

**Kinderklinik**  
**Abteilung für pädiatrische Gastroenterologie und Hepatologie**  
**Universitätskrankenhaus Hamburg-Eppendorf**  
**Direktor: Prof. Dr. K. Ullrich**

# **Antioxidantien im Plasma von pädiatrischen Patienten mit Morbus Crohn oder Colitis Ulcerosa**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich vorgelegt von

Volker Habermann

aus Hamburg

Hamburg, 1999

Angenommen von dem Fachbereich Medizin  
der Universität Hamburg am: 06. Juni 2000

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs  
Medizin der Universität Hamburg

Sprecher: Prof. Dr. H. -P. Leichtweiß

Referent: Prof. Dr. M. Burdelski

Koreferent: Prof. Dr. K. Ulrich

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>4</b>
<b>1.1 Erläuterung der Thematik</b>	<b>4</b>
1.1.1 Ätiologie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen	4
1.1.2 Morbus Crohn	5
1.1.3 Colitis ulcerosa	5
1.1.4 Extraintestinale Symptome und Komplikationen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen	6
<b>1.2 Freie Radikale</b>	<b>7</b>
1.2.1 Entstehung freier Radikale	9
<b>1.3 Antioxidative Abwehr</b>	<b>11</b>
1.3.1 Superoxiddismutase	12
1.3.2 Katalase	12
1.3.3 Peroxidase	12
1.3.4 Vitamin C	13
1.3.5 Vitamin E	13
1.3.6 Harnsäure	14
1.3.7 Protein-SH-Gruppen	14
1.3.8 Weitere Antioxidantien	15
<b>1.4 Wissenschaftliches Umfeld</b>	<b>16</b>
<b>1.5 Fragestellungen</b>	<b>20</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>21</b>
<b>2.1 Patientengut</b>	<b>21</b>
2.1.1 Einschlußkriterien	21
2.1.2 Ausschlußkriterien	21
2.1.3 Patientenbeschreibung	21
2.1.4 Kontrollgruppenbeschreibung	22
<b>2.2 Methodik</b>	<b>23</b>
2.2.1 Probengewinnung	23
<b>2.3 Laboruntersuchungen</b>	<b>24</b>
2.3.1 TRAP (Total radical-trapping antioxidant parameter)	24
2.3.1.1 Meßvorgang im Einzelnen	27
2.3.1.2 Errechnete TRAP	28
2.3.2 Vitamin C	28
2.3.3 Tocopherole, Ubichinon und Ubichinol	29
2.3.3.1 Chemikalien und Standards	29
2.3.3.2 Probenpräparation	30
2.3.3.3 Messung	31
2.3.3.4 Berechnung	31
2.3.4 Harnsäure	33

2.3.5 SH-Gruppen	33
2.3.6 Bilirubin	33
2.3.7 Cholesterin	34
2.3.8 Übrige Parameter	34
2.3.9 Klinische Parameter	35
2.3.9.1 PCDAI (Paediatric Crohn's Disease Activity Index) nach Harms	35
2.3.9.2 CUAJ (Colitis ulcerosa Activity Index) nach Rachmilewitz	36
2.3.10 Statistik	37
<b>3 ERGEBNISSE</b>	<b>38</b>
<b>3.1 Antioxidantien im Plasma</b>	<b>38</b>
3.1.1 Gemessene TRAP im Plasma	38
3.1.2 Errechnete TRAP im Plasma	39
3.1.3 Vitamin C im Plasma	40
3.1.4 Vitamin E im Plasma	41
3.1.4.1 $\alpha$ -Tocopherol im Plasma	41
3.1.4.2 $\alpha$ -Tocopherol-Cholesterin-Quotient	42
3.1.4.3 $\gamma$ -Tocopherol im Plasma	43
3.1.4.4 $\gamma$ -Tocopherol-Cholesterin-Quotient	43
3.1.5 Q-10total, Ubichinol-10 und Ubichinon-10 im Plasma	44
3.1.5.1 Q-10total-Cholesterin-Quotienten	44
3.1.6 Harnsäure im Plasma	45
3.1.7 Protein-SH-Gruppen im Plasma	46
3.1.8 Bilirubin im Plasma	47
3.1.9 Cholesterin im Plasma	48
<b>3.2 Anteil der Antioxidantien an der TRAPmeas</b>	<b>49</b>
<b>3.3 Unidentifizierte Antioxidantien</b>	<b>50</b>
<b>3.4 PCDAI der Morbus Crohn Patienten</b>	<b>51</b>
<b>3.5 CUAJ der Colitis ulcerosa Patienten</b>	<b>51</b>
<b>3.6 Korrelationen</b>	<b>52</b>
3.6.1 Korrelationen mit der gemessenen TRAP	52
3.6.1.1 Morbus Crohn	52
3.6.1.2 Colitis ulcerosa	56
3.6.2 Korrelationen mit dem PCDAI bei Morbus Crohn	58
3.6.3 Korrelationen mit dem CUAJ bei Colitis ulcerosa	60
<b>3.7 Wirkung von Medikamenten</b>	<b>62</b>
<b>4 DISKUSSION</b>	<b>63</b>
<b>4.1 Gemessene TRAP</b>	<b>63</b>
<b>4.2 Errechnete TRAP und unidentifizierte Antioxidantien</b>	<b>65</b>
<b>4.3 Vitamin C</b>	<b>65</b>

<b>4.4 <math>\alpha</math>-Tocopherol</b>	<b>66</b>
<b>4.5 <math>\gamma</math>-Tocopherol</b>	<b>67</b>
<b>4.6 Q-10total, Ubichinol-10 und Ubichinon-10</b>	<b>68</b>
<b>4.7 Harnsäure</b>	<b>68</b>
<b>4.8 Protein-SH-Gruppen</b>	<b>69</b>
<b>4.9 Bilirubin</b>	<b>70</b>
<b>4.10 Cholesterin</b>	<b>70</b>
<b>4.11 Schlußfolgerungen</b>	<b>71</b>
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>73</b>
<b>6 LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>75</b>
<b>7 DANKSAGUNG</b>	<b>86</b>
<b>8 LEBENSLAUF</b>	<b>87</b>
<b>9 ERKLÄRUNG</b>	<b>88</b>

# 1 Einleitung

## *1.1 Erläuterung der Thematik*

Oxidative Vorgänge im Pathomechanismus verschiedener Krankheiten sind in den letzten 20 Jahren in der medizinischen Forschung und zunehmend auch in der klinischen Behandlung stark in den Vordergrund gerückt.

Bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen fand man Zusammenhänge mit oxidativen Vorgängen im Stoffwechsel [35]. Man konnte eine Überproduktion von freien Radikalen und Produkten aus oxidativer Schädigung feststellen [54]. Die Wirksamkeit einiger gebräuchlicher Medikamente zur Therapie von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wird zum Teil einem antioxidativen Effekt zugeschrieben.

Ein Ungleichgewicht zwischen Entstehung und Abwehr von freien Radikalen (Oxidantien) wird im Allgemeinen als oxidativer Streß bezeichnet. Oxidativer Streß könnte an der Schädigung des Organismus, speziell der Darmschleimhaut, bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen beteiligt sein.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit Antioxidantien im Plasma von Kindern mit den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa.

### **1.1.1 Ätiologie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen**

Die Erkrankungsursachen für chronisch entzündliche Darmerkrankungen sind viel diskutiert; bislang gibt es jedoch keine nachweisbare Hauptursache. Verschiedene Theorien reichen von infektiösen Ursachen zum Beispiel durch spezifische Erreger wie das Mycobakterium paratuberculosis oder die Paramyxoviren [71], über immunologische Ursachen zum Beispiel durch eine gestörte Immuntoleranz [24], einen Mangel an mucosaler IgA [59] und einer übersteigerten Immunantwort, bei der es zu einer Überproduktion von proinflammatorischen Cytokinen kommt [64] bis hin zu psychogenen Ursachen [81].

Alle bisher diskutierten Pathomechanismen könnten einen Einfluß auf die Entstehung freier Radikale und deren Abwehr und Eliminierung durch Radikalfänger haben.

### **1.1.2 Morbus Crohn**

Morbus Crohn ist eine chronische Darmentzündung, bei der transmural alle Darmwandschichten in den Entzündungsprozeß eingeschlossen sein können. Sämtliche Darmabschnitte von der Mundschleimhaut bis zum Anus können vom Morbus Crohn betroffen sein, am häufigsten kommt es zu einer Entzündung des terminalen Ileums und proximalen Kolons, daher auch das Synonym Ileitis terminalis. Die erkrankten Darmabschnitte sind diskontinuierlich betroffen, daher rührt ein weiteres Synonym, Ileitis regionalis.

Ungefähr 25% aller Neuerkrankungen treten im Alter unter 20 Jahren auf [45]. Die Inzidenz im Kindesalter wird je nach Region unterschiedlich beziffert, sie liegt zwischen 2,3 auf 100.000 der unter 16 Jahre alten Kinder in Schottland [10] und 16,0 der 15-19 jährigen Kinder in Skandinavien [43].

Jungen und Mädchen sind in gleicher Häufigkeit betroffen [45].

Der Morbus Crohn führt zu Bauchschmerzen, insbesondere im rechten Unterbauch, zu akuter und chronischer Diarrhöe, selten mit Blutauflagerungen, Gewichtsverlust, Wachstumsverminderung, gelegentlich erhöhten Temperaturen und tastbaren Resistenzen im rechten Unterbauch. In ca. 25% kommt es zu extraintestinalen Manifestationen (siehe unten)[45].

### **1.1.3 Colitis ulcerosa**

Bei der Colitis ulcerosa ist vor allem der Dickdarm von dem Entzündungsprozeß betroffen. Die Entzündung beginnt meist im distalen Rektum und breitet sich kontinuierlich über die Kolonschleimhaut nach oral aus, dabei kommt es zur Ausbildung von Ulzerationen der oberflächlichen Schleimhautschichten.

Die Inzidenz variiert stark in den unterschiedlichen Regionen, bevorzugt betroffen sind die industrialisierten Länder. Für die 10-19 jährigen Kinder wurde eine Inzidenz von 2,3 auf 100.000 gefunden [16].

Jungen und Mädchen sind gleich häufig betroffen.

Klinisch stehen blutig-schleimige Durchfälle und krampfartige Unterbauchschmerzen im Vordergrund, häufig kommt es zu Gewichtsverlust, Übelkeit und Erbrechen und gelegentlich zu Fieber [16].

### **1.1.4 Extraintestinale Symptome und Komplikationen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen**

Zusätzlich, selten auch primär, kann es bei beiden Erkrankungen zu extraintestinalen Symptomen kommen [45]. An der Haut kann es zum Beispiel zum Erythema nodosum, zum Pyoderma gangränosum, zur Epidermolysis bullosa acquisita und Polyarteriitis nodosa kommen, an den Augen zu Iritis, Uveitis, Episkleritis und zum Pseudotumor orbitae, an den Gelenken zu Arthritiden, Arthralgien und Ankylosierender Spondylitis, in der Leber zur primär sklerosierenden Cholangitis.

Selten kann der langwierige Entzündungsprozeß zu einer Amyloidose führen.

Als Komplikationen können zum Beispiel Malabsorptionssyndrome mit Gewichtsverlust, Resorptionsstörungen von Vitamin B 12, Folsäure und Gallensäuren und daraus folgend im Kindesalter Wachstumsstörungen auftreten.

Bei der Colitis ulcerosa kann es zu massiven Blutungen und zum toxischen Megacolon kommen. Im späteren Verlauf häufen sich Colonkarzinome.

Der Morbus Crohn kann im Rahmen fortschreitender Entzündungsprozesse zu Darmstenosen mit Ileus und Perforationsgefahr und häufig zu Fisteln und Abszessen führen.

## ***1.2 Freie Radikale***

Freie Radikale sind chemische Moleküle, welche ein oder mehrere unpaarige Elektronen in ihren äußeren Orbitalen tragen. Durch dieses Elektronenmißverhältnis sind freie Radikale besonders reaktiv [38]. Sie nehmen an Oxidations- und Reduktionsreaktionen ihrer Umgebung teil, um dadurch ihre elektrochemische Stabilität zurückzugewinnen. Dabei können sämtliche biochemische Verbindungen wie Lipide, Proteine, Nukleinsäuren, Kohlenhydrate und Gewebe geschädigt oder zerstört werden. Biologisch relevant sind das Superoxid ( $O_2^{\cdot-}$ ), das Wasserstoffsuperoxid ( $H_2O_2$ ), das Hydroxylradikal ( $\cdot OH$ ), die Hypochlorsäure ( $HOCl$ ), das Ferryl, das Peroxyl und das Alkoxy [39].

In Organismen erfolgt die zelluläre Schädigung durch freie Radikale primär über die Peroxidation von mehrfachungesättigten Fettsäuren in Membranen. Durch die dabei entstehenden Peroxylradikale wird die sogenannte Lipidperoxidation in einer Kettenreaktion unterhalten. Lipidhydroperoxide sind das initiale Produkt dieser Kettenreaktion (siehe Abbildung 1). Durch Dekomposition können eine Reihe von cytotoxischen Produkten, wie Aldehyde (zum Beispiel Malondialdehyd) entstehen. Dies kann die Membranstabilität und -permeabilität stark beeinträchtigen und so das Zellvolumen und den Zellmetabolismus verändern oder sogar Zellen zerstören [76].

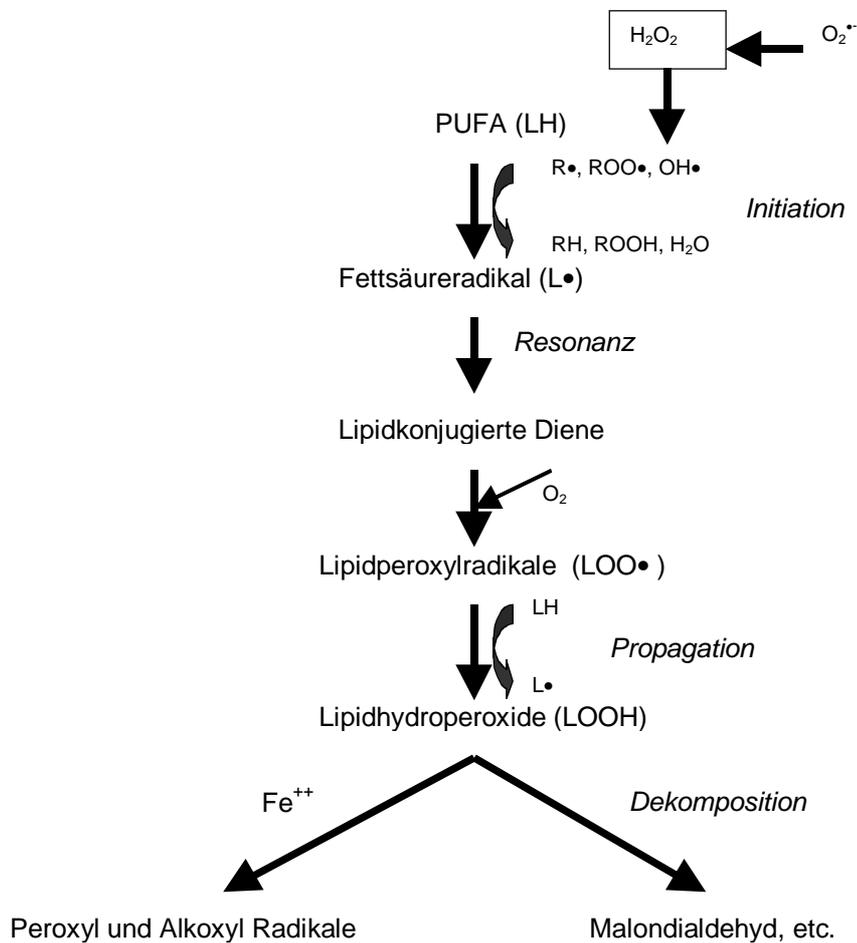
Lipidperoxidation

Abbildung 1: Reaktionsweg der Lipidperoxidation nach Sokol und Hoffenberg [76]: Induziert durch Superoxid ( $\text{O}_2^{\bullet -}$ ) und andere freie Radikale (erkennbar an  $\bullet$ ) werden mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFA/LH) zu Fettsäureradikalen ( $\text{L}\cdot$ ), indem sie im Bereich ihrer Doppelbindungen ein Wasserstoffatom abgeben. Das  $\text{L}\cdot$  reagiert rasch unter Sauerstoffverbrauch zu einem Peroxylradikal ( $\text{LOO}\cdot$ ). Dieses kann eine neue PUFA oxidieren und so die Kettenreaktion unterhalten (Propagation), dabei entstehen Lipidhydroperoxide (LOOH), welche durch Dekomposition unter anderem zu dem mutagenen Malondialdehyd reagieren können.

Lipidperoxide und deren Nebenprodukte können direkte toxische Wirkungen auf Zellen und Zellorganellen haben, können chemotaktisch auf Neutrophile Granulozyten wirken und könnten die Cytokin- und Phospholipaseaktivitäten beeinflussen. Sie werden als Indikatoren für oxidativen Streß angesehen und gemessen [76]. Freie Radikale oxidieren Protein-Sulfhydrylgruppen (z.B. in Glutathion, Zytoskeletproteinen und  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase) und inaktivieren so Enzyme und verändern Strukturproteine. Das Hydroxylradikal kann die DNS beschädigen, sie ist in jeder Zelle täglich  $10^4$  Oxidationen ausgesetzt. Dabei können mehr als 20 verschiedene oxidative Verbindungen entstehen, zum Beispiel aus dem Guanin der DNS das mutagene 8-Hydroxyguanin. Dies kann zum Abbruch von DNS-Replikationen bei Reparaturprozessen führen [29]. Zum Teil wird dieser Vorgang und die unzureichenden Reparaturmechanismen für die Tumorentstehung und die Alterung des Organismus verantwortlich gemacht [6].

Im Darm können Wasserstoffperoxid und Nitritoxide die Wasser- und Elektrolytsekretion erhöhen und sind damit zum Teil für die Durchfälle bei entzündlichen Darmkrankungen verantwortlich [35]. Außerdem könnte Hypochlorsäure Proteaseinhibitoren inaktivieren und so durch unkontrollierte Protease- und Kollagenaseaktivität zur Gewebeschädigung führen [89].

### **1.2.1 Entstehung freier Radikale**

Im menschlichen Stoffwechsel entstehen freie Sauerstoffradikale physiologischerweise als Nebenprodukt der Elektronentransportkette in den Mitochondrien [80] und bei anderen mikrosomalen Elektronentransporten (Cytochrom P-450). Dabei können vor allem das Superoxid ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), das Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) und das Hydroxylradikal ( $\cdot\text{OH}$ ) entstehen. Durch sogenannte Leckagen können sie dabei freigesetzt werden und die Zellen schädigen [39].

Durch verschiedene Oxidasen (zum Beispiel Xanthin-, Aldehyd- und NADPH-Oxidasen) wird direkt oder indirekt Superoxid produziert, welches Vorläufer für noch reaktivere Substanzen ist [34].

Zusätzlich entstehen freie Radikale durch Autooxidationsvorgänge (z.B. Katecholamine und Tetrahydrofolsäure) [48].

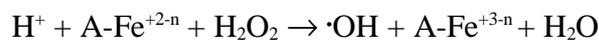
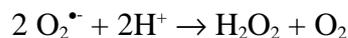
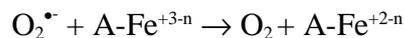
Aktivierte Phagozyten (z.B. Neutrophile, Eosinophile, endotheliale Zellen, Monozyten und Makrophagen) bilden als Antwort auf Entzündungsmediatoren und Bakterienzellwandprodukte Superoxid und Wasserstoffperoxid zur Zerstörung der phagozytierten organischen Substanzen [75].

Durch die verschiedenen Mechanismen ist der menschliche Körper pro Tag etwa  $10^{10}$  Molekülen Superoxid ausgesetzt, das entspricht einer Menge von 1,75 kg pro Jahr für eine 70 kg schwere Person [6].

In der Haber-Weiss Reaktion entsteht aus Superoxid und Wasserstoffperoxid das schädlichste freie Radikal, das hochreaktive Hydroxylradikal. Unter physiologischen Bedingungen ist diese Reaktion zu langsam um den Organismus zu schädigen. In Anwesenheit von freiem Eisen oder Kupfer erfolgt diese Reaktion katalysiert deutlich schneller, diese Reaktion heißt dann Fenton Reaktion (siehe Gleichung 1).

Aktivierte Granulozyten und Monozyten setzen Myeloperoxidase frei, ein Enzym, welches

#### Entstehung des Hydroxylradikals



*Gleichung 1: Eisenkatalysierte Haber-Weiss Reaktion (Fenton Reaktion): Chelatoraniongebundenes Eisen ( $\text{A-Fe}^{+3-n}$ ) katalysiert die Reaktion von Superoxid ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) und Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) zum Hydroxylradikal ( $\cdot\text{OH}$ ).*

aus Wasserstoffperoxid Superoxid und Hypochlorsäure produziert, eine starke antibakterielle Substanz, die auch Zellen in der Umgebung schädigt [35, 89].

Bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wurde eine erhöhte Aktivität der Myeloperoxidase in entzündlich veränderter Darmschleimhaut gefunden [4, 52]. In Granulozyten und Monozyten aus peripherem Blut und in entzündeter Darmschleimhaut konnte eine erhöhte Produktion freier Radikale nachgewiesen werden [49, 50, 51, 74].

### ***1.3 Antioxidative Abwehr***

Verschiedene enzymatische und nichtenzymatische endogene Mechanismen schützen den Organismus vor freien Radikalen; diese Antioxidantien werden in zwei Gruppen aufgeteilt [15].

Die primären präventiven Antioxidantien reduzieren die Produktionsrate von freien Radikalen, zum Beispiel durch die Reduktion von Wasserstoffperoxiden (zum Beispiel durch Glutathionperoxidase und Katalase) oder durch freies Metall bindende Substanzen wie Transferrin, Lactoferrin und Ferritin als Eisenfänger sowie Coeruloplasmin und Albumin als Kupferfänger.

Die sekundären Antioxidantien, welche direkt freie Radikale durch Verkürzung der Kettenlänge inaktivieren, werden kettenunterbrechende Antioxidantien genannt. Sie sind die eigentlichen Radikalfänger. Hierzu gehören zum Beispiel Vitamin E als Peroxyfänger und Superoxiddismutase (SOD) als Superoxidfänger.

Superoxiddismutase (SOD), Katalase und Glutathionperoxidase schützen die Zellen vorwiegend intrazellulär vor lokal entstandenen freien Radikalen.

Frei et al. konnten zeigen, daß die sekundären Antioxidantien bei der Lipidperoxidation in einer bestimmten Reihenfolge verbraucht werden: Vitamin C und SH-Gruppen > Bilirubin > Harnsäure >  $\alpha$ -Tocopherol [32].

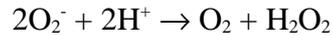
Im Blut gibt es eine Reihe von wasserlöslichen und an Lipide bzw. Lipoproteine gebundene lipidlösliche Antioxidantien, zum Beispiel Glutathion, Harnsäure, Albumin, Cystein, Vitamin C, Tocopherol, Ubichinon und eine Gruppe verschiedener hämbindender Proteine wie zum Beispiel Haptoglobin und Hämopexin [41].

Für die Untersuchung des antioxidativen Status im menschlichen Plasma stand uns eine Methode zu Verfügung, mit der man die Eigenschaft des Blutplasmas messen kann, freie Radikale abzufangen. Diese Radikalfängerkapazität wird TRAP (aus dem Englischen: Total radical-trapping antioxidant parameter) genannt.

Als Radikalfänger kommen verschiedene Plasmakomponenten in betracht, die wichtigsten bekannten haben wir einzeln bestimmt und ihren Anteil an der TRAP errechnet.

