

1. Zusammenfassung

1.1. Der Verlauf atherogener Risikofaktoren, oxidativer Marker und antioxidativer Mechanismen in verschiedenen Stadien der diabetischen Nephropathie

Diabetes mellitus gilt als hoher Risikofaktor für die Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen. Medizinisch und ökonomisch stellt er eine zunehmende Herausforderung für unser Gesundheitssystem in dar. In der Nephrologie machen Typ 2 Diabetiker heute bereits eine Fraktion von 30 – 50 % aller Patienten aus, bei denen erstmals mit der Dialysebehandlung begonnen wird. Gleichzeitig stellen Diabetiker die Patientenpopulation mit der höchsten kardiovaskulären Mortalität unter den Dialysepatienten dar. Eine verminderte renale Funktion verstärkt bei Diabetikern die Atherosklerose zusätzlich. Dabei spielen sowohl Diabetes mellitus- bedingte Faktoren, als auch Faktoren, die ihre Ursache in der zunehmenden Nierenfunktionseinschränkung haben, eine Rolle. Um das kardiovaskuläre Risiko von Diabetikern langfristig zu senken, erscheint es daher sinnvoll, kardioprotektive Massnahmen nicht erst spät nach Beginn der Dialyse-Einleitung zu ergreifen, sondern bereits früher im Verlauf der diabetischen Nephropathie.

Neben den bekannten traditionellen kardiovaskulären Risikofaktoren, wie Rauchen, Hypertonie und Hypercholesterinämie spielen gerade bei dialysepflichtigen Patienten sogenannte nicht-traditionelle Faktoren eine bedeutende Rolle. Hierzu werden neben erhöhten Homozystein-Spiegeln auch oxidativer Stress und ein inflammatorischer Zustand gezählt. Bislang gibt es nur wenige Untersuchungen, die sich mit Entstehung und Entwicklung dieser nicht-traditionellen Risikofaktoren im Verlauf der diabetischen Nephropathie beschäftigt haben. Kenntnisse über den Zeitpunkt des Auftretens dieser Risikofaktoren sind der erste Schritt zur rechtzeitigen Behandlung dieser Risikofaktoren.

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine Querschnittsuntersuchung an 110 Patienten mit Typ 2 Diabetes und nachgewiesener diabetischer Nephropathie in allen Stadien der Niereninsuffizienz. In einer umfangreichen Analyse wurden die

bedeutenden nicht-traditionellen Risikofaktoren Hyperhomozysteinämie, oxidativer Stress, chronische Inflammation und deren Einflussfaktoren hinsichtlich ihres Vorliegens und ihrer Ausprägung in Relation zur Einschränkung der Nierenfunktion untersucht.

Die kontinuierliche Zunahme der medianen Konzentrationen des atherogenen Risikofaktors CRPus bei gleichzeitigem Abfall des Serum- Albumin- Spiegels in Relation zur fortschreitenden Nierenfunktionseinschränkung weist, gemeinsam mit einer frühzeitig bestehenden Hyperhomozysteinämie auf ein deutlich erhöhtes atherogenes Risiko bei diabetischer Nephropathie hin. Gleichzeitig fallen die Spiegel wichtiger im Homozystein-Stoffwechsel involvierter Vitamine (Folsäure und Vitamin B6) ab. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass oxidativer Stress bereits in einem frühen Stadium der diabetischen Niereninsuffizienz vorliegt. Ein kontinuierlicher Abfall der GSH- Konzentration in Leukozyten, bei gleichzeitig stabilen, im Normbereich liegenden Vitamin E- und TAS-Konzentrationen, sowie einer sogar über dem Normalbereich liegenden Vitamin A- Konzentration, unterstützt die These komplexer, ineinander greifender Mechanismen, die zu einem erhöhten atherogenen Risiko bei diabetischer Nephropathie führen.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass im Verlauf der diabetischen Nephropathie mit zunehmender Einschränkung der Nierenfunktion nicht-traditionelle Risikofaktoren zunehmend nachweisbar werden, die zu einem gesteigerten kardiovaskulären Risiko dieser Patientengruppe beitragen können. Die Ergebnisse dieser Arbeit stellen erstmals dar, ab welcher Einschränkung der Nierenfunktion mit einem Anstieg von Risikofaktoren gerechnet werden kann. In dieser Hinsicht sind die Daten von großem Interesse, da eine frühzeitige medikamentöse Intervention die Entwicklung dieser Risikofaktoren positiv beeinflussen könnte.

1.2. Alterations in atherogenic risk factors, markers of oxidative stress and plasma antioxidative mechanisms in diabetics with various stages of chronic kidney disease

Diabetes mellitus is a strong risk factor for cardiovascular disease. The proportion of patients with diabetes as the presumed cause of end-stage renal disease reaches about thirty percent in Germany, as well as in many other countries. On patients with decreased renal function the progression of atherosclerosis is highly increased. This process includes diabetes mellitus-associated factors, as well as factors associated with the decline of renal function. To reduce the long-term cardiovascular risk in diabetes it seems to be favorable to take cardioprotective measures in an early stage of diabetic nephropathy.

Besides the well-known traditional cardiovascular risk factors such as smoking, high blood pressure and hypercholesterolemia, a variety of non-traditional factors are involved in CVD especially in non-dialysis-dependent diabetic nephropathy. These non-traditional risk factors are hyperhomocysteinemia, oxidative stress and inflammatory reaction. So far only few studies investigated the development and progress of those non-traditional risk factors. Knowledge about the time of their appearance are a first step in treating these risk factors at an early stage or chronic renal failure.

The present study was undertaken to investigate oxidative stress, inflammatory reaction and antioxidative capacity in patients with different stages of chronic renal insufficiency, caused by type-2 diabetes mellitus. 110 patients were included in this cross-sectional study. To obtain a comprehensive profile we measured markers of oxidative stress, inflammation and the activity of antioxidants in CRF patients in different stages of chronic kidney disease and in patients on regular maintenance hemodialysis, as well as their correlation to the stage of renal dysfunction.

We found an inflammatory reaction at an early stage of renal impairment, measured in an increase of C-reactive protein, going along with a decrease of the albumin concentration. We also observed an increase in the concentration of homocysteine, together with a decrease of co-factors of the homocysteine metabolism (folate and vitamin B6). Homocysteine itself is regarded as an oxidative stress factor. A

correlation with other stress Factors (MDA and GSH) can be seen as increased oxidative stress in these patients.

Our results demonstrate an increase in non-traditional risk-factors for cardiovascular disease along with the decline of renal function in diabetic nephropathy. These risk factors contribute to a higher cardiovascular risk in these patients. To the best of our knowledge, this study is the first to show in which stages of diabetic nephropathy there is an increase of cardiovascular risk factors and gives the opportunity to gain more knowledge about the best time of intervention to retard the development and progression of cardiovascular diseases in diabetic nephropathy.

2. Abkürzungen

AGE	a dvanced g lycation e nd- products
ALB	A lbumin
CRPus	C - reaktives P rotein
CVD	Kardiovaskuläre Erkrankung (c ardio v ascular d isease)
DM	D iabetes m ellitus
ESRD	terminale Niereninsuffizienz (e nd- s tage r enal d isease)
GF	Wachstumsfaktor (g rowth f actor)
GFR	g lomeruläre F iltrationsrate
GSH	Glutathion in den Leukozyten
HCY	H omocystein
HD	H ämodialyse
4- HNE	4 - H ydroxynoneal
HST	H arnstoff
IDDM	insulinabhängiger Diabetes mellitus (i nsulin- d eendent d iabetes m ellitus)
IGF- 1	I nsulin g rowth f actor - 1
KREA	K reatinin
LDL	L ow- D ensity- L ipoprotein
MAC	m embrane a ttack c omplex
MDA	M alondialdehyd
MPO	M yeloperoxidase
NIDDM	nicht insulinabhängiger Diabetes mellitus (non insulin- d eendent d iabetes m ellitus)
oxLDL	O xidiertes L DL
PDF	P latelet- d erived growth f actor
ROS	freie Sauerstoffradikale (r eactive o xxygen s pecies)
TAK	T otale a ntioxidative K apazität
TAS	T otales a ntioxidatives S ystem

3. Einleitung

3.1. Diabetes mellitus

Der Diabetes mellitus ist als eine der größten Herausforderungen für die Gesundheitssysteme der nahen Zukunft anzusehen. Voraussagen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) gehen von einer weltweiten Zunahme der Diabetiker von 135 Mio. (1995) auf 300 Mio. (2025) aus (WHO, Pressemitteilung WHO/ 63 14.9.1998). Die Verteilung von Typ 1- zu Typ 2- Diabetes beträgt 1:19. In Deutschland sind ca. 8 Mio. Typ 2- Diabetiker bekannt, die geschätzte „Dunkelziffer“ liegt bei weiteren 4 Mio. Europaweit zeigt die Entwicklung der letzten Jahre eine dramatische Zunahme des Typ-2-Diabetes (Zimmer et al., 1997).

Der Diabetes mellitus selbst ist sowohl als mikro-, als auch als makrovaskulärer Risikofaktor anerkannt. Hinzutretende Folgeerkrankungen des Diabetes haben einen großen Einfluss auf die Behandlung und Prognose der Patienten. Außer der 2- 4fach erhöhten Prävalenz eine kardiovaskuläre Erkrankung zu entwickeln (Kannel et al., 1979) gehört zu den schwerwiegendsten Spätfolgen des Diabetes mellitus die diabetische Nephropathie.

3.2. Diabetische Nephropathie

Die diabetische Nephropathie ist die häufigste Ursache der chronischen Niereninsuffizienz in Deutschland und anderen Industrienationen. In den letzten zwei Jahrzehnten wurde ein kontinuierlicher Anstieg der diabetischen Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz verzeichnet (Ritz et al., 1999)

Etwa ein Drittel aller Diabetiker in Deutschland entwickeln eine diabetische Nephropathie, davon sind 10-20% dialysepflichtig. Sie stellen mit 40- 50% den Hauptanteil neuer Dialysepatienten (Ritz et al., 1999). Die diabetische Nephropathie mit ihren hohen Kosten einschließlich der Dialysetherapie und der Nierentransplantation hat damit epidemieähnliche Ausmaße angenommen.

3.2.1. Verlauf

Über einen Zeitraum von 20- 25 Jahren entwickelt sich die Erkrankung über mehrere Stadien (Ismail et al., 1999):

- I Im **Initialstadium** kommt es zunächst zu einer supranormalen glomerulären *Hyperfiltration* und einer *Nierenhypertrophie*.
- II Im **Stadium der frühen Nierenbeteiligung** (subklinisch) kommt dann die histologisch nachweisbare *Verdickung der glomerulären Basalmembran* hinzu.
- III Das **klinische Initialstadium mit beginnender Nephropathie** ist gekennzeichnet durch eine kontinuierliche *Mikroalbuminurie* bis auf 30-300mg/d. Dies entspricht dem Klinischen Frühstadium und kann bei NIDDM-Patienten bereits zum Zeitpunkt der diabetischen Diagnose, bei IDDM-Patienten ab dem zweiten Jahr der Erstdiagnose des Diabetes mellitus nachgewiesen werden.
- IV Mit Nachweis einer *Albuminurie* von mehr als 300mg/d und *progredienter Niereninsuffizienz* (d.h. GFR- Abfall um monatlich mindestens 1ml/min), gemessen in zwei Proben in 2- bis 4wöchigem Abstand, ist das Stadium der klinischen **diabetische Nephropathie** erreicht. Es manifestiert sich, innerhalb von ca. 10- 20 Jahren nach der diabetischen Erstdiagnose, durch eine arterielle Hypertonie und zunehmende Proteinurie bis hin zum nephrotischen Syndrom.
- V Im **Endstadium** (ESRD) droht die *terminale Niereninsuffizienz* mit vollständigem Verlust der glomerulären Filtrationsrate (GFR<15ml/min) und *Tod* innerhalb von 8-10 Jahren.

3.2.2. Kontrolle und Therapie

In beiden Diabetestypen entwickelt sich die Erkrankung ähnlich (Ritz et al., 1999 B). Die Progression der Nephropathie wird bei Typ-2- Diabetes ab beginnender Erkrankung und bei Typ-1- Diabetes ab dem 7. Erkrankungsjahr, durch eine jährliche Untersuchung auf Albuminurie, überwacht. Die Untersuchung des 24- Stunden Sammelurins stellt dabei die sensitivste Methode dar. Aus praktischen Gründen wird aber meist die Albumin/Kreatinin- Ratio durchgeführt. Bei Werten unter 30mg/d kann die Messung im Jahresabstand wiederholt werden.

Nach den Praxis- Leitlinien der Deutschen Diabetes- Gesellschaft (2002) stellt die wichtigste therapeutische Maßnahme die optimale Blutzuckereinstellung dar. Der HbA_{1c}- Wert sollte unter 7% liegen. Normotensive Typ 1- und Typ 2- Diabetiker mit persistierend erhöhter Albuminausscheidung sind mit einer Salzrestriktion und einer antihypertensiven Therapie, vorzugsweise mit ACE- Hemmern (Alternative AT₁- Blocker), zu behandeln. Bei hypertensiven Diabetikern sollte ein Zieldruck von 125/75 mmHg angestrebt werden. Wenn die Therapie mit ACE- Hemmern dazu alleine nicht ausreicht, ist eine Kombination mit Diuretika, β - Blockern oder Calcium-Antagonisten angezeigt. Ritz et al. betonen außerdem die Bedeutung begleitender Therapiemaßnahmen. Dazu gehören: Die Optimierung des Lipidstoffwechsel (LDL- Cholesterol <100mg/dL), das Rauchen sollte eingestellt werden und eine protein- arme Diät eingehalten werden, die nicht mehr als 0,8g täglicher Eiweißzufuhr pro Kg Körpergewicht erlaubt (Ritz et al., 1999 B).

3.2.3. Prognose

Die Mikroalbuminurie sagt nicht nur einen Verlust der renalen Funktion vorher, sondern gilt auch als Risikofaktor für die Entwicklung einer CVD.

Diabetiker mit terminaler Niereninsuffizienz haben ein exzessives Risiko, eine kardiovaskuläre Erkrankung zu entwickeln. Die Überlebensrate bei Diabetikern ist bereits vor Entwicklung einer terminalen Niereninsuffizienz dramatisch reduziert und fällt noch einmal auf 6% (in Deutschland) mit Erreichen der terminalen Niereninsuffizienz. Das entspricht der einer 5- Jahresüberlebensrate der Patienten mit metastasiertem gastrointestinalem Karzinom (Ritz et al., 1999 B)

3.3. Diabetische Nephropathie und Atherosklerose

Diabetes mellitus gilt als hoher Risikofaktor für die Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen (CVD). Epidemiologische Studien zeigen, dass Diabetiker, im Vergleich zu Nicht-Diabetikern, eine 2- bis 4- fach erhöhte kardiovaskuläre Mortalität aufweisen (Kannel et al., 1979). Die alterskorrigierte Prävalenz einer KHK bei Diabetikern liegt bei 45%, im Vergleich zu etwa 25% bei Nicht-Diabetikern (Wingard et al., 1995). 70 % aller Diabetiker sterben an den kardiovaskulären Komplikationen ihrer diabetischen Erkrankung (Laakso, 1999).

Die Entwicklung der Atherosklerose ist ein sehr komplexer und multifaktorieller Prozess, der auch in der Literatur noch nicht abschließend geklärt werden konnte. Bei der diabetischen Nephropathie spielen sowohl DM- bedingte Faktoren, als auch Faktoren, die ihre Ursache in der zunehmenden Nierenfunktionseinschränkung haben, eine Rolle. Diese beiden Pathomechanismen lassen sich nicht immer eindeutig von einander abgrenzen. Im folgenden sollen nun die Mechanismen beschrieben werden, deren Ursache vor allem in der diabetischen Grunderkrankung liegt, und die in der aktuellen Literatur im Vordergrund stehen. Aronson et al. (Aronson et al., 2002) haben in einem Übersichtsartikel diese Mechanismen zusammengefasst.

3.3.1. Advanced glycolysation end- products

Einer der wichtigsten Mechanismen, die zu anhaltender Atherosklerose bei Diabetikern führt ist die nicht- enzymatische Reaktion zwischen Glukose und Proteinen oder Lipoproteinen in der Arterienwand (Maillard Reaktion). Die Endprodukte dieser Reaktion, die sogenannten AGEs sind extrem stabil und in der Lage den atherosklerotischen Prozess rezeptorvermittelt oder rezeptorunabhängig zu fördern.

Rezeptorunabhängige Mechanismen

Rezeptorunabhängig kommt es zum Beispiel zu einer Glykolysierung des Apoprotein B auf der Oberfläche des Low- Density- Lipoproteins (LDL). Dieser Prozess führt zu

funktionellen Veränderungen des LDL. Die Folge ist eine verstärkte Akkumulation in Intimazellen und Makrophagen, sowie ein Umbau letzterer zu Schaumzellen, in direkter Abhängigkeit vom Glukosespiegel. Dieser Mechanismus wurden als entscheidend in der Pathogenese der Atherosklerose identifiziert (siehe auch Kapitel AGEs).

Die Glykolyse von Aminoguanid- haltigen Phospholipiden auf der LDL-Oberfläche führt, in Korrelation zur Glucose- Konzentration, zu einer Oxidation ungesättigter Fettsäurereste der LDL- Struktur. Glykolyse erhöht also die Empfindlichkeit für oxidative Modifikation des LDL, ein wichtiger Schritt der Atherogenese.

Ein weiterer nicht- Rezeptor vermittelter Mechanismus der Atherogenese bei Hyperglykämie betrifft die Modifikation des Komplement regulierenden Proteins CD59, das nach seiner Glykolyse eine Ablagerung des sogenannten "membrane attack complex" (MAC) in der Gefäßwand zulässt. MAC lagert sich im Endothel ab und stimuliert die Proliferation von Fibroblasten und glatten Muskelzellen.

Die Glykolyse verschiedener Matrixkomponenten wie Kollagen IV, Laminin oder Vitronectin stimuliert die kompensatorische Überproduktion anderer Komponenten.

Rezeptor- vermittelte Mechanismen

Die zellulären Wirkungen der AGE werden vermittelt durch den spezifischen AGE- Rezeptor (RAGE), ein Mitglied der Immunglobulin Familie. RAGE konnte in allen Zellen, die am atherosklerotischen Prozess beteiligt sind, einschließlich der Endothelzellen, Makrophagen und glatten Muskelzellen, nachgewiesen werden. Normalerweise ist die RAGE- Synthese sehr gering, unter pathologischen Bedingungen wie dem DM, konnten hohe RAGE- Konzentrationen in der Gefäßwand nachgewiesen werden. Zu den RAGE- vermittelten Veränderungen gehören:

- ✍ Eine Reduktion der endothelialen Barrierefunktion. Diese vermehrte Durchlässigkeit der Endothelzellen bereitet den Boden für eine

transendotheliale Migration durch Lipide, den initialen Prozess der Atherogenese.

- ✍ Eine AGE-RAGE Interaktion veranlasst mononukleäre Zellen zu einer Infiltration intakter Endothelzellschichten und einer Ablagerung dieser Zellen in der Intima. Monozyten- Makrophagen Interaktion mit AGE resultiert auch in einer Produktion von IL-1, TNF- α , PDF, und des IGF- 1, die eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der Atherosklerose haben (siehe auch Kapitel „C- reaktives Protein“).
- ✍ In glatten Muskelzellen führt die Bindung von AGE an RAGE zu einer verstärkten Proliferation dieser Zellen.

Park et al. zeigten die Rolle des RAGE im atherogenen Prozess bei Diabetikern. Er konnte in Gefäßwänden diabetischer Mäuse eine vermehrte Expression von RAGE in Anwesenheit von AGE zeigen. Eine Blockade der AGE- RAGE Interaktion resultierte in einer deutlichen Suppression beginnender und fortgeschrittener atherosklerotischer Läsionen. Diese Effekte zeigten sich unabhängig von Glukose- und Lipidkonzentrationen (Park et al., 1998)

3.3.2. Protein- Kinase C

Zur Familie der Protein- Kinase C gehören 12 Isoformen. In Gefäßzellen wurden mehrere PKC- Isoformen nachgewiesen. In den Zellen der Aorta, Herz und Retina wurde bei diabetischen Ratten vor allem die PKC β 2 gefunden, in Glomeruli hingegen die PKC β 1. Die PKC beteiligt sich an der Transkription von Wachstumsfaktoren und der daraus resultierenden Signaltransduktion.

In glatten Muskelzellen und anderen Gefäßzellen (Endothelzellen, Monozyten- Makrophagen) konnte als Folge einer PKC Aktivierung eine verstärkte Wachstumsrate der Zellen, Modifikationen der DNA- Synthese und eine verstärkte Expression des PDF β - Rezeptors nachgewiesen werden.

PKC erhöht die Expression von TGF- β , dem wichtigsten Regulationsprotein für die Produktion extrazellulärer Matrix. Eine Aktivierung führt zu verstärkter Proteoglykan-

und Kollagen- Synthese und hemmt die Produktion proteolytischer Enzyme. Die Folge ist ein Verdickung der kapillaren Basalmembran - eine der frühen strukturellen Abnormalitäten, die bei Diabetikern in fast allen Zellen gefunden werden.

3.3.3. Oxidativer Stress

Die Rolle des oxidativer Stress in der Pathogenese der Atherosklerose ist inzwischen weitgehend unumstritten. Hyperglykämie erhöht den oxidativen Stress über verschiedene Wege.

Den Hauptmechanismus stellt die Hyperglykämie induzierte intrazelluläre ROS Produktion dar. Sie entstehen durch einen Elektronengradienten, der durch den mitochondrialen Elektronentransport entsteht und in einer vermehrten Superoxid-Synthese resultiert.

Zwei Mechanismen werden in der Literatur diskutiert die erklären helfen wie der Zustand der Hyperglykämie zur ROS- Entstehung beiträgt.

1. Freie Glucose autooxidiert metall- katalysiert und setzte so Radikale (v.a. O_2^- und H_2O_2) frei.

2. Der zweite Mechanismus umfasst die metallkatalysierte Autooxidation proteingebundener Amadori- Produkte , die ebenfalls zu einer massiven Freisetzung von Superoxid- und Hydroxyl- Radikalen, führt. Außerdem entstehen bei der Reaktion von Proteinen mit Glukose bei oxidativem Stress, Glycolysationprodukte, wie N^e- carboxymethyl-lysine (CML) und Pentosidine.

Oxidativer Stress bei chronischer Niereninsuffizienz spielt nicht nur bei diabetischer Nephropathie eine wichtige Rolle, sondern bei Nierenerkrankungen im Allgemeinen. (Siehe dazu auch unser Kapitel „Oxidativer Stress“)

Außer den hier dargestellten Mechanismen eines verstärkten atherosklerotischen Prozesses, die vor allem in Zusammenhang mit einer Hyperglykämie zu sehen sind, werden in der Literatur noch zahlreiche weitere Pathomechanismen und Risikofaktoren bei Diabetikern und chronisch niereninsuffizienten Patienten diskutiert.

Die Beschreibung dieser Mechanismen würde den hier gegebenen Rahmen sprengen. In Tabelle 1 sind die wichtigsten beteiligten Faktoren zusammengestellt. Auf die Rolle einzelner Faktoren in der Atherogenese, die für diese Arbeit von Bedeutung waren, wird in den folgenden Kapiteln noch gesondert eingegangen.

Arterielle Hypertension
Hyperglykämie
Pathologischer Lipoproteinmetabolismus
Oxidativer Stress
Chronische Inflammation
Pathologische Homocystein- Konzentrationen
Zigaretten-Abusus
Störungen des Calciumphosphat- Metabolismus (Hypercalciämie, Hyperparathyreodismus)
Vitamin E Defizit
Lokale Wirkung pro- oder anti- atherogener Substanzen (NO, Angiotensinogen, Endothelin- 1, Thromboxan, Cyokine)
Virale Infektionen
Östrogen Defizit
Medikamente (Heparin, Antihypertensiva, Immunsuppressiva)

Tabelle 1: Atherogene Mechanismen und Risikofaktoren bei chronischer Niereninsuffizienz

3.4. Pathophysiologie des oxidativen Stress

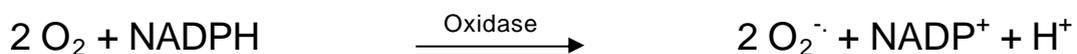
3.4.1. Sauerstoffradikale und Lipidperoxidation

Reaktive Sauerstoffmetaboliten (ROS) stellen unter Normalbedingungen ein potentes Defensivsystem gegen zelluläre Antigene (Bakterien, Viren) und neoplastische Zellen dar. Sie werden ständig produziert und mit Hilfe antioxidativer Mechanismen neutralisiert. Oxidativer Stress entsteht damit erst bei einer Störung des Gleichgewichts zwischen oxidativen und antioxidativen Kräften. Das Ergebnis sind Gewebeschäden.

3.4.1.1. Metabolismus der Sauerstoff- Radikale

Zu den Vertretern der reaktiven Oxidantien gehören die Hydrogen- Peroxide (H_2O_2) und Wasserstoffchlorid (HOCl) sowie das Hydroxyl-Radikal ($\text{OH}\cdot$), Nitritoxid ($\text{NO}\cdot$), und das Superoxid- Anion (O_2^-) als das wichtigste freie Radikal. Während Mitochondrien die Hauptquelle für „zufällig“ entstehenden Radikale sind, setzen Phagozyten und Neutrophile unter Sauerstoff-Verbrauch „absichtlich“ Radikale, als Verteidigung gegen Pathogene, frei. In der Niere werden ROS durch aktivierte Makrophagen, Leukozyten, vaskulären und glomeruläre Zellen (v.a. Fibroblasten) gebildet (Ichkawa et al., 1994).

Neutrophile Granulozyten reagieren bei Aktivierung durch Phagozytose oder mittels löslicher Entzündungsmediatoren mit dem sogenannten „respiratory burst“. Dabei nimmt der nicht- mitochondriale Sauerstoff- Verbrauch innerhalb von Sekunden auf das 100- fache zu und es werden über die membranassoziierte NADPH- Oxidase sowohl O_2^- als auch H_2O_2 gebildet.



Der größte Teil des O_2^- wird entweder spontan oder durch die Superoxiddismutase (SOD) schnell zu H_2O_2 umgewandelt. Weiterhin reagieren O_2^- in der metallkatalysierten Haber- Weiss- Reaktion und H_2O_2 in einer eisen- oder kupferabhängigen Fenton- Reaktion und bilden das hochreaktive Hydroxylradikal $\cdot\text{OH}$ (Galle, 2001).

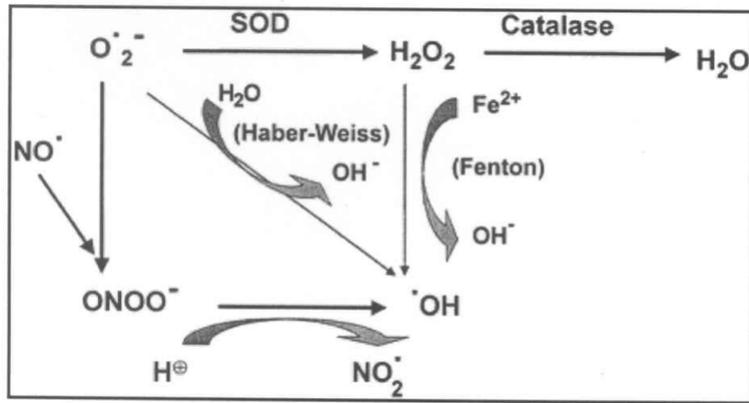


Abbildung 1: Haber- Weiss-Reaktion und Fenton- Reaktion

Die Myeloperoxidase (MPO) in den azurophilen Granula der segmentkernigen Granulozyten bildet außerdem HOCl aus H₂O₂ und Cl⁻. HOCl reagiert mit biologischen Aminen zu noch toxischeren Formationen (Himmelfarb et al., 2002).



Weitere freie Radikale werden auch beim mitochondrialen Elektronentransport ("electron leakage") und im Prostaglandin- und Leukotrien- Stoffwechsel gebildet.

3.4.1.2. Entstehung der Lipidperoxidation

Freie Sauerstoff- Radikale können auf der Ebene von ungesättigten Bindungen oder Thiol- Gruppen mit allen zellulären Bestandteilen reagieren. In Proteinen sind manche Aminosäuren (Lysin, Histidin, Cystein) besonders anfällig gegenüber diesen Reaktionen, die dann Veränderungen der enzymatischen Aktivität oder Konformationsänderungen nach sich ziehen können. Auch Nukleinsäuren und Nukleotide sind Ziel für den Angriff freier Radikaler. Dies kann zu Strangbrüchen oder

Punktmutationen in der DNA führen. (Himmelfarb et al., 2002). Andere Wirkungen der Radikale sind Störung der Calcium- Homöostase, Glutathion- Verbrauch, Veränderungen der mitochondrialen Atmung und Hemmung zahlreicher Enzyme (Siems et al., 2002).

Die wichtigste Schädigung durch reaktive Sauerstoff- Radikale ist jedoch die Lipidperoxidation von Zellmembranen, die wesentliche Veränderungen in der Ultrastruktur der Membranen und damit Aktivitätsänderungen ihrer Enzyme und Störungen des Membrantransportes bewirken.

Initiiert wird die Peroxidation einer Membran oder einer vielfach ungesättigten Fettsäure durch die Abspaltung eines Wasserstoff- Atoms (H^+) von einer Methylengruppe ($-CH_2-$). Die Doppelbindungen in den Fettsäuren schwächen die C-H- Bindung und erleichtern die H^+ - Abspaltung. Zurück bleibt ein ungepaartes Elektron am C-Atom ($-CH\cdot$). In der Folge kommt es zu einer Umstrukturierung des Moleküls zu einem konjugierten Dien. Dieses kann mit Sauerstoff ein Hydroxylradikal bilden, was wiederum ein Wasserstoff-Atom abspalten kann. So wird eine Kettenreaktion mit Bildung vom Lipidperoxiden ausgelöst. Durch stufenweise Polyensäurenabbau entsteht ein komplexes Gemisch aus Malondialdehyd, n-Alkanen, n-Alkanalen, Hydroxyalkanen, 2-Alkanalen, Hydroxyalkanen, Ketonen Epoxiden und Alkoholen (Lucchi, 1993 und Siems et al., 2002).

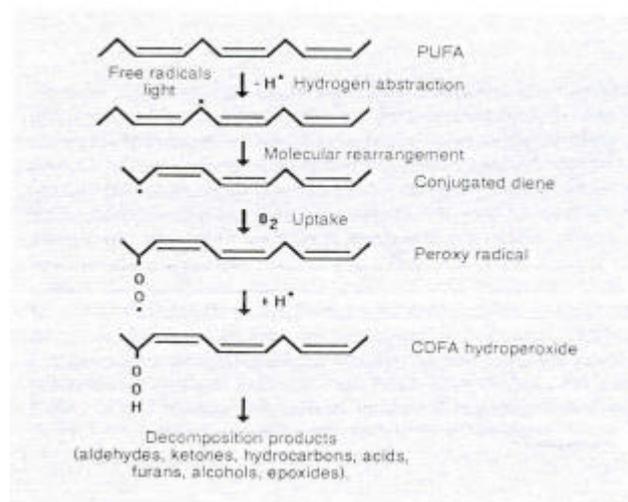
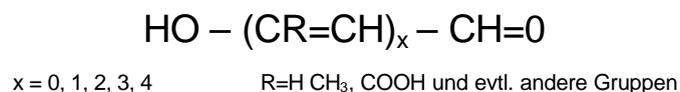


Abbildung 2: Lipidperoxidation

3.4.1.3. Nachweis einer Radikalenwirkung

Der direkte Nachweis freier Radikaler ist aufgrund der niedrigen Konzentration, die meist unter der Nachweisgrenze liegt, sehr schwierig. In dieser Arbeit wird daher das Ausmaß des oxidativen Stress indirekt durch Bestimmung der Endprodukte der Lipiperoxidation evaluiert.

