

Aus der Klinik und Poliklinik für
Kinder- und Jugendmedizin
des Zentrums für Frauen-, Kinder- und Jugendmedizin
am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Ärztlicher Direktor Prof. Dr. K. Ullrich

Messungen von Endothelfunktion und oxidativem Stress zur Beurteilung des
Arterioskleroserisikos bei Kindern mit chronischer Niereninsuffizienz und bei
Kindern mit korrigierten Herzfehlern

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Nikki Janneke Rink

aus Düsseldorf

Hamburg, 2005

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 16.02.2006

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. A. Kohlschütter

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter: Prof. K. Ullrich

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter: Prof. D. E. Müller-Wiefel

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis	6
1. Einleitung	7
1.1. Thematik	7
1.2. Endotheliale Dysfunktion und oxidativer Stress	7
1.3. Die nicht-invasive ultrasonographische Endothelfunktionsmessung	11
1.4. Darstellung der Parameter der pro- und antioxidativen Balance	13
1.4.1. Malondialdehyd als Marker der Lipidperoxidation	14
1.4.2. Carbonylgruppen in oxidativ geschädigten Proteinen	16
1.4.3. Radikalresistenz von Erythrozyten	16
1.4.4. Tocopherole als Antioxidantien	16
1.4.5. Coenzym Q ₁₀ als Antioxidans	18
1.4.6. Sulfhydrylgruppen als Radikalfänger	19
1.4.7. Vitamin C als Antioxidans	20
1.4.8. Harnsäure	21
1.4.9. Total Radical-trapping Antioxidant Parameter (TRAP)	22
1.4.10. Homocystein	22
1.4.11. Cholesterin	23
1.4.12. Antikörper gegen oxidiertes LDL	23
1.5. Chronische Niereninsuffizienz und kardiovaskuläres Risiko	24
1.6. Angeborene Herzvitien nach operativer Korrektur und kardiovaskuläres Risiko	25
1.7. Fragestellung der Arbeit	27
2. Probanden, Material und Methoden	29
2.1. Patienten und Kontrollpersonen	29
2.2. Material und Methoden	31
2.2.1. Endothelfunktionsmessung	31
2.2.2. Probengewinnung zur Messung der laborchemischen Parameter im Blut	32
2.2.3. HPLC-Analytik zur Bestimmung von Malondialdehyd	33
2.2.4. Enzymimmunoassay zur Bestimmung der Carbonylgruppen in Proteinen	35
2.2.5. ABAP-Hämolysetest	41

2.2.6.	HPLC-Analytik zur Bestimmung der lipophilen Antioxidantien	43
2.2.7.	Photometrische Bestimmung von Sulfhydrylgruppen	45
2.2.8.	Photometrische Bestimmung von Harnsäure	47
2.2.9.	Photometrische Bestimmung von Vitamin C	47
2.2.10.	Bestimmung des Total Radical-trapping Antioxidant Parameter	48
2.2.11.	Enzymimmunoassay zur Bestimmung von Homocystein	50
2.2.12.	Photometrische Bestimmung von Cholesterin und Triglyzeriden	50
2.2.13.	Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von humanen Antikörper gegen oxidiertes LDL im Serum	51
2.3	Statistische Auswertung	51
3.	Ergebnisse	53
3.1.	Ergebnisse der Endothelfunktionsanalysen	53
3.2.	Ergebnisse der laborchemischen Parameter im Blut	54
3.2.1.	Malondialdehydkonzentration im Plasma	54
3.2.2.	Carbonylgruppengehalt der Proteine im Plasma	56
3.2.3.	Radikalresistenz der Erythrozyten	57
3.2.4.	Konzentration der Tocopherole im Plasma	58
3.2.5.	Coenzym Q ₁₀ -Konzentration im Plasma	60
3.2.6.	Konzentration der Sulfhydrylgruppen im Plasma	62
3.2.7.	Harnsäurekonzentration im Plasma	63
3.2.8.	Vitamin C-Konzentration im Plasma	64
3.2.9.	TRAP-Konzentration im Plasma	65
3.2.10.	Homocysteinkonzentration im Plasma	66
3.2.11.	Gesamtcholesterinkonzentration im Plasma	67
3.2.12.	Triglyzeridkonzentration im Plasma	68
3.2.13.	Antikörper gegen oxidiertes LDL im Serum	69
3.3.	Korrelationen zwischen den Parametern der Endothelfunktion und den laborchemischen Parameter	70
3.3.1.	Korrelationen für alle Probanden	70
3.3.2.	Korrelationen für die Kontrollgruppe	83
3.3.3.	Korrelationen für die Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ohne und mit Peritonealdialyse	83

4. Diskussion	86
4.1. Allgemeine Zusammenhänge zwischen Parametern der Endothelfunktion und den verschiedenen laborchemischen Parametern im Blut	86
4.2. Vergleich von Parametern der Endothelfunktion und laborchemischen Parametern bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ohne und mit Peritonealdialyse	91
4.3. Vergleich von Parametern der Endothelfunktion und laborchemischen Parametern bei Patienten mit operativ korrigierten Herzfehlern	95
5. Zusammenfassung	96
6. Literaturverzeichnis	98
7. Anhang	105

Abkürzungsverzeichnis

ADMA	Asymmetrisches Dimethylarginin
Asc• ⁻	Ascorbyl-Radikal
AscH ⁻	Ascorbat (Ascorbinsäure, Vitamin C)
cGMP	zyklisches Guaninmonophosphat
CoQ	Ubichinon
CoQH ₂	Ubichinol
CrP	C-reaktives Protein
DHA	Dehydroascorbat
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EAD	Endothelabhängige Dilatation
eNOS	endotheliale NO-Synthase
GSH	Glutathion
GSNO	S-Nitrosoglutathion
LDL	LDL-Cholesterin
L-NMMA	N-monomethyl-L-Arginin
LO ₂ •	Lipidperoxyradikal
LPO	Lipidperoxidation
MDA	Malondialdehyd
NADH/NAD ⁺	Nikotinamidadenindinukleotid (reduzierte/oxidierte Form)
NADPH/NADP ⁺	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat (reduzierte/oxidierte Form)
NEAD	Nicht-endothelabhängige Dilatation
NO	Stickstoffmonoxid
ox-LDL	oxidiertes Low-density-Lipoprotein
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
RO•	Alkoxyradikal
RO ₂ •	Peroxyradikal
ROS	reactive oxygen species (Reaktive Sauerstoffspezies)
SOD	Superoxiddismutase
TBARS	Thiobarbitursäure reaktive Substanzen
UrH• ⁻	Uratradikal

1. Einleitung

1.1. Thematik

Die Gefäßerkrankung Arteriosklerose und ihre systemischen Folgen wie Herzinfarkt und Schlaganfall bleiben bislang auch im 21. Jahrhundert die Hauptursache der Bevölkerungsterblichkeit in Westeuropa und Nordamerika. Bereits im Kindesalter lassen sich erste Gefäßveränderungen nachweisen (Berenson et al. 1998), die sich im Laufe der Jahre als irreversible Ablagerungen in den Gefäßen manifestieren können (Stary et al. 1994, 1995). Somit steht die Frage nach einer rechtzeitigen Erkennung und Therapie dieser sehr frühen und noch reversiblen Veränderungen bei Risikopersonen immer mehr im Vordergrund. Im Kindesalter sind neben den Fettstoffwechselstörungen vor allem Patienten und Patientinnen* mit nephrologischen und kardiologischen Erkrankungen einem erhöhten Arterioskleroserisiko ausgesetzt. Das erste Indiz für eine beginnende, aber noch präsymptomatische Arteriosklerose kann eine endotheliale Dysfunktion sein, eine Störung der molekularphysiologischen Abläufe an den Endothelzellen der Arterienwände (Cai und Harrison 2000). Zur Messung der Endothelfunktion am Patienten hat sich die nicht-invasive ultrasonographische Messung der arteriellen, stimulierten Vasodilatation international etabliert (Adams et al. 1999). An der Entstehung von endothelialer Dysfunktion und späterer Arteriosklerose ist auf molekularer Ebene oxidativer Stress entscheidend mitbeteiligt (Mügge 1998). Oxidativer Stress entsteht durch ein Ungleichgewicht von pro- und antioxidativ wirkenden Substanzen, wodurch es zu einem erhöhtem Vorhandensein von freien Radikalen kommt, die aufgrund ihrer Aggressivität Zellsysteme und Proteine schädigen und deren Dysfunktion hervorrufen können.

1.2. Endotheliale Dysfunktion und oxidativer Stress

Das Gefäßendothel, eine das Lumen der Gefäße auskleidende einschichtige Zellreihe, erfüllt mit seiner Oberfläche von ca. 7 m^2 essentielle metabolische und regulatorische Funktionen. Seitdem die physiologischen Funktionen, zu denen auch die Kontrolle des Gefäßtonus gehört, zunehmend entdeckt werden, wird es auch als ein großes und

* Aus Gründen der Lesbarkeit wird im Folgenden darauf verzichtet, männliche Formen der Personenbezeichnungen durch weibliche zu ergänzen. Soweit möglich, werden geschlechtsneutrale Formulierungen benutzt. Wenn sich Personenbezeichnungen allein in der männlichen Form finden, sind dennoch stets sowohl Frauen wie Männer gemeint.

komplexes, endokrines Organ bezeichnet. Es ist darüber hinaus an der primären Hämostase, der Blutkoagulation und Fibrinolyse, der Thrombo- und Leukozyten-Interaktionen an den Gefäßwänden und dem Lipoproteinmetabolismus beteiligt und es präsentiert die Histokompatibilitätsmerkmale (Vapataalo et al. 2001). Eine intakte Endothelfunktion ist die Voraussetzung für einen normalen Blutfluß und ein reagibles Gefäßbett. Sie begünstigt durch ein komplexes Zusammenspiel von humoralen Mediatoren die Vasodilatation, Antithrombose und Fibrinolyse. Außerdem verhindert das intakte Endothel die Leukozytenadhäsion. Zu den am Endothel gebildeten und/oder dort wirkenden Substanzen gehören zum Beispiel Stickstoffmonoxid, Prostazykline, Thromboxan, Endothelin, Angiotensin, EDHF (endothelium-derived hyperpolarizing factor), freie Radikale und Bradykinin. Endothelzellen sind zudem Wirkort vieler Pharmaka und auch toxischer Substanzen, wie Alkohol und Nikotin.

Stickstoffmonoxid (NO), früher als Endothelium-derived relaxing factor (EDRF) bezeichnet, gilt als die potenteste vasodilatative Substanz und spielt eine wesentliche Rolle bei der Regulation des Gefäßtonus. NO wird von der endothelialen NO-Synthase (eNOS) aus L-Arginin, Sauerstoff (O_2) und NADPH in den Endothelzellen synthetisiert. Es diffundiert über die Zellmembranen hinweg um in den glatten Muskelzellen der Gefäße die Guanylatcyclyase zu aktivieren und so die Relaxation der Muskelzellen hervorzurufen (Abb. 1.1). Ferner wirkt NO auf Leuko- und Thrombozytenadhäsion sowie -aggregation inhibierend. Darüber hinaus gibt es Beweise für den hemmenden Einfluss von NO auf die Proliferation von glatten Muskelzellen (Mügge 1994). Mit diesem Wirkungsprofil erfüllt NO eine wichtige anti-arteriosklerotische Funktion an intakten Endothelzellen.

Die Interaktionen der molekularen Mechanismen am Endothel können durch freie Radikale und oxidativen Stress gestört werden. Freie Radikale sind hochreaktive, kurzlebige Moleküle mit einem oder mehreren ungepaarten Elektronen, die ständig im Organismus entstehen und schnell und aggressiv mit anderen Molekülstrukturen reagieren können. Die im Körper entstehenden freien Radikale sind zum größten Teil toxische Sauerstoffderivate (ROS = reactive oxygen species) wie Superoxidanionen ($O_2^{\cdot-}$), Hydroxylradikale (OH^{\cdot}), Peroxylradikale (RO_2^{\cdot}), Alkoxyradikale (RO^{\cdot}) oder Hydroperoxyradikale (HO_2^{\cdot}). Physiologischerweise entstehen sie bei enzymatischen Reaktionen des Atmungskettenkomplexes in der inneren Mitochondrienmembran, bei Lipooxygenase- und Cyclooxygenasereaktionen im Rahmen des Arachnoidonsäuremetabolismus oder bei

Cytochrom p450-Reaktionen sowie einer Reihe weiterer Enzymreaktionen. An den Endothelzellen sind im besonderen drei weitere Enzymsysteme bekannt, die als Quellen einer erhöhten Produktion toxischer Sauerstoffderivate (ROS) beschrieben werden: Xanthinoxidase, endotheliale NO-Synthase (eNOS) und NADH/NADPH-Oxidase (Cai et al. 2000). ROS haben in geringen Konzentrationen gut beschriebene Funktionen als Signalmoleküle, indem sie Zellaktivitäten wie die Zytokinausschüttung und die Zellproliferation steuern. In höheren Konzentrationen wirken sie dagegen toxisch auf Zellfunktionen, da durch oxidative Veränderungen von Proteinen, Lipidperoxidation und DNS-Abbrüchen die normalen Zellaktivitäten gestört werden (Lum et al. 2001).

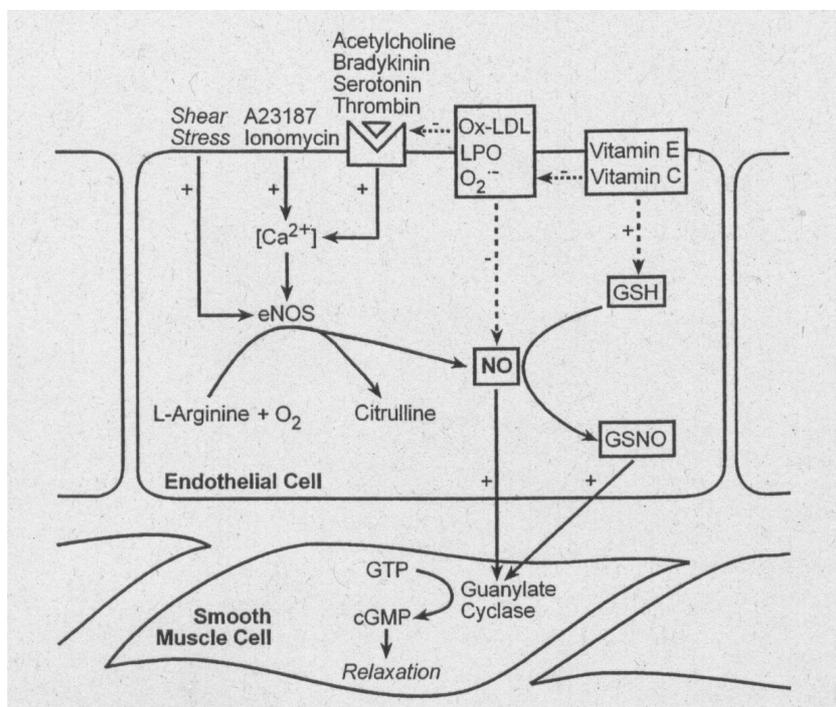


Abb. 1.1: Interaktion von Oxidantien und Antioxidantien mit Stickstoffmonoxid (NO) an den Endothelzellen (Carr und Frei 2000)

LPO=Lipidperoxidation, ox-LDL=oxidiertes LDL, GSH=Glutathion, GSNO=Nitrosoglutathion, $O_2^{\cdot-}$ =Superoxidation, eNOS=endotheliale NO-Synthase

Physiologischerweise stehen den im Körper entstehenden freien Radikalen eine Reihe antioxidativer Schutzmechanismen gegenüber um Schäden der Zellintegrität zu verhindern oder zu reparieren. Hierzu zählen als antioxidative Enzyme die Superoxiddismutase, Katalase, Glutathionperoxidase und Glutathionreduktase. Vitamin C, α -Tocopherol, γ -Tocopherol, Coenzym Q_{10} (Ubichinol-10) und Sulfhydrylgruppen zählen zu den wichtigsten nicht-enzymatischen Antioxidantien. Wenn allerdings eine chronisch erhöhte

Produktion an reaktiven Sauerstoffspezies oder andere pathophysiologische Veränderungen die Balance stören und diese durch die vielfältigen Regulationsmechanismen nicht ausreichend kompensiert werden kann, kommt es zu einem Überwiegen der schädigend wirkenden freien Radikale. Dies wird dann als oxidativer Stress bezeichnet.

Es wird angenommen, dass vor allem die verminderte Bioverfügbarkeit von NO eine Schlüsselrolle in der Pathophysiologie der endothelialen Dysfunktion einnimmt. Neben einer herabgesetzten Expression oder Aktivität des NO-produzierenden Enzyms, der endothelialen NO-Synthase (eNOS), können auch reaktive Sauerstoffspezies wie Superoxidanionen oder oxidiertes LDL zu einem beschleunigtem Abbau von NO führen und so die Konzentration von NO an Endothelzellen vermindern. Superoxidanionen reagieren mit NO zu Peroxynitrit (OONO^\cdot), welches, wenn es nicht zu harmlosem Nitrat protoniert wird, als starkes Oxidans wirken kann (Mügge 1998). Oxidiertes LDL-Cholesterin (ox-LDL) und Lipidperoxidation (LPO) in Zellmembranen unterbrechen vermutlich die durch Agonisten wie Acetylcholin, Bradykinin oder Thrombin induzierte NO-Produktion (Abb.1.1). Stehen der endothelialen NO-Synthase nicht ausreichend Cosubstrate wie L-Arginin oder Tetrahydrobiopterin zur Verfügung, beginnt die eNOS sogar selbst Superoxidanionen und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zu generieren und es kommt zu einer dramatischen Zunahme von oxidativen Prozessen (Cai und Harrison 2000). Antioxidantien können diese Reaktion verhindern oder abschwächen. So „spart“ ausreichend vorhandenes Vitamin C das intrazelluläre Glutathion (GSH), dieses wiederum kann NO in Form des biologisch aktiven S-Nitrosoglutathion (GSNO) stabilisieren und erneut freisetzen (Carr et al. 2000).

Eine endotheliale Dysfunktion ist ein frühes Merkmal von vaskulären Komplikationen, weil es die zur Arteriosklerose führenden Pathomechanismen begünstigt. An Endothelzellen mit gestörter molekularer Physiologie schreitet die Proliferation von Myozyten, die Aggregation von Thrombozyten mit Ausbildung von Mikrothromben, die Ablagerung von Lipiden in der Intima-Gefäßschicht sowie die vermehrte Produktion von Kollagen, Elastin und Mucopolysacchariden und deren Einlagerung in den intra- und extrazellulären Räumen wesentlich schneller voran als an Endothelzellen mit intakter Funktion.

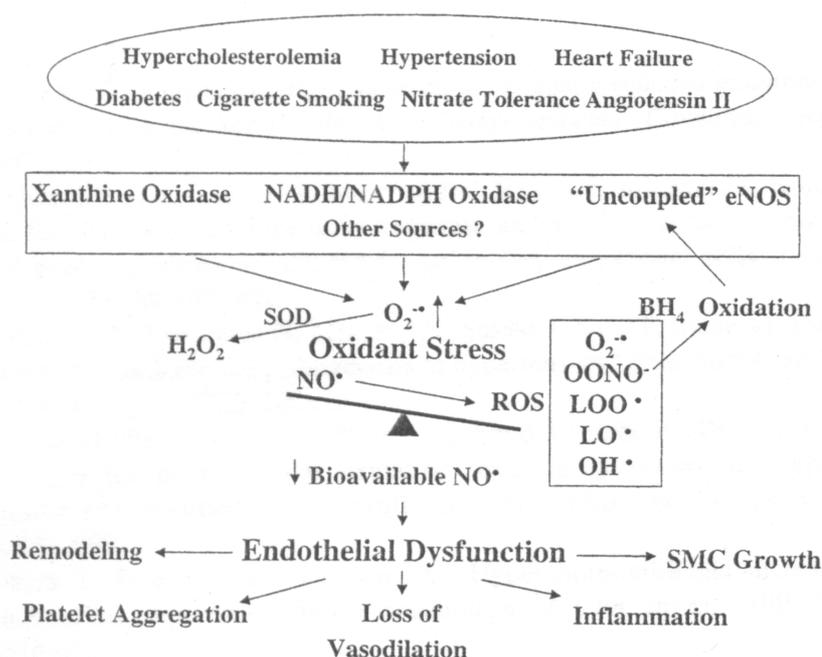


Abb. 1.2: Mechanismen für die durch oxidativen Stress induzierte endotheliale Dysfunktion (Cai und Harrison 2000)

SOD=Superoxiddismutase, ROS=reaktive Sauerstoffderivate, BH_4 =Tetrahydrobiopterin, SMC=glatte Muskelzelle, eNOS=endotheliale NO-Synthase.

1.3. Die nicht-invasive ultrasonographische Endothelfunktionsmessung

In der nicht-invasiven Beurteilung der endothelialen Funktion *in vivo* hat sich die von Celemajer et al. (1992) erstmals beschriebene Messung der peripheren arteriellen Gefäßdilatation als Antwort auf physiologische oder pharmakologische Stimuli durchgesetzt. Mittels externer, hochauflösender Ultraschallsonographie lässt sich der Gefäßdurchmesser von peripheren Arterien (A. brachialis oder A. femoralis) vor und nach einem Stimulus messen. Im Falle der endothelabhängigen Dilatation (EAD) werden nach Aufpumpen einer Blutdruckmanschette für 4,5 Minuten durch die darauffolgende Hyperämie Scherkräfte hervorgerufen, welche die endotheliale NO-Synthase aktivieren und so die endothelabhängige NO-Produktion provozieren (Johannides et al. 1995). Es wird angenommen, dass bei Patienten, die eine verminderte Dilatationsfähigkeit zeigen, aufgrund einer verringerten NO-Bioverfügbarkeit eine Endothelschädigung vorliegt. Um sicherzustellen, dass es sich bei einer verminderten EAD auch um eine reduzierte NO-Bereitstellung des Endothels handelt, wird als Kontrolle die nicht-endothelabhängige

Dilatation (NEAD) bestimmt. Diese reaktive Änderung des Gefäßdurchmessers auf extern zugeführtes Nitroglycerin (Glyceroltrinitrat) führt zu einer endothelunabhängigen NO-Freisetzung. Diese nicht-invasive Methode zur Messung der endothelialen Funktion konnte sich aufgrund der Entwicklung von Ultraschallgeräten mit immer höherer Auflösung durchsetzen. Zuvor wurden die Endothelfunktionsmessungen invasiv durchgeführt, wie erstmals von Ludmer et al. (1986) beschrieben. In quantitativen Angiographien wurde der Gefäßdurchmesser der Koronararterien vor und nach einer Acetylcholin-Infusion, die zu einer NO-Freisetzung am Endothel und damit zur Dilatation der Arterien führt, gemessen. Da bei Erwachsenen eine enge Korrelation von koronarer, also invasiv, und peripher gemessener Endothelfunktion bestätigt wurde (Anderson et al. 1995), hat sich vor allem bei Kindern die auch in der vorliegenden Untersuchung angewandte externe, periphere Messung aufgrund ihrer Nichtinvasivität durchgesetzt (Raitakari und Celermajer 2000).

Studien zur Bewertung der Präzision von sonographischen Endothelfunktionsmessungen ergaben eine gute Reproduzierbarkeit der Befunde bei verschiedenen Untersuchern. Es zeigte sich allerdings eine große Variabilität der Befunde in verschiedenen Studien, so dass allgemein empfohlen wird, immer Doppelmessungen durchzuführen und den Mittelwert zu bilden. In klinischen Studien zur Evaluation von Therapieversuchen wird eine Verbesserung der endothelabhängigen (EAD) sowie der nicht-endothelabhängigen Dilatation (NEAD) von 5% - 13% als positives Ergebnis interpretiert (Sorensen et al. 1995, Hardie et al. 1997). Streng zu beachtende Eigenschaften der Tests sind:

1. Es besteht eine Abhängigkeit der EAD von der Länge der Okklusionszeit und die maximale Dilatation wird erst nach 4,5 Minuten erreicht.
2. Die NEAD steigt mit steigender Nitroglycerindosis an und erreicht ihre maximale Dilatation bei einer Dosis von 200 µg Nitroglycerin.

Nur bei Beachtung dieser Testeigenschaften ist mit konsistenten und reproduzierbaren Ergebnissen zu rechnen (Leeson et al. 1997). Die Nachteile dieser Methode liegen vor allem in der Schwierigkeit der Ausführung der Ultrasonographie. Die Untersucher müssen genügend Erfahrung im Umgang mit der Ultraschalldiagnostik und ausreichende Übung haben (Raitakari und Celermajer 2000). In diesem Sinne wurde die vorliegende Untersuchung auch als Pilotprojekt zur Etablierung der nicht-invasiven Endothelfunktionsmessung in der Abteilung für Kinderkardiologie an der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf genutzt.

Bei Erwachsenen mit kardiovaskulären Risikofaktoren wie Rauchen, Adipositas, Diabetes mellitus und Hypertonus konnte ein Zusammenhang zwischen diesen Risikofaktoren und einer prävalenten Verschlechterung der endothelabhängigen Vasodilatation in vielen Studien belegt werden (Celermajer et al. 1992, 1993; Clarkson 1996; Iiyama et al. 1996). Auch bei den folgenden Erkrankungen mit bekanntem erhöhten Arterioskleroserisiko wurde bereits im Kindesalter eine endotheliale Dysfunktion nachgewiesen: Familiäre Hypercholesterinämie (Sorensen et al. 1994), Diabetes mellitus Typ I (Clarkson et al. 1996), positive familiäre Anamnese für eine vorzeitige koronare Herzkrankheit (Clarkson et al. 1997), niedriges Geburtsgewicht (Leeson et al. 1997), Homocystinurie (Celermajer et al. 1993) und chronische Niereninsuffizienz (Kari et al. 1997). Reproduzierbare Zusammenhänge von beeinträchtigter EAD und laborchemischen Parametern im Plasma konnten in pädiatrischen Kollektiven noch nicht hergestellt werden; es wurde jedoch über eine negative Korrelation mit LDL-Cholesterin, Lipoprotein(a) und Apoprotein B berichtet (Slyper 2004).

Tabelle 1.1: Nicht-invasive Endothelfunktionsmessungen bei gesunden pädiatrischen Kontrollkollektiven in der Literatur

Studie	Gefäßdurchmesser [mm]	EAD [%]	NEAD [%]
Celermajer et al. 1992	5,0 (0,2)	9,0 (1,0)	13,0 (1,0)
Kari et al. 1997	2,9 (0,1)	8,6 (0,6)	23,3 (1,2)
Dhillon et al. 1996	3,0 (0,4)	9,4 (3,5)	21,7(5,4)
Järvisalo et al. 2002	3,1 (0,3)	7,7 (4,0)	11,5 (4,5)
Charakida et al. 2005	2,7 (0,5)	8,1 (2,5)	-

Mittelwert (Standardabweichung)

EAD= endothelabhängige Dilatation, NEAD= nicht-endothelabhängige Dilatation

1.4 Darstellung der Parameter der pro- und antioxidativen Balance

Zur Beurteilung des pro-/antioxidativen Gleichgewichtes können im Blut verschiedene Parameter bestimmt werden. Da es aufgrund ihrer molekularen Eigenschaften sehr schwierig ist, freie Radikale direkt zu messen, wird oft auf die Messung verschiedener, durch freie Radikale veränderter Moleküle zurückgegriffen, um das Ausmaß an stattgefundenen oxidativen Prozessen abzuschätzen. Als Marker für eine abgelaufene Lipidperoxidation werden Malondialdehyd und die Plasmakonzentration der Antikörper gegen oxidativ verändertes LDL-Cholesterin herangezogen. Zur Beurteilung der Proteinoxidation dient die Messung der Carbonylgruppen an Proteinen. Die Evaluierung

der antioxidativen Schutzmechanismen im Blut kann anhand der Bestimmung verschiedener Antioxidantien wie Vitamin E (Tocopherole), Vitamin C, reduziertem Coenzym Q₁₀, Sulfhydrylgruppen und Harnsäure oder Parametern wie der Radikalresistenz der Erythrozyten oder dem Total Radical-trapping Antioxidant Parameter (TRAP) erfolgen. Homocystein und Cholesterin zählen zu den unabhängigen kardiovaskulären Risikofaktoren. Anhand des pro- und antioxidativen Profils lässt sich das individuelle Ausmaß an oxidativem Stress einer Person feststellen.

1.4.1 Malondialdehyd als Marker der Lipidperoxidation

Malondialdehyd (MDA) entsteht im Körper als ein Produkt der durch freie Radikale ausgelösten Lipidperoxidation. Mehrfach ungesättigte Fettsäuren, die sich in Zellmembranen aller Zellen und Zellorganellen sowie in Lipoproteinen befinden, können durch freie Radikale angegriffen werden. Wenn freie Radikale ausreichend Reaktivität besitzen, um aus einer Methylgruppe der Fettsäuren ein H-Atom abzuziehen, zerfallen die Fettsäuren oxidativ. Durch Initiation und Propagation entstehen hierbei zunächst konjugierte Diene, die unter aeroben Bedingungen Peroxylradikale bilden. Peroxylradikale können wiederum mit weiteren Fettsäuren reagieren und so eine Kettenreaktion auslösen, oder sich zu Hydroperoxiden formieren. Diese Hydroperoxide zerfallen zu Aldehyden, Epoxiden, Alkoholen oder weiteren Radikalen.

Malondialdehyd zählt zu den hierbei entstehenden Aldehyden und kann als einer der Marker der Lipidperoxidation betrachtet werden. In Abhängigkeit vom pH-Wert kann freies MDA in der Keto-, Enol- oder Enolatanion-Form vorliegen (Abb. 1.4). Bei physiologischem pH überwiegt zu 99% die Enolatanionform. MDA kann Schäden an Proteinen hervorrufen sowie mit der DNS reagieren und mutagen wirken (Halliwell 1999).

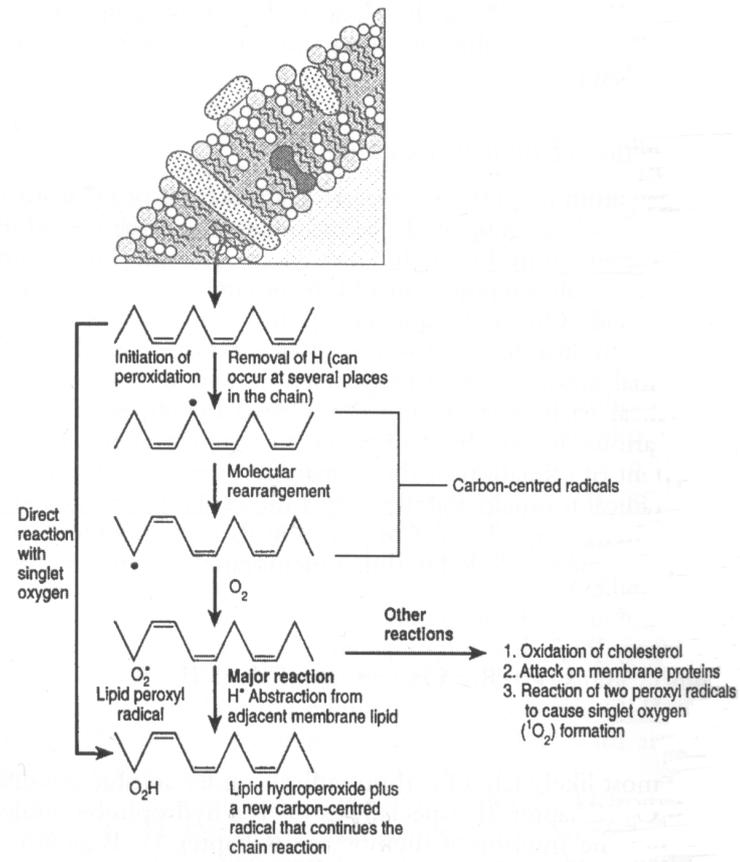


Abb. 1.3: Idealierte Präsentation von Initiation und Propagation der Lipidperoxidation (Halliwell 1999)

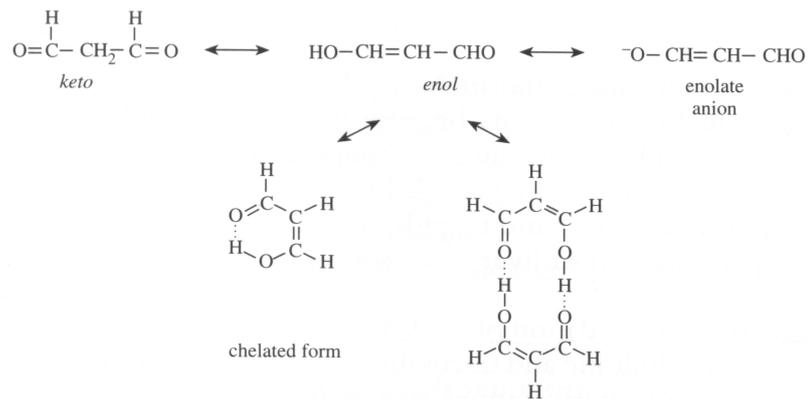


Abb.1.4: Malondialdehyd (Halliwell 1999)

1.4.2 Carbonylgruppen in oxidativ geschädigten Proteinen

Wenn Proteine oxidativem Stress ausgesetzt sind, bilden sich durch Angriff von freien Radikalen auf endständige Aminosäuren (im besonderen Histidin, Arginin, Lysin und Prolin) Carbonylgruppen. Eine Reihe weiterer Mechanismen können die Bildung von Protein-Carbonylgruppen hervorrufen: radioaktive Strahlung, Ozon, freie Metallionen wie Eisen oder Kupfer, Bindung von Aldehyden wie Malondialdehyd oder Glycoxidation. Die Konzentration von Carbonylgruppen pro Einheit Protein variiert sehr in verschiedenen Geweben. Im Plasma wird sie allgemein mit 0,4 – 1,0 nmol/mg Protein angegeben (Halliwell 1999).

1.4.3 Radikalresistenz von Erythrozyten

Die Messung der Resistenz von Erythrozyten gegenüber freien Radikalen ist von Bedeutung als Indikator für die Abwehr von oxidativem Stress auf zellulärer Ebene. Durch den Angriff radikaler Substanzen bricht, abhängig von den schon vorher stattgefundenen Attacken, die Zellmembranintegrität der Erythrozyten nach einer bestimmten Zeit zusammen und lässt das Hämoglobin aus der Zelle austreten: die Erythrozyten hämolysieren. Die Dauer in Minuten vom Zusetzen der Radikale bis zur Hämolysierung der Hälfte der Erythrozyten (H 50%) gilt als Parameter der Radikalresistenz. Die signifikante Korrelation zwischen H 50% und den absoluten α - und γ -Tocopherolspiegeln im Plasma, die wiederum im Austausch mit den Tocopherolspiegeln in (erythrozytären) Zellmembranen stehen, könnte ein Hinweis für die Abhängigkeit der Radikalresistenz vom Tocopherolgehalt der Erythrozytenmembranen sein (Boda et al. 1998).

1.4.4 Tocopherole als Antioxidantien

Unter dem Namen Vitamin E lassen sich acht natürlich vorkommende Substanzen mit einer Vitamin E-Aktivität zusammenfassen:

d- α -, d- β -, d- γ -, d- δ -Tocopherole

d- α -, d- β -, d- γ -, d- δ -Tocotrienole

Gemeinsam ist ihnen als chemische Grundstruktur ein Chromanring und eine isoprenoide Seitenkette. Die verschiedenen Tocopherole unterscheiden sich durch Zahl und Stellung der Methylgruppen R_1 , R_2 und R_3 am Chromanring.

Tocopherols

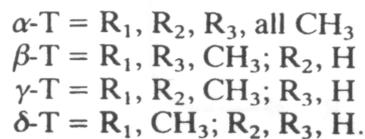
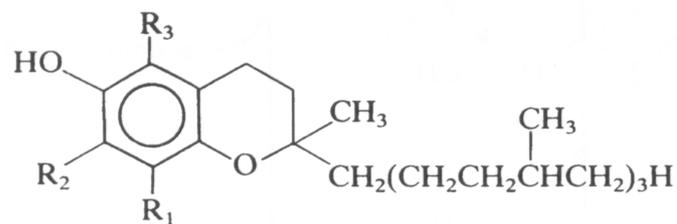
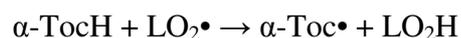
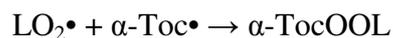


Abb. 1.5: Tocopherole (Halliwell 1999)

Tocopherole und Tocotrienole sind biologisch sehr bedeutende lipophile Antioxidantien, da sie mit Lipidperoxyradikalen (LO_2^\bullet) reagieren, bevor diese überhaupt die angrenzenden, ungesättigten Fettsäuren und Membranproteine angreifen können. Für die Reaktion des in dieser Substanzgruppe im Vordergrund stehenden d- α -Tocopherols (RRR- α -Tocopherol) mit Lipidperoxyradikalen beträgt die Gleichgewichtskonstante $10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$:



Damit läuft die Reaktion um den Faktor vier im Exponenten schneller ab als die Reaktion der Lipidperoxyradikale mit den Membranlipiden ($\sim 10^2 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$). Hierdurch kann die Kettenreaktion der Lipidperoxidation inhibiert werden. Das entstandene α -Tocopherol-Radikal ($\alpha\text{-Toc}^\bullet$) kann mit weiteren Lipidperoxyradikalen zu nicht-radikalischen Produkten reagieren:



Prinzipiell können also zwei Lipidperoxidationskettenreaktionen durch ein α -Tocopherolmolekül unterbrochen werden. Das lipidlösliche α -Tocopherol konzentriert sich im Körper vor allem in Zellmembranen und Lipoproteinen. Die Mitochondrienmembran zum Beispiel enthält ein α -Tocopherolmolekül pro 2100 Phospholipidmoleküle. Vitamin C

und Coenzym Q₁₀ können durch Reduktion das α -Tocopherolradikal wieder zu α -Tocopherol regenerieren. Ein weiteres Oxidationsprodukt dieser Reaktion ist das α -Tocopherolquinon welches nach chemischer Umwandlung mit der Galle oder über den Urin ausgeschieden werden kann. Neben der biologisch wohl bedeutendsten Rolle als Inhibitor der Lipidperoxidationkettenreaktion kann α -Tocopherol die Thrombozytenaggregation herabsetzen und die *in vitro* Proliferation von glatten Muskelzellen von Blutgefäßen hemmen, ein Prozess, der an der Bildung von arteriosklerotischen Plaques in Gefäßen beteiligt ist (Halliwell 1999).

1.4.5 Coenzym Q₁₀ als Antioxidans

Das in biologischen Systemen ubiquitär vorkommende Coenzym Q (Ubichinon) ist ein Chinonderivat mit einer langen Isoprenoidkette. Die Anzahl der Isopreneinheiten im Coenzym Q ist speziesabhängig. Bei Säugern findet sich am häufigsten die Form mit 10 Isoprenoideinheiten (Q₁₀). Durch Aufnahme eines Elektrons wird Ubichinon (CoQ) zu einem Semichinon mit einem freien Radikal reduziert (CoQ•⁻). Eine weitere Reduktion durch Aufnahme eines zweiten Elektrons führt zum Ubichinol (CoQH₂).

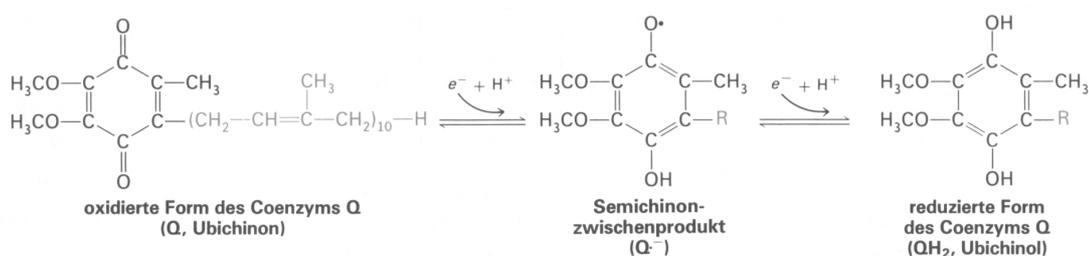
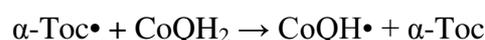


Abb. 1.6: Ubichinon wird über ein intermediär auftretendes Semichinonanionintermediat zu Ubichinol reduziert (Streier 1995).

Ubichinon ist ein essentieller Bestandteil der Atmungskette in Mitochondrien, da es als Elektronenüberträger an der Energiebereitstellung beteiligt ist. Darüber hinaus kann membranständiges Ubiquinol α -Tocopherolradikale regenerieren und trägt so zur Resistenz der Lipoproteine (zum Beispiel LDL) und der Zellmembranen gegenüber Lipidperoxidationen bei (Halliwell 1999):



Es wird vermutet, dass das Enzym DT Diaphorase (Quinonreduktase) das Equilibrium zwischen oxidiertem und reduziertem Coenzym Q zugunsten der reduzierten Form – Ubiquinol – aufrechterhält und so zum antioxidativen Schutz beiträgt. Demnach wird das Verhältnis von Ubichinol-10 zu Ubichinon-10 im Plasma als Index für oxidativen Stress betrachtet.

1.4.6 Sulfhydrylgruppen als Radikalfänger

Sulfhydrylgruppen (SH-Gruppen) finden sich im menschlichen Organismus in der Molekülstruktur von Cystein und Glutathion, an vielen Enzymen, Membranproteinen und im Hämoglobin. Sie sind für Oxidationsprozesse leicht zugänglich. SH-Gruppen des Glutathions wirken als Radikalfänger indem zwei freie SH-Gruppen zu einer Disulfidbrücke oxidieren. Werden SH-Gruppen von Enzymen oder Membranproteinen oxidiert, kann es zu Funktionsbeeinträchtigungen kommen. SH-Gruppen, vor allem die des Glutathions, dienen als Sulfhydrylpuffer, da hierdurch andere freie SH-Gruppen im Hämoglobin und in Membranproteinen im reduzierten Zustand gehalten werden. Glutathion wechselt zwischen einer reduzierten (GSH) und einer oxidierten (GSSG) Thiolform.

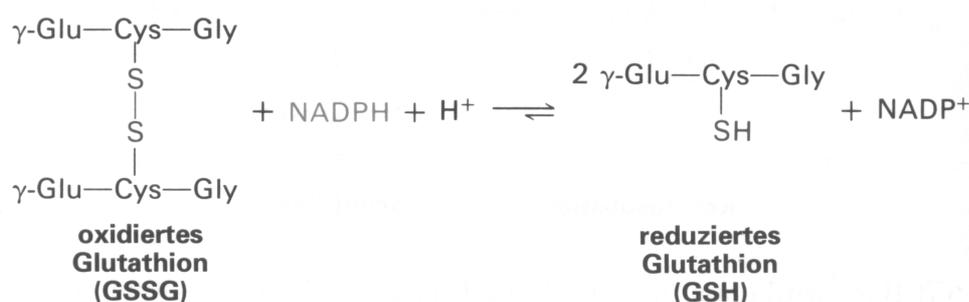


Abb. 1.7: Reduziertes und oxidiertes Glutathion (Streyer 1995)

Oxidiertes und reduziertes Glutathion bilden ein Redoxsystem, das zu 98% in der reduzierten Form vorliegt und so andere freie SH-Gruppen vor Oxidation schützt, indem es mit organischen Peroxiden selbst reagiert:



1.4.7 Vitamin C als Antioxidans

Vitamin C (Ascorbinsäure) ist ein wasserlösliches Antioxidans mit normalen Blutplasmaspiegeln von 30-100 $\mu\text{mol/L}$ (Evans et al. 1982). Neben der Beteiligung an einer Reihe von enzymatischen Reaktionen wie der Kollagen- und Carnitinbiosynthese, hat die antioxidative Wirkung der Ascorbinsäure eine besondere Rolle bei der Eliminierung von Lipidperoxyradikalen, unter anderem im Zusammenwirken mit Vitamin E.

Ascorbinsäure besitzt zwei ionisierbare OH-Gruppen und liegt bei physiologischem pH-Wert bevorzugt in der Monoanionform als Ascorbat (AscH^-) vor. Durch zweimalige 1-Elektronenübertragung reduziert Ascorbat freie Radikale und wird als Elektronendonator zunächst zum Ascorbyl-Radikal ($\text{Asc}^{\bullet-}$). In einem zweiten Schritt wird es weiter zum Dehydroascorbat (DHA) oxidiert. Das Ascorbat/Dehydroascorbat-Verhältnis ist in gesundem Gewebe sehr hoch, da DHA enzymatisch unter NADH- oder Glutathionverbrauch zu Ascorbat rekonvertiert wird, oder in Oxalat, Threonat oder andere Oxidationsprodukte zerfällt (Halliwell, 1999).

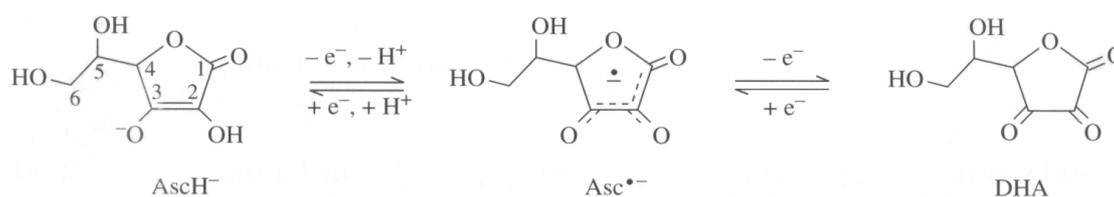


Abb. 1.8: Struktur der Ascorbinsäure und seiner Oxidationsprodukte (Halliwell 1999)

AscH^- = Ascorbat; $\text{Asc}^{\bullet-}$ = Ascorbyl-Radikal; DHA = Dehydroascorbat

Studien haben gezeigt, dass die NO-abhängige endotheliale Dysfunktion der Koronar- und peripheren Arterien bei Patienten mit manifester Arteriosklerose unter Vitamin C-Substitution reversibel ist. Eine Besserung der endothelialen Funktion durch Vitamin C-Substitution konnte auch bei Patienten mit Prädisposition für die Entwicklung einer Arteriosklerose, wie zum Beispiel bei Nikotinabusus, Hyperhomocysteinämie, Hypercholesterinämie, arterieller Hypertension und Diabetes mellitus gezeigt werden (May et al. 2000).

1.4.8 Harnsäure

Harnsäure ist im Stoffwechsel von Menschen ein Endprodukt des Purin-Metabolismus, da diese nicht wie andere Säuger das Enzym Uratoxidase besitzen, welches Harnsäure zu dem wasserlöslichen Allantoin abbaut. Täglich wird eine Gesamtmenge von 4-6 mmol Harnsäure aus dem intrazellulären Nukleotidabbau in die Körperflüssigkeiten abgegeben und zum größten Teil im Urin ausgeschieden (Löffler 1998). Bei physiologischem pH-Wert liegt Harnsäure (UrH_2^-) dissoziiert vor und trägt bei einem pK-Wert von 5,4 eine einfach negative Ladung.

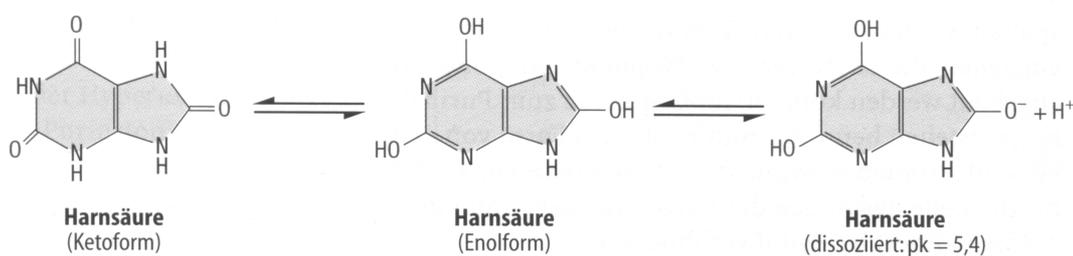


Abb. 1.9: Harnsäure (Löffler 1995)

Harnsäure wird als Radikalfänger angesehen, da es von starken Oxidantien wie dem Hydroxylradikal ($\text{OH}\bullet$) zu einem Uratradikal ($\text{UrH}\bullet^-$) oxidiert werden kann, wobei das daraufhin ungepaarte Elektron über dem Purinring delokalisiert ist. Damit entsteht ein relativ stabiles Radikal, das bei einer Gleichgewichtskonstante von $< 10^{-2} \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ wenig Tendenz zeigt mit O_2 zu Peroxylradikalen zu reagieren, aber von Ascorbat unter Bildung von Ascorbylradikalen wieder regeneriert werden kann. Peroxylradikale ($\text{RO}_2\bullet$) reagieren mit Harnsäure unter Bildung von Uratradikalen:



Als Substrat von H_2O_2 -Systemen der Hämproteine wird Harnsäure bevorzugt oxidiert und schützt so vor oxidativen Schäden an Proteinen. Darüber hinaus bildet Harnsäure Chelate mit Metallionen, wie Eisen oder Kupfer, und verringert so die durch diese Ionen katalysierten Reaktionen freier Radikale. Bei dem oxidativen Angriff von Radikalen auf Harnsäure entsteht als Zerfallsprodukt unter anderem Allantoin, das auf physiologische Weise nicht im Körper des Menschen gebildet werden kann. Bei Erkrankungen wie

Rheumatoider Arthritis, Hämochromatose oder Morbus Wilson, die mit erhöhtem oxidativen Stress einhergehen, sind erhöhte Allantoinkonzentrationen, beziehungsweise erhöhte Allantoin/Harnsäure-Quotienten im Plasma messbar. Welche biologischen Effekte das Uratradikal *in vivo* hat, wenn es nicht durch Ascorbat regeneriert wird, ist bisher nicht bekannt. *In vitro* konnte die Inhibition von zwei Enzymen durch das Uratradikal gezeigt werden: Alkoholdehydrogenase und α_1 -Antiproteinase (Halliwell 1999). Der Normbereich der Harnsäurekonzentration im Serum liegt für Kinder bei 1,9 - 5,9 mg/dL (Lentze 2000).

1.4.9 Total Radical-trapping Antioxidant Parameter (TRAP)

Das körpereigene Abwehrsystem gegen freie Radikale und oxidativen Stress besteht aus komplexen Interaktionen verschiedener antioxidativ wirkender Substanzen. Der „Total Radical-trapping Antioxidant Parameter“ (TRAP) -Test wurde entwickelt, um die Gesamtkapazität der im Plasma vorhandenen, reaktionskettenunterbrechenden Antioxidantien messen zu können. TRAP gibt die Anzahl der Peroxylmoleküle in Mol pro Liter Plasma an, die durch alle synergistisch agierenden Bestandteile des Plasmas gefangen (trapped) werden. Zu den Hauptbestandteilen zählen Vitamin E und C, Harnsäure und freie Sulfhydrylgruppen (SH-Gruppen) der Plasmaproteine, sowie weitere bislang noch unidentifizierte Komponenten. Die Anteile der Radikalfänger gehen nach Wayner et al. (1987) wie folgt in den TRAP ein: 5-10% Vitamin E, 0-24% Ascorbinsäure, 35-65% Harnsäure und 10-50% Plasmaprotein-SH-Gruppen. Der TRAP-Test misst direkt wieviele Peroxylradikale pro Liter Plasma abgefangen werden ($\text{TRAP}_{\text{gemessen}}$). Der Normbereich des TRAP liegt nach Halliwell im humanen Plasma bei 800-1200 $\mu\text{mol/L}$.

1.4.10 Homocystein

Homocystein ist eine Aminosäure, die eine Thiolgruppe trägt und intrazellulär bei der Demethylierung von Methionin entsteht. Einerseits lässt sich aus Homocystein mit Hilfe von N^5 -Methylhydrofolat und der Homocystein-Methyltransferase Methionin regenerieren, andererseits dient es der irreversiblen, pyridoxalphosphatabhängigen Cysteinsynthese. Im Plasma zirkuliert Homocystein hauptsächlich an Proteine gebunden in der oxidierten Form, daneben sind kleinere Mengen von reduziertem Homocystein und Disulfid-Homocystein

vorhanden. Erhöhte Homocysteinkonzentrationen im Plasma gelten als unabhängiger Risikofaktor für die Entwicklung der Arteriosklerose (Clarke et al. 1991). Durch Studien *in vitro* und im Tiermodell wird vermutet, dass Homocystein die Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO) herabsetzt, zu erhöhtem oxidativen Stress führt, das Wachstum der glatten Gefäßmuskelzellen stimuliert und elastische Anteile der Membranen verändern kann (van Gulder et al. 2000). Welche dieser pathophysiologischen Mechanismen *in vivo* von Bedeutung sind, ist jedoch noch unklar. Der Normalbereich für Homocystein schwankt bei verschiedenen Bevölkerungsgruppen und steigt mit dem Alter an. Im Kindes- und Jugendalter liegen die Normbereiche bei 3,3 – 8,3 $\mu\text{mol/L}$ (2 Monate – 10 Jahre), 4,7 – 10,3 $\mu\text{mol/L}$ (11 – 15 Jahre) und 4,7 – 11,3 $\mu\text{mol/L}$ (16 – 18 Jahre) (Lentze 2000).

1.4.11 Cholesterin

Cholesterin leitet sich wie alle Steroide vom Steran (Cyclopentano-Perhydrophenanthren) ab und wird im Körper durch das Enzym HMG-CoA-Reduktase synthetisiert. Die Cholesterinbiosynthese in der Leber ist abhängig von der Menge des Nahrungscholesterins. Seine biologische Bedeutung erfährt Cholesterin als integrierter Bestandteil aller tierischen Zellmembranen sowie als Ausgangspunkt der Steroidhormonbiosynthese. Ein erhöhter Gesamtcholesterinspiegel ($> 200\text{mg/dL}$) im Plasma zählt zu den klassischen Risikofaktoren der Arteriosklerose.

1.4.12 Antikörper gegen oxidiertes LDL-Cholesterin

Oxidiertes Low Density Lipoprotein (ox-LDL)-Cholesterin ist ein wichtiger Faktor bei der Entstehung und Entwicklung von Arteriosklerose (Steinberg et al. 1989). Durch den Angriff freier Radikale können LDL-Partikel oxidiert werden, wodurch ihre physiologische Aufnahme in die Zellen gestört wird. Oxidative Veränderungen am Apoprotein B der LDL-Partikel verhindern eine Bindung an den Apo B-Rezeptor der Zellen, so dass es stattdessen zu einer Bindung an Scavenger-Rezeptoren von Makrophagen kommt. Eine unregulierte Aufnahme solcher oxidierten LDL-Partikel in die Makrophagen der Gefäßwände mit einer Akkumulation von oxidiertem LDL führt zur Entwicklung von sogenannten Schaumzellen. Da Makrophagen das oxidierte LDL nicht abbauen können, verbleiben sie als Schaumzellen im Extrazellularraum des Endothels und

häufen sich zu Fettstreifen (fatty streaks) an, die die erste Phase der arteriosklerotischen Läsion darstellen. Untersuchungen haben gezeigt, dass Autoantikörper gegen Epitope des oxidativ veränderten LDL abgelaufene Oxidationsprozesse widerspiegeln und als ein unabhängiger Prädiktor für das Fortschreiten der Arteriosklerose gelten (Salonen et al. 1992).

1.5 Chronische Niereninsuffizienz und kardiovaskuläres Risiko

Die Arteriosklerose und das daraus folgende kardiovaskuläre Risiko ist bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz 16-19fach gegenüber der gesunden Bevölkerung erhöht und ist Hauptgrund für die Mortalität und Morbidität von niereninsuffizienten Patienten (Wheeler et al. 1996). Dies ist nur zum Teil durch das mit der Nierenerkrankung einhergehende Vorliegen von klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren wie arteriellem Hypertonus, Hyperglykämie und Dyslipidämie bedingt. Bei chronisch niereninsuffizienten Patienten werden durch die besondere metabolische Situation zunehmend auch nicht-traditionelle Risikofaktoren für die frühzeitige Arteriosklerosegefährdung als ätiologisch bedeutsam angesehen. Dazu zählen eine Hyperhomocysteinämie, oxidativer Stress, eine chronische Inflammation mit Erhöhung von Entzündungsparametern wie dem C-reaktiven Protein (CrP) und dem Tumornekrosefaktor- α (TNF α) und die Akkumulation von endogenen Stoffwechselmetaboliten, wie dem asymmetrischen Dimethylarginin (ADMA) und glykolisierten Proteinen. All diese pathologischen Veränderungen können letztendlich eine endotheliale Dysfunktion hervorrufen. Eine Verschlechterung der Endothelfunktion ist sowohl bei Erwachsenen (Annuk et al. 2000) als auch bei Kindern (Kari et al. 1997) mit chronischer Niereninsuffizienz ebenso wie bei Patienten unter Peritonealdialyse (van Guldener et al. 1998) und Hämodialyse (Miyazaki et al. 2000) nachzuweisen und bestärkt diesen theoretisch-klinischen Zusammenhang.

Quellen vermehrter Produktion von freien Radikalen bei niereninsuffizienten und urämischen Patienten sind zum einen eine Überladung mit oxidierend wirkendem Eisen, hervorgerufen durch Hämolyse oder Eisensubstitution bei renaler Anämie (Peuchant et al. 1994), zum weiteren eine durch eine Hypertriglyzeridämie induzierte erhöhte monozytäre Radikalfreisetzung, wie sie auch bei Diabetikern beschrieben wurde. Bei Patienten unter Hämodialyse kommt es durch den Kontakt des Blutes zur Dialysemembran zu einer

Neutrophilen- und Komplementaktivierung wodurch freie Radikale freigesetzt werden (Hasselwander und Young 1998). Die inadäquate Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems bei nierenkranken Patienten führt nicht nur über eine Vasokonstriktion und Natrium- und Wasserretention zu einem arteriellen Hypertonus sondern hat wahrscheinlich auch eine über Angiotensin II vermittelte Bildung von freien Radikalen zur Folge. Angiotensin II gilt als Aktivator der vaskulären NADH- oder NADPH-Oxidase und könnte dadurch die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies hervorrufen (Higashi et al. 2002). Freie Radikale können eine renale Vasokonstriktion bewirken oder diese über andere Mediatoren vermitteln und so die NO-abhängigen Systeme modulieren (Schnackenberg et al. 2002). Die in der chronischen Niereninsuffizienz zirkulierenden LDL-Partikel sind triglyzeridreich und weisen durch diese qualitative Veränderung eine gestörte Interaktion mit dem Apo B-Rezeptor der Zellen auf. Hierdurch kommt es zu einer längeren Verweildauer im Extrazellularraum der Gefäßwände, wo LDL vermehrt oxidativen Prozessen ausgesetzt ist (Hasselwander et Young 1998). Zu den in der Urämie akkumulierenden Substanzen zählen neben ADMA als endogenem Inhibitor der endothelialen NO-Synthase auch die durch Glykolisierungsprozesse entstehenden glykolytierten Proteine (AGE; advanced glycation end products). Sie könnten durch ihre Interaktionen mit Rezeptoren verschiedene Zellfunktionen beeinträchtigen.

Darüber hinaus findet sich bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz aufgrund strenger Diätvorschriften und Verlusten bei Hämo- und Peritonealdialyse (Zarling et al. 1994) eine erniedrigte Konzentration von antioxidativen Substanzen (Ha et al. 1996). Die Kombination aus erhöhter Produktion von freien Radikalen bei gleichzeitig vermindertem antioxidativem Schutz erklärt die besonders schädigende Wirkung von oxidativem Stress bei niereninsuffizienten Patienten. Ausgehend von Ergebnissen zahlreicher Studien, die diese Zusammenhänge aufzeigen, wird bereits empfohlen, bei chronischer Niereninsuffizienz Antioxidantien wie Vitamin A und E oral zu substituieren. Es konnte auch gezeigt werden, dass durch Anwendung von Vitamin E-beschichteten Dialysemembranen der oxidative Stress reduziert und so einer endothelialen Dysfunktion vorgebeugt werden kann (Miyazuki et al. 2000, Clermont et al. 2001).

1.6 Angeborene Herzvitien nach operativer Korrektur und kardiovaskuläres Risiko

Aufgrund der erheblichen Fortschritte in der interventionellen Therapie komplexer angeborener Herzfehler hat sich die Lebenserwartung der betroffenen Patienten erfreulicherweise deutlich gebessert (Nicolas et al. 2005). Dennoch treten in der Nachsorge von Kindern nach operativer Korrektur eines angeborenen Herzvitiums Komplikationen wie Reoperationen, Arrhythmien und Thromboembolien auf (Bhat und Sahn 2004). Patienten mit „erfolgreich“ korrigierten Vitien werden anhand hämodynamischer und anatomischer Parameter als gesund betrachtet. Allerdings könnten weitere kardiovaskuläre Komplikationen, wie eine vorzeitige Arteriosklerose, durch Verbesserung der Operationsmethoden erst im Laufe der Zeit relevant werden. So konnten einzelne Studien zeigen, dass bei jungen und – bis auf den operierten Herzfehler – gesunden Patienten, eine Verschlechterung der endothelialen Funktion an den Gefäßen messbar ist und damit die Vermutung nahe liegt, dass sich eine Arteriosklerose bei diesen Patienten früher als bei gesunden Kindern entwickeln könnte.

Gardiner et al. (1994) zeigten, dass nach erfolgreich operierter Aortenisthmusstenose die Endothelfunktion im ehemals prästenotischen Gefäßbett deutlich verschlechtert ist und ursächlich an der Entwicklung einer Belastungshypertension mitbeteiligt sein könnte. Heger et al. (2005) demonstrierten kürzlich das Folgende: je älter die Patienten zum Zeitpunkt der Operation einer Aortenisthmusstenose sind, desto schlechter sind im weiteren Verlauf die endothelabhängige und nicht-endothelabhängige Dilatation der A. brachialis. Celermajer et al. (1993) fanden bei Kindern, deren Herzfehler mit einer abnormen pulmonalen Hämodynamik einhergehen, eine segmental verringerte, endothelabhängige Dilatation der Pulmonalarterie. Mahle et al. (2003) zeigten, dass nach einer Fontan-Operation die endothelabhängige Dilatation peripherer Arterien deutlich vermindert ist. Eine systemische Affektion der Gefäße mit einer signifikant verminderten endothelabhängigen Dilatation fanden Dhillon et al. (1996) bei Patienten mit Kawasaki-Syndrom, mehrere Jahre nach der vaskulären Erkrankung, ohne dass es dabei im Verlauf zu einer Beteiligung der Koronararterien gekommen war.

Unter Zugrundelegung dieser Hinweise auf beeinträchtigte EAD`s und NEAD`s in besonders exponierten Teilen des Gefäßbetts nach operativ korrigierten Herzfehlern erfolgte für die vorliegende Studie die Abschätzung des kardiovaskulären Risikos bei den

zu untersuchenden Patienten mit operativ korrigierten Herzfehlern. Die Patienten mit verschiedenen angeborenen Vitien wurden nach dem Schweregrad des Vitiums und dem Ausmaß der Einschränkung der allgemeinen Prognose nach der operativen Korrektur in drei Gruppen eingeteilt. In die Gruppe mit hypothetisch geringem kardiovaskulärem Risiko fallen Patienten mit einfachem Ventrikelseptumdefekt (VSD). Bei Patienten mit zyanotischen Herzvitien wie Transposition der großen Arterien (TGA) und Fallot'scher Tetralogie (FT) wurde ein mittleres kardiovaskuläres Risiko postuliert. Demgegenüber wurden Patienten mit verschiedenen seltenen komplexen Herzfehlern, wie zum Beispiel das hypoplastische Linksherzsyndrom, die Trikuspidalatresie oder Pulmonalstenose nach Korrektur durch Fontan-Operation (FON) der Gruppe mit höchstem kardiovaskulären Risiko zugeordnet. Diese letztgenannten Patienten weisen auch nach der Fontan-Operationen aufgrund ihres funktionell univentrikulären Herzens am häufigsten hämodynamische Komplikationen auf und haben daher eine geringere Lebenserwartung als die Patienten der leichten und mittleren Risikogruppen (van den Bosch et al. 2004).

1.7 Fragestellung dieser Arbeit

Ein großer Teil der Studien mit ähnlicher Thematik wurde an Erwachsenen mit kardiovaskulären Risikofaktoren durchgeführt. Da jedoch die Arteriosklerose und die endotheliale Dysfunktion im frühen Kindesalter ihren Anfang haben, erscheint es uns besonders unter prophylaktischen und therapeutischen Aspekten berechtigt zu sein, bereits im Kindesalter nach den ersten Zeichen von Funktionsminderungen des Gefäßendothels zu suchen. Dementsprechend wurden in der vorliegenden Studie Kinder mit chronischer Niereninsuffizienz, bei denen ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko bekannt ist, und Kinder und junge Erwachsene mit verschiedenen angeborenen und operativ korrigierten Herzfehlern, bei denen aufgrund ihrer Grunderkrankung ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer späteren Arteriosklerose vermutet werden kann, untersucht. Dabei begünstigt der Umstand, dass sich die Gefäßreagibilität als endothelialer Funktionsparameter mit der hochauflösenden Ultraschallsonographie messen lässt, die Untersuchung an Kindern. Auf diese Weise können heute schon funktionelle Einschränkungen des Gefäßendothels zu einem frühen Zeitpunkt erfasst werden, an dem morphologisch noch keine strukturellen Veränderungen zu finden sind. Interessant sind Untersuchungen zu den Pathomechanismen der Arterioskleroseentstehung an Kindern auch

deshalb, weil bei ihnen im allgemeinen außer den krankheitsbedingten keine weiteren Risikofaktoren wie Rauchen, Diabetes mellitus, Adipositas, Hypertension und Hyperlipidämie vorliegen. Da es zahlreiche Hinweise dafür gibt, dass sowohl die frühe endotheliale Dysfunktion als auch die Entstehung von arteriosklerotischen Plaques unter anderem durch freie Radikale und oxidativen Stress vermittelt werden, erschien es interessant zu sein, bei den genannten Kindern die laborchemischen Parameter des pro- und antioxidativen Gleichgewichts im Blut zu messen.

Folgende Fragen sollten beantwortet werden:

1. Sind Endothelfunktion und/oder pro- und antioxidative Parameter bei Kindern mit chronischer Niereninsuffizienz und bei Kindern mit korrigierten Herzfehlern gegenüber einem gesunden Kontrollkollektiv verändert?
2. Besteht ein Zusammenhang zwischen einer möglicherweise veränderten Endothelfunktion und den Markern für oxidativen Stress?
3. Ergeben sich aus den laborchemischen Untersuchungen zum oxidativen Stress Ansätze für eine therapeutische Intervention zur Reduzierung des oxidativen Stresses und dem damit verbundenen kardiovaskulären Risiko?

2. Probanden, Material und Methoden

2.1. Patienten und Kontrollpersonen

In dieser Studie wurden 87 Probanden auf ihre Endothelfunktion und auf laborchemische Parameter des pro-/antioxidativen Gleichgewichts im Blut untersucht. Eine Messung sowohl der Endothelfunktion als auch der pro-/antioxidativen Parameter war bei 65 Personen möglich. Eine Messung lediglich der pro-/antioxidativen Parameter fand bei 22 Personen statt. Eine Übersicht über die Probandengruppen gibt Tabelle 2.1. Im einzelnen handelte es sich um folgende Probandengruppen:

Kontrollpersonen:

Einschlusskriterien: 8-18 Jahre, gesund

Ausschlusskriterien: Medikamenteneinnahme, akute und chronische Erkrankung

Patienten mit angeborenen operierten Herzfehlern:

Einschlusskriterien: 8-30 Jahre

- Patienten mit korrigierten azyanotischen angeborenen Herzfehlern:
Ventrikelseptumdefekt (VSD); > 5 Jahre postoperativ
- Patienten mit korrigierten zyanotischen angeborenen Herzfehlern: Transposition der großen Arterien (TGA), Fallot'sche Tetralogie (FT); > 5 Jahre postoperativ
- Patienten mit nach einer Fontan-Operation (FON) optimal korrigierten (belastbar, keine Medikation) angeborenen Herzfehlern; > 5 Jahre postoperativ

Ausschlusskriterien:

- corotrope oder die Endothelfunktion beeinflussende Medikamente
- manifeste Arteriosklerose

Patienten mit Nierenerkrankungen:

Einschlusskriterien: 2-18 Jahre

- Chronische Niereninsuffizienz (CNI) mit GFR < 80 mL/min ohne Dialysetherapie
- Patienten unter Peritonealdialyse (PD)

Die Medikation war bei den Patienten mit Niereninsuffizienz, dem Schweregrad ihrer Erkrankung entsprechend, breit gefächert und individuell sehr verschieden. Es waren Diuretika (ACE-Hemmer, Furosemid, Hydrochlorothiazid, Lorsatan), Antihypertensiva (Metoprolol, Nifedipin, Clonidin), Erythropoetin, Wachstumshormon, Decortin, Azathioprin, Omeprazol, Antiepileptika (Phenytoin, Lamotrigin), Antibiotika (Trimethoprim), Elektrolyte (Kalium, Phosphat, Magnesium, Natriumbikarbonat, Natriumhydrogencarbonat), Eisen und Multivitaminpräparate (inkl. Folsäure, Vitamin C, usw.).

Tabelle 2.1: Übersicht über die untersuchten Probanden

Probandengruppe (Abkürzung)	Anzahl [n]	Alter [Jahren]: Median (Bereich)	Ausgewertete Messungen:	
			Laborchemische Parameter mit Parameter der Endothelfunktion	ohne Parameter der Endothelfunktion
Kontrollen (Kontr)	13	12,5 (9,3–15,9)	11	2
Ventrikelseptumdefekt (VSD)	8	14,6 (11,1–18,5)	5	3
Fallot'sche Tetralogie (FT)	12	14,4 (8,8–30,6)	10	2
Transposition der gr. Arterien (TGA)	18	13,5 (8,7–20,4)	16	2
Z.n. Fontan-Operation (FON)	13	11,2 (9,0–17,4)	12	1
Niereninsuffizienz (CNI)	12	9,6 (4,8–17,6)	8	4
Peritonealdialyse (PD)	11	11,9 (2,9–19,3)	1	10
Gesamt	87	12,8 (2,9–30,6)	65	22

Die Endothelfunktionsmessungen waren bei den Patienten unter Peritonealdialyse nicht vorgesehen. Ein Patient mit chronischer Niereninsuffizienz wurde während der laufenden Studie peritonealdialysepflichtig und wechselte die Probandengruppe: die Messung der Endothelfunktion wurde daher in der Auswertung nicht weiter berücksichtigt.

Die Studie wurde am 14.02.2001 von der Ethik-Kommission der Ärztekammer Hamburg genehmigt. Sowohl die Messung der Endothelfunktion als auch die Blutentnahmen erfolgten freiwillig und nach ausführlicher Aufklärung der Probanden, gegebenenfalls zusätzlich ihrer Eltern.

2.2. Material und Methoden

2.2.1 Messung von Endothelfunktion und Intima-Media-Dicke der A. carotis interna

Die Endothelfunktionsmessungen wurden ultrasonographisch von Frau Dr. T. Höchstetter in der Abteilung für Kinderkardiologie der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf durchgeführt. Als externes, hochauflösendes Ultraschallgerät wurde der Apparat Synergy (GE Ultrasound Europe) der Firma Diasonics Ultrasound mit 12 MHz Schallköpfen im B-Mode verwendet.

Zunächst wurde bei liegendem Patienten die Intima-Media Dicke der A. carotis (=Gefäßwanddicke von Intima- + Media-Schicht) ultrasonographisch ausgemessen (Mittelwert der rechten und linken Seite). Die nicht-invasive ultrasonographische Endothelfunktionsmessung beginnt mit der Bestimmung des Gefäßdurchmessers der A. brachialis rechts. Nach einer Ruhezeit von 5 Minuten wird ein Stauschlauch am rechten Unterarm angelegt und dieser wird bis zu einem Druck von 250 mmHg aufgepumpt. Nach genau 5 Minuten wird der Druck beendet. Unmittelbar nach Beendigung der Stauung wird erneut der Gefäßdurchmesser der A. brachialis an gleicher Stelle ausgemessen. Die durch diese Prozedur erzeugte prozentuale Änderung des Gefäßdurchmessers entspricht der endothelabhängigen Dilatation (EAD). Nach einer 15-minütigen Pause, in der der Proband ruhig liegt, wird ein Hub (400µg) Nitroglycerinspray (Glyceroltrinitrat) sublingual appliziert. 4 Minuten nach Nitroglycerin-Gabe erfolgt eine weitere Messung des Gefäßdurchmessers. Die nun ermittelte prozentuale Änderung des Gefäßdurchmessers im Vergleich zum Ruhegefäßdurchmesser ergibt den Parameter der nicht-endothelabhängigen Dilatation (NEAD).

Zeitlicher Ablauf der Messungen in Minuten:

- 0:00': Messung von Intima-Media-Dicke der A. carotis und Gefäßdurchmesser der rechten A. brachialis in Ruhe (Ruhe 1)
- 5:00': Cuff-Okklusion (250 mmHg)
- 10:00': Cuff-Deflation und Messung des Gefäßdurchmessers (Endothelabhängige Dilatation = EAD); anschließend liegend 15 Minuten Ruhepause
- 25': Messung des Gefäßdurchmessers in Ruhe (Ruhe 2)

- 26': Nitroglycerin-Gabe (400 μ g)
- 30': Messung des Gefäßdurchmessers (Nicht-endothelabhängige Dilatationsmessung = NEAD)

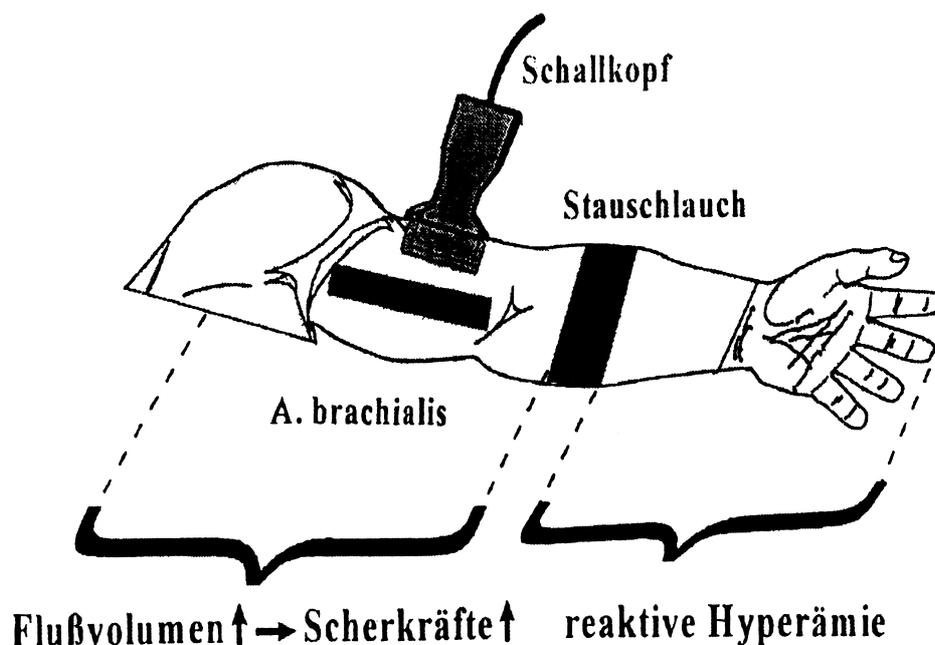


Abb.2.1: Sonographische Messung der Endothelfunktion

Die Parameter für EAD, Ruhe 2 und NEAD werden als prozentuale Änderungen gegenüber dem Gefäßdurchmesser in Ruhe 1 angegeben. Der Messwert Ruhe 2 darf definitionsgemäß nicht mehr als $\pm 1,5\%$ vom Messwert Ruhe 1 unterscheiden, da sonst die Messung als ungenau gilt und die gesamte Endothelfunktionsmessung bei diesem Probanden nicht verwertbar ist. Elf Patienten wurden deswegen nachgemessen und zehn mussten ausgeschlossen werden.

2.2.2 Probengewinnung zur Messung der laborchemischen Parameter

Die Blutentnahme zur Bestimmung der pro- und antioxidativen Parameter erfolgte jeweils unmittelbar nach Abschluss der Endothelfunktionsmessung. Es wurden jeweils 2,7 mL Venenblut in eine EDTA-Monovette und 1 mL Venenblut in ein Röhrchen ohne Zusätze zur Gewinnung von Serum entnommen. Nach Zentrifugation (5 Minuten, 3000 U/min) wurden Plasma und Serum in Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert, mit Argon

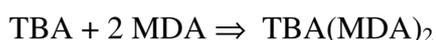
überschichtet und bis zur weiteren Verarbeitung bei - 80°C tiefgefroren. Nach dem Abpipettieren des Plasmas wurden die verbleibenden zellulären Blutbestandteile mit isotonischer NaCl-Lösung aufgefüllt und bis zur Messung der Radikalresistenz der Erythrozyten innerhalb von 3 Tagen bei + 4°C aufbewahrt. Zur Bestimmung der Vitamin C-Konzentration wurden 130 µL Plasma in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und mit 130 µL einer 10%igen Metaphosphorsäure gemischt. Anschließend wurde das Plasma erneut zentrifugiert, der Überstand abgenommen und bei - 80°C tiefgefroren.

2.2.3 HPLC-Analytik zur Bestimmung von Malondialdehyd

Die Malondialdehydbestimmung erfolgte mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit Fluoreszenzdetektion nach der von Fukunaga et al. (1993) beschriebenen Methode.

Prinzip:

Unter Hitzeeinwirkung reagiert Malondialdehyd (MDA) mit 2-Thiobarbitursäure (TBA) wobei ein TBA-MDA Komplex entsteht, der mit Butanol extrahiert wird. Die Auftrennung des Butanolextrakts erfolgt über eine HPLC-Säule, die spezifische Erfassung des TBA-MDA-Komplexes geschieht mittels Fluoreszenzdetektion (Extinktion: $\lambda = 515\text{nm}$; Emission $\lambda = 553\text{nm}$).



Materialien:

- High performance Liquid Chromatograph mit Pumpe/Säule/Fluoreszenzdetektor
- Eppendorf-Reaktionsgefäße
- Eppendorf-Thermostate
- Nunc Röhrchen 50 mL,
- Plastikspitzröhrchen,
- Glasflasche 100 mL mit grauem Stopfen,
- Multipipetten 10 µL, 100 µL
- Pipettenspitzen

Reagenzien:

- 1,1,3,3-tetraethoxypropan (TEP; MG 220,3 g); Fluka, Best. Nr. 86570

- Methanol Lichrosolv; Merck
- Essigsäure p.a. 100 % Eisessig; Merck, Best. Nr. 1.00063
- Wasser (Lichrosolv HPLC-Qualität); Merck
- Natriumacetat wasserfrei suprapur; Merck Best. Nr.1.06264
- Diethylenetriamine-pentaacetic acid (DTPA); Fluka
- 2-Thiobarbitursäure; Aldrich
- 2,6-Di-tert-butyl-p-cresol (BHT); Fluka
- Ethanol (Lichrosolv HPLC-Qualität); Merck
- 1-Butanol (Lichrosolv HPLC-Qualität); Merck
- Acetonitril (Lichrosolv HPLC-Qualität); Merck

Herzustellende Lösungen:

- Stammstandardlösung: 1,23 mL TEP werden mit 98,7 mL Methanol in einer 100 mL Glasflasche gemischt und mit einem grauen Stopfen verkapselt. Diese Stammstandardlösung zur Herstellung der Standardreihe hat eine Konzentration von 51,4 mmol/L TEP und kann bei - 20°C bis zu acht Wochen aufbewahrt werden.
- Pufferlösung: In ein graduiertes 50 mL Nunc Röhrchen werden zunächst 45 mL Baker Wasser und 5 mL Eisessig gefüllt, dann 427mg Natriumacetat, 20 mg DTPA und 100 mg Thiobarbitursäure hinzugegeben. Diese Pufferlösung wird auf einem Roller gemischt.
- BHT-Lösung: 500 mg BHT werden in einem Plastikspitzröhrchen in 5 mL Ethanol aufgelöst (10%ige Lösung).
- HPLC-Laufmittel: 20% Acetonitril/80% Baker Wasser, Menge je nach Bedarf.

Durchführung:

Zur Herstellung der Standardreihe werden 50 µL der Stammstandardlösung in einem Plastikspitzröhrchen mit 4950 µL Baker Wasser verdünnt (Lösung I = 0,514 mmol/L). 500 µL der Lösung I werden mit 4500 µL Baker Wasser verdünnt (Lösung II = 51,4 µmol/L), wovon wiederum 500 µL in 4500 µL Baker Wasser verdünnt werden (Lösung III = 5,14 µmol/L). Lösung III wird nun noch weiter 1:1 in Eppendorfreaktionsgefäßen zu den folgenden Konzentration verdünnt: 2,57 µmol/L; 1,29 µmol/L; 0,64 µmol/L; 0,32 µmol/L; 0,16 µmol/L; 0,08 µmol/L.

In Eppendorf-Reaktionsgefäße werden je 5 μL des zu messenden Plasmas, ein Blindwert (Baker Wasser) und die Standardreihe (Eichbereich von 1,29 $\mu\text{mol/L}$ bis 0,08 $\mu\text{mol/L}$) vorgelegt. Mit der Multipipette werden zu allen Proben 200 μL Pufferlösung und 10 μL BHT-Lösung hinzugegeben. Die Proben werden verschlossen, kurz gevortext und für 45 Minuten bei 95°C im Eppendorfthermostat inkubiert. Nach dieser Zeit werden die Proben entnommen und abgekühlt. Nach einer kurzen Zentrifugation (um Tropfen vom Deckel zu entfernen) wird mit einer Multipipette je 200 μL Butanol dazugegeben und die Proben auf dem automatischem Schüttler jeweils für eine Minute geschüttelt. Alle Proben werden jetzt in der Zentrifuge 5 Minuten bei 3000 Umdrehungen zentrifugiert; der Butanolüberstand wird abpipettiert, in Eppendorf-Reaktionsgefäße gefüllt und bei + 4°C aufbewahrt. Die HPLC-Pumpe wird auf eine Förderungsgeschwindigkeit von 2,0 mL/min eingestellt und je 40 μL der Butanolphase werden injiziert. Der Ausschlag für den MDA-TBA-Komplex erscheint nach einer Retentionszeit von ungefähr zwei Minuten.

Berechnung:

Die MDA-Konzentration der Plasmaprobe wird mit Hilfe der Standardreihe berechnet. Jede Probe wurde dreifach gemessen und der Mittelwert berechnet. Die Konzentrationsangabe erfolgt sowohl bezogen auf das Volumen in $\mu\text{mol/L}$ als auch bezogen auf die Gesamtlipidkonzentration in $\mu\text{mol}/\mu\text{g}$ totale neutrale Lipide .

2.2.4 Enzymimmunoassay zur Bestimmung des Carbonylgruppengehaltes in Proteinen

Prinzip:

Carbonylgruppen von Proteinen binden Dinitrophenylhydrazin (DNP) welches von Anti-DNP-Antikörpern in einem Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) quantitativ nach der Methode von Winterbourne und Buss (1999) bestimmt werden kann. Dabei erfolgt als erstes die Proteinbestimmung (I) nach Bradford et al. (1972), danach die sogenannte Bezugsmethode (II) in der die Carbonylgruppen photometrisch quantifiziert werden und schließlich der ELISA (III).

Materialien:

Für die Proteinbestimmung (I):

- Coomassie Blue G (Coomassie-Brilliantblau G-250); Serva Nr. 35050 Lot 12052
- Ethanol (95%-ig); Merck

- Phosphorsäure (85%-ig); Merck
- Glycerin von Sigma
- Humanes Serumalbumin: Albumin, Human, Fraktion V, 96-99% Albumin; Sigma Lot 106 F 9333
- Phosphatpuffer (PBS), siehe unter III

Für die Bezugsmethode und den ELISA-Ansatz (II+III):

- Albumin bovine, Fraktion V, fatty acid free; Calbiochem 126575
- Natrium hypochloride; Aldrich Cat.-Nr. 42,504-4
- Natrium borohydride; Sigma S 9125
- 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNP); Fluka 42210
- Guanidinhydrochlorid; Sigma G 4505
- Salzsäure 2 M; Merck 1.09063
- Salzsäure 32%-ig
- KH_2PO_4 ; Merck 1.04871
- Na_2HPO_4 ; wasserfrei; Merck 6586
- Trichloressigsäure (TCA) 40%-ig; Bioanalytik 970201.1
- Ethanol, absolut; Merck
- Ethylacetat p.a.; Merck
- NaCl ; Merck
- Tween 20 ; Serva 37470
- o-Phenylendiamin; Sigma P 9020
- Zitronensäure; Merck 241
- Wasserstoffperoxid 30%-ig; Merck 1.07209
- Dialyseschlauch, Rolle à 30 m; neoLab Art.-Nr. 20009040
- CryoTube-Röhrchen 4,5 mL; Nunc Art.-Nr. 379146
- Anti-Dinitrophenyl-KLH Antibody (0,5 mL); rabbit IgG fraction, biotin-XX conjugate, 2 mg/mL; Mo Bi Tech A-6435
- Streptavidin-biotinylated horseradish peroxidase complex 2 mL; Amerh. Pharm. RPN 1051
- ELISA Maxisorb F96 Platten; Nunc 442404
- ELISA-Reader Molecular Devices; MWG Biotech
- ELISA-Washer; SLT Labin. 812 SW 1

Herzustellende Lösungen:

- Coomassie-Brilliantblau Farbreagenz: 100 mg Coomassie Blue G in 50 mL Ethanol lösen, 100 mL Phosphorsäure zugeben und mit aqua bidest. auf 600 mL auffüllen. Lösung filtrieren, dann 100 mL Glycerin zugeben und auf 1 L verdünnen.
- PBS: Na_2HPO_4 10 mM in 0,14 M NaCl mit pH = 7,4
- DNP-Reagenz: 2,4-Dinitrophenylhydrazin 10 mM in 2M HCl
- 28%-ige Trichloressigsäure: entsprechen mit PBS verdünnen
- Ethanol/Ethylacetat-Lösung (1+1; v/v)
- Guanidinhydrochlorid-Lösung: Ansatz einer 6M Guanidinhydrochlorid-Lösung in 0,5 M Kaliumphosphat-Puffer (pH = 2,5)
- Fully oxidized BSA: 112 mg BSA + 27,09 mL PBS + 909 μL NaOCl (1:10 vorverdünnt mit PBS) vortexen und 10 Minuten inkubieren, dann direkt in Eichreihe pipettieren.
- Fully reduced BSA: 500 mg BSA + 100 mL PBS + 0,1 g Natriumborohydrid 30 Minuten unter Abzug inkubieren, auf pH = 7,4 einstellen, Lösung in den Dialyseschlauch geben, Enden verschließen, 1000 mL Gefäß mit PBS füllen, den gefüllten Dialyseschlauch in PBS legen. Dialysevorgang über Nacht bei + 4°C im Dunkeln ablaufen lassen. Fully reduced BSA aliquotieren (à 750 μL) und bei -80°C lagern.
- PBS + Tween 20 (0,1%-ig): 1 L PBS in 1 mL Tween 20 geben.
- Substratpuffer: Na_2HPO_4 ; 50 mM
- Kaliumphosphatpuffer zum Ansatz des DNP-Reagenz: KH_2PO_4 ; 0,5 M
- 2. Derivatisationsreagenz: 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNP) 10 mM und Guanidinhydrochlorid-Lösung 6M; 28,659 g Guanidinhydrochlorid einwiegen, mit KH_2PO_4 (0,5 M) nicht ganz bis zur 50 mL Marke auffüllen, pH mit 32%-iger Salzsäure einstellen (pH=2,5), dann Zugabe von 99,07 mg DNP.
- Fully oxidized BSA für ELISA (4 mg BSA/mL): 16 mg BSA + 3871 μL PBS + 129 μL NaOCl (1:10 vorverdünnt). Einwiegen des BSA mit Plastikspatel in CryoTube-Röhrchen.
- Fully reduced BSA für ELISA (4 mg BSA/mL): aus dem Gefrierfach - 80°C und Proteinkonzentration (nach der Proteinbestimmung) mit PBS auf 4 mg einstellen.
- Blocking-Solution: 19,5 mL PBS mit 0,1% Fully reduced BSA (6,5 mL) in der Lösung.

- 1. Antikörper = biotinylierter Anti-DNP-Antikörper: Verdünnung 1:1000 mit 23,976 mL BPS+Tween 20 (0,1%-ig) + 24 µL Anti-DNP-Antikörper
- 2. Antikörper = streptavidin-biotinylierte horseradish peroxidase: Verdünnung 1:3000 mit 24 mL PBS+Tween 20 (0,1%-ig) + 8 µL strept.-bio. horseradish peroxidase.
- ELISA Substrat: 25 mL Na₂HPO₄; 50 mM + 15 mg o-Phenylendiamin (0,6 mg/mL) + Zitronensäure 115,25 mg/25 mL + 10 µL H₂O₂ (30%-ig)

Durchführung Proteinbestimmung (I): Ansatz einer Standard-Eichkurve für humanes Serumalbumin von 1 mg HSA/mL bis 0,015 mg HSA/mL mit Verdünnungspuffer PBS: Plasma 20 µL (1:100 vorverdünnt mit PBS), Standard 20 µL, Leerwert 20 µL PBS mit je 1000 µL Farbreagenz versehen. Inkubation bei Raumtemperatur für 5-60 Minuten, Extinktionsmessung gegen Leerwert bei $\lambda = 578$ nm, Berechnung der Proteinkonzentration der Proben über die Standard-Eichreihe. Für den ELISA-Ansatz müssen die Proben so verdünnt werden, dass jede Probe einen Proteingehalt von 4 mg/mL aufweist.

Durchführung der Bezugsmethode (II):

- Doppelbestimmung von jedem Mischungsverhältnis der ELISA-Eichreihe und zu jeder Verdünnung ein separater Leerwert
- Ein Reagentienleerwert für die Proteinbestimmung am Ende des Tests (1 mL Guanidinhydrochlorid-Lösung)
- Ansatz der ELISA-Eichreihe, für die 53,625 mL red. BSA und 21,375 mL benötigt werden (Tabelle 2.2)
- Zugabe von 1 mL DNP (10 mM in 2M HCl) je Test-Röhrchen; zu den Leerwert-Röhrchen wird je 1 mL 2M HCl gegeben. Dann 45 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubieren und gelegentlich vortexen, im Anschluß nach Zugabe von 1 mL 28%-ige Trichloressigsäure alle Röhrchen vortexen und 10 Minuten bei 3000-4000 U/min zentrifugieren. Überstand abkippen und 3 Waschzyklen durchführen: Zugabe von insgesamt 2,5 mL Ethanol/Ethylacetat-Lösung (1+1; v/v) zu dem pellet wie folgt: zunächst nur 1 mL Ethanol/Ethylacetat-Lösung zu den pellets geben, dann ein Röhrchen/pellet „sonicaten“ und mit 1,5 mL Ethanol/Ethylacetat-Lösung Reste am Sonicator in das Röhrchen spülen. Dann alle Röhrchen vortexen und 10 Minuten bei 3000-4000 U/min zentrifugieren, schließlich den Überstand abkippen.

Tab. 2.2: Ansatz der ELISA-Eichreihe für die Bestimmung der Carbonylgruppen

Mischungsverhältnis für ELISA-Eichreihe		Volumina der BSA-Lösungen (4 mg/mL)	
ox. BSA	red. BSA	ox. BSA	red. BSA
80%	20%	2000 µL	500 µL
60%	40%	1500 µL	1000 µL
40%	60%	1000 µL	500 µL
30%	70%	750 µL	1750 µL
25%	75%	625 µL	1875 µL
20%	80%	500 µL	2000 µL
15%	85%	375 µL	2125 µL
10%	90%	200 µL	2250 µL
5%	95%	125 µL	2375 µL
0%	100%	-	2500 µL

- Nach dem 3. Waschzyklus insgesamt 1 mL Guanidinhydrochlorid-Lösung (6M) zu den pellets geben; zunächst nur 0,5 mL direkt auf das pellet geben, sonicaten und mit den restlichen 0,5 mL die Lösungsreste am Sonicator spülen.
- 1 CryoTube-Röhrchen nur mit 1 mL Guanidinhydrochlorid-Lösung füllen (als Reagentienleerwert für die Proteinbestimmung)
- Röhrchen erneut vortexen und 10 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubieren.
- Extinktionsmessung gegen den jeweiligen Leerwert bei $\lambda = 375 \text{ nm}$.
- Proteinbestimmung aus den mitgeführten Leerwerten (Proteinverlust bei den Waschzyklen), dann Verdünnung der Leerwert-Lösungen 1:10 mit PBS und photometrische Messung der verdünnten Leerwert-Lösungen gegen den Reagentienleerwert bei $\lambda = 280 \text{ nm}$
- Die Berechnung der Carbonylgruppen erfolgt über den molekularen Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{375\text{nm}} = 22.000 \text{ m} \times \text{cm}^{-1}$, Doppelwerte für die Extinktion der Test-Röhrchen mitteln $\rightarrow E$. Extinktion des jeweiligen Leerwertes von E subtrahieren $\rightarrow \Delta E$. Jetzt jeweils das ΔE des fully red. BSA von den ermittelten ΔE subtrahieren. Die erhaltene Differenz in die Formel: $c = E \div d \times \epsilon$ einsetzen. Die Konzentrationsangabe erfolgt in [nmol/mg Protein].
- Die Berechnung der Proteinkonzentration am Ende des Tests erfolgt mittels Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{280\text{nm}} = 5,31$ für eine 1g/100 mL-Lösung
- Korrektur des Wertes für die Carbonylgruppenkonzentration entsprechend dem Proteinverlust.

Durchführung ELISA (III):

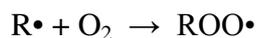
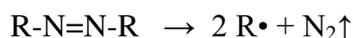
- Für ELISA-Eichreihe fully oxidized BSA frisch einwiegen und oxidieren (4 mg BSA/mL), fully reduced BSA aus der - 80°C Gefriertruhe holen und gegebenenfalls auf 4 mg BSA/mL verdünnen. Konzentrationsabstufungen von 80% - 0% ox. BSA (siehe %-Abstufungen unter Methode II) in Eppendorfhütchen (1 mL) auf ein Gesamtvolumen von 100 µL pipettieren.
- Nach Verdünnung der Proben auf ein Proteingehalt von 4 mg/mL mit PBS erfolgt die Derivatisation mit 15 µL der Probe und 45 µL Derivatisationsreagenz, anschließen vortexen und 45 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren, dabei alle zehn Minuten vortexen.
- Verdünnung des Derivatisationsansatzes (5 µL) mit 1995 µL PBS in ein 2 mL Eppendorfhütchen und vortexen (entspricht jetzt einer Proteinkonzentration von 2,5 µg/mL).
- Je 200 µL der Proben (je Probe im Triplikate: 3 x 200 µL) in die Kavität der ELISA-Mikrotiterplatte geben (entspricht einer Proteinkonzentration von 0,5 µg/Kavität) und über Nacht bei + 4°C im Dunkeln inkubieren.
- Am folgenden Tag ELISA-Platte abkippen und 3 Waschzyklen mit PBS (Raumtemperatur) durchführen und anschließend auf Zellstoff abklopfen.
- In jede Kavität 250 µL Blocking-Solution geben und 90 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren.
- ELISA-Platte abkippen, waschen (siehe oben) und abklopfen
- In jede Kavität 200 µL Anti-DNP-Antikörper (1:1000) pipettieren und 60 Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubieren.
- ELISA-Platte abkippen, waschen (siehe oben) und abklopfen
- In jede Kavität 200 µL strept.-bio. horseradish-Antikörper (1:3000) pipettieren und bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren.
- ELISA-Platte abkippen, waschen (siehe oben) und abklopfen
- In jede Kavität 200 µL Substrat geben und 25 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren.
- Die Extinktionsmessung der ELISA-Platte erfolgt direkt (d.h. ungestoppt) nach Ablauf der Inkubationszeit bei $\lambda = 490 \text{ nm}$ und die Berechnung der Carbonylgruppenkonzentrationen erfolgt anhand der mitgeführten ELISA-Eichreihe.

2.2.5 ABAP-Hämolysetest

Die Messung der Radikalresistenz von Erythrozyten im ABAP-Hämolysetest basiert auf einer Arbeit von Yamamoto et al. (1986). In dieser Studie wurde eine von Boda et al. (1995) entwickelte Mikromethode angewandt, für die nur 15 µl Erythrozytenkonzentrat benötigt werden.

Prinzip:

Eine von Plasma und anderen Zelltypen gereinigte 0,5%ige Erythrozytensuspension wird 2,5 Stunden bei 37°C mit 2,2'-Azobis(2-amindinopropane)dihydrochlorid (ABAP) inkubiert. ABAP ist eine Diazo-Verbindung (R-N=N-R) mit R= HCl•HN=C(NH₂)C(CH₃), die in Lösung bei 37°C pro Zeiteinheit eine konstante Menge an Peroxylradikalen freisetzt, welche die Erythrozytenmembran angreifen und so zur Hämolyse führen.



Die Extinktion des durch die Hämolyse aus den Erythrozyten freigesetzten Hämoglobins wird photometrisch bei einer Wellenlänge von 540 nm halbstündlich gemessen und dient zur Berechnung des Hämolysegrades in %.

Materialien:

- Eppendorf Photometer, UKE Hamburg
- Quartzeinmalküvetten
- Kochsalzlösung (NaCl 0,9%)
- Phosphatpuffer PBS-Dulbecco ohne Ca²⁺, Mg²⁺, Seromed
- destilliertes Wasser (Aqua dest.)
- Triton X-100; Serva
- ABAP/AAPH (2,2'-Azobis(2-amindinopropane)dihydrochlorid); Fluka, Art. 56510

Herzustellende Reagenzien:

- 74 mM ABAP: 201 mg ABAP in 10 mL PBS
- NaCl-PBS-Gemisch: NaCl 0,9% : PBS = 1:1

- 0,1%ige Triton X-100-Lösung: 1 mL 100% Triton + 9 mL Aqua dest. → 10 % Triton
1 mL 10 % Triton + 99 mL Aqua dest. → 0,1 % Triton

Durchführung:

Die nach Zentrifugation und Abpipettieren des Plasma verbleibenden zellulären Bestandteile des EDTA-Blutes wurden in isotonische NaCl-Lösung gegeben und bis zur Verarbeitung bei + 4°C maximal drei Tage gelagert. Zur Reinigung der Erythrozyten wurden diese erneut 2x jeweils in frischer NaCl-Lösung gewaschen und zentrifugiert (5 Minuten, 3000U/min). Die Erstellung einer 0,5%igen Erythrozytensuspension erfolgte aus 15 µL Erythrozytensediment und 2985 µL PBS-Lösung. Für jede Probe wurden drei Ansätze hergestellt:

- A: Messung des Hämolysegrades in der Probe
- B: Positivkontrolle (vollständige Hämolyse durch Zugabe von Triton X-100)
- C: Negativkontrolle

Für die Reaktionsansätze wurde in die Glasreagenzgläser A und B jeder Probe 2400 µL der 0,5%igen Erythrozytensuspension und 2400 µL ABAP (74 mM) gegeben, in das Reagenzglas C für die Negativprobe je 500 µL 0,5%ige Erythrozytensuspension und 500 µL NaCl-PBS-Gemisch. Bei einer Temperatur von 37°C wurden die Ansätze in einem Wasserbad unter leichtem horizontalem Schütteln inkubiert. Nach 30, 60, 90 und 120 Minuten wurde aus den Ansätzen A und B je 350 µL entnommen und in Halbmikroküvetten überführt in denen sich schon 350 µL kaltes NaCl-PBS-Gemisch (für Ansatz A) oder 350 µL kalte 0,1%ige Triton X-100-Lösung (für Ansatz B) befanden. Aus dem Reagenzglas C wurde nur zu den Zeitpunkten 30 und 120 Minuten ein Aliquot von je 350 µL entnommen und in eine Halbmikroküvette mit 350 µL kaltem NaCl-PBS-Gemisch gegeben. Die Küvetten der Ansätze A und C wurden vor dem Messgang 5 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert. Nach Nullabgleich mit NaCl-PBS-Gemisch wurde die Extinktion freigewordenen Hämoglobins in einem Photometer ($\lambda = 540 \text{ nm}$) gemessen.

Berechnung:

Der prozentuale Hämolysegrad berechnet sich nach folgender Gleichung:

$$\text{Hämolyse (\%)} = \frac{E_A - E_{C^*}}{E_B - E_{C^*}} \times 100$$

E = Extinktion, A = Probenwert, B = Wert der totalen Hämolyse, C = Negativkontrolle, C* = Mittelwert von C_{30min} und C_{120min}

Die Angabe der Radikalresistenz der Erythrozyten erfolgt in Minuten Inkubationzeit bei der 50% der Erythrozyten hämolysiert sind. Dieser Wert wird H 50% genannt und anhand der Funktion der Inkubationszeit ermittelt.

2.2.6 HPLC-Analytik zur Bestimmung der lipophilen Antioxidantien

Die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit elektrochemischer Detektion zur Bestimmung der lipophilen Antioxidantien α -Tocopherol, γ -Tocopherol und Coenzym Q₁₀ wurde nach der Methode von Finckh et al. (1999) durchgeführt.

Prinzip:

Die lipophilen Antioxidantien werden nach Extraktion mit Hexan über die HPLC aufgetrennt und mittels elektrochemischer Detektion registriert. Über die mitgeführten internen Standards können die mit der Extraktion einhergehenden Substanzverluste erfasst und bei der Konzentrationsberechnung berücksichtigt werden.

Substanzen:

- Interne Standardlösungen: 1. γ -Tocotrienol; Merck, 2. Ubichinol-9; Sigma, 3. Ubichinon-9; Sigma
- Natriumlaurylsulfat; Merck
- Burylhydroxytoluol; Fluka
- Hexan (Lichrosolv HPLC-Qualität); Merck
- Methanol (Lichrosolv HPLC-Qualität); Merck
- Ethanol (Lichrosolv HPLC-Qualität); Merck
- 2-Propanol (Lichrosolv HPLC-Qualität); Fluka

- Lithiumperchlorat; Fluka
- Natriumdithionat; Merck
- Argon; Linde

Geräte:

- HPLC-Pumpe Modell 2150; Amersham Pharm.
- Injektionsventil 20 μL -Schleife; Rheodyne, Cotati, USA
- SuperPac PepS RP (c2/c18)Vorsäule (10x4,0 mm i.d. 5 μm Partikelgröße); Amersham Pharm.
- SuperPac PepS RP (c2/c18) Säule (250x4,0 mm i.d. 5 μm Partikelgröße); Amersham Pharm.
- Elektrochemischer Detektor, Coulochem 5200; ESA, Bedford, USA
- Konditionierungszelle Modell 5020; ESA, Bedford, USA
- Analytische Zelle Modell 5011; ESA, Bedford, USA
- Integrator SP 4270; Spectra Physics

Durchführung:

Aus den Stammlösungen von γ -Tocotrienol (97,81 pmol/ μL), Ubichinol-9 (7,74 pmol/ μL) und Ubichinon-9 (2,42 pmol/ μL) wurde die interne Standardlösung mit 25 μL γ -Tocotrienol (1:10 vorverdünnt), 50 μL Ubichinol-9/Ubichinon-9-Lösung und 425 μL Ethanol angesetzt. Zu jeder Plasmaprobe (50 μL) wurde 50 μL der internen Standardlösung sowie 10 μL Butylhydroxytoluol-Lösung gegeben und dieser Ansatz für zehn Sekunden gevortext. Nach Zugabe von 500 μL Hexan wurde der Ansatz erneut für zwei Minuten gevortext und dann für fünf Minuten zentrifugiert (3000 U/min). Der Überstand aus der, die lipophilen Antioxidantien enthaltenden Hexanphase wurde abpipettiert und ein zweites Mal gevortext (eine Minute) und zentrifugiert (fünf Minuten). Nach Eindampfen von 400 μL der Hexanphase unter Argon, wurde der Ansatz in 200 μL Reagenzalkohol:Methanol (1:1, v/v; Reagenzalkohol: Ethanol:2-Propanol, 95:5, v/v) aufgenommen. Während dieser Arbeitsschritte wurden alle Probenansätze durch Aluminiumfolie-umwickelte Reagenzgläser vor Lichteinwirkung geschützt und auf einer Temperatur von + 4°C gehalten. Vor Analyse konnten die so präparierten Proben für max. 8 Stunden bei - 20°C zwischengelagert werden.

Für jeden HPLC-Lauf wurde 30 µL des Extraktes eingespritzt, dabei lief das heliumtgasge Laufmittel (13,4 mM Lithiumperchlorat in Methanol:Ethanol:2-Propanol (88:24:10), (v/v)) mit einer Flussrate von 1,5 mL/min. Die HPLC-Säule trennt die einzelnen lipophilen Antioxidantien auf, die dann nacheinander die Messzellen passieren und dort erfasst werden. Die elektrochemische Detektion erfolgt durch zwei in Serie geschaltete Messzellen die im „Reduktions-Oxidations-Modus“ arbeiten. Dabei werden an der ersten „Konditionierungszelle“ (- 0,60 V) Ubichinon-9 und Ubichinon-10 reduziert und an der zweiten „analytischen Zelle“ (Elektrode 1: -0,15 V; Elektrode 2: +0,60 V) alle oxidierbaren Substanzen oxidiert und detektiert.

Berechnung:

Das Integral der Ausschlagflächen der zu messenden Konzentrationen wird in Bezug zu den bekannten Konzentrationen der internen Standards gesetzt; γ -Tocotrienol für α - und γ -Tocopherol, Ubichinol-9 für Ubichinol-10 und Ubichinon-9 für Ubichinon-10. Die Konzentrationsangaben für α -Tocopherol, γ -Tocopherol und Coenzym Q₁₀ werden auf Gesamtlipidkonzentration bezogen und erfolgen in µmol/µg totale neutrale Lipide .

2.2.7 Photometrische Bestimmung von Sulfhydrylgruppen

Prinzip:

Mit Hilfe einer Eichreihe mit bekannter Sulfhydrylgruppen (SH-Gruppen)-Konzentration in Glutathion (GSH) wurde die SH-Konzentration im Plasma photometrisch nach der Methode von Ellmann (1959) bestimmt.

Materialien:

- Photometer Lange LP 700; Roche, Mannheim
- Plastikröhrchen
- Quatzküvetten
- Pipettenspitzen
- NaCl: Merck 6404
- EDTA: Merck 8418
- Natriumdihydrogenphosphat: Merck 6346
- Dinatriumhydrogenphosphat: Merck 6579

- Glutathion (GSH): Sigma G 4251
- 5,5Dithio-bis-2-Nitrobenzoesäure(DTNB): Sigma D 8130

Herzustellende Lösungen:

- NaCl 0,9% (0,9g NaCl in 100 mL bidest-H₂O lösen)
- EDTA 2 mM (74,44 mg in 100 mL 0,2M Dinatriumhydrogenphosphat lösen und auf pH 9,0 prüfen)
- Dinatriumhydrogenphosphat 0,2 M (7,16g in 100 mL bidest- H₂O lösen)
- Natriumdihydrogenphosphat 0,2 M (2,76g in 100 mL bidest- H₂O lösen)
- Phosphatpuffer 0,025 M pH 7,0 (30,5 mL 0,2M Dinatriumhydrogenphosphat und 19,5 mL 0,2 M Natriumdihydrogenphosphat auf 100 mL bidest- H₂O auffüllen und auf pH 7,0 prüfen, davon 25 mL Phosphatpuffer mit 75 mL bidest- H₂O verdünnen)
- DTNB 10 mM (39,6 mg DTNB in 10 mL 0,025M Phosphatpuffer lösen, 10 Minuten mischen, dann filtrieren)
- Glutathion 1 mM (15,4 mg GSH in 50 mL 0,9% NaCl lösen)

Durchführung:

Die Bestimmung der SH-Gruppen erfolgte über eine Eichreihe mit GSH-Konzentrationen von 1mM, 0,5 mM, 0,25 mM, 0,125 mM, 0,063 mM. Die Ansätze wurden in Plastikröhrchen mit je 900 µL EDTA und 20 µL DTNB versetzt, gemischt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Überführung der Ansätze in eine Quatzküvette wurde die Extinktion nach Leerwerteinstellung gegen NaCl 0,9% photometrisch ($\lambda = 412\text{nm}$) gemessen. Die Extinktion entspricht der Konzentration von GSH in mM, die Konzentration von SH in µmol/L erhält man nach Multiplikation mit dem Faktor 750. Die Ansätze der Proben (50 µL Plasma + 50 µL NaCl + 900 µL EDTA + 20 µL DTNB) und der Probenleerwerte (50 µL Plasma + 50 µL NaCl + 900 µL EDTA + 20 µL Phosphatpuffer 0,025 mM) wurden wie die der Eichreihe durchgeführt und gemessen. Nach Abzug des Leerwertes der jeweiligen Probe wurde die Extinktion mit dem Faktor 1500 multipliziert.

2.2.8 Photometrische Bestimmung von Harnsäure

Die Harnsäure wurde mit dem UA Plus-Kit der Firma Roche, Mannheim bestimmt, die photometrische Messung erfolgte mit dem Gerät Lange LP 700 der Firma Roche.

2.2.9 Photometrische Bestimmung von Vitamin C

Prinzip:

In Anlehnung an die Methode von Omaye, Turnbull, Sauberlich (1979) wird die Farblösung 2,6-Dichlorphenolindophenol von Ascorbinsäure reduziert und löst dabei einen Farbumschlag aus, der sich bei 520 nm als eine Erniedrigung der Absorption zeigt. Die Reaktion muss bei einem pH-Wert von 3,0 - 4,5 ablaufen. Ein Kontrollwert wird durch Zugabe von einigen Kristallen Ascorbinsäure, die den Farbausschlag bis zur Farblosigkeit auslöscht, erzeugt. Unspezifische Reduktionen in der Lösung sollen durch Zugabe des Puffers Tri-natriumcitratdihydrat blockiert werden.

Materialien:

- Eppendorf Photometer, UKE Hamburg
- Metaphosphorsäure (HPO_3): Merck 546
- Tri-natriumcitratdihydrat: Merck 6448 MW: 294,10
- Essigsäure 96% (Eisessig): Merck 62 MW: 60,05
- 2,6-Dichlorphenolindophenol (DCIP): Merck 3028 MW: 326,11
- Ascorbinsäure: Merck 127 MW: 176,13

Herzustellende Lösungen:

- Metaphosphorsäure 10% (10 g auf 100 mL bidest- H_2O lösen -wöchentlich neu ansetzen)
- Metaphosphorsäure 5% (1:2 mit bidest- H_2O verdünnen)
- Citrat-Acetat-Puffer (22 g Na-Citrat in ca. 40 mL bidest- H_2O lösen, mit Eisessig pH 4,15 einstellen, dann auf 100 mL mit H_2O auffüllen)
- DCIP 0,01% (10mg in 100 mL bidest- H_2O lösen)

Durchführung:

Die Proben (130 μL Plasma) wurden nach Aliquotierung mit 130 μL 10%iger Metaphosphorsäure ausgefällt, in der Eppendorffzentrifuge abzentrifugiert, der Überstand wurde abpipettiert und bei -80°C tiefgefroren. Die Herstellung einer Standardlösung der Konzentration 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ascorbinsäure erfolgte durch Lösung von 50 mg Ascorbinsäure in 2,5 mL 5%iger Metaphosphorsäure in einem Messkolben, wovon wiederum 5 μL in 5 mL 5%iger Metaphosphorsäure verdünnt wurden und eine Verdünnungsreihe folgender Konzentrationen: 20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hergestellt wurde.

Nach Zugabe von je 200 μL Citratacetatpuffer und DCIP wurde die Probe in eine Plastikeinküvette überführt und nach 30 Sekunden in einem Eppendorf Photometer ($\lambda=520\text{nm}$) die Extinktion gemessen (E_1). Durch Einrühren einiger Kristalle Ascorbinsäure in den Probenansatz entfärbt sich die Probe vollständig und die Messung des Probenleerwert (E_2) kann erfolgen. Zur Bestimmung des Reagenzienwerts wurden 400 μL 5%ige Metaphosphorsäure, 200 μL Citrat-Acetat-Puffer und 200 μL DCIP vermischt und die Absorption im Photometer gemessen.

Berechnung:

Die Extinktion (ΔE) ergibt sich aus E_1 minus E_2 . ΔE wird dann vom Reagenzienleerwert subtrahiert. Aus den Extinktionswerten der Standardreihe wird eine Eichkurve erstellt, hieraus lässt sich nach Eingabe der Proben-Extinktionen die Ascorbinsäurekonzentration ablesen und anschließend in $\mu\text{mol}/\text{L}$ umrechnen.

2.2.10 Bestimmung des Total Radical-trapping Antioxidant Parameter (TRAP)

Die Bestimmung des Total Radical-trapping Antioxidant Parameter (TRAP) erfolgte nach der Methode von Wayner et al. (1987)

Prinzip:

Das Plasma wird mit der freie Radikale-generierenden Substanz ABAP (2,2'-Azobis(2-amindinopropane)dihydrochlorid) und Linolsäure in einer luftdichten Messkammer inkubiert. Die Zeitspanne bis zum Einsetzen der Lipidperoxidation wird über eine Sauerstoffelektrode bestimmt. Der Ansatz wird dabei mit dem wasserlöslichen Tocopherol-Analogen TROLOX kalibriert. Die Menge der von den unterschiedlichen

Antioxidantien im Plasma eingefangenen (trapped) Peroxylradikale wird in $\mu\text{mol/L}$ Plasma als TRAP_{gemessen} angegeben.

Materialien:

- Two-Channel Biological Oxygen Monitor; YSI Inc., Yellow Springs, Ohio, USA
- Linolsäure; Sigma Best. Nr. 1376
- ABAP (2,2'-Azobis(2-amindinopropane)dihydrochlorid) MW 271,2 g/mol; Polysciences, Warrington, PA, USA
- TROLOX (6-Hydroxy-2, 5, 7, 8-tetra-methyl-chroman-2-carboxysäure); Fluka Best. Nr. 56510
- Phosphatpuffer PBS-Dulbeco ohne Ca^{2+} , Mg^{2+} , Seromed Best. Nr. L1825

Herzustellende Reagenzien:

- ABAP: 105 mg ABAP abwiegen und in 1 mL PBS lösen
- TROLOX: 10 mg TROLOX in 100 mL PBS ansetzen

Durchführung:

Die Glasküvetten mit Magnetrührern werden mit 3 mL PBS befüllt, etwaige Luftblasen entfernt, in das auf 37° C vorgewärmte Wasserbad eingehängt und mit den Sauerstoffelektroden verschlossen. Die Sauerstoffelektroden werden einmal täglich nach Vorschrift geeicht. 5,2 μL Linolsäure werden mit 130 μL Plasma in Eppendorfhütchen 40 Sekunden auf einem Vortex verwirbelt, es entsteht ein milchig-trübes Gemisch. Die Magnetrührer werden wieder ausgeschaltet und die Sauerstoffelektroden aus den Messkammern gezogen. Mit je 50 μL des Linosäure-Plasma-Gemisches lassen sich pro Messprobe zwei Messkammern befüllen, dabei wird die Pipettenspitze durch dreifaches Ansaugen und Ablassen der Mischung gespült. Die Sauerstoffelektroden werden wieder eingesetzt und entstandene Luftblasen durch Verschieben des Elektrodenhalters zerstört. Die Sauerstoffschreiber werden gestartet und sobald eine konstante Sauerstoffsättigung erreicht ist, wird der Sauerstoffschreiber auf 100% Sauerstoffsättigung justiert. Die Peroxidationsreaktion wird über die Zugabe von ABAP gestartet. Zur Vermeidung von Lichteinwirkungen wird ein Lichtschutz angebracht. Die Zeit der gehemmten Peroxidation der Linolsäure von der ABAP-Zugabe bis zum Verbrauch der Plasma-Antioxidantien, erkennbar an dem dann rascheren Sauerstoffverbrauch bei ungehemmter Peroxidation, wird als „T-Plasma“ bezeichnet. Sie spiegelt die gesamte antioxidative Aktivität des

Plasmas wieder, dessen verschiedene Antioxidantien die Peroxidation der Linolsäure hemmen. Nach Beginn der ungehemmten Peroxidation wird das System bei 50% Sauerstoffsättigung über die Zugabe von 25 μL (= 0,04 mM) TROLOX kalibriert. Bei einer Sauerstoffsättigung von 0% ist der Versuch beendet. Der $\text{TRAP}_{\text{gemessen}}$ errechnet sich in $\mu\text{mol/L}$ aus der Konzentration von TROLOX (hier 3,22 $\mu\text{mol/L}$) multipliziert mit zwei (ein Mol TROLOX „fängt“ 2 Mol freier Radikale), dem Plasmaverdünnungsfaktor n (hier 20) und der Zeit T-Plasma dividiert durch die Zeit T-TROLOX. Der gemessene TRAP wird im folgenden $\text{TRAP}_{\text{gemessen}}$ genannt.

Berechnung von TRAP:

Der theoretisch vorhandene $\text{TRAP}_{\text{berechnet}}$ berechnet sich aus den Konzentrationen der einzelnen Komponenten und einem experimentell ermittelten effektiven Multiplikationsfaktor. Dieser gibt wiederum an, wieviele freie Radikale von einem Molekül der jeweiligen Substanz abgefangen werden können, so fängt beispielsweise ein Molekül α -Tocopherol zwei Radikale ab (Wayner et al. 1987).

$$\text{TRAP}_{\text{gerechnet}} = 2 \times [\alpha\text{-Tocopherol}] + 1,3 \times [\text{Harnsäure}] + 1,7 \times [\text{Vitamin C}] + 0,33 \times [\text{Sulphydrylguppen}]$$

2.2.11 Enzymimmunoassay zur Bestimmung von Homocystein

Zur Bestimmung von Homocystein wurde ein Microplate Enzymimmunoassay der Firma Bio-Rad Laboratories (Oslo, Norwegen) verwandt, die photometrische Messung erfolgte mit dem ELISA-Plattenphotometer der Firma Dynatech, Modell MR 5000.

2.2.12 Photometrische Bestimmung von Cholesterin und Triglyzeriden

Die Cholesterinbestimmung erfolgte mit dem enzymatischen Farbttest der Firma Roche (Cholesterin CHOD-PAP; Best. Nr. 1489437) mit anschließender photometrischer Messung im Gerät Lange LP 700 der Firma Roche.

Die Bestimmung der Triglyzeride erfolgte mit dem enzymatischen Farbstest der Firma Boehringer (Triglyzeride GPO-PAP Best. Nr. 701912). Die photometrische Messung wurde mit dem Gerät Lange LP 700 der Firma Roche durchgeführt.

Die Konzentrationsangabe der fettlöslichen Substanzen α -Tocopherol, γ -Tocopherol und Coenzym Q₁₀ sowie Malondialdehyd wurde auf die Konzentration der totalen neutralen Lipide (TNL) bezogen, welche sich folgendermaßen ermittelt:

$$\text{Cholesterin [mg/dL]} + \text{Triglyzeride [mg/dL]} = \text{Totale neutrale Lipide (TNL) [mg/dL]} \times 100 = \text{TNL } [\mu\text{g/L}]$$

2.2.13 Enzymimmunoassay zur Bestimmung von Antikörpern gegen oxidiertes LDL im Serum

Zur Bestimmung der Antikörper gegen oxidiertes LDL wurde ein Enzymimmunoassay-Kit der Firma Biomedica (Kat. Nr. BI-20032) angewendet. Die photometrische Messung erfolgte mit dem ELISA-Plattenphotometer der Firma Dynatech, Modell MR 5000.

Testprinzip:

Cu²⁺ oxidiertes Low Density Lipoprotein (LDL) ist als Antigen auf Mikrotiterstreifen beschichtet. In der vorverdünnten Probe vorhandene Antikörper binden spezifisch an das Antigen. Nach einem Waschschrift wird die Menge an gebundenem humanen IgG bestimmt. Hierzu wird ein mit Peroxidase konjugierter anti-human IgG Antikörper eingesetzt. Nach einem weiteren Waschschrift wird Tetramethylbenzidin (TMB) als nicht toxisches Substrat zugegeben. Die im ELISA-Photometer messbare Farbentwicklung ist direkt proportional der Konzentration an Antikörpern in der Probe.

2.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe des Computerprogrammes STATISTICA 6.0 durchgeführt. Nach dem Mann-Whitney-U-Test für nichtparametrische Verfahren wurden Unterschiede zwischen den einzelnen Probandengruppen ermittelt. Zum Vergleich der gemessen und gerechneten TRAP-Konzentration wurde der Wilcoxon-Test für gepaarte

Stichproben verwendet. Zur Korrelation der einzelnen Parameter untereinander wurden Spearman´s Rangkorrelationen bestimmt, dabei wurden alle Probanden (Gesamtkollektiv) betrachtet, die Kontrollgruppe alleine und die zusammengefassten Gruppen der Nierenpatienten (Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz mit und ohne Peritonealdialyse). Als signifikant wurden p-Werte $< 0,05$ erachtet. Zur zusätzlichen graphischen Darstellung der signifikanten Korrelationen wurde die lineare Darstellung gewählt, die in den Abbildungen wiedergegeben R-Werte und das p-Niveau beziehen sich jedoch auf die nach Spearman´s Rangkorrelationen berechneten Werte.

Durchgeführte Korrelationen nach Spearman:

- Endothelabhängige und nicht-endothelabhängige Dilatation mit allen laborchemischen Parametern
- Malondialdehyd, Carbonylgruppen, oxidierte-LDL-Antikörper und Cholesterin mit den restlichen laborchemischen Parametern

3. Ergebnisse

3.1. Ergebnisse der Endothelfunktionsanalysen

Die Ergebnisse der Messungen der Intima-Media-Dicke der A. carotis interna und die der endothelabhängige Vasodilatation (EAD) und nicht-endothelabhängige Vasodilatation (NEAD) bei den verschiedenen Probandengruppen sind in Tabelle 3.1 dargestellt.

Tab. 3.1: Ergebnisse der Endothelfunktionsanalysen bei den verschiedenen Probandengruppen

Probandengruppe	n	Intima-Media-Dicke (IMD) [mm]	Gefäß- durchmesser in Ruhe [mm]	Endothelabhängige Dilatation (EAD) [Änderung in %]	Nicht- endothelabhängige Dilatation (NEAD) [Änderung in %]
Kontrollen (Kontr)	11	0,38 (0,3-0,48)	5,6 (2,6-8,3)	8,7 (1,3-16,0)	18,4 (8,8-34,7)
Ventrikelseptumdefekt	5	0,39 (0,38-0,43)	4,3 (2,5-5,4)	4,8 (3,5-11,2)	20,8 (5,5-24,3)
FalLOT´sche Tetralogie	10	0,43 (0,38-0,48)	3,3 (2,6-5,4)	6,4 (0-11,0)	29,0 (6,1-35,1)
Transposition der gr. Arterien	16	0,43 (0,3-0,53)	4,3 (2,2-7,3)	7,5 (0-18,4)	18,5 (9,4-33,2)
Z.n. Fontan-Operation	12	0,43 (0,38-0,53)	3,4 (2,6-5,0)	4,6 (1,1-16,2)	25,8 (10,6-38,8)
Niereninsuffizienz	8	0,43 (0,34-0,49)	6,0 (2,7-9,6)	6,7 (1,1-12,4)	17,1 (7,6-36,2)
Peritonealdialyse	1	0,42	7,5	0,93	1,0

Median (Bereich)

Die Dicke der Intima-Media der A. carotis interna unterschied sich in keiner der einzelnen Patientengruppen signifikant von der Kontrollgruppe. Auch bezüglich der EAD und NEAD zeigten die einzelnen Patientengruppen keine signifikanten Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe.

3.2. Ergebnisse der laborchemischen Messungen im Blut

3.2.1 Malondialdehydkonzentration im Plasma

Die Konzentration von Malondialdehyd im Plasma bei den verschiedenen Probandengruppen ist in Abb. 3.1 und Abb. 3.2 dargestellt. Die Malondialdehydkonzentration war bei den Patienten unter Peritonealdialyse (Median 0,79 $\mu\text{mol/L}$, $p < 0,005$) signifikant höher als in der Kontrollgruppe (Median 0,38 $\mu\text{mol/L}$). Bezogen auf die Konzentration der totalen neutralen Lipide (=TNL; Cholesterin + Triglyzeride) war Malondialdehyd bei den Patienten nach Fontan-Operation (Median 0,24 $\mu\text{mol}/\mu\text{g TNL}$; $p < 0,05$) und bei den Patienten unter Peritonealdialyse (Median 0,26 $\mu\text{mol}/\mu\text{g TNL}$; $p < 0,05$) signifikant gegenüber der Kontrollgruppe (Median 0,12 $\mu\text{mol}/\mu\text{g TNL}$) erhöht.

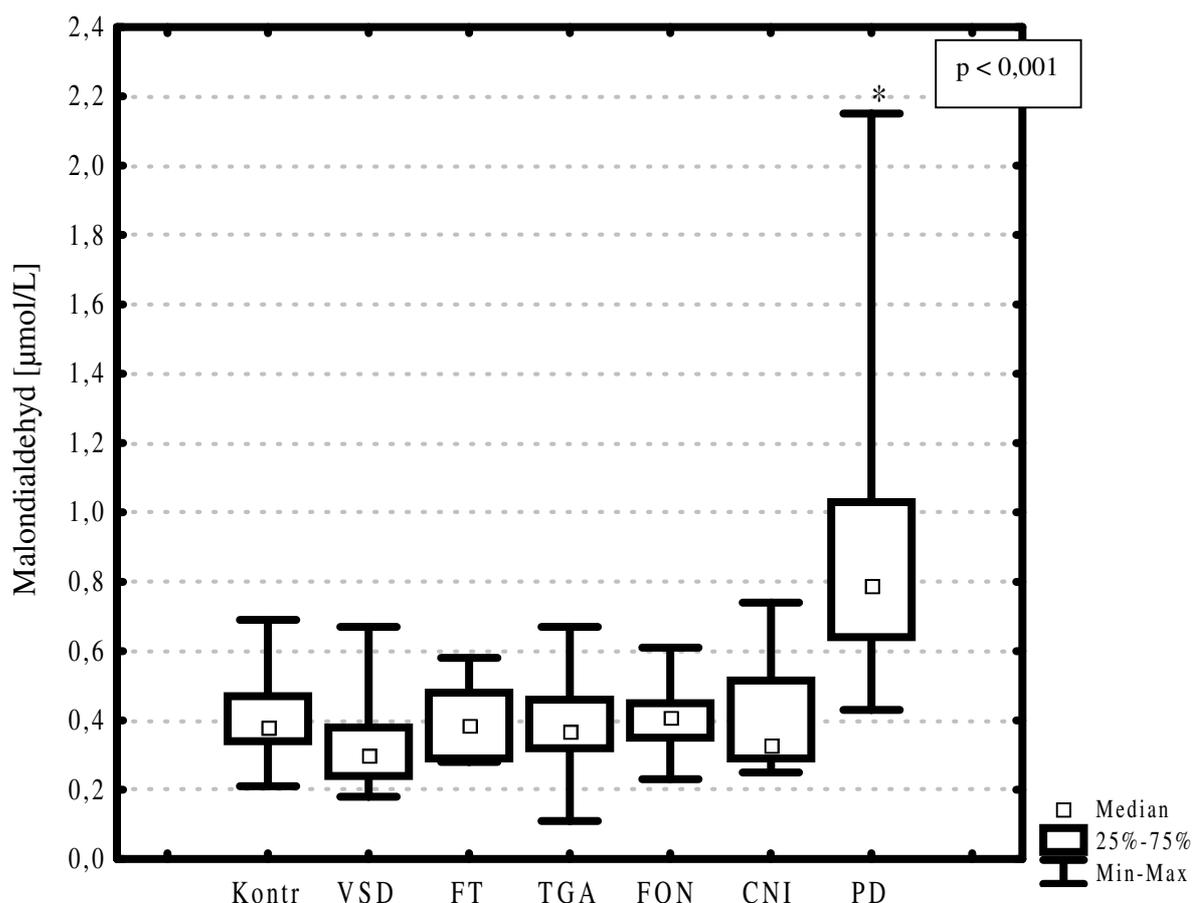


Abb. 3.1: Malondialdehydkonzentration im Plasma bei den verschiedenen Probandengruppen (* = p-Niveau gegenüber der Kontrollgruppe).

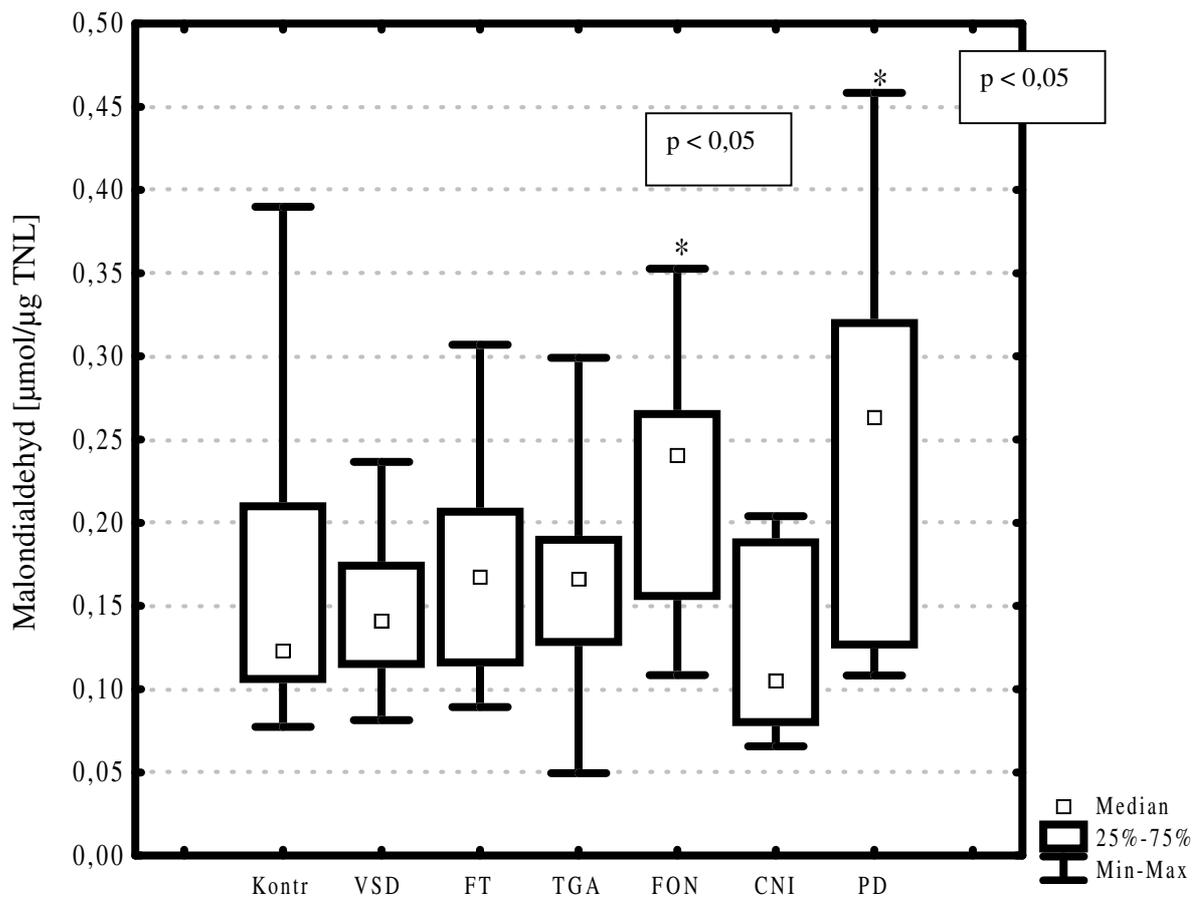


Abb. 3.2: Malondialdehydkonzentration im Plasma bezogen auf die totalen neutralen Lipide (TNL) bei den verschiedenen Probandengruppen (* = p-Niveau gegenüber der Kontrollgruppe).

3.2.2 Carbonylgruppengehalt der Proteine im Plasma

In Abb. 3.3 ist der Carbonylgruppengehalt der Proteine im Plasma bei den verschiedenen Probandengruppen dargestellt. Der Carbonylgruppengehalt war bei den Patienten unter Peritonealdialyse (Median 0,173 $\mu\text{mol/l}$; $p = 0,005$) gegenüber der Kontrollgruppe (Median 0,121 $\mu\text{mol/l}$) erhöht.

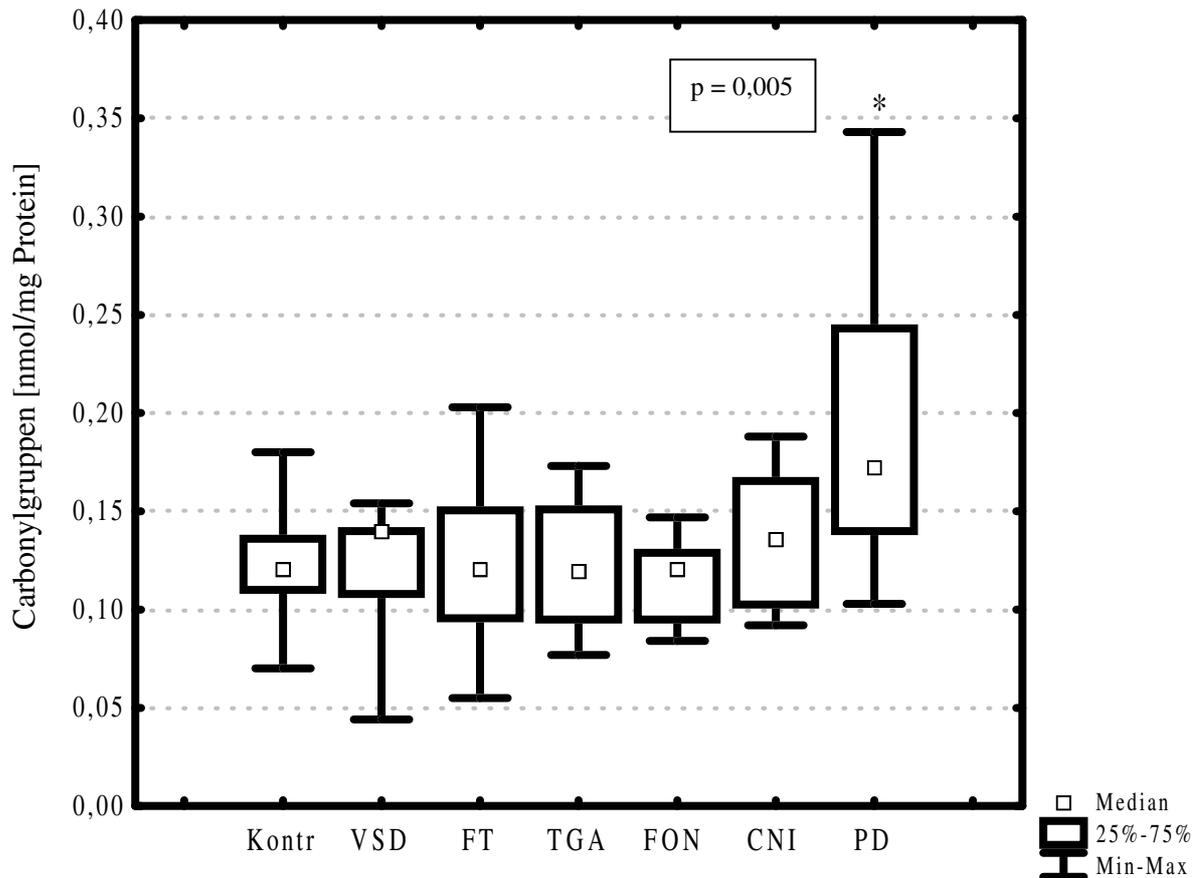


Abb 3.3: Carbonylgruppengehalt der Proteine im Plasma bei den verschiedenen Probandengruppen (* = p-Niveau gegenüber der Kontrollgruppe).

3.2.3 Radikalresistenz der Erythrozyten

Die Radikalresistenz der Erythrozyten bei den verschiedenen Probandengruppen ist in Abb. 3.4 wiedergegeben. Die Radikalresistenz der Erythrozyten war bei den Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (Median 83,5 min; $p < 0,05$) und den Patienten unter Peritonealdialyse (Median 81,0 min; $p < 0,05$) gegenüber der Kontrollgruppe (Median 95,0 min) vermindert. In den einzelnen Gruppen der Patienten mit korrigierten Herzfehlern zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Radikalresistenz der Erythrozyten zur Kontrollgruppe.

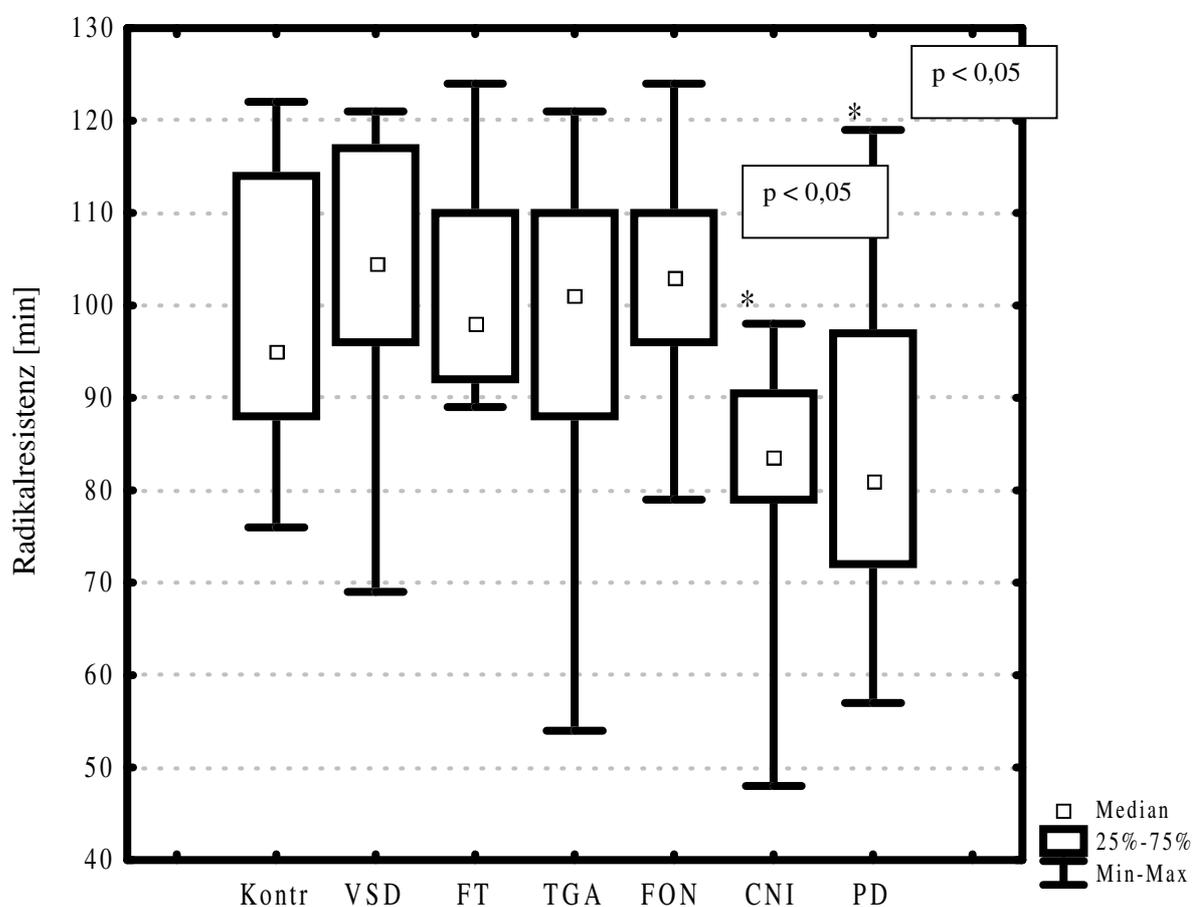


Abb 3.4: Radikalresistenz der Erythrozyten bei den verschiedenen Probandengruppen (* = p-Niveau gegenüber der Kontrollgruppe).

3.2.4 Konzentration der Tocopherole im Plasma

Die α -Tocopherol-Konzentration bezogen auf die Konzentration der totalen neutralen Lipide (=TNL; Cholesterin + Triglyzeride) bei den einzelnen Probandengruppen ist in Abb. 3.5 dargestellt. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den einzelnen Patientengruppen.

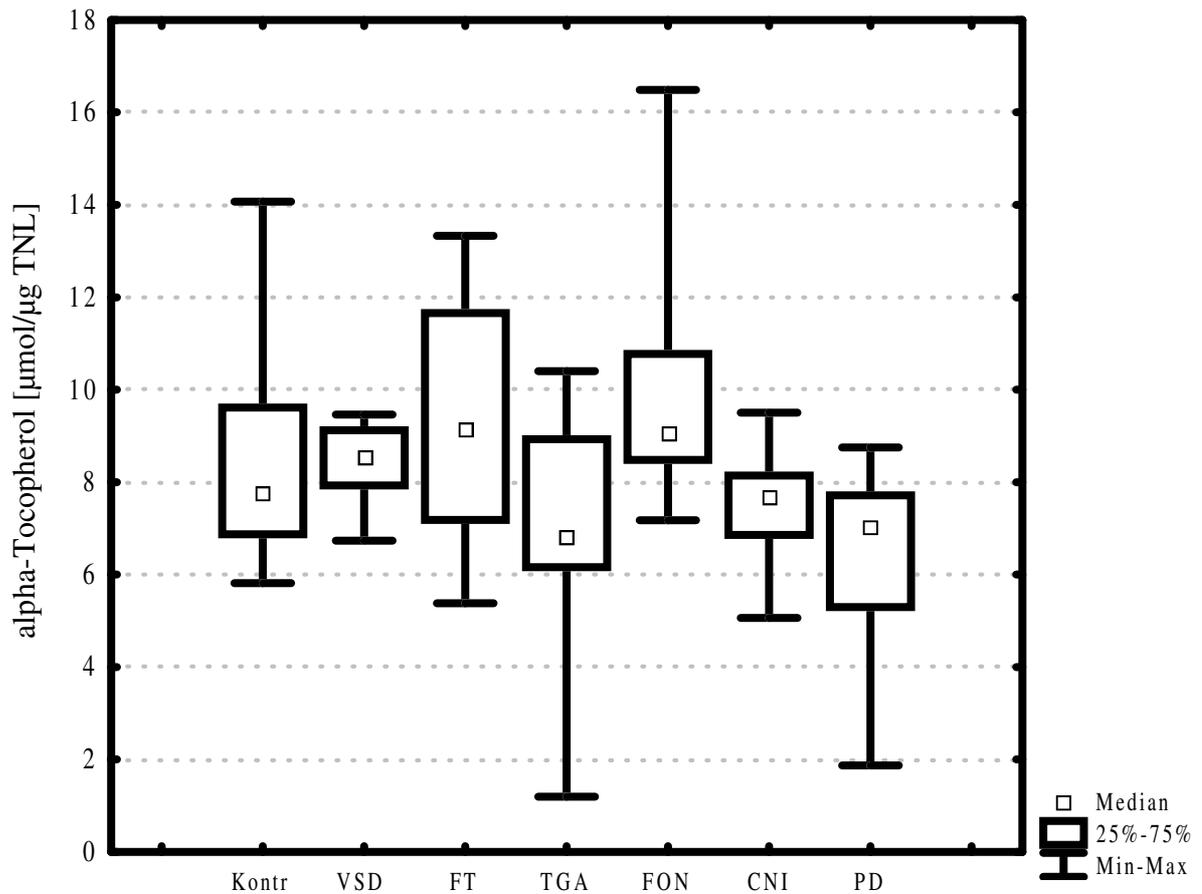


Abb. 3.5: α -Tocopherol-Konzentration im Plasma bezogen auf die totalen neutralen Lipide (TNL) bei den verschiedenen Probandengruppen.

Die γ -Tocopherol-Konzentration bezogen auf die Konzentration der totalen neutralen Lipide (TNL) unterschied sich in den einzelnen Patientengruppen nicht signifikant von der Kontrollgruppe.

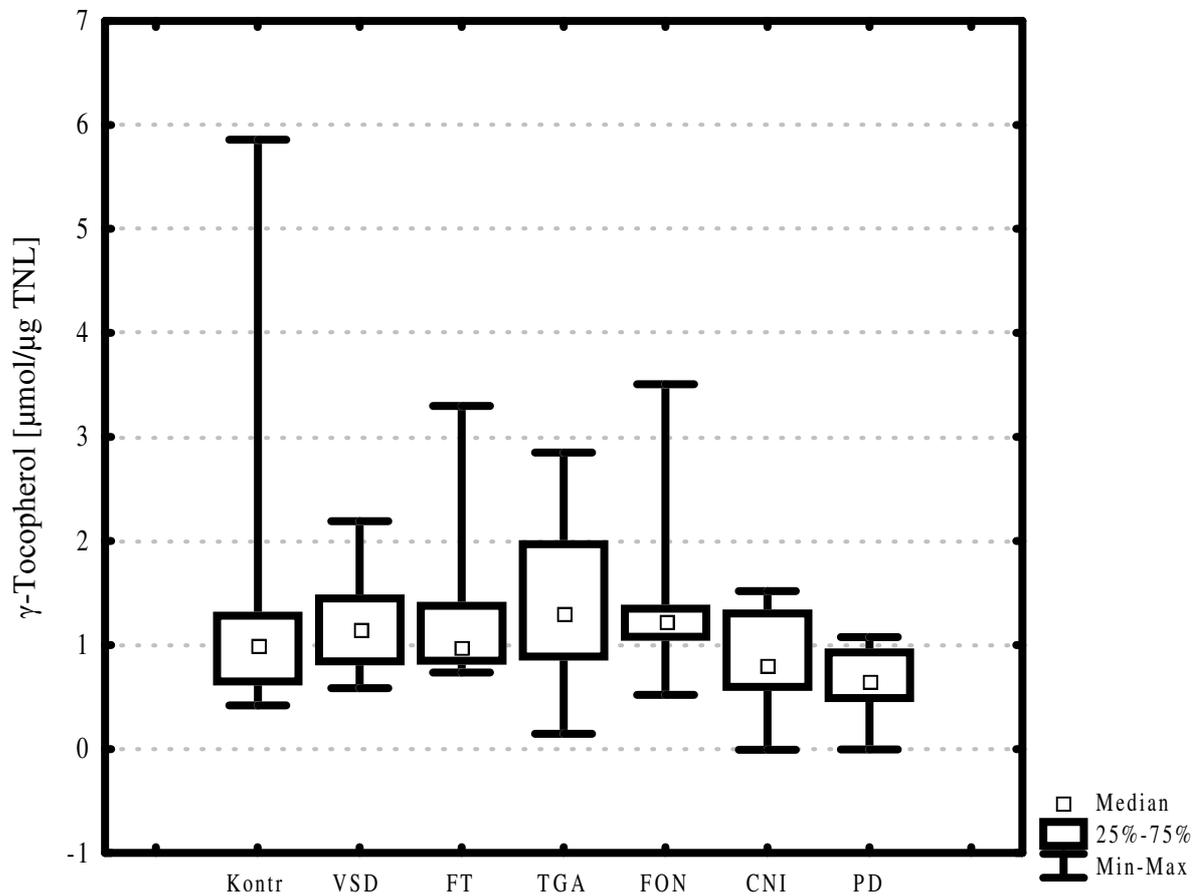


Abb. 3.6: γ -Tocopherol-Konzentration im Plasma bezogen auf die totalen neutralen Lipide (TNL) bei den verschiedenen Probandengruppen.

3.2.5 Coenzym Q₁₀-Konzentration im Plasma

In Abb. 3.7 ist die Konzentration des Gesamtcoenzym Q₁₀ bezogen auf die totalen neutralen Lipide (=TNL; Cholesterin + Triglyzeride) bei den verschiedenen Probandengruppen dargestellt. Bei den Patienten nach Fontan-Operation (Median 0,50 $\mu\text{mol}/\mu\text{g}$ TNL, $p < 0,05$) war das Gesamtcoenzym Q₁₀ gegenüber der Kontrollgruppe (Median 0,37 $\mu\text{mol}/\mu\text{g}$ TNL) erhöht.

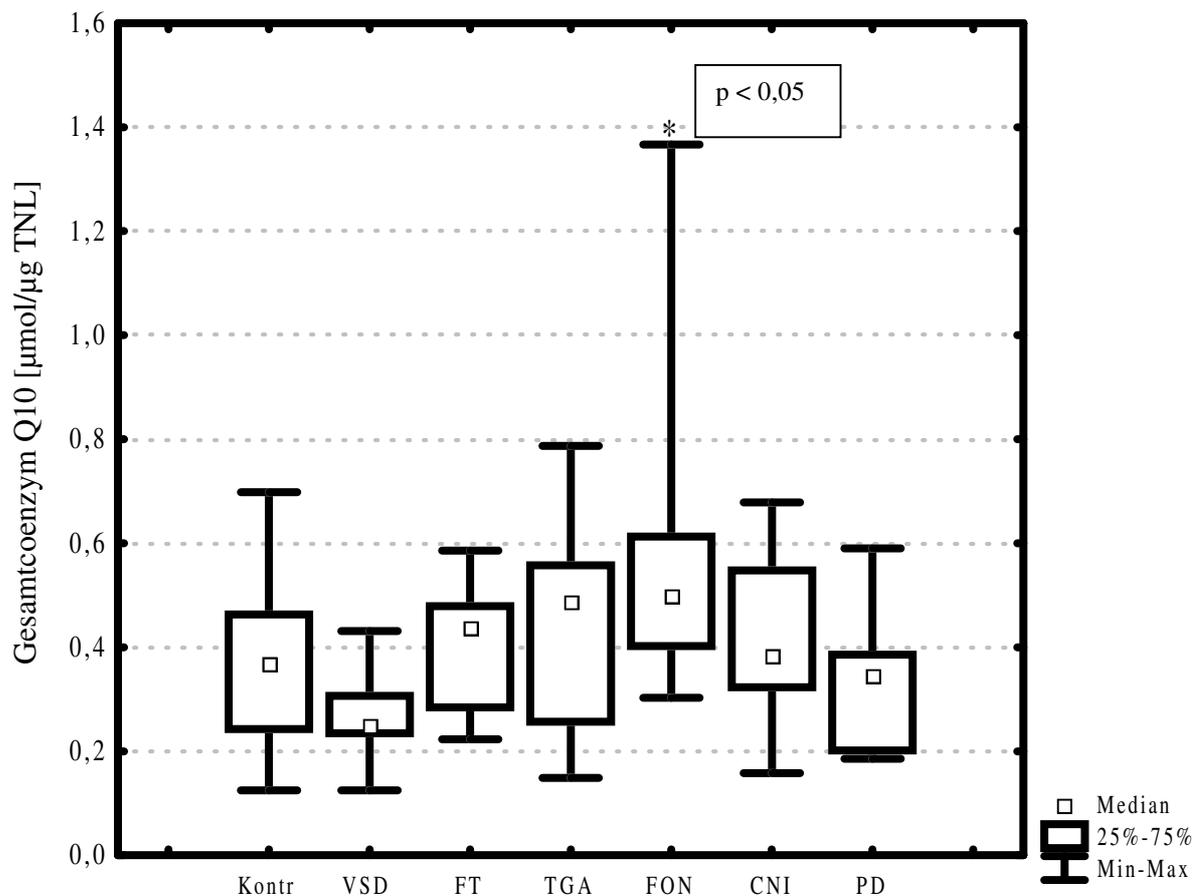


Abb. 3.7: Coenzym Q₁₀-Gesamtkonzentration im Plasma bezogen auf die totalen neutralen Lipide (TNL) bei den verschiedenen Probandengruppen (* = p-Niveau gegenüber der Kontrollgruppe).

Der Anteil an reduziertem Coenzym Q₁₀ am Gesamtcoenzym Q₁₀ war bei den Patienten unter Peritonealdialyse (Median 90,0 %, $p < 0,001$) und bei den Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (Median 91,5 %, $p < 0,001$) signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erniedrigt. Bei den einzelnen Gruppen der Patienten mit korrigierten Herzfehlern fanden sich keine signifikanten Unterschiede im reduzierten Coenzym Q₁₀ zur Kontrollgruppe.

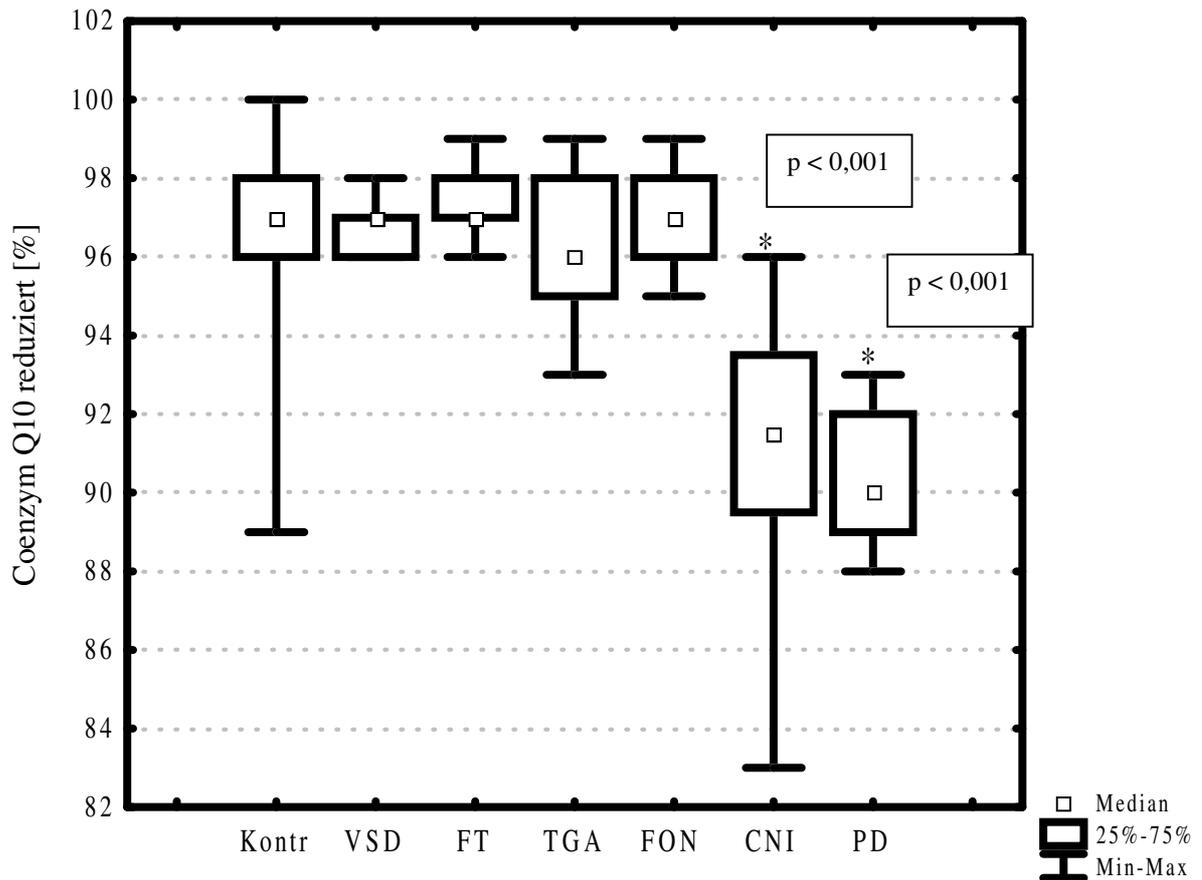


Abb. 3.8: Anteil an reduziertem Coenzym Q₁₀ in % der Coenzym Q₁₀-Gesamtkonzentration im Plasma bei den verschiedenen Probandengruppen (* = p-Niveau gegenüber der Kontrollgruppe).

3.2.6 Konzentration der Sulfhydrylgruppen im Plasma

Die Konzentration der Sulfhydrylgruppen (SH-Gruppen) im Plasma bei den verschiedenen Probandengruppen ist in Abb. 3.9 dargestellt. Bei den Patienten unter Peritonealdialyse (Median = 329 $\mu\text{mol/L}$, $p < 0,001$) und bei den Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (Median = 411 $\mu\text{mol/L}$; $p < 0,001$) waren die SH-Gruppen hochsignifikant niedriger als in der Kontrollgruppe (Median = 533 $\mu\text{mol/L}$). Bei den einzelnen Gruppen der Patienten mit korrigierten Herzfehlern unterschied sich die Konzentration der SH-Gruppen nicht signifikant von denen der Kontrollgruppe.

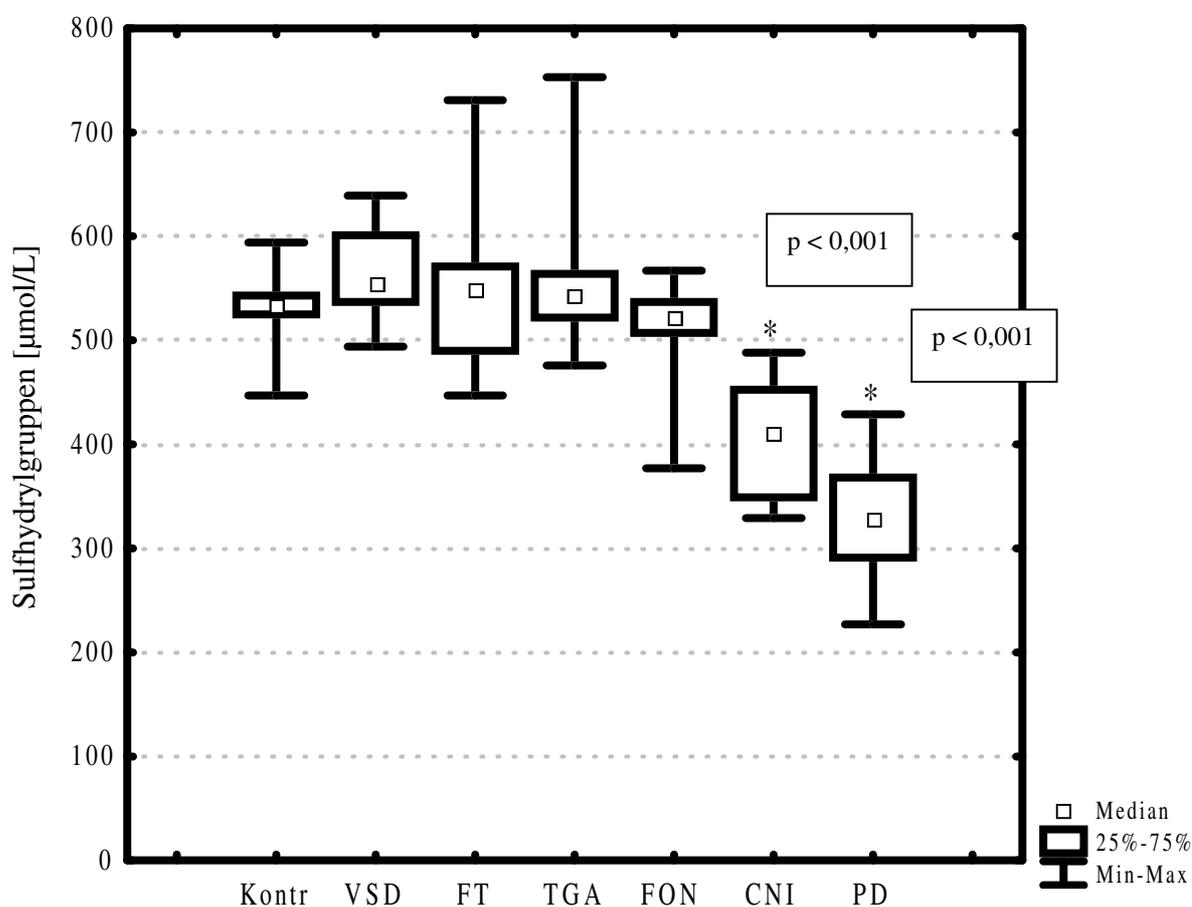


Abb. 3.9: Konzentration der Sulfhydrylgruppen im Plasma bei den verschiedenen Probandengruppen (* = p-Niveau gegenüber der Kontrollgruppe).

3.2.7 Harnsäurekonzentration im Plasma

Die Harnsäurekonzentrationen bei den verschiedenen Probandengruppen ist in Abb. 3.10 dargestellt.

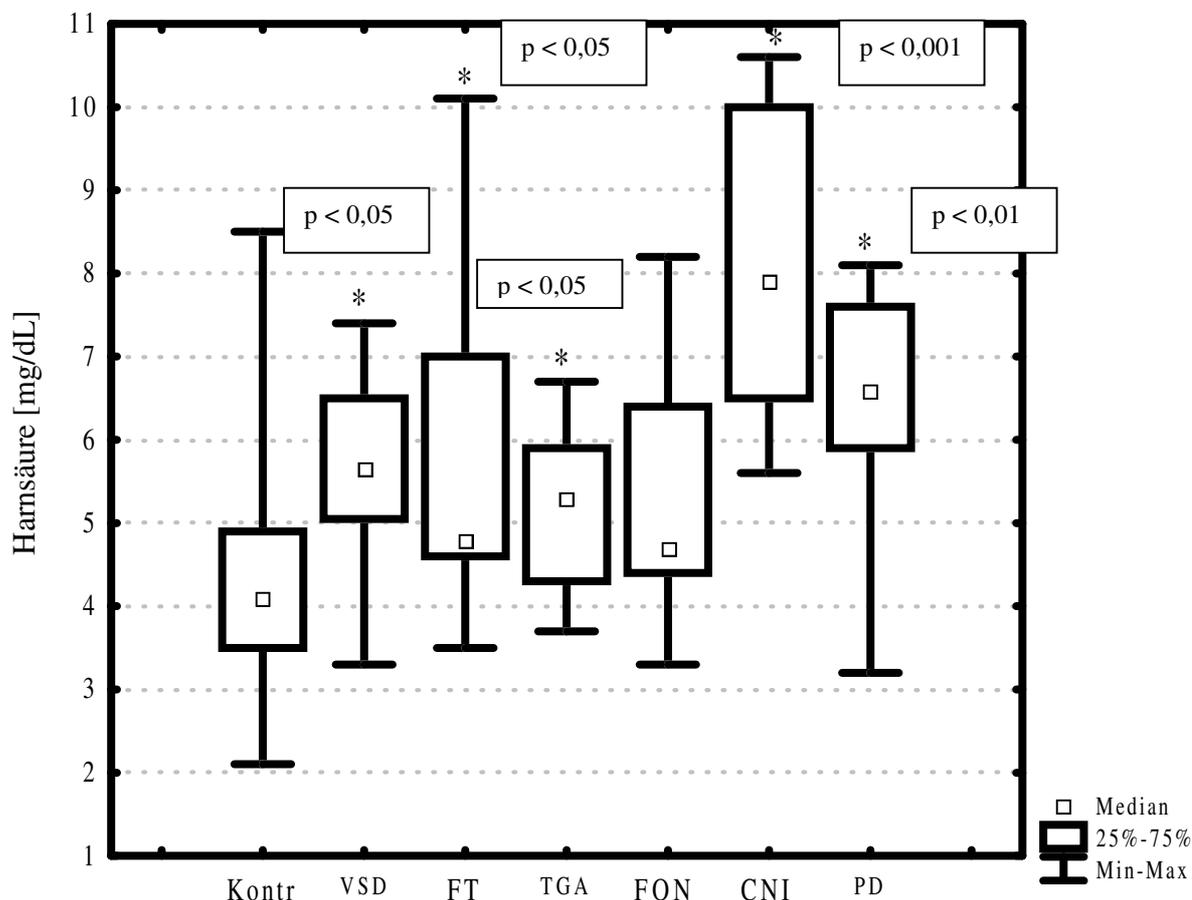


Abb. 3.10: Harnsäurekonzentration im Plasma bei den verschiedenen Probandengruppen (* = p-Niveau gegenüber der Kontrollgruppe).

Bei der Kontrollgruppe (Median 4,1 mg/dL), den Patienten nach Fontan-Operation (Median 4,8 mg/dL), den Patienten mit Fallot'scher Tetralogie (Median 4,8 mg/dL), den Patienten mit Ventrikelseptumdefekt (Median 5,65 mg/dL) und den Patienten mit Transposition der großen Arterien (Median 5,3 mg/dL) lagen die Mediane der Harnsäurekonzentrationen im Normbereich (1,9 – 5,9 mg/dl; Lentze 2001) Gegenüber der Kontrollgruppe zeigten sich signifikant erhöhte Harnsäurekonzentration bei der Gruppe der Patienten mit Ventrikelseptumdefekt ($p < 0,05$), der Gruppe der Patienten mit Fallot'scher Tetralogie ($p < 0,05$) und der Gruppe der Patienten mit Transposition der großen Arterien ($p < 0,05$). Über dem Normbereich liegende Mediane der Harnsäurekonzentrationen

fanden sich bei den Patienten unter Peritonealdialyse (Median 6,6 mg/dl; $p < 0,01$) und bei den Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (Median 7,9 mg/dl; $p < 0,001$) mit entsprechend signifikant erhöhten Konzentrationen gegenüber der Kontrollgruppe.

3.2.8 Vitamin C-Konzentration im Plasma

Die Abb. 3.11 zeigt, nach Probandengruppen geordnet, die Vitamin C-Konzentrationen im Plasma, die gerade unter oder im Normbereich (30-100 $\mu\text{mol/L}$) lagen. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den einzelnen Patientengruppen.

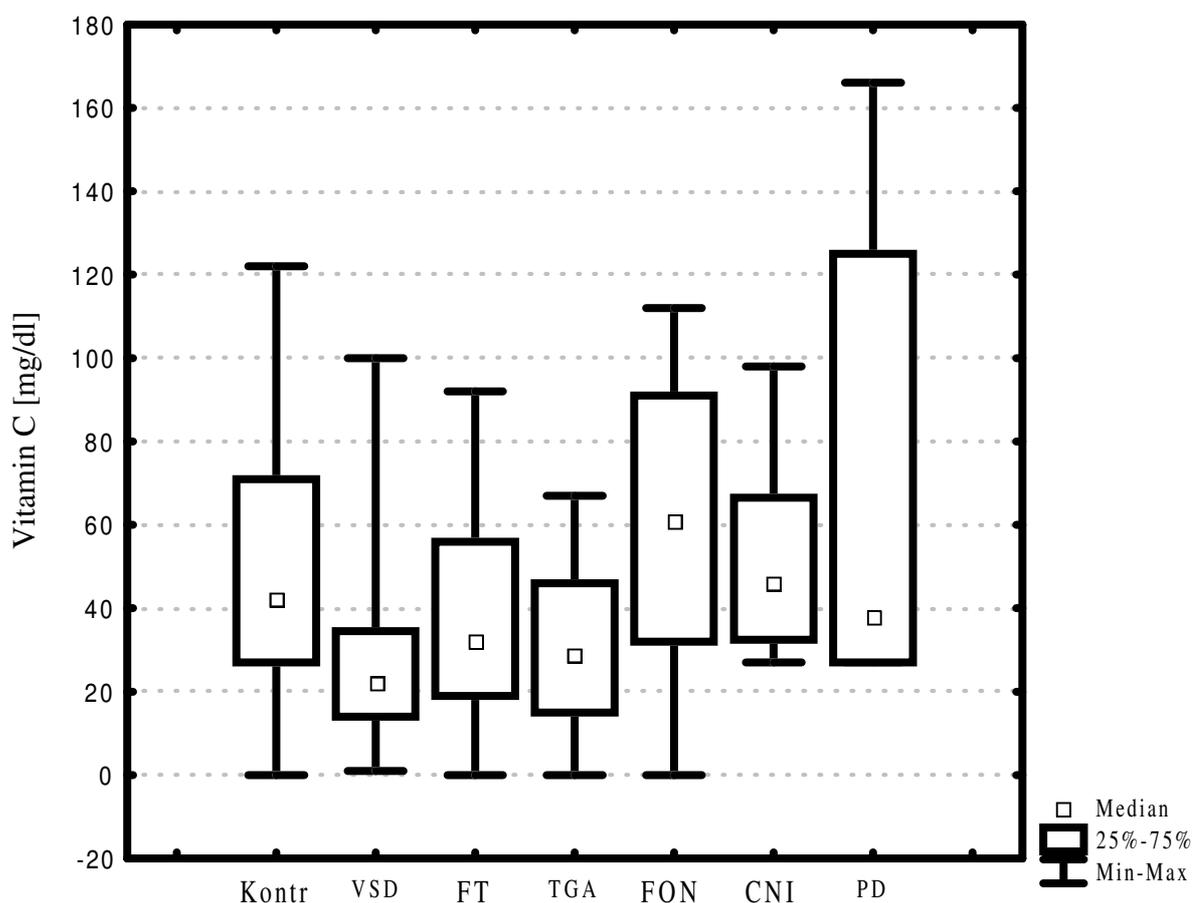


Abb. 3.11: Vitamin C-Konzentration im Plasma bei den verschiedenen Probandengruppen.

3.2.9 TRAP-Konzentration im Plasma

In Abb. 3.12 sind die gemessenen und die berechneten TRAP-Konzentrationen bei den verschiedenen Probandengruppen dargestellt. Die gemessene TRAP-Konzentration korrelierte mit der berechneten TRAP-Konzentration ($p < 0,0001$). Es ergaben sich in der direkten Messung gegenüber der berechneten Bestimmung bei allen Gruppen leicht höhere Konzentrationen. Die gemessene TRAP-Konzentration war bei den folgenden drei Patientengruppen deutlich höher als bei der Kontrollgruppe (Median = 673 $\mu\text{mol/L}$): Patienten mit Fallot'scher Tetralogie (Median = 767 $\mu\text{mol/L}$, $p < 0,05$), Patienten mit chronischen Niereninsuffizienz (Median = 941 $\mu\text{mol/L}$, $p < 0,01$) und Patienten unter Peritonealdialyse (Median = 924 $\mu\text{mol/L}$, $p < 0,001$).

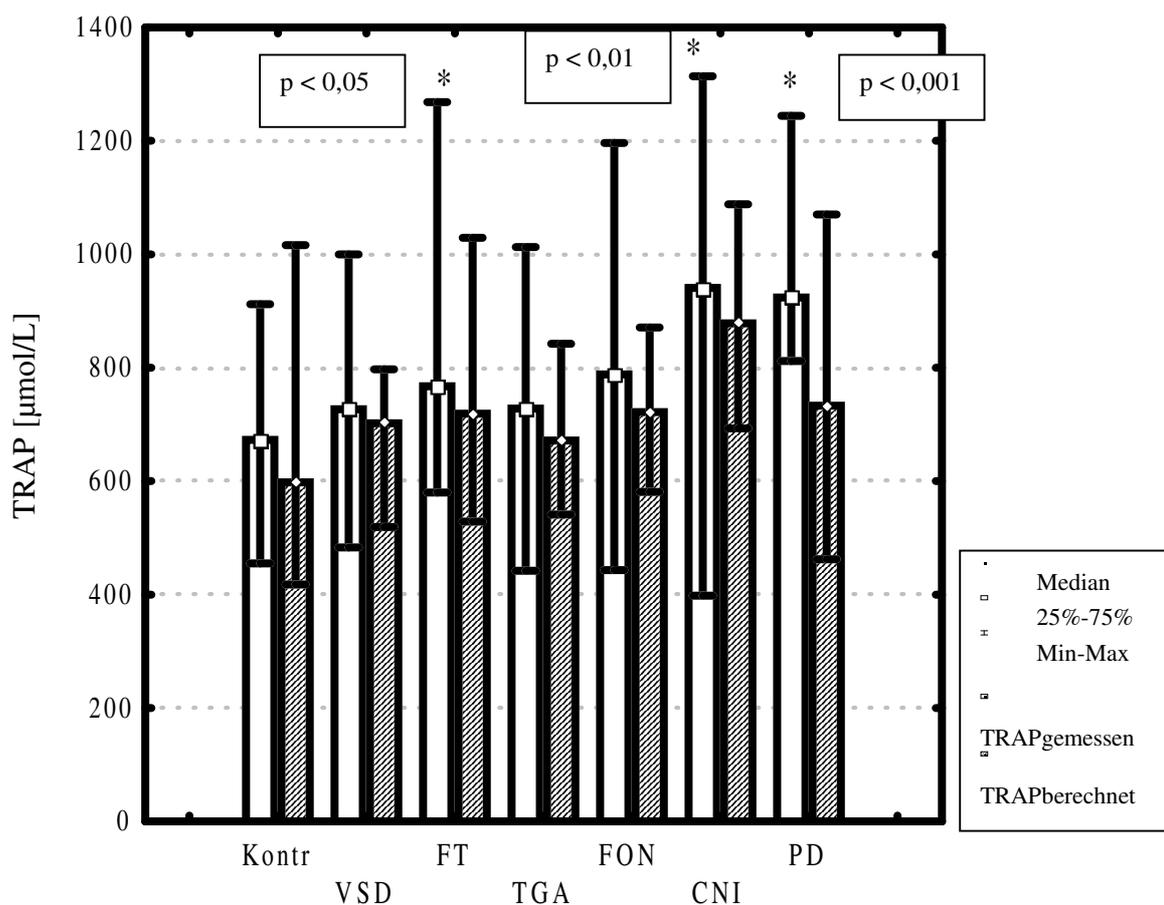


Abb. 3.12: Gemessene und berechnete TRAP-Konzentration im Plasma bei den verschiedenen Probandengruppen (* = p-Niveau gegenüber der Kontrollgruppe).

3.2.10 Homocysteinkonzentration im Plasma

In der Abb. 3.13 wird die Konzentration von Homocystein bei den verschiedenen Probandengruppen dargestellt. Die Homocysteinkonzentration der Kontrollgruppe (Median 5,7 $\mu\text{mol/l}$) und aller Patientengruppen mit korrigierten Herzfehlern lagen im Normbereich. Die Homocysteinkonzentration bei den Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ohne Dialyse (Median 14,75 $\mu\text{mol/l}$; $p < 0,001$) und unter Peritonealdialyse (Median 11,0 $\mu\text{mol/l}$; $p < 0,001$) lag über dem Normbereich und war signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht. Signifikante Erhöhungen gegenüber der Kontrollgruppe zeigten ebenfalls die Patienten mit Ventrikelseptumdefekt (Median 8,25 $\mu\text{mol/l}$; $p < 0,05$) und die Patienten mit Transposition der großen Arterien (Median 8,05 $\mu\text{mol/l}$; $p < 0,01$).

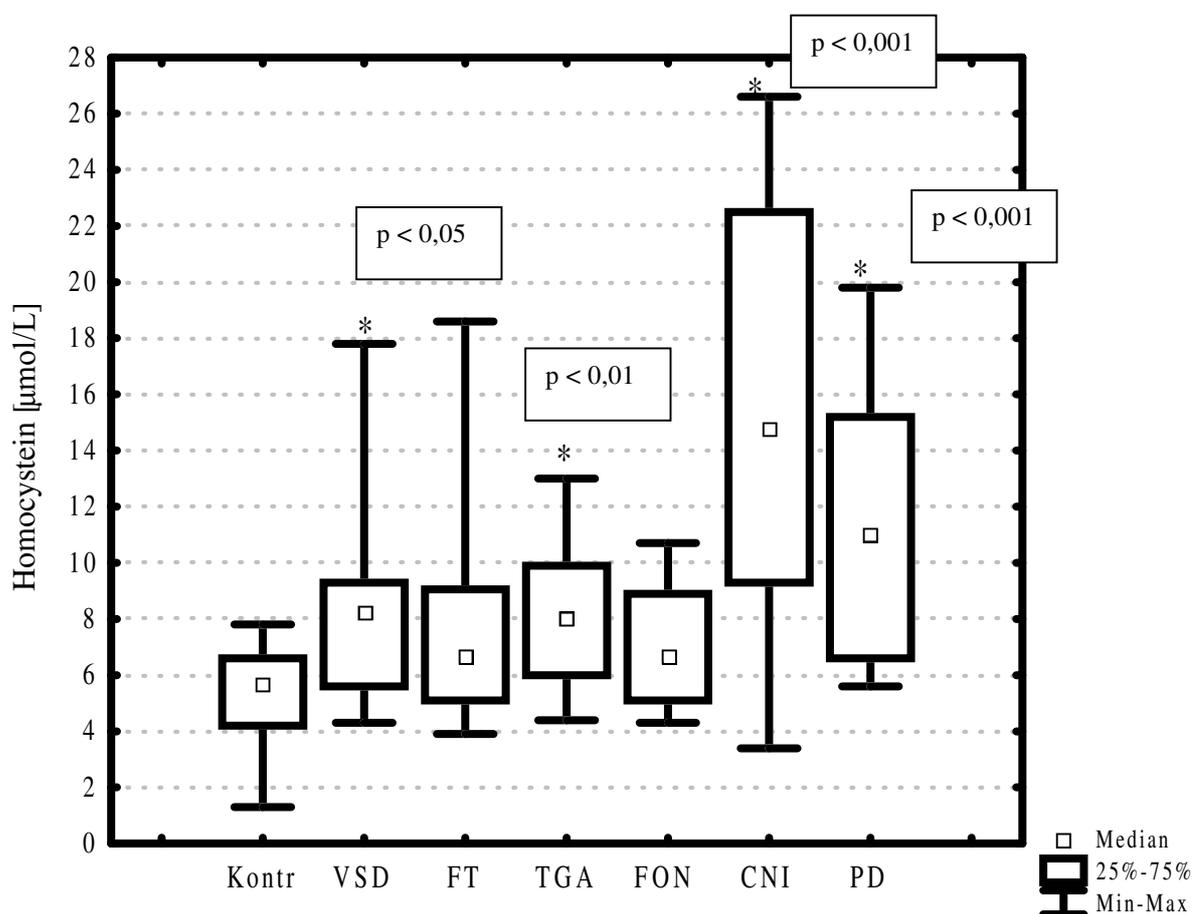


Abb. 3.13: Homocysteinkonzentration im Plasma bei den verschiedenen Probandengruppen (* = p-Niveau gegenüber der Kontrollgruppe).

3.2.11 Gesamtcholesterinkonzentration im Plasma

Die Abb. 3.14 gibt die Gesamtcholesterinkonzentration bei den verschiedenen Probandengruppen wieder. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Patientengruppen und der Kontrollgruppe.

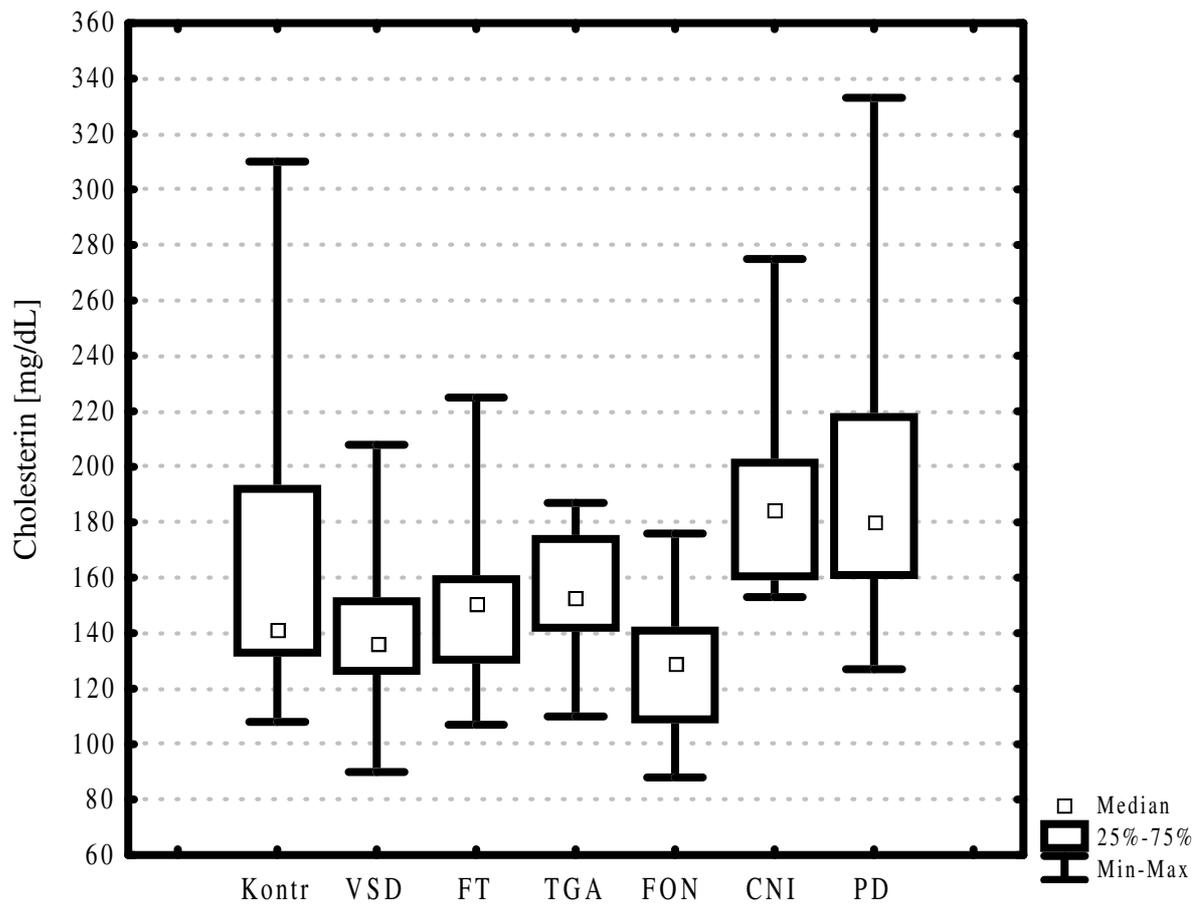


Abb. 3.15: Cholesterinkonzentration im Plasma bei den verschiedenen Probandengruppen.

3.2.12 Triglyzeridkonzentration im Plasma

In Abb. 3.15 sind die Triglyzeridkonzentrationen bei den verschiedenen Probandengruppen dargestellt. Bei den Patienten unter Peritonealdialyse (Median 230 mg/dl) war die Triglyzeridkonzentration gegenüber der Kontrollgruppe erhöht (Median 114 mg/dl, $p < 0,05$).

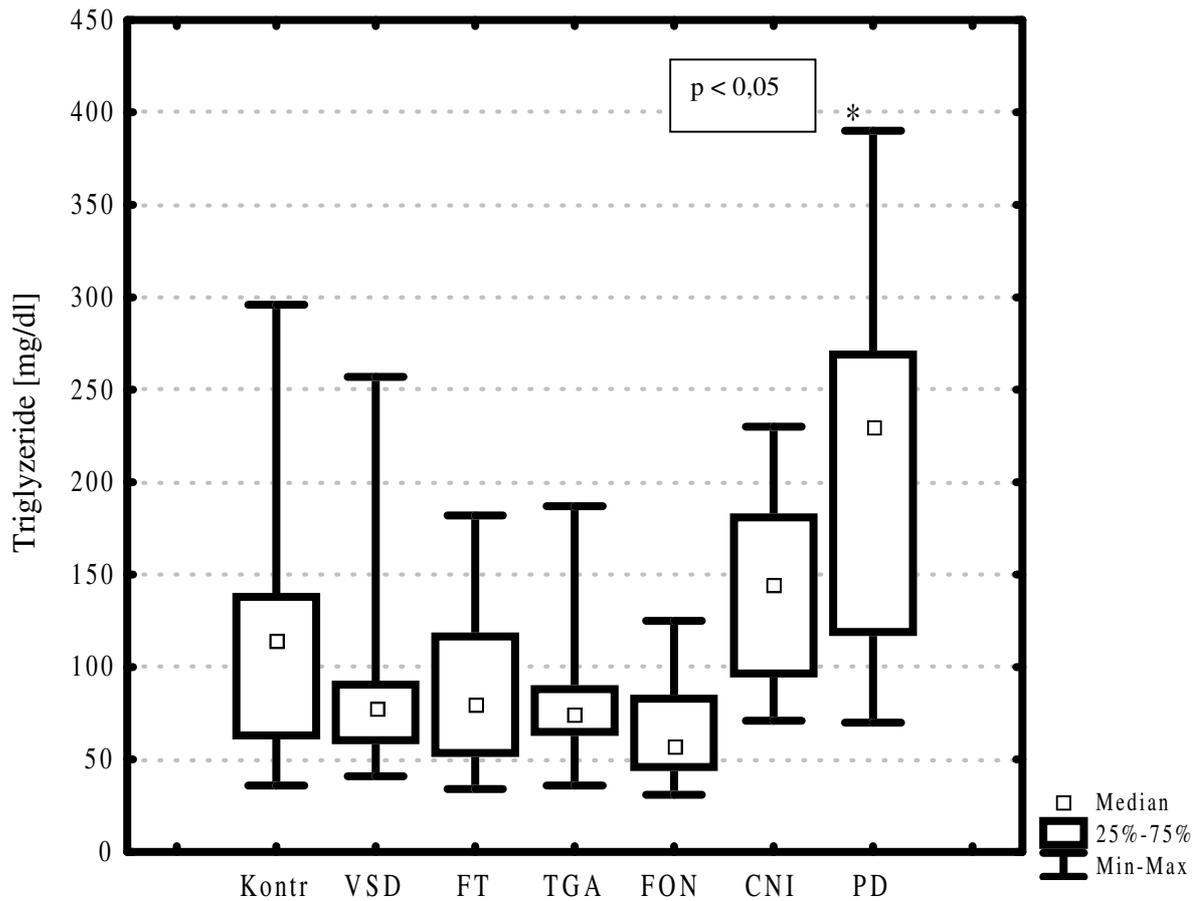


Abb. 3.15: Triglyzeridkonzentration im Plasma bei den verschiedenen Probandengruppen (* = p-Niveau gegenüber der Kontrollgruppe).

3.2.13 Antikörper gegen oxidiertes LDL im Serum

In Abb. 3.16 sind die Konzentrationen der Antikörper gegen oxidiertes LDL bei den verschiedenen Probandengruppen dargestellt. Es ergaben sich bei keiner Patientengruppe signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe. Eine Bestimmung von Antikörpern gegen oxidiertes LDL hat bei den Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (CNI) und bei den Patienten unter Peritonealdialyse (PD) nicht stattfinden können.

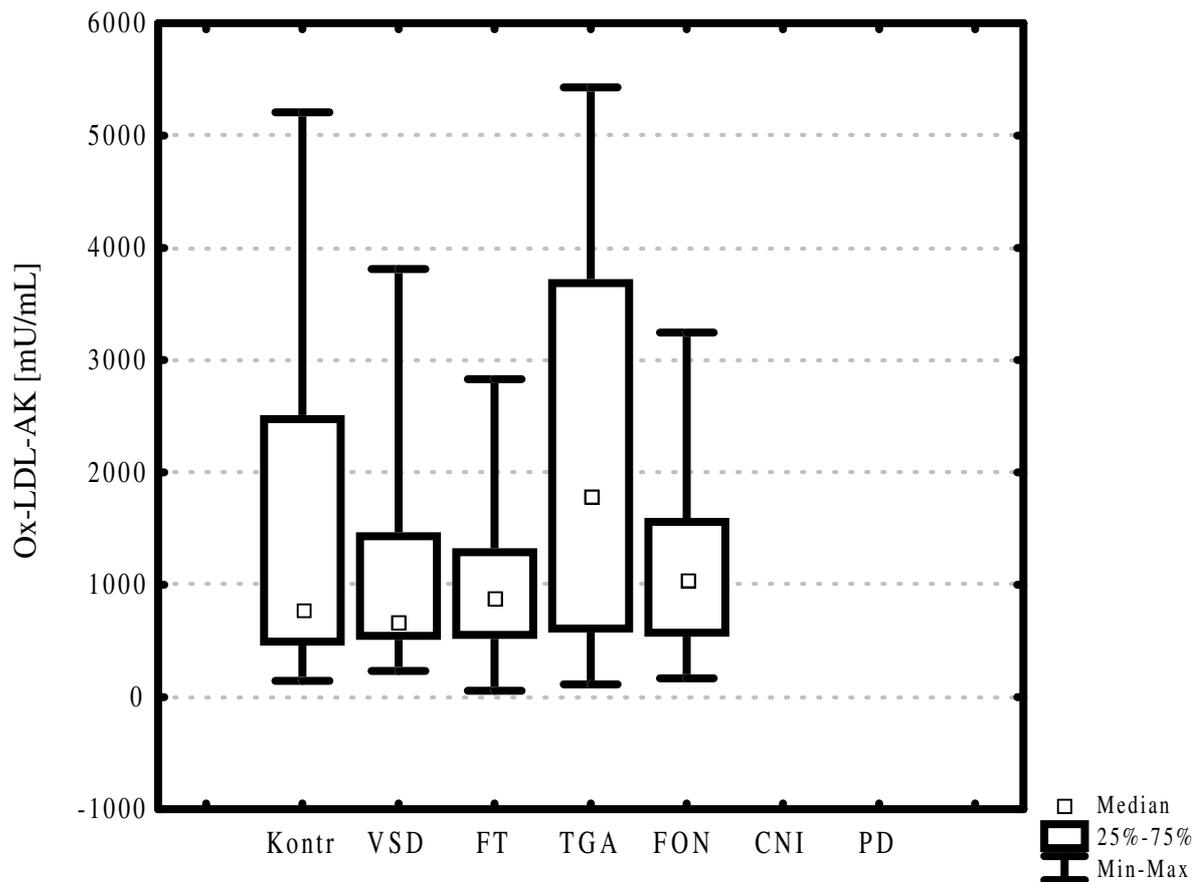


Abb. 3.16: Konzentration der Antikörper gegen oxidiertes LDL (ox-LDL-AK) im Serum bei den verschiedenen Probandengruppen.

3.3 Korrelationen zwischen den Parametern der Endothelfunktion und den laborchemischen Parametern

3.3.1 Korrelationen für alle Probanden

Tabelle 3.2 gibt einen Überblick über die signifikanten Korrelationen ($p < 0,05$) zwischen den funktionellen Gefäßparametern EAD und NEAD und allen laborchemischen Parametern für die Probanden, bei denen sowohl Gefäßparameter als auch laborchemische Parameter bestimmt wurden ($n = 65$). Im folgenden werden die signifikanten Zusammenhänge zwischen den einzelnen Parametern erläutert und gegebenenfalls zusätzlich graphisch dargestellt.

Tab. 3.2: Signifikante Korrelationen ($p < 0,05$) zwischen den Parametern der Endothelfunktion und den laborchemischen Parametern für alle Probanden ($n = 65$)

Korrelationen	Spearman R	p-Niveau
EAD & NEAD	0,30	0,01
NEAD & Gefäßdurchmesser	-0,57	<0,0001
NEAD & Homocystein	-0,45	< 0,001
NEAD & TRAP	-0,30	0,01
NEAD & γ -Tocopherol/Lipid	-0,25	< 0,05
NEAD & Vitamin C	0,30	< 0,05
NEAD & Q₁₀ reduziert	0,26	< 0,05

fett: im folgenden als Grafik dargestellt

EAD = endothelabhängige Dilatation; NEAD = nicht-endothelabhängige Dilatation

EAD und NEAD zeigten einen positiven Zusammenhang, während der Gefäßdurchmesser negativ mit der NEAD korrelierte. Der Anteil an reduziertem Coenzym Q₁₀ am Gesamtcoenzym Q₁₀ und die Vitamin C-Konzentration im Plasma korrelierten positiv mit der nicht-endothelabhängigen Endothelfunktion (NEAD). Eine negative Korrelation fand sich zwischen der nicht-endothelabhängigen Dilatation (NEAD) und der Homocysteinkonzentration im Plasma, zusätzlich der Konzentrationen von TRAP sowie der γ -Tocopherolkonzentration/Lipid. Es fand sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der endothelabhängigen Vasodilatation (EAD) und den gemessenen laborchemischen Parametern.

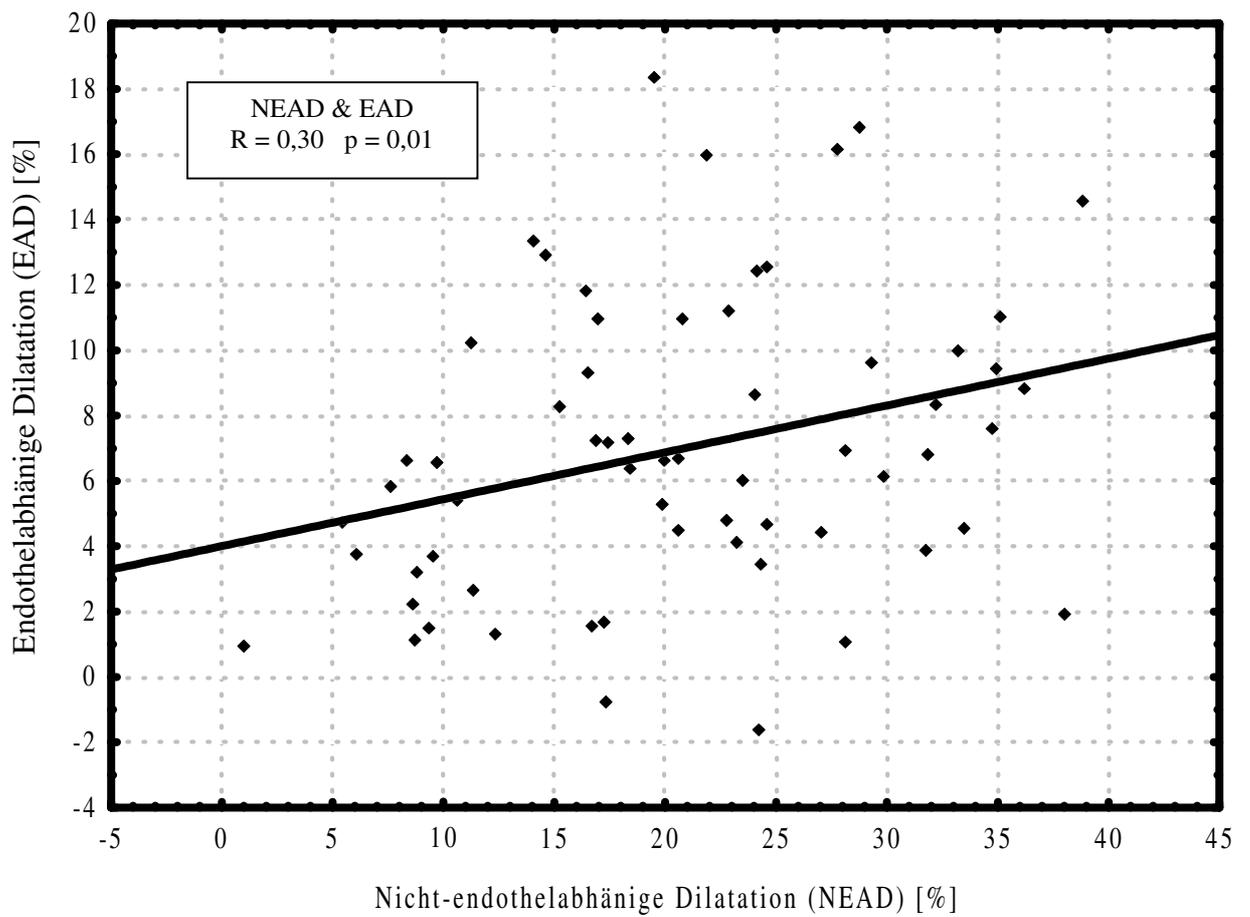


Abb. 3.17: Zusammenhang zwischen der endothelabhängigen Vasodilatation (EAD) und der nicht-endothelabhängigen Vasodilatation (NEAD) für allen Probanden.

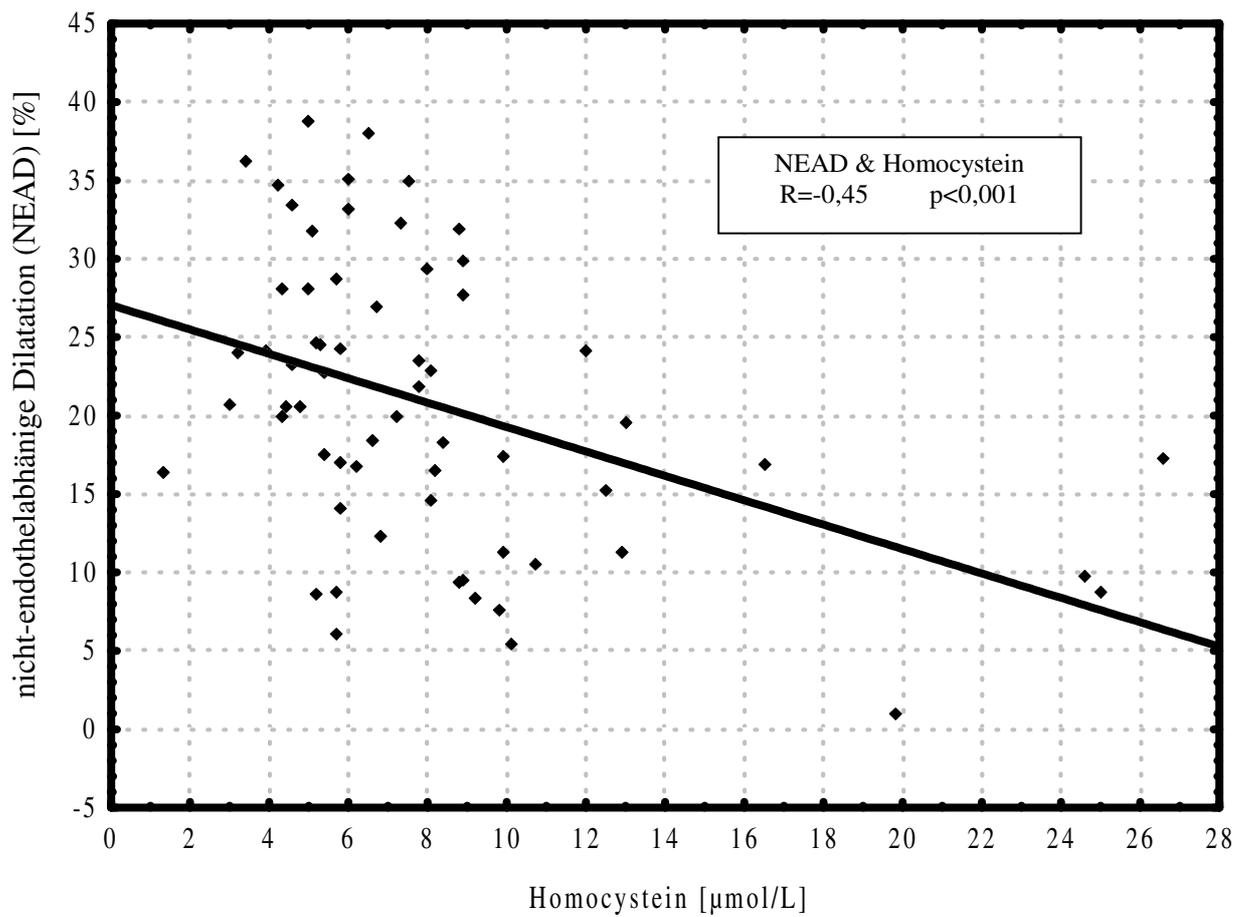


Abb. 3.18: Zusammenhang zwischen der Homocysteinkonzentration im Plasma und der nicht-endothelabhängigen Vasodilatation (NEAD) für alle Probanden.

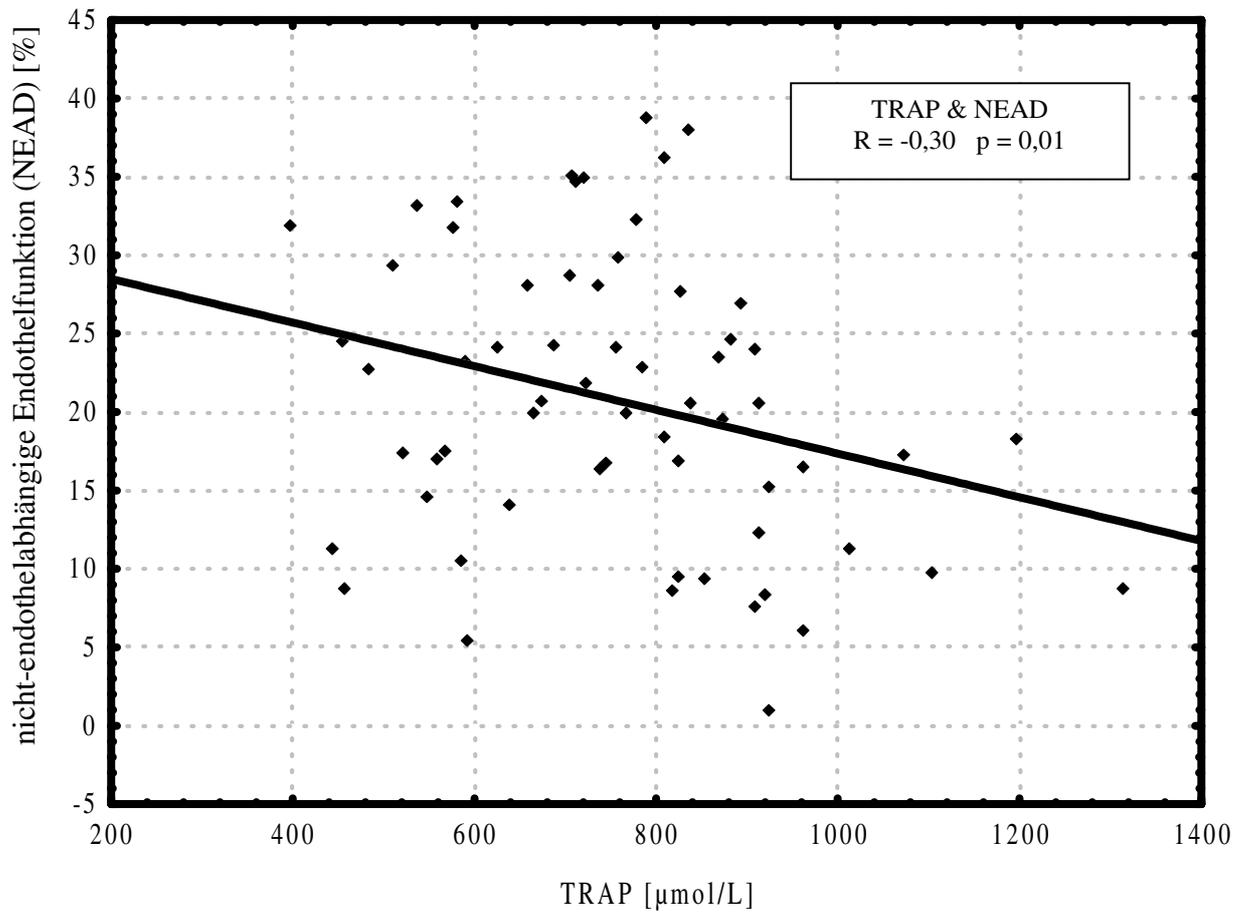


Abb. 3.19: Zusammenhang zwischen dem Total-radical-antioxidant-Parameter (TRAP) im Plasma und der nicht-endothelabhängigen Vasodilatation (NEAD) für alle Probanden.

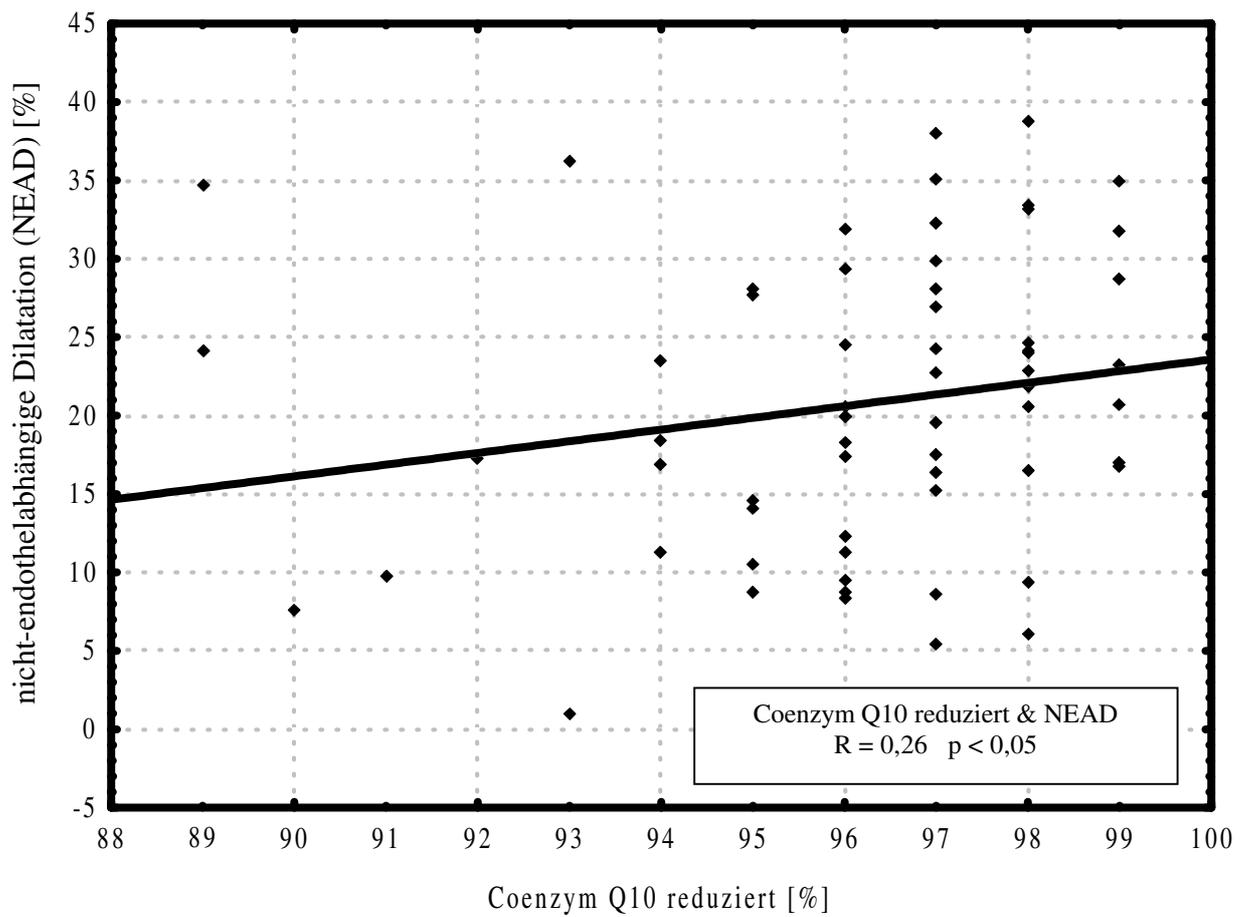


Abb. 3.20: Zusammenhang zwischen dem Anteil an reduziertem Coenzym Q₁₀ am Gesamtoenzym Q₁₀ im Plasma und der nicht-endothelabhängigen Vasodilatation (NEAD) für alle Probanden.

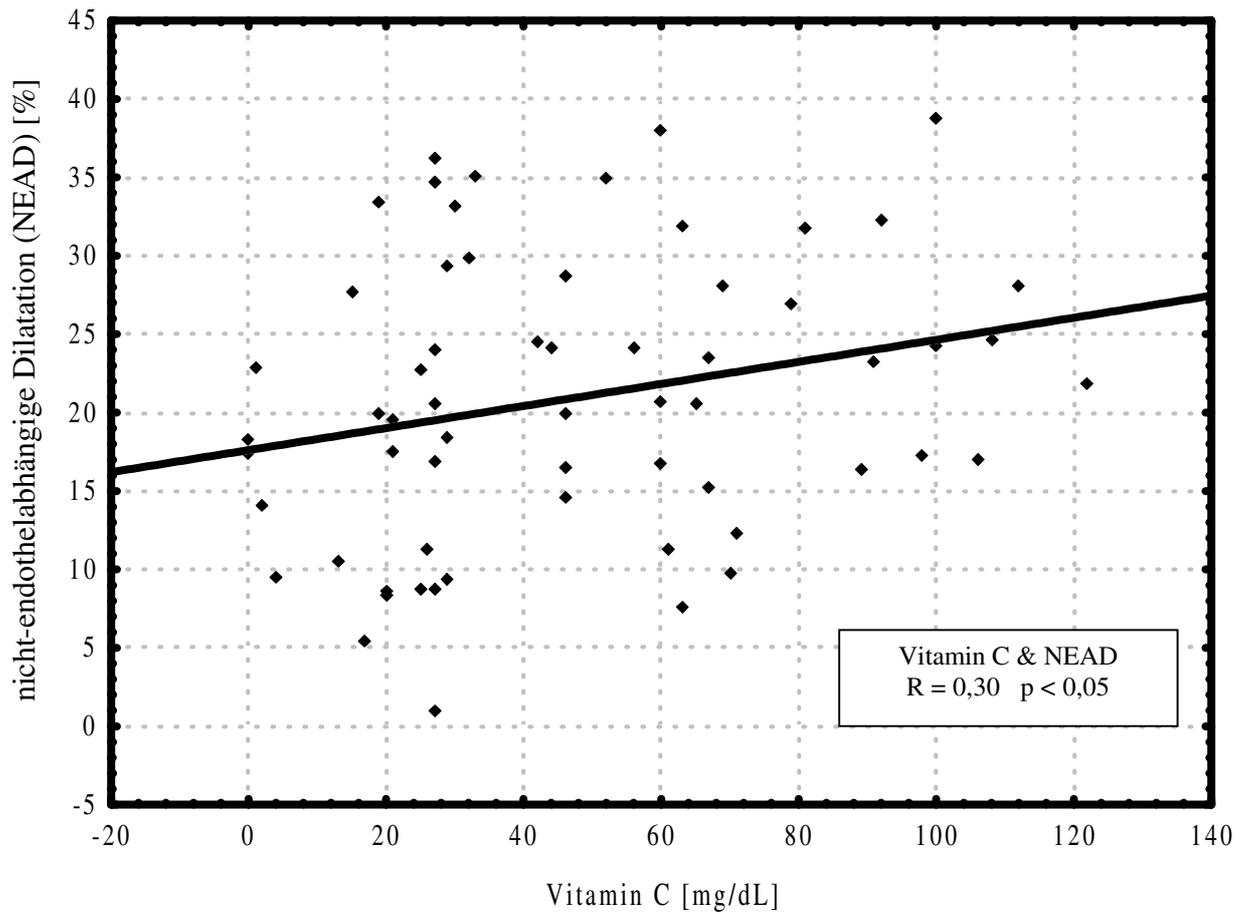


Abb. 3.21: Zusammenhang zwischen der Vitamin C-Konzentration im Plasma und der nicht-endothelabhängigen Vasodilatation (NEAD) für alle Probanden.

Die laborchemischen Parameter, die als Produkte des stattgehabten oxidativen Stress angesehen werden können, sogenannte prooxidative Marker (Malondialdehyd, Carbonylgruppen und Antikörper gegen oxidiertes LDL), sowie Homocystein und Cholesterin (atherogene Risikofaktoren) wurden mit den übrigen laborchemischen Parametern korreliert. Die signifikanten Zusammenhänge sind in Tabelle 3.3 dargestellt.

Tab. 3.3: Signifikante Korrelationen ($p < 0,05$) zwischen den prooxidativen Markern sowie atherogenen Risikofaktoren und den übrigen laborchemischen Parametern für alle Probanden ($n = 86$).

Korrelationen	Spearman R	p-Niveau
MDA & Radikalresistenz der Erythrozyten	-0,23	< 0,05
<i>MDA & Q₁₀ reduziert</i>	-0,34	0,001
MDA & SH-Gruppen	-0,29	< 0,01
MDA & Homocystein	0,21	< 0,05
MDA & Cholesterin	0,30	< 0,01
Carbonylgruppen & Q ₁₀ reduziert	-0,31	< 0,01
Carbonylgruppen & SH-Gruppen	-0,34	< 0,001
Carbonylgruppen & TRAP	0,37	< 0,001
Carbonylgruppen & Cholesterin	0,29	< 0,01
Carbonylgruppen & Triglyzeride	0,28	< 0,01
Homocystein & α -Tocopherol/Lipid	-0,21	< 0,05
<i>Homocystein & Q₁₀ reduziert</i>	-0,50	< 0,001
Homocystein & SH-Gruppen	-0,21	< 0,05
Homocystein & Radikalresistenz Erythrozyten	-0,26	0,01
Homocystein & TRAP	0,42	< 0,001
Homocystein & Harnsäure	0,52	< 0,001
Homocystein & Triglyzeride	0,22	< 0,05
Homocystein & Cholesterin	0,33	0,001
Cholesterin & SH-Gruppen	-0,27	0,01
Cholesterin & α -Tocopherol/Lipid	-0,38	< 0,0001
Cholesterin & γ -Tocopherol/Lipid	-0,30	< 0,01
Cholesterin & TRAP	0,29	< 0,01
Cholesterin & Harnsäure	0,24	< 0,05
Cholesterin & Triglyzeride	0,46	< 0,0001

fett: im folgenden als Grafik dargestellt

MDA= Malondialdehyd, SH-Gruppen=Sulphydrylgruppen, TRAP=Total Radical-trapping Antioxidant Parameter

Die Malondialdehydkonzentration im Plasma korrelierte negativ mit der Radikalresistenz der Erythrozyten, dem Anteil des reduzierten Coenzym Q₁₀ sowie der Konzentration von SH-Gruppen im Plasma. Eine positive Korrelation fand sich zwischen den Konzentrationen von Gesamtcholesterin und Homocystein mit der Malondialdehydkonzentration im Plasma.

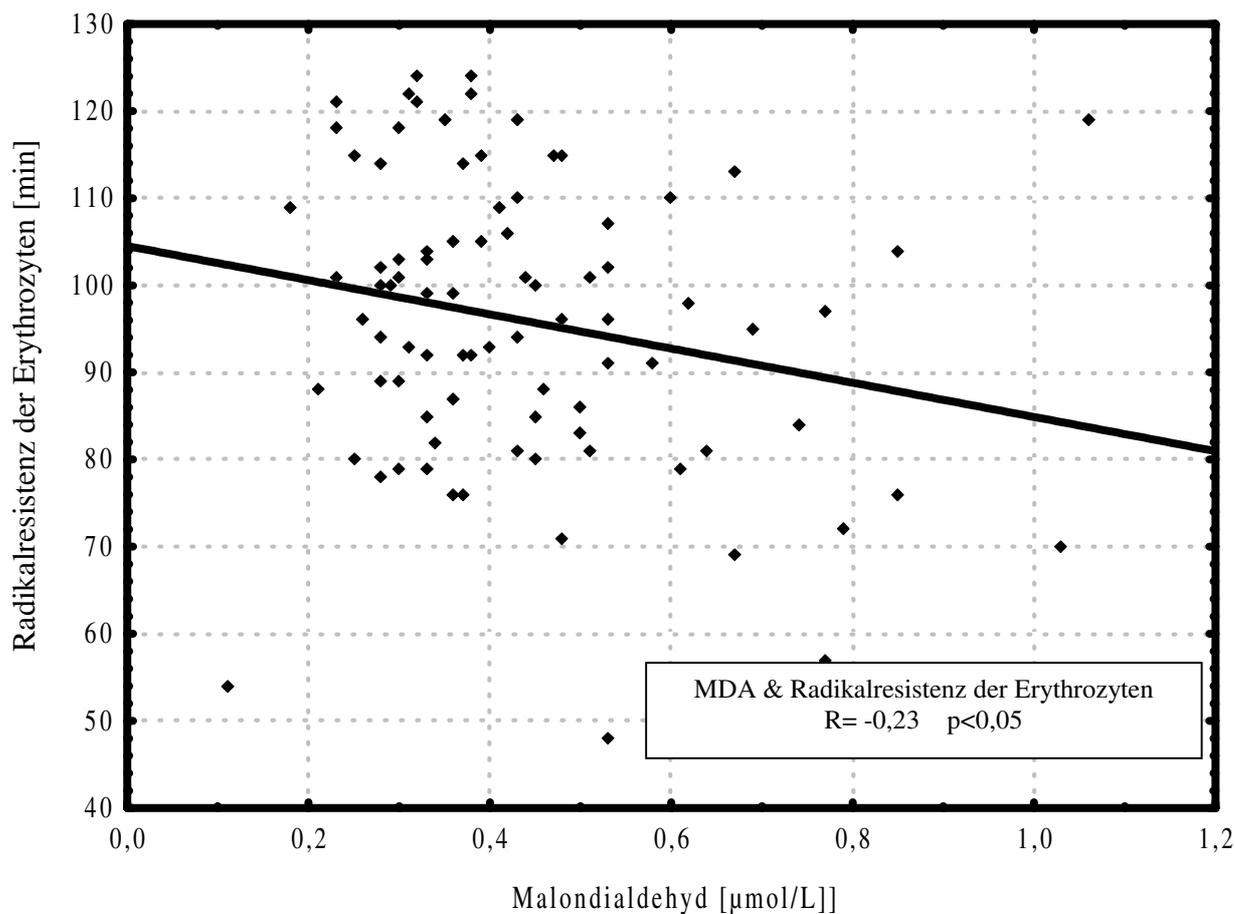


Abb. 3.22: Zusammenhang zwischen dem Malondialdehydkonzentration (MDA) im Plasma und der Radikalresistenz der Erythrozyten bei allen Probanden.

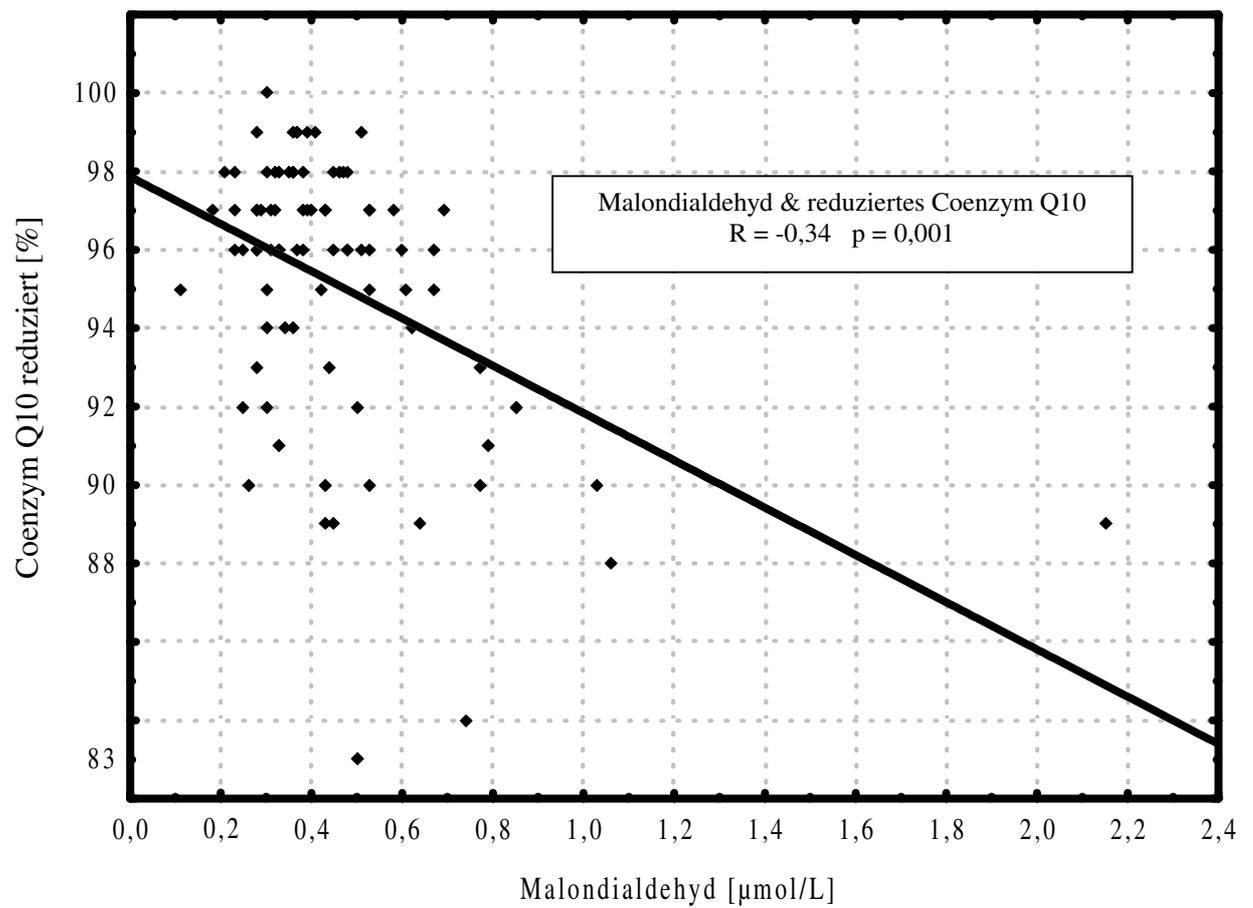


Abb. 3.23: Zusammenhang zwischen der Malondialdehydkonzentration (MDA) im Plasma und dem Anteil von reduziertem Coenzym Q₁₀ am Gesamtcoenzym Q₁₀ im Plasma bei allen Probanden.

Der Carbonylgruppengehalt der Proteine korrelierte negativ mit der Konzentration von SH-Gruppen und dem reduzierten Coenzym Q₁₀. Ein positiver Zusammenhang wurde zwischen dem Carbonylgruppengehalt der Proteine und den Konzentrationen von TRAP, Gesamtcholesterin und Triglyzeriden gefunden.

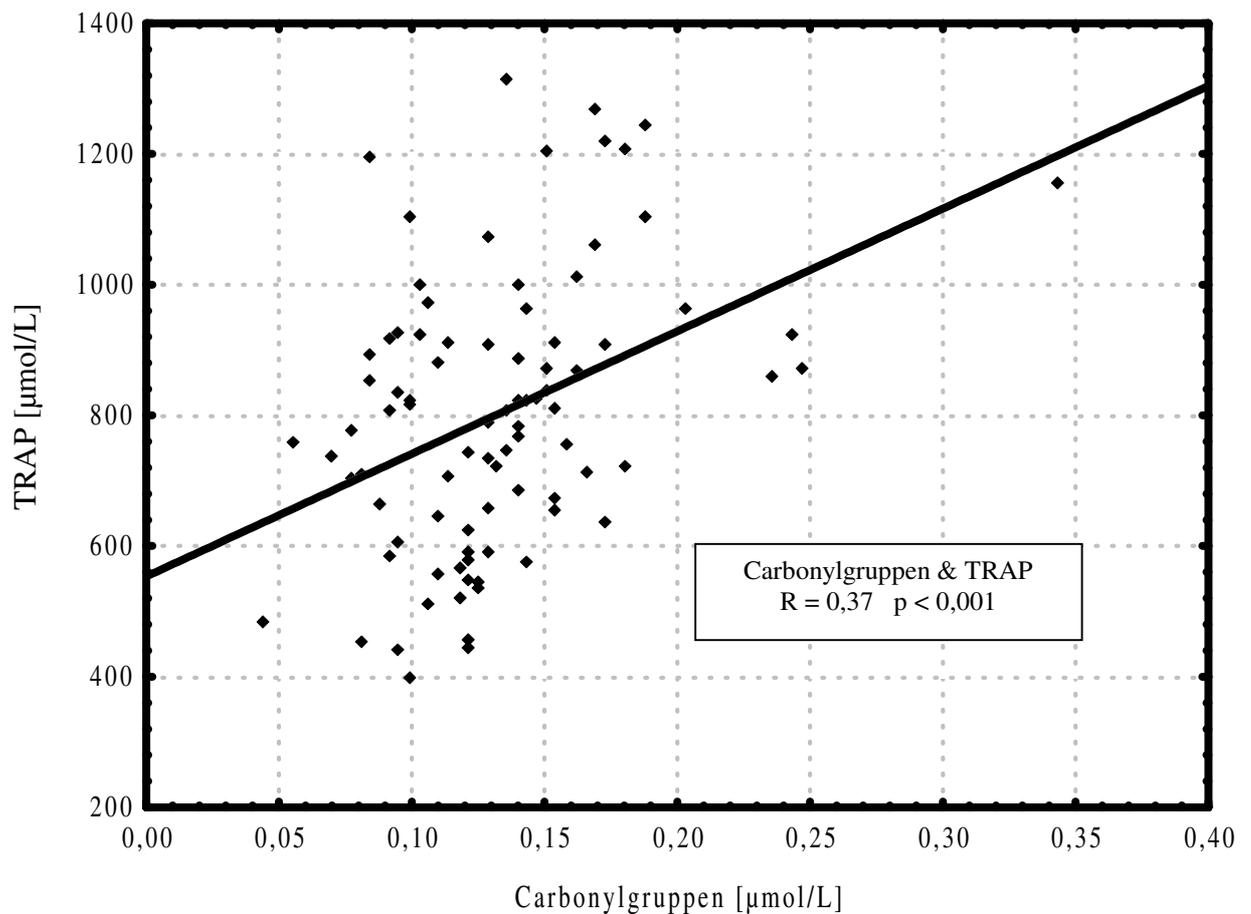


Abb. 3.24: Zusammenhang zwischen dem Carbonylgruppengehalt der Proteine im Plasma und dem Total Radical-trapping Antioxidant Parameter (TRAP) im Plasma für alle Probanden.

Es ergab sich ein positiver Zusammenhang zwischen der Konzentration von Homocystein und den Konzentrationen von Harnsäure, TRAP und Triglyzeriden im Plasma. Es fand sich eine negative Korrelation zwischen der Homocysteinkonzentration und den Konzentrationen von α -Tocopherol/Lipid und Sulfhydrylgruppen sowie dem Anteil an reduziertem Coenzym Q₁₀ am Gesamtcoenzym Q₁₀.

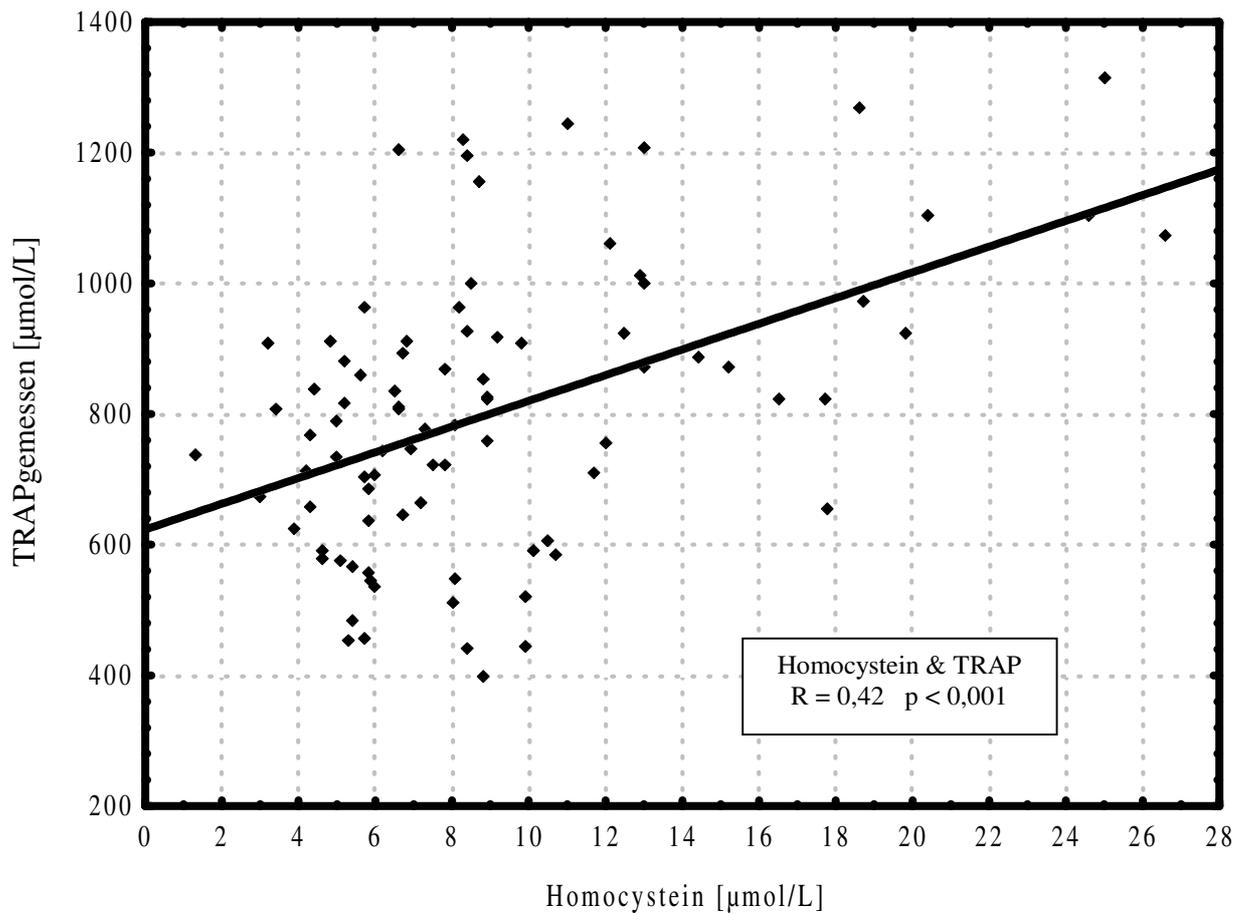


Abb. 3.25: Zusammenhang zwischen der Homocysteinkonzentration im Plasma und dem Total-radical-trapping-antioxidant-Parameter (TRAP) im Plasma für alle Probanden.

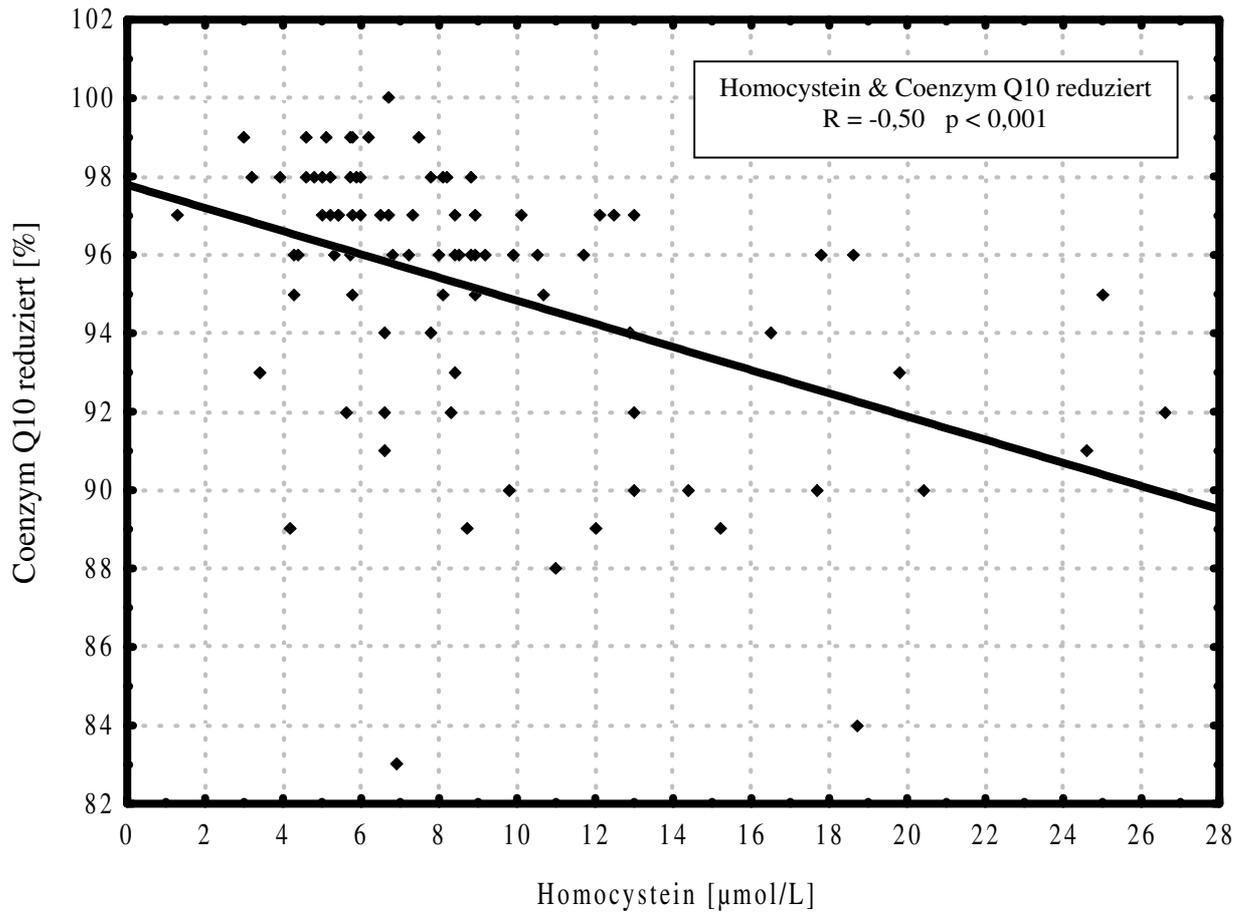


Abb. 3.26: Zusammenhang zwischen der Homocysteinkonzentration im Plasma und dem reduzierten Coenzym Q₁₀ im Plasma bei allen Probanden.

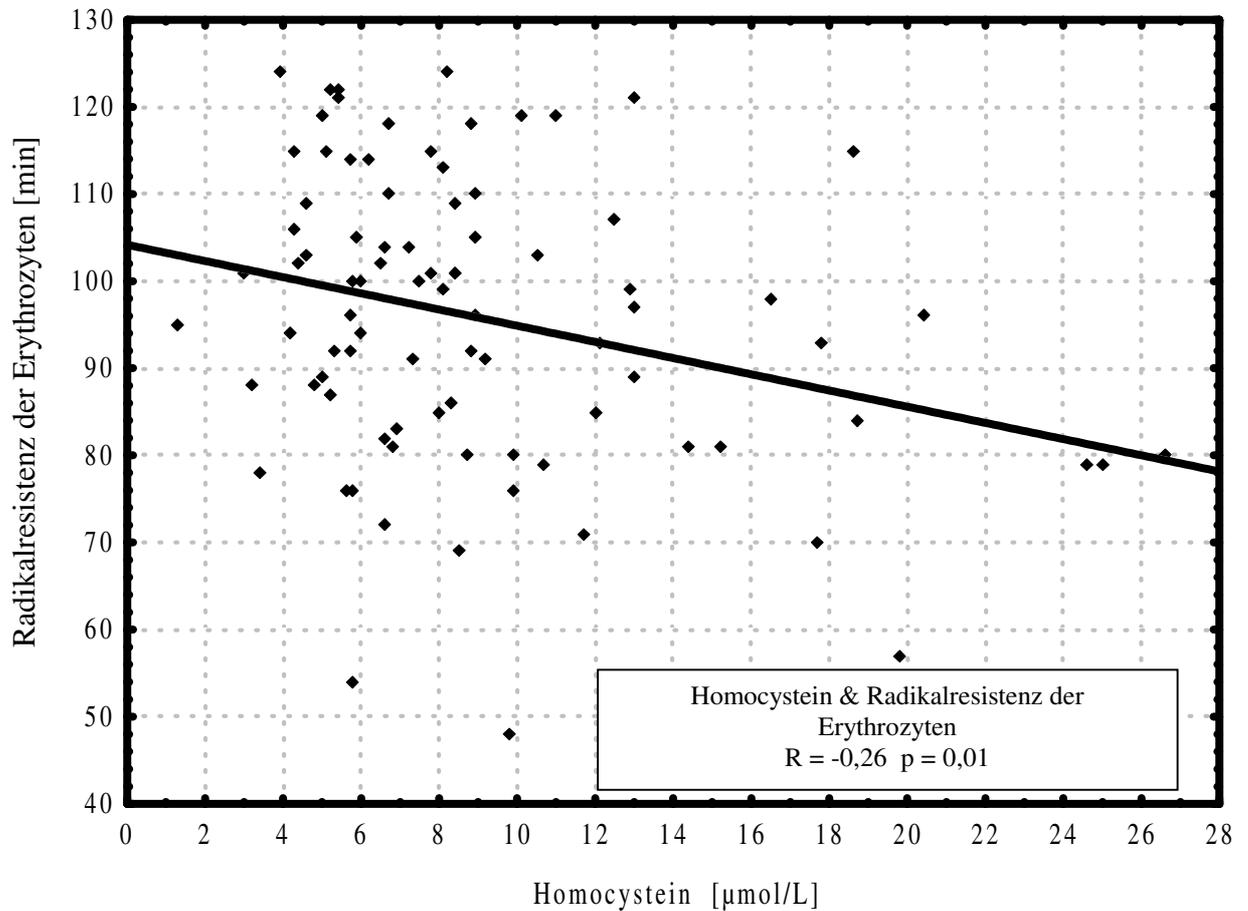


Abb. 3.27: Zusammenhang der Homocysteinkonzentration im Plasma und der Radikalresistenz der Erythrozyten für alle Probanden.

Die Gesamtcholesterinkonzentration korrelierte negativ mit den Konzentrationen von SH-Gruppen, α -Tocopherol/Lipid und γ -Tocopherol/Lipid und korrelierte positiv mit den Konzentrationen von Harnsäure, TRAP und Triglyzeriden im Plasma.

Es fanden sich keine signifikanten Zusammenhänge von Antikörpern gegen oxidiertes LDL im Serum zu den Parametern der Endothelfunktion oder anderen laborchemischen Parametern.

3.3.2 Korrelationen für die Kontrollgruppe

In der Kontrollgruppe (n =13) fanden sich signifikante Korrelationen zwischen den funktionellen Gefäßparametern und den laborchemischen Parametern sowie zwischen den laborchemischen Parametern untereinander, diese sind in Tabelle 3.4 dargestellt. Zusätzlich zu einer positiven Korrelation zwischen der Harnsäurekonzentration und Homocysteinkonzentration, die sich auch für alle Probanden fand, korrelierte die endothelabhängige Dilatation mit der Konzentration von γ -Tocopherol/Lipid. Der Titer der Antikörper gegen oxidiertes LDL korrelierte positiv mit den Konzentrationen von Gesamtcholesterin und γ -Tocopherol/Lipid.

Tab. 3.4: Signifikante Korrelationen ($p < 0,05$) in der Kontrollgruppe (n = 13)

Korrelationen	Spearman R	p-Niveau
EAD & γ -Tocopherol/Lipid	0,64	< 0,05
<i>Homocystein & Harnsäure</i>	<i>0,59</i>	<i>< 0,05</i>
oxLDL-Antikörper & Cholesterin	0,71	<0,05
oxLDL-Antikörper & γ -Tocopherol/Lipid	0,66	<0,05

Kursiv: Korrelationen die sich auch für alle Probanden fanden

3.3.3 Korrelationen für die Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ohne und mit Peritonealdialyse

In der Gruppe der Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz bei denen die Endothelfunktion gemessen wurde (n =8), fanden sich signifikante Korrelationen zwischen den funktionellen Gefäßparametern und den biochemischen Parametern, die in Tabelle 3.5 dargestellt sind. Die endothelabhängige Endothelfunktion (EAD) korrelierte negativ mit der Cholesterinkonzentration und der TRAP-Konzentration. Die nicht-endothelabhängige Endothelfunktion (NEAD) korrelierte negativ mit der TRAP-Konzentration und dem Gehalt an γ -Tocopherol/Lipid.

Tab. 3.5: Signifikante Korrelationen ($p < 0,05$) zwischen den Parametern der Endothelfunktion und den laborchemischen Parametern bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ($n = 8$).

Korrelationen	Spearman R	p-Niveau
EAD & TRAP	-0,78	<0,05
EAD & Cholesterin	-0,73	<0,05
NEAD & TRAP	-0,73	<0,05
NEAD & γ -Tocopherol/Lipid	-0,80	<0,05

fett: im folgenden als Grafik dargestellt

EAD = endothelabhängige Dilatation; NEAD = nicht-endothelabhängige Dilatation

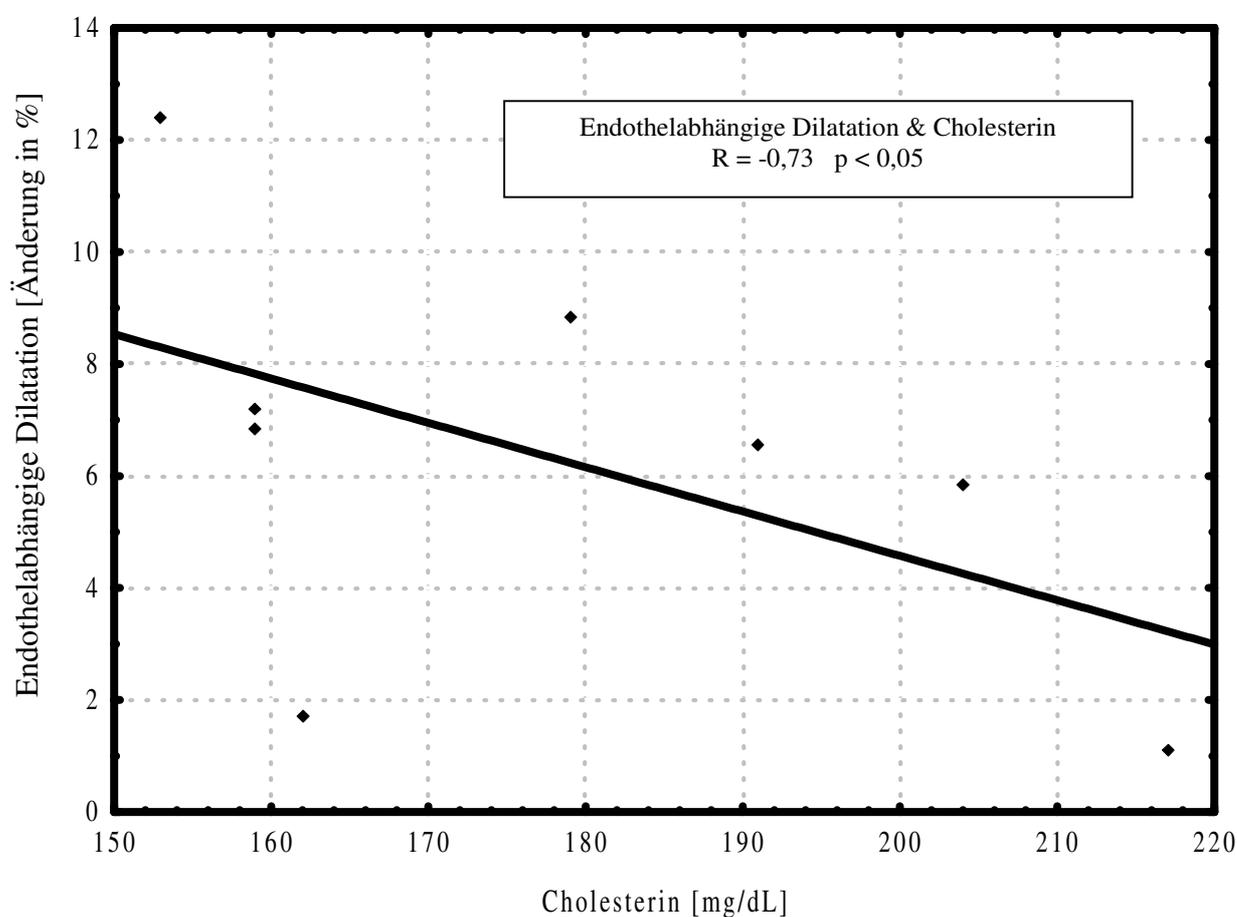


Abb. 3.28: Zusammenhang von Cholesteringehalt im Plasma und endothelabhängiger Dilatation bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz.

In beiden Nierenpatientengruppen (Chronische Niereninsuffizienz und Peritonealdialyse; $n = 23$) wurden die biochemischen Parameter untereinander korreliert, die signifikanten Korrelation sind in Tabelle 3.6 wiedergegeben. Es zeigten sich positive Korrelationen zwischen Malondialdehyd und Carbonylgruppen, Cholesterin und TRAP, Cholesterin und

Triglyzeriden, sowie negative Korrelationen von Carbonylgruppen und SH-Gruppen, Cholesterin und Gesamt Q₁₀/Lipid.

Tab. 3.6: Signifikante Korrelationen ($p < 0,05$) zwischen den laborchemischen Parametern, die sich bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ohne und mit Peritonealdialyse ($n = 23$) fanden.

Korrelationen	Spearman R	p-Niveau
<i>Carbonylgruppen & SH-Gruppen</i>	-0,43	<0,05
Carbonylgruppen & MDA	0,43	<0,05
Cholesterin & Gesamt Q ₁₀ /Lipid	-0,49	<0,05
<i>Cholesterin & TRAP</i>	0,47	<0,05
<i>Cholesterin & Triglyzeride</i>	0,45	<0,05

Kursiv: Korrelationen, die sich auch für alle Probanden fanden

4. Diskussion

Es wurden die Parameter der Endothelfunktion auf nicht-invasive Weise mittels Ultrasonographie sowie verschiedene laborchemische Parameter des pro- und antioxidativen Gleichgewichts im Blut bei Kindern mit chronischer Niereninsuffizienz und bei Kindern mit operierten angeborenen Herzfehlern untersucht. Aufgrund verschiedener Studien und klinischer Erfahrung wird bei diesen Patienten ein erhöhtes Arterioskleroserisiko postuliert. In der vorliegenden Arbeit sollte versucht werden, einen ursächlichen Zusammenhang zwischen der endothelialen Dysfunktion, als dem ersten Schritt der Arterioskleroseentwicklung, und einem durch vermehrten oxidativen Stress gestörten Gleichgewicht von pro- und antioxidativen Substanzen im Blut herzustellen.

4.1. Allgemeine Zusammenhänge zwischen Parametern der Endothelfunktion und den verschiedenen laborchemischen Parametern im Blut

Eine Hyperhomocysteinämie gilt als unabhängiger kardiovaskulärer Risikofaktor (Clarke et al. 1991). Verschiedene Studien konnten zeigen, dass es einen Zusammenhang zwischen einer Hyperhomocysteinämie und der endothelialen Dysfunktion mit verminderter endothelabhängiger Dilatation (EAD) gibt (Chambers et al. 1999, Woo et al. 1997). Einen solchen Zusammenhang konnten wir in der vorliegenden Studie nicht feststellen. Hingegen fanden wir eine negative Korrelation zwischen der nicht-endothelabhängigen Dilatation (NEAD) und dem Plasmahomocysteinspiegel, was letztlich auf eine Zunahme der Toleranz der glatten Muskelzellen gegenüber Nitroglycerin mit steigender Plasmahomocysteinkonzentration hinweist.

Als Schlüsselreaktion der Nitroglycerinwirkung gilt die Aktivierung der Guanylatcyclase, welche, vermittelt durch cGMP, zur Phosphorylierung von Proteinen und nachfolgend zu einem erhöhten intrazellulären Calciumgehalt führt und auf diese Weise letztlich die Vasorelaxation der glatten Muskelzellen bewirkt. Für die Zunahme der Toleranz gegenüber Nitrat unter langdauernder Therapie mit Nitraten wiederum wird eine herabgesetzte NO-Bioaktivität mit Endorganresistenz und neurohormonaler Gegenregulationen ins Feld geführt (Gori und Parker 2002). Nach diesen Autoren könnte auch eine vermehrte Superoxidanionen-Produktion für eine erhöhte Nitrat-Toleranz und verminderte NEAD von entscheidender Bedeutung sein.

Fu et al. (2002) konnten im Tiermodell einen Zusammenhang zwischen Homocystein und NO aufzeigen, insofern, als bei erhöhten Homocystein-Spiegeln sowohl die Bioaktivität des am Endothel gebildeten NO als auch die von extern zugeführtem NO, zum Beispiel durch Nitroglycerin, einschränkt und dadurch die nicht-endothelabhängige Vasodilatation (NEAD) vermindert ist. Somit könnte durchaus die Inaktivierung von NO durch Homocystein als Erklärung für den in der vorliegenden Studie gefundenen negativen Zusammenhang zwischen Homocystein und NEAD angeführt werden. Münzel et al. (1995) demonstrierten eine Assoziation der erhöhten Nitrat-Toleranz mit einer erhöhten Produktion von Superoxidanionen ($O_2^{\cdot-}$), welche Ausdruck von vermehrtem oxidativem Stress ist. Außerdem konnten diese Autoren zeigen, dass es bei einer Steigerung der Nitrat-Toleranz zu einer Inhibition der NO-vermittelten Vasodilatation kommt, sowohl das endogene als auch das exogene NO betreffend. Die Nitrat-Toleranz wird nach Laursen et al. (1996) nicht auf eine verminderte Biokonversion von Nitroglycerin zu NO, sondern auf eine verminderte NO-Bioaktivität zurückgeführt. Sie konnten ebenfalls zeigen, dass ein Anstieg der Nitrat-Toleranz nicht nur mit einer verminderten NEAD, sondern auch mit einer verminderten endothelabhängigen Dilatation (EAD) einhergeht. Somit scheint, zumindest nach diesen Autoren, auch die Nitrat-Toleranz mit einer verminderten Bioaktivität von endogenem NO assoziiert zu sein. Warum wir allerdings in unserer Untersuchung diesen Zusammenhang nicht fanden, muss offen bleiben. Warnholtz et al (2004) schreiben sogar der Nitrat-Therapie eine entscheidende Rolle an der Entstehung der endothelialen Dysfunktion zu.

Offenbar lässt sich ein Zusammenhang zwischen einer Einschränkung der EAD und einer Hyperhomocysteinämie nicht konstant reproduzieren, denn es gelang nicht nur uns sondern auch anderen Autoren (Hanratty et al. 1998) nicht. Möglicherweise besteht eine Altersabhängigkeit für dieses Phänomen. So konnten Chao et al. (2000) zeigen, dass bei jungen Erwachsenen die normale EAD während einer Methionin-induzierten Hyperhomocysteinämie erhalten blieb, während sie sich bei älteren Personen vermindert darstellte. Dass sich bei unserem pädiatrischen Kollektiv kein Zusammenhang von Hyperhomocysteinämie und verminderter EAD fand, könnte demnach in der Altersabhängigkeit begründet sein. Dass allerdings das Alter allein für die diskrepanten Ergebnisse verantwortlich sein soll, erscheint eher unwahrscheinlich.

Die genauen Mechanismen, wie Homocystein in den molekularen Metabolismus am Endothel eingreift, ist nicht eindeutig geklärt. Die Hypothese, dass Homocystein seine atherogenen Eigenschaften über oxidativen Stress vermittelt, ist viel diskutiert. Dass eine Vitamin C-Prophylaxe zwar nicht die Homocysteinkonzentration im Blut senkt, jedoch die endothelabhängige Dilatation verbessert (Chambers et al. 1999) unterstützt diese Hypothese. Danach wird der negative Effekt des Homocysteins durch oxidativen Stress vermittelt und kann durch Erhöhung der antioxidativen Abwehr abgeschwächt werden. Ob in diesem Fall das Homocystein der Mediator des oxidativen Stress ist, bleibt fraglich. Vor allem *in vitro* durchgeführte Studien, in denen oftmals supraphysiologische Homocysteinkonzentrationen verwendet wurden und bei denen die *in vivo* antioxidativen Abwehrsysteme nicht vorhanden sind, unterstützen die Hypothese des oxidativen Stress – für den Homocystein-vermittelten Pathomechanismus am Endothel (Jacobsen 2000). Auch in Tiermodellen wurde dies nachgewiesen (Fischer et al. 2003). Hingegen konnten Blom et al. (1995) bei Patienten mit Homocysteinurie eine positive Korrelation zwischen der Homocysteinkonzentration im Blut und der Lipidperoxidation (TBARS-Methode), einem anderen Marker für oxidativen Stress, nicht finden. Auch Chao et al. (2000) zeigten, dass die (Methionin-induzierte) Hyperhomocysteinämie durch eine reduzierte Stickstoffmonoxid (NO)-Wirkung vermittelt wird und nicht mit Veränderungen im oxidativen Status (mit P-Selectin als Marker) einhergeht. Als weitere Effekte, über die Homocystein eine vaskuläre Schädigung vermittelt, werden unter anderem die Proliferation glatter Muskelzellen, und eine erhöhte Thromboxan A₂-Freisetzung und Thrombozytenaktivierung postuliert (Bagi et al. 2001).

In der vorliegenden Studie fanden sich bei hohen Homocysteinkonzentrationen sowohl eine hohe Malondialdehydkonzentration als Marker für stattgefundenen oxidativen Stress, als auch erniedrigte Spiegel verschiedener Antioxidantien (α -Tocopherol/Lipid, SH-Gruppen, reduziertes Coenzym Q₁₀) und eine verminderte Radikalresistenz der Erythrocyten, also eine Imbalance im pro/antioxidativen Gleichgewicht. Ob nun der Zusammenhang zwischen Hyperhomocysteinämie und oxidativem Stress ursächlicher Natur ist oder ob es sich hierbei um parallel zu beobachtende Phänomene handelt, lässt sich auch in diesem Teil der Studie nicht beurteilen. Probanden mit einer Hyperhomocysteinämie stammten in erster Linie aus der Gruppe von Patienten unter Peritonealdialyse, bei denen aufgrund der Urämie etliche weitere Verursacher von

oxidativem Stress vorliegen können (Suliman et al. 2005). Die Frage bleibt offen: *Ist Homocystein Marker oder Mediator von endothelialer Dysfunktion?*

In verschiedene Studien wurde untersucht, ob eine Substitution von Folsäure (Cosubstrat der Remethylierung von Homocystein) einen positiven Effekt auf die endotheliale Funktion hat. Durch Folsäure ließ sich bei urämischen Patienten zwar die Homocysteinkonzentration reduzieren ohne dass jedoch ihre komplette Normalisierung erreicht wurde. (Thambyrajah et al. 2000). Weder Thambyrajah et al. (2000) noch Bennett-Richards et al. (2002) konnten eine direkte Verbesserung der endothelialen Dilatation durch Folsäuresubstitution nachweisen. Gori et al. (2001) dagegen fanden, dass eine Prophylaxe mit Folsäure einer endothelialen Dysfunktion vorbeugen kann und eine Erhöhung der Nitrat-Toleranz unter kontinuierlicher transdermaler Nitratgabe verhindert. Stanger et al. (2002) zeigten, dass es bei Patienten mit manifester koronarer Herzkrankheit nach Folsäuresubstitution im Mittel zu einer Reduktion des Homocysteins um 21% kam. Zudem war eine deutliche Verbesserung der Gefäßreagibilität nachweisbar bei denjenigen Patienten, die eine Reduktion des Homocysteinspiegels um mehr als 2 μM aufwiesen.

Die Antioxidantien Vitamin C und reduziertes Coenzym Q_{10} korrelierten positiv mit der nicht-endothelabhängige Vasodilatation (NEAD). Dass Vitamin C eine protektive Wirkung am Endothel besitzt und eine verminderte NEAD unter Therapie mit Vitamin C reversibel ist, wurde mehrfach beschrieben (Chambers et al. 1999). Im Tiermodell konnte bei chronischer Nitrat-Behandlung durch eine Vitamin C-Prophylaxe eine verbesserte Nitroglycerin-vermittelte Dilatation und eine Reduzierung des am Endothel gebildeten Superoxidanions erreicht werden (Mülsch et al. 2001). Es stellt sich die Frage, warum in dem hier untersuchten Kollektiv der positive Effekt des Vitamin C auf die NEAD, nicht aber auf die EAD zu finden war.

In der Literatur ist weit verbreitet, dass die nicht-endothelabhängige Dilatation (NEAD) im Gegensatz zur endothelabhängigen Dilatation (EAD) bei sehr früher Endothelschädigung nicht vermindert ist. Allenfalls wurde eine leichte, nicht signifikante Verminderung der NEAD beobachtet. Adams et al. (1998) fanden erstmals in einer großen Studie (n=800) bei Erwachsenen mit erhöhtem Arterioskleroserisiko eine Verschlechterung der NEAD, die mit männlichem Geschlecht, hohem Lebensalter, Größe des Gefäßdurchmessers, Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus, Nikotinabusus sowie reduzierter EAD assoziiert

war. Dies lässt auf eine mit den klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren assoziierte Dysfunktion der glatten Muskelzelle schließen. Järvisalo et al. (2004) fanden eine reduzierte NEAD auch bei Kindern, die ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen (Diabetes Typ I und familiäre Hypercholesterinämie) hatten, klinisch aber asymptomatisch waren. Oxidiertes LDL und eine verminderte EAD waren hier Prädiktoren für das eingeschränkte Ansprechen auf exogenes NO. Auch in der vorliegenden Studie fand sich eine negative Korrelation von NEAD und Gefäßdurchmesser sowie eine positive Korrelation von EAD und NEAD, wobei allerdings keine der Patientengruppen eine Verschlechterung von EAD oder NEAD zeigten. Ob in der Pathogenese der dysfunktionalen glatten Muskelzelle (oder im weiteren Sinne auch einer erhöhten Nitrat-Toleranz) eine verminderte NO-Bioverfügbarkeit, eine Desensibilisierung der Guanylatcyclyase oder eine gestörte intrazelluläre Signalleitung die Schlüsselrolle einnehmen und inwiefern oxidativer Stress Verursacher dieser Störungen ist, bleiben spannende Themen, die es weiter zu untersuchen gilt.

Malondialdehyd, Carbonylgruppen und Antikörper gegen oxidiertes LDL als prooxidative Parameter zeigten keine signifikanten Zusammenhänge mit Veränderungen der funktionellen Gefäßparameter. Eine hohe Malondialdehydkonzentration als Ausdruck einer stattgefundenen Lipidperoxidation ging mit einer Erniedrigung einiger Antioxidantien (Coenzym Q₁₀ und SH-Gruppen) und einer reduzierten Radikalresistenz der Erythrozyten einher. Dies spiegelt ein gestörtes anti-/prooxidatives Gleichgewicht wider und kann als Ausdruck einer vermehrten Auseinandersetzung mit freien Radikalen angesehen werden. In diesem Sinne waren auch die als kardiovaskuläre Risikofaktoren zu betrachtenden Parameter Cholesterin und Homocystein positiv mit dem Malondialdehydgehalt korreliert.

Ähnliche Korrelationen fanden sich für den Marker Carbonylgruppen und für Cholesterin. Hohe Konzentrationen von Carbonylgruppen gingen einher mit einer Erniedrigung von antioxidativen Substanzen wie SH-Gruppen und reduziertem Coenzym Q₁₀, beziehungsweise es wurde bei hohen Antioxidantienspiegeln niedrige Konzentrationen von Carbonylgruppen gefunden. Die Cholesterin- und Triglyzeridspiegel verhielten sich gleichsinnig zur Konzentration der Carbonylgruppen in Proteinen. Für die lipophilen Substanzen α -Tocopherol und Gesamtcoenzym Q₁₀ konnten nach Bezug auf die totalen neutralen Lipide keine signifikanten Veränderungen in der Korrelation zu prooxidativen Markern gefunden werden. 00

Der vielverwendete Total Radical-trapping Parameter-Test (TRAP-Test), ein Test mit dem sich die Gesamtkapazität der Antioxidantien im Plasma messen lässt, korrelierte in dieser Studie positiv mit Carbonylgruppen und Homocystein und war in hohen Konzentrationen assoziiert mit einer beeinträchtigten nicht-endothelabhängigen Dilatation (NEAD). Damit wies der TRAP in dieser Studie überraschenderweise positive Korrelationen zu prooxidativen und proatherogenen Markern auf, die nicht zu einem Parameter der antioxidativen Gesamtkapazität passen. TRAP war bei denjenigen Probandengruppen erhöht, die auch erhöhte Harnsäurewerte aufwiesen (Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ohne und mit Peritonealdialyse sowie Patienten mit Fallot'scher Tetralogie). Da Harnsäure mit einem Anteil von 35-65% in den TRAP eingeht, wird man wohl bei diesen Patienten die Erhöhung des TRAP auf eine Erhöhung der Harnsäure zurückführen müssen. Dass die Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz außer einer erhöhten Harnsäurekonzentration und einem erhöhten TRAP auch erhöhte Marker für oxidativen Stress und eine Erniedrigung der einzelnen Antioxidantien aufwiesen, könnte durchaus den statistischen Zusammenhang zwischen TRAP und prooxidativen Markern beeinflussen, ohne dass es dafür einen ursächlichen Zusammenhang gibt. Es gibt auch Studien, die das antioxidative Potential der Harnsäure in Frage stellen. So zeigten Moeslinger et al. (1999), dass Harnsäure in sehr hohen Konzentrationen *in vitro* über eine Hemmung der induzierbaren NO-Synthase die Makrophagenproliferation stimulieren kann und auf diese Weise bei urämischen Patienten sogar zur Arterioskleroseentwicklung beitragen könnte. Unsere Studie unterstützt die von Nguyen-Khoa et al. (1999) geäußerte Folgerung, dass der TRAP-Test bei hyperurikämischen Patienten kein relevanter Parameter zur Evaluierung der antioxidativen Kapazität im Plasma sein kann. *In vivo* scheint die Harnsäure nicht die antioxidative Wirkung zu haben, die man *in vitro* im TRAP-Test misst.

4.2. Vergleich von Parametern der Endothelfunktion und laborchemischen Parametern bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz mit und ohne Peritonealdialyse

Eine reduzierte endothelabhängige Vasodilatation (EAD) als Ausdruck einer endothelialen Dysfunktion ist sowohl bei Kindern mit chronischer Niereninsuffizienz (Kari et al.) als auch bei Patienten mit Peritoneal- und Hämodialyse bekannt (van Guldener et al. 1998, Miyazaki et al. 2000) und wird im allgemeinen als ein entscheidender Faktor bei der Arterioskleroseentstehung bei chronisch niereninsuffizienten Patienten betrachtet. Im

direkten Vergleich fand sich bei chronisch Niereninsuffizienten sogar eine stärker beeinträchtigte EAD als bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen wie Angina pectoris (Bolton et al. 2001). Die endotheliale Dysfunktion bei chronisch niereninsuffizienten Kindern ohne Dialyse ließ sich in unserer Studie mit der Sonographie nicht nachvollziehen: bei diesen Patienten war weder die EAD noch die NEAD signifikant gegenüber der Kontrollgruppe verändert. Der Grund für die diskrepanten Ergebnisse zu vielen anderen Studien könnte in den niedrigen Fallzahlen (n=8) liegen.

Man muss davon ausgehen, dass die gestörte endotheliale Funktion bei niereninsuffizienten Patienten, sowohl vor Beginn einer Dialyse-Therapie als auch unter Peritoneal- und Hämodialyse, multifaktoriell bedingt ist. Als mögliche Ursachen werden oxidativer Stress, chronisch erhöhte Entzündungsmarker, Mangelernährung, Retention von Inhibitoren der endogenen NO-Synthase, Hyperhomocysteinämie, Dyslipidämie, Hyperglykämie und renovaskuläre Hypertension diskutiert (Stenvinkel 2001). Das hier untersuchte niereninsuffiziente Patientenkollektiv wies, trotz einer im Vergleich mit dem Kontrollkollektiv nicht signifikant veränderten endothelabhängigen Dilatation (EAD), neben laborchemischen Zeichen von erhöhtem oxidativen Stress auch eine Hyperhomocysteinämie und Dyslipidämie auf. Hier handelt es sich um laborchemische Veränderungen, die bekanntermaßen mit einer endothelialen Dysfunktion assoziiert sind.

Bei den beiden untersuchten Patientengruppen mit chronischer Niereninsuffizienz fanden sich im Vergleich zum Kontrollkollektiv eine Erniedrigung der Antioxidantienkonzentration (niedrige Konzentration von SH-Gruppen, verminderter Anteil des reduzierten Coenzym Q₁₀) und eine herabgesetzte Radikalresistenz der Erythrozyten. Die Schwächung der antioxidativen Abwehr mit der nachfolgenden pro-/antioxidativen Imbalance wird mit zunehmendem Funktionsverlust der Nieren immer ausgeprägter (Ceballos-Picot et al. 1996).

Aufgrund des größeren Bedarfs an Vitamin C durch Verluste während der Dialyse, verringertem Appetit und erhöhtem oxidativen Stress (Lim et al. 2001) werden Patienten unter Dialysetherapie regelhaft mit Vitaminen (inklusive Vitamin C) substituiert, so auch die Patienten dieser Studie. Dies könnte erklären, weshalb das Antioxidans Vitamin C in diesen Gruppen im Normbereich lag, ebenso wie die Tocopherol-Plasmaspiegel. Die erniedrigte Radikalresistenz der Erythrozyten, die als ein Ausdruck eines verminderten Tocopherolgehaltes in der Erythrozytenmembran gelten könnte (Boda et al. 1998), fand

sich dagegen in beiden Gruppen von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz. Diese Konstellation der Tocopherolverteilung in den verschiedenen Kompartimenten (Plasma versus Erythrozytenmembran) wurde bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz bereits beschrieben (Taccone-Gallucci et al. 1988). Hornig et al. (1998) zeigten eine akute und lang-anhaltende Verbesserung der endothelabhängigen Dilatation (EAD) nach intraarterieller Gabe oder vierwöchiger oraler Substitution von Vitamin C. Das ist ein Effekt, der zumindest teilweise auf eine vermehrte endotheliale Verfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO) zurückzuführen ist, da er sich durch die Gabe des endothelialen NO-Synthase-Inhibitors L-NMMA verhindern ließ. Dass die EAD bei unseren Nierenpatienten nicht schlechter war als in der Kontrollgruppe, könnte in den normwertigen Vitamin C-Spiegeln begründet liegen; eine signifikante positive Korrelation von EAD mit der Vitamin C-Konzentration fand sich jedoch nicht. Die empfohlene orale Substitution von Antioxidantien wie die Vitamine C und E bei niereninsuffizienten Patienten wird daher auch anhand unserer Ergebnisse bestärkt.

In der Gruppe der Patienten unter Peritonealdialyse waren darüber hinaus die Marker des Radikalangriffs auf Biomoleküle wie die Konzentration der Carbonylgruppen und des Malondialdehyds (sowohl absolut als auch bezogen auf den Lipidgehalt im Blut) gegenüber dem Kontrollkollektiv deutlich erhöht. Demgegenüber waren bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ohne Dialysetherapie keine erhöhten Marker für einen stattgefundenen Angriff auf Radikale zu finden. Dies deckt sich mit Studien, die einen graduellen Anstieg prooxidativer Marker mit Zunahme des Nierenfunktionsverlustes und steigender Intensität der Ersatztherapie (vor Dialyse-Beginn < Peritonealdialyse < Hämodialyse) nachweisen konnten (Donate et al. 2002, Ozden et al. 2002, Al-Hashimi et al. 2004). Die durch den Blutkontakt mit Dialysemembranen hervorgerufene erhöhte Produktion von freien Radikalen existiert bei Peritonealdialyse nicht. Hier wird die chronische Aktivierung von peritonealen Phagozyten und Thrombozyten als mögliche Ursache für die vermehrte Lipidperoxidation diskutiert (Samouilidou et al. 2003). Usberti et al. (2002) konnten einen Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Lipidperoxidation (gemessen als Malondialdehyd im Plasma) und dem Schweregrad der kardiovaskulären Erkrankung bei niereninsuffizienten Patienten herstellen. Boaz et al. (1999) wiesen Malondialdehyd als einzigen robusten prädiktiven Marker für eine manifeste kardiovaskuläre Erkrankung bei Patienten unter Hämodialyse nach.

In beiden Gruppen von Nierenpatienten fand sich eine erhöhte Homocysteinkonzentration im Blut, die mit zunehmendem Nierenfunktionsverlust bekanntermaßen ansteigt und in vielen Studien eine enge Korrelation zur endothelialen Dysfunktion aufwies (siehe auch 4.1). Bei den Patienten unter Peritonealdialyse fand sich mit einer gegenüber den Kontrollen erhöhten Plasma-Triglyzeridkonzentration eines der typischen Anzeichen einer Dyslipidämie. Diese schließt bei Patienten unter Peritonealdialyse im Plasma außer der Triglyzeriderhöhung auch eine Erhöhung von oxidiertem LDL-Cholesterin und Lipoprotein(a), eine Erniedrigung von HDL-Cholesterin und triglyzeridreiches VLDL mit ein. Die Abweichungen im Lipidmuster werden bei Patienten unter Peritonealdialyse als stärker atherogen eingeschätzt als bei Patienten unter Hämodialyse (Prichard 2003). Dass in unserer Studie in der Patientengruppe mit chronischer Niereninsuffizienz der Cholesterinspiegel negativ mit der EAD korrelierte, bestärkt diese Einschätzung. Stärkere Zusammenhänge entsprechender Parameter waren, möglicherweise wegen der niedrigen Fallzahlen, nicht nachzuweisen. Der Cholesterinspiegel (hier nur als Gesamtcholesterin bestimmt) war bei den Nierenpatienten nicht signifikant höher als in der Kontrollgruppe; dennoch korrelierten die Spiegel für die Triglyzeride und für Cholesterin innerhalb beider Nierenpatientengruppen positiv.

Mittlerweile werden neben der sonographischen Endothelfunktionsmessung auch zunehmend laborchemische Marker einer Endothelzellschädigung (v. Willebrand-Faktor, Thrombomodulin, Adhäsionsmoleküle wie VCAM, ICAM, Selektine und CD146) entdeckt, die auch bei Patienten unter Peritonealdialyse häufiger erhöht nachgewiesen werden. (Jacobson et al. 2002, Malyszko et al. 2005). Aguilera et al. (2003) fanden bei Patienten unter Peritonealdialyse eine negative Korrelation zwischen Albumin und verschiedenen Markern der endothelialen Dysfunktion im Blut (v. Willebrandfaktor, Thrombomodulin, tPA) sowie eine positive Korrelation des Entzündungsmarkers TNF- α mit kardiovaskulären Risikofaktoren wie Homocystein. Diese sind als Indikatoren für einen ätiologischen Zusammenhang von endothelialer Dysfunktion, Malnutrition und chronischer Inflammation bei chronischer Niereninsuffizienz zu werten. Malgorzewicz et al. (2004) fanden die höchsten Konzentrationen für Malondialdehyd- und Carbonylgruppen unter solchen Patienten unter Peritonealdialyse, die eine schwere Malnutrition aufwiesen. Zusammenhänge wie diese haben zu Spekulationen über das Vorliegen eines sogenannten Malnutrition-Inflammation-Arteriosklerose (MIA)-Syndroms in der chronischen Niereninsuffizienz geführt, da diese Symptome in ihrer Ätiologie eng verbunden sind, ihre

messbaren Marker miteinander korrelieren und sie in der Gesamtheit in der Regel bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz vorhanden sind (Kalantar-Zadeh et al. 2003, Stenvinkel et al. 1999). Engler et al. (2003) zeigten, dass es unter einer Substitution von Vitamin C und Vitamin E bei Kindern mit Hyperlipidämie zu einer Verbesserung der endothelabhängigen Dilatation (EAD) kommt. Diese Ergebnisse untermauern die Bedeutung adäquat hoher Antioxidantienpiegel und die Vorbeugung einer Malnutrition bei niereninsuffizienten Patienten. Dementsprechend gilt es diese Substanzen, wenn sie in erniedrigten Konzentrationen vorliegen, zur Vorbeugung kardiovaskulärer Komplikationen zu substituieren.

4.3. Vergleich von Parametern der Endothelfunktion und laborchemischen Parametern bei Patienten mit operativ korrigierten Herzfehlern

In keiner Gruppe von Patienten mit einem operierten Herzfehler zeigte sich ein signifikanter Unterschied der funktionellen Gefäßparameter oder der Intima-Media-Dicke der A. carotis interna zur denen der Kontrollgruppe. Das postulierte Risiko einer vorzeitigen Entwicklung von Arteriosklerose nach Operation eines kongenitalen Herzfehlers, welches sich in einer frühen endothelialen Dysfunktion zeigen könnte, ließ sich durch die Ergebnisse der vorliegenden Studie nicht stützen. Ebenso wenig zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen von Herzpatienten, die anhand des postulierten Risikos unterteilt worden waren. Die geringste endothelabhängige Dilatation fand sich bei Patienten nach Fontanoperation (FON), der Gruppe mit dem höchsten postulierten kardiovaskulären Risiko. Dies waren auch diejenigen Patienten mit operierten Herzfehlern, für die Mahle et al. (2004) eine deutlich verminderte endothelabhängige Dilatation nachweisen konnten. Die Gruppe der nach Fontan-operierten Patienten wies auch als einzige Gruppe von Herzpatienten eine erhöhte Plasma-Malondialdehydkonzentration bezogen auf Lipide auf. Das in der Patientengruppe erhöht gemessene Malondialdehyd geht allerdings nicht mit einer Reduktion von Antioxidantien einher, so dass es fraglich bleibt, ob diese Patienten einem erhöhten oxidativen Stress ausgesetzt sind. Da zudem auch die Endothelfunktion nicht signifikant vermindert war, sind die Hinweise für eine vorzeitige Arteriosklerosegefährdung eher schwach und die Fallzahlen zu gering, um das postulierte Risiko zu bestärken.

5. Zusammenfassung

Arteriosklerotische Gefäßveränderungen, die im späteren Leben zu erheblicher Morbidität und Mortalität führen, können im Kindesalter beginnen. Das Risiko hierzu ist bei gewissen chronischen Krankheiten besonders erhöht, so bekanntermaßen bei chronischer Niereninsuffizienz, möglicherweise auch bei Kindern nach Operation bestimmter Herzfehler.

In dieser Arbeit wurden Parameter des Arterioskleroserisikos bei 23 nierenkranken Kindern (chronische Niereninsuffizienz und Peritonealdialyse), bei 51 Kindern mit operativ korrigierten, angeborenen Herzfehlern und bei einem Kontrollkollektiv von 13 Kindern studiert. Als Parameter dienten einerseits ultrasonographische Messungen des arteriellen Endothels und seiner Funktion (Intima-Media-Dicke, endothelabhängige Dilatation (EAD), nicht-endothelabhängige Dilatation NEAD), andererseits eine Auswahl an laborchemischen Parametern der pro- und antioxidativen Balance im Blut (Malondialdehyd, Carbonylgruppen, Radikalresistenz der Erythrozyten, Tocopherole, Coenzym Q₁₀, Sulfhydrylgruppen, Vitamin C, Harnsäure, Total Radical-trapping Antioxidant Parameter (TRAP), Antikörper gegen oxidiertes LDL, Homocystein, Cholesterin und Triglyzeride).

Bei den Endothelfunktionsmessungen ergaben sich zwischen Patienten und Kontrollpersonen keine Unterschiede beim Vergleich der entsprechenden Gesamtgruppen. Bei den Kindern mit operativ korrigierten Herzfehlern ergab sich weder mittels Endothelfunktionsanalyse noch bei den laborchemischen Untersuchungen ein Anhalt für ein erhöhtes Arterioskleroserisiko. Bei den Nierenpatienten fanden sich laborchemische Veränderungen im Sinne einer verminderten antioxidativen Abwehr. Bei den Patienten unter Peritonealdialyse war zusätzlich eine Erhöhung von prooxidativen Markern nebst klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren nachweisbar. Dieser Nachweis von oxidativem Stress im noch jugendlichen Organismus von Patienten mit bekanntermaßen erhöhtem Arterioskleroserisiko untermauert die Hypothese, dass freie Radikale bei der Entstehung der Arteriosklerose von Bedeutung sind. Die Substitution von Antioxidantien wie Vitamin C und E in entsprechend hoher Dosis bei den gefährdeten Patienten ist daher ein wichtiger therapeutischer Aspekt bei der Reduzierung des kardiovaskulären Risikos.

Der Blutgehalt an Homocystein korrelierte negativ mit der nicht-endothelabhängigen, Nitroglycerin-vermittelten Dilatation. Dies lässt vermuten, dass Homocystein die Dilatationsfunktion der glatten Muskelzelle beeinträchtigt; es könnte bei der Entstehung der Nitrat-Toleranz beteiligt sein. Der Total Radical-trapping Antioxidant Parameter zur Beurteilung der antioxidativen Gesamtkapazität erwies sich bei urämischen Patienten als nicht geeignet zur Beurteilung des pro/antioxidativen Gleichgewichts.

Literaturverzeichnis:

- Adams MR, Robinson J, McCredie R, Seale P, Sorensen KE, Deanfield JE, Celermajer DS (1998): Smooth muscle dysfunction occurs independently of impaired endothelium-dependent dilatation in adults at risk of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 1998; 32: 123-127
- Adams MR, Celermajer DS (1999): Detection of presymptomatic atherosclerosis: a current perspective. *Clin Sci (Lond)*. 1999; 97(5):615-624
- Aguilera A, Sanchez-Tomero JA, Bajo MA, Ruiz-Caravaca ML, Alvarez V, de la Torre JG, Herranz A, Cuesta MJ, Castro MJ, Selgas R (2003): Malnutrition-inflammation syndrome is associated with endothelial dysfunction in peritoneal dialysis patients. *Adv Perit Dial*. 2003; 19:240-245
- Al-Hashimi AF, Mohammed FH, Al-Khazragi AS (2004): Oxidative stress in chronic renal failure patients treated by peritoneal dialysis. *Saudi Med J* 2004; 25(9): 1186-1192
- Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD et al (1995): Close relationship of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. *J Am Coll Cardiol* 1995; 26:1235-1241
- Annuk M, Zilmer M, Lind L, Linde T, Fellstrom B (2001): Oxidative stress and endothelial function in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12(12):2747-2752
- Bagi Z, Ungvar Z, Szollar L, Koller A (2001): Flow-induced Constriction in Arterioles of Hyperhomocysteinemic Rats Is Due to Impaired Nitric Oxide and Enhanced Thromboxane A2 Mediation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001; 21:233-237
- Benett-Richards K, Kattenhorn M, Donald A, Oakley G, Varghese Z, Rees L, Deanfield JE (2002): Does oral folic acid lower total homocystein levels and improve endothelial function in children with chronic renal failure? *Circulation* 2002; 105:1810-1815
- Berenson GS, Srinivasan SR, Bao W, Newman WP, Tracy RE, Wattigney WA (1998): Association between multiple cardiovascular risk factors and atherosclerosis in children and young adults. *N Engl J Med* 1998; 338:1650-6
- Bhat, AH, Sahn DJ (2004): Congenital heart disease never goes away, even when it has been "treated": the adult with congenital heart disease. *Curr Opin Pediatrics* 2004; 16:500-507
- Blom HJ, Kleinvelde HA, Boers GHJ, Demacker PNM, Hak-Lemmers HLM, Te Poele-Pothoff MTWB, Trijbels JMF (1995): Lipid peroxidation and susceptibility of low-density lipoprotein to in vitro oxidation in hyperhomocysteinemia: *Eur J Clin Invest*. 1995; 25:149-154
- Boaz M, Matas Z, Biro A, Katzir Z, Green M, Fainaru M, Smetana S (1999): Serum malondialdehyde and prevalent cardiovascular disease in hemodialysis. *Kidney Int*. 1999; 56:1078-1083
- Boda V, Finckh B, Dürken M, Commentz J, Hellwege HH, Kohlschütter A (1998): Monitoring erythrocyte free radical resistance in neonatal blood microsamples using a peroxy radical-mediated haemolysis test. *Scand J Clin Lab Invest* 1998; 58: 317-322
- Bolton CH, Downs LG, Victory JG, Dwight JF, Tomson CR, Mackness MI, Pinkey JH (2001) : Endothelial dysfunction in chronic renal failure: roles of lipoprotein oxidation and pro-inflammatory cytokines. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16(6):1189-1197
- Bradford MM (1976) : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-254
- Cai H, Harrison DG (2000): Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases: The Role of Oxidant Stress. *Circ Res*. 2000;87:840-844
- Carr A, Ben-Zhan Z, Frei B (2000): Potential antiatherogenic mechanisms of ascorbate (Vitamin C) and α -Tocopherol (Vitamin E). *Circ Res* 2000; 87:349-354

- Carr A, Frei B (2000): The role of natural antioxidants in preserving the biological activity of endothelium-derived nitric oxide. *Free Rad Biol Med* (2000); 28:1806-1814
- Ceballos-Picot I, Witko-Sarsat V, Merad-Boudia M, Nguyen AT, Thevenin M, Jaudon MC, Zingraff J, Verger C, Jungers P, Descamps-Latscha B (1996): Glutathione antioxidant system as a marker of oxidative stress in chronic renal failure. *Free Radic Biol Med* 1996; 21(6):845-853
- Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, Lloyd JK, Deanfield JE (1992): Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet* 1992; 340(8828): 1111-1115
- Celermajer DS, Cullen S, Deanfield JE (1993): Impairment of Endothelium-Dependant Pulmonary Artery Relaxation in Children With Congenital Heart Disease and Abnormal Pulmonary Hemodynamics. *Circulation* 1993; 87:440-446
- Celermajer DS, Sorensen KE, Georgakopoulos D, Bull C, Thomas O, Robinson J, Deanfield JE (1993): Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependant dilatation in healthy young adults. *Circulation* 1993; 88(5 Pt 1): 2149-2155
- Celermajer DS, Sorensen KE, Ryalls M, Robinson J, Thomas O, Leonard JV, Deanfield JE (1993): Impaired endothelial function occurs in the systemic arteries of children with homozygous homocystinuria but not their heterozygous parents. *J Am Coll Cardiol* 1993; 22:854-858
- Chambers JC, McGregor A, Jean-Marie J, Obeid OA, Kooner JS (1999): Demonstration of Rapid Onset Vascular Endothelial Dysfunction After Hyperhomocysteinemia - An Effect Reversible With Vitamin C Therapy. *Circulation* 1999;99:1156-1160
- Chao CL, Kuo TL, Lee YT (2000): Effects of Methionine-Induced Hyperhomocysteinemia on Endothelium-Dependent Vasodilation and Oxidative Status in Healthy Adults. *Circulation* 2000;101:485-490.
- Charakida M, Donald AE, Terese M, Leary S, Halcox JP, Ness A, Smith GD, Golding J, Friber P, Klein NJ, Deanfield JE (2005): Endothelial dysfunction in childhood infection. *Circulation* 2005; 111:1660-1665
- Clarke R, Daly L, Robinson K, Naughten E, Cahalane S, Fowler B, Graham I (1991): Hyperhomocysteinemia, an independent risk factor for vascular disease, *New England Journal of Medicine* 1991; 324: 1149-1155
- Clarkson P, Celermajer DS, Donald AE et al (1996): Impaired vascular reactivity in insulin-dependent diabetes mellitus is related to disease duration and low density lipoprotein cholesterol levels. *J Am Coll Cardiol* 1996; 28:573-579
- Clarkson P, Celermajer DS, Powe AJ, Donald AE, Henry RM; Deanfield JE (1997): Endothelium-dependant dilatation is impaired in young healthy subjects with a family history of premature coronary heart disease. *Circulation* 1997; 96(10): 3378-3383
- Clermont G, Lecour S, Cabanne JF, Motte G, Guillaud JC, Chevet D, Rochette L (2001): Vitamin E-coated Dialyzer reduces oxidative stress in hemodialysis patients. *Free Rad Biol Med* (2001); 31:233-241
- Dhillon R, Clarkson P, Donald AE, Powe AJ, Nash M, Novelli V, Dillon JM, Deanfield JE (1996): Endothelial Dysfunction Late After Kawasaki Disease. *Circulation* 1996; 94: 2103-2106
- Donate T, Herreros A, Martinez E, Martinez J, Andres E, Cabezas A, Ortiz A, de Prado A, Pou JM, Pamplona R, Portero Otin M, Bellmunt MJ (2002): Protein oxidative stress in dialysis patients. *Adv Perit Dial.* 2002;18:15-17
- Ellmann GL (1959): Tissue Sulhydryl Groups. *Arch Biochem Biophys* (1959); 82: 70-77
- Engler MM, Engler MB, Malloy MJ, Chiu EY, Schloetter MC, Paul SMP, Stuehlinger M, Lin KY, Cooke JP, Morrow JD, Ridker PM, Rifai N, Miller E, Witztum JL, Mietus-Snyder M (2003):

- Antioxidant vitamins C and E improve endothelial function in children with hyperlipidemia. *Circulation* 2003; 108:1059-1063
- Evans RM, Currie L, Campbell A (1982): The distribution of ascorbic acid between various cellular components of blood, in normal individuals, and its relation to the plasma concentration. *Br J Nutr* 1982; 47: 473-482
- Fischer PA, Dominguez GN, Cuniberti LA, Marinez V, Werba JP, Ramirez AJ, Masnatta LD (2003): Hyperhomocysteinemia induces renal hemodynamic dysfunction: Is nitric oxide involved? *J Am Soc Nephrol* 2003; 14:653-660
- Finckh B, Kontush A, Commentz J, Hübner C, Burdelski M, Kohlschütter A (1999): High-Performance Liquid Chromatography-Coulometric Electrochemical Detection of Ubiquinol 10, Ubiquinone 10, Carotenoids, and Tocopherols in Neonatal Plasma. *Methods Enzymol.* 1999; 299: 341-348.
- Fu WY, Dudman NP, Perry MA, Wang XL (2002): Homocystein attenuates hemodynamic responses to nitric oxide in vivo. *Atherosclerosis* 2002; 161:169-176
- Fukunaga K, Suzuki T, Takama K (1993): Highly sensitive high-performance liquid chromatography for the measurement of malondialdehyde in biological samples. *Journal of Chromatography*, 621 (1993) 77-81
- Gardiner HM, Celermajer DS, Sorensen KE, Georgakopoulos D, Robinson J, Thomas O, Deanfield JE (1994): Arterial Reactivity Is Significantly Impaired in Normotensive Young Adults After Successful Repair of Aortic Coarctation in Childhood. *Circulation* 1994; 89:1745-1750.
- Gori T, Burstein JM, Ahmed S, Miner SES, Al-Hesayen A, Kelly S, Parker JD (2001): *Circulation* 2001; 104:1119-1123
- Gori T, Parker JD (2002): Nitrate tolerance. A unifying hypothesis. *Circulation* 2002; 106:2510-2113
- Ha TKK, Sattar N, Talwar C, Cooney J, Simpson K, O'Reilly DSJ, Lean MEJ (1996): Abnormal antioxidant vitamin and carotenoid status in chronic renal failure. *Quarterly Journal of Medicine*, 89, 765-769
- Halliwell B, Gutteridge J (1999): *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford, University Press
- Guldener C van, Stehouwer CD (2000): Hyperhomocysteinemia, vascular pathology, and endothelial dysfunction. *Sem Thromb Hemost.* 2000; 26(3): 281-289
- Hanratty CG, Mc Auley DF, McGurk C, Young IS, Johnston GD (1998): Homocysteine and endothelial vascular function. *Lancet* 1998; 351:1288-1289
- Hardie KL, Kinlay S, Hardy DB, Wlodarczyk J, Silberger JS, Fletcher PJ (1997): Reproducibility of brachial ultrasonography and flow-mediated dilatation (FMD) for assessing endothelial function. *Aust NZ J Med* 1997; 27: 649-652
- Hasselwander O, Young IS (1998): Oxidative Stress in Chronic Renal Failure. *Free Rad Res* 1998; 29: 1-11
- Heger M, Willforth A, Neunteufl T, Rosenhek R, Gabriel H, Wollenek G, Wimmer M, Maurer G, Baumgartner H (2005): Vascular dysfunction after coarctation repair is related to the age at surgery. *Int J Cardiol* 2005; 99:295-299
- Higashi Y, Sasaki S, Nakagawa K, Matsuura H, Oshima T, Chayama K (2002): Endothelial Function and oxidative stress in renovascular hypertension. *N Engl J Med* 2002; 346(25): 1954-1962
- Hornig B, Arakawa N, Kohler C, Drexler H (1998): Vitamin C improves endothelial function of conduit arteries in patients with chronic heart failure. *Circulation* 1998; 97:363-368
- Iiyama K, Nagano M, Yo Y et al ((1996): Impaired endothelial function with essential hypertension assessed by ultrasonography. *Am Heart* 1996; 132:779-782

- Jacobsen DW (2000): Hyperhomocysteinemia and oxidative stress- Time for a Reality Check? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20:1182-1184
- Jacobsen SH, Egberg N, Hylander B, Lundahl J (2002): Correlation between soluble markers of endothelial dysfunction in patients with renal failure. *Am J Nephrol* 2002; 22:42-47
- Järvisalo MJ, Rönnemaa T, Volanen I, Kaitsosaari T, Kallio K, Hartiala JJ, Irjala K, Viikari JSA, Simell O, Raitakari OT (2002): Brachial artery dilatation responses in healthy children and adolescents. *Am J Physiology Heart* 2002; 282:87-92
- Järvisalo MJ, Lehtimäki T, Raitakari OT (2004): Determinants of Arterial nitrate-mediated dilatation in children: role of oxidised low-density lipoprotein, endothelial function, and carotid intima-media thickness. *Circulation* 2004; 109:2885-2889
- Johannides R, Haefeli WE, Linder L et al (1995): Nitric oxid is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral arteries in vivo. *Circulation* 1995; 91:1314-1319
- Kalantar-Zadeh K, Stenvinkel P, Pilon L, Kopple JD (2003): Inflammation and nutrition in renal insufficiency. *Adv Ren Replace Ther.* 2003; 10(3):155-169
- Kari JA, Donald AE, Vallance DT, Bruckdorfer KR, Leone A, Mullen MJ, Brunce T, Dorado B, Deanfield JE, Rees L (1997): Physiology and biochemistry of endothelial function in children with chronic renal failure. *Kidney International* 1997; 52: 468-472
- Laursen JB, Mulsch A, Boesgaard S, Mordvintcev P, Trautner S, Gruhn N, Nielsen-Kudsk, Busse R, Aldershvile J (1996): In vivo nitrate tolerance is not associated with reduced bioconversion of nitroglycerin to nitric oxide. *Circulation* 1996; 94:2241-2247
- Laursen JB, Mulsch A, Boesgaard S, Enghusen H, Aldersville J, Aldersville P (1996): Nitrate tolerance impairs nitric oxide-mediated vasodilatation in vivo. *Cardiovascular Res* 1996; 31(5):814-819
- Leeson CPM, Whincup PH, Cokk DG, Donald AE, Papacosta O, Lucas A, Deanfield JE (1997): Flow-Mediated Dilatation in 9- to 11-Year-Old Children. The influence of Intrauterine and Childhood Factors. *Circulation* 1997; 96; 2233-2238
- Leeson P, Thorne S, Donald A, Mullen M, Clarkson P, Deanfield J (1997): Non-invasive measurement of endothelial function: effect on brachial artery dilatation of graded endothelial dependent and independent stimuli. *Heart* 1997; 78:22-27
- Lentze, Schaub, Schulte, Spranger (Hrsg.): *Pädiatrie – Grundlagen und Praxis.* Springer 2001
- Lim SL, Lee EJ, Myint CC, Ong KT, Tay ME, Yusuf N, Ong CN (2001): Oral intake and serum levels of ascorbic acid in continous ambulatory peritoneal dialysis patients. *Adv Perit Dial* 2001; 17:215-218
- Löffler G, Pertrides PE (1998): *Biochemie und Pathobiochemie.* 6. Auflage. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York
- Ludmer PL, Selwyn AP, Shood TL et al (1986): Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 1986; 315:1046-1051
- Lum H, Roebuck KA (2001): Oxidant Stress and endothelial cell dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001; 280: C719-741
- Mahle WT, Todd K, Fyfe DA (2003): Endothelial function following the Fontan operation. *Am J Coll Cardiol* 2003; 91:1286-1288
- Malyszko J, Malyszko JS, Mysliwiec M (2005): Is there a link between CD146, a novel adhesion molecule and other markers of endothelial dysfunction in nephrotic syndrome and continous ambulatory peritoneal dialysis? *Throm Res* 2005; 115:19-24

- Malgorzewicz S, Lichodziejewska-Niemierko M, Rutkowski B, Lysiak-Slydlowska W (2004): Nutritional status and oxidative processes in diabetic and nondiabetic peritoneal dialysis patients. *J Ren Nutr.* 2004; 14(4):242-247
- Miyazaki H, Matsuoka H, Itabe H, Usui M, Ueda S, Okuda S, Imaizumi T (2000): Hemodialysis Impairs Endothelial Function via Oxidative Stress – Effects of Vitamin E-coated Dialyzer. *Circulation* 2000; 101:1002-1006
- May JM (2000): How does ascorbic acid prevent endothelial dysfunction? *Free Rad Biol Med* (2000); 28: 1421-1429
- Moeslinger T, Friedl R, Volf I, Brunner M, Baran H, Koller E, Spiekermann PG (1999): Urea induces macrophage proliferation by inhibition of inducible nitric oxide synthesis. *Kidney Int* 1999; 56:581-588
- Mülsch A, Oelze M, Klöss S, Mollnau H, Töpfer A, Smolenski A, Walter U, Stasch JP, Warnholtz A, Hinz U, Meinertz T, Münzel T (2001): Effects of in vivo nitroglycerin treatment on activity and expression of the guanylyl cyclase and cGMP-dependent protein kinase and their downstream target vasodilator-stimulated phosphoprotein in aorta. *Circulation* 2001; 103:2188-
- Mugge A (1994): Abnorme Endothel-vermittelte Regulation des Gefäßtonus bei Arteriosklerose. *Z Kardiol.* 1994; 83(10): 759-767
- Mugge A (1998): The role of reactive oxygen species in atherosclerosis. *Z Kardiol.* 1998; 87(11): 851-64
- Münzel T, Sayegh H, Freeman BA, Tarpey MM, Harrision DG (1995): Evidence for enhanced vascular superoxide anion production in nitrate tolerance. *J Clin Invest* 1995; 95:187-194
- Nguyen-Khao T, Massy ZA, Witko-Sarst V, Thevenin M, Touam M, Lambrey G, Lacour B, Druke TB, Descamps-Latscha B (1999): Critical evaluation of plasma and LDL oxidant-trapping potential in hemodialysis patients. *Kidney Int* 1999; 56:747-753
- Nicolas RT, Hills C, Moller JH, Huddleston CB, Johnson MC (2005): Early outcome after Glenn shunt and Fontan palliation and the impact of operation during viral respiratory season: analysis of a 19-year multi-institutional experience. *Ann Thorac Surg* 2004; 79:613-617
- Omaye ST, Turnbull JD, Sauberlich HE (1979): Selected Methods for the Determination of Ascorbic Acid in Animal Cells, Tissues and Fluids. *Methods Enzymol.* (1979); 62: 3-11
- Ozden M, Maral H, Akaydin D, Cetinalp P, Kalender B (2002): Erythrocyte glutathione peroxidase activity, plasma malondialdehyde and erythrocyte glutathione levels in hemodialysis and CAPD patients. *Clin Biochem.* 2002; 35(4):269-273
- Peuchant E, Carbonneau MA, Dubourg L, Thomas MJ, Perromat A, Clerc M (1994): Lipoperoxidation in plasma and red blood cells of patients undergoing haemodialysis: vitamins A, E, and iron status. *Free Rad Biol Med* 16, 339-346
- Prichard SS (2003): Impact of dyslipidemia in end-stage renal disease. *J AM Soc Nephrol* 2003; 14:315-320
- Raitakari OT, Celermajer DS (2000): Testing for endothelial function. *Ann Med* 2000; 32:293-304
- Salonen JT, Yla-Herttuala S, Yamamoto R, Butler S, Korpela H, Salonen R, Nyyssönen K, Palinski W, Witzt JL (1992): Autoantibody against oxidised LDL and progression of carotid atherosclerosis. *Lancet* 1992; 339: 883-887
- Samouilidou E, Grapsa E (2003): Effect of dialysis on plasma total antioxidant capacity and lipid peroxidation products in patients with end-stage renal failure. *Blood Purif* 2003; 21:209-212
- Schnackenberg CG (2002): Physiological and pathophysiological roles of oxygen radicals in the renal microvasculature. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2002; 282(2): 335-342

- Slyper AH (2004): What vascular ultrasound testing has revealed about pediatric atherogenesis, and a potential clinical role for ultrasound in pediatric risk assessment. *J Clin Endocrinol Metabol* 2004; 89:3089-3095
- Sorensen KE, Celermajer DS, Spiegelhalter DJ, Georgakopoulos D, Robinson J, Thomas O, Deanfield JE (1995): Non-invasive measurement of human endothelium dependant arterial responses: accuracy and reproducibility. *Br Heart J*. 1995; 74(3): 247-253
- Stanger O, Semmelrock HJ, Wonisch W, Bös U, Pabst E, Wascher TC (2002): Effects of folate treatment and homocysteine lowering on resistance vessel reactivity in atherosclerotic subjects. *Journal of Pharmaceutical and Experimental Therapeutics* 2002; 303:158-162
- Stary HC, Chandler B, Glagov S, Guyton JR, Insull W, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW (1994): A Definition of Initial, Fatty Streak, and Intermediate Lesions in Atherosclerosis. *Circulation* 1994; 89:2462-2478
- Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE (1995): A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Atherosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 1995; 92: 1355-74
- Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, KhooJC, Witztum JL (1989): Beyond cholesterol: Modifications of low density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989; 320: 915-924
- Stenvinkel P, Heimbürger O, Paultre F, Diczfalusy U, Wang T, Berglund L, Jogestrand T (1999): Strong association between malnutrition, inflammation, and atherosclerosis in chronic renal failure. *Kidney Int* 1999; 55(5): 1523-1755
- Stryer L (1995): *Biochemie*. 4. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg-Berlin-Oxford
- Suliman ME, Barany P, Kalantar-Zadeh K, Lindholm B, Stenvinkel P (2005): Homocystein in uremia- a puzzling and conflicting story. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20:16-21
- Taccone-Gallucci M, Lubrano R, Bandino D, Citti G, Attard-Barbini D, Mazzarella V, Elli M, Meloni C, Morosetti M, Tozzo C, Antonini R, Urbinati G, Giardini O, Casciani CU (1988): Discrepancies between serum and erythrocyte concentrations of vitamin E in hemodialysis patients: role of HDL-bound fraction of vitamin E. *Artificial Organs* 1988; 12(5): 379-381
- Thambyrajah J, Landray MJ, McGlynn FJ, Jones HJ, Wheeler DC, Twonend JN (2000): Does folic acid decrease homocystein and improve endothelial function in patients with predialysis renal failure? *Circulation* 2000; 102: 871-875
- Usberti M, Geradi GM, Gazzotti RM, Benedini S, Archetti S, Sugherini L, Vaentini M, Tira P, Bufano G, Albertini A, Di Lorenzo D (2002): Oxidative stress and cardiovascular disease in dialyzed patients. *Nephron* 2002; 91:25-33
- van den Bosch AE, Ross-Hesselink JW, Van Domburg R, Bogers AJ, Simoons ML, Meijboom FJ (2004): Long-term outcome and quality of life in adult patients after the Fontan operation. *Am J Cardiol* 2004; 93:1141-1145
- van Guldener C, Janssen MJFM, Lambert J, Steyn M, Donker AJM, Stehouwer CDA (1998): Endothelium-dependent vasodilatation is impaired in peritoneal dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13:1782-1786
- Vapaatalo H, Mervaala E (2001): Clinically important factors influencing endothelial dysfunction. *Med Sci Monit*. 2001; 7(5): 1075-1085
- Warnholtz A, Wendt M, August M, Münzel T (2004): Clinical aspects of reactive oxygen species and nitrogen species. *Biochem Soc Symp* 2004; 71:121-133

Wayner DDM, Burton GW, Ingold KU, Barclay LRC, Locke SJ (1987): The relative contributions of vitamin E, ascorbate and proteins to the total peroxy radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochimica et Biophysica Acta* (1987); 924: 408-419

Wheeler DC (1996): Cardiovascular disease in patients with chronic renal failure. *Lancet* 1996; 348: 1673-1674

Winterbourne C, Buss H (1999): Protein Carbonyl Measurement by Enzyme-linked Immunosorbent Assay. *Methods Enzymol.* 1999; 300: 106-111

Woo KS, Chook P, Lolin YI, Cheung AS, Chan LT, Sun YY, Sanderson JE, Metrewli C, Celermajer DS (1997): Hyperhomocyst(e)inemia is a risk factor for arterial endothelial dysfunction in humans. *Circulation* 1997; 96(8): 2542-2544

Yamamoto Y, Niki E, Kamiya Y, Miki M, Tamai H, Mino M (1986): Free radical chain oxidation and hemolysis of erythrocytes by molecular oxygen and their inhibition by vitamin E. *J Nutr Sci Vitaminol* (1986); 32: 475-479

Zarling EJ, Gottlieb K (1994): Nutrition aspects of continuous ambulatory peritoneal dialysis. A review. *Journal of American College of Nutrition*; 13, 133-138

Patient Nr.	Gruppen-code	Geschlecht 1=w; 2=m	Alter [Jahre]	Gewicht [z-score]	Gewicht [kg]	Größe [z-score]	Größe [cm]	BMI [kg/m ²]	RR sys [mmHg]	RR dia [mmHg]
151	1	1	13,1	1,1	55	1,5	168	19,5	109	59
154	1	1	12,4	1,2	52	1,5	165	19,12	115	64
155	1	1	9,3	1,3	37	0,4	141	18,59	104	50
159	1	1	15,4	0	54	-0,3	164	20,07	108	57
173	1	1	10,4	1,2	41	0	145	19,52	105	65
184	1	1	13,1	0,3	50	1,1	166	18,12	118	67
190	1	1	12,5	-1,2	36	-1,6	146	16,9	97	51
129	1	2	12,2							
152	1	2	15,7							
164	1	2	13,7	-0,1	49	-0,4	159	19,37	106	54
165	1	2	11,5	0,2	40	0,1	150	17,78	120	63
167	1	2	9,5	0,2	31	-1,3	132	17,82	121	63
169	1	2	15,9	3,7	90	2,1	190	24,98	131	59
116	2	1	14,5	1,5	64	-0,3	162	24,4	124	61
104	2	2	11,1							
117	2	2	14,9							
150	2	2	14,7							
140	2	2	11,4	0,3	39	0,5	152	16,88	113	71
119	2	2	13,2	1,8	63	1,6	172	21,3	132	72
120	2	2	16,9	0,3	66	0	178	20,8	126	78
118	2	2	18,5	-0,2	64	1	186	19,7	116	55
158	3	1	13,2	-2,6	28	-4,7	130	16,57	110	60
161	3	1	17,4	-1,4	50	-0,7	164	18,59	111	69
171	3	1	15	0,1	54	-0,5	162	20,61	99	68
125	3	1	12,9	2,4	64	0,9	164	17,1	137	111
100	3	1	12,1	-1,5	32	-2	141	16,1	86	64
110	3	2	29,3							
121	3	2	30,6							
146	3	2	9	-0,7	26	-1,2	130	15,38	97	56
160	3	2	8,8	0,2	29	0	135	15,93	102	65
157	3	2	16,7	-2,3	48	-1,7	167	17,2	94	56
115	3	2	13,8	-1,8	37	-0,5	160	14,5	116	68
107	3	2	15,1	-0,2	66	0	171	22,6	121	81
148	4	1	13,6	0,2	51	0,8	166	18,48	105	65
153	4	1	9	-2,4	20	-2,2	123	13,25	101	47
163	4	1	12,1	0,3	44	0,7	158	17,89	99	49
109	4	1	17,3	2,2	76	0,2	169	26,6	131	62
106	4	1	19,5							
108	4	2	20,4							
149	4	2	8,7	-0,2	27	-0,8	130	15,98	104	53
141	4	2	19,8	0,8	72	-1,1	174	23,76	117	65
133	4	2	16,5	1,2	72	0,4	179	22,3	130	72
134	4	2	17,6	0,2	66	0,1	180	20,4	116	64
137	4	2	10,9	-1,2	30	-1	140	15,31	115	73
138	4	2	13,4	-1,6	37	-1,4	150	16,44	96	44

Gruppen-code: 1 = Kontrollen, 2 = Ventrikelseptumdefekt, 3 = Transposition der großen Arterien, 4 = Fallot'sche Tetralogie, 5 = Fontan-Operation, 6 = Chronische Niereninsuffizienz, 7 = Peritonealdialyse

Patient Nr.	Gruppen-code	Geschlecht 1=w; 2=m	Alter [Jahre]	Gewicht [z-score]	Gewicht [kg]	Größe [z-score]	Größe [cm]	BMI [kg/m ²]	RR sys [mmHg]	RR dia [mmHg]
142	4	2	18,6	1,3	76	1	186	21,97	117	57
144	4	2	9,6	-1,5	25	-1,6	130	14,79	108	66
166	4	2	12,8	1,1	54	2	172	18,24	134	47
126	4	2	11,2	0,6	40	1,1	154	16,9		
103	4	2	15,8	0,8	67	0,5	171	22,9	113	84
111	4	2	9,3	1	35	1,5	146	16,4	114	52
135	5	1	11,8	-1	34	-0,2	152	14,72	92	61
136	5	1	14,9	-1,4	44,5	-1,1	158	18,0	91	65
170	5	1	11,8	-1,3	32	-1,6	143	15,65	121	78
172	5	1	10,4	-0,8	30	-0,4	143	14,71	122	56
174	5	1	11,2	-1,5	29	-2,8	131	16,86	93	50
131	5	1	9							
132	5	2	9,4	-2,3	22	-2,2	126	13,84	117	59
139	5	2	15,5	1,1	68	-2,3	166	24,64	117	70
143	5	2	17,4	-0,7	60	-0,7	175	19,61	120	65
145	5	2	9,5	-0,5	28	-1,4	131	16,28	98	74
147	5	2	11,7	0,5	42	-1,5	140	21,43	111	73
156	5	2	9,5	-2	23	-1,9	128	14,02	98	50
162	5	1	10,9	1,7	41	0	148	18,72	112	58
175	6	1	15,3	2,2	72,2	0,5	168	25,58	110	68
176	6	1	7,8	2	33,9	0,8	133	19,16	122	62
177	6	2	4,8	-1,9	15,2	-0,6	108	13,03	104	70
178	6	2	15,7	0,8	67	0,9	181	20,45	155	76
179	6	2	11,6	-0,7	34,9	1,3	142	17,31	122	70
180	6	2	8,3	0,4	28,6	-0,8	128	17,46	101	56
181	6	2	8,5	0,3	28,5	-0,9	128	17,4	103	60
182	6	2	17,6	-2,7	45,4	-3,2	161	17,51	111	76
183	6	2	16,2	1,8	76,4	1,2	184	22,57	124	66
189	6	1	7,6	-0,2	24,2	-3,7	107	21,14	109	61
194	6	1	8	-0,9	22,6	-0,7	126	14,24	99	56
198	6	2	11,4							
185	7	2	17,3	-2,2	49,7	-1,7	169	17,4	122	63
186	7	2	6,2							
191	7	2	8,5							
192	7	1	18,6							
193	7	1	11,9							
195	7	2	12,9							
196	7	2	19,3							
197	7	2	8,9							
200	7	2	4,5							
201	7	2	2,9							
202	7	2	13							

Gruppencode: 1 = Kontrollen, 2 = Ventrikelseptumdefekt, 3 = Transposition der großen Arterien, 4 = Fallot'sche Tetralogie, 5 = Fontan-Operation, 6 = Chronische Niereninsuffizienz, 7 = Peritonealdialyse

Patient Nr.	Gruppen-code	Gefäß-durchmesser [mm]	Ruhe 1 [%]	Endothelabhängige Dilatation (EAD) [%]	Ruhe 2 [%]	Nicht-endothel-abhängige Dilatation (NEAD) [%]	Intima-Media-Dicke [mm]
151	1	8,35	0	7,19	0,72	17,46	0,48
154	1	5,58	0	3,23	-0,18	8,78	0,43
155	1	5,74	0	12,54	0	24,57	0,38
159	1	5,69	0	15,99	1,41	21,88	0,38
173	1	4,83	0	10,97	-0,21	16,98	0,43
184	1	3,8	0	7,63	-1,32	34,74	0,3
190	1	5,81	0	6,37	-0,7	18,42	0,38
129	1						
152	1						
164	1	3,58	0	8,66	-0,84	24,02	0,38
165	1	6,51	0	11,83	0,79	16,44	0,48
167	1	2,65	0	10,94	0,75	20,75	0,38
169	1	3,72	0	1,34	0,54	12,37	0,48
116	2	3,98	0	11,19	-0,02	22,87	0,39
104	2						
117	2						
150	2						
140	2	2,5	0	4,8	0,8	22,8	0,43
119	2	5,22	0	6,64	0,39	19,98	0,3
120	2	5,44	0	4,72	0,45	5,46	0,39
118	2	4,25	0	3,463	-0,25	24,28	0,39
158	3	3,49	0	4,58	0,52	33,47	0,38
161	3	2,55	0	9,41	-0,39	34,9	0,38
171	3	3,01	0	8,31	1,33	32,23	0,43
125	3	2,857	0	11	1,2	35,07	0,48
100	3	5,368	0	3,76	0,2	6,06	0,48
110	3						
121	3						
146	3	2,88	0	6,94	0,35	28,13	0,38
160	3	3,06	0	-1,63	-2,6	24,2	0,38
157	3	3,75	0	6,13	1,07	29,87	0,43
115	3	3,947	0	2,25	2	8,65	0,43
107	3	5,48	0	6,6	1,5	8,33	0,48
148	4	4,47	0	9,62	0,67	29,31	0,38
153	4	4,72	0	12,92	-1,91	14,59	0,38
163	4	2,26	0	16,81	1,77	28,76	0,48
109	4	7,275	0	3,71	0,15	9,53	0,38
106	4						
108	4						
149	4	4,03	0	-0,74	0	17,37	0,43
141	4	6,72	0	1,49	-0,45	9,37	0,48
133	4	3,02	0	8,28	0	15,23	0,53
134	4	5,87	0	1,53	0,34	16,7	0,49
137	4	2,2	0	10	1,36	33,18	0,39
138	4	4,37	0	5,29	0,46	19,91	0,38

Gruppencode: 1 = Kontrollen, 2 = Ventrikelseptumdefekt, 3 = Transposition der großen Arterien, 4 = Fallot'sche Tetralogie, 5 = Fontan-Operation, 6 = Chronische Niereninsuffizienz, 7 = Peritonealdialyse

Patient Nr.	Gruppen-code	Gefäß-durchmesser [mm]	Ruhe 1 [%]	Endothelabhängige Dilatation (EAD) [%]	Ruhe 2 [%]	Nicht-endothel-abhängige Dilatation (NEAD) [%]	Intima-Media-Dicke [mm]
142	4	5,99	0	18,36	0,5	19,52	0,48
144	4	3,89	0	6,68	0	20,57	0,43
166	4	4,22	0	4,5	-0,71	20,62	0,53
126	4	3,239	0	6,02	0,09	23,49	0,3
103	4	4,61	0	10,26	0,5	11,29	0,48
111	4	3,53	0	13,32	0,5	14,05	0,38
135	5	3,12	0	3,85	0,96	31,73	0,39
136	5	2,63	0	1,9	-0,38	38,02	0,53
170	5	3,69	0	5,42	-0,54	10,57	0,39
172	5	3	0	2,67	-1,33	11,33	0,38
174	5	3,81	0	1,05	0	28,1	0,43
131	5						
132	5	3,63	0	4,41	0	27	0,43
139	5	4,37	0	7,32	0,46	18,31	0,48
143	5	5,03	0	9,34	-0,8	16,5	0,48
145	5	3,09	0	14,56	0,97	38,83	0,38
147	5	3,03	0	16,17	0,99	27,72	0,38
156	5	4,13	0	4,12	-0,48	23,25	0,43
162	5	2,56	0	4,69	0,39	24,61	0,43
175	6	4,96	0	10,69	2,47	8,87	0,35
176	6	8,02	0	5,86	-0,13	7,61	0,38
177	6						
178	6	9,57	0	7,21	1,3	16,9	0,48
179	6	4,68	0	6,83	0,42	31,84	0,49
180	6	2,74	0	12,41	1,1	24,11	0,34
181	6	5,54	0	21,8	1,99	28,88	0,45
182	6	4,42	0	6,56	-0,91	9,73	0,48
183	6	6,29	0	1,11	0,16	8,74	0,48
189	6	5,77	0	8,84	-1,21	36,22	0,35
194	6	7,13	0	1,7	-1,12	17,25	0,36
198	6						
185	7	7,49	0	0,93	-0,4	1	0,42
186	7						
191	7						
192	7						
193	7						
195	7						
196	7						
197	7						
200	7						
201	7						
202	7						

Gruppencode: 1 = Kontrollen, 2 = Ventrikelseptumdefekt, 3 = Transposition der großen Arterien, 4 = Fallot'sche Tetralogie, 5 = Fontan-Operation, 6 = Chronische Niereninsuffizienz, 7 = Peritonealdialyse

Patient Nr.	Gruppen-code	MDA [μmol/L]	MDA/Lipid [μmol/μg TNL]	Carbonylgruppen [nmol/mg Protein]	Protein [mg/mL]	Radikalresistenz der Erythrozyten [min]	α-Tocopherol [μmol/L]	α-Tocopherol/Lipid [μmol/μg TNL]
151	1	0,38	0,21	0,118	93,44	122	17,4	9,61
154	1	0,28	0,11	0,121	73,18	114	18,8	7,34
155	1	0,38	0,12	0,081	75,2	92	21,3	6,89
159	1	0,47	0,21	0,18	77,38	115	21,3	9,68
173	1	0,36	0,11	0,11	81,68	76	27,3	8,05
184	1	0,43	0,16	0,166		94	16,5	5,98
190	1	0,34	0,10	0,136		82	19,2	5,82
129	1	0,36	0,08	0,125		105	28,9	6,22
152	1	0,3	0,19	0,11		118	18,5	11,64
164	1	0,21	0,09	0,129	72,22	88	17,8	7,77
165	1	0,69	0,39	0,07	76,6	95	15,4	8,70
167	1	0,51	0,24	0,154	77,64	101	30,4	14,07
169	1	0,51	0,12	0,114	80,46	81	29,5	6,88
116	2	0,33	0,15	0,14	77,85	99	20	8,89
104	2	0,67	0,14	0,14		69	31,3	6,73
117	2	0,18	0,08	0,095		109	18,1	8,19
150	2	0,31	0,24	0,154		93	12,4	9,47
140	2	0,23	0,11	0,044	81,1	121	19,4	9,19
119	2	0,25	0,12	0,14	76,77	115	15,8	7,67
120	2	0,43	0,20	0,121	82,95	119	19,3	9,06
118	2	0,29	0,14	0,14	81,79	100	17,3	8,24
158	3	0,3	0,15	0,121	72,22	103	23,4	11,82
161	3	0,28	0,11	0,132	76,34	100	19,8	7,44
171	3	0,58	0,31	0,077	89,22	91	25,2	13,33
125	3	0,28	0,09	0,114	74,31	94	16,9	5,38
100	3	0,48	0,22	0,203	75,15	96	19,2	8,97
110	3	0,48	0,14	0,169		115	25,2	7,50
121	3	0,4	0,12	0,169		93	23	6,93
146	3	0,28	0,19	0,129	73,88	89	18,2	12,30
160	3	0,38	0,18	0,121	79,4	124	23,8	11,50
157	3	0,39	0,18	0,055	76,78	105	19,8	9,34
115	3	0,31	0,11	0,099	84,26	122	26,5	9,57
107	3	0,53	0,24	0,092	67,75	91	12,3	5,47
148	4	0,33	0,15	0,106	98,62	85	22,4	10,18
153	4	0,67	0,30	0,121	70,54	113	23,3	10,40
163	4	0,37	0,19	0,077	86,08	92	13,4	6,87
109	4	0,6	0,27	0,099	79,78	110	2,7	1,19
106	4	0,48	0,17	0,081		71	17,4	6,04
108	4	0,44	0,17	0,095		101	20,6	7,86
149	4	0,37	0,17	0,118	82,38	76	18,2	8,35
141	4	0,23	0,12	0,084	76,31	118	12,2	6,13
133	4	0,53	0,28	0,103	74,38	107	12,9	6,75
134	4	0,37	0,15	0,121	70,52	114	13,4	5,28
137	4	0,45	0,19	0,125	78,7	100	23,6	9,79
138	4	0,33	0,16	0,088	79,55	104	13,7	6,78

Gruppencode: 1 = Kontrollen, 2 = Ventrikelseptumdefekt, 3 = Transposition der großen Arterien, 4 = Fallot'sche Tetralogie, 5 = Fontan-Operation, 6 = Chronische Niereninsuffizienz, 7 = Peritonealdialyse

Patient Nr.	Gruppen-code	MDA [$\mu\text{mol/L}$]	MDA/Lipid [$\mu\text{mol}/\mu\text{g TNL}$]	Carbonylgruppen [nmol/mg Protein]	Protein [mg/mL]	Radikalresistenz der Erythrozyten [min]	α -Tocopherol [$\mu\text{mol/L}$]	α -Tocopherol/Lipid [$\mu\text{mol}/\mu\text{g TNL}$]
142	4	0,32	0,19	0,151	76,5	121	15,1	8,93
144	4	0,28	0,13	0,151	69,58	102	19,9	9,13
166	4	0,46	0,21	0,154	80,46	88	13,9	6,29
126	4	0,3	0,08	0,162	82,87	101	22,8	6,16
103	4	0,36	0,12	0,162	81,71	99	19,6	6,34
111	4	0,11	0,05	0,173	75,93	54	17,2	7,75
135	5	0,39	0,26	0,143	72,61	115	13,4	8,93
136	5	0,53	0,24	0,095	75,15	102	19,9	9,05
170	5	0,61	0,35	0,092	77,12	79	18,4	10,64
172	5	0,45	0,27	0,121	85,02	80	27,2	16,48
174	5	0,42	0,20	0,129	63,24	106	25,8	12,29
131	5	0,33	0,17	0,095		103	16,8	8,48
132	5	0,43	0,27	0,084	68,52	110	13,8	8,52
139	5	0,23	0,11	0,084	74,31	101	15,6	7,36
143	5	0,32	0,16	0,143	92,64	124	19,9	9,71
145	5	0,35	0,15	0,129	72,82	119	29,1	12,54
147	5	0,53	0,25	0,147	74,66	96	15	7,18
156	5	0,41	0,29	0,129	60	109	15,3	10,77
162	5	0,36	0,14	0,11	80,2	87	20	7,72
175	6	0,3	0,07	0,18		89	32,1	7,02
176	6	0,53	0,19	0,173		48	21,2	7,71
177	6	0,5	0,18	0,136		83	18,2	6,69
178	6	0,62	0,20	0,143		98	28,9	9,51
179	6	0,33	0,08	0,099		92	19,7	5,06
180	6	0,45	0,15	0,158		85	25	8,39
181	6	0,74	0,20	0,106		84	27,5	7,26
182	6	0,33	0,12	0,099		79	22,5	7,89
183	6	0,3	0,08	0,136		79	34,2	8,61
189	6	0,28	0,09	0,092		78	19,9	6,28
194	6	0,25	0,10	0,129		80	20,4	7,82
198	6	0,26	0,07	0,188		96	26,7	7,69
185	7	0,77	0,13	0,243		57	46,7	7,69
186	7	2,15	0,46	0,343		80	33,1	7,06
191	7	0,5	0,11	0,173		86	30,5	6,62
192	7	1,03	0,23	0,14		70	23,7	5,30
193	7	0,85	0,28	0,236		76	25,9	8,52
195	7	0,43	0,11	0,14		81	18,5	4,66
196	7	0,64	0,32	0,247		81	17,5	8,75
197	7	0,79	0,26	0,154		72	5,6	1,87
200	7	1,06	0,17	0,188		119	42,9	6,85
201	7	0,85	0,28	0,151		104	23,6	7,71
202	7	0,77	0,35	0,103		97	16,2	7,36

Gruppencode: 1 = Kontrollen, 2 = Ventrikelseptumdefekt, 3 = Transposition der großen Arterien, 4 = Fallot'sche Tetralogie, 5 = Fontan-Operation, 6 = Chronische Niereninsuffizienz, 7 = Peritonealdialyse

Patient Nr.	Gruppen-code	γ -Tocopherol [$\mu\text{mol/L}$]	γ -Tocopherol/Lipid [$\mu\text{mol}/\mu\text{g TNL}$]	Gesamt Q_{10} [$\mu\text{mol/L}$]	Gesamt Q_{10} /Lipid [$\mu\text{mol}/\mu\text{g TNL}$]	Q_{10} reduziert [%]	SH-Gruppen [$\mu\text{mol/L}$]	Harnsäure [mg/dL]	Vitamin C [mg/dL]
151	1	4,48	2,48	0,78	0,43	97	558	3,8	21
154	1	1,83	0,71	0,32	0,13	96	533	2,1	25
155	1	18,1	5,86	0,72	0,23	96	563	3,6	42
159	1	2,32	1,05	0,81	0,37	98	525	4,1	122
173	1	2,52	0,74	1,76	0,52	99	447	4,6	106
184	1	1,34	0,49	0,71	0,26	89	459	3,5	27
190	1	2,01	0,61	2	0,61	94	459	4,2	29
129	1	5,28	1,14	0,89	0,19	98	594	4,9	0
152	1	2,73	1,72	1,11	0,70	100	533	5,5	52
164	1	2,29	1,00	0,9	0,39	98	528	5,1	27
165	1	2,27	1,28	0,43	0,24	97	533	3,1	89
167	1	1,4	0,65	1	0,46	99	543	3,2	60
169	1	1,8	0,42	1,22	0,28	96	542	8,5	71
116	2	3,09	1,37	0,56	0,25	98	555	7,4	1
104	2	4,83	1,04	0,58	0,12	96	552	4,9	11
117	2	3,37	1,52	0,5	0,23	97	639	6,4	29
150	2	2,87	2,19	0,36	0,27	96	522	5,5	40
140	2	1,87	0,89	0,91	0,43	97	554	3,3	25
119	2	1,64	0,80	0,5	0,24	96	611	5,8	19
120	2	2,71	1,27	0,54	0,25	97	494	6,6	17
118	2	1,23	0,59	0,71	0,34	97	591	5,2	100
158	3	2,01	1,02	1,16	0,59	98	516	4,5	19
161	3	4,02	1,51	1,1	0,41	99	473	4,8	52
171	3	1,78	0,94	0,88	0,47	97	447	4,8	92
125	3	3,89	1,24	0,7	0,22	97	554	6,8	33
100	3	7,06	3,30	1,09	0,51	98	479	4,3	
110	3	3,7	1,10	1,1	0,33	96	597	10,1	0
121	3	2,93	0,88	1,59	0,48	97	549	4,7	17
146	3	4,64	3,14	0,71	0,48	97	731	4,7	69
160	3	1,6	0,77	0,95	0,46	98	501	3,5	56
157	3	2,02	0,95	0,89	0,42	97	560	7,2	32
115	3	2,04	0,74	0,67	0,24	97	582	5,6	20
107	3	1,84	0,82	0,53	0,24	96	548	7,8	20
148	4	1,57	0,71	0,76	0,35	96	520	5,3	29
153	4	4,41	1,97	1,15	0,51	95	534	3,8	46
163	4	2,14	1,10	1,04	0,53	99	476	4,7	46
109	4	0,33	0,15	0,58	0,26	96	753	5,3	4
106	4	2,56	0,89	0,5	0,17	96	540	4,7	15
108	4	3,57	1,36	0,89	0,34	93	647	5,4	0
149	4	4,8	2,20	1,55	0,71	96	560	4,3	0
141	4	3,99	2,01	1,11	0,56	98	546	6,7	29
133	4	3,37	1,76	0,94	0,49	97	581	6,6	67
134	4	3,26	1,28	2	0,79	99	516	5,6	60
137	4	1,85	0,77	1,47	0,61	98	527	3,9	30
138	4	1,85	0,92	0,68	0,34	96	524	4,7	46

Gruppencode: 1 = Kontrollen, 2 = Ventrikelseptumdefekt, 3 = Transposition der großen Arterien, 4 = Fallot'sche Tetralogie, 5 = Fontan-Operation, 6 = Chronische Niereninsuffizienz, 7 = Peritonealdialyse

Patient Nr.	Gruppen-code	γ -Tocopherol [μmol/L]	γ -Tocopherol/Lipid [μmol/μg TNL]	Gesamt Q ₁₀ [μmol/L]	Gesamt Q ₁₀ /Lipid [μmol/μg TNL]	Q ₁₀ reduziert [%]	SH-Gruppen [μmol/L]	Harnsäure [mg/dL]	Vitamin C [mg/dL]
142	4	2,26	1,34	1,14	0,67	97	554	5,9	21
144	4	3,92	1,80	1,11	0,51	96	522	3,7	65
166	4	6,3	2,85	1,06	0,48	98	545	5,7	27
126	4	3,78	1,02	0,88	0,24	94	564	6,1	67
103	4	2,23	0,72	0,46	0,15	94	648	6,3	26
111	4	4,43	2,00	0,45	0,20	95	518	4,3	2
135	5	1,63	1,09	2,05	1,37	99	500	3,7	81
136	5	1,73	0,79	1,15	0,52	97	521	7,2	60
170	5	2,24	1,29	0,86	0,50	95	551	4,4	13
172	5	2,68	1,62	0,5	0,30	96	465	4	61
174	5	1,63	0,78	1,03	0,49	95	377	4,6	112
131	5	2,67	1,35	1,01	0,51	96	567	4,7	32
132	5	2	1,23	1,46	0,90	97	528	6,4	79
139	5	2,84	1,34	0,73	0,34	96	536	8,2	0
143	5	1,07	0,52	1,84	0,90	98	509	6,5	46
145	5	2,5	1,08	0,76	0,33	98	516	5	100
147	5	3,64	1,74	0,84	0,40	95	542	4,6	15
156	5	4,98	3,51	0,87	0,61	99	507	3,3	91
162	5	2,93	1,13	1,05	0,41	98	537	4,8	108
175	6	2,66	0,58	1,63	0,36	92	423	10,6	38
176	6	4,17	1,52	1,53	0,56	90	465	6,7	63
177	6	2,29	0,84	0,9	0,33	83	488	6,4	46
178	6	4,44	1,46	1,93	0,63	94	440	10,5	27
179	6	1,9	0,49	2,1	0,54	96	387	6,6	63
180	6	2,28	0,77	0,94	0,32	89	408	5,6	44
181	6	2,34	0,62	0,6	0,16	84	414	8,6	46
182	6	4,04	1,42	1,17	0,41	91	347	9,4	70
183	6	4,66	1,17	1,16	0,29	95	329	10,5	27
189	6	1,93	0,61	1,34	0,42	93	486	7,2	27
194	6	3,11	1,19	1,77	0,68	92	338	6,4	98
198	6	-0,03	-0,01	1,22	0,35	90	351	9,5	75
185	7	2,96	0,49	1,9	0,31	93	227	5,9	27
186	7	2,58	0,55	0,87	0,19	89	315	6,6	31
191	7	2,48	0,54	1,6	0,35	92	390	8,1	27
192	7	2,91	0,65	0,9	0,20	90	368	3,2	27
193	7	2,82	0,93	1,14	0,38	92	329	4,6	27
195	7	1,35	0,34	0,86	0,22	90	366	6,3	38
196	7	1,43	0,72	1,18	0,59	89	291	6,1	60
197	7	2,76	0,92	1,09	0,36	91	240	6,8	156
200	7	-0,03	0,00	1,25	0,20	88	300	7,8	166
201	7	3,29	1,08	1,18	0,39	92	429	7,6	122
202	7	2,05	0,93	0,94	0,43	90	356	6,6	125

Gruppencode: 1 = Kontrollen, 2 = Ventrikelseptumdefekt, 3 = Transposition der großen Arterien, 4 = Fallot'sche Tetralogie, 5 = Fontan-Operation, 6 = Chronische Niereninsuffizienz, 7 = Peritonealdialyse

Patient Nr.	Gruppen-code	TRAP gemessen [µmol/L]	TRAP berechnet [µmol/L]	Homocystein [mg/dL]	Cholesterin [mg/dL]	Triglyzeride [mg/dL]	Totale neutrale Lipide (TNL) [µg/L]	OxLDLak [mU/mL]
151	1	567	549	5,4	134	47	1,81	2475
154	1	458	418	5,7	108	148	2,56	143
155	1	455	578	5,3	192	117	3,09	5205
159	1	723	740	7,8	157	63	2,2	494
173	1	558	738	5,8	220	119	3,39	1775
184	1	712	501	4,2	138	138	2,76	
190	1	808	564	6,6	219	111	3,3	
129	1	545	633	5,9	310	155	4,65	2889
152	1	645	727	6,7	120	39	1,59	668
164	1	909	650	3,2	115	114	2,29	627
165	1	738	598	1,3	141	36	1,77	952
167	1	673	590	3	146	70	2,16	779
169	1	912	1016	6,8	133	296	4,29	338
116	2	784	797	8,1	132	93	2,25	1906
104	2	1000	642	8,5	208	257	4,65	625
117	2	927	791	8,4	133	88	2,21	232
150	2	655	690	17,8	90	41	1,31	465
140	2	483	519	5,4	149	62	2,11	667
119	2	767	714	4,3	121	85	2,06	3811
120	2	591	741	10,1	154	59	2,13	674
118	2	687	632	5,8	140	70	2,1	958
158	3	580	597	4,6	149	49	1,98	55
161	3	721	655	7,5	157	109	2,66	960
171	3	777	726	7,3	107	82	1,89	447
125	3	707	799	6	132	182	3,14	2831
100	3	962	529	5,7	157	57	2,14	1355
110	3	1268	1029	18,6	225	111	3,36	591
121	3	1062	620	12,1	210	122	3,32	1270
146	3	735	758	5	114	34	1,48	1273
160	3	625	579	3,9	129	78	2,07	1305
157	3	758	836	8,9	162	50	2,12	758
115	3	818	712	5,2	152	125	2,77	819
107	3	919	843	9,2	150	75	2,25	513
148	4	511	676	8	170	50	2,2	1919
153	4	547	595	8,1	183	41	2,24	674
163	4	704	626	5,7	117	78	1,95	5354
109	4	824	671	8,9	150	76	2,26	4124
106	4	711	602	11,7	187	101	2,88	385
108	4	442	672	8,4	174	88	2,62	3688
149	4	522	554	9,9	150	68	2,18	232
141	4	854	772	8,8	123	76	1,99	5428
133	4	924	842	12,5	155	36	1,91	160
134	4	745	732	6,2	142	112	2,54	611
137	4	537	574	6	176	65	2,41	1117
138	4	665	642	7,2	116	86	2,02	4469

Gruppencode: 1 = Kontrollen, 2 = Ventrikelseptumdefekt, 3 = Transposition der großen Arterien, 4 = Fallot'sche Tetralogie, 5 = Fontan-Operation, 6 = Chronische Niereninsuffizienz, 7 = Peritonealdialyse

Patient Nr.	Gruppen-code	TRAP gemessen [$\mu\text{mol/L}$]	TRAP berechnet [$\mu\text{mol/L}$]	Homocystein [mg/dL]	Cholesterin [mg/dL]	Triglyzeride [mg/dL]	Totale neutrale Lipide (TNL) [$\mu\text{g/L}$]	OxLDLak [mU/mL]
142	4	873	705	13	110	59	1,69	1444
144	4	837	609	4,4	145	73	2,18	113
166	4	912	694	4,8	153	68	2,21	2357
126	4	868	817	7,8	183	187	3,7	1657
103	4	1013	785	12,9	168	141	3,09	2666
111	4	638	541	5,8	152	70	2,22	2889
135	5	577	616	5,1	109	41	1,5	3246
136	5	836	871	6,5	137	83	2,2	1699
170	5	585	581	10,7	142	31	1,73	1561
172	5	443	621	9,9	119	46	1,65	1447
174	5	658	722	4,3	176	34	2,1	1036
131	5	606	639	10,5	141	57	1,98	432
132	5	893	831	6,7	107	55	1,62	1557
139	5	1196	842	8,4	131	81	2,12	754
143	5	962	789	8,2	119	86	2,05	815
145	5	788	785	5	107	125	2,32	430
147	5	826	590	8,9	129	80	2,09	167
156	5	590	608	4,6	88	54	1,42	575
162	5	881	772	5,2	158	101	2,59	2700
175	6	1208	1088	13	275	182	4,57	
176	6	909	821	9,8	204	71	2,75	
177	6	747	771	6,9	199	73	2,72	
178	6	824	1061	16,5	159	145	3,04	
179	6	398	785	8,8	159	230	3,89	
180	6	756	693	12	153	145	2,98	
181	6	973	935	18,7	178	201	3,79	
182	6	1103	1006	24,6	191	94	2,85	
183	6	1314	1035	25	217	180	3,97	
189	6	808	803	3,4	179	138	3,17	
194	6	1072	814	26,6	162	99	2,61	
198	6	1105	1032	20,4	190	157	3,47	
185	7	924	671	19,8	333	274	6,07	
186	7	1157	733	8,7	200	269	4,69	
191	7	1221	862	8,3	218	243	4,61	
192	7	824	462	17,7	217	230	4,47	
193	7	859	562	5,6	180	124	3,04	
195	7	888	710	14,4	161	236	3,97	
196	7	872	705	15,2	127	73	2	
197	7	812	882	6,6	180	119	2,99	
200	7	1244	1070	11	236	390	6,26	
201	7	1204	984	6,6	163	143	3,06	
202	7	999	873	13	150	70	2,2	

Gruppen-code: 1 = Kontrollen, 2 = Ventrikelseptumdefekt, 3 = Transposition der großen Arterien, 4 = Fallot'sche Tetralogie, 5 = Fontan-Operation, 6 = Chronische Niereninsuffizienz, 7 = Peritonealdialyse

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. A. Kohlschütter für die fundierte wissenschaftliche Beratung und die jederzeit gewährte freundliche Unterstützung und konstruktive Kritik bedanken. Ganz besonders danke ich auch Dr. Barbara Finckh für die geduldige Beratung in inhaltlichen, organisatorischen und technischen Fragen sowie für die Unterstützung beim Erlernen der Methoden. Ich möchte mich zudem auch bei allen Mitarbeiterinnen des Stoffwechsellabors der Kinderklinik für Ihre Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der Methoden danken, insbesondere bei Fr. Jutta Giesecking, die viel Zeit für die Messungen zur Verfügung gestellt hat und immer ein offenes Ohr für Probleme hatte. Mein Dank gilt ebenso Fr. Dr. Theda Höchstetter für Durchführung der Endothelfunktionsmessungen sowie Dr. Christian Lilje für die Überlassung des Themas. Des weiteren danke ich Julia Kramer für Unterstützung beim Lektorieren des Manuskriptes. Mein ausdrücklicher Dank richtet sich an alle Probanden, die ihre Zeit und ihr Blut für diese Studie zur Verfügung gestellt haben.

Lebenslauf

Name: Nikki Janneke Rink
 Geburtsdatum: 30.06.1975
 Geburtsort: Düsseldorf
 Familienstand: ledig

1982-1986 Montessori Grundschule Düsseldorf
 1986-1989 Geschwister-Scholl-Gymnasium Düsseldorf
 1989-1995 Helmholtz-Gymnasium Hilden
 Juni 1995 Allgemeine Hochschulreife

1995-1996 16-monatige Tätigkeit als Lehrerin an einer Grundschule in Maputo, Mosambik für die Entwicklungshilfeorganisation DAPP (Development Aid from People for People)

1997-2004 Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg

seit Juni 2004 Assistenzärztin an der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Promotion: Prof. Dr. med Alfried Kohlschütter (Klinik für Kinder- und Jugendmedizin des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf)
Titel: Messungen von Endothelfunktion und oxidativem Stress zur Beurteilung des Arterioskleroserisikos bei Kindern mit chronischer Niereninsuffizienz und bei Kindern mit korrigierten Herzfehlern

Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als von mir angegebene Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter and einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Hamburg, den 14.06.2005

Nikki J. Rink