### 1.3.1 Superoxiddismutase

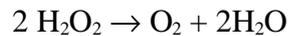
Die drei bekannten Superoxiddismutasen enthalten verschiedene Metalle in ihrem Molekül, sie katalysieren die Reaktion des Superoxidradikals zum weniger schädlichen Wasserstoffperoxid:



Die Cu-Zn-SOD kommt im Zytosol, die Mn-SOD mitochondrial und eine dritte erst kürzlich entdeckte SOD extrazellulär vor.

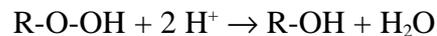
### 1.3.2 Katalase

Die Katalase, überwiegend in Peroxisomen vorkommend, katalysiert die Reaktion des Wasserstoffperoxids zu unschädlichem Sauerstoff und Wasser:



### 1.3.3 Peroxidase

Die Peroxidase katalysiert die Reaktion von Hydroperoxidradikalen zu Hydroxid und Wasser:



Die Glutathionperoxidasen sind eine Gruppe von zytosolischen, mitochondrialen und extrazellulären Enzymen. Sie enthalten das diätetisch wichtige Selen auf ihrer aktiven Seite.

### 1.3.4 Vitamin C

Die hydrophile Ascorbinsäure (Vitamin C) ist mit etwa 14% an der TRAP im Blutplasma beteiligt [85], sie ist das wichtigste nutritive wasserlösliche Antioxidans. Vitamin C hat sowohl antioxidative als auch prooxidative Eigenschaften. Antioxidativ wirkt es zum Beispiel auf Hydroxylradikale, Wasserstoffperoxid und Hypochlorsäure [38], indem es mit ihnen reagiert und selbst zu einem kaum schädlichen Ascorbylradikal [31] wird. Im weiteren Verlauf reagieren zwei Ascorbylradikale zu Dehydroascorbinsäure und Ascorbinsäure. Vitamin C wirkt außerdem indirekt antioxidativ indem es oxidiertes Vitamin E reaktiviert. In Kombination mit Eisen verstärkt Vitamin C die Lipidperoxidation und kann oxidative Schäden verursachen [11]. Die Bewertung der antioxidativen Aktivität ist konzentrationsabhängig. Wayner et al. konnten 1986 eine Abhängigkeit der antioxidativen Kapazität von der initialen Vitamin C Konzentration nachweisen [85]. Für die Praxis hat sich ein mittlerer Bewertungsfaktor für die antioxidative Kapazität von 1,7  $\mu\text{mol}$  freier Radikale pro  $\mu\text{mol}$  Vitamin C als praktikabel erwiesen.

### 1.3.5 Vitamin E

Vitamin E ist der wichtigste fettlösliche Radikalfänger [23], es ist überwiegend zellmembrangebunden, sowie im Blutkreislauf an Lipoproteine gebunden. Vitamin E ist ein Sammelgriff für 4 verschiedene Tocopherole und 4 Tocotrienole, sie gehören zu den essentiellen Vitaminen, die nur nutritiv erworben werden können. Wirksam ist im wesentlichen  $\alpha$ -Tocopherol und zu einem deutlich geringeren Teil  $\gamma$ -Tocopherol.  $\alpha$ -Tocopherol ist für ca. 7% der TRAP im Plasma verantwortlich [85]. Das  $\alpha$ -Tocopherol reagiert direkt mit den freien Radikalen, dabei wird es selbst zu einem wenig schädlichen Tocopherolradikal. Es blockiert die Kettenreaktion der Lipidperoxidation durch Reaktion mit den Peroxyl- und den Alkoxyradikalen. Außerdem reduziert es die Konzentrationen von Superoxid, Hydroxylradikalen und reaktivem Sauerstoff. Das dabei entstandene Tocopherolradikal kann zur Zellmembran wandern und an ihrer Außenfläche von Vitamin C in  $\alpha$ -Tocopherol zurückverwandelt werden [88].

### 1.3.6 Harnsäure

Harnsäure entsteht bei der Oxidation von Hypoxanthin und Xanthin aus dem Abbau von Nukleinsäuren. Harnsäure ist mit ca. 58% Anteil die wichtigste wasserlösliche Komponente der TRAP im Blutplasma [85]. Seine antioxidative Wirkung beruht in der direkten Aufnahme der überzähligen Elektronen und damit der Oxidation zu Allantoin [5]. Harnsäure hemmt effektiv die Lipidperoxidation durch Inaktivierung der Peroxylradikale [65], fängt Superoxid, Hydroxylradikale und Hypochlorsäure [36]. Zusätzlich bildet Harnsäure Komplexe mit Kupfer- und Eisenionen, dies hemmt die oben beschriebene Fenton-Reaktion sowie die eisenkatalysierten Oxidationsvorgänge durch Vitamin C [22]. Man konnte einen effektiven antioxidativen Schutz der DNA nachweisen [19]

### 1.3.7 Protein-SH-Gruppen

Thiol-Gruppen (SH-Gruppen) sind die antioxidativ wirksamen Komponenten der radikalefangenden Plasmaproteine. Der Anteil der SH-Gruppen an der TRAP im Blutplasma ist etwa 21% [85]. In früheren Untersuchungen wurden Aussagen über den Antioxidantienstatus mit der Messung von einzelnen Proteinen getroffen, zum Beispiel mit Bestimmung des Glutathions. Glutathion steht in der oxidativen Abwehr in Erythrozyten an vorderer Stelle, es schützt eine Reihe von wichtigen Enzymen und SH-Gruppen enthaltende Proteine (zum Beispiel  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen und Hormonrezeptoren) vor Oxidation [11]. Die Messung der antioxidativen Aktivität aller Plasmaproteine kann in der Praxis besser durch die Bestimmung der SH-Gruppen erfolgen, deren Messung ist einfacher und damit genauer als die Bestimmung der antioxidativen Kapazität der einzelnen Plasmaproteine. SH-Gruppen werden leicht durch Hypochlorsäure und Hydroxylradikale zu Schwefelradikalen (Thiylradikalen) oxidiert. Unter bestimmten Bedingungen sind Schwefelradikale selbst schädliche reaktive Produkte, sie können mit Sauerstoff Oxysulfurradikale bilden, welche wiederum singulären Sauerstoff bilden können [87].

### 1.3.8 Weitere Antioxidantien

Das überwiegend aus dem Hämoglobinabbau entstehende Bilirubin spielt für die antioxidative Abwehr in physiologischer Konzentration keine entscheidende Rolle. Erst in höheren Konzentrationen fällt die antioxidative Kapazität des albumingebundenen Bilirubins ins Gewicht. Seine antioxidative Wirkung pro Mol zwei freie Radikale abzufangen beruht auf der Oxidation zu Biliverdin [77]. Es inhibiert die Lipidperoxidation und fängt singulären Sauerstoff [63]. Wie Vitamin C kann es oxidiertes Tocopherol regenerieren.

Ubichinol-10 ist die reduzierte Form des Koenzyms Ubichinon-10 (Q-10). Ubichinon hat eine ähnliche Strukturformel wie das  $\alpha$ -Tocopherol, wird vom menschlichen Körper jedoch selbst synthetisiert. Wie das Vitamin E fängt Ubichinol-10 freie Radikale in Lipidmembranen und im Plasma. Ubichinol-10 findet sich zu 45% in den Mitochondrien und ist dort für die antioxidative Abwehr verantwortlich [69]. In physiologischen Konzentrationen kann es das Vitamin E als Antioxidans im Plasma ersetzen und oxidiertes Tocopherol regenerieren [30]. Ubichinol-10 fängt freie Radikale, indem es selbst zu Ubisemichinon und weiter zu Ubichinon oxidiert wird. Ein verändertes Verhältnis von Ubichinon-10 zu Ubichinol-10 zugunsten der oxidierten Form läßt oxidativen Streß vermuten.

Vitamin A beziehungsweise seine Vorstufe, das  $\beta$ -Karotin, ist eine fettlösliche Substanz. Als Antioxidans kann es wie  $\alpha$ -Tocopherol Sauerstoffradikale in der Lipidmembran fangen und die Lipidperoxidation hemmen; hauptsächlich quencht es singulären Sauerstoff [15]. In vivo spielt es wegen seiner niedrigen Konzentration gegenüber dem Vitamin E eine untergeordnete antioxidative Rolle.

## ***1.4 Wissenschaftliches Umfeld***

Das Mißverhältnis von freien Radikalen und Antioxidantien - oxidativer Streß - beziehungsweise die dabei entstehenden erhöhten Spiegel an Oxidationsprodukten, wurde vielfach bei unterschiedlichsten Erkrankungen nachgewiesen. Unter anderen bei Myokardinfarkt [37, 60, 61], Diabetes mellitus [7], Krebserkrankungen [8] und bei den typischen Frühgeborenenkrankheiten wie der Retinopathia prämaturoorum [18], den intraventrikulären Blutungen, der nekrotisierenden Enterokolitis [58] und der bronchopulmonalen Dysplasie [47].

Das vermehrte Entstehen freier Radikale wurde bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen in verschiedenen Untersuchungen nachgewiesen. Es gibt starke Hinweise für eine wichtige Rolle von oxidativem Streß bei der Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen [9].

In Biopsien entzündeter Darmschleimhaut von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa Patienten fanden Lih-Brody et al. 1996 erhöhte Konzentrationen von Stoffwechselprodukten aus Proteinoxidation und DNA-Oxidation, sowie eine erhöhte Chemilumineszens von reaktiven oxidativen Mediatoren. Sie fanden dabei die antioxidative Superoxiddismutase in der entzündeten Schleimhaut erniedrigt, Zink und Kupfer, als Kofaktoren der Superoxiddismutase, waren ebenfalls erniedrigt. Der Eisenspiegel als Prooxidans (Fenton-Reaktion) war erhöht [54].

Für die wirksamen Therapeutika beider Erkrankungen wurden sowohl in vitro [20, 90], als auch in vivo [3] antioxidative Wirkmechanismen nachgewiesen und dadurch ihre medikamentöse Wirkung teilweise erklärt. Die Entstehung Freier Radikale bei der Phagozytose wird durch Immunsuppression mit Glucokortikoiden, Cyclosporin und Salicylaten verhindert und die Radikalfängeraktivität mit Salicylaten und diätetischer Einnahme von Antioxidantien erhöht. Den Erfolg der Behandlung ermittelte man retrospektiv anhand der Klinik und der Rückfallrate.

In einer achtjährigen Dosisfindungsstudie konnte Emerit 1989 die Wirksamkeit von parenteral gegebener boviner Superoxiddismutase bei steroidresistenten Morbus Crohn Patienten zeigen [26].

Nur wenige Studien beschäftigten sich bisher mit den Antioxidantien bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Einzelne antioxidative Substanzen wurden in verschiedenen Untersuchungen bestimmt.

Fernandez-Banares et al. veröffentlichten 1989 eine Studie des Vitaminstatus im Plasma von Patienten mit Morbus Crohn (= MC) und Colitis ulcerosa (= CU) gegen eine Kontrollgruppe Gesunder. Unter den untersuchten Vitaminen waren auch die antioxidativen Substanzen Vitamin C und  $\alpha$ -Tocopherol. Vitamin C war in beiden Patientengruppen erniedrigt (MC:  $2,57 \pm 0,6$   $p < 0,01$ ; CU:  $3,2 \pm 0,77$  n.s.; gegen  $8,7 \pm 0,30$  mg/l). Das  $\alpha$ -Tocopherol war bei Morbus Crohn Patienten unverändert ( $10,5 \pm 10,0$  gegen  $10,7 \pm 0,30$  mg/l), bei erhöhtem  $\alpha$ -Tocopherol/Cholesterin-Quotienten ( $7,9 \pm 0,40$  gegen  $6,1 \pm 0,10$  mg/g,  $p < 0,01$ ). Bei den Colitis ulcerosa Patienten war das  $\alpha$ -Tocopherol erniedrigt ( $8,5 \pm 0,70$  gegen  $10,7 \pm 0,3$  mg/l,  $p < 0,01$ ), bei normalem  $\alpha$ -Tocopherol/Cholesterin-Quotienten ( $6,3 \pm 0,5$  gegen  $6,1 \pm 0,10$  mg/g) [27].

Bei einer Vitaminstudie fanden Kuroki et al. 1993 im Blutplasma von Morbus Crohn Patienten erniedrigte Konzentrationen von Vitamin E ( $0,66 \pm 0,14$  gegen  $0,79 \pm 0,16$  mg/dl,  $P < 0,01$ ) und Vitamin A. Das Vitamin C zeigte eine tendentielle Erhöhung der Plasmakonzentration ( $0,86 \pm 0,29$  gegen  $0,72 \pm 0,26$  mg/dl). Es fand sich keine Korrelation der Antioxidantien mit der Krankheitsaktivität. Vitamin E und Cholesterin korrelierten bei den Patienten miteinander ( $r = 0,45$ ,  $P < 0,05$ ) [53].

Hoffenberg et al. untersuchten 1997 die Konzentrationen einiger Antioxidantien im Blutplasma von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Sie fanden eine Tendenz zu erniedrigtem Vitamin C bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa (MC:  $27,3 \pm 12,5$ ; CU:  $29,5 \pm 13,6$  gegen  $42,0 \pm 11,4$   $\mu\text{mol/l}$ , n.s.) - beide Patientengruppen zusammen betrachtet ergaben eine signifikante Erniedrigung des Vitamin C ( $28,4 \pm 12,5$   $\mu\text{mol/l}$ ,  $p < 0,05$ ), eine Erhöhung der Glutathionperoxidase (MC:  $p < 0,05$ ; CU: n.s.), eine Erhöhung des Glutathions (MC:  $p < 0,05$ ; CU: n.s.) und eine Erhöhung des  $\alpha$ -Tocopherols (MC:  $26 \pm 4$   $p < 0,05$ ; CU:  $24 \pm 12$  n.s.; gegen  $20 \pm 4$   $\mu\text{mol/l}$ ). Das  $\gamma$ -Tocopherol war im Bereich der Kontrollen (MC:  $7 \pm 3$ ; CU:  $5 \pm 4$  gegen  $5 \pm 2$   $\mu\text{mol/l}$ ) [44].

Ramakrishna et al. fanden 1997 bei einer Untersuchung von Colitis ulcerosa Patienten die Konzentration des Vitamin E im Plasma unverändert gegenüber der Kontrollgruppe, Vitamin A und Cystein waren signifikant erniedrigt, es fand sich keine Korrelation der Antioxidantien mit der Krankheitsaktivität [68].

Zwei Untersuchungen von Antioxidantien in entzündeter und nicht entzündeter Darmschleimhaut wurden von Buffinton und Doe 1995 durchgeführt. In der ersten Untersuchung an 17 Morbus Crohn und 13 Colitis ulcerosa Patienten fanden sie ein erniedrigtes Vitamin C in entzündeter Schleimhaut [13].

Im gleichen Jahr wurde ihre nachfolgende Untersuchung von entzündeter im Vergleich zu normaler Mucosa bei 28 Morbus Crohn und 28 Colitis ulcerosa Patienten veröffentlicht [14]. Sie bestimmten die totale Kapazität der Darmschleimhaut Peroxylradikale im wässrigen Milieu zu fangen (Total aqueous peroxy radical scavenging capacity) mit einer Methode nach Glazer (TRAP<sub>Glazer</sub>) [33]. Die Methode beruht auf der Zerstörung von Phycoerythrin und damit der Abnahme seiner Fluoreszenz bei Peroxidation durch freie Radikale, induziert durch ABAP ((2,2'-Azo-bis-2-amidipropan-Hydrochlorid). Phycoerythrin ist ein für die Photosynthese einer Rotalgenart wichtiges Protein. Durch die Messung der Verzögerungsphase (Lagphase) in Bezug zur DNA-Menge, in der die Gewebeprobe eine Fluoreszenzabnahme verhindert, bestimmte man die TRAP<sub>Glazer</sub> der Gewebeprobe.

Die beschriebene Methode ähnelt der in unserer Untersuchung verwendeten Methode, bestimmt jedoch nur die Antioxidantien in der wässrigen Phase.

Die TRAP<sub>Glazer</sub> in entzündeter Mucosa aller Patienten war deutlich erniedrigt im Vergleich zu nicht entzündeter Mucosa derselben Patienten (Lagphase:  $186 \pm 84$  gegen  $408 \pm 54$  s/mg DNA;  $p=0,0031$ ). Die Harnsäure in entzündeter Schleimhaut war nicht signifikant erniedrigt. Das reduzierte und das gesamte Glutathion waren bei den Morbus Crohn Patienten nicht signifikant erhöht und bei den Colitis ulcerosa Patienten nicht signifikant erniedrigt. Das Ubichinol-10 war bei beiden Gruppen deutlich erniedrigt. Das  $\alpha$ -Tocopherol war unverändert. Man fand keinen Einfluß irgendeiner konventionellen Therapie auf die Antioxidantien [14].

Die bisherigen, oben zum Teil erwähnten Studien bestimmten die Einzelkomponenten der oxidativen Abwehr. Sie kamen dabei zu zum Teil messtechnisch begründbaren unterschiedlichen Ergebnissen. Es existierte bisher keine Untersuchung des gesamten Radikalfängerstatus von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. In keiner Studie wurden bisher die wichtigsten radikalfangenden Antioxidantien auf einmal bestimmt.

Dieses versuchten wir in dieser Untersuchung mit der Bestimmung des gesamten Antioxidantienstatus sowie der wichtigsten einzelnen Antioxidantien im Blutplasma der Patienten zu erreichen.

Da sich die einzelnen bekannten Antioxidantien in zum Teil noch unverstandener Art und Weise untereinander beeinflussen und miteinander interagieren zeigt ein physiologisches Gemisch der Antioxidantien ein anderes Verhalten als theoretisch von den Einzelkomponenten her zu erwarten wäre. Wayner et al. veröffentlichten 1985 eine Methode den gesamten antioxidativen Status zu messen [84].

Wir benutzten für unsere Studie die leicht abgewandelte Form von Wayners TRAP-Methode nach Thurnham [78].

Mehrere Studien der antioxidativen Abwehr haben seit 1985, nach der Einführung der TRAP-Methode nach Wayner, bei unterschiedlichen Erkrankungen die TRAP (im Folgenden, wie in den erwähnten Studien, als  $TRAP_{meas}$  bezeichnet), SH-Gruppen, Vitamin C,  $\alpha$ -Tocopherol, Harnsäure und zum Teil Bilirubin gemessen, die theoretische TRAP (im Folgenden als  $TRAP_{calc}$  bezeichnet) aus den einzelnen Antioxidantien errechnet und mit einem Normalkollektiv verglichen.

Bei der rheumatoiden Arthritis fand Thurnham 1987 im Plasma sämtliche Parameter erniedrigt, bis auf normale Harnsäure und eine normale errechnete TRAP [78].

Bei dem Myokardinfarkt fand Mullholland 1991 eine erniedrigte gemessene TRAP im Plasma, eine normale errechnete TRAP, Vitamin C war erniedrigt, SH-Gruppen,  $\alpha$ -Tocopherol und Harnsäure waren unverändert [62].

Bei früh- und termingeborenen Neugeborenen fand Lindeman 1993 im Plasma erhöhte Werte für  $TRAP_{meas}$ ,  $TRAP_{calc}$ , Vitamin C und Bilirubin, sowie erniedrigte Werte für SH-Gruppen und  $\alpha$ -Tocopherol. Die Harnsäure war unverändert. Er fand dabei keinen signifikanten Unterschied zwischen Früh- und Termingeborenen [55].

Bei der Eklampsie fand Jendryczko 1995 im Plasma sämtliche Werte bis auf das Bilirubin erniedrigt [46].

Bei der Pneumonie fand Aejmelaus 1996 sämtliche Parameter unverändert [2].

Beim Diabetes mellitus fand Asayama 1993 im Plasma Erniedrigungen der  $TRAP_{meas}$  und Erhöhungen von Vitamin C und  $\alpha$ -Tocopherol [7]. Ceriello fand bei Diabetikern 1997 bei einem erhöhten Malonyldialdehyd im Plasma Erniedrigungen von  $TRAP_{meas}$ ,  $TRAP_{calc}$ , SH-Gruppen und Harnsäure gegenüber erhöhtem  $\alpha$ -Tocopherol [17].

## ***1.5 Fragestellungen***

Deutliche Hinweise für eine Beteiligung von freien Radikalen an dem Pathomechanismus der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen lassen die Schlußfolgerung naheliegen, daß die normalerweise bestehende Balance zwischen der Entstehung und Abwehr von freien Radikalen bei diesen Erkrankungen gestört ist.

Die Erhöhung von freien Radikalen im Plasma ist bereits in mehreren Studien nachgewiesen worden. Es stellt sich die Frage, ob die Radikalfängerkapazität im Plasma von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen erniedrigt ist, umfassende Studien hierüber existieren bisher nicht.

Um genauere Aussagen über das Niveau der oxidativen Balance treffen zu können, interessierte uns die Radikalfängerkapazität des Plasmas insgesamt sowie die Plasmakonzentrationen der einzelnen bekannten Antioxidantien.

Gibt es Hinweise für bisher unbekannte antioxidative Komponenten im Plasma?

Wenn die oxidative Abwehr verändert ist, hat die Krankheitsaktivität darauf einen Einfluß, das heißt korrelieren die Antioxidantien mit der Krankheitsaktivität?

Bestehen Unterschiede zwischen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa Patienten?

## **2 Material und Methoden**

### ***2.1 Patientengut***

#### **2.1.1 Einschlußkriterien**

In diese Studie wurden alle Patienten mit der Diagnose einer chronischen entzündlichen Darmerkrankung aufgenommen, die sich von April 1994 bis Mai 1995 entweder neu oder routinemäßig in der gastroenterologischen Ambulanz der Universitäts Kinderklinik Hamburg-Eppendorf vorstellten. Voraussetzung für die Aufnahme in diese Studie war, daß die Erkrankung radiologisch oder endoskopisch und histologisch diagnostiziert worden war. Die untersuchten Patienten leiden an Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa.

#### **2.1.2 Ausschlußkriterien**

In die Untersuchung wurden keine Patienten mit chronischen Zweiterkrankungen aufgenommen.

#### **2.1.3 Patientenbeschreibung**

Es wurden 50 Patienten der Kinderklinik des Universitätskrankenhauses Hamburg-Eppendorf mit klinisch, histologisch und/oder radiologisch gesicherter Chronisch Entzündlicher Darmerkrankung untersucht. 29 Patienten waren an Morbus Crohn erkrankt, davon 10 Mädchen und 19 Jungen. 21 Patienten waren an Colitis ulcerosa erkrankt, davon 11 Mädchen und 10 Jungen (siehe Tabelle 1).

Zum Untersuchungszeitpunkt waren die Patienten im Alter von 3 bis 18 Jahren.

Die Morbus Crohn Patienten waren älter als die Colitis ulcerosa Patienten ( $p < 0,05$ ).

Die Patienten waren unterschiedlicher ethnischer Herkunft und standen unter individueller Therapie.

Bei den Routineblutentnahmen aus peripheren Venen wurde den Patienten, nach vorherigem mündlichen Einverständnis der Eltern, zusätzlich je ein EDTA-Röhrchen Blut für diese Studie entnommen.

## 2.1.4 Kontrollgruppenbeschreibung

Die Kontrollgruppe bestand aus 90 internistisch gesunden Patienten, 54 Jungen und 36 Mädchen im Alter von 1 bis 20 Jahren (siehe Tabelle 1), die sich wegen verschiedenen nicht entzündlichen Erkrankungen (zum Beispiel zur Minderwuchsdiagnostik) oder chirurgischen Eingriffen (zum Beispiel Leistenhernienoperationen) in der Kinderklinik des Universitätskrankenhauses Eppendorf aufgehalten haben.

