

Aus der Klinik für Endokrinologie und Nephrologie
der Medizinischen Fakultät Charité-Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Glutathion/Glutathiondisulfid-Ratio als Hinweis von oxidativem Stress
und nichtinvasive Gefäßmessung zur Ermittlung
der arteriellen Gefäßeigenschaften bei Patienten mit
chronischer Niereninsuffizienz

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Rachel Ayala Karge
aus Berlin

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. M. Tepel
 2. Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. M. Gollasch
 3. Priv.- Doz. Dr. med. B. Henning

Datum der Promotion: 01.02.2013

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	4
1. Einleitung	7
1.1. Chronische Niereninsuffizienz und Hypertonie	7
1.2. Physiologie und Pathophysiologie der arteriellen Gefäßsteifigkeit	13
1.3. Pulswellenanalyse und Endothelfunktion	16
1.4. Oxidativer Stress und antioxidative Mechanismen	18
1.5. Fragestellung	24
2. Materialien und Methoden	25
2.1. Patienten	25
2.2. Applanationstonometrie	26
2.3. Messungen von GSH/GSSG mittels Fluoreszenz-Spektrophotometrie	26
2.4. Statistik	30
3. Ergebnisse	30
4. Diskussion	38
5. Zusammenfassung	48
6. Literatur	49
Danksagung	58
Lebenslauf	59
Erklärung	60

Abkürzungsverzeichnis

ACE-Hemmer	Angiotensin-Converting-Enzym-Hemmer
Arterielle Gefäßsteifigkeit (S)	reziproker Wert der arteriellen Gefäßcompliance
BMI	Body Mass Index
Compliance(C)	Veränderung des Arterien­durchmessers (ΔD) / Veränderungen des Druckes (ΔP), Dehnbarkeit
C1	Compliance der Kapazitätsgefäße
C2	Compliance der kleinen Gefäße
CRF	Chronic renal failure/ chronische Niereninsuffizienz
Dehnbarkeit	Volumenänderung / Volumen x Druckänderung, bzw. Compliance pro Volumeneinheit
DTNB	5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic­säure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid (oxidiertes Glutathion)
GPx	Glutathionperoxidase
GR	Glutathionreduktase

GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
HD	Hämodialyse
HCl	Salzsäure
HBSS	Hank´s Balanced Salt Solution
HEPES	Na-4-2-Hydroxyethyl-piperazin-1-ethanesulfonic-Säure
LDL	Low-Density-Lipoproteine
min	Minute
ml; mL	Milliliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
ms	Millisekunden
MPV	Metaphosphatsäure
M2VP	1-Methyl-2-Vinyl-Pyridiumtrifluormethansulfat in HCl
μM	Mikromolar = 10^{-9} mol/l
μl	Mikroliter = 10^{-6} l
nm	Nanometer
NaCl	Kochsalzlösung

NADPH	Nikotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat+H
NO	Stickstoffmonoxid
Pulsdruck	Differenz zwischen systolischem und diastolischem Blutdruck
RI	Reflektive Index
R1	GSSG-Probe
R2	GSH-Probe
ROS	Reactive Oxigen Species / Reaktive Sauerstoffspezies
SV	Schlagvolumen
SVR	Systemic Vascular Resistance / total peripherer Widerstand
S1	arterielle Steifigkeit der großen Gefäße; Reziprokwert von C1
S2	arterielle Steifigkeit der kleinen Gefäße; Reziprokwert von C2
sec	Sekunde
WHO	World Health Organization; Weltgesundheitsorganisation

1. Einleitung

1.1. Allgemeines zur chronischen Niereninsuffizienz und Hypertonie

Die chronische Niereninsuffizienz ist die Folge einer irreversiblen Verminderung der glomerulären, tubulären und endokrinen Funktion der Nieren. Sie kann über Jahre hinweg fortschreiten, wobei die ersten Symptome durch die starke Kompensationsfähigkeit der Nieren lange fehlen können. Die ersten Symptome einer Niereninsuffizienz zeigen sich erst bei einer Funktionseinschränkung von über 50%. Diese Störung der Nierenfunktion zeigt zunächst nur unspezifische Symptome einer osmotischen Diurese mit vermehrtem Harndrang, Ödeme und Nykturie (Herold 2009).

Die fortschreitende Niereninsuffizienz verläuft dabei in vier Stadien ab, die fließend ineinander übergehen. Abhängig von den Retentionswerten und von der glomerulären Filtrationsrate ist das Terminalstadium der Niereninsuffizienz letztendlich erreicht, wenn die konservativen Maßnahmen nicht mehr greifen und der Patient für das weitere Überleben die Nierenersatztherapie braucht. Die extrakorporale Hämodialyse ist das führende Therapieverfahren mit 87%, die Peritonealdialyse die einzige Alternativtherapie dazu. Der Beginn einer chronischen Niereninsuffizienz (chronic renal failure / CRF) als Erkrankung ist dennoch durchaus frühzeitig beeinflussbar (QuaSi-Niere 2009).

Die chronische Nierenerkrankung kann durch einzelne Allgemeinmaßnahmen lange herausgezögert werden, zum Beispiel durch besonders nachhaltige Blutdrucknormalisierung, nierenschonenden Medikamenten und strenge Diabetesschulung, bzw. Diabeteseinstellung. Während Stadium 3 und 4 der Niereninsuffizienz (siehe Tabelle 1) noch ohne Dialysemaßnahmen mit optimierter und intensivierter Therapie einhergeht, ist Stadium 5 mit Dialysepflicht unumkehrbar und nur durch eine Nierentransplantation behandlungsfähig. Die fortschreitende CRF zeigt als Symptomatik das Versagen der Hormonsekretion und Organfunktion mit Verlust der Retention der harnpflichtigen Substanzen. Es kommt schließlich zur irreparablen Schädigung der Nierenfunktion mit dem Stadium der Urämie. In diesem Stadium zeigt die Niereninsuffizienz (NI) toxische Schädigung anderer Organe mittels Ansammlung

harnpflichtiger Substanzen im Gewebe des Herz-Kreislaufsystems, im zentralen und peripheren Nervensystem, wie auch dem Blut mit seinen Blutbestandteilen. Die Symptome der Urämie führen zu Pruritus, Hyperkaliämie, Nausea, Enzephalopathie und Lungenödem mit Dyspnoe. Mit dem Versagen der Hormonsekretion kommt es zur renalen Anämie und deren folgen wie sekundärer Hyperparathyreodismus, renale Osteopathie und renale Hypertonie. Tabelle 1 zeigt die Einteilung in 5 Stadien der Niereninsuffizienz nach der National Kidney Foundation (NKF).

Tabelle 1: Die chronische Niereninsuffizienz wird nach der National Kidney Foundation / NKF eingeteilt (Herold 2009).

Stadium	Bezeichnung	GFR ml/min/1,73 m	Aufgabe/Therapie
0	Erhöhtes Risiko für Niereninsuffizienz	über 90	Diagnostik/ Prophylaxe
1	Nierenschädigung bei normaler Nierenfunktion	über 90	Diagnostik plus Therapie der Begleiterkrankung, Risikovermeidung
2	CRF mit milder Niereninsuffizienz	60-90	wie bei Stadium 1
3	mittelschwere CRF	30-59	Zusätzlich Diagnostik und Therapie der Komplikationen
4	Schwere NI	15-29	Vorbereitung Dialyse
5	Nierenversagen	unter 15	Nierenersatztherapie

Die Nierenersatztherapie hat das Ziel harnpflichtigen Substanzen wie Kreatinin, Harnstoff, Wasser, Harnsäure und Urämietoxine wie Hippursäure, Cyanat, Homocystein und Parathormon zu eliminieren und Störungen im Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushalt zu korrigieren. Die Dialysebehandlung kann die Ausscheidungsfunktion der Niere nur soweit ersetzen, dass eine dauerhafte urämische Intoxikation vermieden werden kann. Die

Dialyse dient nur als Organersatz auf Zeit. Leider führt ebenso das meist langjährige Dialyseverfahren häufig zu Spätkomplikationen und besitzt somit auch einen limitierenden Faktor. In verschiedenen Arbeiten wird bei chronischer Niereninsuffizienz und dialysepflichtigen Patienten eine deutlich gesteigerte kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität nachgewiesen und beschrieben (Amann et al., 2004; Anavekar et al., 2004; Sarnak et al., 2003; Saw et al., 2004, Saran et al., 2008). Über 50% aller Dialysepatienten werden in ihrem Krankheitsverlauf mit kardiovaskulären Erkrankungen konfrontiert, zudem auch koronare Herzerkrankung, Herzinfarkt, Schlaganfall und periphere Verschlusskrankheit gehört (Bowry et al., 2005).

Die jährliche Inzidenz der chronischen Niereninsuffizienz beträgt in Westeuropa 10/100.000 Erkrankte im Jahr, in den USA sind es mit 60/100.000 noch mehr Erkrankte im Jahr (Herold 2009). Etwa 65 000 Dialysepflichtige gibt es insgesamt in der Bundesrepublik, in den letzten zehn Jahren ist die Anzahl der Dialysepflichtigen jährlich mit knapp 5% zum Vorjahr angestiegen. Die 5-Jahres-Überlebensrate von Dialysepflichtigen liegt mit 50% nur knapp unter den malignen Tumorerkrankungen, die mit 55% vom Robert-Koch-Institut angegeben wird. In der Studie über die Todesursachen von Dialysepflichtigen (n=4587) von Frei & Schober-Halstenberg 2006 war der größte Anteil mit 39,7% kardial bedingte Haupttodesursache. Infektionen (17,8%), Malignome (10,3%) und Abbruch der Dialysebehandlung (3,1%) bildeten den minderen Anteil der Haupttodesursachen.

Die hohe Prävalenz vaskulärer Erkrankungen wie der Hypertonie und Atherosklerose verlangt neben etablierten Maßnahmen der Prävention und suffizienter Therapie vor allem auch effektive diagnostische Methoden, um mögliche Ursachen und Symptome frühzeitig und sicher erkennen zu können. So können Veränderungen der Laborparameter beim Hausarzt durch die Bestimmung vom Kreatininwert im Blut und Proteinnachweis im Urin frühzeitig eine eingeschränkte Nierenfunktion nachweisen. Auch regelmäßige Blutdruckkontrollen beim Hausarzt können erste Anzeichen einer hypertensiven Erkrankung aufgedeckt und somit bei frühzeitiger Erkennung eine chronische Erkrankung vorbeugen, denn arterielle Hypertonie und chronische Niereninsuffizienz zeigen eine erheblich gesteigerte kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität (Amann et al., 2004;

Anavekar et al., 2004; Sarnak et al., 2003; Saw et al., 2004). Die jährliche Todesrate von Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz liegt bei fast 25%, gleichzeitig liegt die jährliche Todesrate von Patienten mit Hypertonie bei annähernd 55% (Locatelli et al., 2000; Parfrey 2000). Die dialysepflichtigen Grunderkrankungen werden aufgeteilt in Diabetes mellitus (davon 24% Diabetes mellitus Typ II, 4% Diabetes mellitus Typ I), Glomerulonephritis (19%), Interstitielle Nephritis (17%) und der vaskulären Nephropathie (17%). Weiter wird noch in zystische Nierenerkrankungen (7%) und andere Ursachen mit 15% aufgeteilt (Frei & Schober-Halstenberg 2006).

Eine Zunahme der vaskulären Nephropathie, eine Folgeerkrankung der arteriellen Hypertonie, nimmt einen großen Anteil bei der Diagnoseverteilung der dialysepflichtigen Grunderkrankungen ein (Frei & Schober-Halstenberg 2006). Bekanntermaßen begünstigt die arterielle Hypertonie das Auftreten arteriosklerotischer Veränderungen an Arterien, nicht nur an den Koronargefäßen und Zerebralgefäßen, sondern auch an der Niere als Endorgan. Mit der Zunahme der vaskulären Nephropathie, die auf dem Boden der arteriellen Hypertonie entsteht, ist vor allem die Altersklasse der über 70-jährigen betroffen. Betrachtet man diese Sachlage mit dem Hintergrund des demographischen Wandels Deutschlands, ist das eine große Anzahl an Patienten, Kosten und somit ein enormes Problem für das Gesundheitswesen. Zudem wird eine geringe Nierenschädigung bei kardial vorbelasteten Patienten als ein Hauptrisikofaktor für kardiovaskuläre Komplikationen angesehen (Anavekar et al., 2004; Amann et al., 2004, Go et al., 2004, Fox et al., 2004).

Nur für wenige Formen der arteriellen Hypertonie ist die Pathogenese eindeutig geklärt, bei der primären Form der Hypertonien (95% aller Hypertonien) sind direkte Ursachen nicht zu finden. Verschiedene Risikofaktoren wie psychosozialer Stress, veränderte Hormonwirkung, Medikamente, Salzaufnahme und Ernährung, Rauchen und mangelnde Bewegung als Lebensweise der westlichen Welt könnte ursächlich sein. Man spricht daher bei der arteriellen Hypertonie von einer multifaktoriellen, polygenetischen Erkrankung. Die arterielle Hypertonie wird nach WHO in folgenden Blutdruckwerten eingeteilt, siehe Tabelle 2:

Tabelle 2: Einteilung der arteriellen Hypertonie nach WHO 2006.

Blutdruckbereich	Systolischer Blutdruck in mmHg	Diastolischer Blutdruck in mmHg
Normoton	kleiner 140	kleiner 90
Grenzwerthypertonie	140 -160	90-95
Hypertonie	über 160	über 95

Die oben genannten Risikofaktoren können in vielen Fällen minimiert und verhindert werden, die genetischen Faktoren wie Defekte einzelner Enzyme oder eine Geschlechtsspezifität nicht. So zeigten beispielsweise Männer bei chronischem und negativem Stress während einer Arbeitsbelastung einen steigenden Bluthochdruck aufgrund Überaktivität des sympathischen Nervensystems (Pickering et al., 1996).

Die Ursachen einer sekundären Hypertonie (5% der Hypertonien) sind beispielsweise Aortenisthmusstenose, primärer Hyperaldosteronismus, Phäochromozytom, Glomerulonephritiden oder Nierenarterienstenosen (Herold 2009). Die Folgen einer jahrelangen arteriellen Hypertonie sind ausreichend bekannt, zudem erhöhen alle Formen der Hypertonie das Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen (Zakharieva, 1999).

Wie bei vielen Erkrankungen multifaktorieller Genese gestaltet sich auch bei der Erkrankung der Hypertonie die Diagnostik und Therapie schwierig. Einzig eine strenge medikamentöse Therapie und das Erlernen neuer Verhaltensweisen wie z. B. eine diätetische Schulung und regelmäßige Bewegung kann das Fortschreiten der Erkrankung verlangsamen.

Die arterielle Hypertonie begünstigt zudem das Auftreten arteriosklerotischer Veränderungen am gesamten Gefäßsystem, letztendlich auch an der Niere als Endorgan, welches das Krankheitsbild der vaskulären Nephropathie aufzeigt. Einen Überblick über die Schäden am Endorgan gibt die Tabelle 3:

Tabelle 3: Einteilung der Hypertonie nach ihrem Schweregrad des Schadens am Endorgan (Herold 2009)

Schweregrade	Schäden am Endorgan
Schweregrad I	keine Organschäden
Schweregrad II	Linksherzhypertrophie, Retinopathie, beginnende Proteinämie
Schweregrad III	Herzinsuffizienz, Myokardinfarkt, zerebrale Komplikationen, Apoplexie, exsudative Retinopathie, Niereninsuffizienz

In der vorliegenden Arbeit wurden Patienten mit gesicherter arterieller Hypertonie, Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz Stadium 3 bis zum Stadium 5 mit Dialysepflicht in die klinische Untersuchung aufgenommen. Als Gründe für das vermehrte Auftreten arteriosklerotischer Gefäßveränderungen bei Dialysepatienten werden spezifische Risikofaktoren wie Hyperfibrinogenämie, Hyperhomocysteinämie, renale Anämie, endotheliale Dysfunktion und eine chronische Entzündung mit dauerhaft erhöhten C-reaktiven Proteinen und oxidativer Stress diskutiert (Nguyen-Khoa et al., 2001; Sarnak et al., 2003; Anavekar et al., 2004; Amann et al., 2004; Rubin et al., 2007; Himmelfarb et al., 2008). Die meisten der oben genannten Risikofaktoren sind Folgen einer Entzündungsreaktion mit der Dialysemembran. Da der Organismus regelmäßig mit der Dialysemembran und den Endotoxinen des Dialysats konfrontiert wird, kommt es zu einer chronischen Stimulation von Monozyten und Makrophagen und demzufolge zu den erhöhten CRP-Werten bei Hämodialyse-Patienten (Morena et al., 2005; Nguyen-Khoa et al., 2001). Die entstehenden Interleukine und Anaphylatoxine aktivieren die NADPH-Oxidase, die die Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Superoxidanionen katalysiert, und durch die Superoxiddismutase wird Hydrogenperoxid gebildet, welches bei unzureichender Anwesenheit von Antioxidantien oxidativer Stress bedeutet.