Malondialdehyd (MDA) und 4-Hydroxynonenal (HNE) sind die am häufigsten bestimmten Endprodukte der Lipidperoxidation. Sato et al. beschrieben 1979 erstmals die Messung der MDA- Konzentration durch die Thiobarbitursäure (TBA)- Methode zur Bestimmung des Lipidperoxidationsausmaßes. Spätere Studien zeigten, dass der Farbkomplex bei der TBA- Methode außer durch MDA auch durch verschiedene andere Lipidperoxidationsprodukte gebildet wird (Janero, 1990). Deshalb wird die Methode jetzt als TBA-RS- Methode (Thiobarbitursäure- reaktive Substanzen) bezeichnet. Dabei reagieren alle aliphatischen Verbindungen folgender Summenformel



mit Thiobarbitursäure unter Abspaltung von Wasser zu einem pinkfarbenen Trimethin- Farbstoff, dessen Absorptionsmaximum im sauren Milieu bei 532- 535 nm liegt. Interferenzen in Plasma Proben durch Aminosäuren, Dikarbonsäuren, Pyrimidine, Pyridine, Zucker, etc. können durch entsprechende Leerwerte korrigiert werden.

Die TBA- Reaktion an sich hat eine geringe Spezifität. Der Vorteil der Methode liegt jedoch in ihrer einfachen und kostengünstigen Durchführung. Bei unserer Methodik wurde versucht durch Leerwerte und die Umrechnung auf den Plasma- Gesamtproteingehalt sowie durch leichte Modifikationen der ursprünglichen Methode von Yagi (1976), mögliche Interferenzen auszuschalten (siehe Methodikteil).

3.4.1.4. Die Rolle freier Radikaler in der Atherosklerose

Die Lipidperoxidation spielt eine wichtige pathogenetische Rolle bei einer ganzen Reihe von Erkrankungen wie Diabetes mellitus (Hendra et al., 1991 und Mooradian et al., 1991), Alkoholismus (Fink et al., 1986), rheumatoide Arthritis (Lunec et al., 1986) und vieler anderer (Halliwell, 1987).

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass es bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz zu einer signifikant erhöhten Konzentration an Lipidperoxidationsendprodukten kommt (Siems et al., 2002; Lucchi et al., 1993, Loughrey et al., 1994). ROS spielen eine bekannt wichtige Rolle sowohl in der Pathogenese als auch in der Progression renaler Erkrankungen.

Die Oxidation von Lipiden, aber auch Proteinen und Kohlenhydraten, steigt mit dem Fortschreiten der Nierenerkrankung und erreicht ihren Höhepunkt im terminalen Nierenversagen. Eine der Folge ist eine sich schnell und vorzeitig entwickelnde Atherosklerose.

In der Literatur finden sich folgende Mechanismen zur Erklärung der Rolle der Oxidantien bei der Entstehung der Atherosklerose:

✎ LDL- Oxidation durch freie Radikale.

Bei dieser Oxidation entstehen MDA und 4-HNE, die mit Lysin-Resten in apoB reagieren. Diese Reaktionsprodukte wurden sowohl in oxidiertem LDL(oxLDL), als auch in atherosklerotischen Plaques selbst nachgewiesen (Drücke et al., 2001). Auch Salomon et al. konnte 4- HNE in atherosklerotischen Plaques und im Plasma atherosklerotischer Patienten nachweisen (Salomon et al., 2001). Die Rolle oxidierter Lipide und Lipoproteinen wurde als Schlüsselereignis im atherogenen Prozess identifiziert (Ross, 1999).

✎ ROS- Produktion durch oxLDL schädigt Endothelzellen und Nierenzellen

Atherogene Lipoproteine, wie LDL und Lp(a) werden durch Radikale nicht nur oxidiert, sondern zusätzlich angeregt, selbst ROS *via* Stimulation der NADH/NADPH- abhängigen Oxidase zu produzieren. Verstärkte O₂⁻-Produktion resultiert schließlich in einer Zellproliferation oder Apoptose (in Abhängigkeit von Konzentration und Expositionszeit). Dieser Prozess wurde in

Endothelzellen, glatten Muskelzellen, juxtaglomerulären und mesangialen Zellen nachgewiesen (Heinloth et al., 2000 und Galle et al., 1995).

✍ **Akkumulation der Myeloperoxidase in atherosklerotischen Läsionen**

Daugherty et al. wiesen in atheromatösen Plaques die Akkumulation der MPO, die aus H_2O_2 HOCl generiert, zusammen mit HOCl-induzierten Protein-Schäden, nach (Daugherty et al., 1994).

✍ **Advanced glycation end- products**

Autooxidation von Kohlenhydraten, Lipiden und Vitamin C, führt bei Diabetikern zur Formation von AGEs oder Glycoxidations-Produkten. Bei der Glycoxidation und der Lipidperoxidation entstehen Carbonyle, die in der atheromatös verdickten Intima nachgewiesen werden konnten (Miyata et al., 1998).

✍ **Peroxynitrit- Formation schädigt den endothelialen Stoffwechsel**

O_2^- reagiert in Endothelzellen mit dem Vasodilatator NO. Das Reaktionsprodukt Peroxynitrit ($ONOO^-$) ist an der Synthese weiterer ROS, wie OH \cdot , in der Gefäßwand beteiligt. Die Folgen sind endotheliale Dysfunktion und Störungen der Zellerneuerung. (Halliwell et al., 1999).

✍ **Induktion der Entzündungskaskade durch freie Radikale**

Ward et al. konnte nachweisen, dass durch Urämie aktivierte Phagozyten verstärkt ROS und Zytokine freisetzen. Die Folge ist eine Induktion der Akute-Phase- Antwort und ein Anstieg der CRP- Produktion (Ward et al., 1995). (Siehe auch Kapitel „C-reaktives Protein“)

3.4.1.5. Oxidativer Stress bei Nierenerkrankungen

Die Frage nach vermehrtem oxidativen Stress bei prä- Dialyse und Dialyse Patienten war Thema zahlreicher Studien der letzten Jahre. Keine der Studien befasste sich jedoch ausschließlich diabetischer Nephropathie in verschiedenen Stadien der Niereninsuffizienz.

Richard et al. fanden eine signifikant erhöhte MDA- Konzentration bei hämodialysierten Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe, und eine leicht erhöhte Konzentration von MDA bei prä- Dialyse Patienten (Richard et al., 1991). Mimic- Oka et al. untersuchten 36 nicht dialysierte chronisch niereninsuffiziente Patienten (Keine Diabetiker!) in verschiedenen Stadien der Niereninsuffizienz und 10 hämodialysierten Patienten (keine Diabetiker). Sie fanden signifikant erhöhte MDA- Konzentrationen bei allen Gruppen, sowie eine negative Korrelation zwischen MDA und der Kreatinin-Clearance (Mimic- Oka et al., 1999). Ihre Ergebnisse stehen damit im Einklang mit den Ergebnissen anderer Studien. Auch Dasgupta et al. zeigten einen signifikant erhöhte TBA-RS- Spiegel bei hämodialysierten Patienten (Dasgupta et al., 1992). Für prä-Dialyse Patienten (Taccone- Gallucci et al., 1987) und CAPD- Patienten (Taccone- Gallucci et al., 1986) fanden sich ähnliche Ergebnisse.

Paul et al. hingegen fanden normale MDA –Level in hämodialysierten Patienten (Paul et al., 1993). Auch Erdogan et al. fanden weder bei Hämodialyse- Patienten noch bei CAPD Patienten erhöhte MDA- Werte im Vergleich zu gesunden Kontrollgruppen (Erdogan et al., 2002).

Lucchi et al. konnten zeigen, dass es bei ihren Patienten mit eine $C_{cr} > 20$ ml/min keine signifikanten Unterschiede in der MDA-Konzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe kommt. Erst bei ihren Patienten mit $C_{cr} < 20$ ml/min steigt die MDA-Konzentration des Plasma signifikant an. Eine Normalisierung der MDA- Werte wurde bei den Hämodialyse- Patienten berichtet (Lucchi et al., 1993).

Miyata et al. fanden signifikant erhöhte MDA - Konzentrationen im Plasma nicht-diabetischer und diabetischer Hämodialyse- Patienten. Die Konzentration zwischen Diabetikern und Nicht- Diabetikern war nicht signifikant unterschiedlich (Miyata et al., 1998).

3.4.2. Glykolisierungsstoffwechsel

3.4.2.1. HbA_{1c} als Zwischenprodukt der Glykolisierung

Einer der wichtigsten Mechanismen, der verantwortlich ist für die beschleunigte Atherosklerose bei Diabetikern ist die Maillard oder Browning-Reaktion (Maillard,

1912). Dabei reagiert Glukose nicht-enzymatisch mit Proteinen oder Lipoproteinen in den arteriellen Gefäßwänden. Glukose bildet mit reaktiven Aminogruppen auf der Oberfläche frei zirkulierender oder in der Gefäßwand ansässiger Proteine (Schiff-Basen). Es entstehen noch vollkommen reversible sogenannte frühe Glykolisierungsprodukte, die sich anschließend zu weitaus stabileren Amadori-Produkten umformen. Das bekannteste Amadori-Produkt ist Hämoglobin A_{1c}. Das Ausmaß der nicht-enzymatischen Glycation ist vor allem abhängig von der Glukosekonzentration, sowie der Expositionszeit (Brownlee et al., 1988).

Einige der frühen Glykolisierungsprodukte reagieren weiter, bis sie nach mehreren komplexen chemischen Reaktionen die AGE bilden (Brownlee et al., 1988). Zu den bekanntesten Vertretern der AGE gehört das N^e-Carboxymethyllysin (CML).

AGEs sind sehr stabil und werden irreversibel gebildet. Sie akkumulieren in den Gefäßwänden mit zunehmendem Alter und vermehrt bei Diabetikern (Brownlee et al., 1988). (Siehe auch Kapitel 3.3.1.)

Wir haben bei unseren Patienten den HbA_{1c}-Wert bestimmt, um ihn als Marker für den Glykolisierungsstoffwechsel bei diabetischer Nephropathie auszuwerten. Seine Bestimmung ist einfach und gehört bei Diabetikern zur Routineuntersuchung.

3.4.2.2. Die Rolle der Glykolisierungsprodukte in der Atherogenese

Über die Rolle der AGEs in der Atherogenese wurde bereits in Kapitel 3.3.1. berichtet.

3.4.2.3. Die Glykolisierungsprodukte bei Nierenerkrankungen und Diabetes

Makita et al. konnten in ihrer Studie zeigen, dass Diabetiker mit persistierender Proteinurie im Stadium der terminalen Niereninsuffizienz einen signifikant erhöhten HbA_{1c}-Wert, im Vergleich zu nicht diabetischen hämodialysierten Patienten, gesunden Kontrollen und Diabetikern mit unauffälliger Nierenfunktion, haben (Makita et al., 1991). Aso et al. konnte für Diabetiker eine Korrelation zwischen HbA_{1c} und Serum-AGEs feststellen und zeigt damit, dass eine schlechte Blutzuckereinstellung

zur verstärkten Entstehung der AGEs wesentlich beiträgt. Die Folge ist die frühzeitige Entwicklung mikro- und makroangiopathischer Schäden bei Diabetikern (Aso et al., 2000). Shimoike et al. hingegen kann diese Korrelation zwischen HbA_{1c} und AGEs nicht finden. Dies legt den Schluss nahe, dass die erhöhten AGE- Konzentrationen und ihre Folgen, bei Diabetikern eher Ursache einer verminderten renalen Exkretion sind (Shimoike et al., 2000).

Die meisten Studien, in denen AGES bei Nierenpatienten und/oder Diabetikern bestimmt wurden, fokussieren auf die Endprodukte des Glycolysationstoffwechsel und bestimmen Pentosidine und CML.

Die Pentosidin- Konzentrationen im Plasma und Kollagenzellen sind bei urämischen Patienten und Diabetikern erhöht (Odetti et al., 1992; Sell et al., 1990), genauso die CML- Konzentrationen der Plasmaproteine chronisch niereninsuffizienter Patienten (Degenhardt et al., 1997). Die Pentosidin- und CML- Konzentrationen zeigten keinen Unterschied zwischen hämodialysierten und nicht- dialysierten Diabetikern (Miyata et al., 1996; Miyata et al. 1998 B).

3.5. Pathophysiologie der Antioxidantien

Um sich gegen den Angriff durch freie Radikale zu schützen hat der Organismus verschiedene antioxidative Systeme entwickelt: zum einen niedrig-molekulare antioxidative Moleküle wie α - Tocopherol (Vitamin E), β - Carotin (Vitamin A), Ascorbinsäure (Vitamin C), Glutathion und Harnsäure, zum anderen die intrazellulär vorkommenden antioxidativen Enzyme Superoxiddismutase (SOD), Catalase und Glutathion- Peroxidase (GPX). Zusätzlich halten enzymatische Hilfsmechanismen die Konzentration reaktiver Sauerstoffspezies niedrig. Dazu gehören Glutathion-S-Transferasen, Glucoronyltransferasen, u.s.w.

Vielen Antioxidantien gemeinsam ist die Rückführung reaktiver Sauerstoffspezies zu Wasser oder die Reduktion von Lipidperoxidationsprodukten zu Alkohol oder Hydroperoxiden. Unter physiologischen Bedingungen sorgen diese Abwehrmechanismen für eine gleichbleibend niedrige Konzentration an freien Radikalen in der Zelle und eine präzise Regulation ihrer Aktivität (Harris, 1992).

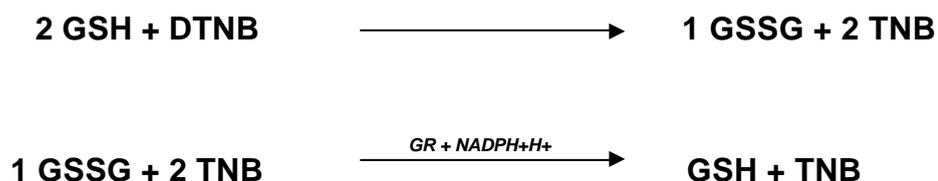
3.5.1. Glutathion

3.5.1.1. Metabolismus und Rolle als Antioxidans

In vorliegender Arbeit wurde die Konzentration an totalem und oxidiertem Glutathion in den Leukozyten gemessen. Glutathion ist ein Tripeptid, das in einer reduzierten (Sulphydryl-) und einer oxidierten (Disulfid-) Form vorkommt. *In vivo* liegt Glutathion hauptsächlich, durch die Aktivität der Glutathion- Reduktase (GR), in reduzierter Form vor. Der Sulphydryl- Rest funktioniert als Redox- Puffer und stabilisiert die Proteinstruktur und – funktion. Den GSH- Gehalt in den Leukozyten zu messen schien uns sinnvoll, da diese über den „respiratory burst“ and der Freisetzung freier Sauerstoffradikale beteiligt sind. Gleichzeitig besitzen sie mit ihrem hohen Gehalt an Glutathion einen sehr effektiven antioxidativen Mechanismus, der sie vor dem Angriff der „eigenen“ Radikalen schützt.

Bei der von uns durchgeführten GSH- Bestimmung wird nun eigentlich der Gesamtgehalt an GSH, sowie dem in den Zellen bereits vorhandenem GSSG gemessen. Dieser ist im allgemeinen bei nicht gestressten Zellen sehr gering. GSSG und GSH liegen im Verhältnis 1:500 vor, so dass in der Literatur häufig die Begriffe GSH und „total glutathione“ gleichgesetzt werden.

Das Prinzip der GSH- Bestimmung beruht auf der zunächst nicht-enzymatischen Oxidation von zwei Molekülen GSH zu einem Molekül GSSG durch Reaktion mit DTNB (5,5'-dithio-bis (2)-nitrobenzoat) (= Ellman´s Reagenz), wobei zwei Moleküle TNB (2-nitro-5-thiobenzoat) entstehen. Die Glutathionreductase (GR) wandelt nun unter Reduktion von $\text{NADPH} + \text{H}^+$ das GSSG wieder zu GSH um.



Diese Reaktion ist nur in einem saurem Milieu, in dem freie Protonen ungebunden vorliegen, möglich. Das fortlaufende Entstehen von TNB, das im genauen Verhältnis

zum GSH-Gehalt steht, kann photometrisch bei 412nm gemessen und mit Hilfe einer Kalibrationskurve die Glutathionkonzentration errechnet werden (siehe dazu auch im Methodikteil: 4.3.6 GSH).

3.5.1.2. Glutathion bei Nierenerkrankungen

Bei hämodialysierten Patienten wurden erhöhte (Mimic- Oka, 1992; El- Rashidi et al., 1984) aber auch erniedrigte GSH- Konzentrationen gemessen (Cebalot- Picot et al., 1996,). Cebalot- Picot et al. fanden außerdem, dass die GSH- Konzentration mit dem Ausmaß des chronischen Nierenversagens korreliert. Selvaraj et al. fanden erniedrigte GSH- Spiegel bei nicht- dialysierten CRF-Patienten (Selvraj et al., 2002). Mimic- Oka et al. hingegen erhöhte GSH- Spiegel bei nicht dialysierten CRF- Patienten (Mimic- Oka, 1992).

Schettler at al. zeigten einen GSH- Verlust in Granulozyten bei hämodialysierten Patienten, sowie einen Verlust der granulozytären GSH- Konzentration während einer Dialyse Therapie (Schettler at al., 1998)

3.5.2. Vitamin E

3.5.2.1. Metabolismus

Vitamin E (Tocopherol) ist, zusammen mit Vitamin C, einer der wirksamsten natürlich vorkommenden Antioxidantien. Bei den Tocopherolen handelt es sich um eine relativ umfangreiche Gruppe von lipophilen Substanzen, die aus einem Chromanring und einer isoprenoiden Seitenkette bestehen. Der Chromanring und mindestens eine Methyl- und Hydroxylgruppe sind für die biologische Wirkung verantwortlich. Die verschiedenen Tocopherole unterscheiden sich durch die Anzahl und Stellung der Methylgruppen. In dieser Arbeit wurde, wie in vielen anderen, das α Tocopherol gemessen, weil dieses die höchste biologische Aktivität aufweist.

3.5.2.2. Die Rolle des Vitamin E als Antioxidans

Die wichtigste Funktion der α -Tocopherole ist die als Radikalfänger. Sie reagieren mit organischen Peroxylradikalen und wandeln sie in Lipidperoxyde um, wobei das Tocochinonradikal entsteht. Dies zeichnet sich dadurch aus, dass es mit Hilfe von Ascorbat oder Thiolen zum Tocochinon reoxidiert wird. Vitamin E unterbricht so die Kettenreaktion der Lipidperoxidation (Burton et al., 1989).

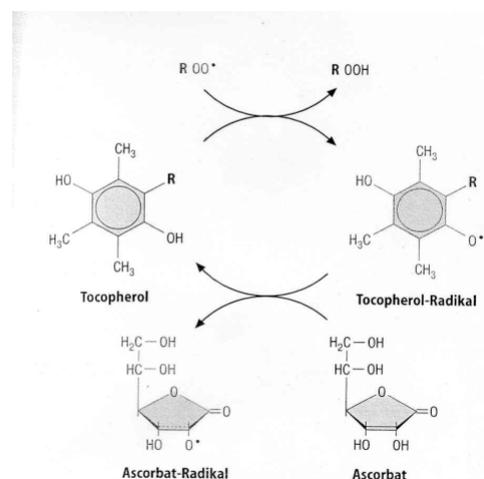


Abbildung 3: Vitamin E- Stoffwechsel

Vitamin E spielt also eine wichtige Rolle beim Schutz des LDL vor Oxidation, ein Vorgang, der als entscheidender Mechanismus bei der Entstehung der Atherosklerose identifiziert wurde (Suzukawa et al., 1998). Der empfohlene tägliche Bedarf an Vitamin E liegt bei 65- 78 μmol (25-30 mg) und steigt mit der Zufuhr ungesättigter Fettsäuren, da diese besonders leicht Peroxylradikale bilden.

3.5.2.3 Vitamin E bei Nierenerkrankungen und Diabetes

Clermont et al. konnten keine Unterschiede des Vitamin E-Spiegels zwischen chronisch niereninsuffizienten-, und Hämodialyse- Patienten sowie der gesunden

Kontrollgruppe finden. Alle Patientengruppen lagen mit dem Median ihrer Vitamin E-Konzentration im physiologischen Bereich (Clermont et al., 2000). Porrini et al. und Stein et al. bestätigen die normalen Vitamin E Spiegel im Plasma chronisch niereninsuffizienter Patienten (Porrini et al., 1989 und Stein et al., 1983).

Hultquist et al. (Hultquist et al., 1997) sowie andere Arbeitsgruppen (Pastor et al., 1993; Paul et al., 1993; Nguyen-Khoa et al., 1999) bestätigen die Ergebnisse für Hämodialyse-Patienten. Sie fanden keine Unterschiede der α -Tocopherol-Konzentration im Plasma zwischen HD-Patienten und den Kontrollgruppen. Lediglich Triolo et al. fanden bei HD-Patienten niedrigere α -Tocopherol-Konzentrationen als bei den Kontrollgruppen (Triolo et al., 1994). Eine Studie, die sich mit Konzentration und Verlauf des α -Tocopherol in verschiedenen Stadien der diabetischen Nephropathie befasst, konnten wir in der Literatur nicht finden.

3.5.3. Vitamin A

3.5.3.1 Metabolismus und Rolle als Antioxidans

Vitamin A ist ein aus 4 Isopreneinheiten zusammengesetzter Alkohol. Es wird entweder als solcher, oder in Form des Provitamins β -Carotin mit der Nahrung zugeführt.

Die Bedeutung des Retinols liegt vor allem in seiner Rolle in der Photorezeption. Als aktivierte Form (Retinal) ist es wichtigster Bestandteil des in den stäbchenförmigen Sinneszellen der Retina vorkommenden Sehpigments Rhodopsin. Das Provitamin gehört zur Gruppe der fettlöslichen Carotinoide, die formal aus 8 Isoprenresten bestehen und nur im Pflanzenreich synthetisiert werden. Die Carotinoide β -Carotin und Lycopene wirken antioxidativ als sehr effektive Quencher, fangen vor allem den reaktiven Singulett-Sauerstoff ab und unterbrechen Radikalketten.

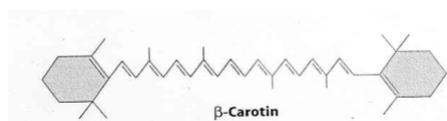


Abbildung 4: β -Carotin

3.5.3.2. Vitamin A bei Nierenerkrankungen

Einige Studien der letzten Jahre untersuchten die Vitamin A- Plasmaspiegel bei chronischer Niereninsuffizienz. Allman et al. und Werb et al. fanden Plasma Retinol-Konzentrationen bei hämodialysierten Patienten über dem Normalwert. (Allmann et al., 1989; Werb et al., 1979). Stein et al. und Ono (Stein et al., 1985 B; Ono K, 1984) konnten zeigen, dass diese erhöhte Vitamin A- Konzentration hämodialysierter Patienten signifikant über dem Niveau der Kontrollgruppen liegt. Eine Studie, die sich mit Konzentration und Verlauf des α -Tocopherol in verschiedenen Stadien der diabetischen Nephropathie befasst, konnten wir in der Literatur nicht finden.

3.5.4. Totales antioxidatives System

3.5.4.1. Definition

Schließlich haben wir in dieser Arbeit noch den totalen antioxidativen Status (TAS) im Plasma unserer Patienten bestimmt. Halliwell et al. haben gezeigt, dass protein-gebundene Thiole (SH- Reste) und Ascorbinsäure zu den wichtigsten Verteidigungsmechanismen gegen oxidativen Stress im Plasma gehören (Halliwell et al.,1987). Weitere Antioxidantien des Plasmas sind:

Billirubin, Albumin, Harnstoff, α - Tocopherol, Vitamin A, Carotinoide und Flavonoide. Caeruloplasmin, Transferrin, Ferritin und Myoglobin tragen zur antioxidativen Kapazität bei, indem sie die Eisen- Verfügbarkeit erniedrigen. Außerdem wirken die Spurenelemente Mangan, Selen, Kupfer und Zink bekanntermaßen antioxidativ.

3.5.4.2. TAS bei Nierenerkrankungen

Das totale antioxidative System (TAS) wurde nach unseren Recherchen weder bei Patienten mit diabetischer Nephropathie, noch in verschiedenen Stadien der Niereninsuffizienz bisher gemessen. Andere Studien haben sich vor allem mit der Dokumentation der totalen antioxidativen Kapazität (TAK) befasst.

Jackson et al. fanden eine erhöhte totale antioxidative Kapazität (TAK) bei Hämodialyse-Patienten. Sie zeigten einen signifikanten Abfall der TAK nach einer einzelnen Dialyse Therapie. Die erhöhte Konzentration an TAK vor der Hämodialyse konnte sie allein auf einen relativ hohen Serum Harnstoff Spiegel zurück führen (Jackson et al., 1995). Diese Ergebnisse bestätigen Fiorello et al. die ebenfalls bei ihren hämodialysierten Patienten eine, im Vergleich zu gesunden Kontrollen, erhöhte antioxidative Kapazität im Plasma, sowie spezifischer antioxidativer Moleküle, fanden (Fiorello et al., 1998). Annuk et al. fanden bei ihren nicht dialysierten CRF- Patienten (Crea-Clearance \bar{x} mean \pm SD: 25.1 \pm 16.2) keinen Unterschied in der totalen antioxidativen Aktivität im Vergleich zu Kontrollgruppe (Annuk et al., 2001). Das totale antioxidative System (TAS) wurde nach unserem besten Wissen bisher weder bei Patienten mit diabetischer Nephropathie, noch in verschiedenen Stadien der Niereninsuffizienz gemessen.

3.6. C-reaktives Protein

3.6.1. Aktivierung der Akute- Phase- Antwort

Das C-reaktive Protein, ein Mitglied der Pentraxin- Familie, ist das klassische Akute-Phase- Protein auf eine entzündliche Reaktion. Die Synthese erfolgt hauptsächlich in der Leber und unterliegt der Regulation einer Reihe von Zytokinen. Vor allem IL-6, IL-1 und TNF- α und IFN- γ , werden nach einer Gewebsverletzung, Infektion oder Entzündung durch Makrophagen, Fibroblasten, Monozyten und Endothelzellen freigesetzt, um die hepatische Synthese der Akute Phase-Proteine zu induzieren.

C-reaktives Protein ist der empfindlichste Reaktant der Akuten Phase und seine Konzentration steigt in Gegenwart inflammatorischer Prozesse innerhalb von 6-48 h bis auf das 1000- fache seiner ursprünglichen Konzentration an. Da die Halbwertszeit mit 19 h sehr kurz ist, machen sie entzündliche Veränderungen sehr kurzfristig in der CRP- Konzentration bemerkbar.

CRP initiiert die Opsonierung und Phagozytose eingedrungener Zellen, seine Hauptaufgabe liegt jedoch in der Aktivierung des Komplementsystems, beginnend bei C1q.

3.6.2. Die Rolle des CRP in der Atherogenese und Thrombogenese

CRP gilt heute als starker und unabhängiger Vorhersagewert für CVD und ein größerer Risikofaktor für KHK als die Lipid-Risikofaktoren (Ridker et al., 1998). Mehrere Studien haben den pathogenetischen Zusammenhang zwischen CRP und der Atherosklerose unterstrichen. So findet sich ein Zusammenhang zwischen CRP und dem Ausmaß der Arteriosklerose koronarer, peripherer und extrakranieller Hirnarterien (Heinrich et al., 1995). Ridker et al. konnten zeigen, dass Patienten mit hohen CRP-Spiegeln ein dreifach erhöhtes Risiko haben einen Myokardinfarkt zu entwickeln und ein zweifach erhöhtes Risiko eine Hirninfarkt zu erleiden (Ridker et al., 1997). Zimmermann et al. konnten zeigen, dass mit Hilfe des CRP-Levels eine Vorhersage über die Mortalität von hämodialysierten Patienten gemacht werden kann (Zimmermann et al., 1999).

CRP ist an der Pathogenese der Atherosklerose und ihrer Komplikationen durch eine Reihe von Mechanismen beteiligt:

✍ *CRP bindet an untergehendem Gewebe und aktiviert Komplement.*

Grisseli et al. (Grisseli et al., 1999) postulieren eine potentiell pathogenetische Rolle des CRPs an der Entstehung von Schaumzellen und damit der Unterstützung der Atherogenese. Torzewski et al. (Torzewski et al., 1998) zeigten, ein positive staining des CRP an subendothelial gelegenen Schaumzellen. Sie weisen eine diffuse Ablagerung von CRP und eine Komplementaktivierung in fibroelastischen und fibromuskulären Intima- Schichten nach. Lagrand et al. fanden CRP in infarziertem Myokardgewebe, zusammen mit aktiviertem Komplement (Lagrand et al., 1997)

✍ *CRP bindet und aggregiert calcium-abhängig LDL und VLDL.*

Bhakdi et al. konnten zeigen dass CRP an LDL und VLDL bindet und sich mit diesen Lipiden in frühen atherosklerotischen Läsionen abgelagert (Bhakdi et al., 1999)

- ✍ CRP ist ein potenter Stimulator der Gewebefaktorproduktion durch Monozyten (Cermak et al.). Dieser Effekt wird noch verstärkt durch weitere inflammatorische Mediatoren (Nakagomi et al., 2000).

Diese Reaktionen sind an der Entstehung und dem Wachstum atherosklerotischer Läsionen beteiligt. Eine direkte Rolle des CRP an der Atherogenese ist somit sehr wahrscheinlich, allerdings müssen noch weitere Studien die näheren Zusammenhänge untersuchen.

3.6.3. CRP bei Nierenerkrankungen

C-reaktives Protein wird klassischerweise als Marker akuter Infektionen oder als Aktivitätsparameter inflammatorischer Prozesse bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz bestimmt. Mehrere Studien der letzten Jahre haben jedoch gezeigt, dass CRP bei einer großen Anzahl von Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz auch bei Fehlen einer akuten Infektion, erhöht ist. Sethi et al. (Sethi et al., 1988) zeigten als Erste, dass CRP bei einem Drittel ihrer Hämodialyse Patienten erhöht war. Kario et al. konnten signifikant erhöhte CRP Werte bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz unter Dialysetherapie zeigen (Kario et al., 1995). Stenvinkel et al. zeigten kürzlich, dass sich schnell entwickelnde Atherosklerose bei prä-Dialyse Patienten durch eine Reihe von Mechanismen wie Malnutrition, oxidativer Stress, genetischen Faktoren und chronischer Inflammation verursacht ist (Stenvinkel et al., 1999). Auch Ortega et al. fanden erhöhte CRP-Spiegel bei prä-Dialyse Patienten. CRP korreliert negativ mit dem S-Albumin-Spiegel. Keine Korrelation besteht zwischen der renalen Funktion und CRP (Ortega et al., 2002).

Pecoits-Filho et al. teilten ihre Patienten anhand ihres GFR-Median in zwei Gruppen auf. Sie konnten zeigen, dass Patienten mit niedrigerer GFR eine signifikant höhere CRP-Konzentrationen aufweisen als die Patienten mit einer GFR >6,5ml/min. Eine separate Untersuchung der Diabetiker dieser Gruppen zeigte, dass es keine Unterschiede des CRPs zwischen Diabetikern und Nicht-Diabetikern gibt. Eine inverse Korrelationen wurde zwischen CRP und dem Serum-Albumin Spiegel der Patienten gefunden (Pecoits-Filho et al., 2003).

Eine Studie die Veränderungen des CRPs bei diabetischer Nephropathie in verschiedenen Stadien der Niereninsuffizienz untersucht, gibt es nach unseren Recherchen zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht.

3.7. Homocystein

3.7.1. Metabolismus

Die toxische Aminosäure Homocystein wird während der Verstoffwechslung der essentiellen Aminosäure Methionin zu Cystein gebildet. Cystein spielt als Redoxsystem und Stabilisator von Proteinstrukturen eine Rolle. Cystein und Methionin sind als Aminosäuren außerdem wichtiger Bestandteil vieler Proteine. Beim Abbau der schwefelhaltigen Aminosäure Methionin entseht auch Sulfat, welches durch Bildung von aktiviertem Sulfat (3-Phosphoadenosin- 5- Phosphosulfat) für Konjugationen und Biosynthesen in der Leber und zur Bildung von Cerebrosiden und sauren Mukopolysachariden verwendet wird. Methionin gilt als wichtigster Methylgruppendonator im Zellstoffwechsel. Homocystein selbst ist für die Proteinbiosynthese nicht von Bedeutung. (Löffler, 1997).

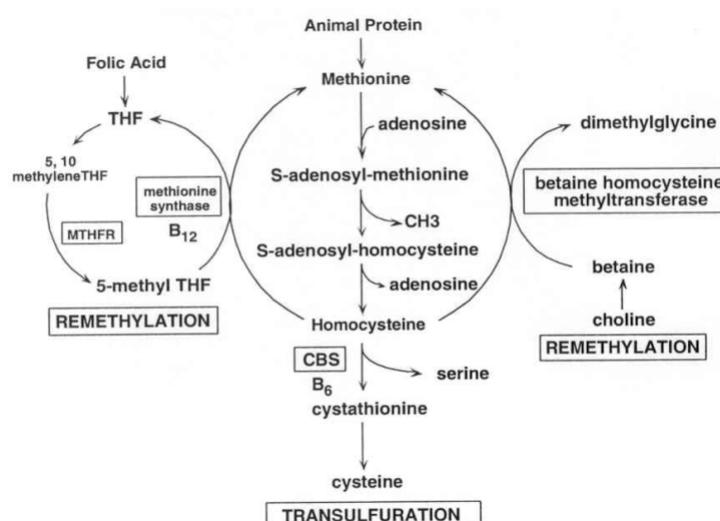


Abbildung 5: Homocysteinstoffwechsel

Wie in Abbildung 4 dargestellt, wird Methionin zu S-adenosyl-methionin aktiviert. Unter Abspaltung einer Methylgruppe und eines Adenosinrestes entsteht dann Homocystein. Dieses kann nun entweder zu Methionin remethyliert werden oder kondensiert mit Serin zu Cystathionin. Ist Methionin in ausreichender Menge vorhanden, werden etwa 50 % des Homocysteins kondensiert. Diese Reaktion ist irreversibel. Sie wird von der Cystathion- β -Synthase (CBS) katalysiert und ist Vitamin B6-abhängig. Cystathionin wird nun irreversibel hydrolytisch gespalten, katalysiert durch die ebenfalls Vitamin B6-abhängige, Cystathionase. Es entsteht Cystein und α -Ketobutyrat. Cystein wird über Cysteamin und dessen weitere Oxidation zu Taurin abgebaut oder es wird stufenweise zu Cysteinsäure oxidiert, transaminiert und danach zu Pyruvat hydrolisiert.

Wird jedoch, wie oben beschrieben, vermehrt Methionin vom Organismus benötigt, so kann aus Homocystein durch Remethylierung aus Methyltetrahydrofolsäure wieder Methionin resynthetisiert werden. Für diesen Schritt benötigt man die Methioninsynthetase und die 5,10-Methyltetrahydrofolsäurereductase. Die Reaktion ist Vitamin B12- und Folsäure abhängig und kann in allen Geweben stattfinden. Eine zweite Remethylierung des Homocystein ist durch die ebenfalls Vitamin B12 abhängige Betain-Homocystein-Methyltransferase möglich. Diese Reaktion ist jedoch nur in der Leber und in den Nieren möglich.

Die Ursache erhöhter Homocysteinserumspiegeln bei Patienten mit Nierenerkrankungen konnte noch nicht endgültig geklärt werden. Eine Ursache scheint der absolute oder relative Vitamin B6-, B12- und Folsäuremangel in dieser Gruppe zu sein. (Dennis, Robinson, 1996(a); Robinson et. al,1996b). Eine verminderte renale Exkretion als Ursache einer Hyperhomocysteinämie scheint eher von geringerer Bedeutung zu sein (Foreman et. al,1982).

Brosnan et al. gehen von einer entscheidenden Rolle der Niere im Homocysteinmetabolismus aus. Sie sehen die Ursache für eine Hyperhomocysteinämie eher im verminderten Metabolismus in der Niere und nicht, wie oft vermutet, in einer verminderten renalen Exkretion (Brosnan et al., 1995). Auch Van-Gouldner et al. haben entdeckt, dass bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz die Remethylierung von Homocystein zu Methionin um ca. 30% geringer ist als in der Kontrollgruppe (Van-Guldner et al., 1995).

3.7.2. Die genetisch bedingte Homocysteinurie

Eine extreme Hyperhomocysteinämie, wie sie bei der homozygoten Homocysteinurie vorkommt, geht mit einer verzögerten geistigen Entwicklung im Kindesalter (Oligophrenie), Linsenektopie, ausgeprägter Osteoporose, Skelettdeformitäten, Thrombembolien, arterieller Hypertonie und Leberverfettung einher (Herold, 2000).

Ursache dieses Krankheitsbildes ist ein Defekt der Cystathion- β -Synthase. Die fehlende oder verminderte Aktivität dieses Enzyms hat zur Folge, dass sich Homocystein im Körper anhäuft, nicht mehr in ausreichender Menge metabolisiert werden kann und schließlich über die Nieren mit dem Urin ausgeschieden wird. Dieser Enzymdefekt wird autosomal-rezessiv vererbt und kommt mit einer Prävalenz zwischen 1: 40 000 und 1: 332 000 in Europa vor (Kreutzig, 1994).

Klassischerweise kommt jedoch die heterozygote Homocysteinämie mit einer Prävalenz von 1% in der europäischen Bevölkerung vor. Sowohl ein heterozygoter Cystathion- β -Synthase-Defekt, aber auch ein Vitamin B₆, B₁₂- oder Folsäure-Mangel, verursachen moderate Hyperhomocysteinämien (Selhub, 1999). Meist wird dieses Krankheitsbild erst durch einen Methionin- Belastungstest diagnostiziert, da die Homocysteinblutspiegel normale Werte aufweisen. Die heterozygote Homocysteinurie gilt als eine der häufigsten Ursachen für frühzeitige Atherosklerose und Thrombose.

3.7.3. Die Rolle des Homocysteins in der Atherogenese und Thrombogenese

Erhöhte Homocysteinplasmaspiegel gelten heute als unabhängige Risikofaktoren bei der Entstehung der Atherosklerose (Welch et al., 1998 und Nygard et al., 1995). Ein erhöhter Homocysteinspiegel ist an der Entstehung folgender vaskuläre Erkrankungen beteiligt:

- ? Koronare Herzkrankheit (Glueck et al., 1995)
- ? peripher arterielle Verschlusskrankheit (Mölgaard et al., 1992)
- ? Phlebothrombosen (Falcon et al. 1994)

- ? Arterielle Hypertonie (Sutton- Tyrell,1997 und Fiorina, 1998).
- ? kraniale Verschlusskrankheit

Die pathologischen Mechanismen, mit welchen Homocystein eine Atherosklerose induziert, werden noch diskutiert. Folgende Mechanismen scheinen eine Rolle zu spielen:

1. Homocystein reagiert chemisch mit den Intimazellen der Gefäßwand. Es kommt zu einer Aktivierung der ERK2, was wiederum zu einer Proliferation der glatten Muskelzellen in den Gefäßwänden führt (Brown, 1998).
2. Des weiteren kann Homocystein die Oxidation der Low- Density- Lipoproteine (LDL) beschleunigen. Dies führt zu einer Aufnahme dieser in Makrophagen, die sich dann in Schaumzellen umwandeln und bei der Atheroskleroseentstehung eine Rolle spielen (Heinecke et al., 1987).
3. Homocystein nimmt auf vielfache Weise Einfluss auf das Gerinnungssystem. So stimuliert Homocystein die Synthese des Vasokonstriktors und gerinnungsfördernden Mediators Thromboxan A₂ (Graeber, 1982). Außerdem blockiert Homocystein den Plasminogen- bindenden Rezeptor des Annexin II und verhindert damit dessen thrombolytischen Effekt und fördert so die Thrombogenese (Hajjar, 1998).
4. Homocystein hemmt die Funktion von Thrombomodulin, ein antikoagulatorisches Glykoprotein der Endotheloberfläche, welches als Kofaktor für die Aktivierung von Protein C aus Thrombin zuständig ist (Lentz, 1991).

Von besonderem Interesse für diese Arbeit sind die oxidativen Effekte, die für Homocystein nachgewiesen wurden. In einem Autoxidationsprozess entsteht aus Homocystein in Anwesenheit von Kupfer oder Caeruloplasmin Hydrogen- Peroxid,

welches Endothelzellen schädigt (Starkebaum, 1993). Weiter werden durch Homocystein Superoxidradikale angehäuft, die die Relaxation von Gefäßen hemmt (Emsley, 1999). Außer der Anhäufung von Peroxiden und Superoxid- Radikalen konnte gezeigt werden, dass Homocystein intrazelluläre antioxidative Enzyme einschließlich der Glutathion- peroxidase (GPX) hemmt und damit die Fähigkeit der Zelle, oxidative Radikale zu neutralisieren, vermindert (Upchurch, 1997). Intrazelluläres Glutathion, ein wirksames endogenes Antioxidans, wird durch Homocystein signifikant vermindert (Hultberg, 1997).

3.7.4. Therapie der Hyperhomocysteinämie

Ziel der Behandlung einer Hyperhomocysteinämie ist die Entstehung kardiovaskulärer Komplikationen zu verhindern oder zumindest zu verringern. Petersen et al. konnte zeigen, dass die Behandlung der Hyperhomocysteinämie durch Vitamine zur Verkleinerung atherosklerotischer Plaques führt (Petersen et al., 1998)

Die homozygote Form der Hyperhomocysteinämie mit Cytathion- β -Synthase- Mangel wird durch eine Methioninrestriktion und durch Gabe von Vitamin B6, B12, Folsäure und Betain behandelt (Bostom, 1997).

Bei Patienten mit moderater Homocysteinerhöhung und normaler Nierenfunktion ist noch keine einheitliche Therapieempfehlung in der Literatur zu finden. Das folgende Dosierungsschema geht auf Resch et al. (Resch et al., 1996) zurück.

Vitamin B6:	Prophylaxe 1.0 – 6.0mg/d Therapie: 6.0- 20mg/d
Vitamin B 12:	Prophylaxe 25 – 150 μ g/d Therapie 150 – 500 μ g/d Dauertherapie 1mg/Monat
Folsäure:	Prophylaxe: 80-500 μ g/d Therapie: 0.5 – 5.0mg/d

Bei Patienten mit Nierenerkrankungen reicht diese Therapie wohl nicht aus. Touam et al. (Touam et al., 1999) konnten in einer dialysepflichtigen Patientengruppe erst durch einwöchige Gabe von 50 mg Folsäure und 250mg Vitamin B6 3x/Woche die Homocysteinspiegel bei 78% der Patienten auf Normalwerte senken.

3.7.5. Homocystein bei Nierenerkrankungen

In den letzten Jahren haben sich zahlreiche Wissenschaftler mit der Untersuchung von Homocystein bei Patienten mit Nierenerkrankungen befasst. Tamura et al. (Tamura et al., 1998) zum Beispiel fanden bei 42 von 48 Patienten, die sich einer kontinuierlichen Hämodialyse unterziehen mussten, eine Hyperhomocysteinämie. 70% ihrer Patienten wiesen einen unzureichenden Folat- und/oder Vitamin B6-Spiegel im Plasma auf. Man fand eine signifikant negative Korrelation zwischen dem Homocystein- und Folatspiegel. Keine Korrelation wurde zwischen dem Homocystein und dem Vitamin B6-Spiegel gefunden. Hong et al. bestätigten diese Ergebnisse. Sie fanden zusätzlich eine negative Korrelation von Hcy und Vitamin B12 (Hong et al., 1998). Auch Moustapha et al. zeigen eine negative Korrelation zwischen tHcy und Folsäure, Vitamin B12 und Vitamin B6 für hämodialysierte-, aber keine solche Korrelationen für peritonealdialysierte Patienten. Die Ursache sehen sie in einem Verlust der Vitamine und der Folsäure über die Dialysemembran. Der Mangel hemmt dann im weiteren den Homocysteinmetabolismus. (Moustapha et al., 1999).

Auch bei Diabetikern konnte durch Wollensen et al. eine negative Korrelation zwischen tHcy und Folsäure nachgewiesen werden. Sie zeigten außerdem, dass die tHcy-Konzentration bei Diabetikern niedriger ist als bei Nicht-Diabetikern. Die Ursache sehen sie in einer glomerulären Hyperfiltration (Wollensen et al., 1999). Agullò-Ortuno et al. hingegen beobachteten bei Diabetikern eine höhere Homocystein-Konzentration als bei ihren gesunden Kontrollgruppen (Agullò-Ortuno et al., 2002).

Oshi et al. fanden bei 87% ihrer hämodialysierten Diabetikern eine pathologisch erhöhte Homocystein-Konzentration im Serum, die jedoch immer noch signifikant niedriger lag als die Vergleichsgruppe von hämodialysierten Nicht-Diabetikern (Oshi et al., 2000).

Parsons et al. teilten ihre Patienten in fünf Gruppen anhand ihrer GFR auf. Alle Gruppen zeigten eine signifikant höhere Homocystein-Konzentration im Plasma als die gesunde Kontrollgruppe. Man fand einen zunehmenden Anstieg des Homocysteins mit Abnahme der Nierenfunktion, aber keine signifikanten Veränderungen des Folats oder des Vitamin B12 innerhalb der 5 Gruppen. Signifikante Korrelationen fanden sich mit der GFR, Kreatinin, Folsäure, C-reaktivem Protein und eine grenzwertige Korrelation mit Vitamin B12 (Parsons et al., 2002).

Henning et al. stellten bei ihren Hämodialyse- Patienten einen höheren Homocysteinspiegel fest, als bei einer Vergleichsgruppe mit einer GFR zwischen 10 und 30 ml/min (Henning et al., 2000).

Mieczyslaw et al. untersuchten ebenfalls hämodialysierte Patienten und Patienten mit chronischer Niereinsuffizienz, die sie anhand ihrer GFR in 2 Gruppen einteilten. Die Hämodialysegruppe wies auch hier die höchsten Konzentrationen auf. In allen Gruppen lag der Median der Homocystein- konzentration über dem Median der gesunden Kontrolle. Die Vitamin B12- und Folsäure Spiegel lagen in allen Gruppen innerhalb des physiologischen Bereichs, ohne Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Nur die Folsäurespiegel lagen für die Hämodialyse Patienten und die Patienten mit einer GFR von 10-20 ml/min signifikant höher als die der Kontrollgruppe. Signifikante Korrelationen konnten zwischen Homocystein und der GFR gezeigt werden, nicht aber zwischen Homocystein und Folsäure oder Vitamin B12 (Mieczyslaw et al., 2001).

3.8. Fragestellung

In mehreren Studien wurden bereits atherogene Risikofaktoren und antioxidative Marker bei dialysierten und nicht-dialysierten chronisch niereninsuffizienten Patienten untersucht. Diabetiker waren in diesen Studien allerdings meist ausgeschlossen. Bislang hat sich noch keine Studie damit befasst, die Risikofaktoren in verschiedenen Stadien der diabetischen Nephropathie zu dokumentieren.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten im Rahmen einer Querschnittsuntersuchung ambulante Patienten mit nachgewiesener diabetischer Nephropathie in verschiedenen Stadien der chronischen Niereninsuffizienz auf das Vorliegen diverser nicht-traditioneller vaskulärer Risikofaktoren untersucht werden. Im spezifischen wurde dabei folgenden Fragestellungen nachgegangen:

- In welchen Stadien der Nierenerkrankung lassen sich laborchemisch Zeichen einer chronischen Inflammation nachweisen?
- In welchen Stadien finden sich hinweise auf gesteigerten oxidativen Stress?
- In welchen Stadien ist eine Hyperhomocysteinämie nachweisbar?

- Gibt es Hinweise für einen Zusammenhang zwischen chronischer Inflammation, oxidativem Stress und einer Hyperhomocysteinämie?

4. Patienten, Materialgewinnung und Methoden

4.1. Patienten

4.1.1. Auswahl und Ausschlusskriterien

Insgesamt nahmen 110 Patienten, 46 Frauen und 64 Männer, an dieser Untersuchung teil. Der jüngste Teilnehmer war 31 Jahre, der älteste 87 Jahre alt. Der Mittelwert liegt bei 63, 6 Jahren. Im Zeitraum von Juni 2001 bis Dezember 2001 waren sie zur ambulanten Behandlung in der nephrologischen Abteilung der Universitätsklinik des Saarlandes.

Vorraussetzung für die Aufnahme in diese Studie war eine Nierenfunktionseinschränkung durch einer diabetische Nephropathie.

Ausschlusskriterien waren:

- ? Immunsuppressive Therapie
- ? akute Infektion
- ? Schwangerschaft
- ? Tumorerkrankung

4.1.2. Gruppeneinteilung

Die Patienten wurden entsprechend ihrer glomerulären Filtrationsrate in fünf Gruppen eingeteilt. Die epidemiologischen Daten der Gruppen sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

In Gruppe 1 wurden die hämodialysierten Patienten zusammengefasst. Die Hämodialyse ist ein extrakorporales Blutreinigungsverfahren. Über eine semipermeable Membran wird das Blut des Patienten mit einer Dialysatflüssigkeit im

Gegenstrom in Berührung gebracht. Entlang eines Konzentrationsgefälles werden harnpflichtige Substanzen und entlang eines osmotischen Druckgefälles, Wasser entzogen. Die Hämodialyse erfolgte 3 x wöchentlich für jeweils 3 bis 4 Stunden im Dialysezentrum der Nephrologischen Klinik der Universitätskliniken des Saarlandes. Zur Dialyse wurde die Geräte 4008B und 2008E (Fresenius, Bad Homburg, Deutschland) sowie AK 100 (Gambro, Planegg, Deutschland) verwendet.

In Gruppe 2 wurden Patienten aufgenommen, die eine Restnierenfunktion von weniger als 20 ml/min haben und nicht dialysiert werden. In Gruppe 3 wurden nicht dialysierten Patienten, mit einer GFR von 20-50 ml/min eingeschlossen. Bei einer GFR von 50- 80 ml/min wurde der nicht dialysierte Patient Gruppe 4 zugeordnet. Bei einer GFR von über 80ml/min wurden die Patienten der Gruppe 5 angeschlossen.

	<u>Anzahl</u>	<u>Alter</u> (mean ; range)	<u>Geschlecht</u> (M/F)
<u>Gruppe 1</u>	21	68 (45-87)	10/11
<u>Gruppe 2</u>	16	68 (56-80)	9/7
<u>Gruppe 3</u>	23	66 (45-87)	14/9
<u>Gruppe 4</u>	23	64 (41-77)	16/7
<u>Gruppe 5</u>	9	59 (41-72)	4/5

Table 2: epidemiologische Daten

4.1.3. Berechnung der glomerulären Filtrationsrate

Die glomeruläre Filtrationsrate der Patienten wurde bestimmte durch folgende, von LEVY (1999) aufgestellte Formel berechnet:

$$270 \times (\text{S-Krea})^{-1,007} \times (\text{Alter [J]})^{-0,180} \times (\text{SUN}^*)^{-0,169} \times (0,755 \text{ bei weiblichem Patient})$$

*SUN = Serumharnstoff (mg/ dl) / 2,14

Für die hämodialysierten Patienten wurde keine GFR berechnet.

4.2. Materialgewinnung

Den Patienten wurde am Morgen ihrer ambulanten Behandlung, im nüchternen Zustand, nach Venenpunktion Vollblut entnommen (Sarstedt Monovettensystem). Bei Patienten, die zur Hämodialyse kamen, wurde das Blut unmittelbar vor Beginn der Dialyse entnommen. Nach Abnahme wurden die Proben sofort auf Eis gelagert und innerhalb von 45 Minuten in einer gekühlten Zentrifuge (Hettich, Rotanda RPC, Lorch) des Labors der nephrologischen Klinik zentrifugiert.

Das Serum für die Bestimmung des Malondialdehyds wurde bei 3500 U/min 5 Minuten kühl (4°C) zentrifugiert. Aliquots zu 0.3 ml Plasma wurden in 1.5 ml Eppendorfgefäße (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) abgefüllt, beschriftet und bei -20 °C eingefroren.

Die GSH-Konzentration wurde in den Leukozyten gemessen. Dazu wurden auf jeweils 3 ml Histopaque 1119 und 1077 (Sigma-Aldrich, Nr. 1119) 3 ml Citratvollblut geschichtet und bei 2500 U/min 40 Minuten lang zentrifugiert. Die so isolierten Granulozyten, mononukleären Zellen und Thrombozyten wurden drei Mal mit kalter PBS/EDTA- Lösung gewaschen. Eine anschließende Zellzählung in der Neubauer-Kammer dient der späteren Umrechnung des gemessenen GSH- Gehalts auf die Zellzahl.

Das Pellet wurde in 500 µl Zitronensäurepuffer pH 6,95 aufgenommen. Der Puffer hält das System stabil, und schafft ein saures Milieu, das für die spätere enzymatische Reaktion mit NADPH+H Voraussetzung ist.

Die Proben wurden zwei Mal bei -70°C eingefroren und aufgetaut, um die Zellen zu knacken. Die Zellsuspension wurde dann mit dem Dispensiergerät homogenisiert und zentrifugiert. Alle Proben wurden vor Ablauf von 6 Monaten, im Zeitraum von August 2001 bis April 2002, analysiert. Alle einmal aufgetauten Proben wurden am selben Tag gemessen, um zu verhindern, dass die Messergebnisse durch wiederholtes Auftauen und Einfrieren verfälscht werden.

Die Vollblutproben zur Bestimmung des Kreatinin, Harnstoff, $\text{HbA}_{1\text{c}}$, Protein, Albumin, CRPus, Homocystein, totalem antioxidativen Status, Vitamin A, B6, B12, E, und Folsäure wurden gekühlt innerhalb von 30 Minuten nach Entnahme, an das Zentrallabor übergeben. Die Messungen wurden im Zeitraum von Juni 2001 bis Februar 2002 mit den täglich anfallenden Proben der Universitätsklinik Homburg, bestimmt. Die Qualitätskontrollen unterliegen denen der Bundesärztekammer für quantitative Bestimmungen in Laboratorien und können als solche im Zentrallabor eingesehen werden.

CRPus und der totale antioxidative Status wurden, außerhalb der Routine, in den Forschungslabors des Zentrallabors der Universitätskliniken Homburg, bestimmt.

4.3. Labormethoden

4.3.1. Kreatinin

Die Konzentration von Kreatinin im Serum wurden im Zentrallabor der Universitätskliniken standardisiert bestimmt. Kreatinin wird nach der Methode von Jaffè unter Berücksichtigung des Probenleerwertes bestimmt. Die Methode nach Jaffe ist eine kinetische Messung ohne Enteiweisung. Der Referenzbereich liegt bei 0,5-0,9 mg/dl für Frauen und bei 0,7-1,2 mg/dl für Männer (Verfahrensliste des klinisch-chemischen Zentrallabors der Universitätskliniken des Saarlandes). Die Bestimmung erfolgte standardisiert im Zentrallabor der Universitätskliniken.

4.3.2. Harnstoff

Die Harnstoff-Konzentration wurde durch den enzymatischen UV-Test bestimmt, der ebenfalls eine kinetische Messung erlaubt. Der Referenzbereich liegt bei 10-50 mg/dl (Verfahrensliste des klinisch-chemischen Zentrallabors der Universitätskliniken des Saarlandes). Die Bestimmung erfolgte standardisiert im Zentrallabor der Universitätskliniken.

4.3.3. HbA_{1c}

Die Konzentration an HbA_{1c} wurde im EDTA-Blut mittels HPLC standardisiert im Zentrallabor der Universitätskliniken bestimmt. Der Referenzbereich liegt bei 4,3-5,8% (Verfahrensliste des klinisch-chemischen Zentrallabors der Universitätskliniken des Saarlandes).

4.3.4. Protein und Albumin

Das Gesamteiweiß und Albumin im Plasma wurde im Zentrallabor der Universitätskliniken des Saarlandes standardisiert bestimmt.

Die Bestimmung des Gesamteiweißes erfolgte nach der Biuret- Methode mit Probenleerwert. Eine Konzentration von unter 66 g/l und über 87 g/l gilt als pathologisch (Verfahrensliste des klinisch-chemischen Zentrallabors der Universitätskliniken des Saarlandes). Die Bestimmung der Albuminkonzentration erfolgte nach der Bromescolgrün- Methode plus. Der Referenzbereich liegt zwischen 34-48 g/l (Verfahrensliste des klinisch-chemischen Zentrallabors der Universitätskliniken des Saarlandes).

4.3.5. Malondialdehyd

Die Bestimmung erfolgte nach einer modifizierten Methode nach Nourooz-Zadeh (Nourooz-Zadeh et al., 1995).

Das Prinzip beruht auf der Umsetzung von z.B. 1 Mol MDA mit 2 Mol TBA zu einem rosa Pigment mit einem Absorptionsmaximum bei 532-535 nm. Die Reaktion verläuft unter Energiezufuhr (90-100 Grad C).

MDA- Messung

Jeweils 100µl des wie oben beschrieben gewonnen und behandelten Plasmas wurden mit 650µl 2-Thiobarbitursäure (Sigma-Aldrich, T-5500; $C_4H_4N_2O_2S$ FW144.1) und 500µl 2% Phosphorsäure gemischt.

Die Thiobarbitursäure reagiert mit Malondialdehyd unter Energiezufuhr zu einem rosa Farbkomplex. 0,67g wurden mit 100ml Aqua destillata unter Rühren und Erwärmen, an jedem Tag einer Messung, frisch angesetzt.

Die Phosphorsäuremethode ist eine Modifikation der MDA-Reaktion zur zusätzlichen Erfassung proteingebundener TBARS, da unter diesen Bedingungen diese Bindungen partiell reversibel erscheinen.

Nach 20 Minuten im Wasserbad bei 100°C und anschließendem Abkühlen wurde der entstandene Farbstoff durch Zugabe von 2ml n-Butanol (Roth, Art.Nr.7171.1, $C_4H_{10}O$), kräftigem Schütteln und 20 minütigem Zentrifugieren bei 3500 U/min in den Überstand gebracht. Auf diese Weise wird der Tyndall-Effekt vermieden. Dabei kommt es im Photometer durch das in der Probe vorhandene Eiweiß zu Lichtstreuungen, die dann zu Verfälschungen der Werte führen.

Der farbige Überstand wird in eine Küvette (Saarstedt, Nr.67.746) pipettiert und die Extinktion bei 532nm im Photometer gemessen.

MDA- Standard

Eine Standardreihe für MDA wurde mit 1,1,3,3-Tetramethoxy-Propane (Sigma T-1642 $C_7H_{16}O_4$ FW 164.2 $d=0.997g/ml$) und 1% Schwefelsäure angesetzt, zwei

Stunden zur Hydrolyse stehen gelassen und in Doppelbestimmung mit den Proben gemessen. Durch Anlegen einer linearen Regressionsanalyse konnte so die TBA-Konzentration in den Proben bestimmt werden.

4.3.6. Glutathion in den Leukozyten

Die Bestimmung des zellulären Gehalts an Glutathion in Granulozyten und mononukleären Zellen erfolgte nach einer modifizierten Methode nach Tietze (Tietze et al., 1969).

Das Testprinzip beruht auf der zunächst nicht-enzymatischen Oxidation von zwei Molekülen GSH zu einem Molekül GSSG durch Reaktion mit DTNB (5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoat)), wobei zwei Moleküle TNB (2-nitro-5-thiobenzoat) entstehen. Die Glutathionreductase (GR) wandelt nun unter Reduktion von NADPH+H das GSSG wieder zu GSH um:



Für diese Reaktion braucht man ein saures Milieu, in dem freie Protonen ungebunden vorliegen. Das fortlaufende Entstehen von TNB, das im genauen Verhältnis zum GSH- Gehalt steht, kann photometrisch bei 412nm gemessen und mit Hilfe einer Kalibrationskurve die Glutathionkonzentration errechnet werden.

Bei dieser GSH- Bestimmung wird nun eigentlich der Gesamtgehalt an GSH und dem in den Zellen bereits vorhandenen vorhandenen GSSG gemessen. Dieser ist im allgemeinen bei nicht gestressten Zellen sehr gering. GSSG und GSH liegen im Verhältnis 1:500 vor, so dass in der Literatur häufig die Begriffe GSH und „total glutathione“ gleichgesetzt werden.

Zunächst müssen vier Lösungen hergestellt werden:

(= Elmanns Reagenz)

Lösung 1: 0,3 mmol/l NADPH-Lösung (β -Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate reduced Form; Sigma-Aldrich, Nr. 1630) in Citronensäurepuffer pH 6,95.

Lösung 2: 6 mmol/l DTNB-Lösung (5'5 Dithiobis(2-nitrobenzoic acid); Sigma- Aldrich, Nr. D 21,820-0) in Citronensäurepuffer pH 6,95.

Lösung 1, Lösung 2 und Aqua dest. wurden im Verhältnis 7:1:1 vorpipettiert (= Messlösung) und für die Dauer des Versuchs lichtgeschützt bei 4°C gelagert.

Lösung 3: 100 U/ml Glutathionreductase (Typ III, Bakers Yeast; Sigma-Aldrich, Nr. G-4751) in Citronensäurepuffer pH 6,95 und für die Dauer des Versuch bei 4°C gelagert.

Lösung 4: Natriumcitratpuffer mit EDTA aus 0,2 M Na-Phosphatpuffer mit 6,3mM EDTA + 0,1 M Citronensäure + Aqua dest. Mit 1N NaOH wurde der pH auf 6,95 eingestellt.

Lösung 1 und 4 konnten bei 4°C gelagert werden und waren über zwei Wochen stabil. Lösung 2 und 3 wurden täglich frisch angesetzt.

GSH-Messung

Wie bereits oben beschrieben wurde die Zellensuspension vor der Messung zwei Mal bei

-70°C eingefroren und aufgetaut, dann mit dem Dispensiergerät homogenisiert. Auf diese Weise wurden die Zellen geknackt und das GSH aus den Leukozyten freigesetzt. Die Suspension wurde zentrifugiert. Zur Messung der Konzentration wurde zunächst pro Küvette (Saarstedt, Nr. 67.746) 900 μ l Messlösung 5 min lang auf 30°C vortemperiert, dann 100 μ l Probe dazugegeben und erneut 5 min temperiert. Mit Zugabe der Glutathionreduktase wurde die Uhr sofort gestartet und die Lösung gut gemischt. Die Änderung der Extinktion wurde nach 2 und 5 min gemessen.

Während der ersten 2 Minuten wird das GSH zu GSSG oxidiert. Erst danach beginnt die Entstehung von TNB im Verhältnis zur ursprünglichen GSH Konzentration. Es wurde für jede Probe eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Standard

Für die Erstellung der Kalibrationskurve wurde eine GSH- Standard-Lösung (L-Glutathion red. Form 98%, Aldrich G470-5) von 20mmol/l-Lösung in Aqua dest. täglich frisch hergestellt und dann auf eine 1 mmol/l –Lösung weiterverdünnt. Dieser GSH- Standard wurde mit Citratpuffer pH 6,95 auf Konzentrationen von 2-0,5nmol/ml verdünnt. Außerdem wurde ein Nullwert mit Aqua dest. angelegt. Diese Lösungen wurden in 900µl Messlösung , die bereits 5 Minuten auf 30°C vortemperierte war, erneut 5 Minuten temperiert. Die Reaktion wurde dann durch die Glutathionreductase gestartet, die Extinktion wiederum nach 2 und 5 Minuten abgelesen.

Die Differenz der Extinktionsänderung wurde durch die Zeit geteilt (dA/dt ; t in min). In einem Koordinatensystem wurde auf der X- Koordinate die jeweilige Standard-Konzentration in nmol /ml angegeben und auf der Y- Achse die entsprechende dA/dt . Durch diese Werte wurde mit linearer Regression eine Gerade gelegt. An dieser konnte man die GSH- Konzentration der Proben ablesen.

4.3.7. C- reaktives Protein

C-reaktives Protein ultrasensitiv wurde im Serum über ein Komplettkitt der Firma Roche (Best.-Nr. 1972855) bestimmt. Das Prinzip beruht auf einem immunologischen Agglutinationstest mit Reaktionsverstärkung durch Latex und turbidimetrischer Messung. Als pathologisch gilt jede Konzentration über 5 mg/l. Der Test wurde im Zentrallabor der Universitätskliniken des Saarlandes durchgeführt.

4.3.8. Homocystein

Homocystein wurde im EDTA-Plasma mittels HPLC (Agilent, 1100, Waldbronn) routinemäßig im Zentrallabor der Universitätskliniken des Saarlandes gemessen. Pathologische Werte liegen über 12 µmol/l. (Verfahrensliste des klinisch-chemischen Zentrallabors der Universitätskliniken des Saarlandes).

4.3.9. Totales antioxidatives System

Das TAS wurde nach einem Kit der Firma Randox (Kat. Nr. NX2332 5x 40 t) im Serum bestimmt. Der Referenzbereich liegt bei 1,3-1,77 mmol/l. Die Bestimmung erfolgte im Zentrallabor der Universitätskliniken des Saarlandes.

4.3.10. Vitamin A, B6, B12 und E

Die Konzentrationen der Vitamin A, B6 und E wurden mittels HPLC (Agilent, 1100, Waldbronn) routinemäßig im Zentrallabor der Universitätskliniken des Saarlandes gemessen. Der Referenzbereich liegt für Vitamin A bei 31,6-88 µg/dl, für Vitamin B6 bei 4,8-36,9 ng/ml und für Vitamin E bei 680-1840 µg/dl (Verfahrensliste des klinisch-chemischen Zentrallabors der Universitätskliniken des Saarlandes).

Die Bestimmung der Vitamin B12-Konzentration erfolgte durch den kompetitiven chemilumineszens Liganden- Immunoassay (chLIA komp.). Der Referenzbereich liegt bei 211-911 pg/ml (Verfahrensliste des klinisch-chemischen Zentrallabors der Universitätskliniken des Saarlandes). Die Bestimmungen wurden routinemässig im Zentrallabor der Universitätskliniken des Saarlandes durchgeführt.

4.3.11. Folsäure

Die Bestimmung der Folsäure-Konzentration erfolgte durch kompetitiven chemilumineszens Liganden- Immunoassay (chLIA komp.). Die Bestimmung erfolgte

routinemäßig im Zentrallabor der Universitätsklinik des Saarlandes. Der Referenzbereich liegt bei 2,6-14,6 ng/ml (Verfahrensliste des klinisch-chemischen Zentrallabors der Universitätskliniken des Saarlandes).

5. Statistische Methoden

Die Analyse der Daten wurde mit Hilfe der Statistical Software for Social Science (SPSS) 9.0 durchgeführt. Die Berechnung der Malondialdehyd- und GSH-Konzentrationen wurde mit Hilfe des Programms Prism 3.0 berechnet.

Die deskriptive Analyse erfolgte in Form von Boxplots. Die fettgedruckte Linie zeigt den Median. Die obere Grenze der Box entspricht dem 75% Perzentil, die untere Grenze dem 25% Perzentil, wenn es keine Ausreißer gibt. Finden sich Ausreißer entsprechen die Boxgrenzen der höchsten bzw. niedrigsten Nicht-Ausreißer Konzentration.

Der Kruskal-Wallis-Test wurde durchgeführt, um mehrere unverbundene Stichproben auf einen signifikanten Konzentrationsunterschied zwischen den Diagnosegruppen zu untersuchen. Zur Testung zweier unverbundener Diagnosegruppe untereinander wurde der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt.

Ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,05$ wurde ein statistisch signifikanter Unterschied in der Konzentration angenommen. Das Vorliegen eines solchen Konzentrationsunterschieds wurde durch „*“, markiert.

Ab $p = 0,01$ wurde der Konzentrationsunterschied als hoch signifikant angesehen und ist gekennzeichnet durch „**“.

Statistisch höchst signifikant wird $p = 0,001$ gewertet und ist markiert durch „***“.

Nicht signifikant (n. s.) sind Werte von $p > 0,05$.

Die Korrelationen wurden mit Hilfe des Spearman-Rho-Tests zweiseitig durchgeführt. Ein Korrelations-Niveau von $p = 0,05$ wird dabei als statistisch signifikant angesehen. Je näher der Korrelationskoeffizient (r) bei 1,0 liegt, um so stärker ist die Korrelation. Ein Korrelationsniveau von $p =$ kleiner 0,01 gilt als hoch signifikant und $p = 0,001$ als höchst signifikant.

6. ERGEBNISSE

	1 Hämodialy- sierte (n=21)	2 GFR < 20 ml/min (n=16)	3 GFR 20-50 ml/min (n=23)	4 GFR 50-80 ml/min (n=23)	5 GFR >80 ml/min (n=9)
<u>Alter, Jahre</u> mean +/-SD range	68 +/- 9,6 45-87	68 +/- 7,2 56-80	66 +/- 8,6 45-87	64 +/- 7,7 41-77	59 +/- 11 41-72
<u>Geschlecht</u> (M/F)	(10/11)	(9/7)	(14/9)	(16/7)	(4/5)
<u>GFR*</u> (ml/min) mean+/- SD	/	13 +/- 2,7	32 +/- 9,2	61 +/- 7,9	91 +/- 8,2
<u>Kreatinin</u> (mg/dl) n:0,7-1,2	8,1 (4,3/13)	4,5* (3,0/6,2)	2,1* (1,4/2,8)	1,1* (0,8/1,5)	0,8 (0,7/0,9)
<u>Harnstoff</u> (mg/dl) n:10-50	150* (100/197)	133* (119/186)	74* (53/182)	40* (26/52)	39 (28/40)
<u>Protein</u> (g/l) n:66-87	70* (61/75)	74 (66/80)	75 (58/81)	74 (64/87)	75 (67/77)
<u>Albumin</u> (g/l) n:34-48	35* (28/38)	37 (33/42)	38 (27/44)	40 (34/48)	41 (32/42) ¹

Tabelle 3: Laborchemische Parameter dialysierter und nicht-dialysierter Diabetiker

Daten angegeben als Median (25./75. Perzentil); außer anders angegeben
 *: signifikant an- oder abfallender Konzentrationsunterschied zu nächster Gruppe
 1: hier n=7

	1 Hämodialy- sierte (n=21)	2 GFR < 20 ml/min (n=16)	3 GFR 20-50 ml/min (n=23)	4 GFR 50-80 ml/min (n=23)	5 GFR > 80 ml/min (n=9)
<u>MDA</u> (nmol/ml)	0,30 (0,11/0,71)	0,33* (0,11/0,61)	0,21 (0,11/0,43)	0,25* (0,02/0,56)	0,39 (0,18/0,49)
<u>GSH</u> (nmol/ml)	0,99* (0,53/2,5)	0,70 (0,35/1,5)	0,93 (0,33/2,23)	1,13 (0,58/4,71)	1,56 (0,62/2,0)
<u>HbA1c</u> (%) n:4,3-5,8	6,2* (4,7/10)	7,7 (5,5/9,6)	7,2 (5,9/9,8) ²	7,3 (5,2/10)	7,3 (6,3/8,2)
<u>CRP_{us}</u> (mg/l) n:0,0-5,0	7,5* (1,1/106)	3,6 (0,5/13)	3,4 (0,6/45)	3 (0,7/19)	2,2 (0,6/4,8)
<u>TAS</u> (μmol/l) n:1,3-1,77	1,5 (1,2/1,8)	1,4* (1,3/1,6)	1,3 (1,1/1,5)	1,3 (1,2/1,5)	1,3 (1,2/1,4)
<u>Homocystein</u> (μmol/l) n:<12	22 (8,5/87)	22 (14/37)	20*** (11/41)	11* (7/34)	9 (6,3/11)
<u>Vitamin A</u> (μg/dl) n:31,6-88	107 (35/165)	99 (57/117)	98** (39/169)	63 (40/154)	54 (32/63)
<u>Vitamin B6</u> (ng/ml) n:4,8-36,9	7 (1,1/47)	8,5 (1,5/13)	11,4 (3,6/32)	9,7 (3/95)	12 (5,8/16)
<u>Vitamin B12</u> (pg/ml) n:211-911	462 (265/1554)	400 (236/558)	399 (196/177)	416 (266/1779)	526 (338/601)
<u>Vitamin E</u> (μg/dl) n:680-1840	1255,7 (673/1900)	1594,5 (911/2406)	1738,7 (673/3602)	1563,3 (949/4182)	1443 (500/1988)
<u>Folsäure</u> (ng/ml) n:2,4-14,6	7,4 (3,3/22)3	8,3 (5,3/13)	9,3 (4,4/19)	9,7 (5,9/36)	9,9 (6/14) ¹

Tabelle 4: Laborchemische Parameter dialysierter und nicht-dialysierter Diabetiker

Daten angegeben als Median (5./95. Perzentil); außer anders angegeben

*: signifikant an- oder absteigender Konzentrationsunterschied zu nächster Gruppe;

** : hoch signifikant an- oder absteigender Konzentrationsunterschied zu nächster Gruppe;

***: höchst signifikant an- oder absteigender Konzentrationsunterschied zu nächster Gruppe;

1:hier n=7 2:hier n=20 3: hier n=15

6.1 Malondialdehyd

6.1.1 Verlauf

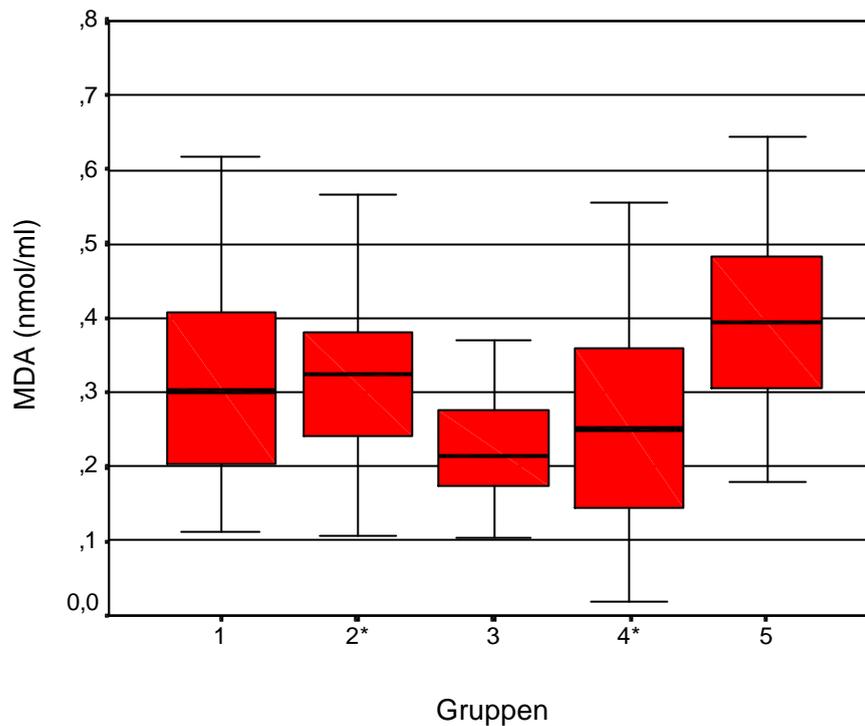


Abbildung 6: MDA

Gruppe 1: Hämodialysierte Gruppe 2: GFR <20ml/min
Gruppe 3: GFR 20-50ml/min Gruppe 4: GFR 50-80ml/min Gruppe 5: GFR >80ml/min

*: Statistisch signifikanter Konzentrationsunterschied ($p=0,5$) zu nächst höherer Gruppe

In Abbildung 6 ist der Median der MDA- Konzentrationen in verschiedenen Stadien der diabetischen Niereninsuffizienz als Boxplots dargestellt.

Die statistische Analyse mittels Kruskal- Wallis- und Mann- Whitney- U- Test weisen den niedrigsten Median für die Patienten mit einer GFR von 20-50ml/min (Gruppe 3) auf. Der höchste Median findet sich bei Patienten mit einer GFR von >80ml/min (Gruppe 5). Insgesamt zeigte sich keine einheitliche Tendenz. Bei den nicht-dialysierten Patienten (Gruppe 2-5) kommt es zu einem signifikanter Abfall des Medians von Gruppe 5 auf Gruppe 4. Fällt die GFR weiter auf Werte zwischen 50-

20ml/min (Gruppe 3) fällt auch der Median der MDA- Konzentration nicht signifikant, bevor sie erneut signifikant ansteigt, wenn die GFR auf <20ml/min (Gruppe 2) sinkt. Bei den hämodialysierten Diabetikern findet sich dann ein Median, der wiederum niedriger liegt als der Median der Gruppe 2.

6.1.2. Korrelationen

Die MDA- Konzentration wurde mit den anderen Markern korreliert. Die Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen zusammengefasst.

Alter	Sex	GFR	Hst	Krea	Alb	HbA _{1c}
Keine Korrelation* (r = -0,125 p = 0,591)	Korrelation (r = -0,583 p < 0,01)	/	Keine Korrelation* (r = -0,219 p = 0,354)	Keine Korrelation* (r = 0,117 p = 0,613)	Keine Korrelation* (r = 0,018 p = 0,938)	Keine Korrelation* (r = -0,122 p = 0,599)
CRP _{us}	TAS	Vit A	Vit E	HCY	GSH	
Keine Korrelation* (r = 0,113 p = 0,626)	Keine Korrelation* (r = 0,036 p = 0,875)	Keine Korrelation* (r = -0,245 p = 0,285)	Keine Korrelation* (r = -0,267 p = 0,242)		Keine Korrelation* (r = -0,166 p = 0,473)	

Tab. 5: Korrelationen der MDA- Konzentration hämodialysierter Patienten (Gruppe 1)
 r: Korrelationskoeffizient p: Signifikanzniveau /: entfällt
 *Keine Korrelation auf dem Niveau von 0,05 oder 0,01.

Alter	Sex	GFR	Hst	Krea	Alb	HbA_{1c}
Keine Korrelation* (r = -0,156 p = 0,194)	Keine Korrelation* (r = -0,213 p = 0,075)	Keine Korrelation* (r = 0,103 p = 0,398)	Keine Korrelation* (r = -0,090 p = 0,457)	Keine Korrelation* (r = -0,024 p = 0,842)	Keine Korrelation* (r = 0,211 p = 0,082)	Keine Korrelation* (r = -0,092 p = 0,461)
CRP_{us}	HCY	TAS	Vit A	Vit E	GSH	
Keine Korrelation* (r = -0,111 p = 0,364)	Korrelation (r = -0,243 p < 0,05)	Keine Korrelation* (r = 0,067 p = 0,580)	Keine Korrelation* (r = -0,225 p = 0,059)	Keine Korrelation* (r = -0,028 p = 0,814)	Keine Korrelation* (r = 0,042 p = 0,727)	

Tab. 6: Korrelationen der MDA- Konzentration nicht dialysierter Diabetiker (Gruppe 2-5)
r: Korrelationskoeffizient p: Signifikanzniveau /: entfällt
*Keine Korrelation auf dem Niveau von 0,05 oder 0,01.

6.2. HbA_{1c}

6.2.1. Verlauf

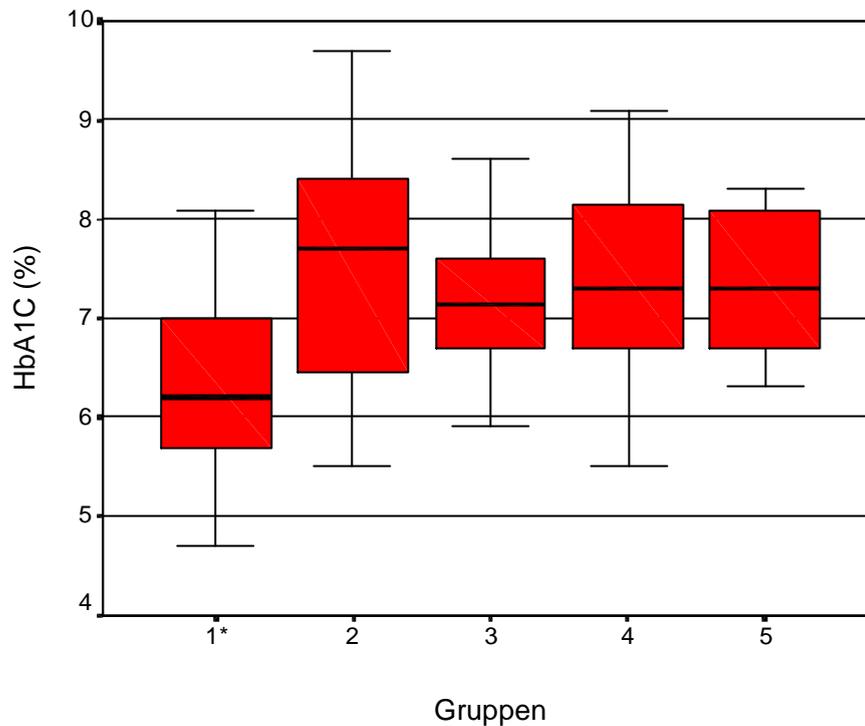


Abbildung 7: HbA_{1c}

Gruppe 1: Hämodialysierte Gruppe 2: GFR <20ml/min
Gruppe 3: GFR 20-50ml/min Gruppe 4: GFR 50-80ml/min Gruppe 5: GFR >80ml/min

*: Statistisch signifikanter Konzentrationsunterschied ($p = 0,5$) zu nächst höherer Gruppe

In Abbildung 7 sind die Verteilungen des Medians der HbA_{1c}- Konzentrationen in der verschiedenen Stadien der diabetischen Niereninsuffizienz als Boxplots dargestellt.

Alle Gruppen zeigen einen über dem Referenzwert von 5,8% liegenden Median. Die statistische Analyse mittels Kruskal- Wallis- und Mann- Whitney- U- Test weisen den höchsten HbA_{1c}- Median für Gruppe 2 (7,7%) aus, den niedrigsten für Gruppe 1 (6,2%).

Bei den nicht dialysierten Patienten (Gruppe 2-5) zeigt sich keine Tendenz zur Veränderung des HbA_{1c} in Abhängigkeit von der Nierenfunktionseinschränkung. Allen Gruppen zeigen einen annähernd gleichen Median. Erst bei der

hämodialysierten Gruppe kommt es im Vergleich zur Gruppe 2 zu einem signifikanten Abfall des HbA_{1c}- Medians.

6.2.2. Korrelationen

Die HbA_{1c}- Konzentration wurde mit anderen Markern korreliert. Die Ergebnisse wurden in folgenden Tabellen zusammengefasst.

Alter	Sex	GFR	Hst	Krea	Alb	
Keine Korrelation* (r = -0,020 p = 0,933)	Keine Korrelation* (r = 0,095 p = 0,683)	/	Keine Korrelation* (r = 0,124 p = 0,602)	Keine Korrelation* (r = -0,211 p = 0,358)	Keine Korrelation* (r = -0,067 p = 0,774)	
CRPus	HCY	TAS	Vit A	Vit E	MDA	GSH
Keine Korrelation* (r = -0,394 p = 0,077)	Keine Korrelation* (r = 0,287 p = 0,207)	Keine Korrelation* (r = 0,085 p = 0,)	Keine Korrelation* (r = -0,066 p = 0,777)	Keine Korrelation* (r = -0,177 p = 0,443)	Keine Korrelation* (r = -0,122 p = 0,599)	Keine Korrelation* (r = 0,206 p = 0,370)

Tab. 7: Korrelationen der HbA_{1c}-Konzentration hämodialysierter Diabetiker (Gruppe 1)
 r: Korrelationskoeffizient p: Signifikanzniveau /: entfällt
 *Keine Korrelation auf dem Niveau von 0,05 oder 0,01.

Alter	Sex	GFR	Hst	Krea	Alb	
Keine Korrelation* (r = 0,092 p = 0,460)	Keine Korrelation* (r = 0,172 p = 0,164)	Keine Korrelation* (r = -0,001 p = 0,996)	Keine Korrelation* (r = 0,038 p = 0,758)	Keine Korrelation* (r = -0,051 p = 0,682)	Keine Korrelation* (r = -0,117 p = 0,352)	
CRPus	Hcy	TAS	Vit A	Vit E	MDA	GSH
Keine Korrelation* (r = 0,128 p = 0,301)	Keine Korrelation* (r = -0,011 p = 0,930)	Keine Korrelation* (r = -0,049 p = 0,697)	Keine Korrelation* (r = -0,046 p = 0,709)	Keine Korrelation* (r = 0,236 p = 0,055)	Keine Korrelation* (r = -0,092 p = 0,461)	Keine Korrelation* (r = -0,036 p = 0,774)

Tab. 8: Korrelationen der HbA_{1c}-Konzentration nicht diatisierter Diabetiker (Gruppe 2-5)
r: Korrelationskoeffizient p: Signifikanzniveau
*:Keine Korrelation auf dem Niveau von 0,05 oder 0,01

6.3. Glutathion

6.3.1. Verlauf

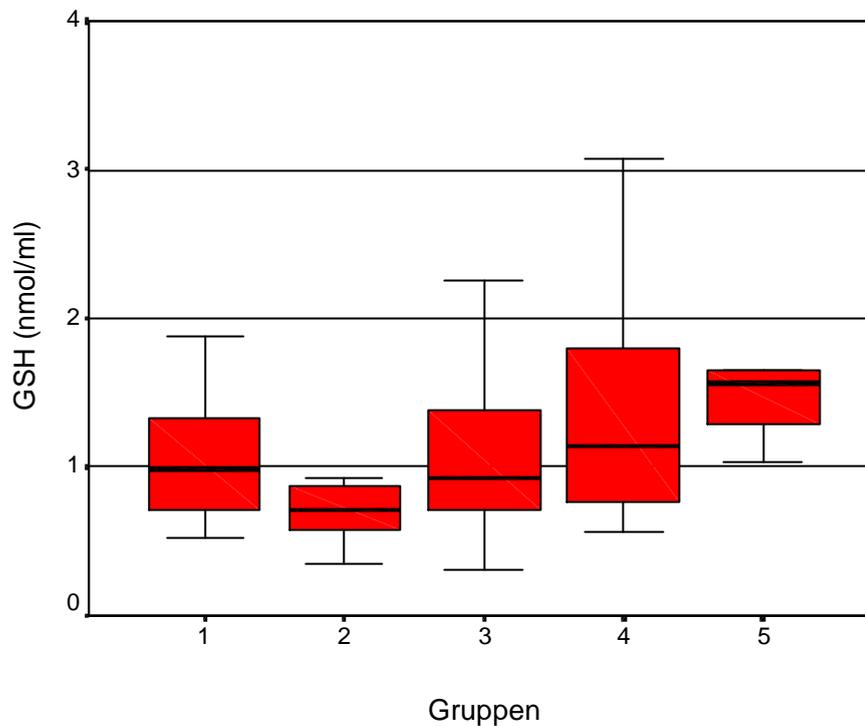


Abbildung 8: Glutathion in den Leukozyten

Gruppe 1: Hämodialysierte Gruppe 2: GFR <20ml/min
Gruppe 3: GFR 20-50ml/min Gruppe 4: GFR 50-80ml/min Gruppe 5: GFR >80ml/min

In Abbildung 8 sind die Verteilungen der medianen GSH- Konzentration in verschiedenen Stadien der diabetischen Niereninsuffizienz als Boxplots dargestellt.

Die statistische Analyse mittels Kruskal- Wallis- und Mann- Whitney- U- Test weisen den niedrigsten Median an Glutathion in den Leukozyten bei den Diabetikern mit einer GFR von <20 ml/min (Gruppe 2) auf, den höchsten die Gruppe 5. Bei den nicht dialysierten Diabetikern (Gruppe 2-5) zeigt sich tendenziell ein Abfall des GSH- Medians von einer Gruppe zur anderen, mit sinkender GFR. Keine dieser Änderungen ist statistisch signifikant sind. Bei den hämodialysierten Diabetikern kommt es dann zu einem erneuten, nicht signifikanten Anstieg des GSH- Medians.

6.3.2. Korrelationen

Die GSH- Konzentration wurde mit anderen Werten korreliert. Die Ergebnisse sind in folgenden Tabellen zusammengefasst.

Alter	Sex	GFR	Hst	Krea	Alb	HbA1c
Keine Korrelation* (r = 0,054 p = 0,816)	Keine Korrelation* (r = 0,016 p = 0,946)	/	Keine Korrelation* (r = 0,210 p = 0,375)	Korrelation (r = 0,553 p < 0,01)	Keine Korrelation* (r = -0,300 p = 0,187)	Keine Korrelation* (r = 0,207 p = 0,370)
CRPus	HCY	TAS	Vit A	Vit E	MDA	
Keine Korrelation* (r = 0,052 p = 0,823)	Keine Korrelation* (r = -0,066 p = 0,775)	Keine Korrelation* (r = 0,073 p = 0,754)	Keine Korrelation* (r = -0,108 p = 0,642)	Keine Korrelation* (r = 0,097 p = 0,674)	Keine Korrelation* (r = -0,166 p = 0,473)	

Tab. 9: Korrelationen der GSH- Konzentration in den Leukozyten hämodialysierter Patienten (Gruppe 1)
 r: Korrelationskoeffizient p: Signifikanzniveau /: entfällt
 *Keine Korrelation auf dem Niveau von 0,05 oder 0,01.

Alter	Sex	GFR	Hst	Krea	Alb	HbA _{1c}
Keine Korrelation* (r = -0,184 p = 0,125)	Keine Korrelation* (r = 0,079 p = 0,510)	Korrelation (r = 0,424 p < 0,001)	Korrelation (r = -0,439 p < 0,001)	Korrelation (r = 0,399 p = 0,001)	Korrelation (r = 0,334 p < 0,01)	Keine Korrelation* (r = -0,036 p = 0,774)
CRP _{us}	HCY	TAS	Vit A	Vit E	MDA	
Keine Korrelation* (r = -0,062 p = 0,612)	Korrelation (r = -0,241 p < 0,05)	Keine Korrelation* (r = -0,010 p = 0,933)	Korrelation (r = -0,416 p < 0,001)	Keine Korrelation* (r = -0,041 p = 0,737)	Keine Korrelation* (r = 0,042 p = 0,727)	

Tab. 10: Korrelationen der GSH- Konzentration in den Leukozyten nicht dialysierter Patienten (Gruppe 2-5)

r: Korrelationskoeffizient p: Signifikanzniveau
*Keine Korrelation auf dem Niveau von 0,05 oder 0,01.

6.4. Vitamin E

6.4.1. Verlauf

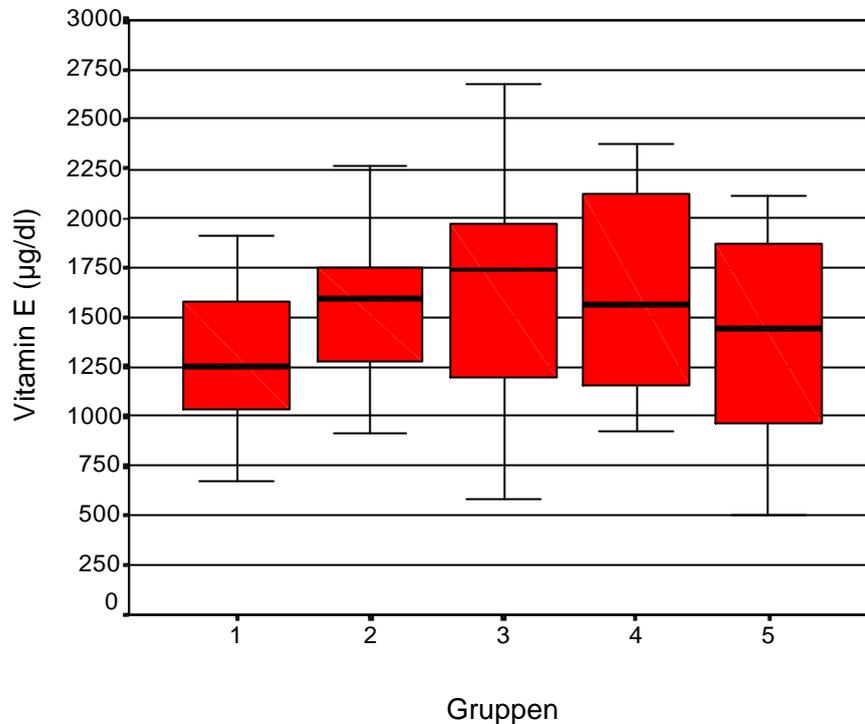


Abbildung 9: Vitamin E

Gruppe 1: Hämodialysierte Gruppe 2: GFR <20ml/min
Gruppe 3: GFR 20-50ml/min Gruppe 4: GFR 50-80ml/min Gruppe 5: GFR >80ml/min

In Abbildung 9 sind die Verteilungen der medianen Vitamin E- Konzentration in verschiedenen Stadien der diabetischen Niereninsuffizienz als Boxplots dargestellt.

Alle Gruppen liegen mit ihrem Median im Bereich der physiologischen Norm von 680-1840µg/dl. den niedrigsten Median für die Patienten mit einer GFR von 20-50ml/min (Gruppe 3)

Die statistische Analyse mittels Kruskal- Wallis- und Mann- Whitney- U- Test ergab den niedrigsten Vitamin E- Median bei den hämodialysierten Patienten, den höchsten bei Patienten mit einer GFR von 20-50ml/min (Gruppe 2). Bei den nicht- dialysieren Diabetikern gibt es zwischen den einzelnen Gruppen keine Unterschiede im Median

der Vitamin E- Konzentration im Serum. Erst bei den dialysierten Patienten kommt es zu einem nicht signifikanten Abfall der medianen Vitamin E- Konzentration.

6.4.2. Korrelationen

Die Vitamin E-Konzentration wurde mit anderen Werten korreliert. Die Ergebnisse sind in folgenden Tabellen zusammengefasst.

Alter	Sex	GFR	Hst	Krea	Alb	HbA1c
Korrelation (r = -0,511 p < 0,05)	Keine Korrelation* (r = 0,205 p = 0,373)	/	Keine Korrelation* (r = -0,111 p = 0,643)	Keine Korrelation* (r = 0,039 p = 0,867)	Keine Korrelation* (r = 0,232 p = 0,311)	Keine Korrelation* (r = -0,177 p = 0,443)
CRPus	HCY	TAS	Vit A	MDA	GSH	
Keine Korrelation* (r = -0,060 p = 0,797)	Keine Korrelation* (r = -0,388 p = 0,082)	Keine Korrelation* (r = -0,003 p = 0,989)	Korrelation (r = 0,712 p < 0,001)	Keine Korrelation* (r = 0,267 p = 0,242)	Keine Korrelation* (r = 0,097 p = 0,674)	

Tab. 11: Korrelationen der Vitamin E- Konzentration hämodialysierter Diabetiker (Gruppe 1)
 r: Korrelationskoeffizient p: Signifikanzniveau /: entfällt
 *Keine Korrelation auf dem Niveau von 0,05 oder 0,01.

Alter	Sex	GFR	Hst	Krea	Alb	HbA_{1c}
Keine Korrelation* (r = -0,003 p = 0,978)	Keine Korrelation* (r = 0,077 p = 0,521)	Keine Korrelation* (r = -0,040 p = 0,743)	Keine Korrelation* (r = 0,100 p = 0,407)	Keine Korrelation* (r = 0,009 p = 0,938)	Keine Korrelation* (r = 0,142 p = 0,244)	Keine Korrelation* (r = 0,236 p = 0,055)
CRP_{us}	HCY	TAS	Vit A	MDA	GSH	
Keine Korrelation* (r = 0,183 p = 0,132)	Keine Korrelation* (r = -0,022 p = 0,853)	Keine Korrelation* (r = 0,109 p = 0,367)	Korrelation (r = 0,305 p < 0,01)	Keine Korrelation* (r = -0,028 p = 0,814)	Keine Korrelation* (r = -0,041 p = 0,737)	

Tab. 12: Korrelationen der Vitamin E-Konzentration nicht dialysierter Diabetiker (Gruppe 2-5)
r: Korrelationskoeffizient p: Signifikanzniveau /: entfällt
*Keine Korrelation auf dem Niveau von 0,05 oder 0,01.

6.5. Vitamin A

6.5.1. Verlauf

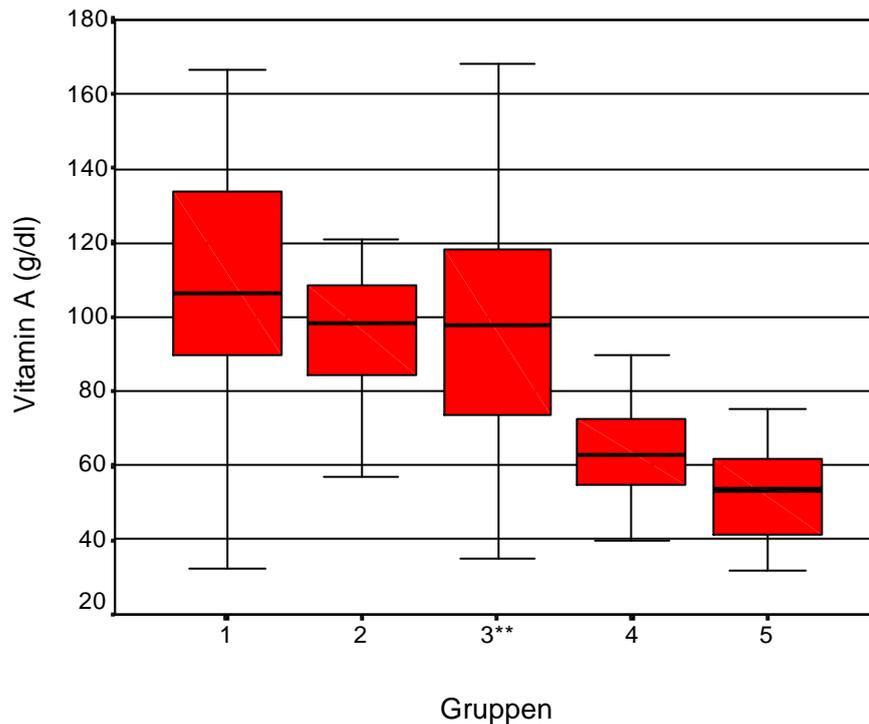


Abbildung 10: Vitamin A

*Gruppe 1: Hämodialysierte Gruppe 2: GFR <20ml/min
Gruppe 3: GFR 20-50ml/min Gruppe 4: GFR 50-80ml/min Gruppe 5: GFR >80ml/min*

** : Statistisch hoch signifikanter Konzentrationsunterschied ($p = 0,001$) zu nächst höherer

In Abbildung 10 sind die Verteilungen der medianen Vitamin A-Konzentration in verschiedenen Stadien der diabetischen Niereninsuffizienz als Boxplots dargestellt.

Die höchste mediane Konzentration an Vitamin A im Serum zeigen die hämodialysierten Patienten (Gruppe 1), die niedrigste die Gruppe 5. Gruppe 4 und 5 liegen innerhalb des physiologischen Bereichs. Gruppe 2 und 3, sowie der Median der hämodialysierten Patienten liegen über dem Normwert.

Bei den nicht dialysierten Patienten (Gruppe 2- 5) kommt es von Gruppe 5 zu Gruppe 4 zu einem statistisch signifikanten Anstieg der medianen Vitamin A- Konzentration, genauso von Gruppe 4 zu 3. Zwischen den Gruppen 2 und 3 zeigt sich eine nahezu gleiche mediane Konzentration. Bei den hämodialysierten Patienten kommt es dann zu einem weitem nicht signifikanten Anstieg der medianen Vitamin A- Konzentration

6.5.2. Korrelationen

Die Vitamin A-Konzentration wurde mit anderen Werten korreliert. Die Ergebnisse sind in folgenden Tabellen zusammengefasst.

Alter	Sex	GFR	Hst	Krea	Alb	HbA1c
Keine Korrelation* (r = 0,193 p = 0,401)	Keine Korrelation* (r = -0,016 p = 0,946)	/	Keine Korrelation* (r = -0,025 p = 0,917)	Keine Korrelation* (r = 0,090 p = 0,697)	Keine Korrelation* (r = 0,335 p = 0,138)	Keine Korrelation* (r = -0,066 p = 0,777)
CRPus	HCY	TAS	Vit E	MDA	GSH	
Keine Korrelation* (r = -0,156 p =)	Keine Korrelation* (r = -0,112 p = 0,630)	Keine Korrelation* (r = 0,361 p = 0,108)	Korrelation (r = 0,712 p < 0,001)	Keine Korrelation* (r = -0,245 p = 0,285)	Keine Korrelation* (r = -0,108 p = 0,642)	

Tab. 13: Korrelationen der Vitamin A-Konzentration hämodialysierter Patienten (Gruppe 1)
 r: Korrelationskoeffizient p: Signifikanzniveau /: entfällt
 *Keine Korrelation auf dem Niveau von 0,05 oder 0,01.

Alter	Sex	GFR	Hst	Krea	Alb	HbA_{1c}
Keine Korrelation* (r = 0,156 p = 0,194)	Keine Korrelation* (r = -0,077 p = 0,521)	Korrelation (r = -0,661 p<0,001)	Korrelation (r = 0,669 p<0,001)	Korrelation (r = 0,641 p<0,001)	Keine Korrelation* (r = -0,133 p = 0,275)	Keine Korrelation* (r = -0,046 p = 0,709)
CRP_{us}	HCY	TAS	Vit E	MDA	GSH	
Keine Korrelation* (r = 0,063 p = 0,608)	Korrelation (r = 0,557 p<0,001)	Korrelation (r = 0,279 p<0,05)	Korrelation (r = 0,305 p<0,01)	Keine Korrelation* (r = -0,225 p = 0,059)	Korrelation (r = -0,416 p<0,001)	

Tab. 13: Korrelationen der Vitamin A-Konzentration nicht dialysierter Patienten (Gruppe 2-5)
r: Korrelationskoeffizient p: Signifikanzniveau
*Keine Korrelation auf dem Niveau von 0,05 oder 0,01.

6.6. Totales antioxidatives System

6.6.1. Verlauf

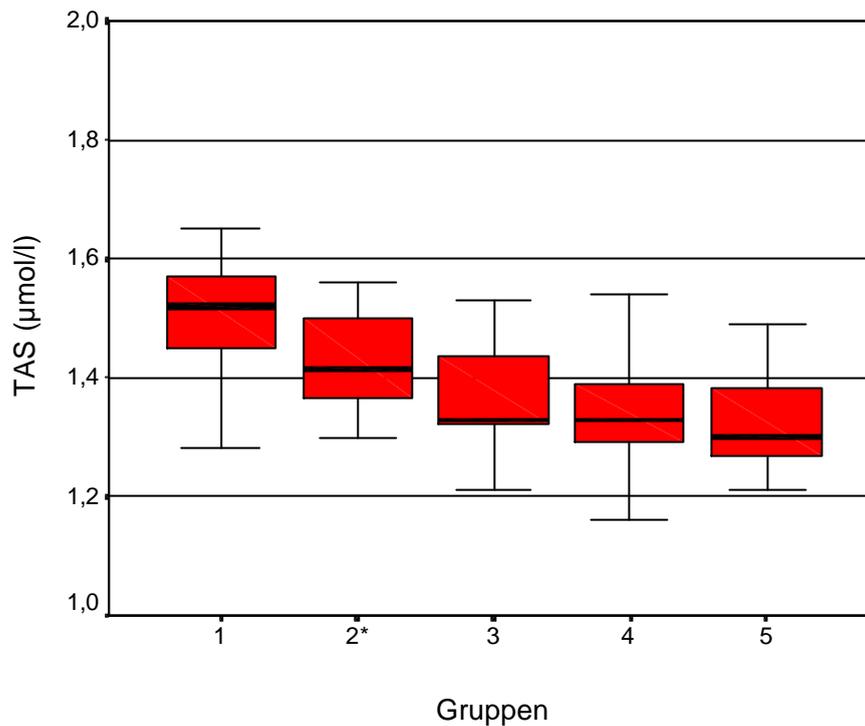


Abbildung 11: TAS

Gruppe 1: Hämodialysierte Gruppe 2: GFR <20ml/min
Gruppe 3: GFR 20-50ml/min Gruppe 4: GFR 50-80ml/min Gruppe 5: GFR >80ml/min

*: Statistisch signifikanter Konzentrationsunterschied ($p=0,001$) zu nächst höherer Gruppe

In Abbildung 11 sind die Verteilungen der medianen TAS- Konzentration in verschiedenen Stadien der diabetischen Niereninsuffizienz als Boxplots dargestellt.

Alle Gruppen liegen mit ihrer mittleren Konzentration im Bereich des Referenzwertes von 1,30-1,77mmol/l. Die höchste mediane Konzentration findet sich bei der hämodialysierten Gruppe (1), die niedrigste bei Gruppe 5. Die statistische Analyse mittels Kruskal- Wallis- und Mann- Whitney- U- Test ergab für die nicht dialysierten Gruppen mit einer GFR von >20ml/min (Gruppe 3, 4, 5) eine gleiche hohe mediane

Konzentration. Bei Gruppe 2 kommt es dann zu einem signifikanten Anstieg der medianen Konzentration.

6.6.2. Korrelationen

Die TAS- Konzentration wurde mit anderen Werten korreliert. Die Ergebnisse sind in folgenden Tabellen zusammengefasst.

Alter	Sex	GFR	Hst	Krea	Alb	HbA_{1c}
Korrelation (r = -0,479 p < 0,05)	Keine Korrelation* (r = -0,307 p = 0,175)	/	Keine Korrelation* (r = 0,285 p = 0,223)	Korrelation (r = 0,484 p < 0,05)	Keine Korrelation* (r = 0,268 p = 0,240)	Keine Korrelation* (r = 0,085 p = 0,713)
CRP_{us}	HCY	Vit A	Vit E	MDA	GSH	
Keine Korrelation* (r = 0,081 p = 0,728)	Keine Korrelation* (r = 0,163 p = 0,481)	Keine Korrelation* (r = 0,361 p = 0,108)	Keine Korrelation* (r = -0,003 p = 0,989)	Keine Korrelation* (r = 0,036 p = 0,875)	Keine Korrelation* (r = 0,073 p = 0,754)	

Tab. 15: Korrelationen der TAS- Konzentration hämodialysierter Patienten (Gruppe 1)
 r: Korrelationskoeffizient p: Signifikanzniveau /: entfällt
 *Keine Korrelation auf dem Niveau von 0,05 oder 0,01.

Alter	Sex	GFR	Hst	Krea	Alb	HbA_{1c}
Keine Korrelation* (r = -0,015 p = 0,900)	Keine Korrelation* (r = -0,099 p = 0,412)	Korrelation (r = -0,358 p < 0,01)	Korrelation (r = 0,314 p < 0,01)	Korrelation (r = -0,380 p = 0,001)	Keine Korrelation* (r = 0,190 p = 0,118)	Keine Korrelation* (r = -0,049 p = 0,697)
CRP_{us}	HCY	Vit A	Vit E	MDA	GSH	
Keine Korrelation* (r = 0,191 p = 0,117)	Keine Korrelation* (r = 0,215 p = 0,071)	Korrelation (r = 0,279 p < 0,05)	Keine Korrelation* (r = 0,109 p = 0,367)	Keine Korrelation* (r = 0,067 p = 0,580)	Keine Korrelation* (r = -0,010 p = 0,933)	

Tab. 16: Korrelationen der TAS- Konzentration nicht dialysierter Patienten (Gruppe 2-5)
r: Korrelationskoeffizient p: Signifikanzniveau
*Keine Korrelation auf dem Niveau von 0,05 oder 0,01.

6.7. CRP ultrasensitiv

6.7.1. Verlauf

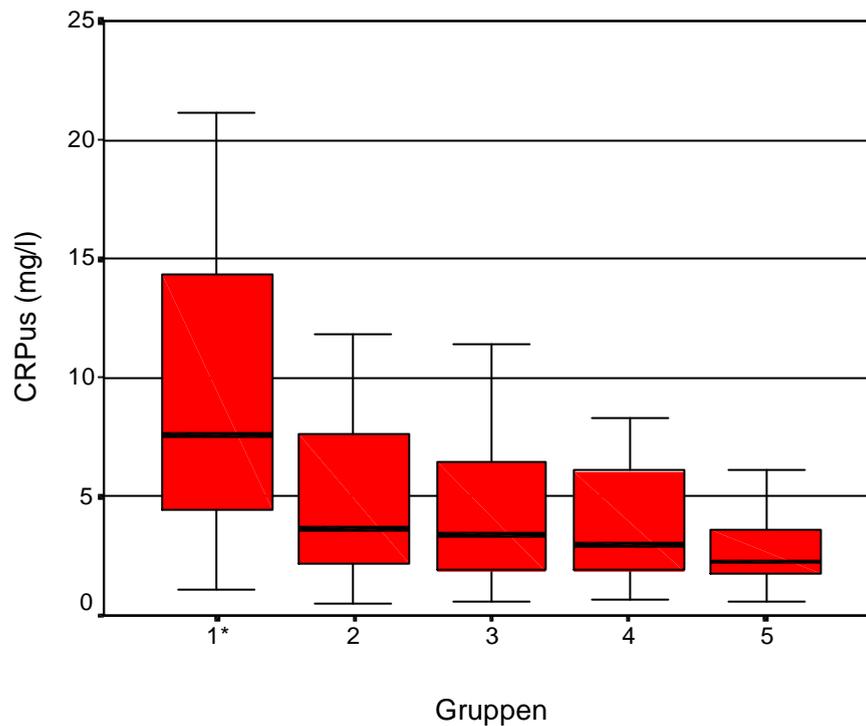


Abbildung 12: C- reaktives Protein ultrasensitiv

*Gruppe 1: Hämodialysierte Gruppe 2: GFR <20ml/min
Gruppe 3: GFR 20-50ml/min Gruppe 4: GFR 50-80ml/min Gruppe 5: GFR >80ml/min*

*: Statistisch signifikanter Konzentrationsunterschied ($p=0,001$) zu nächst höherer Gruppe

In Abbildung 12 sind die Verteilungen der medianen CRPus- Konzentration in verschiedenen Stadien der diabetischen Niereninsuffizienz als Boxplots dargestellt.

Die Konzentration von CRP ultrasensitiv (CRPus) im Serum ist, bei einem physiologischen Wert von $<5\text{mg/l}$, nur bei den hämodialysierten Patienten (Gruppe 1) pathologisch erhöht. Bei allen nicht dialysierten Patienten (Gruppe 2-5) liegt der Wert im physiologischen Bereich. Der Median ist bei dieser Gruppe am höchsten, am niedrigsten bei Gruppe 5.

Der Verlauf des CRPus - Medians zeigt tendenziell einen kontinuierlichen Anstieg von einer Gruppe zur anderen.

6.7.2. Korrelationen

Die CRPus- Konzentration wurde mit anderen Werten korreliert. Die Ergebnisse sind in folgenden Tabellen zusammengefasst.

Alter	Sex	GFR	Hst	Krea	Alb	HbA _{1c}
Keine Korrelation* (r = -0,139 p = 0,547)	Keine Korrelation* (r = -0,016 p = 0,946)	/	Keine Korrelation* (r = 0,063 p = 0,791)	Keine Korrelation* (r = 0,116 p = 0,615)	Keine Korrelation* (r = -0,190 p = 0,410)	Keine Korrelation* (r = -0,394 p = 0,077)
HCY	TAS	Vit A	Vit E	MDA	GSH	
Keine Korrelation* (r = 0,231 p = 0,313)	Keine Korrelation* (r = -0,081 p = 0,728)	Keine Korrelation* (r = -0,156 p = 0,500)	Keine Korrelation* (r = -0,060 p = 0,797)	Keine Korrelation* (r = 0,113 p = 0,626)	Keine Korrelation* (r = 0,052 p = 0,823)	

Tab. 17: Korrelationen der CRPus - Konzentration hämodialysierter Patienten (Gruppe 1)
 r: Korrelationskoeffizient p: Signifikanzniveau /: entfällt
 *Keine Korrelation auf dem Niveau von 0,05 oder 0,01.

Alter	Sex	GFR	Hst	Krea	Alb	HbA_{1c}
Keine Korrelation* (r = 0,053 p = 0,664)	Keine Korrelation* (r = 0,023 p = 0,849)	Keine Korrelation* (r = -0,143 p = 0,245)	Keine Korrelation* (r = 0,057 p = 0,642)	Keine Korrelation* (r = 0,143 p = 0,241)	Keine Korrelation* (r = -0,194 p = 0,116)	Keine Korrelation* (r = 0,128 p = 0,301)
HCY	TAS	Vit A	Vit E	MDA	GSH	
Keine Korrelation* (r = 0,102 p = 0,404)	Keine Korrelation* (r = 0,191 p = 0,117)	Keine Korrelation* (r = 0,063 p = 0,608)	Keine Korrelation* (r = 0,183 p = 0,132)	Keine Korrelation* (r = -0,111 p = 0,364)	Keine Korrelation* (r = -0,062 p = 0,612)	

Tab. 18: Korrelationen der CRPus - Konzentration nicht hämodialysierter Patienten (Gruppe 2-5)
r: Korrelationskoeffizient p: Signifikanzniveau
*Keine Korrelation auf dem Niveau von 0,05 oder 0,01.

6.8. Albumin

6.8.1. Verlauf

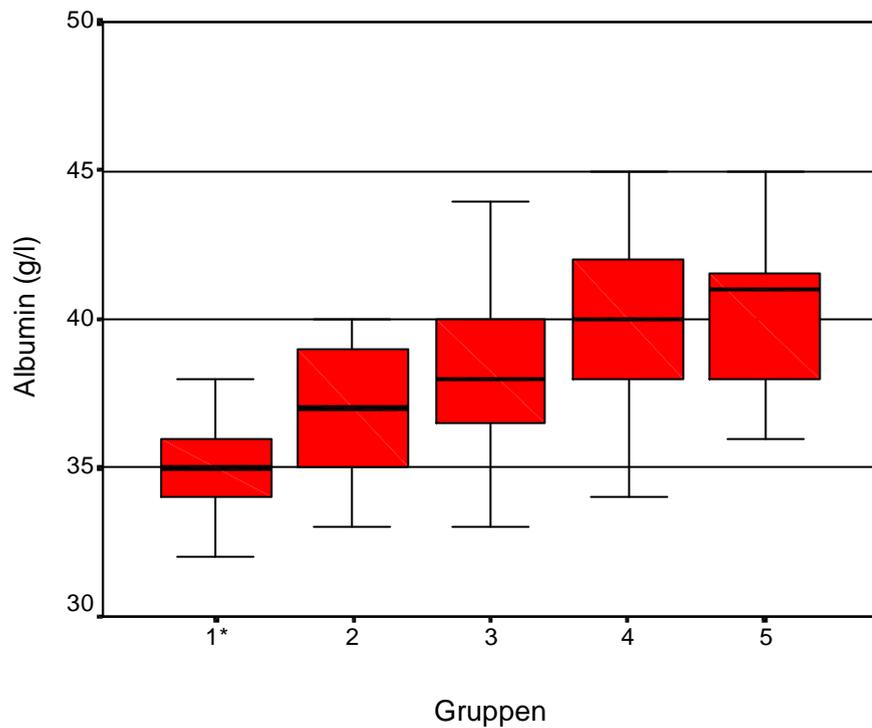


Abbildung 13: Albumin

Gruppe 1: Hämodialysierte **Gruppe 2: GFR <20ml/min**
Gruppe 3: GFR 20-50ml/min **Gruppe 4: GFR 50-80ml/min** **Gruppe 5: GFR >80ml/min**

*: Statistisch signifikanter Konzentrationsunterschied ($p = 0,001$) zu nächst höherer Gruppe

In Abbildung 13 sind die Verteilungen der medianen Albumin- Konzentration in verschiedenen Stadien der diabetischen Niereninsuffizienz als Boxplots dargestellt.

Die höchste mediane Konzentration an Albumin im Serum zeigt sich bei Gruppe 6, der niedrigste bei Gruppe 1. Alle Gruppe liegen mit ihrem Median innerhalb des physiologischen Bereiches von 34-48 g/l.

Die statistische Analyse mittels Kruskal- Wallis- und Mann- Whitney- U- Test zeigt bei den nicht dialysierten Gruppen (2-5) von Gruppe zu Gruppe zur anderen ein tendenzielles, aber nicht signifikantes Absinken der medianen Albuminkonzentration.

6.8.2. Korrelationen

Die Albumin-Konzentration wurde mit anderen Werten korreliert. Die Ergebnisse sind in folgenden Tabellen zusammengefasst.

Alter	Sex	GFR	Hst	Krea	HbA_{1c}	
Keine Korrelation* (r = -0,321 p = 0,156)	Keine Korrelation* (r = -0,088 p = 0,705)	/	Keine Korrelation* (r = -0,079 p = 0,741)	Keine Korrelation* (r = 0,168 p = 0,468)	Keine Korrelation* (r = -0,067 p = 0,774)	
CRP_{us}	HCY	TAS	Vit A	Vit E	MDA	GSH
Keine Korrelation* (r = -0,190 p = 0,410)	Keine Korrelation* (r = -0,070 p = 0,764)	Keine Korrelation* (r = 0,268 p = 0,240)	Keine Korrelation* (r = 0,335 p = 0,138)	Keine Korrelation* (r = 0,232 p = 0,311)	Keine Korrelation* (r = 0,018 p = 0,938)	Keine Korrelation* (r = -0,300 p = 0,187)

Tab. 19: Korrelationen der Albumin- Konzentration hämodialysierter Patienten (Gruppe 1)

r: Korrelationskoeffizient p: Signifikanzniveau /: entfällt

*Keine Korrelation auf dem Niveau von 0,05 oder 0,01.

Alter	Sex	GFR	Hst	Krea	HbA_{1c}	
Keine Korrelation* (r = -0,058 p = 0,637)	Keine Korrelation* (r = -0,018 p = 0,881)	Korrelation (r = 0,357 p < 0,01)	Korrelation (r = -0,365 p < 0,01)	Korrelation (r = -0,335 p < 0,01)	Keine Korrelation* (r = -0,117 p = 0,352)	
CRP_{us}	HCY	TAS	Vit A	Vit E	MDA	GSH
Keine Korrelation* (r = -0,194 p = 0,116)	Keine Korrelation* (r = -0,130 p = 0,287)	Keine Korrelation* (r = 0,190 p = 0,118)	Keine Korrelation* (r = -0,133 p = 0,275)	Keine Korrelation* (r = 0,142 p = 0,244)	Keine Korrelation* (r = 0,211 p = 0,082)	Korrelation (r = 0,334 p < 0,01)

Tab. 20: Korrelationen der Albumin- Konzentration nicht dialysierter Patienten (Gruppe 2-5)
r: Korrelationskoeffizient p: Signifikanzniveau
*Keine Korrelation auf dem Niveau von 0,05 oder 0,01.

6.9. Homocystein

6.9.1. Verlauf

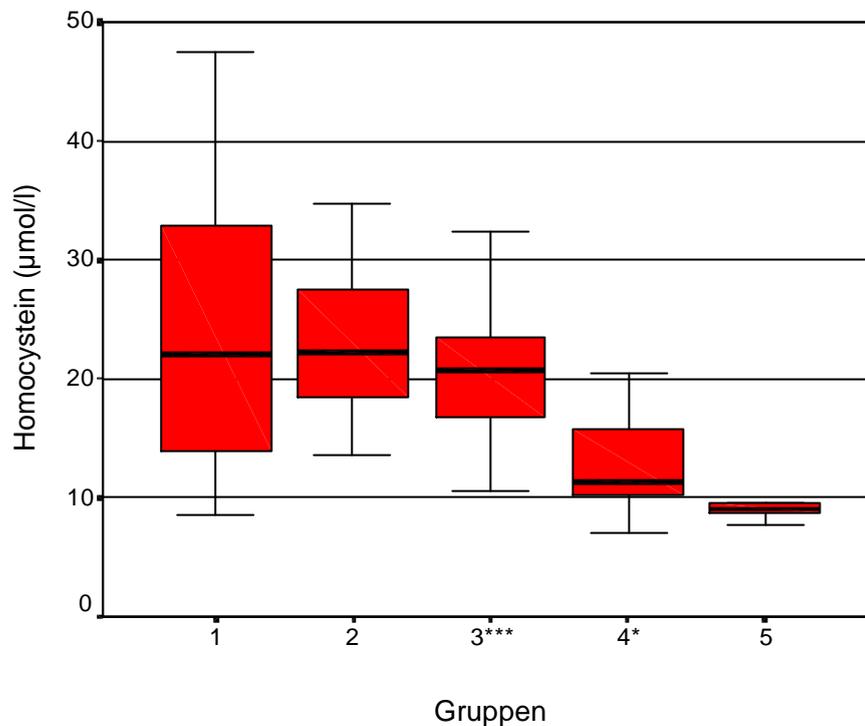


Abbildung 14: Homocystein

Gruppe 1: Hämodialysierte **Gruppe 2: GFR <20ml/min**
Gruppe 3: GFR 20-50ml/min **Gruppe 4: GFR 50-80ml/min** **Gruppe 5: GFR >80ml/min**

*: Statistisch signifikanter Konzentrationsunterschied ($p=0,5$) zu nächst höherer Gruppe

***: Statistisch höchst signifikanter Konzentrationsunterschied ($p=0,001$) zu nächst höherer Gruppe

In Abbildung 14 sind die Verteilungen der medianen Homocystein- Konzentration in verschiedenen Stadien der diabetischen Niereninsuffizienz als Boxplots dargestellt.

In allen Gruppen mit einer GFR von < 50ml/min (Gruppe 1-4) ist die Homocystein-Konzentration im Plasma signifikant über den Normalwert von 12 µmol/l erhöht. Nur der Median der Gruppe 5 liegt innerhalb des physiologischen Bereichs.

Der höchste mediane Homocysteinspiegel wurde bei den hämodialysierten Patienten (Gruppe 1) gemessen, der niedrigste bei Gruppe 5.

Gruppe 1-3 zeigen einen annähernd gleichen Median. Der Median der Gruppe 4 fällt dann statistisch höchst signifikant, liegt aber immer noch über dem Normalwert. Bei Gruppe 5 fällt der Median noch einmal statistisch signifikant bleibt aber ebenfalls innerhalb des Normalbereichs.

6.9.2. Korrelationen

Die Homocysteinkonzentration wurde mit anderen Werten korreliert. Die Ergebnisse sind in folgenden Tabellen zusammengefasst.

Alter	Sex	GFR	Hst	Krea	Alb	HbA_{1c}	CRP_{us}
Keine Korrelation* (r = -0,388 p = 0,082)	Keine Korrelation* (r = -0,409 p = 0,065)	/	Keine Korrelation* (r = -0,003 p = 0,990)	Keine Korrelation* (r = -0,109 p = 0,639)	Keine Korrelation* (r = -0,070 p = 0,764)	Keine Korrelation* (r = 0,287 p = 0,207)	Keine Korrelation* (r = 0,231 p = 0,313)
Vit B6	TAS	Vit A	Vit E	Vit B12	Fol	MDA	GSH
Korrelation (r = -0,758 p < 0,001)	Keine Korrelation* (r = 0,163 p = 0,481)	Keine Korrelation* (r = -0,112 p = 0,630)	Keine Korrelation* (r = -0,388 p = 0,082)	Korrelation (r = -0,647 p < 0,01)	Korrelation (r = -0,579 p < 0,05)	Keine Korrelation* (r = 0,062 p = 0,790)	Keine Korrelation* (r = -0,066 p = 0,775)

Tab. 21: Korrelationen der Homocystein- Konzentration hämodialysierter Patienten (Gruppe1)

r: Korrelationskoeffizient p: Signifikanzniveau /: entfällt

*Keine Korrelation auf dem Niveau von 0,05 oder 0,01.

Alter	Sex	GFR	Hst	Krea	Alb	HbA _{1c}	CRPus
Korrelation (r = 0,313 p < 0,01)	Keine Korrelation* (r = -0,027 p = 0,824)	Korrelation (r = -0,688 p < 0,001)	Korrelation (r = 0,663 p < 0,001)	Korrelation (r = 0,653 p < 0,001)	Keine Korrelation* (r = -0,130 p = 0,287)	Keine Korrelation* (r = -0,011 p = 0,930)	Keine Korrelation* (r = -0,102 p = 0,404)
Vit B6	TAS	Vit A	Vit E	Vit B12	Fol	MDA	GSH
Keine Korrelation* (r = -0,132 p = 0,274)	Keine Korrelation* (r = 0,215 p = 0,071)	Korrelation (r = 0,557 p < 0,001)	Keine Korrelation* (r = -0,022 p = 0,853)	Korrelation (r = -0,281 p < 0,05)	Keine Korrelation* (r = -0,225 p = 0,072)	Korrelation (r = -0,243 p < 0,05)	Korrelation (r = -0,241 p < 0,05)

Tab. 22: Korrelationen der Homocystein- Konzentration nicht dialysierter Patienten (Gruppe 2-5)
r: Korrelationskoeffizient p: Signifikanzniveau
*Keine Korrelation auf dem Niveau von 0,05 oder 0,01.

6.10. Vitamin B6

6.10.1. Verlauf

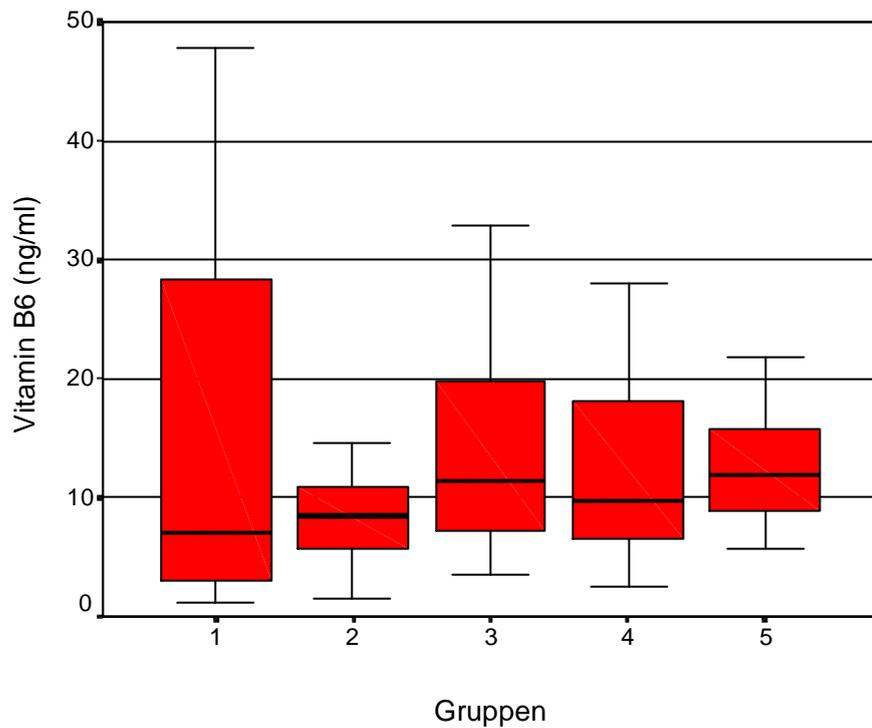


Abbildung 15: Vitamin B6

*Gruppe 1: Hämodialysierte Gruppe 2: GFR <20ml/min
Gruppe 3: GFR 20-50ml/min Gruppe 4: GFR 50-80ml/min Gruppe 5: GFR >80ml/min*

In Abbildung 15 sind die Verteilungen der medianen Vitamin B6- Konzentration im Serum in verschiedenen Stadien der diabetischen Niereninsuffizienz als Boxplots dargestellt.

Alle Gruppen liegen mit ihrer mittleren Konzentration innerhalb des Referenzbereiches von 4,8-36,9ng/ml.

Die niedrigste mediane Vitamin B6- Konzentration im Serum finden wir mit 7ng/ml bei Gruppe 1, den höchsten bei Gruppe 5. Die statistische Analyse mittels Kruskal-

Wallis- und Mann-Whitney-U-Test zeigt keine einheitliche Tendenz im Verlauf der medianen Vitamin B6-Konzentration. Zwischen Gruppe 1, 2 und 3 kommt es zunächst zu einem statistisch nicht signifikanten Anstieg des Medians. Zwischen Gruppe 3 und 4 zeigt sich dann ein nicht signifikanter Abfall, bei Gruppe 5 steigt der Median auf seinen höchsten Wert.

6.10.2. Korrelationen

Die Vitamin B6-Konzentration wurde mit anderen Werten korreliert. Die Ergebnisse sind in folgenden Tabellen zusammengefasst.

Alter	Sex	GFR	Hst	Krea
Keine Korrelation* (r = 0,148 p = 0,522)	Keine Korrelation* (r = 0,110 p = 0,634)	/	Keine Korrelation* (r = 0,032 p = 0,895)	Keine Korrelation* (r = 0,301 p = 0,185)
HCY	Vit B12	Fol	Alb	
Korrelation (r = -0,758 p < 0,001)	Korrelation (r = 0,552 p < 0,01)	Korrelation (r = 0,832 p < 0,001)	Keine Korrelation* (r = 0,363 p = 0,106)	

Tab. 23: Korrelationen der Vitamin B6-Konzentration hämodialysierter Patienten (Gruppe 1)
 r: Korrelationskoeffizient p: Signifikanzniveau /: entfällt
 *Keine Korrelation auf dem Niveau von 0,05 oder 0,01.

Alter	Sex	GFR	Hst	Krea
Keine Korrelation* (r = 0,082 p = 0,498)	Keine Korrelation* (r = -0,232 p = 0,051)	Keine Korrelation* (r = 0,205 p = 0,088)	Keine Korrelation* (r = -0,171 p = 0,154)	Keine Korrelation* (r = -0,139 p = 0,248)
HCY	Vit B12	Fol	Alb	
Keine Korrelation* (r = -0,132 p = 0,274)	Keine Korrelation* (r = -0,026 p = 0,834)	Korrelation (r = 0,606 p < 0,001)	Korrelation (r = 0,322 p < 0,01)	

Tab. 24: Korrelationen der Vitamin B6-Konzentration nicht dialysierter Patienten (Gruppe 2-5)
r: Korrelationskoeffizient p: Signifikanzniveau
*Keine Korrelation auf dem Niveau von 0,05 oder 0,01.

6.11. Vitamin B12

6.11.1. Verlauf

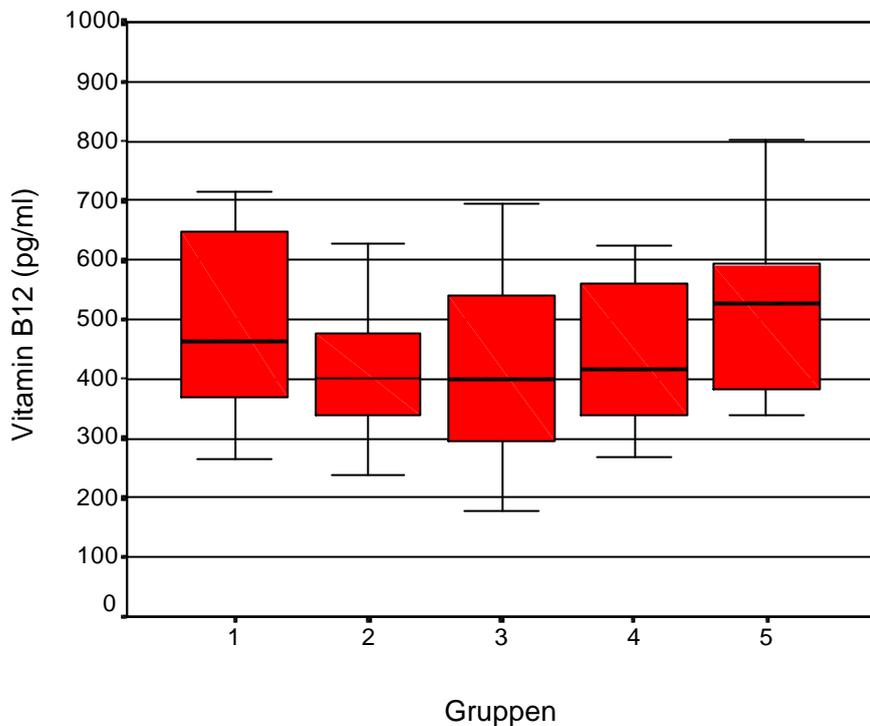


Abbildung 16: Vitamin B12

*Gruppe 1: Hämodialysierte Gruppe 2: GFR <20ml/min
Gruppe 3: GFR 20-50ml/min Gruppe 4: GFR 50-80ml/min Gruppe 5: GFR >80ml/min*

In Abbildung 16 sind die Verteilungen der medianen Vitamin B12- Konzentration im Serum in verschiedenen Stadien der diabetischen Niereninsuffizienz als Boxplots dargestellt.

Der Median aller Gruppen liegt innerhalb des physiologischen Bereichs von 211- 911 pg/ml. Die höchste mediane Konzentration an Vitamin B12 im Serum weisen die Patienten mit einer GFR von > 80ml/min (Gruppe 5) auf, die niedrigste Gruppe 3. Zwischen Gruppe 1 und 2 kommt es zu einem nicht signifikanten Abfall der medianen Vitamin B12- Konzentration. Gruppe 2, 3 und 4 zeigen einen fast gleichen Vitamin

B12- Median. Zwischen Gruppe 4 und 5 kommt es dann zu einem Anstieg der Vitamin B12 – Konzentration auf den höchsten gemessenen Wert.

6.11.2. Korrelationen

Die Vitamin B12-Konzentration wurde mit anderen Werten korreliert. Die Ergebnisse sind in folgenden Tabellen zusammengefasst.

Alter	Sex	GFR	Hst	Krea
Keine Korrelation* (r = 0,231 p = 0,315)	Keine Korrelation* (r = 0,220 p = 0,337)	/	Keine Korrelation* (r = 0,044 p = 0,855)	Keine Korrelation* (r = 0,007 p = 0,975)
CRPus	Hcy	Vit B6	Fol	Alb
Korrelation (r = 0,074 p<0,001)	Korrelation (r = 0,074 p<0,01)	Korrelation (r = 0,552 p<0,01)	Keine Korrelation* (r = 0,507 p = 0,054)	Keine Korrelation* (r = 0,146 p = 0,529)

Tab. 25: Korrelationen der Vitamin B12-Konzentration hämodialysierter Patienten (Gruppe 1)
 r: Korrelationskoeffizient p: Signifikanzniveau /: entfällt
 *Keine Korrelation auf dem Niveau von 0,05 oder 0,01.

Alter	Sex	GFR	Hst	Krea
Keine Korrelation* (r = -0,116 p = 0,338)	Keine Korrelation* (r = 0,061 p = 0,615)	Keine Korrelation* (r = 0,165 p = 0,175)	Keine Korrelation* (r = -0,190 p = 0,115)	Keine Korrelation* (r = -0,146 p = 0,228)
HCY	Vit B6	Fol	Alb	
Korrelation (r = -0,281 p < 0,05)	Keine Korrelation* (r = 0,026 p = 0,834)	Keine Korrelation* (r = 0,140 p = 0,268)	Keine Korrelation* (r = 0,196 p = 0,108)	

Tab. 26: Korrelationen der Vitamin B12-Konzentration nicht dialysierter Patienten (Gruppe 2-5)
r: Korrelationskoeffizient p: Signifikanzniveau /: entfällt
*Keine Korrelation auf dem Niveau von 0,05 oder 0,01.

6.12. Folsäure

6.12.1. Verlauf

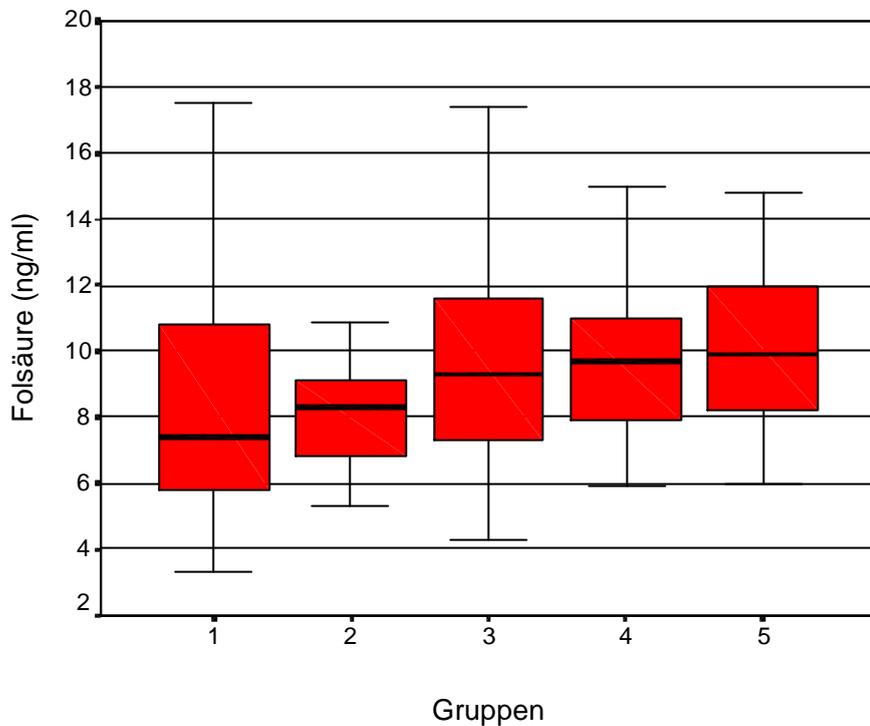


Abbildung 17: Folsäure

*Gruppe 1: Hämodialysierte Gruppe 2: GFR <20ml/min
Gruppe 3: GFR 20-50ml/min Gruppe 4: GFR 50-80ml/min Gruppe 5: GFR >80ml/min*

In Abbildung 17 sind die Verteilungen der medianen Folsäure- Konzentration in verschiedenen Stadien der diabetischen Niereninsuffizienz als Boxplots dargestellt.

Der Median aller Gruppen liegt innerhalb des physiologischen Bereichs von 2.4-14.6 ng/ml. Die höchste mediane Folsäure- Konzentration im Serum zeigt Gruppe 5, die niedrigste Gruppe 1.

Die statistische Analyse mittels Kruskal- Wallis- und Mann- Whitney- U- Test zeigt für die nicht dialysierten Patienten (Gruppe 2-5) eine Tendenz zu einem Abfall der medianen Konzentration an Folsäure von einer Gruppe zu anderen. Diese Veränderungen sind statistisch nicht signifikant.

6.12.2. Korrelationen

Die Folsäure-Konzentration wurde mit anderen Werten korreliert. Die Ergebnisse sind in folgenden Tabellen zusammengefasst.

Alter	Sex	GFR	Hst	Krea
Keine Korrelation* (r = 0,289 p = 0,296)	Keine Korrelation* (r = 0,217 p = 0,438)	/	Keine Korrelation* (r = 0,411 p = 0,144)	Keine Korrelation* (r = 0,047 p = 0,869)
HCY	Vit B12	Vit B6	Alb	
Korrelation (r = -0,579 p < 0,05)	Keine Korrelation* (r = 0,507 p = 0,054)	Korrelation (r = 0,832 p < 0,001)	Keine Korrelation* (r = 0,513 p = 0,051)	

Tab. 27: Korrelationen der Vitamin Folsäure-Konzentration hämodialysierter Patienten (Gruppe 1)
r: Korrelationskoeffizient p: Signifikanzniveau /: entfällt
*Keine Korrelation auf dem Niveau von 0,05 oder 0,01.

Alter	Sex	GFR	Hst	Krea
Keine Korrelation* (r = -0,039 p = 0,758)	Keine Korrelation* (r = -0,003 p = 0,979)	Keine Korrelation* (r = 0,224 p = 0,075)	Keine Korrelation* (r = -0,220 p = 0,078)	Keine Korrelation* (r = -0,200 p = 0,111)
HCY	Vit B12	Vit B6	Alb	
Keine Korrelation* (r = -0,225 p = 0,072)	Keine Korrelation* (r = 0,140 p = 0,268)	Korrelation (r = 0,606 p < 0,001)	Korrelation (r = 0,364 p < 0,01)	

Tab. 28: Korrelationen der Folsäure-Konzentration nicht dialysierter Patienten (Gruppe 2-5)
r: Korrelationskoeffizient p: Signifikanzniveau
*Keine Korrelation auf dem Niveau von 0,05 oder 0,01.

7. Diskussion

Diabetes mellitus ist ein starker Risikofaktor für das frühzeitige Fortschreiten eines verstärkten atherosklerotischen Prozesses. Ishimura et al konnten zeigen, dass eine verminderte renale Funktion bei Typ 2-Diabetikern die Atherosklerose zusätzlich verstärkt und die chronische Niereninsuffizienz an sich ein signifikanter, unabhängiger Risikofaktor für die Entwicklung einer Carotisstenose ist (Ishimura et al., 2001).

Homocystein ist ein unabhängiger Risikofaktor für Herz- und Kreislauferkrankungen. GSH und MDA sind Marker des oxidativen Stoffswechsels. MDA trägt selbst zur Atherogenese bzw. zur Induktion einer, die Atherogenese unterhaltenden Entzündung bei. Die Rolle der Entzündungsmediatoren, allen voran des CRP an der Atherogenese wurde in den letzten Jahren zunehmend untersucht. Die Supplementation antioxidativ wirkender Vitamine und Folsäure als anti-atherosklerotische Prophylaxe bei chronisch niereninsuffizienten Patienten wird seit vielen Jahren mit unterschiedlichen Ergebnissen, untersucht.

Die Höhe des HbA_{1c} dient nicht nur der Langzeitkontrolle des Diabetes mellitus, sondern lässt sich auch, als Produkt eines oxidativen Vorgangs, als Marker heranziehen. Das totale antioxidative Potential dient zur Überprüfung der Fähigkeit des Körpers sich gegen die oxidativen Angriffe zu wehren.

In dieser Arbeit soll gezeigt werden, wie sich die Konzentrationen dieser unterschiedlichen Marker mit dem Stadium der Nierenfunktionseinschränkung bei Diabetikern verändern.

7.1. Malondialdehyd

Studien der letzten Jahre ließen keinen Zweifel an der Tatsache, dass es zu verstärktem oxidativen Stress bei dialysierten und prä-dialysierten Patienten kommt. Unsere Auswertung, die den Verlauf der MDA-Konzentration in verschiedenen Stadien der diabetischen Nephropathie untersucht, ergab, dass es nicht zu einem kontinuierlichen Anstieg der TBA-RS bei diabetischer Niereninsuffizienz kommt.

Damit unterscheiden sich unsere Ergebnisse von denen von Mimic- Oka, der den Verlauf der MDA- Konzentration bei nicht- dialysierten chronisch niereninsuffizienten Patienten in verschiedenen Stadien der Niereninsuffizienz und bei hämodialysierten Patienten (alles keine Diabetiker!) untersuchte (Mimic- Oka et al.,1992 und Mimic- Oka et al.,1999). Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass es bei nicht- Diabetikern zu einem signifikanten Anstieg der MDA- Konzentration von einer Gruppe zu anderen kommt und die höchsten Werte bei HD- Patienten zu finden sind.

Unsere Ergebnisse zeigen die höchsten MDA- Werte für die Gruppe 5 (GFR >80ml/min). Im weiteren Verlauf kommt es zu einem Abfall der medianen MDA- Konzentration, bis diese erneut zwischen Gruppe 3 und 2 (GFR <20ml/min) statistisch signifikant ansteigt. Die Gruppe der hämodialysierten Diabetiker zeigt dann wieder einen Abfall der medianen MDA- Konzentration. Damit stehen unsere Ergebnisse im Einklang mit denen von Lucchi et al., die ebenfalls zeigen konnten, dass es bei Patienten mit einer $C_{cr} > 20$ ml/min keine signifikanten Unterschiede in der MDA- Konzentration im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe kommt. Erst bei Patienten mit $C_{cr} < 20$ ml/min steigt die MDA- Konzentration des Plasmas signifikant an. Über eine Normalisierung der MDA- Werte wurde bei den Hämodialyse- Patienten berichtet (Lucchi et al., 1993).

Über die Ursachen dieser Beobachtung herrscht in der Literatur noch Uneinigkeit. Der TBA- RS Test ist nicht spezifisch und zahlreiche Substanzen, wie Aminosäuren, Biliverdin, Prostaglandine, Hämoglobin und sogar Harnstoff können ebenso mit Thiobarbitursäure reagieren, wie MDA und 4- Hydroxynonenal. Allerdings wurde der Test bei zahlreichen Studien angewandt. (Fink et al., 1986; Lunec et al., 1981; Halliwell et al., 1987; Taccone- Gallucci et al., 1986). Auch alimentäre Ursachen wie die direkte Aufnahme von Lipidperoxidationsprodukten, z.B. über Fischöl werden diskutiert (Patienten, die Fisch-Öl zu sich nehmen zeigten einen Anstieg des MDA- Spiegel, nicht so sehr durch vermehrte endogene Lipidperoxidation, sondern eher durch direkte MDA- Aufnahme über das Öl). Auch der Verdacht, dass die MDA- Veränderungen auf eine Dyslipoproteinämie zurückzuführen sind, lässt sich hier nicht halten. Der Anstieg des MDA wurde erst in der Gruppe mit der schlechtesten Nierenfunktion festgestellt, während sich Lipoprotein- Veränderungen bei chronischer Niereninsuffizienz bereits viel früher manifestieren (Altman et al., 1991). Außerdem konnte Lucchi zeigen, dass es zu einem Abfall der MDA- Konzentration bei

hämodialysierten Patienten kommt, ohne dass sich Veränderungen im Lipidprofil ergeben (Lucchi et al., 1993).

Die enge Beziehung zwischen dem CRP- Metabolismus und oxidativem Stress wurde bereits oben beschrieben. Bei unseren Untersuchungen konnten wir keine Korrelationen zwischen Malondialdehyd und HbA_{1c}, als Markern des oxidativen Stress finden. Auch eine Korrelation zwischen Malonaldehyd und CRP, Homocystein oder den Markern der antioxidativen Abwehr (TAS, Vitamin E, Glutathion) waren nicht nachzuweisen.

Zahlreiche Studien der letzten Jahre konnten verstärken oxidativen Stress bei Dialyse und nicht dialysierten chronisch niereninsuffizienten Patienten zeigen. Dabei stellt sich die Frage, ob es zu einem kontinuierlichen Anstieg der Endprodukte der Lipidperoxidation in Korrelation zur zunehmenden Einschränkung der Nierenfunktion bei Diabetikern kommt. Unsere Beobachtungen über den Verlauf der Marker der Lipidperoxidation haben nun gezeigt, dass es diesen kontinuierlicher Zunahme nicht gibt. Erst in einem sehr späten Stadium der chronischen Niereninsuffizienz (ab einer GFR von unter 20ml/min) kommt es zu einem Anstieg der MDA-Plasmakonzentration.

Wir haben verschieden mögliche Ursachen dafür diskutiert. Die wahrscheinlichste scheint jedoch zu sein, dass der Anstieg der Endprodukte der Lipidperoxidation nicht nur durch vermehrten oxidativen Stress, sondern auch durch eine verzögerte Ausscheidung, die zu einer Akkumulation der Aldehyde führt, verursacht ist. Allerdings wurde keine Korrelation zwischen MDA und der GFR gefunden. Der Konzentrationsabfall bei den hämodialysierten Patienten könnte durch die regelmäßige Entfernung der MDA durch die Dialyse-Therapie zustande kommen.

7.2. HbA_{1c}

Die Rolle des HbA_{1c} im Metabolismus der AGE wurde bereits erläutert. Mehrere Studien haben sich mit der Rolle der AGEs bei Diabetikern, hämo- und nicht-dialysierten Patienten beschäftigt. Keine Studie war nach unseren Recherchen jedoch zu finden, die sich mit dem Verlauf des HbA_{1c} in verschiedenen Stadien der diabetischen Nephropathie befasste.

Aso et al. konnte für Diabetiker eine Korrelation zwischen HbA_{1c} und Serum- AGEs feststellen und zeigt damit, dass eine schlechte Blutzuckereinstellung zur verstärkten Synthese der AGEs wesentlich beiträgt (Aso et al., 2000). Diese Ergebnisse werden bestätigt durch Makita et al.. Dieser teilte seinen Diabetiker in 3 Gruppen ein (Diabetiker mit normaler Nierenfunktion, Diabetiker mit erhöhtem Kreatinin, hämodialysierte Diabetiker). Er konnte zeigen, dass es sowohl zu einem Anstieg des HbA_{1c}, als auch der Serum AGEs mit abnehmender Nierenfunktion kommt (Makita et al., 1991). Die Folge ist die frühzeitige Entwicklung mikro- und makroangiopathischer Schäden bei Diabetikern. Shimoike et al. hingegen kann diese Korrelation zwischen HbA_{1c} und AGEs nicht finden. Dies legt den Schluss nahe, dass die erhöhten AGE-Konzentrationen und ihre Folgen, bei Diabetikern eher Ursache einer verminderten renalen Exkretion sind (Shimoike et al., 2000).

Unsere Ergebnisse zeigen nun für alle Patientengruppen eine mediane HbA_{1c}-Konzentration, die über dem für Diabetiker angestrebten Zielwert von 5,8% liegt. Bei den nicht dialysierten Patientengruppen ist der mediane HbA_{1c} für alle Gruppen nahezu gleich. Bei den dialysierten Diabetikern kommt es dann zu einem signifikanten Abfall des HbA_{1c}. Da wir die AGEs in unserer Studie nicht gemessen haben, ist keine Aussage darüber möglich, ob eine Korrelation zwischen ihnen und dem HbA_{1c}- Wert besteht. Wir können nicht sagen, ob in den unterschiedlichen Stadien der diabetischen Nephropathie die AGEs ansteigen, oder wie das HbA_{1c} annähernd gleich bleiben. Wir können nur sehen, dass der HbA_{1c} nicht assoziiert ist, an das Ausmaß der Nierenfunktionseinschränkung. Dieses Ergebnis spricht eher für die Theorie Shimoikes, lässt sich aber nicht mit absoluter Sicherheit untermauern. Die unterschiedlichen Ansätze Shimoikes und Asos zur Erklärung erhöhter AGE-Spiegel bei Diabetikern bedarf damit noch weiterer Abklärung.

Für das HbA_{1c} konnten, weder für die dialysierten, noch für die nicht- dialysierten Diabetiker, Korrelationen mit anderen Marker nachgewiesen werden.

7.3. Glutathion

GSH gehört zu den wichtigsten und wirkungsvollsten physiologischen Thiol(SH)-Verbindungen der Zellen. Es ist ein nicht- enzymatisch wirkendes Antioxidans, das die Zellen gegen die zerstörenden Einwirkungen der ROS und anderen toxischen

Verbindungen schützt. Hat die Lipidperoxidation breites stattgefunden, spielt es als wichtigster Thiolgruppendonator im Metabolismus der peroxidierten Aldehyde eine entscheidende Rolle und schützt biologische Strukturen gegen deren Angriff.

Keine Studie befasste sich nach unseren Recherchen bisher mit der Darstellung des GSH- Verlaufs in verschiedenen Stadien der diabetischen Nephropathie. Selvaraj et al. fanden erniedrigte GSH- Spiegel bei nicht- dialysierten CRF- Patienten (Selvraj et al., 2002). Cebalot- Picot et al. konnten erniedrigte GSH- Konzentrationen bei hämodialysierten Patienten nachweisen. Außerdem fanden sie eine Korrelation zwischen der GSH- Konzentration und dem Ausmaß des chronischen Nierenversagens. (Cebalot-Picot et al., 1996). Die Ergebnisse unserer Studie bestätigen diese Beobachtungen. Sie zeigen einen Abfall der GSH- Konzentration von einer Gruppe zur nächsten und eine Korrelation der GSH- Konzentration mit der GFR bei den nicht- dialysierten Patienten. Die niedrigste mediane Konzentration an GSH weisen die Leukozyten unserer hämodialysierten Patienten auf. Der Konzentrationsabfall könnte sowohl an einer verminderten GSH- Synthese, als einem Nebeneffekt der Urämie, als auch an einem Anstieg des GSH- Verbrauchs, bei verstärktem oxidativen Stress, liegen. Auch ein Mangel an NAD(P)H, welches zur Reduktion des GSH essentiell ist, wäre denkbar. NAD(P)H wird bei der Entstehung von Radikalen, durch die NAD(P)H- Oxidase in Granulozyten massiv verbraucht. Es steht damit der GSH- Reduktion nicht mehr zu Verfügung (Babior et al., 1984). Eine zunehmende ROS- Produktion, die mit der Abnahme der Nierenfunktion korreliert könnte so indirekt einen Abfall des reduzierten GSH verursachen.

Schettler at al. zeigten einen GSH- Verlust in Granulozyten bei hämodialysierten Patienten, sowie einen Verlust der granulozytären GSH- Konzentration während einer Dialyse- Therapie (Schettler at al., 1998). Chronische Dialyse *per se* scheint also ebenfalls zu einem intrazellulären GSH Verlust beizutragen und erklärt die niedrige Konzentration an GSH in den Leukozyten unserer hämodialysierten Patienten.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass wohl anscheinend sowohl die Urämie, als auch das Verfahren der Dialyse zu einem Verlust an Glutathion in Leukozyten beiträgt. Die einzelnen Mechanismen bedürfen jedoch noch weiterer Untersuchungen. Die Frage ob sich die Verminderung des GSH- Gehalts in den Leukozyten Ursache oder Folge eines vermehrten oxidativen Stress bei chronisch Nierenkranken ist, wird auch in der Literatur nicht abschließend geklärt. Auch die von

uns gefundenen Korrelationen der medianen GSH- Konzentration in den Leukozyten bei den Patienten der nicht dialysierten Gruppen mit Homocystein, Vitamin A und Albumin untermauert eher die Möglichkeit der Folge eines Abfalls antioxidativ wirkender Mechanismen bei chronisch nierenkranken Diabetikern, ohne einen wirklichen abschließenden Beweis dafür zu erbringen. Eine Korrelation mit MDA oder HbA_{1c} konnte hingegen nicht gefunden werden.

7.4. Vitamin E

Studien der letzten Jahre unterstreichen zunehmend die Bedeutung des Vitamin E als wichtiger Gegenspieler des verstärkten oxidativen Stress bei hämodialysierten und prä-Dialyse Patienten (Galli et al., 1999). Vitamin E unterbricht nicht nur die Kettenreaktion der Lipidperoxidation, sondern schützt auch Plasma-Thiole und Glutathion vor der Oxidation (Buoncristiani et al., 1997). *In Vitro* konnte gezeigt werden, dass Vitamin E Hydroxyperoxide abfängt und die Lipidperoxidation über enzymatische, wie auch nicht- enzymatische Mechanismen reguliert (Upston et al., 1999). *In vivo* ist die Rolle des Vitamin E am Schutz vor Lipidperoxidation noch nicht eindeutig geklärt (Keany et al., 1999; Upston et al., 1999). Es wird vermutet, dass es sowohl als klassisches Antioxidans reagiert, aber auch über andere biologische Mechanismen eine anti- atherogene Rolle einnimmt. So kann es zum Beispiel die Proliferation der endothelialen Komponenten der Atherogenese (Endothelzellen, glatte Muskulatur und ortsansässige Makrophagen) kontrollieren. Das lipophile Antioxidans vermindert somit die Entstehung der Atherosklerose bei chronisch nierenkranken Diabetikern bereits in frühen Stadien der Niereninsuffizienz.

Für chronisch nierenkranke Patienten konnte Galli kürzlich zeigen, dass Vitamin E die ROS Produktion, induziert durch Neutrophilen-Kontakt mit der Dialyse-Membran, vermindert (Galli et al., 1998). Die Ergebnisse unserer Studie zeigen für jede Gruppe einen Vitamin E-Spiegel im normalen Bereich. Dies bestätigt die Ergebnisse zahlreicher früherer Studien (Clermont et al., 2000; Porrini et al., 1989; Hultquist et al., 1997; Nguyen- Khoa et al., 1999). Zwischen den einzelnen Gruppen der nicht-dialysierten Diabetiker (Gruppe 2- 5) ist kein Unterschied im Median der Vitamin E-Konzentration zu erkennen. Erst bei den Hämodialyse-Patienten kommt es zu einem nicht signifikanten Abfall der Vitamin E-Konzentration.

Mehrere klinische Studien untersuchten den Effekt einer Vitamin E- Substitution bei hämodialysierten und nicht- dialysierten nierenkranken Patienten. Die Ergebnisse sind kontrovers. Die CHAOS (Cambridge Heart Antioxidant Study) und die SPACE-Studie (Secondary Prevention with Antioxidants of Cardiovascular Disease in End-Stage Renal Disease), konnte bei den 196 untersuchten Dialyse- Patienten eine deutliche Verminderung des Herzinfarkt- Risikos feststellen, die mit 800 IU/d Vitamin E behandelt wurden. Patienten, die mit einer, mit Vitamin E beschichtete Dialysemembran behandelt wurden, zeigten vermindert oxidativen Stress. Die so beschichteten Dialysemembranen scheinen in ihrem oxidativen Effekt einer oralen Vitamin E Therapie sogar überlegen zu sein (Mydlik et al., 2001). Auch Jialal konnten kürzlich bei Diabetikern wiederum einen sehr guten therapeutischen Effekt einer hochdosierten Vitamin E- Therapie auf die Lipidperoxidation und die Synthese pro-inflammatorischer Cytokine feststellen (Jialal et al., 2002).

In der HOPE- Studie hingegen zeigten die Patienten die Tendenz, eine CVD, bei gleichzeitig normalen Vitamin E- Konzentrationen im Plasma, zu entwickeln. Diese Beobachtung legt den Verdacht nahe, dass im Zustand der Urämie und Hämodialyse das Vitamin E keine Rolle als antioxidativer Verteidigungsmechanismus darstellt. Der Sinn einer Vitamin E- Therapie bei prä- Dialyse und Dialyse- Patienten bleibt also weiter umstritten. Bei normalen Vitamin E- Spiegeln wird eine gezielte Therapie mit hoch-dosiertem, oral verabreichten Vitamin E nicht generell empfohlen (Weiss, 2001).

Eine Korrelation besteht sowohl für die hämodialysierten, wie auch die nicht dialysierten Diabetiker mit dem antioxidativ wirkenden Vitamin A.

7.5. Vitamin A

Für das lipophile, antioxidativ wirkende Vitamin A konnte gezeigt werden, dass es Lipide vor der Oxidation schützt und die endogene Aktivität antioxidativer Enzyme reguliert (Ciaccio et al., 1993). Merzouk et al. konnten eine signifikant niedrigere Vitamin A- Konzentration bei Typ 1 und Typ 2 Diabetikern im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe zeigen (Merzouk et al., 2003). Ha et al. hingegen fand mit seiner Arbeitsgruppe eine, bei chronisch niereninsuffizienten Patienten, signifikant erhöhte Vitamin A- Konzentration im Serum (Ha et al., 1996). Auch Mydlik et al. zeigten eine

erhöhte Serumkonzentration an Vitamin A bei nicht dialysierten und dialysierten Patienten (Mydlik et al., 1977). Keine Studie befasste sich nach unseren Recherchen, bisher mit der Untersuchung des Verlaufs der Vitamin A- Konzentration in verschiedenen Stadien der diabetischen Nephropathie.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die mediane Vitamin A – Konzentration, ab einer Nierenfunktionseinschränkung von $<50\text{ml/min}$ GFR (Gruppe 1, 2 und 3), über dem physiologischen Bereich liegt. Zwischen Gruppe 3 und 4 zeigt sich ein höchst signifikanter Anstieg der medianen Vitamin A- Konzentration. Tendenziell kommt es zu einem Anstieg der Vitamin A- Konzentration von einer Gruppe zur nächsten. Die höchsten Konzentrationen finden sich dann bei den hämodialysierten Diabetikern. Diese Ergebnisse sind erklärbar, wenn man bedenkt, dass Retinol (Vitamin A) im Serum an das Retinol- bindende Protein (RBP) gebunden ist. RBP ist an der Freisetzung und dem Transport des Retinols aus der Leber beteiligt. Die Konzentrationen an RBP korrelieren mit der Serum Vitamin A- Konzentration (Jaconi et al., 1995). RBP ist ein niedrig molekulares Protein (21 kDA). Diese werden normalerweise durch glomeruläre Filtration ausgeschieden. Bei Niereninsuffizienz ist die glomeruläre Filtration nun eingeschränkt und die niedrig molekularen Protein werden folglich nicht mehr filtriert. Die Folge ist ein Anstieg des RBP im Serum (Mogielnicki et al., 1971 und Berggard et al.,1970) und mit ihm die Vitamin A- Konzentration. Denkbar ist auch eine Akkumulation des Retinols durch Veränderungen in dessen oxidativer Verstoffwechslung. Diese Möglichkeit wurde von DeBevere (DeBevere et al., 1981) untersucht und ausgeschlossen. Auch die Korrelation zwischen Vitamin A und der GFR für die nicht- dialysierten Diabetiker zeigt: je schlechter die Nierenfunktion, desto höher die Vitamin A- Konzentration im Serum. Eine Notwendigkeit zur Vitamin A- Supplementation bei chronisch niereninsuffizienten Diabetikern scheint somit nicht gegeben zu sein.

Ondreicka et al. und Anzulovich et al. zeigten eine Korrelation zwischen der Vitamin A-Konzentration des Serums und Malondialdehyd (Ondreicka et al.,1998 und Anzulovich et al., 2000). Diese Beobachtung konnten wir weder für unsere hämodialysierten, noch für unserer nicht- dialysierten Patienten bestätigen. Die Vitamin A- Konzentration der hämodialysierten Patientengruppe zeigt eine Korrelation mit der Vitamin E – Konzentration. Für die nicht dialysierten Patienten besteht zusätzlich noch eine Korrelation mit GSH, Homocystein und dem totalen antioxidativen System.

7.6. Totales antioxidatives System

Das totale antioxidative System umfasst eine ganze Reihe intra- und extrazellulärer Enzyme und Moleküle, die in ihrer Gesamtheit eine entscheidende Rolle beim Schutz des Organismus vor dem Angriff durch ROS darstellt.

Unsere Ergebnisse zeigen eine Konzentration des totalen antioxidativen Systems (TAS), die für alle Gruppen im Normalbereich liegen. Bei den prädialysierten Gruppen 3-5 gibt es keinen Unterschied in der medianen Konzentration. Erst wenn die GFR auf Werte unter 20 ml/min fällt (Gruppe 2) kommt es zu einem signifikanten Anstieg der medianen TAS- Konzentration. Bei den hämodialysierten Patienten kommt es dann noch einmal zu einem Anstieg der TAS. Dieses Ergebnis wird weitgehend bestätigt durch Jackson et al. (Jackson et al.,1995) und Annuk et al. (Annuk et al., 2001), die zeigen konnten, dass nicht dialysierte CRF- Patienten, im Vergleich zu gesunden Kontrollgruppe, keine unterschiedlichen Konzentrationen in der antioxidativen Kapazität aufweisen.

Obwohl die Ergebnisse der Messung des GSH- Gehalts in Leukozyten gezeigt hat, dass es dort zu einer Verminderung des antioxidativ wirkenden Glutathion in Abhängigkeit vom Ausmass der Nierenfunktionseinschränkung kommt, scheint die Gesamtheit der antioxidativen Mechanismen im Plasma nicht vom vermehrten oxidativen Stress beeinflusst zu sein. Für diese Theorie sprechen auch die Ergebnisse der medianen Vitamin E und A – Konzentrationen im Plasma. Die Vitamin E- Konzentration des Plasmas zeigt keine Veränderungen zwischen den Gruppen. Die Vitamin A- Konzentration steigt sogar von einer Gruppe zur anderen tendenziell leicht an. Die Diskrepanz könnte auch ihre Ursache in der Tatsache haben, dass gerade Leukozyten auch von vermehrtem oxidativen Stress betroffen sind. Leukozyten produzieren im Rahmen des „respiratory burst“ bei Aktivierung massiv Radikale und sind daher auch als einer der ersten Zellen von den Einwirkungen der Radikalen betroffen. Dieser Effekt ist an einem Absinken der Konzentration an reduziertem Glutathion in Leukozyten zu sehen, während weitergehende Schädigungen (z. B. Lipidperoxidation; siehe MDA) durch die reaktiven Sauerstoffspezies von anderen antioxidativen Mechanismen des totalen antioxidativen Systems relativ gut abgefangen werden.

7.7. C- reaktives Protein und Albumin

Unsere Ergebnisse zeigen den höchsten CRP- Spiegel für die hämodialysierten Patienten. Der Median dieser Gruppe liegt bei 7,5mg/l und damit deutlich über dem Normalwert von 5,0 mg/l. Unsere prä- Dialyse Patienten liegen mit dem Median ihres CRP- Spiegels alle innerhalb des physiologischen Bereichs. Zwischen den Gruppen konnte kein signifikanter Konzentrationsunterschied gezeigt werden. Dennoch fällt auf, dass es von einer Gruppe zur anderen mit abnehmender Nierenfunktion zu einem Anstieg des CRP im Serum kommt. Pecoits- Filho et al. konnten in ihrer Arbeit diesen Trend bestätigen. Sie fanden einen signifikanten Anstieg des CRP- Median von einer Gruppe Patienten mit einer GFR von >6,5ml/min zu einer zweiten Gruppe mit einer GFR <6,5ml/min (Pecoits- Filho et al., 2003).

Ridker et al. (Ridker et al., 1997) konnten zeigen, dass erhöhte CRP- Spiegel eine Vorhersage über zukünftige Herzinfarkte und ischämische Hirninfarkte erlauben. Maseri et al. (Maseri et al., 1997) bestätigten eine starke Korrelation zwischen dem CRP- Spiegel und dem Ausmaß der atherosklerotischen Veränderungen. Die Autoren postulieren eine direkte Verbindung zwischen dem CRP- Spiegel und der Schwere des atherosklerotischen Prozesses.

Aufgrund dieser Erkenntnisse stellt sich nun die Frage, wie es zu dieser Zunahme des CRP- Levels bei abnehmender Nierenfunktion und den über den Normalwert erhöhten CRP- Spiegel bei Hämodialyse- Patienten, kommt. Die von uns beobachtete Tendenz eines ansteigenden CRP- Spiegels bei prä- Dialyse Patienten legt den Verdacht nahe, dass auch von der Dialyse unabhängige Faktoren für einen Anstieg des CRPs verantwortlich sind.

Die Rolle der Niere im Zytokin- Metabolismus wurde von Hession et al. (Hession et al.,1987) entdeckt. Das Tamm- Horsefall Glycoprotein der Niere reguliert die Aktivität solch potenter Zytokine wie IL-1 und TNF- a, die an der Stimulation der hepatischen CRP- Synthese beteiligt sind. Diese Entdeckung lässt den Schluss zu, dass eine verminderte Nierenfunktion zu einer verminderten Clearance und damit einer Akkumulation dieser Zytokine führt. Die Folge ist eine anhaltende Stimulation der CRP- Synthese. Panichi et al. (Panichi et al.,2000) sprechen von einer verminderten renalen Clearance des C-reaktiven Proteins selbst. Die abnehmende Nierenfunktion wäre damit entscheidenden Faktor des zunehmenden proinflammatorischen Status bei der Urämie.

Mehrere Studie zeigen, dass proinflammatorische Cytokine in prä-dialysierten urämischen Patienten, aber auch in Dialyse-Patienten erhöht sind. (Herbelin et al., 1991 und Pereira et al., 1994). Die Urämie *per se* scheint einen persistierenden proinflammatorischen Zustand zu verursachen.

Auch andere, nicht dialyse-abhängige Faktoren, werden als Ursache eines zunehmenden Entzündungszustandes bei Urämie diskutiert. Eine abnehmende Nierenfunktion führt zur Akkumulation von Stoffen, die die Entzündungsreaktion verstärken können.

Zu diesen so genannten endogenen Faktoren gehören:

- ? Angiotensin II,
- ? LPS,
- ? AGEs,
- ? Lipoprotein (a) ,
- ? ox-LDL etc.

Diese Faktoren sind in der Lage, freie Sauerstoffradikale (O_2^-) zu bilden. Oxidativer Stress stimuliert Zellen, vor allem das Endothel, IL-6, den wichtigsten Aktivator der hepatischen CRP- Synthese, zu synthetisieren (Wanner et al., 2002)

Den höchsten CRP- Spiegel weisen in unserer Studie die Patienten der Hämodialyse-Gruppe auf. Der Median (7,5mg/l) liegt deutlich über dem Normalwert von 5,0mg/l. Außer den oben genannten nicht dialyse-abhängigen Ursachen eines erhöhten CRP- Spiegels kommen bei Hämodialyse Patienten noch eine Reihe von dialysebedingter Ursachen hinzu, die diesen deutlich erhöhten CRP- Wert erklären helfen:

- ? Eine Monozytenaktivierung bei Kontakt mit der Dialysemembran (Zaoui et al., 1994)
- ? durch Kontakt mit Lipopolysacchariden auf der Membran werden Zellen stimuliert, vermehrt Zytokine auszuschütten und die Entzündungskaskade in Gang zu setzen (Lonnemann et al., 1990).

Als weitere Faktoren werden diskutiert:

- ? Bioinkompatible Dialysemembranen (Schouten et al., 2000)
- ? Rückfiltration unsteriler Dialysatflüssigkeit (Panichi et al., 2000), aber auch
- ? der vaskuläre Zugang (Kaysen et al., 1997) und
- ? unerkannte Infekte, wie sie gerade bei Diabetikern gehäuft vorkommen (Quereshi et al., 1998).

In unserer Studie konnte weder für unserer Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz noch für die Hämodialyse- Patienten eine Korrelation zwischen CRP und Serum-Albumin nachgewiesen werden. Der Median der Albuminkonzentration liegt für alle Gruppen im normalen Bereich. Allerdings ist eine Tendenz erkennen, dass der S-Albumin-Spiegel von Gruppe zu Gruppe abfällt. Diese Beobachtung eines sinkenden Albuminspiegels bei zunehmendem CRP- Spiegel passen zu den Beobachtungen von Ortega et al., Panichi et al. und Stenvinkel et al., die eine zunehmende Hypoalbuminämie und Zeichen einer zunehmenden Akute-Phase- Antwort bei sich verschlechternder Nierenfunktion zeigen konnten. (Ortega et al., 2002; Panichi et al., 2000 und Stenvinkel et al., 1999). Eine Korrelation zwischen der GFR und Albumin besteht aber nicht.

Proinflammatorische Zytokine (Interleukine und TNF- α) scheinen eine Akute- Phase- Antwort der Leber, mit ansteigenden CRP- Werten und sinkender Albumin- Synthese, zu verursachen. Möglicherweise ist eine noch deutlichere Entzündung nötig, um eine Korrelation zwischen Albumin und CRP nach zu weisen.

Die enge Beziehung zwischen dem CRP- Metabolismus und oxidativem Stress wurde bereits oben beschrieben. Bei unseren Untersuchungen konnten wir aber keine Korrelationen zwischen CRP und Malondialdehyd oder HbA_{1c}, als Markern des oxidativen Stress finden. Auch eine Korrelation zwischen CRP und Markern der antioxidativen Abwehr (TAS, Vitamin E, Glutathion) waren nicht nachzuweisen.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass es einen Zusammenhang zwischen zunehmender inflammatorischer Aktivität (bei abnehmendem S-Albumin) und sich verschlechternder Nierenfunktion bei diabetischer Nephropathie gibt: Die Ursachen sind vielfältig und werden in der Literatur noch diskutiert. Die Entzündungsreaktion scheint jedoch bereits vor der Dialyse einzusetzen.

Unsere Ergebnisse untermauern die Hypothese, dass die Nieren in der Clearance und Inaktivierung inflammatorischer Mediatoren eine entscheidende Rolle spielen. Weitere Studien sind notwendig um die näheren Zusammenhänge zu klären.

7.8. Homocystein, Vitamin B6, B12 und Folsäure

Viele Studien der letzten Jahre haben sich mit Hyperhomocysteinämie bei chronischer und terminaler Niereninsuffizienz beschäftigt (Oshi et al., 2000; Parson et al., 2002; Tamura et al., 1998 und Hong et al., 1998). Auslöser war die Rolle des Homocysteins in der Pathogenese der Arteriosklerose. Homocystein gilt heute als eigenständiger atherogener Risikofaktor.

Die Auswirkungen kardiovaskulärer Komplikationen gehören bei Patienten mit chronischer und terminaler Niereninsuffizienz zu den größten Problemen. Kunz et al. (Kunz et al., 1999) dokumentierten bei 48% ihrer dialysepflichtigen Patienten mindestens ein kardiovaskuläres Ereignis. Moustapha et al. (Moustapha et al., 1998) dokumentieren bei 33% ihrer Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz und einer Hyperhomocysteinämie ein kardiovaskuläres Ereignis in der Anamnese. Betroffen sind vor allem hämodialysierte Patienten und Patienten mit diabetischer Nephropathie, denn der Diabetes mellitus gilt selbst auch als eigenständiger Risikofaktor für die vorzeitige Atherosklerose.

Betrachtet man nun die Homocysteinspiegel bei den Patienten unserer Studie sieht man, dass eine Hyperhomocysteinämie bereits bei einer moderater Niereninsuffizienz (ab Gruppe 4 = GFR <50 ml/min) besteht.

Insgesamt lagen 79,1% aller Patienten der Gruppen 2-5 über dem physiologischen Level von <12µmol/l. Außerdem fanden wir einen fortschreitenden Anstieg des Homocysteins mit abnehmender Nierenfunktion. Parson et al. (Parson et al., 2002) fanden ähnliche Ergebnisse. Die Ursachen eines erhöhten Homocysteins bei chronischer Niereninsuffizienz bleiben weiter unklar. Eine verminderte Exkretion scheint nicht die Ursache zu sein. Brattstrom et al. beschreiben eine renale Rückresorption des Homocysteins (Brattstrom et al., 1995). Bostom et al. unterstützen diese Hypothese nach Studien an Nieren von Ratten (Bostom et al., 1995). Die Ursache hoher Homocystein-Konzentrationen wird eher in einem gestörten renalen Metabolismus des Homocysteins liegen (Guttormsen et al., 1997).

Beide Remethylierungsenzyme, die Methionin-Synthase und die Betain-Homocysteine Methyltransferase kommen in höherer Aktivität in der Niere vor.

Eine Hyperhomocysteinämie tritt also bereits bei Patienten mit moderater chronischer Niereninsuffizienz auf. Die höchsten Spiegel jedoch wurden bei den Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz (Hämodialyse) gemessen. So lag der Median der Hämodialyse- Patienten deutlich über der Norm. 90,5% der hämodialysierten Diabetiker hatten unphysiologische Werte. Oshi et al. (Oshi et al., 2000) bestätigt diese Ergebnisse. Sie fanden bei 87% ihrer hämodialysierten Diabetiker einen abnorm hohen Homocysteinspiegel.

Neben den oben genannten Ursachen scheint bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz auch der relative oder absolute Vitamin B6-, Vitamin B12-, und Folsäuremangel Grund einer Hyperhomocysteinämie zu sein. Tamura et al. und Hong et al. führten diesen Mangel (inadäquater Vitamin B6 und Folsäure Status bei 70% ihrer Hämodialyse Patienten) darauf zurück, dass die wasserlöslichen Vitamine mit dem Dialysat ausgeschwemmt werden (Tamura et al., 1998 und Hong et al., 1998). Bei unseren Patienten fand sich in der Hämodialyse Gruppe der niedrigste Folsäure- und Vitamin B6-Spiegel. Allerdings befinden sich die Konzentrationen der Vitamin B6, B12-, und Folsäure-Spiegel für alle Gruppen, einschließlich der hämodialysierten Diabetiker, immer noch im physiologischen Bereich. Wir fanden negative Korrelationen für beide B- Vitamine und Folsäure mit Homocystein bei den hämodialysierten Patienten. Für die nicht- dialysierten Diabetiker wurde eine schwache inverse Korrelation ($r = -0,281$) für Vitamin B12 gefunden. Bei dieser Patientengruppe kommt es aber interessanterweise zu einer zunehmenden Verminderung der Folsäure und des Vitamin B6, mit Abnahme der Nierenfunktion, jedoch ohne signifikanten Konzentrationsunterschied zwischen den einzelnen Gruppen. Ursache dieses Trends könnte ein verminderte Bioverfügbarkeit der Vitamine mit Abnahme der Nierenfunktion sein, aber auch ein verstärkter Methionin/ Homocystein- Metabolismus, der, aufgrund eines gesteigerten Metabolismus, zu einem Abfall der Vitamin und Folsäure- Spiegel führt. Sekundär kommt es dann durch den Vitamin und Folsäure-Mangel zum Anstau von Homocystein. Denkbar ist auch ein nutritives Defizit.

Folsäure vermindert nachweislich die Homocystein- Konzentration bei Hämodialyse Patienten und Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz. Der Effekt der Folsäure könnte dabei eher von der intrazellulären als von der Serum- Folsäure- Konzentration

abhängen. Dies könnte auch die fehlende Korrelation zwischen Homocystein und Folsäure erklären. Keiner unserer Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz hatte einen Folsäure-Mangel. Dies könnte bedeuten, dass man entweder supraphysiologische Folsäure-Konzentrationen benötigt, um die „Blockade“ im Homocystein-Metabolismus (-Abbau) zu überwinden oder eben, dass die intrazelluläre Folsäure-Konzentration relevanter ist als die hier gemessene Serum-Konzentration. Die Korrelation mit Vitamin B12 wurde schon von anderen beschrieben.

Unsere Regressionsanalyse ergaben weiterhin für die Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz (Hämodialyse) keine Korrelation der Homocysteinwerte mit dem Alter oder dem Geschlecht. Auch zwischen Homocystein und MDA, CRP, HbA_{1c}, Glutathion oder TAS wurde keine Korrelation gefunden. Bei den Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz hingegen wurde eine Korrelation zwischen Homocystein und dem Alter gefunden. Die GFR und die Kreatininspiegel korreliert mit HCY. Außerdem fanden wir eine inverse Korrelation mit MDA und GSH für die dialysierten und auch die nicht-dialysierten Diabetiker.

8. Zusammenfassung und Ausblick

Studien der letzten Jahre ließen keinen Zweifel an der Tatsache, dass es zu verstärktem oxidativen Stress bei dialysierten und prä-dialysierten Patienten kommt. Oxidativer Stress potenziert gemeinsam mit anderen Faktoren das Risiko eine atherosklerotische Folgerkrankung zu entwickeln.

In dieser Arbeit sollte nun gezeigt werden, wie sich die Konzentrationen atherogener Risikofaktoren (CRPus und Homocystein), der Marker des oxidativen Stressstoffwechsels (Malondialdehyd) und Marker der antioxidativen Abwehr (Glutathion, Vitamin A, E, TAS) mit dem Stadium der Nierenfunktionseinschränkung bei diabetischer Nephropathie verändert.

Die kontinuierliche Zunahme der medianen Konzentrationen des atherogenen Risikofaktors CRPus bei gleichzeitigem Abfall des Serum- Albumin- Spiegels in Relation zur fortschreitenden Nierenfunktionseinschränkung weist, gemeinsam mit einer frühzeitig bestehenden Hyperhomocysteinämie und einer Zunahme der Homocystein- Konzentration mit Abnahme der Nierenfunktion, auf ein deutlich erhöhtes atherogenes Risiko bei diabetischer Nephropathie hin. Die Auswertung der MDA- Konzentration im Serum zeigt eine Zunahme des oxidativen Stresses erst in einem späten Stadium der nicht dialysepflichtigen Niereninsuffizienz an. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass oxidativer Stress bereits in einem frühen Stadium der diabetischen Niereninsuffizienz vorliegt, die Auswirkungen einem komplexen System aus verminderter Verfügbarkeit von Stoffwechselfsubstraten durch Nierenfunktionseinschränkung, vermehrter Synthese, Akkumulation von Stoffwechselprodukten und Elimination durch Dialyse unterliegt.

Die Ergebnisse der Untersuchung antioxidativer Mechanismen unterstützt die These komplexer, ineinander greifender Mechanismen. Die vermeintliche Diskrepanz zwischen einem kontinuierlichen Abfall der GSH- Konzentration in Leukozyten und einer stabilen Vitamin E- Konzentration, einer ebenfalls, unabhängig vom Stadium der Niereninsuffizienz, im Normbereich liegenden TAS und einer sogar über dem Normalbereich liegenden Vitamin A- Konzentration spricht für eine frühe Schädigung der Leukozyten. Diese produzieren im Rahmen des „respiratory burst“ freie Radikale und gehören zu den ersten Zellen, die selbst von der Einwirkung freier Radikaler

betroffen sind. Weitergehende oxidative Schädigungen scheinen dann effektiv durch die bestehenden antioxidativen Mechanismen abgefangen zu werden. Dies liegt wohl zum einen an den unterschiedlichen Wirkmechanismen, als auch an einem unterschiedlichen Zeitpunkt des Wirkungseintritts der antioxidativen Abwehr. Die Vermutung liegt jedoch nahe, dass die scheinbare Unausgewogenheit einer koordinierten Abwehr zur Akkumulation freier Radikaler und atherogener Mechanismen zumindest beiträgt.

Diese Studie ist nach unseren Recherchen die Erste, die in dieser Art und Weise atherogene und antiatherogene Mechanismen im Verlauf einer diabetischen Nephropathie untersucht. Aus den hier gewonnen Erkenntnissen und Grenzen unserer ergeben sich eine Vielzahl neuer Fragestellungen und Möglichkeiten weiterführender Studien:

Im nächste Schritt wäre eine Varianzanalyse, die sich damit befasst, in wie weit die einzelnen Marker sich gegenseitig beeinflussen, von Interesse. Ein Vergleich unserer Ergebnisse mit denen einer gesunden Kontrollgruppe und einer Gruppe Diabetiker ohne Nierenfunktionseinschränkung kann das erhöhte atherosklerotische Risiko in Abhängigkeit von der diabetischen Grunderkrankung klären. Studien, die entsprechende Ergebnisse von hämodialysierten und einer peritonealdialysierten Patienten vergleichen, könnten Hinweise auf den Einfluss des Dialyseverfahrens auf die Atherogenese geben.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit ergeben sich eine Vielzahl von weiteren Fragen zum Verlauf der diabetischen Nephropathie. Ein erster Schritt zur Untersuchung des Einflusses atherogener Faktoren und damit möglichen Konsequenzen in der Therapie einer fortschreitenden diabetischen Niereninsuffizienz ist gemacht.

9. Literaturverzeichnis

1. Agullò- Ortuno MT, Albaladejo MD, Parra S, Rodriguez- Manotas M, Fenollar M, Ruiz- Espejo F, et al. (2002) Plasmatic homocysteine concentration and its relationship with complications associated to diabetes mellitus. *Clinica Chim Acta* 326: 105-112
2. Alfrey AC (1994) Role of iron and oxygen radicals in the progression of chronic renal failure. *Am J Kidney Dis* 23: 183- 187
3. Allman MA, Truswell AS, Tiller DJ, Stewart PM, Yau DF et al. (1989) Vitamin supplementation of patients receiving hemodialysis. *Am J Kidney Dis* 16: 103-106
4. Altman PO, Alaupovic P (1991) Lipid and apolipoprotein profiles of uremic dyslipoproteinemia- Relation to renal function and dialysis. *Nephron* 57: 401-410
5. Annuk M, Zilmer M, Lind L, Linde T, Fellström B (2001) Oxidative stress and endothelial function in chronic renal failure (unpublished)
6. Anzulovich AC, Oliveros LB, Munoz E, Martinez LD, Giminez MS (2000) Nutritional vitamin A deficiency alters antioxidant defenses and modifies the liver histoarchitecture in rat. *J Trace Elem Exp Med* 13: 343- 357
7. Aronson D, Rayfield EJ (2002) How hyperglycemia promotes atherosclerosis: molecular mechanisms. *Cardiovasc Diabetol* 1:1
8. Aso Y, Inukai T, Tayama K, Takemura Y (2000) Serum concentrations of advanced glycation endproducts are associated with the development of atherosclerosis as well as diabetic microangiopathy in patients with type 2 diabetes. *Acta Diabetol* 37: 87- 92
9. Babior BM (1984) Respiratory burst of phagozytes. *J Clin Invest* 73: 599- 601
10. Bayes B, Pastor C, Bonal J, Junca J, Hernandez JM, Riutort N (2003) Homocysteine, C-reactive protein, lipid peroxidation and mortality in hemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 18: 106-12
11. Berggard (1970) Plasma proteins in normal human urine. In: Manuel Y, Revillard H, Beutel H, (eds) *Proteins in normal and pathological urine*. Karger, Basel pp 7- 19
12. Bhakdi S, Tozewski M, Klouche M (1999) Binding of CRP to degraded, nonoxidized LDL enhances complement activation. *Arteriscler Thromb Vasc Biol* 19: 2348-2354

13. Bliga R, Ueda N, Walker PD, Shah SV (1997) Oxidant mechanisms in chronic renal failure. *Am J Kidney Dis* 29: 465- 477
14. Bostom A, Brosnan JT, Hall B, Nadeau MR, Selhub J (1995) Net uptake of plasma homocysteine by rat kidney uptake in vivo. *Atherosclerosis* 116: 59-62
15. Bostom AG, Lathrop L (1997) Hyperhomocysteinemia in end-stage renal disease: prevalence, etiology and potential relationship to atherosclerotic outcomes. *Kidney Int.* 52:10-20
16. Brattstrom LA, Lindgren A, Israelson B, Anderson A, Hultberg B (1995) Homocysteine and cysteine- determinants of plasma levels in middle-aged and elderly subjects. *J Int Med* 236: 633- 641
17. Brosnan JT, Hall B, Selhub J, Nadeau MR, Bostom AG (1995) Renal metabolism of homocysteine in vivo. *Biochem. Soc. Trans.* 23: 470
18. Brown JC, Rosenquist TH, Monaghan DT (1998) ERK2 activation by homocysteine in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Comm* 251: 669-679
19. Brownlee M, Cerami A, Vlassara H (1988) Advanced glycolisation end-products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl J Med* 318: 1315- 1321
20. Buoncristiani U, Galli F, Rovidati S, Albertini MC, Campus C, Canestrari F (1997) Oxidative damage during hemodialysis using a vitamin E- modified dialysis membrane: A preliminary characterization. *Nephron* 77: 57- 61
21. Burton GW, Ingold KU (1989) Vitamin E as *in vitro* and *in vivo* antioxidant. *Ann NY Acad Sci* 570: 7-22
22. Cappelli G, Lucchi L, Bonucchi D, Cenci AM, Montagnani G, De Palma M, Lusvardi E (1989) Polymorphonuclear oxygen free radical production and complement activation induced by dialysis membranes as assayed in an experimental model. *Blood Purif* 7: 293- 300
23. Cebalot- Picot I, Witko- Sarsat V, Merad- Boudia M et al. (1996) Glutathione antioxidant system as a marker of oxidative stress in chronic renal failure. *Free Radic Biol Med* 21: 845- 853
24. Cermak J, Key NS, Bach RR, et al. (1993) C-reactive protein induces human peripheral blood monocytes to synthesize tissue factor. *Blood* 82: 513-520
25. Chen J, Henderson GI, Freeman GL (2001) Role of 4-hydroxynonenal in modification of cytochrome oxidase in ischemia/reperfused rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 33: 1919- 1927
26. Ciaccio M, Valenza M, Tesoriere L, Bongiorno A, Albiero R, Livrea MA (1993) Vitamin A inhibits doxorubicin- induced membrane lipid peroxidation in rat tissues in vivo. *Arch Biochem Biophys* 302: 103- 108

27. Clermont G, Lecour S, Lahet J, Siohan P, Vergely C (2000) Alteration in plasma antioxidant capacities in chronic renal failure and hemodialysis patients: a possible explanation for the increased cardiovascular risk in these patients. *Nephron* 73:187-189
28. Dasgupta A, Hussain S, Ahmad S (1992) Increased lipid peroxidation in patients on maintenance hemodialysis. *Nephron* 60: 56- 59
29. Daugherty A, Dunn JL, Rater DL, Heinecke JW (1994) Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 94: 437- 444
30. DeBevere VO, De Paepe M, De Leenheer AP, Nelis HJ, Lambert Weet al. (1981) Plasma vitamin A in hemodialysis patients. *Clin Chim Acta* 114: 249-256
31. Dennis VW, Robinson K (1996a) Homocysteinemia and vascular disease in end-stage renal disease. *Kidney International* 50:11-17
32. Dennis VW, Robinson K (1996b) Homocysteinemia and vascular disease in end-stage renal disease. *Kidney International (Suppl.)* 57:11-17
33. Drücke TB, Khoa TN, Massy ZA, Witko- Sarsat V, Lacour B, Descamp, Latscha B (2001) Role of oxidized low- density lipoprotein in atherosclerosis of uremia. *Kidney Int* 59 (78): 114- 119
34. Eaton P, Hearse DJ, Shattock MJ (2001) Lipid hydroperoxide modification of proteins during myocardial ischaemia. *Cardiovasc Res* 51: 294- 303
35. El- Rashidi FH, Al- turk WA, Stohs SJ (1984) Glutathione, glutathione reductase and glutathione S- transferase activities in erythrocytes and lymphocytes in chronic renal disease. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 44: 423-430
36. Emsley AM, Jeremy JY, Gomes GN, Angelini GD, Plane F (1999) Investigation of the inhibitory effects of homocysteine and copper on nitric oxide-mediated relaxation of rat isolated aorta. *Brit J Pharmacol* 126: 1034-1040
37. 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(1): 157- 167
38. Falcon CR, Cattaneo M, Martinelli I, Panzeri D, Mannuci PM (1994) High prevalence of hyperhomocysteinemia in patients with juvenile venous thrombosis. *Arterioscler Thromb* 14: 1080-1083
39. Fink R, Marjot DH, Clemens MR, Parsalos P, Cawood P, et al. (1986) Plasma markers of lipid peroxidation in alcoholic patients, in Rice- Evans C (eds) *Free Radicals, Cell Damage and Disease*. Richelieu Press, London, pp111- 117

40. Fiorillo C, Oliviero C, Rizutti G, Nediani C, Pacini A, Nassi P (1998) Oxidative stress and antioxidative defenses in renal patients receiving regular hemodialysis. *Clin Chem Lab Med* 36(3): 149- 153
41. Fiorina P, Lanfrdini M, Montanari A (1998): Plasma homocysteine and folate are related to arterial blood pressure in Type 2 diabetes mellitus, *Am J Hypertens* 11:1100-1107
42. Foreman JW, Wald H (1982) *Metabolism* 31: 613-617
43. Galle J, Bengen J, Schollmeyer P, Wanner C (1995) Impairment of endothelium - dependent dilation in rabbit renal arteries by oxidized lipoprotein(a)- role of oxygen- derived radicals. *Circulation* 92: 1582- 1589
44. Galle J (2001) Oxidative stress in chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 16:2135-2137
45. Galli F, Rovidati S, Chiarantini L, Campus G, Canestrari F, Buoncristiani (1998) Bioreactivity and biocompatibility of a vitamin E- modified multi-layer hemodialysis filter. *Kidney Int* 54: 580- 589
46. Galli F, Canestrari F, Buoncristiani U (1999) Biological effects of oxidant stress in hemodialysis patients: the possible roles of Vitamin E. *Blood Purif* 17: 79- 94
47. Glueck ChJ, Lang JE, Tracy T, Sieve-Smith L, Wang Y (1995) Evidence that homocysteine is an independent risk factor for atherosclerosis in Hyperlipidemic patients. *Am J Card* 75:132-136
48. Graeber JE, Slott JH, Ulane RE, Schulman JD, Stuart MJ (1982) Effect of homocysteine and homocystine on platelet and vascular arachidonic acid metabolism. *Pediatr Res* 16: 490-493
49. GrisJC, Branger B, Vecina F, Sabadani BA, Fourcade J, Schved JF (1994) Increased cardiovascular risk factors and features of endothelial activation and dysfunction in dialyzed uremic patients. *Kidney Int* 46: 807- 813
50. Grisseli M, Herbert J, Hutchinson WL (1999) C-reactive protein and complementare important mediators of tissue damage in acute myocardial infarction. *J Exp Med* 190: 1733-1739
51. Grundy SM, Howard B, Smith S, Eckel R, Redberg R, Bonow RO (2002) Prevention Conference VI: Diabetes and Cardiovascular disease- American Heart Association. *Circulation* 105(18): 2231
52. Guttormsen AB, Ueland PM, Svarstad E, Refsum H (1997) Kinetic basis of hyperhomocysteinemia in patients with chronic renal failure. *Kidney Int* 52: 495-502

53. Ha TK, Sattar N, Talwar D, Cooney J, Simpson K et al. (1996) Abnormal antioxidant vitamin and carotenoid status in chronic renal failure. *QJM* 89(10): 765- 769
54. Haaber AB, Eidemak I, Jensen T, Feldt- Rasmussen B, Strandgard S (1995) Vascular endothelial cell function and cardiovascular risk factors in patients with chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 5: 1581- 1584
55. Hajjar KA, Mauri L, Jaciovina AT (1998) Tissue plasminogen activator binding to the annexin II tail domain. Direct modulation by homocysteine. *J Biol Chem* 273: 9987-9993
56. Halliwell B (1987) Oxidants in human disease: some new concepts. *FASEB J* 1: 358- 364
57. Halliwell B, Zhao K, Whiteman M (1999) Nitric oxide and peroxynitrite. The ugly, uglier and the not so good- a personal view of recent controversies. *Free Radic Res* 31: 651- 669
58. Harris E (1992) Regulation of antioxidant enzymes. *FASEB J* 6: 2675- 2683
59. Hasslacher C (2002) Diabetische Nephropathie- Praxis- Leitlinien der Deutschen Diabetes- Gesellschaft. *Diabetes und Stoffwechsel* 11(2):17- 19
60. Heinecke JW, Rosen H, Suzuki LA, Chait A (1987): The role of sulfur-containing amino-acids in superoxide production and modification of low density lipoprotein by arterial smooth muscle cell *J Biol Chem* 262: 10098- 10103
61. Heinloth A, Heermeier K, Raff U, Wanner C, Galle J (2000) Stimulation of NADPH oxidase by oxidized LDL induces proliferation of human vascular endothelial cells. *J Am Soc Nephrol* 11: 1819- 1825
62. Heinrich J, Schulte H, Schönfeld R (1995) Association of variables of coagulation, fibrinolysis and acute-phase with atherosclerosis in coronary and peripheral arteries and those arteries supplying the brain. *Thromb Haemostas* 73: 347-379
63. Hendra TJ, Wickens DG, Dormandy TL, Yudkin JS (1991) Platelet function and conjugated diene concentrations in diabetic and non-diabetic survivors of acute myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 25: 676- 683
64. Henning BF, Tepel M, Graefe U, Zideck W (2000) Homocysteine and its metabolites in chronic renal insufficiency and effect of a vitamin replacement. *Med. Klinik* 95(9) 477- 81
65. Herbelin A, Urena P, Nguyen AT (1991) Elevated circulating level of interleukin-6 in patients with chronic renal failure. *Kidney Int* 39 : 954- 960
66. Herold G (2000) Innere Medizin- Eine vorlesungsorientierte Darstellung 2000.pp 503-504

67. Hession C, Decker JM, Sherblom AP (1987) Uromodulin (Tamm-Horsfall glycoprotein): A renal ligand for lymphokines. *Science* 237: 1479- 1484
68. Himmelfarb J, Stenvinkel P, Ikizler TA, Hakim RM (2002) The elephant in uremia: Oxidant stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia. *Kidney Int* 62(5): 1524-1532
69. Hoffman MA, Lalla E, Lu Y (2001) Hyperhomocysteinemia enhances vascular inflammation and accelerates atherosclerosis in a murine model. *J Clin Invest* 107: 675-83
70. Hong SY, Yang DH, Chang SK (1998) Plasma homocysteine, vitamin B6, vitamin B12 and folic acid in end- stage renal disease during low- dose supplementation with folic acid. *Am J Nephrol* 18: 367- 72
71. Hultberg B, Anderson A, Isaksson A (1997) The cell damaging effects of low amounts of homocysteine and copper ions in human cell line cultures are caused by oxidative stress. *Toxicology* 123: 33-40
72. Hultquist M, Hegbrandt J, Nilsson- Thorell C, Lindholm T, Nilsson P et al. (1997) Plasma concentrations of vitamin C, vitamin E and /or malondialdehyd as markers of oxygen free radical production during hemodialysis. *Clin Nephrol* 47(1): 37- 46
73. Ichkawa I, Kiyama S, Yoshioka T (1994) Renal antioxidant enzymes: their regulation and function. *Kidney Int* 45: 1-9
74. Ishimura E, Shoji T, Emoto M, Motoyama K, Shinohara K, et al (2001) Renal insufficiency accelerates atherosclerosis in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Kidney Dis* 38 (4 suppl 1): 186- 190
75. Ismail N, Becker B, Strzelczyk P, Ritz E (1999) Renal disease and hypertension in non- insulin- dependent diabetes mellitus. *Kidney Int* 53: 1-28
76. Jackson P, Loughrey CM, Lightbody JH, McNamee PT Young IS (1995) Effect of hemodialysis on total antioxidant capacity and serum antioxidants in patients with chronic renal failure. *Clin Chim* 41: 1135- 1138
77. Jaconi S, Rose K, Hughes G, Saurat J- H Siegenthaler G (1995) Characterizations of two post- translationally processed forms of human serum retinol- binding protein: altered ratios in chronic renal failure. *J Lipid Res* 36: 1247- 1253
78. Janero DR (1990) Malondialdehyde and thiobarbituric acid- reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med* 9: 515-540
79. Jialal I, Devaraj S, Venugopal SK (2002) Oxidative stress, inflammation, and diabetic vasculopathies: the role of alpha- tocopherol therapy. *Free Radic Res* 36: 1331- 1336

80. Junger P, Massy ZA, Nguyen-Khoa T, Fumeron C, Labrunie M, Lacour M et al. (1997) Incidence and risk factors of atherosclerotic cardiovascular accidents in predialysis chronic renal failure patients: A prospective study. *Nephrol Dial Transplant* 12: 2597- 2602
81. Kannel WB, McGee DL (1979) Diabetes and cardiovascular disease: The Framingham Study. *JAMA* 241: 2035- 2038
82. Kario K, Matsuo T, Kobayashi H et al. (1995) High lipoprotein(a) levels in chronic hemodialysis patients are closely related to the acute phase reaction. *Thromb Haemost* 74: 1020-1024
83. Kaysen GA, Stevenson FT, Depner TA (1997) Determinants of albumin concentration in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 29: 658- 668
84. Kawagishi T, Nishizawa Y, Konishi T, Kawasaki K, Emoto M et al. (1995) High- resolution ultrasonography in evaluation of atherosclerosis in uremia. *Kidney Int* 48: 820- 826
85. Keany JF, Simon DI, Freedman JE (1999) Vitamin E and vascular homeostasis: implications for atherosclerosis. *FASEB J* 13: 965- 975
86. Kreutzig T (1994) Stoffwechsel der Aminosäuren, in Kreutzig T (ed.) *Biochemie*. Jungjohann Verlagsgesellschaft, Stuttgart, pp.67-71
87. Kunz K, Petitjean P, Lisri M, Chantrel F, Koehl C (1998) Cardiovascular morbidity and endothelial dysfunction in chronic hemodialysis patients: is homocysteine the missing link? *Nephrol Dial Transplant* 14: 1934-1942
88. Laakson M (1999) Hyperglycemia and cardiovascular disease in type 2 diabetes. *Diabetes* 48: 937- 942
89. Lagrand WK, Niessen HWM, Wolbink GJ (1997) C-reactive protein colocalizes with complement in human hearts during acute myocardial infarction. *Circulation* 95: 97-103
90. Lentz SR, Sadler JE (1991) Inhibition of thrombomodulin surface expression and protein C activation by the thrombogenic agent homocysteine. *J Clin Invest* 88: 1906-1914
91. Lindner A, Charra B, Sherrard DJ, Scribner BH (1974) Accelerated atherosclerosis in prolonged maintenance hemodialysis. *N Engl J Med* 290: 697- 701
92. Levy AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N (1999) For the modification of diet in renal disease study Group: a more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. *Ann Int Med* 130: 462- 470

93. Litwin M, Abuaba M, Wawer ZT, Grenda R, Kuryt T et al. (2001) Folate, vitamin B12 and sulfur amino acid levels in patients with renal failure. *Pediatr Nephrol* 16: 127-132
94. London GM, Drücke TB (1997) Atherosclerosis and arteriosclerosis in chronic renal failure (editorial review). *Kidney Int* 51: 1678- 1695
95. Lonnemann G, Haubitz M Schindler R (1990) Hemodialysis-associated induction of Cytocines. *Blood Purif* 8: 214- 222
96. Loughrey CM, Young IS, Lightboy JH, McMaster D, Mc Namee PT, Trimble ER (1994) Oxidative stress in hemodialysis. *J Q Med* 87: 679- 683
97. Lucchi L, Banni S, Botti B, Cappelli G, Medici G, Melis MP et al. (1993) Conjugated diene fatty acids in patients with chronic renal failure: Evidence of increased lipid peroxidation? *Nephron* 65: 401- 409
98. Lunec J, Halloran SP, Whit AG, Dormandy TL (1981) Free-radical oxidation (peroxidation) products in serum in serum and synovial fluid in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 8: 233- 245
99. Löffler, Petrides (1997) Stoffwechsel der Aminosäuren. In Löffler, Petrides (eds) *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer Verlag, Würzburg pp 546 – 552
100. Maillard L (1912) Action des acides aminés sur les sucres : formation des mélanoidines par voie méthodique. *C R Hebd Seances Acad Sci* 154: 66- 68
101. Makita Z, Radoff S, Rayfield EJ, Yang Z, Skolnik E (1991) Advanced glycolisation products in patients with diabetic nephropathy. *NEJM* 325 (12): 836- 842
102. Merzouk S, Hichami A, Madani S, Merzouk H, Berrouiguet AY (2003) Antioxidant status and levels of different vitamins determined by high-performance liquid chromatography in diabetic subjects with complications. *Gen Physiol Biophys* 22(1): 15- 27
103. Meydani M (1995) Vitamin E. *Lancet* 345: 170- 175
104. Mimic- Oka J, Simic T, Djukanovic L, Stefaowski J, Ramic Z (1992) Glutathione and its associated enzymes in peripheral blood cells in different stages of chronic renal insufficiency. *Amino Acids* 2: 215- 225
105. Miyata M, Ueda Y, Shinzato T, Ida Y, Tanaka S, et al. (1996) Accumulation of albumin-linked and free- form pentosidine in the circulation of uremic patients with end- stage renal failure: renal implication in the pathophysiology of pentosidine. *J Am Soc Nephrol* 7: 1198- 1206
106. Miyata M, Inagiri R, Ashi K, Yamada Y, Horie K, Sakai H, et al. (1998) Generation of protein carbonyls by glycooxidation and lipoxidation reactions with autoxidation products of ascorbic acid and polyunsaturated fatty acids. *FEBS Lett* 437: 24- 28

107. Mimic- Oka J, Simic T, Djukanovic L, Reljic Z, Davicevic Z (1999) Alterations in plasma antioxidant capacity in various degrees of chronic renal failure. *Clin Nephrol* 51(4): 233-241
108. Miyata M, Fu MX, Kurokawa K, van Ypersele de Strihou C, Thorpe SR, Baynes JW (1998) Autoxidation of both carbohydrates and lipids are increased in uremic plasma: is there oxidative stress in uremia? *Kidney Int* 54: 1290-1295
109. Miyata M, Kurokawa K, van Ypersele de Strihou C, Thorpe SR, Baynes JW (2000) Relevance of oxidative and carbonyl stress to longterm uremic complications. *Kidney Int* 58 (76): 120- 125
110. Mogielnicki RP, Waldmann TA, Strober W (1971) Renal handling of low molecular weight proteins. *J Clin Invest* 50: 901-909
111. Mooradian AD (1991) Increased serum conjugated dienes in elderly diabetic patients. *J Am Geriatr Soc* 39: 571- 574
112. Moustapha A, Naso A, Nahlawi M, Gupta A, Arheart KL, et al. (1998) Prospective study of hyperhomocysteinemia as an adverse cardiovascular risk- factor in end- stage renal disease. *Circulation* 97: 138-141
113. Moustapha A, Gupta A, Robinson K, Arheart K, Jacobson DW et al. (1999) Prevalence and determinants of hyperhomocysteinemia in hemodialysis and peritoneal dialysis *Kidney Int.* 55 (4): 1470 ff.
114. Mølgaard J, Malinow MR, Lassvik C, Holm AC, Upson B, Olsson AG (1992) Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for intermittent claudication. *J Int Med* 231:273-279
115. Mydlik M, Dersziova K, Ahlers I, Hildebrand T, Takac M (1977) Vitamin A and lipids in serum during long term dialysis program. *Z Urol Nephrol* 70 (5): 339- 344
116. Mydlik M, Dersziova K, Rasz O, Sipulova A, Lovasova E, Pertovicova J (2001) A modified dialyzer with vitamin E and antioxidant defense parameters. *Kidney Int* 59 (78): 144- 147
117. Nagakomi A, Freedmann SB, Geczy CL (2000) Interferon- γ and lipopolysaccharide potentiate monocyte tissue factor induction by c-reactive protein: relationship with sex, age, and hormone replacement treatment. *Circulation* 101: 1785-1791
118. Nguyen- Khoa T, Massay ZA, Witko-Sarsat V, Thevenin M, Touam M, Lambrey G, et al. (1999) Critical evaluation of plasma and LDL oxidant-trapping potential in hemodialysis patients. *Kidney Int* 56 (2): 747- 753

119. Nourooz-Zadeh J, Tajaddini-Sarmadi J, Mc Carthy S, Betteridge DJ, Wolff Simon P (1995) Elevated levels of authentic plasma hydroperoxides in NIDDM. *Diabetes* 44: 1054-1058
120. Nygard O, Vollset SE, Refsum H, Stensfold I, Tverdal A (1995) Total plasma homocysteine and cardiovascular risk profile: the Hordaland Homocysteine Study. *JAMA* 274: 1526-1533
121. Odetti P, Fogarty J, Sell Dr, Monnier VM (1992) Chromatographic quantitation of plasma and erythrocyte pentosidine in diabetic and uremic subjects. *Diabetes* 41: 153- 159
122. Oishi K, Nagake Y, Yamasaki H, Fukuda S, Ichikawa H, Ota K, Makino H (2000) The significance of serum homocystein levels n diabetic patients on hemodialysis. *Nephrol Dial Transplant*, 15 (6): 851- 855
123. Ondreicka R, Beno I, Cerna O (1998) Relation between levels of vitamin C, E, A and beta- carotene and actiuvity of antioxidant enzymes in the blood. *Brattisl Lek Listy* 99: 250- 254
124. Ono K (1984) Hypervitaminosis A toxicity in regular hemodialysis patients. *Trans Am Soc Artif Intern Organs* 30: 40- 43
125. Ortega O, Rodruguez I, Gallar P, Cerreno A, Ortiz M, Espejo B, Jiminez J, et al. (2002) Significance of high C- reactive protein levels in pre-dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 17: 1105- 1109
126. Panichi V, Migliori M, De Pietro S (2000) Plasma C-reactive protein in hemodilysis patients: A cross-sectional, longitudinal clinical survey. *Blood Purif*18: 30-36
127. Park L, Raman KG, Lee KJ, Lu Y, Ferran LJ, et al. (1998) Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproducts. *Nature Med* 4: 1025- 1031
128. Parson DS, Reaveley DA, Pavitt DV, Brown EA (2002) Relationship of renal function to homocysteine and lipoprotein (a) level: the frequency of the combination of both risk factors in chronic renal impairment. *Am J Kidney Dis* 40 (5): 916-23
129. Pastor MC, Sierra C, Bonal J, Teixido J (1993) Serum and erythrocyte tocopherol in uremic patients: effect of hemodilaysis versus peritoneal dialysis. *Am J Nephrol* 13:238- 243
130. Paul JL, Sall ND, Soni T, Poignet JL, Lidenbaum A, Man NK, Moatti N, et al. (1993) Lipid peroxidation abnormalities in hemodialysed patients. *Nephron* 64: 106- 109
131. Pecoits-FilhoR, Heimbürger O, BaranyP, Suliman M, Fehrman- Ekholm I, et al. (2003) Associations between circulating inflammatory markers and residual renal fuction in CRF paients. *Am J Kidney Dis* 41(6): 1212- 1218

132. Perera BJG, Shapiro L, King AJ (1994) Plasma levels of IL-8, TNF- α and their specific inhibitors in undialyzed chronic renal failure, CAPD and hemodialysis patients. *Kidney Int* 45: 890-896
133. Peterson JC, Spence JD (1998) Vitamins and progression of atherosclerosis in hyperhomocyst(e)inaemia. *Lancet* 351: 263
134. Porrini M, Simonetti P, Testolin G, Gentle MG, Manna GM, Fellin G, D'Amico GD (1989) Vitamin E in plasma of patients with chronic renal insufficiency. *Nephron* 53: 387- 388
135. Quereshi AR, Alvestrand A, Danielson A (1998) Factors predicting malnutrition in hemodialysis patients: a cross-sectional study. *Kidney Int* 53: 773- 782
136. Resch K– L, Till U, Riezler R(1996) Homocystein- Störung des Vitamin B6-, B12-, und Folsäuremetabolismus. Ponte Press
137. Richard MJ, Arnaud J, Jurkovitz C, Hachache T, Meftahi T et al. (1991) Trace elements and Lipid peroxidation abnormalities in patients with chronic renal failure. *Nephron* 57 :10- 15
138. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ (1997) Inflammation, aspirin and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med* 336: 973-979
139. Ridker PM, Glynn RJ, Hennenkens CH (1998) C-reactive protein adds to the predictive value of total and HDL cholesterol in determining risk of first myocardial infarction. *Circulation* 97: 2007-2011
140. Ritz E, Rychlik I, Locatelli F, Halimi S (1999) End- stage renal failure in type 2 diabetes: a medical catastrophe of worldwide dimensions. *Am J Kidney Dis* 34 (5): 795- 808
141. Ritz E, Orth SR (1999 B) Nephropathy in patients with Type 2 diabetes mellitus. *NEJM* 341(15): 1127-1133
142. Robinson K, Arheart K, Refsum H, Brattstrom L, Boers G, Ueland P, et al. (1998) Low circulating folate and vitamin B6 concentrations: risk factors for stroke, peripheral vascular disease and coronary artery disease, European COMAC Group. *Circulation* 97: 437-443
143. Ross R (1999) Atherosclerosis- An inflammatory disease. *N Engl J Med* 340: 115- 126
144. Sack MN, Rader DJ (1994) Oestrogen and inhibition of oxidation of low-density lipoproteins in postmenopausal women. *Lancet* 343: 269-270
145. Salomon RG, Kaur K, Podrez E, Hoff HF, Krushinsky AV, Sayre LM (2000) HNE-derived 2-pentylpyrroles are generated during oxidation of LDL, are more

- prevalent in blood plasma from patients with renal disease of atherosclerosis, and are present in atherosclerotic plaques. *Chem Res Toxicol* 13: 557- 564
146. Sato Y, Hotta N, Sakamoto N, Matsuoka S, Oshini N, Yagi K (1979) Lipid peroxide level in plasma of diabetic patients. *Biochemistry* 28
 147. Schettler V, Wieland E, Methe H, Schuff- Werner P, Müller GA (1998) Oxidative stress during dialysis: effect of free radical scavenging enzyme (FRSE) activities and Glutathione (GSH) concentration in granulocytes. *Nephrol Dial Transplant* 13: 2588- 2593
 148. Schouten WEM, Grootema MPC, van Houte A-J (2000) Effects of dialyser and dialysate on the acute phase reaction in clinical bicarbonate dialysis. *Nephrol Dial Transplant* 15: 379- 384
 149. Seghrouchini I, Draï J, Bannier E, Riviere J, Calmard P, Garcia I, Orgiazzi J, Revol A (2002) Oxidative stress parameters in type1, type 2 and insulin treated type 2 diabetes mellitus: insulin treatment efficiency. *Clin Chim Acta* 321: 89- 96
 150. Selhub J (1999) Homocysteine metabolism. *Annual Rev. of Nutrition* 19: 217-246
 151. Sell DR, Monnier VM (1990) End- stage renal disease and diabetes catalyze the formation of a pentose- derived crosslink from aging human collagen. *J Clin Invest* 85: 380- 384
 152. Selvaraj N, Bobby Z, Das AK, Ramesh R, Koner BC (2002) An evaluation of level of oxidative stress and protein glycation in nondiabetic undialyzed chronic renal failure patients. *Clin Chim Acta* 324(1): 45- 50
 153. Sethi D, Muller BR, Brown EA(1988) Elevated serum levels of C-reactive protein in hemodialysis patients with dialysis arthropathy. *Nephrol Dial Transplant* 3: 269- 271
 154. Shimoike T, Inoguchi T, Umeda F, Nawata H, Kawano K, Ochi H (2000) The meaning of serum levels of advanced glycation end products in diabetic nephropathy. *Metabolism* 49(8): 1030- 1035
 155. Siems W, Quast S, Carluccio F, Wiswedell, Hirsch D, Augustin W, Hampl H, Riehle M, Sommerburg O (2002) Oxidative stress in chronic renal failure as a cardiovascular risk factor. *Clin Nephrol* 58 (1):12-19
 156. SPACE (2000) *Lancet* 356: 1213- 1218
 157. Starkebaum G, Harlan JM (1991) Endothelial cell injury due to copper-catalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine. *J Clin Invest* 77: 1370-1376

158. Stein G, Richter G, Funfstuck R, Sperschneider H, Gunther K (1983). Serum vitamin E levels in patients with chronic renal failure. *Int J Artif Organs* 6: 285-287
159. Stein G, Sperschneider H, Koppe S (1985 B) Vitamin levels in chronic renal failure and need for supplementation. *Blood Purif* 3(1): 52- 62
160. Stenvinkel P, Heimbürger O, Paulter F et al. (1999) Strong association between malnutrition, inflammation and atherosclerosis in chronic renal failure. *Kidney Int* 55: 1899- 1911
161. Sutton- Tyrell K, Bostom A, Selhub J, Zeigler- Johnson C (1997) High homocysteine levels are independently related to isolated systolic hypertension in older adults. *Circulation*, 96:1745-1749
162. Suzukawa M, Ayaori M, Shige H, Hisada T, Ishikawa T, Nakamura H (1998) Effect of supplementation with Vitamin E on LDL oxidizability and prevention of atherosclerosis. *Biofactors* 7: 51- 54
163. Taccone- Gallucci M, Giardini O, Lubrano R, Mazzarella V, Bandino D, Kmashan S, et al. (1987) Red blood cell membrane lipid peroxidation in continuous ambulatory peritoneal dialysis patients. *Am J Nephrol* 6: 92- 95
164. Taccone- Gallucci M, Giardini O, Leebrano R, Mazzarell O, Meloni CM, Elli M, Tozzo C, Strolighi L, et al. (1987) Red blood cell lipid peroxidation in predialysis chronic renal failure. *Clin Nephrol* 27: 238- 241
165. Tamura T, Bergmann SM, Morgan SL (1998). Homocysteine, B vitamins and vascular-access thrombosis in patients treated with hemodialysis. *Am J Kidney Dis*, 32: 475-481
166. Tietze F (1969) Enzymatic Method for Quantitative Determination of Nanogram Amounts of Total and Oxidized Glutathione: Applications to Mammalian Blood and other Tissues. *Anal Biochem* 27: 502- 522
167. Torzewski J, Torzewski M, Bowyer DE, et al. (1998) C-reactive protein frequently colocalizes with the terminal complement complex in the intima of early atherosclerotic lesions of human coronary arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18: 1386-1392
168. Touam M, Zingraff J, Jungers P, Chadeaux VB, Druecke T, Massay ZA (1999). Effective correction of hyperhomocysteinemia in hemodialysis patients by intravenous folic acid and pyridoxine therapy. *Kidney Int.* 56: 2292-2296
169. Triolo L, Lippa S, Oradei A, De Sole P, Mori R (1994) Serum coenzyme Q10 in uremic patients on chronic hemodialysis. *Nephron* 66: 153-156
170. Upchurch GR, Welch GN, Fabian AJ, et al. (1997) Homocyst(e)ine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 272:17012-17017

171. Upston JM, Terentis AC, Stocker R (1999) Tocopherol- mediated peroxidation of lipoproteins: Implications for vitamin E as a potential atherogenic supplement. *FASEB J* 13: 977- 994
172. Van- Guldner C, Jansen MJ, De-mer K, Donker AJ (1999) Effect of folic acid and betaine on fasting and postmethionin- loading plasma homocysteine and methionin levels in chronic hemodialysis patients. *J Int Med* 245: 175-183
173. Vessby J, Basu S, Mohsen R, Berne C, vessby B (2002) oxidative stress and antioxidant status in type 1 diabetes mellitus. *J Int Med* 251: 69- 76
174. Voutilainen S, Morrow J, Roberts J (1999) Enhanced in vivo lipid peroxidation at elevated plasma total homocysteine levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 1263-1266
175. Wanner C, Metzger T (2002) C-reactive protein a marker for all-cause and cardiovascular mortality in hemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 17(8): 29- 32
176. Ward RA, McLeish KR (1995) Polymorphonuclear leukocyte oxidative burst is enhanced in patients with chronic renal insufficiency. *J Am Soc Nephrol* 5: 1697-1672
177. Weiss MF (2001) Vitamin E for Dialysis Patients. *Seminars in Dialysis* 14(1) 71- 72
178. Welch G, Loscalzo J (1998) Homocysteine and atherothrombosis (Review). *N Engl J Med* 338: 1042-1050
179. Werb R, Clark WF, Lindsay RM, Jones EOP, Linton AL (1979) Serum vitamin A levels and associated abnormalities in patients on regular dialysis treatment. *Clin Nephrol* 12: 63- 68
180. Westhuyzen J, Adams CE, Flemming SJ (1995) Evidence for oxidative stress during in vitro hemodialysis. *Nephron* 70: 49- 54
181. Wingard DL, Barret- Connor E (1995) Heart disease and diabetes, In: Harris MI, Cowie CC, Stern MS, Boyko EJ, Reiber GE, Benett PH (eds.): *Diabetes in America*. 2nd edn., Washington: National Institutes of Health 429-448
182. Wollensen F, Brattström L, Refsum H, Ueland PM, Berglund L, et al. (1999) Plasma total homocysteine and cysteine in relation to glomerular filtration rate in diabetes mellitus. *Kidney Int.* 55(3): 1028ff.
183. Wratten ML, Tetta C, Ursini F, Sevanian A (2000) Oxidant stress in hemodialysis: prevention and treatment strategies. *Kidney Int* 58(76): 126- 132
184. Zaoui P, Hakim RM (1994) The effects of the dialysis membrane on cytokine release. *J Am Soc Nephrol* 4: 1711- 1718

185. Zimmer PZ, McCarty DJ, De Couren MP (1997) The global epidemiology of non- insulin- dependent diabetes mellitus and the metabolic syndrome. *J Diabets Complications* 11: 60- 68
186. Zimmermann J, Herrlinger S, Pruy A, Metzger T, Wanner C (1999) Inflammation enhances mortality in hemodialysis patients. *Kidney Int* 55: 648-658
187. Yagi K (1976) A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem Med* 15(2): 212-216

10. Danksagung

Meinem wissenschaftlichen Betreuer und Doktorvater Herrn PD Dr. Martin Kuhlmann möchte ich für die freundliche Überlassung des Themas und seinen kompetenten fachlichen Rat danken.

Mein Dank geht auch an Prof. Dr. Köhler, durch dessen Einsatz die Verwirklichung dieser Arbeit überhaupt erst möglich wurde.

Frau Martina Wagner hat mir mit ihrer langjährigen Erfahrung und viel Geduld die Grundlagen der Labortechniken näher gebracht.

Mit Frau Heike Schorr entstand eine sehr produktive Zusammenarbeit. Ich möchte ihr meinen besonderen Dank aussprechen, weil sie mich sehr sachkundig und in anregenden Gesprächen durch diese Arbeit begleitete.

Grossen Dank gebührt meinen Eltern, deren Hilfe weit über ihre stete Bereitschaft, mir ein offenes Ohr entgegen zu bringen, hinausgeht und ganz besonders meinem Mann, der mich in jeder Phase der Arbeit begleitete, mich stets ermunterte und viel Geduld zeigte. Deine Disziplin, Fleiß und Bescheidenheit sind mir stets ein Vorbild.

11. Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Julia Müller

Geburtsname: Makowski

Geboren: 28. April 1975 in Würzburg

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: verheiratet

Anschrift: Öhlbühler Str.7
66914 Waldmohr

Telefon: 06373 - 891974

Schulbildung

1981 - 1985: Grund- und Volksschule Giebelstadt

1985 - 1995: Städt. Schönborn Gymnasium, Würzburg

Abschluss: Abitur

Studium

1996 - 2003: Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg und der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Abschluss: Staatsexamen (Note: gut)

seit April 2003: Assistenzärztin am Bundesknappschaftskrankenhaus Sulzbach, Fachabteilung Augenheilkunde

Sonstiges

September 1992 - Juli 1993: Auslandsaufenthalt an der Churchville Chili Senior High-School, Rochester, NY, USA

Dezember 2002 - Februar 2003: PJ-Tertial in Augenheilkunde an der Wayne State University Detroit, Michigan, USA