Bei den Routineblutentnahmen aus peripheren Venen wurde, nach mündlichem Einverständnis, zusätzlich je ein EDTA-Röhrchen Blut für Studienzwecke entnommen.

Aus organisatorischen Gründen konnten nicht bei allen Kontrollpersonen sämtliche Laborparameter bestimmt werden, wie bei den Patienten, so daß die Laborparameter der Kontrollgruppe in unterschiedlicher Anzahl vorhanden sind.

Tabelle 1: Gruppenbeschreibung von Patienten und Kontrollepersonen

<b>Gruppe</b>	<b>Anzahl gesamt</b>	<b>Anzahl Jungen</b>	<b>Anzahl Mädchen</b>	<b>Alter (m ± SD)</b>
Morbus Crohn	29	19	10	13,3 ± 3,7
Colitis ulcerosa	21	10	11	10,8 ± 4,3
Kontrollen	90	54	36	9,1 ± 5,3

## **2.2 Methodik**

### **2.2.1 Probengewinnung**

Von jeder Routineblutentnahme aus einer peripheren Vene eines Patienten der gastroenterologischen Ambulanz, beziehungsweise präoperativ bei den Kontrollperson wurden zusätzlich 10 ml EDTA-Blut für die Studie entnommen.

Das Blut wurde im Kühlschrank bei 4°C kurzzeitig aufbewahrt und innerhalb einer Stunde bei 1000 g zentrifugiert, das Plasma abgezogen und in Eppendorfhütchen gemäß den für die verschiedenen Untersuchungen geforderten Mengen aliquotiert.

Die Plasmaprobe für die Bestimmung des Cholesterinspiegels wurde bis zur Messung bei minus 20° C eingefroren.

130 µl Plasma zur Bestimmung des Vitamin C Spiegels wurden zum Ausfällen der Eiweiße mit 130 µl 10%iger Metaphosphorsäure (HPO<sub>3</sub>) gemischt, in einer Zentrifuge abzentrifugiert, der Überstand abpipettiert und bei minus 80° C bis zur Messung eingefroren.

Die übrigen Plasmaproben wurden mit Argon überschichtet und bei minus 80° C bis zur Messung aufbewahrt.

## 2.3 Laboruntersuchungen

### 2.3.1 TRAP (Total radical-trapping antioxidant parameter)

Die Radikalfängerkapazität von Patientenplasma wurde mit der TRAP-Methode nach Wayner et al. [86] in der abgewandelten Form nach Thurnham [78] bestimmt.

TRAP gibt die Anzahl der Peroxidmoleküle in Mol pro Liter Plasma wieder, die durch synergistisch agierende unterschiedliche Bestandteile des Plasmas gefangen (trapped) werden.

Den Hauptbeitrag an der TRAP im Blutplasma haben Harnsäure, Plasmaprotein-SH-Gruppen, Vitamin C und  $\alpha$ -Tocopherol (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Radikalfänger, Anteil an der TRAP nach Wayner [85]

Antioxidans	Anteil an der TRAP in %	
	m $\pm$ SD	Spannbreite
Harnsäure	58 $\pm$ 18	35 - 65
Plasmaprotein-SH-Gruppen	21 $\pm$ 10	10 - 50
Vitamin C	14 $\pm$ 8	0 - 24
Vitamin E	7 $\pm$ 2	5 - 10

Die Messung fand in einer Meßkammer statt, die lichtgeschützt in ein von 37°C warmem Wasser kontinuierlich durchspültes Becken auf einem Magnetrührwerk tauchte. Die Meßkammer wurde mit der Sauerstoffmesselektrode luftdicht verschlossen. Während des gesamten Meßvorgangs wurde die Probe mit Magnetrühren vermischt, entstehende Gasblasen wurden regelmäßig abgelassen. Die Sauerstoffsättigung wurde mit zwei- oder vierkanaligen Sauerstoffschreibern (Firma Yellow Springs, Ohio, USA) gemessen und aufgezeichnet.

Die Peroxidation von 1,9  $\mu$ l in 3 ml Phosphatpuffer (PBS-Dulbeco, Firma Seromed) gelöster Linolsäure (Firma Sigma), durch 30  $\mu$ l ( $\cong$  0,4mM) des wasserlöslichen Freie-Radikale-Initiators ABAP ((2,2'-Azo-bis-2-amidipropan-Hydrochlorid) Polysciences, Warrington, PA), wurde über den Sauerstoffverbrauch mit Hilfe der Sauerstoffelektrode ermittelt.

ABAP ist ein thermolabiler Freie-Radikale-Initiator, welcher bei seiner Dekomposition eine über die Zeit konstante Menge von freien Radikalen produziert. Die freien Radikale reagieren im Meßsystem unter Verbrauch von Sauerstoff mit der Linolsäure zu Peroxylradikalen. Diese setzen den oben beschriebenen Prozeß der Lipidperoxidation in Gang (siehe Abbildung 1).

Antioxidantien unterbrechen diese Kettenreaktion, indem sie die Peroxylradikale abfangen. Durch die gleichzeitige Zugabe von 48 µl Patientenplasma zur Linolsäuremischung wurde eine maximale Sauerstoffabnahme für eine bestimmte Zeit („*T-Plasma*“) verhindert. Nach Verbrauch des Plasma, erkennbar an dem erneuten ungehemmten Sauerstoffverbrauch wurde zur Kalibrierung des Systems eine bestimmte Menge des wasserlöslichen Vitamin E Analogons TROLOX ((6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylsäure) Firma Fluka), in die Meßzelle injiziert, welches in bekanntem Maße die ungehemmte Linolsäureperoxidation für eine bestimmte Zeit („*T-TROLOX*“) verhindert (siehe Abbildung 2).

### Sauerstoffsättigungskurve der TRAP-Messung

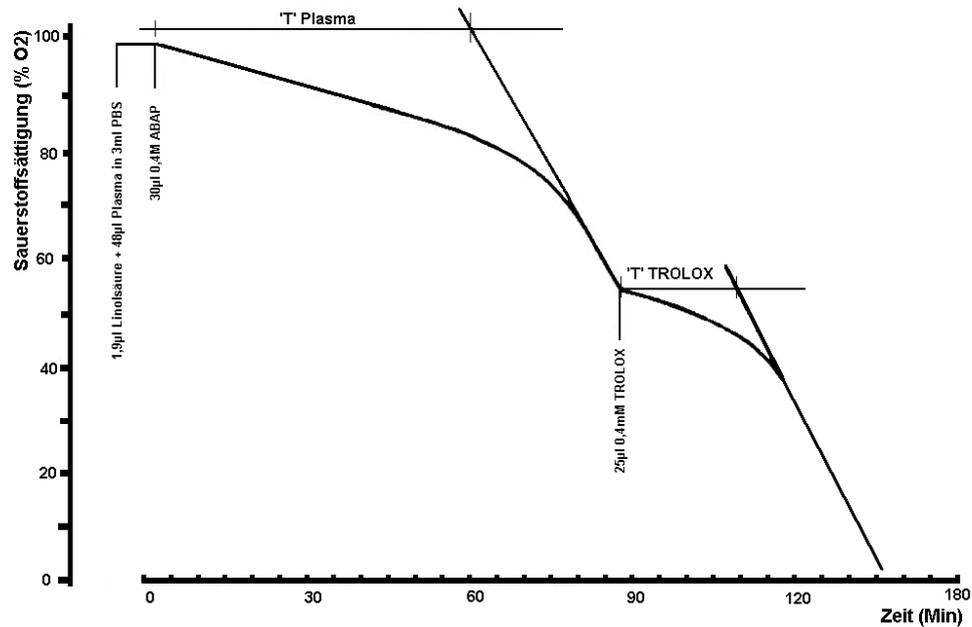


Abbildung 2: TRAP (Total radical-trapping antioxidant parameter): Die Peroxidation von Linolsäure wird durch den Freie Radikale Initiator ABAP gestartet und aufrechterhalten, dabei wird konstant Sauerstoff verbraucht. Die Peroxidation wird durch die Zugabe von Plasma (T-Plasma) und einer bekannten Menge des wasserlöslichen Vitamin E Analogons TROLOX (T-TROLOX) inhibiert.  $TRAP_{meas} (\mu\text{mol/l}) = 2 * [\text{TROLOX}] * n * T\text{-Plasma} / T\text{-TROLOX}$  ( $n = \text{Verdünnungsfaktor des Plasmas}$ ).

### ***2.3.1.1 Meßvorgang im Einzelnen***

Die Glasküvetten mit Magnetrührern wurden mit 3 ml PBS befüllt, etwaige Luftblasen entfernt, in das auf 37° C vorgewärmte Wasserbad eingehängt und mit den Sauerstoffelektroden verschlossen. Die Sauerstoffelektroden wurden einmal täglich nach Vorschrift geeicht. 5,2 µl Linolsäure wurden mit 130 µl Plasma in Eppendorfhütchen 40 Sekunden auf einem Vortex verwirbelt, es entstand ein milchig-trübes Gemisch. Die Magnetrührer wurden wieder ausgeschaltet und die Sauerstoffelektroden aus den Meßkammern gezogen. Mit je 50 µl des Linolsäure-Plasma-Gemisches ließen sich pro Meßprobe zwei Meßkammern befüllen, dabei wurde die Pipettenspitze durch dreifaches Ansaugen und Ablassen der Mischung gespült. Die Sauerstoffelektroden wurden wieder eingesetzt und entstandene Luftblasen durch Verschieben des Elektrodenhalters zerstört. Der Sauerstoffschreiber wurden gestartet, man wartete ab bis eine konstante Sauerstoffsättigung erreicht war und justierte den Sauerstoffschreiber auf 100% Sauerstoffsättigung. Die Peroxidationsreaktion wurde über die Zugabe des ABAP gestartet. Zur Vermeidung von Lichteinwirkungen wurde 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, nannten wir „T-Plasma“. Sie spiegelt die gesamte antioxidative Aktivität des Plasmas wieder, dessen verschiedene Antioxidantien die Peroxidation der Linolsäure hemmen.

Nach Beginn der ungehemmten Peroxidation wurde das System bei 50% Sauerstoffsättigung über die Zugabe von 25 µl ( $\cong$  0,4mM) TROLOX kalibriert.

Bei einer Sauerstoffsättigung von 0% war der Versuch beendet.

Die TRAP errechnet sich in µmol/l aus der Konzentration von TROLOX (hier 3,22 µmol/l) multipliziert mit 2 (ein Mol TROLOX „fängt“ 2 Mol freier Radikale), dem Plas-maverdünnungsfaktor  $n$  (hier 20) und der Zeit T-Plasma dividiert durch die Zeit T-TRO-LOX. Die gemessene TRAP wird im folgenden  $TRAP_{meas}$  genannt.

### 2.3.1.2 Errechnete TRAP

Die gemessene TRAP wurde mit einer stoichiometrisch aus den Hauptplasmaantioxidantien berechneten TRAP verglichen, diese wird im folgenden  $TRAP_{calc}$  genannt. Die  $TRAP_{calc}$  berechnet sich nach Wayner et al. und Stocker mit experimentell ermittelten effektiven Multiplikationsfaktoren, entsprechend der Fähigkeit pro Mol des Antioxidans Peroxylradikale zu fangen, und wird in  $\mu\text{mol/l}$  angegeben. (siehe Tabelle 3) [77, 86].

Tabelle 3: Effektiver Multiplikationsfaktor der Antioxidantien bei der errechneten TRAP

Antioxidantien in $\mu\text{Mol/l}$	Multiplikationsfaktor
Vitamin E ( $\alpha$ -Tocopherol )	2
Vitamin C (Ascorbinsäure)	1,7
Harnsäure	1,3
Bilirubin	2
Protein-SH-Gruppen	0,33

### 2.3.2 Vitamin C

Die Ascorbinsäure im Serum wurde indirekt spektrophotometrisch nach Omaye bestimmt [66]. Sämtliche Reagenzien wurden von der Firma Merck bezogen. Das Meßprinzip beruht darauf, daß Ascorbinsäure DCIP (2,6-Dichlorphenolindophenol, 0,1 mg/ml)) reduziert, dabei nimmt die Lichtabsorption bei 520 nm ab. Die Abnahme der Absorption spiegelt die Ascorbinsäurekonzentration wieder.

Zum Probenansatz nimmt man 100  $\mu\text{l}$  des mit 10%iger  $\text{HPO}_3$  (Metaphosphorsäure) gefällten Plasmaüberstandes und mischt es mit 300  $\mu\text{l}$  5%iger  $\text{HPO}_3$ , 200  $\mu\text{l}$  Citrat-Acetat-Puffer (Herstellung: 22g Na-Citrat in 40 ml bidest- $\text{H}_2\text{O}$  lösen, mit 96%igem Eisessig auf pH 4,15 titrieren, auf 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$  auffüllen) und mit 200  $\mu\text{l}$  DCIP. Nach 30 Sekunden erfolgt in einem Photometer bei 520 nm die Messung des Probenwerts ( $E_1$ ).

Nach Zugabe von Ascorbinsäure in den Probenansatz, es kommt zu einer vollständigen Entfärbung, erfolgt die Messung des Probenleerwerts ( $E_2$ ).

Zur Bestimmung des Reagenzienwerts vermischt man 400  $\mu\text{l}$  5%ige  $\text{HPO}_3$  mit 200  $\mu\text{l}$  Citrat-Acetat-Puffer und 200  $\mu\text{l}$  DCIP und mißt die Absorption.

Zum Herstellen einer Standardmessreihe mit 6 unterschiedlichen Ascorbinsäurekonzentrationen wird von einer Ausgangslösung mit 20 µg Ascorbinsäure pro Milliliter (200 mg Ascorbinsäure gelöst in 10 ml 5%iger  $\text{HPO}_3$ , wovon 50 µl auf 50 ml mit 5%iger  $\text{HPO}_3$  aufgefüllt werden) ausgegangen. Die Standards werden jeweils in der Konzentration halbiert. Den Standards wird je 200 µl Citratpuffer und 200 µl DCIP zugegeben, gemischt und nach 30 Sekunden bei 520 nm im Photometer gemessen ( $E_1$ ), dann erfolgt nach Zugabe von Ascorbinsäure die Messung des Probenleerwerts ( $E_2$ ).

Die Extinktion ( $\Delta E$ ) ergibt sich aus  $E_1$  minus  $E_2$ , sie wird vom Reagenzienwert subtrahiert. Mit Hilfe eines elektronischen Rechners wird aus den Standardextinktionen eine Eichkurve erstellt, und daraus nach Eingabe der Probenextinktion die Ascorbinsäurekonzentration abgelesen und in µmol/l umgerechnet.

### **2.3.3 Tocopherole, Ubichinon und Ubichinol**

Die fettlöslichen Antioxidantien  $\alpha$ -Tocopherol,  $\gamma$ -Tocopherol, Ubichinol-10 und Ubichinon-10 wurden mit einer Methode nach Finckh et al. [28] elektrochemisch mittels Reverse Phase HPLC (High Performance Liquid Chromatography) gemessen.

#### **2.3.3.1 Chemikalien und Standards**

Ubichinon-7, -9, 10 wurden von der Firma Sigma bezogen,  $\alpha$ -Tocopherol,  $\gamma$ -Tocopherol,  $\delta$ -Tocopherol,  $\gamma$ -Tocotrienol und HPLC-Lösungsmittel (Lichrosolv) von der Firma Merck und Lithiumperchlorat von der Firma Fluka. Alle anderen Chemikalien waren von analytischem Grad und wurden von der Firma Sigma bezogen. Das Laufmittel bestand aus 13,4 mM Lithiumperchlorat in Methanol:Ethanol:2-Propanol (88:24:10, v/v). Der Reagenzalkohol bestand aus Ethanol und 2-Propanol (95:5, v/v). Die interne Standardlösung (50 µl) enthielt 122 pmol  $\gamma$ -Tocotrienol, 5,6 pmol Ubichinol-9, 8,5 pmol Ubichinon-7 und 0,2 pmol Ubichinon-9 in Ethanol gelöst. Ubichinol-7,-9 und -10 wurden aus den dazugehörigen Ubichinonen durch Reduktion mit Natriumdisulfat hergestellt. Alle Standardgrundlösungen wurden bei minus 20 Grad Celsius unter Argon aufbewahrt. Der interne Standard wurde aus 120 µl  $\gamma$ -Tocopherol, 50 µl Ubichinon-7 und 80 µl Ubichinol-9 hergestellt.

### ***2.3.3.2 Probenpräparation***

Für die Patientenplasmaproben wurden 100 µl Plasma mit 50 µl internem Standard und 50 µl β-Hydroxytoluol Lösung (111 mg / 100 ml Ethanol) vermischt und 10 Sekunden auf einem Vortex verwirbelt. Die gesamte Präparation fand unter Lichtschutz statt. Zu dieser Mischung gab man 500 µl Hexan, verwirbelte die Mischung für 2 Minuten und zentrifugierte alles bei 100g.

Der Überstand wurde abpipettiert und mit Argon bis zur Trockenheit eingedampft.

Zur besseren Ausbeute lipophiler Substanzen wurde das Sediment ein weiteres Mal mit 500 µl Hexan überschichtet, wie oben vermischt, zentrifugiert und der Überstand im selben Reagenzglas wie vorher eingedampft.

Zur anschließenden Messung wurde die trockene Phase wieder in 300 µl RM-Alkohol (Reagenzalkohol : Methanol, 50 : 50, v/v) gelöst.

### **2.3.3.3 Messung**

Im HPLC-System arbeitete eine Pumpe (Modell 2150, Firma Pharmacia), welche die mit Helium entgaste mobile Phase mit einem konstanten Pumpvolumen von 1,2 ml pro Minute transportierte.

40  $\mu$ l der Plasmaprobe wurden bei Raumtemperatur in eine 20  $\mu$ l Schleife (Rheodyne, Cotati, CA) injiziert und zum Schutz der Hauptsäule durch eine Vorsäule (10 x 4,0 mm I.D., 5  $\mu$ m Partikelgröße, Firma Pharmacia) gepumpt.

Beim anschließenden Transport durch die Hauptsäule (SuperPac Pep-S RP<sub>C<sub>2</sub>/C<sub>18</sub></sub>, 250 x 4,0 mm I.D., 5  $\mu$ m Partikelgröße, Firma Pharmacia) wurde die Probe je nach ihrer unterschiedlichen Adsorption an das Kieselgel aufgetrennt.

Mit einem elektrochemischen Detektor (Coulochem Modell 5100 A oder 5200, Firma ESA) erfolgte über zwei Elektroden die elektrochemische Messung der Probe nach dem Reduktions-Oxidations-Prinzip: Beim Durchfließen der ersten Elektrode in der coulometrischen Konditionierungszelle (Modell 5020, -0,60 V) wurden Ubichinon-9 und -10 reduziert und beim Passieren der amperometrischen zweiten Elektrode in der Detektionszelle (Modell 5011, Elektrode-1: -0,15 V, Elektrode-2: +0,60 V) die Oxidationsstromstärke gemessen.

Die chromatographischen Kurven wurden zu einem Teil auf einem Personalcomputer (Software: Hyperdata Chromsoft, Firma Bischoff) und zu einem anderen Teil auf einem Integrator (SP 4270, Firma Spectraphysics) berechnet (siehe Abbildung 3).

### **2.3.3.4 Berechnung**

Die Konzentration der lipophilen Antioxidantien bestimmte man durch den Vergleich der Integrale der zu messenden Substanz mit dem jeweils dazugehörigen internen Standard und Umrechnung mit den Verdünnungsfaktoren.  $\gamma$ -Tocotrienol wurde als interner Standard für  $\gamma$ -Tocopherol und  $\alpha$ -Tocopherol, Ubiquinol-9 als interner Standard für Ubiquinol-10 und Ubiquinon-9 oder alternativ Ubiquinon-7 als interne Standards für Ubiquinon-10 benutzt.

HPLC-Chromatogramme zur Bestimmung von Ubichinol-10, Ubichinon-10,  $\alpha$ -Tocopherol und  $\gamma$ -Tocopherol.

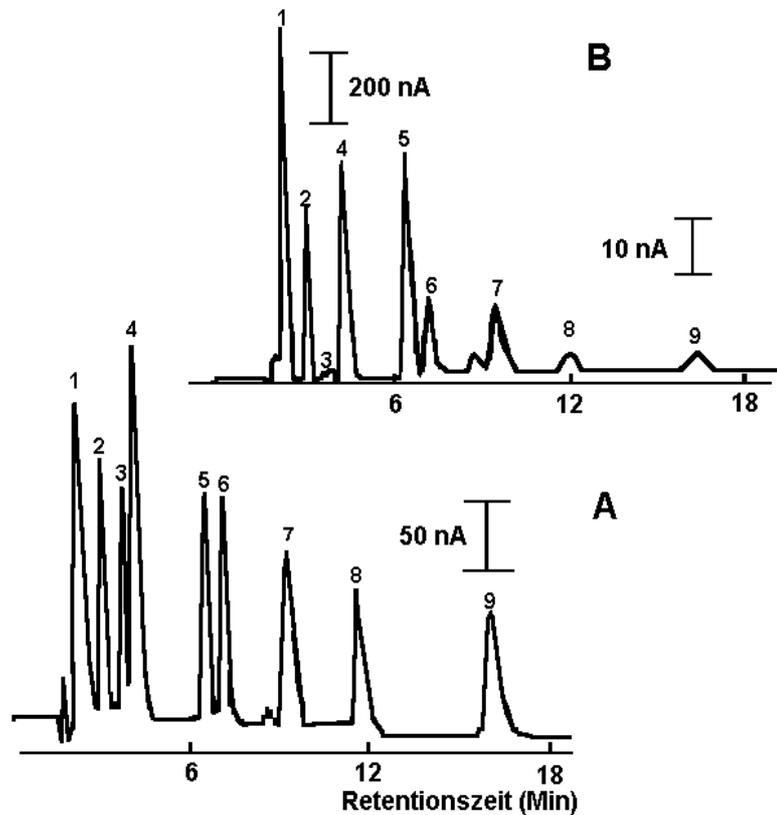


Abbildung 3: Typische HPLC-Chromatogramme einer Standardlösung (A) und einer Plasmaprobe (B), nach Finckh et al.[28]:

Die Standardlösung enthielt  $\beta$ -Hydroxytoluol (1),  $\gamma$ -Tocotrienol (2),  $\gamma$ -Tocopherol (3),  $\alpha$ -Tocopherol (4), Ubichinon-7 (5), Ubichinol-9 (6), Ubichinol-10 (7), Ubichinon-9 (8) und Ubichinon-10 (9). Die Kurven des Chromatogramms wurden integriert und die Fläche unter der Kurve der zu untersuchenden lipophilen Antioxidans jeweils mit einem internen Standard verglichen und unter Berücksichtigung eines Verdünnungsfaktors deren Konzentration berechnet.

### 2.3.4 Harnsäure

Die Harnsäurekonzentration im Probanden Plasma wurde photometrisch mit einem enzymatischen Test nach Town et al. [79] im Zentrallabor des UKE bestimmt.

### 2.3.5 SH-Gruppen

Die Konzentration der SH-Gruppen im Serum wurden photometrisch bei 412 nm nach Reduktion von DTNB (5,5 Dithio-bis-2-Nitrobenzoic Säure, Firma Sigma) in einem modifizierten Verfahren nach Ellmann [25] gemessen.

Zur Herstellung der 10 mM DTNB-Lösung wurden 39,6 mg DTNB in 10 ml 0,025 M Phosphatpuffer gelöst und nachfolgend filtriert.

Phosphatpuffer Herstellung: 30,5 ml 0,2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Di-Natriumhydrogenphosphat, Firma Merck) und 19,5 ml 0,2 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Natriumhydrogenphosphat, Firma Merck) wurden mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf 100 ml aufgefüllt und gemischt. Davon wurden 25ml mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf 100 ml aufgefüllt und gemischt. Dies ergab einen 0,025 M Phosphatpuffer mit pH 7.

50  $\mu\text{l}$  Plasma wurden mit 50  $\mu\text{l}$  NaCl (Firma Merck), 900  $\mu\text{l}$  EDTA (Firma Merck) und 20  $\mu\text{l}$  DTNB-Lösung gemischt und 30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei kommt es zu einer Reduktion von DTNB zu 2-Nitro-5-Mercaptobenzolsäure, welches eine intensiv gelbe Färbung aufweist. Das Reaktionsverhältnis von SH-Gruppen zu DTNB war 1:1 Mol. Bei 412 nm wurde in einem Photometer die Extinktion ermittelt.

Die Standards, ausgehend von 100  $\mu\text{l}$  einer Glutathionlösung 1 nM wurden bis zu einer 0,063 mM Lösung verdünnt. Sie wurden wie die Plasmaproben mit EDTA und DTNB vermischt. Nach 30 Min. Inkubation bei Raumtemperatur wurde bei 412 nm im Photometer die Extinktion gemessen. Die Standardextinktionen wurden auf eine Kurve aufgetragen und davon mit der Probenextinktion die Glutathion Konzentration der Proben abgelesen und in  $\mu\text{mol/l}$  umgerechnet.

### 2.3.6 Bilirubin

Die Gesamt-Bilirubin Konzentrationen des Probanden Plasmas wurden photometrisch im Zentrallabor des Universitätskrankenhauses Eppendorf mit der DPD-Methode nach Wahlfeld [83] gemessen.

### **2.3.7 Cholesterin**

Die Gesamtcholesterinkonzentrationen wurden photometrisch mit einem Testkit der Firma Boehringer durch ein enzymatisches Verfahren nach Sherlock [73] bestimmt.

Zur Messung wurden 0,01 ml Plasma mit 1 ml Reagenzlösung vermischt, in eine Küvette einpipettiert und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Blutplasma enthält Cholesterinester sowie freies Cholesterin. Zur Spaltung der Ester enthielt die Reagenzlösung eine Cholesterinesterase, welche die Plasmacholesterinester zu freiem Cholesterin spaltet. Das vorhandene und durch die vorherige Reaktion entstandene freie Cholesterin wurde durch eine Cholesterinoxidase oxidiert, dabei entstand Wasserstoffperoxid, welches mit 4-Aminophenazon und Phenol zu dem Farbstoff 4-p-Benzochinonmonoimino-phenazon reagierte.

Die Absorption dieses Farbstoffes wurde bei 546 nm Wellenlänge in einem Photometer gemessen und daraus die Cholesterinkonzentration berechnet (Absorption multipliziert mit 853).

### **2.3.8 Übrige Parameter**

Die Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (BKS) nach Westergren wurde in der Gastroenterologischen Ambulanz bestimmt. Alle übrigen Parameter (Differenzialblutbild, Eisen, Serumelektrophorese (Albumin,  $\alpha$ 1 Globulin,  $\alpha$ 2 Globulin,  $\beta$  Globulin,  $\gamma$  Globulin.)) wurden mit Standardmethoden im Zentrallabor des UKE bestimmt.

## 2.3.9 Klinische Parameter

### 2.3.9.1 PCDAI (*Paediatric Crohn's Disease Activity Index*) nach Harms

Vier einfache Labor- (BKS,  $\alpha$ 2 Globulin, stabkernige Granulozyten, Eisen) und 2 klinische Parameter (Appetit, Stuhlfrequenz) werden über einen Berechnungsfaktor (siehe Tabelle 4) summiert. Dies ergibt einen Punktwert, der laut Harms et al. ausgezeichnet mit dem Schweregrad der Erkrankung an Morbus Crohn erkrankter Kinder korreliert [42].

Tabelle 4: Berechnung des PCDAI nach Harms

Berechnungsfaktor	Parameter
20,2	Appetit (1=gut, 2=mäßig, 3=schlecht)
2,4	Anzahl der Stühle pro Woche
0,8	BKS (mm/h)
-0,3	Serum-Eisenkonzentration ( $\mu$ g/dl)
4,1	$\alpha$ 2 Globulin (% des Serum-Gesamtproteingehalts)
1,3	Stabkernige Granulozyten (% der weißen Blutkörperchen)

Punktwerte unter 150 zeigen eine niedrige, zwischen 150 und 220 eine mäßige und über 220 eine hohe Krankheitsaktivität an (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Krankheitsaktivitätsgruppen des PCDAI nach Punktwerten

Krankheitsaktivität	PCDAI-Punkte
gering	<150
mäßig	150 - 220
hoch	>220

### 2.3.9.2 CUI (Colitis ulcerosa Activity Index) nach Rachmilewitz

Nach Rachmilewitz werden sechs klinische und zwei Laborparameter über einen Bewertungsfaktor summiert (siehe Tabelle 6) [67]. Der Punktwert gibt die Krankheitsaktivität bei Colitis ulcerosa wieder.

Tabelle 6: Beurteilungsparameter für den CUI (Colitis ulcerosa Activity Index) nach Rachmilewitz

Parameter	Bewertungskriterien	Bewertung
Stuhlfrequenz /Woche	< 18	0
	18-35	1
	36-60	2
	>60	3
Meläna	keine	0
	wenig	2
	viel	4
Allgemeinzustand	gut	0
	durchschnittlich	1
	schlecht	2
	sehr schlecht	3
Abdominelle Schmerzen/Krämpfe	keine	0
	leicht	1
	mäßig	2
	stark	3
Körpertemperatur (aufgrund der Colitis)	37-38	0
	>38	3
Extraintestinale Symptome	Iritis	3
	Erythema nodosum	3
	Arthritis	3
Laborparameter	BKS >50 /h	1
	BKS > 100 /h	2
	Hämoglobin < 100 g/l	4

Ein Gesamtscore <4 bedeutet Remission, 4-7 leichter Schub, 8-9 mittelschwerer Schub und ≥10 schwerer Schub der Colitis ulcerosa. Der CUI ist für Erwachsene Patienten entworfen worden und wird in der Regel zusammen mit einem endoskopischen Index erhoben.

### 2.3.10 Statistik

Die Statistik wurde auf einem Personalcomputer mit dem Programm *Statistica* berechnet.

Die Meßwerte werden im folgenden in Tabellen als Mittelwert ( $m$ )  $\pm$  die Standardabweichung (SD) wiedergegeben.

Die signifikanten Ergebnisse werden zusätzlich in Grafiken mit Mittelwert, Standardabweichung, Minimum und Maximum veranschaulicht.

Das Signifikanzniveau liegt bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ( $p < 0,05$ ).

Statistische Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet und die Signifikanz in „p“ angegeben.

Korrelationen wurden nach Spearman berechnet und werden in „r“ angegeben, die Signifikanz in „p“.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Antioxidantien im Plasma

#### 3.1.1 Gemessene TRAP im Plasma

Die TRAP<sub>meas</sub> der Patientengruppen war bei den Morbus Crohn Patienten um 31% und bei den Colitis ulcerosa Patienten um 20% erhöht gegenüber den Kontrollen (siehe Abbildung 4).

Bei den Morbus Crohn Patienten war die Erhöhung gegenüber der Kontrollgruppe hoch signifikant ( $p < 0,0001$ ), bei den Colitis ulcerosa Patienten nicht signifikant ( $p = 0,08$ ).

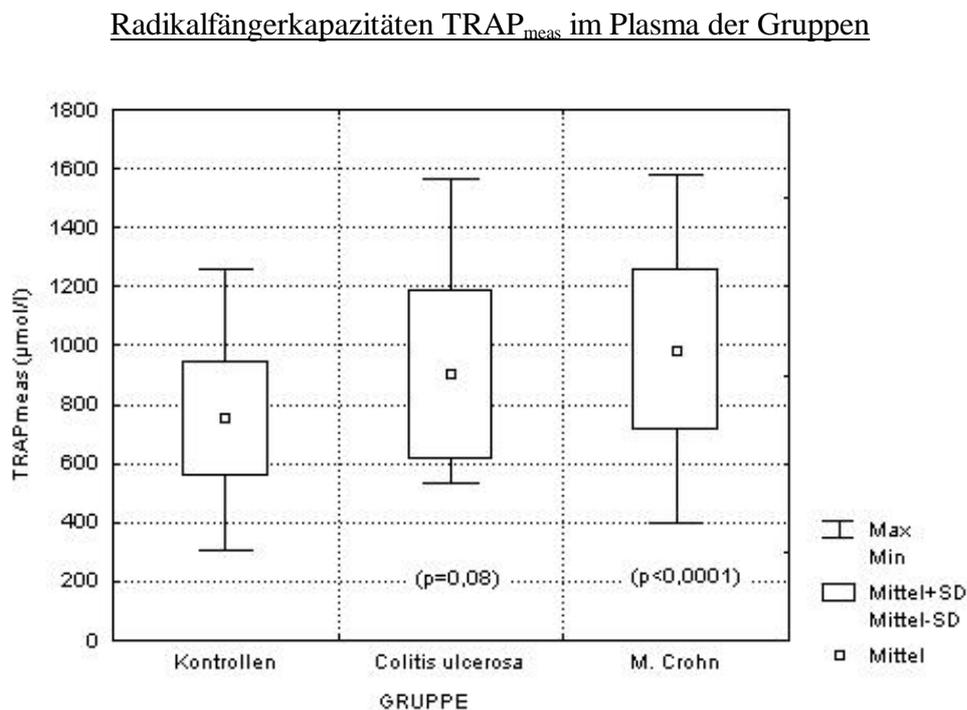


Abbildung 4: Gemessene TRAP-Konzentrationen im Plasma von Kontrollpersonen ( $n=57$ ), Patienten mit Colitis ulcerosa ( $n=21$ ) und Morbus Crohn ( $n=29$ ).

### 3.1.2 Errechnete TRAP im Plasma

Die aus den einzelnen Plasma Antioxidantien errechnete TRAP war bei beiden Patientengruppen nicht signifikant unterschiedlich von der errechneten TRAP der Kontrollgruppe (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: Konzentrationen der errechneten TRAP im Plasma

<b>Gruppe</b>	<b>TRAP<sub>calc</sub> in <math>\mu\text{mol/l}</math></b>
Kontrollen (n=13)	644 $\pm$ 177
Morbus Crohn (n=21)	709 $\pm$ 108
Colitis ulcerosa (n=19)	672 $\pm$ 146

### 3.1.3 Vitamin C im Plasma

Die Vitamin C Spiegel im Blutplasma waren bei den Morbus Crohn Patienten um 29% und bei der Colitis ulcerosa Gruppe um 21% erniedrigt gegenüber der Kontrollgruppe (siehe Abbildung 5).

Die Erniedrigung der Vitamin C-Konzentrationen war bei den Morbus Crohn Patienten signifikant ( $p < 0,05$ ), bei den Colitis ulcerosa Patienten nicht signifikant.

#### Vitamin C-Konzentrationen im Plasma der Gruppen

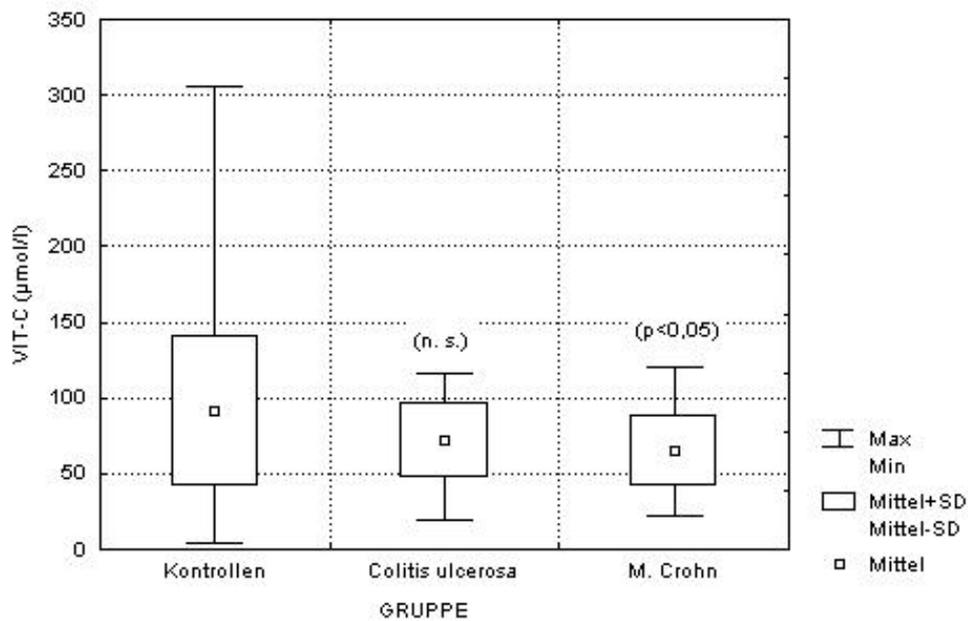


Abbildung 5: Konzentrationen des Vitamin C im Plasma von Kontrollpersonen ( $n=83$ ), Patienten mit Colitis ulcerosa ( $n=19$ ) und Morbus Crohn ( $n=25$ ).

### 3.1.4 Vitamin E im Plasma

#### 3.1.4.1 $\alpha$ -Tocopherol im Plasma

Die Plasmakonzentration für  $\alpha$ -Tocopherol waren bei den Morbus Crohn Patienten um 78% und die der Colitis ulcerosa Patienten um 43% erhöht gegenüber den Kontrollpersonen (siehe Abbildung 6).

Die Erhöhung der  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentrationen im Plasma war bei den Morbus Crohn Patienten mit  $p < 0,0001$  und bei den Colitis ulcerosa Patienten mit  $p < 0,0005$  hoch signifikant .

#### $\alpha$ -Tocopherol-Konzentrationen im Plasma der Gruppen

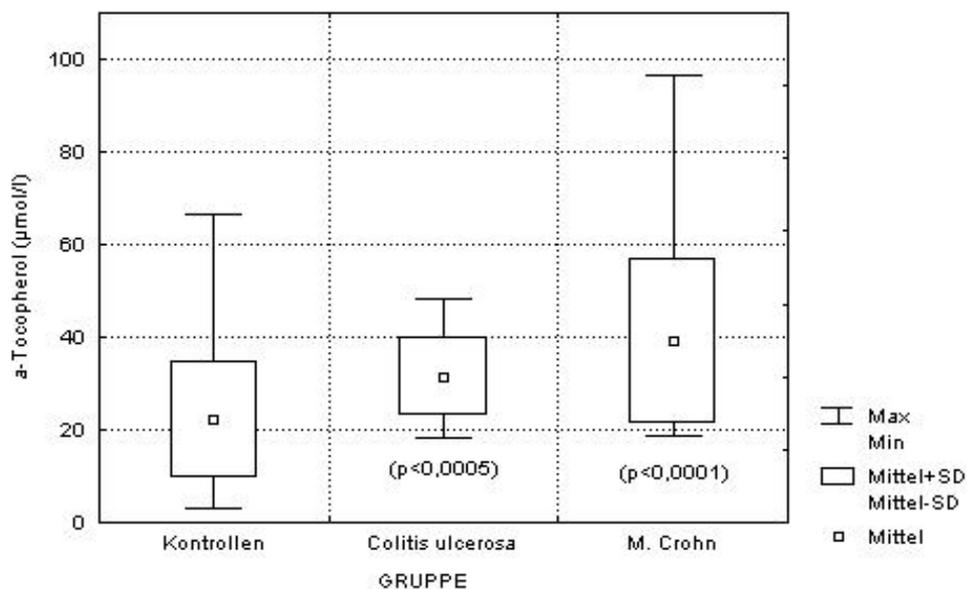


Abbildung 6: Konzentrationen des  $\alpha$ -Tocopherol im Plasma von Kontrollpersonen ( $n=48$ ), Patienten mit Colitis ulcerosa ( $n=20$ ) und Morbus Crohn ( $n=29$ ).

### 3.1.4.2 $\alpha$ -Tocopherol-Cholesterin-Quotient

Am zuverlässigsten lässt sich der Vitamin E-Status mit dem errechneten  $\alpha$ -Tocopherol-Cholesterin-Quotienten bewerten, da die Plasmaspiegel der fettlöslichen Vitamine direkt mit den Lipidplasmaspiegeln korrelieren [75].

Die  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentration im Verhältnis zum Cholesterinspiegel war bei den Morbus Crohn Patienten um 117% und bei den Colitis ulcerosa Patienten um 63% erhöht gegenüber den Kontrollpersonen (siehe Abbildung 7).

Die Erhöhungen des  $\alpha$ -Tocopherol-Cholesterin-Quotienten waren bei den Morbus Crohn Patienten mit  $p < 0,0001$  und bei den Colitis ulcerosa Patienten mit  $p < 0,0001$  hoch signifikant.

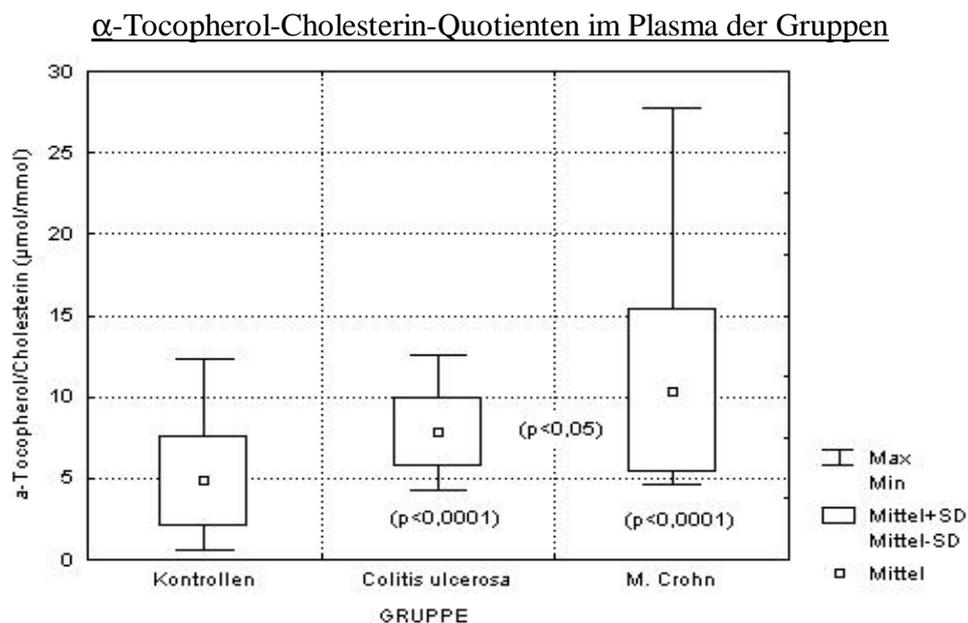


Abbildung 7: Errechnete  $\alpha$ -Tocopherol-Cholesterin-Quotienten im Plasma von Kontrollpersonen ( $n=48$ ), Patienten mit Colitis ulcerosa ( $n=20$ ) und Morbus Crohn ( $n=29$ ).

### 3.1.4.3 $\gamma$ -Tocopherol im Plasma

Die  $\gamma$ -Tocopherol-Konzentrationen der unterschiedlichen Gruppen unterschieden sich nicht signifikant voneinander (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8:  $\gamma$ -Tocopherol im Plasma

<b>Gruppe</b>	<b><math>\gamma</math>-Tocopherol (<math>\mu\text{mol/l}</math>)</b>
Kontrolle (n=40)	2,15 $\pm$ 0,74
Morbus Crohn (n=29)	2,07 $\pm$ 1,25
Colitis ulcerosa (n=20)	1,95 $\pm$ 1,10

### 3.1.4.4 $\gamma$ -Tocopherol-Cholesterin-Quotient

Die  $\gamma$ -Tocopherol-Cholesterin-Quotienten der unterschiedlichen Gruppen unterschieden sich nicht signifikant voneinander (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9:  $\gamma$ -Tocopherol-Cholesterin-Quotient im Plasma

<b>Gruppe</b>	<b><math>\gamma</math>-Tocopherol-Cholesterin-Quotient (<math>\mu\text{mol}/\text{mmol}</math>)</b>
Kontrolle (n=40)	0,45 $\pm$ 0,17
Morbus Crohn (n=29)	0,54 $\pm$ 0,32
Colitis ulcerosa (n=20)	0,48 $\pm$ 0,27

### 3.1.5 Q-10<sub>total</sub>, Ubichinol-10 und Ubichinon-10 im Plasma

Das Q-10<sub>total</sub> wird aus Ubichinol-10 und Ubichinon-10 aufsummiert (siehe Tabelle 11). Die Q-10<sub>total</sub> Konzentrationen im Plasma der Gruppen unterschieden sich nicht signifikant voneinander (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10: Gesamt Q-10<sub>total</sub> im Plasma

Gruppe	Q-10 <sub>total</sub> (µmol/l)
Kontrolle (n=22)	1,42 ± 0,67
Morbus Crohn (n=29)	1,26 ± 0,53
Colitis ulcerosa (n=20)	1,17 ± 0,47

Tabelle 11: Komponenten des Q-10<sub>total</sub> im Plasma und prozentualer Anteil des reduzierten Ubichinol-10

Gruppe	Ubichinol-10	Ubichinon-10	Anteil Ubichinol-10 am Q-10 <sub>total</sub>
Kontrollen (n=2)	0,85 ± 0,08	0,13 ± 0,02	87%
Morbus Crohn (n=29)	1,05 ± 0,46	0,21 ± 0,11	83%
Colitis ulcerosa (n=20)	1,00 ± 0,40	0,16 ± 0,12	85%

#### 3.1.5.1 Q-10<sub>total</sub>-Cholesterin-Quotienten

Die Q10<sub>total</sub>-Cholesterin-Quotienten der verschiedenen Gruppen unterschieden sich nicht signifikant voneinander (siehe Tabelle 12).

Tabelle 12: Q-10<sub>total</sub>-Cholesterin-Quotient im Plasma

Gruppe	Q-10-Cholesterin-Quotient (µmol/mmol)
Kontrolle (n=22)	0,31 ± 0,13
Morbus Crohn (n=29)	0,32 ± 0,11
Colitis ulcerosa (n=20)	0,28 ± 0,10

### 3.1.6 Harnsäure im Plasma

Die Harnsäurekonzentration im Plasma war bei den Morbus Crohn Patienten um 31% erhöht gegenüber den Kontrollpersonen. Der Unterschied war mit  $p < 0,0001$  hoch signifikant gegenüber der Kontrollgruppe (siehe Abbildung 8).

Die Colitis ulcerosa Patienten unterschieden sich nicht signifikant von den Kontrollpersonen.

Harnsäure im Plasma der Gruppen

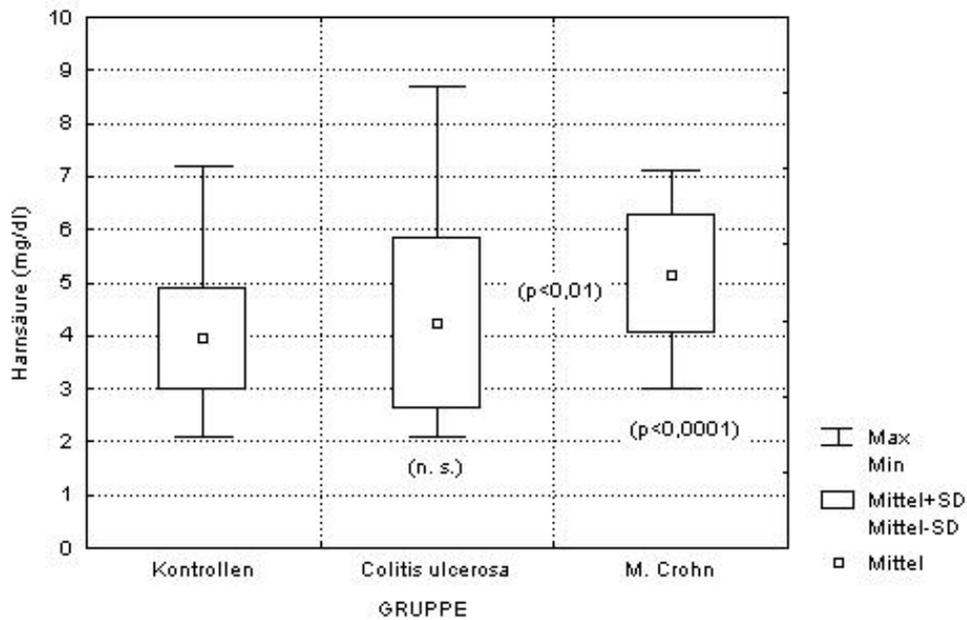


Abbildung 8: Die Harnsäurekonzentration im Plasma von Kontrollpersonen ( $n=43$ ), Patienten mit Colitis ulcerosa ( $n=21$ ) und Morbus Crohn ( $n=27$ ).

### 3.1.7 Protein-SH-Gruppen im Plasma

Die Konzentration der Protein-SH-Gruppen war bei den Morbus Crohn Patienten um 27% und bei den Colitis ulcerosa Patienten um 17% erniedrigt gegenüber den Kontrollpersonen (siehe Abbildung 9).

Die Erniedrigungen der Protein-SH-Gruppen war bei den Morbus Crohn Patienten mit  $p < 0,0001$  und bei den Colitis ulcerosa Patienten mit  $p < 0,0005$  hoch signifikant gegenüber den Kontrollpersonen. Der Unterschied zwischen den Morbus Crohn und den Colitis ulcerosa Patienten war mit  $p < 0,05$  signifikant.

Protein-SH-Gruppen im Plasma der Gruppen

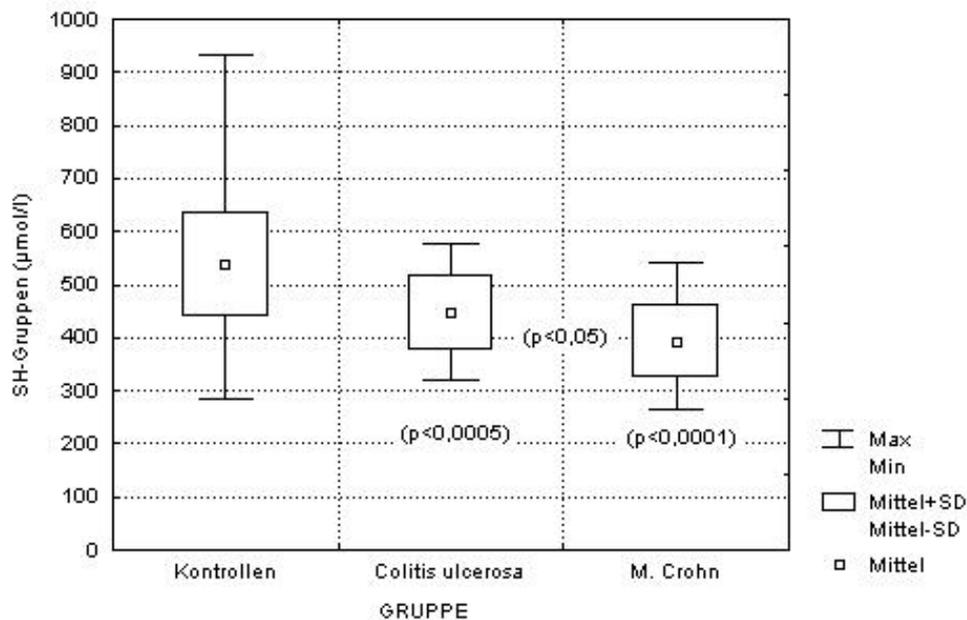


Abbildung 9: SH-Gruppen-Konzentrationen im Plasma von Kontrollpersonen ( $n=48$ ), Patienten mit Colitis ulcerosa ( $n=20$ ) und Morbus Crohn ( $n=29$ ).

### 3.1.8 Bilirubin im Plasma

Die Bilirubinkonzentration im Plasma war bei den Morbus Crohn Patienten um 22% erniedrigt.

Die Erniedrigung war mit  $p < 0,05$  signifikant gegenüber den Kontrollpersonen.

Die Bilirubinkonzentration der Colitis ulcerosa Patienten zeigte keine signifikante Veränderung gegenüber den Kontrollpersonen (siehe Abbildung 10).

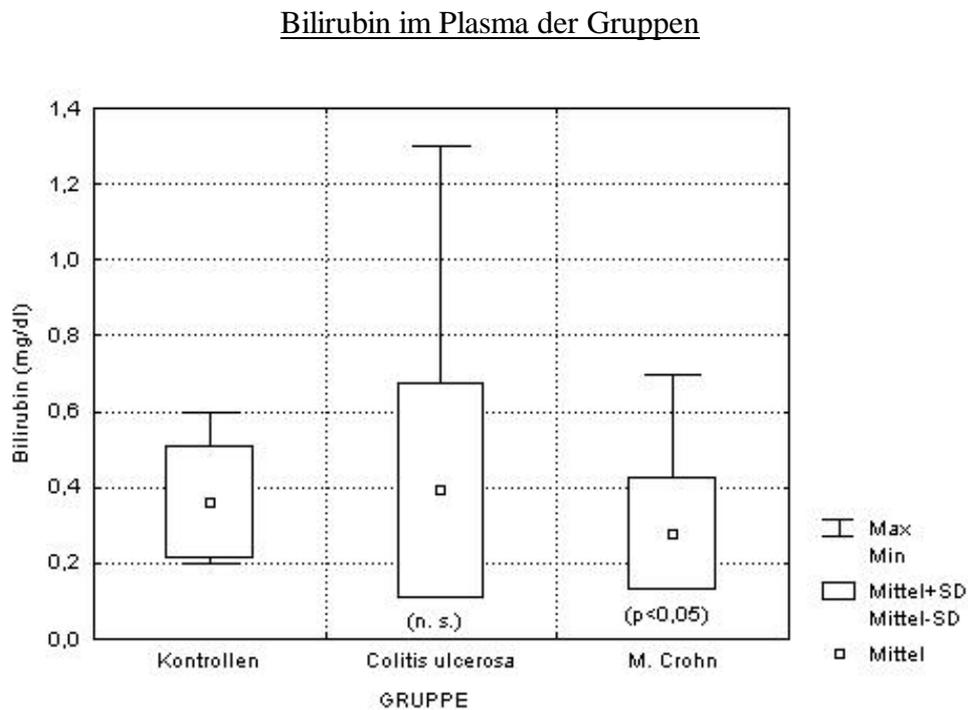


Abbildung 10: Bilirubinkonzentrationen im Plasma von Kontrollpersonen ( $n=33$ ), Patienten mit Colitis ulcerosa ( $n=21$ ) und Morbus Crohn ( $n=26$ ).

### 3.1.9 Cholesterin im Plasma

Die Cholesterin-Konzentrationen der Morbus Crohn Patienten waren um 17,6% und der Colitis ulcerosa Patienten um 13% erniedrigt gegenüber den Kontrollpersonen (siehe und Abbildung 11).

Die Erniedrigungen der Cholesterinkonzentrationen waren bei den Morbus Crohn Patienten mit  $p < 0,0005$  und bei den Colitis ulcerosa Patienten mit  $p < 0,005$  hoch signifikant gegenüber den Kontrollpersonen.

Cholesterin im Plasma der Gruppen

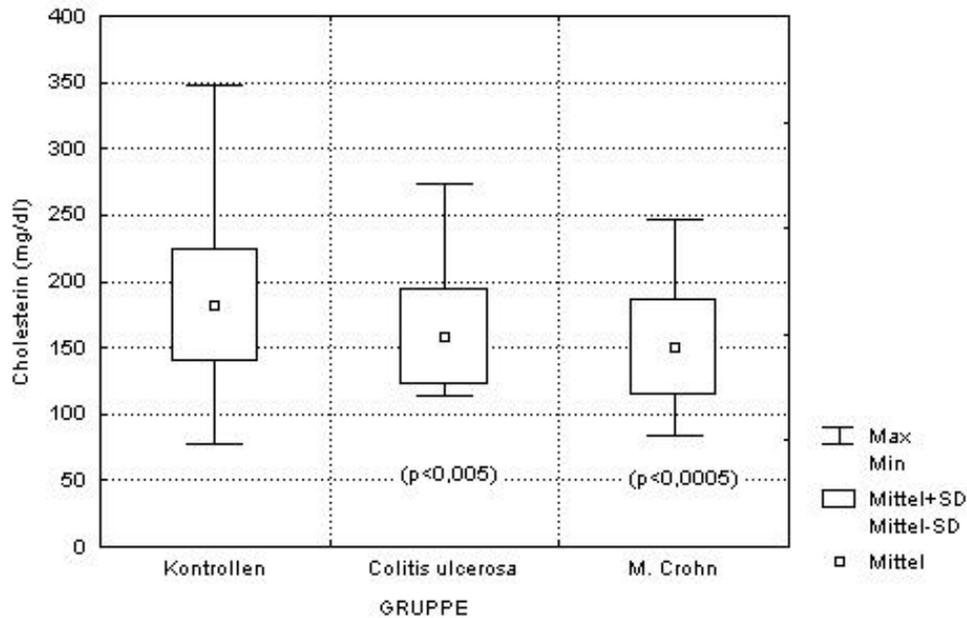


Abbildung 11: Cholesterinkonzentration im Plasma von Kontrollpersonen ( $n=89$ ), Patienten mit Colitis ulcerosa ( $n=21$ ) und Morbus Crohn ( $n=29$ ).

### 3.2 Anteil der Antioxidantien an der $TRAP_{meas}$

Berechnet man mit den in der Einleitung beschriebenen Berechnungsfaktoren (siehe Tabelle 2) den Anteil der für die gemessene TRAP verantwortlich zu machenden Antioxidantien, so zeigt sich eine Lücke bei der Gruppe der Patienten von 27% bei Morbus Crohn und 26% bei Colitis ulcerosa gegenüber 6,4% bei den Kontrollen (siehe Tabelle 13).

Tabelle 13: Plasmaantioxidantien und Radikalfängeranteil an der gemessenen TRAP

Plasmaantioxidantien ( $\mu\text{mol/l}$ )	Multiplikationsfaktor	Kontrollen		Morbus Crohn		Colitis ulcerosa	
		Radikalfängerkapazität ( $\mu\text{mol/l}$ ) / Anteil an der $TRAP_{meas}$ (%)	Radikalfängerkapazität ( $\mu\text{mol/l}$ ) / Anteil an der $TRAP_{meas}$ (%)	Radikalfängerkapazität ( $\mu\text{mol/l}$ ) / Anteil an der $TRAP_{meas}$ (%)	Radikalfängerkapazität ( $\mu\text{mol/l}$ ) / Anteil an der $TRAP_{meas}$ (%)		
$\alpha$ -Tocopherol	2	44,0	5,8	78,4	8	63	7
Vitamin C	1,7	155	21	110	11	123	14
Harnsäure	1,3	305	41	399	40	328	36
Bilirubin	2	12	1,6	9	1	13	1
SH-Gruppen	0,33	177	24	130	13	147	16
$TRAP_{meas}$		753	%	985	%	900	%
Unbekannt			6,4		27		26

### 3.3 Unidentifizierte Antioxidantien

Aus den in Tabelle 13 aufgezeigten Anteilen von unbekanntem Antioxidantien errechneten wir die Konzentration der unidentifizierten Antioxidantien im Plasma in  $\mu\text{mol/l}$ . Für die Kontrollgruppe ergibt sich eine Konzentration von  $48 \mu\text{mol/l}$ , für die Morbus Crohn Patienten von  $266 \mu\text{mol/l}$  und für die Colitis ulcerosa Patienten von  $234 \mu\text{mol/l}$ . Da die unidentifizierten Antioxidantien aus den Mittelwerten errechnet wurden, die ihrerseits aus unterschiedlich vielen Einzelmessungen der Antioxidantien stammt, lassen sich keine Signifikanzen der Unterschiede angeben.

Errechnet man die unidentifizierten Antioxidantien aus der Differenz der  $\text{TRAP}_{\text{calc}}$  und der  $\text{TRAP}_{\text{meas}}$ , so bekommt man ein etwas anderes Ergebnis. Dann können nur 13 der 90 Kontrollpersonen, 21 der 29 Morbus Crohn Patienten und 19 der 21 Colitis ulcerosa Patienten berücksichtigt werden, für die sämtliche notwendigen Parameter bestimmt wurden. Die Differenz ist dann nicht signifikant (siehe Tabelle 14).

Tabelle 14: Unidentifizierte Antioxidantien  
als Differenz aus gemessener und  
errechneter TRAP

<b>Gruppe</b>	<b>UNID in <math>\mu\text{mol/l}</math></b>
Kontrollen (n=13)	$174 \pm 242$
Morbus Crohn (n=21)	$224 \pm 198$
Colitis ulcerosa (n=19)	$216 \pm 190$

### ***3.4 PCDAI der Morbus Crohn Patienten***

Die Krankheitsaktivität aller Morbus Crohn Patienten lag im Durchschnitt bei mäßiger Aktivität. 7 Patienten stellten sich mit hoher Krankheitsaktivität vor, 14 mit mäßiger Aktivität und 8 mit niedriger Aktivität (siehe Tabelle 15).

Tabelle 15: Verteilung des Krankheitsaktivitätsindex bei Morbus Crohn

<b>Krankheitsaktivität</b>	<b>PCDAI</b>
alle (n = 29)	189 ± 63,6
hoch (n = 7)	280 ± 56,8
mäßig (n = 14)	177 ± 19,5
niedrig (n = 8)	130 ± 12,5

### ***3.5 CUA I der Colitis ulcerosa Patienten***

Der CUA I konnte bei 16 der 21 Colitis ulcerosa Patienten errechnet werden, alle hatten eine niedrige Krankheitsaktivität, im Mittel von 1,0. 14 Patienten waren nach dem CUA I in Remission und 2 Patienten hatten eine leichte Krankheitsaktivität, kein Patient hatte eine erhöhte Krankheitsaktivität (siehe Tabelle 16).

Tabelle 16: Verteilung des Krankheitsaktivitätsindex bei Colitis ulcerosa

<b>Krankheitsaktivität</b>	<b>CUAI</b>
alle (n=16)	1,0 ± 1,4
Remission (n=14)	0,7 ± 0,76
niedrig (n=2)	4,0 ± 0
mäßig (n=0)	
hoch (n=0)	

## 3.6 Korrelationen

### 3.6.1 Korrelationen mit der gemessenen TRAP

#### 3.6.1.1 Morbus Crohn

Eine signifikante positive Korrelation der gemessenen TRAP fand sich mit der errechneten TRAP dem  $\alpha$ -Tocopherol, dem  $\alpha$ -Tocopherol-Cholesterin-Quotienten, dem Q-10-Cholesterin-Quotienten, dem Ubichinol-10 und der Harnsäurekonzentration bei den Morbus Crohn Patienten (siehe Abbildung 12 bis Abbildung 17).

Die übrigen Parameter zeigten keine signifikante Korrelation, bis auf die unidentifizierten Antioxidantien, die ja aus der TRAP<sub>meas</sub> errechnet wurden (siehe Tabelle 17).

Tabelle 17: Korrelationen der gemessenen TRAP mit den Plasmaantioxidantien bei Patienten mit Morbus Crohn

Antioxidans (Anzahl)	Korrelation (r)	Signifikanz (p)
TRAP <sub>calc</sub> (n=21)	<b>0,61</b>	<b>0,0046</b>
Unidentifizierte Antioxidantien (n=21)	<b>0,90</b>	<b>0,0000</b>
SH-Gruppen (n=29)	0,19	0,31
Vitamin C (n=25)	0,09	0,68
$\alpha$ -Tocopherol (n=29)	<b>0,47</b>	<b>0,010</b>
$\alpha$ -Tocopherol-Cholesterin (n=29)	<b>0,48</b>	<b>0,008</b>
$\gamma$ -Tocopherol (n=29)	0,33	0,083
$\gamma$ -Tocopherol-Cholesterin (n=29)	0,36	0,054
Q-10 <sub>total</sub> (n=29)	0,35	0,067
Q-10 <sub>total</sub> -Cholesterin (n=29)	<b>0,51</b>	<b>0,0044</b>
Ubichinol-10 (n=29)	0,29	0,13
Ubichinol-10 (n=29)	<b>0,47</b>	<b>0,012</b>
Bilirubin (n=26)	-0,018	0,93
Harnsäure (n=27)	<b>0,66</b>	<b>0,0000</b>

Lineare Regression der errechneten TRAP mit der gemessenen TRAP bei Patienten mit Morbus Crohn

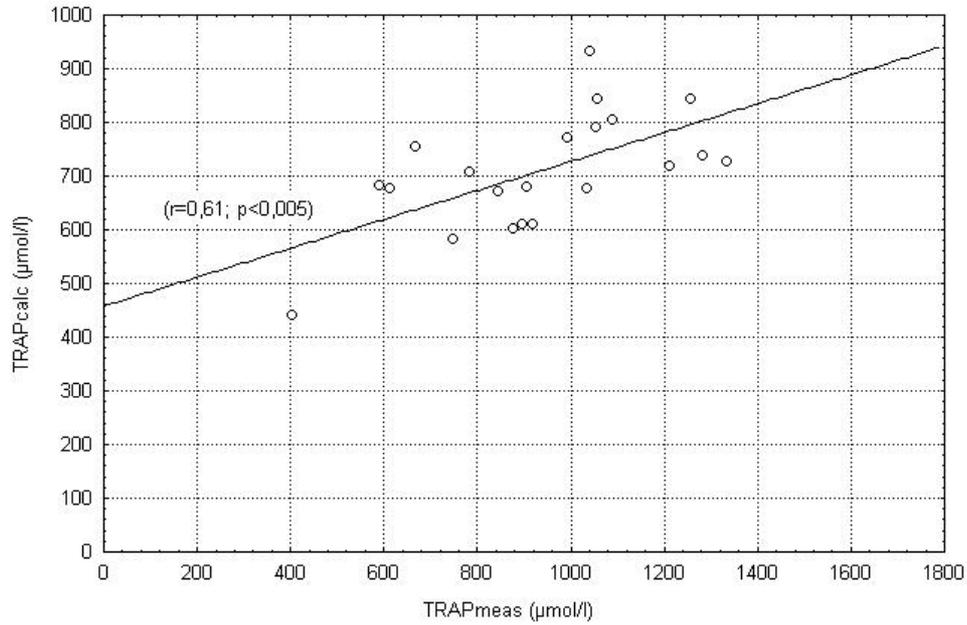


Abbildung 12: Korrelation der errechneten TRAP mit der gemessenen TRAP bei Patienten mit Morbus Crohn

Lineare Regression des  $\alpha$ -Tocopherols mit der gemessenen TRAP bei Patienten mit Morbus Crohn

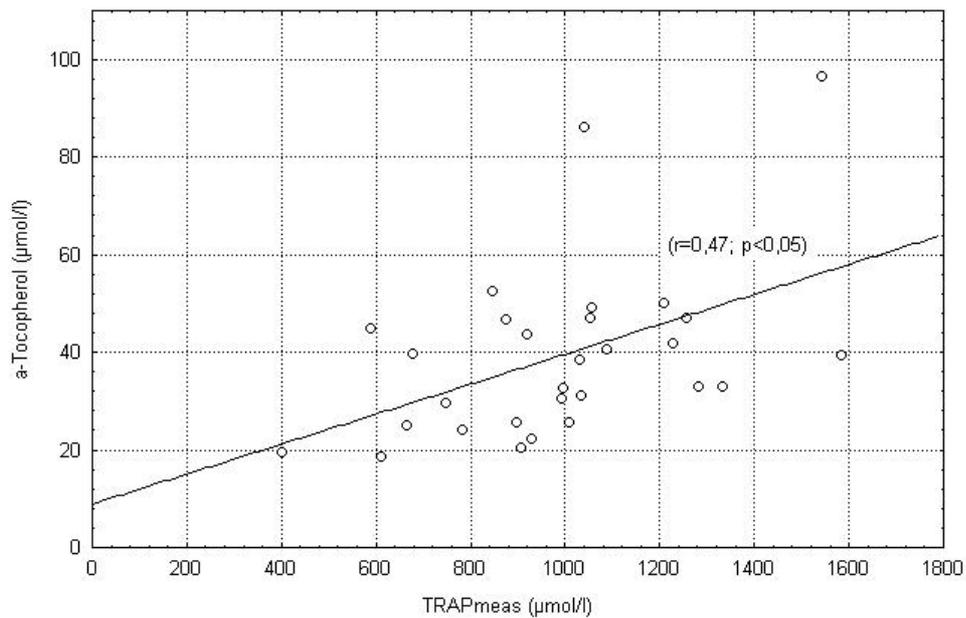


Abbildung 13: Korrelation des  $\alpha$ -Tocopherols mit der gemessenen TRAP bei Patienten mit Morbus Crohn

Lineare Regression des  $\alpha$ -Tocopherol-Cholesterin-Quotienten mit der gemessenen TRAP bei Patienten mit Morbus Crohn

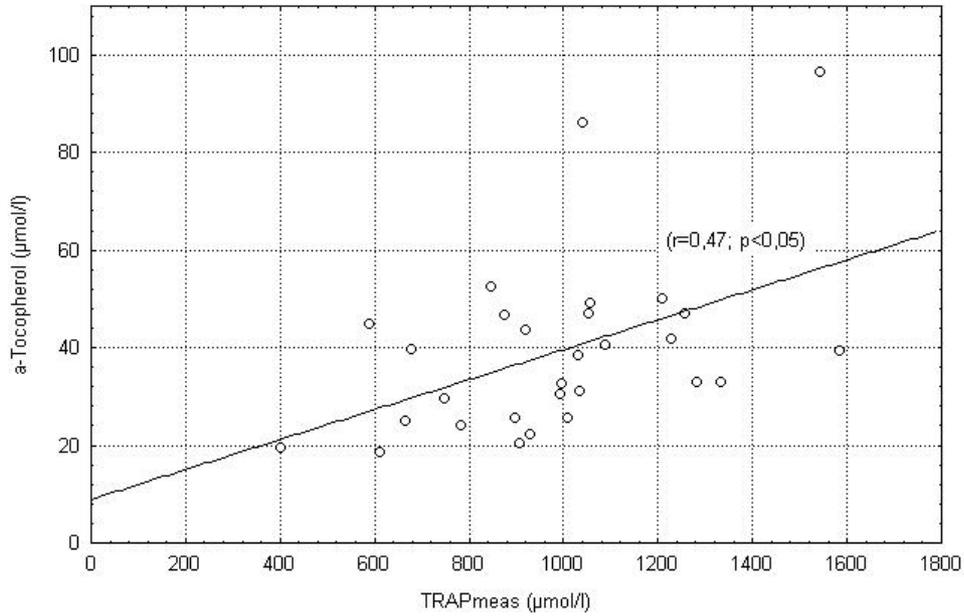


Abbildung 14: Korrelation des  $\alpha$ -Tocopherol-Cholesterin-Quotienten mit der gemessenen TRAP bei Patienten mit Morbus Crohn.

Lineare Regression des  $Q10_{total}$ -Cholesterin-Quotienten mit der gemessenen TRAP bei Patienten mit Morbus Crohn

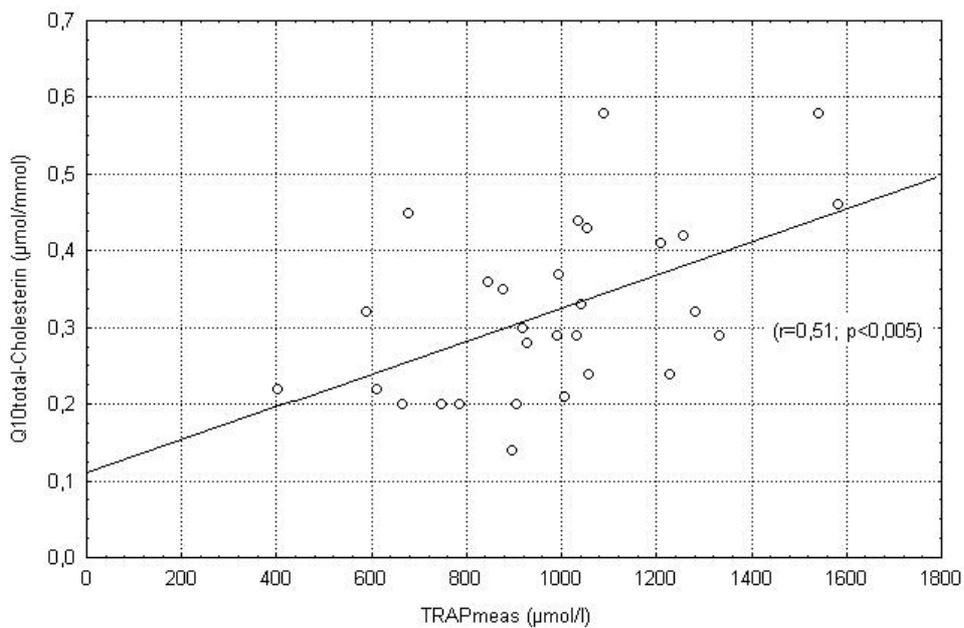


Abbildung 15: Korrelation des  $Q10_{total}$ -Cholesterin-Quotienten mit der gemessenen TRAP bei Morbus Crohn.

Lineare Regression des Ubichinon-10 mit der gemessenen TRAP bei Patienten mit Morbus Crohn

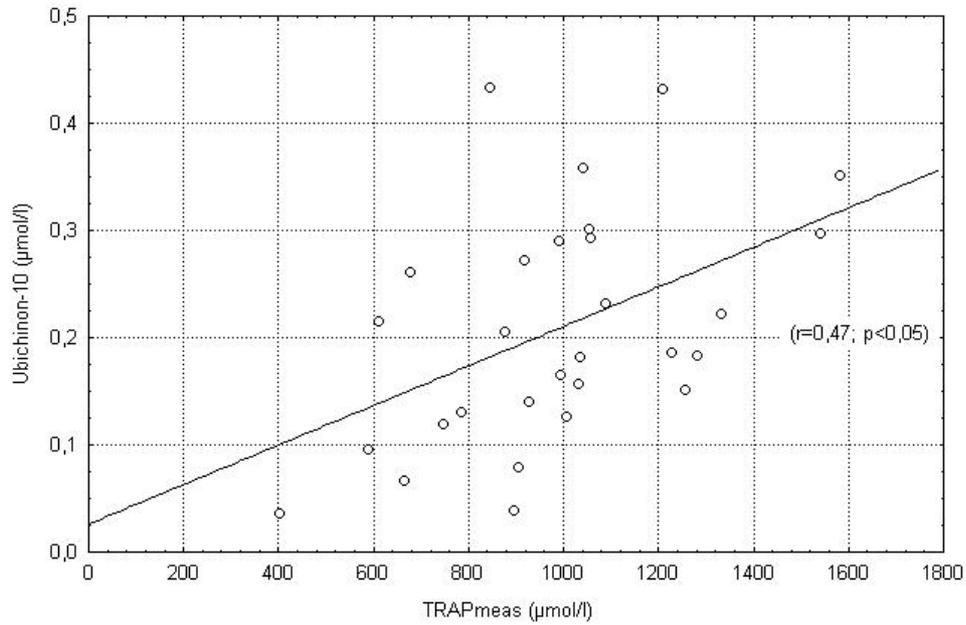


Abbildung 16: Korrelation des Ubichinon-10 mit der gemessenen TRAP bei Patienten mit Morbus Crohn.

Lineare Regression der Harnsäure mit der gemessenen TRAP bei Patienten mit Morbus Crohn

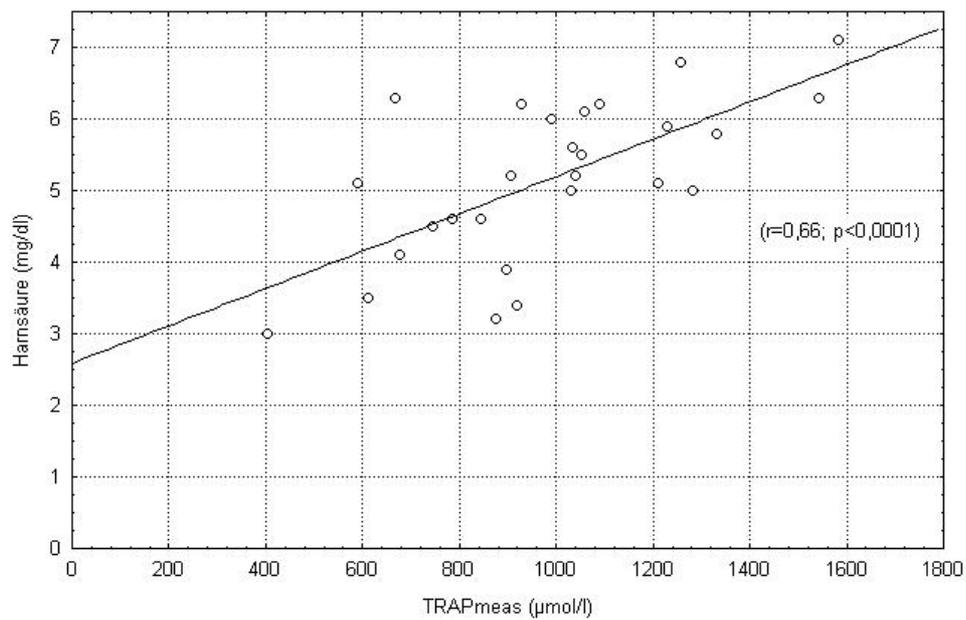


Abbildung 17: Korrelation der Harnsäure mit der gemessenen TRAP bei Patienten mit Morbus Crohn

### 3.6.1.2 Colitis ulcerosa

Bei den Colitis ulcerosa Patienten fand sich eine hoch signifikante Korrelation der gemessenen TRAP mit der errechneten TRAP und der Harnsäure (siehe Abbildung 18 und 19). Die übrigen Parameter zeigten keine signifikante Korrelation, bis auf die unidentifizierten Antioxidantien, die ja aus der TRAP<sub>meas</sub> errechnet wurden (siehe Tabelle 18).

Tabelle 18: Korrelationen der gemessenen TRAP mit den Plasmaantioxidantien bei Patienten mit Colitis ulcerosa

<b>Antioxidans (Anzahl)</b>	<b>Korrelation (r)</b>	<b>Signifikanz (p)</b>
TRAP <sub>calc</sub> (n=19)	<b>0,86</b>	<b>0,0001</b>
Unidentifizierte Antioxidantien (n=19)	<b>0,92</b>	<b>0,0001</b>
SH-Gruppen (n=20)	0,14	0,57
Vitamin C (n=19)	0,0034	0,99
α-Tocopherol (n=20)	0,13	0,59
α-Tocopherol-Cholesterin (n=20)	0,21	0,37
γ-Tocopherol (n=20)	0,22	0,36
γ-Tocopherol-Cholesterin (n=20)	0,27	0,26
Q-10 <sub>total</sub> (n=20)	-0,31	0,19
Q-10 <sub>total</sub> -Cholesterin (n=20)	-0,32	0,16
Ubichinol-10 (n=20)	-0,34	0,15
Ubichinon-10 (n=20)	-0,072	0,76
Bilirubin (n=21)	-0,007	0,98
Harnsäure (n=21)	<b>0,91</b>	<b>0,0007</b>

Lineare Regression der errechneten TRAP mit der gemessenen TRAP bei Patienten mit Colitis ulcerosa

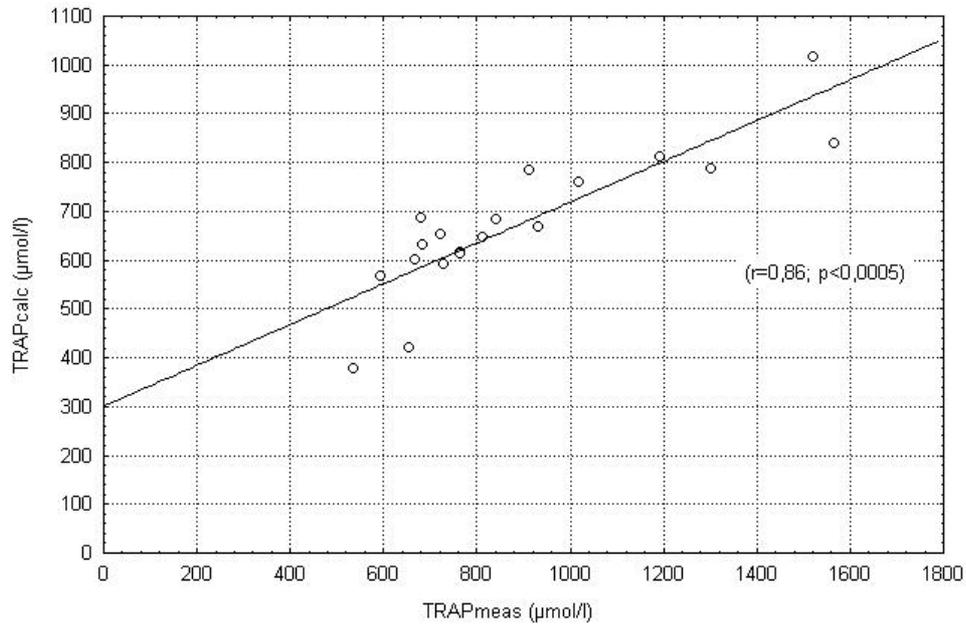


Abbildung 18: Korrelation von gemessener TRAP mit der errechneten TRAP bei Patienten mit Colitis ulcerosa

Lineare Regression der Harnsäure mit der gemessenen TRAP bei Patienten mit Colitis ulcerosa

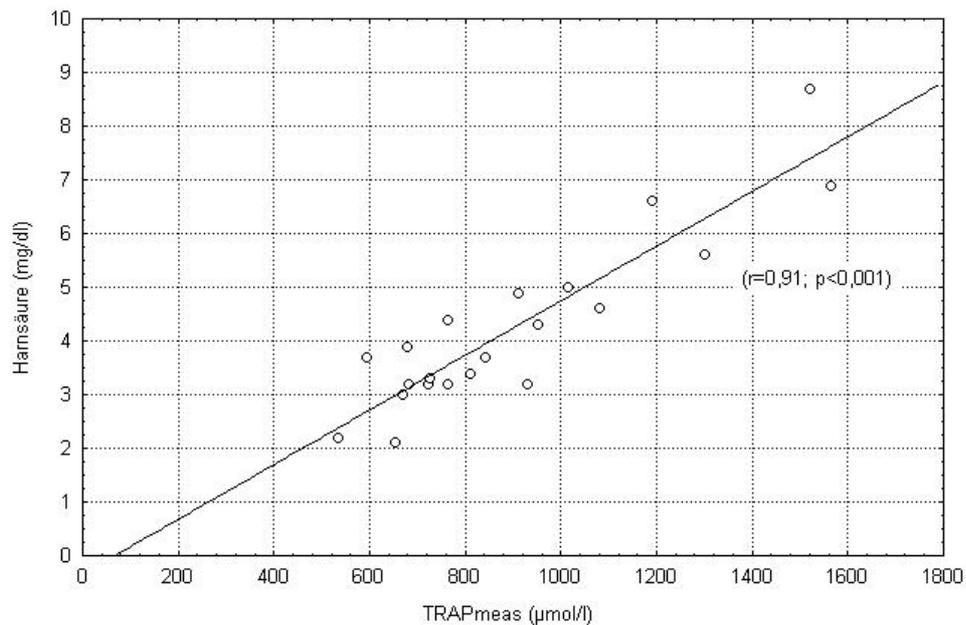


Abbildung 19: Korrelation von gemessener TRAP mit der Harnsäurekonzentration bei Patienten mit Colitis ulcerosa

### 3.6.2 Korrelationen mit dem PCDAI bei Morbus Crohn

Bei der Morbus Crohn Gruppe korrelierte die Krankheitsaktivität signifikant negativ mit der Vitamin C-Konzentration (siehe Abbildung 20).

Ein Korrelationstrend des PCDAI mit der TRAP<sub>meas</sub> ( $r=-0,57$ ;  $p=0,19$ ) ist bei den Patienten mit hoher Krankheitsaktivität ( $n=7$ ) im Vergleich zu denen mit mäßiger ( $n=14$ ;  $r=-0,02$ ;  $p=0,95$ ) und niedriger Aktivität ( $n=8$ ;  $r=-0,25$ ;  $p=0,55$ ) zu erkennen (siehe Abbildung 21).

Die Korrelationen mit den übrigen Parametern waren nicht signifikant (siehe Tabelle 19).

Tabelle 19: Korrelationen der Krankheitsaktivität- PCDAI - mit den Plasmaantioxidantien bei Patienten mit Morbus Crohn

Antioxidans (Anzahl)	Korrelation (r)	Signifikanz (p)
TRAP <sub>meas</sub> (n=29)	0,003	0,99
TRAP <sub>calc</sub> (n=21)	-0,13	0,58
Unidentifizierte Antioxidantien (n=21)	-0,067	0,77
SH-Gruppen (n=29)	-0,12	0,53
Vitamin C (n=25)	<b>-0,53</b>	<b>0,008</b>
α-Tocopherol (n=29)	-0,11	0,57
α-Tocopherol-Cholesterin (n=29)	-0,11	0,59
γ-Tocopherol (n=29)	-0,007	0,97
γ-Tocopherol-Cholesterin (n=29)	-0,005	0,98
Q-10 <sub>total</sub> (n=29)	-0,16	0,40
Q-10 <sub>total</sub> -Cholesterin (n=29)	-0,15	0,45
Ubichinol-10 (n=29)	-0,15	0,45
Ubichinon-10 (n=29)	-0,17	0,39
Bilirubin (n=26)	-0,32	0,11
Harnsäure (n=27)	0,20	0,31

Lineare Regression der Vitamin C-Konzentration mit der  
Krankheitsaktivität - PCDAI - bei Patienten mit Morbus Crohn

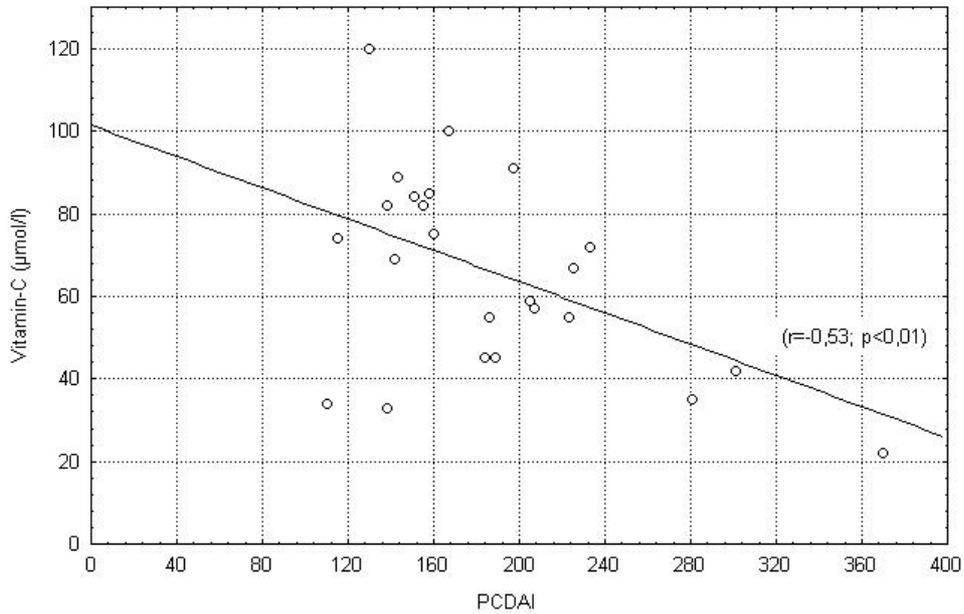


Abbildung 20: Korrelation der Vitamin C-Konzentration mit der Krankheitsaktivität - PCDAI - bei Patienten mit Morbus Crohn

Streudiagramm der gemessenen TRAP mit der Krankheitsaktivität - PCDAI - bei  
Morbus Crohn

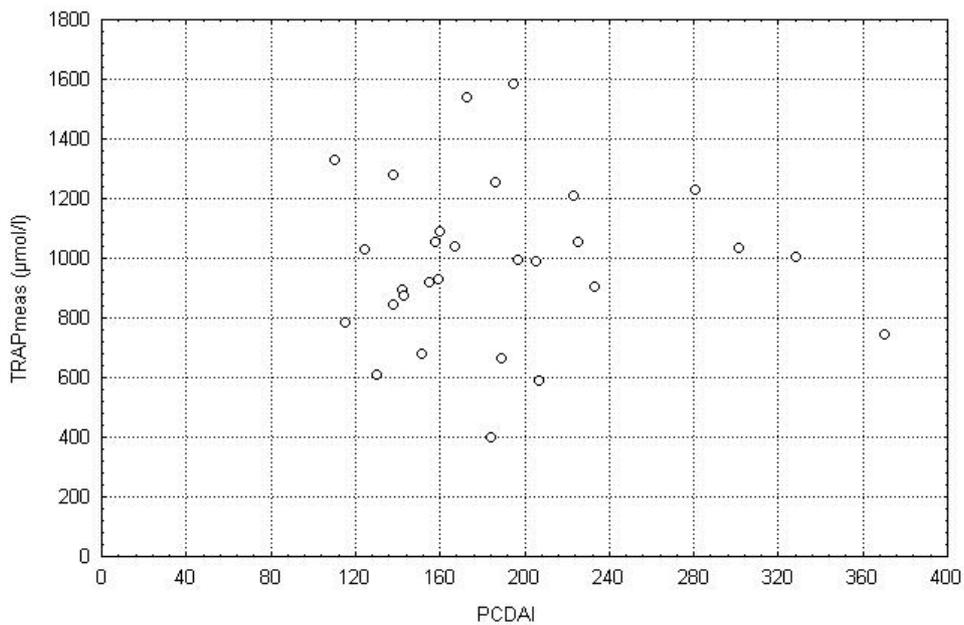


Abbildung 21: Streuung der gemessenen TRAP mit der Krankheitsaktivität bei Patienten mit Morbus Crohn.

### 3.6.3 Korrelationen mit dem CUA I bei Colitis ulcerosa

Bei den Colitis ulcerosa Patienten fand sich eine positive Korrelation des CUA I mit dem Bilirubin (siehe Abbildung 22). Die Korrelationen mit den übrigen Parametern waren nicht signifikant (siehe Tabelle 20).

Tabelle 20: Korrelationen der Krankheitsaktivität - CUA I - mit den Plasmaantioxidantien bei Patienten mit Colitis ulcerosa

<b>Antioxidans (Anzahl)</b>	<b>Korrelation (r)</b>	<b>Signifikanz (p)</b>
TRAP <sub>meas</sub> (n=16)	0,20	0,45
TRAP <sub>calc</sub> (n=15)	0,32	0,25
Unidentifizierte Antioxidantien (n=15)	0,09	0,76
SH-Gruppen (n=16)	0,21	0,43
Vitamin C (n=15)	-0,25	0,36
$\alpha$ -Tocopherol (n=16)	0,28	0,30
$\alpha$ -Tocopherol-Cholesterin (n=16)	0,07	0,80
$\gamma$ -Tocopherol (n=16)	0,27	0,32
$\gamma$ -Tocopherol-Cholesterin (n=16)	0,16	0,55
Q-10 <sub>total</sub> (n=16)	0,39	0,13
Q-10 <sub>total</sub> -Cholesterin (n=16)	0,15	0,57
Ubichinol-10 (n=16)	0,38	0,15
Ubichinon-10 (n=29)	0,27	0,32
Bilirubin (n=16)	<b>0,53</b>	<b>0,037</b>
Harnsäure (n=16)	0,31	0,24

Korrelation der Krankheitsaktivität mit dem Bilirubin  
bei Colitis ulcerosa

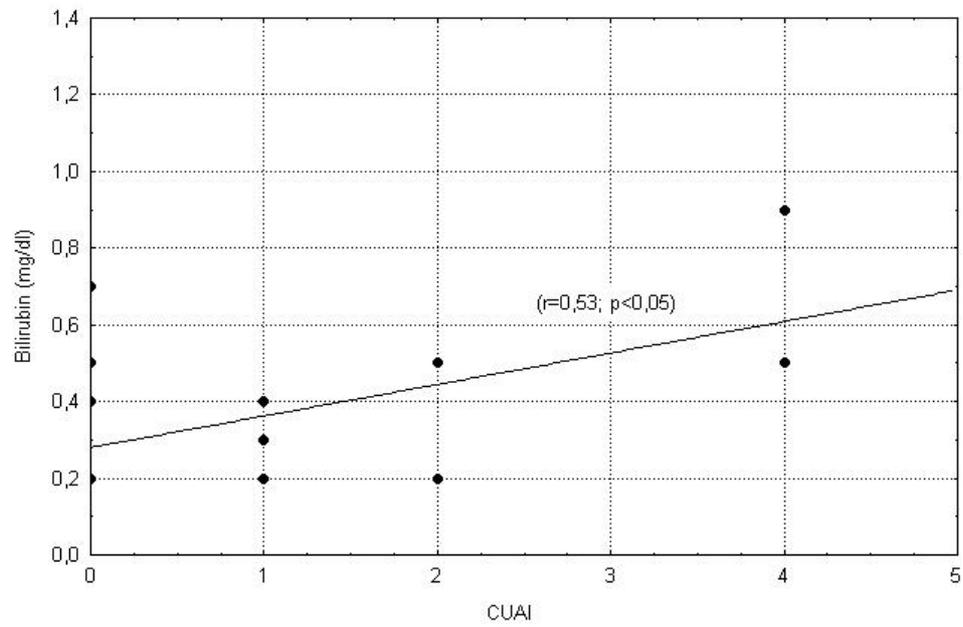


Abbildung 22: Positive Korrelation des Colitis ulcerosa Aktivitätsindex mit dem Bilirubin bei Colitis ulcerosa.

### ***3.7 Wirkung von Medikamenten***

Bei unserer Untersuchung fanden wir keinen Einfluß von Medikamenten auf die gemessenen Parameter.

Von den 29 Morbus Crohn Patienten erhielten 7 keine Medikamente, einer Sulfasalazin, 11 5-Aminosalicylsäure, 8 Prednisolon, 2 Cyclosporin und 8 Metronidazol.

Wir fanden keine Korrelation mit den gemessenen Parametern, es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Patienten mit und ohne Medikation, die Daten sind daher hier nicht aufgeführt.

Von den Colitis ulcerosa Patienten erhielten 4 keine Medikamente, 3 Sulfasalazin, 10 5-Aminosalicylsäure, 9 Prednisolon, 3 Cyclosporin und 5 Metronidazol.

Wir fanden eine Korrelation des Prednisolons mit der  $TRAP_{meas}$  ( $r=-0,68$ ;  $p<0,05$ ). Mit den übrigen gemessenen Parametern fanden wir keine Korrelation. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Patienten mit und ohne Medikation, die Daten sind daher hier nicht aufgeführt.

## 4 Diskussion

### 4.1 Gemessene TRAP

Mit der von uns verwendeten Methode oder einer ähnlichen wurde bisher noch keine Untersuchung im Blutplasma von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa Patienten gemacht. Damit ist dies die erste uns bekannte umfassende Studie über die Radikalfängeraktivität im Plasma von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa Patienten. Vergleiche mit Ergebnissen aus anderen Untersuchungen sind deshalb schwierig.

Vor unserer Untersuchung hatten wir eine verringerte antioxidative Kapazität bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen erwartet, ähnlich den Ergebnissen von Studien bei rheumatoider Arthritis [78], die in einigen Bereichen große pathogenetische Ähnlichkeiten wie die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen aufweist und mit ähnlichen Medikamenten behandelt wird.

Unsere Ergebnisse zeigen im Plasma bei den Colitis ulcerosa Patienten eine um 20% und bei den Morbus Crohn Patienten um 31% erhöhte gemessene TRAP im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Somit haben Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eine unerwartet hohe Radikalfängerkapazität im Plasma.

Buffinton fand 1995, mit einer anderen Messmethode für die totale Radikalfängeraktivität ( $\text{TRAP}_{\text{Glazer}}$ ) als der von uns angewandten, in entzündlich veränderter Darmschleimhaut von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen im Vergleich zu normaler Darmschleimhaut derselben Patienten eine Erniedrigung der Radikalfängerkapazität [14].

Eine mögliche Erklärung für die erhöhte gemessene TRAP im Plasma unserer Patienten ist die Aktivierung der gesamten körpereigenen Antioxidantien durch den lokalen oxidativen Streß in der entzündlich betroffenen Darmschleimhaut bei einer Überproduktion von freien Radikalen und dem damit verbundenen relativen Mangel an Antioxidantien. Möglicherweise kommt es dabei zu einem ähnlichen Prozeß, wie bei der Erhöhung von Akutephasenproteinen im Blutplasma bei Entzündungsprozessen. Die in den zahlreichen Untersuchungen im Blutkreislauf gemessenen Erhöhungen der freien Radikale und der Oxidationsprodukte, sowie die Erhöhungen von Entzündungsmediatoren im Blut erkrankter Patienten, könnten über einen noch unbekanntem Weg direkt oder indirekt an der Aktivierung der TRAP beteiligt sein.

Eine mögliche Rolle in der Regulation der oxidativen Abwehr spielen Cytokine. Reimund et al. konnten 1998 nach Gabe von Antioxidantien in vitro eine Inhibition einiger Cytokine (Interleukin-1 $\beta$  und -6) in Blutmonozyten um bis zu 50% und in Colonbiopsien von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa Patienten (Interleukin-1 $\beta$  und Tumornekrosefaktor- $\alpha$ ) um bis zu 70% nachweisen [70].

Es ist bekannt, daß Antioxidantien die Expression des „Nuclear Factor Kappa B“ (NF- $\kappa$ B) hemmen. Der NF- $\kappa$ B ist ein zentraler Mediator in der Immunantwort, er aktiviert die Expression von verschiedenen inflammatorischen Cytokinen [82]. Auf der anderen Seite wird die Expression von NF- $\kappa$ B und damit die Produktion von Cytokinen auch direkt durch freie Radikale erhöht [72].

Die Aktivierung von Cytokinen durch oxidativen Streß hätte nur dann einen Sinn, wenn durch die Aktivierung der Cytokine die körpereigene Abwehr gegen freie Radikale aktiviert würde. Durch einen solchen Aktivierungsmechanismus könnte auch die Erhöhung der TRAP<sub>meas</sub> bei unseren Patienten erklärt werden.

Ein Beweis für die Aktivierung der antioxidativen Abwehr durch Cytokine müßte in einer weiteren Untersuchung erfolgen, durch Messung der TRAP, möglicher Antioxidantien im Einzelnen und Korrelation mit verschiedenen Cytokinen. Die Frage wäre auch, ob es ein spezifisches Cytokin für oxidativen Streß gibt.

Die Korrelation der TRAP<sub>meas</sub> mit der TRAP<sub>calc</sub> weist darauf hin, daß bei unseren Patienten dieselben Antioxidantien an der TRAP<sub>meas</sub> beteiligt sind wie bisher aus anderen Untersuchungen bekannt war.

Eine hochsignifikante Korrelation hat sich mit der Harnsäure gezeigt, die mit ca. 40% in unserer Untersuchung das wichtigste an der TRAP<sub>meas</sub> beteiligte Antioxidans in allen Gruppen ist. Ebenso zeigte sich eine Korrelation mit dem  $\alpha$ -Tocopherol bei der Morbus Crohn Gruppe. Harnsäure und  $\alpha$ -Tocopherol scheinen also die bevorzugten Antioxidantien bei einer Aktivierung der oxidativen Abwehr zu sein.

Die negative Korrelation mit dem Prednisolon bei den Colitis ulcerosa Patienten scheint eher zufällig zu sein, denn bei den Morbus Crohn Patienten zeigte sich kein solcher Trend. Prednisolon ist auch kein potentielles Antioxidans. Wenn ein Zusammenhang besteht, dann eher aufgrund der antiinflammatorischen Wirkung des Prednisolons, die sekundär die Bildung freier Radikale durch ihre hemmende Wirkung auf die Entzündungszellen erniedrigt. Auf diese Weise könnte ebenfalls die Aktivierung der TRAP erniedrigt sein.

## ***4.2 Errechnete TRAP und unidentifizierte Antioxidantien***

Die errechnete TRAP fanden wir im Patientenplasma nicht signifikant erhöht gegenüber der Kontrollgruppe.

Die unidentifizierten Antioxidantien, als Differenz zwischen gemessener und errechneter TRAP, waren bei den Patienten um 24% bei Colitis ulcerosa und um 29% bei Morbus Crohn erhöht gegenüber den Kontrollpersonen. Wie bereits im Ergebnisteil beschrieben, hatten wir Schwierigkeiten Signifikanzen für die unidentifizierten Antioxidantien zu berechnen. Ursache war die organisatorisch bedingte lückenhafte Bestimmung der einzelnen Parameter bei der Kontrollgruppe.

Die aus den Mittelwerten der drei Gruppen berechneten unidentifizierten Antioxidantien zeigten einen sehr deutlichen Unterschied. In der Kontrollgruppe fand man einen deutlich geringen Anteil unidentifizierter Komponenten der TRAP<sub>meas</sub>.

Dies weist darauf hin, daß außer den uns bekannten Antioxidantien, die bei den gesunden Probanden den Großteil der TRAP<sub>meas</sub> ausmachen bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zusätzlich andere Antioxidantien eine Rolle spielen. Dies zeigt auch, daß die einfach zu bestimmende errechnete TRAP<sub>calc</sub> nicht geeignet ist eine Aussage über die antioxidative Abwehr von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zu treffen, dafür eignet sich die Messung der TRAP<sub>meas</sub> mit unsere Methode besser, da unbekannte Antioxidantien miterfaßt werden.

## ***4.3 Vitamin C***

Wir fanden ein um 29% erniedrigtes Vitamin C im Plasma der Morbus Crohn Gruppe, die Erniedrigung um 21% bei der Colitis ulcerosa Gruppe war nicht signifikant. Hoffenberg kam zu ähnlichen Ergebnissen [44]. Fernandez-Banares fand einen signifikant erniedrigten Vitamin C Spiegel im Plasma beider Patientengruppen [27].

Bei dem Myocardinfarkt [62], der rheumatoiden Arthritis [78] und der Eklampsie [46] fand man ebenfalls erniedrigte Vitamin C-Konzentrationen im Plasma, bei früh- und termingeborenen Neugeborenen [55] und Diabetikern [7] erhöhte und bei Pneumonie [2] und einer anderen Untersuchung von Diabetikern [17] unveränderte Vitamin C-Konzentrationen. Vitamin C wird bei oxidativem Streß als erste Antioxidans verbraucht [32]. Dies scheint auch bei unseren Patienten der Fall zu sein, insbesondere bei den Morbus Crohn Patienten.

Der Vitamin C Spiegel korrelierte in unserer Untersuchung negativ mit der Krankheitsaktivität bei Morbus Crohn. Dies weist auf einen Verbrauch des Vitamin C bei stärkerer Krankheitsaktivität hin.

#### ***4.4 $\alpha$ -Tocopherol***

Die Plasmakonzentrationen des  $\alpha$ -Tocopherols war bei den Morbus Crohn Patienten um 78% und die des  $\alpha$ -Tocopherol-Cholesterin-Quotienten um 117% erhöht. Zum gleichen Ergebnis kam Hoffenberg, er fand eine Erhöhung der Plasmakonzentrationen des  $\alpha$ -Tocopherols um 30% und des  $\alpha$ -Tocopherol-Lipid-Quotienten um 29% [44]. Fernandez-Banares fand keine signifikanten Veränderungen des  $\alpha$ -Tocopherols, jedoch eine Erniedrigung des  $\alpha$ -Tocopherol-Cholesterin-Quotienten im Plasma [27]. Im Gegensatz zu uns fand Kuroki eine Erniedrigung des Vitamin E im Plasma [53]. Bei Untersuchungen entzündeter Darmmucosa fand Buffinton keine Veränderung des  $\alpha$ -Tocopherols [14].

Bei der Colitis ulcerosa fanden wir eine Erhöhung des  $\alpha$ -Tocopherols und des  $\alpha$ -Tocopherol-Cholesterin-Quotienten im Plasma. Zu einem ähnlichen Ergebnis kam Hoffenberg, er fand eine nicht signifikante Erhöhung des  $\alpha$ -Tocopherols und des  $\alpha$ -Tocopherol-Lipid-Quotienten [44]. Ramakrishna fand das Vitamin E unverändert [68]. Fernandez-Banares fand eine Erniedrigung des  $\alpha$ -Tocopherols bei normalem  $\alpha$ -Tocopherol-Cholesterin-Quotienten [27]. In entzündeter Darmmucosa fand Buffinton keine Veränderungen des  $\alpha$ -Tocopherols [14].

Bei anderen Erkrankungen fand man unterschiedliche Ergebnisse im Blutplasma (siehe auch Einleitung): bei der Eklampsie [46] und der rheumatoiden Arthritis [78] fand man erniedrigte Plasmaspiegel von  $\alpha$ -Tocopherol, nur bei dem Diabetes mellitus war das  $\alpha$ -Tocopherol in zwei Untersuchungen erhöht [7, 17], bei dem Myokardinfarkt [62] und der Pneumonie [2] unverändert. Bei früh- und termingeborenen Neugeborenen fand man ein erniedrigtes  $\alpha$ -Tocopherol im Vergleich zu Erwachsenen [55]. Eine altersbedingte Abhängigkeit des Plasmaspiegels ist bekannt, Neugeborene haben nur etwa 30% des mütterlichen Blutspiegels. Für Erwachsene werden Normwerte im Mittel von 13,7 [56] und 24,3 [12]  $\mu\text{mol/l}$  angegeben. Unsere Ergebnisse liegen bei den Patienten deutlich über diesen Werten, während die Kontrollgruppe im gleichen Bereich liegt.

Wir nehmen an, daß das  $\alpha$ -Tocopherol reaktiv durch den oben beschriebenen Aktivierungsmechanismus erhöht ist. Da der menschliche Körper selbst kein Vitamin E bilden kann, sondern  $\alpha$ -Tocopherol in Chylomikronen aufnimmt, muß die Aufnahme des Tocopherols gesteigert oder der Verbrauch verringert sein.

Ein möglicher Mechanismus der Erhöhung des  $\alpha$ -Tocopherol-Plasmaspiegels wäre über die Expression der  $\alpha$ -Tocopherol-Transferproteins in der Leber denkbar. Dieses ist für das transferieren des  $\alpha$ -Tocopherols auf die „very low density Lipoproteine“ (VLDL) zuständig. Es gibt eine Krankheit (Ataxie mit isoliertem Vitamin E Defizit – AVED), bei der aufgrund des Fehlens des  $\alpha$ -Tocopherol-Transferproteins kaum  $\alpha$ -Tocopherol im Plasma meßbar ist.

Der umgekehrte Fall einer verstärkten Aktivität des Transferproteins wäre denkbar, ein Beweis dafür konnte in unserer Untersuchung nicht erbracht werden. Vorstellbar wäre auch die Aktivierung der Expression dieses Transferproteins durch Cytokine, wie oben beschrieben.

Für zukünftige Studien wäre eine Bestimmung des  $\alpha$ -Tocopherol-Transferproteins in Zusammenhang mit oxidativem Streß oder der Bestimmung der Radikalfängerkapazität interessant.

## ***4.5 $\gamma$ -Tocopherol***

Wir fanden keine Veränderungen des  $\gamma$ -Tocopherols im Patientenplasma, zum gleichen Ergebnis kam Hoffenberg [44].

$\gamma$ -Tocopherol ist nur zu einem sehr geringen Teil an der oxidativen Abwehr beteiligt, obwohl es in vitro ein hervorragender Radikalfänger ist. Dies liegt hauptsächlich an seiner im Vergleich zum  $\alpha$ -Tocopherol um 20fach niedrigeren Konzentration in vivo.

Es scheint auch keine reaktive Erhöhung des  $\gamma$ -Tocopherol durch die oben beschriebene Aktivierung zu geben.

Daraus schließen wir, daß  $\gamma$ -Tocopherol als Antioxidans für die Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen nicht so wichtig ist, dies ist auch wegen seiner physiologisch geringen Konzentration nicht sinnvoll.

## 4.6 *Q-10<sub>total</sub>, Ubichinol-10 und Ubichinon-10*

Das Q-10<sub>total</sub> fanden wir bei beiden Patientengruppen unverändert gegenüber der Kontrollgruppe. Buffinton fand in der Darmmucosa bei beiden Patientengruppen eine Erniedrigung des Ubichinol-10 [14]. Uns sind keine weiteren Studien bekannt, die das Ubichinol-10 oder das Ubichinon-10 bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen bestimmt haben.

Betrachtet man Ubichinol-10 und Ubichinon-10 einzeln bei unseren Patienten, so läßt sich kein Hinweis für einen Verbrauch derselben finden.

Bei den Patienten ist der Anteil des Ubichinol-10 am gesamten Q-10<sub>total</sub> niedriger, dies fällt insbesondere bei den Morbus Crohn Patienten auf, möglicherweise ist dies die Folge von oxidativem Streß. Mit unseren Daten lassen sich jedoch keine statistischen Beweise dafür führen, da die Erhebung der Kontrollgruppe leider zu lückenhaft war.

Die positive Korrelation der TRAP<sub>meas</sub> mit dem Ubichinon-10 ohne Korrelation mit dem Ubichinol-10 zeigt möglicherweise ebenfalls einen Trend zu dem Ubichinon-10 bei oxidativem Streß und der dadurch reaktiv erhöhten TRAP<sub>meas</sub>.

Das Ubichinol-10 wird vor dem  $\alpha$ -Tocopherol in späteren Phasen der oxidativen Abwehr verbraucht [57].

Bei unseren Patienten lag ebenfalls keine Erhöhung des Q-10<sub>total</sub> durch Aktivierung der körpereigenen Synthese vor. Daraus schließen wir, daß Ubichinol-10 für die oxidative Abwehr bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eher unwichtig ist.

## 4.7 *Harnsäure*

Die Harnsäure ist das wichtigste wasserlösliche Antioxidans mit einem Anteil in unserer Untersuchung von ca. 40% an der TRAP<sub>meas</sub>. Im Plasma der Morbus Crohn Patienten fanden wir eine Erhöhung um 31%.

Bei den Colitis ulcerosa Patienten fanden wir eine nicht signifikante Erhöhung der Harnsäure um 7%.

Wir fanden keine Untersuchung der Harnsäure als Antioxidans im Plasmas bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Buffinton fand in entzündeter Mucosa bei beiden Erkrankungen eine Erniedrigung der Harnsäure [14].

Auch hier nehmen wir den oben beschriebenen Mechanismus der Aktivierung durch lokalen Mangel an Antioxidantien an.

Harnsäure entsteht bekanntlich beim Purinabbau, Purine werden bei der Proteinsynthese und der Zellteilung benötigt. Ist die Aktivität des NF- $\kappa$ B durch den oxidativen Streß gesteigert, kommt es zu einem erhöhten Umsatz von Ribonukleinsäuren und damit zu einer Erhöhung der Purinsynthese. In entzündlich veränderter Darmschleimhaut ist der Zellsatz ebenfalls gesteigert und auch die Produktion von Entzündungszellen erhöht die Purinproduktion. Andere Mechanismen für eine Erhöhung der Harnsäure im Plasma, zum Beispiel verminderte renale Clearance oder purinreiche Diät, sind unwahrscheinlich.

Bei Diabetes mellitus [17] und der Eklampsie [46] fand man erniedrigte Harnsäurekonzentrationen im Plasma, bei der Pneumonie [2], früh- und termingeborenen Neugeborenen [55], Myokardinfarkt [62] und der rheumatoiden Arthritis [78] keinen signifikanten Unterschied. Alle diese Erkrankungen spielen sich im gesamten Organismus ab. Cytokine spielen dabei eine eher untergeordnete Rolle. Lediglich bei der Rheumatoiden Arthritis handelt es sich um einen ähnlichen Prozeß mit lokalen Entzündungsreaktionen.

Die Korrelation der Harnsäure mit der TRAP<sub>meas</sub> bei beiden Patientengruppen zeigt ihren wichtigen Anteil an der Radikaleabwehr und die mögliche Aktivierung bei zunehmenden oxidativem Streß.

## ***4.8 Protein-SH-Gruppen***

Wir fanden eine Erniedrigung der SH-Gruppen im Plasma beider Patientengruppen, dies weist möglicherweise auf einen Verbrauch von SH-Gruppen enthaltenden Proteinen bei der Abwehr freier Radikale hin. Wie oben beschrieben werden die SH-Gruppen wie das Vitamin C in der initialen Abwehr gegen freie Radikale verbraucht.

SH-Gruppen sind vor allem auch im Glutathion bei der oxidativen Abwehr präsent. Hoffenberg fand das Glutathion bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen nicht signifikant verändert [44]. Buffinton fand eine Erhöhung des Glutathions in der Mucosa bei Morbus Crohn und eine Erniedrigung bei Colitis ulcerosa [14].

Messungen der SH-Gruppen fanden wir sonst nur bei anderen Erkrankungen. Bei Diabetes mellitus [17], rheumatoider Arthritis [78], früh- und termingeborenen Neugeborenen [55] und Eklampsie [46] fand man ebenfalls erniedrigte SH-Gruppen, bei dem Myokardinfarkt [62] und der Pneumonie [2] keine Veränderungen. Die beiden letztgenannten Erkrankungen sind eher akute Geschehen, im Gegensatz zu den erstgenannten und den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen.

## ***4.9 Bilirubin***

Das Bilirubin im Blutplasma fanden wir bei den Morbus Crohn Patienten um 32% erniedrigt gegenüber der Kontrollgruppe, die Colitis ulcerosa Patienten zeigten keine Veränderungen.

Ob die Bilirubinerniedrigung bei den Morbus Crohn Patienten pathognomonisch ist kann hier nicht geklärt werden. Für die oxidative Abwehr ist das Bilirubin in den Konzentrationen, die wir bei den Messungen fanden kaum relevant, es ist in diesen niedrigen Konzentrationen nur zu etwa 1-2% an der TRAP<sub>meas</sub> beteiligt.

## ***4.10 Cholesterin***

Wir fanden ebenso wie Fernandez-Banares [27] eine Erniedrigung des Cholesterins im Plasma beider Patientengruppen.

Cholesterin spielt für den Antioxidantienstatus eine indirekte Rolle als Teil der Lipoproteine, welche Carrier der fettlöslichen Antioxidantien sind.

Die Erniedrigung des Cholesterins bei den Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen könnte so mitverantwortlich sein, daß  $\alpha$ -Tocopherol und Ubichinol-10 keine adäquaten Konzentrationen in der Darmmucosa erreichen.

## 4.11 *Schlußfolgerungen*

Wie in der Einleitung beschrieben, konnten Frei et al. eine Reihenfolge im Verbrauch der Antioxidantien zeigen [29]. Dabei steht Vitamin C an erster Stelle der oxidativen Abwehr. Wir nehmen an, das die Ursache der Erniedrigung des Vitamin C, insbesondere bei den Morbus Crohn Patienten, im Verbrauch bei der Abwehr von freien Radikalen zu sehen ist. Das  $\alpha$ -Tocopherol kann regeneriert werden, solange noch ausreichende Konzentrationen von Vitamin C vorhanden sind.

Für einen Beweis dieser These müßte die Untersuchung vor allem bei Patienten im akuten Schub durchgeführt werden, vielleicht wäre dann auch ein Verbrauch des  $\alpha$ -Tocopherols festzustellen.

Die Harnsäureerhöhung unserer Patienten scheint hauptverantwortlich für die Erhöhung der TRAP zu sein, daneben spielen möglicherweise auch nicht identifizierte Antioxidantien eine entscheidende Rolle, denn ihr Anteil an der TRAP<sub>meas</sub> ist für ca. ¼ der Radikalfängerkapazität verantwortlich.

Wir sehen lokalen oxidativen Streß in der Darmschleimhaut als Ursache für die von uns gemessene Erhöhung der TRAP<sub>meas</sub> im Blutplasma an. Die Aktivierung der oxidativen Abwehr erfolgt möglicherweise durch Cytokine. Die Aktivierung der Radikalfänger betrifft in unserer Untersuchung vor allem das  $\alpha$ -Tocopherol, sein Anteil an der TRAP ist gegenüber der Kontrollgruppe deutlich höher.

Von beiden Patientengruppen scheinen die Morbus Crohn Patienten von den beschriebenen Veränderungen stärker betroffen zu sein. Bei ihnen sind sowohl die SH-Gruppen als auch das Vitamin C stärker erniedrigt als bei der Colitis ulcerosa Gruppe und auf der anderen Seite sind die gemessene TRAP, die errechnete TRAP, das  $\alpha$ -Tocopherol und die Harnsäure stärker erhöht. Dies zusammen könnte durch den bei Morbus Crohn Patienten höheren oxidativen Streß bedingt sein.

Zeichen der trotz Aktivierung immer noch inadäquaten oxidativen Abwehr sind die Erniedrigung des Vitamin C und der SH-Gruppen.

Daraus folgend scheint es trotz der erhöhten gesamten Radikalfängerkapazität immer noch einen höheren Bedarf an Antioxidantien, insbesondere an Vitamin C zu geben.

Abad-Lacruz konnte 1988 keinen eindeutigen Effekt von Vitaminsubstitutionen in üblicher Dosierung auf den Vitaminstatus von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen nachweisen [1].

Wir meinen, daß möglicherweise die Gabe von lokal wirksamen Antioxidantien sinnvoll sein kann. Ein Schritt in diese Richtung wurde mit der Einführung der lokalen Behandlung der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen mit 5-Aminosalicylsäureklystieren gemacht, denn wie Ahnfeld-Ronne 1987 nachweisen konnte, hat 5-Aminosalicylsäure in vivo gute Radikalfängereigenschaften [3].

Für zukünftige Studien ist eine gleichzeitige Messung der oxidativen Schädigungen, zum Beispiel durch Untersuchung des Fettsäuremusters oder der Malondialdehydaktivität wünschenswert. Eine Bestimmung der Parameter in entzündlich veränderter Darmschleimhaut wäre ebenfalls sinnvoll, jedoch ist die bei erwachsenen Patienten durchgeführte routinemäßige Coloskopie bei Kindern nicht durchführbar.

## 5 Zusammenfassung

In Blutkreislauf und Darmmucosa von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen konnten in Studien erhöhte Spiegel freier Radikale und eine Erhöhung von Oxidationsprodukten nachgewiesen werden, das normalerweise bestehende oxidative Gleichgewicht scheint gestört zu sein. Nur wenige Untersuchungen beschäftigten sich bisher mit den Antioxidantien.

In dieser Untersuchung gingen wir der Frage nach, ob die Antioxidantien im Plasma von Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa gegenüber gesunden Kontrollpersonen erniedrigt sind und ob ein Zusammenhang mit der Krankheitsaktivität besteht.

Mit einer den gesamten Antioxidantienstatus messenden Methode bestimmten wir die sogenannte TRAP (aus dem Englischen: Total radical-trapping antioxidant parameter) im Blutplasma erkrankter Kinder im Vergleich zu gesunden Kindern. Außerdem haben wir die wichtigsten bekannten Antioxidantien im Blut bestimmt und konnten damit eine theoretische TRAP errechnen.

Bei den 29 Morbus Crohn Patienten fanden wir gegenüber den Kontrollpersonen Erhöhungen von gemessener TRAP ( $985 \pm 272$  gegen  $753 \pm 197$   $\mu\text{mol/l}$ ,  $p < 0,0001$ ),  $\alpha$ -Tocopherol ( $39,2 \pm 17,7$  gegen  $22 \pm 12,6$   $\mu\text{mol/l}$ ,  $p < 0,0001$ ) und Harnsäure ( $5,16 \pm 1,11$  gegen  $3,95 \pm 0,97$   $\text{mg/dl}$ ,  $p < 0,0001$ ), Erniedrigungen von Vitamin C ( $64,8 \pm 23,9$  gegen  $91,2 \pm 50,2$   $\mu\text{mol/l}$ ,  $p < 0,05$ ), SH-Gruppen ( $393 \pm 70$  gegen  $537 \pm 100$   $\mu\text{mol/l}$ ,  $p < 0,0001$ ), Bilirubin ( $0,28 \pm 0,15$  gegen  $0,36 \pm 0,15$   $\text{mg/dl}$ ,  $p < 0,05$ ) und Cholesterin ( $150 \pm 36$  gegen  $182 \pm 42$   $\text{mg/dl}$ ,  $p < 0,0005$ ) und keine Unterschiede bei  $\gamma$ -Tocopherol, Ubichinon, Ubichinol und die errechnete TRAP. Wir fanden eine negative Korrelation der Krankheitsaktivität mit der Vitamin C-Konzentration, keine mit den übrigen Parametern.

Bei den 21 Colitis ulcerosa Patienten fanden wir gegenüber den Kontrollpersonen Erhöhungen von gemessener TRAP ( $900 \pm 289$  gegen  $753 \pm 197$   $\mu\text{mol/l}$ , n.s.) und  $\alpha$ -Tocopherol ( $31,5 \pm 8,4$  gegen  $22 \pm 12,6$   $\mu\text{mol/l}$ ,  $p < 0,0005$ ), Erniedrigungen von Vitamin C ( $72,2 \pm 25,2$  gegen  $91,2 \pm 50,2$   $\mu\text{mol/l}$ , n.s.), SH-Gruppen ( $447 \pm 70$  gegen  $537 \pm 100$   $\mu\text{mol/l}$ ,  $p < 0,0005$ ) und Cholesterin ( $158 \pm 36$  gegen  $182 \pm 42$   $\text{mg/dl}$ ,  $p < 0,005$ ) und keine Unterschiede bei  $\gamma$ -Tocopherol, Ubichinon, Ubichinol, Harnsäure, Bilirubin und der errechneten TRAP.

Die erhöhte Differenz von errechneter und gemessener TRAP bei den Patientengruppen weist auf bisher unbekannte antioxidative Komponenten im Plasma hin.

Die erhöhte Radikalfängerkapazität im Plasma von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ist überraschend. Möglicherweise ist sie reaktiv auf einen lokalen oxidativen Streß im Darm erhöht. Die Regulierung der oxidativen Abwehr könnte dabei durch Cytokine wie zum Beispiel den Nuklear Faktor Kappa B erfolgen. Die Erhöhung der TRAP könnte so indirekt ein Hinweis auf einen erhöhten lokalen Bedarf an Antioxidantien bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen sein.

## 6 Literaturverzeichnis

- 1 Abad-Lacruz A, Fernandez-Banares F, Cabre E, Gil A, Esteve M, Gonzalez-Huix F, Xiol X und Gassull MA (1988) The effect of total enteral tube feeding on the vitamin status of malnourished patients with inflammatory bowel disease. *Int J Vitam Nutr Res* 58 (4): 428-35
- 2 Aejmelaesus R, Metsa-Ketela T, Laippala P und Alho H (1996) Is there an unidentified defence mechanism against infection in human plasma? *Febs Lett* 384 (2): 128-30
- 3 Ahnfelt-Ronne I, Nielsen OH, Christensen A, Langholz E, Binder V und Riis P (1990) Clinical evidence supporting the radical scavenger mechanism of 5-aminosalicylic acid. *Gastroenterology* 98 (5 Pt 1): 1162-9
- 4 Allgayer H (1991) Clinical relevance of oxygen radicals in inflammatory bowel disease-- facts and fashion. *Klin Wochenschr* 69 (21-23): 1001-3
- 5 Ames BN, Cathcart R, Schwiers E und Hochstein P (1981) Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78 (11): 6858-62
- 6 Ames BN, Shigenaga MK und Hagen TM (1993) Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (17): 7915-22
- 7 Asayama K, Uchida N, Nakane T, Hayashibe H, Dobashi K, Amemiya S, Kato K und Nakazawa S (1993) Antioxidants in the serum of children with insulin-dependent diabetes mellitus. *Free Radic Biol Med* 15 (6): 597-602
- 8 Babbs CF (1990) Free radicals and the etiology of colon cancer. *Free Radic Biol Med* 8 (2): 191-200

- 9 Babbs CF (1992) Oxygen radicals in ulcerative colitis. *Free Radic Biol Med* 13 (2): 169-81
- 10 Barton JR, Gillon S und Ferguson A (1989) Incidence of inflammatory bowel disease in Scottish children between 1968 and 1983; marginal fall in ulcerative colitis, three-fold rise in Crohn's disease. *Gut* 30 (5): 618-22
- 11 Bast A, Haenen GR und Doelman CJ (1991) Oxidants and antioxidants: state of the art. *Am J Med* 91 (3C): 2S-13S
- 12 Bieri JG, Poukka RK und Prival EL (1970) Determination of alpha-tocopherol in erythrocytes by gas-liquid chromatography. *J Lipid Res* 11 (2): 118-23
- 13 Buffinton GD und Doe WF (1995) Altered ascorbic acid status in the mucosa from inflammatory bowel disease patients. *Free Radic Res* 22 (2): 131-43
- 14 Buffinton GD und Doe WF (1995) Depleted mucosal antioxidant defences in inflammatory bowel disease. *Free Radic Biol Med* 19 (6): 911-8
- 15 Burton GW und Ingold KU (1984) beta-Carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science* 224 (4649): 569-73
- 16 Caulfield ME (1993) Ulcerative Colitis. In: Wyllie R and Hyams JS (ed) *Pediatric Gastroenterology*. WB Saunders, Philadelphia, p. 742-764
- 17 Ceriello A, *et al.* (1997) Total radical-trapping antioxidant parameter in NIDDM patients. *Diabetes Care* 20 (2): 194-7
- 18 Chemtob S, Roy MS, Abran D, Fernandez H und Varma DR (1993) Prevention of postasphyxial increase in lipid peroxides and retinal function deterioration in the newborn pig by inhibition of cyclooxygenase activity and free radical generation. *Pediatr Res* 33 (4 Pt 1): 336-40

- 19 Cohen AM, Aberdroth RE und Hochstein P (1984) Inhibition of free radical-induced DNA damage by uric acid. *Febs Lett* 174 (1): 147-50
- 20 Craven PA, Pfanstiel J, Saito R und DeRubertis FR (1987) Actions of sulfasalazine and 5-aminosalicylic acid as reactive oxygen scavengers in the suppression of bile acid-induced increases in colonic epithelial cell loss and proliferative activity. *Gastroenterology* 92 (6): 1998-2008
- 21 Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, McCord JM und Harman D (1987) Oxygen radicals and human disease [clinical conference]. *Ann Intern Med* 107 (4): 526-45
- 22 Davies KJ, Sevanian A, Muakkassah-Kelly SF und Hochstein P (1986) Uric acid-iron ion complexes. A new aspect of the antioxidant functions of uric acid. *Biochem J* 235 (3): 747-54
- 23 Diplock AT, In: *Fat-soluble vitamins, their biochemistry and application*. 1985, Heineman: London. p. 154-224.
- 24 Duchmann R, Neurath M, Marker-Hermann E und Meyer Zum Buschenfelde KH (1997) Immune responses towards intestinal bacteria--current concepts and future perspectives. *Z Gastroenterol* 35 (5): 337-46
- 25 Ellman GL (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82 : 70-77
- 26 Emerit J, Pelletier S, Tosoni-Verlignue D und Mollet M (1989) Phase II trial of copper zinc superoxide dismutase (CuZnSOD) in treatment of Crohn's disease. *Free Rad Biol Med* 7 : 145-149
- 27 Fernandez-Banares F, Abad-Lacruz A, Xiol X, Gine JJ, Dolz C, Cabre E, Esteve M, Gonzalez-Huix F und Gassull MA (1989) Vitamin status in patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 84 (7): 744-8

- 28 Finckh B, Kontush A, Commentz J, Hubner C, Burdelski M und Kohlschutter A (1995) Monitoring of ubiquinol-10, ubiquinone-10, carotenoids, and tocopherols in neonatal plasma microsamples using high-performance liquid chromatography with coulometric electrochemical detection. *Anal Biochem* 232 (2): 210-6
- 29 Frei B, Stocker R und Ames BN (1988) Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85 (24): 9748-52
- 30 Frei B, Kim MC und Ames BN (1990) Ubiquinol-10 is an effective lipid-soluble antioxidant at physiological concentrations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (12): 4879-83
- 31 Frei B (1991) Ascorbic acid protects lipids in human plasma and low-density lipoprotein against oxidative damage. *Am J Clin Nutr* 54 (6 Suppl): 1113S-1118S
- 32 Frei B (1994) Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. *Am J Med* 97 (3A): 5S-13S; discussion 22S-28S
- 33 Glazer AN (1988) Fluorescence-based assay for reactive oxygen species: a protective role for creatinine. *Faseb J* 2 (9): 2487-91
- 34 Grisham MB und Granger DN (1988) Neutrophil-mediated mucosal injury. Role of reactive oxygen metabolites. *Dig Dis Sci* 33 (3 Suppl): 6S-15S
- 35 Grisham MB (1994) Oxidants and free radicals in inflammatory bowel disease. *Lancet* 344 (8926): 859-61
- 36 Grootveld M, Halliwell B und Moorhouse CP (1987) Action of uric acid, allopurinol and oxypurinol on the myeloperoxidase-derived oxidant hypochlorous acid. *Free Radic Res Commun* 4 (2): 69-76

- 37 Guarnieri C, Flamigni F und Caldarera CM (1980) Role of oxygen in the cellular damage induced by re-oxygenation of hypoxic heart. *J Mol Cell Cardiol* 12 (8): 797-808
- 38 Halliwell B, Wasil M und Grootveld M (1987) Biologically significant scavenging of the myeloperoxidase-derived oxidant hypochlorous acid by ascorbic acid. Implications for antioxidant protection in the inflamed rheumatoid joint. *Febs Lett* 213 (1): 15-7
- 39 Halliwell B (1991) Drug antioxidant effects. A basis for drug selection? *Drugs* 42 (4): 569-605
- 40 Halliwell B (1991) Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med* 91 (3C): 14S-22S
- 41 Halliwell B (1994) Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? [see comments]. *Lancet* 344 (8924): 721-4
- 42 Harms HK, Blomer R, Bertele-Harms RM, Shmerling DH, Konig M und Spaeth A (1994) A paediatric Crohn's disease activity index (PCDAI). Is it useful? Study Group on Crohn's Disease in Children and Adolescents. *Acta Paediatr Suppl* 83 (395): 22-6
- 43 Haug K, Schrupf E, Halvorsen JF, Fluge G, Hamre E, Hamre T und Skjollingstad R (1989) Epidemiology of Crohn's disease in western Norway. Study group of Inflammatory Bowel Disease in Western Norway. *Scand J Gastroenterol* 24 (10): 1271-5
- 44 Hoffenberg EJ, Deutsch J, Smith S und Sokol RJ (1997) Circulating antioxidant concentrations in children with inflammatory bowel disease [published erratum appears in *Am J Clin Nutr* 1998 Jan;67(1):151-2] [see comments]. *Am J Clin Nutr* 65 (5): 1482-8

- 45 Hyams JS (1993) Crohn's Disease. In: Wyllie R and Hyams JS (ed) Pediatric Gastroenterology. WB Saunders, Philadelphia, p. 742-764.
- 46 Jendryczko A und Tomala J (1995) The total free radical trapping ability of blood plasma in eclampsia. *Zentralbl Gynakol* 117 (3): 126-9
- 47 Kelly FJ (1993) Free radical disorders of preterm infants. *Br Med Bull* 49 (3): 668-78
- 48 Kerr ME, Bender CM und Monti EJ (1996) An introduction to oxygen free radicals. *Heart Lung* 25 (3): 200-9; quiz 210-1
- 49 Keshavarzian A, Sedghi S, Kanofsky J, List T, Robinson C, Ibrahim C und Winship D (1992) Excessive production of reactive oxygen metabolites by inflamed colon: analysis by chemiluminescence probe. *Gastroenterology* 103 (1): 177-85
- 50 Kirk AP, Cason J, Fordham JN, Brown KA, Goddard DH, Holborow EJ und Lennard-Jones JE (1983) Polymorphonuclear leukocyte function in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 28 (3): 236-48
- 51 Kitahora T, Suzuki K, Asakura H, Yoshida T, Suematsu M, Watanabe M, Aiso S und Tsuchiya M (1988) Active oxygen species generated by monocytes and polymorphonuclear cells in Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 33 (8): 951-5
- 52 Krawisz JE, Sharon P und Stenson WF (1984) Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology* 87 (6): 1344-50
- 53 Kuroki F, Iida M, Tominaga M, Matsumoto T, Hirakawa K, Sugiyama S und Fujishima M (1993) Multiple vitamin status in Crohn's disease. Correlation with disease activity. *Dig Dis Sci* 38 (9): 1614-8

- 54 Lih-Brody L, *et al.* (1996) Increased oxidative stress and decreased antioxidant defenses in mucosa of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 41 (10): 2078-86
- 55 Lindeman JH, van Zoeren-Grobbe D, Schrijver J, Speek AJ, Poorthuis BJ und Berger HM (1989) The total free radical trapping ability of cord blood plasma in preterm and term babies. *Pediatr Res* 26 (1): 20-4
- 56 Lovelady HG (1973) Separation of individual tocopherols from human plasma and red blood cells by thin-layer and gas-liquid chromatography. *J Chromatogr* 85 (1): 81-92
- 57 Lynch SM, Morrow JD, Roberts L2 und Frei B (1994) Formation of non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F2-isoprostanes) in plasma and low density lipoprotein exposed to oxidative stress in vitro. *J Clin Invest* 93 (3): 998-1004
- 58 MacKendrick W und Caplan M (1993) Necrotizing enterocolitis. New thoughts about pathogenesis and potential treatments. *Pediatr Clin North Am* 40 (5): 1047-59
- 59 Macpherson A, Khoo UY, Forgacs I, Philpott-Howard J und Bjarnason I (1996) Mucosal antibodies in inflammatory bowel disease are directed against intestinal bacteria. *Gut* 38 (3): 365-75
- 60 McCord JM und Roy RS (1982) The pathophysiology of superoxide: roles in inflammation and ischemia. *Can J Physiol Pharmacol* 60 (11): 1346-52
- 61 McCord JM (1985) Oxygen derived free radicals in post-ischaemic tissue injury. *New Eng J Med* 312 : 159-163
- 62 Mulholland CW und Strain JJ (1991) Serum total free radical trapping ability in acute myocardial infarction. *Clin Biochem* 24 (5): 437-41

- 63 Neuzil J und Stocker R (1993) Bilirubin attenuates radical-mediated damage to serum albumin. *Febs Lett* 331 (3): 281-4
- 64 Nielsen OH und Rask-Madsen J (1996) Mediators of inflammation in chronic inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol Suppl* 216 : 149-59
- 65 Niki E, Saito M, Yoshikawa Y, Yammmamoto Y und Kamiya Y (1986) Oxidation of lipids. XII. Inhibition of oxidation of soybean phosphatidylcholine and methyl linolate in aqueous dispersions by uric acid. *Bull Chem Soc Jpn* 59 : 471-477
- 66 Omaye ST, Turnbull JD und Sauberlich HE (1979) Selected method for the determination of ascorbic acid in animal cells, tissues and fluids. *Methods in Enzymology* 62 : 3-14
- 67 Rachmilewitz D (1989) Coated mesalazine (5-aminosalicylic acid) versus sulphasalazine in the treatment of active ulcerative colitis: a randomised trial. *Bmj* 298 (6666): 82-6
- 68 Ramakrishna BS, Varghese R, Jayakumar S, Mathan M und Balasubramanian KA (1997) Circulating antioxidants in ulcerative colitis and their relationship to disease severity and activity. *J Gastroenterol Hepatol* 12 (7): 490-4
- 69 Ramasarma R und Jayaraman J (1971) Metabolism of ubiquinone in the rat. *Meth Enzymol* 18c: 232-237
- 70 Reimund JM, Allison AC, Muller CD, Dumont S, Kenney JS, Baumann R, Duclos B und Poindron P (1998) Antioxidants inhibit the in vitro production of inflammatory cytokines in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Eur J Clin Invest* 28 (2): 145-50
- 71 Sartor RB, Rath HC und Sellon RK (1996) Microbial factors in chronic intestinal inflammation. *Curr Opin Gastroenterol* 12: 327-333

- 72 Schreck R und Baeuerle PA (1994) Assessing oxygen radicals as mediators in activation of inducible eukaryotic transcription factor NF-kappa B. *Methods Enzymol* 234 : 151-63
- 73 Sherlock S (1951) *Liver Disease*. Vol. 204., London: Churchill.
- 74 Simmonds NJ, Allen RE, Stevens TR, Van-Someren RN, Blake DR und Rampton DS (1992) Chemiluminescence assay of mucosal reactive oxygen metabolites in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 103 (1): 186-96
- 75 Sokol RJ, Heubi JE, Iannaccone ST, Bove KE und Balistreri WF (1984) Vitamin E deficiency with normal serum vitamin E concentrations in children with chronic cholestasis. *N Engl J Med* 310 (19): 1209-12
- 76 Sokol RJ und Hoffenberg EJ (1996) Antioxidants in pediatric gastrointestinal disease. *Pediatr Clin North Am* 43 (2): 471-88
- 77 Stocker R, Glazer AN und Ames BN (1987) Antioxidant activity of albumin-bound bilirubin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84 (16): 5918-22
- 78 Thurnham DI, Sitnnyake RD, Koottathep S, McConkey B und Davis M (1987) Antioxidant status measured by the 'TRAP' assay in rheumatoid arthritis (Hrsg) . Richelieu Press: London.
- 79 Town M-H, Gehm S, B. H und Ziegenhorn J (1985) A sensitive colorimetric method for the enzymatic determination of uric acid. *J Clin Chem Clin Biochem* 23 : 591
- 80 Turrens JF und Boveris A (1980) Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J* 191 (2): 421-7

- 81 von Wietersheim J, Kohler T und Feiereis H (1992) Relapse-precipitating life events and feelings in patients with inflammatory bowel disease. *Psychother Psychosom* 58 (2): 103-12
- 82 Wahl C, Liptay S, Adler G und Schmid RM (1998) Sulfasalazine: a potent and specific inhibitor of nuclear factor kappa B. *J Clin Invest* 101 (5): 1163-74
- 83 Wahlfeld AW, Herz G und Bernt E (1972) Modification of the Malloy-Evelyn method for simple, reliable determination of total bilirubin in serum. *Scand J Clin Lab Invest* 29 (Suppl 126): abstract no. 11.12.
- 84 Wayner DD, Burton GW, Ingold KU und Locke S (1985) Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. The important contribution made by plasma proteins. *FEBS Lett* 187 (1): 33-7
- 85 Wayner DD, Burton GW und Ingold KU (1986) The antioxidant efficiency of vitamin C is concentration-dependent. *Biochim Biophys Acta* 884 (1): 119-23
- 86 Wayner DD, Burton GW, Ingold KU, Barclay LR und Locke SJ (1987) The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxy radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochim Biophys Acta* 924 (3): 408-19
- 87 Wefers H und Sies H (1983) Oxidation of glutathione by the superoxide radical to the disulfide and the sulfonate yielding singlet oxygen. *Eur J Biochem* 137 (1-2): 29-36
- 88 Wefers H und Sies H (1988) The protection by ascorbate and glutathione against microsomal lipid peroxidation is dependent on vitamin E. *Eur J Biochem* 174 (2): 353-7

- 89 Weiss SJ (1989) Tissue destruction by neutrophils [see comments]. *N Engl J Med* 320 (6): 365-76
- 90 Williams JG und Hallett MB (1989) The reaction of 5-amino-salicylic acid with hypochlorite. Implications for its mode of action in inflammatory bowel disease. *Biochem Pharmacol* 38 (1): 149-54

## 7 Danksagung

Ich danke

Herrn Prof. Martin Burdelski für die Überlassung des interessanten Themas und für die Betreuung und Beratung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Alfried Kohlschütter für die Benutzung des Laboratoriums mit dessen technischen Einrichtungen, die kritische Einsichtnahme des Skripts und die Beratung bei der Durchführung der Arbeit.

Frau Dr. Barbara Finckh für die wissenschaftliche Betreuung und Beratung bei der Laborarbeit und für die kritische Einsichtnahme des Skripts.

Frau Jutta Giesecking für die Einarbeitung und Hilfe bei der TRAP-Messung und für die Messung des Cholesterins und des Bilirubins.

Frau Ingeborg Wernicke für die Einarbeitung und Hilfe am HPLC-Gerät.

Den Mitarbeitern der gastroenterologischen Ambulanz für die Blutentnahmen und die Ermöglichung der Akteneinsicht.

Der Firma Sun- Stardivision für die erfolgreiche Wiederherstellung des Dokuments.

Meiner Frau Susanne Habermann für die kritische Einsichtnahme des Skripts und ihre Geduld.

## 8 Lebenslauf

geboren: 28.06.1969 in Hamburg

Familienstand: verheiratet, ein Kind

Staatsangehörigkeit: deutsch

### **Ausbildung/ Abschluß**

August 1976- März 1977 Grundschule Lütjenmoor in Norderstedt

April 1977- Juli 1980 Grundschule Hörnerkirchen

August 1980- Mai 1989 Bismarckschule Elmshorn: Abitur.

Oktober 1990- Juni 1997 Universität Hamburg Fachbereich Medizin: Staatsexamen.

### **Veröffentlichungen**

Mai 1995 Poster auf der 28. Jahrestagung der ESPGAN (European Society of Paediatric Gastroenterology and Nutrition) in Jerusalem mit dem Titel: The total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP) in plasma from paediatric patients with Crohn disease.

September 1995 Poster auf der 91. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kinderheilkunde in Krefeld mit dem Titel: Der *Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter* (TRAP) im Plasma von Kindern mit Morbus Crohn.

### **Bisherige Tätigkeit**

November 1997- April 1999 AiP im Kinderkrankenhaus auf der Bult in Hannover, als Stationsarzt auf wechselnden Abteilungen.

## 9 Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, daß ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die von mir angegebenen 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, und daß ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Hamburg, den  
19.10.1999