Sofern harnpflichtigen Substanzen nicht mehr genügend über die Niere ausgeschieden werden können und daraufhin die Konzentration im Blut ansteigt, entwickelt sich das Krankheitsbild der Urämie. Diese Urämietoxine sind stickstoffhaltige Substanzen, die für die Symptome der Urämie verantwortlich gemacht werden (Pruritus, Enterokolitis, Nausea,

Gastritis, Dyspnoe, Hyperkaliämie, Enzephalopathie, Lungenödem). Dazu gehören zum Beispiel: Harnstoff, Kreatinin, Harnsäure, Hippursäure, Cyanat, Homocystein, Stickstoffmonoxid (NO), Parathormon, Phenole und Granulozyteninhibierende Proteine (GIP I und II genannt). Bei Urämiepatienten findet außerdem eine erhöhte Lipidperoxidation statt, welche zu einer steigenden Produktion von oxidiertem LDL führt (Himmelfarb et al., 2005; Ivanovski et al., 2007). Dabei zeigt oxidativ modifiziertes LDL eine entscheidende Erhöhung der Atherogenese (Carr et al., 2000; Heinecke et al., 2001; Morena et al., 2000).

Diese erhöhte Entstehung von Arteriosklerose aus oxidativ modifiziertem LDL bei Urämiepatienten ist maßgeblich für die erhöhte kardiovaskuläre Mortalität verantwortlich. Mit dem Versagen der Nierenfunktion als Hormonbildendes Organ kommt es zudem zur renalen Anämie, zum sekundären Hyperparathyreoidismus mit renaler Osteopathie sowie zum renalen Hypertonus. Weitere Zeichen der Urämie sind gegeben, wenn es keine konservativen Möglichkeiten mehr gibt den Hydratationsstatus oder den Blutdruck zu kontrollieren, sowie eine zunehmende Verschlechterung des Ernährungszustandes.

1.2. Physiologie und Pathophysiologie der arteriellen Gefäßsteifigkeit

Die Arteriosklerose als Auswirkung und Ursache der arteriellen Hypertonie wird hier genauer betrachtet, denn Gefäßwandelastizität und arterielle Gefäßsteifigkeit haben physiologische und pathophysiologische Gründe. Arterien haben zwei unterschiedliche Funktionen, welche miteinander zusammenhängen: Erstens eine Verteilungsfunktion, die das Blut in die Peripherie zu den Organen leitet; zweitens eine Dämpfungsfunktion, die Druckschwankungen, durch wechselnd inotrope Herzaktion hervorgerufen, glättet (Goldsmith et al., 2004; O'Rourke et al., 2002; Pannier et al., 2005; Safar et al., 2003). Die Verteilungsfunktion der Arterien hängt vom Durchmesser der Arterien und von der Konstanz des mittleren Blutdruckes entlang des arteriellen Gefäßbaumes ab und kann bei gesteigertem Bedarf auf das fünf- bis acht- Fache erhöht werden infolge von Dilatation der arteriellen Muskulatur und damit veränderter Fließgeschwindigkeit des Blutes. Die isolierte systolische Hypertonie, welche häufig bei älteren Menschen vorkommt, zeigt sich durch einen altersphysiologisch bedingten Verlust der Gefäßwandelastizität. Der systolische

Blutdruck ist dabei erhöht, der diastolische Blutdruck ist normal bis erniedrigt, was sich in einem erhöhten Pulsdruck (PWV) zeigt. Durch den erhöhten Pulsdruck kommt es zu einem Verlust der Gefäßwandelastizität. Zudem kommt bei isolierter systolischer Hypertonie eine mechanische Belastung der Aorta und der zentralen Arterien durch das stoßweise aus dem linken Ventrikel ausgeworfene Schlagvolumen hinzu. Dies bewirkt eine Fragmentation und den Verlust von Elastin im Gewebe. Dadurch wird die Gefäßwand, bestehend aus Strukturproteinen wie Kollagen, zunehmend fibrosiert. Dieser Mechanismus führt zu einer Verdickung der Media-Wandschicht der Arterie, auch Intimafibrose genannt. Bei diesen Umbauprozessen nimmt die arterielle Gefäßsteifigkeit zunehmend zu, es resultieren ein erhöhter systolischer Druck und ein erhöhter Pulsdruck.

Eine Elastizitätsverminderung von Gefäßen wird auch gerne unter dem Begriff der Arteriosklerose subsumiert. Dabei sind im Begriff der Arteriosklerose zwei unterschiedliche Prozesse vereinigt, einmal die Arteriosklerose und zum anderen die Atheromatose. Der Begriff Arteriosklerose, auch Atherosklerose genannt, definiert einen krankhaften und nicht-entzündlichen Prozess der großen Herznahen Gefäße und der Aorta. Arteriosklerose führt zu einer pathologischen Veränderung der Arterien mit Verhärtung, Verdickung, Verlust der elastischen Komponenten bis zur Dilatation der Arterien und Lumeneinengung. Das pathologische Charakteristikum der Arteriosklerose ist eine nicht-atheromatöse, einheitliche Versteifung der Tunica Media der Arterienwand durch Hypertrophie der glatten Gefäßmuskelzellen (Cohn 2006).

Atheromatose entsteht auf dem Boden einer endothelialen Dysfunktion. Dabei werden bei Mikroinflammation und Mikroverletzung am Endothel Adhäsionsmoleküle und chemotaktische Substanzen exprimiert die zur Einwanderung mononukleärer Leukozyten in den subendothelialen Raum führen. Ist ebenfalls aufgenommenes LDL vorhanden, wird es durch ROS wie z. B. Superoxidanion, Hydrogenperoxid oder Lipidperoxid, oxidiert. Das so entstandene oxidierte LDL wird von Rezeptoren an diesen Zellen gebunden und führt zur Umwandlung von Monozyten in Schaumzellen, und somit zu einem Beginn des Arterioskleroseprozess (Scott et al., 2004; Sigrist et al., 2006). Es kommt zur Freisetzung von Wachstumsfaktoren, Einwanderung sowie Proliferation von glatten Muskelzellen und

Bindegewebe, was schließlich zur Bildung eines immer mehr wachsenden Atheroms führt. ROS führen bei weiterem Kontakt unvermittelt zur Stimulation der Proliferation von glatten Muskelzellen in den Gefäßen, und infolgedessen zur Produktion von Cytokinen und Aktivierung verschiedener Proteinasen der Matrix. Letztendlich führen diese Vorgänge zur Instabilität der atherosklerotischen Plaques und führen zu Gefäßverschluß und Ruptur (Himmelfarb et al., 2004).

Die Gefäßverkalkungen in CRF-Patienten sind kein passiver Vorgang aus einer erhöhten Calciumphosphatproduktion anzusehen, sondern als direkte Folge des metabolischen Umstands von Diabetes, Dyslipidämie, oxidativer Stress, Urämie, und Hyperphosphatämie, welche "Osteoblasten-ähnliche" Zellen in der Gefäßwand bilden (Mizobuchi et al., 2009).

Die WHO teilt die Arteriosklerose in 3 Krankheitsstadien ein, wobei Stadium 0 eine normale und gesunde Arterie ist. Stadium I zeigt frühe Läsionen und Fettstreifen der Arterieninnenwand, Stadium II zeigt fortgeschrittene Läsionen und fibröse Plaques, während Stadium III komplizierte Läsionen der Tunica media aufweist mit klinisch manifesten Folgeerkrankungen (Pschyrembel). Eine kardiale Hypertrophie, eine vaskuläre Hypertrophie sowie eine Dysfunktion der Endorgane stellen Komplikationen der Arteriosklerose dar (Izzo et al., 2001; Cohn 2006).

Die Atheromatose ist und bedeutet eine Betonung der histopathologischen Veränderung bei Arteriosklerose mit Bildung atheromatöser Plaques. Atheromatose wird durch eine vaskuläre Entzündung, eine Dysfunktion von Endothelzellen hervorgerufen. Anfangs reversibel zeigt dieser Prozess im Laufe der Zeit ein Ungleichgewicht zwischen vasokonstriktiven Substanzen wie Angiotensin II und vasodilatatorischen Substanzen wie Stickstoffmonoxid (NO). Der Prozess wird zunehmend irreversibel wobei es zu einer Kalzifikation und Narbenbildung der Gefäßwand mit Zunahme der Wanddicke kommt (Cockcroft & Wilkinson 2002). Klinisch bleibt die Atheromatose lange symptomlos, erst in den Spätstadien kommt es zur spontanen Plaqueruptur mit Freisetzung von thrombogenesefördernden Substanzen wie Calcium und Kollagen.

1.3. Pulswellenanalyse und Endothelfunktion

Nachdem oben auf die Physiologie und Pathophysiologie der arteriellen Gefäßsteifigkeit eingegangen wurde, wird nun die Pulsweite genauer betrachtet. Arterielle Pulsweiten sind Druckwellen eines flüssigen Mediums. Diese Druckwellen, die Interaktionen zwischen dem linken Ventrikel und den physikalischen Eigenschaften des arteriellen Systems vorzeigen, können Informationen mit einer Analyse der arteriellen Pulsdruckkurve beschrieben und gewonnen werden. Der aortale Pulsdruck wird durch verschiedene Faktoren maßgeblich beeinflusst, wie insbesondere Schlagvolumen und Auswurf des linken Ventrikels, als auch die dämpfende Kapazität oder auch Steifigkeit der Aorta und der großen Arterien. Nicht zu vergessen moduliert außerdem der Einfall der Pulswellenreflexionen den aortalen Pulsdruck (Safar et al., 2003; Izzo et al., 2001; Goldsmith et al., 2004).

In den zentralen Arterien werden Pulsenergie und das mitgeführte Schlagvolumen in den elastischen Fasern der Arteriolen gespeichert, wie im früheren Windkesselleffekt erstmals erwähnt wurde. Die Beibehaltung des systemischen Drucks durch die Arteriolen erzeugt den systemischen Widerstand. Während der Systole werden etwa 70-80% des Schlagvolumens im Windkessel der Aorta durch Dehnung der Gefäßwand gespeichert, die restlichen 20-30% fließen systolisch weiter. Unterdessen fließt in der Diastole das gespeicherte Blut in die Arterien weiter und sorgt auf diese Weise für einen kontinuierlichen Blutfluss bis in die Kapillaren. Dieser kontinuierliche Blutfluss sorgt für eine reduzierte Herzarbeit, das Herz müsste sonst das Blutvolumen jedes Mal aus einem Stillstand heraus mobilisieren (Izzo et al., 2001). Die Effizienz der Druckwellen an der Gefäßwand bzw. die Windkesselfunktion ist abhängig von den Eigenschaften der elastischen Fasern der Gefäßwände, sowie Durchmesser und Länge der Arterien und weitere geometrische Beschaffenheiten. Die elastischen Eigenschaften werden als Compliance (C) dargestellt, berechnet aus dem Verhältnis der Veränderung des Arterienradius (ΔD) und durch den Druckanstieg (ΔP): $C = \Delta D / \Delta P$. Der reziproke Wert der Compliance wird in dieser Arbeit als arterielle Gefäßsteifigkeit definiert (Goldsmith et al., 2004; Izzo et al., 2001). Die Compliance fällt bei einem erhöhten Blutdruckniveau ab und bedeutet somit eine verminderte Dämpfungsfunktion der großen Arterien bei erhöhtem Blutdruck.

Die Compliance der kleinen Gefäße hat hohe Aussagekraft über den Zustand des arteriellen Gefäßsystems, unabhängig von Alter und Blutdruck (Cohn 2006). Das einfache Windkesselmodell kann nicht auf das periphere Gefäßsystem übertragen werden, da es die Morphologie der peripheren Pulskontur nicht nachahmen kann, weshalb das modifizierte Windkesselmodell entwickelt wurde. In dieser Modifikation wurde eine wahrheitsgetreuere Reproduktion der Pulskontur berücksichtigt und obendrein die Beschreibung des diastolischen Kurvenverlaufs der Druckkurve verbessert, so dass daraus die Compliance der großen (C1) und der kleinen Gefäße (C2) abgeleitet werden kann. In der vorliegenden Arbeit wird dieses Modell zur Bestimmung arterieller Gefäßeigenschaften herangezogen. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass der Nachweis einer verminderten Dämpfungsfunktion von großen Arterien ein unabhängiger Vorhersageparameter für bevorstehende kardiovaskuläre Ereignisse ist (McVeigh 2003).

Ein weiterer physiologischer Faktor, der bei Gefäßeigenschaften eine Rolle spielt ist das Endothel selber. Als Zellverband kleidet das Endothel die gesamte innerste Schicht der Blutgefäße im menschlichen Körper aus. Das Endothel sezerniert als Gewebe verschiedene Substanzen, welche lokal und im Zentralnervensystem wirken kann. Bei indirekter Aktivierung des Endothels, wie z.B. durch Mikroverletzung, wird die Membranintegrität vom eigenen Zellverband gestört und Endothelin sezerniert. Dabei ist Endothelin als Gewebehormon ein hochwirksamer, körpereigener Vasokonstriktor. Eine Aktivierung endothelialer Rezeptoren mittels Endothelin kann eine Stickstoffmonoxid-vermittelter Vasodilatation und eine Vasokonstriktion zur Folge haben. Kommt es zu Mikroverletzungen und Mikroinflammation werden Wachstumsfaktoren und chemotaktische Faktoren freigesetzt, welche dann eine Atheromatose an der Gefäßwand induzieren. Dabei beeinflussen verschiedene Risikofaktoren wie Hyperhomocysteinämie, Hypertonus, Diabetes mellitus, Niereninsuffizienz, Hyperlipidämie und das Rauchen die Funktion von Gefäßendothelzellen (Gibbons et al., 1994).

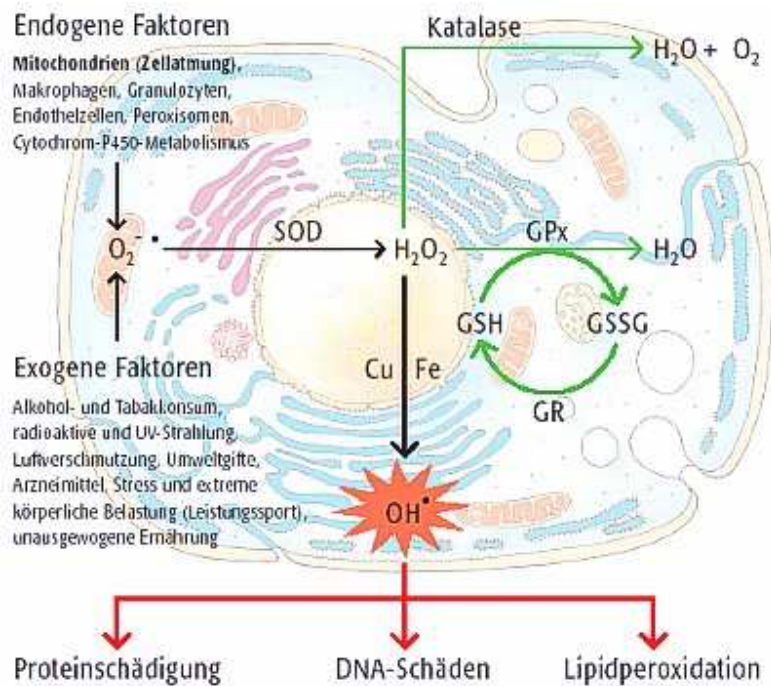
Endothelin besitzt in seiner Wirkung eine zehnfach bis hundertfach stärkere und ausgeprägte vasokonstriktorische Kraft als Noradrenalin. Insbesondere bei arteriosklerotischen Erkrankungen wird ein erhöhter Endothelin Spiegel beobachtet. Dabei begünstigen die

geschädigten Endothelzellen die Anlagerung von Thrombozyten und zirkulierende Monozyten, welche sich später in Makrophagen umwandeln. Dieser pathogenetische Prozess schreitet fort und es bilden sich unterhalb der noch intakten Gefäßendothelzellen die so genannten Fettstreifen, die Vorstufe der atherogenen Plaquebildung. Somit wird die Eigenschaft der Gefäße sich bei Bedarf zu erweitern bzw. die Compliance deutlich eingeschränkt. In Untersuchungen mit nierengesunden Probanden konnte gezeigt werden, dass mit dem Auftreten von Mikroinflammationen in der Gefäßendothelschicht die Endotheldysfunktion zunimmt (Stenvinkel 2001). Unter anderem wurde auch nachgewiesen, dass bei bestehender chronischer Niereninsuffizienz und Erhöhung von oxidativen Stress die Anreicherung von Urämietoxinen, Elektrolyten, Hypervolämie, Anämie und Eisenmangel die Entzündungsreaktion und Zunahme der Gefäßsteifigkeit begünstigt wird (Kalantar-Zadeh et al., 2004a; Kalantar-Zadeh et al., 2004b; Locatelli et al., 2004). Somit besteht bei dialysepflichtigen Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz auch eine Störung der endothelabhängigen Vasodilatation (Annuk et al., 2001; Miyazaki et al., 2000) und ein enormer Risikofaktoren der erhöhten kardiovaskulären Mortalität bei Dialysepatienten durch oxidativen Stress.

1.4. Oxidativer Stress und antioxidative Mechanismen

Oxidativer Stress liegt dann vor, wenn das Gleichgewicht zwischen pro- und antioxidativen Prozessen in Richtung der pro-oxidativen mit vermehrter ROS-Bildung verschoben ist (Himmelfarb et al., 2005; Taki et al., 2006; Valko et al., 2007; Himmelfarb et al., 2008). Das geht mit einer vermehrten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, reaktive oxygen species) einher. ROS sind sehr reaktionsfreudige Moleküle, die eine Vielzahl zellulärer Strukturen schädigen können. Im Normalfall herrscht in der Zelle ein Gleichgewicht zwischen pro- und antioxidativen Prozessen. Sind zelluläre Schutzmechanismen nicht mehr in der Lage die ROS-Konzentration unter der toxischen Schwelle zu halten, ist Oxidativer Stress entstanden. Nehmen Sauerstoffspezies in einer Stoffwechsellage überhand, werden diese mit Hilfe nichtenzymatischer und enzymatischer Mechanismen in weniger reaktive Moleküle umgewandelt. Zu den nichtenzymatischen Antioxidantien gehören die fettlöslichen Vitamine E (Tocopherole) und A (Retinoide), das wasserlösliche Vitamine C (Ascorbinsäure), Glutathion und die Flavonoide. Weitere im Plasma

vorhandene chemische Verbindungen wie Bilirubin, Harnsäure, Steroide und Ubichinone stellen wichtige nichtenzymatische Antioxidantien dar und können bei oxidativen Stress antioxidativ wirken (Neuzil & Stocker 1993).



Grafik 1: Entstehung, Entgiftung und Folgen von oxidativer Stress. Endogene und exogene Faktoren führen zur Bildung von hoch reaktiven Superoxidradikalen. Grafikadresse im Literaturanhang.

Eine Erhöhung des oxidativen Stresses ist bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz mehrfach beschrieben worden (Himmelfarb & Hakim 2003; Kalousova et al., 2003; Vaziri et al., 2002). Die wichtigsten enzymatischen Antioxidantien der Zelle sind Superoxiddismutase, Katalase und Glutathionperoxidasereduktase sowie reduziertes Nicotinamid-adeninucleotid-Phosphat (NADPH).

Nicht metabolisierte ROS führen somit zu einer Schädigung zellulärer Strukturen. Diese Veränderungen von Proteinen in Struktur und biologischer Aktivität werden vor allem durch eine Reaktion mit Methionin-, Histidin-, und Cysteingruppen mit ROS verursacht. Umfangreiche oxidative Schädigungen von Lipiden führen zur Bildung von Lipidperoxiden

und damit bis zu einer Störung der Membranintegrität von Zellen (Dringen 2000) und somit auch der Endotheldysfunktion. Ortständige vaskuläre Zellen wie z.B. Gefäßendothelzellen, glatte Muskelzellen und renale Zellen (Mesangialzellen, Tubuluszellen, glomerulären Epithelzellen) sind Reaktionsquellen für ROS. Freie Radikale sind folglich an der Entstehung und Pathophysiologie vieler Krankheiten und dem Wirkungsmechanismus vieler Toxine beteiligt (Beutelspacher 2000). Zunehmend wird oxidativer Stress als Ursache zahlreicher chronischer Krankheiten wie Hypertonie, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie oder Ischämie postuliert (Zalba et al., 2000, Da Ros et al., 2005). Endogene Einflüsse vom Lebensstil wie z.B. Rauchen, Überernährung, Stress und Belastungen, aber auch Sport lassen oxidativen Stress entstehen (Gosslau et al., 2002). Durch gesteigerten oxidativen Stress werden Veränderungen von Transkription und folgendermaßen auch von Wachstumsfaktoren ausgelöst, die bekannt für die Entwicklung von arteriosklerotischen Gefäßveränderungen sind (Blake & Ridker, 2001; Griendling et al., 2000; Lassègue et al., 2001; Wolin 2000). Die unter physiologischen Bedingungen im Stoffwechsel gebildeten reaktiven Metabolite werden in zwei Gruppen unterschieden: in reaktive Sauerstoffspezies und in freie Stickstoffradikale. Reaktive Sauerstoffspezies werden unter physiologischen Bedingungen im Rahmen des oxidativen Metabolismus intra- und extrazellulär im menschlichen Körper freigesetzt und spielen in der Physiologie und Pathophysiologie des vaskulären Systems eine wesentliche Rolle (Sigrist et al., 2006). Sauerstoffradikale dagegen entstehen am Beispiel des menschlichen Körpers ganz natürlich während der Energieerzeugung. Jede funktionstüchtige Zelle ist daneben mit einer Grundausstattung an antioxidativen Schutzmechanismen versehen. Zwischen Oxidantien und antioxidativ wirkenden Substanzen, zu denen Enzyme und nicht enzymatische Antioxidantien gezählt werden, besteht in gesunden Zellen ein Gleichgewicht. Antioxidantien zeichnen sich durch ihre Fähigkeit aus, einzelne Elektronen bzw. Wasserstoffatome zu übertragen, sie wirken dadurch reduzierend. Ihre oxidierten Formen müssen relativ stabil sein, da sie sonst zur Fortsetzung der Kettenreaktionen beitragen würden (Beutelspacher 2000).

Gegenspieler der Antioxidantien sind das Superoxidanion und das Wasserstoffperoxid. Diese beiden stellen die Metabolite des Ausgangssauerstoffs dar, aus denen zelltoxische

Sauerstoffradikale entstehen können wie z.B. das Hydroxylradikal (Gillissen et al., 1999). Freie Stickstoffradikale sind Superoxidanionen und maßgeblich an der Induktion der endothelialen Dysfunktion beteiligt (Griendling et al., 2000). In ihrer Funktion als second Messenger vermitteln freie Sauerstoffradikale die Aktivierung verschiedener intrazellulärer Proteine und Enzyme. Dies führt zur Induktion von Genen, die Faktoren der Funktionalität von vaskulären Zellen steuern, wie Zellwachstum und Zellmigration, endothelabhängige Gefäßrelaxation und mehr. Zudem wird eine direkte Interaktion zwischen endothelalem Stickstoff und freien Sauerstoffradikalen beschrieben: einer Superoxidanionen vermittelten Stickstoffinaktivierung, die antiproliferative und vasodilatorische Funktionen deutlich vermindert. Enzyme wie NADPH werden bei einem Stoffwechselungleichgewicht durch das Abfangen der Sauerstoffradikale aufgebraucht. Dies bedeutet aber für die wichtigen Funktionen von Antioxidantien ebenfalls, dass ein geringer Bestand von Antioxidantien, besonders von NADPH, maßgeblich an Gefäßerkrankungen beteiligt ist (Lassègue & Griendling 2010).

Bei Patienten mit essentieller Hypertonie ist die Fähigkeit der Acetylcholin-induzierter Vasodilatation signifikant vermindert im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen. Eine vermehrte Freisetzung reaktiver Sauerstoffradikale mit einer gesteigerten Vasokonstriktion ist bei Patienten mit essentieller Hypertonie vermutlich die Ursache endothelialer Dysfunktion (Taddei et al., 2001; Tepel 2003). Folglich sind die wichtigsten Risikofaktoren der erhöhten kardiovaskulären Mortalität bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (mit und ohne Dialysepflicht) eine endotheliale Dysfunktion und oxidativer Stress. Eine objektive Nachweismethode von beidem wäre Wünschenswert. Zur Überwachung von Arzneibehandlungen oder im Rahmen einer Antioxidantien-Supplementierung ist eine Nachweismethode bedeutend für Antioxidative Therapien (Pharmazeutische Zeitung, 2006). Einige Apotheken bieten inzwischen Schnelltests zur Bestimmung von vornehmlich Hydroperoxiden im Kapillarblut an. Dabei wird wie bei einer Blutzuckerbestimmung Blut durch Punktion der Fingerbeere gewonnen, mit Hilfe einer Kapillare aufgenommen, in einem pH-sauren Puffer ausgeschüttelt und das farbige Reaktionsprodukt photometrisch bestimmt.

Da Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz durch vermehrten oxidativen Stress eine erhöhte Morbidität und Mortalität zeigen, kann sich eine antioxidative Therapie auf diese Patientengruppe günstig auswirken (Tepel 2003). Die entstandenen Endprodukte bei oxidativem Stress können als Biomarkernachweis fungieren. Da es messbare Endprodukte der Oxidation von verschiedenen enzymatischen Bestandteilen und Endprodukte des Körpers sind, erlauben Sie Rückschlüsse auf das Ausmaß von oxidativen Stress und der Auswirkung einer antioxidativen Therapie zu ziehen. Auch ist es schwieriger den aktiven Sauerstoff direkt zu messen, weshalb in vielen Studien enzymatische Bestandteile als Biomarker zur Erfassung des oxidativen Stresses herangezogen werden (Himmelfarb et al., 2002; Himmelfarb et al., 2005). Eine Möglichkeit, oxidativen Stress und der damit verbundene oxidative Schaden objektiv darzustellen ist die Bestimmung der Glutathion-Redox-Ratio (GSH/GSSG-Ratio).

Die Glutathionperoxidase katalysiert die Reduktion von aggressivem Wasserstoffperoxid durch Glutathion in harmloses Wasser. Oxidiertes GSSG und reduziertes GSH bilden ein Redoxsystem, wobei die reduzierte Form (GSH) überwiegt. Durch die GSH-Reduktase erfolgt die Regeneration der oxidierten Form in eine NADPH-abhängige Reaktion (Smith et al., 1993; Vento et al., 2001; Madamachi et al., 2005). Der Zyklus kann neu beginnen und somit eine Belastung der Zelle mit Hydroperoxiden durch die Glutathionperoxidase-Reaktion abgefangen werden. Die breite Substratspezifität erlaubt die Reduktion praktisch aller organischen Hydroperoxiden, beispielsweise solcher von mehrfach ungesättigten Fettsäuren (Lipidperoxiden) oder von Nukleinsäurebasen.

Die Glutathionperoxidase (GPx) ist somit ein weiteres wichtiges Enzym zur Reaktivierung toxischer ROS. Das katalytische Zentrum der Glutathionperoxidase besteht aus Selen, welches durch die Glutathionreduktase unter Verbrauch von NADPH wieder in das oxidierte Glutathion zurückreagiert (Valko et al., 2007; Lassègue & Griendling 2010). Glutathion (GSH) gehört zur Gruppe der Thiole, es handelt sich dabei um eine organische Schwefel-Ableitung, die eine Funktion als Redoxpuffer besitzt. Diese entscheidende intra- und extrazelluläre Funktion als Redoxpuffer besteht aus den Aminosäuren Cystein, Glutamat und Glycin und besitzt in seiner reduzierten Form eine freie Thiolgruppe, mit der

es Elektronen auf ROS übertragen kann. Mittels katalysierenden Enzyms werden ROS wie Hydrogenperoxidasen und Lipidhydroperoxidasen durch Glutathionperoxidase (GPx) reduziert und unschädlich gemacht. Durch Oxidation entstehen aus zwei Glutathion-Molekülen eine Glutathion-Disulfid-Verbindung (GSSG), welches wiederum unter NADPH mittels Glutathionreduktase (GR) GSSG in zwei GSH recycelt wird. Somit ist Glutathion unter anderem für die Aufrechterhaltung der reduzierten Stoffwechsellumgebung in der Zelle zuständig. In der extrazellulären Flüssigkeit stellen nur Glutathion und Ascorbinsäure den Hauptteil der extrazellulären Abwehr gegen oxidativen Stress dar (Halliwell et al., 1990; Anderson 1996; Beutelspacher 2000, Annuk et al., 2001). Wird zur Aufrechterhaltung des Stoffwechselgleichgewichts in der Zelle Glutathion reduziert, wird es im Verhältnis weniger, Glutathion wird sozusagen aufgebraucht. Es entsteht dann das nicht mehr so „nützliche“, oxidierte Glutathion (GSSG), welches erst wieder reduziert werden muss. Die entstehende Ratio aus GSH/GSSG nimmt bei zunehmenden oxidativen Stress ab infolge von vermehrten vorkommen an GSSG.

Da die GSH/GSSG-Ratio ein Zeichen für physiologisches Gleichgewicht ist, kann sie ebenfalls als Stoffwechselhinweis für oxidativen Stress angewendet werden. Die Bestimmung der Aktivität der GSH/GSSG-Ratio wurde erstmals von Tietze 1969 beschrieben. Durch weitere Arbeiten von Griffith 1980, Richie et al., 1996 und Anderson 1996 entstand basierend auf ihren Methoden und jeweilige Modifikationen die Nachweismethode der GSH/GSSG-Ratio. Für den enzymatischen Nachweis des Gesamt-Glutathion wird das Ellman-Reagenz benutzt. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass ein Thiol-Scavenging Reagenz (M2VP) als Maß für schnelle Umsetzung des GSH zunutze gemacht wird, dadurch werden die Glutathionperoxidasen in ihrer Funktion nicht werden beeinflusst. Infolge dessen Vorhandenseins wird die Menge GSSG durch die Reduktion von GSSG zu GSH bestimmt und anschließend als spektrophotometrischen nachweisbares Produkt bei 412 nm erfasst. Der dabei entstehende GSH/GSSG-Quotient zeigt bei dieser Nachweismethode die messbare Veränderung der Reaktion.

Die Intensität der von dem Fluoreszenz-Spektrophotometer in dem Emissionsspektrum gemessenen Fluoreszenz erlaubt einen Rückschluss auf die Anzahl der in der Probe

befindlichen Moleküle und somit eine Bestimmung der Konzentration. Je kleiner der Ratio-Wert ist, desto weniger Glutathion-Antioxidantien sind in der Blutprobe vorhanden gewesen. Dabei verhält sich die Extinktionsabnahme proportional zur Glutathionperoxidaseaktivität (Annuk et al., 2001). In dieser Arbeit wird der Wert der GSH/GSSG-Ratio als ein Hinweis für oxidativen Stress eingesetzt.

1.5. Fragestellung

Nach wie vor zeigen Erkrankungen des Gefäßsystems eine steigende Tendenz, so dass die Weiterentwicklung der Gefäßdiagnostik von besonderer Wichtigkeit ist. Die Entwicklung von nichtinvasiven, sensitiven Methoden, welche die frühen Stadien von Gefäßwandschäden sensitiv und spezifisch erfassen können, hat einen präventiven Nutzen, um bei betroffenen Hochrisikopatienten eine frühe und effektive Therapie einleiten zu können (Safar et al., 2003). Zur objektiven Beurteilung der Gefäßelastizität macht man sich ein nichtinvasives Verfahren zunutze, bei dem die zu untersuchenden Personen so wenig wie möglich beeinträchtigt werden. Bei diesem Verfahren handelt es sich um die Methode des Vascular Profiling, die Aussagen über die Gefäßelastizität zulässt und in verschiedenen Studien zur Anwendung kam (Glasser et al., 1997; Wilkinson et al., 2002). Eine erhöhte Gefäßsteifigkeit ist ein guter Ausdruck für atheromatöse Veränderungen (Cohn 2006). Die Veränderungen der Gefäß-Compliance können durch Pulswellenanalyse nichtinvasiv, einfach, risikolos und reproduzierbar bestimmt werden. Dabei werden der Index der Elastizität der großen Gefäße (S1) und der Index der Elastizität der kleinen Gefäße (S2) als Maß für die Gefäß-Compliance ermittelt. Dabei möchte die Arbeit auf die Veränderung der Gefäßreaktivität bei drei verschiedenen Kollektiven untersuchen und Gefäßeigenschaften vergleichend dargestellt werden. Zudem soll mit dem Nachweis von der GSH/GSSG-Ratio im Serum als Stoffwechselprodukt von oxidativen Stress nachgewiesen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die arterielle Steifigkeit bei einer gesunden Kontrollgruppe und einer chronisch niereninsuffizienten Patientengruppe untersucht. Weil besonders chronisch niereninsuffiziente Patienten und auch Hypertoniker als Patientengruppe wesentlich häufiger von kardiovaskulären Komplikationen betroffen sind als die

Durchschnittsbevölkerung soll in diesem Zusammenhang neue Methoden zur Bestimmung arterieller Gefäßeigenschaften überlegt werden. Mit dem Anwenden der GSH/GSSG Ratio und der Messung der Gefäß-Compliance soll ein besseres Risikoprofil erzeugt werden, um die therapeutischen Maßnahmen bei betroffenen Patienten zu optimieren. Aus diesem Sachverhalt ergeben sich folgende Fragestellungen:

1. Wie verhält sich die die GSH/GSSG-Ratio bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz? Ist die GSH/GSSG-Ratio des Plasmas bei chronisch niereninsuffizienten Patienten im Vergleich zu den nierengesunden Patienten signifikant verändert?
2. Wie unterscheidet sich die arterielle Gefäßsteifigkeit, gemessen durch nichtinvasive Applanationstonometrie, bei gesunden Probanden, Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz und Patienten mit arterieller Hypertonie?

2. Materialien und Methoden

2.1. Patienten

In der vorliegenden Arbeit wurden Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz, Patienten mit Hypertonie und gesunde Probanden untersucht. Eingeschlossen wurden Patienten >18 Jahre alt, Männer wie Frauen mit unterschiedlicher Ätiologie zur chronischen Niereninsuffizienz und/oder Dialysepflicht, sowie nierengesunde Patienten mit und ohne hypertotonischer Erkrankung. Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Charité-Universitätsmedizin Berlin, Standort Benjamin Franklin, genehmigt und alle Patienten gaben ihre mündliche und schriftliche Einverständniserklärung ab. Zur Datenerfassung wurde bei jedem Patienten ein standardisierter Bogen ausgefüllt. Dieser Bogen beinhaltete Informationen über die Grunderkrankungen, Dialysedauer, kardiovaskuläre Erkrankungen, Diabetes mellitus, die aktuelle Medikation, Nikotin- und Alkoholkonsum.

Bei den Patienten wurde die arterielle Hypertonie anamnestisch festgestellt, wenn bei mehrfacher Messung unter Ruhebedingungen ein systolischer Blutdruck >140 mmHg und/oder ein diastolischer Blutdruck >90 mmHg gemessen wurde. Bei allen Patienten erfolgte die Blutdruckmessung im Sitzen nach einer Ruhephase von 10 Minuten, die Messung erfolgte am Oberarm in Herzhöhe mit einer an den Oberarmumfang angepassten Manschette. Beim Ablassen des Manschettendruckes wurde der systolische Blutdruck beim ersten Korotkoff-Geräusch und dem Nachweis eines palpablen Pulses im Bereich der Arteria radialis des gemessenen Armes bestimmt. Der diastolische Blutdruck wurde als Manschettendruck beim Verschwinden des Korotkoff-Geräusches bestimmt. Die routinemäßig erfassten Labordaten waren Kreatinin, Elektrolyt-Werte, Leberenzyme, Blutfettwerte und ein Blutbild.

2.2. Applanationstonometrie

Die Messung der arteriellen Gefäßsteifigkeit erfolgte mit einem HDI Pulsewave Research Cardio Vascular Profiling Instrument (Model CR-2000) entsprechend den Empfehlungen des Herstellers (Hypertension Diagnostics, Eagan, Minnesota, USA). Dies ist eine nichtinvasive, komplikationsfreie und von den Patienten gut tolerierte Untersuchung die mittels Applanationstonometrie eine Aussage über den Gefäßstatus und seiner Dynamik erlaubt. Die Messung der Pulswelle erfolgt mittels eines Applanationstonometers, der von außen auf die Arteria radialis aufgesetzt wird. Der Sensor wurde mittels einer Halterung an der Innenseite des Handgelenkes des Probanden fixiert, so dass er die Arteria radialis erfassen kann, und gleichzeitig senkrecht über der Arterie an der Stelle der stärksten tastbaren Pulsation angebracht wird.

Der Sensor besteht aus einem Edelstahlzylinder, der die Pulswelle durch einen Tonometer empfängt und am Monitor eine Pulswelle abbildet. Der Blutdruck wird mit einer Blutdruckmanschette automatisch bestimmt. Nach Messung von Pulswelle und Blutdruck bestimmt das Gerät einen Index der Elastizität der großen Gefäße (C1 in ml/mmHg \times 10) und einen Index der Elastizität der kleinen Gefäße (C2 in ml/mmHg \times 100). Diese Werte werden aus den Mittelwerten der Pulswellen während einer Messperiode von 30 Sekunden berechnet (Arnett et al., 2001; Rietzschel et al., 2001; Manning et al., 2002).

2.3. Messungen von GSH/GSSG mittels Fluoreszenz-Spektrophotometrie

Das Testprinzip des GSH/GSSG-Ratio Assay (Calbiochem; MERCK KGAA, Darmstadt, Germany) beruht auf folgenden Mechanismen: Reduziertes Glutathion (GSH) ist ein Tripeptid mit einer Thiolgruppe und ein Hauptantioxidanz im menschlichem Gewebe, die für die Reduktion von Hydrogenperoxidasen und Lipidhydroperoxidasen durch die Glutathionperoxidase (GPx) reduzierte Äquivalente bereitstellt. Dadurch wird Glutathion zu oxidierten Glutathion: GSH wird zu GSSG. Das GSH/GSSG-Ratio Assay-Kit macht sich das Vinylpyridinium-trifluoromethansulfat (M2VP) zunutze. Dieses reagiert mit GSH bei 25°C, und zeigt das Maß für die schnelle Umsetzung der GSH. Für den enzymatischen Nachweis des Gesamt-Glutathion wird das Ellman-Reagenz benutzt. Das Ellman-Reagenz ist 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoicacid (DTNB), jenes reagiert mit GSH zu einem spektrophotometrisch nachweisbaren Produkt, das bei 412 nm gemessen wird. Dabei wird die Menge GSSG durch die Reduktion von GSSG zu GSH bestimmt und anschließend gemessen. Die Reaktionsrate ist proportional zu den GSH und GSSG Konzentrationen. Je kleiner der Ratio wert ist, desto weniger Glutathion Antioxidantien sind in der Blutprobe vorhanden gewesen.

Die Test wurde wie folgt durchgeführt: Die Reagenzien und Labormaterialien für ca. 200 Tests wurden jeweils selber angemischt bzw. vor den Arbeitsschritten vorbereitet. Reagenzien, die vorbereitet werden müssen, werden jeweils für einen Tag neu gemischt (NADPH, M2VP). NADPH wird mit 7,5 ml Assay Puffer versetzt. Danach ist das Reagenz immer nur für sechs Stunden bei Raumtemperatur benutzbar und stabil. Der Assay Puffer wird mit dem lyophilisierten Puder und 650 ml destilliertes Wasser versetzt. Dieses Reagenz ist nur bei 4°C stabil und muss daher bei der angegebenen Temperatur aufbewahrt werden und nur zum kurzen Gebrauch bei Raumtemperatur gedacht. Die 5% Metaphosphatsäure wird jeden Tag neu gemischt und auf Eis gesetzt; 1g MPA wird mit 20 ml Aqua bidestillat versetzt. MPA und NADPH sollten immer am gleichen Tag angesetzt und verbraucht werden.

Die Reagenzien und Lösungen werden bei einer Temperatur von 2°C bis 4°C geschlossen aufbewahrt. Der Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) Puffer wurde selbst hergestellt mit

NaCl₂ 136mmol/L, KCL 5,4mmol/L; KH₂PO₄ 0,44mmol/L, Na₂HPO₄ Glucose 5,6mmol/L, CaCl₂ 1,0mmol/L, MgCl₂ 1,0mmol/L, HEPES 10,0mmol/L.

Das EDTA Blut wurde in zwei kleine Eppendorfggefäße aufgeteilt (R1 und R2). Für die R1-Proben wurden 10 µL Blut mit 290 µl kaltem 5% MPA 15-20 Sekunden vermischt mit dem Vortex und anschließend bei 1000 G für 10 min zentrifugiert. Vom Überstand werden 50 µl zu vorgelegten 700 µl GSSG Puffer pipettiert, dabei wird zu 1/15 die Probenmischung verdünnt. Die Endverdünnung der Probe R1 beträgt nun insgesamt 1/60. Das andere Eppendorfggefäß für die GSH-Probe (R2) wurde mit 100 µl Blut gefüllt und auf Eis gestellt.

Die R2-Proben für die GSH-Ermittlung wurden vorsichtig gemischt. Anschließend wurden die Proben zur GSH-Testung folgend vorbereitet: Zugabe von 350 µl kaltem 5% MPA und 15-20 Sekunden mischen und anschließend auch bei 1000G für 10 min zentrifugiert. Von dem GSH -Proben-Überstand werden 25 µl zu bereitgestellten 1,5 ml Assay Puffer pipettiert, dadurch wird die Probenmischung zu 1/61 verdünnt. Die Proben bis zum Messen auf Eis legen, die Endverdünnung der Probe R2 beträgt nun insgesamt 1/488.

Nun folgten die Fluoreszenz-Spektrophotometrische Bestimmungen:

1. Füge 50 µl des Standard in die Küvette
2. Füge 50 µl des Chromogens in jede Küvette
3. Füge 50 µl des Enzyms zu jeder Küvette
4. Platte in den Reader stellen und Programm starten
5. Die Platte wird zunächst geschüttelt und dann für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert
6. Platte fährt heraus aus dem Gerät , wird aber dort belassen um
7. rasch 50 µl NADPH in jede Küvette zuzufügen
8. Messung starten

Die Proben werden in einem Fluoreszenz-Spektrophotometer gemessen. Die Extinktionsänderung bei 412 nm wird dabei über 3 Minuten alle 15 s gemessen und die

Adsorptionsänderung aufgezeichnet. Der A 412-Wert setzt sich zusammen aus dem slope (Anstieg), aus den Minuten als x-Wert und dem Intercepts als y-Achse der Geradengleichung: $A_{412} = \text{slope} \times \text{minutes} + \text{intercepts}$. Die Standardkurven werden aus den 6 gemessenen Standardkonzentrationen erstellt. Durch die Berücksichtigung der Verdünnungen lassen sich GSH (x488) und GSSG (x30 statt 60, da 60-fache Verdünnung dividiert durch 2 GSH Moleküle pro 1 GSSG Molekül ergibt) Konzentrationen angeben. Der Quotient wird dann als GSH/GSSG Ratio bezeichnet und bei Ergebnissen in arbiträre Einheiten angegeben. In der Tabelle 4 sind die Geräte angegeben, die bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit verwendet worden sind.

Tabelle 4. Geräte und Instrumente.

Geräte/ Instrumente	Hersteller
Fluoreszenzspektrometer	Multiscan Ascent Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finnland
Zentrifuge 541R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Spektralphotometrische Küvetten	Multiscan Ascent Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finnland
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pasteurpipetten	Alpha Laboratories Ltd., Eastleigh, Hampshire, UK
Feinwaage	Sartorius®, Göttingen, Deutschland
Vortexer	Vibrofix VF 1 Electronic, IKA®, Staufen, Deutschland
Kanülen für Blutentnahme	Vacutainer Systems, Becton Dickinson S.A., Madrid, Spanien
Vacutainerröhrchen (10ml) für Blutentnahme	BD Vacutainer Systems, Plymouth, UK
Fluoreszenzmesser	Odyssey® Infrared Imaging System, LI-COR®, Lincon, USA

2.4. Statistik

Die erhobenen Daten wurden mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramms *Microsoft Excel* und *Windows XP* sowie mit der Software *GraphPad Prism 5.0* durchgeführt. Die deskriptive Beschreibung umfasst Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes. Die Untersuchungen zwischen den Gruppen erfolgten mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney Test bei ungepaarten Daten oder dem Wilcoxon-signed-rank Test bei gepaarten Daten.

Wurden mehr als zwei Gruppen verglichen, dann erfolgte die Analyse mit dem nicht-parametrischen Kruskal-Wallis Test. Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen wurden dann mit Dunn's Multiple Comparison post-hoc Test untersucht. Die Korrelationen wurden nach Pearson erstellt. Ein $p < 0,05$ im zweiseitigen Test wurde als signifikanter Unterschied angesehen.

3. Ergebnisse

Die Untersuchungen erfolgten bei insgesamt 326 Probanden und Patienten, davon waren 140 Frauen und 196 Männer. In der Gesamtgruppe waren 50 nierengesunde Kontrollprobanden, 98 Patienten mit arterieller Hypertonie (aHT) und 188 Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (CKD). Die klinischen und biochemischen Charakterisierungen der untersuchten Patienten sind in Tabelle 5 bis Tabelle 7 angegeben.

Tabelle 5. Klinische Charakterisierung der nierengesunden Kontrollprobanden (Kontrolle), Patienten mit arterieller Hypertonie (aHT) und der Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (CKD). Kontinuierliche Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben, andere Angaben in absoluten Zahlen.

Gruppe	Kontrolle	aHT	CKD
Anzahl	50	98	188
Geschlecht m/w	22/28	46/52	128/60
Alter	57 \pm 2	65 \pm 2	62 \pm 2
Raucher	7	21	34

Diabetes mellitus	4	17	46
Koronare Herzerkrankung	4	23	45
Peripher-arterielle Verschlusskrankheit	2	12	23
Apoplektische Insult	7	20	12
Tumor	9	8	14

Die Ursache der chronischen Niereninsuffizienz waren arterielle Hypertonie in 33 Fällen (18%), Diabetes mellitus in 27 Fällen (14,8%), Glomerulonephritis in 84 Fällen (45,9%), Zystennieren in 16 Fällen (8,7%) und unbekannt in 23 Fällen (12,6%).

Tabelle 6: Biochemische Charakterisierung der nierengesunden Kontrollprobanden (Kontrolle), Patienten mit arterieller Hypertonie (aHT) und der Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (CKD). Kontinuierliche Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben.

Biochemischer Parameter	Kontrolle	aHT	CKD
CRP (C-reaktives Protein)	5,4 \pm 1,2	2,3 \pm 0,4	4,9 \pm 0,5
Hämatokrit (%)	38,3 \pm 0,9	39,4 \pm 0,4	33,6 \pm 0,4
Leukozyten (/nl)	8,34 \pm 0,60	7,67 \pm 0,30	9,48 \pm 0,34
Hämoglobin (g/dl)	12,9 \pm 3,0	13,3 \pm 1,8	11,1 \pm 1,4
Thrombozyten (/nl)	235 \pm 13	237 \pm 10	217 \pm 7
Serum-Kreatinin (mg/dl)	0,85 \pm 0,03	0,86 \pm 0,02	3,60 \pm 0,18
Serum-Harnsäure (mg/dl)	5,1 \pm 0,2	6,0 \pm 0,2	7,7 \pm 0,2
Serum Harnstoff (mg/dl)	37 \pm 4	36 \pm 2	101 \pm 5
Gesamt-Eiweiß (g/l)	6,8 \pm 0,4	7,0 \pm 0,2	6,5 \pm 0,1
Serum Natrium (mmol/l)	136 \pm 1	137 \pm 1	137 \pm 1
Serum Kalium (mmol/l)	3,9 \pm 0,1	3,9 \pm 0,1	4,1 \pm 0,1
Serum Calcium (mmol/l)	2,24 \pm 0,02	2,28 \pm 0,02	2,23 \pm 0,02
Serum Phosphat (mmol/l)	1,1 \pm 0,1	1,1 \pm 0,0	1,4 \pm 0,7

Tabelle 7. Anzahl der Patienten mit verschiedenen Medikamentengruppen bei nierengesunden Kontrollprobanden (Kontrolle), Patienten mit arterieller Hypertonie (aHT) und bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (CKD). ACE steht für Angiotensin Converting Enzym Inhibitor, ASS steht für Acetylsalicylsäure, Angaben in absoluten Zahlen.

Medikamente der Patienten	Anzahl		
	Kontrolle	aHT	CKD
Vitamine	2	5	18
Phosphatbinder	0	1	28
Erythropoietin	0	0	17
Eisen	1	0	41
ACE	2	36	53
β-Blocker	5	82	110
andere Medikamente	21	48	101
Nitrate	1	7	8
Cholesterinsynthesehemmer	2	11	33
ASS	5	40	51
Diuretika	6	35	83
Immunsuppressiva	8	5	92

Bestimmung der Gefäßsteifigkeit

Entsprechend den Angaben aus der Literatur wurde die Gefäßsteifigkeit mit der Applanatationstonometrie mit Hilfe des kommerziell erhältlichen HDI Pulsewave Research Cardio Vascular Profiling Instrument (Model CR-2000; Hypertension Diagnostics) ermittelt. Die Steifigkeit der großen arteriellen Gefäße wurde dabei mit S1 und die Steifigkeit der kleinen arteriellen Gefäße wurde mit S2 bezeichnet. Zunächst wurde die Reproduzierbarkeit der S1 und S2-Messungen untersucht. S1 und S2 wurden bei 7 Probanden an zwei aufeinander folgenden Tagen bestimmt.

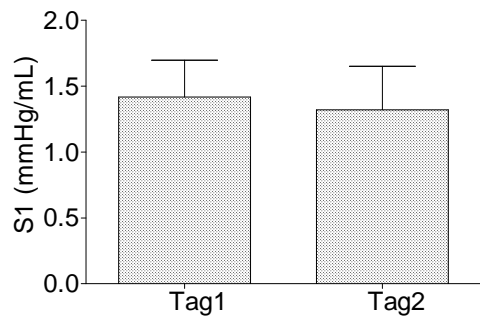


Abbildung 1

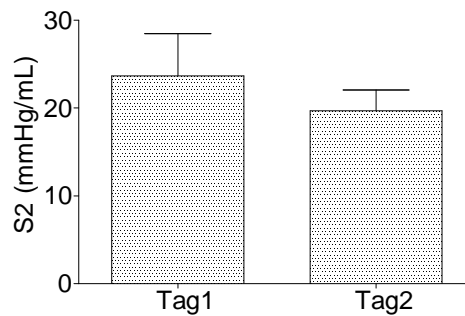


Abbildung 2

Abbildung 1: Bestimmung der arteriellen Gefäßsteifigkeit der großen Gefäße S1 an zwei aufeinander folgenden Tagen bei 7 Probanden. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes. Abbildung 2: Bestimmung der arteriellen Gefäßsteifigkeit der kleinen Gefäße S2 an zwei aufeinander folgenden Tagen bei 7 Probanden. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes.

S1 war $1,41 \pm 0,28$ mmHg/mL am Tag 1 und S1 war $1,32 \pm 0,33$ mmHg/mL am Tag 2 (Abbildung 1, $p=1.0$). Nach dem Bland-Altman plot waren Bias $-0,10$ und 95% limits of agreement von $-1,40$ bis $1,21$. S2 war $23,7 \pm 4,8$ mmHg/mL am Tag 1 und S2 war $19,7 \pm 2,4$ mmHg/mL am Tag 2 (Abbildung 2, $p=1.0$). Nach dem Bland-Altman plot waren Bias $-3,9$ und 95% limits of agreement von $-35,7$ bis $27,8$. Die Resultate sprechen für eine gute Reproduzierbarkeit der Bestimmung von S1 und S2.

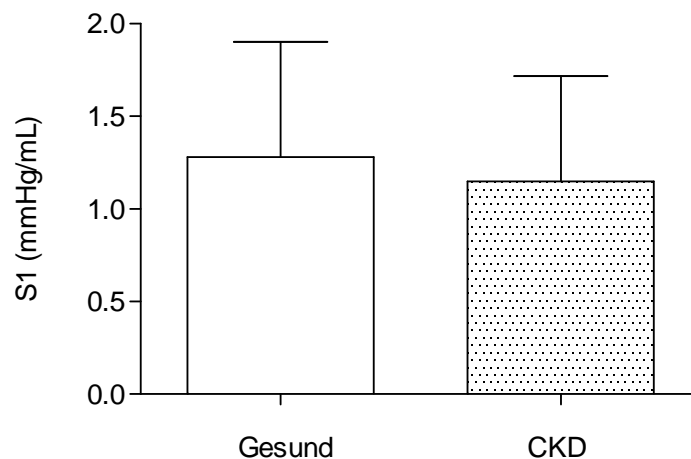


Abbildung 3: Arterielle Gefäßsteifigkeit der großen Gefäße S1 bei Nierengesunden im Vergleich zur CKD-Gruppe.

Jetzt wurden S1 und S2 bei 148 nierengesunden Probanden und 188 Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz verglichen. Zwischen diesen Gruppen ergab sich kein signifikanter Unterschied für S1 ($1,28 \pm 0,05$ mmHg/mL vs. $1,14 \pm 0,04$ mmHg/mL; $p=0,06$; Abbildung 3). Zwischen diesen Gruppen (Gesund und CKD) ergab sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied für S2 ($32,2 \pm 1,6$ mmHg/mL vs. $29,3 \pm 1,4$ mmHg/mL; $p=0,09$; Abbildung 4). Die gemessene Gefäßsteifigkeit wurde weiterhin zwischen gesunden Kontrollpersonen, Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz und Patienten mit arterieller Hypertonie statistisch verglichen.

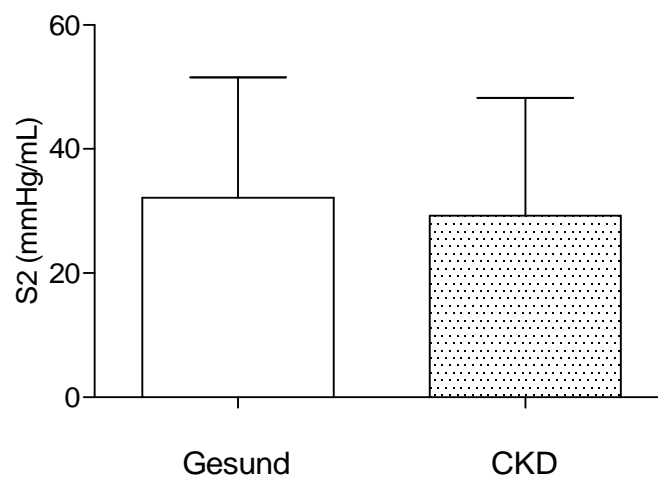


Abbildung 4: Arterielle Gefäßsteifigkeit der kleinen Gefäße S2 bei Nierengesunden im Vergleich zur CKD-Gruppe.

Wie in Abbildung 5 gezeigt, ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen für die Steifigkeit der großen Gefäße (Kruskal-Wallis Test, $p=0,088$). Wie in Abbildung 6 gezeigt, ergab sich zwar ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen für die Steifigkeit der kleinen Gefäße (Kruskal-Wallis Test, $p=0,039$), ohne dass in Dunn's Multiple Comparison Test ein signifikanter Unterschied zwischen einzelnen Gruppen gefunden werden konnte.

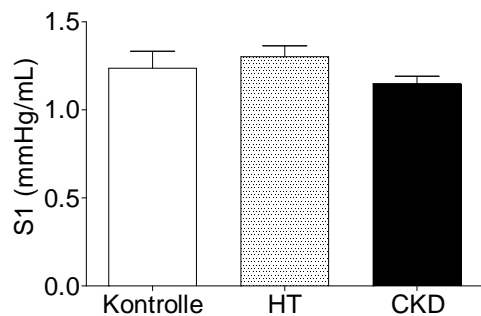


Abbildung 5

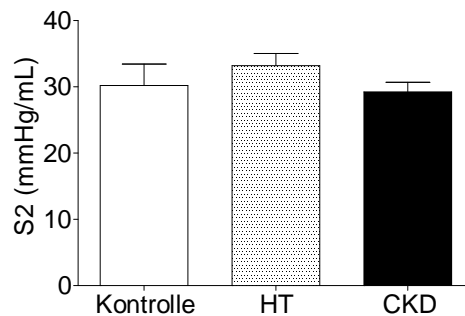


Abbildung 6

Abbildung 5: Arterielle Gefäßsteifigkeit der großen Gefäße S1 bei gesunden Kontrollpersonen (Kontrolle), Patienten mit arterieller Hypertonie (HT) und Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (CKD). Abbildung 6: Arterielle Gefäßsteifigkeit der kleinen Gefäße S2 bei gesunden Kontrollpersonen (Kontrolle), Patienten mit arterieller Hypertonie (HT) und Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (CKD).

Bestimmung der Gefäßsteifigkeit in Abhängigkeit von der Messposition. Die Messungen zur Gefäßsteifigkeit wurden sowohl an der Arteria radialis als auch an der Arteria dorsalis pedis durchgeführt. Bei der Bestimmung der arteriellen Steifigkeit der großen Gefäße S1 ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Messung an der Arteria radialis und der Arteria dorsalis pedis ($1,15 \pm 0,04$ mmHg/mL vs. $0,79 \pm 0,04$ mmHg/mL; $p < 0,0001$; Abbildung 7). Bei der Bestimmung der arteriellen Steifigkeit der kleinen Gefäße S2 ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Messung an der Arteria radialis und der Arteria dorsalis pedis ($32,22 \pm 1,78$ mmHg/mL vs. $23,48 \pm 1,23$ mmHg/mL; $p = 0,0004$; Abbildung 8).

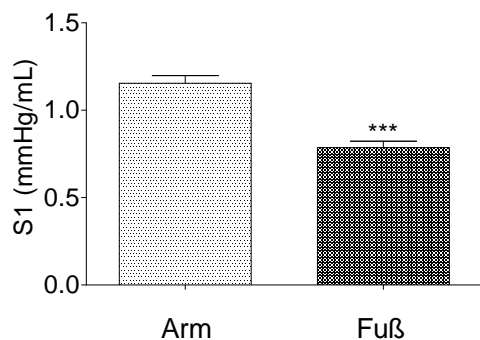


Abbildung 7

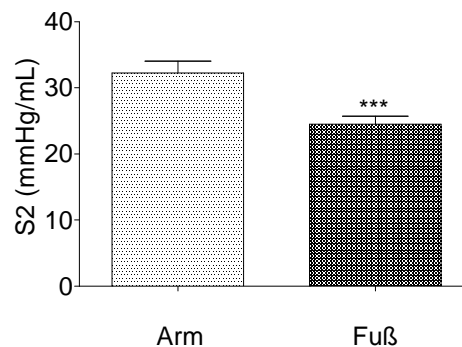


Abbildung 8

Abbildung 7. Bestimmung der arteriellen Gefäßsteifigkeit der großen Gefäße (S1) gemessen mittels Applanationstonometrie an der Arteria radialis (Arm) und an der Arteria dorsalis pedis (Fuß). *** $p < 0,0001$.

Abbildung 8. Bestimmung der arteriellen Gefäßsteifigkeit der kleinen Gefäße (S2) gemessen mittels Applanationstonometrie an der Arteria radialis (Arm) und an der Arteria dorsalis pedis (Fuß). *** $p = 0,0004$.

Bestimmung der GSH/GSSG Ratio

Jetzt wurde die GSH/GSSG Ratio bei 148 nierengesunden Probanden und 188 Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz verglichen. Zwischen diesen Gruppen ergab sich ein grenzwertig signifikanter Unterschied ($3,99 \pm 0,40$ vs. $5,99 \pm 0,64$ arbiträre Einheiten; $p = 0,06$; Abbildung 9).

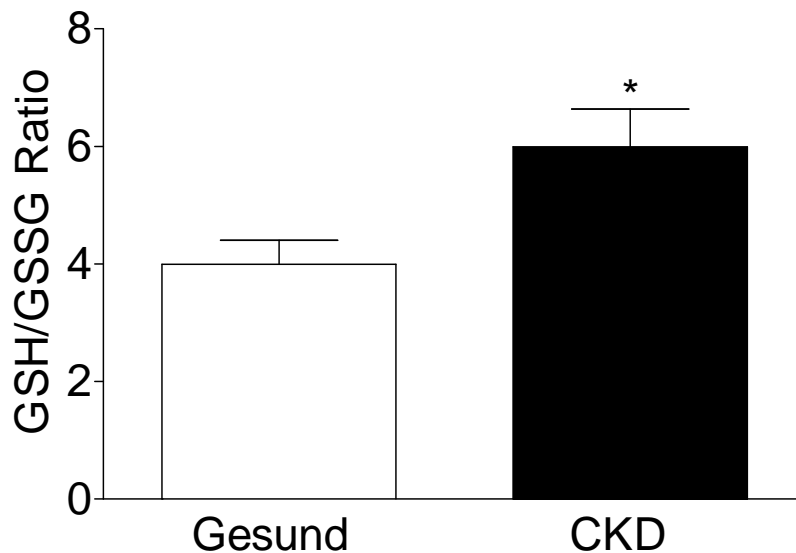


Abbildung 9: GSH/GSSG-Ratio bei Nierengesunden im Vergleich zur CKD-Gruppe. * $p = 0,06$ zwischen den Gruppen.

Die gemessene GSH/GSSG-Ratio wurde weiterhin zwischen gesunden Kontrollpersonen, Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz und Patienten mit arterieller Hypertonie statistisch verglichen. Wie in Abbildung 10 gezeigt, ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen für die GSH/GSSG-Ratio (Kruskal-Wallis Test, $p = 0,152$). Weiterhin wurde untersucht, ob Korrelationen zwischen klinischen und

laborchemischen Parametern und der GSH/GSSG-Ratio bestehen. Die Ergebnisse der Korrelationsanalysen mit den laborchemischen Variablen sind in Tabelle 8 dargestellt.

Es ergab sich eine signifikante Korrelation zwischen der GSH/GSSG-Ratio mit Serum-Kreatinin und Serum-Calcium.

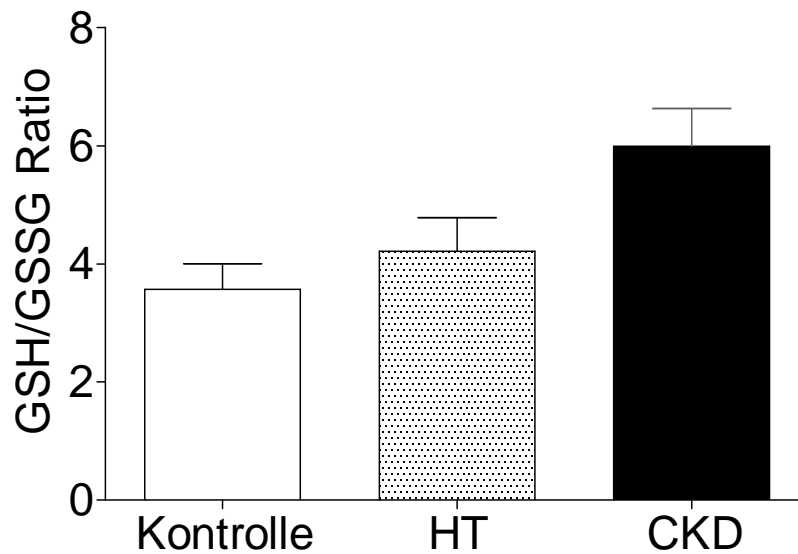


Abbildung 10: GSH/GSSG-Ratio bei gesunden Kontrollpersonen (Kontrolle), Patienten mit arterieller Hypertonie (HT) und Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (CKD).

Tabelle 8: Korrelationen zwischen laborchemischen Parametern und der GSH/GSSG-Ratio zeigten eine Signifikanz bei Kreatinin und Calcium.

	Calcium	Kreatinin	Harnstoff	Harnsäure	Phosphat	Eiweiß
GSH/GSSG-Ratio	p=0.025 r=0,117	p=0.032 r=0,117	p=0.512 r=0,039	p=0.917 r=-0,007	p=0.253 r=0,079	p=0.735 r=0,026
n	260	330	273	214	210	166

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde geprüft ob bei chronisch niereninsuffizienten Patienten mit und ohne Nierenersatztherapie und gesunden Probanden durch die GSH/GSSG-Ratio ein Stoffwechsellnachweis für oxidativen Stress abzuleiten ist. Die GSH/GSSG-Ratio ist ein Nachweis für ein Ungleichgewicht zwischen der Bildung freier Radikale und der Konzentration antioxidativ wirkender Enzymsysteme und stellt im peripheren Blut ein antioxidatives System dar. Dabei verhält es sich mit dem Ratio-Wert folgend: je kleiner der Ratio-Wert ist, desto weniger Glutathion als Antioxidans ist im Blut vorhanden. Das bedeutet auch, dass Serumwerte mit niedriger GSH/GSSG-Ratio auf verbrauchte Antioxidantien, bzw. Oxidativen Stress hinweisen.

Hinsichtlich Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz bzw. deren vermehrten oxidativen Stress wollte diese Arbeit mit den ermittelten Glutathion/Glutathiondisulfid-Ratio Werten einen messbaren Stoffwechsellnachweis darlegen. Denn bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ist ein dauerhafter oxidativer Stress vorhanden und damit ein Ungleichgewicht der Antioxidativen Mechanismen. Dieses Ungleichgewicht entsteht durch die Ansammlung von Urämietoxinen im Blut und deren ungenügende Entfernung während der Dialyse. Keinesfalls zu vergessen ist auch, daß durch die hohe Permeabilität der Dialysemembranen auch eine unbeabsichtigte Entfernung von Antioxidantien während der Dialyse erfolgt und damit ein stetiger Verlust von Antioxidantien u. a. gegeben ist (Morena et al., 2005; Himmelfarb et al., 2008).

Allein der Verlust von Spurenelementen wie Zink, Kupfer, Selen und Mangan, die wichtige Kofaktoren antioxidativer Enzymsysteme sind, ist bei Langzeithämodialysepatienten noch nicht klar definiert. Gewiss ist aber, dass besonders bei niereninsuffizienten Patienten ein besonderer Bedarf dieser Spurenelemente besteht. Außerdem ist der Vorgang der Hämodialyse selber eine Gegebenheit, der eine erhöhte Entzündungsreaktion zur Folge hat bzw. dessen Entzündungszustand ein Auslöser für erhöhten oxidativen Stress ist (Himmelfarb et al., 2002; Himmelfarb et al., 2004). Urämie-assoziiertes oxidativer Stress führt zu diversen Faktoren, wie zu einer Reduktion der endothelabhängigen Vasodilatation, erhöhten Vasotonus und einer immer mehr zunehmenden Verkalkung der Gefäßmedia

(Annuk 2003; Shanahan 2005). Die Folge ist dadurch ein erhöhtes kardiovaskuläres Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko bei chronisch niereninsuffiziente Patienten verglichen mit der Durchschnittsbevölkerung (Covic et al., 2005; Locatelli et al., 2001; Fried et al., 2005). Auch wird Oxidativer Stress mittlerweile als wichtiges Verbindungsglied zwischen arterieller Hypertonie und Arteriosklerose verstanden (Madamanchi et al., 2005) und ist auch bei einer Vielzahl von Erkrankungen pathogenetisch beteiligt, wie z.B. bei der Entstehung von Arteriosklerose oder der damit assoziierten endothelialen Dysfunktion. Hierbei zeigt verletztes Endothel eine Hochregulation von Endothelin, einer Niederregulation von vasodilatierendem Stickstoff (NO) und zu einer vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen. Diese Expression von Adhäsionsmolekülen führt schließlich zu einer Migration von Thrombozyten und Monozyten, die dann der Beginn von arteriosklerotischem Plaque ist (Sigrist et al., 2006).

Diese Sachlage begründet die Notwendigkeit weitere Methoden zu entwickeln um oxidativen Stress mit messbaren Stoffwechselprodukten zu objektivieren (Woodman et al., 2005). Die GSH/GSSG-Ratio ist bei der Darstellung von oxidativen Stress interessant, da sie ein Nachweis für ein Ungleichgewicht zwischen der Bildung freier Radikale und der Konzentration antioxidativ wirkender Enzymsysteme ist. Zusammen mit der nichtinvasiven Gefäßmessung wurde eine neue Handhabung gesucht um das kardiovaskulären Risiko besser darzustellen.

Die Ergebnisse der Gefäßmessungen, die mittels HDI/Pulswave Cardio-Vascular Profiling Instrument durchgeführt wurden, geben Hinweise auf die Steifigkeit großer und kleiner Gefäße (Arterial Stiffness). Die Gefäßsteifigkeit der großen Gefäße S1 und der kleinen Gefäße S2 charakterisieren die Beschaffenheit der Gefäßwand. Bei kardiovaskulären Komplikationen verursacht der arteriosklerotische Umbau der Gefäße eine Reduktion der arteriellen Dehnbarkeit (Compliance), die man durch die Messung der Pulswelle und der charakteristischen Impedanz erfassen kann. Eine Abnahme der Compliance (Dehnbarkeit) der großen Gefäße, führt zu einem Anstieg des systolischen Blutdruckes, des Pulsdruckes und dadurch zu einer linksventrikulären Hypertrophie die eine verminderte Koronardurchblutung mit sich zieht (Sarnak et al., 2003; Weber et al., 2008).

Die Arbeitsweise des Applanationstonometers erfasst die Pulswellen der Arteria radialis nichtinvasiv und gibt Hinweise auf die Elastizität beziehungsweise Steifigkeit großer und kleiner Gefäße. Dabei steht C1 für die Gefäß-Compliance der großen und C2 für die der kleinen Gefäße. Demgegenüber steht die Gefäßsteifigkeit Arterial Stiffness S1 (der großen Gefäße) und S2 (der kleinen Gefäße). Diese lässt sich aus der Compliance wie folgt berechnen: $S1=10/C1$ und $S2=100/C2$. Die Werte charakterisieren die Beschaffenheit der Gefäßwand. Die der Pulswellenanalyse basierte auf die Verwendung eines modifizierten Windkesselmodells (Hypertension Diagnostics; Cohn et al., 1995, Manning et al., 2002). Dieses nichtinvasive Messverfahren wurde von unseren Patienten gut toleriert und die Methode bewertete die arterielle Gefäßfunktion sowie Veränderungen zuverlässig, und besitzt somit einen entscheidenden Vorteil im Vergleich zu invasiven Methoden (Wilkinson et al., 2002). Es werden immer neue Methoden gesucht und Entwickelt, die einen besseren Einblick in pathologische Veränderungen der Arterienwand ermöglichen sollen, wie zum Beispiel die Pulswellenanalyse, durch welche die Pulswellengeschwindigkeit, die arterielle Gefäßsteifigkeit sowie der Augmentations-Index ermittelt werden kann (Wilkinson et al., 2002; Weber et al., 2004). Dabei kann die Methode des Vaskular Profiling Elastizitätswerte der großen und kleinen Gefäße ermitteln und darstellen.

Ergebnisse der Pulswellenmessungen mittels Applanationstonometrie

Die Pulswellenmessungen wurden bei allen Patienten durchgeführt. Um zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse der arteriellen Gefäßsteifigkeit bei chronisch niereninsuffizienten und nierengesunden Patienten ermitteln können, wurde zunächst die Reproduzierbarkeit der Messwerte von S1 und S2 in einem Zeitintervall von 24 Stunden nach An- und Ablegen von Manschette, überprüft. Dabei wurde immer Blutdruckmanschette und Sensor am selben Arm angebracht. Bei Dialysepatienten wurden, um die Funktion des arteriovenösen Shunts nicht zu gefährden, die Messungen am gegenüberliegenden Arm positioniert. Zunächst wurde die Reproduzierbarkeit der Bestimmung der Arterial Stiffness der großen (S1) und kleinen Gefäße (S2) untersucht. Die arterielle Steifigkeit zeigte nach 24 Stunden keinen signifikanten Unterschied mit

Anfangswerten. Die Resultate sprechen für eine gute Reproduzierbarkeit der Bestimmung von S1 und S2 durch den Applanationstonometers.

Durch die Messungen mittels Applanationstonometrie sollte gezeigt werden, dass die arterielle Steifigkeit der Gefäße bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz schlechter ist als bei gesunden Patienten. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede gegenüber der arteriellen Steifigkeit der großen Gefäße bei nierengesunden Patienten im Vergleich mit den Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz. Die Mittelwerte der Gruppen weisen bei CKD-Patienten trotzdem auf schlechtere Ergebnisse gegenüber den nierengesunden Patienten. Auch bei den Messungen der kleinen Gefäße der Nierengesunden gegenüber der Patientengruppe mit chronischer Niereninsuffizienz ergab sich kein signifikanter Unterschied des Arterial Stiffness für S2.

Zur genaueren Darstellung der Mittelwerteverteilung von S1 und S2 bei der gesunden Gruppe wurde die gesunde Gruppe in die Untergruppe Kontrollgruppe und arterielle Hypertoniegruppe unterteilt um etwaige Beeinflussungen des Gefäßstatus auszuschließen. Es wurde hiermit überlegt, ob die Werte der einen Gruppe die andere Gruppe beeinträchtigen. Das Ergebnis zeigte keine signifikanten Unterschiede der arteriellen Steifigkeit von den großen (S1) und den kleinen Gefäßen (S2) aller drei Gruppen zueinander. Dies bedeutet auch, dass die Mittelwerte von S1 und S2 in der vorherigen Berechnung durch die Zusammensetzung der beiden Untergruppen nicht beeinträchtigt wurde.

Trotzdem wäre eigentlich mit einem signifikanter Abfall von S2-Werten bei der CKD-Patientengruppe zu rechnen, die Ergebnisse dieser Arbeit konnten diese Theorie jedoch nicht bestätigen. Die Begründung dafür, dass bei chronisch niereninsuffizienten Patienten, Hypertonieerkrankten und gesunden Patienten kein signifikanter Unterschied von S1 und S2 nachgewiesen wurde, liegt vielleicht zum einen an einer unterschiedlichen Probandenzahl (CKD n=188, Nierengesund n=148), und zum anderen an vielleicht auch an der Tatsache, dass auch kürzlich Nierentransplantierte mit in die Gruppe der chronisch Niereninsuffizienten gezählt wurden. In einer Studie von Westhoff et al. wurde eine Verbesserung der arteriellen Compliance nach Transplantation einer Leichenniere

beobachtet, welches sich aber wieder zum Ausgangswert einstellte. Die arterielle Elastizität befand sich bei der Studie vor der Transplantation unter dem für gesunde Menschen bekannten Werten. Nach der Transplantation nahm die Compliance der großen und kleinen Arterien innerhalb der ersten vier Wochen gegenüber dem Ausgangswert zu. Wobei das Maximum nach drei Wochen erreicht wurde und dann nach drei Monaten wieder bei ihrem Ausgangswert war. Durch diese Arbeit wurde eine Verbesserung der arteriellen Compliance durch eine Transplantation gezeigt, die aber lediglich nur ein vorübergehender Zustand zu sein scheint (Westhoff et al., 2006).

Interessanterweise zeigte sich folgende Aufstellung bei den Ergebnissen der Gefäßmessungen der drei Gruppen (siehe Abbildung 5 und 6): Die arterielle Steifigkeit der Gefäße zeigte bei der HT-Gruppe die besten Mittelwerte bei S1 wie bei S2, gefolgt von der gesunden Kontroll-Gruppe. Die Gruppe der CKD-Patientengruppe hatte bei beiden Gefäßmessungen die schlechtesten Mittelwerte, und demnach auch den schlechteren Gefäßstatus. Warum die HT-Gruppe einen besseren Gefäßstatus als die gesunde Kontrollgruppe aufweist, scheint zunächst unverständlich. Denn gerade auch Patienten mit arterieller Hypertonie haben ein enorm hohes Risiko für Arteriosklerotische und kardiovaskuläre Erkrankungen (Zakharieva, 1999; Sarnak et al., 2003).

Ein weiterer ausschlaggebender Anhaltspunkt auf die unterschiedlichen Ergebnisse der arteriellen Steifigkeit von Gefäßen bei den beschriebenen Gruppen kann auch der Gefäßtonus sein. Vielleicht Verhält sich der Tonus der glatten Gefäßmuskulatur und damit der systemische periphere Widerstand bei Patienten mit arterieller Hypertonie abweichend von Gesunden aufgrund der medikamentösen Einstellung, die meist mit ACE-Hemmer, Statinen und Betablockern (Covic et al., 2004) einhergeht (siehe Tabelle 7; Medikation der einzelnen Patientengruppen). So zeigten Leibovitz et al. in einer Studie 2001, dass Atorvastatin bei Patienten mit schwerer Hypercholesterinämie die Elastizität der kleinen Gefäße verbesserte. Daraus lässt sich zumindest schließen, dass die ermittelte arterielle Gefäßsteifigkeit der kleinen Gefäße (S2) ein messbarer Parameter des Gefäßsystems ist und durch Medikamente, Blutdruck oder oxidativen Stress folglich auch ein modifizierbarer

und flexibler Parameter ist und Gefäßveränderungen aufzeigen kann (Annuk et al., 2001, Annuk et al., 2003).

Bestimmung der Gefäßsteifigkeit in Abhängigkeit von der Messposition

Bei der Bestimmung der Gefäßsteifigkeit in Abhängigkeit von der Messposition wurden Messungen sowohl an der Arteria radialis als auch an der Arteria dorsalis pedis durchgeführt. Es wurde überlegt, ob Messpositionen bei Gefäßmessungen wichtig sind und es unterschiedliche Ergebnisse zwischen Arm- und Fußpositionen gibt. Wieder wurden bei den Gefäßmessungen S1 und S2 zu den jeweiligen Messpositionen ermittelt. Die Resultate zeigten bei den Berechnungen einen signifikanten Unterschied der Vascular Profiling- Werte. Bei der Bestimmung der arteriellen Steifigkeit der großen Gefäße S1 ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Messung an der Arteria radialis und der Arteria dorsalis pedis $p < 0.0001$ ($r = 0.490$). Bei den kleinen Gefäßen S2 zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Messungen von Arm und Fuß von $p = 0.0004$ ($r = 0.486$). Diese signifikanten Gefäßunterschiede weist bei den Endergebnissen auf eine reduzierte Gefäß-Compliance der Arteria dorsalis pedis hin. Das Ergebnis kann folglich auch Ausdruck der physiologischen Dehnbarkeit bzw. Tonus der distal gelegenen Widerstandsgefäße sein (Manning et al., 2002). Dieses Ergebnis zeigt, dass es bei den kleinen Gefäßen eine Differenz im Dehnungsverhalten gibt. Das Resultat reiht sich in die Befunde anderer Studien ein (Annuk et al., 2001; Annuk et al., 2003; Goldsmith et al., 2004; Madamanchi et al., 2005; Shanahan et al., 2006; Lassègue et al., 2010): Die wichtigste Variable Größe des Gefäßwiderstandes ist der Gefäßradius, sein Wert setzt sich durch den Tonus der glatten Gefäßmuskulatur und vom systemischen peripheren Widerstand zusammen (Manning et al., 2002).

Die Funktion der Widerstandsgefäße wird mittels des Schellong-Tests beurteilt. Im Rahmen unserer Arbeitsgruppe entstandenen Dissertationen wurden Schellong-Tests bei ähnlicher Patientenkonstellation durchgeführt. Wie bei mir wurden die hämodynamischen Parameter durch die Applanationstonometrie registriert. Es zeigten sich nach dem Aufstehen ähnliche Werte der arteriellen Steifigkeit der großen (S1) und der kleinen Gefäße (S2) sowie einen signifikanten Anstieg der Herzfrequenz im Vergleich zu den

Werten im Liegen auf. Der systolische und der diastolische Blutdruck blieben nahezu unverändert. Der Anstieg der Gefäßsteifigkeit sowohl der kleinen (S2) als auch der großen Gefäße (S1) wird durch eine Zunahme des Arterientonus nach dem Aufstehen hervorgerufen, da der Körper im Rahmen dieses Orthostase-Tests den zentralen Druck aufrechtzuerhalten versucht. Durch den Anstieg der Gefäßsteifigkeit wird der Blutdruck auf einem konstanten Niveau gehalten. Bei den Werten der vorliegenden Arbeit wurden die hämodynamischen Parameter durch Messung der Applanationstonometrie allesamt bei liegenden Probanden durchgeführt.

Bestimmung der Glutathion/Glutathiondisulfid-Ratio

Bei der Bestimmung der GSH/GSSG Ratio wurde diese von nierengesunden Probanden und Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ermittelt und verglichen. Das Redoxsystem GSH/GSSG erfüllt in der einzelnen Zelle und im Blutserum eine Reihe wichtiger Funktionen. Es schützt biologische Membranen und andere Zellbestandteile vor oxidativen Schäden. Die strukturellen Gefäßschäden bei terminal niereninsuffizienten Patienten entstehen durch die Dysregulation des Stoffwechselgleichgewichts und die daraus resultierende, vermehrte Oxidation, bzw. oxidativer Stress. Ebenfalls wird ein erhöhter Vasotonus bei CKD-Patienten diskutiert, der durch Phosphat und andere Urämietoxine entsteht. Diese Urämietoxine spielen bei der Transformation glatter Gefäßmuskelzellen in Osteoblasten-ähnliche Zellen eine wichtige Rolle, die an der progredienten Verkalkung der Gefäßmedia beteiligt sind (Shanahan 2005; Shanahan 2006). Ein Unterschied in der Expression der Glutathionperoxidase im Verlauf der Dialyse wird auch diskutiert. Bei einem Vergleich von CKD-Patienten vor Hämodialyse und gesunden Kontrollen war die Glutathionperoxidase Aktivität bei Hämodialyse Patienten erniedrigt (Schettler et al., 2003).

Die Glutathion/Glutathiondisulfid-Ratio (GSH/GSSG-Ratio) als Stoffwechsellnachweis für vermehrten oxidativen Stress wurde zwischen nierengesunden Probanden und Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz verglichen. Die Anwesenheit von oxidativen Stress würde sich durch eine niedrige GSH/GSSG-Ratio bestätigen. Im Ergebnis zeigte sich eine grenzwertige Signifikanz im Unterschied zwischen nierengesunden und chronisch

nierenkranken Patienten. Auffallend war, dass die CKD-Gruppe gegenüber der gesunden Gruppe signifikant bessere bzw. höhere Werte der GSH/GSSG-Ratio zeigte.

Um die genaue Verteilung der GSH/GSSG-Ratio in der Gruppe der gesunden Patienten darzustellen, wurde die gesunde Gruppe in die Untergruppen der Kontrollgruppe und der Patientengruppe mit arterieller Hypertonie unterteilt. Es zeigte sich dabei keine Signifikanz zwischen Kontrollgruppe, aHT- und CKD-Gruppe. Das bedeutet aber, anders als von mir angenommen, dass die gesunde Kontrollgruppe die schlechteren Ratio-Werte im Ergebnis hat, die Hypertoniegruppe hatte die mittleren Werte der GSH/GSSG-Ratio und die CKD-Gruppe bei den Mittelwerten die besten GSH/GSSG-Ratio Werte. Wie kann es sein, dass die Glutathion/Glutathiondisulfid-Ratio bei der CKD-Gruppe höher ist, die Patienten aber trotzdem viele oxidative Schäden aufweisen?

Die Glutathion/Glutathiondisulfid-Ratio ist zweifellos ein Maß des oxidativen Stresses, aber ob sie ein messbarer Indikator ist, ist hiermit anzuzweifeln. Denn wie kann es sein, dass chronisch niereninsuffiziente Patienten einen besseren Glutathion/Glutathiondisulfid-Ratio Wert haben? Vielleicht wird die die Glutathion/Glutathiondisulfid-Ratio nicht als Antioxidatives System in diesem Maße verbraucht, bzw. das Glutathion gebraucht, wie es bei anderen antioxidativen Stoffen der Fall ist. Es entspricht einer Möglichkeit, dass Patienten mit Niereninsuffizienz Stoffe akkumulieren die antioxidativ wirken, dazu gehören z.B. Harnsäure und Bilirubin. In einer Studie von Ujhelyi et al. wird gezeigt, dass die hohe Radikalfängerkapazität des Plasmas von Hämodialyse- Patienten vor der Hämodialyse mit hohen Harnsäurespiegeln verbunden ist. Nach der Hämodialyse wird von einer signifikanten Abnahme der totalen antioxidativen Kapazität des Plasmas berichtet, außerdem wurde von ein erhöhter antioxidativen Effekt des Plasma-Ultrafiltrats bei chronisch niereninsuffizienten Patienten ohne Hämodialyse (Ujhelyi et al., 2006) im Vergleich zu gesunden Kontrollen ermittelt. Das bedeutet: Harnsäure bildet und ist ein Teil des antioxidativen Potentials des Plasmas. Es reagiert mit Hydroxyl- und Superoxidradikalen sowie Peroxinitrit und inaktiviert diese. Harnsäure wird dabei zu Allantoin oxidiert. Es entsteht ein Harnsäure-Radikal, welches wiederum durch Ascorbinsäure reduziert wird. Dennoch muss erwähnt werden, dass erhöhte Harnsäurespiegel keinen adäquaten antioxidativen Schutz bieten kann, wenn es Defizite

bei anderen antioxidativen Systemen gibt, besonders wenn die Defizite beim Vitamin C bestehen. Auch konnte bei der Studie von Ujhelyi et al. gezeigt werden, dass nach der Entfernung von Harnsäure durch Urikase etwa 30% der antioxidativen Kapazität des Plasmas erhalten blieb. Dies weist auf das Vorhandensein weiterer wichtiger Antioxidantien und antioxidative Systeme im Plasma hin. Die Radikalfängerkapazität des Plasmas von Hämodialyse-Patienten vor der Hämodialyse ist mit hohen Harnsäurespiegeln verbunden. Harnsäure bildet demnach einen Teil des antioxidativen Potentials des Plasmas. Es reagiert mit Hydroxyl- und Superoxidradikalen sowie Peroxinitrit und inaktiviert diese. Harnsäure wird dabei zu Allantoin oxidiert, dabei entsteht bei der Reaktion von Radikalen mit Harnsäure ein Harnsäure-Radikal das wiederum durch Ascorbinsäure reduziert wird. Andererseits sind es aber auch Stoffe wie Albumin, welche am Ende der Dialyse in höheren Konzentrationen vorliegen, die ebenfalls an der antioxidativen Kapazität beteiligt sind.

Ebenfalls wurde überlegt, ob es zwischen den Werten der GSH/GSSG-Ratio und verschiedenen Laborparametern ein Zusammenhang besteht, die von Urämiefaktoren abhängig sind. Die Werte der GSH/GSSG-Ratio korrelierten jedoch nicht signifikant mit den Serumwerten von Harnstoff, Harnsäure, Phosphat und Eiweiß. Es wurde aber eine signifikante Korrelation der GSH/GSSG-Ratio und dem Laborparametern Calcium und Kreatinin gemessen. Zusammenhänge von oxidativen Stress und Calcium werden in der Literatur beschrieben und diskutiert. Beispielsweise wird bei Ermak & Davies 2002 beschrieben, dass Reaktive Sauerstoff- und Stickstoff-Spezies als Botenstoffe in Zellfunktionen funktionieren. Doch bei oxidativen Stress zeigen sie sich in ihrer Funktion beeinträchtigt und führen die Zelle auf normalem physiologischem Wege zum Zelltod. Diese Veränderung ist weitgehend durch die Ca (2+)-Signalisierung vermittelt. Oxidativer Stress verursacht Ca (2+)-Einstrom in das Zytoplasma aus der extrazellulären Umgebung. Von dort strömt dann Calcium vom Endoplasmatischen Retikulum bis in den Nukleus und veranlasst dort den Apoptosevorgang. Seitdem oxidativer Stress und seine demzufolge bestehende Stoffwechsellage mit vielen Erkrankungen in Verbindung gebracht wurde, ist es ersichtlich geworden das reaktive Sauerstoff-Spezies die Ca (2+)-Signalisierung verändert (Ermak & Davies 2002) und die Molekulare Ebene und einzelnen Prozesse des

Alterns bzw. auch der Krankheitsentstehung besser verstanden wird. Der signifikante Zusammenhang zwischen Kreatininwerten und Calcium ist pathophysiologisch Vorhanden und entwickelt sich oft Aufgrund einer chronischen Nierenerkrankung. Die Auftretenden und auch latent anwesenden klinischen Symptome des sekundären Hyperparathyreoidismus zeigen als Ursache eine verminderte Produktion von aktiviertem Vitamin D, welches zu einem niedrigem Calciumspiegel und erhöhtem Phosphatspiegel führt. Viele chronisch und terminal niereninsuffiziente Patienten zeigen diese Blutspiegelkonstellation. Dieser Zusammenhang von Kreatininwerten und Werten der GSH/GSSG-Ratio wurde mit einer Signifikanz nachgewiesen und zeigt somit seine Gültigkeit im Bezug zueinander (Herold 2009).

Die GSH/GSSG-Ratio scheint also von den urämieassoziierten Faktoren wie Harnstoff, Harnsäure, Phosphat und Eiweiß unabhängig zu sein. Wobei hier erwähnt werden muss, dass die gesamte Anzahl der untersuchten Patienten in der Analyse mit den Parametern korreliert wurde. Es wäre hier sicher sinnvoll gewesen eine weitere Analyse der einzelnen Patientengruppen und der Laborparameter darzustellen um zu sehen, wie es sich bei den einzelnen Patientengruppen verhält. Eine erhöhte oxidative Belastung geht sehr wohl mit einem Abfall des intrazellulären GSH und einem Anstieg des GSSG einher. Intrazellulär liegt Glutathion vorwiegend in reduzierter Form vor mit einem Anteil von mehr als 95 % am Gesamt-Glutathion. Aufgrund dieser Verteilung ist eventuell der GSH/GSSG-Quotient ein zu empfindlicher, aber auch schnell veränderbarer Parameter als Bewertung von oxidativen Stress. Außerdem stellt die von uns gemessene Ratio nicht die Verhältnisse in allen Kompartimenten dar, sondern in unserem Fall nur die des Blutplasmas.

Alles weist darauf hin, dass der erhöhte oxidative Stress bei Patienten mit Urämie multifaktorieller Art ist, und die Speicherung von oxidierten und gelösten Stoffen durch den Verlust der Nierenfunktion ein vermutlich wichtiger pathophysiologischer Faktor bei der antioxidativen Kapazität von chronisch niereninsuffizienten Patienten ist (Himmelfarb 2008). Vermutlich entstehen die hohen Ratio-Werte der CKD-Gruppe durch die nicht ausreichenden antioxidativen Stoffwechselsysteme und die dadurch entstandenen unbekanntenen kompensatorischen Mechanismen bei Niereninsuffizienz. Denn meine Werte

der GSH/GSSG-Ratio stellen natürlich nur den augenblicklichen Wert der Blutentnahmesituation dar. Angenommen wir gehen von oxidativen Stressspitzen im Plasma aus, die durchaus einen Schaden verursacht haben und nun abgebaut werden, ist der Schaden wie Proteindenaturierung, Membranstabilität oder Lipidperoxidation schon vorhanden. Die GSH/GSSG-Ratio, die wieder über GSH und NADPH regeneriert wird, würde den Schaden nicht zeigen. Würde der Körper zum Beispiel demnach mehr antioxidative Systeme und Kapazitäten im Zuge seiner Nierenerkrankung zulegen, wäre nämlich der Gegenteil der Fall: die Ratio wäre bei dem CKD-Patienten sogar besser als beim Gesunden. Denn der nierengesunde Patient, der vermutlich wenig oxidativen Stress hat, bzw. nur unregelmäßig von oxidativen Stressspitzen übermannt wird, könnte diese zwar ausreichend abfangen, aber eine lange Wiederherstellungsphase des GSH benötigen und somit eine niedrige Ratio anzeigen.

5. Zusammenfassung

Bekanntermaßen sind Gefäßveränderungen eine wesentliche Ursache für Morbidität und Mortalität von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz. Weiterhin spielen oxidative Vorgänge eine wesentliche Rolle bei der Pathogenese der chronischen Niereninsuffizienz. In der vorliegenden Arbeit wurde jetzt untersucht, wie sich die arterielle Gefäßsteifigkeit, gemessen durch nichtinvasive Applanationstonometrie, bei nierengesunden Probanden und Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz unterscheiden. Weiterhin wurde untersucht, ob es bei chronisch niereninsuffizienten Patienten im Vergleich zu den nierengesunden Probanden eine Veränderung der Glutathion/Glutathiondisulfid-Ratio als Ausdruck des gesteigerten oxidativen Stresses gibt.

Die Steifigkeit der großen Gefäße S1 und die Steifigkeit der kleinen Gefäße S2 wurden mit Hilfe der nichtinvasiven Applanationstonometrie bestimmt. Die Steifigkeit der großen Gefäße S1 war nicht signifikant unterschiedlich bei 148 nierengesunden Probanden und 188 Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ($1,28 \pm 0,05$ mmHg/mL vs. $1,14 \pm 0,04$ mmHg/mL; $p=0,06$). Die Steifigkeit der kleinen Gefäße S2 war ebenfalls nicht signifikant unterschiedlich zwischen diesen Gruppen ($32,2 \pm 1,6$ mmHg/mL vs. $29,3 \pm 1,4$ mmHg/mL;

p=0,09). Die Gruppe der nierengesunden Probanden wurde weiterhin in die Untergruppe Kontrollgruppe und arterielle Hypertoniegruppe unterteilt. Das Ergebnis zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen diesen Gruppen für die Steifigkeit der kleinen Gefäße (Kruskal-Wallis Test, p=0,039), ohne dass in Dunn's Multiple Comparison Test ein signifikanter Unterschied zwischen einzelnen Gruppen gefunden werden konnte.

Die Gefäßsteifigkeit wurde ebenfalls an verschiedenen Messpositionen, daß heißt an der Arteria radialis und auch an der Arteria dorsalis pedis, durchgeführt. Bei Messungen von 151 Personen ergab die Bestimmung der arteriellen Steifigkeit der großen Gefäße S1 an der Arteria radialis signifikant größere Werte im Vergleich mit der Bestimmung an der Arteria dorsalis pedis ($1,15 \pm 0,04$ mmHg/mL vs. $0,79 \pm 0,04$ mmHg/mL; $p < 0,0001$). Die Bestimmung der arteriellen Steifigkeit der kleinen Gefäße S2 zeigte ebenfalls signifikant größere Werte an der Arteria radialis im Vergleich mit der Arteria dorsalis pedis ($32,22 \pm 1,78$ mmHg/mL vs. $23,48 \pm 1,23$ mmHg/mL; $p = 0,0004$). Bei dem Vergleich der Glutathion/Glutathiondisulfid-Ratio bei 148 nierengesunden Probanden und 188 Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ergab sich ein grenzwertig signifikanter Unterschied ($3,99 \pm 0,40$ vs. $5,99 \pm 0,64$ arbiträre Einheiten; $p = 0,06$).

Die Arbeit zeigt statistisch grenzwertige Veränderungen von Gefäßsteifigkeit und Glutathion/Glutathiondisulfid-Ratio bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz.

6. Literatur

Anavekar NS, Mc Murray JJV, Velaquez EJ, Solomon SD, Kober L, Rouleau J, White HD, Nordlander R, Maggioni A, Dickstein K, Zelenkofske S, Leimberger JD, Califf RM, Pfeffer MA: Relation between renal dysfunction and cardiovascular outcomes after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2004; 351:1285-95.

Anderson M: Glutathione in Free Radicals, A Praktical Approach, ed. N.A. Punchard and F.J. Kelly Oxford University Press 1996; New York: 213.

Annik M, Zilmer M, Lind L, Linde T, Fellström B. Oxidative stress and endothelial function in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12:2747-2752.

Annik M., Zilmer M., Fellstrom B. Endothelium-dependent vasodilation and oxidative stress in chronic renal failure: impact on cardiovascular disease. *Kidney Int Suppl* 2003; 50-53.

Amann K, Gross M, Ritz E: Pathophysiology underlying accelerated atherogenesis in renal disease: closing in on the target. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15, 1664-6.

Arnett DK, Glasser SP, McVeigh G, Prineas R, Finkelstein S, Donahue R, Cohn JN, Sinaiko A: Blood pressure and arterial compliance in young adults: the Minnesota children's blood pressure study. *Am J Hypertens* 2001; 14(3): 200-5.

Beutelspacher SC: Antioxidative Vitamine (Vitamine C, E und A) in Blut und Leber als indirekte Marker für die Lipidperoxidation bei eisenüberladenen Ratten unter Ethanolexposition. *Med. Diss., Universität Hamburg* 2000.

Blake GJ, Ridker PM. Novel clinical markers of vascular wall inflammation. *Circ Res* 2001; 89: 763-771.

Bowry SK, Kuchinke-Kiehn U, Ronco C: The cardiovascular burden of the dialysis patient: the impact of dialysis technology. *Contrib Nephrol* 2005; 149:230-9.

Carr AC, McCall MR, Frei B: Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:1716-23.

Cockcroft JR, Wilkinson IB: Arterial stiffness and pulse contour analysis: an age old concept revisited. *Clinical Science* 2002; 103: 379-380.

Cohn JN, Finkelstein S, McVeigh G, Morgan D, LeMay L, Robinson J, Mock J: Noninvasive pulse wave analysis for the early detection of vascular disease. *Hypertension* 1995; 26: 503-508.

Cohn JN: Arterial Stiffness, Vascular disease, and risk of cardiovascular events. *Circulation* 2006; 113: 601-603.

Covic A, Goldsmith DJA, Tatomir PG Covic M: Haemodialysis acutely improves endothelium-independent vasomotor function without significantly influencing the endothelium-mediated abnormal response to a β_2 -agonist. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19: 637-643.

Covic A, Haydar AA, Bhamra-Ariza P, Gusbeth-Tatomir P, Goldsmith DJ: Aortic pulse wave velocity and arterial wave reflections predict the extent and severity of coronary artery disease in chronic kidney disease patients. *J Nephrol* 2005; 18:388-396.

Da Ros R, Assaloni R, Ceriello A. Postprandial hyperglycaemia and diabetic complications. *Recenti Prog Med* 2005; 96:436 – 444.

Dringen, R: Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol* 2000; 62: 649.

Ermak G, Davies KJ. Calcium and oxidative stress: from cell signaling to cell death. *Mol Immunol* 2002; Feb;38 (10):713-21.

Fox CS, Larson MG, Keyes MJ, Levy D, Clouse ME, Culeton B, O'Donnell C J: Kidney function is inversely associated with coronary artery calcification in men and women free of cardiovascular disease: the Framingham Heart Study. *Kidney Int* 2004; 66: 2017-21.

Fried LF, Katz R, Sarnak MJ, Shlipak MG, Chaves PHM, Jenny NS, Stehman-Breen C, Gillen D, Bleyer AJ, Hirsch C, Siscovick D, Newman AB: Kidney funktion as a predictor of noncardiovascular mortality. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 3728-3735.

Frei U, Schober-Halstenberg HJ. Nierenersatztherapie in Deutschland. Bericht über Dialysebehandlung und Nierentransplantation in Deutschland 2006/2007. www.QuaSi-Niere.de

Glasser SP, Arnett DK, Mc Veigh GE, Finkelstein SM, Bank AJ, Morgan DJ, Cohn JN: Vascular compliance and cardiovascular disease. A risk factor or a marker. *Am J Hypertens* 1997; 10:1175-1189.

Gibbons GH, Dzau VJ: Mechanisms of Disease: The Emerging Concept of Vascular Remodeling. *N Engl J Med* 1994; 330: 1431-1438.

Gillissen A, Löseke S, Jaworska M, Wickenburg D, Fisseler-Eckhoff A und Schultze-Werninghoff G: Regulative Mechanismen intrazellulärer Antioxidantien in staubexponierten humanen bronchoepithelialen Zellen in vitro und in vivo. *Forschungsbericht* 1999; FZKA-BWPLUS 16.

Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, HSU C: Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med* 2004; 351: 1296-305.

Goldsmith D, Ritz E, Covic A: Vascular calcification: A stiff challenge for the nephrologist. *Kidney Int* 2004; 66: 1315-1333.

Gosslau A, Rensing L: Oxidative stress, age-dependent [correction of age-related] cell damage and antioxidative mechanisms. *Gerontol Geriatr* 2002; Apr; 35(2):139-50.

Griffith OW: Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Analytical Biochemistry* 1980; 106, 207.

Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M: NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 2000; 86: 494-501.

Halliwell B and Gutteridge JM: The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys* 1990; 280, 1-8.

Heinecke JW: Is the emperor wearing clothes? Clinical trials of vitamin E and the LDL oxidation hypothesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21, 1261-4.

Herold G. und Mitarbeiter, *Innere Medizin*, Verlag Arzt+ Information, 2009

Himmelfarb J, Stenvinkel P, Ikizler TA, Hakim RM: The elephant in uremia: oxidant stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia. *Kidney Int* 2002; 62: 1524-1538.

Himmelfarb J, Hakim RM. Oxidative stress in uremia. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2003; Nov;12(6):593-8.

Himmelfarb J: Linking oxidative stress and inflammation in kidney disease: which is the chicken and which is the egg? *Semin Dial* 2004; 17: 449-54.

Himmelfarb J: Relevance of oxidative pathways in the pathophysiology of chronic kidney disease. *Cardiol Clin* 2005; 23: 319-30.

Himmelfarb J: Oxidative stress in hemodialysis. *Contrib Nephrol* 2008; 161: 132-7.

Hypertension Diagnostics Inc. HDI/Pulswave CR-2000 Research CardioVascular Profiling System Operator's Manual. Logan, Minn: Hypertension Diagnostics; 2000

Ivanovski O, Nikolov IG, Drueke BT, Massy AZ: Atherosclerosis and vascular calcification in uraemia -a new experimental model, *Prilozi* 2007; 28, 11-24.

Izzo JL, Shykoff BE: Arterial Stiffness: Clinical Relevance, Measurement, and Treatment. *Hypertension, Rev Cardiovasc Med.* 2001; 2: 29-40.

Kalantar-Zadeh K, Block G, Humphreys MH, McAllister CJ, Kopple JD. A low, rather than a high, total plasma homocysteine is an indicator of poor outcome in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 2004a.; 15: 442-453.

Kalantar-Zadeh K, McAllister CJ, Lehn RS, Liu E, Kopple JD. A low serum iron level is a predictor of poor outcome in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2004b; 43: 671-684.

Kalousova M, Sulkova S, Fialova Loukupova J, Malbohan IM, Spacek P, Braun M, Mikulikova L, Fortova M, Horejsi M, Tesar V, Zima T: Glycooxidation and inflammation in chronic haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18: 2577-81.

Lassègue B, Sorescu D, Szöcs K, Yin Q, Akers M, Zhang Y, Grant SL, Lambeth JD, Griendling KK. Novel gp91 (phox) homologues in vascular smooth muscle cells : nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. *Circ Res* 2001; May 11; 88(9):888-94.

Lassègue B, Griendling KK. NADPH oxidases: functions and pathologies in the vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; Apr; 30(4):653-61.

Leibovitz E, Hazanov N, Zimlichman R, Shargorodsky M, Gavish D: Treatment with Atorvastatin improves small artery compliance in patients with severe hypercholesterolemia. *Am J Hypertens* 2001; 14: 1096-1098.

Locatelli F, Marcelli D, Conte F, D'Amico M, DelVecchio L, Limido A, Malberti F, Spotti D. Cardiovascular disease in chronic renal failure: the challenge continues. *Registro Lombardo Dialisi e Trapianto. Nephrol Dial Transplant* 2000;15: 69-80.

Locatelli F, Marcelli D, Conte F, D'Amico M, Del Vecchio L, Limido A, Malberti F, Spotti D: Survival and development of cardiovascular disease by modality of treatment in patients with end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 2411-2417.

Locatelli F, Covic A, Chazot C, Leunissen K, Luno J, Yaqoob M: Optimal composition of the dialysate, with emphasis on its influence on blood pressure. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19: 785-796.

Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative Stress and Vascular Disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2005; 25:29-38.

Manning TS, Shykoff BE, Izzo JL: Validity and reliability of diastolic pulse contour analysis (Windkessel model) in humans. *Hypertension* 2002; 39: 963-968.

McVeigh GE: Pulse waveform analysis and arterial wall properties. *Hypertension* 2003; 41: 1010-1011.

Miyazaki H, Matsuoka H, Itabe H, Usui M, Ueda S, Okuda S, Imaizumi T. Hemodialysis impairs endothelial function via oxidative stress: effects of vitamin E-coated dialyzer. *Circulation* 2000; 101: 1002-1006.

Mizobuchi M, Towler D, Slatopolsky D. Vascular Calcification: The Killer of Patients with Chronic Kidney Disease. *J. Am. Soc. Nephrol* 2009; Jul 1, 20: 1453-1464.

Morena M, Cristol JP, Dantoine T, Carbonneau MA, Descomps B, Canaud B: Protective effects of high-density lipoprotein against oxidative stress are impaired in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 389-95.

Morena M, Delbosc S, Dupuy AM, Canaud B, Cristol JP. Overproduction of reactive oxygen species in end-stage renal disease patients: a potential component of hemodialysis-associated inflammation. *Hemodial Int.* 2005; Jan; 9(1):37-46.

Neuzil J and Stocker R.: Bilirubin attenuates radical-mediated damage to serum albumin. *FEBS Lett* 1993; 331:281.

Nguyen-Khoa T, Massy ZA, De Bandt JP et al.: Oxidative stress and haemodialysis: role of inflammation and duration of dialysis treatment. *Nephrology, Dialysis, Transplantation* 2001; 16, 335-340.

National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis* 2002; 39:S1–266.

O'Rourke MF, Pauca A, Jiang XJ: Pulse wave analysis. *Br J Clin Pharmacol* 2001; 51: 507-522.

O'Rourke MF, Staessen JA, Vlachopoulos C, Duprez D, Plante GE: Clinical applications of arterial stiffness. *American Journal of Hypertension* 2002; 15: 426-444.

Pannier B, Guérin AP, Marchais SJ, Safar ME, London GM: Stiffness of capacitive and conduit arteries. Prognostic significance for end-stage renal disease patients. *Hypertension* 2005; 45:592-596.

Parfrey PS. Cardiac disease in dialysis patients: diagnosis, burden of disease, prognosis, risk factors and management. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 58-68.

Pickering TG, Devereux RB., James GD., et al.: Environmental influences on blood pressure and the role of job strain. *J Hypertens Suppl* 1996; 14 (5): 179-85.

Pschyrembel Klinisches Wörterbuch, Verlag De Gruyter, 260. Auflage

Richie JP Jr, Skowronski L, Abraham P, Leutzinger Y. Blood glutathione concentrations in a large-scale human study. *Clin Chem* 1996; Jan;42(1):64-70.

Rietzschel ER, Boeykens E, De Buyzere ML, Duprez DA, Clement DL: A comparison between systolic and diastolic pulse contour analysis in the evaluation of arterial stiffness. *Hypertension* 2001; 37: 15-22.

Rubin C, Nolin TD, Himmelfarb J: Are biomarkers useful for assessing cardiovascular risk in patients with chronic kidney disease? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2007; 16: 506-11.

Safar ME, Levy BI, Struijker-Boudier H: Current perspectives on arterial stiffness and pulse pressure in hypertension and cardiovascular diseases. *Circulation* 2003; 107: 2864-2869.

Saran AM, DuBose TD Jr. Cardiovascular disease in chronic kidney disease. *Ther Adv Cardiovasc Dis* 2008; Dec; 2(6):425-34.

Sarnak MJ, Levey AS, Schoolwerth AC et al.: American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. *Circulation* 2003; 108: 2154-2169.

Saw J, Levin A, Gin K. Coronary artery disease in chronic kidney disease patients: assessing the evidence for diagnosis, screening and revascularization. *Can J Cardiol* 2004; 20: 807-813.

Schettler V, Kühn W, Kleinoeder T, Armstrong VW, Oellerich M, Müller GA, Wieland E. No acute impact of haemodialysis treatment on free radical scavenging enzyme gene expression in white blood cells. *J Intern Med* 2003; Feb; 253(2):201-7.

Scott J: Pathophysiology and biochemistry of cardiovascular disease. *Curr Opin Genet Dev* 2004; 14:271-9.

Shanahan C.M.: Mechanisms of vascular calcification in renal disease. *Clin Nephrol*; 63:146-157, 2005

Shanahan C.M.: Vascular calcification--a matter of damage limitation? *Nephrol Dial Transplant* 2006; May; 21(5): 1166-9.

Sigrist M, Bungay P, Taal MW, McIntyre CW: Vascular calcification and cardiovascular funktion in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21: 707-714.

Smith CV, Hansen TN, Martin NE, McMicken HW, Elliott SJ. Oxidant stress responses in premature infants during exposure to hyperoxia. *Pediatr Res* 1993; 34:360.

Stenvinkel P: Inflammatory and atherosclerotic interactions in the depleted uremic patient. *Blood Purif* 2001; 19: 53–61.

Taki, K, Takayama F., Tsuruta Y, Niwa T: Oxidative stress, advanced glycation end product, and coronary artery calcification in hemodialysis patients. *Kidney Int* 2006; 70: 218-24.

Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L: Age - related reduction of NO availability and oxidative stress in humans. *Hypertension* 2001; 38: 274–279.

Tepel M: Oxidative stress: does it play a role in the genesis of essential hypertension and hypertension of uraemia? *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18: 1439-42.

Tietze, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem* 1969; Mar; 27(3):502-22.

Ujhelyi L, Balla G, Jeney V, Varga Z, Nagy E, Vercellotti GM, Agarwal A, Eaton JW, Balla J. Hemodialysis reduces inhibitory effect of plasma ultrafiltrate on LDL oxidation and subsequent endothelial reactions. *Kidney Int* 2006; Jan; 69(1):144-51.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin M. T. D., Mazur M and Telser J: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 44-84.

Vaziri ND, Ni Z, Oveisi F, Liang K, Pandian R. Enhanced nitric oxide inactivation and protein nitration by reactive oxygen species in renal insufficiency. *Hypertension* 2002; 39: 135-141.

Vento M, Asensi M, Sastre J, García-Sala F, Pallardó FV, Viña J. Resuscitation with room air instead of 100% oxygen prevents oxidative stress in moderately asphyxiated term neonates. *Pediatrics* 2001; Apr: 107(4):642-7.

Weber T, Auer Johann, O'Rourke MF, Kvas E, Lassnig E, Berent R, Eber B: Arterial stiffness, wave reflections, and risk of coronary artery disease. *Circulation* 2004; 109: 184-189.

Weber T, O'Rourke MF, Ammer M, Kvas E, Punzengruber C, Eber B.: Arterial stiffness and arterial wave reflections are associated with systolic and diastolic function in patients with normal ejection fraction. Am J Hypertens 2008; 21(11): 1194-202.

Westhoff T.H., Straub-Hohenbleicher H., Basdorf M., van der Giet S., Schmidt S., Offermann G., et al. Time-dependent effects of cadaveric renal transplantation on arterial compliance in patients with end-stage renal disease. Transplantation 2006; 81:1410-1414.

Wilkinson IB, Hall IR, MacCallum H, Mackenzie IS, McEniery CM, van der Arend BJ, Shu Y-E, MacKay LS, Webb DJ, Cockcroft JR: Pulse-wave analysis. Clinical evaluation of noninvasive, widely applicable method for assessing endothelial function. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2002; 22: 147-152.

Wolin MS: Interactions of oxidants with vascular signaling systems. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000; 20: 1430-1442.

Woodman RJ, Kingwell BA, Beilin LJ, Hamilton SE, Dart AM, Watts GF: Assessment of central and peripheral arterial stiffness: studies indicating the need to use a combination of techniques. Am J Hypertens 2005; 18: 249-260.

www.quasi-niere.de/deutsch/bericht/04

www.Robert-Koch-Institut.de

www.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=1418. Beitrag erschien in Ausgabe 24/2006; Oxidativer Stress: Apothekenrelevante Messmethoden von Gunter P. Eckert, Tanja Wegat und Sebastian Schaffer, Frankfurt am Main, Steffen Theobald, Freiburg, und Walter E. Müller, Frankfurt am Main

Zalba G, Beaumont FJ, San Jose G, Fortuno A, Fortuno MA, Etayo JC, Diez J. Vascular NADH/NADPH oxidase is involved in enhanced superoxyde production in spontaneously hypertensive rats. Hypertension 2000; 35: 1055-1061.

Zakharieva S: Arterial hypertension and obesity- a dangerous combination. Vutr Boles 1990; 31: 28-32.

Grafikadresse:

Grafik 1: www.pharmazeutische-zeitung.de/uploads/pics/titel062401.JPG

Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. M. Tepel möchte ich ganz besonders danken für die Überlassung des Themas, seine Betreuung, seine Geduld und Motivation.

Des Weiteren möchte ich mich sehr herzlich bei Frau Dr. med. A. Scholze für die Betreuung, intensive Hilfe (auch über Ländergrenzen hinweg) und Geduld bei sowohl technischen Fragen als auch Fragen der Auswertung bedanken.

Besonderer Dank gilt meinem Mann Matthias, meiner Familie und meinen Freunden, die mich über die Jahre unterstützt und immer wieder motiviert haben.

Lebenslauf

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

Erklärung

„Ich, Rachel Karge, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Die Glutathion/Glutathiondisulfid-Ratio als Hinweis von oxidativem Stress und nichtinvasive Gefäßmessung zur Ermittlung der arteriellen Gefäßeigenschaften bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift