

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

DISSERTATION

Nachweis von oxidativem Stress bei Hämodialyse Patienten

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Kathrin Koch

aus Neustrelitz

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. M. Tepel

2. Prof. Dr. med. W. M. Kübler

3. Priv.-Doz. Dr. med. B. Henning

Datum der Promotion: 29.06.2009

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung und Fragestellung.....	1
1.1 Einleitung.....	1
1.1.1 Hämodialyse.....	1
1.1.1.1 Ablauf der Hämodialyse.....	5
1.1.2 Kardiovaskuläre Mortalität bei Dialysepatienten.....	7
1.1.3 Oxidativer Stress.....	11
1.1.3.1 Reaktive Sauerstoffspezies.....	11
1.1.3.2 Stickstoffmonoxid.....	11
1.1.4 Auswirkungen des oxidativen Stresses.....	12
1.1.4.1 Arteriosklerose.....	14
1.1.5 Antioxidantien.....	15
1.1.5.1 Enzymatische Antioxidantien.....	15
1.1.5.2 Nicht-Enzymatische Antioxidantien.....	16
1.1.6 Rhodanese.....	19
1.1.7 Antioxidative Therapieversuche.....	21
1.1.8 Plasma versus Serum.....	22
1.2 Fragestellung.....	23
2 Material und Methoden.....	24
2.1 Material.....	24
2.1.1 Chemikalien.....	24
2.1.2 Antikörper für Immunfluoreszenz.....	24
2.1.3 Verbrauchsmaterialien.....	25
2.1.4 Kits.....	25
2.1.5 Geräte.....	25
2.2 Methoden.....	26
2.2.1 Aufbereitung der Blutproben.....	26
2.2.1.1 Serum.....	26
2.2.1.2 Plasma.....	26
2.2.1.3 Monozytenisolierung.....	26
2.2.2 Total Antioxidant Status Assay.....	27
2.2.3 Fluoreszenzphotometrie.....	29
2.2.4 Immunodetektion.....	30
2.2.4.1 In-Cell Western.....	32
2.3 Patientencharakterisierung bei der Rhodanesebestimmung.....	34
2.3.1 Kontrollgruppen.....	37
2.4 Datenverarbeitung und Statistik.....	38
3 Ergebnisse.....	39
3.1 Totale Antioxidative Kapazität TAC.....	39

3.1.1 Vergleich Plasmaproben mit Serumproben.....	39
3.1.2 Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.....	40
3.1.3 TAC vor und nach der Hämodialyse / Vergleich mit der Kontrollgruppe.....	41
3.1.4 Veränderungen während der Hämodialyse.....	45
3.1.5 Regressionsanalyse.....	46
3.1.5.1 TAC und klinische Chemie.....	46
3.1.5.2 TAC und weitere Daten.....	49
3.1.5.3 TAC und Vitamine.....	50
3.2 In-Cell Western.....	53
3.2.1 Rhodanese.....	53
3.2.1.1 Veränderungen durch die Dialyse.....	53
3.2.1.2 Vergleich der Hämodialyse-Patienten mit den Kontrollgruppen.....	54
3.2.1.3 Regressionsanalyse.....	56
3.2.2 nNOS.....	59
3.2.2.1 Veränderungen durch die Dialyse und Vergleich mit gesunden Kontrollpersonen.....	59
3.2.2.2 Regressionsanalyse.....	62
3.2.3 SOD1, SOD2, GPx.....	64
3.2.3.1 Veränderungen durch die Dialyse und Vergleich mit gesunden Kontrollpersonen.....	64
3.2.3.2 Regressionsanalyse.....	69
3.3 Fluoreszenzmessungen.....	74
3.3.1 Vergleich der Hämodialyse-Patienten mit der Kontrollgruppe.....	74
3.3.2 Regressionsanalyse.....	76
4 Diskussion.....	79
4.1 Oxidativer Stress bei Hämodialysepatienten.....	79
4.1.1 Totale Antioxidative Kapazität TAC.....	79
4.1.2 Antioxidative Enzymsysteme.....	85
4.1.2.1 Rhodanese.....	85
4.1.2.2 nNOS.....	89
4.1.2.3 SOD1, SOD2, GPx.....	91
4.1.3 Fluoreszenz.....	93
5 Zusammenfassung.....	96
6 Abkürzungsverzeichnis.....	97
7 Abbildungsverzeichnis.....	99
8 Literaturverzeichnis.....	104
9 Danksagung.....	114
10 Tabellarischer Lebenslauf.....	115
11 Erklärung.....	116

1 Einleitung und Fragestellung

1.1 Einleitung

1.1.1 Hämodialyse

Hämodialyse (HD) ist ein Blutreinigungsverfahren, bei dem das Blut der niereninsuffizienten Patienten extrakorporal, das heißt außerhalb des Körpers, von urämischen Substanzen gereinigt wird.

In Deutschland beträgt die Prävalenz der chronischen Nierenersatztherapie im Jahre 2006 (Stichtag 31.12.2006) 91.718 Patienten (1.114 Patienten pro 1 Million Einwohner). Davon sind 66.508 Patienten (808 Patienten pro eine Million Einwohner) Dialysepatienten, wobei das am häufigsten angewendete Dialyseverfahren mit 63.307 Patienten die Hämodialyse ist. Die Inzidenz liegt bei 213 Patienten pro 1 Million Einwohner. Die Zahl der chronisch dialysepflichtigen Patienten ist in den vergangenen Jahren deutlich gestiegen. In den Jahren von 1997 bis 2006 stieg die Prävalenz im Durchschnitt um 4,4 % und die Inzidenz um 5,1 % jährlich. [Frei; Halstenberg2006]

Für die Dialysepflicht verantwortlich, ist die akute und chronische Niereninsuffizienz, wobei letztere Hauptthema dieser Arbeit sein soll.

Die chronische Niereninsuffizienz (end stage renal disease, ESRD) ist irreversibel und führt dazu, dass die Patienten dauerhaft auf eine Nierenersatztherapie angewiesen sind.

Das Maß für die Nierenfunktion ist die glomeruläre Filtrationsrate (GFR). Diese kann durch Messung der Serum Kreatinin Konzentration mit Hilfe der verkürzten MDRD-Formel und der Cockcroft-Gault Formel bestimmt werden. Die GFR gibt das Gesamtvolumen des Primärharns an, das von den Glomerulie beider Nieren in einer bestimmten Zeiteinheit gefiltert wird. Der Normalwert ist abhängig von Alter, Geschlecht und Körpergröße und liegt bei jungen Erwachsenen zwischen 120 und 130 ml/min/1,73m². Im Alter von 70 Jahren liegt der Normalwert nur noch bei ca. 70 ml/min/1,73m². Wenn die GFR dauerhaft unter 60 ml/min/1,73m² sinkt, dass heißt die Nierenfunktion unter 60 % der Norm abgefallen ist, liegt eine chronische Niereninsuffizienz vor.

Die chronische Niereninsuffizienz wird gemäß der National Kidney Foundation (NKF) mit Hilfe der GFR in 5 Stadien eingeteilt [Meguid_EI_Nahas2005]:

Stadium I:

Nierenerkrankung mit normaler Nierenfunktion (GFR >89 ml/min/1,73m²)

Stadium II:

Nierenerkrankung mit milder Funktionseinschränkung (GFR 60-89 ml/min/1,73m²)

Stadium III:

Nierenerkrankung mit moderater Funktionseinschränkung (GFR 30-59 ml/min/1,73m²)

Stadium IV:

Nierenerkrankung mit schwerer Funktionseinschränkung (GFR 15-29 ml/min/1,73m²)

Stadium V:

chronisches Nierenversagen/Urämie (GFR <15 ml/min/1,73m²)

Im Stadium 5, dem Stadium der Urämie, muss, um das Überleben des Patienten zu sichern, mit einer entsprechenden Nierenersatztherapie (Hämodialyse, Peritonealdialyse, Nierentransplantation) begonnen werden. [NKF_KDOQITM]

Urämie, aus dem griechischen stammend, bedeutet Harnvergiftung oder wörtlich „Harn im Blut“. Das bedeutet, dass die harnpflichtigen Substanzen nicht mehr genügend über die Niere ausgeschieden werden können und deren Konzentration im Blut ansteigt. Unter Urämietoxinen versteht man stickstoffhaltige Substanzen, die für die Symptome der Urämie (Pruritus, Enterokolitis, Nausea, Gastritis, Dyspnoe, Hyperkaliämie, Encephalopathie, Lungenödem) verantwortlich gemacht werden. Dazu gehören zum Beispiel: Harnstoff, Kreatinin, Harnsäure, Hippursäure, Cyanat, AGE (advanced glycosylation endproducts), Homocystein, Stickstoffmonoxid (NO), Parathormon, Phenole, Granulozyteninhibierende Proteine (GIP I und II). Die Urämietoxine mit einer niedrigen bis mittleren molaren Masse lassen sich teilweise durch das Verfahren der Dialyse entfernen und damit die Symptome lindern. [Baenkler_et_al]

Es gibt eine Reihe von Ursachen für die chronische Niereninsuffizienz und dem folgenden terminalen Nierenversagen. Betrachtet man die im Jahre 2006 erfassten Dialysepatienten, liegt der Diabetes mellitus Typ I und II als ursächliche Grunderkrankung mit insgesamt 28 % an erster Stelle. (Abbildung 1) Die Diagnoseverteilung, beobachtet über den gesamten Erhebungszeitraum (seit 1995) zeigt, dass der Diabetes mellitus im Laufe der Jahre als Grunderkrankung immer mehr an Bedeutung gewonnen hat, sich aber in den letzten Jahren auf einem relativ stabilen hohen Niveau einstellt. An zweiter Stelle hat bei den im Jahre 2006 neu entdeckten niereninsuffizienten Patienten die Gruppe der vaskulären Nephropathien den Platz der zweithäufigsten Diagnosen eingenommen und damit die Glomerulonephritis abgelöst. (Abbildung 2) Auffällig dabei ist, dass die vaskulären Nephropathien (in diese Gruppe gehört die arterielle Hypertonie) vor allem in der Altersklasse der über 70jährigen überdurchschnittlich häufig auftrat. Weitere Ursachen sind Systemerkrankungen, Zystennieren, interstitielle und hereditäre Erkrankungen. Oft ist auch keine auslösende Ursache eruierbar. [Frei; Halstenberg2006; Pastan1998]

Einleitung und Fragestellung

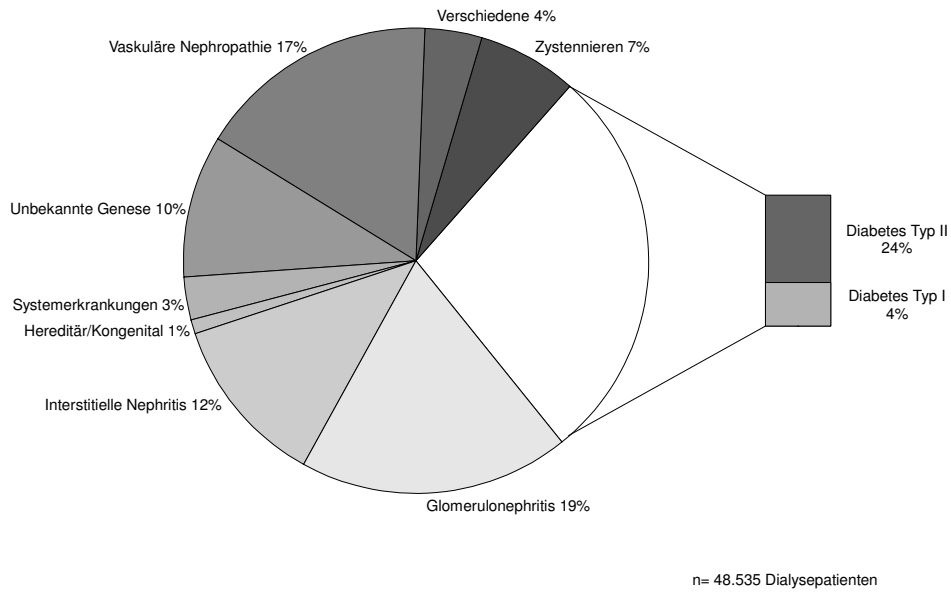


Abbildung 1: Diagnoseverteilung aller erfassten lebenden Dialysepatienten (Prävalenz) im Jahr 2006. [Frei; Halstenberg2006]

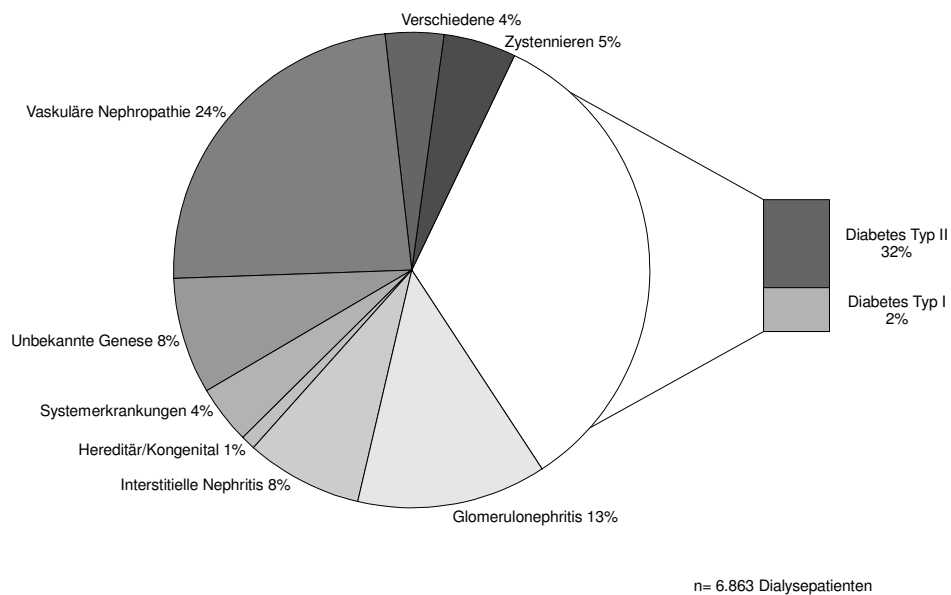


Abbildung 2: Diagnoseverteilung der Patienten bei Therapiebeginn (Inzidenz) im Jahr 2006. [Frei; Halstenberg2006]

Die chronische Niereninsuffizienz ist eine Erkrankung, „so alt wie die Menschheit selbst“ Schon im Mittelalter wurde versucht, die Urämie durch Schwitzkuren, Aderlasse oder Einläufe zu behandeln. [Fresenius_medical_Care2005].

Die physikalischen Prozesse wie Osmose und Diffusion, die Grundlagen auf denen die heutigen Behandlungsverfahren des Nierenversagens beruhen, wurden bereits 1855-1861 von Graham und Fick erarbeitet. 1913 haben Abel und seine Mitarbeiter erstmals die Dialyse an Tieren durchgeführt. 1924 dialysierte Georg Haas den ersten Patienten mit chronischem Nierenversagen. Nach dem er in den darauf folgenden Jahren bis 1928 weitere sechs Patienten dialysierte von denen jedoch niemand überlebte, gelang es dem Niederländer Willem Kolff 1945 die erste erfolgreiche Dialysebehandlung mit einer von ihm entwickelten Trommelniere durchzuführen. Der Kolff'schen Trommelniere folgte ein modifizierter Dialysator von Alwall, der die Kombination aus Dialyse und Ultrafiltration möglich machte. In den folgenden Jahren gab es umfangreiche Arbeiten auf dem Gebiet zur Weiterentwicklung der künstlichen Niere. So entstanden im Jahre 1948 der Skegg-Leonards-Dialysator , ein Parallel-Fluss-Dialysator, und 1960 der Kiil-Dialysator.

Die heute üblichen Hohlfaserdialysatoren wurden im Jahre 1964 durch den Amerikaner Richard Stewart entwickelt.

Parallel zu den technischen Entwicklungen der Dialysatoren gelang 1960 mit dem „Scribner-Shunt“ der Durchbruch auf dem Gebiet des Gefäßzuganges. Damit konnten die für die Behandlung notwendigen Blutmengen vom Patienten bereitgestellt und die Dialyse als Dauertherapie genutzt werden. 1966 wurde die „arterio-venöse Cimino Fistel“ eingeführt, welcher heute der Gefäßzugang der Wahl ist. [Fresenius_medical_Care2005]

Schon im Jahre 1974 war die anfängliche Euphorie über die Errungenschaften in der Therapie chronisch niereninsuffizienter Patienten vorbei. Lindner und seine Mitarbeiter untersuchten das Überleben der ersten 39 Patienten, die eine Erhaltungsdialyse bekommen haben und fanden heraus, das diese Patienten ein übermäßig hohes Risiko hatten, an kardiovaskulären Komplikationen zu erkranken und zu versterben [Lindner1974]. Lindner selbst hat aus Angst davor, das die Menschen nun davor zurück schrecken könnten die lebensrettende Therapie der Dialyse anzunehmen, 6 Monate gewartet, ehe er seine Studie publizierte. Doch letztendlich überwog bei ihm die Hoffnung, das seine Arbeit andere Wissenschaftler dazu anregen würde, weitere Forschungen zu unternehmen um die Pathogenese dieser erhöhten Morbidität und Mortalität zu ergründen und spezifische präventive Maßnahmen zu finden. [Fresenius_medical_Care2005]

1.1.1.1 Ablauf der Hämodialyse

Bei der Hämodialyse wird das Blut mittels eines Dialysegerätes durch einen Dialysator (Filter) gepumpt und anschließend wieder zum Patienten zurückgeführt. Es handelt sich um ein extrakorporales Verfahren. Im Filter durchläuft das Blut sehr dünne Kapillaren mit einer semipermeablen Membran.

Um zu verhindern, dass das Blut während der Passage durch die Schläuche der Dialysemaschine gerinnt, wird das Blut heparinisiert. Es fließt mit ca. 250-350 ml/min entlang einer semipermeablen Membran. Eine Spülflüssigkeit auf der anderen Seite fließt mit ca. 500-800 ml/min in die entgegengesetzte Richtung (Gegenstromprinzip). Während der Dialyse kommt es zu einer Diffusion von gelösten Stoffen zwischen dem Blut des Patienten und der Spülflüssigkeit, dem sogenannten Dialysat, entlang eines Konzentrationsgefälles. Dadurch werden aus dem Blut Abfallprodukte des Stoffwechsels (Harnstoff, Kreatinin, etc.) entfernt. Die giftigen Stoffe treten über die Poren der Membran in das Dialysat über, welches mit einer höheren Geschwindigkeit die Stoffe abtransportiert. (Abbildung 3) Die Harnstoffclearance bestimmt dabei die Reduktion der Blut-Harnstoff-Stickstoff Konzentration (BUN=blood urea nitrogen), die nach einer drei bis vier stündigen Behandlung bei ca. 65 bis 70 % liegt. Die Harnstoffclearance ist abhängig von der Oberfläche des Dialysates, der Permeabilität der Membran, der Zusammensetzung der Spülflüssigkeit und den eingestellten Druckwerten. Die Spülflüssigkeit besteht aus gereinigtem Wasser und gelösten Stoffen. Aus der Spülflüssigkeit gelangen Nährstoffe, Salze, Glukose und Bikarbonat in das Blut des Patienten wodurch der Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushalt ausgeglichen und der Blutzuckerspiegel konstant gehalten werden kann. Da auch andere, nicht giftige Stoffe, wie zum Beispiel Vitamine, aus dem Blut entfernt werden, müssen diese dem Körper anschließend wieder zugeführt werden. Blutzellen und wichtige Proteine verbleiben dagegen im Blut.

Damit während dieses Vorganges kein Wasser aus der Dialyseflüssigkeit in die Blutbahn gelangt, wird ein Unterdruck erzeugt. Auf diese Weise kann durch das Regulieren der Höhe des Unterdrucks geregelt werden, wieviel Flüssigkeit dem Blut entzogen wird um überschüssige Körperflüssigkeit zu entfernen und damit die natürliche diuretische Funktion der Niere zu ersetzen.

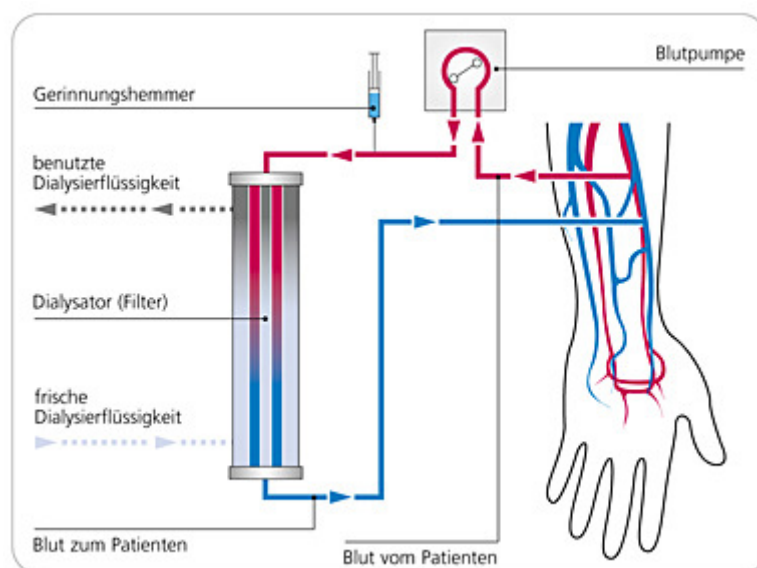


Abbildung 3: Aufbau und Ablauf der Hämodialyse.[Fresenius_medical_Care2005]

Da für die Hämodialyse eine größere Menge Blut notwendig ist, ist es erforderlich durch einen operativen Eingriff eine Kurzschlussverbindung („shunt“) zwischen einer Arterie (meist Arteria radialis) und einer Vene (meist Vena cephalica), eine sogenannte arterio-venöse Fistel (Cimino-Fistel), zu schaffen. Dadurch durchströmt das Blut die Vene mit einem höheren Druck und einer höheren Fließgeschwindigkeit. [Berufsverband_Deutscher_Internisten; Pastan1998; Fresenius_medical_Care2005]

Die Qualität der Hämodialyse ist abhängig von der Dauer der Dialysetherapie, von der Dialysatoroberfläche, der verwendeten Membran, dem Blutfluss und vor allem von individuellen Faktoren. Um die Effektivität der Dialyse, anders ausgedrückt, die Dialyседosis quantitativ zu erfassen, nutzt man die Harnstoff-Reduktions-Rate (urea-reduction-ratio, URR). Sie ergibt sich aus 1 minus dem Quotienten aus der Reduktion des Harnstoffes während der Dialyse (Harnstoffkonzentration nach der Dialyse durch die Harnstoffkonzentration vor der Dialyse), als prozentualer Wert. Weiterhin berechnet man die Kt/V. Kt/V ist ein dimensionsloser Index, der sich errechnet aus K, der Harnstoff Clearance des Dialysators in ml/min, t, der Behandlungszeit in Minuten und V, dem Verteilungsvolumen des Harnstoffes in ml, welches dem Körperwasser entspricht. [Pastan1998; Owen1998; Mallick1999]

Eine Kt/V von mindestens 1,0 pro Behandlung und eine URR von 65 % sind minimaler Standard. Geringere Werte sind mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität verbunden. [Pastan1998; Owen1993; Owen1998; Chertow1999] Dabei bleiben aber zum größten Teil die individuellen Komorbiditäten der Patienten unberücksichtigt. Andere Studien haben gezeigt, dass eine weitere Erhöhung der Kt/V über 1,3 oder der URR über 70 % nicht zu einer steigenden Überlebensrate führt [Held1996], dass eine weitere Steigerung sogar mit einer Anhebung der Mortalitätsrate verbunden ist, da nun eine Reihe anderer individueller Risikofaktoren ausschlaggebend sind. [McClellan1998; Chertow1999].

1.1.2 Kardiovaskuläre Mortalität bei Dialysepatienten

Dialysepatienten haben ein erhöhtes Risiko an arteriosklerotisch bedingten kardiovaskulären Ereignissen zu erkranken beziehungsweise daran zu versterben. [Shah2008; Petrović2008; Ivanovski2007; Saran2008; Lindner1974; Himmelfarb2005; Taki2006; Foley1998; Stenvinkel1999; Amann2004; Anavekar2004; Pastan1998; Pawlak2005; Bolton2001]

Trotz der immer weiter anhaltenden technischen Verbesserungen des Dialyseverfahrens und der Fortschritte in der Behandlung und Betreuung chronisch niereninsuffizienter Patienten, ist nach wie vor eine Steigerung der Mortalität zu verzeichnen.

Im Jahr 2006 sind 12.124 erwachsene Dialysepatienten verstorben. Im Jahre 2005 waren es noch 11.071 Patienten. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt mit 50 % nur knapp unter der für maligne Tumorerkrankungen, die mit 55 % angegeben wird (Robert-Koch-Institut) [Pastan1998]. Die mit Abstand häufigsten Todesursachen der verstorbenen Patienten sind kardiovaskuläre Erkrankungen in 51,5 % der Fälle, gefolgt von Infektionen in 17,8 % der Fälle. Malignome und weitere Ursachen, wie der Abbruch der Dialysebehandlung, gehören ebenfalls zu den Todesursachen der Dialysepatienten (Abbildung 4). [Frei; Halstenberg2006; Himmelfarb2004; Himmelfarb2005; Anavekar2004; Bayes2006]

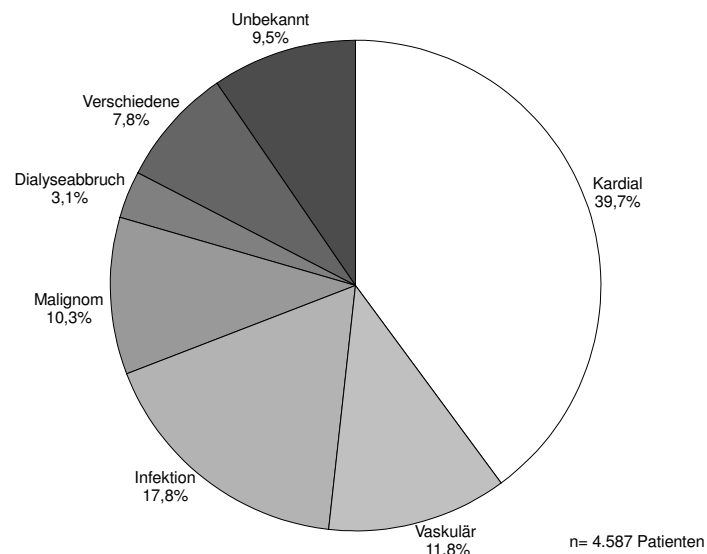


Abbildung 4: Todesursachen der im Jahr 2006 verstorbenen Patienten. [Frei; Halstenberg2006]

Das kardiovaskuläre Erkrankungen die Haupttodesursache in der Normalbevölkerung sind, ist seit langem bekannt. Daher ist es auch nicht ungewöhnlich, dass dies auch für Dialysepatienten zutrifft. Ungewöhnlich ist jedoch, dass die kardiovaskuläre Mortalität bei Dialysepatienten um das 10- bis 30fache im Vergleich zur Normalbevölkerung erhöht ist [Taki2006; Himmelfarb2002]. Selbst mit Altersstandardisierung ist das Risiko immer noch 5 mal größer [Sarnak2003; Himmelfarb2002]. In einigen

Arbeiten wird bei jungen Dialysepatienten unter 45 Jahren gar von einer bis zu 100 mal höheren Mortalität berichtet [Foley1998; Baigent2000].

Über die Hälfte aller Dialysepatienten sieht sich im Krankheitsverlauf mit kardiovaskulären Erkrankungen (cardiovascular disease, CVD) konfrontiert. Dazu gehören die koronare Herzkrankheit, der Schlaganfall, die periphere arterielle Verschlusskrankheit sowie der Herzinfarkt [Bowry2005].

In Untersuchungen wurde festgestellt, dass mit nachlassender glomerulärer Filtrationsrate es vermehrt zu vor allem schwerwiegenden kardiovaskulären Ereignissen (Tod, Reinfarkte, Herzinsuffizienz, Reanimation nach Herzstillstand) kommt. Des Weiteren ist die Mortalität nach einem Herzinfarkt im ersten und zweiten Jahr nach dem Infarkt mit 59 % und 73 % wesentlich höher als bei Myokardinfarktpatienten der Normalbevölkerung [Sarnak2003]. Selbst eine geringgradige Nierenschädigung muss bei diesen Patienten als ein Hauptrisikofaktor für kardiovaskuläre Komplikationen angesehen werden [Anavekar2004; Go2004; Fox2004; Baigent2000; Amann2004], was angesichts der hohen Zahl an Patienten mit leichten Nierenfunktionseinschränkungen ein enormes Problem für das Gesundheitswesen darstellt.

Als Gründe für die bei Dialysepatienten auftretenden vermehrten arteriosklerotischen Gefäßveränderungen, die zu einer beschleunigten Gefäßalterung und damit zu kardiovaskulären Erkrankungen führen, werden sowohl traditionelle Risikofaktoren wie Alter, Rauchen, Hypertonie, Dyslipoproteinämie, Diabetes und positive Familienanamnese als auch nicht-traditionelle, spezifische Risikofaktoren angegeben. [Nguyen-Khoa2001; Sarnak2003; Bayes2006; Pawlak2006; Rubin2007]

Der Begriff traditionell wurde deshalb gewählt, weil diese Faktoren schon seit vielen Jahren das Risiko einer beschleunigten Arteriosklerose in der Gesamtbevölkerung erhöhen.

Da die Rate der kardiovaskulären Mortalität jedoch überproportional hoch ist, als dass sie allein durch diese üblichen oben genannten traditionellen Risikofaktoren erklärt werden könnte, rücken nun zunehmend die nicht-traditionellen Risikofaktoren in den Fokus. Diese haben für Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz eine bessere voraussagende Kraft, da sie stark mit der erhöhten Mortalität korrelieren. Zu den nicht-traditionellen Risikofaktoren gehören Hyperfibrinogenämie, Hyperhomozysteinämie, Anämie, endotheliale Dysfunktion, chronische Entzündung mit erhöhtem C-reaktives Protein, Unterernährung sowie insbesondere oxidativer Stress. [Sarnak2003, Anavekar2004; Nguyen-Khoa2001; Bayes2006; Wanner2001; Himmelfarb2004; Himmelfarb2005; Becker1997; Amann2004; Stenvinkel1999; Boaz2001; Vaziri2004; Shah2008; Rubin2007; Himmelfarb2008]

Man geht davon aus, dass oxidativer Stress, chronische Entzündungsreaktionen bzw. ein systemischer Mikroinflammationsprozess sowie endotheliale Dysfunktion bei der Arterioskleroseentstehung entscheidend sind und in einem kausalen Zusammenhang stehen [Himmelfarb2005; Amann2004; Taki2006; Stenvinkel1999].

Begründet wird dies unter anderem durch das Vorliegen von Entzündungszellen und -mediatoren in arteriosklerotischen Plaques sowie laborchemisch erhöhtem C-reaktiven Protein (CRP). Dies gilt für die niereninsuffizienten Patienten genau wie für die Allgemeinbevölkerung [Ross1999; Dikow; Kalantar-Zadeh2006].

In einer Reihe von Studien [Oberg2004; Bolton2001; Jung2004] wurde bei ESRD Patienten eine hohe Prävalenz von erhöhten Entzündungsmarkern (CRP, Il-6) sowie erhöhte Marker von oxidativem Stress nachgewiesen [Oberg2004; Himmelfarb2005; Amann2004].

Dabei handelte es sich um Patienten in einem geringeren Stadium der chronischen Niereninsuffizienz bis hin zu Dialysepatienten. Es ist jedoch weder geklärt, ob CRP bei ESRD Patienten nur ein Marker für kardiovaskuläre Erkrankungen ist oder selber eine aktive auslösenden Rolle spielt, noch ob der erhöhte oxidative Stress die erhöhte Entzündungsreaktion zur Folge hat oder der Entzündungsstatus auslösend für erhöhten oxidativen Stress ist [Himmelfarb2004; Himmelfarb2002].

Bei Dialysepatienten gibt es folgende Erklärungsansätze für diesen Zusammenhang.

Während der Dialyse kommt es immer wieder zur Auseinandersetzung des Organismus mit der Dialysemembran und den Endotoxinen des Dialysates. Dadurch kommt es zur chronischen Stimulation von Monozyten und Makrophagen und den bei HD-Patienten erhöhten CRP-Werten [Morena2005; Pupim2004; Nguyen-Khoa2001; Becker1997]. Durch die während der Hämodialyse entstehenden Interleukine und Anaphylatoxine kommt es zur Aktivierung der NADPH-Oxidase und damit wiederum, wird die Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Superoxidanionen katalysiert, die dann rasch durch die Superoxiddismutase in Hydrogenperoxid (H_2O_2) umgewandelt wird.

Das belegt die direkte Verbindung zwischen der Entzündungsreaktion und der Entstehung von oxidativem Stress bei Dialysepatienten [Descamps-Latscha2001].

Weitere mögliche Gründe für erhöhten oxidativen Stress bei Dialysepatienten sind zum einen die Urämietoxine sowie Urämie bedingten Faktoren, die das Anlocken von Leukozyten zur ROS-Produktion (reaktive Sauerstoffspezies) fördern. Außerdem spielt die Schädigung der antioxidativen Abwehrmechanismen (Glutathion/Glutathion-Peroxidase-Komplex, Superoxiddismutase-Aktivität, NO-System) [Paul1993], sowie der Verlust von Antioxidantien während der Dialyse durch die hohe Permeabilität der Membranen eine wichtige Rolle. [Koenig1997; Morena2005; Droge2002; Himmelfarb2008]

Ebenfalls eine wichtige Rolle im Arterioskleroseprozess spielen zirkulierende Blutzellen, vor allem Monozyten. MCP-a (Monocyte chemoattractant protein), ein Zytokine, das für die Rekrutierung von mononukleären Zellen in atherosklerotischen Plaques verantwortlich ist, sowie VEGF (vascular endothelial growth factor) welches die Migration und Akkumulation von Monozyten in Plaques erhöht, sind bei HD Patienten in erhöhtem Maße gefunden worden und korrelieren mit dem vorliegenden oxidativen Stress. [Pawlak2004]

In einer sehr umfangreichen Arbeit von Himmelfarb2002 „The elephant in uremia“ vertreten die Autoren die Hypothese, dass oxidativer Stress eine der hauptverantwortlichen Ursachen der erhöhten kardiovaskulären Mortalität bei Urämiepatienten ist. Gestützt wird diese Annahme durch Studien, die eine erhöhte oxidative Belastung bei niereninsuffizienten Patienten sowohl vor als auch nach Beginn einer Nierenersatztherapie festgestellt haben. Des weiteren wird in dieser Arbeit ein Bezugssystem geschaffen, in welchem eine Verbindung zwischen dem oxidativen Stress, der chronischen Entzündungsreaktion, der Malnutrition mit dem daraus resultierenden erniedrigten Albuminspiegel und einer eventuell begonnen

Nierenersatztherapie dargestellt wird. Es zeigt sich, dass alle weiteren Cofaktoren, die als nicht-traditionelle Risikofaktoren eingestuft wurden, letztendlich in eine weitere Erhöhung des oxidativen Stresses münden.

Wichtigstes Ziel bleibt weiterhin der Entstehung der chronische Niereninsuffizienz von vornherein vorzubeugen. Doch es werden auch dringend effektive Interventionen gebraucht, um die überproportionale kardiovaskuläre Mortalität, die diese Patienten tragen müssen, zu reduzieren [Go2004].

Ziel sollte es nicht nur sein, jede mögliche Determinante der Arterioskleroseentstehung und erhöhten kardiovaskulären Mortalität bis ins Detail zu eruieren, es würde für die betroffenen Patienten ein viel größerer Gewinn sein, wenn das Gesamtrisiko, durch das Erarbeiten von effektiven Behandlungsmethoden der uns bekannten Risikofaktoren, gesenkt werden könnte [Baigent2000]. Aus vielen großen Studien werden Patienten mit Nierenerkrankungen weiterhin ausgeschlossen. Oft erhalten weder Patienten mit ESRD noch diejenigen mit Nierenschädigungen in geringeren Stadien eine entsprechende kardiovaskuläre Medikation oder Intervention (Koronarrevaskularisation) zur Risikominimierung [Anavekar2004].

1.1.3 Oxidativer Stress

Als einer der wichtigsten und umfangreichsten Risikofaktoren der erhöhten kardiovaskulären Mortalität bei Dialysepatienten, soll in dieser Arbeit speziell auf den oxidativen Stress eingegangen werden.

Oxidativer Stress liegt dann vor, wenn das Gleichgewicht zwischen oxidativen und reduktiven Reaktionen in Richtung der oxidativen Prozesse verschoben ist. [Himmelfarb2005; Taki2006; Valko2007; Himmelfarb2008]

1.1.3.1 Reaktive Sauerstoffspezies

Oxidative Prozesse laufen hauptsächlich in den Mitochondrien ab. Die dortige Cytochromoxidase ist verantwortlich für die Umwandlung von 90 % des Sauerstoffs beim Menschen. Dieses Enzym besteht aus 4 Redoxsystemen, die jedes ein Elektron speichern und übertragen. Dabei werden 2 Moleküle Wasser gebildet. Wenn alle Redoxsysteme reduziert sind, werden durch einen Zwischenschritt alle 4 Elektronen auf einmal auf ein Sauerstoffmolekül übertragen, um dadurch die Produktion von reaktiven Zwischenprodukten zu minimieren. Trotzdem kommt es in 1-2 % der Fälle zur Bildung freier Radikale, die nach Diffusion aus den Mitochondrien eine Quelle für oxidativen Stress darstellen. [Himmelfarb2002; Himmelfarb2005; Droge2002]

Bei freien Radikalen handelt es sich um Atome oder Moleküle, die ein oder mehrere ungepaarte Elektronen besitzen und daher eine starke Tendenz haben, von einem potentiellen Reaktionspartner ein Elektron zu extrahieren um eine höhere Stabilität zu erreichen [Droge2002].

Es handelt sich um Sauerstoffderivate die auch unter dem Begriff reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zusammengefasst werden. ROS werden für die Pathogenese einer Reihe von Erkrankungen (Arteriosklerose, Tumorerkrankungen, Sepsis, Niereninsuffizienz, Morbus Alzheimer, etc.) mitverantwortlich gemacht [Tepel2002]. Wichtigste Quelle der ROS scheint hierbei die mitochondriale NADPH-Oxidase zu sein [Mohazzab1994; Griendling2000].

Die wichtigsten Radikale sind Hydroxyl-Radikale ($\text{OH}\cdot$), Superoxid-Radikale ($\text{O}_2\cdot^-$) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Des weiteren sind noch folgende Sauerstoffradikale bekannt: Peroxyl-Radikale, Alkoxy-Radikale und Phenoxy-Radikale.

Bis zu einem gewissen Ausmaß kommt es aber auch zu einer gezielten ROS-Produktion bei der Abwehr von Mikroorganismen im Rahmen des sogenannten „Oxidativen Burst“. Hierbei kommt es durch die NADPH-Oxidase in Leukozyten zur Bildung reaktiver Produkte. [Himmelfarb2005]

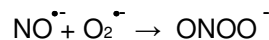
1.1.3.2 Stickstoffmonoxid

Zur Gruppe der ROS werden auch Stickstoffverbindungen wie das freie Radikal Stickstoffmonoxid ($\text{NO}\cdot$), welches durch NO-Synthasen (NOS) gebildet wird, gezählt. Es gibt verschiedene Isoformen des Enzymes. Zum einen die endotheliale NOS (eNOS), die sich im Endothel der Arterien befindet. Das NO wirkt hier gefäßdilatierend und dadurch blutdrucksenkend. Die neuronale NOS (nNOS) kommt in Neuronen vor, NO fungiert hier als Neurotransmitter. Durch die induzierbare Isoform (iNOS) werden im

Körper bei Entzündungsreaktionen große Mengen von NO im Rahmen einer Abwehrreaktion synthetisiert. In Mitochondrien gibt es noch die mitochondriale NOS (mtNOS) als Stoffwechsel- und Sauerstoffregulator. Während die Aktivität der nNOS und eNOS durch die intrazelluläre Calcium Konzentration reguliert ist, wird die Expression der iNOS durch Lipopolysaccharide und Cytokine stimuliert. [Valko2007]

NO ist ein Radikal, das in fast allen Körperzellen vorkommt. Durch seine geringe Größe, Neutralität und Lipophilie kann es ungehindert Membranen passieren und ist an einer ganzen Reihe physiologischer Prozesse beteiligt. Es ist relativ kurzlebig und nicht stark reaktionsfreudig. In physiologischer Konzentration hat das NO des Endothels starke antiarteriosklerotische Eigenschaften durch das Hemmen der Plättchenaggregation, Verhindern der Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen und Vasodilatation über Steigerung der Guanylatzyklase. [Himmelfarb2004; Himmelfarb2005] Kommt es dagegen in hohen Konzentrationen vor (zum Beispiel bei Entzündungen), können höhere Stickoxide (No_x) entstehen, die ein breiteres Reaktionsspektrum aufweisen und unter anderem mit Thiolgruppen reagieren können. Die durch oxidativen beziehungsweise nitrosativen Stress entstehenden Folgeprodukte hemmen SH-abhängige Enzyme, führen zur Freisetzung von Metallen aus Metall-Schwefel-Komplexen, blockieren die mitochondriale Atmung (Peroxinitrit irreversibel) und können die DNA schädigen. Darüber hinaus wirken sie auf die Signaltranskription und -transduktion in dem sie Proteine, die die Transkription steuern, in ihrer Konfirmation und Funktion verändern [Sies; Kuklinski2005]. Dies bezeichnet man als „nitrosativen Stress“. [Sies; Kuklinski2005; Amore1995; Valko2007]

Bei erhöhtem oxidativen Stress reagieren die ROS (Superoxidanionen) sehr schnell mit NO was zur Bildung von Peroxinitrit (ONOO^{-•}):



und zu einem Verlust der NO-Aktivität und damit zur endothelialer Dysfunktion, einem wesentlichen Faktor in der Arterioskleroseentstehung, führt [Cai2000; Tepel2003/1; Amann2004; Stroes1998].

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass hohe Konzentrationen von ROS zu oxidativen Veränderungen der NOS führen und damit zur Entkopplung. Das heißt, dass die Produktion von NO durch dieses Enzym sinkt, es dagegen aber in erhöhtem Maße Superoxidanionen produziert. [Yilmaz2006; Carr2000; Schmidt2000; Becker1997; Tetta1999; Mulac2005]

1.1.4 Auswirkungen des oxidativen Stresses

In lebenden Organismen werden ständig Oxidantien gebildet, gleichermaßen arbeiten in einem gesunden Organismus ein Vielzahl an antioxidativen Mechanismen konsequent dagegen [Himmelfarb2005].

Reichen die antioxidativen Systeme nicht mehr aus, und übersteigt die Produktion von ROS die antioxidative Kapazität, kommt es zur Oxidation nicht nur von Zellen, sondern auch von Molekülen, Proteinen, Kohlenhydraten, Nukleinsäure, und vor allem Lipiden, die gegenüber freien Radikalen am em-

pfänglichsten sind. Diese Strukturveränderungen sind irreversibel. Die dabei entstehenden Endprodukte fungieren als sogenannte Biomarker für oxidativen Stress.

Biomarker sind messbare Produkte der Oxidation verschiedener Bestandteile des Körpers. Sie erlauben Rückschlüsse auf das Ausmaß des oxidativen Stresses beziehungsweise die Auswirkung einer antioxidativen Therapie zu ziehen. Da es schwieriger ist den aktiven Sauerstoff direkt zu messen, wurden in vielen Studien diese Biomarker zur Erfassung des oxidativen Stresses herangezogen.

[Himmelfarb2002; Himmelfarb2005]

Im Zustand der Urämie spielen vor allem die Endprodukte der oxidativen Veränderungen von Lipiden, der Lipidperoxidation, zum Beispiel Malondialdehyd (MDA) und oxidativ modifiziertes LDL (oxLDL) im Zusammenhang mit der Häufung der kardiovaskulären Mortalität eine Rolle [Boaz1999; Himmelfarb2008]. Außerdem wichtig sind die AOPPs (advanced oxidation protein products). Als Biomarker der Proteinoxidation sind sie ebenfalls bei Dialysepatienten erhöht [Wratten2000]. Weitere Auswirkungen sind die Thioloxidation sowie die, durch Oxidation von Kohlenhydraten entstehenden Endprodukte, die als AGEs (advanced glycosylation endproducts) bezeichnet werden.

Die Oxidation von Alkoholgruppen oder Aminogruppen führt zur Bildung von reaktiven Aldehyden welche biochemisch durch die Identifikation und Messung von Carbonylgruppen (C=O) erfassbar sind.

Diese reaktiven Aldehyde führen zur irreversiblen Bildung von AGEs durch die Reaktion der reaktiven Carbonylverbindung mit den verschiedenen Aminogruppen in Proteinen [Taki2006]. Dieser Vorgang wird als Carbonylstress bezeichnet. AGEs fördern ebenfalls die Arteriosklerose, in dem sie die Expression von Adhäsionsmolekülen und damit die Anlockung von zirkulierenden Monozyten in die Gefäßwand unterstützen. Zusätzlich steigern sie die Produktion von IL-6 und CRP, was wiederum eine Entzündungsreaktion nach sich zieht. AGEs kummulieren bei Nierenerkrankungen und können durch das Dialyseverfahren nicht effektiv aus dem Kreislauf entfernt werden. Sie stellen wichtige Biomarker des oxidativen Stresses dar und können zur Überwachung einer antioxidativen Therapie genutzt werden.

[Himmelfarb2002; Kalousova2003]

Ebenfalls zu den erfassbaren Biomarkern des oxidativen Stresses gehören oxidativ veränderte Thiolgruppen. Der erhöhte Level an Thiolgruppen-Oxidation führt zu einem Verlust dieser wichtigen organischen Schwefel-Ableitungen, die entscheidende intra- und extrazelluläre Funktionen als Redoxpuffer besitzen. Da Disulfid- (S-S) und Thiolverbindungen (S-H) an einer Reihe von enzymatischen- und Transportvorgängen beteiligt sind, hat deren Oxidation Auswirkung auf die Funktion und Struktur von Proteinen [Halliwell1990; Iciek2001]. Zusätzlich kommt es durch die Hämodialyse zu einem Verlust der Protein-gebundenen Thiole [Himmelfarb2005].

Hämodialysepatienten zeigen, im Vergleich zu Gesunden, einen erhöhten Anteil an oxidierten Thiolen und einen verminderten Anteil an sowohl Protein-gebundenen als auch freien, niedrig molekularen und reduzierten Thiolen im Plasma [Himmelfarb2002].

1.1.4.1 Arteriosklerose

Die bei Urämiepatienten stattfindende erhöhte Lipidperoxidation führt zu einer steigenden Produktion von oxidiertem LDL (oxLDL) [Himmelfarb2005; Steinberg1995; Maggi1994; Ivanovski2007].

