ist daher von großem Interesse, die Zusammenhänge von Risikofaktoren, Entstehung und Verlauf dieser Erkrankungen zu erforschen, um einerseits geeignete Methoden zur Diagnostik und Prävention und andererseits kausale Therapieansätze zu entwickeln. Die Mechanismen der mikro- und makrovaskulären Veränderungen im Rahmen der Atherosklerose spielen dabei eine zentrale Rolle. Sie sind vielschichtig und reichen von allgemeinen Risikofaktoren wie Diabetes mellitus hin zu pathobiochemischen Vorgängen in den Signalkaskaden des Zellstoffwechsels.

In der vorliegenden Arbeit wird der Einfluss des vaskulär aktiven oxidierten Low-Density-Lipoproteins für die Diagnostik atherogener Gefäßveränderungen anhand bereits bekannter Parameter für vaskuläre Risikofaktoren untersucht. Dabei wurde zur Bestimmung der Serumkonzentration von oxidiertem LDL erstmalig eine von Jankowski et al. entwickelte ¹H-NMR-spektroskopische Analyse angewendet, welche es aufgrund ihrer Effizienz erlaubt, größere Patientenkollektive in vergleichbar kurzer Zeit zu untersuchen.

3 Methodik

3.1 Patientencharakterisierung

Es wurden 549 postmenopausale Frauen konsekutiv in die Untersuchung einbezogen. Die Frauen wurden anhand einer Stichprobe 45- bis 65-jähriger Frauen des Einwohnermeldeamtsregisters Bochum durch schriftliche Kontaktaufnahme rekrutiert. Es wurden nur Frauen in die Untersuchung einbezogen, die sich in den ersten zehn Jahren nach der Menopause befanden und aktuell keine weiblichen Hormonersatz- oder Kortisonpräparate einnahmen. Eine frühere Einnahme dieser Präparate oder die Verwendung bestimmter anderer hormonhaltiger oder Östrogenrezeptor-modulierender Medikamente wie Phytopharmaka zur Behandlung klimakterischer Beschwerden oder östrogenhaltige Externa zur Behandlung atrophischer Schleimhautveränderungen im Genitalbereich stellten kein Ausschlusskriterium dar. Die Probandinnen ernährten sich drei Tage vor der Untersuchung zur Vorbereitung auf einen oralen Glukose-Toleranztest kohlenhydratreich, wenn kein manifester Diabetes mellitus bei ihnen bekannt war. Die Studie wurde von der örtlichen Ethikkommission der Ruhr-Universität Bochum unter der Registrier-Nummer 1343 genehmigt.

3.2 Modifizierter Studienfragebogen

Die anamnestischen Daten wurden mit Hilfe eines modifizierten Studienfragebogens (siehe Abschnitt V Anhang) der "Bochumer Studie zu Gesundheit und Krankheit bei Frauen nach den Wechseljahren" standardisiert erhoben. Es wurden Fragen (Items) zur Erfassung eines erhöhten Arteriosklerosisrisikos gestellt. Im Einzelnen bezogen sich diese Items auf folgende Inhalte:

In den Fragen 1 bis 4 werden die demographischen Daten Lebensalter, Körpergewicht und -größe erhoben. Die Fragen 5 bis 12 und 19 befassen sich mit der Familien- bzw. Eigenanamnese der Probandinnen. Hierbei wurde gezielt nach Erkrankungen wie Herzinfarkt, Schlaganfall, Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, Hypercholesterinämie, periphere arterielle Verschlusskrankheit und Nierenfunktionsstörungen gefragt. Die Frage 13 eruiert die aktuelle Medikamentenanamnese (z. B. Antihypertensiva, Lipidsenker, Koronartherapeutika, orale Antidiabetika und Insulin). Eine genaue Anamnese eines eventuell vorliegenden Nikotinabusus erheben die

Fragen 14 bis 18. Schließlich erheben die Fragen 20 bis 22 die Ernährungsgewohnheiten der Probandinnen (Fettgehalt der Kost, Anteil von Obst und Gemüse, Konsum von Genussmitteln wie Kaffee und Alkohol).

3.3 Blutentnahme

Die Blutprobengewinnung erfolgte zwischen 7:00 Uhr und 9:00 Uhr. Die Probandinnen erschienen nüchtern; die letzte Nahrungsaufnahme bzw. Aufnahme kohlenhydrathaltiger Getränke war bis 20:00 Uhr des Vortages erlaubt. Die Blutabnahme wurde in einer Zeitspanne von zwei Wochen vor bis zwei Wochen nach der sonographischen Untersuchung der Halsschlagadern durchgeführt. Die Blutproben wurden im Sitzen durch Venenpunktion der Vena cubitalis gewonnen. Es wurden dazu zwei EDTA Vollblut-Proben zur Bestimmung von HbA_{1c} und Homozystein (mit Eis gekühlt) und zwei Serum-Proben entnommen. Eine zur Bestimmung der Serumlipide (Gesamtcholesterin, LDL, HDL, Triglyzeride), der Nüchternglukose und der Nierenwerte (Kreatinin, Harnstoff) sowie eine Serum-Probe für die ¹H-NMR-Spektroskopie von oxidiertem LDL.

Nach initialer Blutentnahme bekamen die Probandinnen im Rahmen des oralen Glukose-Toleranztests (OGTT) 300 ml einer standardisierten Glukoselösung zu Trinken (Dextro O.G-T., Hoffmann-La Roche, Mannheim, Deutschland). Diese Lösung wurde innerhalb von 5 Minuten getrunken und enthielt ein Gemisch aus Mono- und Oligosacchariden, das nach enzymatischer Spaltung einer Menge von 75 g wasserfreier Glukose entspricht. Die Uhrzeit der Glukosegabe wurde dokumentiert. Danach sollten die Probandinnen in den nächsten zwei Stunden keine zusätzliche Nahrung oder Flüssigkeit zu sich nehmen, nicht rauchen und nach Möglichkeit ruhig und bequem sitzen ohne übermäßige körperliche Aktivität. Nach 120 Minuten wurde eine weitere Blutentnahme zur Bestimmung der Blutglukosekonzentration vorgenommen und die Untersuchung beendet. Die Blutanalyse wurde im Labor des Instituts für Klinische Chemie, BG-Kliniken Bergmannsheil, Klinikum der Ruhr-Universität Bochum, Transfusions- und Laboratoriumsmedizin durchgeführt.

3.4 Probenvorbereitung

Das Vollblut wurde unmittelbar nach der venösen Entnahme bei 5.000 U/min für 20 min vom Serum abzentrifugiert (Zentrifuge Eppendorf 3200; Firma Eppendorf,

Hamburg, Deutschland). Der klar gelbliche Serumüberstand wurde mit einer Pasteurpipette von den roten Blutkörperchen getrennt. Es wurden ein 2 ml Serum entnommen und mittels eines Rüttlers zur Gewährleistung der Probenhomogenität 60 s durchgemischt. 0,5 ml Serum wurde mit 50 µl D₂O und mit 50 µl einer 0,75% 3-Trimethylsilyl-[2,2,3,3-²H₄]-Propionsäure (TSP) haltigen D₂O-Lösung (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) versetzt und in ein 5 mm high-quality NMR tube (Goss Scientific Instruments, Great Baddow, Essex, UK) gefüllt. Das NMR-Röhrchen wurde sowohl mit einem Polyethylenstopfen, als auch mit einem Parafilm verschlossen. Nach der Probenvorbereitung wurde die Probe an der Fakultät für Chemie und Biochemie der Ruhr-Universität Bochum vermessen.

3.5 Carotiden-B-Bild-Sonographie zur Intima-Medien-Dicken-Bestimmung

Die Probandinnen wurden vor der Carotiden-B-Bild-Sonographie zunächst körperlich untersucht. Im Rahmen dieser Routineuntersuchung wurde der Ruheblutdruck bestimmt. Die Dickenmessung des Intima-Media-Komplexes (IMD) der Carotiden-Arterien wurde mit hochauflösender B-Bild-Sonographie durchgeführt. Dazu wurde ein Ultraschallgerät mit hochfrequentem 7,5 MHz-Linear-Schallkopf (CoreVision SSA 350A, Firma Toshiba) verwendet. Die Probandinnen wurden auf einer Liege in Rückenlage mit leicht erhobenem Oberkörper gelagert. Der Kopf war nach hinten überstreckt und leicht von der zu untersuchenden Seite weggedreht. Zur Darstellung der Arteria carotis communis wurden die Halsgefäße zunächst im Querschnitt von der Klavikula bis zur Schädelbasis in kaudal-kränialer Richtung untersucht. Medial in Höhe des Musculus sternocleidomastoideus wurde der Schallkopf auf dem Gefäßquerschnitt in eine Längsachse gedreht und die Bifurkation in einer Ebene dargestellt. Die Dickenmessung des Intima-Media-Komplexes erfolgte an drei Stellen, 1,0 cm, 1,5 cm und 2,0 cm proximal der Bifurkation. Die dorsale Gefäßwand der Arteria carotis communis zeigt zwei parallele echoreiche Schichten unterbrochen von einer echoarmen Region (Media). Der innere echoreiche Eintrittsreflex stellt den Übergang zwischen Gefäßlumen und Intima dar. Der Übergang zur zweiten echoreichen Schicht entspricht der Media-Adventitia-Grenze. Gemessen wurde der Abstand zwischen diesen Linien, der sich aus den Dicken der Intima und Media (IMD) zusammensetzt. Größere Wandverdickungen in Form von Plaques wurden gesondert dokumentiert. Das identische Vorgehen wurde zur Untersuchung der Arte-

ria carotis communis auf der Gegenseite angewendet. Die dopplersonographische Vermessung der Intima-Media-Dicke (IMD) beider Arteriae carotenes communes einer Probandin ergab somit je Arteria carotis communis drei Messwerte im Abstand von 1,0 cm, 1,5 cm und 2,0 cm proximal der Bifurkation. Es wurde der Mittelwert von drei IMD-Messungen jeder Seite bestimmt und der jeweils größte Messwert in Zentimetern dokumentiert. Der dopplersonographische Nachweis von atherosklerotischen Plaques an den Gefäßwänden wurde gesondert registriert.

3.6 $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie der Probandinnenserum

Zur Aufnahme der hochaufgelösten 9,5 T (400 MHz) Spektren wurde ein AMX-400 FT-NMR-Spektrometer der Firma Bruker (Bruker Analytische Messtechnik, Rheinstetten, Deutschland) mit einem selektiven 5 mm- ^1H -Probenkopf verwendet. Die Rotationsfrequenz der Probe betrug während der Messung 21 Umdrehungen pro Minute. Die Halbwertslinienbreite des TSP-Signals wurde als Kriterium zum Ausschluss von Magnetfeldinhomogenitäten bestimmt. Die standardisierten Messungen wurden bei einer kontrollierten Temperatur von 25°C aufgenommen. Die Anregungsfrequenz wurde in einem 90°-Impuls eingestrahlt, welcher in Vormessungen jeweils bestimmt wurde. Die Sättigungsfrequenz des Wassersignals wurde für jede Probe individuell bestimmt. Der Freie-Induktions-Abfall (FID) der Messungen wurde sowohl mit als auch ohne Apodisationsfunktion einer Fourier-Transformation unterzogen. Im Anschluss wurden die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren phasen- und basislinienkorrigiert, auf das TSP-Signal kalibriert und abgespeichert.

3.7 In-vitro Oxidation von nativem LDL

3.7.1 Isolation von Lipoproteinen aus humanem Serum

Zur Isolation der Lipoproteine wurden Serumlipide nach der Methode von Folch et al. (41) aus humanem Serum extrahiert. Dazu wurde Serum wie bereits in Kapitel 3.3 beschrieben vorbereitet, mit Methanol und Chloroform im Verhältnis 4 Vol. %:11 Vol. %:5,4 Vol. % gemischt und 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Zur Phasentrennung wurden 0,2 Vol. 0,1 mol/l Kaliumchlorid-Lösung zugegeben und das Extraktionsgemisch bei 15.000 U/Min für drei Minuten in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Die untere lipophile Phase wurde abgenommen und unter Stickstoffbelüftung

getrocknet, in Ethanol gelöst und unter Rühren in eine Pufferlösung (PBS;1:200) eingespritzt.

In einem zweiten Schritt wurden Chylomikronen ($d < 1,000$ g/L), Very-Low-Density-Lipoprotein (VLDL; $d = 1,000 - < 1,006$ g/L) mit Intermediate-Density Lipoprotein (IDL; $d = 1,006 - < 1,019$ g/L) und LDL ($d = 1,019 - < 1,063$ g/L) aus humanem Serum über diskontinuierliche KBr-Gradienten nach Havel et al.(42) isoliert. Dazu wurden zunächst eine VLDL-Dichtelösung mit $d = 1,006$ g/L (12,5 g NaCl + 950 ml Aqua destillata) und eine HDL-Dichtelösung mit $d = 1,346$ g/L (354,0 g KBr + 153,0 g NaCl + 1000 ml Aqua destillata) als Stammlösungen erstellt, aus denen sich durch anteiliges Mischen die anderen benötigten Dichtelösungen ergaben. Um die Chylomikronen-Fraktion zu erhalten, wurden 5 ml Plasma in ein verschließbares Plastik-Zentrifugen-Tube mit definiertem Volumen (Beckmann, München, Deutschland) gefüllt und mit VLDL/IDL-Dichtelösung ($d = 1,019$ g/L aus 251,5 ml VLDL-Dichtelösung und 10 ml HDL-Dichtelösung) überschichtet. Anschließend wurde mit einem Festwinkelrotor 30 Minuten bei 9500 U/min und 25°C zentrifugiert. Die Chylomikronen-Fraktion wurde durch Schneiden des Röhrchens (Tube) auf einer Schnitthöhe von 1 cm gewonnen.

Zur Isolation der VLDL/IDL-Fraktion wurde der gesamte Chylomikronen-Unterstand in ein neues Röhrchen überführt, mit VLDL/IDL-Dichtelösung ($d = 1,019$ g/L) aufgefüllt und 16 Stunden bei 40.000 U/min und 16°C zentrifugiert. Die Schnitthöhe zur Gewinnung des VLDL/IDL-freien Unterstandes betrug 1/3 des Röhrchens. Von diesem Unterstand wurden nun 6 ml in ein weiteres neues Röhrchen überführt, mit 6 ml LDL-Dichtelösung ($d = 1,107$ g/L aus 118 ml VLDL-Dichtelösung und 50 ml HDL-Dichtelösung) überschichtet und mit einer Dichtelösung von $d = 1,063$ g/L (VLDL/IDL- und LDL-Dichtelösung 1:1) aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde 20 Stunden lang bei 40.000 U/min und 16°C zentrifugiert. Die Isolation der LDL-Fraktion erfolgte aus dem Überstand des bei 1/3 der Länge geschnittenen Zentrifugen-Röhrchens. Die Lipoproteine wurden über 24 Stunden bei pH 7,4 gegen PBS dialysiert, danach filtriert und anschließend bei 4°C unter Lichtausschluss und Stickstoffabschluss aufbewahrt. EDTA (0,1% w/v) war bei allen Präparationsschritten enthalten.

Der Proteingehalt der Lipoproteine wurde durch Ausfällen mit Trichloressigsäure nach der Methode von Lowry et al. bestimmt (43). Dabei wurde 1 ml Lipoprotein-Lösung in einem Reagenzglas mit Schliff vorgelegt und mit 5 ml einer alkalischen

Cu²⁺-Reagenz (50:1-Gemisch aus 2 %iger Lösung von Na₂CO₃ und K-Na-Tartrat in 0,1 mol/l NaOH und 0,5%iger Lösung von CuSO₄·5H₂O) durchmischt. Nach 15-minütiger Inkubation bei 25°C wurde zur Probe 0,5 ml Folin-Reagenz (Phosphormolybdat/ Phosphorwolframat) hinzugefügt und der Reaktionsansatz nach dem Verschließen des Reagenzglases sofort kräftig durchgeschüttelt. Nach 60-minütiger Inkubation bei 25°C wurde die Extinktion des gebildeten blauen Farbstoffes bei 750 nm an einem Absorptionsspektralphotometer (Perkin-Elmer, Rodgau, Deutschland) vermessen. Der Proteingehalt der Lipoprotein-Lösung wurde dann anhand des molaren Extinktionskoeffizienten einer Verdünnungsreihe bekannter Proteinkonzentration unter Anwendung des Lambert-Beer'schen Gesetzes ermittelt.

3.7.2 Oxidation von LDL

Das isolierte LDL wurde 24 Stunden lang bei 4°C gegen mit Stickstoff gesättigtem PBS dialysiert und anschließend mit EDTA freiem und mit Stickstoff gesättigtem PBS (pH 7,4) verdünnt. Die Oxidation von LDL wurde mit der Zugabe von frisch hergestelltem Kupfersulfat (CuSO₄·5H₂O) bei Raumtemperatur gestartet. Die resultierenden Konzentrationen ergaben 0,25 mg/ml oxidiertes LDL und 0,41 µg/ml CuSO₄. Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen (TBARS) in der oxidierten LDL-Probe wurden nach der Methode von Yagi (44) mit Malondialdehydbisdimethylacetal als Standard bestimmt.

3.8 Ermittlung der Kalibrierfunktion

Aus der Stammlösung des *in vitro* oxidierten LDL mit einer bekannten Konzentration von 0,25 mg/ml wurde eine zehnstufige Verdünnungsreihe hergestellt. Die Konzentration von oxidiertem LDL in den Proben wurde dazu jeweils abwechselnd auf 20% beziehungsweise 50% des vorhergehenden Verdünnungsschrittes eingestellt bis zu einer Endkonzentration von 2,5 ng/ml, entsprechend 0,01‰ der Stammlösung. Zur Vorbereitung der Proben wurde jeweils 50 µl TSP/D₂O und 50 µl D₂O in einem ¹H-NMR-Tube vorgelegt, das entsprechend anteilige Volumen der Stammlösung dazugegeben und mit Aqua destillata auf 600 µl aufgefüllt. Die zehn Proben der Verdünnungsreihe mit jeweils bekannter Konzentration wurden wie in Kapitel 3.6 beschrieben vermessen, phasen- und basislinienkorrigiert und auf das TSP-Signal kalibriert. Die Intensität (arbitrary units) der charakteristischen Resonanz von

oxidiertem LDL bei 1,17 ppm (relativ zu TSP), die in den ^1H -NMR-Probespektren gemessen wurde, wurden als Funktion der Konzentration von oxidiertem LDL graphisch dargestellt. Mittels linearer Regression des Funktionswertes resultierte eine Gerade mit bekanntem Anstieg, deren zugrunde liegende Funktion zur Berechnung unbekannter Probenkonzentrationen von oxidiertem LDL diente.

3.9 Statistik

Die statistische Analyse der Daten wurde mit dem Programm SPSS for Windows Version 13.1. der SPSS Software GmbH (München, Deutschland) durchgeführt. Zum Varianz- und Regressionsanalytischen Vergleich mehrerer unabhängiger Messwertreihen (Laborwerte, IMD, Fragebogen-Items und demographische Daten) und der Zielgröße oxidiertes LDL wurde eine multifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde dabei auf $p < 0,05$ festgelegt.

4 Ergebnisdarstellung

4.1 Auswertung der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren

Für die abschließende Auswertung standen 533 Seren der insgesamt 549 in die Studie eingeschlossenen Probandinnen zur Verfügung. Die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der Probandinnen-Seren wurden digital mit der Software WIN-NMR[®] Version 6.0 der Bruker-Daltronik (Bremen, Deutschland) bearbeitet. Dazu wurden alle Spektren mit dem Programm zuerst automatisch phasen- und basislinienkorrigiert. Das Spektrum wurde anhand des TSP-Standards (3-Trimethylsilyl-[2,2,3,3- $^2\text{H}_4$]-Propionsäure) kalibriert, so dass das Intensitätsmaximum der TSP-Resonanz den Nullpunkt der chemischen Phasenverschiebungsskala definiert (0,0 ppm). Aus den Resonanz-Intensitätsmaxima des oxidierten LDLs bei 1,20 ppm, 1,18 ppm und 1,17 ppm wurde dann die maximale Intensität der charakteristischen Resonanz bei 1,17 ppm relativ zur maximalen Intensität des TSP-Signals bestimmt. Charakteristische $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von Seren ohne und mit oxidativ verändertem LDL werden beispielhaft in Abbildung 1 und 2 gezeigt.

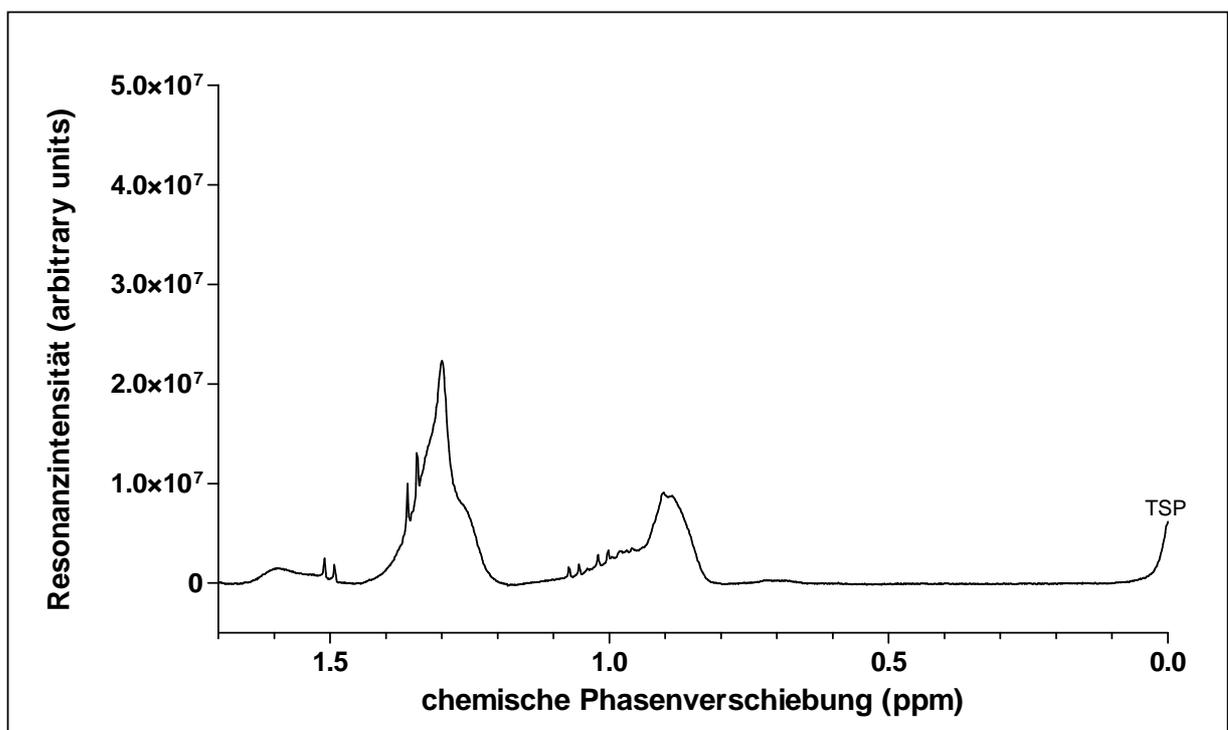


Abbildung 1: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ohne Resonanzen von oxidiertem LDL
TSP-Resonanz-Intensitätsmaximum bei 0,0 ppm (parts per million)

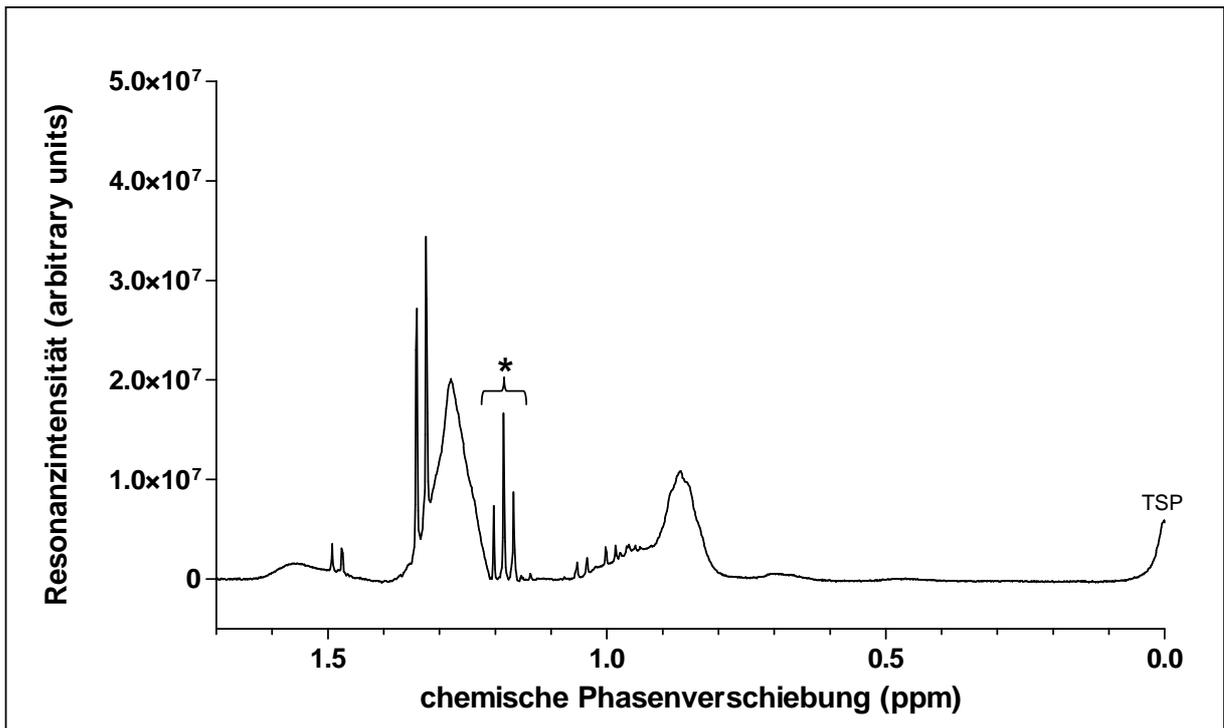


Abbildung 2: ¹H-NMR-Spektrum mit charakteristischen Resonanz-Intensitätsmaxima von oxidiertem LDL

* kennzeichnet die charakteristischen Resonanz-Intensitätsmaxima von oxidiertem LDL bei 1,17 ppm, 1,18 ppm und 1,20 ppm; TSP-Resonanz-Intensitätsmaximum bei 0,0 ppm

4.2 Bestimmung der Serumkonzentration von oxidiertem LDL

Zur Ermittlung der Kalibrierfunktion für die charakteristische Resonanz von oxidiertem LDL bei 1,17 ppm wurden zehn Proben mit bekannter Konzentration wie in Kapitel 3.8 beschrieben vermessen und ausgewertet. Die lineare Regression der Resonanz-Intensitäten (arbitrary units) relativ zur TSP-Intensität ergab eine Gerade mit einem Anstieg des Faktors 0,39 bei einem Determinationskoeffizienten von $r^2 = 0,95$ und $p = 0,001$. Die resultierende Kalibrierfunktion für 1,17 ppm (Abbildung 3) diene im Folgenden zur Berechnung unbekannter Probenkonzentrationen von oxidiertem LDL.

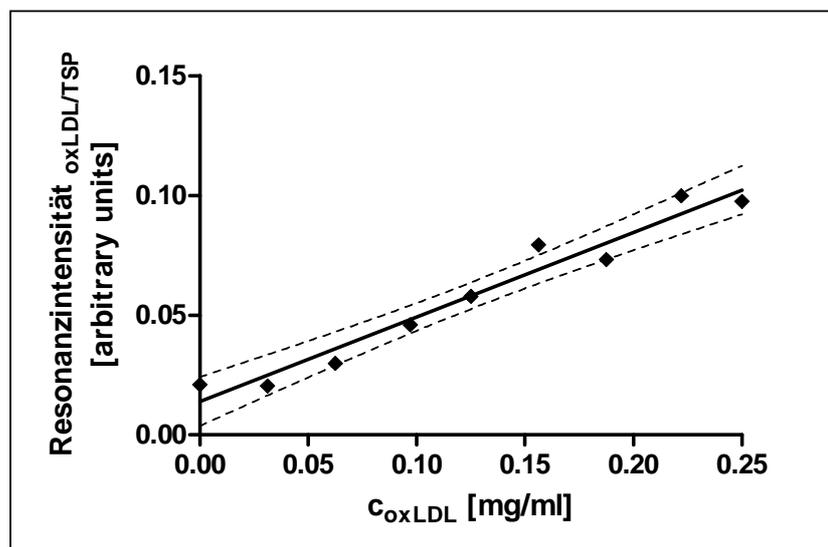


Abbildung 3: Ausschnitt der Kalibrierfunktion für die charakteristische Resonanz von oxidiertem LDL bei 1,17 ppm.

Exemplarische Darstellung der Kalibrierfunktion für das Konzentrationsintervall 0,0 bis 0,25 mg/dl (durchgezogene Linie) mit 95%-Konfidenzintervall (gestrichelte Linien). $x = c_{\text{oxLDL}}$ [mg/ml]: Konzentration des oxidierten LDL in mg/ml; $y =$ arbitrary units: die Resonanzintensität von oxidiertem LDL wurde durch die von TSP dividiert

Die Serumkonzentrationen des oxidierten LDL aller Probandinnenserien wurden in mg/dl berechnet. Dazu wurden für jedes Spektrum die Werte der maximalen Resonanz-Intensität bei 1,17 ppm relativ zum TSP-Resonanzintensitätsmaximum in die Gleichung der Kalibrierfunktion eingesetzt. Insgesamt konnte bei 66 von 533 Probandinnen (= 12,4%) oxidiertes LDL nachgewiesen werden. Deskriptiv statistisch besteht bei diesen 66 Seren eine mittlere Konzentration an oxidiertem LDL von

0,98 ± 2,77 mg/dl. Minimal wurde eine Konzentration von 0,02 mg/dl und maximal eine von 18,10 mg/dl gemessen.

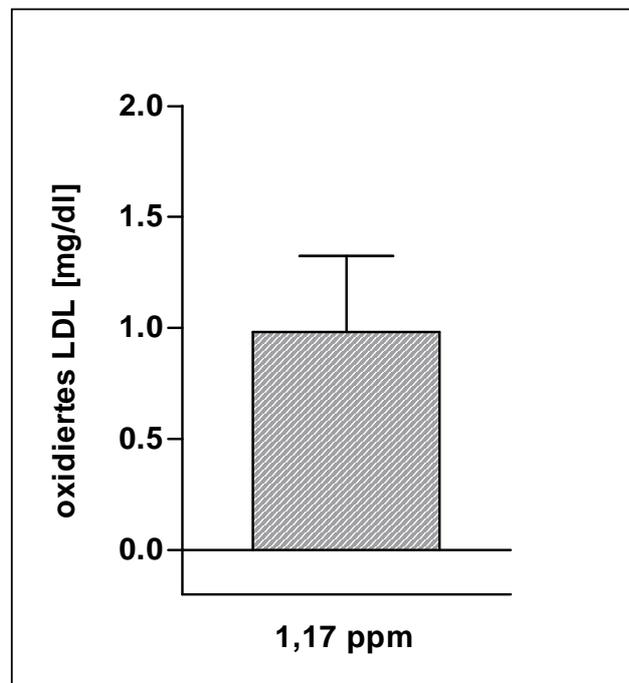


Abbildung 4: Verteilung der Konzentration von oxidiertem LDL in Probandinnenseren bei der charakteristischen Resonanz 1,17 ppm

Die Konzentration von oxidiertem LDL bei der Resonanz 1,17 ppm wird in mg/dl wiedergegeben; Mittelwert = 0,98 mg/dl; SEM = 0,34 mg/dl.

4.3 Korrelation der Serumkonzentration von oxidiertem LDL mit klinischen Parametern

Der Zusammenhang zwischen der Serumkonzentration von oxidiertem LDL und den anamnestischen, klinischen und laborchemischen Daten wurde mittels multifaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) untersucht. Als abhängige Variable diente dabei die Serumkonzentration von oxidiertem LDL in mg/dl bei der Resonanz 1,17 ppm. Als unabhängige Variablen wurden die demographischen Daten (Alter, Körpergewicht, Körpergröße), die Frage-Items des modifizierten Studienfragebogens, die Intima-Media-Dicken sowie alle Blutparameter herangezogen. Das ANOVA-Modell wurde mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ definiert und hat den Pearson'schen Koeffizienten $r = 0,634$ sowie den multiplen Determinationskoeffizienten $r^2 = 0,402$ ergeben.

4.3.1 Korrelation mit den Fragebogen-Items

Die Antworten auf die Frage-Items des modifizierten Studienfragebogens (vgl. Kapitel 3.1.2) der "Bochumer Studie zu Gesundheit und Krankheit bei Frauen nach den Wechseljahren" (siehe Abschnitt V Anhang) wurden kodiert und die Daten anonymisiert. Die Auswertung der demographischen Daten Probandinnenalter, Körpergewicht und Körpergröße, welche im Rahmen des Fragebogens erhoben wurden, ergab ein durchschnittliches Probandinnenalter von 55 ± 6 Jahren. Der errechnete Body-Mass-Index betrug im Mittel $27,0 \pm 5,6$. Zum Vergleich mit der Zielgröße Konzentration von oxidiertem LDL wurden die Antworten des Fragebogens mittels ANOVA analysiert. Dabei zeigte sich für das Frage-Item 13.12.1 Applikation von Insulin länger als drei Monate aus dem Themenblock der aktuellen Medikamentenanamnese ein signifikanter Zusammenhang mit hohen Serumkonzentrationen für oxidiertes LDL. Die Analyse ergab einen Regressionskoeffizienten von $b_{\text{Item}} = 3,504$, $p = 0,001$. Probandinnen mit einer subkutanen Insulinapplikation in der Dauermedikation haben demnach höhere Serumspiegel von oxidiertem LDL (vgl. Abbildung 5). Die Themenblöcke Demographische Daten, Familien- und Eigenanamnese, Nikotinabusus und Ernährungsgewohnheiten zeigten keinen signifikanten Zusammenhang zur Serumkonzentration von oxidiertem LDL.

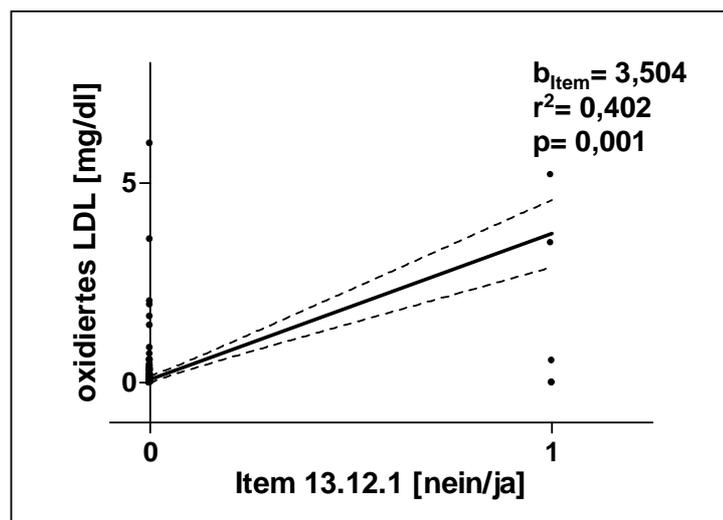


Abbildung 5: Korrelation der Konzentration von oxidiertem LDL mit Item 13.12.1

Regressionsgerade von $x =$ Beantwortungsmöglichkeit [nein (0)/ ja (1)] des Items 13.12.1 (Applikation von Insulin länger als drei Monate) und $y = c_{\text{oxLDL}}$ [mg/ml]: Serumkonzentration von oxidiertem LDL in mg/ml. b_{Item} = Regressionskoeffizient.

4.3.2 Korrelation mit der Intima-Media-Dicke

Die maximale Intima-Media-Dicke betrug in der dopplersonographischen Vermessung bei allen Probandinnen im Mittel $0,67 \text{ cm} \pm 0,09 \text{ cm}$. Die maximale Intima-Media-Dicke der Probandinnen, in deren Seren oxidiertes LDL nachweisbar war, betrug $0,68 \text{ cm} \pm 0,1 \text{ cm}$. Insgesamt konnten bei sechs von 533 Probandinnen atherosklerotische Plaques in einer Arteria carotis communis detektiert werden. Bei allen sechs Probandinnen wurde auch oxidiertes LDL im Serum nachgewiesen. In der statistischen Analyse bestand jedoch kein signifikanter Zusammenhang zwischen IMD-Werten ($r^2 = 0,171$; $p = 0,175$) oder dem Nachweis von atherosklerotischen Plaques ($r^2 = 0,015$; $p = 0,903$) und einer erhöhten Serumkonzentration für oxidiertes LDL.

4.3.3 Korrelation mit den Ergebnissen der Blutuntersuchungen

Bei der laborchemischen Untersuchung der Blutproben wurden folgende Parameter analysiert: Serumlipide (Gesamtcholesterin, Triglyzeride, LDL, HDL), Nierenwerte (Kreatinin, Harnstoff), Nüchtern glukose, Blutzuckerlangzeitwert (HbA_{1c}), sowie Homozystein. Im Rahmen des oralen Glukosetoleranztests (OGTT) wurde der Blutzuckerserumwert 120 Minuten nach Verabreichung einer standardisierten Glukoselösung gemessen.

Die Serumlipide wurden zudem in Bezug auf die pathophysiologische Relevanz ihrer Serumkonzentrationen deskriptiv ausgewertet. Dabei wurde die reale und die prozentuale Anzahl der Probandinnen mit einer behandlungsbedürftigen Serumlipidkonzentration bei Probandinnen mit Nachweis von oxidiertem LDL denen ohne Nachweis von oxidiertem LDL gegenüber gestellt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Verteilung von behandlungsbedürftigen Serumlipidwerten für Frauen ab dem 50. Lebensjahr nach Dörner (45)

Darstellung der Probandinnen mit behandlungsbedürftigen Serumlipidwerten. Maximaler Referenzwert des Serumlipids Spalte eins von links. Reale und prozentuale Anzahl der Probandinnen ohne Nachweis von oxidiertem LDL (oxLDL negativ, n = 467) und der Probandinnen mit Nachweis von oxidiertem LDL (oxLDL positiv, n = 66).

Serumlipid mit max. Referenzwert	Probandinnen-Gruppe	reale Anzahl an Probandinnen	prozentuale Anzahl an Probandinnen
Gesamtcholesterin ≥ 260 mg/dl	ox LDL positiv	n = 17 von 66	25,6 %
	ox LDL negativ	n = 130 von 467	27,8 %
Triglyceride ≥ 200 mg/dl	ox LDL positiv	n = 9 von 66	13,6 %
	ox LDL negativ	n = 55 von 467	11,7 %
LDL-Cholesterin ≥ 190 mg/dl	ox LDL positiv	n = 9 von 66	13,6 %
	ox LDL negativ	n = 96 von 467	20,5 %
HDL-Cholesterin ≤ 46 mg/dl	ox LDL positiv	n = 8 von 66	12,1 %
	ox LDL negativ	n = 73 von 467	15,6 %

Die multifaktorielle Varianzanalyse der Blutparameter ergab fünf Parameter, die mit einer erhöhten Serumkonzentration von oxidiertem LDL signifikant korrelieren ($r^2 = 0,402$; $p < 0,05$). Hierzu gehören die Serumlipide Triglyceride und HDL, die Diabetes-Parameter glykierte Hämoglobin-Unterfraktion A_{1c} („Blutzuckerlangzeitwert“ HbA_{1c}) und der Serum-Glukosespiegel nach 120 Minuten im oralen Glukose-Toleranztest ($OGTT_{120}$) sowie der Nierenfunktionswert Harnstoff. Die resultierenden Regressionskoeffizienten der Serumlipide $b_{TRI} = 0,009$ und $b_{HDL} = 0,073$ als auch die der Diabetes-Parameter $b_{HbA_{1c}} = 0,599$ und $b_{OGTT} = 0,004$ sind grösser Null und zeigen einen proportionalen Zusammenhang mit oxidiertem LDL. Probandinnen mit erhöhten Serumwerten für oxidiertes LDL hatten folglich eine signifikant höhere Serumkonzentration an Triglyceriden, HDL, HbA_{1c} und höhere Glukosespiegel im oralen Glukose-Toleranztest nach 120 Minuten als die übrigen Probandinnen. Der

Regressionskoeffizient des Nierenfunktionswertes Harnstoff $b_{\text{HST}} = -0,204$ ist kleiner Null, die Korrelation ist folglich invers: Probandinnen mit erhöhten Serumwerten für oxidiertes LDL hatten demnach signifikant niedrigere Harnstoff-Serumwerte als die übrigen Probandinnen. Die Regressionsmodelle von oxidiertem LDL und den signifikant korrelierenden Blutparametern sind in den folgenden fünf Abbildungen (Abbildungen 6-10) graphisch dargestellt.

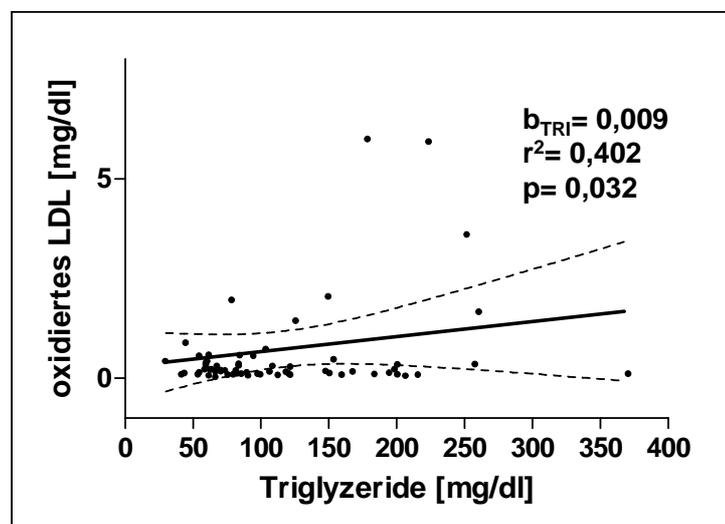


Abbildung 6: Korrelation der Konzentration von oxidiertem LDL mit Triglyceriden

Regressionsgerade von $x = c_{\text{TRI}}$ [mg/ml]: Serumkonzentration der Triglyceride in mg/ml und $y = c_{\text{oxLDL}}$ [mg/ml]: Serumkonzentration von oxidiertem LDL in mg/ml. b_{TRI} = Regressionskoeffizient. Die gestrichelte Markierung zeigt das 95%-Konfidenzintervall.

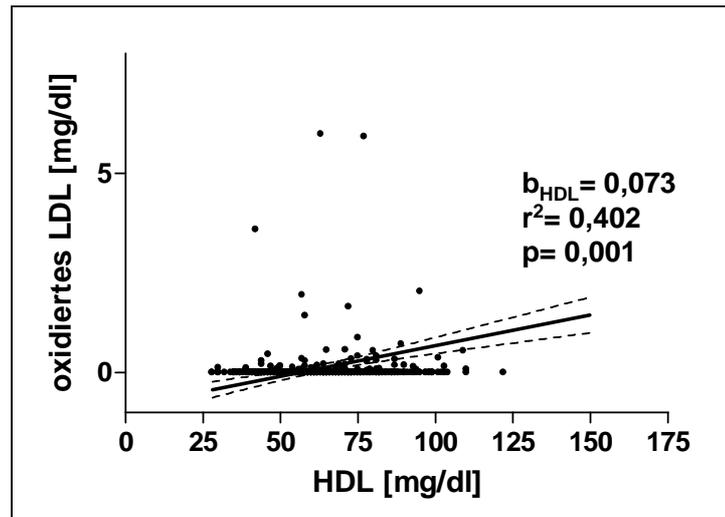


Abbildung 7: Korrelation der Konzentration von oxidiertem LDL mit HDL

Regressionsgerade von $x = c_{\text{HDL}}$ [mg/ml]: Serumkonzentration von HDL in mg/ml und $y = c_{\text{oxLDL}}$ [mg/ml]: Serumkonzentration von oxidiertem LDL in mg/ml. b_{HDL} = Regressionskoeffizient. Die gestrichelte Markierung zeigt das 95%-Konfidenzintervall.

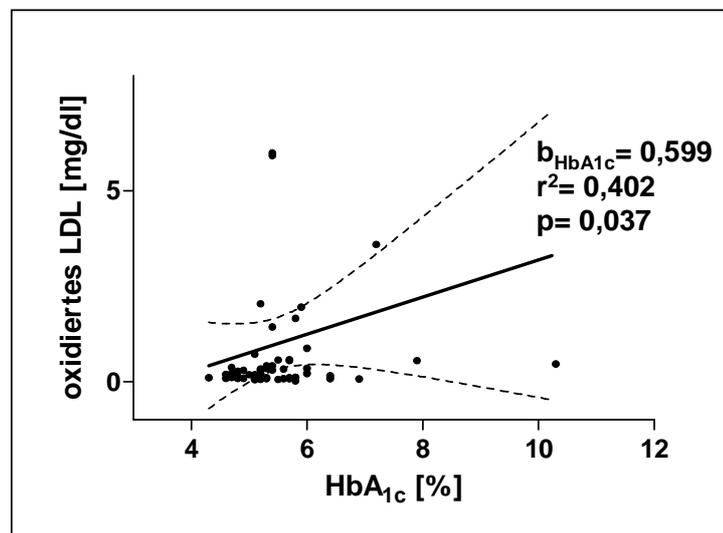


Abbildung 8: Korrelation der Konzentration von oxidiertem LDL mit HbA_{1c}

Regressionsgerade von $x = c_{\text{HbA1c}}$ [%]: Serumkonzentration der glykierten Hämoglobin-Unterfraktion A1c („Blutzuckerlangzeitwert“) in Prozent und $y = c_{\text{oxLDL}}$ [mg/ml]: Serumkonzentration von oxidiertem LDL in mg/ml. b_{HbA1c} = Regressionskoeffizient. Die gestrichelte Markierung zeigt das 95%-Konfidenzintervall.

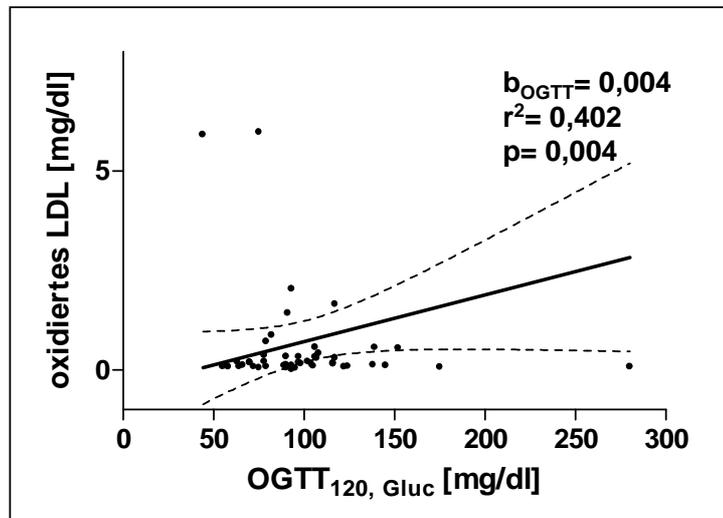


Abbildung 9: Korrelation der Konzentration von oxidiertem LDL mit $OGTT_{120}$

Regressionsgerade von $x = c_{OGTT_{120, Gluc}}$ [mg/ml]: Serum-Glucose-Konzentration nach 120 Minuten im oralen Glucose-Toleranztest und $y = c_{oxLDL}$ [mg/ml]: Serumkonzentration von oxidiertem LDL in mg/ml. b_{OGTT} = Regressionskoeffizient. Die gestrichelte Markierung zeigt das 95%-Konfidenzintervall.

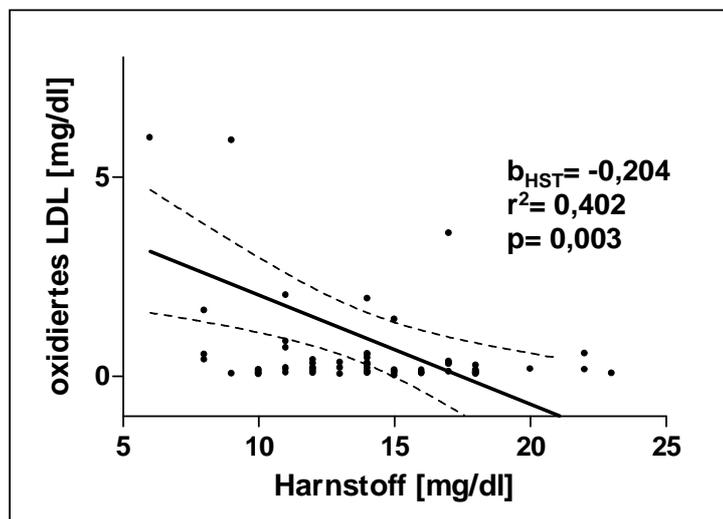


Abbildung 10: Korrelation der Konzentration von oxidiertem LDL mit Harnstoff

Regressionsgerade von $x = c_{HST}$ [mg/ml]: Serumkonzentration von Harnstoff in mg/ml und $y = c_{oxLDL}$ [mg/ml]: Serumkonzentration von oxidiertem LDL in mg/ml. b_{HST} = Regressionskoeffizient. Die gestrichelte Markierung zeigt das 95%-Konfidenzintervall.

Die Blutparameter Nüchtern glukose, Kreatinin, Homozystein, Cholesterin und LDL sowie die Ruheblutdruckwerte zeigten in der statistischen Auswertung keinen signifikanten Zusammenhang mit erhöhten Serumkonzentrationen von oxidiertem LDL. Eine Zusammenfassung dieser Parameter wird in Tabelle 2 wiedergegeben.

Tabelle 2: Parameter ohne signifikante Korrelation mit oxidiertem LDL

Darstellung des mittleren Blutdrucks sowie der mittleren Serumkonzentrationen der Blutparameter ohne signifikanten Zusammenhang mit erhöhten Serumwerten für oxidiertes LDL von Probandinnen ohne Nachweis von oxidiertem LDL (oxLDL negativ, n = 467) und der Probandinnen mit Nachweis von oxidiertem LDL (oxLDL positiv, n = 66). sys= systolisch, dia= diastolisch.

	ox LDL positiv	ox LDL negativ	Korrelation
Ruheblutdruck	140/ 88 mmHg	136/ 86 mmHg	$r^2 = 0,048$; $p = 0,082$ sys $r^2 = 0,038$; $p = 0,120$ dia
Nüchtern glukose	95,4 mg/dl	97,4 mg/dl	$r^2 = 0,143$; $p = 0,316$
Kreatinin	0,77 mg/dl	0,77 mg/dl	$r^2 = 0,212$; $p = 0,092$
Homocystein	10,12 $\mu\text{mol/l}$	9,96 $\mu\text{mol/l}$	$r^2 = 0,107$; $p = 0,408$
Gesamtcholesterin	239,0 mg/dl	240,7 mg/dl	$r^2 = 0,226$; $p = 0,072$
LDL-Cholesterin	147,0 mg/dl	152,0 mg/dl	$r^2 = 0,034$; $p = 0,786$

5 Diskussion

Mit Hilfe der ^1H -NMR-Spektroskopie der 533 Probandinnen-Seren konnte bei 66 Probandinnen oxidiertes LDL im Serum nachgewiesen werden. Der statistische Vergleich mit etablierten Parametern von vaskulären Risikofaktoren ergab einen signifikanten Zusammenhang zwischen den Serumwerten für oxidiertes LDL und den Serumlipiden Triglyceride und HDL, den Diabetes-Parametern Blutzuckerlangzeitwert (HbA_{1c}), Serum-Glukosespiegel nach 120 Minuten im oralen Glukose-Toleranztest (OGTT_{120}) und der Applikation von Insulin länger als drei Monate (Frage-Item 13.12.1) sowie dem Nierenfunktionswert Harnstoff.

Im Folgenden sollen die für diese Arbeit angewendete Methode diskutiert und die Ergebnisse vor dem aktuellen wissenschaftlichen Hintergrund interpretiert werden. Abschließend soll die Relevanz von oxidiertem LDL für die Diagnostik vaskulärer Prozesse bei Atherosklerose und Diabetes mellitus herausgestellt werden.

5.1 Diskussion der Methodik

In verschiedenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass nicht nur Makrophagen, sondern auch zahlreiche andere Zellklassen wie Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Monozyten, Lymphozyten und Fibroblasten LDL-Partikel oxidativ modifizieren können (46). Die Mechanismen der zellvermittelten Oxidation sind bisher jedoch nur in Teilen bekannt. Gegenwärtig lassen sich fünf Konzepte abgrenzen, in denen die Oxidation der LDL-Partikel durch intra- versus extrazelluläre Enzyme (Lipoxygenase, Phospholipase A_2), durch reaktive Sauerstoffspezies aus dem Stickstoffmonoxid (NO)-Stoffwechsel sowie durch die katalytische Aktivität der Myeloperoxidase diskutiert werden (47), (48), (49), (50).

Der Oxidationsprozess im LDL-Partikel schreitet nach Anreicherung von Lipidperoxidasen in einer durch Radikale vermittelten Kettenreaktion rasch voran. Dabei kommt es zur Oxidation von freiem Cholesterin und im Rahmen der Fettsäureperoxidation zur Anreicherung von Malondialdehyd (51). Aldehyde binden an Lysin-Reste des Apolipoproteins B-100 und führen somit über Änderungen der Elektronegativität zu dessen erheblichen strukturellen Veränderungen (52).

Die Quantifizierung oxidierten LDLs im Serum erfolgt bisher vorwiegend über chromatographische Verfahren und Immunoabsorptionsassays (53). Der Aufwand

dieser Methoden macht die Diagnostik von oxidiertem LDL kostspielig und zeitaufwendig. Um ein größeres Kollektiv auf diesen Parameter hin untersuchen zu können, entwickelten Jankowski et al. 1998 eine Methode zur Quantifizierung von oxidiertem LDL in humanem Serum mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie (25). Ausgehend von *in vitro* Cu^{2+} -oxidiertem LDL konnte ein spezifisches Resonanzmuster (1,17 ppm, 1,18 ppm, 1,20 ppm; relativ zu 3-Trimethylsilyl-(2,2,3,3- $^2\text{H}_4$)-propionat) identifiziert werden, welches sich im Serum von Patienten mit schwerer koronarer Herzkrankheit reproduzieren ließ. Vergleichbare Ergebnisse erzielte im Jahr 2002 auch die Forschergruppe um Brindle und Nicholson (UK). Sie konnten zeigen, dass die Serumkonzentration einer Substanz mit einem $^1\text{H-NMR}$ -Intensitätsmaximum um 1,30 ppm mit dem Schweregrad der koronaren Herzkrankheit korreliert und vermuteten, dass es sich dabei um modifiziertes LDL handelt (54). Es gelang bisher jedoch noch nicht, das $^1\text{H-NMR}$ -Resonanzmuster für oxidiertes LDL einem Korrelat auf molekularer Ebene zuzuordnen. Aufgrund des komplexen Oxidationsprozesses innerhalb des LDL-Partikels resultiert möglicherweise aus einer Summe oxidativer Reaktionen eine Mischung oxidierter Strukturgruppen.

In der vorliegenden Arbeit konnte bei 12,4 % der untersuchten Probandinnen (66 von $n = 533$) oxidiertes LDL in den $^1\text{H-NMR}$ -Spektren anhand der oben genannten spezifischen Resonanzmuster detektiert werden. Die Auswertung der Probandinnen-daten ergab $^1\text{H-NMR}$ -Spektren, bei denen nur ein (1,17 ppm), zwei (1,18 ppm, 1,17 ppm) oder alle drei (1,20 ppm, 1,18 ppm, 1,17 ppm) Resonanz-Peaks vorhanden waren. Da die Resonanz bei 1,17 ppm bei allen Probandinnen mit Nachweis von oxidiertem LDL vorhanden war, wurden ausschließlich die Intensitäts-maxima bei 1,17 ppm zur Berechnung der Serumkonzentration von oxidiertem LDL verwendet. Zur Erklärung der inhomogenen Verteilung der Resonanz-Peaks kann der oben beschriebene, komplexe Oxidationsprozess innerhalb der LDL-Partikel herangezogen werden. Dieser könnte *in vivo* zu einer inhomogenen Konzentration oxidierter Strukturgruppen im LDL-Partikel führen, so dass das typische $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von *in vitro* Cu^{2+} -oxidiertem LDL nicht vollständig erreicht wird.

5.2 Oxidiertes LDL und Dyslipoproteinämie

Probandinnen dieser Studie mit zunehmend hohen Serumwerten für oxidiertes LDL weisen signifikant häufiger eine Hypertriglycerinämie auf. Interessanterweise konnten

jedoch keine signifikanten Korrelationen zwischen Serumkonzentrationen von oxidiertem LDL und Gesamtcholesterin oder LDL-Cholesterin gefunden werden. Im Vergleich zum Gesamtkollektiv scheinen Probandinnen mit Nachweis von oxidiertem LDL sogar insgesamt weniger behandlungsbedürftige Serumspiegel für Gesamtcholesterin und LDL-Cholesterin zu haben (Tabelle 1; Kapitel 4.3.3). Die gleiche Befundkonstellation beschrieben auch Julius et al. in einer Studiengruppe mit 752 Probanden (55). Anhand ihrer Studienergebnisse konnten Julius et al. 2007 des Weiteren nachweisen, dass hohe Triglycerid-Serumwerte zu einer vermehrten Bildung atherogener, kleiner und dichter LDL-Partikel ($< 25,5$ nm) führen (55). Es wird angenommen, dass mögliche Ursachen für die erhöhte Atherogenität kleiner dichter LDL-Partikel eine höhere Oxidationsbereitschaft, eine leichtere Penetration der Arterienwände und eine geringe Affinität zum LDL-Rezeptor bei gleichzeitig hoher Affinität zum Scavenger-Rezeptor darstellen könnten (56; 57). Hohe Triglycerid-Serumwerte können somit die Bildung von oxidiertem LDL durch die Bereitstellung leicht oxidierbarer, kleiner LDL-Partikel begünstigen.

Dem gegenüber steht die in dieser Arbeit ermittelte positive Korrelation von oxidiertem LDL und HDL-Cholesterin. Aus den Ergebnissen zahlreicher Studien, in denen für HDL eine anti-atherogene Wirkung nachgewiesen werden konnte (58; 59), resultiert jedoch die Annahme einer negativen Korrelation, das heißt einer inversen Beziehung zwischen proatherogenem oxidiertem LDL und kardioprotektivem HDL. HDL-Cholesterin verfügt über zahlreiche antiatherogene Wirkungen: neben dem reversen Cholesterintransport (Kapitel 1.2) vermag HDL biologisch aktive und zytotoxische Lipidperoxidationsprodukte aus LDL, zum Beispiel oxidiertes LDL zu inaktivieren und besitzt antiinflammatorische sowie antikoagulatorische Eigenschaften (60). Es gibt jedoch zunehmend Hinweise, dass HDL von Patienten mit chronischer systemischer Inflammation, Diabetes mellitus und Atherosklerose paradoxerweise die vaskuläre Inflammation sowie die Oxidation von LDL begünstigt (61). Dieses proinflammatorische HDL scheint aufgrund chemischer und struktureller Modifikationen durch die enzymatische Aktivität der Myeloperoxidase zu entstehen (62). Zudem entsteht bei chronischer systemischer Inflammation vermehrt das Akute-Phase-Protein Serum-Amyloid-A, welches in den HDL-Partikeln Apolipoprotein A-I ersetzen kann und dadurch die Funktionalität des HDL deutlich einschränkt (63). Insbesondere führt der Austausch von Apolipoprotein A-I gegen Serum-Amyloid-A zum Verlust

der Paraoxonase. HDL verliert dadurch die Fähigkeit Lipidperoxidationsprodukte zu inaktivieren (64).

Die vorliegenden Ergebnisse lassen vor diesem Hintergrund den Schluss zu, dass die Oxidation von LDL durch ein Lipidmuster aus Hypertriglycerinämie und proinflammatorischem HDL begünstigt wird. Bei der routinemäßigen Beurteilung der HDL-Fraktion im Patientenserum zur Dyslipoproteinämie-Diagnostik bei kardiovaskulären Erkrankungen bzw. zur Verlaufskontrolle unter einer lipidsenkenden medikamentösen Therapie sollte daher nicht nur auf quantitative Aspekte Wert gelegt werden. Es wäre zukünftig zu prüfen, ob die erhöhte Serumkonzentration von oxidiertem LDL im Rahmen der Labordiagnostik ein Indikator für das Vorhandensein von proinflammatorischem HDL in der HDL-Gesamtfraktion darstellen könnte.

5.3 Oxidiertes LDL und Diabetes mellitus

Die Relevanz von Diabetes mellitus für die Progredienz der koronaren Herzkrankheit ist hinlänglich bekannt und in vielen großen Studien nachgewiesen worden. Zwei Drittel aller Patienten mit Diabetes mellitus versterben an einer kardiovaskulären Komplikation (65). Die Situation von Frauen in der Postmenopause, welche in der vorliegenden Arbeit das untersuchte Kollektiv darstellen, ist unter diesem Aspekt sehr risikoreich: Östrogene hemmen die Bildung von oxidiertem LDL und die Expression proinflammatorischer Zytokine (2), so dass mit dem raschen Abfall der Östrogene nach der Menopause gleich zwei inhibierende Ansatzpunkte in dem Prozess der Atheroskleroseentstehung verloren gehen. Der Östrogenmangel erhöht somit das Risiko der Entwicklung einer koronaren Herzerkrankung. Des Weiteren konnten Huxley et al. 2006 zeigen, dass das relative Risiko für tödliche Komplikationen einer koronaren Herzkrankheit bei Frauen mit Diabetes mellitus um 50% höher lag als bei den Männern der Vergleichsgruppe (66).

Der meist im Erwachsenenalter erworbene Diabetes mellitus Typ 2 ist mit 90-95% die häufigste Form des Diabetes mellitus (67). Der Erkrankungsverlauf ist schleichend und durch kaum wahrnehmbare Veränderungen der Stoffwechselfunktionen in der Frühphase gekennzeichnet. Die zumeist späte Diagnosestellung erfolgt oft erst anhand sekundärer Folgeerkrankungen von Gefäßen, Nerven, Nieren, Augen und der Haut. Es stellt daher eine Herausforderung dar, die laborchemischen und klinischen Anzeichen eines Diabetes mellitus Typ 2 möglichst früh zuerkennen (68).

Die international gültigen Kriterien zur Diagnostik eines Diabetes mellitus werden durch die Amerikanische Diabetes-Gesellschaft (ADA) in Kooperation mit der Weltgesundheitsorganisation (WHO) regelmäßig aktualisiert und empfohlen. Demnach besteht ein Diabetes mellitus, wenn klassische Symptome wie Polyurie, Polydipsie und unklarer Gewichtsverlust mit einem Gelegenheitswert für Serumglukose >200 mg/dl oder ein Nüchternglukosewert >126 mg/dl oder Messwerte für Serumglukose im OGTT nach 120 Minuten >200 mg/dl vorliegen (69).

In der vorliegenden Arbeit kann ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Serumkonzentration von oxidiertem LDL und den Diabetes-Markern 120-Minuten-Wert des OGTT (OGTT120), HbA_{1c} und Insulinpflichtigkeit (Item 13.12.1 Applikation von Insulin länger als drei Monate) gezeigt werden. Dabei kommt dem OGTT120 die meiste Bedeutung in der Standarddiagnostik des Diabetes mellitus und vor allem in der Diagnostik der diabetischen Frühformen zu. Der OGTT120 korreliert darüber hinaus besser mit der diabetesbedingten kardialen Sterblichkeit als der Nüchternglukosewert und besitzt damit über seine Funktion als Diagnosekriterium hinaus einen hohen Stellenwert in der Risikoeinschätzung der Entwicklung sekundärer kardiovaskulärer Erkrankungen (70).

HbA_{1c} ist eine glykierte Hämoglobin-Unterfraktion in Erythrozyten und dient der Verlaufkontrolle bei Patienten mit bekanntem Diabetes mellitus. Im Rahmen der Erythrozytenalterung kommt es nicht-enzymatisch zu einer irreversiblen Bindung von Glukose an Hämoglobinmoleküle. Dieser Prozess findet linear zur Plasmaglukosekonzentration statt. Da die Überlebenszeit von Erythrozyten circa zwei bis drei Monate beträgt, bildet der HbA_{1c}-Wert die mittlere Plasmaglukosekonzentration für dieses Zeitintervall zuverlässig ab (71). Bei fortgeschrittenem Diabetes mellitus Typ 2 kommt es zunehmend zu einer Störung der Insulinsekretionskinetik der pankreatischen β -Zellen. Letztlich ist die körpereigene Insulinproduktion zur Regulation der postprandialen Hyperglykämie nicht mehr ausreichend, so dass Insulin zusätzlich therapeutisch substituiert werden muss (72).

Erhöhte Serumwerte für oxidiertes LDL stehen laut den Untersuchungsergebnissen dieser Arbeit mit den zuvor genannten Parametern OGTT120, HbA_{1c} und der therapeutischen Insulinsubstitution und folglich mit den frühen und fortgeschrittenen Formen des Diabetes mellitus Typ 2 in einem signifikanten Zusammenhang. Es

können somit metabolische Schnittstellen zwischen oxidiertem LDL und konsekutiven Diabetesfolgen sowie den pathophysiologischen Mechanismen des Diabetes mellitus Typ 2 vermutet werden.

Die diabetische Stoffwechselstörung ist unter anderem gekennzeichnet durch die Entwicklung einer triglyceridreichen Dyslipoproteinämie sowie einer chronischen Inflammation mit oxidativem Stress. Die Hypertriglyceridämie führt über die bereits in Kapitel 5.2 erläuterten Mechanismen zur Entstehung kleiner atherogener LDL-Partikel sowie zu cholesterinesterreichen VLDL-Remnants, die zu einer verstärkten zellulären Lipidakkumulation in Makrophagen führen (73). Des Weiteren werden bei dauerhafter hyperglykämischer Stoffwechsellage hochreaktive Intermediärprodukte aus glykierten Proteinen, so genannte AGE-Produkte (advanced glycation end products) gebildet. Diese führen über eine intrazelluläre Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B zur Produktion zahlreicher proinflammatorischer Zytokine und hoch-reaktiver Sauerstoffradikale (74). Die diabetische Stoffwechsellage kann somit die Voraussetzungen für eine ausgeprägte Lipidperoxidation schaffen und folglich die Entstehung von oxidiertem LDL begünstigen.

Die Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2 wird durch die beiden Größen Insulinresistenz der Zielorgane (Skelettmuskulatur, Leber) und Insulinsekretionsdefekt der pankreatischen β -Zellen bestimmt (75). Der Insulinresistenz kommt hierbei eine wichtige Rolle zu, da sie mehrere Jahre unbemerkt einer symptomatischen Manifestation eines Diabetes mellitus Typ 2 vorausgehen kann. Insulin führt über den Insulin-Rezeptor, der zur Familie der Tyrosinkinase-Rezeptoren gehört, an den Zielorganen zur Induktion intrazellulärer Signalkaskaden. Hierbei kommt es nicht nur zur Insulin-vermittelten Glukoseaufnahme in die Zelle, sondern auch zu verschiedenen Mechanismen der genetischen Regulierung des Fettstoffwechsels und der zellulären Insulinsensitivität (76). Die Insulinresistenz ist somit eine verminderte zelluläre Antwort auf Insulin. Sie bewirkt eine kompensatorisch vermehrte Insulinsekretion des Pankreas und resultiert in einer initialen postprandialen Hyperglykämie mit verzögerter Hyperinsulinämie (77). In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass insulinresistente Muskel- und Leberzellen sowie pankreatische β -Zellen vermehrt intrazelluläre Lipidablagerungen aufweisen (78). Nach der Hypothese von Unger und McGarry kommt dieser ektopen Lipidakkumulation eine entscheidende Rolle in der Entstehung und Ausprägung der Insulinresistenz zu (79), indem es zu

einem Ungleichgewicht intrazellulärer Signalkaskaden zugunsten einer verminderten Glukoseaufnahme in die Zelle kommt (80). Ein analoger Mechanismus könnte auch in den Endothel- und Gefäßmuskelzellen präatherosklerotischer Gefäße existieren, auf deren Zelloberfläche auch Insulinrezeptoren exprimiert werden. Insulin vermittelt über diese Rezeptoren sowohl pro- als auch antiatherogene Effekte (siehe Abbildung 11/A). Es aktiviert einerseits die PI₃K-Akt/PKB-Kaskade (Phosphoinositid-3-Kinase; Akt-Proteinkinase B) und erzielt somit unter anderem über eine vermehrte eNOS-stimulierte Stickoxid-Produktion (endotheliale Stickoxidsynthase, Kapitel 1.1) eine Vasodilatation. Gleichzeitig wirkt Insulin über den MAP-Kinase-Signalweg (Mitogen Activated Protein Kinase) mitogen durch die Expression von Adhäsionsmolekülen und vasokonstriktiv wirkendem Endothelin-1 (81). Eine ektope Lipidakkumulation könnte ebenso wie eine chronische systemische Inflammation zur Entwicklung einer Insulinresistenz der Gefäßzellen führen und letztlich eine endotheliale Dysfunktion verursachen. Hierbei kommt es intrazellulär zur Blockierung der PI₃K-Akt/PKB-Kaskade, so dass die mitogene, MAP-Kinase vermittelte Insulinwirkung überwiegt und eine proatherogene Situation entsteht (82).

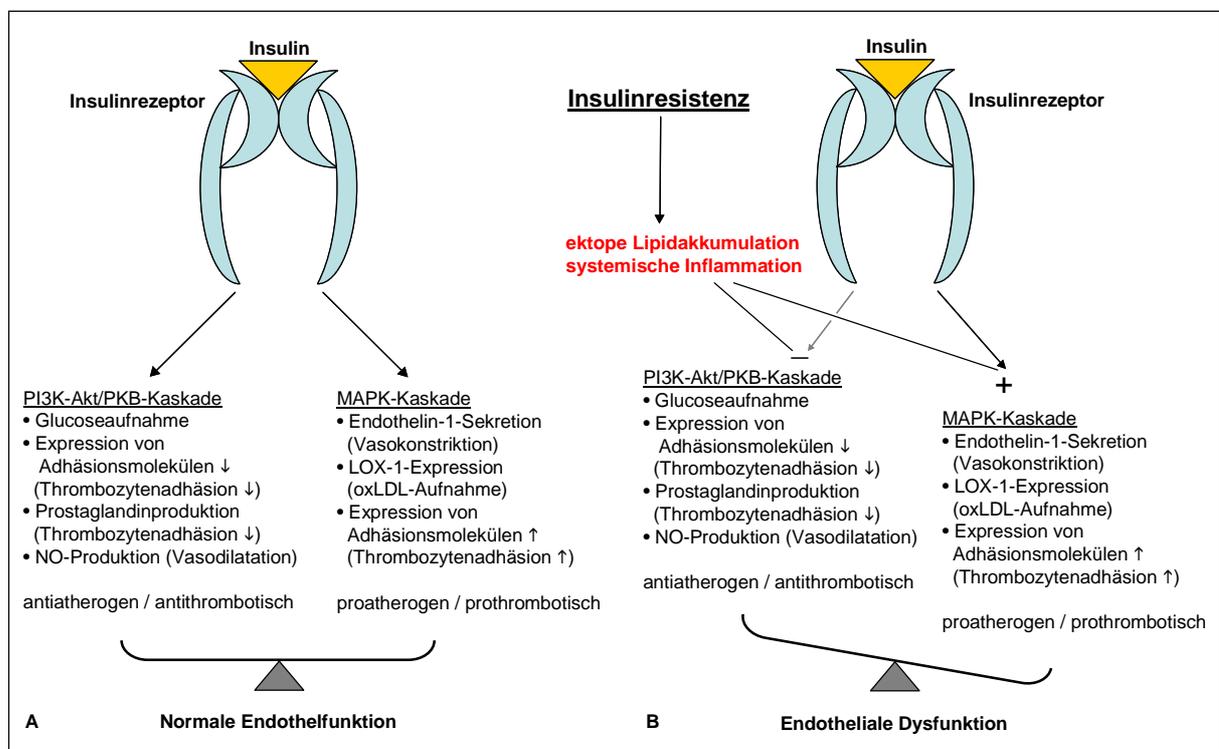


Abbildung 11: Änderungen der Insulinrezeptor vermittelten intrazellulären Signalkaskaden bei Insulinresistenz und deren Auswirkung auf die Endothelfunktion

Quelle: eigene Darstellung in Anlehnung an Li et al (82)

Der Prozess der ektopen Lipidakkumulation sowie die daran beteiligten Lipidfraktionen sind im Detail noch nicht bekannt. Oxidiertes LDL könnte in diesem Zusammenhang jedoch ein entscheidendes Bindeglied darstellen. Über Scavenger-Rezeptoren kann oxidiertes LDL ungehemmt in Gefäßzellen eindringen und eine Lipotoxizität induzieren. Eine weitere Verstärkerschleife besteht darin, dass über den stimulierten MAP-Kinase-Signalweg vermehrt Endothelin-1 produziert wird (siehe Abbildung 11/B). Endothelin-1 führt über eine Aktivierung des membranständigen Endothelin-Rezeptors 2 zur Expression von LOX-1 (Lectin-like oxLDL-Rezeptor-1) (18). LOX-1 ist ebenfalls membranständig und bewirkt eine weitere intrazelluläre Aufnahme von oxidiertem LDL und begünstigt somit das Fortschreiten der Lipidakkumulation.

Die in diesem Kapitel dargestellten Zusammenhänge machen deutlich, dass oxidierte LDL-Partikel sowohl in der Pathogenese des Diabetes mellitus, als auch in der Entwicklung sekundärer diabetischer Folgeerkrankungen ein wichtiges Bindeglied darstellen. Die in dieser Arbeit signifikante Korrelation von oxidiertem LDL mit OGTT120 stellt einerseits die mögliche Bedeutung von oxidiertem LDL für die Diagnostik einer Insulinresistenz mit hohem kardiovaskulären Risikopotential dar. Andererseits macht sie die Hypothese der ektopen Lipidakkumulation als pathogenetisches Teilkonzept der Insulinresistenzentwicklung wahrscheinlich. Die wesentlich durch oxidiertes LDL vermittelte Lipotoxizität der Gefäßzellen (Endothelzellen, Mediamyozyten) könnte darüber hinaus einen neuen Stellenwert in der Pathogenese der Atherosklerose erhalten. Diabetische Folgeerkrankungen resultieren aus einer chronischen systemischen Inflammation, welche durch oxidativen Stress, AGE-Produkte und eine hohe Zytokinausschüttung gekennzeichnet ist. Zeichen für dieses metabolische Umfeld sind hohe Serumwerte für HbA_{1c} und die Notwendigkeit einer therapeutischen Insulinsubstitution bei fortgeschrittener Insulinsekretionsstörung. Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, kann oxidiertes LDL in diesem Zusammenhang ebenfalls als Marker für eine fortgeschrittene diabetische Stoffwechsellaage angesehen werden.

5.4 Oxidiertes LDL und Nierenfunktionsstörung

Störungen des Fettstoffwechsels und Veränderungen im Lipoproteinmuster entstehen bereits früh bei einer nur minimal eingeschränkten Nierenfunktion. Im

Rahmen einer langsam zunehmenden Störung der glomerulären Filtrationsrate entstehen durch sinkende Serumalbuminspiegel Störungen in der Clearance und Synthese proatherogener Lipidfraktionen mit Akkumulation triglyceridreicher HDL₃, LDL, und VLDL-Remnants, die zu einer manifesten Dyslipoproteinämie mit hoch-atherogenem Lipidprofil und hohem kardiovaskulärem Risiko führen (83).

Die Untersuchungsergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen einen inversen Zusammenhang der Serumkonzentrationen von oxidiertem LDL und Harnstoff. Harnstoff dient in der Routinelabordiagnostik zur Verlaufskontrolle einer Niereninsuffizienz sowie zur Kontrolle des Proteinstoffwechsels bei Niereninsuffizienz und ist von drei Faktoren abhängig. Einerseits führt die Senkung der glomerulären Filtration zur Retention von Harnstoff im Serum. Andererseits haben auch die Proteinaufnahme über die Nahrung und der Proteinkatabolismus Einfluss auf die Harnstoff-Serumkonzentration. Eine verminderte Harnstoff-Serumkonzentration, wie bei den Probandinnen mit erhöhten Serumwerten für oxidiertes LDL nachgewiesen wurde, tritt physiologisch nur bei Kindern, Schwangeren und im Rahmen einer proteinarmen Ernährung auf. Der pathophysiologische Zustand, den der inverse Zusammenhang von oxidiertem LDL und Harnstoff abbildet, kann jedoch einer initialen chronischen Niereninsuffizienz im Stadium I entsprechen (84). Dabei kommt es zu Beginn einer Niereninsuffizienz durch Störungen während der tubulären Rückdiffusion des zuvor vollständig glomerulär ultrafiltrierten Harnstoffs zu einer vermehrten Ausscheidung. Diese Störungen können darin bestehen, dass die Diurese z.B. durch eine Polyurie verstärkt oder die Nierendurchblutung durch eine beginnende Nierengefäßsklerose vermindert ist (85). Diese Form der Störungen ist charakteristisch für eine beginnende Nierenschädigung unter einer diabetischen Stoffwechsellage, welche mit erhöhten Serumwerten für oxidiertes LDL korreliert (Kapitel 5.3).

Zur routinemäßigen Beurteilung der glomerulären Nierenfunktion wird in erster Linie Serum-Kreatinin herangezogen, da dieses nicht von variablen Stoffwechselprozessen, sondern nur von der konstanten Muskelmasse abhängig ist. Die Kreatininkonzentration im Serum steigt jedoch erst an, wenn die glomeruläre Filtrationsrate bereits auf 50% oder weniger reduziert ist (86). Marginale Funktionseinschränkungen, wie sie zuvor beim Harnstoff beschrieben wurden, sind daher am Serum-Kreatinin-Wert nicht zu erkennen. Vor diesem Hintergrund ist die fehlende

Korrelation von Kreatinin mit oxidiertem LDL in dieser Studie erklärbar. Des Weiteren ist bekannt, dass oxidiertes LDL zytotoxische Wirkungen auf die glomerulären Mesangialzellen ausübt (87). In Analogie zum Gefäßendothel exprimieren Mesangialzellen LDL-Rezeptoren, über welche oxidierte LDL-Partikel in die Zellen aufgenommen werden und dort akkumulieren (88). Diese mesangiale Lipidakkumulation trägt bereits in der Frühphase der Glomerulosklerose zur Nierenfunktions-schädigung bei (89). Oxidiertes LDL ist unter Berücksichtigung der oben genannten Zusammenhänge nicht nur bei fortgeschrittener Niereninsuffizienz mit manifester Dyslipoproteinämie, sondern bereits in der Frühphase von Nierenfunktionsstörungen bei diabetischer Stoffwechsellage von Bedeutung.

5.5 ¹H-NMR gestützte Diagnostik von oxidiertem LDL – Ein lohnenswertes Verfahren in der klinischen Labordiagnostik?

5.5.1 Relevanz von oxidiertem LDL für die klinische Labordiagnostik der Atherosklerose

Im vorangehenden Teil der Diskussion wurde beschrieben, dass oxidiertes LDL bereits in der Frühphase atherosklerotischer, diabetischer und pathologischer renaler Prozesse eine zentrale Rolle in den bekannten pathophysiologischen Konzepten einnimmt. Die signifikanten Korrelationen der in dieser Studie mittels ¹H-NMR-Analyse bestimmten Serumwerte für oxidiertes LDL mit Serumlipiden, Diabetes-Markern und dem Nierenfunktionswert Harnstoff bestätigen diesen Stellenwert. Insbesondere stellt sich in diesem Zusammenhang die ektope Lipidakkumulation in vaskulären Endothelzellen, pankreatischen Betazellen und renalen Mesangialzellen als mögliches pathophysiologisches Bindeglied zur Entstehung von Atherosklerose, Diabetes mellitus sowie einer initialen chronischen Niereninsuffizienz heraus, da sie durch Insulinresistenz und hohen Serumspiegeln von oxidiertem LDL direkt induziert wird (Kapitel 5.3 und 5.4). Des Weiteren deutet das Vorhandensein von oxidiertem LDL auf ein hochatherogenes Lipidprofil hin, welches durch Hyper-triglyceridämie und „kleine“, hochreaktive LDL-Partikel charakterisiert ist. Gleichzeitig kann eine erhöhte Fraktion an proinflammatorischen HDL-Partikeln vorliegen, welche die Oxidation von LDL begünstigen (Kapitel 5.2).

Die Bestimmung von oxidiertem LDL in der Laboranalyse von Serumproben könnte somit die Diagnostik von Atherosklerose und Diabetes mellitus um ein funktionelles Kriterium erweitern. Die Serumkonzentration von oxidiertem LDL kann als bewertendes Kriterium für das Ausmaß der Inflammation der Stoffwechsellage herangezogen werden, da hohe Serumlipidwerte und Insulinresistenz bei gleichzeitig hohen Serumwerten für oxidiertes LDL auf eine proinflammatorische Stoffwechselsituation schließen lassen. Es ergäbe sich somit eine Einschätzung für die Progressionsgeschwindigkeit sekundärer sklerosierender Prozesse.

Es bleibt in weiteren Studien zu prüfen, welches Potential die ektope Lipidakkumulation in der Pathogenese Atherosklerose assoziierter Prozesse einnimmt und ob sie auch durch andere Metabolite als durch oxidiertes LDL beeinflusst wird.

5.5.2 Vorteile der $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie in der klinischen Labordiagnostik

Zur Bestimmung von oxidiertem LDL in humanem Serum stehen verschiedene Methoden zur Verfügung (vgl. Kapitel 1.3). Gemessen an diesen bisher üblichen Messmethoden ist die Bestimmung der Serumkonzentration von oxidiertem LDL mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie schneller und bei entsprechender Standardisierung der Probengewinnung, der Probenvorbereitung und des Probenverkehrs von geringem Aufwand. Weitere Vorteile bestehen in dem nur geringen benötigten Probevolumen von 0,5 ml sowie der Wiederverwendbarkeit der Probe für andere Parameterbestimmungen. Moderne $^1\text{H-NMR}$ -Laborgeräte (z.B. Bruker NMR sample Xpress®) verfügen zudem über Barcodescanner-gestützte Identifikationssysteme und eine standardisierte Verarbeitungssoftware, so dass eine unkomplizierte Bedienung bei hohem Probedurchlauf erfolgen kann. Als nachteilig könnten sich die relativ hohen Anschaffungskosten und der immer noch deutliche Platzbedarf der bereits im Verhältnis zu früher kompakten Geräte erweisen. Insgesamt jedoch stellt die $^1\text{H-NMR}$ -Analyse im laborklinischen Alltag eine zukunftsweisende Methode dar, mit der eine große Auswahl an Stoffwechselmetaboliten im Serum und im Urin effizient detektiert werden kann.

6 Zusammenfassung

Die Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems besitzen einen herausragenden Stellenwert für Morbidität und Mortalität in der westlichen Welt. Die Mechanismen der mikro- und makrovaskulären Veränderungen im Rahmen der Atherosklerose spielen dabei eine zentrale Rolle. In der vorliegenden Arbeit wird die Relevanz des vasculär aktiven oxidierten Low-Density-Lipoproteins (oxidiertes LDL) für die Diagnostik atherogener Gefäßveränderungen insbesondere im Rahmen von Diabetes mellitus, Fettstoffwechselstörungen und Nierenfunktionsstörungen untersucht. Die Bestimmung der Serumkonzentration von oxidiertem LDL erfolgte mit einer kernresonanzgestützten Analysemethode, welche von Jankowski et al. entwickelt wurde.

In die Studie wurden 549 postmenopausale Probandinnen eingeschlossen. Anamnestische Daten zu den Körpermaßen, Vorerkrankungen, Medikamenteneinnahme, Essgewohnheiten sowie der Konsum von Genussmitteln wurden mit einem Fragebogen erhoben. Zur Dickenmessung des Intima-Media-Komplexes (IMD) der Carotiden-Arterien wurde eine hochauflösende B-Bild-Sonographie durchgeführt und später der Ruheblutdruck bestimmt. Mittels Blutentnahme konnten Serumlipide (Gesamtcholesterin, Triglyzeride, LDL, HDL), Nüchternblutzucker (Glukose), Blutzuckerlangzeitwert (HbA_{1c}), Nierenwerte (Kreatinin, Harnstoff) und Homozystein bestimmt werden. Zur differenzierten Diabetes-Diagnostik erfolgte zudem ein oraler Glukose-Toleranztest (OGTT). Zwei Milliliter des Probandinnen-Serums wurden mit 3-Trimethylsilyl-[2,2,3,3-²H₄]-Propionsäure (TSP) versetzt und der ¹H-NMR-Spektroskopie zugeführt. Die resultierenden ¹H-NMR-Spektren wurden phasen- und basislinienkorrigiert, auf das TSP-Signal kalibriert (Nullpunkt der chemischen Phasenverschiebungsskala= 0 ppm) und zur Berechnung des charakteristischen Resonanzintensitätsmaximums von oxidiertem LDL bei 1,17 ppm vermessen. Zur Erstellung einer Kalibriergerade wurde natives LDL aus humanem Serum isoliert und *in vitro* durch Kupfersulfat oxidiert. Die ¹H-NMR-Intensitätsmaxima bei 1,17 ppm der daraus erstellten Verdünnungsreihe mit bekannter Konzentration an oxidiertem LDL dienten der Bestimmung unbekannter Probenkonzentrationen. Die statistische Analyse der unabhängigen Variablen Blutparameter, Fragebogen-Items, IMD, Ruheblutdruck sowie demographische Daten zu der abhängigen Zielgröße oxidiertes LDL erfolgte durch eine multifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit $r^2 = 0,402$ bei $p < 0,05$.

Für die abschließende Auswertung standen 533 der insgesamt 549 Probandinnen zur Verfügung. Mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie konnte in 66 Seren (12,4%) oxidiertes LDL mit einer Konzentration von durchschnittlich $0,98 \pm 2,77$ mg/dl SD nachgewiesen werden. Die Korrelation der Serumkonzentrationen von oxidiertem LDL mit den klinischen Parametern ergab in der ANOVA signifikante Zusammenhänge für ein Fragebogen-Item aus der Medikamentenanamnese (Applikation von Insulin länger als drei Monate) sowie für fünf Blutparameter: Die Serumlipide Triglyceride (Regressionskoeffizient $b = 0,009$; $p = 0,032$) und HDL ($b = 0,073$; $p = 0,001$), die Diabetes-Parameter HbA_{1c} (glykierte Hämoglobin-Unterfraktion A_{1c}) ($b = 0,599$; $p = 0,037$) und der Serum-Glukosespiegel nach 120 Minuten im OGTT ($b = 0,004$; $p = 0,004$) sowie der Nierenfunktionswert Harnstoff ($b = -0,204$; $p = 0,003$).

Die signifikanten Korrelationen der in dieser Arbeit mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie bestimmten Serumwerte für oxidiertes LDL mit Serumlipiden, Diabetes-Markern und dem Nierenfunktionswert Harnstoff bestätigen den pathophysiologischen Stellenwert von oxidiertem LDL bereits in der Frühphase atherosklerotischer, diabetischer und pathologischer renaler Prozesse. In diesem Zusammenhang konnte die ektople Lipidakkumulation in vaskulären Endothelzellen, pankreatischen Betazellen und renalen Mesangialzellen als mögliches pathophysiologisches Bindeglied zur Entstehung von Atherosklerose, Diabetes mellitus und einer initialen chronischen Niereninsuffizienz herausgestellt werden, da sie durch Insulinresistenz und hohen Serumspiegeln von oxidiertem LDL direkt induziert wird. Des Weiteren deutet das Vorhandensein von oxidiertem LDL auf ein hochatherogenes Lipidprofil hin, welches durch Hypertriglyceridämie und „kleine“, hochreaktive LDL-Partikel charakterisiert ist. Gleichzeitig kann eine erhöhte Fraktion an strukturell und funktionell modifizierten, proinflammatorischen HDL-Partikeln die Oxidation von LDL begünstigen. Isoliert niedrige Harnstoffserumwerte deuten im Rahmen einer proinflammatorischen diabetischen Stoffwechsellage mit Dyslipoproteinämie auf beginnende Sklerosierungsprozesse im Glomerulum und in den Nierengefäßen hin, welche zu progredienten Nierenfunktionsstörungen führen. Oxidiertem LDL kann für die klinische Diagnostik von Atherosklerose und Diabetes mellitus eine hohe Relevanz bescheinigt werden. Die Bestimmung der Serumkonzentration von oxidiertem LDL könnte als funktionelles Kriterium das Ausmaß der Inflammation der proatherogenen und diabetischen Stoffwechsellage ergänzend bewerten. Es ergäbe sich somit eine

Einschätzung der Progressionsgeschwindigkeit sekundärer sklerosierender Prozesse.

In dieser Studie wurde zur Bestimmung der Serumkonzentration von oxidiertem LDL erstmalig die $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie verwendet. Diese Methode bietet im Vergleich zu den anderen zur Verfügung stehenden Methoden (Chromatographie, Antikörper-Assays) mehrere Vorteile. Sie ermöglicht bei ausreichender Standardisierung der Probenverarbeitung eine sichere Analyse für ein großes Patientenkollektiv. Das nur geringe benötigte Probevolumen von 0,5 ml steht nach der Vermessung für weitere Parameterbestimmungen zur Verfügung. Mittlerweile existieren auf dem Markt kompakte $^1\text{H-NMR}$ -Laborgeräte, welche die $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie in der Entwicklung zu einer zukunftsfähigen Methode für die Diagnostik stoffwechselaktiver Metabolite voranbringen.

IV Literaturverzeichnis

1. UN Riede, HE Schaefer, Eds., Allgemeine und spezielle Pathologie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1999:437.
2. Subbiah MT. Mechanisms of cardioprotection by estrogens. *Proc Soc Exp Biol Med* 1998;217:23–29.
3. Maxwell SR. Women and heart disease. *Basic Res Cardiol* 93, 1998;Suppl 2: 79–84.
4. Mendelsohn ME, Karas RH. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med* 1999;340: 1801–1811.
5. Napoli C, D'Armiento FP, Corso G, et al. Occurrence of the same peroxidative compounds in low density lipoprotein and in atherosclerotic lesions from a homozygous familial hypercholesterolemic patient: a case report. *Int J Cardiol* 1997;62:77–85.
6. Ylä-Herttuala S, Palinski W, Rosenfeld ME, et al. Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J Clin Invest* 1989;84:1086–1095.
7. Ross R. Atherosclerosis - An Inflammatory Disease. *N Engl J Med* 1999;340(2): 115–126.
8. Witztum JL. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *Lancet* 1994;344: 793–795.
9. Shaikh M, Wootton R, Nordestgaard BG, et al. Quantitative studies of transfer in vivo of low density, Sf 12-60, and Sf 60-400 lipoproteins between plasma and arterial intima in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1991;11:569–577.
10. Hodis HN, Kramsch DM, Avogaro P, et al. Biochemical and cytotoxic characteristics of an in vivo circulating oxidized low density lipoprotein (LDL-). *J Lipid Res* 1994;35:669–677.
11. Keaney JF Jr, Gaziano JM, Xu A, et al. Low-dose alpha-tocopherol improves and high-dose alpha-tocopherol worsens endothelial vasodilator function in cholesterol-fed rabbits. *J Clin Invest* 1994;93:844–851.

12. Keaney JF Jr, Gaziano JM, Xu A, et al. Dietary antioxidants preserve endothelium-dependent vessel relaxation in cholesterol-fed rabbits. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:11880–11884.
13. Vergnani L, Hatrik S, Ricci F, et al. Effect of native and oxidized low-density lipoprotein on endothelial nitric oxide and superoxide production : key role of L-arginine availability. *Circulation* 2000 ;101: 1261–1266.
14. Napoli C, Lerman LO, de Nigris F, et al. Glycooxidized low-density lipoprotein downregulates endothelial nitric oxide synthase in human coronary cells. *J Am Coll Cardiol*, 2002;40:1515–1522.
15. Candipan RC, Wang BY, Buitrago R, Tsao PS, Cooke JP. Regression or progression. Dependency on vascular nitric oxide. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:44–50.
16. Tsao PS, Buitrago R, Chan JR, Cooke JP. Fluid flow inhibits endothelial adhesiveness. Nitric oxide and transcriptional regulation of VCAM-1. *Circulation* 1996;94:1682–1689.
17. Chamley-Campbell JH, Cambell GR, Ross R. Phenotype-dependent response of cultured aortic smooth muscle to serum mitogens. *J Cell Biol* 1981;89:191.
18. Morawietz H. Augmented endothelial uptake of oxidized low-density lipoprotein in response to endothelin-1. *Clin Sci (Lond)* 2002 ;103 Suppl 48:9S-12S.
19. Esaki T, Hayashi T, Muto E, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase and Fas/Fas ligand correlates with the incidence of apoptotic cell death in atheromatous plaques of human coronary arteries. *Nitric Oxide* 2000;4:561–571.
20. Sambrano GR, Parthasarathy S, Steinberg D. Recognition of oxidatively damaged erythrocytes by a macrophage receptor with specificity for oxidized low density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:3265–3269.
21. Kunitake ST, Mendel CM, Hennessey LK. Interconversion between apolipoprotein A-I-containing lipoproteins of pre-beta and alpha electrophoretic mobilities. *J Lipid Res* 1992;33:1807–1816.

22. Van der Giessen AG, Schapp M, Gijsen FJ, et al. 3D fusion of intravascular ultrasound and coronary computed tomography for in-vivo wall shear stress analysis: a feasibility study. *Int J Cardiovasc Imaging* 2010;24:781–796.
23. Radulescu LL, Stancu C, Antohe F. Antibodies against human oxidized low-density lipoprotein (LDL) as markers for human plasma modified lipoproteins. *Med Sci Monit* 2004;10:207–214.
24. Yang CY, Raya JL, Chen HH, et al. Isolation, characterization, and functional assessment of oxidatively modified subfractions of circulating low-density lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1083–1090.
25. Jankowski J, Nofer JR, Tepel M. Identification of oxidised low-density lipoprotein in human serum by NMR spectroscopy. *Clinical Science* 1998;95:489–495.
26. Roberts GCK. *NMR of Macromolecules: A practical Approach*. Oxford University Press, Oxford, USA, 1993.
27. Evans J. *Biomolecular NMR Spectroscopy*. Oxford University Press, Oxford, USA, 1995.
28. Klein M, Brudvig G, DeRose V, et al. *Biochemical Spectroscopy*. In: *Methods in Enzymology*. Sauer K (Hrsg), New York Press, 1995:529–678.
29. Gronenborn A, Clore M. Nuclear magnetic resonance studies of small and medium sized proteins in solution. In: *Spectroscopic methods for determining protein structure in solution*. Havel HA (Hrsg), Wiley-VCH, Weinheim, 1996:190–246.
30. Ernst R. *Kernresonanz-Spektroskopie mit stochastischen Hochfrequenzfeldern; Zur Konstruktion eines optimalen Kernresonanz-Messkopfes*. Juris-Verlag, Zürich, 1962.
31. De Graaf RA, Behar KL. Quantitative ^1H NMR spectroscopy of blood plasma metabolites. *Anal Chem* 2003;75:2100–2104.
32. Tang H, Wang Y, Nicholson JK, Lindon JC. Use of relaxation-edited one-dimensional and two dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy to improve detection of small metabolites in blood plasma. *Anal Chem* 2004;325:260–275.

33. Griffin JL, Nicholls AW, Keun HC. Metabolic profiling of rodent biological fluids via ^1H NMR spectroscopy using a 1 mm microlitre probe. *Analyst* 2002;127:582–584.
34. Nicholson JK, Foxall PJ, Spraul M, et al. 750MHz ^1H and ^1H - ^{13}C NMR spectroscopy of human blood plasma. *Anal Chem* 1995;67:793–811.
35. Wevers RA, Engelke U, Heerschap A. High-resolution ^1H -NMR spectroscopy of blood plasma for metabolic studies. *Clin Chem* 1994;40:1245–1250.
36. Yang Y, Bai G, Zhang X, et al. ^1H NMR spectroscopic evidence of interaction between ibuprofen and lipoproteins in human blood plasma. *Anal Biochem* 2004;324:292–297.
37. Dobbins RL, Malloy CR. Measuring in-vivo metabolism using nuclear magnetic resonance. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2003;6:501–509.
38. Shulman GI. Unraveling the cellular mechanism of insulin resistance in humans: new insights from magnetic resonance spectroscopy. *Physiology (Bethesda)* 2004;19:183–190.
39. Jenkins AJ, Lyons TJ, Zheng D. Lipoproteins in the DCCT/EDIC cohort: associations with diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2003;64:817–828.
40. Rieder A. Epidemiologie der Herz-Kreislauf-Erkrankungen. *Austrian Journal of Cardiology* 2004;Supplementum D:3–4.
41. Folch J, Leeds MB, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 1957;226:497–509.
42. Havel RJ, Eder H, Bragdon H. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* 1955;34:1345–1353.
43. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265–275.
44. Yagi K, Ed. Lipid peroxides in biology and medicine. International Conference on Lipid Peroxides in Biology and Medicine 1980, Nagoya-shi, Japan. Academic Press, New York, 1982.
45. Dörner K (Hrsg). *Klinische Chemie und Hämatologie*. Enke Reihe zur AOÄ 1998: 150–162.

-
46. Chait A, Heinecke JW. Lipoprotein modification: cellular mechanisms. *Curr Opin Lipidol* 1994;5:365–370.
47. Miyoshi T, Matsumoto AH, Shi W. Paradoxical increase in LDL oxidation by endothelial cells from an atherosclerosis-resistant mouse strain. *Atherosclerosis* 2007;192: 259–265.
48. Stocker R, Keaney JF. Role of oxidative modification in atherosclerosis. *Physiol Rev* 2004;84:1381–1478.
49. Carr AC, Frei B. The nitric oxide congener nitrite inhibits myeloperoxidase/H₂O₂/Cl-mediated modification of low density lipoprotein. *J Biol Chem* 2001;19:1822–1828.
50. Heinecke JW. Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis: implications for the oxidized low density lipoprotein hypothesis. *Atherosclerosis* 1998;141:1–15.
51. Jurgens G, Hoff HF, Chisolm GM, et al. Modification of human serum low density lipoprotein by oxidation - characterization and pathophysiological implications. *Chem Phys Lipids* 1987;45:315–336.
52. Steinbrecher UP, Witztum JL, Parthasarathy S, Steinberg D. Decrease in reactive amino groups during oxidation or endothelial cell modification of LDL. Correlation with changes in receptor-mediated catabolism. *Atherosclerosis* 1987;7:135–143.
53. Yamaguchi Y, Kunitomo M, Haginaka J. Assay methods of modified lipoproteins in plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002;781:313–330.
54. Brindle JT, Antti H, Nickolson JK, et al. Rapid and noninvasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using ¹H-NMR-based metabolomics. *Nat Med* 2002;8:1439–1444.
55. Julius U, Dittrich M, Pietzsch J. Factors influencing the formation of small dense low-density lipoprotein particles in dependence on the presence of the metabolic syndrome and on the degree of glucose intolerance. *Int J Clin Pract* 2007;61: 1798–1804.
56. Austin MA, Rodriguez BL, McKnight B, et al. Low-density lipoprotein particle size, triglycerides and high-density lipoprotein cholesterol as risk factors for coronary heart disease in older Japanese-American men. *Am J Cardiol* 2000;86:412–416.

-
57. Niskanen L, Turpeinen A, Penttila I, Uusitupa MI. Hyperglycemi and compositional lipoprotein abnormalities as predictors of cardiovascular mortality in type 2 diabetes: a 15-year follow-up from the time of diagnosis. *Diabetes Care* 1998;21:1861–1869.
58. Barter PJ, Rye KA. High density lipoproteins and coronary heart disease. *Atherosclerosis* 1996;121:1–12.
59. Boden WE. High-density lipoprotein cholesterol as an independent risk factor in cardiovascular disease: assessing the data from Framingham to the Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Intervention Trial. *Am J Cardiol* 2000;86:19L-22L.
60. Calabresi L, Gomaschi M, Franceschini G. Endothelial protection by high-density lipoproteins: from bench to bedside. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 2003;23:1724–1731.
61. Navab M, Anantharamiah GM, Reddy ST, et al. The double jeopardy of HDL. *Ann Med* 2005;37:1–6.
62. Shao B, Oda MN, Oram JF, Heinecke JW. Myeloperoxidase an inflammatory enzyme for generating dysfunctional high density lipoprotein. *Curr Opin Cardiol* 2006;21: 322–328.
63. Rohrer L, Hersberger M, von Eckardstein A. High density lipoproteins in the intersection of diabetes mellitus, inflammation and cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* 2004;15:269–278.
64. Van Lenten BJ, Hama SY, de Beer FC, et al. Antiinflammatory HDL becomes pro-inflammatory during the acute phase response. Loss of protective effect of HDL against LDL oxidation in aortic wall cell cocultures. *J Clin Invest* 1995;96:2758–2767.
65. Roglic G, Unwin N, Bennett PH, et al. The Burden of Mortality Attributable to Diabetes. *Diabetes Care* 2005;28:2130–2135.
66. Huxley R, Barzi F, Woodward M. Excess risk of fatal coronary heart disease associated with diabetes in men and women: meta-analysis of 37 prospectiv cohort studies. *BJM* 2006;332:73–76.
67. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2004;27 Suppl 1:S5-S10.

68. Kellerer M. Insulinresistenz bei Typ 2 Diabetes. Diabetes heute 2001 at <http://www.diabetes-heute.uni-duesseldorf/index.html?TextID=969.de>.
69. Kerner W, Fuchs C, Redaelli M, et al. Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus. In: Evidenzbasierte Diabetes-Leitlinien. Scherbaum WA, Lauterbach KW, Joost HG (Hrsg) 2006:13–35.
70. The DECODE study group. Glucose tolerance and mortality: comparison of WHO and American Diabetes Association diagnostic criteria. Lancet 1999;354:617–621.
71. Pfohl M. Fettstoffwechsel bei Diabetes mellitus. In: Diabetologie kompakt: Grundlagen und Praxis. H Schatz (Hrsg), Blackwell Wiss.-Verl., Berlin, Wien, 2001:23–24.
72. Kellerer M, Hennige A, Häring HU. Pathogenese des Typ-2-Diabetes In: Diabetologie kompakt: Grundlagen und Praxis. H Schatz (Hrsg) Blackwell Wiss.-Verl., Berlin, Wien, 2001:105–113.
73. Pfohl M. Stoffwechselkontrolle - Glucosemessung, Ketonkörper, HbA1c, Fructosamin. In: Diabetologie kompakt: Grundlagen und Praxis. H Schatz (Hrsg) Blackwell Wiss.-Verl., Berlin, Wien, 2001:181–186.
74. Schleicher E. Pathobiochemie der Makro-, Mikro- und Neuropathie. In: Diabetologie kompakt: Grundlagen und Praxis. H Schatz (Hrsg) Blackwell Wiss.-Verl., Berlin, Wien, 2001:195–203.
75. Reaven GM. Why syndrom X? From Harold Himsworth to the insulin resistance syndrome. Cell Metab 2005;1:9–14.
76. Vergès B. Clinical interest of PPARs ligands. Diabetes Metab 2004;30:7–12.
77. Müller-Wieland D. Pathogenese des Typ-2-Diabetes, Insulinresistenz, metabolisches Syndrom. In: Kursbuch Diabetologie. Nauck M, Brabant G, Hauner H (Hrsg), Verlag Kirchheim, Mainz, 2005:40–43.
78. Kelley DE, Goodpastre BH. Skeletal muscle triglyceride - an aspect of regional adiposity and insulin resistance. Diabetes Care 2001;24:933–941.
79. Unger WH. Weapons of lean body mass destruction: the role of ectopic lipids in the metabolic syndrome. Endocrinology 2003;144:5159–5165.
80. McGarry JD. Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. Diabetes 2002;51:7–18.

-
81. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 2006;444:860–867.
82. Li G, Barrett EJ, Barrett MO, Cao W, Liu Z. Tumor necrosis factor- α induces insulin resistance in endothelial cells via a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *Endocrinology* 2007;148:3356–3363.
83. Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu CY. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med* 2004;351:1296–1305.
84. Hasslacher C, Wolf G, Kempe P, Ritz E. Leitlinien DDG: Diabetische Nephropathie. *Diabetologie* 2007;Suppl 2:159-162.
85. Dörner K (Hrsg). *Klinische Chemie und Hämatologie*. Enke Reihe zur AOÄ 1998:130–132.
86. Dörner K (Hrsg). *Klinische Chemie und Hämatologie*. Enke Reihe zur AOÄ 1998:459–466.
87. Tashiro K, Makita Y, Shike T, et al. Detection of cell death of cultured mouse mesangial cells induced by oxidized low-density lipoprotein. *Nephron* 1999;82:51–58.
88. Ruan XZ, Vargese Z, Fernando R, Powas SH, Moorhead JF. LDL receptor gene expression in human mesangial cells under influence of calcium channel blockers. *Clin Nephrol* 1999;51:263–271.
89. Kaysen GA. Lipid and lipoprotein metabolism in chronic kidney disease. *J Ren Nutr* 2009;19:73-77.

V Anhang

Anhang 1:	Modifizierter Studienfragebogen	XVII
-----------	---------------------------------------	------

Anhang 1: Modifizierter Studienfragebogen

Prob. Nr.

Modifizierter Studienfragebogen
Fragebogen zum Selbstauffüllen

1. Bitte tragen Sie in die nachfolgenden Kästchen das heutige Datum ein.

<input type="text"/>					
Tag	Monat	Jahr			

Fragen zur Lebenssituation

2. Wann sind Sie geboren?

<input type="text"/>					
Tag	Monat	Jahr			

Allgemeiner Gesundheitszustand

3. Ihr Körpergewicht mit 25 Jahren:

 kg

aktuell:

 kg

4. Ihre Körpergröße mit 25 Jahren:

, m

aktuell:

, m

Prob. Nr.

5. Ist bei Ihren Eltern oder Geschwistern vor dem 50. Lebensjahr ein Herzinfarkt aufgetreten?

5.1 Mutter	5.2 Vater	5.3 Schwester	5.4 Bruder
<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> nein (0)
<input type="checkbox"/> ja (1)	<input type="checkbox"/> ja (1)	<input type="checkbox"/> ja (1)	<input type="checkbox"/> ja (1)
<input type="checkbox"/> weiß nicht (3)	<input type="checkbox"/> weiß nicht (3)	<input type="checkbox"/> weiß nicht (3)	<input type="checkbox"/> weiß nicht (3)
<input type="checkbox"/> trifft nicht zu (9)	<input type="checkbox"/> trifft nicht zu (9)	<input type="checkbox"/> trifft nicht zu *(9)	<input type="checkbox"/> trifft nicht zu *(9)

(* keine Geschwister)

6. Haben Ihre Eltern oder Geschwister jemals einen Schlaganfall erlitten?

6.1 Mutter	6.2 Vater	6.3 Schwester	6.4 Bruder
<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> nein (0)
<input type="checkbox"/> ja (1)	<input type="checkbox"/> ja (1)	<input type="checkbox"/> ja (1)	<input type="checkbox"/> ja (1)
<input type="checkbox"/> weiß nicht (3)	<input type="checkbox"/> weiß nicht (3)	<input type="checkbox"/> weiß nicht (3)	<input type="checkbox"/> weiß nicht (3)
<input type="checkbox"/> trifft nicht zu (9)	<input type="checkbox"/> trifft nicht zu (9)	<input type="checkbox"/> trifft nicht zu *(9)	<input type="checkbox"/> trifft nicht zu *(9)

(* keine Geschwister)

7. Sind Ihre Eltern oder Geschwister an Zuckerkrankheit (Diabetes mellitus) erkrankt?

7.1 Mutter	7.2 Vater	7.3 Schwester	7.4 Bruder
<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> nein (0)
<input type="checkbox"/> ja (1)	<input type="checkbox"/> ja (1)	<input type="checkbox"/> ja (1)	<input type="checkbox"/> ja (1)
<input type="checkbox"/> weiß nicht (3)	<input type="checkbox"/> weiß nicht (3)	<input type="checkbox"/> weiß nicht (3)	<input type="checkbox"/> weiß nicht (3)
<input type="checkbox"/> trifft nicht zu (9)	<input type="checkbox"/> trifft nicht zu (9)	<input type="checkbox"/> trifft nicht zu *(9)	<input type="checkbox"/> trifft nicht zu *(9)

(* keine Geschwister)

Prob. Nr.

8. Hat ein/e Arzt/Ärztin jemals Zuckerkrankheit (Diabetes mellitus) bei Ihnen festgestellt?

nein (0) ja (1)



wenn ja,

8.1 Wie alt waren Sie, als die Zuckerkrankheit festgestellt wurde?

Jahre alt

8.2 Wie wird der Zucker eingestellt?

- nur mit Diät (1)
 Tabletten und Diät (2)
 Insulin und Diät (3)

8.3 Sind infolge der Zuckerkrankheit bereits Schäden an Gefäßen oder inneren Organen aufgetreten?

 nein (0) ja (1)



wenn ja, welche?

Bitte jede Unterfrage beantworten!

	nein (0)	ja (1)
1. Netzhautschäden (diabetische Retinopathie)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2. Nierenschäden (diabetische Nephropathie)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3. Nervenschäden (diabetische Neuropathie)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4. Herzmuskelschäden (diabetische Kardiomyopathie)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5. Offene, schlecht verheilende Hautstellen (z.B. diabetischer Fuß)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Prob. Nr.

9. Hat ein/e Arzt/Ärztin jemals einen Herzinfarkt bei Ihnen festgestellt?

nein (0) ja (1)



wenn ja,

Anzahl	Jahr des ersten Herzinfarkts	Stationäre Behandlung in welcher Klinik ?

10. Hat ein/e Arzt/Ärztin jemals einen Schlaganfall bei Ihnen festgestellt?

nein (0) ja (1)



wenn ja,

Anzahl	Jahr des ersten Schlaganfalls	Stationäre Behandlung in welcher Klinik ?

11. Ist von einem/er Arzt/Ärztin jemals eine der folgenden Krankheiten bei Ihnen festgestellt worden?

Bitte in jeder Zeile eine Antwort ankreuzen!

Krankheit			Jahr der Diagnose
Entzündliche Gelenk- oder Wirbelsäulenerkrankung (z.B. Rheumatoide Arthritis; Morbus Bechterew)	<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> ja (1)	
Schilddrüsenüberfunktion (Hyperthyreose)	<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> ja (1)	
Überfunktion der Nebenschilddrüsen (Hyperparathyreoidismus)	<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> ja (1)	
Überfunktion der Nebennierenrinde (Cushing Syndrom)	<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> ja (1)	
Leberschrumpfung (Leberzirrhose)	<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> ja (1)	

Prob. Nr.

Fortsetzung von Frage 11:

Ist von einem/er Arzt/Ärztin jemals eine der folgenden Krankheiten bei Ihnen festgestellt worden?

Leberentzündung, ansteckende Gelbsucht (Hepatitis)	<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> ja (1)	
Magen- oder Zwölffingerdarmgeschwür, Ulcuskrankheit	<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> ja (1)	
Magenschleimhautentzündung (Gastritis)	<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> ja (1)	
Einschränkung der Nierenfunktion	<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> ja (1)	
Nierenbeckenentzündung (Pyelonephritis)	<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> ja (1)	
Nierenkolik, Nierensteine	<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> ja (1)	
Gallenblasenentzündung, Gallenkolik oder Gallensteine	<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> ja (1)	
Chronische Bronchitis	<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> ja (1)	
Asthma bronchiale (Bronchialasthma, allergisches Asthma)	<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> ja (1)	
Venenthrombose	<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> ja (1)	
Bluthochdruck (Hypertonie)	<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> ja (1)	
Durchblutungsstörungen am Herzen, Verengung der Herzkranzgefäße, Angina pectoris	<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> ja (1)	
Herzschwäche, Herzinsuffizienz	<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> ja (1)	
Herzklappenfehler	<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> ja (1)	
Durchblutungsstörungen des Gehirns (nur wenn sie bei Ihnen mit Lähmungen, Gefühlsstörungen oder Sprachstörungen einhergingen und nicht durch Migräne bedingt waren)	<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> ja (1)	
Durchblutungsstörungen an den Beinen, arterielle Verschlusskrankheit, „Schaufensterkrankheit“	<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> ja (1)	
Krampfadern (Varizen mit oder ohne „offene“ Beine, Ulcus cruris)	<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> ja (1)	
Harnsäureerhöhung, Gicht	<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> ja (1)	
Erhöhte Blutfette, erhöhtes Cholesterin	<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> ja (1)	

Prob. Nr.

Fortsetzung von Frage 11:

Ist jemals von einem/er Arzt/Ärztin eine der folgenden Krankheiten bei Ihnen festgestellt worden?

Blutarmut, Eisenmangel	<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> ja (1)	
Osteoporose	<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> ja (1)	
Gelenkverschleiß, Arthrose der Hüft-, Knie oder Wirbelgelenke	<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> ja (1)	
Brustkrebs	<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> ja (1)	
andere Krebserkrankung, bösartiger Tumor (ausser Brustkrebs)	<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> ja (1)	
Migräne	<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> ja (1)	
Epilepsie (Krampfanfälle, zerebrale Anfälle)	<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> ja (1)	
Parkinson Krankheit	<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> ja (1)	
Multiple Sklerose	<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> ja (1)	
Essstörung (Bulimie, Anorexia nervosa)	<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> ja (1)	
Sucht- oder Abhängigkeitserkrankung (Medikamente, Alkohol, Drogen)	<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> ja (1)	
Allergisches Kontaktekzem (Hautausschlag durch Waschmittel, Kosmetika, Nickel und anderer Metalle u.a.)	<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> ja (1)	
Heuschnupfen, allergische Bindehautentzündung (allergische Rhinitis, allergische Konjunktivitis)	<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> ja (1)	
Neurodermitis (endogenes Ekzem, atopisches Ekzem)	<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> ja (1)	
Nahrungsmittelallergie	<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> ja (1)	
Allergische Hautquaddeln (Nesselsucht, Urtikaria)	<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> ja (1)	
Psychische Erkrankung (z.B. Depression)	<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> ja (1)	
Störungen der Blutgerinnung (vermehrte Blutungsneigung, verlängerte Blutungszeit)	<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> ja (1)	
Grauer Star (Katarakt)	<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> ja (1)	
Sonstige Erkrankungen, die hier nicht genannt wurden	<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> ja (1)	

Prob. Nr.

Fortsetzung von Frage 11:

Ist jemals von einem/er Arzt/Ärztin eine der folgenden Krankheiten bei Ihnen festgestellt worden?

Sonstige Erkrankungen, die hier nicht genannt wurden
wenn ja, welche

- 1) _____
- 2) _____
- 3) _____
- 4) _____
- 5) _____

12. Ist bei Ihnen jemals eine der folgenden Operationen/Untersuchungen durchgeführt worden?

Bitte in jeder Zeile eine Antwort ankreuzen!

Operation			Jahr der Operation / Unters.
Magenoperation	<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> ja (1)	
Darmoperation	<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> ja (1)	
Schilddrüsenoperation	<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> ja (1)	
Operation der Nebenschilddrüsen	<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> ja (1)	
Herzkatheteruntersuchung	<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> ja (1)	
Ballonaufdehnung der Herzkranzgefäße (PTCA)	<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> ja (1)	
Bypassoperation	<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> ja (1)	

Prob. Nr.

13. Haben Sie jemals eines der folgenden Medikamente länger als drei Monate eingenommen?

Bitte in jeder Zeile eine Antwort ankreuzen!

Medikament			Jahr der Einnahme	
Cortisonhaltige Tabletten gegen Asthma, Allergien oder zur Verhinderung von Abstoßungsreaktionen nach Organ-Transplantationen	<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> ja (1)	___ bis ___	<input type="checkbox"/> weiß nicht (3)
Medikamente gegen Krampfanfälle (Antiepileptika)	<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> ja (1)	___ bis ___	<input type="checkbox"/> weiß nicht (3)
Mittel gegen zuviel Magensäure (Antazida)	<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> ja (1)	___ bis ___	<input type="checkbox"/> weiß nicht (3)
Harntreibende Medikamente (Diuretika)	<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> ja (1)	___ bis ___	<input type="checkbox"/> weiß nicht (3)
Mittel gegen hohen Blutdruck (Antihypertensiva)	<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> ja (1)	___ bis ___	<input type="checkbox"/> weiß nicht (3)
Mittel zur Senkung der Blutfette (Lipidsenker)	<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> ja (1)	___ bis ___	<input type="checkbox"/> weiß nicht (3)
Mittel gegen Verengung der Herzkranzgefäße (z.B. Nitrospray)	<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> ja (1)	___ bis ___	<input type="checkbox"/> weiß nicht (3)
Aspirin	<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> ja (1)	___ bis ___	<input type="checkbox"/> weiß nicht (3)
Schlafmittel	<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> ja (1)	___ bis ___	<input type="checkbox"/> weiß nicht (3)
Schmerzmittel	<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> ja (1)	___ bis ___	<input type="checkbox"/> weiß nicht (3)
Tabletten zur Einstellung des Blutzuckers (orale Antidiabetika)	<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> ja (1)	___ bis ___	<input type="checkbox"/> weiß nicht (3)
Insulin	<input type="checkbox"/> nein (0)	<input type="checkbox"/> ja (1)	___ bis ___	<input type="checkbox"/> weiß nicht (3)

Prob. Nr.

Lebensgewohnheiten

14. Haben Sie früher geraucht oder rauchen Sie zurzeit?

Bitte kreuzen Sie nur eine Zahl an!Ich habe noch nie geraucht
(bis auf ganz seltenes Probieren) (0) → Bitte weiter mit Frage 20!

Ich rauche zurzeit -

Ja, täglich

 (1)

Ja, gelegentlich

 (2)Ich habe in den letzten 12 Monaten
aufgehört zu rauchen (3)Ich habe früher geraucht
und rauche seit mindestens
einem Jahr nicht mehr (4) → Ich habe vor Jahren
aufgehört zu rauchen

15. Wie alt waren Sie, als Sie angefangen haben, regelmäßig zu rauchen, wenn auch nur in kleineren Mengen?

Ich habe im Alter von Jahren angefangen zu rauchen!

16. Wie alt waren Sie, als Sie aufgehört haben, regelmäßig zu rauchen?

Ich habe im Alter von Jahren aufgehört zu rauchen!

Prob. Nr.

Nur von aktuellen Rauchern zu beantworten
--

17. Wie viel rauchen Sie zurzeit durchschnittlich am Tag (Stückzahl)?

--	--	--

Zigaretten

--	--

Zigarren,

Zigarillos

--	--

Pfeifen

Nur von ehemaligen Rauchern zu beantworten

18. Wie viel haben Sie früher durchschnittlich am Tag geraucht (Stückzahl)?

--	--	--

Zigaretten

--	--

Zigarren,

Zigarillos

--	--

Pfeifen

Von allen zu beantworten

19. Geraten Sie (normalerweise) außer Atem bzw. ins Schwitzen, wenn Sie 3 Stockwerke Treppen steigen?

Nein (0)

Ja (1)

Drei Stockwerke zu steigen ist mir nicht möglich..... (3)

Prob. Nr.

20. Wie häufig nehmen Sie die einzelnen Nahrungsmittel bzw. Fertigprodukte zu sich?

*Bitte denken Sie an die **letzten 12 Monate**.*

Bitte in jeder Zeile eine Antwort ankreuzen!

	mehr- mals täglich (6)	bzw. fast täglich (5)	mehr- mals in der Woche (4)	etwa einmal in der Woche (3)	zwei- bis dreimal im Monat (2)	einmal im oder seltener (1)	(fast) nie (0)
1. Blattsalat, Rohkostsalat, rohes Gemüse (z. B. Tomaten, Möhren, Paprika)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2. Frisches Obst	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3. Vitaminpräparate	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

21. Wie häufig essen oder trinken Sie fett- oder kalorienreduzierte Produkte (Light-Produkte)? *Bitte denken Sie an die **letzten 12 Monate**.*

Bitte in jeder Zeile eine Antwort ankreuzen!

	immer (4)	häufig (3)	manchmal (2)	selten (1)	nie (0)
1. Fettreduzierte Wurst, Wurstwaren	<input type="checkbox"/>				
2. Fettarmen Quark, Joghurt	<input type="checkbox"/>				
3. Fettarmen Käse	<input type="checkbox"/>				
4. Fettarme Milch (Trinkmilch, 1,5% Fettgehalt)	<input type="checkbox"/>				

Prob. Nr.

Fortsetzung von Frage 23:

Wie häufig nehmen Sie die einzelnen Getränke zu sich?

*Bitte denken Sie an die **letzten 12 Monate**.**Bitte in jeder Zeile eine Antwort ankreuzen!*

		täglich	mehr- mals	etwa einmal	zwei- bis dreimal	einmal im Monat	(fast) seltener	nie (0)
	mehr- mals täglich (6)	bzw. fast täglich (5)	in der Woche (4)	in der Woche (3)	im Monat (2)	oder (1)		
12. Mineralwasser, Leitungswasser	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
13. Erfrischungs- getränke, Limonade, Cola, Fruchtsaft- getränke)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
14. Sportlergetränke (z.B. „Isostar“, „Gatorate“)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Wir danken Ihnen sehr herzlich für Ihre Mitarbeit!

VI Danksagung

Mit Fertigstellung der Dissertationsschrift möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die es mir ermöglicht haben, trotz des persönlichen Rückschlags durch eine schwere Tumorerkrankung und des damit verbundenen Zeitverlustes, diese Arbeit zum Abschluss zu bringen.

Begonnen wurde diese Studie in Bochum an den BG-Kliniken Bergmannsheil im Rahmen einer Kooperation der ‚Bochumer Studie für Gesundheit und Krankheit bei Frauen nach den Wechseljahren‘ unter der Leitung von Prof. Dr. med. J. Pfeilschifter, der Fakultät für Chemie und Biochemie der Ruhr-Universität Bochum sowie dem Nephrologischen Labor am Marienhospital Herne unter der Leitung von Prof. Dr. med. W. Zidek und meinem Doktorvater Prof. Dr. rer. nat. J. Jankowski. Ihnen allen gilt mein großer Dank für die hilfreiche Unterstützung und die bereitwillig zur Verfügung gestellten Laborressourcen.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. rer. nat. Joachim Jankowski danke ich für die Fortsetzung meiner Betreuung an der Charité – Universitätsmedizin Berlin, für die wissenschaftlichen Diskussionen über die Resultate der Messungen sowie die kritische Durchsicht dieser Arbeit. Insbesondere danke ich ihm für die allseits verantwortungsvolle und persönliche Begleitung in dieser Zeit.

Des Weiteren danke ich meinem internistischen Kollegen Dr. med. Matthias Böhme, Klinikum Dortmund, für konstruktive Impulse und anregende Diskussionen über internistische Fragestellungen.

Zuletzt aber nicht weniger herzlich bin ich dankbar für die beständigen und wohlwollenden Ermutigungen meiner Eltern und meiner Freundin, die mir gerade in der Zeit während und nach meiner Erkrankung Kraft und Orientierung gegeben haben!

VII Lebenslauf

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

Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Alexander Rouven Just, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Quantifizierung von oxidiertem Low Density Lipoprotein im Serum postmenopausaler Frauen“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Dortmund, 8. März 2012

Alexander Rouven Just