Oxidativ modifiziertes LDL erhöht die Atherogenese entscheidend [Carr2000; Heinecke2001; Morena2000]. Es führt zu einer erhöhten Rate an Arteriosklerose wie sie bei Urämiepatienten gefunden wird und maßgeblich für die erhöhte kardiovaskuläre Mortalität verantwortlich ist. Bei Hämodialysepatienten wurde ein erhöhter Level an oxLDL Antikörpern gefunden [Bayes2006; Himmelfarb2005]. Durch endotheliale Dysfunktion werden Adhäsionsmoleküle und chemotaktische Substanzen exprimiert, die zur Einwanderung mononukleärer Leukozyten in den subendothelialen Raum führen. Das dort ebenfalls aufgenommene LDL wird durch ROS (z. B. Superoxidanion, Hydrogenperoxid, Lipidperoxid) oxidiert. Das entstandene oxLDL wird von Rezeptoren an diesen Zellen gebunden und führt zur Umwandlung von Monozyten in Schaumzellen, dem ersten Schritt im Arterioskleroseprozess (Abbildung 5) [Becker1997; Scott2004].

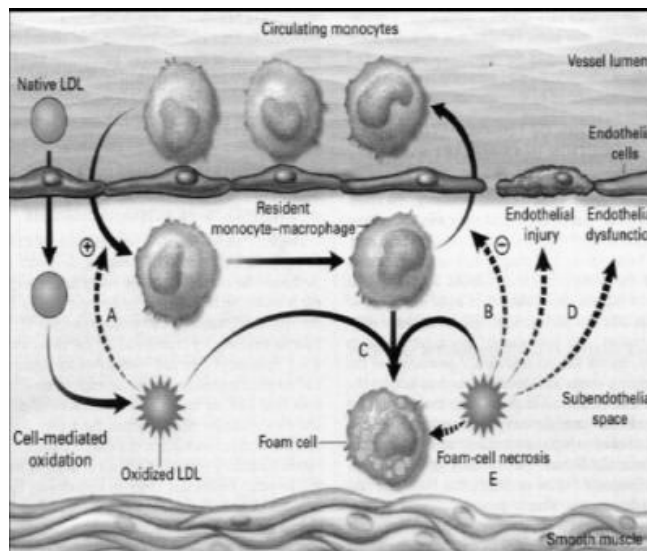


Abbildung 5: Rolle von oxLDL bei der Atherogenese. [Diaz1997; Becker1997]

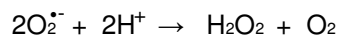
Ferner kommt es zur Freisetzung von Wachstumsfaktoren und Einwanderung sowie Proliferation von glatten Muskelzellen und Bindegewebe was schließlich zur Bildung eines progredienten Atheroms führt. Des weiteren führen ROS direkt zur Stimulation der Proliferation von glatten Muskelzellen in den Gefäßen, zur Produktion von Cytokinen und Aktivierung verschiedener Proteinasen der Matrix, die wiederum zur Instabilität der atherosklerotischen Plaques und deren Ruptur führen. [Himmelfarb2004]

1.1.5 Antioxidantien

Für das Problem der ROS-Überproduktion sind zahlreiche antioxidative Systeme (Radikalfänger, Enzymsysteme) vorhanden, die vor oxidativer Schädigung der Zellen schützen. Zu den antioxidativen Enzymsystemen zählen unter anderem die Gluthationperoxidase, Superoxiddismutase, Katalase und Hydroxyperoxidase. Zu den nicht-enzymatischen Antioxidantien gehören unter anderem die exogenen Antioxidantien wie Ascorbinsäure (Vitamine C), α -Tocopherol (Vitamin E) und Carotinoide sowie die endogenen Antioxidantien wie Glutathion, Harnstoff und Bilirubin. Es handelt sich dabei um Substanzen, die oxidierbare zelluläre Bestandteile vor der Oxidation schützen, und dies entweder als Radikalfänger, unter Bildung neuer Radikale, oder durch Bildung stabiler Endprodukte realisieren um auf diese Weise Kettenreaktionen zu durchbrechen. Sie können Radikale oxidieren, reduzieren, Katalysatoren radikalischer Reaktionen (zum Beispiel Schwermetalle) abfangen oder eine Kaskade von verschiedenen detoxifizierenden Proteinen aktivieren.

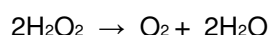
1.1.5.1 Enzymatische Antioxidantien

Bei den bereits besprochenen Radikalen der ROS handelt es sich zum Beispiel um Hydroxyl-Radikale ($\text{OH}\cdot$). Diese entstehen durch energiereiche Strahlung und innerhalb von entzündetem Gewebe. Hydroxyl-Radikale sind hochgradig toxisch und reagieren mit fast allen organischen Substraten. Superoxid-Radikale ($\text{O}_2\cdot^-$) entstehen im Rahmen der Atmungskette in den Mitochondrien sowie bei der NADPH-Oxidase-Reaktion und haben eine relativ milde oxidative Kapazität. Abfangendes antioxidatives Enzym ist die Superoxiddismutase (SOD), ein Metallenzym das ubiquitär im Körper vorkommt und die Dismutation von Superoxidanionen in molekularen Sauerstoff (O_2) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) katalysiert [McCord1969; Imlay1988; Valko2007]:



Es gibt verschiedene Formen der SOD, die Kupfer-Zink-haltige SOD1 (CuZn-SOD) in Erythrozyten und die Mangan-haltige SOD2 (Mn-SOD) in Mitochondrien. Die CuZn-SOD findet sich vorrangig im Zytosol. Die Mn-SOD ist relativ instabil und findet sich fast ausschließlich in der Matrix von Mitochondrien [Ichikawa1994].

Die Wasserstoffperoxide (H_2O_2), die bei dieser Reaktion entstehen, sind wiederum Radikale, die zwar weniger aggressiv sind, aber ebenfalls Schäden an der DNA hervorrufen können. Sie entstehen durch oben beschriebene Superoxiddismutase sowie durch Monoaminoxidasen. Die Katalase, vor allem in Peroxisomen vorkommend, ist ein antioxidatives Enzym welches die Umwandlung von Wasserstoffperoxid zu Sauerstoff und Wasser katalysiert und dadurch Wasserstoffperoxide neutralisiert:



Ein weiteres wichtiges Enzym zur Entgiftung toxischer Peroxide ist die Glutathion-Peroxidase (GPx). Es reduziert Peroxide unter Oxidation von Glutathion:



Das katalytische Zentrum von GPx besteht dabei aus Selen. Durch die Glutathion-Reduktase wird das oxidierte Glutathion unter Verbrauch von NADPH wieder reaktiviert. [Droge2002; Ichikawa1994; Valko2007]

Antioxidative Enzymsysteme sind bei Hämodialysepatienten meist vermindert. [Becker1997; Paul1993; Kalantar-Zadeh2006; Canestrari1994]

Abbildung 6 zeigt noch einmal den Zusammenhang der genannten antioxidativen Enzymsysteme.

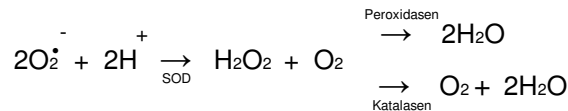
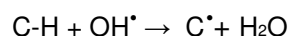


Abbildung 6: Zusammenspiel der antioxidativen Enzymsysteme Superoxiddismutase (SOD), Peroxidase (GPx) und Katalase bei der Neutralisation freier Radikale

1.1.5.2 Nicht-Enzymatische Antioxidantien

Neben den genannten und weiteren Enzymsystemen gibt es noch eine Vielzahl nicht-enzymatischer endogener und exogener Antioxidantien, die als Totale Antioxidative Kapazität (total antioxidant capacity, TAC) oder Totaler Antioxidativer Status (TAS) zusammengefasst werden können.

Man bezeichnet Antioxidantien gerne als Radikalfänger. Bei der Reaktion von freien Radikalen mit anderen Molekülen ist das Reaktionsprodukt wieder ein Radikal. Siehe folgendes Beispiel:



So entstehen gefährliche Kettenreaktionen die durch Radikalfänger unterbrochen werden können. Dazu gehören z. B. Spurenelemente (Selen, Mangan, Zink), exogene Antioxidantien (wasser- und fettlösliche Vitamine), endogene Antioxidantien (Albumin, Harnsäure, Bilirubin, Glutathion, Aminosäuren (z. B. Cystein)) und Polyphenole (Flavonoide).

Assays, die den TAS erfassen, messen die Gesamtheit aller löslichen Antioxidantien im Blut des Patienten. Es handelt sich also um viele verschiedene Stoffe, die im einzelnen durch die Assays nicht erfassbar sind.

Vitamin C (Ascorbinsäure) ist ein Reduktionsmittel. Interagiert es mit einem Radikal entsteht ein Ascorbatradikal, das in Ascorbat und Dehydroascorbat dismutiert. Durch Glutathion wird Dehydroascorbat

wieder zu Ascorbat reduziert. Es ist bereits bekannt, dass die Vitamin C Konzentration während der Dialyse abnimmt. [Eiselt2001; Morena2002]

Vitamin E (Tocopherol) ist wichtigstes lipophiles exogenes Antioxidans. Es hemmt die Oxidation von freien Fettsäuren, Membranlipiden und LDL. Das bei der Reaktion von Vitamin E mit einem Radikal entstehende Tocopheroxyradikal wird in Kooperation mit Ascorbat wieder inaktiviert [Schmidt].

Vitamin E und Vitamin C wirken in geringen Dosen prooxidativ und in hohen Konzentrationen antioxidativ, da sie nach Interaktion mit einem Radikal zunächst selber zu einem Radikal werden.

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass Vitamin C und Vitamin E überdies Einfluss auf antioxidative Enzyme haben. So steigt unter Substitutionstherapie mit Ascorbinsäure und Tocopherol die Aktivität von SOD, die Synthese von NO und es zeigte sich ein Blutdruck-senkender Effekt [Vaziri2000; Chen2001].

Glutathion (GSH) gehört wie Thioreduxin zur Gruppe der Thiole. Dabei handelt es sich um organische Schwefel-Ableitungen die eine entscheidende intra- und extrazelluläre Funktion als Redoxpuffer haben. Es besteht aus den Aminosäuren Cystein, Glutamat und Glycin und besitzt in seiner reduzierten Form eine freie Thiolgruppe mit der es Elektronen auf ROS übertragen und diese unschädlich machen kann. Da Glycin und Glutamin in hoher Konzentration im Plasma vorhanden ist, bestimmt die Verfügbarkeit von Cystein die GSH-Syntheserate.

Das katalysierende Enzym ist die bereits weiter oben beschriebene Glutathion-Peroxidase. Zwei auf diese Weise oxidierte Glutathion-Moleküle verbinden sich zu einem Glutathion-Disulfid (GSSG) und werden durch die Glutathion-Reduktase wieder reduziert.

Intrazelluläre Thiole, zu denen Glutathion gehört, sind für die Aufrechterhaltung der reduzierten Umgebung der Zelle zuständig, während extrazelluläre Thiole eine wichtige Komponente in der antioxidativen Abwehr darstellen. Wichtig deswegen, weil gerade in der extrazellulären Flüssigkeit der Menschen nur wenig bis keine Katalaseaktivität und nur geringe Level anderer antioxidativer Systeme (SOD, GPx) vorhanden sind, da diese hauptsächlich intrazellulär eine Rolle spielen. Protein assoziierte Thiole und Ascorbinsäure stellen den Hauptteil der extrazellulären Abwehr gegen oxidativen Stress dar. [Halliwell1990; Schmidt]

Harnsäure bildet einen Teil des antioxidativen Potentials des Plasmas. Es reagiert mit Hydroxyl- und Superoxidradikalen sowie Peroxinitrit und inaktiviert diese. Die Harnsäure wird dabei zu Allantoin oxidiert. Ein bei der Reaktion von Radikalen mit Harnsäure entstehendes Harnsäure-Radikal wird wiederum durch Ascorbinsäure reduziert.

Bei niereninsuffizienten Patienten kommt es durch die unzureichende Ausscheidung der Harnsäure zur Hyperurikämie, was nach Überschreiten des Löslichkeitsproduktes zum Ausfällen der Harnsäure führt. Daraus folgen Urolithe, Urikopathien und es kann zu sogenannten Harnsäureinfarkten kommen.

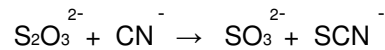
Albumin, Ferritin, Transferrin und Coeruloplasmin haben antioxidative Eigenschaften, die sowohl auf ihrer Fähigkeit beruhen, Metalle zu binden, als auch auf Grund ihrer freien SH-Gruppen.

Bilirubin ist lipophil und in seinen antioxidativen Eigenschaften dem Glutathion in der wässrigen Phase vergleichbar. Bilirubin hemmt die Lipidperoxidation durch Entgiftung des H_2O_2 . Es oxidiert dabei zu Biliverdin und wird anschließend durch die Biliverdin-Reduktase regeneriert. [Schmidt]

Flavonoide gehören zu den wasserlöslichen Pflanzenfarbstoffen und werden über die Nahrung (grüne Pflanzenteile, roter Traubensaft, Rotwein, grüner und schwarzer Tee, Kakao, Schokolade, Obst, Zwiebeln, etc.) aufgenommen. Sie wirken antioxidativ als Radikalfänger und sie sind in der Lage Metallionen zu komplexieren. Zudem wirken sie inhibitorisch auf prooxidative Enzyme (NOS, NADPH-Oxidase, Myeloperoxidase) [Graf2005].

1.1.6 Rhodanese

Rhodanese, ein mitochondriales Enzym das auch Thiosulfat-Sulfurtransferase genannt wird, katalysiert die Umwandlung von Cyaniden, Sulfiten, organischen Schwefelverbindungen und Dithiolen in weniger toxische Schwefelverbindungen. So zum Beispiel generiert es den Transfer eines Schwefelatoms von Thiosulfat ($S_2O_3^{2-}$) auf Cyanid. Dabei entsteht Rhodanid (Thiocyanat, SCN^-) und Sulfit (SO_3^{2-}):



Rhodanese ist in zwei gleich große aber unabhängige Domänen aufgefaltet. Beide Domänen sind fest durch ein stark hydrophobes Zwischenstück miteinander verbunden. Die aktive Form des Enzyms enthält 4 reduzierte Cysteinreste. Auf die Thiolgruppe des Cysteinrest C247 im Katalysezentrum wird in oben beschriebener Reaktion ein Schwefelatom von Thiosulfat übertragen, anschließend wird die Thiolgruppe zurückgebildet und Cyanid sulfidiert [Bhattacharyya2000]. Somit befindet sich das Enzym entweder in der Schwefel-freien oder in der Schwefel-substituierten Form, welche die stabilere von beiden ist [Horowitz1986]. In Studien wurde festgestellt, das Harnstoff in hoher Konzentration ein Entfalten des Enzyms induziert, was mit einem kompletten Verlust der Aktivität einhergeht [Bhattacharyya2000; Horowitz1993; Shibatani1999].

Des weiteren konnte festgestellt werden, das Rhodanese durch Inkubation mit NADH inaktiviert wird. Wird NADH durch molekularen Sauerstoff oxidiert, entstehen reaktive Zwischenprodukte, zum Beispiel Superoxide oder Hydrogenperoxide. Es wird angenommen, dass diese ROS zur Oxidation der Sulfhydrylgruppe (Thiolgruppe) der Rhodanese und damit zum Aktivitätsverlust führt. Reaktiviert wird es durch erneute Inkubation mit Thiosulfat. Sowohl der Zusatz von SOD oder Katalase als auch der Ausschluss von Sauerstoff können vor Inaktivierung des Enzyms schützen [Horowitz1986].

Zellen des Gastrointestinaltraktes, des Respirationstraktes und der Nieren zeigen hohe Rhodanese-Aktivität wohingegen Tumorzellen eine geringe Aktivität dieses Enzyms aufweisen. [Jamshidzadeh]

Vornehmliche Hauptaufgabe der Rhodanese scheint die Entgiftung von Cyanid, weshalb man zum Beispiel Natriumthiosulfat bei Cyanidvergiftungen oder Natrium-Nitroprussid-Überdosierungen (starkes Antihypertensivum der Intensivmedizin aus der Wirkstoffklasse der Cyanide, das über eine Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) in der glatten Gefäßmuskulatur wirkt) verabreicht. [Saidu2004]

Auch wesentlich geringere Dosen des toxischen Agens werden durch Rhodanese metabolisiert. Cyanid ist im Zigarettenrauch, in Medikamenten oder Lebensmitteln (Pfirsich, Aprikose, Bittermandel, etc.) vorhanden, wird darüber aufgenommen und mittels Rhodanese unter Bildung von Thiocyanat entgiftet. [Hasuike2004]

Cyanide sind zytotoxische Verbindungen der Blausäure (Cyanwasserstoff, HCN), die durch Hemmung des Komplex IV (Cytochrome-Oxidase) des mitochondrialen Elektronentransportes zum Zelltod führen.

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass es eine direkte Verbindung zwischen Thiocyanat und Arteriosklerose gibt, da es die Lipidperoxidation verstärkt und das Risiko für cerebrale Infarkte erhöht. [Wang2001]

Diskutiert wird weiterhin, dass Rhodanese eine Rolle als Schwefeldonor in Eisen-Schwefel-Proteinen spielt [Bonomi1977; Hall1993], nach dem gezeigt werden konnte, dass es Proteine der mitochondrialen Atmungskette, wie NADH-Dehydrogenase (Komplex I) und Succinat-Dehydrogenase (Komplex II), reaktiviert. [Pagani1983; Ogata1990; Saidu2004]

Darüber hinaus hat Rhodanese neben weiteren Enzymen einen Anteil an der Bildung von Verbindungen die sogenanntes Sulfan-Schwefel (R-S-SH) enthalten. Dabei handelt es sich um SH-Gruppen, die ein zusätzliches hoch reaktives labiles Schwefelatom im reduzierten Zustand besitzen. Diese Verbindungen beteiligen sich an der Regulation der Zellfunktion durch Aktivierung und Inaktivierung von Proteinen und weisen antioxidative Eigenschaften auf. Sulfan-Schwefel-Verbindungen vermögen sowohl freie Radikale abzufangen als auch die Aktivität antioxidativer Enzyme (SOD, GPx) zu erhöhen. [Kessler2006; Everett1994; Iciek2001]

Eventuell könnte es als Transfermolekül die Übergabe eines Sulfid-Moleküls auf O-Acetyl-L-Serin unter Bildung von Cystein übernehmen [Gliubich1996], wodurch ebenfalls antioxidative Eigenschaften zum tragen kommen, da Cystein ein wichtiger Bestandteil des endogenen Antioxidans Glutathion ist.

Die genauen Funktionen sind jedoch noch nicht hinreichend geklärt.

1.1.7 Antioxidative Therapieversuche

Nach der Erkenntnis der verminderten antioxidativen Kapazität und dem erhöhten oxidativen Status bei HD-Patienten, beschäftigten sich die Studien nun zusätzlich mit den Möglichkeiten antioxidativer Therapien zur Senkung des erhöhten Risikos einer CVD. In der SPACE-Studie 1997-1999 wurde der Effekt einer hoch-dosierten Gabe von Vitamin E (α -Tocopherol) auf die Entwicklung einer CVD bei HD-Patienten mit anamnestisch vorbestehender CVD untersucht. 196 Patienten wurden zufällig auf zwei Gruppen verteilt, von denen die eine Gruppe Vitamin E und die andere Placebo erhielt. Das Ergebnis zeigte, dass die Gabe von Vitamin E signifikant das Risiko, einen akuten Myokardinfarkt zu bekommen, senkt, dass es aber keinen Einfluss auf die Gesamtmortalität durch CVD hat. [Boaz2000] Zu ähnlichen Ergebnissen kam auch die schon 1992-1994 durchgeführte CHAOS-Studie, bei der man ebenfalls von einem präventiven Effekt des Vitamin E auf die Arterioskleroseentstehung durch Hemmung der LDL-Oxidation ausging [Stephens1996]. Auch in dieser Studie konnte durch die Gabe von Vitamin E das Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen gesenkt werden. Eine signifikante Reduktion der Mortalität konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Weitere Studien konnten zeigen, dass eine Therapie mit Antioxidantien oder einer Kombination aus Antioxidantien und Cholesterin-reduzierenden Medikamenten zu einer signifikanten Besserung der Reaktion des Endothels auf NO führt und damit die Vasodilatation begünstigt. [Anderson1995; Becker1997]

Ein weiterer Versuch oxidativen Stress zu vermindern, liegt in der Benutzung von mit Vitamin E modifizierten Dialysemembranen. Es konnte hierbei gezeigt werden, dass der Anstieg des oxidativen Stresses während der Dialyse, gemessen anhand der Biomarker, unter Benutzung einer Vitamin E-modifizierten Membran ausbleibt. [Eiselt2001; Galli2001; Mune1999]

In einer prospektiven Placebo-kontrollierten Untersuchung wurde der Effekt von N-Acetylcystein (einem Thiol-enthaltenden Antioxidans) auf kardiovaskuläre Ereignisse bei Hämodialysepatienten bewertet. Das dabei gemessene oxLDL als Marker für oxidativen Stress, war in der Gruppe der Patienten, die N-Acetylcystein eingenommen hatte, signifikant niedriger. Darüber hinaus konnte eine signifikante Reduktion von kardiovaskulären Ereignissen durch die Behandlung erfasst werden, wobei auch hier keine Verbesserung der absoluten Mortalität nachgewiesen werden konnte. In einer weiteren Arbeit konnte durch die intravenöse Gabe von N-Acetylcystein die Konzentration von Homocystein sowie der Pulsdruck signifikant gesenkt und damit die endotheliale Dysfunktion bei ESRD Patienten verbessert werden. [Tepel2003; Scholze2004]

1.1.8 Plasma versus Serum

„Serum is, of course, not Plasma“ (Lundblad2005). Serum ist Fibrin freies und damit nicht-gerinnbares Blutplasma, das aus geronnenem Vollblut, ohne vorherige Zugabe eines Antikoagulans, durch zentrifugieren gewonnen wird. Plasma dagegen ist der Überstand, der nach dem Zentrifugieren von mit Gerinnungshemmern versetztem Vollblut entsteht. Es handelt sich bei beiden um die zellfreie Blutflüssigkeit bestehend aus Wasser, Plasmaproteinen und kleinmolekularen Substanzen (Elektrolyte, Glukose, Harnstoff). Der Hauptunterschied zwischen Plasma und Serum besteht also in der Entfernung des Fibrinogens und den damit verbundenen Proteinen (wobei es sich vornehmlich um Gerinnungsfaktoren handelt) aus dem Serum.

Zahlreiche Untersuchungen haben sich damit beschäftigt, durch verschiedene chemische Tests die Ergebnisse von Serum- und Plasmaproben miteinander zu vergleichen. Dabei wurden unter anderem signifikante Unterschiede gefunden für zum Beispiel Albumin (im Serum niedriger als im Plasma), alkalische Phosphatase, Calcium, Kalium, Chlorid, Kreatinkinase und totale Proteinkonzentration. [Lundblad2005; Ladenson1974; Lum1974 Miles2004; Hrubec2002]

In dieser Arbeit soll nicht weiter darauf eingegangen werden, diese Erkenntnisse zu verifizieren, wohl aber darauf hingewiesen werden, dass auf die bestehenden Unterschiede geachtet und sie an einer Stelle auch mit untersucht wurden. Für die in dieser Arbeit verwendete Methode In-Cell Western wurde, wie vom Hersteller empfohlen, heparinisieretes Blut zur Isolierung der Monozyten verwendet. Anders verhielt es sich bei dem genutzten Assay zur Bestimmung der Antioxidantien-Konzentration, die sowohl im Serum als auch im Plasma ermittelt werden konnte.

1.2 Fragestellung

Nach der Erkenntnis, dass Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz bereits bei geringer Nierenschädigung erhöhtem oxidativen Stress ausgesetzt sind, welcher die erhöhte kardiovaskuläre Mortalität erklärt, beginnt die Suche nach den genauen Mechanismen, welche die Erhöhung des oxidativen Stresses erklären. Diese Frage konnte bisher noch nicht hinreichend beantwortet werden. Auch bieten bisher durchgeführte Untersuchungen über einen möglichen Einfluss der Hämodialysetherapie keine einheitlichen Ergebnisse.

Daher geht es in dieser Arbeit vor allem um den Einfluss der Hämodialyse auf die Parameter des oxidativen Stresses, ROS, Antioxidantien und antioxidativ wirksamen Enzymsysteme.

Hat die Dialysebehandlung einen protektiven Effekt oder wird der oxidative Stress der Patienten weiter begünstigt?

Wie bereits eingängig erläutert, kann man oxidativen Stress nur indirekt messen. Zum einen kann stattgehabter oxidativer Stress durch spezifische Biomarker nachgewiesen werden. Zum anderen, worum es in dieser Arbeit gehen soll, kann man den antioxidativen Status der Patienten anhand sowohl löslicher Antioxidantien im Serum als auch antioxidativer Enzymsysteme darstellen und eine Beziehung zur Dialysebehandlung schaffen.

Des weiteren soll die Frage nach eventuell bestehenden Zusammenhängen der ausgewählten und untersuchten antioxidativen Enzymsysteme sowie der gesamten antioxidativen Kapazität und klinischen Parametern der untersuchten Patienten beantwortet werden.

Untersucht wurden dabei neben Serum- und Plasmaproben von Dialysepatienten sowie gesunden Probanden als Kontrollgruppe auch Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems, da diese in besonderem Maße an der Entstehung arteriosklerotischer Läsionen beteiligt sind.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Histopaque® - 1077

HBSS (Hanks balanced salt solution (NaCl 136mmol/L, KCl 5,4mmol/L, KH₂PO₄ 0,44mmol/L, Na₂HPO₄ 0,34mmol/L, D-Glukose 5,6mmol/L, CaCl₂ 1mmol/L, N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid 10mmol/L, pH 7.4))

Triton X-100

Tween 20

Dynabeads® M-450 CD14

Odyssey® Blocking buffer

Heparin 25.000 IE

NaCl

Formaldehyd

PBS (137 mM Natriumchlorid, 2,7 mM Kaliumchlorid und 12 mM Phosphat)

2.1.2 Antikörper für Immunfluoreszenz

Primärantikörper

Anti-beta Actin	abcam, ab8227
nNOS antibody	Affinity BioReagents, PA1-033
GPx antibody	Santa Cruz Biotechnology, sc-22146
SOD1 antibody	Santa Cruz Biotechnology, sc-34015
SOD2 antibody	Santa Cruz Biotechnology, sc-18504
Rhodanese antibody	Santa Cruz Biotechnology, sc-20959
GAPDH antibody	Santa Cruz Biotechnology, sc-20357

Sekundärantikörper

Alexa Fluor®680 goat anti rabbit IgG

IRDye®800 donkey anti goat IgG

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Eppendorfgefäße

Mikrotiterplatten (96-well)

Glasküvetten

Zentrifugenröhrchen

Pipettenspitzen

2.1.4 Kits

Calbiochem® Total Antioxidant Status Assay Kit

2.1.5 Geräte

Odyssey® Infrared Imager von Licor

Magnet für 96well-Mikrotiterplatten

Fluoreszenzspektrophotometer

Spectrophotometer der Firma Ascent

Magnetrührer

Schüttler

Kühlschrank

Gefrierschrank -20 °C

Zentrifuge

Photometer

Pipetten

2.2 Methoden

2.2.1 Aufbereitung der Blutproben

Für die Untersuchungen wurden jedem Dialysepatienten vor Beginn der Dialyse und unmittelbar am Ende je 20ml Vollblut abgenommen. Die Blutentnahme erfolgte unter sterilen Bedingungen in sterile Spritzen, in denen Heparin zu einer Endkonzentration von 25 IE/ml Vollblut vorgelegt wurde (dazu 5 ml Heparin 25.000 IE in 20 ml NaCl, davon 0,5 ml auf 20ml Vollblut). Zusätzlich wurden jedem Patienten während der selben Venenpunktion je ein gelhaltiges Serumröhrchen abgenommen. Auch den Probanden der Kontrollgruppen wurde je ein Plasma- und ein Serumröhrchen auf gleiche Weise abgenommen.

Für eine weitere Untersuchungsreihe wurden von einzelnen Dialysepatienten während einer Dialysebehandlung an 6 verschiedenen Zeitpunkten, vor Dialysebeginn sowie jeweils nach ½, 1, 2, 3 Stunden und nach der Dialyse, Blut auf diese Weise abgenommen

Die Blutproben wurden sofort nach der Entnahme am Patienten weiterverarbeitet.

2.2.1.1 Serum

Die gelhaltigen Serumglasröhrchen werden bei 10000 rpm für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und das Serum anschließend in 2ml Eppendorfgefäße abpipettiert. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Serum- wie auch die Plasmaproben im Gefrierschrank in Form von Aliquots bei -20°C aufbewahrt.

2.2.1.2 Plasma

Die 20ml heparinisiertes Blut werden auf 2 10ml-Röhrchen verteilt und bei 2000 rpm, ohne Bremse (entspricht 600 * g) für 15 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Danach ist das Blut aufgetrennt, das Plasma kann abgenommen und in separate Eppendorfgefäße gegeben werden. Aus den übrig gebliebenen Zellen können nun die Monozyten isoliert werden.

2.2.1.3 Monozytenisolierung

Nach der Auftrennung des Blutes, und dem anschließenden abpipettieren des Plasmas, wurden die im Röhrchen verbliebenen Zellen mit 3ml HBSS vermischt und vorsichtig auf, in zwei weitere Zentrifugenröhrchen vorgelegte 3 ml Histopaque® 1077 gegeben, ohne das eine Durchmischung stattfindet. Anschließend wurden die Röhrchen wieder für 15 Minuten bei 2100 rpm zentrifugiert. Histopaque®-1077 ist laut Hersteller eine Lösung aus Polysaccharose und Natriumdiatrizoat mit einer Dichte von 0,001 g/ml. Durch das Zentrifugieren werden die Erythrozyten und Granulozyten durch die Polysaccharose aggregiert und sedimentieren schnell, während sich die Lymphozyten und mononukleären Zellen an der Plasma Histopaque Grenzfläche anlagern und nicht zu Boden sinken. So entsteht ein weißer Ring, der die mononukleären Zellen enthält. (Abbildung 7) Die Ringe zweier zusammengehöriger Röhrchen werden in ein neues Röhrchen übertragen und dieses für weitere 5 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. Nach dem dekantieren des Überstandes wird das am Boden befindliche Zellpellet in 1,4 ml HBSS aufgenommen und nach Zugabe von 25µl Dynabeads® M-450 CD14 für eine Stunde bei 4 °C inkubiert.

Bei den Dynabeads handelt es sich um superparamagnetische Kügelchen, die mit einem monoklonalen Antikörper (Maus IgG2a mAb) gegen CD14, ein Antigen, das auf menschlichen Monozyten präsentiert wird, beschichtet sind. Damit können Monozyten nach einer kurzen Inkubationszeit isoliert werden. [de_Carvalho2004] Die isolierten Zellen stehen nun für den anschließenden In-Cell Western zur Verfügung.

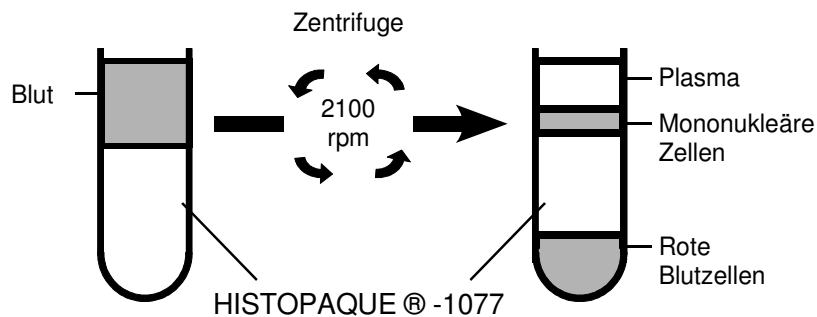


Abbildung 7: Nach dem Zentrifugieren des Histopaques mit den festen Blutbestandteilen entsteht eine trübe Schicht in Form eines Ringes. Diese enthält mononukleäre Zellen. (Abbildung aus den Verfahrensangaben des Herstellers Sigma.)

2.2.2 Total Antioxidant Status Assay

Um die Konzentration von Antioxidantien im Plasma oder Serum von Patienten und Kontrollen zu messen, wurde der Calbiochem® Total Antioxidant Status Assay Kit genutzt. [Miller1993; Huang2003; Wang,XL2001] Der Test basiert auf der Fähigkeit von Antioxidantien, die Oxidation von ABTS® (2,2'-Azino-di[3-ethylbenz-thiazoline sulphonate]) zu ABTS®^{•+} durch die Peroxidase Metmyoglobin zu unterdrücken. Die Menge des gebildeten ABTS®^{•+} kann anschließend gemessen werden, in dem man mittels Photometer die Absorption bei 600nm abliest. Unter den Reaktionsbedingungen, die der Test vorgibt, verursachen die Antioxidantien in den Plasma- bzw. Serumproben der Probanden bei 600nm eine Unterdrückung der Absorption die proportional ist, zu der Konzentration der Antioxidantien der jeweiligen Probe (Abbildung 8).

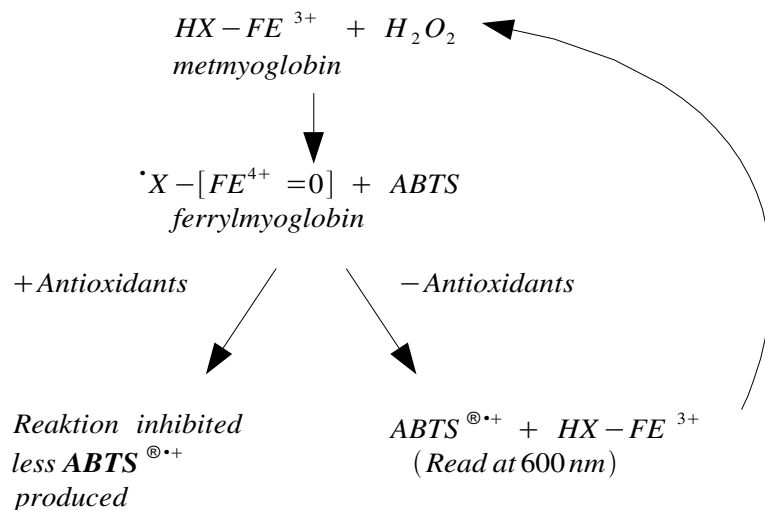


Abbildung 8: Prinzip des Total Antioxidant Status Assay Kit (TAS), Angaben des Herstellers.

Die Messungen erfolgten in einem automatisierten Spectrophotometer der Firma Ascent auf 96well Mikrotiterplatten. Für den Test wurden die entsprechenden Aliquots der Plasma- und Serumproben aufgetaut und vor der Verarbeitung noch einmal bei 5000 rpm zentrifugiert um die Verfälschung der Ergebnisse durch Trübung und noch vorhandene Feststoffe zu vermeiden.

Pro Messdurchgang ist es erforderlich einen Blank-Wert und einen Standard-Wert zu ermitteln. Der Blank-Wert entspricht einer Reaktion ohne Antioxidantien, bei der $ABTS^{\bullet}$ vollständig zu $ABTS^{\bullet\bullet+}$ oxidiert. Der Standard enthält eine definierte Menge an Antioxidantien, führt also zu einer spezifischen Inhibition der Reaktion.

Nach Zubereitung der im Kit enthaltenen Reagenzien, entsprechend des Herstellerprotokolls, wurden in die erste Reihe einer 96well Platte, entsprechend 12 Wells, je 250µl des vorbereiteten Chromogens (Metmyoglobin und $ABTS^{\bullet}$) vorgelegt, in die 2. Reihe dann je 80µl vorbereitetes Substrat (stabilisiertes H_2O_2). Anschließend wurde die Platte bei 37°C für 5 Minuten inkubiert. In das inkubierte Chromogen wurden für den Blank-Wert 5µl destilliertes H_2O , für den Standard-Wert 5µl des vorbereiteten Standards und für die Messung der Antioxidantien-Konzentration der Probanden je 5µl des Patienten- oder Kontrollplasma in die übrigen 10 Wells gegeben und die Initial-Absorption (A_0) gemessen. Im letzten Schritt wurden zu jedem Well der ersten Reihe 50µl des, auf der selben Platte inkubierten Substrats gegeben und nach exakt 3 Minuten erneut die Absorption (A) abgelesen. Für die Berechnung der Konzentration der Antioxidantien gilt dann:

$$Antioxidantien\ Konzentration(mM) = \frac{Konz.\ des\ Standard[mM] \cdot (\Delta A\ Blank - \Delta A\ Sample)}{(\Delta A\ Blank - \Delta A\ Standard)}$$

2.2.3 Fluoreszenzphotometrie

Das Prinzip der Fluoreszenzphotometrie beruht auf der Fähigkeit von Atomen und Molekülen Strahlungsenergie zu absorbieren, wodurch sie in einen energiereicheren Zustand gehoben werden. Trifft Licht einer definierten Wellenlänge auf Elektronen, absorbieren diese das Licht und werden in einen höheren Energiezustand angehoben. Bei der Rückkehr der Elektronen auf das niedrigere Energieniveau, kommt es wiederum zur Emission von Licht einer bestimmten Wellenlänge. Diesen Vorgang bezeichnet man als Fluoreszenz. Das emittierte Licht wird von einem Photometer erfasst und über einen Photomultiplier in ein elektrisches Signal umgewandelt, das über einen Computer aufgezeichnet und ausgedruckt werden kann.

Die Ermittlung der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Emissionswellenlänge bei gegebener fester Excitationswellenlänge (Anregungswellenlänge), ergibt das Fluoreszenzemissionsspektrum. Die Aufzeichnung der Fluoreszenz als Funktion der Excitationswellenlänge bei konstanter Emissionswellenlänge, wird Fluoreszenzexcitationsspektrum genannt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Eigenfluoreszenz der Plasmaproben auf 96-Well Platten mit einem Fluoreszenzspectrophotometer gemessen. Um herauszufinden, bei welcher Emissions- und Excitationswellenlänge ein Maximum der Fluoreszenzintensität erreicht werden kann, wurden einzelne Proben bei folgenden Geräteeinstellungen gemessen:

Emissionsspektrum: Ex 300nm, Em scan start 310nm, Em scan stop 700nm
 Ex 400nm, Em scan start 410nm, Em scan stop 700nm
 Ex 500nm, Em scan start 510nm, Em scan stop 700nm

Excitationsspektrum: Em 610nm, Ex scan start 220nm, Ex scan stop 600nm
 Em 510nm, Ex scan start 220nm, Ex scan stop 500nm
 Em 410nm, Ex scan start 220nm, Ex scan stop 400nm

Ein Maximum der Fluoreszenz zeigte sich im Emissionsspektrum bei einer Excitationswellenlänge von 300nm und der Emissionswellenlänge von 620nm. Mit dieser Einstellung wurde gezielt das Plasma von 24 Hämodialysepatienten vor und nach der Dialyse, sowie das Plasma von 12 gesunden Probanden vermessen. Zusätzlich wurden bei 5 Dialysepatienten, die an fünf verschiedenen Zeitpunkten während der Dialyse abgenommenen Plasmaproben, auf diese Weise untersucht.

Vermessen wurden je 1ml der zuvor frisch aufgetauten und vor Vermessung erneut bei 5000 rpm abzentrifugierten Plasmaproben. Die Messungen erfolgten jeweils bei Raumtemperatur.

2.2.4 Immunodetektion

Der Nachweis der Proteine erfolgte mittels Immunodetektion, ein Verfahren, das auf der so genannten „Sandwich-Methode“ basiert. Dabei wird ein Protein durch einen spezifischen ersten Antikörper gebunden und damit identifiziert, und durch einen zweiten Antikörper detektiert. (Abbildung 9).

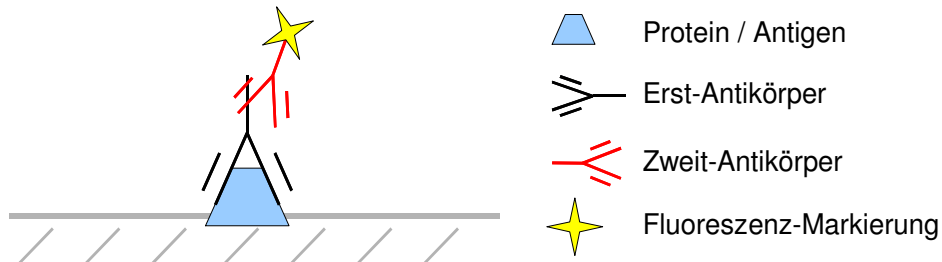


Abbildung 9: "Sandwich-Methode": Der erste Antikörper ist spezifisch für ein Protein und bindet an dieses. Ein 2. Antikörper, der seinerseits Fluoreszenz markiert ist, bindet an den 1. Antikörper.

In dieser Arbeit wurde die Methode des In-Cell Western, bei der die Proteine direkt intrazellulär nachgewiesen werden, angewandt. Der zweite Antikörper ist hierbei fluoreszenzmarkiert, das heißt mit einem speziellen Infrarotfarbstoff konjugiert. Die Visualisierung erfolgte über ein Li-Cor Odyssey® Gerät (Abbildung 10).



Abbildung 10: Odyssey Infrared Imager von LI-Cor Biosciences (Quelle: LI-Cor Biosciences Web-Site www.licor.com)

Die sekundären Antikörper haben meist eine größere Spezifität, so dass mehrere sekundäre Antikörper gleichzeitig an einen Primärantikörper binden können, was zu einer Signalverstärkung führt. Im Infrarotbereich sollen, laut Hersteller, unspezifische Hintergrundsignale, wie sie zum Beispiel durch Autofluoreszenz der Zellen und Kunststoffplatten entstehen, deutlich geringer ausfallen, als das bei Standardmethoden der Fall sei.

Das Li-Cor® System arbeitet mit zwei separaten Fluoreszenzkanälen, bei 700 und 800nm, was den gleichzeitigen Nachweis von zwei Zielstrukturen ermöglicht und damit eine präzisere Bestimmung der Proteinmenge durch Normalisierung der Daten erlaubt (Abbildung 11).

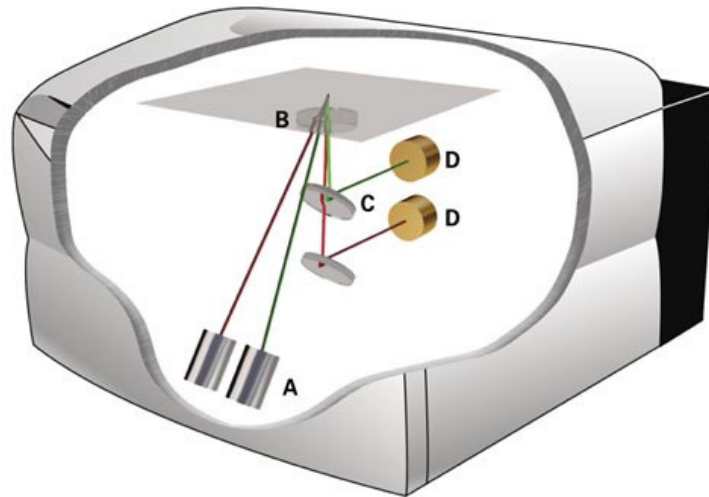


Abbildung 11: Zwei separate Laser und Detektoren fangen gleichzeitig zwei Fluoreszenzsignale auf, bei 680 und 780nm. Beide Laserstrahlen fokussieren auf die Scanneroberfläche. Das Mikroskop-Objektiv (B) ist auf die Oberfläche, den Ort der Excitation, gerichtet, und sammelt das Licht von beiden fluoreszierenden Signalen. Von dort geht das Licht zu einem dichromatischen Spiegel (C), der das Licht in 2 Fluoreszenzsignale aufspaltet. Licht mit einer Wellenlänge größer 810nm geht hindurch, Licht mit einer Wellenlänge kleiner 750nm wird reflektiert. Das hindurchgehende und reflektierte Licht geht jeweils einen individuellen Weg, bis es schließlich auf die jeweilige Photodiode trifft und von ihr gemessen wird. (Quelle: www-licor.com)

Eine Normalisierung der Signalintensitäten gegen ein anderes Protein, ein so genanntes „housekeeping“ Protein ist wichtig, da dadurch Unterschiede, zum Beispiel in der Zellkonzentration der verschiedenen Wells oder auch kleine Unterschiede bei Inkubationszeiten, korrigiert werden können. Diese Referenzproteine gelten als unregulierte Proteine, von denen man annimmt, dass sie in allen Zellen etwa gleich stark exprimiert werden. Das untersuchte Protein wird zum Referenzproteinen ins Verhältnis gesetzt. Für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Proteine nNOS, SOD1, SOD2 und GPx wurde jeweils das Referenzprotein Beta-Actin (β -Actin) und für Rhodanese das Referenzprotein Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) genutzt.

2.2.4.1 In-Cell Western

Der In-Cell Western setzt sich aus mehreren Schritten zusammen (Abbildung 12).

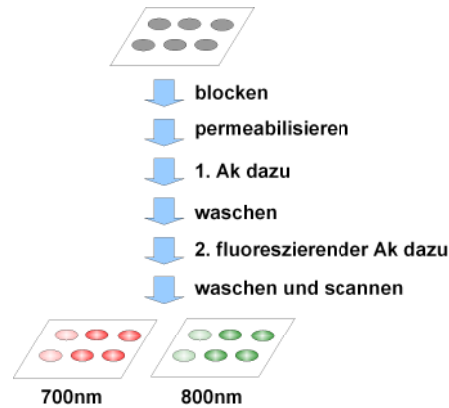


Abbildung 12: Immunochemischer Nachweis von Proteinen im In-Cell Western. (Abbildung modifiziert nach [Calvert2004])

Ausgehend von den isolierten Monozyten, wurden nun je 100µl der präparierten Monozytenlösung in die einzelnen Wells von 96well Platten verteilt, und mit 150µl Fixing Solution (4,5ml PBS + 0,5ml 35 % Formaldehyd) durch 20 minütiges Inkubieren an der Platte fixiert. Anschließend wurden die Zellen durch viermaliges Waschen mit je 200µl Washing Solution (49,5ml HBSS + 0,5ml 10 % Triton X100) für jeweils 5 Minuten permeabilisiert und damit für die spätere Zugabe der Antikörper vorbereitet. Mittels eines Magneten, können, durch die superparamagnetischen Dynabeads, welche die Monozyten festhalten, die zugegebenen Lösungen wieder entfernt werden, ohne dabei die am Boden haftenden Zellen zu verlieren. Nach Aufnahme in 150µl Blocking Buffer über Nacht, zur Absättigung frei gebliebener unspezifischer Bindungsstellen, wurde dieser am 2. Tag wieder mittels des Magneten entfernt. Vor der anschließenden Behandlung der Platte mit den Antikörpern folgte eine Einteilung in verschiedene Abschnitte. Im ersten Abschnitt sollen die unspezifischen Hintergrundsignale erfasst werden, der Background 1. In diesem Abschnitt wird den Zellen mit den Proteinen nur der sekundäre, fluoreszenzmarkierte Antikörper zugegeben, nicht aber der primäre, an den der sekundäre sich spezifisch binden sollte. Jedes Signal, das in diesem Abschnitt gemessen wird, resultiert aus der ungezielten Bindung des 2. Antikörpers zum Beispiel direkt an ein Protein oder das Kunststoff der Platten. Diese Signale gelten als Hintergrund und müssen, da sie in jedem Well entstehen, auch von den Messergebnissen der Proteine abgezogen werden. In einem zweiten Abschnitt soll ein weiterer Hintergrund ermittelt werden, der Background 2. Dabei handelt es sich um einen Bereich, in den wiederum die Zellen und diesmal der primäre Antikörper gegeben wurden, aber kein fluoreszenzmarkierter Antikörper vorhanden ist. Es handelt sich hierbei um eine Kontrolle der Reinheit der Reagenzien und Platten des jeweiligen Versuches. Dieser Wert wird nicht von den Proteinwerten abgezogen.

Vom 1. Antikörper wurden jeweils 50µl in einer Verdünnung von 1:1000 (mit Blocking Buffer/PBS 1:1 verdünnt) auf die Zellen gegeben, wobei die Wells, die als Background 1 gewertet werden sollten, ausge-

spart wurden. Für diese Wells wurde stattdessen die Antikörper-freie Mischung von BlockingBuffer/PBS im Verhältniss 1:1 verwendet.

Nach einer Inkubationszeit von 2h, wurden die Wells mit 200µl Tween Washing Solution (9,95ml HBSS + 50µl 20 % Tween20), unter Zuhilfenahme des Magneten, viermal mal 5 Minuten gewaschen, wodurch nicht gebundene Antikörper wieder entfernt werden sollten. Anschließend erfolgte die Reaktion mit 50µl des 2. Antikörper, in gleicher Verdünnung wie bereits beim Erstantikörper beschrieben, unter Zugabe von 0,125 % Tween 20 zur Verringerung der Hintergrundsignale. Der 2. Antikörper wurde dafür in jedes Well, mit Ausnahme der Wells des 2. Backgrounds gegeben. Während der Inkubationszeit von einer Stunde musste die Platte wegen der Lichtempfindlichkeit des 2. Antikörpers vor Licht geschützt behandelt werden. Im darauf folgenden letzten Schritt wurden abermals unspezifisch gebundene Antikörper durch viermaliges Waschen von je 5 Minuten mit Tween Washing Solution entfernt. Nach dem letzten Waschdurchgang wurde die Fluoreszenz der trockenen Platte durch den Odyssey® Scanner bei 700 und 800 nm gemessen und mit der zugehörigen Software ausgewertet. (Abbildung 13)

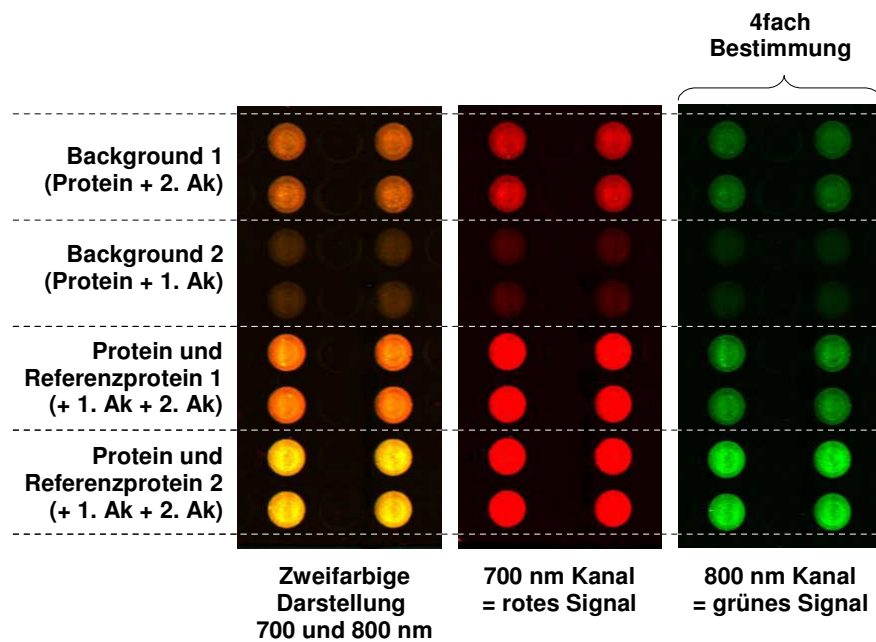


Abbildung 13: Beispiel eines durch das Odyssey® System gescannten In-Cell Western. Es erfolgte jeweils eine vierfach Proteinbestimmung.

Für die anschließende Auswertung wurden die Messergebnisse in eine Excel-Tabelle umgewandelt und die Konzentration der Proteine berechnet.

Bei der Auswertung eines In-Cell Western gilt es, vor der schon beschriebenen Normalisierung der Proteinkonzentrationen, die unspezifische Hintergrundmessung für jedes Protein abzuziehen.

2.3 Patientencharakterisierung bei der Rhodanesebestimmung

Für die verschiedenen Untersuchungen wurde jeweils eine unterschiedliche Anzahl von Dialysepatienten untersucht. Eine Patientencharakterisierung erfolgt daher im Ergebnisteil für jeden Test im Einzelnen.

Nachfolgend soll exemplarisch eine detaillierte Patientencharakterisierung für die Patienten, bei denen eine Rhodanesebestimmung erfolgte, dargestellt werden, um einen Überblick der weiteren vorliegenden Parameter zu bekommen.

Untersucht wurden 35 dialysepflichtige Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz. Die Patienten waren im Mittel 68 ± 2 Jahre alt (Mittelwert \pm SEM), seit 24 ± 8 Monate dialysepflichtig und hatten ein mittleres Körpergewicht von 74 ± 4 kg, eine mittlere Körpergröße von $1,73 \pm 0,02$ m. Dabei handelt es sich um 25 männliche und 10 weibliche Probanden. Vor und nach der Dialyse wurden den Patienten Blut abgenommen und Blutbild, Elektrolyte, die Retentionsparameter (Kreatinin, Harnstoff, Harnsäure), die Leberenzyme (GOT, GPT, gGT, alk. Phosphatase, Bilirubin) sowie kardiovaskuläre Risikofaktoren (Blutfettwerte, Parathormon, Homocystein, Lipoprotein A) laborchemisch bestimmt. Außerdem wurden Vollblut-, Plasma- und Serumproben für die experimentellen Enzymtests und Proteinbestimmungen abgenommen. Während der Dialyse wurden am Patienten Gefäßmessungen durchgeführt. Diese Daten wurden für andere Dissertationen unserer Arbeitsgruppe erhoben und in dieser Arbeit an verschiedener Stelle mit berücksichtigt.

Tabelle 1: Charakterisierung der Dialyse-Patienten an Hand der für die Rhodanesebestimmung ausgewählten Probanden:

Merkmal	Mittelwert \pm SEM
Mann / Frau	25/10
Alter (Jahre)	68 ± 2
Körpergewicht (kg)	74 ± 4
Körpergröße (m)	$1,73 \pm 0,02$
Körperoberfläche (m ²)	$1,88 \pm 0,04$
Body Mass Index (kg/m ²)	$24,90 \pm 1,75$
Raucher (%)	12,12
Alkohol (%)	15,15
Bluthochdruck (%)	67,65
Diabetes Mellitus (%)	40,00
KHK (%)	32,35
PAVK (%)	22,86
Insult (%)	20,00
Tumor (%)	37,14

Material und Methoden

Merkmal	Mittelwert \pm SEM
Medikation (%):	
Vitamine	42,42
Phosphatbinder	39,39
ACC	24,24
Eisen	60,61
EPO	60,61
ACE-Hemmer	15,15
Beta-Blocker	48,48
Ca-Antagonisten	18,18
Nitrate	9,09
HMGcoA Reduktase-Hemmer	18,18
Thrombozytenaggregationshemmer	27,27
Diuretika	69,70
Immunsuppressiva	30,30
Hämodialyse-Dauer (Monate)	24 \pm 8
Harnstoff - Reduktionsrate (%)	0,44 \pm 0,03
Dialyse - Dosis (kt/V)	1,02 \pm 0,08
Ultrafiltration (L)	1,76 \pm 0,17
Systolischer Blutdruck (mmHg)	128 \pm 4
Diastolischer Blutdruck (mmHg)	68 \pm 3
Pulsdruck (mmHg)	60 \pm 2
Leukozyten ($10^9/L$)	9,08 \pm 0,71
Erythrozyten ($10^{12}/L$)	3,34 \pm 0,12
Hämoglobin (g/dL)	10,32 \pm 0,35
Hämatokrit (%)	0,31 \pm 0,01
MCV (fL)	91,62 \pm 0,90
MCH (pg)	31,06 \pm 0,35
MPV (fL)	8,46 \pm 0,15
Thrombozyten ($10^9/L$)	227,03 \pm 14,55
GOT (U/L)	30,85 \pm 6,38

Material und Methoden

Merkmal	Mittelwert \pm SEM
GPT (U/L)	26,36 \pm 6,05
Gamma GT (U/L)	118,45 \pm 46,55
Alk. Phosphatase (U/L)	110,33 \pm 26,47
Bilirubin gesamt (μ mol/L)	18,25 \pm 7,97
Glukose (mmol/L)	7,15 \pm 0,50
Cholesterin gesamt (mmol/L)	3,93 \pm 0,21
HDL – Cholesterin (mmol/L)	1,05 \pm 0,07
LDL – Cholesterin (mmol/L)	2,51 \pm 0,13
Triglyceride (mmol/L)	1,98 \pm 0,22
HsCRP (mg/L)	52,48 \pm 10,98
Parathormon (ng/L)	112,33 \pm 26,81
Homocystein (μ mol/L)	19,22 \pm 2,08
Lipoprotein A (mg/L)	340,00 \pm 123,62
Fibrinogen (g/L)	5,30 \pm 0,23
Ferritin (μ g/L)	1849,24 \pm 552,99
Transferrin (g/L)	1,30 \pm 0,07
Eisen (μ mol/L)	12,08 \pm 1,20
Folsäure (μ g/L)	10,70 \pm 4,76
Vitamin B12 (ng/L)	952,45 \pm 234,65
HbA1c (%)	6,32 \pm 0,20
Serum-Kreatinin vor HD (μ mol/L)	513,97 \pm 45,11
Serum-Harnstoff vor HD (mmol/L)	21,58 \pm 1,70
Serum-Harnsäure vor HD (mmol/L)	356,98 \pm 19,48
Serum-Natrium vor HD (mmol/L)	134,55 \pm 0,88
Serum-Kalium vor HD (mmol/L)	4,40 \pm 0,13
Serum-Calcium vor HD (mmol/L)	2,29 \pm 0,05
Serum-Phosphat vor HD (mmol/L)	1,46 \pm 0,10
Gesamt-Eiweiß vor HD (g/L)	61,39 \pm 1,9
Albumin (g/L)	30,77 \pm 1,12

2.3.1 Kontrollgruppen

Desweiteren wurden zwei Kontrollgruppen untersucht. Für die Rhodanesebestimmung ergibt sich eine Gruppe, die sich aus jungen gesunden Probanden (n=20) zusammen setzt, 6 männlichen und 14 weiblichen, welche im Mittel 29 ± 1 Jahre alt (Mittelwert \pm SEM) waren. Mittleres Körpergewicht und mittlere Körpergröße betragen $66,7 \pm 2,7$ kg und $1,75 \pm 0,02$ m, alle Nichtraucher. Das Kriterium 'jung' umschließt Personen deren Alter <55 Jahren ist. Die andere Gruppe umfasst 13 Nieren-gesunde ältere Probanden (>55 Jahre), die sich zu dem Zeitpunkt der Untersuchung in stationärer Behandlung des Klinikum Benjamin Franklin befanden. Von diesen Probanden sind 5 männlich und 8 weiblich. Das mittlere Alter dieser Gruppe ist $69,0 \pm 4$ Jahre. Die Gruppe der älteren Probanden wurde „Healthy control I“ genannt, die der jungen Probanden „Healthy control II“. Für die weiteren Proteinmessungen und Enzymbestimmungen erfolgt die genaue Charakterisierung der untersuchten Kontrollgruppen in den entsprechenden Kapiteln.

2.4 Datenverarbeitung und Statistik

Auswertungen und Berechnungen der erhobenen Daten wurden mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramms Excel und OpenOffice.org Calc 2.3 sowie mit GraphPad Prism 2.01 durchgeführt.

Textverarbeitung erfolgte mit OpenOffice.org writer 2.3, Grafiken wurden unter der Verwendung von Prism, Abbildungen durch OpenOffice.org Draw erstellt.

Die Ergebnisse der Messdaten werden als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

Als statistische Tests wurden der parametrische t-Test sowie der nichtparametrische Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben verwendet. Bei unverbundenen Stichproben kamen der ungepaarte t-Test sowie der nicht-parametrische Mann Whitney-Test zur Anwendung.

Beim Vergleich von mehr als 2 gepaarten Stichproben wurde der nichtparametrische Friedman-Test sowie zusätzlich bei beiden der Dunn's Multiple Comparison Test verwendet. Bei ungepaarten Daten gilt der Kruskal-Wallis-Test. Bei Vorhandensein einer Normalverteilung der Daten wurde auf die Varianzanalyse nach ANOVA zurückgegriffen.

Alle Tests nach Signifikanz sind zweiseitig. Das statistische Signifikanzniveau wurde mit $p < 0,05$ definiert.

Um Zusammenhänge und Kausalitäten zwischen verschiedenen Daten zu beschreiben, wird die Regressionsanalyse verwendet. Hierbei wird der Korrelationskoeffizient nach Pearson, bei Normalverteilung und nach Spearman bei unparametrischen Daten berechnet und die Beziehung grafisch mit der Regressionsgeraden, erstellt durch GraphPad Prism, dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Totale Antioxidative Kapazität TAC

3.1.1 Vergleich Plasmaproben mit Serumproben

Wie schon am Anfang der Arbeit erwähnt wurde, konnte die Totale Antioxidative Kapazität sowohl aus Plasma- als auch aus Serumproben gewonnen werden. Um die Frage zu klären, welches Medium sich für die Bestimmung besser eignet, und ob es eventuell gravierende Unterschiede zwischen beiden gibt, wurden von 21 Probanden sowohl Serum- als auch Plasmaproben aufbereitet und untersucht.

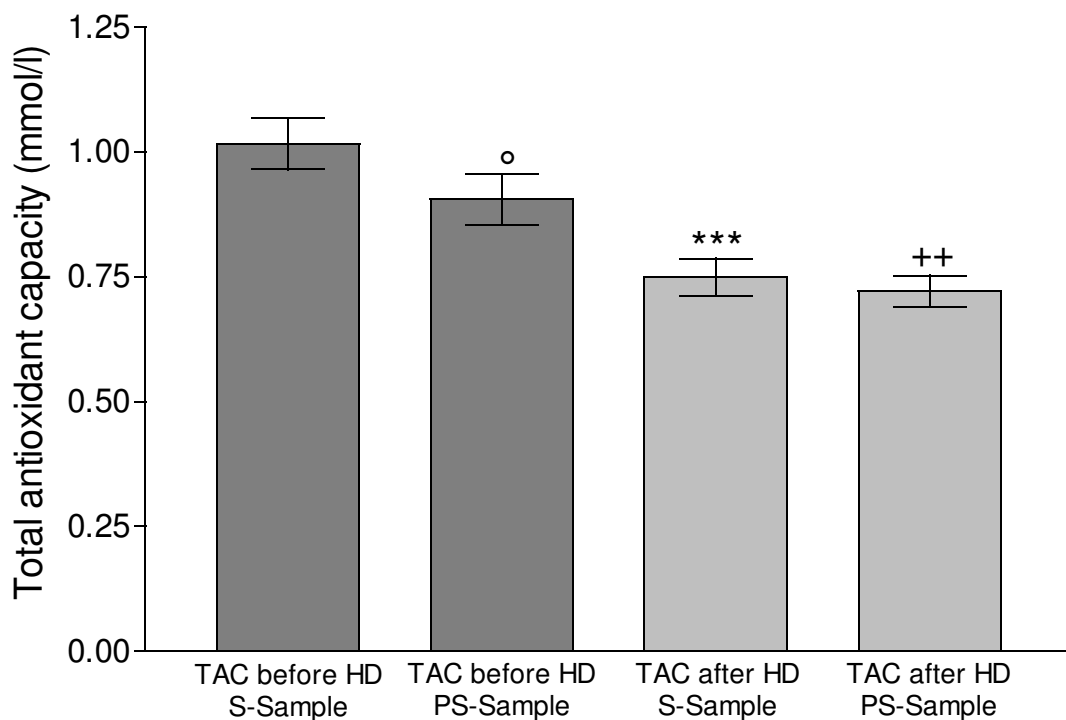


Abbildung 14: Vergleich der Bestimmung der Totalen Antioxidativen Kapazität aus Serum-Proben und Plasma-Proben. (S=Serum; PS=Plasma); °p=0,0246 (Vergleich zwischen S-Proben vor HD und PS-Proben vor HD; ***p=0,0003 (Vergleich der S-Proben vor und nach HD); ++p=0,0039 (Vergleich der PS-Proben vor und nach HD)

Wie aus Abbildung 14 ersichtlich, gibt es quantitativ im Resultat keinen Unterschied, denn bei beiden Ausgangsmaterialien ist im Ergebnis eine signifikante Reduktion der Antioxidantien nach der Dialyse zu verzeichnen. Bei den Serum-Proben liegt die Signifikanz bei $p=0,0003$, bei den Plasma-Proben bei $p=0,0039$ (nach Wilcoxon). Ersichtlich ist auch, dass es einen signifikanten Unterschied gibt, zwischen der TAC der Serum-Probe eines Probanden im Vergleich zu seiner Plasma-Probe, gemessen vor der Dialyse ($p=0,0246$). Kein Unterschied ergab der Vergleich der Serum und Plasma-Proben nach der Dialyse. Nach diesen Ergebnissen, die bereits zu Beginn der Patientenuntersuchungen vorlagen, wurde vor allem im Hinblick auf den Schutz des Patienten vor einer weiteren Blutabnahme entschlossen, Plasmaproben von Patienten und Kontrollprobanden für die Arbeit zu verwenden.

3.1.2 Reproduzierbarkeit der Ergebnisse

Um die Reproduzierbarkeit der einzelnen TAC-Messungen zu untersuchen, wurden Mehrfachmessungen der selben Proben durchgeführt. Insgesamt wurden 5 verschiedene Proben an jeweils 5 unterschiedlichen Zeitpunkten analysiert. Zur Analyse auf Signifikanz wurde der Friedman-Test und der Dunn's Multiple Comparison Test angewendet. Es zeigte sich in keinem Fall ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Wiederholungen der Messungen einer Probe. (Abbildung 15)

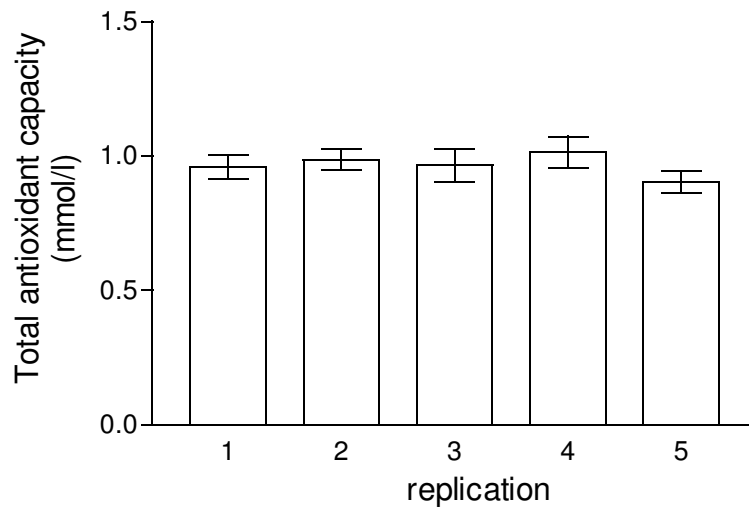


Abbildung 15: Darstellung des Tests auf Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, die durch den TAS-Assay ermittelt wurden. Die Messungen an 5 verschiedenen Zeitpunkten (X-Achse) zeigten keine signifikanten Unterschiede.

3.1.3 TAC vor und nach der Hämodialyse / Vergleich mit der Kontrollgruppe

Mit dem Total Antioxidant Status Assay Kit wurden insgesamt 123 Dialysepatienten, 83 Männer und 37 Frauen untersucht. Die Patienten waren im Durchschnitt $63,75 \pm 1,25$ (Mittelwert \pm SEM) Jahre alt und wurden seit $27,05 \pm 3,55$ Monaten dialysiert, mit einer mittleren Dialysezeit von $3,59 \pm 0,07$ Stunden.

Die Kontrollgruppe, bestehend aus insgesamt 40 Probanden, davon 23 Frauen und 17 Männer, mit einem mittleren Alter von $50,50 \pm 3,64$ Jahren, setzt sich zusammen, aus einer Gruppe von 17 älterer (mittleres Alter $71,29 \pm 3,14$ Jahre) Probanden (Healthy control I) und einer Gruppe von 23 jungen Probanden mit einem mittleren Alter von $31,65 \pm 1,86$ Jahren (Healthy control II). Die Gruppe der Healthy control I unterschied sich im Alter nicht signifikant von den Hämodialysepatienten (ANOVA, Dunn's Multiple Comparison Test, $p > 0,05$).

Die Messung der Totalen Antioxidativen Kapazität im Plasma der Dialysepatienten ergab einen signifikanten Abfall der Antioxidantien nach der Dialyse im Vergleich zu vorher, t-Test $p < 0,0001$. Zu Beginn der Dialyse lag die Konzentration der Antioxidantien im Mittel bei $1,015 \pm 0,021$ mmol/l (Mittelwert \pm SEM), am Ende der Dialyse lag die Konzentration bei $0,743 \pm 0,017$ mmol/l. Der Verlust der antioxidativen Kapazität lag im Durchschnitt bei $0,272 \pm 0,014$ mmol/l. (Abbildung 16)

Im direkten Vergleich der Antioxidantien-Konzentration der Hämodialysepatienten mit der Kontrollgruppe, gab es signifikante Unterschiede sowohl zwischen der TAC zu Beginn der Dialyse und der Gesamtheit aller Kontrollpersonen, als auch im Einzelnen zur Gruppe der Healthy control I und II.

Bei der Gesamtheit der Kontrollen lag die antioxidative Kapazität im Mittel bei $0,762 \pm 0,0344$ mmol/l, wobei die Konzentration bei Healthy control II mit $0,690 \pm 0,026$ mmol/l deutlich ($p = 0,0126$) niedriger lag als bei den älteren Probanden (Healthy control I), bei denen die Konzentration bei $0,860 \pm 0,0668$ mmol/l lag. Die Gesamtheit aller Probanden der Kontrollgruppe hatte eine mit $p < 0,0001$ signifikant niedrigere antioxidative Kapazität als Dialysepatienten vor Beginn einer Dialysebehandlung. Bei den jüngeren Probanden war der Unterschied mit $p < 0,0001$ gravierender als bei den älteren Probanden, die mit $p = 0,0129$ ebenfalls noch eine deutlich niedrigere antioxidative Kapazität aufwiesen (ungepaarter t-Test).

26 der Dialysepatienten waren Raucher, 81 Patienten hatten eine Hypertonie, 9 Patienten gaben an regelmäßig Alkohol zu konsumieren, 43 Patienten hatten eine koronare Herzkrankheit, 24 eine PAVK, 50 Diabetes mellitus. Bei 35 Patienten konnten keine Comorbiditäten ausgemacht werden.

Wenn man die Raucher mit den Nichtraucher hinsichtlich ihrer antioxidativen Kapazität vergleicht, zeigen Raucher tendenziell eine niedrigere Antioxidantien-Konzentration als Nichtraucher. Zu Beginn der Dialyse ist dieser Unterschied mit $p = 0,0918$ nicht signifikant, aber am Ende der Dialyse haben Raucher eine signifikant ($p = 0,0126$ (ungepaarter t-Test)) niedrigere TAC (Abbildung 17). Ähnlich verhält es sich beim Vergleich der Alkohol konsumierenden Patienten (Abbildung 18), bei denen die TAC nach HD ebenfalls signifikant niedriger ist, als bei den Patienten die angaben regelmäßig Alkohol zu konsumieren.

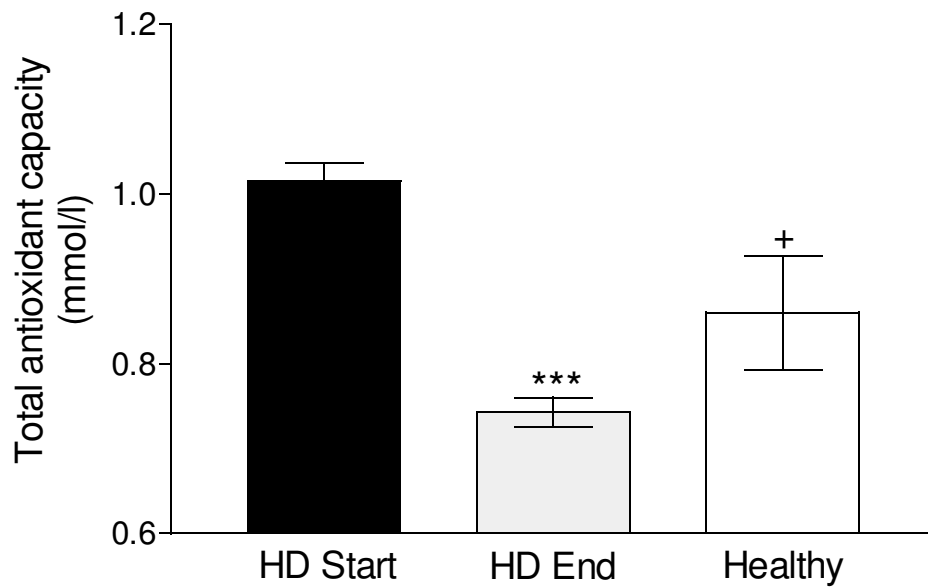


Abbildung 16: Totale Antioxidative Kapazität der Hämodialysepatienten zu Beginn und am Ende der Dialyse im Vergleich zur Kontrollgruppe. *** $p < 0,0001$; + $p = 0,0129$. Healthy steht für Healthy control I.

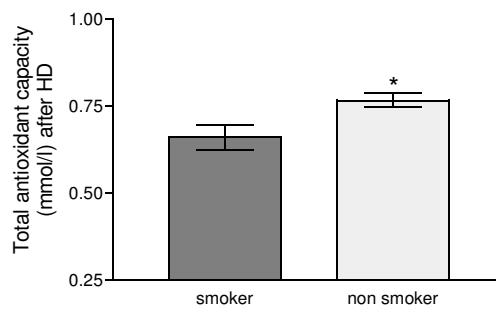


Abbildung 17: Vergleich der Totalen Antioxidativen Kapazität am Ende der Dialyse bei Rauchern und Nichtrauchern. * $p = 0,0191$;
TAC bei 'smoker' nach HD = $0,6604 \pm 0,0358$ mmol/l;
TAC bei 'non smoker' nach HD = $0,7662 \pm 0,0198$ mmol/l.

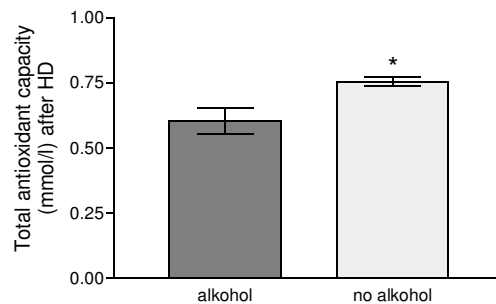


Abbildung 18: Vergleich der Totalen Antioxidativen Kapazität am Ende der Dialyse bei Patienten die angaben Alkohol zu trinken und Patienten, die dies nicht taten. * $p = 0,0240$
TAC bei 'alkohol' nach HD = $0,6044 \pm 0,05025$ mmol/l;
TAC bei 'no alkohol' nach HD = $0,7543 \pm 0,01834$ mmol/l

Abbildung 19 zeigt eine Gegenüberstellung der TAC bei Dialysepatienten mit verschiedenen, zur Niereninsuffizienz und damit Dialysepflichtigkeit führenden Grunderkrankungen. 8 Patienten hatten eine arterielle Hypertonie, 20 Diabetes mellitus, 8 eine Glomerulonephritis, bei 50 Patienten waren verschiedene andere Erkrankungen ursächlich und bei 37 Patienten war die ursächliche Erkrankung unbekannt. Bei Patienten, deren Nierenversagen durch eine arterielle Hypertonie (HT) verursacht ist, findet sich am Ende der Dialyse eine signifikant geringere TAC ($0,7138 \pm 0,0664$ mmol/l), als bei Patienten mit Diab. mell. ($0,7965 \pm 0,0456$ mmol/l) oder einer Glomerulonephritis ($0,8663 \pm 0,0765$ mmol/l) als Grunderkrankung. Im Dunn's Test ergibt sich für den Vergleich der Hypertoniepatienten, mit den an Diabetes mellitus erkrankten Patienten ein signifikanter Unterschied der TAC mit $p < 0,05$, und im Vergleich HT mit Glomerulonephritis mit $p < 0,001$. Patienten mit Diabetes mellitus verlieren signifikant ($p < 0,05$) mehr Antioxidantien als Patienten mit Glomerulonephritis. Der TAC-Verlust bei Diab. Mell.= $0,2895 \pm 0,03398$ mmol/l, der TAC-Verlust bei Glomerulonephritis= $0,2275 \pm 0,04233$ mmol/l.

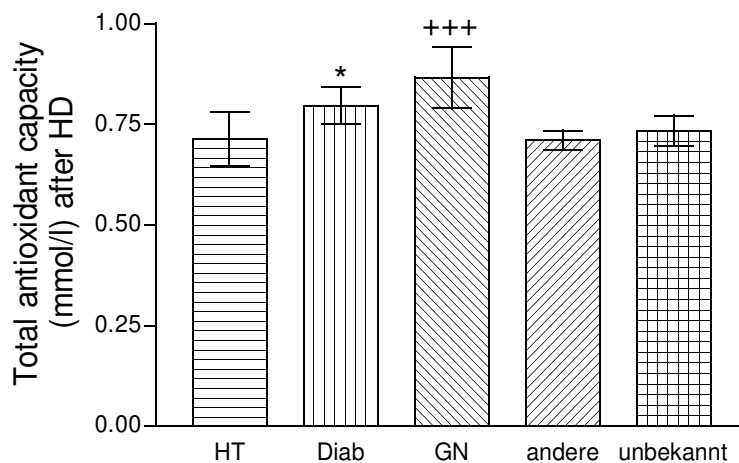


Abbildung 19: Totale Antioxidative Kapazität am Ende der Dialyse bei Patienten mit unterschiedlichen Grunderkrankungen.
 HT: arterielle Hypertonie, Diab.: Diabetes mellitus, GN: Glomerulonephritis.
 * $p < 0,05$ im Vergleich der Hypertoniepatienten mit den Diabetes mellitus Patienten.
 +++ $p < 0,001$ im Vergleich der Hypertoniepatienten mit Patienten, die an einer Glomerulonephritis leiden. (Kruskal-Wallis Test / Dunn's Multiple Comparison Test)

Die folgenden Abbildungen 20 - 22 zeigen, das bei Patienten mit diversen vaskulären Erkrankungen (KHK, pAVK, Z.n. zerebralem Insult) eine tendenziell niedrigere Kapazität der antioxidativen Substanzen vorhanden ist. Dies ist teilweise vor, teilweise erst am Ende der Dialyse erfassbar. Bei Patienten, die zusätzlich an einer pAVK leiden, konnte eine mit $p = 0,025$ signifikant niedrigere TAC nachgewiesen werden (Abbildung 20). Das Geschlecht der Patienten spielte keine wesentliche Rolle.

Ergebnisse

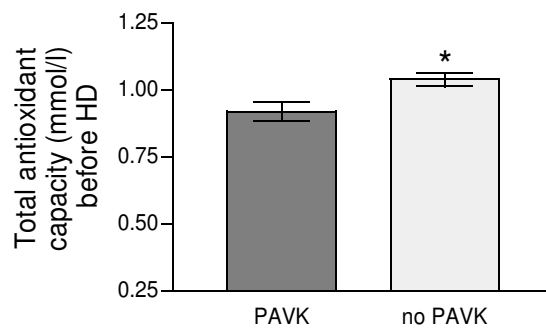


Abbildung 20: Totale Antioxidative Kapazität zu Beginn der Dialyse bei Patienten mit pAVK (n=24) im Vergleich zu Patienten ohne pAVK (n=95). *p=0,0253
TAC bei Patienten mit pAVK 0,9208 ± 0,0349 mmol/l;
TAC bei Patienten ohne pAVK 1,041 ± 0,025 mmol/l;

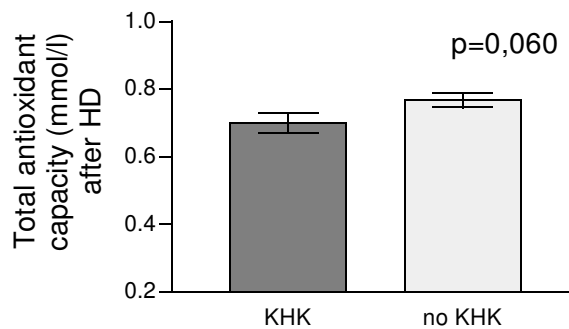


Abbildung 21: Totale Antioxidative Kapazität am Ende der Dialyse bei Patienten mit zusätzlicher KHK und ohne KHK.
TAC bei KHK-Patienten= 0,6988 ± 0,0294 mmol/l;
TAC Patienten ohne KHK= 0,7671 ± 0,0213 mmol/l.

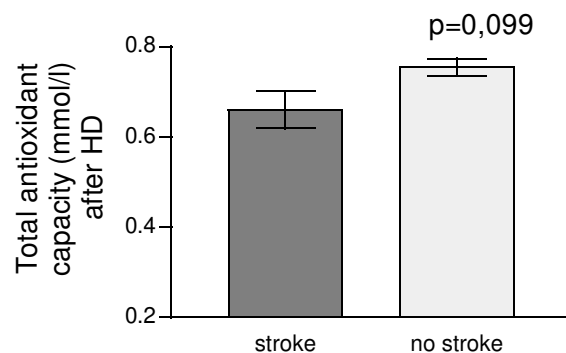


Abbildung 22: Totale Antioxidative Kapazität am Ende der Dialyse bei Patienten die einen zerebralen Insult erlitten haben im Vergleich zu Patienten ohne Insult.
TAC bei Patienten mit Insult= 0,6600 ± 0,0410 mmol/l;
TAC bei Patienten ohne Insult= 0,7529 ± 0,0189 mmol/l.

3.1.4 Veränderungen während der Hämodialyse

Weiterhin wurde die Totale Antioxidative Kapazität im Plasma von 14 Dialysepatienten, 11 Männer und 3 Frauen, zu 6 verschiedenen Zeitpunkten während einer Dialysetherapie gemessen. Dies geschah zu Beginn sowie nach 0,5h, 1h, 2h, 3h und am Ende der Dialyse. Die Patienten waren im Mittel $68,78 \pm 2,47$ Jahre alt.

Im Ergebnis dieser Untersuchung ist erkennbar (Abbildung 23), dass es während einer Dialysebehandlung zu einer stetigen Abnahme der Antioxidantien-Konzentration kommt, die bereits nach 2h signifikant ist ($p < 0,05$).

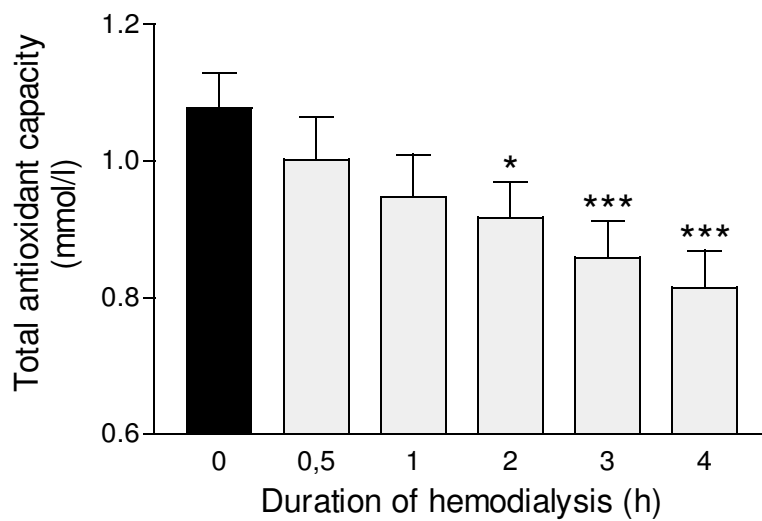


Abbildung 23: Veränderung der Antioxidantien-Konzentration (Y-Achse) während einer Dialysetherapie (X-Achse).

*p (nach 2h) <0,05;

***p (nach 3h) <0,001;

***p (nach 4h) <0,001 (Friedman-Test und Dunn's Multiple Comparison Test)

TAC 0= $1,077 \pm 0,0509$ mmol/l;

TAC 0,5= $1,002 \pm 0,0618$ mmol/l;

TAC 1= $0,9471 \pm 0,0618$ mmol/l;

TAC 2= $0,9171 \pm 0,0521$ mmol/l;

TAC 3= $0,8586 \pm 0,0531$ mmol/l;

TAC 4= $0,8143 \pm 0,0543$ mmol/l

3.1.5 Regressionsanalyse

3.1.5.1 TAC und klinische Chemie

Bei der Totalen Antioxidativen Kapazität (TAC) handelt es sich nicht um eine bestimmte, genau definierte Substanz, vielmehr geht es um eine Vielzahl von Stoffen, die im einzelnen nicht genau erfassbar sind. Einzelnen und zusammen haben sie antioxidative Eigenschaften und können durch den TAS-Assay erfasst werden. Vergleicht man die Ergebnisse des TAS-Assay mit der Paraklinik der jeweiligen Probanden, zeigen sich verschiedene Korrelationen zwischen der antioxidativen Kapazität und der Konzentration bestimmter Serumbestandteile.

Analysiert wurden 110 Dialysepatienten. Diesen wurde zu Beginn des stationären Aufenthaltes in der Nephrologie der Charité Campus Benjamin Franklin, Blut zur Untersuchung zahlreicher Laborparameter abgenommen. Zusätzlich wurde ihnen jeweils vor und nach jeder Dialysebehandlung, zur Bestimmung der TAC, Plasma, sowie zur Bestimmung der klinischen Chemie (Harnstoff, Kreatinin, Calcium, Natrium, Kalium, Phosphat, Eiweiss, Harnsäure), Serum und zur Analyse des Blutbildes, EDTA-Blut abgenommen. In den Untersuchungen zeigte sich, dass die Transaminasen GOT, GPT und gGT, sowie Ferritin, Harnsäure und Kreatinin, als auch HDL und Triglyceride möglicherweise selber antioxidative Eigenschaften besitzen oder auf andere Weise Einfluss auf diese nehmen, beziehungsweise mit der antioxidativen Kapazität in einer anderweitigen Beziehung stehen.

Abbildung 24 und 25 zeigen, dass die Konzentration der Transaminase GOT und die Konzentration der Harnsäure, im Serum der Patienten ermittelt, mit der TAC vor Beginn einer Dialysesitzung kovariieren. Je höher die Serumkonzentration der Transaminasen (dieses gilt ebenso für gGT und GPT), desto höher die Ausgangskonzentration der Antioxidantien. Dabei ergibt sich bei GOT ($29,83 \pm 3,103$ U/l) ein Korrelationskoeffizient nach Pearson von $r=0,3361$ mit einer Wahrscheinlichkeit von $p=0,0003$. Für gGT ($115,1 \pm 22,66$ U/l) ergibt sich $r=0,3717$ mit einer Wahrscheinlichkeit $p<0,0001$ und für GPT ($26,04 \pm 3,083$ U/l) $r=0,3885$ und $p<0,0001$. Für Harnsäure ($379,7 \pm 11,28$ $\mu\text{mol/l}$) ergibt sich mit $p<0,0001$ eine signifikante Korrelation mit der TAC vor HD ($r=0,3594$). Ähnliche Korrelationen zeigten sich beim Vergleich der TAC mit der alk. Phosphatase ($152,2 \pm 33,93$ U/l; $r=0,2028$; $p=0,0344$), Bilirubin gesamt ($15,25 \pm 3,446$ $\mu\text{mol/l}$; $r=0,3411$; $p=0,0005$), Ferritin ($1248 \pm 214,1$ $\mu\text{g/l}$; $r=0,2895$; $p=0,0025$), HDL ($1,06 \pm 0,0406$ mmol/l; $r=-0,2150$; $p=0,0261$), Triglyceride ($2,13 \pm 0,1238$ mmol/l; $r=0,2559$; $p=0,0067$), der Leukozytenkonzentration vor der Dialyse ($8,747 \pm 0,3793$ /nl; $r=0,2291$; $p=0,0122$) sowie der Kreatininkonzentration ($584,4 \pm 23,16$ $\mu\text{mol/l}$; $r=0,2519$; $p=0,0055$).

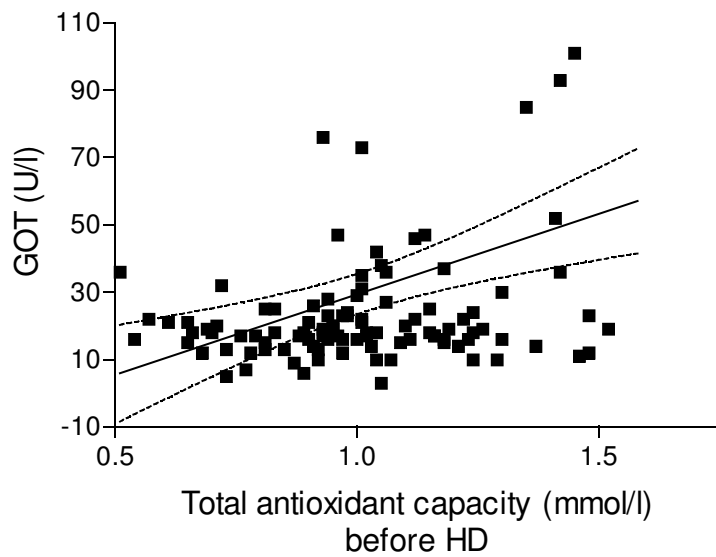


Abbildung 24: Korrelation zwischen der TAC (X-Achse) im Blut von Dialyse Patienten und der Serumkonzentration von GOT (Y-Achse). Die Blutabnahme erfolgte jeweils vor Beginn einer Dialyse. (r=0,3361; p=0,0003)

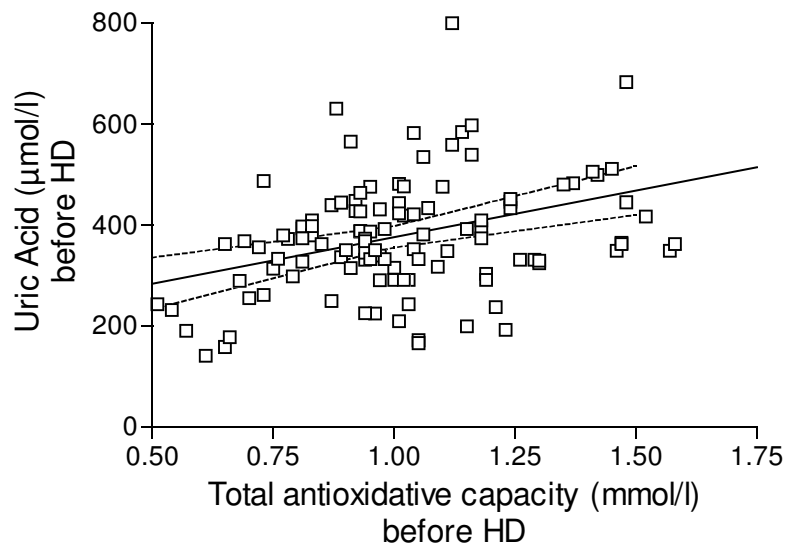


Abbildung 25: Korrelation zwischen der TAC (X-Achse) im Blut von Dialysepatienten und der Serumkonzentration von Harnsäure (Y-Achse). Die Blutabnahme erfolgte jeweils vor Beginn einer Dialyse. (r=0,3594; p<0,0001)

Ergebnisse

Aus den Daten der klinischen Chemie, die ebenfalls vor und nach einer Dialysebehandlung gewonnen wurden, konnte für Kreatinin (Abbildung 26) und Harnsäure (Abbildung 27) bei jeweils 119 Patienten die Differenz der vor und nach Dialyse ermittelten Werte, d.h. der Verlust der jeweiligen Substanz, errechnet, und dieser jeweils der Differenz der TAC gegenüber gestellt werden. Es zeigte sich dabei, dass ein hoher Verlust an Harnsäure mit einem ebenfalls erhöhten Verlust antioxidativer Kapazität einhergeht ($r=0,3340$, $p=0,003$). Auch ein während der Dialyse ermittelter erhöhter Verlust an Kreatinin geht mit einem erhöhten Verlust an Antioxidantien einher ($r=0,2491$, $p=0,0063$).

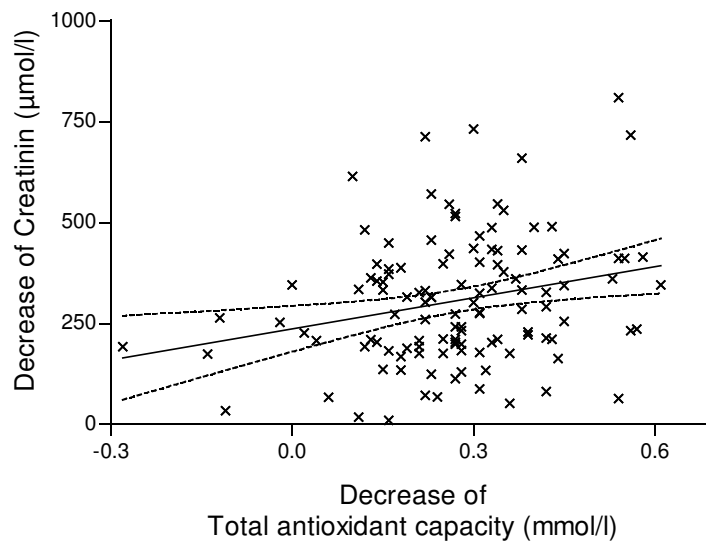


Abbildung 26: Die Abbildung zeigt den Verlust der Kreatinin-Konzentration ($304,6 \pm 14,09 \mu\text{mol/l}$) im Blut der Probanden nach der Dialyse in Korrelation zu dem Verlust an antioxidativer Kapazität ($0,2723 \pm 0,0140 \text{ mmol/l}$) während der Dialyse. ($r=0,2491$, $p=0,0063$).

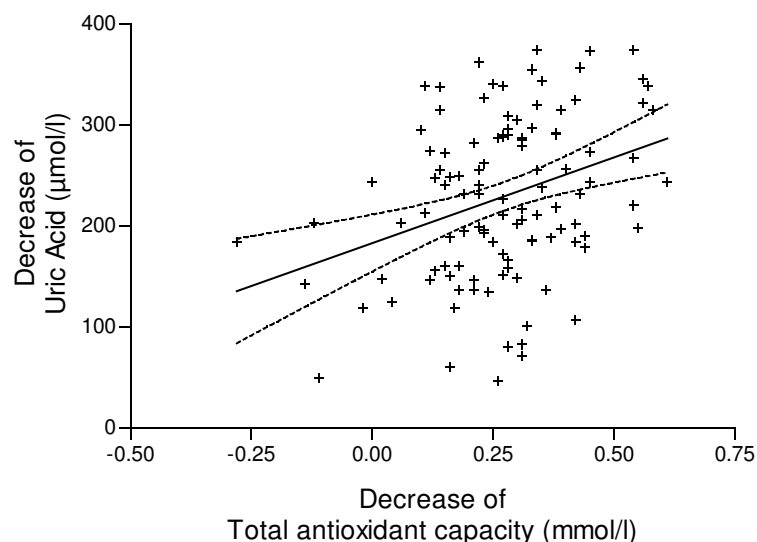


Abbildung 27: Die Abbildung zeigt den Verlust der Harnsäure-Konzentration ($227,8 \pm 7,317 \mu\text{mol/l}$) im Blut der Probanden nach der Dialyse in Korrelation zu dem Verlust an antioxidativer Kapazität ($0,2723 \pm 0,0140 \text{ mmol/l}$) während der Dialyse. ($r=0,3340$, $p=0,003$)

3.1.5.2 TAC und weitere Daten

Aus weiteren von den Patienten erfassten Daten ließen sich folgende Zusammenhänge ableiten. Das Körpergewicht der Patienten ($72,78 \pm 1,534$ kg) korreliert in einem geringen Maße ($r=-0,1933$; $p=0,0385$) invers mit dem Verlust an Antioxidantien unter der Dialyse. Patienten mit einem höheren Körpergewicht scheinen hiernach weniger Antioxidantien während der Dialyse zu verlieren als Patienten mit einem geringeren Körpergewicht.

Der Kt/Veq-Wert ist ein wichtiger patientenspezifischer Parameter zur Bestimmung der Dialyseeffektivität. Bei 112 untersuchten Dialysepatienten (34 Frauen und 78 Männer), im Durchschnitt $63,83 \pm 1,35$ Jahre alt, konnte zwischen der Kt/Veq, die im Mittel bei $1,06 \pm 0,0354$ lag, und dem Verlust der TAC während der Dialyse eine signifikante Korrelation (nach Pearson) beobachtet werden ($r=0,1971$, $p=0,0373$). Abbildung 28 beschreibt den Zusammenhang zwischen der Effektivität der Dialyse (Kt/Veq) und dem Ausmaß des Verlustes an antioxidativer Kapazität. Hieraus wird ersichtlich, dass bei steigender Effektivität in geringem Maße mehr Antioxidantien verloren gehen.

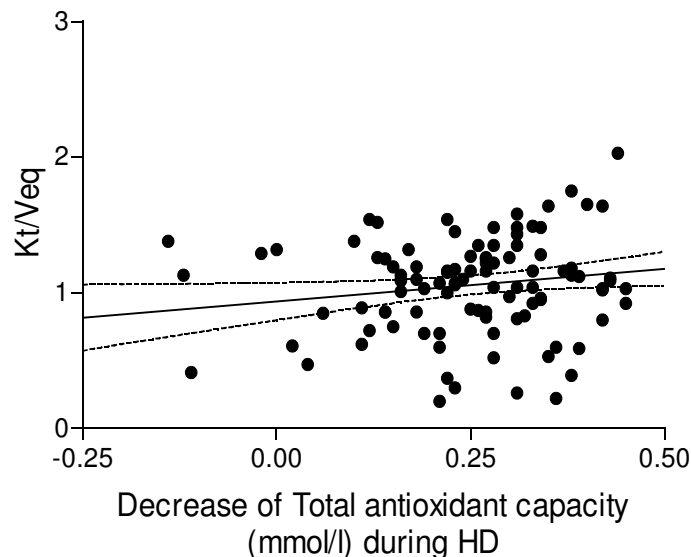


Abbildung 28: Zusammenhang zwischen der Dialyseeffektivität, dargestellt als Kt/Veq (Y-Achse) und dem Verlust an Antioxidantien (X-Achse). ($r=0,1971$; $*p=0,0373$)

Dagegen zeigte sich, dass die Dialysedauer (im Durchschnitt $26,59 \pm 3,441$ Monate), das heißt die Gesamtzeit in der die Patienten dialysepflichtig sind und dialysiert werden, als auch die durchschnittliche Dialysezeit ($3,59 \pm 0,0684$ Stunden) keine Korrelation mit der antioxidativen Kapazität ergibt. Ebenso wenig hat das Alter der Patienten, die Blutdruck- und Pulssituation oder die Gefäßcompliance, ermittelt durch nicht-invasive Pulswellenanalyse, einen signifikanten Einfluss.

3.1.5.3 TAC und Vitamine

Hierbei handelt es sich um Untersuchungen an einer Gruppe bestehend aus 14 Dialysepatienten, 11 Männer und 3 Frauen mit einem mittleren Alter von $68,8 \pm 2,5$ Jahren, bei denen jeweils an 6 aufeinander folgenden Zeitpunkten während der Dialyse Blut abgenommen und bezüglich verschiedener Vitamine, Vitaminvorstufen und Pflanzenfarbstoffen mit antioxidativen Eigenschaften einerseits und der Totalen Antioxidativen Kapazität andererseits analysiert wurde. Somit ergaben sich insgesamt circa 80 Datenpaare.

Die Untersuchung zeigte unter anderem, dass es während eines Dialysevorganges zu einer signifikanten Zunahme von α -Tocopherol kommt ($p=0,0353$, Wilcoxon Test). Die Konzentration steigt von $9,841 \pm 0,5037 \mu\text{g/ml}$ zu Beginn der Dialyse auf $10,69 \pm 0,6826 \mu\text{g/ml}$ am Ende der Dialyse. Die Konzentration von α -Tocopherol im Serum der Dialysepatienten korreliert nach Spearman signifikant mit der TAC (Korrelationskoeffizient $r=0,3476$, $p=0,0016$), siehe Abbildung 29. Betrachtet man nur die Werte vor und nach der Dialyse, ergibt sich eine signifikante Korrelation der TAC vor Dialyse mit der α -Tocopherol-Konzentration vor Dialyse ($r=0,7008$; $p=0,0052$, nach Spearman). Nach der Dialyse ist die Korrelation aufgehoben.

Ebenfalls signifikant korrelierte die TAC während der Dialyse mit der gleichzeitig gemessenen Konzentration verschiedener Carotinoide. Die Gesamtheit aller Carotinoide korreliert mit einem Korrelationskoeffizient nach Spearman $r=0,5703$ und einer Wahrscheinlichkeit $p<0,0001$ signifikant. Im einzelnen handelt es sich um Lutein ($r=0,4861$; $p<0,0001$), Zeaxanthin ($r=0,6256$; $p<0,0001$, Abbildung 30), Canthaxanthin ($r=0,3046$; $p=0,0060$), β -Cryptoxanthin ($r=0,6537$; $p<0,0001$), α -Carotin ($r=0,2287$; $p=0,0413$), β -Carotin ($r=0,5127$; $p<0,0001$), Lycopin ($r=0,3885$; $p=0,0004$) und Cholesterol ($r=0,4587$; $p<0,0001$). Keine signifikante Korrelation fand sich mit Retinol (Vitamin A_1). Die Gesamtheit der Carotinoide steigt unter der Dialyse von $0,2133 \pm 0,03987 \mu\text{g/ml}$ auf $0,2429 \pm 0,03661 \mu\text{g/ml}$ signifikant an ($p=0,0067$, Wilcoxon Test). Im einzelnen sind die ansteigenden Carotinoide: Lutein, Retinol, Cryptoxanthin, Lycopin, α -Carotin und β -Carotin. Zudem kommt es auch bei Cholesterol zu einem signifikanten ($p=0,0031$) Anstieg von $171,9 \pm 7,717 \text{ mg/dl}$ auf $193,8 \pm 10,56 \text{ mg/dl}$. Die Konzentration der TAC nahm während der Dialyse signifikant ab (siehe Kapitel 3.1.3).

Die Zunahme der Carotinoide korreliert signifikant mit der Abnahme der TAC während der Dialyse. ($r=0,6249$; $p=0,0169$; nach Spearman). In der Einzelbetrachtung trifft dies für β -Carotin (Abbildung 31) und Lutein (Abbildung 32) zu.

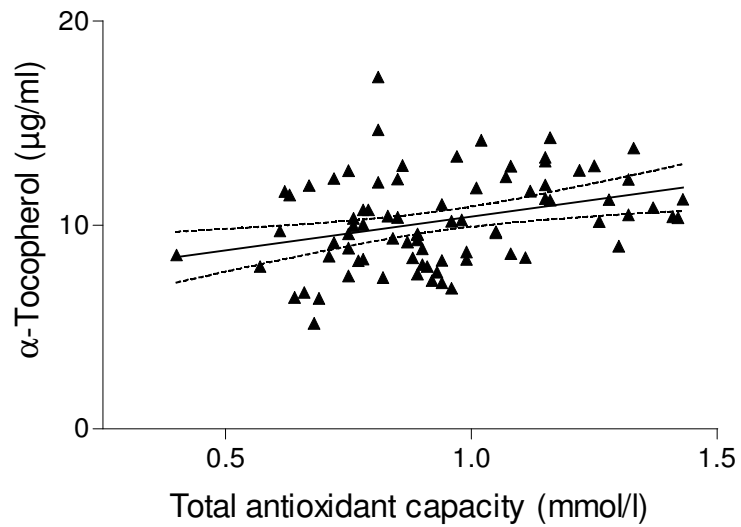


Abbildung 29: Korrelation und Regression zwischen der α -Tocopherol-Konzentration (Y-Achse) und der TAC (X-Achse) im Plasma von Dialysepatienten während einer Dialysebehandlung. ($r=0,3476$, $**p=0,0016$)

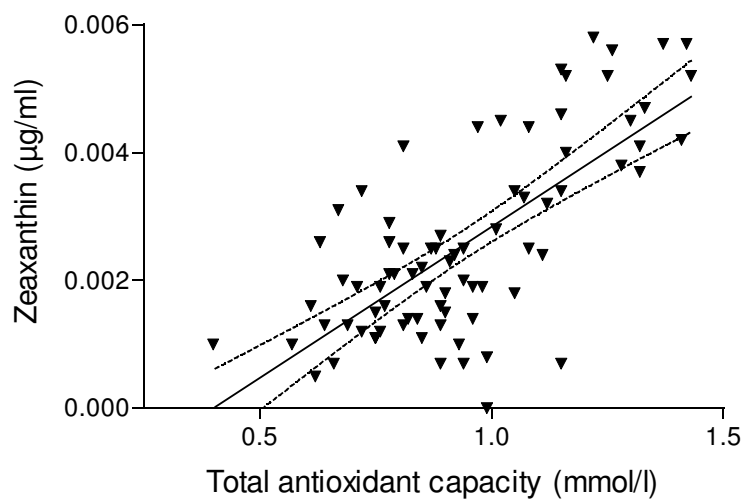


Abbildung 30: Korrelation zwischen der Konzentration von Zeaxanthin (Y-Achse) und der TAC (X-Achse) bei Dialysepatienten, untersucht an verschiedenen Zeitpunkten während einer Dialysebehandlung. ($r=0,6256$, $***p<0,0001$)

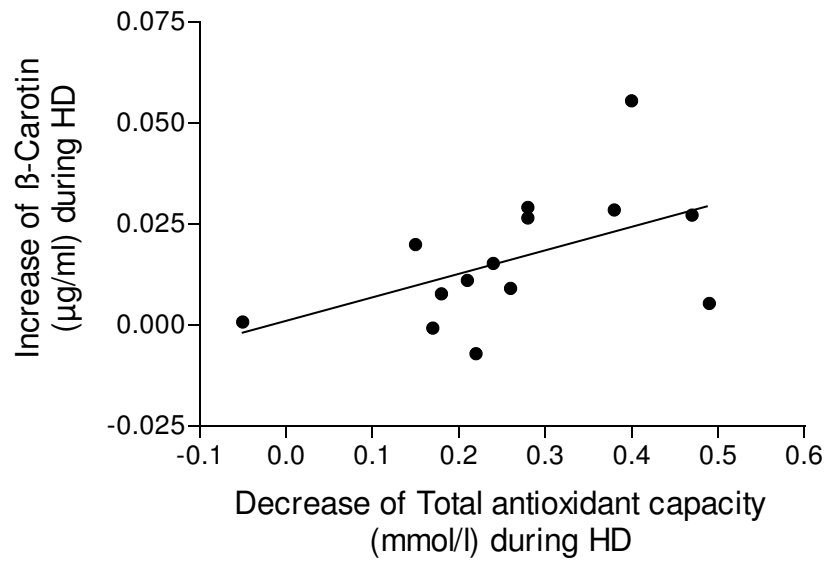


Abbildung 31: Korrelation der Zunahme der β -Carotin-Konzentration während der Dialyse (Y-Achse) und der Abnahme der Totalen Antioxidativen Kapazität (X-Achse). Die Werte entsprechen jeweils der Differenz aus den vor und nach der Dialyse ermittelten Konzentrationen. Der Korrelationskoeffizient nach Spearman $r=0,5369$, die Wahrscheinlichkeit $*p=0,0478$.

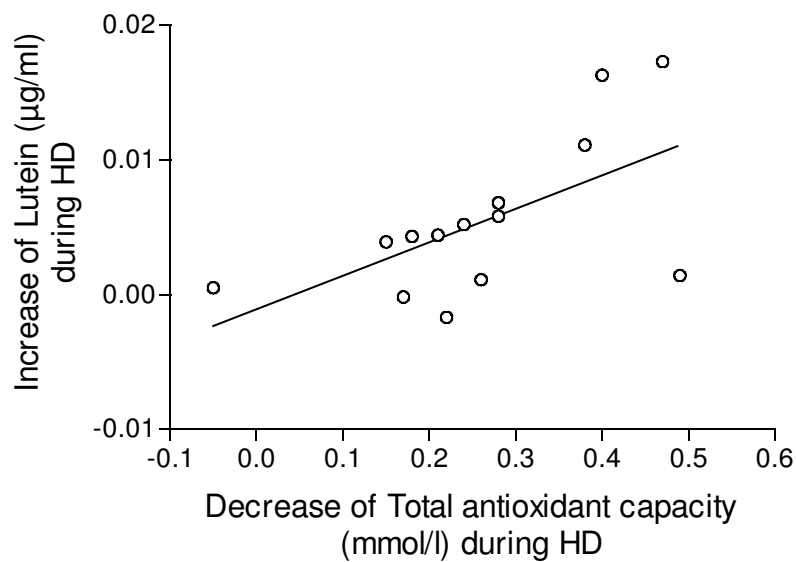


Abbildung 32: Korrelation der Zunahme der Lutein-Konzentration während der Dialyse (Y-Achse) und der Abnahme der Totalen Antioxidativen Kapazität (X-Achse). Die Werte entsprechen jeweils der Differenz aus den vor und nach der Dialyse ermittelten Konzentrationen. Der Korrelationskoeffizient nach Spearman $r=0,6249$, die Wahrscheinlichkeit $*p=0,0169$.

3.2 In-Cell Western

3.2.1 Rhodanese

3.2.1.1 Veränderungen durch die Dialyse

Bei 36 Dialysepatienten, 26 Männer und 10 Frauen, wurde in den, aus dem Vollblut gewonnenen Monozyten jeweils vor und nach der Dialyse die intrazellulären Konzentrationen von Rhodanese und dem Referenzprotein Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) bestimmt. Die Patienten waren im Durchschnitt $67,56 \pm 1,635$ Jahre alt. 4 der Dialysepatienten waren Raucher, 5 gaben an, übermäßig Alkohol zu sich zu nehmen. Als Komorbidität konnte bei 23 Patienten eine arterielle Hypertonie nachgewiesen werden, bei 14 Diabetes mellitus, bei 11 KHK, bei 8 pAVK und bei 13 eine Tumorerkrankung. Zusätzlich wurde die Rhodanese-Konzentration in zwei Kontrollgruppen, die jeweils aus Nieren-gesunden Probanden bestehen, bestimmt. Dabei handelt es sich zum einen um eine Gruppe von 13 Probanden (5 Männer, 8 Frauen), mit einem Durchschnittsalter von $69,46 \pm 4,47$ Jahren (Healthy Control I), und zum anderen um eine Gruppe bestehend aus 20 Probanden (6 Männer und 14 Frauen), die im Durchschnitt $29,35 \pm 1,493$ Jahre alt waren (Healthy Control II). Zusammengefasst ergibt sich eine Kontrollgruppe von 33 Probanden (Healthy Control I+II), 11 Männer und 22 Frauen, die im Durchschnitt $45,15 \pm 3,97$ Jahre alt sind.

In Abbildung 33 findet sich eine grafische Darstellung der Veränderungen der Konzentration von Rhodanese, nach Korrektur durch das Referenzprotein GAPDH, durch die Dialyse. Die 36 untersuchten Patienten hatten zu Beginn der Dialyse eine Rhodanese-Konzentration von $0,3830 \pm 0,01260$ arbitrary units zum Ende $0,4089 \pm 0,01468$ arbitrary units (Mittelwert \pm SEM). Es kommt zu einem signifikanten ($p=0,0443$ t-Test) Anstieg von Rhodanese zum Ende der Dialyse.

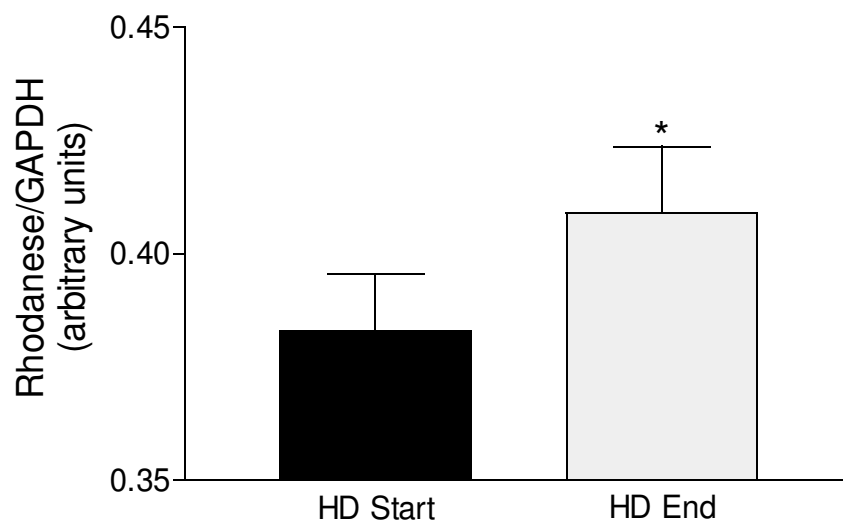


Abbildung 33: Veränderung der Konzentration von Rhodanese/GAPDH, gemessen zu Beginn (HD Start) und am Ende der Dialyse (HD End). Mit $*p=0,0443$ signifikanter Anstieg der Konzentration nach der Dialyse.

3.2.1.2 Vergleich der Hämodialyse-Patienten mit den Kontrollgruppen

Beim Vergleich der Ergebnisse der Dialysepatienten mit den Kontrollen muss, auf Grund der sehr unterschiedlichen Altersstruktur, zwischen der Gruppe der Healthy control I und der Healthy control II unterschieden werden. Bei der Gruppe der Healthy control II handelt es sich um sehr junge Probanden, die sich im Alter mit $p < 0,0001$ deutlich von den Dialysepatienten unterscheiden. Auch beide Gruppen zusammengenommen haben ein deutlich geringeres Durchschnittsalter als die Patienten ($p < 0,0001$). Bei den Probanden der Healthy control I gibt es keinen signifikanten Unterschied zu den Dialysepatienten bezüglich des Alters, sodass diese Gruppe zum direkten Vergleich von Dialysepatienten mit gesunden Kontrollen herangezogen wird.

Abbildung 34 ist eine Darstellung der Ergebnisse der Rhodanesemessungen sowohl bei Dialysepatienten als auch bei den verschiedenen Kontrollgruppen. Bei den 20 Probanden der Healthy control II ergab sich im Mittel eine Rhodanese-Konzentration von $0,4284 \pm 0,01975$ arbitrary units. Diese ist mit $p = 0,0476$ (ungepaarter t-Test) signifikant höher als die initiale Konzentration bei den Dialysepatienten ($0,3830 \pm 0,01260$ arbitrary units). Keine signifikanten ($p = 0,8622$) Unterschiede ergab der Vergleich der Dialysegruppe und der Healthy control I, bei denen die Konzentration bei $0,3787 \pm 0,02084$ arbitrary units lag, sowie im Vergleich der Gesamtheit aller Kontrollen ($0,4088 \pm 0,01493$ arbitrary units) mit der Dialysegruppe ($p = 0,1881$). Auch die grafisch in der Abbildung ersichtliche höhere Konzentration bei der Healthy control I im Vergleich zur Healthy control II ist nicht signifikant ($p = 0,1050$).

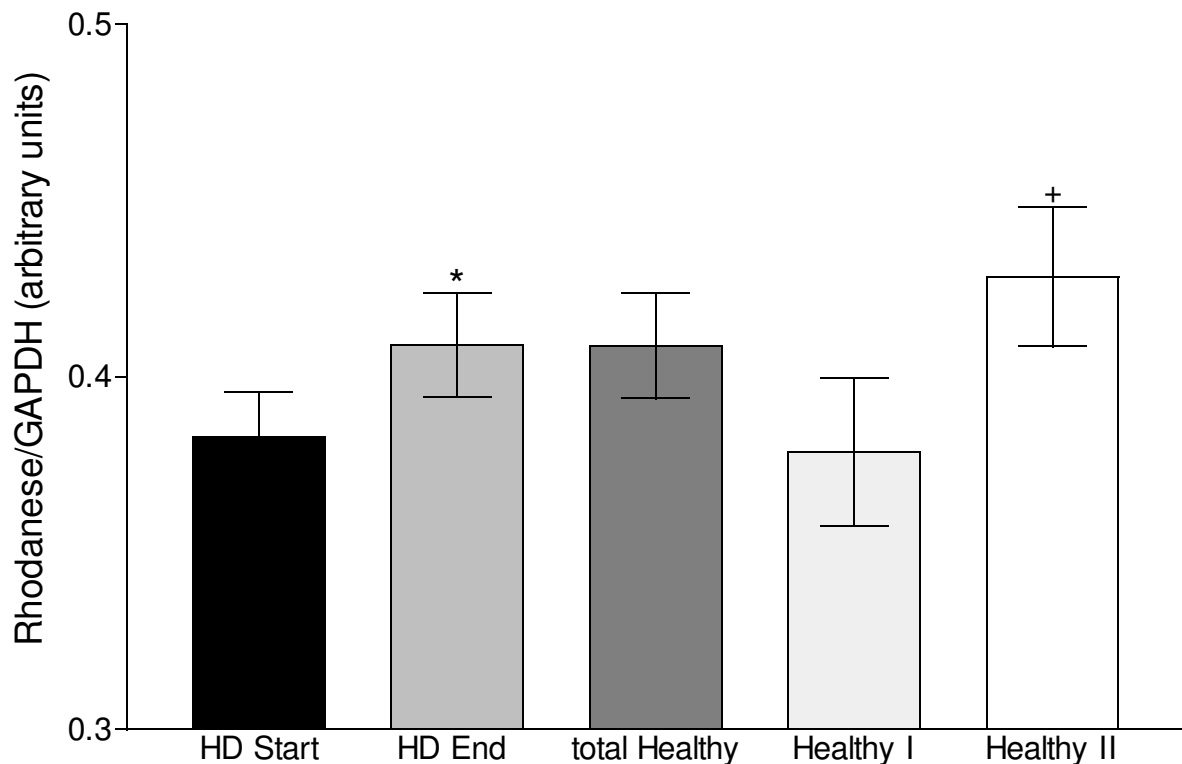


Abbildung 34: Grafische Darstellung der Konzentration von Rhodanese/GAPDH (Y-Achse) bei Dialysepatienten und den Kontrollgruppen.

* $p=0,0443$ bezieht sich auf den Vergleich HD End zu HD Start.

+ $p=0,0476$ entspricht einem signifikanten Unterschied zwischen der Rhodanese-Konzentration der Dialysepatienten vor der Dialyse (HD Start) und der Healthy control II (Kontrollgruppe junger Probanden.)

Der Unterschied zwischen HD End und Healthy control I ist mit $p=0,2774$ nicht signifikant.

Der Vergleich von Healthy control I und Healthy control II ist mit $p=0,1050$ ebenfalls nicht signifikant verschieden.

Untersucht wurde des weiteren, ob sich das Geschlecht oder Eigenschaften der Probanden (rauchen, Alkohol trinken), vorhandene Komorbiditäten (art. Hypertonie, Diabetes mell., KHK, pAVK, Insult, Tumor) oder die Einnahme von Medikamenten (Vitamine, Phosphatbinder, ACC, Erythropoetin, Eisen, ACE-Hemmer, Beta Blocker, Calciumkanalantagonisten, Cholesterinsynthesehemmer, Nitrate, ASS, Diuretika, Immunsuppressiva) auf die Rhodanese-Konzentration auswirken. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden. Es zeigt sich lediglich, dass die Gruppe der Alkohol trinkenden Probanden (5 Patienten) vor der Dialyse eine deutlich aber nicht signifikant ($p=0,0536$, ungepaarter t-Test) niedrigere Rhodanese-Konzentration ($0,3248 \pm 0,0232$ arbitrary units) aufwies als die 28 Probanden, die keinen Alkohol trinken ($0,3840 \pm 0,0117$ arbitrary units).

3.2.1.3 Regressionsanalyse

In der Gegenüberstellung der Ergebnisse der Rhodanesemessungen mit den von den untersuchten Patienten zusätzlich erhobenen klinischen Parametern (Tabelle 1) sowie mit den, im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten der antioxidativen Kapazität TAC, zeigte sich die in Abbildung 35 dargestellte Korrelation mit der Fibrinogen-Konzentration der Dialysepatienten. Die Konzentration von Fibrinogen lag bei den 27 untersuchten Probanden im Durchschnitt bei $5,296 \pm 0,2327 \mu\text{mol/l}$. Mit einem Korrelationskoeffizient $r=-0,4311$ (Pearson) und $p=0,0248$ ergibt sich eine signifikante negative Korrelation der Rhodanese-Konzentration vor HD mit der Fibrinogen-Konzentration. Ein ähnliches Ergebnis zeigt die Regressionsanalyse der Fibrinogen-Konzentration und der Rhodanese-Konzentration nach HD ($r=-0,4290$, $p=0,0256$).

In Abbildung 36 und Abbildung 37 wird die durch Regressionsanalyse ermittelte Abhängigkeit der Rhodanese-Konzentration von der Totalen Antioxidativen Kapazität ersichtlich. Grundlage dafür waren die Daten von 32 Dialysepatienten (23 Männern und 9 Frauen) die im Durchschnitt $66,69 \pm 1,75$ Jahre (Mittelwert \pm SEM) alt waren und $24,33 \pm 8,30$ Monate mit Dialyse behandelt wurden. Durch das Verfahren der Immunodetektion wurden die intrazellulären Rhodanese-Konzentrationen (vor HD= $0,3811 \pm 0,0140$ arbitrary units, nach HD= $0,4108 \pm 0,01631$ arbitrary units) und durch den Total Antioxidant Status Assay Kit die Totale Antioxidative Kapazität (vor HD= $0,9938 \pm 0,0389$ mmol/l, nach HD= $0,6938 \pm 0,0337$ mmol/l) ermittelt und in Korrelation zu einander gestellt. Die Konzentration von Rhodanese vor einer Dialysebehandlung korreliert mit der TAC vor HD ($r=0,3848$, $p=0,0297$) und mit der TAC nach HD ($r=0,6056$, $p=0,0002$). Außerdem korreliert auch die nach der Dialyse gemessene Rhodanese-Konzentration mit der TAC vor HD ($r=0,4518$, $p=0,0094$) und nach HD ($r=0,5458$, $p=0,0012$). Dabei sind alle Korrelationen signifikant.

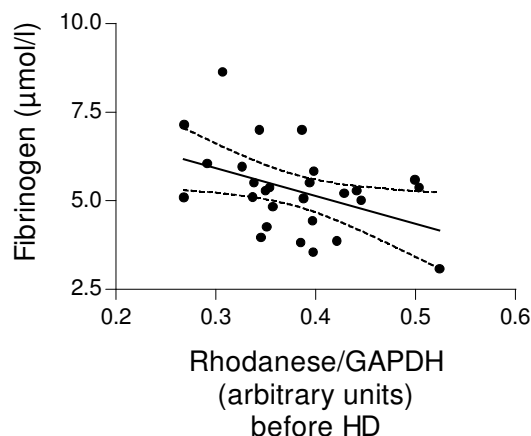


Abbildung 35: Grafische Darstellung der negativen Korrelation der Fibrinogen-Konzentration bei Dialysepatienten mit der vor der Dialyse ermittelten Konzentration von Rhodanese.
($r=-0,4311$, $p=0,0248$)

Ergebnisse

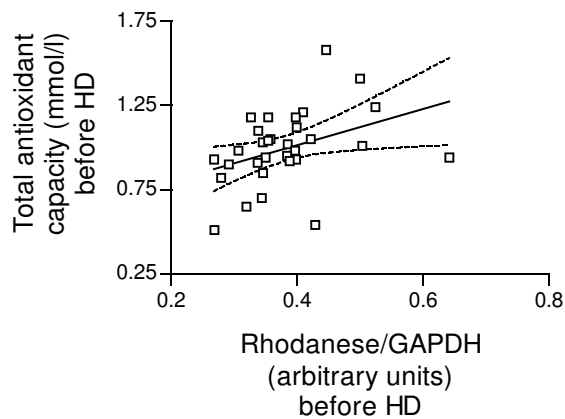


Abbildung 36: Korrelation der Rhodanese-Konzentration in Monozyten mit der Totalen Antioxidativen Kapazität des Plasmas. Beide Werte wurden vor der Dialyse bestimmt. Die Korrelation ist nach Pearson signifikant. ($r=0,3848$, $p=0,0297$)

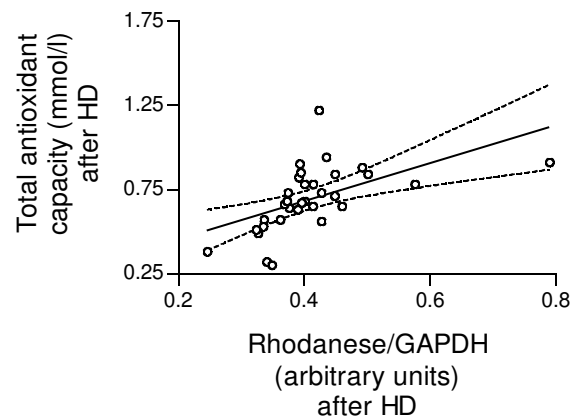


Abbildung 37: Korrelation der nach der Dialyse bestimmten Konzentrationen von Rhodanese in Monozyten mit der TAC im Plasma der Patienten. Die Korrelation ist nach Pearson signifikant. ($r=0,5458$, $p=0,0012$)

Im Rahmen weiterer, in unserer Arbeitsgruppe entstandener Dissertationen, wurden von Dialysepatienten Gefäßmessungen mittels eines HDI/Pulswave cardiovascular profiling instrument durchgeführt. Aus den Ergebnissen der Pulswellenmessungen konnten unter anderem der Index der Elastizität der großen Gefäße ($C1$ in $\text{ml/mmHg} \times 10$) und der Index der Elastizität der kleinen Gefäße ($C2$ in $\text{ml/mmHg} \times 100$) bestimmt werden. Diese Werte charakterisieren die Gefäß-Compliance, welche wiederum Aussagen über die Beschaffenheit der Gefäßwand zulässt. Strukturelle Veränderungen der Gefäßwände, wie bei Arteriosklerose oder arterieller Hypertonie, gehen mit einer Abnahme der Gefäß-Compliance und Zunahme der Steifigkeit einher. Die Gefäßsteifigkeit Arterial Stiffness $S1$ (Arterial Stiffness der großen Gefäße in mmHg/ml) und $S2$ (Arterial Stiffness der kleinen Gefäße in mmHg/ml) berechnet sich wie folgt: $S1=10/C1$, $S2=100/C2$.

Von 26 Dialysepatienten, aus deren Monozyten die Konzentration von Rhodanese durch Immunodetektion gemessen wurde, lagen zusätzlich Ergebnisse aus Gefäßmessungen vor. Die Patienten (19 Männer und 7 Frauen) waren im Mittel $67,19 \pm 2,06$ Jahre alt und $19,44 \pm 7,54$ Monate in der Dialysetherapie. Von den Patienten waren 3 Raucher, 16 wiesen eine arterielle Hypertonie auf, 9 Diabetes mellitus, 6 KHK. Bei den Patienten kam es zu einem signifikanten Anstieg der Rhodanese-Konzentration am Ende der Dialyse ($p=0,0294$ (t-Test), Rhodanese vor HD= $0,3958 \pm 0,0156$ arbitrary units, nach HD= $0,4327 \pm 0,01759$ arbitrary units). Die Parameter $C1, C2, S1$ und $S2$ aus den Gefäßmessungen wurden bei diesen Patienten ebenfalls am Start und am Ende der Dialyse ermittelt. Bei $C1$ ergab sich mit $p=0,0095$ (paired t-Test) ein signifikanter Abfall der Elastizität. Die Ergebnisse für $C1$ vor HD= $10,17 \pm 0,7901$ $\text{ml/mmHg} \times 10$ und $C1$ nach HD= $9,255 \pm 0,7796$ $\text{ml/mmHg} \times 10$. Die entsprechende Arterial Stiffness $S1$ zeigte einen signifikanten ($p=0,0074$) Anstieg nach der Dialyse. ($S1$ vor HD= $1,218 \pm 0,1410$ mmHg/ml , $S1$ nach HD= $1,266 \pm 0,1171$ mmHg/ml). Bei der Elastizität $C2$ der kleinen Gefäße zeigte sich mit $C2$ vor HD= $4,200 \pm 0,4842$ $\text{ml/mmHg} \times 100$ und $C2$ nach HD= $3,618 \pm 0,1171$ $\text{ml/mmHg} \times 100$ ein tendenzieller Abfall, der jedoch im Paired t-Test mit $p=0,1856$ nicht signifikant war. Die Arterial Stiffness $S2$ der kleinen Gefäße war mit $p=0,0413$ dagegen signifikant höher, im Vergleich Ende Dialyse zu Start der Dialyse. ($S2$ vor HD= $35,34 \pm 5,002$ mmHg/ml , $S2$ nach HD= $36,02 \pm 3,759$ mmHg/ml .)

Abbildung 38 zeigt die Abhängigkeit der Rhodanese-Konzentration, gemessen zu Beginn der Dialyse, von der Elastizität der kleinen Gefäße C2, gemessen ebenfalls zu Beginn der Dialyse. Es zeigte sich eine signifikante ($p=0,0298$) Korrelation (Pearson-Korrelationskoeffizient $r=0,4265$)

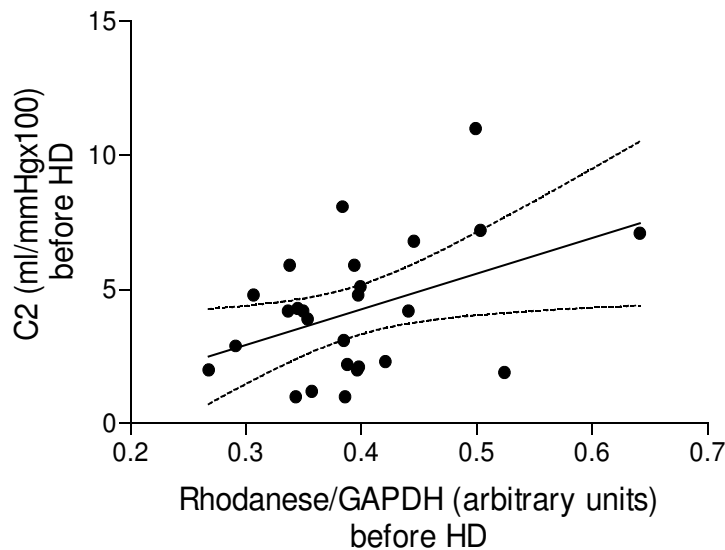


Abbildung 38: Korrelation der Rhodanese-Konzentration vor HD mit der Gefäßelastizität der kleinen Gefäße C2 vor HD. * $p=0,0298$, $r=0,4265$

Bei C1, S1 und S2 zeigten sich keine weiteren Korrelationen. Da sich der S2-Wert aus dem C2-Wert ergibt, wurde auch ein entsprechenden Zusammenhang zwischen S2 und Rhodanese erwartet. Nach dem Logarithmieren sowohl der C2- als auch der S2-Werte und der anschließenden Regressionsanalyse, zeigte sich jeweils eine mit $p=0,0914$, im Signifikanzintervall $p<0,1$ signifikante Korrelation von $\log C2$ und $\log S2$ vor HD mit der Rhodanese-Konzentration vor HD. Diese korrelierte bei $\log C2$ mit $r=0,3378$ positiv und bei $\log S2$ mit $r=-0,3378$ negativ (Korrelation nach Pearson). Dargestellt sind die Korrelationen in Abbildung 39 und 40. Betrachtet man diese Werte jedoch mit dem Hintergrund eines Signifikanzintervalles von $p<0,05$ sind diese Korrelationen als nicht signifikant anzusehen.

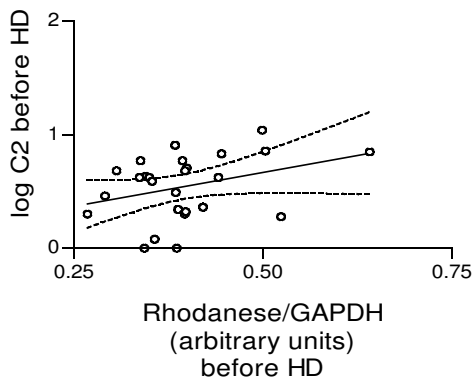


Abbildung 39: Korrelation der Rhodanese-Konzentration vor HD mit dem Logarithmus von C2 vor HD. $r=0,3378$, $p=0,0914$ ($p<0,1$)

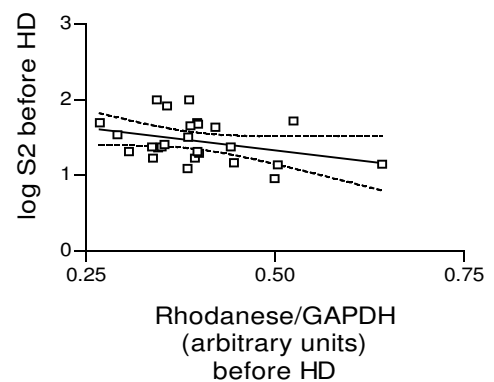


Abbildung 40: Korrelation der Rhodanese-Konzentration vor HD mit dem Logarithmus von S2 vor HD. ($r=-0,3378$, $p=0,0914$ ($p<0,1$))

3.2.2 nNOS

Die Untersuchung des Proteins nNOS wurde bei 27 Hämodialysepatienten, 17 Männern und 10 Frauen, durchgeführt. Ermittelt wurde die intrazelluläre Konzentration von nNOS mittels Monozytenisolierung und In-Cell Western. Als Referenzprotein diente Beta-Actin.

Die Patienten waren im Durchschnitt $68,00 \pm 1,61$ Jahre alt und seit $19,16 \pm 7,49$ Monaten in der Dialysebehandlung bei einer durchschnittlichen Dialysezeit von $3,48 \pm 0,15$ Stunden. Die weitere klinische Befragung ergab, dass einer der Patienten Raucher war und 4 Alkoholiker. Als Komorbidität traten bei 16 Patienten arterielle Hypertonie auf, bei 10 Diabetes mellitus, bei 8 KHK, bei 4 eine pAVK und bei 10 eine Tumorerkrankung. Von den Patienten nahmen 17 regelmäßig Diuretika ein, 11 Beta Blocker, 16 Eisenpräparate.

Weiterhin wurden 2 Gruppen als Kontrollen untersucht. Zum einen die Gruppe der Healthy control I bestehend aus 11 Probanden mit einem mittleren Alter von $67,273 \pm 5,37$ Jahren, von denen 4 männlich und 7 weiblich sind. Diese Gruppe ist von der Altersstruktur mit der Gruppe der Dialysepatienten vergleichbar. Die zweite Gruppe, Healthy control II, besteht aus 21 jungen Probanden (mittleres Alter $30,429 \pm 1,59$ Jahre), von denen 6 männlich und 15 weiblich sind.

3.2.2.1 Veränderungen durch die Dialyse und Vergleich mit gesunden Kontrollpersonen

Die Messungen ergaben, nach Korrektur durch das Referenzprotein Beta-Actin, eine nNOS-Konzentration vor HD von $3,838 \pm 0,4937$ arbitrary units, nach HD von $5,221 \pm 0,8847$ arbitrary units. Im Vergleich ergibt sich damit ein signifikanter Anstieg von nNOS zum Ende der Dialyse ($p=0,0120$ nach Wilcoxon). (Abbildung 41)

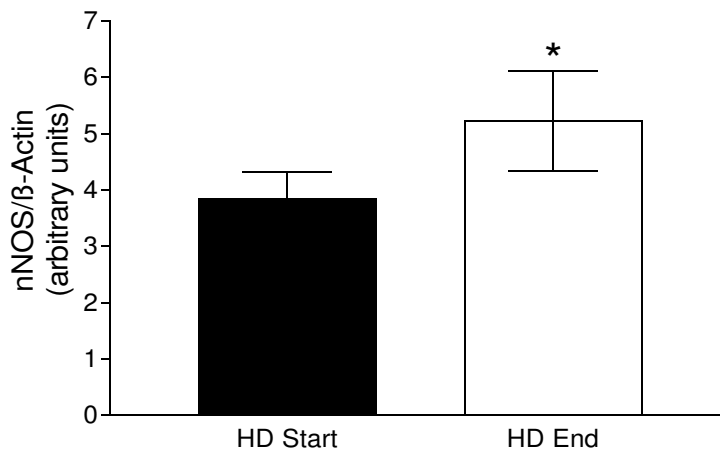


Abbildung 41: Grafische Darstellung der intrazellulären Konzentration des Proteins nNOS/β-Actin (Y-Achse), gemessen in Monozyten, vor und nach einer Dialysebehandlung.

* $p=0,0120$ nach Wilcoxon.

Ergebnisse

Bei der hinsichtlich des Alters passenden Kontrollgruppe der Healthy control I lag die nNOS-Konzentration im Durchschnitt bei $4,566 \pm 0,6417$ arbitrary units und war mit $p=0,0598$ (Mann Whitney U Test) nicht signifikant aber tendenziell höher als die nNOS-Konzentration vor HD. Die Gruppe Healthy control II hatte im Durchschnitt eine nNOS-Konzentration von $4,677 \pm 0,6306$ arbitrary units. Mit $p=0,1905$ zeigte sich kein signifikanter Unterschied zur nNOS-Ausgangskonzentration bei den Dialysepatienten. (Abbildung 42)

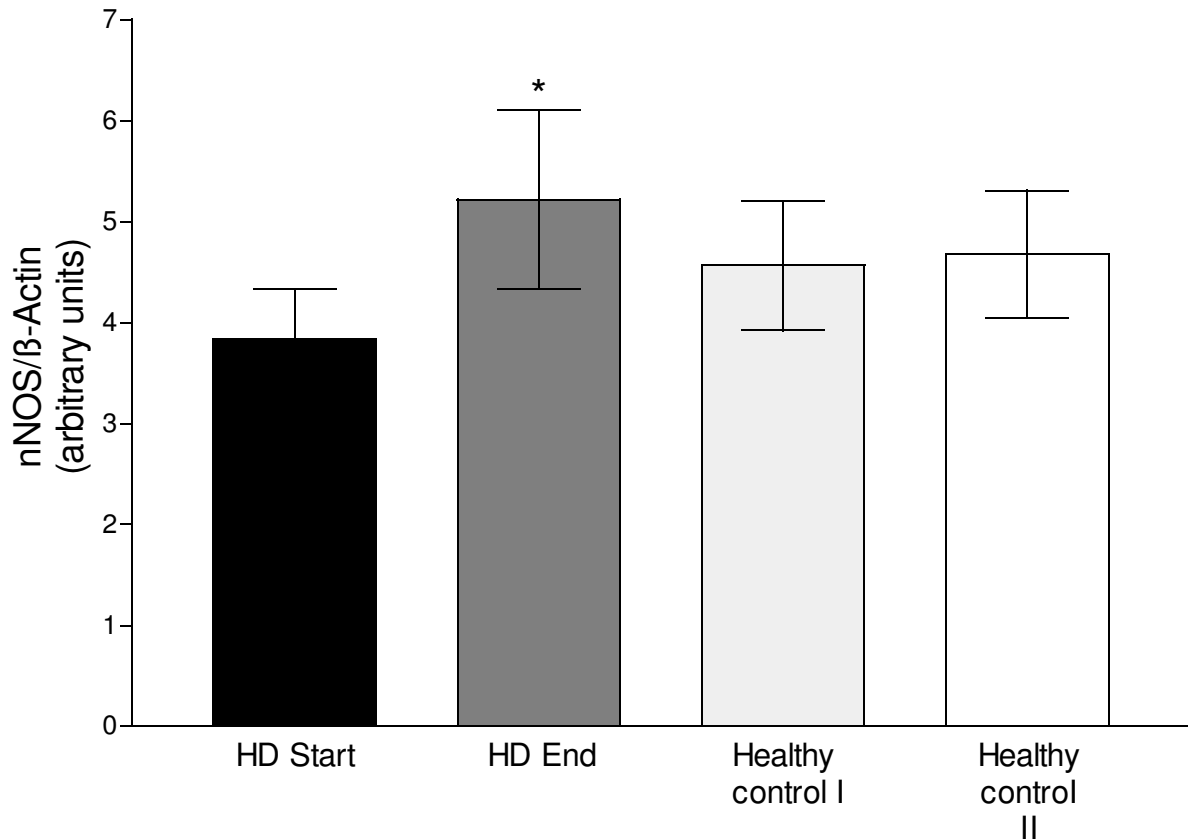


Abbildung 42: Gegenüberstellung der Ergebnisse der nNOS-Messungen bei Dialysepatienten und Kontrollgruppen.
* $p=0,0120$: Vergleich nNOS HD Start versus HD Ende;
 $p=0,0598$: Vergleich nNOS HD Start und Healthy control I;
 $p=0,1905$: Vergleich nNOS HD Start und Healthy control II;
 $p=0,5386$: Vergleich nNOS Healthy control I und nNOS Healthy control II.

Ergebnisse

Die Differenz von nNOS während der Dialyse, das heißt, die Zunahme bis zum Ende der Dialyse, zeigte sich bei Tumorpatienten, im Vergleich zu Patienten die keine Tumorerkrankung hatten, besonders gering ($p=0,0067$), siehe Abbildung 43. Patienten die angaben an einer pAVK zu leiden, hatten eine mit $p=0,0361$ signifikant stärkere Zunahme von nNOS während der Dialyse, als Patienten die keine pAVK hatten (siehe Abbildung 44).

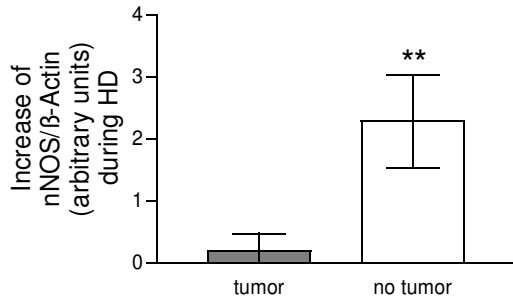


Abbildung 43: Vergleich der nNOS-Konzentration während der Dialyse bei Patienten mit zusätzlicher Tumorerkrankung und Patienten ohne Tumorerkrankung.

** $p=0,0067$

Untersucht wurden 10 Patienten mit Tumorerkrankung in der Anamnese und 16 Patienten ohne Tumorerkrankung.

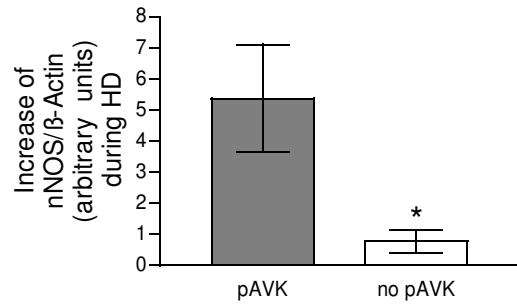


Abbildung 44: Vergleich der nNOS-Konzentration während der Dialyse bei Patienten mit und ohne pAVK.

* $p=0,0361$

Untersucht wurden 4 Patienten mit pAVK und 22 Patienten ohne pAVK.

3.2.2.2 Regressionsanalyse

Die Regressionsanalyse ergab eine nach Spearman signifikante Korrelation der nNOS Konzentration in Monozyten vor Beginn der Dialyse mit der im Rahmen laborchemischer Untersuchungen erhobenen Daten von HDL (mittlere Konzentration $1,060 \pm 0,0406$ mmol/l, Korrelationskoeffizient nach Spearman $r=0,3963$, $p=0,0498$), siehe Abbildung 45. Weiterhin zeigte sich eine mit $r=0,4426$; $p=0,0267$ signifikante Korrelation der nNOS Konzentration vor HD mit Albumin (mean= $32,13 \pm 0,5220$ g/l; $r=0,4426$; $p=0,0267$). Negative Korrelationen ergaben sich mit Ferritin (mean= $1248 \pm 214,1$ μ g/l; $r=-0,4962$; $p=0,0116$), Harnstoff vor HD (mean= $27,90 \pm 7,48$ mmol/l; $r=-0,4601$; $p=0,0207$), BUN vor HD (mean= $80,00 \pm 21,9$ mg/dl; $r=-0,4902$; $p=0,0205$) und der Totalen Antioxidativen Kapazität ($r=-0,4395$; $*p=0,0316$), gemessen vor der Dialyse (Abbildung 46).

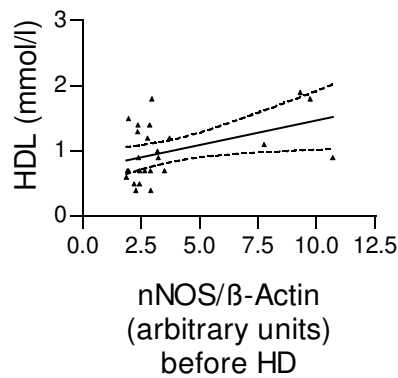


Abbildung 45: Korrelation der nNOS-Konzentration in Monozyten, gemessen vor Beginn der Dialyse, mit der HDL-Konzentration. ($r=0,3963$. $*p=0,0498$)

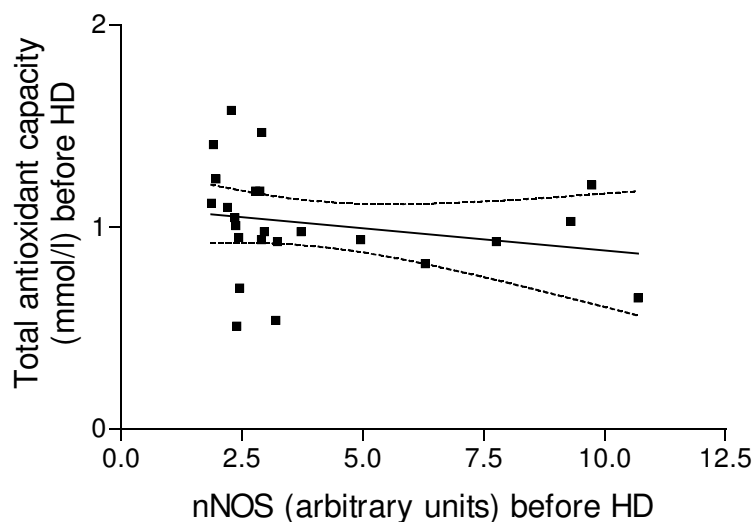


Abbildung 46: Korrelation der Totalen Antioxidativen Kapazität vor HD (Y-Achse) und der nNOS-Konzentration in Monozyten (X-Achse) vor HD. Die TAC beträgt vor HD $1,015 \pm 0,0294$ mmol/l, $r=-0,4395$; $*p=0,0316$.

Die PCRn (normalized protein catabolic rate) korreliert negativ ($r=-0,4688$; $p=0,0278$) mit nNOS vor HD. Bei der PCRn handelt es sich um einen Wert zur Beschreibung der Ernährungssituation der Dialysepatienten. Der Wert errechnet sich aus dem vor HD ermittelten BUN-Wert und der Kt/V [Depner1996]. Er betrug bei den untersuchten Dialysepatienten $0,9933 \pm 0,2377$ g/kg/d.

In weiteren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe wurde mittels digitaler Photoplethysmographie der Vascular Index (RI) erfasst. Die Differenz zwischen dem Vascular Index nach Stauung des Oberarms mittels einer Blutdruckmanschette und dem Vascular Index vor der Stauung (RI n-v) ist ein Maß für die Dilatation. Bei den, in dieser Arbeit untersuchten Patienten korrelierte der Vascular Index RI n-v nach HD (mean= $-0,6425 \pm 0,6204$ %) signifikant mit der nNOS-Konzentration vor HD (Korrelationskoeffizient $r=0,5301$; $p=0,0077$; Abbildung 47), sowie mit der nNOS Konzentration nach HD ($r=0,5402$; $p=0,0064$).

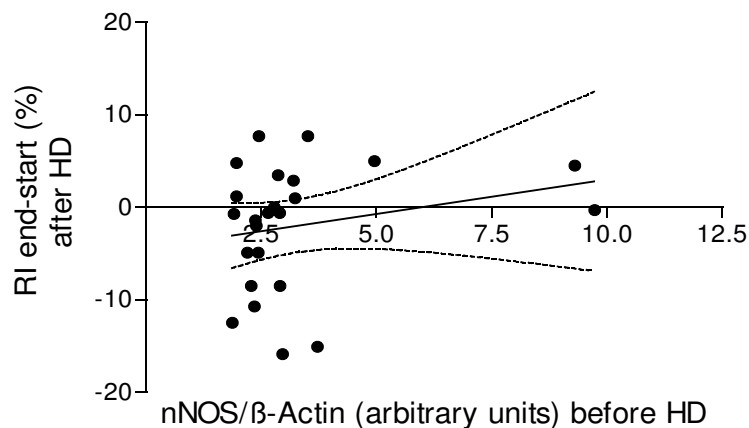


Abbildung 47: Korrelation des Vascular Index (RI n-v) am Ende der Dialyse (Y-Achse) mit der Konzentration von nNOS vor Dialyse. Die Korrelation nach Spearman ($r=0,5301$) ist mit $**p=0,0077$ signifikant.

Die Ferritinkonzentration korrelierte ebenfalls umgekehrt signifikant mit der nach der Dialyse ermittelten nNOS-Konzentration, der Korrelationskoeffizient nach Spearman beträgt $r=-0,5374$ mit einer Wahrscheinlichkeit von $p=0,0056$. Zusätzlich korrelierten die Konzentration von GPx vor HD (mean= $44,65 \pm 5,117$ arbitrary units; $r=-0,7857$; $p=0,048$) und die PCRn (mean= $0,9933 \pm 0,2377$; $r=-0,4919$; $p=0,0200$) positiv mit der nach der Dialyse gemessenen nNOS-Konzentration.

3.2.3 SOD1, SOD2, GPx

3.2.3.1 Veränderungen durch die Dialyse und Vergleich mit gesunden Kontrollpersonen

Für diese Daten wurden 20 Dialysepatienten, 9 Männer und 11 Frauen, sowie eine Kontrollgruppe bestehend aus 24 Probanden, 11 Männer und 13 Frauen, untersucht. Die Kontrollgruppe setzt sich wieder aus zwei, bezüglich der Altersstruktur unterschiedlichen Gruppen zusammen. Healthy control I besteht aus 7 älteren ($73,00 \pm 3,54$ Jahre) Probanden, Healthy control II aus 17 jüngeren Probanden ($34,12 \pm 2,26$ Jahre). Die Gesamtheit der Kontrollen (Healthy control I+II) war $45,46 \pm 4,13$ Jahre alt.

Die Dialysepatienten waren im Durchschnitt $64,79 \pm 4,24$ Jahre alt und seit $22,06 \pm 8,74$ Monaten regelmäßig in der Dialysetherapie, mit einer mittleren Dialysezeit von $3,44 \pm 0,19$ Stunden. Von den 20 untersuchten Patienten waren 3 Raucher, 11 hatten als Komorbidität arterielle Hypertonie, 7 Diabetes mellitus, 5 KHK und 8 eine Tumorerkrankung. 8 der Patienten gaben an, regelmäßig Beta-Blocker einzunehmen, 4 Cholesterinsynthesehemmer und 13 ein Diuretikum.

Für den Vergleich zwischen den Dialysepatienten und den Kontrollen eignet sich ebenfalls die Gruppe der Healthy control I, da diese sich bezüglich der Altersstruktur nicht von der Gruppe der Dialysepatienten unterscheidet ($p=0,4699$).

Nach Isolierung der Monozyten wurde sowohl bei den Dialysepatienten am Start und am Ende der Dialyse, als auch bei den Probanden der Kontrollgruppe mittels Immunodetektion im In-Cell Western die intrazelluläre Konzentration von SOD1, SOD2 und GPx, jeweils als Verhältnis zu dem Referenzprotein Beta-Actin, ermittelt.

Bei allen drei Proteinen konnte am Ende der Dialyse ein signifikanter ($p<0,05$) Abfall der Proteinkonzentration festgestellt werden. Ebenfalls identisch bei allen drei Proteinen war ein signifikanter Unterschied zwischen der Proteinkonzentration der Healthy control I und der Ausgangskonzentration des jeweiligen Proteins vor HD, sowie ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden verschiedenen Kontrollgruppen (siehe Abbildung 48, 49 und 50).

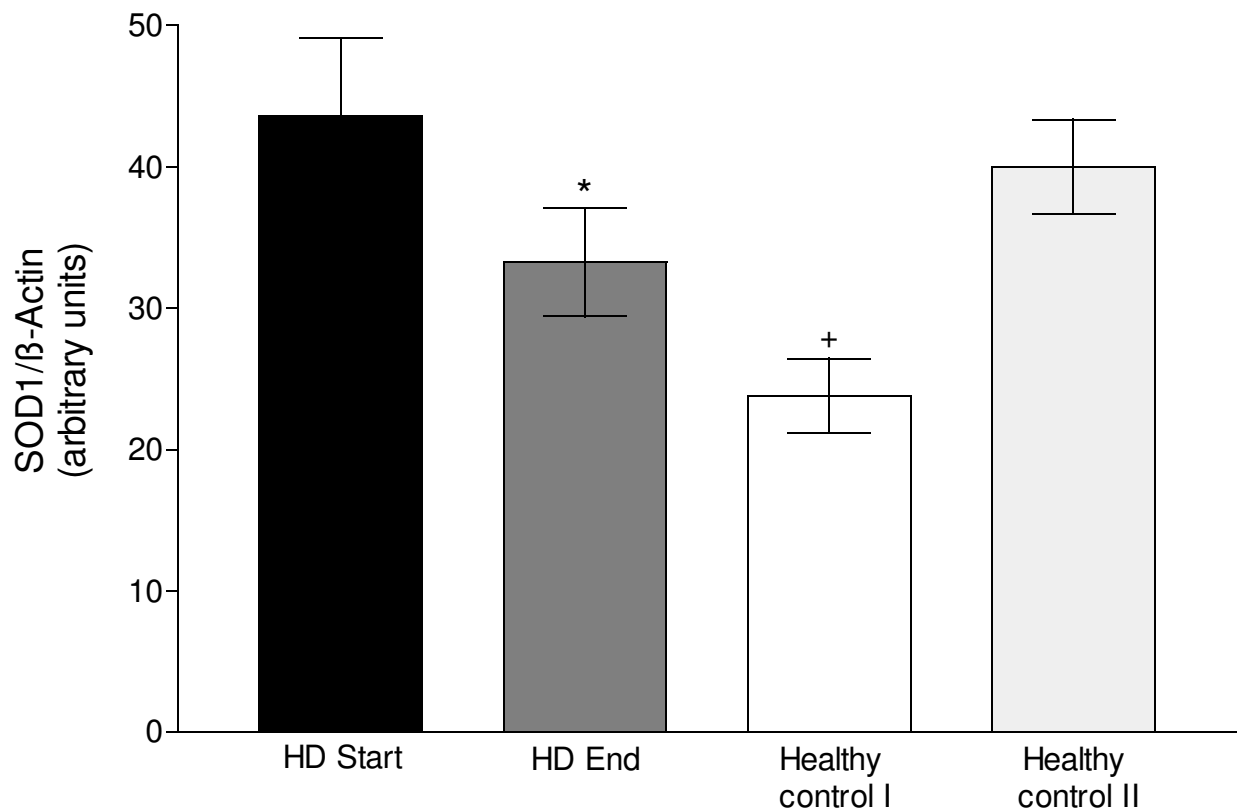


Abbildung 48: Grafische Darstellung der Konzentrationen von SOD1, nach Korrektur durch das Referenzprotein Beta-Actin (β -Actin), bei Dialysepatienten vor (HD Start) und nach der Dialyse (HD End) sowie bei den beiden Kontrollgruppen Healthy control I und Healthy control II.

SOD1 HD Start= 43,62 \pm 5,512 arbitrary units,

SOD1 HD End= 33,27 \pm 3,842 arbitrary units,

SOD1 Healthy control I= 23,80 \pm 2,648 arbitrary units,

SOD1 Healthy control II= 40,01 \pm 3,360 arbitrary units.

*p=0,0214 (nach Wilcoxon): im Vergleich SOD 1 Start versus Ende der Dialyse.

+p=0,0217 (Mann-Whitney-Test): im Vergleich SOD 1 vor der Dialyse versus der Healthy control I.

Auch zwischen den beiden Kontrollgruppen ergab sich ein signifikanter Unterschied, wobei Healthy control I (die Gruppe der in der Altersstruktur mit den Dialysepatienten vergleichbaren Probanden) mit p=0,0063 eine signifikant geringere SOD1-Konzentration aufweist, als die Gruppe der Healthy control II.

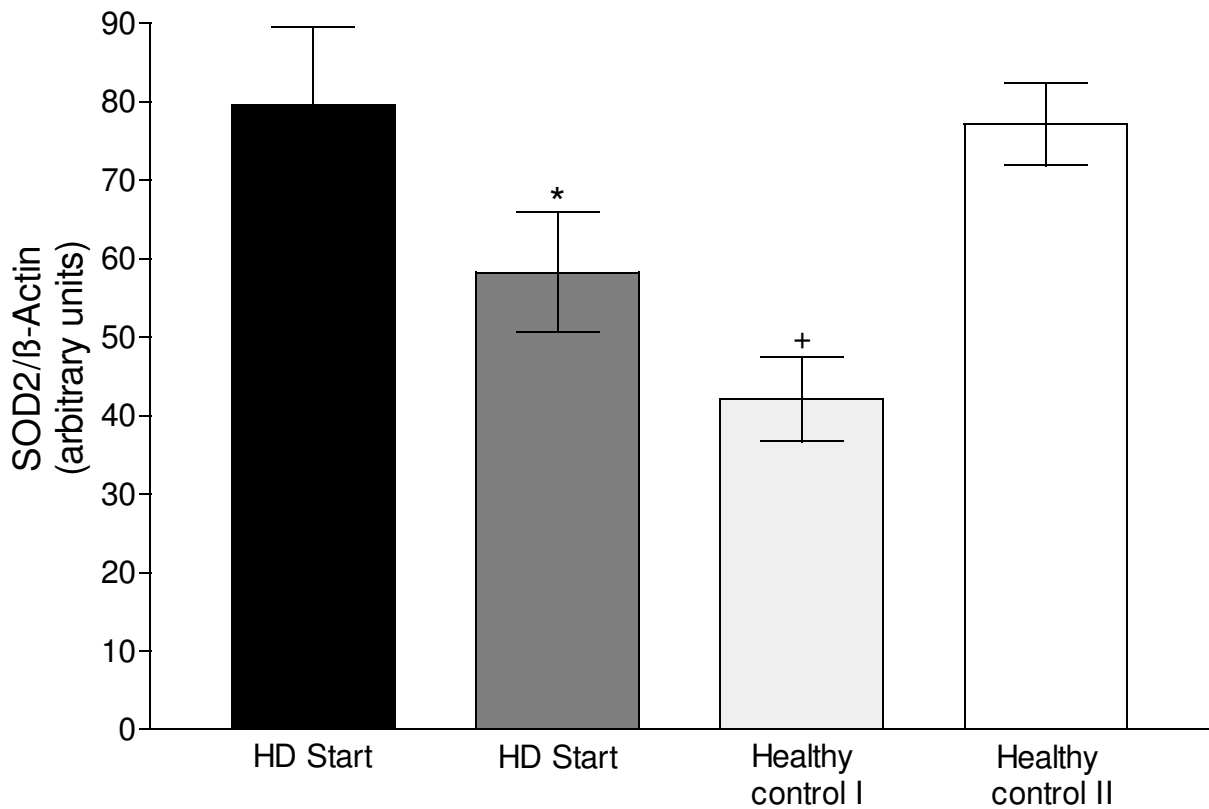


Abbildung 49: Grafische Darstellung der Konzentrationen von SOD2, nach Korrektur durch das Referenzprotein Beta-Actin (β-Actin). Dargestellt und verglichen werden die SOD2-Konzentrationen von Dialysepatienten, die vor (HD Start) und nach der Hämodialyse (HD End) gemessen wurden, sowie die Konzentrationen der Kontrollgruppen.

SOD2 HD Start= 79,64 ± 9,907 arbitrary units,

SOD2 HD End= 58,27 ± 7,649 arbitrary units,

SOD2 Healthy control I= 42,12 ± 5,357 arbitrary units,

SOD2 Healthy control II= 77,18 ± 5,258 arbitrary units.

*p=0,0131 (Wilcoxon): im Vergleich SOD 2 Start versus Ende der Dialyse.

+p=0,0281 (Mann-Whitney-Test): im Vergleich SOD 2 vor der Dialyse versus der Kontrollgruppe Healthy control I.

Healthy control I weist mit p=0,0019 eine signifikant geringere Konzentration an SOD2 auf als Healthy control II.

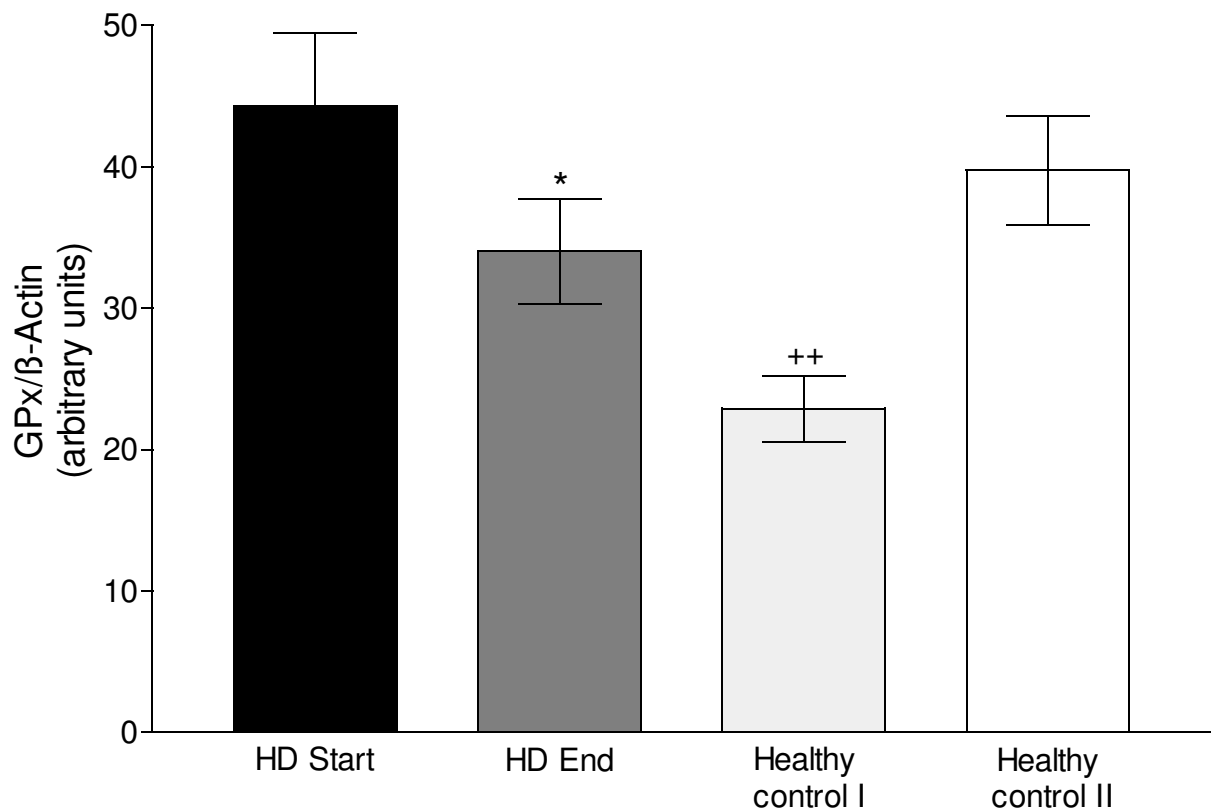


Abbildung 50: Grafische Darstellung der Konzentrationen von GPx, nach Korrektur durch das Referenzprotein Beta-Actin (β -Actin). Dargestellt und verglichen werden die GPx-Konzentrationen von Dialysepatienten, die vor (HD Start) und nach der Hämodialyse (HD End) gemessen wurden, sowie die GPx-Konzentrationen der Kontrollgruppen.

GPx HD Start= 44,28 \pm 5,184 arbitrary units,

GPx HD End= 34,02 \pm 3,704 arbitrary units,

GPx Healthy control I= 22,90 \pm 2,338 arbitrary units,

GPx Healthy control II= 39,78 \pm 3,850 arbitrary units.

*p=0,0313 (Wilcoxon): im Vergleich GPx Start versus Ende der Dialyse.

++p=0,0086 (Mann-Whitney-Test): im Vergleich GPx vor der Dialyse versus der Kontrollgruppe Healthy control I.

Healthy control I weist mit p=0,0019 eine signifikant geringere Konzentration an GPx auf als Healthy control II.

Ergebnisse

KHK-Patienten haben vor der Hämodialyse eine signifikant niedrigere Konzentration an SOD1 als Patienten, die keine KHK aufweisen ($p=0,0487$), (siehe Abbildung 51). Während der Dialyse verlieren sie jedoch weniger SOD1, sodass anschließend kein signifikanter Unterschied mehr nachweisbar ist ($p=0,1676$).

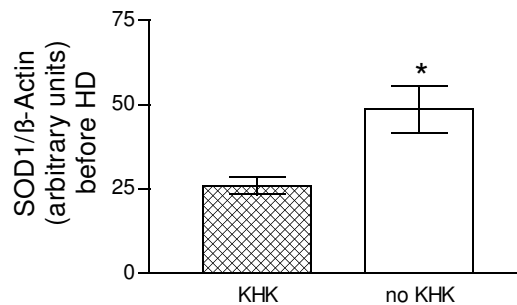


Abbildung 51: Darstellung der SOD1-Konzentration in Monozyten von Dialysepatienten, bei denen zusätzlich eine KHK besteht.

* $p=0,0487$ (Mann-Whitney-Test)

5 Patienten mit KHK (SOD1= 25,89 ± 2,540 arbitrary units) versus 13 Patienten ohne KHK (SOD1= 48,53 ± 6,877 arbitrary units).

Die Abbildungen 52 und 53 zeigen, dass die Einnahme von verschiedenen Medikamenten einen nachweisbaren Einfluss auf die Proteinkonzentration hat. Wobei die Einnahme jeweils zu einer Abnahme der Proteinkonzentration führt. So haben Patienten die regelmäßig Cholesterinsynthesehemmer einnehmen eine signifikant geringere SOD1-Konzentration vor der Dialyse ($p=0,0295$). Die SOD2-Konzentration war bei Patienten, die regelmäßig Diuretika einnahmen sowohl vor ($p=0,0133$) als auch nach HD ($p=0,0308$) signifikant erniedrigt. Zusätzlich verlieren diese Patienten auch mehr ($p=0,0235$) SOD2 durch die Dialyse. Ähnliches konnte bei GPx beobachtet werden, hier führte die Diuretikaeinnahme vor ($p=0,0180$) und nach ($p=0,0487$) der Dialyse zu signifikant geringeren GPx-Konzentrationen.

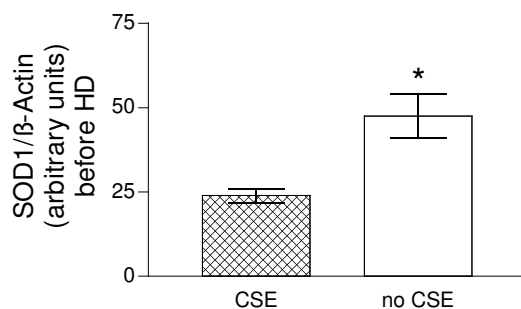


Abbildung 52: Dialysepatienten die CSE (Cholesterinsynthesehemmer) einnahmen zeigten vor HD (SOD1/β-Actin= 23,92 ± 2,073 arbitrary units) eine signifikant geringere SOD1-Konzentration (* $p=0,0295$), als Patienten die keine CSE einnahmen (SOD1= 47,47 ± 6,453 arbitrary units). Verglichen wurden 4 Patienten die CSE einnahmen, mit 14 Patienten die dieses Medikament nicht einnahmen.

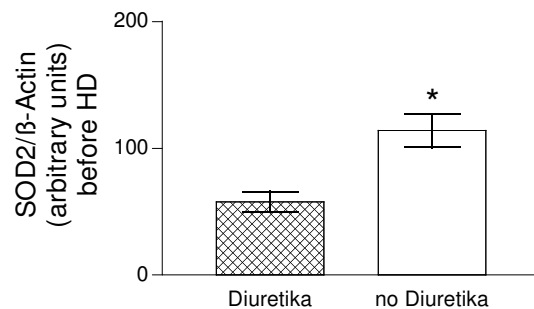


Abbildung 53: Die Einnahme von Diuretika führt bei Dialysepatienten zu einer geringeren SOD2-Konzentration (* $p=0,0133$). Verglichen wurden 12 Dialysepatienten die regelmäßig Diuretika einnahmen (SOD2= 57,80 ± 8,241 arbitrary units) mit 5 Patienten, die keine Diuretika einnahmen (SOD2= 114,1 ± 13,08 arbitrary units).

3.2.3.2 Regressionsanalyse

Die Konzentrationen der untersuchten Proteine in Monozyten von Dialysepatienten korrelierten signifikant untereinander. So wie in Abbildung 54 am Beispiel von SOD1 und SOD2 ersichtlich, korrelieren die Proteine vor und nach der Dialyse und auch der jeweilige Verlust des Proteins durch die Dialyse korreliert positiv.

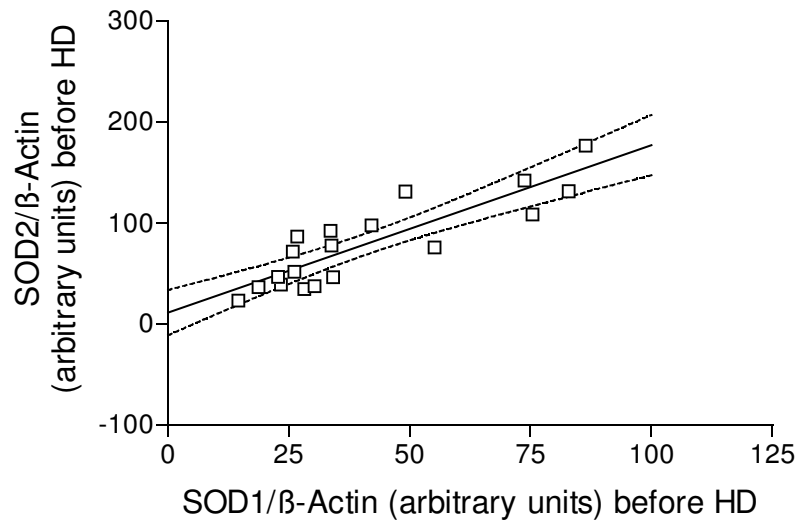


Abbildung 54: Korrelation der SOD1-Konzentration ($43,63 \pm 5,511$ arbitrary units) mit der SOD2-Konzentration ($79,64 \pm 9,907$ arbitrary units). Die Konzentrationen wurden jeweils vor der Dialyse bestimmt. Der Korrelationskoeffizient nach Spearman beträgt $r=0,8175$, die Korrelation ist mit $p<0,0001$ signifikant. Untersucht wurden 19 Patienten.

Alle 3 untersuchten Proteine zeigten eine deutliche Abhängigkeit von der Dialysezeit, das ist die Zeit, in der die Patienten durchschnittlich pro Sitzung dialysiert wurden ($3,590 \pm 0,06837$ h, Minimum 1h, Maximum 5h). Am Beispiel von GPx ist die Korrelation in Abbildung 55 und 56 dargestellt. Dieses trifft sowohl auf GPx als auch auf SOD1 und SOD2 zu. Bei SOD2 findet sich zusätzlich eine signifikante negative Korrelation ($r=-0,6926$, $p=0,0029$) zwischen der Abnahme an SOD2 während der Dialyse und der Dialysezeit. Eine kurze Dialysezeit steht in Zusammenhang mit einem höheren Verlust von SOD2 unter der Dialyse (Abbildung 57).

Ergebnisse

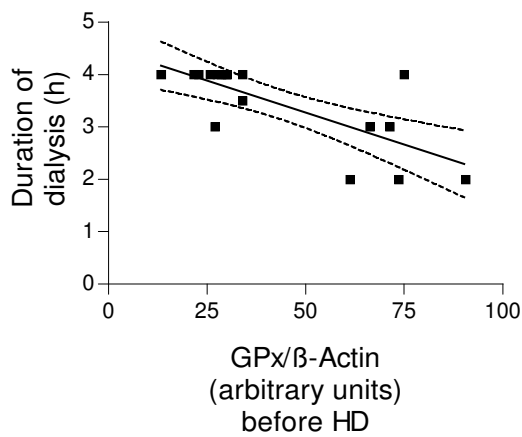


Abbildung 55: Grafische Darstellung der negativen Korrelation zwischen der Dialysezeit in Stunden und der GPx-Konzentration der Dialysepatienten vor dem Beginn der Dialyse.
Korrelationskoeffizient (Spearman) $r=-0,6116$, $**p=0,0091$.

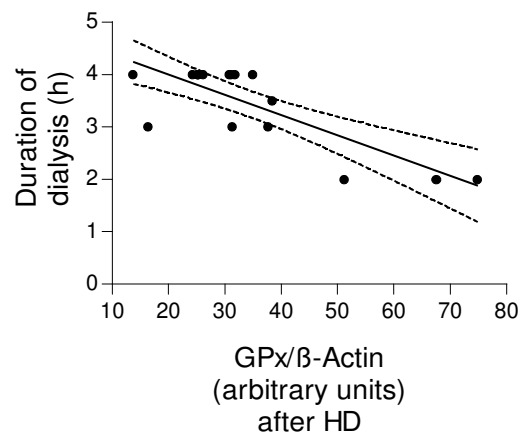


Abbildung 56: Grafische Darstellung der negativen Korrelation zwischen der Dialysezeit in Stunden und der GPx-Konzentration der Dialysepatienten gemessen am Ende der Dialyse.
Korrelationskoeffizient (Spearman) $r=-0,6433$, $**p=0,0053$.

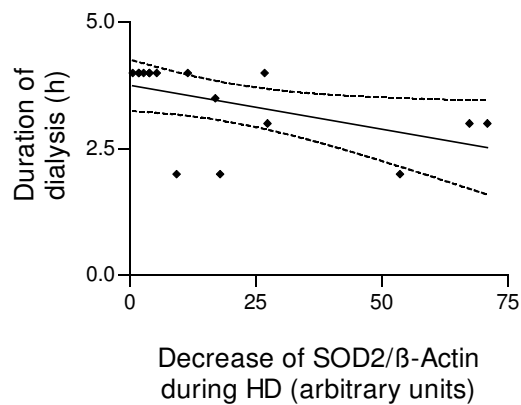


Abbildung 57: In dieser Abbildung ist die Differenz der SOD2-Konzentration am Ende der Dialyse gegenüber dem Ausgangswert in Korrelation mit der Dialysezeit in Stunden dargestellt. Die Korrelation ist mit dem Korrelationskoeffizient $r=-0,6926$ (nach Spearman) und einer Wahrscheinlichkeit von $**p=0,0029$ signifikant.

Die Regressionsanalyse der Enzymdaten zusammen mit den Daten der Gefäßmessungen ergab eine positive Korrelation von SOD1 vor HD und der Arterial Stiffness S1 vor HD mit $r=0,5535$; $p=0,0261$ (nach Spearman). Ebenfalls positiv signifikant war die Korrelation von S1 vor HD mit SOD2 vor HD ($r=0,6229$; $p=0,0100$) und GPx vor HD ($r=0,6495$; $p=0,0065$), siehe Abbildung 58-60. Die GPx-Konzentration vor HD korrelierte zusätzlich signifikant ($r=0,5044$; $p=0,0463$) mit der Gefäßsteifigkeit der kleinen Gefäße S2 (Arterial Stiffness S2) vor HD (mean= $31,14 \pm 2,187$ mmHg/ml) und GPx nach HD korrelierte signifikant ($r=0,5328$; $p=0,0336$) mit S1 vor HD (mean= $1,311 \pm 0,06465$ mmHg/ml).

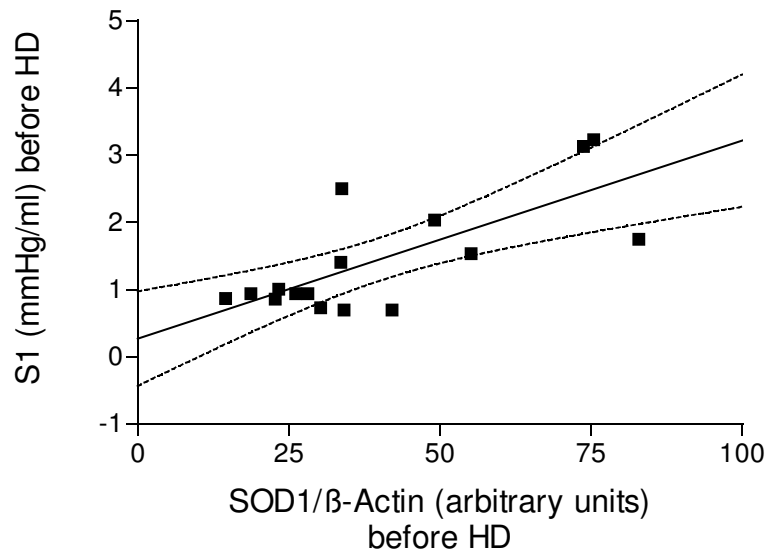


Abbildung 58: Korrelation der Konzentration von SOD1 vor HD mit der Arterial stiffness S1 vor HD (mean= $1,311 \pm 0,0647$ mmHg/ml) Korrelationskoeffizient nach Spearman $r=0,5535$; $*p=0,0261$.

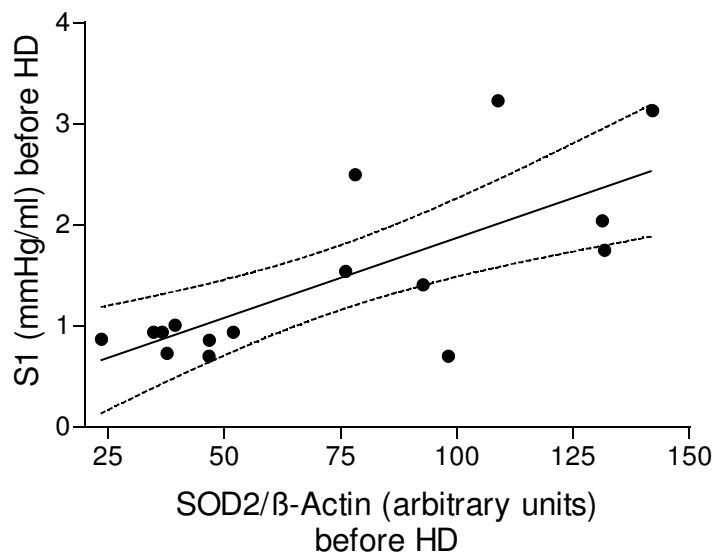


Abbildung 59: Korrelation der Konzentration von SOD2 vor HD mit der Arterial stiffness S1 vor HD (mean= $1,311 \pm 0,06465$ mmHg/ml) Korrelationskoeffizient nach Spearman $r=0,6229$; $p=**0,0100$.

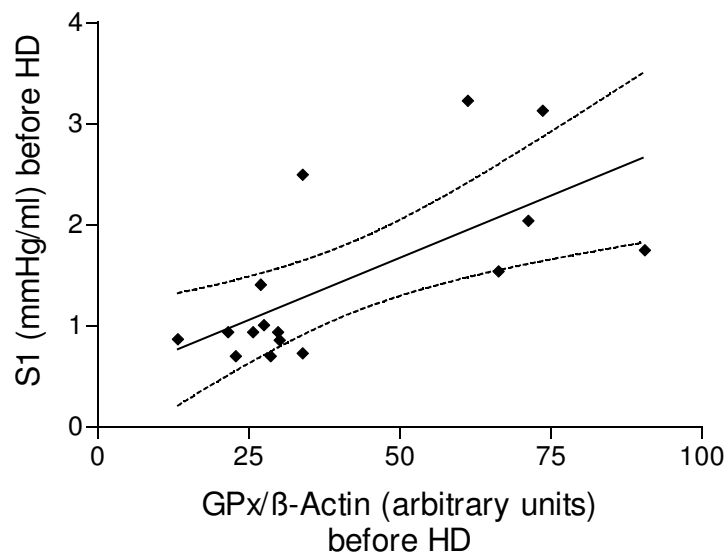


Abbildung 60: Korrelation der Konzentration von GPx vor HD mit der Arterial stiffness S1 vor HD (mean= 1,311 ± 0,06465 mmHg/ml)
Korrelationskoeffizient nach Spearman $r=0,6495$; $**p=0,0065$.

Weiterhin zeigte sich eine positive Korrelation der Abnahme der SOD 1 Konzentration während der Dialyse mit dem MCV-Wert (mean corpuscular volume) vor HD (mean= 90,69 ± 0,8815 fl; $r=0,6007$; $p=0,0065$) und nach HD (mean= 91,09 ± 0,722 fl; $r=0,7159$; $p=0,0008$), mit dem Systemic vascular resistance (svr) vor (mean= 1854 ± 109,2 Dynxsec/cm⁵; $r=0,7305$; $p=0,0013$) und nach HD (mean= 2013 ± 81,91 Dynxsec/cm⁵; $r=0,5803$; $p=0,0184$) und mit den nach der Dialyse erhobenen systolischen und diastolischen Blutdruckwerten (RRsyst nach HD mean= 138,3 ± 2,781; $r=0,5801$; $p=0,0185$; RRdiast nach HD mean= 72,58 ± 1,611; $r=0,6440$; $p=0,0071$).

Die Serum-Calcium-Konzentration vor Dialyse korrelierte negativ mit der SOD1-Konzentration vor Dialyse, siehe Abbildung 61. Ebenfalls negativ ist die Korrelation des Kt/V-Wertes (mean= 0,9143 ± 0,0298) mit der SOD1-Konzentration am Ende der Dialyse ($r=-0,5301$; $p=0,0286$). Positiv korreliert der Harnstoffwert nach HD mit dem SOD1-Wert nach HD. Die Harnstoffkonzentration am Ende der Dialyse liegt bei durchschnittlich 11,63 ± 2954 mmol/l, der Korrelationskoeffizient $r=0,5595$; $p=0,0195$.

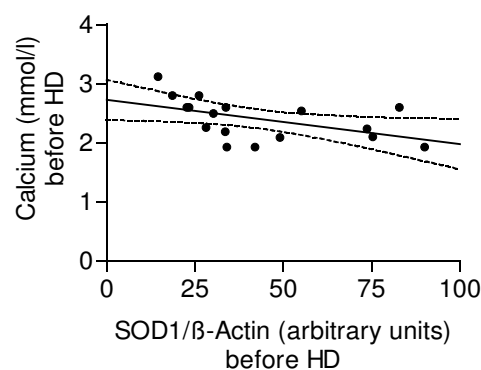


Abbildung 61: $Ca^{2+}= 2,277 \pm 0,0248$ mmol/l.
($r=-0,6568$; $p=0,0042$)

Die Differenz aus der SOD2-Konzentration am Ende der Dialyse und dem Ausgangswert ergibt den Verlust von SOD2, dieser korreliert negativ sowohl mit der nNOS-Konzentration vor (mean= 3,838 ± 0,4937 arbitrary units; r= -0,8469; p=0,0238) als auch nach HD (mean= 5,221 ± 0,8847 arbitrary units; r=-0,8829; p=0,0123). Die Korrelation beruht hierbei auf den Daten von 7 untersuchten Dialysepatienten. Die Konzentration von nNOS ist hierbei nach der Dialyse signifikant (p=0,012 nach Wilcoxon) höher als vor der Dialyse.

Die Konzentration von SOD2 vor HD korreliert negativ mit dem Gewicht der Patienten (r=-0,512 Spearman; p= 0,0356), welches im Durchschnitt bei 72,20 ± 1,51 kg lag (siehe Abbildung 62). Eine negative Korrelation besteht zwischen der SOD2-Konzentration nach HD und der PCRn (mean= 0,9933 ± 0,2377; r=-0,5155; p=0,0410)

Für GPx vor HD ergab sich weiterhin eine negative Korrelation (nach Spearman) mit dem Ultrafiltrationsvolumen (r=-0,5096; p=0,0367), welches im Durchschnitt bei 1,672 ± 0,0916 l lag und ebenfalls mit der GPx-Konzentration nach HD negativ korrelierte (r=-0,5972; p=0,0114).

GPx vor HD korrelierte des weiteren positiv mit dem mittleren Blutdruck vor HD (mean= 96,30 ± 1,828 mmHg; r=0,5767; p=0,0194). GPx nach HD zeigte eine negative Korrelation mit der PCRn (mean= 0,9933 ± 0,2377; r=-0,6221; p=0,0077).

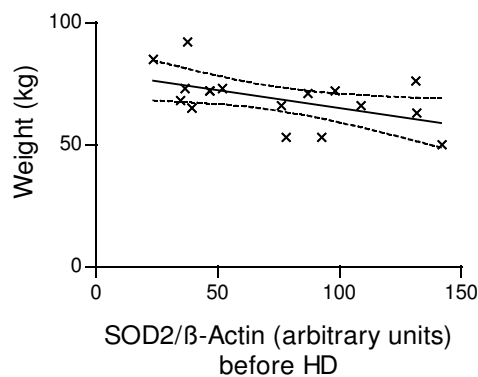


Abbildung 62: Korrelation der SOD2-Konzentration vor HD mit dem Gewicht der Patienten. (r=-0,512; p=0,0356 nach Spearman)

3.3 Fluoreszenzmessungen

Wie im Methodenteil erläutert, wurde die Eigenfluoreszenz von Plasmaproben bei verschiedenen Emissions- und Excitationswellenlängen vermessen, um die optimalsten Einstellungen mit der maximalen Fluoreszenzintensität herauszufinden (Abbildung 63).

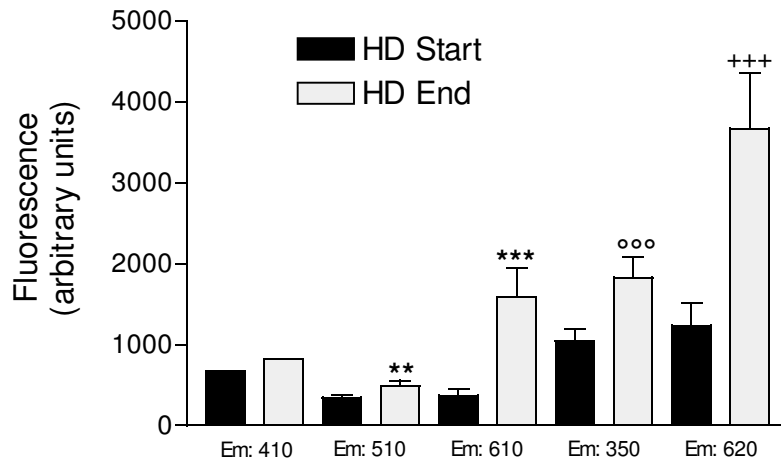


Abbildung 63: Messung der Eigenfluoreszenz (Y-Achse) von Plasmaproben von Dialysepatienten bei einer Excitationswellenlänge von 300nm und den Emissionswellenlängen von 410, 510, 610, 350 und 620nm (X-Achse). Ein Maximum der Fluoreszenzintensität konnte bei den Emissionswellenlängen 350 und 620nm gemessen werden. Die Untersuchungen auf Signifikanz beziehen sich jeweils auf die vor und nach der Dialyse ermittelten Werte.

p=0,0012; *p<0,0001; °°°p<0,0001; +++p<0,0001

3.3.1 Vergleich der Hämodialyse-Patienten mit der Kontrollgruppe

Es wurden 24 Dialysepatienten (15 Männer, 9 Frauen, mittleres Alter $64,52 \pm 2,66$ Jahre) und 12 Kontrollpersonen (3 Männer, 9 Frauen, mittleres Alter $41,38 \pm 7,91$ Jahre) untersucht. Von den Dialysepatienten waren 4 Raucher, 18 waren an arterieller Hypertonie, 7 an Diabetes mellitus und 10 an KHK erkrankt. Desweiteren wurden bei 5 Patienten (4 Männer, 1 Frau, mittleres Alter $60,8 \pm 4,70$ Jahre) die Veränderungen an verschiedenen Zeitpunkten während einer Dialysebehandlung erfasst.

Die Eigenfluoreszenz war bei Ex: 300nm und Em: 620nm maximal (Abbildung 63). Das Plasma von den untersuchten Dialysepatienten zeigte bei dieser Einstellung einen mit $p<0,0005$ signifikanten Anstieg der Eigenfluoreszenz (t-Test). Die Eigenfluoreszenz bei Em: 620 lag vor der Dialyse bei durchschnittlich $1234 \pm 275,9$ arbitrary units und nach der Dialyse bei $3669 \pm 685,2$ arbitrary units. In der Kontrollgruppe konnte mit einer Eigenfluoreszenz von $4416 \pm 664,5$ arbitrary units ebenfalls eine signifikant ($p<0,0001$) höhere Fluoreszenz gemessen werden als bei Dialysepatienten zu Beginn der Dialyse (Abbildung 64). Hierzu gilt allerdings zu beachten, das die Kontrollgruppe im Mittel signifikant ($p=0,0178$) jünger war, als die untersuchten Dialysepatienten. Somit gilt, das jüngere Probanden im Vergleich zu Dialysepatienten eine signifikant höhere Eigenfluoreszenz des Plasmas aufweisen.

Ergebnisse

In Abbildung 65 ist die Veränderung der Eigenfluoreszenz unter einer Dialysebehandlung dargestellt. Untersucht wurde vor der Dialyse sowie nach 0,5, 1, 2, 3 und 4 h. Die Abbildung 65 zeigt, dass sich erst nach 4 h eine signifikante Änderung ($p < 0,01$) der Eigenfluoreszenz einstellt. Ob es sich bei den Patienten um Raucher handelte, sie übermäßig Alkohol zu sich nahmen, sie Diabetes oder KHK hatten, hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Fluoreszenz.

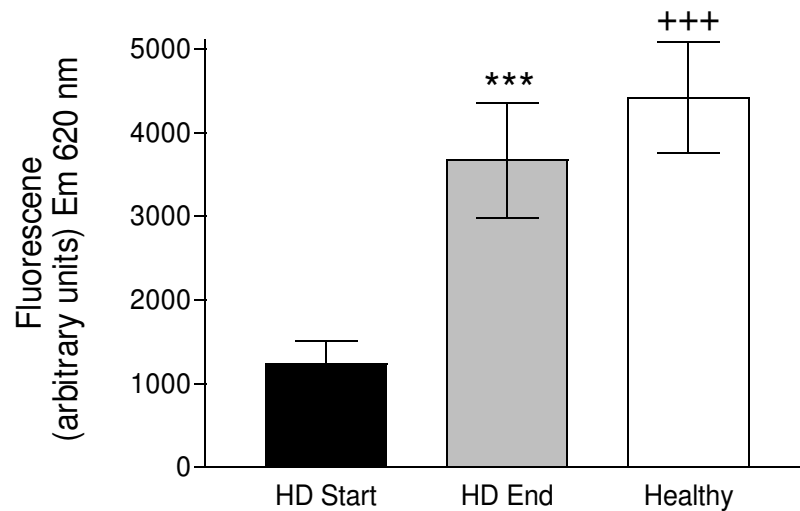


Abbildung 64: Darstellung der Eigenfluoreszenz des Plasmas bei Dialysepatienten zu Beginn (HD Start) und am Ende der Dialyse (HD End) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Healthy). Ex: 300nm, Em: 620nm. *** $p < 0,0001$; +++ $p < 0,0001$

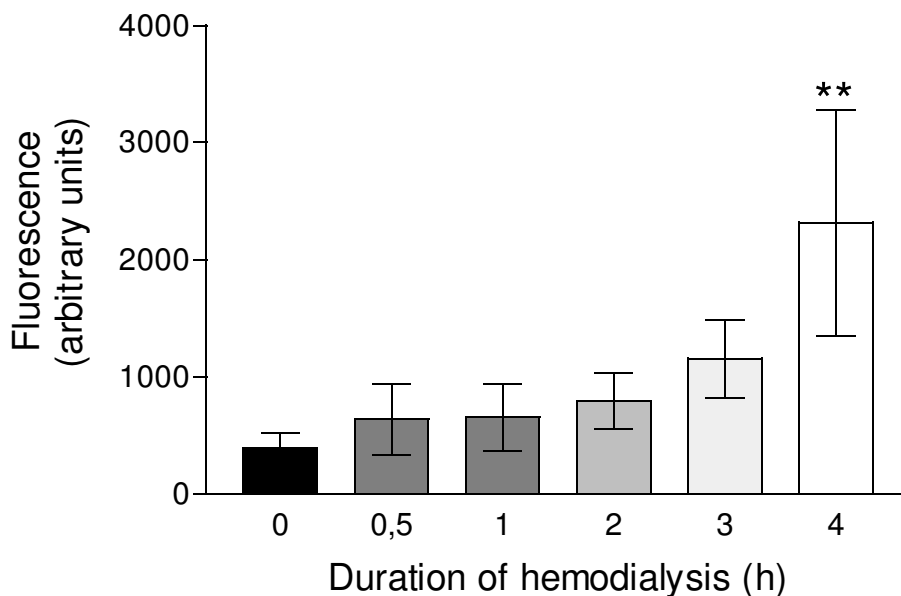


Abbildung 65: Anstieg der Eigenfluoreszenz des Plasmas von Dialysepatienten während der Dialyse. Ex: 300nm, Em: 620nm. ** $p < 0,01$ (ANOVA)
Fluoreszenz zum Zeitpunkt 0= $289,0 \pm 131,0$ arbitrary units; 0,5= $638,9 \pm 302,6$ arbitrary units; 1= $652,8 \pm 287,2$ arbitrary units; 2= $794,2 \pm 239,8$ arbitrary units; 3= $1153 \pm 330,5$ arbitrary units; 4= $2314 \pm 964,5$ arbitrary units.

3.3.2 Regressionsanalyse

Im direkten Vergleich der Fluoreszenzwerte mit den TAC-Ergebnissen zeigte sich eine signifikante negative Korrelation zwischen der TAC vor Hämodialyse ($1,021 \pm 0,0226$ mmol/l) und der zur gleichen Zeit ermittelten Fluoreszenz ($r=-0,4247$; $p=0,0386$), dargestellt in Abbildung 66. Auch die nach der Dialyse ermittelte TAC ($0,7565 \pm 0,0175$ mmol/l) korreliert negativ mit der Eigenfluoreszenz vor Dialyse. ($r=-0,4105$; $p=0,0463$)

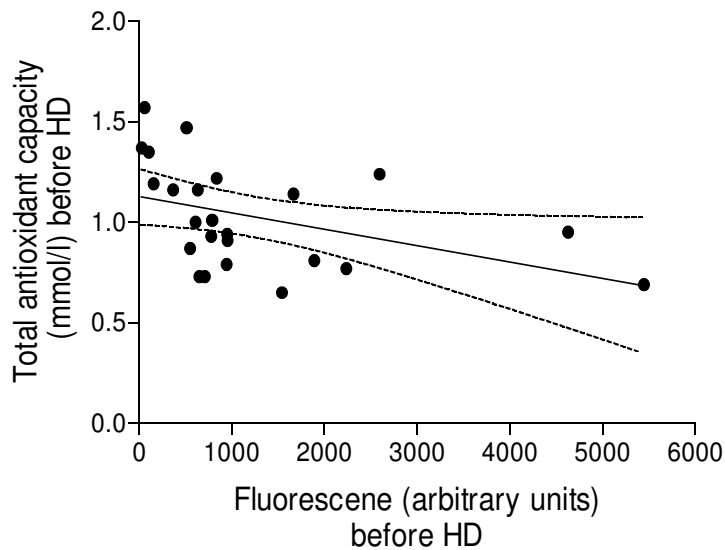


Abbildung 66: Korrelation der Eigenfluoreszenz (X-Achse) mit der Totalen Antioxidativen Kapazität (Y-Achse) von Dialysepatienten. Die Werte wurden jeweils vor der Dialyse gemessen. Die Korrelation nach Pearson ist signifikant. ($r=-0,4247$, $*p=0,0386$)

Abbildung 67 und 68 beschreiben die Korrelation des geschätzten Schlagvolumens (esv=estimated stroke volume), das vor und nach der Dialyse ermittelt wurde, mit dem Anstieg der Spontanfluoreszenz. Das esv lag vor der Dialyse im Mittel bei $61,46 \pm 1,758$ ml und nach der Dialyse bei $56,78 \pm 1,178$ ml. Es zeigte sich somit eine signifikante ($p<0,0001$) Abnahme des esv.

Die durchschnittliche Körpergröße der untersuchten Patienten war $170,4 \pm 1,98$ cm. Verglichen mit der Abnahme der Eigenfluoreszenz durch die Dialyse ($2435 \pm 606,0$ arbitrary units), zeigte sich eine signifikante ($p=0,0027$) Korrelation nach Pearson ($r=0,5952$). (Abbildung 69)

Abbildung 70 zeigt eine negative Korrelation zwischen der Kt/Veq ($1,060 \pm 0,0354$) und der initialen Fluoreszenz ($r=-0,6879$, $***p=0,0003$). Weiterhin wurde das Ultrafiltrationsgewicht (in % des Körpergewichtes) und die Harnstoffreduktionsrate ermittelt. Das Ultrafiltrationsgewicht betrug bei den untersuchten Patienten $2,343 \pm 0,1339$ % und korrelierte mit $r=-0,4441$ nach Pearson signifikant negativ mit der Eigenfluoreszenz, gemessen zu Beginn der Dialyse. Die Wahrscheinlichkeit beträgt hierbei $p=0,0337$, siehe Abbildung 71. Die Harnstoffreduktionsrate lag durchschnittlich bei $42,33 \pm 1,4$ %. Der Korrelationskoeffizient nach Pearson, im Vergleich mit der initial gemessenen Eigenfluoreszenz, lag bei $r=0,7631$ und war mit $p<0,0001$ deutlich signifikant. (Abbildung 72)

Ergebnisse

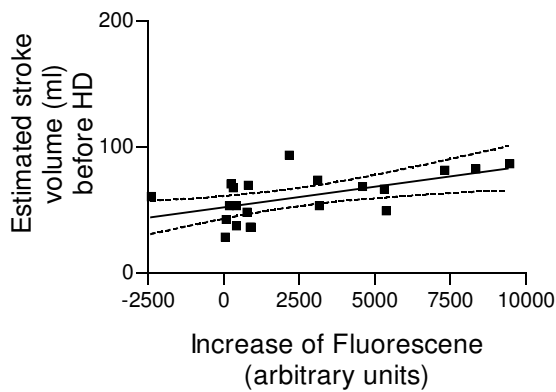


Abbildung 67: Korrelation zwischen dem geschätzten Schlagvolumen (estimated stroke volume) zu Beginn der Dialyse und dem Anstieg der Eigenfluoreszenz während der Dialyse.
($r=0,5675$, $**p=0,0073$; esv vor HD= $61,52 \pm 1,774$ ml)

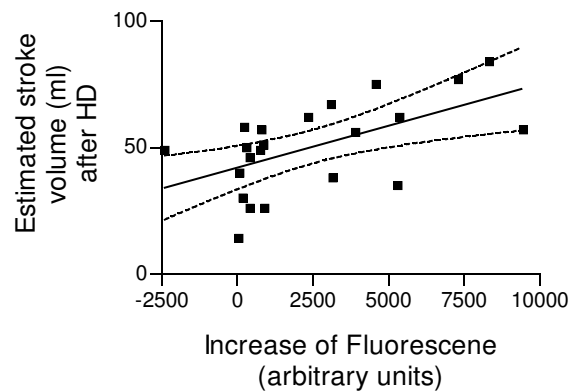


Abbildung 68: Korrelation zwischen dem geschätzten Schlagvolumen (estimated stroke volume) am Ende der Dialyse und dem Anstieg der Eigenfluoreszenz während der Dialyse.
($r=0,5748$, $**p=0,0051$; esv nach HD= $56,88 \pm 1,1792$ ml)

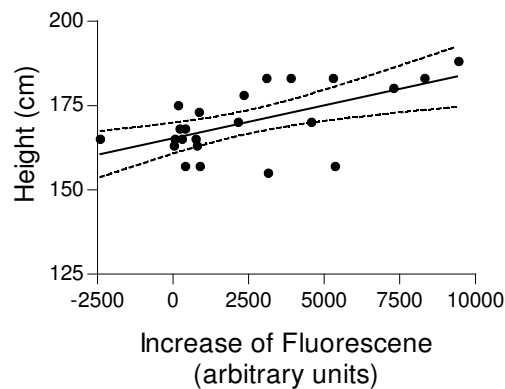


Abbildung 69: Korrelation zwischen dem Anstieg der Eigenfluoreszenz des Plasmas und der Körpergröße von Dialysepatienten.
($r=0,5952$, $**p=0,0027$)

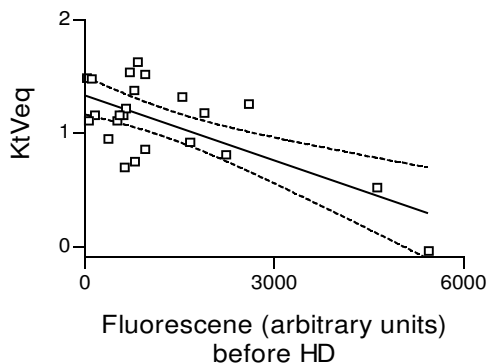


Abbildung 70: Negative Korrelation zwischen der Eigenfluoreszenz des Plasmas vor HD (X-Achse) und der Kt/Veq.
($r=-0,6879$; $***p=0,0003$)

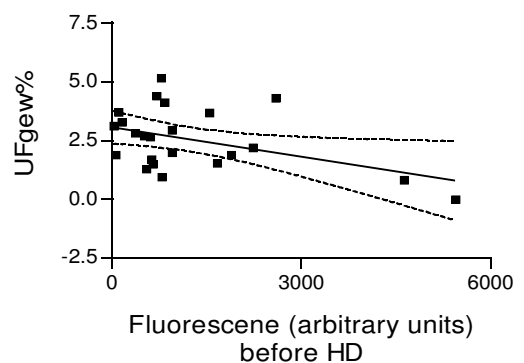


Abbildung 71: Darstellung der negativen Korrelation des Ultrafiltrationsgewichtes mit der Eigenfluoreszenz zu Beginn der Dialyse.
($r=-0,4441$, $*p=0,0337$)

Ergebnisse

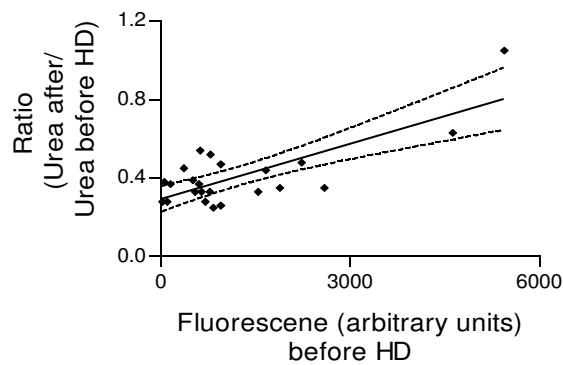


Abbildung 72: Korrelation der Eigenfluoreszenz des Plasmas von Dialysepatienten zu Beginn der Dialyse (X-Achse) und dem Verhältnis aus Harnstoff nach durch Harnstoff vor HD (Y-Achse).
($r=0,7631$; $***p<0,0001$)

Für die Werte der Spontanfluoreszenz, die bei 5 Patienten während der Dialyse an 6 unterschiedlichen Zeitpunkten erhoben wurden, konnten Korrelationen mit verschiedenen Vitaminen im Serum dieser Patienten nachgewiesen werden. Wie in Abbildung 73 ersichtlich, korrelierten die Werte der Fluoreszenz ($r=0,9235$ nach Spearman) mit der Konzentration von α -Tocopherol signifikant ($p<0,0001$). Weiterhin zeigte sich eine signifikante Korrelation mit Lutein ($r=0,4598$; $p=0,0106$), Zeaxanthin ($r=0,5341$; $p=0,0024$), α -Carotin ($r=-0,3665$; $p=0,0462$) und Cholesterol ($r=0,6199$; $p=0,0003$; siehe Abbildung 74)

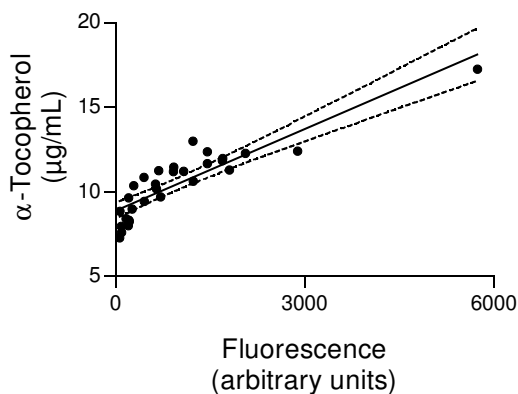


Abbildung 73: Grafische Darstellung der Korrelation der Eigenfluoreszenz mit der Konzentration von α -Tocopherol.
($r=0,9235$, $***p<0,0001$)

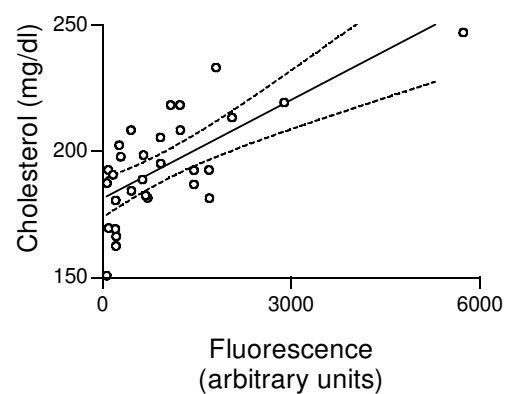


Abbildung 74: Grafische Darstellung der Korrelation der Eigenfluoreszenz mit der Konzentration von Cholesterol.
($r=0,7045$, $***p<0,0001$)

4 Diskussion

4.1 Oxidativer Stress bei Hämodialysepatienten

Hämodialyse ist ein Verfahren, das den Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ermöglicht, trotz ihrer Erkrankung eine gute Lebensqualität aufrecht erhalten zu können.

Hämodialyse wird genutzt um Toxine und Abbauprodukte aus dem Blut zu entfernen. Trotzdem konnte in zahlreichen Studien: Pupim2004; Tepel2000; Oberg2004; Himmelfarb2005; Amann2004; Amann2004; Taki2006; Stenvinkel1999; Boaz2003; Shirai2005; Pawlak2005; Pawlak2006; Bayes2006; Paul1993; Morena2005; Boaz1999; Himmelfarb2004; Becker1997; Toborek1992; Loughrey1994; Tetta1999; Erdogan2002 belegt werden, dass niereninsuffiziente und dialysierte Patienten im Vergleich zu Gesunden einem erhöhten oxidativen Stress ausgesetzt sind. Dies wurde in Form nachgewiesener erhöhter Biomarker, einer vermehrten ROS-Bildung, beziehungsweise verminderten antioxidativen Schutzmechanismen belegt. Der oxidative Stress steht in unmittelbarem Zusammenhang mit der bei diesen Patienten vorherrschenden erhöhten kardiovaskulären Mortalität und führt zu einer beschleunigten Arteriosklerose. [Himmelfarb2005; Taki2006; Foley1998; Stenvinkel1999; Amann2004; Anavekar2004; Huang2003].

Bisher konnten jedoch weder die genauen Mechanismen geklärt noch ein klares Bild vom Einfluss der Dialysetherapie auf den oxidativen Stress und der damit verbundenen erhöhten kardiovaskulären Mortalität gezeichnet werden.

Es soll das Ziel dieser Arbeit sein, die Bedeutung der Dialyse bei der Entstehung des oxidativen Stresses zu klären. Es wird versucht, eine Aussage darüber zu treffen, ob die Dialysebehandlung den oxidativen Stress dieser Patienten weiter erhöht oder eher vermindert und welche Faktoren im Einzelnen möglichen Einflüssen unterliegen.

4.1.1 Totale Antioxidative Kapazität TAC

Die Vielzahl der nicht-enzymatischen Antioxidantien zur Abwehr des oxidativen Stresses werden in dieser Arbeit als Totale Antioxidative Kapazität (TAC) bezeichnet und wurden durch den Total Antioxidant Status Assay laborchemisch in ihrer Gesamtheit erfasst. Da sich zunächst noch die Frage stellte, aus welchem Medium die Bestimmung der Antioxidantien erfolgen sollte, wurden zunächst die Ergebnisse der TAC-Messung aus Serumproben denen aus Plasmaproben der selben Probanden gegenübergestellt. Es ergab sich quantitativ kein Unterschied zwischen den Proben. Bei den untersuchten Dialysepatienten war die TAC nach HD sowohl bei den Serum- als auch bei den Plasmaproben signifikant vermindert. Da es zur Untersuchung der Serumproben notwendig war, den Patienten zusätzlich vor und nach der Dialyse Blut abzunehmen, wurde, auf Grund der in den meisten Fällen vorhandenen Anämie im Rahmen der Niereninsuffizienz, das Plasma aus dem Blut, welches für die Monozytenisolierung abgenommen wurde, gewonnen.

Ebenfalls vor Beginn der TAC-Messungen bei Dialysepatienten wurde gezeigt, ob der Test wiederholbar ist und damit eine Reliabilität aufweist. Zu diesem Zweck wurde die TAC von fünf verschiedenen Probanden an 5 unterschiedlichen Zeitpunkten gemessen. Zu keinem Zeitpunkt konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Ergebnissen ermittelt werden. Eine Reliabilität besteht.

Die Messung der antioxidativen Kapazität bei insgesamt 123 Dialysepatienten jeweils zu Beginn und am Ende einer Dialysetherapie ergab einen mit $p < 0,0001$ signifikanten Abfall der TAC nach der Dialyse von $1,015 \pm 0,021$ mmol/l vor HD auf $0,743 \pm 0,017$ mmol/l nach HD. Die Patienten verloren im Durchschnitt $0,272 \pm 0,0014$ mmol/l Antioxidantien durch die Dialyse.

Für den Vergleich der antioxidativen Kapazität bei Hämodialysepatienten und bei einer gesunden Kontrollgruppe, wurden insgesamt 40 Kontrollpersonen untersucht. Diese wiederum wurden, auf Grund der sehr unterschiedlichen Altersverteilung, in zwei Gruppen aufgeteilt. Zum einen in die Gruppe der älteren gesunden Kontrollpersonen mit einem mittleren Alter von $71,29 \pm 3,14$ Jahren (Healthy control I). Zum anderen in die Gruppe der jungen (<55 Jahre) gesunden Kontrollpersonen mit einem mittleren Alter von $31,65 \pm 1,86$ Jahren (Healthy control II). Das Alter der Healthy control I entsprach dem der Dialysepatienten, so dass diese Gruppe zum direkten Vergleich der TAC herangezogen wurde. Es zeigte sich, dass die 17 Probanden dieser Gruppe mit $0,860 \pm 0,0668$ mmol/l eine deutlich ($p = 0,0129$) niedrigere TAC aufweisen, als Dialysepatienten vor HD ($1,015 \pm 0,021$ mmol/l). Nach der Dialyse und dem Verlust der TAC, liegen die Konzentrationen in etwa auf dem gleichen Niveau. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass sehr junge Probanden eine niedrigere TAC aufweisen als ältere Probanden. Die TAC der 23 jungen Probanden der Healthy control II lag bei durchschnittlich $0,690 \pm 0,026$ mmol/l und war damit signifikant ($p = 0,0126$) reduziert gegenüber der Healthy control I und ebenfalls deutlich ($p < 0,0001$) niedriger als die initiale TAC der Dialysepatienten.

Dialysepatienten haben eine, im Vergleich zu einer alterskonformen gesunden Kontrollgruppe als auch im Vergleich zu einer aus sehr jungen Probanden bestehenden Kontrollgruppe, höhere antioxidative Kapazität. Das kann an einer besseren therapiebedingten Versorgung der Patienten mit Antioxidantien via Medikamente oder Lebensmittel liegen oder auf den erhöhten Bedarf zur Bekämpfung von vorhandenem erhöhten oxidativen Stresses zurückzuführen sein.

Am ehesten kann von einer Bedarfsregelung ausgegangen werden. So dass erhöhter Bedarf zu einer Konzentrationserhöhung führt, da vor allem die jungen Probanden, mit einer gegenüber den älteren niedrigeren TAC, in weniger ausgeprägtem Maße oxidativem Stress ausgesetzt sind.

Bei 14 Hämodialysepatienten wurde zusätzlich eine detaillierte Aufzeichnung der TAC-Veränderungen während eines Dialyseprozesses vorgenommen. Durch wiederholte Blutabnahmen zur Ermittlung der TAC zu Beginn sowie an verschiedenen Zeitpunkten während der Dialyse, konnte gezeigt werden, dass bereits nach 2 Stunden eine signifikante ($p < 0,05$) Abnahme der TAC stattgefunden hat.

Die Totale Antioxidative Kapazität wurde vielfach untersucht und zeigte sich dabei ebenfalls zu Beginn der Dialyse als signifikant höher im Vergleich mit gesunden Kontrollen. Im Vergleich der Konzentrationen vor und nach der Dialyse wurde ebenso beobachtet, dass es zur Abnahme der TAC kommt [Eiselt2001; Erdogan2002; Jackson1995; Samouilidou2003; Huang2003; Galli2001].

Die TAC-Abnahme wird hierbei generell mit dem Dialyse-bedingten Verlust von Antioxidantien erklärt.

Auch von einem fehlenden Effekt der Dialyse auf die antioxidative Aktivität wird berichtet [Toborek1992].

Ein genaueres Betrachten der Dialysepatienten, deren Comorbiditäten, Grunderkrankungen, Alkohol- und Zigarettenkonsum, ergab eine tendenziell niedrigere TAC bei Rauchern und Alkohol konsumierenden Pa-

tienten. Dieser Trend ist in beiden Fällen jedoch nicht signifikant. Nach der Dialyse zeigen beide Gruppen signifikant niedrigere TAC-Werte. Die unterschiedlichen Grunderkrankungen, die letztendlich zu einer fortgeschrittenen Niereninsuffizienz und Dialysepflichtigkeit geführt haben, stellen dann zum Zeitpunkt der Dialyse Comorbiditäten dar, die die Patienten weiter begleiten und deren Mortalität und Morbidität beeinflussen. Bei 8 der untersuchten Patienten war nachweislich eine arterielle Hypertonie die Grunderkrankung, die zur fortschreitenden Niereninsuffizienz geführt hat. Diese Patienten haben im Vergleich zu Dialysepatienten, bei denen ein Diabetes mellitus (20 Patienten) oder eine Glomerulonephritis (8 Patienten) als Grunderkrankung vorliegt, eine signifikant niedrigere TAC nach der Dialyse. Die Signifikanz war beim Vergleich Hypertonie versus Glomerulonephritis mit $p < 0,001$ deutlicher als beim Vergleich Hypertonie versus Diabetes mellitus ($p < 0,05$). Zu Beginn der Dialyse wiesen alle Patienten noch annähernd gleiche Antioxidantien-Konzentrationen auf.

Ebenfalls scheinen begleitende vaskuläre Erkrankungen Einfluss auf den antioxidativen Status zu nehmen. So konnte gezeigt werden, dass Patienten beim Vorliegen einer peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) zu Beginn der Dialyse eine signifikant ($p = 0,0253$) geringere antioxidative Kapazität aufweisen. Eine bestehende KHK sowie ein stattgehabter Schlaganfall beeinflussen die TAC, die am Ende der Dialyse gemessen wurde und führen jeweils zu tendenziell niedrigeren Werten. Diese Beobachtungen waren jedoch mit $p = 0,060$ und $p = 0,099$ nicht signifikant, bei Definition eines Signifikanzniveaus von $p < 0,05$.

Anders als bei Wang, XL2001, die herausgefunden haben, dass die TAC bei Frauen signifikant niedriger ist als bei Männern und dass es mit zunehmendem Alter einen signifikanten Abfall der TAC bei Männern gibt, was bei Frauen nicht beobachtet wurde, konnten in dieser Arbeit keine signifikanten oder tendenziellen Auswirkungen des Geschlechtes auf die antioxidative Kapazität gefunden werden. Beobachtet wurde stattdessen bei den gesunden Kontrollpersonen einen Anstieg der TAC im Alter.

Als ebenfalls irrelevant für die TAC erwies sich die Dialysezeit, die bei durchschnittlich $3,59 \pm 0,0684$ Stunden lag sowie die Gesamtzeit der Dialysepflichtigkeit, $26,59 \pm 3,441$ Monate. Auch Alter, Blutdruck- und Pulssituation sowie die Gefäßcompliance hatten keinen Einfluss auf die antioxidative Kapazität.

Für die untersuchten Patienten konnten zusätzlich Daten der klinischen Chemie, die für alle Patienten im Rahmen ihrer Dialysebehandlung in der Nephrologie der Charité Campus Benjamin Franklin erhoben wurden, mit einbezogen werden. Die Regressionsanalyse ergab eine positive und deutlich signifikante Korrelation der Totalen Antioxidativen Kapazität bei Dialysepatienten vor HD und der Konzentration der Transaminasen GOT, GPT und gGT. Das heißt, eine hohe Konzentration der genannten Transaminasen geht mit einer hohen Konzentration der Antioxidantien einher.

Ebenfalls positive und signifikante Korrelationen ergab die TAC mit der Konzentration der alkalischen Phosphatase, des Gesamtbilirubins, des Ferritins, der Triglyceride und der Leukozyten. Eine negative Korrelation zeigte sich zwischen der TAC und der HDL-Konzentration.

Bilirubin hat wie Ferritin selber antioxidative Eigenschaften, so dass beide Substanzen ein Teil der antioxidativen Kapazität ausmachen und dadurch die positive Korrelation entsteht.

Transaminasen haben selber keine antioxidativen Effekte. Vielmehr konnten Antioxidantien wie Vitamin E und N-Acetylcystein nachweislich die Transaminasen sowie die alkalische Phosphatase senken [Buscher2004]. Hiernach müsste die Korrelation eigentlich umgekehrt also negativ sein.

Triglyceride sind an atherosklerotischen Prozessen, wie sie bei den Dialysepatienten das Hauptproblem sind, unmittelbar beteiligt und bei Nierenfunktionsstörungen erhöht. Die positive Korrelation zeigt möglicherweise, dass mit steigenden Triglyceriden eine höhere Konzentration von Antioxidantien notwendig ist, um deren Oxidation entgegenwirken zu können.

Die Werte von Harnsäure und Kreatinin wurden bei den Patienten sowohl vor als auch nach der Dialyse bestimmt. Beide Werte sind nach der Dialyse signifikant erniedrigt. Dieser Verlust korreliert jeweils mit dem Verlust der TAC.

Da die TAC eine Gesamtheit aller antioxidativ wirksamen Substanzen darstellt, eben auch die hohen Konzentrationen an Harnsäure, die durch das Verfahren der Dialyse gewollt aus dem Blut der Patienten entfernt wird, wird dies als Begründung sowohl für die initial hohen Konzentrationen als auch für das Absinken der TAC angesehen [Malliaraki2003; Jackson1995]. Andererseits sind aber auch Stoffe wie Albumin, welche am Ende der Dialyse in höheren Konzentrationen vorliegen, an der antioxidativen Kapazität beteiligt. So dass diese Theorie alleine nicht ausreichend erscheint.

Desweiteren sind folgende Substanzen an der Bildung der TAC beteiligt: Ascorbinsäure (Vitamin C), α -Tocopherol, Protein Thiole, Caeruloplasmin, Transferrin sowie eine Reihe uncharakterisierter Stoffe. [Miller1993; Wang,XL2001]

Das Verhalten von Kreatinin zeigt ebenfalls eine Abhängigkeit von der TAC. Kreatinin ist ein harnpflichtiges Stoffwechselprodukt, das man sich zur Abschätzung der GFR und damit der Nierenfunktion zu nutze macht. Es hat keine antioxidativen Funktionen.

Der Kt/V-Wert ist ein wichtiger Parameter um die Dialyseeffektivität zu bestimmen und die Dialyseeffizienz zu beurteilen. Als einen, dem jeweiligen Patienten angepassten und damit präziseren Wert gilt der Kt/Veq, bei dem in der Berechnung auch das Ultrafiltrationsgewicht und das Körpergewicht des Patienten berücksichtigt wurde. Die Abnahme der Totalen Antioxidativen Kapazität durch die Dialyse korrelierte signifikant mit dem Kt/Veq-Wert dieser Patienten. Je höher in diesem Fall der Kt/Veq-Wert und damit die Dialyseeffektivität ist, desto stärker ist der Verlust an antioxidativer Kapazität.

Je höher der Kt/V-Wert desto geringer ist die Mortalität [Pastan1998; Owen1993; Owen1998; Chertow1999]. Ab einem bestimmten Kt/V-Wert ist jedoch nicht mehr mit einer steigenden Überlebensrate zu rechnen. In diesem Fall kommt es sogar wieder zur Anhebung der Mortalität. [McClellan1998; Chertow1999]. Die Ergebnisse dieser Arbeit gehen mit dieser Erkenntnis konform, da ein steigender Kt/V-Wert zu einem höheren Verlust an Antioxidantien führt und damit auch der Schutz vor oxidativen Schäden verloren geht. Ab einem Kt/V über 1,3 ist nicht mehr von einem weiteren Anstieg der Überlebensrate auszugehen. Der Kt/Veq der hier untersuchten Dialysepatienten liegt im Durchschnitt bei $0,9143 \pm 0,0298$ und maximal bei 1,72.

Für eine Gruppe von 14 Dialysepatienten, wurde an 6 verschiedenen Zeitpunkten während der Dialyse die antioxidative Kapazität bestimmt und überdies zu jedem dieser Zeitpunkte die Konzentration verschiedener Carotinoide, Vitamine und Vitaminvorstufen im Plasma ermittelt. Anschließend konnte zu jedem untersuchten Zeitpunkt die TAC mit dem Vitaminstatus des jeweiligen Patienten verglichen werden.

Eines der besagten Vitamine ist α -Tocopherol, eine Vitamin-E-Form, bekannt als ein wichtiges lipidlösliches Antioxidans, welches in der Lage ist, Membranlipide, Lipoproteine und Depotfett vor der Oxidation (Lipidperoxidation) zu schützen. Durch zahlreiche vor allem pflanzliche Nahrungsmittel aufgenommen, wird es anschließend im menschlichen Körper, im Fettgewebe und in der Leber gespeichert oder via LDL transportiert. Die Konzentration von α -Tocopherol ist bei den untersuchten Patienten im Verlauf der Dialyse signifikant ($p=0,0353$) von $9,841 \pm 0,5037 \mu\text{g/ml}$ auf $10,69 \pm 0,6826 \mu\text{g/ml}$ angestiegen. Der Vergleich der α -Tocopherol-Werte mit den Werten der TAC ergab eine mit $p=0,0027$ signifikante Korrelation mit dem Korrelationskoeffizient $r=0,3306$. Daraus folgt, dass hohe α -Tocopherol-Konzentrationen mit einer hohen antioxidativen Kapazität einhergehen. Erklärt werden kann man dies durch die antioxidative Funktion des α -Tocopherols, die durch den Test der Totalen Antioxidativen Kapazität mit erfasst wurde. Trotzdem steigt die Konzentration der Vitamin-E-Form signifikant an, während die TAC signifikant abnimmt. Die Abnahme der antioxidativen Kapazität zeigt dabei aber keine signifikante Korrelation mit der Zunahme von α -Tocopherol.

Desweiteren waren eine Reihe von Carotinoiden, Retinol und Cholesterol Gegenstand der Untersuchung. Carotinoide sind eine umfangreiche Klasse an natürlichen Farbstoffen deren wichtigste Aufgabe im menschlichen Körper darin besteht, freie Radikale zu binden. Damit handelt es sich bei dieser Substanzgruppe ebenfalls um Antioxidantien. Carotinoide sind fettlöslich. Bisher sind über 800 verschiedene Carotinoide bekannt. β -Carotin (Provitamin A) ist die Vorstufe von Retinol (Vitamin A). Auch α -Carotin und β -Cryptoxanthin können in Vitamin A umgewandelt werden, aber sie haben auch eine eigene von Vitamin A unabhängige Bedeutung.

Carotinoide (z.B. β - und α -Carotin, β -Cryptoxanthin, Lutein, Lycopin und Zeaxanthin) werden mit der Nahrung aufgenommen. Zeaxanthin kommt zusammen mit Lutein als Pigment in der Retina vor und schützt die Netzhaut vor zu hoher Lichteinstrahlung. Lycopin ist ein hochpotenter Fänger von reaktivem Singulett-Sauerstoff. Die Rate, Radikale abzufangen, ist bei Lycopin doppelt so groß wie bei β -Carotin und 100-mal so groß wie bei α -Tocopherol.

Die Gesamtheit der Carotinoide bei den untersuchten Patienten korreliert mit $r=0,5703$ signifikant ($p<0,0001$) mit der zu den gleichen Zeitpunkten ermittelten Totalen Antioxidativen Kapazität. Für diese Carotinoide gilt demzufolge, je höher die Konzentration des Carotinoids um so höher die antioxidative Kapazität. Im Gegensatz zu der TAC, dessen Konzentration im Verlauf der Dialyse abnimmt, steigt die Konzentration von Lutein, Retinol, α - und β -Carotin, β -Cryptoxanthin und Lycopin signifikant an. Für β -Carotin und Lutein konnte gezeigt werden, dass dessen Zunahme während der Dialyse signifikant mit der Abnahme der Totalen Antioxidativen Kapazität korreliert. Für β -Carotin lag der Korrelationskoeffizient bei $r=0,5369$ und $p=0,0478$. Bei Lutein war $r=0,6249$ und $p=0,0169$.

Im Zuge des Verlustes der antioxidativen Kapazität steigt die Konzentration der genannten Carotinoide an.

Bei den Antioxidantien wird es sich am ehesten um wasserlösliche kleine und damit dialysierbare Bestandteile des Plasmas handeln. Die Carotinoide sind wie Vitamin A und Vitamin E auf Grund ihrer Unpolarität im Blut an Transportglobuline gebunden und werden im Fettgewebe gespeichert. Daher werden sie so möglicherweise nicht in hohem Maße durch die Dialyse entfernt und steigen im Verhältnis zum Verlust des Körperwassers im Verlauf der Dialyse an.

Retinol ist eine Vitamin-A-Form und als solche wichtig für Aufbau, Wachstum und Funktion der Haut, Schleimhaut, Blutkörperchen, des Stoffwechsels und Sehvorganges. Retinol zeigte keine Korrelation mit der TAC.

Die wasserlöslichen Vitamine C und B gehen, der Literatur zufolge, im Verlauf der Dialyse verloren [Srinivasa_Rao2001; Eiselt2001; Morena2002] und müssen substituiert werden.

In dieser Arbeit zeigte sich, anders als in der Literatur beschrieben [Srinivasa_Rao2001; Morena2002], ein Anstieg von Vitamin E.

Gönenc2002 fand neben einer deutlich reduzierten Vitamin C Konzentration eine, im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöhte Vitamin E Konzentration. In anderen Studien wiederum zeigten HD Patienten eine, im Vergleich zu einer nierengesunden Kontrollgruppe, unveränderte Konzentration antioxidativer Vitamine (Vitamin A und Vitamin E). [Drai2001; Srinivasa_Rao2001]

In zahlreichen Studien wurde bereits der Zusammenhang zwischen Vitaminen und dem erhöhten oxidativen Stress untersucht. Vitamine sind Antioxidantien. Daher wurde auch nach Möglichkeiten, den oxidativen Stress durch zusätzliche Vitaminzufuhr zu verringern, gesucht [Bohm1997, Eiselt2001, Chen2001, Galli2001, Morena2002, Mune1999, Taccone-Gallucci1986]. Gegenstand der Untersuchungen waren die Vitamine C und E. Dabei konnte Chen2001 zeigen, dass es durch die Gabe von Vitamin C und Vitamin E zu einer signifikanten Verbesserung des antioxidativen Status, zu einer erhöhten SOD Aktivität sowie gleichzeitig zu einer verminderten Aktivität der NADPH-Oxidase (der wichtigsten Ursprungsquelle von ROS) kommt. Uzun2006 und Heinecke2001 konnten zeigen, dass die Supplementierung von Vitamin E zu einer Verminderung der Lipidoxidation führt. In groß angelegten Studien [Boaz2000; Stephens1996] konnte durch die zusätzliche Vitamin E Zufuhr zwar eine Reduktion kardiovaskulärer Ereignisse jedoch keine Besserung der Mortalität erzielt werden.

Verschiedene Studien haben sich auch mit dem Einfluss der Gabe von β -Carotin auf coronare Herzkrankheiten befasst. Dabei wurde zum Teil ein protektiver Effekt, aber auch ausbleibende Veränderungen nachgewiesen. [Steinberg1995]

Carotinoide stehen im Verdacht, besonders bei Rauchern und Menschen die Alkohol trinken, in hohen Dosen krebserregend zu sein. Sie steigern das Darmkrebsrisiko. Bei Menschen die weder rauchen noch trinken, können sie hingegen das Darmkrebsrisiko senken [Baron2003]. Das macht den unbedenklichen Einsatz dieser Stoffe schwierig. Auch wegen der bei längerer Überdosierung auftretenden Nebenwirkungen (Gastrointestinale Beschwerden, Osteoporose, Hypothyreose, Hepatosplenomegalie) ist der Einsatz von Carotinoiden abzuwägen.

Die wichtigsten Ergebnisse der TAC-Untersuchungen sind der Abfall der Totalen Antioxidativen Kapazität unter der Dialyse. Ebenfalls interessant ist die bei Dialysepatienten bestehende erhöhte Ausgangskonzentration der Antioxidantien im Vergleich zu einer altersgleichen Kontrollgruppe. Der Zusammenhang des TAC-Verlustes mit der Kt/V macht deutlich, dass es vor allem der intradialytische Verlust ist, der die TAC mindert. Verschiedene Korrelationen der klinischen Chemie geben Hinweise auf die Entstehung und Zusammensetzung der TAC. Ebenfalls ersichtlich ist, dass vaskuläre Erkrankungen tendenziell mit einer verminderten TAC einhergehen.

Interessant erscheint weiterhin die Verbindung zu den erhobenen Daten des Vitamin E sowie der Vitamin A Vorstufen. Trotz deutlicher Korrelationen der Daten, stehen hier die unter der Dialyse steigenden Vitaminkonzentrationen den fallenden Antioxidantien gegenüber.

4.1.2 Antioxidative Enzymsysteme

Die Proteinkonzentrationen wurden durch In-Cell Western, einem Verfahren zum immunochemischen Nachweis von Proteinen, in Monozyten gemessen. Dazu wurden die Monozyten zunächst isoliert und im weiteren durch einen primären und sekundären Antikörper, welcher fluoreszenzmarkiert war, inkubiert. Schließlich wurde das Signal durch einen Odyssey®-Scanner erfasst und die Konzentrationen berechnet. Untersucht wurden Monozyten, da diese als wichtige Vertreter des menschlichen Immunsystems un-mittelbar durch die Dialyse beeinflusst werden. Monozyten und Makrophagen sind die bedeutendsten zellulären Bestandteile atherosklerotischer Läsionen.

Einerseits ist die Immunkompetenz von Dialysepatienten auf Grund des urämischen Milieus gestört und die Phagozytoseeigenschaft von Monozyten vermindert. Andererseits kommt es durch den Kontakt der Zellen mit der Dialysemembran zur Komplementaktivierung und Aktivierung von Monozyten, welche dann Entzündungsmediatoren wie Interleukin 1, Interleukin 6 und TNF α (Tumornekrosefaktor) produzieren [Haefner-Cavaillon1994]. Die aktivierten Zellen exprimieren zusätzlich Adhäsionsmoleküle und werden hauptsächlich in der Lunge als dem ersten kapillären Gefäßbett sequestriert, wo sie proteolytische Enzyme freisetzen und umgebendes Gewebe schädigen können. [Cheung1994]

Die Abnahme zirkulierender Monozyten beeinflusst die Ergebnisse nicht, da nicht die Konzentration der Monozyten, sondern die Enzymkonzentration in Monozyten gemessen wurde.

4.1.2.1 Rhodanese

In bisher veröffentlichten Arbeiten wird die Struktur und Eigenschaften der Rhodanese als Sulfurtransferase beschrieben. Doch fehlen noch konkrete Aussagen über dessen genaue Funktionen und Bedeutung als antioxidatives Enzymsystem. Untersuchungen über Rhodanese bei Dialysepatienten konnten in der Recherche nicht gefunden werden.

Rhodanese ist eine Sulfurtransferase, die als solche den Transfer eines Schwefelatoms von Thiosulfat auf Cyanid generiert, wobei Thiocyanat und Sulfit entstehen und Cyanid damit entgiftet wird.

Für die vorliegende Arbeit wurden insgesamt 36 Dialysepatienten und 33 Kontrollpersonen bezüglich der intrazellulären Rhodanese-Konzentration untersucht.

Im Ergebnis zeigte sich, dass Dialysepatienten gegenüber einer altersgleichen gesunden Kontrollgruppe, bestehend aus 13 Probanden, die als Healthy control I bezeichnet wurde, eine annähernd gleiche Konzentration von Rhodanese aufweisen. Bei dieser Kontrollgruppe lag die Konzentration im Durchschnitt bei $0,3787 \pm 0,02084$ arbitrary units. Die Rhodanese Konzentration der Dialysepatienten betrug $0,3830 \pm 0,01260$ arbitrary units, gemessen vor Beginn einer Dialysebehandlung. Hingegen zeigte die Kontrollgruppe Healthy control II, bestehend aus 20 jungen gesunden Probanden eine mit $0,4284 \pm 0,01975$ arbitrary units deutlich höhere Rhodanese-Konzentration.

Junge gesunde Menschen weisen eine, im Vergleich zu älteren niereninsuffizienten Menschen, höhere ($p=0,0476$) Rhodanese-Konzentration auf. Im Vergleich zu älteren gesunden Menschen zeigen jüngere nur tendenziell eine höhere Rhodanese-Konzentration.

Weder das Geschlecht noch eingenommene Medikamente oder Comorbiditäten scheinen Auswirkungen auf die Rhodanese-Konzentration bei Dialysepatienten zu haben. Lediglich Probanden die angaben, regelmäßig Alkohol zu trinken, zeigten tendenziell eine niedrigere Rhodanese-Konzentration, ohne Signifikanz.

Die Untersuchungen zeigten weiterhin, dass es bei Dialysepatienten im Verlauf der Dialyse zu einem mit $p=0,0443$ signifikanten Anstieg der Rhodanese-Konzentration auf $0,4089 \pm 0,01468$ arbitrary units kommt.

Bisher konnte festgestellt werden, dass Harnstoff in hoher Konzentration ein Entfalten des Enzyms Rhodanese induziert und dadurch dessen Aktivität verloren geht [Bhattacharyya2000; Horowitz1993; Shibatani1999]. Harnstoff als harnpflichtige Substanz ist bei niereninsuffizienten Patienten generell erhöht, da diese Patienten es nicht vermögen Harnstoff über die Nieren auszuschcheiden. Die Dialyse als Nierenersatztherapie führt zur Reduktion und Normalisierung der Harnstoffkonzentration womit sich gleichzeitig die Hemmung der Rhodanese vermindert.

Des weiteren wurde eine negative Korrelation zwischen Thiocyanat und dem BUN-Wert (Blood urea nitrogen) gefunden. BUN, ein Maß für den Blut-Harnstoff-Stickstoff, inaktiviert die Thiocyanatsynthese, also Rhodanese [Hasuike2004]. Die Hemmung durch Harnstoff beziehungsweise Inaktivierung durch BUN könnte eine Erklärung der niedrigen Rhodanese-Konzentration vor der Dialyse und des dann folgenden Konzentrationsanstieges durch die Dialyse sein.

Ferner konnte festgestellt werden, dass Rhodanese durch Inkubation mit NADH inaktiviert wird. Es wird angenommen das ROS wie Superoxid oder Hydrogenperoxid, die bei der Reaktion von NADH mit molekularem Sauerstoff entstehen, zur Oxidation der Sulfhydrylgruppe der Rhodanese führt, was wiederum ebenfalls einen Aktivitätsverlust nach sich zieht [Horowitz1986]. Der erhöhte oxidative Stress bei Dialysepatienten führt demnach zu einem Aktivitätsverlust der Rhodanese.

Die Entgiftung des Cyanids, einem Urämietoxin, welches durch Hemmung des mitochondrialen Elektronentransportes zum Zelltod führen würde, ist eine der Hauptaufgaben von Rhodanese.

Untersuchungen von Dialysepatienten haben ergeben, dass diese im Vergleich zu gesunden nicht rauchenden Probanden, signifikant höhere Konzentrationen sowohl von Cyanid als auch von dem durch Rhodanese entstehenden Thiocyanat aufweisen. Die Konzentration von Thiocyanat war bei diesen Patienten auch im direkten Vergleich mit gesunden aber rauchenden Probanden signifikant höher und

zeigte sich nach der Dialyse signifikant reduziert [Hasuike2004]. Mögliche Ursache der hohen Thiocyanatkonzentration könnte eine verminderte Ausscheidung beziehungsweise ineffektive Dialyse sein, da Thiocyanat an Albumin gebunden ist.

In der gesunden Kontrollgruppe zeigte sich eine positive Korrelation zwischen Cyanid und Thiocyanat wohingegen es bei Dialysepatienten eine negative Korrelation ergab.

Das heißt, geringe Konzentrationen von Cyanat gehen mit höheren Konzentrationen von Thiocyanat einher und umgekehrt, was ebenfalls auf die verminderte kontinuierliche Ausscheidung über den Urin zurückzuführen ist und für ein geschädigtes Entgiftungssystem bei Dialysepatienten spricht [Hasuike2004].

Die erhöhte Konzentration von Thiocyanat bei Dialysepatienten spielt möglicherweise auch eine Rolle bei den kardiovaskulären Erkrankungen dieser Patienten [Koyama1997; Hasuike2004].

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass es eine direkte Verbindung zwischen Thiocyanat und Arteriosklerose gibt, da es die Lipidperoxidation verstärkt und das Risiko für cerebrale Infarkte erhöht [Wang2001]. Thiocyanat entsteht auch beim Rauchen. Es blockiert den Sauerstofftransport der Erythrozyten. Dadurch kommt es zur Erythrocytose was die Hämostase stört und zu Endothelschäden führt. Zusätzlich hat Thiocyanat eine Blutdruck senkende Wirkung. Der vasoregulierende Effekt ist auf die veränderte Aktivität von Kalzium-Kanälen zurückzuführen [Engström1996].

Neben der Detoxifikation von Cyanid hat Rhodanese wichtigen Anteil an der Bildung von Verbindungen die Sulfan-Schwefel (R-S-SH) enthalten. Sulfan-Schwefel-Verbindungen weisen antioxidative Eigenschaften auf, da sie freie Radikale abzufangen vermögen und die Aktivität antioxidativer Enzymsysteme (SOD, GPx) erhöhen [Kessler2006; Everett1994; Iciek2001]. Auch eine Funktion in der Bildung von Cystein, einem wichtigen Bestandteil des Antioxidans Glutathion, wird Rhodanese zugesprochen [Gliubich1996].

Bei der Suche nach Einflussfaktoren auf die Rhodanese-Konzentration ergab die Regressionsanalyse eine signifikante inverse Korrelation der Fibrinogenkonzentration mit der Rhodanese-Konzentration vor ($r=0,4311$; $p=-0,0218$) als auch nach der Dialyse ($r=0,4290$; $p=-0,0256$).

Eine deutliche Abhängigkeit zeichnete sich zwischen der Rhodanese-Konzentration und der zum gleichen Zeitpunkt gemessenen Totalen Antioxidativen Kapazität bei Dialysepatienten ab. Sowohl vor als auch nach der Dialyse korrelierten beide Parameter signifikant.

Für die untersuchten Dialysepatienten lagen neben Daten der klinischen Chemie und TAC-Messungen auch Ergebnisse aus Gefäßmessungen, die mittels eines HDI/Pulswave cardiovascular profiling instrument durchgeführt wurden, vor. Die Pulswellenmessungen geben 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.

Der die kardiovaskulären Komplikationen verursachende arteriosklerotische Umbau der Gefäße führt zur Reduktion der arteriellen Compliance, die man durch die Messung der Pulswelle und der charakteristischen Impedanz erfassen kann. Eine Abnahme der Compliance (Elastizität) 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 [Sarnak2003]. Eine linksventrikuläre Hypertrophie (LVH) wurde in Studien bei bis zu 75 % der untersuchten Dialysepatienten gefunden [Baigent2000].

Die Pulswellenmessungen wurden vor als auch nach der Dialyse durchgeführt und zeigten einen signifikanten Abfall der Compliance der großen Gefäße (C1) und einen tendenziellen aber nicht signifikanten Abfall von C2. S1 und S2 stiegen zum Ende der Dialyse signifikant an.

Die zu Beginn der Dialyse vorliegende Gefäß-Compliance der kleinen Gefäße C2 korreliert signifikant ($p=0,0298$) mit der zur gleichen Zeit gemessenen Rhodanese-Konzentration. Da sich die Arterial Stiffness nach oben genannter Rechnung aus der Compliance errechnet, müsste bei vorliegender Korrelation mit C2 auch von einer signifikanten aber inversen Korrelation mit S2 auszugehen sein. Da dies bei einfacher Betrachtung der Werte nicht der Fall war, wurden sowohl C2 als auch S2 logarithmiert und anschließend erneut mittels Regression analysiert.

LogC2 korreliert mit $r=0,3378$ positiv und logS2 mit $r=-0,3378$ negativ mit der Konzentration von Rhodanese vor Dialysebeginn. Beide Korrelationen liegen mit $p=0,0914$ nicht im Signifikanzintervall $p<0,05$ und sind somit per definitionem nicht signifikant. Ableiten lässt sich jedoch die Tendenz, dass eine hohe Gefäß-Compliance beziehungsweise niedrige Steifigkeit der Gefäße mit hohen Rhodanese-Konzentrationen einhergeht.

Rhodanese geht wahrscheinlich mit einer günstigeren Gefäßbeschaffenheit einher. Ob es für diese verantwortlich ist oder ob einer gute Compliance die Rhodanese-Konzentration günstig beeinflusst, konnte nicht geklärt werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass Rhodanese bei erhöhtem oxidativen Stress, wie er bei Dialyse vorherrscht, vermindert ist. Nach der Dialyse steigt Rhodanese an. Entweder durch die verminderte Harnstoffkonzentration, die nachweislich eine Rhodanese-inhibierende Wirkung gezeigt hat, oder durch einen anderen unbekanntem inhibierenden Stoff, der im Zuge der Dialyse wie Harnstoff eliminiert wird.

Die deutliche Abhängigkeit von der Totalen Antioxidativen Kapazität unterstützt die Annahme einer antioxidativen Wirkung der Rhodanese und zeigt dessen Bedeutung im antioxidativen Stoffwechsel.

Welche spezielle Rolle Rhodanese im Prozess des oxidativen Stresses und der erhöhten kardiovaskulären Mortalität genau spielt, gilt es in weiteren Untersuchungen eingehend zu beleuchten. Dessen Bedeutung als antioxidatives Enzym bei der Bildung von antioxidativ wirksamen Sulfan-Schwefel-Verbindungen und bei der Entgiftung des zum Zelltod führenden Cyanids ist bereits dargestellt worden. Der hier dargestellte Zusammenhang von Rhodanese mit dem Gefäßstatus ist hinweisgebend auf eine gefäßprotektive Wirkung der Rhodanese, die der durch Arteriosklerose erhöhten Mortalität bei Dialysepatienten entgegentreten kann.

4.1.2.2 nNOS

Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS) bilden das freie Radikal Stickstoffmonoxid welches in physiologischen Konzentrationen gefäßdilatierend wirkt und antiarteriosklerotische Eigenschaften besitzt. In hohen Dosen handelt es sich jedoch um ein reaktionsfreudiges Radikal, das eine Reihe von Stoffwechselfvorgängen hemmen und die DNA schädigen kann.

Erdogan2002 fand unter anderem heraus, dass NO bei Dialysepatienten höher ist, als bei gesunden Kontrollen. Außerdem würde eine negative Korrelation zwischen MDA (Malondialdehyd, einem Marker für oxidativen Stress) und NO bestehen, was den antioxidativen Effekt von NO belege.

Über die Radikalität von NO gibt es unterschiedliche Aussagen. Einerseits wird davon ausgegangen, dass NO mit anderen Radikalen reagiere, wodurch ungefährlichere Radikale gebildet werden würden. Andererseits könne es auch zur Bildung toxischerer Radikale wie dem Peroxinitrit führen [Yilmaz2006; Erdogan2002; Amann2004].

Die neuronale intrazelluläre NO-Synthase wurde bei insgesamt 27 Hämodialysepatienten vor und nach der Dialyse und 11 alterskonformen Kontrollpersonen erfasst. Die nNOS-Konzentration war bei den niereninsuffizienten Patienten mit $3,838 \pm 0,4937$ arbitrary units vor Dialysebeginn geringer als bei der Kontrollgruppe, die im Mittel eine nNOS-Konzentration von $4,566 \pm 0,6417$ arbitrary units aufweist. Der Unterschied war mit $p=0,0598$ nicht im definierten Signifikanzintervall, zeigt aber den Trend einer bei Dialysepatienten verminderten nNOS-Konzentration.

Im Verlauf der Dialyse kommt es zu einem mit $p=0,0120$ signifikanten Anstieg der nNOS-Konzentration auf $5,221 \pm 0,8847$ arbitrary units. Dabei war die Zunahme von nNOS bei Tumorpatienten im Vergleich zu Patienten ohne Tumorerkrankung signifikant niedriger. Die Dialysepatienten, die zusätzlich eine pAVK aufwiesen, zeigten hingegen eine signifikant stärkere nNOS-Zunahme während der Dialyse als Patienten die keine pAVK hatten.

Die bei Dialysepatienten verminderte nNOS-Konzentration könnte auf das Vorhandensein von zirkulierenden Inhibitoren zurückzuführen sein. Wenn diese durch die Dialyse inaktiviert beziehungsweise entfernt werden, würde das auch den Anstieg von nNOS durch die Dialyse erklären. Ein bekannter Inhibitor der NOS ist das sogenannte ADMA (asymmetrisches Dimethyl-Arginin). ADMA ist eine, dem L-Arginin chemisch ähnliche Verbindung, die so die Bildung von NO über die NOS kompetitiv blockieren kann [Amore1995]. Erhöhte ADMA Spiegel sind mit kardiovaskulären Komplikationen assoziiert [Böger2005; Leiper1999]. Vermindertes NO und erhöhtes ADMA, wie es bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz gefunden wird, sind Hauptgründe für die endotheliale Dysfunktion dieser Patienten, die ein Element der Pathogenese der Arteriosklerose ist [Yilmaz2006].

Laut Yilmaz2006 erhöht die Dialysebehandlung die Konzentration von ADMA was mit einer vermehrten Hemmung der nNOS einhergehen würde und am ehesten eine Abnahme von NOS nach der Dialyse zur Folge habe. Der in dieser Arbeit gezeigte Anstieg von nNOS könnte mit der Regulation eines erhöhten Bedarfs bei vermehrter Hemmung durch ADMA begründet werden. Erhöhte NO-Konzentrationen würden die NOS direkt hemmen [Valko2007].

Möglich wäre auch das Vorhandensein eines weiteren bis dato unbekanntem Inhibitors.

Es wurde beobachtet, dass eine erhöhte Expression der iNOS, sowie eine Steigerung der Aktivität von iNOS durch Leukozytenkontakt mit der Dialysemembran induziert wurde [Erdogan2002; Amore1995].

Wie bereits beschrieben, wird durch die Reaktion der Blutbestandteile mit der Dialysemembran die Komplementkaskade aktiviert und Cytokine freigesetzt, diese induzieren die iNOS wodurch hohe Mengen an NO produziert werden. Somit hat das Dialyseverfahren per se einen Effekt auf die NOS Aktivität. [Erdogan2002; Amore1995]

Die Regressionsanalyse der vorhandenen Daten der Patienten und der nNOS-Werte ergab eine Reihe von Korrelationen. So fand sich eine positive Korrelation der nNOS-Konzentration vor der Dialyse mit HDL und Albumin. Negativ waren die Korrelationen mit Ferritin, Harnstoff und BUN. Ebenfalls negativ korrelierte die TAC vor HD mit nNOS ($r=-0,4395$; $p=0,0316$).

Es ist bekannt das Dyslipidämie ein häufig anzutreffendes Problem bei ESRD-Patienten ist. Hypertriglyceridämie, hohe VLDL, IDL und LDL sowie niedriges HDL wurden bei chronisch Hämodialysepflichtigen Patienten gefunden [Becker1997]. Niedrige nNOS-Konzentrationen gehen mit niedrigen HDL-Werten einher.

Die PCRn (normalized protein catabolic rate) ist ein Wert der sich aus BUN und Kt/V errechnet und zur Beschreibung der Ernährungssituation dient. Der Wert gibt an, wie viel Eiweiß pro Tag und Kilogramm Körpergewicht abgebaut wird. Er betrug bei den Patienten $0,9933 \pm 0,2377$ g/kg/d und korrelierte mit $r=-0,4688$ negativ signifikant mit der nNOS-Konzentration, gemessen vor und nach HD. Wenn Patienten hiernach eine hohe nNOS-Konzentration haben, kann davon ausgegangen werden, dass der PCRn-Wert niedrig ist. Eine niedrige PCR geht mit einer höheren Mortalität einher [Gotch1985].

Im Rahmen anderer Arbeiten unseres Labors wurden für die gleichen Patienten die Vascular indices (RI) durch digitale Photoplethysmographie erfasst. Der Vascular Index dient als Charakteristikum des diastolischen Anteils der Volumenpulswelle, der hauptsächlich durch Reflexion der Pulswelle in der Peripherie entsteht [Millasseau2003]. RI n-v bezeichnet die Differenz des Vascular index nach Kompression des Oberarms minus vor Kompression und steht für die Dilatation. Der RI n-v wurde sowohl vor als auch nach Dialyse bestimmt. Der Vascular index RI n-v nach der Dialyse zeigte eine positive Korrelation mit der Konzentration von nNOS vor HD und nach HD. Dieses Ergebnis ist auf Grund der dilatierenden Wirkung von Stickstoffmonoxid zu erwarten.

Zusammenfassend ist die wichtigste Erkenntnis der Untersuchungen eine im Dialyseverlauf ansteigende nNOS-Konzentration in Monozyten. Ursächlich könnte ein durch die Dialyse entfernter Inhibitor sein. Nicht klar erscheint, ob die erhöhte nNOS-Konzentration nach der Dialyse als positives oder negatives Faktum bezüglich des oxidativen Stresses zu werten ist. Bei einer erhöhten ROS-Produktion kann es zur Entkopplung der NOS kommen und statt zur NO-Produktion werden in hohem Maße Superoxidanionen produziert. Die erhöhte ROS-Produktion durch die Dialyse würde damit eine zusätzliche Steigerung erfahren. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass der kompetitive Inhibitor ADMA, der seinerseits zu einer Entkopplung der NOS führt [Mulac2005], und unter der Dialyse ansteigt [Yilmaz2006], dann nach der Dialyse zu einer gesteigerten Superoxidanionenkonzentration führt. Dem würde eine verminderte NO-Produktion folgen, die durch eine fehlende Rückkopplung die NOS-Expression steigert.

4.1.2.3 SOD1, SOD2, GPx

Zu den antioxidativen Enzymsystemen gehören die Kupfer-Zink-haltige Superoxiddismutase SOD1 sowie die Mangan-haltige Superoxiddismutase SOD2. Sie katalysieren die Dismutation von Superoxidanionen in Sauerstoff und weniger aggressives Wasserstoffperoxid. Dieses wiederum wird durch die Selen-haltige Glutathion-Peroxidase GPx zu Wasser reduziert.

Es wurden 20 Dialysepatienten zu Beginn und am Ende einer Dialyse, sowie insgesamt 24 gesunde Kontrollpersonen untersucht. Von den Kontrollpersonen zählen 7 in die Gruppe der altersgleichen Healthy control I. Es zeigte sich, dass Dialysepatienten von allen drei untersuchten antioxidativen Enzymsystemen signifikant höhere Konzentrationen aufwiesen als die Kontrollgruppe Healthy control I ($p[\text{SOD1}]=0,0217$; $p[\text{SOD2}]=0,0281$; $p[\text{GPx}]=0,0086$). Die Konzentration der 17 jungen Kontrollpersonen der Gruppe Healthy control II zeigte annähernd gleiche Werte wie sie bei den Dialysepatienten zu finden waren. Für alle drei Enzyme gilt, dass die Konzentrationen der Healthy control I signifikant geringer sind als die der Healthy control II ($p[\text{SOD1}]=0,0063$; $p[\text{SOD2}]=0,0019$; $p[\text{GPx}]=0,0019$). Somit sind die antioxidativen Enzymsysteme bei älteren Menschen im Vergleich zu jüngeren (<55 Jahre) vermindert. Auch im Vergleich zur Gruppe der altersgleichen Dialysepatienten ist die Konzentration von SOD und GPx bei älteren gesunden Menschen niedriger.

Bei Dialysepatienten wurden folgende Konzentrationen gemessen: SOD1= $43,62 \pm 5,512$ arbitrary units; SOD2= $79,64 \pm 9,907$ arbitrary units; GPx= $44,28 \pm 5,184$ arbitrary units.

Es kam jeweils zu einem signifikanten Abfall der Enzymkonzentrationen unter der Dialyse. SOD1 nach HD= $33,27 \pm 3,842$ arbitrary units ($p=0,0214$), SOD2 nach HD= $58,27 \pm 7,649$ arbitrary units ($p=0,0131$), GPx nach HD= $34,02 \pm 3,704$ arbitrary units ($p=0,0313$).

Die Recherche von Arbeiten, die sich mit den Enzymsystemen bei Dialysepatienten beschäftigten, zeigte unterschiedliche Ergebnisse. Ebenfalls uneinheitlich sind die Medien, die untersucht wurden beziehungsweise ob Konzentrationen oder Aktivitäten gemessen wurden.

Messungen der Aktivitäten der antioxidativen Enzymsysteme SOD und GPx in Erythrozyten zeigen zum Teil bei Dialysepatienten geringere Werte [Zima1996; Roxborough1999; Gönenc2002; Durak2001; Weinstein2000]. In weiteren Arbeiten konnten verminderte SOD- und GPx-Konzentrationen im Plasma nachgewiesen werden [Taylor1992; Yilmaz2006; Draï2001; Chen1997].

Nguyen-Khoa2001 konnte zeigen, dass die CuZn-SOD bei Dialysepatienten im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe signifikant reduziert ist. Grundsätzlich wird hierbei von einer deutlichen Schädigung der gesamten antioxidativen Kapazität, vor allem in Form antioxidativer Enzymsysteme ausgegangen. Diese Arbeiten stehen mit den folgenden und den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit im Zwiespalt.

Pawlak2003; Pawlak2005; Pawlak2006,2; Pawlak2004 und Akiyama2005 fanden eine erhöhte Konzentration beziehungsweise Aktivität [Toborek1992] von SOD1 bei Dialysepatienten im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe. Die Autoren setzen hierbei erhöhte Level an SOD1 mit erhöhtem oxidativen Stress im Sinne einer Bedarfsregelung gleich.

Die Ergebnisse der Veränderungen durch die Dialyse sind zum Teil auch widersprüchlich. Am Ende der Dialysesitzung waren sowohl abfallende Aktivitäten von GPx [Morena2002] und SOD [Toborek1992], als auch unveränderte GPx- und SOD-Aktivitäten [McGrath1995; Gönenc2002] zu verzeichnen. Plasma GPx zeigte sich in Draï2001 nach einer Dialysesitzung reduziert.

Teilweise wurde die Aktivität der entsprechenden Enzyme ihrer Konzentration gegenübergestellt. So ergab eine Studie von Roxborough1999, dass die Aktivität von GPx am Ende der Dialyse anstieg, bei gleich bleibender Konzentration des Enzyms. So dass man davon ausgeht, dass ein urämischen Inhibitor der Enzymaktivität vorhanden ist, der durch die Dialyse entfernt wird. Bei Chen1997 kam es nach der Dialyse zu einer reduzierten Aktivität von GPx bei gleichzeitig nachgewiesenem Anstieg der Plasmakonzentration.

Canestrari1994 gehen davon aus, dass es durch die Dialysesitzung zur weiteren Abnahme der Aktivität der Enzymsysteme kommt, durch den wahrscheinlich hohen Verbrauch bei einer Überproduktion oxidativer Substanzen.

Die Regressionsanalyse zeigte, dass sich alle drei untersuchten antioxidativen Enzymsysteme in ihrem Verhalten unter der Dialyse ähneln und von einander abhängig sind. So korrelierten die Werte von SOD1, SOD2 und GPx sowohl vor als auch nach der Dialyse untereinander. Ebenso korrelierten die jeweilige Verluste der Enzyme.

Die Enzyme zeigten außerdem eine signifikante Abhängigkeit von der Dialysezeit die durchschnittlich $3,590 \pm 0,06837$ Stunden betrug. Minimal wurde 1 Stunde maximal 5 Stunden dialysiert.

Es handelt sich jeweils um eine negative Korrelation, das heißt sowohl vor als auch nach dem Ende der Dialysesitzung korreliert eine kurze Dialysedauer signifikant mit einer höheren Enzymkonzentration. Bei SOD2 korreliert zusätzlich der während der Dialyse entstandene Verlust von SOD2 mit der Dialysezeit signifikant negativ. Je kürzer die Dialyse um so geringer der oxidative Stress der zu einem Enzymverbrauch führt.

Taylor1992 fanden in ihrer Arbeiten ebenfalls eine negative Korrelation zwischen der SOD-Konzentration vor Dialysebeginn und der Dauer der Dialyse. Eine positive Korrelation zwischen der Dialysedauer und SOD fand sich bei Pawlak2004 und Pawlak2006, wobei in diesen Arbeiten Patienten, die CAPD (continuous ambulatory peritoneal dialysis) bekamen, untersucht wurden. Zima1996 fand keine Korrelation zwischen der SOD Aktivität von Erythrozyten und der Dialysebehandlung.

Bei den untersuchten Proteinen fanden sich Korrelationen unterschiedlichen Ausmaßes mit den durch die Gefäßmessungen erhobenen Daten der Dialysepatienten. Dabei zeigte sich am deutlichsten eine Abhängigkeit von der Gefäßsteifigkeit Arterial Stiffness S1 der großen Gefäße, gemessen vor HD. Diese korrelierte positiv mit der jeweiligen Ausgangskonzentration aller drei untersuchten Proteine. Hierbei hatte die Korrelation von SOD1 mit S1 einen Korrelationskoeffizienten $r=0,5535$ und war mit $p=0,0261$ signifikant. Bei SOD2 ist der Korrelationskoeffizienten $r=0,6229$ und $p=0,0100$. GPx korreliert mit $r=0,5328$ signifikant ($p=0,0336$) mit der Gefäßsteifigkeit S1 und mit $r=0,5044$ zusätzlich signifikant ($p=0,0463$) mit der Gefäßsteifigkeit der kleinen Gefäße, Arterial stiffness S2.

Eine erhöhte Arterial Stiffness, die für eine stärkere Schädigung der Gefäßwand steht, geht mit hohen Enzymwerten einher, wie sie bei erhöhtem oxidativen Stress auftreten.

Die Höhe des Verlustes von SOD1 zeigte sich signifikant abhängig vom MCV-Wert (mean corpuscular Volume) und vom Systemic vascular resistance der untersuchten Patienten, sowie von den nach der Dialyse ermittelten Blutdruckwerten. Die vor der Dialyse gemessenen SOD1-Konzentrationen korrelieren signifikant negativ mit der Calciumkonzentration im Serum. Die nach der Dialyse gemessene SOD1-Konzentration korreliert negativ signifikant mit der Kt/V.

Bei 7 Dialysepatienten lagen zusätzlich die Daten für nNOS vor. Für diese ergab die Regressionsanalyse eine signifikante negative Korrelation des Verlustes von SOD2 mit der Konzentration von nNOS sowohl vor als auch nach der Dialyse.

Die insgesamt sehr unterschiedlichen Angaben der Konzentrationen antioxidativer Enzymsysteme in der Literatur bedürfen weiterhin einer ausführlichen Klärung. In dieser Arbeit konnten einheitlich alle drei wichtigen Enzymsysteme nebeneinander dargestellt und deren unmittelbare Abhängigkeit von einander gezeigt werden. Die Betrachtung eines einzelnen Systems scheint weniger sinnvoll.

Dialysepatienten haben vor der Dialyse eine im Vergleich zur altersgleichen Kontrollgruppe hohe Ausgangskonzentration, was als Anpassung eines andauernd wirkenden erhöhten oxidativen Stresses bewertet werden könnte. Der eindeutige Abfall der Konzentration der Enzymsysteme am Ende der Dialyse müsste demnach den akuten Verbrauch durch eine kurzzeitige massive oxidative Belastung durch die Dialyse darstellen. Belegt wird dies durch die höhere Enzymkonzentration bei einer kurzen Dialysedauer. Ebenfalls zu diskutieren ist der Verlust der Synthesefähigkeit der Enzymsysteme durch den Verlust der essentiellen Bestandteile [Toborek1992]. Die Konzentrationen der Spurenelemente Kupfer, Zink, Mangan und Selen wurden in dieser Arbeit nicht erfasst. Auf Grund ihrer Molekülgröße ist aber von einem Verlust durch die Dialyse auszugehen.

Generell kommt es mit dem Alter zur Abnahme der antioxidativen Enzymsysteme. Ob dies gleichbedeutend mit einer Abnahme des oxidativen Stresses ist, ist anzuzweifeln.

4.1.3 Fluoreszenz

Zusätzlich zu den genannten Untersuchungen der Totalen Antioxidativen Kapazität und antioxidativen Enzymsysteme wurden Fluoreszenzmessungen durchgeführt. Hierbei wurde Plasma der Patienten verwendet und dessen Eigenfluoreszenz ohne Zugaben gemessen. Um zunächst optimale Einstellungen für quantitativ aussagekräftige Messergebnisse zu bekommen, wurden anfänglich einzelne Proben in verschiedenen Einstellungen vermessen. Letztendlich konnten bei einer Excitationswellenlänge von 300nm und einer Emissionswellenlänge von 620nm optimale Messergebnisse erzielt werden. Diese Einstellungen wurden zur Vermessung alle Proben verwendet.

Untersucht wurde das Plasma von 24 Dialysepatienten vor und nach einer Dialysebehandlung. Zum Vergleich diente eine Kontrollgruppe bestehend aus 12 Probanden, die von der Altersstruktur signifikant jünger waren ($p=0,0178$) als die Dialysepatienten, was beim Vergleich beachtet werden muss.

Die Eigenfluoreszenz der Patienten war vor Beginn der Dialyse mit rund $1234 \pm 275,9$ arbitrary units signifikant niedriger als nach der Dialyse ($3669 \pm 685,2$ arbitrary units). Die Zunahme der Eigenfluoreszenz war mit $p<0,0005$ signifikant. Signifikant ($p<0,0001$) war auch der Vergleich der Ausgangseigenfluoreszenz mit der Eigenfluoreszenz der Kontrollgruppe, die mit $4416 \pm 664,5$ arbitrary units deutlich höher lag.

Bei einer kleinen Auswahl von 5 Patienten wurde die genaue Zunahme der Eigenfluoreszenz während der Dialyse durch Blutabnahmen zu Beginn sowie nach $\frac{1}{2}$, 1, 2, 3 Stunden und nach der Dialyse dokumentiert. Eine im Vergleich zum Dialysebeginn signifikante Zunahme ergibt sich erst nach 4 Stunden, also am Ende der Dialyse. Kürzere Dialysezeiten müssten hiernach zu einer verminderten Zunahme der Eigenfluoreszenz führen. Nicht bekannt ist, was diese Fluoreszenzsignale bedingt. Da durch die Dialyse viele Stoffe aus dem Blut, respektive Plasma, entfernt werden, meistens dem Sinn der Dialyse entsprechend, könnte es sich bei den Stoffen um Fluoreszenzsignal-mindernde Substanzen handeln, deren Wegfall höhere Signale zur Folge habe.

Comorbiditäten wie Diabetes oder KHK hatten ebenso wenig wie Alkohol- und Zigarettenkonsum Einfluss auf die Eigenfluoreszenz.

Die Eigenfluoreszenz des Plasmas wird von vielen Faktoren bestimmt. Zur Erfassung möglicher Zusammenhänge wurden die Ergebnisse durch Regressionsanalyse mit den vorhandenen Daten aus klinischer Chemie, Blutbild, Gefäßmessungen und Dialyseparametern verglichen. Dabei zeigte sich eine inverse Korrelation zwischen der Eigenfluoreszenz und der Totalen Antioxidativen Kapazität. Beide Werte, gemessen vor Dialysebeginn, korrelierten mit $r=-0,4247$. Die Korrelation ist mit $p=0,0386$ signifikant. Die Eigenfluoreszenz steigt mit abnehmender Konzentration der Antioxidantien an. Das würde für die Theorie eines vorhandenen, die Fluoreszenz mindernden Stoffes sprechen.

Bei den 5 Dialysepatienten, bei denen Eigenfluoreszenzwerte von 6 aufeinander folgenden Zeitpunkten während einer Dialysebehandlung vorliegen, konnte eine deutliche ($p<0,0001$) Korrelation der Fluoreszenz mit α -Tocopherol nachgewiesen werden. Der Korrelationskoeffizient ist mit $r=0,9235$ sehr hoch. Das Vitamin E α -Tocopherol steigt unter der Dialyse signifikant an.

Weiterhin signifikant war die Korrelation mit Lutein, Zeaxanthin, α -Carotin und Cholesterol.

Untersucht wurden unter anderem auch hämodynamische Parameter wie Blutdruck, Pulsrate und Schlagvolumina. Das geschätzte Schlagvolumen esv (estimated stroke volume) zeigte eine mit $p<0,0001$ signifikante Abnahme von $61,46 \pm 1,758$ ml auf $56,78 \pm 1,178$ ml durch die Dialyse. Sowohl vor als auch nach der Dialyse ist eine signifikante Korrelation der esv mit dem Anstieg der Eigenfluoreszenz zu verzeichnen. Das Schlagvolumen wird als Differenz von enddiastolischem und endsystolischem Volumen berechnet und ist bei Patienten mit Herzinfarkt, Herzmuskel- oder Herzklappenerkrankungen vermindert. Der Normalwert liegt zwischen 70 und 100 ml. Die Dialysepatienten zeigen im Durchschnitt unter dem

Normwert liegende esv-Werte vor der Dialyse. Die weitere Abnahme ist mit der Abnahme des Körperwassers durch die Dialyse verbunden. Bei hohen Schlagvolumina ist ein stärkerer Anstieg der Eigenfluoreszenz zu erwarten.

Parameter, die die Qualität der Dialyse beschreiben, korrelierten ebenfalls, teilweise deutlich, mit der initialen Eigenfluoreszenz des Plasmas. Der Kt/V_{eq} korreliert wie das Ultrafiltrationsgewicht negativ mit der Fluoreszenz. Die Harnstoffreduktionsrate, die bei $42,33 \pm 1,4\%$ liegt korreliert mit $r=0,7631$ und $p<0,0001$ deutlich positiv mit der Eigenfluoreszenz. Bei der Harnstoffreduktionsrate handelt es sich um den prozentualen Abfall des Serumharnstoffwertes während der Dialysebehandlung. Dieser Wert korreliert wie die Kt/V positiv mit dem Patientenüberleben [Owen1993].

Die Entstehung der Fluoreszenzsignale ist unbekannt. Eine Abhängigkeit von den Parametern, die die Dialysequalität beschreiben zeigt, dass die Signalentstehung durch die Dialyse beeinflusst wird. Korrelationen mit Vitaminen und der Totalen Antioxidativen Kapazität sprechen für einen Zusammenhang mit oxidativem Stress.

5 Zusammenfassung

Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz und insbesondere Dialyse-Patienten haben eine erhöhte kardiovaskuläre Mortalität. Diese ist in einem besonderen Maße erhöht, als dass sie allein durch traditionelle Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen erklärt werden könnte. Erhöhter oxidativer Stress ist einer der wichtigsten nicht-traditionellen Risikofaktoren bei diesen Patienten. Er führt zur oxidativen Veränderung von Proteinen, Lipiden und Aminosäuren, die wiederum an der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen beteiligt sind. Oxidativer Stress ist ein Zustand der Störung des Gleichgewichtes zwischen der Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen und den antioxidativen Abwehrmechanismen.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die Totale Antioxidative Kapazität als Gesamtheit der Antioxidantien im Plasma mit Hilfe eines Total Antioxidant Status Assay Kits und der Oxidation von Azinodif[3-ethylbenz-thiazoline sulphonate] photometrisch bestimmt. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigten Dialysepatienten eine signifikant höhere antioxidative Kapazität ($1,015 \pm 0,021$ mmol/l, $n=123$ vs. $0,762 \pm 0,0344$ mmol/l, $n=40$, Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes; $p<0,0001$). Die antioxidative Kapazität im Plasma fiel während einer Hämodialysetherapie signifikant ab. Es zeigte sich eine positive Korrelation zwischen einer zunehmenden Dialyseeffektivität, gemessen durch die Kt/Veq-Bestimmung, und der Minderung der antioxidativen Kapazität ($r=0,1971$, $p=0,0373$).

Weiterhin wurden die intrazellulären Konzentrationen von 5 antioxidativen Enzymen, nämlich der Thiosulfat-Sulfurtransferase Rhodanese, welche die Umwandlung von Cyaniden, Sulfiten, organischen Schwefelverbindungen und Dithiolen in weniger toxische Schwefelverbindungen katalysiert, der nNO-Synthase (nNOS), welches das reaktive Sauerstoffradikal NO bildet, der Superoxiddismutasen SOD1 und SOD2 sowie der Glutathionperoxidase (GPx) bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz, Dialyse-Patienten und Kontrollpersonen mittels quantitativem In-Cell Western Assay bestimmt. Die intrazellulären Konzentrationen von Rhodanese (vor HD $0,3830 \pm 0,01260$ arbitrary units vs. nach HD $0,4089 \pm 0,01468$ arbitrary units; $n=36$; $p<0,05$) und nNOS stiegen während der Hämodialysetherapie signifikant an, während die Konzentrationen von SOD1, SOD2 und GPx während der Hämodialysetherapie signifikant abfielen (jeweils $p<0,05$). Weiterhin ergab sich eine signifikante Korrelation zwischen der Rhodanese Konzentration und der antioxidativen Kapazität ($r=0,3848$, $p=0,0297$). Hämodialyse-Patienten mit anamnestisch vorbekannter koronarer Herzerkrankung, d.h. Zustand nach Myokardinfarkt, Bypass-Operation oder Coronar-Intervention, hatten eine signifikant niedrigere SOD1 Konzentration als Hämodialyse-Patienten ohne bekannte koronare Herzerkrankung ($25,89 \pm 2,540$ arbitrary units vs. $48,53 \pm 6,877$ arbitrary units, $p<0,05$).

Die Arbeit zeigt charakteristische Veränderungen sowohl der antioxidativen Kapazität als auch von intrazellulären antioxidativen Enzymen besonders unter einer Hämodialyse-Therapie. Diese Veränderungen tragen möglicherweise ursächlich zu der gesteigerten kardiovaskulären Morbidität bei diesen Patienten bei.

6 Abkürzungsverzeichnis

ABTS	2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
ACC	Acetylcystein
ACE	Angiotensin-Converting-Enzym
AGE	advanced glycation endproducts
AOPP	advanced oxidation protein products = oxidativer Stress)
art.	arteriell
BUN	Blood urea nitrogen = Blut-Harnstoff-Stickstoff
bzw.	beziehungsweise
CRP	C-reaktives Protein
CVD	Cardiovascular disease
Diab. Mell.	Diabetes mellitus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
eco	Estimated cardiac output
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Em	Emission
ESRD	End stage renal disease
esv	estimated stroke volume
Ex	Excitation
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
gGT	γ -Glutamyltransferase
GIP	Granulozyteninhibierendes Protein
GN	Glomerulonephritis
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
GPx	Glutathion Peroxidase
GSH	Glutathion
HBSS	Hanks balanced salt solution
HCN	Cyanwasserstoff
HD	Hämodialyse
HDL	high-density lipoprotein
HT	Hypertonie
IE	internationale Einheiten
IL-6	Interleukin 6
KHK	koronare Herzkrankheit
LDL	low-density lipoprotein
MCH	mean corpuscular haemoglobin

Abkürzungsverzeichnis

MCV	mean corpuscular volume
MDA	Malondialdehyd
MDRD	Modification of Diet in Renal Disease
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NKF	National Kidney Foundation
NOS	Stickstoffmonoxid Synthetase
ox	oxidiert
PAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	phosphate buffered saline
PCRn	normalized protein catabolic rate
RI	Vascular Index
ROS	Reaktive Oxygen Spezies
Rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
SEM	Standard Error of the Mean
SOD	Superoxiddismutase
TAC	Totale Antioxidative Kapazität (total antioxidant capacity)
TAS	Totaler Antioxidativer Status
URR	Urea reduction ratio
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
Z.n.	Zustand nach

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Diagnoseverteilung aller erfassten lebenden Dialysepatienten (Prävalenz) im Jahr 2006. [Frei; Halstenberg2006].....	3
Abbildung 2: Diagnoseverteilung der Patienten bei Therapiebeginn (Inzidenz) im Jahr 2006. [Frei; Halstenberg2006].....	3
Abbildung 3: Aufbau und Ablauf der Hämodialyse.[Fresenius_medical_Care2005].....	5
Abbildung 4: Todesursachen der im Jahr 2006 verstorbenen Patienten. [Frei; Halstenberg2006].....	7
Abbildung 5: Rolle von oxLDL bei der Atherogenese. [Diaz1997; Becker1997].....	14
Abbildung 6: Zusammenspiel der antioxidativen Enzymsysteme Superoxiddismutase (SOD), Peroxidase (GPx) und Katalase bei der Neutralisation freier Radikale.....	16
Abbildung 7: Nach dem Zentrifugieren des Histopaques mit den festen Blutbestandteilen entsteht eine trübe Schicht in Form eines Ringes. Diese enthält mononukleäre Zellen. (Abbildung aus den Verfahrensangaben des Herstellers Sigma.).....	27
Abbildung 8: Prinzip des Total Antioxidant Status Assay Kit (TAS), Angaben des Herstellers.....	28
Abbildung 9: "Sandwich-Methode": Der erste Antikörper ist spezifisch für ein Protein und bindet an dieses. Ein 2. Antikörper, der seinerseits Fluoreszenz markiert ist, bindet an den 1. Antikörper. ...	30
Abbildung 10: Odyssey Infrared Imager von LI-Cor Biosciences (Quelle: LI-Cor Biosciences Web-Site www.licor.com).....	30
Abbildung 11: Zwei separate Laser und Detektoren fangen gleichzeitig zwei Fluoreszenzsignale auf, bei 680 und 780nm. Beide Laserstrahlen fokussieren auf die Scanneroberfläche. Das Mikroskop-Objektiv (B) ist auf die Oberfläche, den Ort der Excitation, gerichtet, und sammelt das Licht von beiden fluoreszierenden Signalen. Von dort geht das Licht zu einem dichromatischen Spiegel (C), der das Licht in 2 Fluoreszenzsignale aufspaltet. Licht mit einer Wellenlänge größer 810nm geht hindurch, Licht mit einer Wellenlänge kleiner 750nm wird reflektiert. Das hindurchgehende und reflektierte Licht geht jeweils einen individuellen Weg, bis es schließlich auf die jeweilige Photodiode trifft und von ihr gemessen wird. (Quelle: www.licor.com).....	31
Abbildung 12: Immunochemischer Nachweis von Proteinen im In-Cell Western. (Abbildung modifiziert nach [Calvert2004]).....	32
Abbildung 13: Beispiel eines durch das Odyssey® System gescannten In-Cell Western. Es erfolgte jeweils eine vierfach Proteinbestimmung.....	33
Abbildung 14: Vergleich der Bestimmung der Totalen Antioxidativen Kapazität aus Serum-Proben und Plasma-Proben. (S=Serum; PS=Plasma); $p=0,0246$ (Vergleich zwischen S-Proben vor HD und PS-Proben vor HD; $***p=0,0003$ (Vergleich der S-Proben vor und nach HD); + $p=0,0039$ (Vergleich der PS-Proben vor und nach HD).....	39
Abbildung 15: Darstellung des Tests auf Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, die durch den TAS-Assay ermittelt wurden. Die Messungen an 5 verschiedenen Zeitpunkten (X-Achse) zeigten keine signifikanten Unterschiede.....	40

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 16: Totale Antioxidative Kapazität der Hämodialysepatienten zu Beginn und am Ende der Dialyse im Vergleich zur Kontrollgruppe. *** $p < 0,0001$; + $p = 0,0129$. Healthy steht für Healthy control I.....	42
Abbildung 17: Vergleich der Totalen Antioxidativen Kapazität am Ende der Dialyse bei Rauchern und Nichtrauchern. * $p = 0,0191$;	42
Abbildung 18: Vergleich der Totalen Antioxidativen Kapazität am Ende der Dialyse bei Patienten die angaben Alkohol zu trinken und Patienten, die dies nicht taten. * $p = 0,0240$	42
Abbildung 19: Totale Antioxidative Kapazität am Ende der Dialyse bei Patienten mit unterschiedlichen Grunderkrankungen.	43
Abbildung 20: Totale Antioxidative Kapazität zu Beginn der Dialyse bei Patienten mit pAVK (n=24) im Vergleich zu Patienten ohne pAVK (n=95). * $p = 0,0253$	44
Abbildung 21: Totale Antioxidative Kapazität am Ende der Dialyse bei Patienten mit zusätzlicher KHK und ohne KHK.	44
Abbildung 22: Totale Antioxidative Kapazität am Ende der Dialyse bei Patienten die einen zerebralen Insult erlitten haben im Vergleich zu Patienten ohne Insult.	44
Abbildung 23: Veränderung der Antioxidantien-Konzentration (Y-Achse) während einer Dialysetherapie (X-Achse).	45
Abbildung 24: Korrelation zwischen der TAC (X-Achse) im Blut von Dialyse Patienten und der Serumkonzentration von GOT (Y-Achse). Die Blutabnahme erfolgte jeweils vor Beginn einer Dialyse.	47
Abbildung 25: Korrelation zwischen der TAC (X-Achse) im Blut von Dialysepatienten und der Serumkonzentration von Harnsäure (Y-Achse). Die Blutabnahme erfolgte jeweils vor Beginn einer Dialyse.	47
Abbildung 26: Die Abbildung zeigt den Verlust der Kreatinin-Konzentration ($304,6 \pm 14,09 \mu\text{mol/l}$) im Blut der Probanden nach der Dialyse in Korrelation zu dem Verlust an antioxidativer Kapazität ($0,2723 \pm 0,0140 \text{ mmol/l}$) während der Dialyse. ($r = 0,2491$, $p = 0,0063$).....	48
Abbildung 27: Die Abbildung zeigt den Verlust der Harnsäure-Konzentration ($227,8 \pm 7,317 \mu\text{mol/l}$) im Blut der Probanden nach der Dialyse in Korrelation zu dem Verlust an antioxidativer Kapazität ($0,2723 \pm 0,0140 \text{ mmol/l}$) während der Dialyse. ($r = 0,3340$, $p = 0,003$).....	48
Abbildung 28: Zusammenhang zwischen der Dialyseeffektivität, dargestellt als Kt/V_{eq} (Y-Achse) und dem Verlust an Antioxidantien (X-Achse).....	49
Abbildung 29: Korrelation und Regression zwischen der α -Tocopherol-Konzentration (Y-Achse) und der TAC (X-Achse) im Plasma von Dialysepatienten während einer Dialysebehandlung.....	51
Abbildung 30: Korrelation zwischen der Konzentration von Zeaxanthin (Y-Achse) und der TAC (X-Achse) bei Dialysepatienten, untersucht an verschiedenen Zeitpunkten während einer Dialysebehandlung.....	51
Abbildung 31: Korrelation der Zunahme der β -Carotin-Konzentration während der Dialyse (Y-Achse) und der Abnahme der Totalen Antioxidativen Kapazität (X-Achse). Die Werte entsprechen jeweils der Differenz aus den vor und nach der Dialyse ermittelten Konzentrationen.....	52

Abbildung 32: Korrelation der Zunahme der Lutein-Konzentration während der Dialyse (Y-Achse) und der Abnahme der Totalen Antioxidativen Kapazität (X-Achse). Die Werte entsprechen jeweils der Differenz aus den vor und nach der Dialyse ermittelten Konzentrationen.....	52
Abbildung 33: Veränderung der Konzentration von Rhodanese/GAPDH, gemessen zu Beginn (HD Start) und am Ende der Dialyse (HD End).	53
Abbildung 34: Grafische Darstellung der Konzentration von Rhodanese/GAPDH (Y-Achse) bei Dialysepatienten und den Kontrollgruppen.....	55
Abbildung 35: Grafische Darstellung der negativen Korrelation der Fibrinogen-Konzentration bei Dialysepatienten mit der vor der Dialyse ermittelten Konzentration von Rhodanese.....	56
Abbildung 36: Korrelation der Rhodanese-Konzentration in Monozyten mit der Totalen Antioxidativen Kapazität des Plasmas. Beide Werte wurden vor der Dialyse bestimmt. Die Korrelation ist nach Pearson signifikant. ($r=0,3848$, $p=0,0297$).....	57
Abbildung 37: Korrelation der nach der Dialyse bestimmten Konzentrationen von Rhodanese in Monozyten mit der TAC im Plasma der Patienten. Die Korrelation ist nach Pearson signifikant. ($r=0,5458$, $p=0,0012$).....	57
Abbildung 38: Korrelation der Rhodanese-Konzentration vor HD mit der Gefäßelastizität der kleinen Gefäße C2 vor HD. * $p=0,0298$, $r=0,4265$	58
Abbildung 39: Korrelation der Rhodanese-Konzentration vor HD mit dem Logarithmus von C2 vor HD. ..	58
Abbildung 40: Korrelation der Rhodanese-Konzentration vor HD mit dem Logarithmus von S2 vor HD. ($r=0,3378$, $p=0,0914$ ($p<0,1$)).....	58
Abbildung 41: Grafische Darstellung der intrazellulären Konzentration des Proteins nNOS/ β -Actin (Y-Achse), gemessen in Monozyten, vor und nach einer Dialysebehandlung.....	59
Abbildung 42: Gegenüberstellung der Ergebnisse der nNOS-Messungen bei Dialysepatienten und Kontrollgruppen. * $p=0,0120$: Vergleich nNOS HD Start versus HD Ende;	60
Abbildung 43: Vergleich der nNOS-Konzentration während der Dialyse bei Patienten mit zusätzlicher Tumorerkrankung und Patienten ohne Tumorerkrankung.	61
Abbildung 44: Vergleich der nNOS-Konzentration während der Dialyse bei Patienten mit und ohne pAVK. .	61
Abbildung 45: Korrelation der nNOS-Konzentration in Monozyten, gemessen vor Beginn der Dialyse, mit der HDL-Konzentration.....	62
Abbildung 46: Korrelation der Totalen Antioxidativen Kapazität vor HD (Y-Achse) und der nNOS-Konzentration in Monozyten (X-Achse) vor HD.	62
Abbildung 47: Korrelation des Vascular Index (RI n-v) am Ende der Dialyse (Y-Achse) mit der Konzentration von nNOS vor Dialyse.....	63
Abbildung 48: Grafische Darstellung der Konzentrationen von SOD1, nach Korrektur durch das Referenzprotein Beta-Actin (β -Actin), bei Dialysepatienten vor (HD Start) und nach der Dialyse (HD End) sowie bei den beiden Kontrollgruppen Healthy control I und Healthy control II.....	65
Abbildung 49: Grafische Darstellung der Konzentrationen von SOD2, nach Korrektur durch das Referenzprotein Beta-Actin (β -Actin). Dargestellt und vergleicht werden die SOD2-	

	Konzentrationen von Dialysepatienten, die vor (HD Start) und nach der Hämodialyse (HD End) gemessen wurden, sowie die Konzentrationen der Kontrollgruppen.....	66
Abbildung 50:	Grafische Darstellung der Konzentrationen von GPx, nach Korrektur durch das Referenzprotein Beta-Actin (β -Actin). Dargestellt und vergleicht werden die GPx-Konzentrationen von Dialysepatienten, die vor (HD Start) und nach der Hämodialyse (HD End) gemessen wurden, sowie die GPx-Konzentrationen der Kontrollgruppen.....	67
Abbildung 51:	Darstellung der SOD1-Konzentration in Monozyten von Dialysepatienten, bei denen zusätzlich eine KHK besteht.....	68
Abbildung 52:	Dialysepatienten die CSE (Cholesterinsynthesehemmer) einnahmen zeigten vor HD (SOD1/ β -Actin= $23,92 \pm 2,073$ arbitrary units) eine signifikant geringere SOD1-Konzentration (* $p=0,0295$), als Patienten die keine CSE einnahmen (SOD1= $47,47 \pm 6,453$ arbitrary units). Verglichen wurden 4 Patienten die CSE einnahmen, mit 14 Patienten die dieses Medikament nicht einnahmen.....	68
Abbildung 53:	Die Einnahme von Diuretika führt bei Dialysepatienten zu einer geringeren SOD2-Konzentration (* $p=0,0133$). Verglichen wurden 12 Dialysepatienten die regelmäßig Diuretika einnahmen (SOD2= $57,80 \pm 8,241$ arbitrary units) mit 5 Patienten, die keine Diuretika einnahmen (SOD2= $114,1 \pm 13,08$ arbitrary units).....	68
Abbildung 54:	Korrelation der SOD1-Konzentration ($43,63 \pm 5,511$ arbitrary units) mit der SOD2-Konzentration ($79,64 \pm 9,907$ arbitrary units). Die Konzentrationen wurden jeweils vor der Dialyse bestimmt. Der Korrelationskoeffizient nach Spearman beträgt $r=0,8175$, die Korrelation ist mit $p<0,0001$ signifikant. Untersucht wurden 19 Patienten.....	69
Abbildung 55:	Grafische Darstellung der negativen Korrelation zwischen der Dialysezeit in Stunden und der GPx-Konzentration der Dialysepatienten vor dem Beginn der Dialyse.....	70
Abbildung 56:	Grafische Darstellung der negativen Korrelation zwischen der Dialysezeit in Stunden und der GPx-Konzentration der Dialysepatienten gemessen am Ende der Dialyse.....	70
Abbildung 57:	In dieser Abbildung ist die Differenz der SOD2-Konzentration am Ende der Dialyse gegenüber dem Ausgangswert in Korrelation mit der Dialysezeit in Stunden dargestellt. Die Korrelation ist mit dem Korrelationskoeffizient $r=-0,6926$ (nach Spearman) und einer Wahrscheinlichkeit von ** $p=0,0029$ signifikant.....	70
Abbildung 58:	Korrelation der Konzentration von SOD1 vor HD mit der Arterial stiffness S1 vor HD (mean= $1,311 \pm 0,0647$ mmHg/ml).....	71
Abbildung 59:	Korrelation der Konzentration von SOD2 vor HD mit der Arterial stiffness S1 vor HD (mean= $1,311 \pm 0,06465$ mmHg/ml).....	71
Abbildung 60:	Korrelation der Konzentration von GPx vor HD mit der Arterial stiffness S1 vor HD (mean= $1,311 \pm 0,06465$ mmHg/ml)	72
Abbildung 61:	$Ca^{2+}= 2,277 \pm 0,0248$ mmol/l.	72
Abbildung 62:	Korrelation der SOD2-Konzentration vor HD mit dem Gewicht der Patienten.....	73
Abbildung 63:	Messung der Eigenfluoreszenz (Y-Achse) von Plasmaproben von Dialysepatienten bei einer Excitationswellenlänge von 300nm und den Emissionswellenlängen von 410, 510, 610, 350 und 620nm (X-Achse). Ein Maximum der Fluoreszenzintensität konnte bei den	

Emissionswellenlängen 350 und 620nm gemessen werden. Die Untersuchungen auf Signifikanz beziehen sich jeweils auf die vor und nach der Dialyse ermittelten Werte.....	74
Abbildung 64: Darstellung der Eigenfluoreszenz des Plasmas bei Dialysepatienten zu Beginn (HD Start) und am Ende der Dialyse (HD End) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Healthy). Ex: 300nm, Em: 620nm.	75
Abbildung 65: Anstieg der Eigenfluoreszenz des Plasmas von Dialysepatienten während der Dialyse.	75
Abbildung 66: Korrelation der Eigenfluoreszenz (X-Achse) mit der Totalen Antioxidativen Kapazität (X-Achse) von Dialysepatienten. Die Werte wurden jeweils vor der Dialyse gemessen. Die Korrelation nach Pearson ist signifikant. ($r=-0,4247$, $*p=0,0386$).....	76
Abbildung 67: Korrelation zwischen dem geschätzten Schlagvolumen (estimated stroke volume) zu Beginn der Dialyse und dem Anstieg der Eigenfluoreszenz während der Dialyse.....	77
Abbildung 68: Korrelation zwischen dem geschätzten Schlagvolumen (estimated stroke volume) am Ende der Dialyse und dem Anstieg der Eigenfluoreszenz während der Dialyse.....	77
Abbildung 69: Korrelation zwischen dem Anstieg der Eigenfluoreszenz des Plasmas und der Körpergröße von Dialysepatienten.....	77
Abbildung 70: Negative Korrelation zwischen der Eigenfluoreszenz des Plasmas vor HD (X-Achse) und der Kt/Veq.	77
Abbildung 71: Darstellung der negativen Korrelation des Ultrafiltrationsgewichtes mit der Eigenfluoreszenz zu Beginn der Dialyse.	77
Abbildung 72: Korrelation der Eigenfluoreszenz des Plasmas von Dialysepatienten zu Beginn der Dialyse (X-Achse) und dem Verhältnis aus Harnstoff nach durch Harnstoff vor HD (Y-Achse).	78
Abbildung 73: Grafische Darstellung der Korrelation der Eigenfluoreszenz mit der Konzentration von α -Tocopherol.	78
Abbildung 74: Grafische Darstellung der Korrelation der Eigenfluoreszenz mit der Konzentration von Cholesterol.	78

8 Literaturverzeichnis

- AKIYAMA, S., INAGAKI, M., TSUJI, M., GOTOH, H., GOTOH, T., GOTOH, Y. & OGUCHI, K. (2005): *mRNA study on Cu/Zn superoxide dismutase induction by hemodialysis treatment. Nephron Clin Pract*, 99, c107-14.
- AMANN, K., GROSS, M. & RITZ, E. (2004): *Pathophysiology underlying accelerated atherogenesis in renal disease: closing in on the target. J Am Soc Nephrol*, 15, 1664-6.
- AMORE, A., BONAUDO, R., GHIGO, D., ARESE, M., COSTAMAGNA, C., CIRINA, P., GIANOGGIO, B., PERUGINI, L. & COPPO, R. (1995): *Enhanced production of nitric oxide by blood-dialysis membrane interaction. J Am Soc Nephrol*, 6, 1278-83.
- ANAVEKAR, N. S., McMURRAY, J. J. V., VELAZQUEZ, E. J., SOLOMON, S. D., KOBER, L., ROULEAU, J., WHITE, H. D., NORDLANDER, R., MAGGIONI, A., DICKSTEIN, K., ZELENKOFKSKE, S., LEIMBERGER, J. D., CALIFF, R. M. & PFEFFER, M.A. (2004): *Relation between renal dysfunction and cardiovascular outcomes after myocardial infarction. N Engl J Med*, 351, 1285-95.
- ANDERSON, T. J., MEREDITH, I. T., YEUNG, A. C., FREI, B., SELWYN, A. P. & GANZ, P. (1995): *The effect of cholesterol-lowering and antioxidant therapy on endothelium-dependent coronary vasomotion. N Engl J Med*, 332, 488-93.
- AYMELEK GÖNENC, YESIM ATAK, MEHMET N ORMAN, BOLKAN SIMSEK (2002): *Lipid Peroxidation and Antioxidant Systems in Hemodialyzed Patients. Nephrol Dial Transplant*, 31,2, 88-96.
- BAENKLER ET AL: *Innere Medizin, 2001 Thieme Verlag, ISBN 3131287519.*
- BAIGENT, C., BURBURY, K. & WHEELER, D. (2000): *Premature cardiovascular disease in chronic renal failure. Lancet*, 356, 147-52.
- BARON, J. A., COLE, B. F., MOTT, L., HAILE, R., GRAU, M., CHURCH, T. R., BECK, G. J. & GREENBERG, E.R. (2003): *Neoplastic and antineoplastic effects of beta-carotene on colorectal adenoma recurrence: results of a randomized trial. J Natl Cancer Inst*, 95, 717-22.
- BAYES, B., PASTOR, M. C., BONAL, J., FORASTER, A. & ROMERO, R. (2006): *Oxidative stress, inflammation and cardiovascular mortality in haemodialysis--role of seniority and intravenous ferrotherapy: analysis at 4 years of follow-up. Nephrol Dial Transplant*, 21, 984-90.
- BECKER, B. N., HIMMELFARB, J., HENRICH, W. L. & HAKIM, R.M. (1997): *Reassessing the cardiac risk profile in chronic hemodialysis patients: a hypothesis on the role of oxidant stress and other non-traditional cardiac risk factors. J Am Soc Nephrol*, 8, 475-86.
- BERUFSVERBAND DEUTSCHER INTERNISTEN: *Nierenersatz Dialyse.*
- BHATTACHARYYA, A. M. & HOROWITZ, P. (2000): *Alteration around the active site of rhodanese during urea-induced denaturation and its implications for folding. J Biol Chem*, 275, 14860-4.
- BOAZ, M., GREEN, M., FAINAURU, M. & SMETANA, S. (2001): *Oxidative stress and cardiovascular disease in hemodialysis.. Clin Nephrol*, 55, 93-100.
- BOAZ, M., MATAS, Z., BIRO, A., KATZIR, Z., GREEN, M., FAINARU, M. & SMETANA, S. (1999): *Serum malondialdehyde and prevalent cardiovascular disease in hemodialysis. Kidney Int*, 56, 1078-83.
- BOAZ, M., SMETANA, S., MATAS, Z., BOR, A., PINCHUK, I., FAINARU, M., GREEN, M. S. & LICHTENBERG, D. (2003): *Lipid oxidation kinetics in hemodialysis patients with and without history of myocardial infarction. Isr Med Assoc J*, 5, 692-6.

- BOAZ, M., SMETANA, S., WEINSTEIN, T., MATAS, Z., GAFTER, U., IAINA, A., KNECHT, A., WEISSGARTEN, Y., BRUNNER, D., FAINARU, M. & GREEN, M.S. (2000): *Secondary prevention with antioxidants of cardiovascular disease in endstage renal disease (SPACE): randomised placebo-controlled trial. Lancet*, 356, 1213-8.
- BÖGER, R. H., COOKE, J. P. & VALLANCE, P. (2005): *ADMA: an emerging cardiovascular risk factor. Vasc Med*, 10 Suppl 1, S1-2.
- BOHM, V., TIROKE, K., SCHNEIDER, S., SPERSCHNEIDER, H., STEIN, G. & BITSCH, R. (1997): *Vitamin C status of patients with chronic renal failure, dialysis patients and patients after renal transplantation. Int J Vitam Nutr Res*, 67, 262-6.
- BOLTON, C. H., DOWNS, L. G., VICTORY, J. G., DWIGHT, J. F., TOMSON, C. R., MACKNESS, M. I. & PINKNEY, J.H. (2001): *Endothelial dysfunction in chronic renal failure: roles of lipoprotein oxidation and pro-inflammatory cytokines. Nephrol Dial Transplant*, 16, 1189-97.
- BONOMI, F., PAGANI, S., CERLETTI, P. & CANNELLA, C. (1977): *Rhodanese-Mediated sulfur transfer to succinate dehydrogenase. Eur J Biochem*, 72, 17-24.
- BUSCHER, H. (2004): *[Nonalcoholic steatohepatitis (NASH): therapeutic approaches]. Dtsch Med Wochenschr*, 129 Suppl 2, S60-2.
- CAI, H. & HARRISON, D.G. (2000): *Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. Circ Res*, 87, 840-4.
- CALVERT, V., TANG, Y., BOVEIA, V. & WULFKUHLE, J. (2004): *Development of Multiplexed Protein Profiling and Detection Using Near Infrared Detection of Reverse-Phase Protein Microarrays.*
- CANESTRARI, F., GALLI, F., GIORGINI, A., ALBERTINI, M. C., GALIOTTA, P., PASCUCCI, M. & BOSSÙ, M. (1994): *Erythrocyte redox state in uremic anemia: effects of hemodialysis and relevance of glutathione metabolism.. Acta Haematol*, 91, 187-93.
- CARR, A. C., MCCALL, M. R. & FREI, B. (2000): *Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection. Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20, 1716-23.
- CHEN, C. K., LIAW, J. M., JUANG, J. G. & LIN, T.H. (1997): *Antioxidant enzymes and trace elements in hemodialyzed patients. Biol Trace Elem Res*, 58, 149-57.
- CHEN, X., TOUYZ, R. M., PARK, J. B. & SCHIFFRIN, E.L. (2001): *Antioxidant effects of vitamins C and E are associated with altered activation of vascular NADPH oxidase and superoxide dismutase in stroke-prone SHR. Hypertension*, 38, 606-11.
- CHERTOW, G. M., OWEN, W. F., LAZARUS, J. M., LEW, N. L. & LOWRIE, E.G. (1999): *Exploring the reverse J-shaped curve between urea reduction ratio and mortality. Kidney Int*, 56, 1872-8.
- CHEUNG, A. K. (1994): *Complement activation as index of haemodialysis membrane biocompatibility: the choice of methods and assays. Nephrol Dial Transplant*, 9 Suppl 2, 96-103.
- DE CARVALHO, C. M., BONNEFONT-REBEIX, C., PICANDET, S., BERNAUD, J., PHOTHIRATH, P., CHABANNE, L., MARCHAL, T., MAGNOL, J. & RIGAL, D. (2004): *Evaluation of elutriation and magnetic microbead purification of canine monocytes. Vet Immunol Immunopathol*, 101, 171-8.
- DEPNER, T. A. & DAUGIRDAS, J.T. (1996): *Equations for normalized protein catabolic rate based on two-point modeling of hemodialysis urea kinetics.. J Am Soc Nephrol*, 7, 780-5.

- DESCAMPS-LATSCHA, B., DRUEKE, T. & WITKO-SARSAT, V. (2001): *Dialysis-induced oxidative stress: biological aspects, clinical consequences, and therapy. Semin Dial, 14, 193-9.*
- DIAZ, M. N., FREI, B., VITA, J. A. & KEANEY, J.F.J. (1997): *Antioxidants and atherosclerotic heart disease. N Engl J Med, 337, 408-16.*
- DIKOW, R. (): *Kardiovaskuläre Mortalität und Niereninsuffizienz - Risikofaktoren und Prävention. , , .*
- DRAI, J., BANNIER, E., CHAZOT, C., HUROT, J. M., GOEDERT, G., JEAN, G., CHARRA, B., LAURENT, G., BALTASSAT, P. & REVOL, A. (2001): *Oxidants and antioxidants in long-term haemodialysis patients. Farmaco, 56, 463-5.*
- DROGE, W. (2002): *Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol Rev, 82, 47-95.*
- EISELT, J., RACEK, J., TREFIL, L. & OPATRYNY, K.J. (2001): *Effects of a vitamin E-modified dialysis membrane and vitamin C infusion on oxidative stress in hemodialysis patients. Artif Organs, 25, 430-6.*
- ENGSTRÖM, K. G. & SEHLIN, J. (1996): *Thiocyanate induces vasoconstriction in rat-tail artery primed with norepinephrine.. J Lab Clin Med, 127, 391-400.*
- ERDOGAN, C., UNLUCERCI, Y., TURKMEN, A., KURU, A., CETIN, O. & BEKPINAR, S. (2002): *The evaluation of oxidative stress in patients with chronic renal failure. Clin Chim Acta, 322, 157-61.*
- EVERETT, S. A., FOLKES, L. K., WARDMAN, P. & ASMUS, K.D. (1994): *Free-radical repair by a novel perthiol: reversible hydrogen transfer and perthiyl radical formation. Free Radic Res, 20, 387-400.*
- FOLEY, R. N., PARFREY, P. S. & SARNAK, M.J. (1998): *Epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease.. J Am Soc Nephrol, 9, S16-23.*
- FOX, C. S., LARSON, M. G., KEYES, M. J., LEVY, D., CLOUSE, M. E., CULLETON, B. & O'DONNELL, C.J. (2004): *Kidney function is inversely associated with coronary artery calcification in men and women free of cardiovascular disease: the Framingham Heart Study. Kidney Int, 66, 2017-21.*
- FRESENIUS MEDICAL CARE (2005): *Hämodialyse - von den Anfängen bis zur Gegenwart. Dialyse Kompakt.*
- GALLI, F., VARGA, Z., BALLA, J., FERRARO, B., CANESTRARI, F., FLORIDI, A., KAKUK, G. & BUONCRISTIANI, U. (2001): *Vitamin E, lipid profile, and peroxidation in hemodialysis patients. Kidney Int Suppl, 78, S148-54.*
- GLIUBICH, F., GAZERRO, M., ZANOTTI, G., DELBONO, S., BOMBIERI, G. & BERNI, R. (1996): *Active site structural features for chemically modified forms of rhodanese. J Biol Chem, 271, 21054-61.*
- GO, A. S., CHERTOW, G. M., FAN, D., MCCULLOCH, C. E. & HSU, C. (2004): *Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. N Engl J Med, 351, 1296-305.*
- GOTCH, F. A. & SARGENT, J.A. (1985): *A mechanistic analysis of the National Cooperative Dialysis Study (NCDS). Kidney Int, 28, 526-34.*
- GRAF, B. A., MILBURY, P. E. & BLUMBERG, J.B. (2005): *Flavonols, flavones, flavanones, and human health: epidemiological evidence. J Med Food, 8, 281-90.*
- GRIENDLING, K. K., SORESCU, D. & USHIO-FUKAI, M. (2000): *NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. Circ Res, 86, 494-501.*
- HAEFFNER-CAVAILLON, N. & KAZATCHKINE, M.D. (1994): *Methods for assessing monocytic cytokine production as an index of biocompatibility.. Nephrol Dial Transplant, 9 Suppl 2, 112-5.*

- HALL, R. E., HENRIKSSON, K. G., LEWIS, S. F., HALLER, R. G. & KENNAWAY, N.G. (1993): *Mitochondrial myopathy with succinate dehydrogenase and aconitase deficiency. Abnormalities of several iron-sulfur proteins. J Clin Invest, 92, 2660-6.*
- HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J.M. (1990): *The antioxidants of human extracellular fluids. Arch Biochem Biophys, 280, 1-8.*
- HASUIKE, Y., NAKANISHI, T., MORIGUCHI, R., OTAKI, Y., NANAMI, M., HAMA, Y., NAKA, M., MIYAGAWA, K., IZUMI, M. & TAKAMITSU, Y. (2004): *Accumulation of cyanide and thiocyanate in haemodialysis patients. Nephrol Dial Transplant, 19, 1474-9.*
- HEINECKE, J. W. (2001): *Is the emperor wearing clothes? Clinical trials of vitamin E and the LDL oxidation hypothesis. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 21, 1261-4.*
- HELD, P. J., PORT, F. K., WOLFE, R. A., STANNARD, D. C., CARROLL, C. E., DAUGIRDAS, J. T., BLOEMBERGEN, W. E., GREER, J. W. & HAKIM, R.M. (1996): *The dose of hemodialysis and patient mortality. Kidney Int, 50, 550-6.*
- HIMMELFARB, J. (2004): *Linking oxidative stress and inflammation in kidney disease: which is the chicken and which is the egg?. Semin Dial, 17, 449-54.*
- HIMMELFARB, J. (2005): *Relevance of oxidative pathways in the pathophysiology of chronic kidney disease. Cardiol Clin, 23, 319-30.*
- HIMMELFARB, J. (2008): *Oxidative stress in hemodialysis.. Contrib Nephrol, 161, 132-7.*
- HIMMELFARB, J., STENVINKEL, P., IKIZLER, T. A. & HAKIM, R.M. (2002): *The elephant in uremia: oxidant stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia. Kidney Int, 62, 1524-38.*
- HOROWITZ, P. M. & BUTLER, M. (1993): *Interactive intermediates are formed during the urea unfolding of rhodanese.. J Biol Chem, 268, 2500-4.*
- HOROWITZ, P. M. & FALKSEN, K. (1986): *Oxidative inactivation of the enzyme rhodanese by reduced nicotinamide adenine dinucleotide.. J Biol Chem, 261, 16953-6.*
- HRUBEC, T., WHICHARD, J., LARSON, C. & PIERSON, W. (2002): *Plasma Versus Serum: Specific Differences in Biochemical Analyte Values. Journal of Avian Medicine and Surgery, 16, Issue 2, 101-105.*
- HUANG, K., YANG, C., LEE, K. & CHIEN, C. (2003): *Reduced hemodialysis-induced oxidative stress in end-stage renal disease patients by electrolyzed reduced water. Kidney Int, 64, 704-14.*
- I. DURAK, M. KAVUTCU & M.Y. B. CIMEN (2001): *Oxidant/Antioxidant Status of Erythrocytes from Patients with chronic renal failure: Effects of Hemodialysis. Med Principles Pract, 10, 187-190.*
- ICHIKAWA, I., KIYAMA, S. & YOSHIOKA, T. (1994): *Renal antioxidant enzymes: their regulation and function. Kidney Int, 45, 1-9.*
- IGIEK, M. & WLODEK, L. (2001): *Biosynthesis and biological properties of compounds containing highly reactive, reduced sulfane sulfur. Pol J Pharmacol, 53, 215-25.*
- IMLAY, J. A. & LINN, S. (1988): *DNA damage and oxygen radical toxicity. Science, 240, 1302-9.*
- IVANOVSKI, O., NIKOLOV, I. G., DRUEKE, B. T. & MASSY, A.Z. (2007): *Atherosclerosis and vascular calcification in uraemia - a new experimental model.. Prilozi, 28, 11-24.*

- JACKSON, P., LOUGHREY, C. M., LIGHTBODY, J. H., McNAMEE, P. T. & YOUNG, I.S. (1995): *Effect of hemodialysis on total antioxidant capacity and serum antioxidants in patients with chronic renal failure. Clin Chem, 41, 1135-8.*
- JAMSHIDZADEH, A. & AMINLARI, M.: *Rhodanese and Arginase Activity in Normal and Cancerous Tissues of Human Breast, Esophagus, Stomach and Lung.*
- JUNG, H. H., CHOI, D. H. & LEE, S.H. (2004): *Serum malondialdehyde and coronary artery disease in hemodialysis patients. Am J Nephrol, 24, 537-42.*
- KALANTAR-ZADEH, K. & BALAKRISHNAN, V.S. (2006): *The kidney disease wasting: inflammation, oxidative stress, and diet-gene interaction. Hemodial Int, 10, 315-25.*
- KALOUSOVA, M., SULKOVA, S., FIALOVA, L., SOUKUPOVA, J., MALBOHAN, I. M., SPACEK, P., BRAUN, M., MIKULIKOVA, L., FORTOVA, M., HOREJSI, M., TESAR, V. & ZIMA, T. (2003): *Glycooxidation and inflammation in chronic haemodialysis patients. Nephrol Dial Transplant, 18, 2577-81.*
- KESSLER, D. (2006): *Enzymatic activation of sulfur for incorporation into biomolecules in prokaryotes. FEMS Microbiol Rev, 30, 825-40.*
- KOENIG, J. S., FISCHER, M., BULANT, E., TIRAN, B., ELMADFA, I. & DRUML, W. (1997): *Antioxidant status in patients on chronic hemodialysis therapy: impact of parenteral selenium supplementation. Wien Klin Wochenschr, 109, 13-9.*
- KOYAMA, K., YOSHIDA, A., TAKEDA, A., MOROZUMI, K., FUJINAMI, T. & TANAKA, N. (1997): *Abnormal cyanide metabolism in uraemic patients. Nephrol Dial Transplant, 12, 1622-8.*
- KUKLINSKI, D. D. S. M. B. (2005): *Praxisrelevanz des Nitrosativen Stresses. Umwelt-Medizin-Gesellschaft, 18/2, 95-106.*
- LADENSON, J. H., TSAI, L. M., MICHAEL, J. M., KESSLER, G. & JOIST, J.H. (1974): *Serum versus heparinized plasma for eighteen common chemistry tests: is serum the appropriate specimen?. Am J Clin Pathol, 62, 545-52.*
- LEIPER, J. M., SANTA MARIA, J., CHUBB, A., MACALLISTER, R. J., CHARLES, I. G., WHITLEY, G. S. & VALLANCE, P. (1999): *Identification of two human dimethylarginine dimethylaminohydrolases with distinct tissue distributions and homology with microbial arginine deiminases. Biochem J, 343 Pt 1, 209-14.*
- LINDNER, A., CHARRA, B., SHERRARD, D. J. & SCRIBNER, B.H. (1974): *Accelerated atherosclerosis in prolonged maintenance hemodialysis. N Engl J Med, 290, 697-701.*
- LOUGHREY, C. M., YOUNG, I. S., LIGHTBODY, J. H., McMASTER, D., McNAMEE, P. T. & TRIMBLE, E.R. (1994): *Oxidative stress in haemodialysis. QJM, 87, 679-83.*
- LUM, G. & GAMBINO, S.R. (1974): *A comparison of serum versus heparinized plasma for routine chemistry tests. Am J Clin Pathol, 61, 108-13.*
- LUNDBLAD, R. (2005): *Consideration for the Use of Blood Plasma and Serum for Proteomic Analysis. The Internet Journal of Gastroenterology., 1, Nr. 2, .*
- MAGGI, E., BELLAZZI, R., GAZO, A., SECCIA, M. & BELLOMO, G. (1994): *Autoantibodies against oxidatively-modified LDL in uremic patients undergoing dialysis. Kidney Int, 46, 869-76.*
- MALLIARAKI, N., MPLIAMPLIAS, D., KAMPA, M., PERAKIS, K., MARGIORIS, A. N. & CASTANAS, E. (2003): *Total and corrected antioxidant capacity in hemodialyzed patients. BMC Nephrol, 4, 4.*

- MALICK, N. P. & GOKAL, R. (1999): *Haemodialysis. Lancet*, 353, 737-42.
- MCCLELLAN, W. M., SOUCIE, J. M. & FLANDERS, W.D. (1998): *Mortality in end-stage renal disease is associated with facility-to-facility differences in adequacy of hemodialysis.. J Am Soc Nephrol*, 9, 1940-7.
- MCCORD, J. M. & FRIDOVICH, I. (1969): *The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. J Biol Chem*, 244, 6056-63.
- MCGRATH, L. T., DOUGLAS, A. F., MCCLEAN, E., BROWN, J. H., DOHERTY, C. C., JOHNSTON, G. D. & ARCHBOLD, G.P. (1995): *Oxidative stress and erythrocyte membrane fluidity in patients undergoing regular dialysis. Clin Chim Acta*, 235, 179-88.
- MEGUID EL NAHAS, A. & BELLO, A.K. (2005): *Chronic kidney disease: the global challenge. Lancet*, 365, 331-40.
- MILES, R. R., ROBERTS, R. F., PUTNAM, A. R. & ROBERTS, W.L. (2004): *Comparison of serum and heparinized plasma samples for measurement of chemistry analytes. Clin Chem*, 50, 1704-6.
- MILLASSEAU, S. C., KELLY, R. P., RITTER, J. M. & CHOWIENCZYK, P.J. (2003): *The vascular impact of aging and vasoactive drugs: comparison of two digital volume pulse measurements.. Am J Hypertens*, 16, 467-72.
- MILLER, N. J., RICE-EVANS, C., DAVIES, M. J., GOPINATHAN, V. & MILNER, A. (1993): *A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. Clin Sci (Lond)*, 84, 407-12.
- MOHAZZAB, K. M., KAMINSKI, P. M. & WOLIN, M.S. (1994): *NADH oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary artery endothelium.. Am J Physiol*, 266, H2568-72.
- MORENA, M., CRISTOL, J. P., DANTOINE, T., CARBONNEAU, M. A., DESCOMPS, B. & CANAUD, B. (2000): *Protective effects of high-density lipoprotein against oxidative stress are impaired in haemodialysis patients. Nephrol Dial Transplant*, 15, 389-95.
- MORENA, M., CRISTOL, J., BOSCH, J., TETTA, C., FORRET, G., LEGER, C., DELCOURT, C., PAPOZ, L., DESCOMPS, B. & CANAUD, B. (2002): *Convective and diffusive losses of vitamin C during haemodiafiltration session: a contributive factor to oxidative stress in haemodialysis patients. Nephrol Dial Transplant*, 17, 422-7.
- MORENA, M., DELBOSC, S., DUPUY, A., CANAUD, B. & CRISTOL, J. (2005): *Overproduction of reactive oxygen species in end-stage renal disease patients: a potential component of hemodialysis-associated inflammation. Hemodial Int*, 9, 37-46.
- MULAC K. (2005): *Pathomechanismen der Atherosklerose bei Diabetes mellitus. Journal für Kardiologie*, 12(1-2), 9-14.
- MUNE, M., YUKAWA, S., KISHINO, M., OTANI, H., KIMURA, K., NISHIKAWA, O., TAKAHASHI, T., KODAMA, N., SAIKA, Y. & YAMADA, Y. (1999): *Effect of vitamin E on lipid metabolism and atherosclerosis in ESRD patients. Kidney Int Suppl*, 71, S126-9.
- NGUYEN-KHOA, T., MASSY, Z. A., DE BANDT, J. P., KEBEDE, M., SALAMA, L., LAMBREY, G., WITKO-SARSAT, V., DRUEKE, T. B., LACOUR, B. & THEVENIN, M. (2001): *Oxidative stress and haemodialysis: role of inflammation and duration of dialysis treatment. Nephrol Dial Transplant*, 16, 335-40.

- NKF KDOQITM (): *The National Kidney Foundation Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (NKF KDOQITM)-evidence-based clinical practice guidelines.*
- BERG, B. P., McMENAMIN, E., LUCAS, F. L., McMONAGLE, E., MORROW, J., IKIZLER, T. A. & HIMMELFARB, J. (2004): *Increased prevalence of oxidant stress and inflammation in patients with moderate to severe chronic kidney disease. Kidney Int, 65, 1009-16.*
- OGATA, K. & VOLINI, M. (1990): *Mitochondrial rhodanese: membrane-bound and complexed activity. J Biol Chem, 265, 8087-93.*
- OWEN, W. F. J., CHERTOW, G. M., LAZARUS, J. M. & LOWRIE, E.G. (1998): *Dose of hemodialysis and survival: differences by race and sex. JAMA, 280, 1764-8.*
- OWEN, W. F. J., LEW, N. L., LIU, Y., LOWRIE, E. G. & LAZARUS, J.M. (1993): *The urea reduction ratio and serum albumin concentration as predictors of mortality in patients undergoing hemodialysis. N Engl J Med, 329, 1001-6.*
- PAGANI, S. & GALANTE, Y.M. (1983): *Interaction of rhodanese with mitochondrial NADH dehydrogenase. Biochim Biophys Acta, 742, 278-84.*
- PASTAN, S. & BAILEY, J. (1998): *Dialysis Therapy. N Engl J Med, 338, 1428-37.*
- PAUL, J. L., SALL, N. D., SONI, T., POIGNET, J. L., LINDENBAUM, A., MAN, N. K., MOATTI, N. & RAICHVARG, D. (1993): *Lipid peroxidation abnormalities in hemodialyzed patients. Nephron, 64, 106-9.*
- PAWLAK, K., BORAWSKI, J., NAUMNIK, B. & MYSLIWIEC, M. (2003): *Relationship between oxidative stress and extrinsic coagulation pathway in haemodialyzed patients. Thromb Res, 109, 247-51.*
- PAWLAK, K., PAWLAK, D. & MYSLIWIEC, M. (2004): *Possible new role of monocyte chemoattractant protein-1 in hemodialysis patients with cardiovascular disease. Am J Nephrol, 24, 635-40.*
- PAWLAK, K., PAWLAK, D. & MYSLIWIEC, M. (2005): *Cu/Zn superoxide dismutase plasma levels as a new useful clinical biomarker of oxidative stress in patients with end-stage renal disease. Clin Biochem, 38, 700-5.*
- PAWLAK, K., PAWLAK, D. & MYSLIWIEC, M. (2006): *Oxidative stress effects fibrinolytic system in dialysis uraemic patients. Thromb Res, 117, 517-22.*
- PAWLAK, K., PAWLAK, D. & MYSLIWIEC, M. (2006): *Possible association between circulating vascular endothelial growth factor and oxidative stress markers in hemodialysis patients. Med Sci Monit, 12, CR181-5.*
- PETROVIĆ, D. & STOJIMIROVIĆ, B. (2008): *Cardiovascular morbidity and mortality in patients treated with hemodialysis--epidemiological analysis. Vojnosanit Pregl, 65, 893-900.*
- PUPIM, L. B., HIMMELFARB, J., McMONAGLE, E., SHYR, Y. & IKIZLER, T.A. (2004): *Influence of initiation of maintenance hemodialysis on biomarkers of inflammation and oxidative stress. Kidney Int, 65, 2371-9.*
- ROSS, R. (1999): *Atherosclerosis--an inflammatory disease. N Engl J Med, 340, 115-26.*
- ROXBOROUGH, H. E., MERCER, C., McMASTER, D., MAXWELL, A. P. & YOUNG, I.S. (1999): *Plasma glutathione peroxidase activity is reduced in haemodialysis patients. Nephron, 81, 278-83.*
- RUBIN, C., NOLIN, T. D. & HIMMELFARB, J. (2007): *Are biomarkers useful for assessing cardiovascular risk in patients with chronic kidney disease?. Curr Opin Nephrol Hypertens, 16, 506-11.*

- SAIDU (2004): *Physicochemical features of rhodanese: A review. African Journal of Biotechnology*, 3(4), 370-374.
- SAMOUILIDOU, E. & GRAPSA, E. (2003): *Effect of dialysis on plasma total antioxidant capacity and lipid peroxidation products in patients with end-stage renal failure. Blood Purif*, 21, 209-12.
- SARAN, A. M. & DuBOSE, T.D.J. (2008): *Cardiovascular disease in chronic kidney disease. Ther Adv Cardiovasc Dis*, 2, 425-34.
- SARNAK, M. J., LEVEY, A. S., SCHOOLWERTH, A. C., CORESH, J., CULLETON, B., HAMM, L. L., McCULLOUGH, P. A., KASISKE, B. L., KELEPOURIS, E., KLAG, M. J., PARFREY, P., PFEFFER, M., RAJ, L., SPINOSA, D. J. & WILSON, P.W. (2003): *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. Hypertension*, 42, 1050-65.
- SCHMIDT E. & SCHMIDT N.: *Leitfaden Mikronährstoffe - Orthomolekulare Prävention und Therapie. Urban&Fischer.*
- SCHMIDT, R. J. & BAYLIS, C. (2000): *Total nitric oxide production is low in patients with chronic renal disease.. Kidney Int*, 58, 1261-6.
- SCHOLZE, A., RINDER, C., BEIGE, J., RIEZLER, R., ZIDEK, W. & TEPEL, M. (2004): *Acetylcysteine reduces plasma homocysteine concentration and improves pulse pressure and endothelial function in patients with end-stage renal failure. Circulation*, 109, 369-74.
- SCOTT, J. (2004): *Pathophysiology and biochemistry of cardiovascular disease. Curr Opin Genet Dev*, 14, 271-9.
- SHAH, D. S., POLKINHORNE, K. R., PELLICANO, R. & KERR, P.G. (2008): *Are traditional risk factors valid for assessing cardiovascular risk in end-stage renal failure patients?. Nephrology (Carlton)*, , .
- SHIBATANI, T., KRAMER, G., HARDESTY, B. & HOROWITZ, P.M. (1999): *Domain separation precedes global unfolding of rhodanese.. J Biol Chem*, 274, 33795-9.
- SHIRAI, S., OMINATO, M., SHIMAZU, T., TOYAMA, K., OGIMOTO, G., FUJINO, T., YASUDA, T., SATO, T., MAEBA, T., OWADA, S. & KIMURA, K. (2005): *Imbalance between production and scavenging of hydroxyl radicals in patients maintained on hemodialysis. Clin Exp Nephrol*, 9, 310-4.
- SIES, H., STAHL, W., KLOTZ, L. & BRENNISEN, P.: *Oxidativer Stress: vom molekularen Mechanismus zur Klinik.*
- SRINIVASA RAO, P. V., DAKSHINAMURTY, K. V., SAIBABA, K. S., RAGHAVAN, M. S., VIJAYABHASKAR, M., SREEKRISHNA, V., AMBEKAR, J. G. & JAYASEELAN, L. (2001): *Oxidative stress in haemodialysis--intradialytic changes. Redox Rep*, 6, 303-9.
- STEINBERG, D. (1995): *Clinical trials of antioxidants in atherosclerosis: are we doing the right thing? Lancet*, 346, 36-8.
- STENVINKEL, P., HEIMBURGER, O., PAULTRE, F., DICZFALUSY, U., WANG, T., BERGLUND, L. & JOGESTRAND, T. (1999): *Strong association between malnutrition, inflammation, and atherosclerosis in chronic renal failure. Kidney Int*, 55, 1899-911.

- STEPHENS, N. G., PARSONS, A., SCHOFIELD, P. M., KELLY, F., CHEESEMAN, K. & MITCHINSON, M.J. (1996): *Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS)*. *Lancet*, 347, 781-6.
- STROES, E. S., VAN FAASSEN, E. E., VAN LONDEN, G. J. & RABELINK, T.J. (1998): *Oxygen radical stress in vascular disease: the role of endothelial nitric oxide synthase*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 32 Suppl 3, S14-21.
- SUDHIR K. BOWRY & UTE KUCHINKE-KIEHN (2005): *Der Einfluss behandlungsbezogener Faktoren auf das kardiovaskuläre Risiko des Hämodialysepatienten*. *J nephrol Team*, 2, 57-59.
- TACCONE-GALLUCCI, M., GIARDINI, O., AUSIELLO, C., PIAZZA, A., SPAGNOLI, G. C., BANDINO, D., LUBRANO, R., TAGGI, F., EVANGELISTA, B. & MONACO, P. (1986): *Vitamin E supplementation in hemodialysis patients: effects on peripheral blood mononuclear cells lipid peroxidation and immune response*. *Clin Nephrol*, 25, 81-6.
- TAKI, K., TAKAYAMA, F., TSURUTA, Y. & NIWA, T. (2006): *Oxidative stress, advanced glycation end product, and coronary artery calcification in hemodialysis patients*. *Kidney Int*, 70, 218-24.
- TAYLOR, J. E., SCOTT, N., BRIDGES, A., HENDERSON, I. S., STEWART, W. K. & BELCH, J.J. (1992): *Lipid peroxidation and antioxidants in continuous ambulatory dialysis patients*. *Perit Dial Int*, 12, 252-6.
- TEPEL, M. (2003): *Oxidative stress: does it play a role in the genesis of essential hypertension and hypertension of uraemia?*. *Nephrol Dial Transplant*, 18, 1439-42.
- TEPEL, M., ECHELMAYER, M., ORIE, N. N. & ZIDEK, W. (2000): *Increased intracellular reactive oxygen species in patients with end-stage renal failure: effect of hemodialysis*. *Kidney Int*, 58, 867-72.
- TEPEL, M., VAN DER GIET, M. & ZIDEK, W. (2002): *[Antioxidant therapy in vascular and renal diseases]*. *Med Klin (Munich)*, 97, 144-51.
- TEPEL, M., VAN DER GIET, M., STATZ, M., JANKOWSKI, J. & ZIDEK, W. (2003): *The antioxidant acetylcysteine reduces cardiovascular events in patients with end-stage renal failure: a randomized, controlled trial*. *Circulation*, 107, 992-5.
- TETTA, C., BIASIOLI, S., SCHIAVON, R., INGUAGGIATO, P., DAVID, S., PANICHI, V. & WRATTEN, M.L. (1999): *An overview of haemodialysis and oxidant stress*. *Blood Purif*, 17, 118-26.
- TOBOREK, M., WASIK, T., DROZDZ, M., KLIN, M., MAGNER-WROBEL, K. & KOPIECZNA-GRZEBIENIAK, E. (1992): *Effect of hemodialysis on lipid peroxidation and antioxidant system in patients with chronic renal failure*. *Metabolism*, 41, 1229-32.
- U. FREI & H.-J. SCHÖBER-HALSTENBERG (2006): *Nierenersatztherapie in Deutschland - Bericht über Dialysebehandlung und Nierentransplantation in Deutschland*. *QuaSi-Niere*.
- UZUM, A., TOPRAK, O., GUMUSTAS, M. K., CIFTCI, S. & SEN, S. (2006): *Effect of vitamin E therapy on oxidative stress and erythrocyte osmotic fragility in patients on peritoneal dialysis and hemodialysis.. J Nephrol*, 19, 739-45.
- VALKO, M., LEIBFRITZ, D., MONCOL, J., CRONIN, M. T. D., MAZUR, M. & TELSER, J. (2007): *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*. *Int J Biochem Cell Biol*, 39, 44-84.

- VAZIRI, N. D. (2004): *Oxidative stress in uremia: nature, mechanisms, and potential consequences. Semin Nephrol*, 24, 469-73.
- VAZIRI, N. D., NI, Z., OVEISI, F. & TRNAVSKY-HOBBS, D.L. (2000): *Effect of antioxidant therapy on blood pressure and NO synthase expression in hypertensive rats.. Hypertension*, 36, 957-64.
- WANG, H., SEKINE, M., YOKOKAWA, H., HAMANISHI, S., CHEN, X., SAYAMA, M., NARUSE, Y., NAKAGAWA, H. & KAGAMIMORI, S. (2001): *The relationship between new stroke onset and serum thiocyanate as an indicator to cigarette smoking.. J Epidemiol*, 11, 233-7.
- WANG, X. L., RAINWATER, D. L., VANDEBERG, J. F., MITCHELL, B. D. & MAHANEY, M.C. (2001): *Genetic contributions to plasma total antioxidant activity.. Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21, 1190-5.
- WANNER, C. (2001): *Kardiovaskuläre Komplikationen bei chronischem Nierenversagen. 39. Bayerischer Internisten-Kongress, W. Zuckschwerdt Verlag München*, 1-5.
- WEINSTEIN, T., CHAGNAC, A., KORZETS, A., BOAZ, M., ORI, Y., HERMAN, M., MALACHI, T. & GAFTER, U. (2000): *Haemolysis in haemodialysis patients: evidence for impaired defence mechanisms against oxidative stress. Nephrol Dial Transplant*, 15, 883-7.
- WRATTEN, M. L., SERENI, L. & TETTA, C. (2000): *Hemolipodialysis attenuates oxidative stress and removes hydrophobic toxins. Artif Organs*, 24, 685-90.
- YILMAZ, M. I., SAGLAM, M., CAGLAR, K., CAKIR, E., SONMEZ, A., OZGURTAS, T., AYDIN, A., EYILETEN, T., OZCAN, O., ACIKEL, C., TASAR, M., GENCTOY, G., ERBIL, K., VURAL, A. & ZOCCALI, C. (2006): *The determinants of endothelial dysfunction in CKD: oxidative stress and asymmetric dimethylarginine.. Am J Kidney Dis*, 47, 42-50.
- ZIMA, T., STIPEK, S., CRKOVSKA, J., NEMECEK, K., PLATENIK, J., BARTOVA, V. & TESAR, V. (1996): *Antioxidant enzymes--superoxide dismutase and glutathione peroxidase--in haemodialyzed patients. Blood Purif*, 14, 257-61.

9 Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle ganz besonders bei Herrn Prof. Dr. Martin Tepel für die uneingeschränkte Hilfsbereitschaft bedanken. Zu jeder Zeit konnte ich auf seine Unterstützung vertrauen. Ich danke Ihnen für die unzähligen Patientenproben, die, wann immer ich sie benötigte, bereitstanden und für Ihre Geduld, die sie während des langen Entstehungszeitraumes dieser Arbeit mit mir hatten. Für die Anregungen und Ratschläge, die stetige Ansprechbarkeit und freundliche Zusammenarbeit, und besonders für den Mut, den Sie mir stets zugesprochen haben, danke ich Ihnen herzlichst.

Frau Dr. med. Alexandra Scholze danke ich für die zahlreichen Lösungsvorschläge bei Schwierigkeiten im Labor, für die Denkanstöße, die Literaturvorschläge, Erklärungen, Hilfestellungen und für die stets nette Zusammenarbeit.

Katharina Krüger lehrte mich die Methoden dieser Arbeit, die Funktionsweise der Gerätschaften und war zu jeder Zeit meine wichtigste Ansprechpartnerin in Laborfragen. Mit ihrer Hilfe und Geduld konnten die während dieser Arbeit entstandenen Probleme gelöst werden. Für die immer entspannte und fröhliche Zusammenarbeit, die mir stets viel Spaß gemacht hat, danke ich Dir.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Joachim Jankowski und seinen Mitarbeitern für die freundliche Zusammenarbeit und Überlassung der Laborgeräte.

Überdies gilt mein Dank all meinen freiwilligen Blutspendern und den vielen Patienten der Dialysestation.

Abschließend möchte ich meinem Mann Patrick Koch für seine Liebe danken. Sie gab und gibt mir zu jeder Zeit Kraft und Mut. Danke das es Dich gibt.

10 Tabellarischer Lebenslauf

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

11 Erklärung

„Ich, Kathrin Koch, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: 'Nachweis von oxidativem Stress bei Hämodialyse Patienten' 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: