

Modulation oxidativer Zellschäden bei Hämodialysepatienten

Dem Fachbereich Chemie der Technischen Universität Kaiserslautern
zur Erlangung des akademischen Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
eingereichte Dissertation

D 386

vorgelegt von Diplom-Lebensmittelchemiker
Thomas Spormann

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 23.07.2008

Betreuer der Arbeit: Prof. Dr. G. Eisenbrand

Kaiserslautern 2008

Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit entstand zwischen April 2004 und Juni 2008 im Fachbereich
Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie & Toxikologie der Technischen
Universität Kaiserslautern.

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 23.07.2008

Prüfungskommission Vorsitzender: Prof. Dr. Ing. Stefan Ernst

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Gerhard Eisenbrand
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. med. Dieter Schrenk

Ich danke Herrn Prof. Dr. G. Eisenbrand und Frau Dr. C. Janzowski für die
Möglichkeit zur Promotion, die Bereitschaft, als Betreuer zur Verfügung zu stehen
sowie für die zahlreichen Anregungen und die wohlwollende Unterstützung während
der Promotionszeit.

1. Einleitung	1
2. Problemstellung	3
3. Theoretische Grundlagen	6
3.1. Oxidativer Stress	6
3.1.1. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)	6
3.1.2. Folgen von oxidativem Stress	11
3.1.2.1. DNA-Schädigung.....	11
3.1.2.2. Lipidperoxidation.....	14
3.1.2.3. Proteinoxidation.....	17
3.1.2.4. Nuclear Factor kappa B (NF-κB).....	22
3.1.3. Oxidativer Stress und Krankheiten	30
3.1.3.1. Niereninsuffizienz und Hämodialyse	31
3.1.3.2. Anämie und Eisenmedikamente	36
3.1.3.3. Folgen.....	37
3.2. Antioxidative Abwehrmechanismen	38
3.2.1. Primäre endogene Abwehr	38
3.2.1.1. Enzymatischer Abbau.....	38
3.2.1.2. Proteine.....	38
3.2.1.3. Niedermolekulare Substanzen.....	39
3.2.2. Sekundäre endogene Abwehr	42
3.2.2.1. DNA-Reparatur	42
3.2.2.2. Proteine: Reparatur und Degradation	43
3.2.2.3. Modulation der Signaltransduktion/Cell Response	43
3.3. Exogene Antioxidantien	45
3.3.1. Vitamin C.....	45
3.3.2. Vitamin E.....	46
3.3.3. Carotinoide.....	48
3.3.4. Flavonoide und Polyphenole	49
3.3.4.1. Struktur, Vorkommen, Aufnahmemengen.....	51
3.3.4.2. Anthocyane.....	55

3.4. Mehrfruchtsaft.....	68
3.4.1. Polyphenolprofil von Mehrfruchtsäften.....	68
3.4.2. Herstellung und Zusammensetzung des roten Mehrfruchtsaftes für die Interventionsstudie bei HD-Patienten.....	71
3.5. Testmethoden	74
3.5.1. Testsysteme.....	74
3.5.1.1. Zell-Linie U937	74
3.5.1.2. Blut (Vollblut, Plasma, Serum, PBMCs).....	74
3.5.2. DNA-Schäden.....	76
3.5.3. Glutathion.....	78
3.5.4. Malondialdehyd.....	79
3.5.5. Triglyceride.....	80
3.5.6. Proteincarbonyle.....	81
3.5.7. NF- κ B-Status.....	81
3.5.8. Antioxidative Kapazität (TEAC).....	83
3.5.9. Harnsäure.....	84
3.5.10. Anthocyanbestimmung.....	85
4. Material und Methoden.....	86
4.1. Durchgeführte Untersuchungen	86
4.1.1. Vergleich von verschiedenen Eisenpräparationen.....	86
4.1.1.1. In vitro-Untersuchungen	86
4.1.1.2. HD-Patienten	88
4.1.2. Untersuchungen mit rotem Mehrfruchtsaft.....	89
4.1.2.1. Interventionsstudie.....	89
4.1.2.2. Vergleich des TEAC des Studiensaftes mit anderen Fruchtsäften	92
4.2. Gewinnung und Aufarbeitung der Blutproben.....	92
4.2.1. Blutentnahme.....	94
4.2.1.1. Blutmengen für die Untersuchung der Eisenpräparationen.....	94
4.2.1.2. Blutmengen für die Saftstudie.....	95
4.2.2. Bearbeitung der Blutproben nach der Entnahme.....	96
4.2.2.1. Vollblut.....	96
4.2.2.2. Plasma.....	96

Inhalt

4.2.2.3. Serum	96
4.2.2.4. Isolierung von PBMCs	96
4.2.2.5. Bestimmung der Zellzahl mittels Hämocytometer	97
4.2.2.6. Bestimmung der Zellviabilität	98
4.2.2.7. Bearbeitung der PBMCs als Kontrollen für den Comet Assay	98
4.3. Versuchsdurchführungen.....	99
4.3.1. Einzelzell-Gelelektrophorese (Comet Assay).....	99
4.3.2. Glutathion.....	102
4.3.3. Malondialdehyd.....	105
4.3.4. Triglyceride.....	107
4.3.5. Proteincarbonyle.....	108
4.3.6. NF- κ B-Status.....	111
4.3.7. Antioxidative Kapazität (TEAC).....	119
4.3.8. Harnsäure.....	120
4.3.9. Anthocyan-Analytik.....	122
4.4. Statistik.....	124
4.4.1. Ausreißer-Test nach Nalimov.....	124
4.4.2. Variationskoeffizient.....	124
4.4.3. Normalverteilung der Werte (Anderson Darling-Test).....	125
4.4.4. Signifikanztests.....	126
4.4.4.1. Parametrischer Test: t-Test	127
4.4.4.2. Nichtparametrischer Test: Wilcoxon-Test	128
4.4.5. Varianzanalyse (ANOVA).....	129
5. Ergebnisse und erste Diskussion	131
5.1. Eisenpräparationen	131
5.1.1. In vitro-Untersuchungen.....	131
5.1.1.1. Zell-Linie U937	131
5.1.1.2. PBMCs	133
5.1.1.3. Vollblut.....	137
5.1.2. HD-Patienten.....	140
5.1.2.1. DNA-Schäden.....	140
5.1.2.2. Glutathionstatus.....	141
5.1.2.3. Malondialdehyd	142

Inhalt

5.1.3. Diskussion der Untersuchungen mit Eisenpräparationen.....	143
5.1.3.1. In vitro-Untersuchungen	143
5.1.3.2. Untersuchungen bei HD-Patienten	145
5.2. Interventionsstudie mit rotem Mehrfruchtsaft.....	148
5.2.1. DNA-Schäden.....	149
5.2.2. Glutathion.....	153
5.2.3. Malondialdehyd.....	161
5.2.4. Triglyceride.....	165
5.2.5. Malondialdehyd/Triglyceride.....	168
5.2.6. Proteincarbonyle.....	171
5.2.7. NF- κ B-Status.....	174
5.2.8. Antioxidative Kapazität (TEAC).....	177
5.2.9. Harnsäure.....	180
5.2.10. Anthocyanbestimmung.....	182
5.3. TEAC verschiedener Fruchtsäfte	183
6. Diskussion und Ausblick	185
6.1. Untersuchungen der pro-oxidativen Eigenschaften verschiedener Eisen-Präparationen	185
6.1.1. In vitro-Untersuchungen.....	185
6.1.2. Untersuchungen bei HD-Patienten.....	186
6.2. Interventionsstudie mit rotem Mehrfruchtsaft bei HD- Patienten	188
7. Zusammenfassung	198
8. Literaturverzeichnis.....	200
9. Abbildungen- und Tabellen-Verzeichnis	218
10. Abkürzungsverzeichnis.....	221

11. Anhang	225
11.1. Werte-Verläufe der Patienten bei der Intervention ..	225
11.2. Daten zu den Abbildungen der Ergebnisse	237
11.3. Daten zur Interventionsstudie	252
11.3.1. Ausschlusskriterien.....	252
11.3.2. Durchführungszeitraum.....	252
11.3.3. Liste mit Ernährungsvorgaben.....	253
11.3.4. Exemplarischer Terminplan.....	254
11.4. Patientendaten zur Interventionsstudie	256
11.4.1. Basisdaten, Grund- und Begleiterkrankungen.....	256
11.4.2. Klinische Monatswerte.....	258
11.4.3. Medikation.....	262
11.4.4. Ernährungsprotokolle.....	267
11.5. Statistische Berechnungen	288
11.5.1. Anderson Darling-Test.....	288
11.5.2. Einseitig gepaarter t-Test / einseitiger Wilcoxon-Test.....	289
11.5.3. ANOVA.....	290
11.6. Lebenslauf	292
11.7. Posterbeiträge und Publikationen	293
11.8. Bestätigung der Eigenleistung	295

1. Einleitung

Das Element Sauerstoff ist für die meisten Lebewesen ein unerlässlicher Bestandteil für das Überleben. Abgesehen von einigen anaeroben und aerotoleranten Einzellern sind sämtliche Bakterien, Pflanzen und Tiere auf Sauerstoff zur Energiegewinnung angewiesen. Diese läuft bei Eukaryonten in den Mitochondrien über eine O₂-abhängige Elektronentransportkette ab, wobei O₂ als Elektronenakzeptor dient und schrittweise zu H₂O reduziert wird. Diese Reaktionen verlaufen jedoch nicht verlustfrei und es werden ca. 1-10% der Zwischenprodukte als so genannte „Reaktive Sauerstoffspezies“ (ROS) an die Umgebung abgegeben [Biesalski et al., 2002]. ROS können auch bei anderen physiologischen Prozessen entstehen oder z. B. als Folge von intravenös verabreichten Eisenmedikamenten bei anämischen Patienten oder während der Hämodialyse (HD) gebildet werden [Morena et al., 2002; Lou et al., 2007]. Zu den ROS gehören einige freie Radikale wie das Hydroxyl- und Superoxidanion-Radikal, aber auch neutrale Moleküle wie Wasserstoffperoxid und Singulett-Sauerstoff. Reaktive Sauerstoffspezies sind in der Lage, direkt oder indirekt zelluläre Bestandteile zu schädigen; dies kann durch die Untersuchung von Veränderungen von Lipiden und Makromolekülen wie DNA oder Proteinen nachgewiesen werden [Halliwell et al., 1999; Evans et al., 2004; Valko et al., 2007]. Um sich vor den Auswirkungen dieser Schäden (z. B. Mutationen, Zellschäden, Enzym- und Rezeptordefekte) zu schützen, besitzen aerobe Lebewesen spezielle Abwehrmechanismen, die ROS abfangen, deren Entstehung verhindern oder entstandene Schäden reparieren können [Halliwell et al., 1999; Melidou et al., 2005].

Bei einer Überproduktion von ROS, z. B. bei Entzündungen oder einer Reduktion der körpereigenen Abwehrkapazität, z. B. durch Enzymhemmung oder Enzymdefekte, entsteht oxidativer Stress. Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz, die sich einer regelmäßigen Hämodialyse unterziehen, leiden an erhöhtem oxidativem Stress, bedingt durch Antioxidantienverlust während der Dialyse, Akkumulation von AGEs, Fehlernährung [Hörl, 1999; Morena et al., 2002; Lou et al., 2007] und Begleiterkrankungen wie z. B. Diabetes mellitus. Infolge der Niereninsuffizienz kann die Bildung des Nebennierenrinden-Hormons Erythropoietin (EPO) gestört sein, die Behandlung der damit verbundenen Anämie erfolgt durch die intravenöse Applikation von EPO und eisenhaltigen Medikamenten, die teilweise für den chronisch erhöhtem

Einleitung

oxidativem Stress bei HD-Patienten verantwortlich sind [Giray et al., 2003; Scholze et al., 2004], indem sie unkontrolliert Eisen-Ionen freisetzen können [Agarwal et al., 2004; Hörl, 2007]. Eisen ist mit einem durchschnittlichen Vorkommen von 4–5 g das häufigste essentielle Spurenelement des menschlichen Körpers. Es ist wichtiger Bestandteil des Blutfarbstoffs Hämoglobin, des Muskelfarbstoffs Myoglobin, der Elektronentransportkette und der aktiven Zentren vieler Enzyme [Kreutzig, 1994].

Epidemiologische Studien in den letzten Jahrzehnten haben eine Korrelation zwischen einer obst- und gemüsereichen Ernährung und einer verminderten Inzidenz für degenerative Erkrankungen wie Krebs, Atherosklerose, Diabetes oder Niereninsuffizienz festgestellt [Riboli et al., 2003; Prior, 2003; Facchini et al., 2003; Singh et al., 2006]. Eine gesunde Ernährung kann die antioxidative Abwehr unterstützen und bietet einen Therapieansatz für Risikogruppen wie z. B. HD-Patienten [Block et al., 1992; Hertog et al., 1993; Hertog et al., 1995; Facchini et al., 2003]. Besondere Aufmerksamkeit galt dabei den in der Nahrung vorkommenden Antioxidantien wie den Vitaminen A, C und E, β -Carotin, Folsäure und Selen, des Weiteren die sekundären Pflanzeninhaltsstoffe. Hierzu gehören zahlreiche polyphenolische Verbindungen, darunter auch die zur Familie der Flavonoide gehörenden Anthocyane. Ihr Name leitet sich von den griechischen Wörtern anthos (Blüte) und kyanos (blau) ab. Sie sind als natürliche Farbstoffe in Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft weit verbreitet und besitzen antioxidative, antiinflammatorische und chemopräventive Eigenschaften [Birt et al., 2001; Riboli et al., 2003; Marko et al., 2004; Schaefer et al., 2006; Lee-Hilz et al., 2006; Singh et al., 2006; Heinonen, 2007].

Im Hinblick auf die Zufuhr antioxidativ wirksamer Inhaltsstoffe sind insbesondere Obst- und Gemüsesäfte von Bedeutung. Die Deutschen konsumieren mit 40,2 Litern pro Person und Jahr weltweit die größte Menge an Fruchtsäften und –nektaren. Säfte mit besonders hoher antioxidativer Kapazität (z. B. schwarzer Johannisbeersaft, Holunderbeersaft und Brombeersaft) sind reich an Anthocyanen und anderen Polyphenolen und bieten somit eine vielversprechende Alternative zur Versorgung der gesunden Bevölkerung [O'Byrne et al., 2002; Bub et al., 2003; Weisel et al., 2006; Castilla et al., 2006; Heinonen, 2007] und der Supplementierung von Risikogruppen mit antioxidativ wirksamen Substanzen [Castilla et al., 2006].

2. Problemstellung

Antioxidativ wirksame Substanzen, wie z. B. die Polyphenole/Flavonoide (sekundäre Pflanzenstoffe), die in Obst und Gemüse in zum Teil hohen Mengen enthalten sind, sollen dem oxidativen Stress entgegenwirken und sowohl als Prävention für Gesunde als auch zur Behandlung von Risikogruppen wie HD-Patienten dienen können [Weisel et al., 2006; Castilla et al., 2006]. Rote Fruchtsäfte mit besonders hoher antioxidativer Kapazität wie schwarzer Johannisbeersaft, Holundersaft, Brombeersaft [Pour Nikfardjam et al., 2000] zeichnen sich durch hohe Gehalte an Anthocyanen, einer Untergruppe der Flavonoide, aus [Mazza et al., 1993]. Sie zeigen antioxidative, antiinflammatorische, und chemopräventive Eigenschaften, schützen vor Krebs und kardiovaskulären Erkrankungen [Yoon et al., 2005; Weisel et al., 2006; Castilla et al., 2006]. Da die Bioverfügbarkeit der Anthocyane jedoch als relativ gering beschrieben ist und der Metabolismus bisher nur vereinzelt aufgeklärt ist [Manach et al., 2005], sind für eine aussagekräftige Beurteilung der gesundheitsfördernden Relevanz dieser Verbindungen weitere in vivo- und in vitro-Untersuchungen, einschließlich der Identifizierung wirksamer Substanzen, erforderlich.

Diese Arbeit beschäftigte sich mit den Auswirkungen prooxidativer (Eisen; Untersuchungen in vitro und in vivo) und antioxidativer Substanzen (Anthocyane/Polyphenole; humane Interventionsstudie, gefördert von der Karin Nolte-Stiftung) auf oxidative Zellschäden. Es sollte geklärt werden, ob der bei HD-Patienten im Vergleich zu Gesunden erhöhte oxidative Stress (u. a. durch die Applikation von Eisen verursacht) und eine eventuelle Reduktion der dadurch entstandenen Schäden durch den Konsum von anthocyan/polyphenolreichem rotem Mehrfruchtsaft mit den verwendeten Untersuchungsmethoden nachweisbar sind. Eine weitere Frage war, inwiefern dieser Saft als rein natürliches Produkt geeignet ist, die bisherige Verwendung von Supplementen wie Vitamin C und E zu reduzieren oder zu ersetzen und damit z. B. das Risiko von Nebenwirkungen bei Gabe von hohen Vitamin E-Dosen zu senken [Ohkawa et al., 2004]. Ziel war eine Beurteilung des oxidativen Status von HD-Patienten und der antioxidativen Wirksamkeit eines anthocyan/polyphenolreichen roten Mehrfruchtsaftes anhand verschiedener Biomarker der oxidativen Zellschädigung und des Glutathionstatus. Diese Marker erlauben es, sowohl eine Erhöhung des oxidativen Stress durch die Gabe von

Problemstellung

Eisenpräparationen als auch die mögliche präventive Wirkung durch die Saftinhaltsstoffe zu erfassen.

Im ersten Teil wurden die prooxidativen Effekte verschiedener Eisenpräparationen (Ferrlecit[®], Venofer[®], Cosmofer[®] und FeCl₃) auf Biomarker der oxidativen Zellschädigung untersucht, da freies Eisen im Organismus als einer der Gründe für erhöhten oxidativen Stress angesehen wird [Agarwal et al., 2004]. Dazu dienten die Suspensionszell-Linie U937 und PBMCs von gesunden Probanden (in vitro) sowie Vollblut von gesunden Probanden (ex vivo). Des Weiteren wurden die Einflüsse einer Ferrlecit[®]-Gabe in Blutproben anämischer HD-Patienten analysiert.

Zur Erfassung der prooxidativen Eigenschaften der vier Eisenpräparationen wurden verschiedene Blutbiomarker ausgewählt, da der oxidative Stress bei HD-Patienten durch die intravenöse Eisengabe primär im Blut entsteht. Als Biomarker dienten:

- (Oxidative) DNA-Schädigung (Einzel-Zell Gel-Elektrophorese, Comet Assay) in Vollblut [Singh et al., 1988 ; Collins et al., 1996]
- Lipidperoxidationsprodukt Malondialdehyd (HPLC/Fluoreszenzdetektion) in Plasma [Weisel et al., 2006]
- Bei den Blutproben der HD-Patienten wurde zusätzlich der Glutationstatus (in Vollblut) bestimmt [Gallagher et al., 1994]

Der zweite Teil dieser Arbeit besteht aus Untersuchungen zur antioxidativen Wirkung eines polyphenolreichen roten Mehrfruchtsaftes bei Hämodialysepatienten. Hierzu wurden Voruntersuchungen an fünf HD-Patienten durchgeführt. Diese Untersuchungen dienten der Optimierung der Blutentnahmezeiten und der Prüfung der Biomarker auf ihre Eignung für die Interventionsstudie. Es wurden folgende Biomarker untersucht:

- (Oxidative) DNA-Schädigung (Comet Assay) in Vollblut
- Lipidperoxidationsprodukt Malondialdehyd in Plasma
- Glutationstatus in Vollblut
- Proteinoxidation (Proteincarbonyle) in Plasma [Levine et al., 1990]

An der anschließenden Interventionsstudie nahmen 21 stabile HD-Patienten teil, das Design stellt eine Modifizierung des Studienverlaufs, beschrieben bei Weisel et al. [Weisel et al., 2006] dar. Die zehnwöchige Studiendauer wurde in drei Phasen unterteilt: die Run-in Phase in den ersten drei Wochen, die Saftaufnahme, in der für

Problemstellung

vier Wochen täglich ca. 200 ml des Studiensaftes konsumiert wurden und eine Wash-out Phase in den letzten drei Wochen der Studie. Wöchentlich wurden Blutproben abgenommen und biochemische Marker des oxidativen Status bestimmt. Die Studie wurde von der Karin-Nolte-Stiftung gefördert.

Für die Untersuchung des antioxidativen Potentials des Studiensaftes wurden folgende Parameter untersucht:

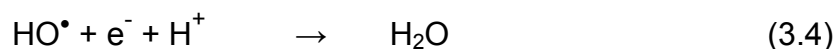
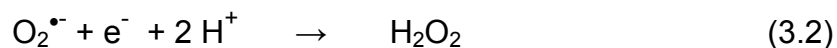
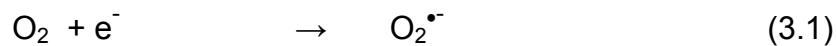
- (Oxidative) DNA-Schädigung (Comet Assay) in Vollblut
- Glutationstatus in Vollblut
- Lipidperoxidationsprodukt Malondialdehyd in Plasma
- Proteinoxidation (Proteincarbonyle) in Plasma
- Modulation von Signaltransduktions-Mechanismen (Transkriptionsfaktor NFκB) in isolierten Lymphozyten [Chaturvedi et al., 2000]
- Antioxidative Kapazität (Trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC) in Plasma [Re et al., 1999]
- Harnsäure-Gehalt in Plasma [Mohanty et al., 1997]
- Triglycerid-Konzentration in Plasma [Fossati et al., 1982]
- Anthocyankonzentration in Blutserum [Mazza et al., 2002]
(Kooperation mit M. Ackermann, TU Würzburg)

3. Theorie

3.1. Oxidativer Stress

3.1.1. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

Sauerstoff wird in aerob lebenden Organismen für Oxidationsreaktionen verwendet. In seinem Grundzustand ist das O₂-Molekül mit zwei ungepaarten Elektronen (Triplettzustand) als freies Diradikal anzusehen und reagiert deswegen hauptsächlich mit Radikalen. Bei der Zellatmung läuft die Reduktion von Sauerstoff zu Wasser über vier Ein-Elektronen-Reduktionsschritte (Gln. 3.1 - 3.4).



Durch die erste Ein-Elektronen-Reduktion entsteht ein Superoxidradikalanion (O₂^{•-}), das durch eine weitere Reduktion und Protonierung Wasserstoffperoxid (H₂O₂) bildet (Gln. 3.1, 3.2). In der dritten Reaktion entsteht aus H₂O₂ das hochreaktive Hydroxylradikal (HO[•]) (Gl. 3.3) und durch den vierten Reduktionsschritt Wasser, das Endprodukt der Zellatmung (Gl. 3.4) [Berg et al., 2003]. Diese Reaktionen verlaufen allerdings nicht verlustfrei und ca. 1-10% der Zwischenprodukte werden als ROS (hauptsächlich O₂^{•-}) an die Umgebung abgegeben [Biesalski et al., 2002]. Zu den ROS zählen neben den radikalischen auch nicht-radikalische Formen, wie z.B. H₂O₂, Ozon (O₃), hypochlorige Säure (HOCl), Alkylhydroperoxide und radikalische Derivate wie Alkoxy- und Alkylperoxyradikale (ROO[•]) [Eisenbrand und Metzler, 2005]. Der Organismus steht diesen Ereignissen nicht wehrlos gegenüber, sondern hat Mechanismen entwickelt, ROS zu eliminieren, bevor sie ihre schädigende Wirkung manifestieren können. Herrscht jedoch ein Ungleichgewicht zwischen der Entstehung und Beseitigung von ROS, so wird dies als oxidativer Stress bezeichnet.

Theorie

Die Entstehung von ROS, zelluläre Abwehrmechanismen und Folgeschäden sind in Abbildung 3.1 dargestellt.

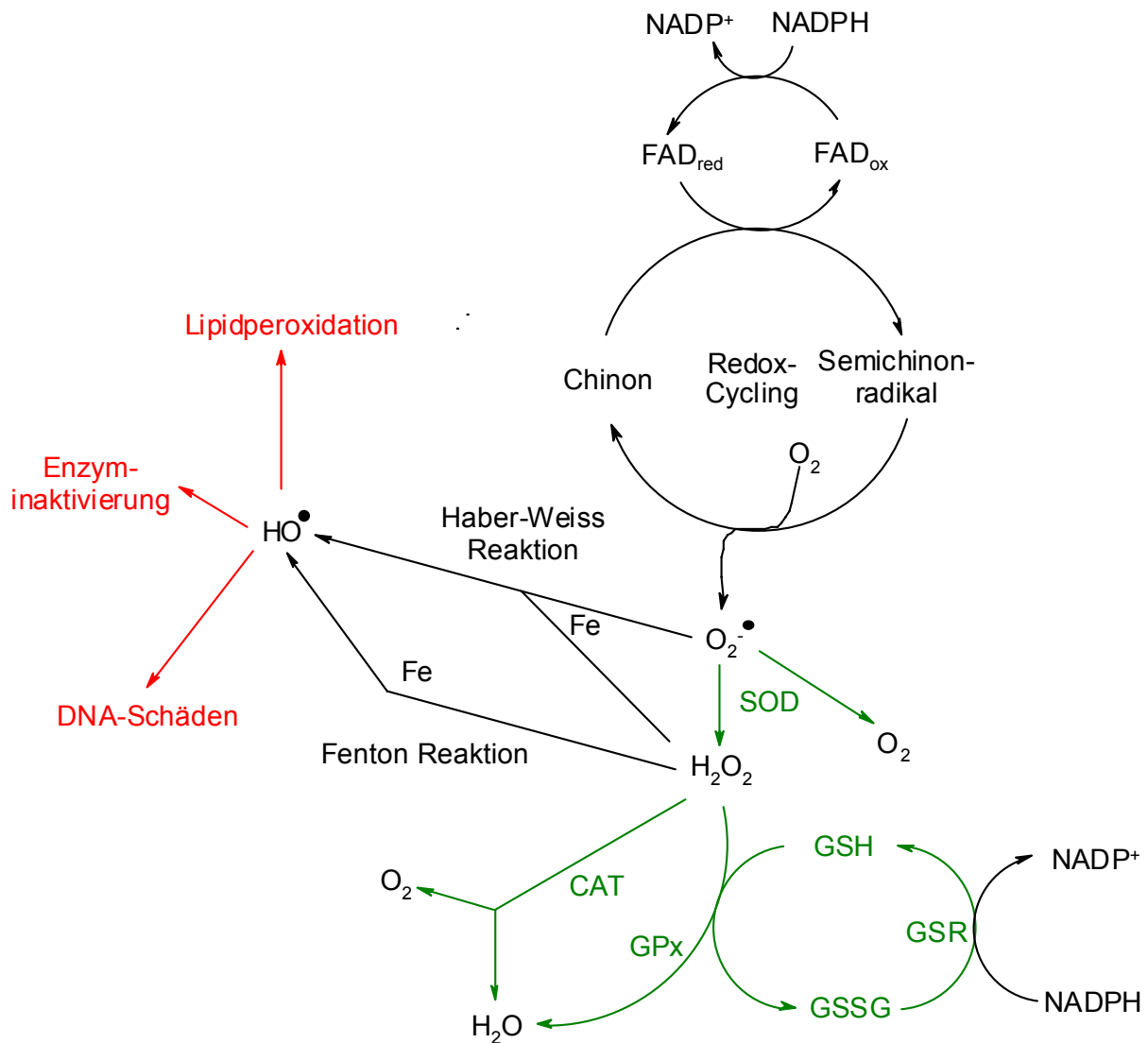
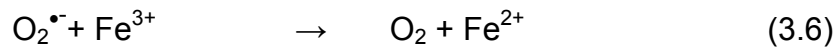
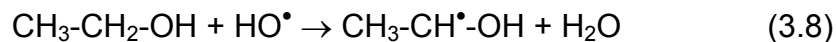


Abbildung 3.1: Beispiele für die Entstehung verschiedener ROS, Abwehrmechanismen und Schädigungen (grün: Entgiftung, rot: direkte Folgen von ROS-Reaktionen; modifiziert nach [Kelly *et al.*, 1998; Sies, 1985]; CAT: Katalase, GSH: reduziertes Glutathion, GSSG: oxidiertes Glutathion, GPx: Glutathion-Peroxidase, GSR: Glutathion-Reduktase, SOD: Superoxid-Dismutase, FAD: Flavin-Adenin-Dinukleotid

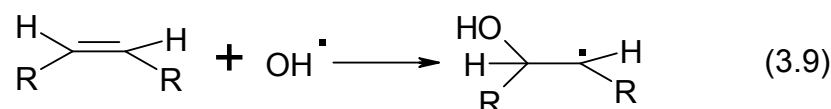
Das **Hydroxylradikal** HO^\bullet ist die reaktivste Sauerstoffspezies [Sies, 1991] und wirkt mit einem Standardreduktionspotenzial von 2,31 V stark oxidierend [Halliwell et al., 1999]. HO^\bullet kann in vielen biologischen Systemen entstehen, wie z. B. durch die Schwermetallionen-katalysierte Haber-Weiss-Reaktion (z.B. mit Kupfer oder Eisen, Gl. 3.5) aus $\text{O}_2^{\bullet-}$ und H_2O_2 . Die Eisenionen-katalysierte Teilreaktion wird auch als Fenton-Reaktion bezeichnet (Gln. 3.6 und 3.7) [Eisenbrand und Metzler, 2005].



UV-Licht-induzierte homolytische Spaltung von H_2O_2 oder Zersetzung von Wasser durch ionisierende Strahlung kann ebenfalls zur Bildung von HO^\bullet führen [Halliwell et al., 1999]. HO^\bullet bevorzugt drei Reaktionstypen, die u. a. bei der Autoxidation von Fetten eine Rolle spielen: Wasserstoffabstraktion (Gl. 3.8), Addition (Gl. 3.9) und Elektronentransfer (Gln. 3.10 und 3.11).



Reaktion von HO^\bullet mit Ethanol: Das HO^\bullet -Radikal abstrahiert ein H-Atom und reagiert zu Wasser



Addition des HO^\bullet -Radikals an eine Doppelbindung



Elektronentransfer-Reaktion zwischen HO^\bullet -Radikal und Halogen-/Nitrit-Ionen

Das **Superoxidradikalanion** $\text{O}_2^{\bullet-}$ wird im Organismus durch einige Enzyme gebildet, die O_2 zu $\text{O}_2^{\bullet-}$ reduzieren (Tab. 3.1).

Tabelle 3.1: Beispiele für Enzyme, die $O_2^{\bullet-}$ generieren [nach Halliwell et al., 1999]

Enzym	Lokalisation
Peroxidasen (nicht spezifisch)	Pflanzen, Bakterien, Tiere (Peroxisomen, v.a. in der Leber; Myeloperoxidase in Leukozyten)
Xanthinoxidase	Leber, Niere, Muskel, Darm, ischämisches Gewebe
NO-Synthase	vorwiegend Säugetierzellen (Muskel, Neuronen, Makrophagen)
Tryptophan-Dioxygenase	Leber
Aldehydoxidase	Leber

Die Reaktion von Hypoxanthin zu Xanthin wird durch die Xanthin-Oxidase katalysiert. Dabei werden Elektronen zu geringen Anteilen auf O_2 anstatt auf NAD^+ übertragen. Hämproteine, die nach O_2 -Bindung und Elektronentransport von Fe^{2+} auf den Sauerstoff $O_2^{\bullet-}$ freisetzen, und Elektronentransportketten, wie in Cytochrom-P450-Enzymen oder in den Mitochondrien, gelten als wichtigste Quellen für die Entstehung von $O_2^{\bullet-}$. Hier kommt es durch „Leckage“ zur unkontrollierten Freisetzung von etwa 1-3% des in den Mitochondrien generierten $O_2^{\bullet-}$, wodurch die erhöhte oxidative Schädigung mitochondrialer DNA erklärt werden kann [Halliwell et al., 1999; Wei, 1998]. Außerdem kann $O_2^{\bullet-}$ durch Autoxidationsreaktionen einiger Moleküle wie flavinhaltigen Reduktionsäquivalenten, Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin gebildet werden [Sies, 1991]. Xenobiotika (z. B. Menadion) können durch so genanntes „Redox-Cycling“ ebenfalls $O_2^{\bullet-}$ erzeugen [Eisenbrand und Metzler, 2005].

Singulett-Sauerstoff 1O_2 zeichnet sich dadurch aus, dass der Spin der Elektronen in den beiden entarteten π^* -Molekülorbitale entgegengesetzt ist. Es existieren zwei Formen, die sich in ihrer Elektronenkonfiguration und Reaktivität unterscheiden. Bei dem Zustand $^1\Delta_g O_2$ handelt es sich zwar nicht um ein Radikal, da keine ungepaarten Elektronen vorliegen, er ist aber dennoch deutlich reaktiver als der Grundzustand. $^1\Sigma_g^+ O_2$ ist wie der Grundzustand ($^3\Sigma_g^- O_2$) ein Diradikal (mit entgegengesetztem Elektronenspin) und noch reaktiver als $^1\Delta_g O_2$. Singulett-Sauerstoff 1O_2 entsteht durch Lichtanregung und ist hinsichtlich Reaktionen mit Molekülen im Singulettzustand (z.B. Fettsäuren) wesentlich reaktiver als der Grundzustand 3O_2 . 1O_2 reagiert mit ungesättigten Fettsäuren in einer Art „Cyclo-Addition“ [Belitz et al., 2001].

Wasserstoffperoxid wird durch die Enzyme Guanylcyclase, Glukoseoxidase, Monoaminoxidase oder Superoxid-Dismutase (SOD) gebildet und ist nur schwach reaktiv [Halliwell et al., 1999; Kelly et al., 1998; Sies, 1991]. H_2O_2 kann weder mit DNA noch Lipiden direkt reagieren, bei einigen schwefelhaltigen Proteinen (z. B. Glutathion) lassen sich durch H_2O_2 Thiol-Gruppen oxidieren, die dadurch inaktiviert werden können. Die wesentliche Toxizität von H_2O_2 beruht auf der Bildung von hochreaktiven HO^\bullet , die durch Metallionen-katalysierte Reaktion wie der Fenton-Reaktion entstehen.

Die Reaktivität der verschiedenen ROS spiegelt sich in der Halbwertszeit wider (Tab. 3.2): das hochreaktive HO^\bullet besitzt die kürzeste Halbwertszeit, wohingegen aus H_2O_2 stabile Lösungen herstellbar sind.

Tabelle 3.2: Geschätzte Halbwertszeiten einiger ROS [nach Pryor, 1986]

ROS	Substrate ^a	Konzentration ^b	Halbwertszeit
Hydroxylradikal (HO^\bullet)	Linolsäure	1 M	10^{-9} s
Alkyl-Radikal (R^\bullet)	O_2	20 μM	10^{-8} s
Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$)	H_2	Solvent	10^{-6} s
Alkoxy-Radikal (RO^\bullet)	Linolsäure	100 mM	10^{-6} s
Peroxy-Radikal (ROO^\bullet)	Linolsäure	1 mM	7 s
Semichinonradikal (Q^\bullet)	z. B. Kondensat (Zigarettenrauch)	-	mehrere Tage
Superoxidanionradikal ($\text{O}_2^{\bullet-}$)	- ^c	-	spontane und enzymatische Dismutation
Wasserstoffperoxid (H_2O_2)	- ^c	-	in wässr. Lösung stabil ^d , enzymatische Dismutation

^a : Die Substrate repräsentieren typische Ziele der reaktiven Spezies (aus der ersten Spalte)

^b : Konzentration des Substrates

^c : sehr variabel (abhängig von der Umgebung)

^d : Halbwertszeit aufgrund der hohen Stabilität im Vergleich zu den anderen erwähnten ROS nicht bestimmbar (mit der von Pryor verwendeten Berechnungsmethode)

ROS stellen nicht ausschließlich nur schädliche Nebenprodukte einer Enzymreaktion dar, sondern werden z.B. von Leukozyten aktiv gebildet, um Mikroorganismen zu bekämpfen [Delves et al., 2000]. Desweiteren werden ROS bei der Synthese von Entzündungsmediatoren wie Prostaglandinen, Leukotrienen und Thromboxanen aus Arachidonsäure benötigt [Halliwell et al., 1999].

3.1.2. Folgen von oxidativem Stress

3.1.2.1. DNA-Schäden

In der Literatur ist der Zusammenhang zwischen ROS und der Krebsentstehung häufig beschrieben. Der Fokus liegt nicht nur auf einer direkten DNA-Schädigung, sondern ebenso auf einer Beeinflussung von Zellproliferation, Signaltransduktion, Zelltod und interzellulärer Kommunikation [Loft et al., 1996; Klaunig et al., 1998; Halliwell et al., 1999; Valko et al., 2006].

Von den ROS ist HO^\bullet für die meisten Schäden verantwortlich, wohingegen Peroxyl-Radikale und H_2O_2 nicht direkt mit der DNA reagieren. Der Angriff von HO^\bullet an den Basen führt zu Hydroxylierungen (Abb. 3.2. a,b,d,e), Ringöffnungen (Abb. 3.2. f) und damit verbundenen Fragmentierungen, woraus eine Vielzahl von Sekundärprodukten gebildet werden können [Kelly et al., 1998].

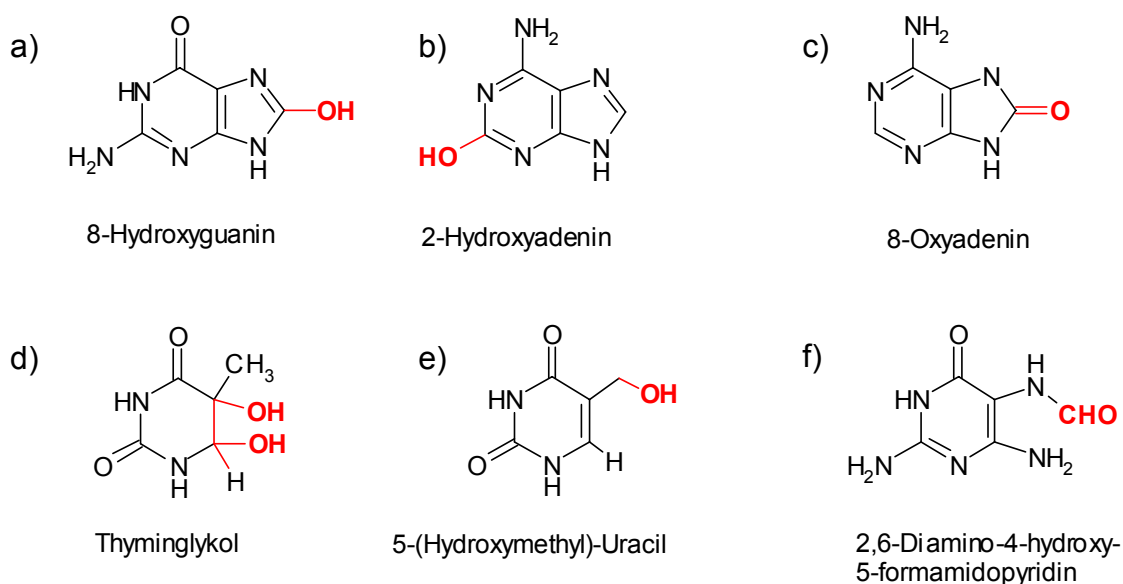


Abbildung 3.2: Beispiele für oxidierte Pyrimidine und Purine [nach Meneghini, 1997]

Ein Angriff des HO^\bullet kann eine Vielzahl von Produkten zur Folge haben, z.B. Oxidation des Guanin in 4, 5 oder 8-Position (8-Oxo-desoxyguanin oder 8-Hydroxy-desoxyguanin, 8-OH-dG) des Purinrings, die zu ringgeöffneten Produkten wie 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidin (FaPy) weiterreagieren (Abb. 3.3). Ein Angriff an Pyrimidinen kann zudem zu Basendimeren führen [Jaruga et al., 1996; Kelly et al., 1998; Halliwell et al., 1999].

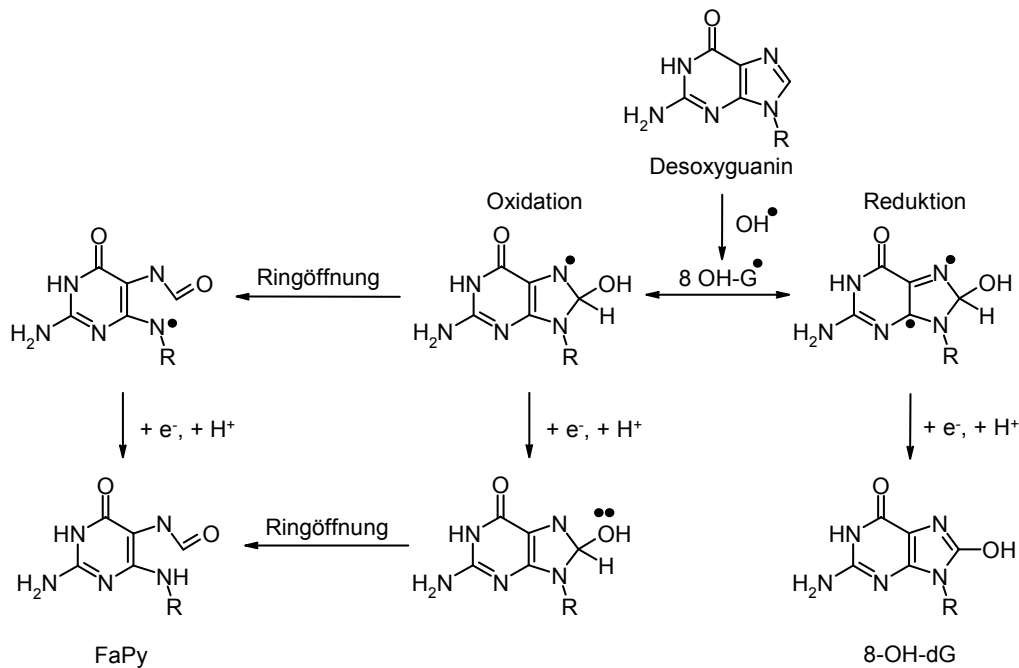


Abbildung 3.3: Modifikationen von Desoxyguanin durch OH-Radikale
[nach Halliwell et al., 1999]

Auch die während der LPO entstehenden Produkte können mit der DNA z.B. zu Etheno- oder Propano-Addukten reagieren, wie hier am Beispiel MDA gezeigt werden soll: MDA reagiert mit den DNA-Basen dC, dA und dG u.a. unter Adduktbildung zu M_1dC , M_1dA und dem Propano-Addukt M_1dG (Abb. 3.4) [Benamira et al., 1995].

Theorie

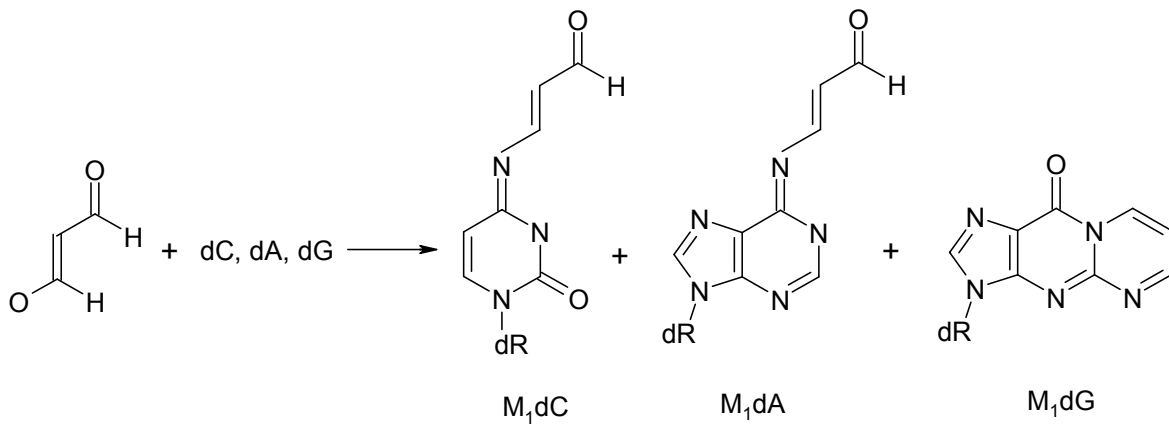


Abbildung 3.4: Strukturen von MDA-DNA-Addukten [nach Benamira et al., 1995]

Ein anderer (LPO-unabhängiger) Weg zu M₁dG und anderen MDA-Addukten führt über einen Radikalangriff am DNA-Zuckerrückgrat in C-4'-Position (Abb. 3.5). Aus dem entstehenden „Basen-Propenal“ kann MDA effektiv auf dG übertragen werden. M₁dG führt bei der Replikation zu Basenfehlpaarungen und ist deshalb als prämutagene Läsion anzusehen [Benamira et al., 1995; Dedon et al., 1998; Kelly et al., 1998; Marnett, 1999].

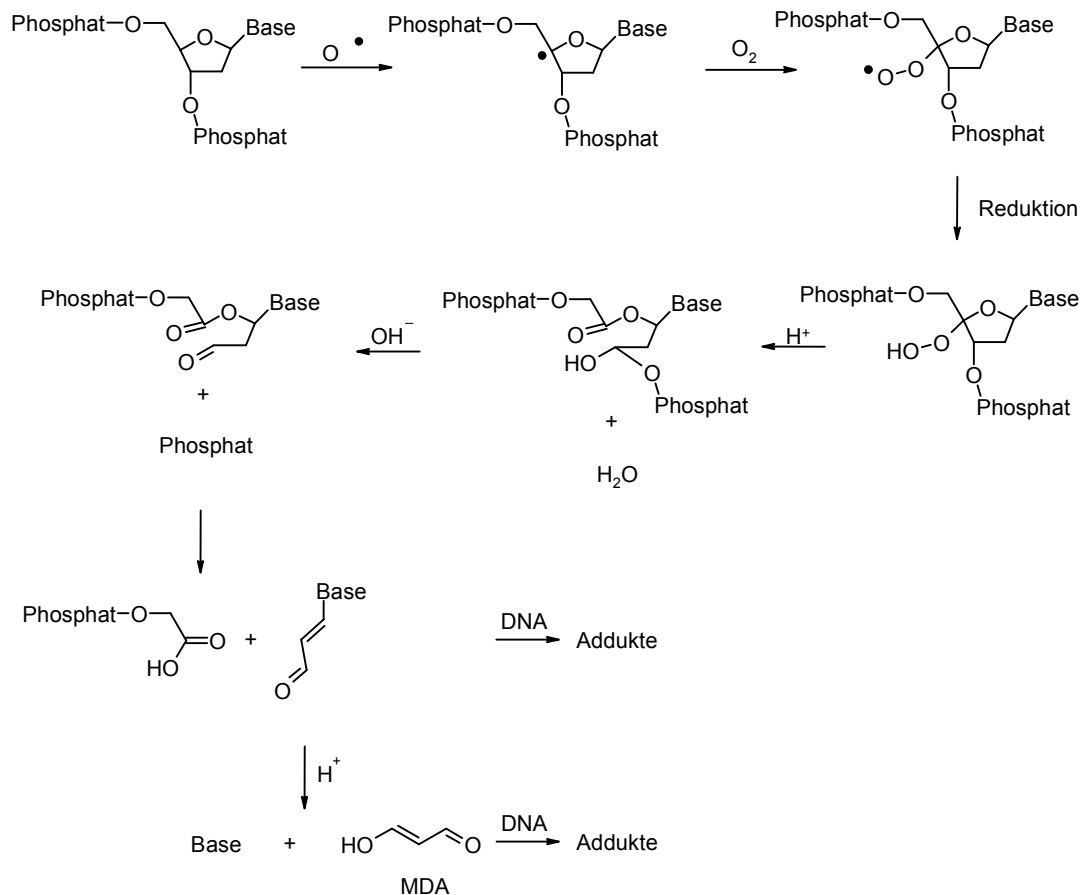


Abbildung 3.5: Bildung von MDA und MDA-Addukten durch Reaktion von OH-Radikal mit dem Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA [Janero et al., 1990; Dedon et al., 1998]

Nicht erkannte DNA-Schäden können bei der Zellteilung auf die DNA der Tochterzelle übertragen werden, sich in Mutationen manifestieren und letztlich zu Störungen der Zellfunktionen bis hin zur Krebsentstehung führen [Hoeijmakers, 2001]. Es werden Mutationen des Genoms (numerische Änderung des Chromosomensatzes), von Chromosomen (strukturelle Veränderungen) und von einzelnen Genen unterschieden. Die Genmutation ist eine stoffliche Veränderung der DNA eines Gens, die auf die Tochterzellen bzw. den DNA-Tochterstrang übertragen wird. Ist nur ein einziges Basenpaar betroffen, so handelt es sich um eine Punktmutation. Weitere Mutationstypen sind Substitution, Deletion, Insertion, Genduplikation und Stop-Codon-Mutation [Murken et al., 1988].

Die Substitution ist der häufigste Mutations-Typ; hierbei kommt es zum Austausch einer einzelnen Base im Triplet-Codon durch eine andere. Bei einer Transition wird ein Purin (Pyrimidin) durch ein anderes Purin (Pyrimidin) oder bei der selteneren Transversion ein Purin (Pyrimidin) durch ein Pyrimidin (Purin) ersetzt. Dies führt zum Austausch einer Aminosäure in der Polypeptidkette. Bei der Deletion kommt es zu einem Verlust eines oder mehrerer Triplet-Codons oder seltener eines Basenpaares, was zu einem Fehler in der Polypeptidkette bzw. zu einem frame shift führt. Unter Insertion versteht man das Einfügen eines Basenpaares und damit eines frame shift. Eine Genduplikation kann partiell oder vollständig sein und entsteht durch ungleiches crossing-over. Eine Stop-Codon-Mutation kann durch einen Basenaustausch im Codon zu Verkürzung (Entstehung eines Stop-Codons) oder Verlängerung (löschen eines Stop-Codons) eines Polypeptids führen [Murken et al., 1988].

3.1.2.2. Lipidperoxidation

Lipide spielen eine zentrale Rolle in biologischen Systemen und Lipidschäden können gravierende Auswirkungen auf die Überlebensfähigkeit haben. Insbesondere die oxidative Schädigung von Lipiden ist von Bedeutung, da sie nach einem Radikalketten-Mechanismus abläuft und somit geringe Mengen an ROS bereits zu gravierenden Schäden führen können. Diese LPO-Kettenreaktion wird in drei Phasen eingeteilt (Initiation, Kettenverlängerung, Termination) und ist schematisch in Abbildung 3.6 dargestellt.

Theorie

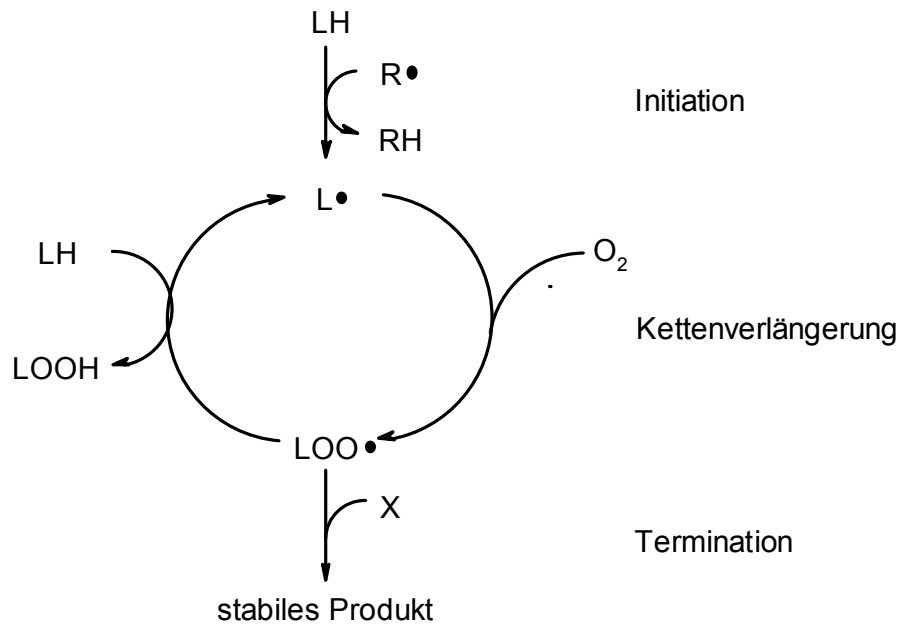


Abbildung 3.6: Überblick über die LPO [nach Kelly et al., 1998]; LH: Fettsäure; R^\bullet : reaktive Spezies; X: Molekül, mit dem LOO^\bullet abreagiert

Die Kettenreaktion wird durch reaktive Spezies gestartet, die ein Wasserstoffatom von einer Methylengruppe abstrahieren können (Initiation). Das Hydroxylradikal (OH^\bullet) reagiert mit allen Fettsäuren, wohingegen $O_2^{\bullet-}$ die Kettenreaktionen nur mit einigen, besonders aktivierten Fettsäuren startet [Halliwell et al., 1999]. Die daraus entstehenden Alkyl- und Peroxyl-Radikale reagieren dann mit weiteren Fettsäuren. Die Radikalkettenreaktion verzweigt sich durch den Zerfall von Peroxiden, woraus je zwei Radikale entstehen (Propagation). Ein Kettenabbruch erfolgt durch Reaktionen der Radikale mit Molekülen, die stabile Produkte bilden (Termination) [Belitz et al., 2001; Kelly et al., 1998].

Mehrfach ungesättigte Fettsäuren mit bis-allylischen Methylene-Gruppen sind ideale Substrate für die LPO. An diesen Positionen besitzen die Kohlenstoff-Wasserstoff-Bindungen niedrige Dissoziationsenergien, so dass Wasserstoffabstraktionen durch Radikalreaktionen leicht möglich sind [Kelly et al., 1998].

Durch die LPO und die damit verbundene Fragmentierung entstehen verschiedenste gesättigte und ungesättigte Moleküle, z.B. Alkane, Aldehyde, Ketone und Furane [Belitz et al., 2001]. Neben Eigenschaften als Aromakomponenten weisen diese reaktiven Moleküle auch zytotoxische, genotoxische und mutagene Wirkungen auf [Marnett, 1999]. Als Beispiel für ein LPO-Produkt soll die Bildung von Malondialdehyd (MDA) ausgehend von Arachidonsäure erläutert werden (Abb. 3.7). MDA entsteht aus mehrfach ungesättigten Fettsäuren durch Reaktionen mit einem Peroxyl-Radikal

Theorie

und Sauerstoff mit nachfolgender Zyklisierung und Fragmentierung. Dies geschieht durch oxidativen Stress in Lipidmembranen und/oder bei der enzym-katalysierten Umsetzung von Eicosanoiden [Esterbauer et al., 1991; Janero, 1990].

Desweiteren wird MDA auch durch die Myeloperoxidase (in aktivierten Makrophagen bei Entzündungen) gebildet [Marnett, 1999]. MDA und andere Aldehyde werden häufig als Marker für LPO herangezogen, indem sie nach Reaktion mit Thiobarbitursäure als Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen (TBARS) photometrisch oder fluorimetrisch bestimmt werden. Ein spezifischer Nachweis von MDA gelingt durch chromatographische Trennung der TBARS per HPLC [Janero, 1990].

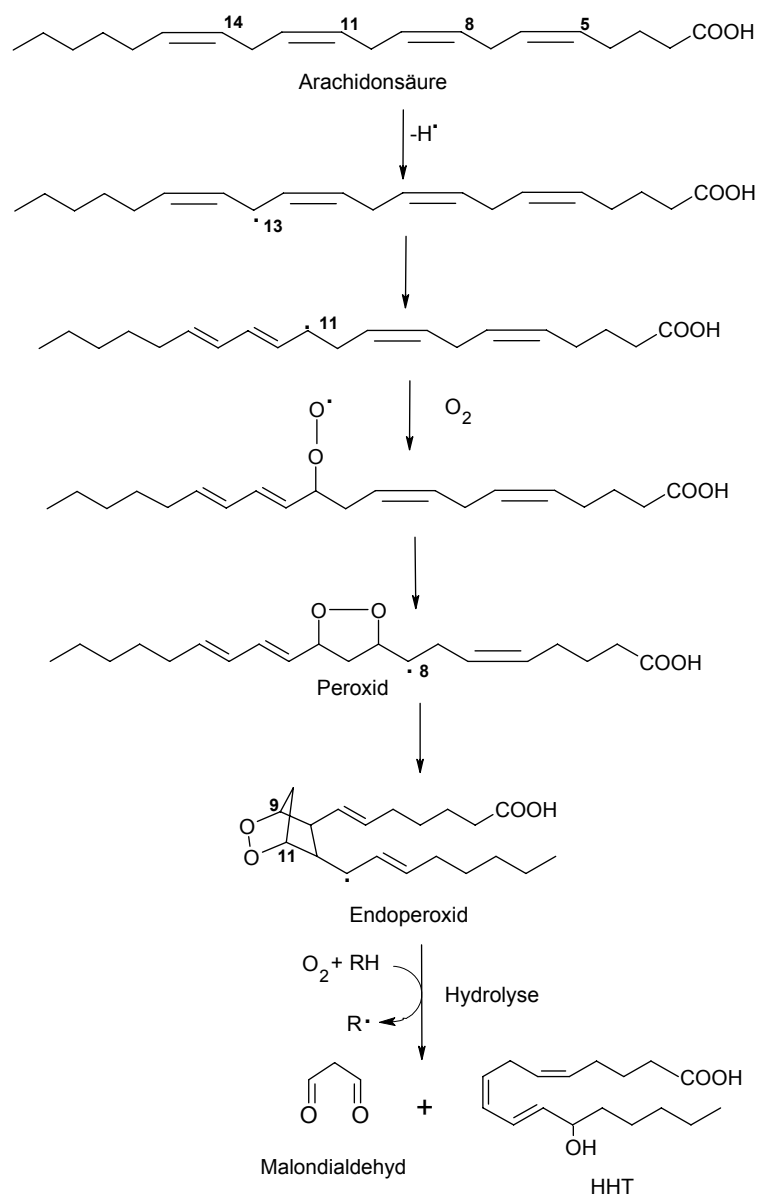


Abbildung 3.7: Bildung von MDA aus Arachidonsäure [Halliwell et al., 1999; Janero, 1990];
HHT = 12(L)-Hydroxy-5,8,10-Heptadecatriensäure; RH = Wasserstoffdonor;
R[•] = Radikal

MDA existiert in verschiedenen Formen, abhängig vom pH-Wert, als α,β -ungesättigte Carbonylverbindung (Enolat) oder als Dialdehyd. Bei physiologischem pH-Wert liegt MDA als Enolat-Anion (Abb. 3.8) vor, ist deshalb hochreaktiv und bindet an Proteine und DNA [Halliwell et al., 1999; Esterbauer et al., 1991; Janero, 1990].

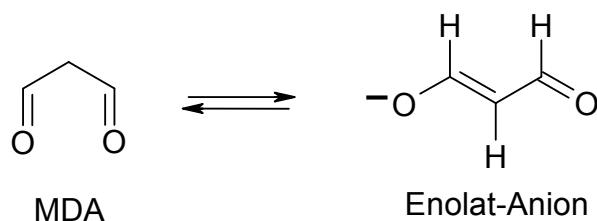


Abbildung 3.8: Keto-Enol-Tautomerie von MDA

3.1.2.3. Proteinoxidation

Die Aufgaben der Proteine im Organismus sind vielfältig. Als Strukturproteine bestimmen sie den Aufbau der Zelle und damit die Beschaffenheit von Geweben, als Enzyme ermöglichen und katalysieren sie chemische Reaktionen. Proteine regulieren in Form von Ionenkanälen die Ionenverteilung inner- und außerhalb der Zelle, den Wassereinstrom in den Organismus und die Erregbarkeit von Nerven; als Bestandteile des Blutplasmas haben sie unter anderem Volumenaktivität, Pufferwirkung und Transportfunktion. Beispiele für Transportproteine sind das Hämoglobin, das für den Sauerstofftransport zuständig ist, oder das Transferrin, das Eisen befördert [Dörner, 2001]. Desweiteren sind Plasmaproteine an der humoralen Infektabwehr beteiligt (Immunglobuline G, A und M).

Die Oxidation von Proteinen spielt eine essentielle Rolle im Alterungsprozess und der Pathogenese einer Vielzahl von Krankheiten. Mittlerweile gibt es viele experimentelle Hinweise, dass oxidierte Proteine verstärkt in geschädigten Geweben von Menschen vorkommen, die an Alzheimer, rheumathoider Arthritis und Atherosklerose leiden [Shacter et al., 2000]. Seit einigen Jahren ist bekannt, dass in alten Organismen mehr oxidierte Proteine zu finden sind als in jungen [Berlett et al., 1997]. Die chemischen Reaktionen der ROS mit Proteinen sind oft sehr komplex und führen zu einer Vielzahl von Produkten, von denen zahlreiche noch unbekannt sind [Evans et al., 1999].

Theorie

Proteine können durch Akkumulation von reaktiven Spezies auf unterschiedliche Weise geschädigt werden. Entweder reagieren ROS direkt mit den Proteinen oder indirekt über Moleküle wie z.B. Zucker oder Fette, wobei die daraus entstehenden Produkte dann mit den Proteinen weiterreagieren [Levine et al., 2001]. Oxidative Proteinmodifikation kann zu Strukturveränderungen und damit z.B. zum Verlust von Enzymaktivität und Proteinfunktion (u. a. bei Rezeptoren) führen.

In der folgenden Tabelle (Tab. 3.3) sind einige der möglichen Produkte, die Aminosäuren, aus denen sie gebildet werden, sowie die Quelle der Oxidation aufgeführt.

Tab. 3.3: Übersicht verschiedener oxidativer Modifikationen von Proteinen (Shacter, 2000);

MCO: Metallkatalysierte Oxidation; γ -Str.: Behandlung mit γ -Strahlung;

$^1\text{O}_2$: Singulett-Sauerstoff

Modifikation	Aminosäuren	Oxidationsquelle
Carbonyle	Lys, Arg, Pro, Thr	MCO, γ -Str., ROS
Disulfide	Cys	MCO, γ -Str., ROS
Methionin Sulfoxid	Met	MCO, γ -Str., ROS
Dithyrosin	Tyr	γ -Str., MCO, $^1\text{O}_2$
Oxo-Histidin	His	γ -Str., MCO, $^1\text{O}_2$
LPO-Addukte (MDA, 4-HNE)	Lys, Cys, His	γ -Str., MCO

Proteincarbonyle

Eine häufig auftretende oxidative Modifikation bei Proteinen ist die Einführung von Carbonylgruppen in Proteinseitenketten. Es gibt drei unterschiedliche Hauptentstehungswege für Proteincarbonyle (Abb. 3.9) [Frank et al., 2000]:

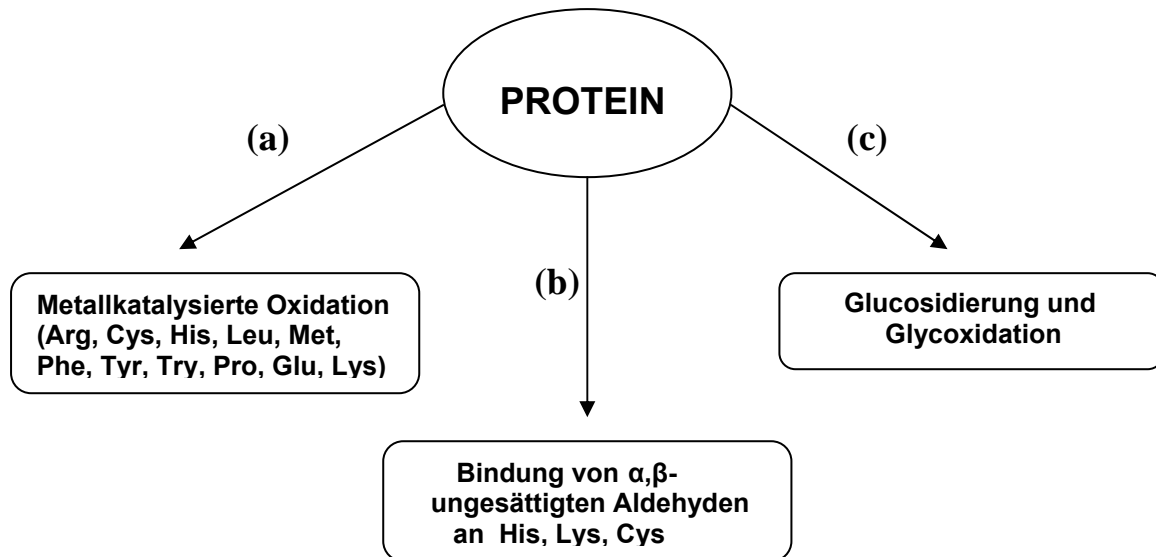


Abbildung 3.9: Entstehung von Proteincarbonylen [Frank et al., 2000]

a) Metallkatalysierte Proteinoxidation (MCO):

Für diese Reaktion werden redoxaktive Metallionen, z.B. Fe(III) und Cu(II) benötigt. Diese können an die Seitenketten der Proteine binden, wobei funktionelle Gruppen der Seitenketten als Liganden dienen und so einen Komplex von Metallion und Protein gebildet wird. Dabei sind v.a. die Aminosäuren Prolin, Arginin und Lysin von Bedeutung (Abb. 3.10) [Requena et al., 2001].

Theorie

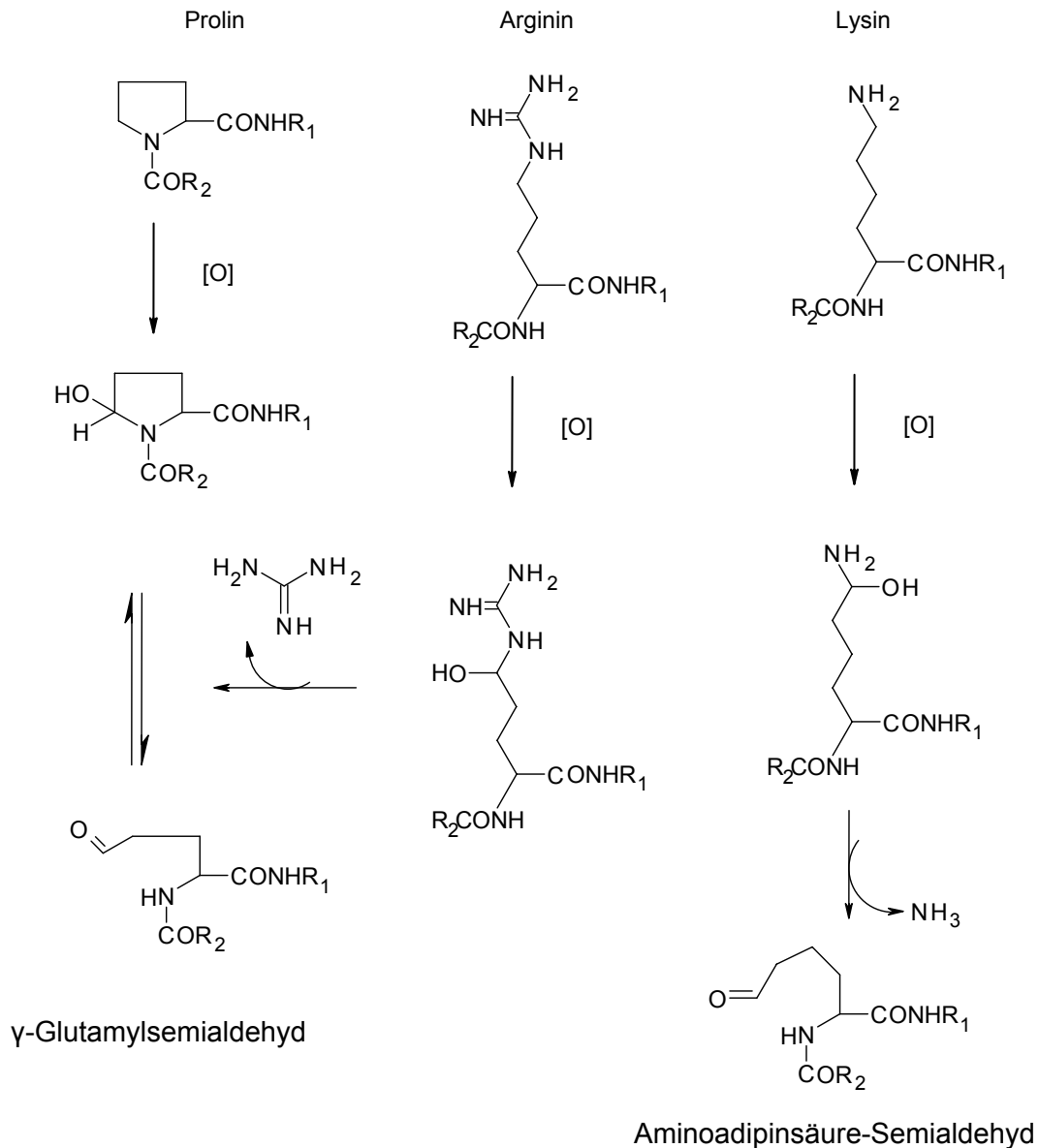


Abbildung 3.10: Carbonylbildung bei prolin-, arginin- oder lysinhaltigen Proteinen
 [modifiziert nach Requena et al., 2001]

Stadtman et al. haben hierzu einen Mechanismus vorgeschlagen (Abb. 3.11), der die Bestandteile Sauerstoff, Eisen und einen Elektronendonator (z. B. NADPH oder NADH) benötigt. Der Donor überträgt Elektronen auf Sauerstoff (O_2) und Fe(III) , wodurch H_2O_2 und Fe(II) entstehen. Das Fe(II) bindet an spezifische Stellen im Protein, an denen dann auch das H_2O_2 weiterreagiert. Das entstehende Hydroxylradikal (OH^*) setzt eine Reihe von Reaktionen in Gang, die zur Oxidation des Proteins führen: Das Hydroxylradikal abstrahiert ein Wasserstoffatom von dem der Aminogruppe benachbarten Kohlenstoffatom, das entstandene Kohlenstoffradikal gibt sein ungepaartes Elektron an das Eisenzentrum ab und lagert sich zu einem Imin um.

Durch anschließende Hydrolyse des Imins entsteht der Aldehyd. OH^- und NH_3 sowie Fe(II) werden freigesetzt. Die MCO ist im Gegensatz zu anderen Reaktionen freier Radikale sehr ortsspezifisch [Stadtman, 2004].

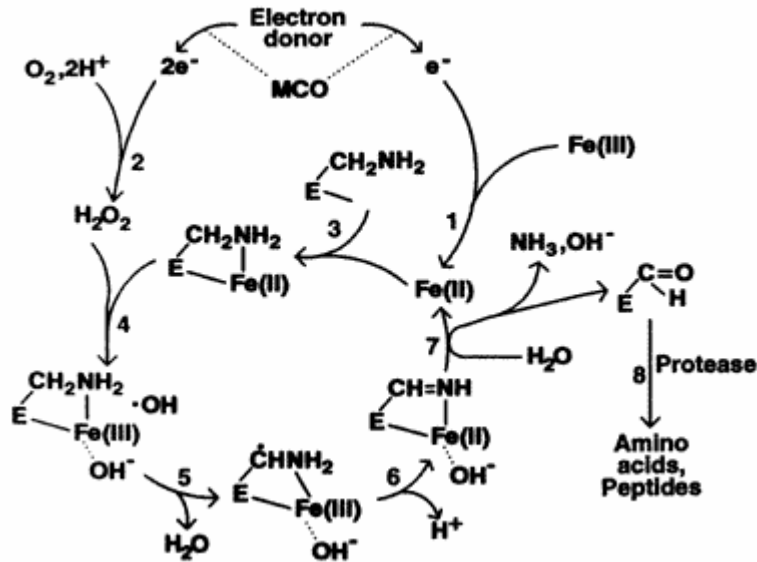


Abb. 3.11: Mechanismus der metallkatalysierten Oxidation von Proteinen
[nach Stadtman, 2004]

Dieser Mechanismus wird durch einige Beobachtungen unterstützt: Proteinmodifikationen durch metallkatalysierte Oxidation lassen sich nicht durch Radikalfänger hemmen, es werden bestimmte Aminosäuren bevorzugt oxidiert, bei freien Radikalen wären unselektive Reaktionen zu erwarten und der Angriff erfolgt an Aminosäuren, die an das Metallzentrum koordinieren können [Stadtman et al., 1991].

b) Bindung von α,β -ungesättigten Aldehyden

Proteincarbonyle können durch Folgeprodukte der Lipidperoxidation, wie z.B. Malondialdehyd (MDA) oder 4-Hydroxinonenal (4-HNE) entstehen und an die Seitenketten bestimmter Aminosäuren binden (Abb. 3.12), wodurch die Proteinstruktur verändert wird.

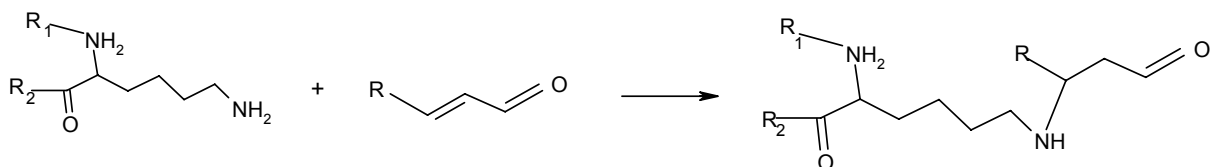


Abbildung 3.12: Proteincarbonylentstehung durch Bindung von α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen an Seitenketten eines Proteins (R_1, R_2 : Proteinreste)
[nach Frank et al., 2000]

c) Glucosidierung und Glycoxidation

Im Körper ablaufende Maillard-Reaktionen, z. B. Bindung von Glucose an die Seitenketten der Proteine, können zur Entstehung von „advanced glycation end products“ (so genannten „AGEs“) führen (Abb. 3.13), wie sie vermehrt bei der Patienten mit Diabetes Mellitus beobachtet werden; diese AGEs sind ebenfalls in der Lage, Proteine zu oxidieren [Frank et al., 2000]. Auch bei Dialysepatienten kann es, bedingt durch Urämie, dialysebedingten Verlust von Antioxidantien und die Biokompatibilität der Dialysemembran zur Entstehung von Sauerstoffradikalen kommen, die auch zur Oxidation von Proteinen führen können. Diese Produkte stimulieren die nichtenzymatische Glucosidierung und führen zur Bildung von AGEs.

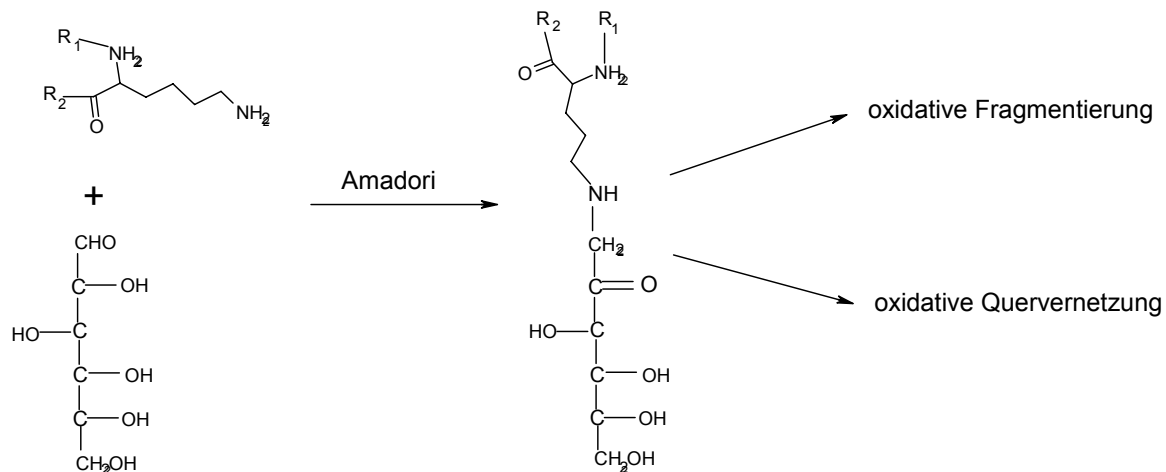


Abbildung 3.13: Maillard-Reaktion im Körper (AGE; R_1 , R_2 : Proteinreste)

Weiterhin kann die Proteinoxidation auch Einfluss auf das Ausmaß von DNA-Schäden haben, indem die Proteinstruktur von Reparaturenzymen verändert und dadurch deren Aktivität verringert wird.

3.1.2.4. Nuclear Factor kappa B (NF- κ B)

Der Nuclear Factor kappa B (NF- κ B) ist ein Transkriptionsfaktor (ein Protein), der im Zellkern sequenzspezifisch an regulatorische DNA-Motive innerhalb der Promotor- und Enhancerregionen binden kann und so zur Aktivierung bzw. Hemmung transkriptioneller Prozesse beiträgt [Bowie et al., 2000].

NF- κ B ist ein dimerer regulatorischer Transkriptionsfaktor, dessen Untereinheiten aus Proteinen der NF- κ B-/Rel-Familie bestehen; er bindet an eine spezifische DNA-

Sequenz (5'-GGGACTTTCC-3') [Ghosh et al., 2002]. NF- κ B besteht aus zwei Untereinheiten, die miteinander Hetero- und Homodimere bilden. Der bisher am häufigsten identifizierte NF- κ B-Komplex besteht aus den Untereinheiten p50 (50 kDa) und p65 (RelA / 65 kDa). Weitere Untereinheiten sind c-Rel (69 kDa), p52 (52 kDa) und RelB (68 kDa), sowie zwei Vorläuferproteine, p105 (für p50) und p100 (für p52). Es kommen fast alle Kombinationen dieser Untereinheiten als Hetero- und Homodimere vor [Karin et al., 2001]. Die Hauptform (p50 / p65) ist weit verbreitet und kommt in fast allen Säugetierzelltypen vor.

In Abbildung 3.14 sind zelluläre und physiologische Auswirkungen der Aktivierung des NF- κ B dargestellt. NF- κ B moduliert durch seine DNA-Bindung die Transkription verschiedener Gene für Zytokine, Wachstumsfaktoren, Chemokine, Adhäsionsmoleküle, Immunregulatoren, Akute Phase-Proteine, Enzyme und Regulatoren der Apoptose und Zellproliferation [Ghosh et al., 1998; Pahl, 1999].

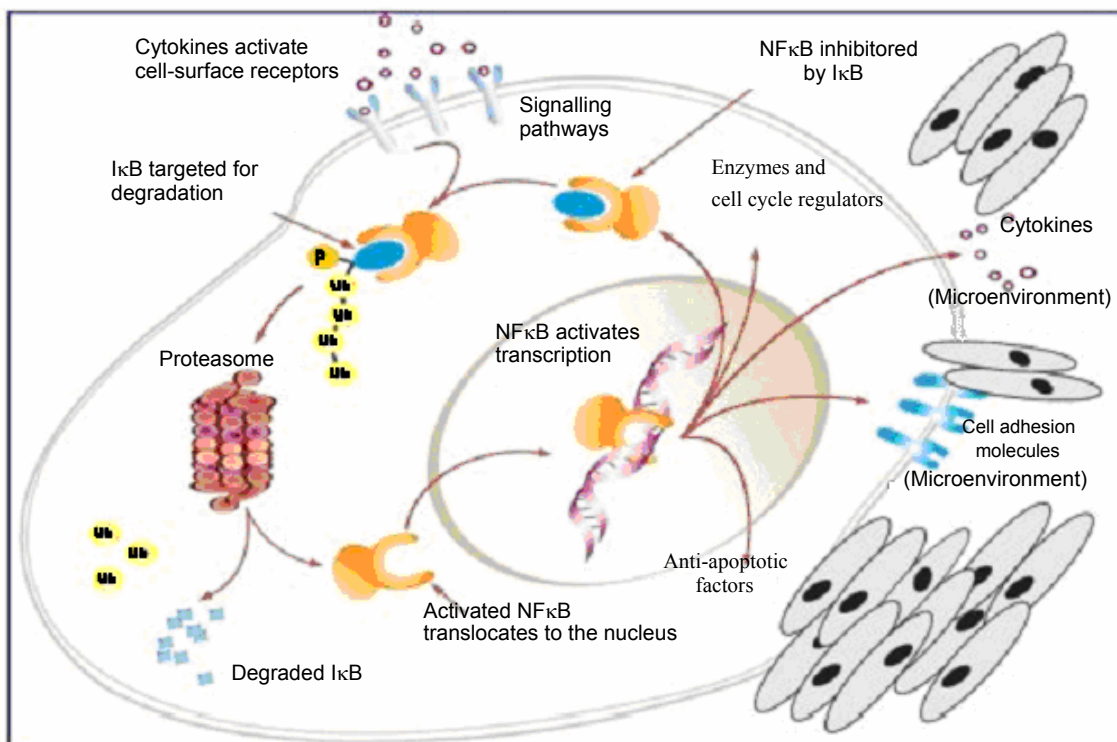


Abbildung 3.14: NF κ B Signalweg [nach Ghosh et al., 1998]

Eine charakteristische Übereinstimmung bei den NF- κ B-/Rel-Proteinen ist die Aminosäuresequenz am N-terminalen Ende, die so genannte Rel-Homologie-Domäne (RHD). Sie besteht aus einer 300 AS umfassenden Sequenz, die die Domänen für Dimerisierung, DNA-Bindung, Interaktion mit I- κ B-Proteinen und Kernlokalisierung enthält. RelA, RelB und c-Rel enthalten zudem in ihrem C-

terminalen Teil Transaktivierungsdomänen, welche die Transkription von Zielgenen aktivieren. Die Vorläuferproteine p105 und p100 enthalten am C-terminalen Ende außerdem sieben Ankyrin-Wiederholungen. Diese Wiederholungen sind auch charakteristisch für I- κ B-Proteine und maskieren die Nuklearlokationssequenz (NLS). Dies bewirkt eine Zurückhaltung der Proteine im Cytoplasma. Nach proteolytischer Abspaltung der Ankyrin-Wiederholungen entstehen p50 und p52 [May et al., 1997]. Von NF- κ B ist vor allem die dreidimensionale Struktur des N-terminalen Endes mit der Rel-Homologie-Domäne (RHD) gut untersucht, weil die Tertiärstruktur des C-terminalen Endes mit der Transkriptions-Aktivierungs-Domäne (TA) in vitro instabil ist. Die NF- κ B-Dimere binden in der Form von Schmetterlingsflügeln an die DNA (Abb. 3.15) [Ghosh et al., 1995].

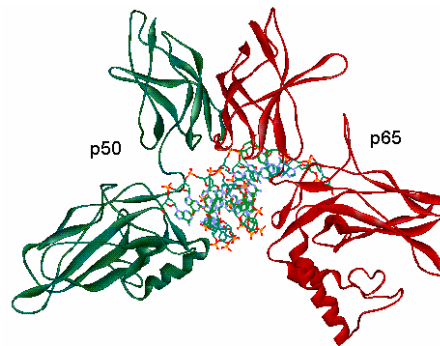


Abbildung 3.15: Dreidimensionale Struktur von NF- κ B gebunden an DNA [Ghosh et al., 1995]

Aktivierungskaskade

In unstimulierten Zellen wird der NF- κ B-Komplex durch die Bindung an verschiedene Inhibitorproteine (I κ B) im Cytoplasma zurückgehalten [Karin et al., 2001]. Das nukleäre Translokationssignal und somit die transkriptionelle Aktivität von NF- κ B wird durch eine Anlagerung der I κ B-Proteine an den NF- κ B-Komplex verhindert.

Der entscheidende Schritt der Aktivierungskaskade von NF- κ B ist die Degradation von I- κ B, welches die NLS des NF- κ B-Dimers verdeckt. Die Degradation wird durch den I- κ B-Kinasekomplex (IKK), auch als Signalosom bezeichnet, reguliert. Der IKK setzt sich aus den regulatorischen Untereinheiten IKK α (IKK1) und IKK β (IKK2), sowie der katalytischen Untereinheit IKK γ , auch bekannt als NEMO [Karin, 1999], zusammen. Die Serin-/Threonin-Kinasen IKK α und IKK β sind die Hauptbestandteile des Komplexes. Sie sind in der Lage, die drei bekannten I- κ B-Proteine I- κ B α , I- κ B β und I- κ B ϵ zu phosphorylieren. Als upstream-Aktivatoren von IKK konnten bisher mehrere Proteinkinasen, darunter die MAP3-Kinasen MEKK1, MEKK2 und MEKK3,

sowie TAK1 und NIK, aber auch PKC und die AKT/PKB identifiziert werden [Karin et al., 2000; Yang et al., 2001].

Wird der IKK durch exogene oder endogene Stimuli aktiviert, phosphoryliert er I- κ B α an spezifischen N-terminalen Serinresten (Ser32 und Ser36). Die Phosphorylierung von I- κ B dient als Signal für eine nachfolgende Polyubiquitinierung durch den E3-Ubiquitin-Ligasekomplex an Lys21 und Lys22 und den anschließenden Abbau der I- κ B-Proteine durch das 26S-Proteasom (Abb. 3.16). Das so freigesetzte Dimer NF- κ B kann in den Zellkern translozieren und an die κ B-Bindungsstellen in den Promotorregionen seiner Zielgene binden [Karin et al., 2000].

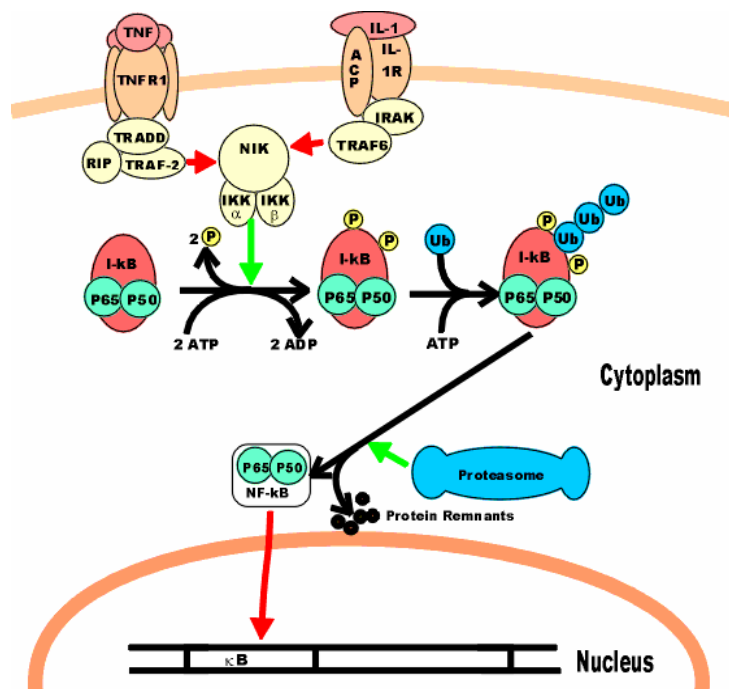


Abbildung 3.16: Der I- κ B-NF- κ B-Komplex und seine Aktivierung durch TNF α oder Interleukin-1 [Karin et al., 2000]

Substanzen, die NF- κ B aktivieren

NF- κ B kann durch verschiedene Faktoren in seine aktive Form überführt werden. Die Aktivierung kann durch Inkubation bzw. Exposition mit den in Tabelle 3.4 aufgeführten Substanzen ausgelöst werden. Dieser Prozess verläuft über verschiedene Rezeptoren und Signalkaskaden oder rezeptorunabhängig, wie die Aktivierung von NF- κ B durch UV-Strahlung und H₂O₂. Hierbei führt wahrscheinlich die Produktion von ROS zum Verbrauch von reduziertem Glutathion. Infolge dessen reichert sich in der Zelle oxidiertes Glutathion an, was zu einer NF- κ B-Aktivierung führt [Bowie et al., 2000].

Tabelle 3.4: Eine Auswahl an NF- κ B-aktivierenden Substanzen [Pahl, 1999]

Zytokine	IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , TNF- β , Leukotriene
Wachstumsfaktoren	PDGF, GM-CSF
Viren	HIV-1, Hepatitis B-Virus, Influenzavirus
Bakterien und bakterielle Produkte	LPS, Helicobacter pylorii
Physikalischer Stress	UV-, Röntgen-, γ -Strahlung
Oxidativer Stress	Ozon, Wasserstoffperoxid, Radikale, Hypoxia
Chemischer Stress	Phorbolester, Zigarettenrauch, Asbest
Pharmaka	Chemotherapeutika
Sonstige	AGEs, Ceramid

Substanzen, die NF- κ B inhibieren

Die Hemmung von akut oder chronisch aktiviertem NF- κ B wird als mögliche Therapie gegen entzündliche und kardiovaskuläre Erkrankungen, Krebs, Aids, Diabetes [Orange et al., 2005; Pande et al., 2005] vorgeschlagen. Eine Hemmung von NF- κ B kann auf allen Stufen der Aktivierungskaskade erfolgen. Die Ansatzpunkte der Inaktivierung sind noch vielfältiger als die der Aktivierung und können selbst für eine Gruppe von Wirkstoffen von Substanz zu Substanz variieren. Deshalb werden die Stellen der Signalkaskade, an denen Inhibierung stattfinden kann, zusammenfassend dargestellt.

a) Eingriff in die frühe Signaltransduktionskaskade:

In Abhängigkeit von dem auslösenden Stimulus kann die Signalweiterleitung über die Inhibierung eines spezifisch aktivierten Oberflächenrezeptors (IL-1R, TNF-R, CD14, CD28) moduliert werden. Andererseits kann die Bildung von H₂O₂ als *second messenger* für die Aktivierung von NF- κ B inhibiert werden [Bowie et al., 2000].

b) Inaktivierung des IKK-Komplexes:

Die Inaktivierung des IKK-Komplexes verhindert die Phosphorylierung von I κ B und führt somit zu einer Hemmung von NF- κ B. Ein direkter Einfluss auf IKK α oder IKK β ist für Myricetin und andere Flavonoide [Tsai et al., 1999] beschrieben worden.

c) Einfluss auf den I κ B- Abbau:

Die Vermeidung der I κ B α -Degradation bzw. der Phosphorylierung inhibiert die Aktivierung von NF- κ B ausübt. So wurde z.B. für Genistein ein Einfluss auf die Degradation festgestellt [Natarajan et al., 1998], wohingegen für Silymarin eine Blockierung der Phosphorylierung von I κ B α nachgewiesen wurde [Manna et al., 2000]. Weitere Beispiele von NF- κ B-Hemmern sind Glukokortikosteroide, SH-

Gruppen-enthaltene Substanzen wie Glutathion [Droge et al., 1994], Antioxidantien wie Vitamin E-Derivate [Suzuki et al., 1993] und Flavonoide [Musonda et al., 1998], sowie entzündungshemmende Stoffe wie Acetylsalicylsäure und Sulfasalazin.

Physiologische Bedeutung

Man kennt inzwischen annähernd 200 Gene, die durch NF- κ B reguliert werden [Pahl, 1999]. Die folgende Tabelle (3.5) zeigt eine Auswahl von Zielgenen, die einer transkriptionellen Regulation durch NF- κ B unterliegen.

Tabelle 3.5: Auswahl von NF- κ B-Zielgenen [Pahl, 1999]

Zytokine	IL-1 β , -2, -6, -12, TNF- α , TNF- β , INF- β
Wachstumsfaktoren	GM-CSF, G-CSF, M-CSF
Chemokine	IL-8, MCP-1, RANTES, Eotaxin
Adhäsionsmoleküle	ICAM-1, VCAM, E-Selectin
Immunregulatoren	MHC-I und -II
Akute Phase-Proteine	SAA
Inflammatorische Enzyme	iNOS, COX-2, 5-Lipoxygenase
Regulatoren der Apoptose	Bcl-X _L , Fas-Ligand, TRAF1, TRAF2

Somit besitzt NF- κ B eine bedeutende Rolle bei physiologischen Prozessen wie Inflammation, Differenzierung, Zellzyklusprogression und Apoptose. In den meisten Geweben liegt NF- κ B in der inaktiven Form vor. Eine kurzzeitige Induktion des Transkriptionsfaktors ermöglicht dem Organismus, auf pathogene und stressinduzierte Stimuli zu reagieren. Eine Störung des abgestimmten Vorgangs ist mit einer Reihe von pathologischen Prozessen verbunden, in denen NF- κ B meist eine erhöhte Aktivität aufweist. Somit kommt NF- κ B auch eine wichtige Rolle bei Entzündung und Krebs zu [Balkwill et al., 2001].

NF- κ B und Entzündung

Inflammatorische Reize führen zu einer örtlichen NF- κ B-Aktivierung, die eine Reihe von pro-inflammatorischen Zielgenen (IL-1, IL-6, TNF- α , Wachstumsfaktoren) induziert. Einige Zytokine aktivieren NF- κ B ihrerseits, so dass sich ein selbst amplifizierender Zyklus ergibt [Collins et al., 1995]. Bleibt NF- κ B in den Entzündungsherden aktiviert, so kommt es nicht zur Auflösung der Entzündung durch Bildung anti-inflammatorischer Mediatoren und Apoptose der entzündeten Zellen,

sondern zur Ausbildung chronisch entzündlicher Erkrankungen. So sind rheumatoide Arthritis, Asthma, chronisch entzündliche Darmerkrankungen und Arteriosklerose durch eine abnormale, konstitutive NF- κ B-Aktivität charakterisiert [Baldwin, 1996; Tak et al., 2001].

Bei zahlreichen chronisch entzündlichen Prozessen wird eine erhöhte Expression des NF- κ B-induzierbaren Enzyms iNOS vorgefunden. Stickoxid (NO), das Produkt des iNOS, kann NF- κ B in Lymphozyten aktivieren [Lander et al., 1993]. Damit zeigt sich hier ein positiv autoregulatorischer Mechanismus.

NF- κ B und Zellproliferation

NF- κ B ist an der Regulation des Zellzyklus und der Apoptose beteiligt. Dabei kann es beide Prozesse sowohl positiv als auch negativ beeinflussen. Unter den meisten Umständen scheint aktiviertes NF- κ B jedoch die Apoptose zu hemmen und die Zellzyklusprogression zu fördern. Wenn zur gleichen Zeit mehrere ungünstige Faktoren zusammen wirken, kann NF- κ B eine entscheidende Rolle während der Krebsentstehung, vor allem während der Initiations- und Progressionsphase, spielen. Die Entstehung von Tumoren erfordert eine Reihe von Mutationen, die den Krebszellen ein ungehemmtes Teilungspotential verleihen und gleichzeitig apoptotische Signalwege blockieren. [Vogelstein et al., 1988]

Der Gesamtprozess von der Normalzelle zum Tumor wird in die drei Phasen Initiation, Promotion und Progression eingeteilt, dargestellt in Abb. 3.17:

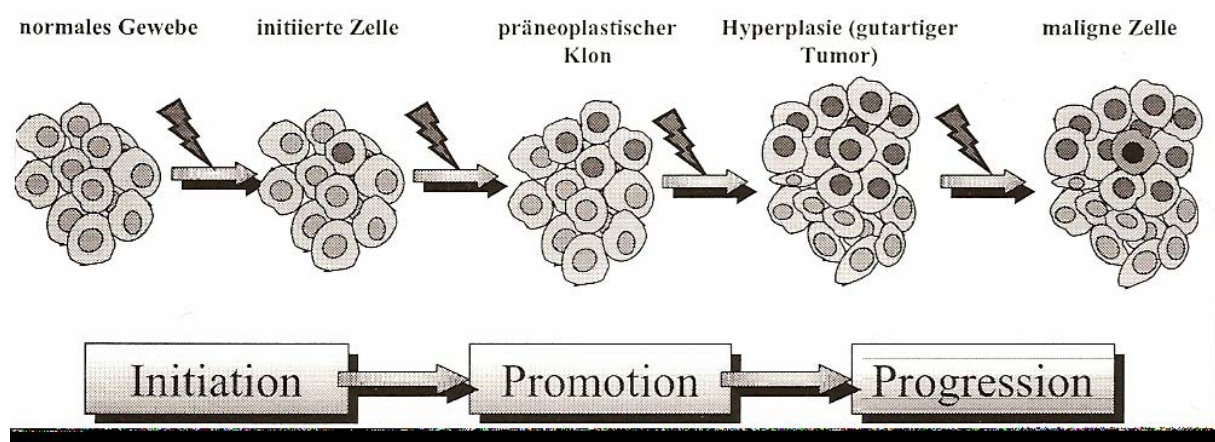


Abbildung 3.17: Mehrstufenmodell der Karzinogenese [Vogelstein et al., 1988]

Der Initiationsprozess ist eine irreversible Änderung des genetischen Materials, beispielsweise hervorgerufen durch Mutationen, die an die Tochterzellen weitergegeben werden. Initiation allein reicht jedoch nicht für die Tumorentstehung aus. In der Promotionsphase muss es zur Hemmung der Apoptose und zur Stimulierung des Zellwachstums kommen, wobei sich initiierte Zellen bevorzugt vermehren müssen. Während der Progressionsphase differenzieren die Vorläuferzellen durch krebsfördernde Einflüsse zu Tumorzellen [Eisenbrand und Metzler, 2005].

Eine abnormale Regulation des NF- κ B-Signalweges führt zu erhöhten NF- κ B Level. Auslöser können Mutationen sein, die I- κ B-Proteine inaktivieren. In Zellkernen verschiedener Tumore (Brust, Eierstock, Prostata, Kolon) wurde eine verstärkte Aktivierung von NF- κ B beobachtet [Rayet et al., 1999]. Weiterhin ist beschrieben, dass inflammatorische Mediatoren die Zellproliferation verstärken und somit als Tumorpromoter wirken können [Balkwill et al., 2001].

Oxidativer Stress

NF- κ B ist ein redoxsensitiver Transkriptionsfaktor, der durch den intrazellulären Redoxstatus der Zelle reguliert werden kann. Während höhere Konzentrationen an ROS irreversible oxidative Schäden hervorrufen, können moderate ROS-Gehalte als *second messenger* in intrazelluläre Signalkaskaden eingreifen und eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B bewirken. Die genauen Vorgänge sind noch nicht geklärt [Sen et al., 1996]. Es wird angenommen, dass die Auswirkungen von ROS eine wesentliche Rolle bei der Aktivierung des redoxsensitiven Transkriptionsfaktors NF- κ B und somit bei der Entstehung und Progression vieler Erkrankungen spielt [Kunsch et al., 1999]. Die Wirkung von antioxidativen Substanzen auf die NF- κ B–DNA-Bindungsaktivität konnte bisher bei gesunden Probanden noch nicht eindeutig belegt werden, bei HD-Patienten jedoch wurde über eine Nahrungssupplementierung mit α -Liponsäure ein antiinflammatorischer Effekt erreicht [Hofmann et al. 1999]. Shimizu et al. berichten von dem Flavanol (-)-Epigallocatechingallat (EGCG), dass es die transkriptionelle Aktivität von NF- κ B in Kolonkrebszellen schwächt [Shimizu et al., 2005], des Weiteren wurde eine Verringerung der DNA-Bindungsaktivität von NF- κ B durch Resveratrol (Zell-Linien: U937, Jurkat, HeLa) [Manna et al. 2000] und Genistein, Quercetin und Epigallo-Catechingallat (L-TK-Zellen) [Muraoka et al. 2002] beobachtet.

3.1.3. Oxidativer Stress und Krankheiten

Oxidativer Stress kann entweder durch Verminderung der antioxidativen Abwehr, z. B. aufgrund der Depletion von Antioxidantien und Mutationen in Genen für antioxidative Enzyme oder durch erhöhte Produktion von ROS z.B. infolge von erhöhter O₂-Exposition und exzessive Aktivierung von ROS-produzierenden Systemen entstehen und wird für viele Krankheiten als Ursache oder zumindest als die Krankheit begleitend oder währenddessen auftretend beschrieben (Tab. 3.6).

Tabelle 3.6: Beispiele für Krankheiten, bei denen ein Zusammenhang mit oxidativem Stress diskutiert wird [nach Halliwell et al., 1999; Dandona et al., 1996; Collins, 1999]

Kategorie	Beispiel
entzündlich/immunologisch	Glomerulonephritis, Autoimmunkrankheiten, Diabetes, Hepatitis
Eisen-Überladung	Hämochromatose, Thalassämie
Respirationstrakt	Zigarettenrauch, Luftschadstoffe
Auge	Katarakt
Haut	UV-Strahlung, Hitze
	Krebs
Herzkreislaufsystem	Atherosklerose, Anthracyclin-Kardiotoxizität
Niere	Autoimmun-Nephrotisches Syndrom, Hämodialyse, Transplantation

3.1.3.1. Niere, Niereninsuffizienz und Hämodialyse

Der Mensch besitzt zwei Nieren, die etwa in Höhe des elften Brustwirbels bis zum zweiten Lendenwirbel liegen. Eine Niere ist im Durchschnitt 12 cm lang und wiegt etwa 150 Gramm. Sie filtert das Blut, damit so genannte harnpflichtige Substanzen (Kreatinin, Harnstoff, Harnsäure), Abbauprodukte und Medikamente ausgeschieden werden, die sonst zur Vergiftung führen würden und um den Stoffwechselhaushalt konstant zu halten, was die Flüssigkeit im Körper, die Elektrolyte (wie z. B. Phosphor, Kalium, Natrium) und das Säure-Base-Gleichgewicht betrifft. Wegen der enormen Filtrierleistung der Nieren werden sie stark durchblutet und somit in 24 Stunden von rund 1500 Litern Blut durchströmt. Für die Filterfunktion sind verschiedene Strukturen in der Niere von Bedeutung (Abb. 3.18). Man unterscheidet dabei die harnbildenden von den harnableitenden Strukturen. Diese bilden in der Niere zusammen eine Funktionseinheit, das Nephron. In einer gesunden Niere sind etwa eine Million Nephrone vorhanden. In einem Gefäßknäuel (Glomerulus), das einem Filter gleichzusetzen ist, wird der Harn gebildet, indem die harnpflichtigen Substanzen aus dem Blut gefiltert werden. [www.roche.de, 2008]

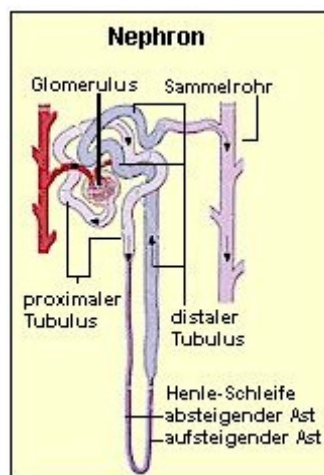


Abb. 3.18: Aufbau eines Nephrons [www.roche.de, 2008]

Die Niere ist außerdem wichtig für die Regelung des Blutdrucks (Hormon Angiotensin) und des Knochenstoffwechsels (Bildung des aktiven Vitamin D). Außerdem regt die Niere durch die Freisetzung des Hormons Erythropoietin (EPO) die Bildung der roten Blutkörperchen an [www.roche.de, 2008].

Unter Niereninsuffizienz versteht man jede Verringerung der Nierenleistung von der eingeschränkten Leistungsbreite bei noch normalen Harnstoff- und Kreatininwerten (Marker für Nierenfunktion) über den Anstieg dieser Werte im Blut bis zur Urämie (terminale Niereninsuffizienz, Harnvergiftung). Eine Urämie hat Auswirkungen auf den gesamten Organismus, z.B. Magen-Darm-Trakt (Erbrechen), Blutsystem (Anämie), Nervensystem (Polyneuropathien), bis hin zum urämischen Koma. Behandelt wird die Urämie durch streng bilanzierte Diäten und Nierenersatztherapien wie HD oder Nierentransplantation. [Sarre et al., 1988; Pschyrembel, 1993; Hasselwander et al., 1998; Canaud et al., 1999; Galli et al., 2000]

Der oxidative Stress kann durch verschiedene Grunderkrankungen ausgelöst werden, wie z. B. glomeruläre Erkrankungen (pathomorphologische Veränderungen in den Nierenkörperchen, häufig Folge von Autoimmunreaktionen), interstitielle und tubuläre Erkrankungen (häufig durch Bakterien oder Medikamente verursacht), hereditäre Nierenerkrankungen, Hypertonie und vaskuläre Nephropathien (Bluthochdruck und atherosklerotische Veränderungen der Gefäße können eine Urämie auslösen) sowie sekundäre Nierenerkrankungen (verursacht durch primär-extrarenale Erkrankungen wie Diabetes mellitus). Diabetiker stellen nach 10 bis 15 Jahren Krankheitsdauer bis zu 40% der HD-Patienten. [Pschyrembel, 1993; Sarre et al., 1988; Schönweiß, 1998; Schiffel et al., 1999]

Die HD ist die am häufigsten angewandte Nierenersatztherapie. Hierbei wird arterielles Blut mit Schläuchen und Schlauchpumpen durch einen extrakorporalen Blutkreislauf (Dialysegerät) geführt und dabei gereinigt, bevor es wieder in den Körper zurückgeführt wird (Abb. 3.19). In diesem Dialysator findet ein Stoffaustausch durch Diffusion über eine semipermeable Dialysatormembran (mehrheitlich Polysulfon- oder Polyamidmembranen) statt, die das Patientenblut vom Dialysat trennt (blauer Rahmen in Abb. 3.19). Um die treibende Kraft des Konzentrationsgefälles zwischen den Flüssigkeiten möglichst groß zu halten, werden Blut (200-300ml/min) und Dialysat (ca. 500ml/min) im Gegenstrom geführt und das Dialysat nach einem Durchfluss verworfen. Die Stoffe diffundieren passiv ohne Beteiligung des Lösungsmittels von der Flüssigkeit mit hoher zu der mit niedriger Konzentration. Allerdings passieren nur Stoffe den Dialysator, deren Molekulargewicht kleiner als die Ausschlussgrenze der Membran ist. Auf diese Weise werden Urämietoxine aus dem Blut entfernt und ein Elektrolyt- und Säure-Basen-Ausgleich zwischen Blut und Dialysat erreicht. Patienten mit terminaler

Niereninsuffizienz werden in der Regel dreimal pro Woche für vier bis fünf Stunden hämodialysiert. [Sarre et al., 1988]

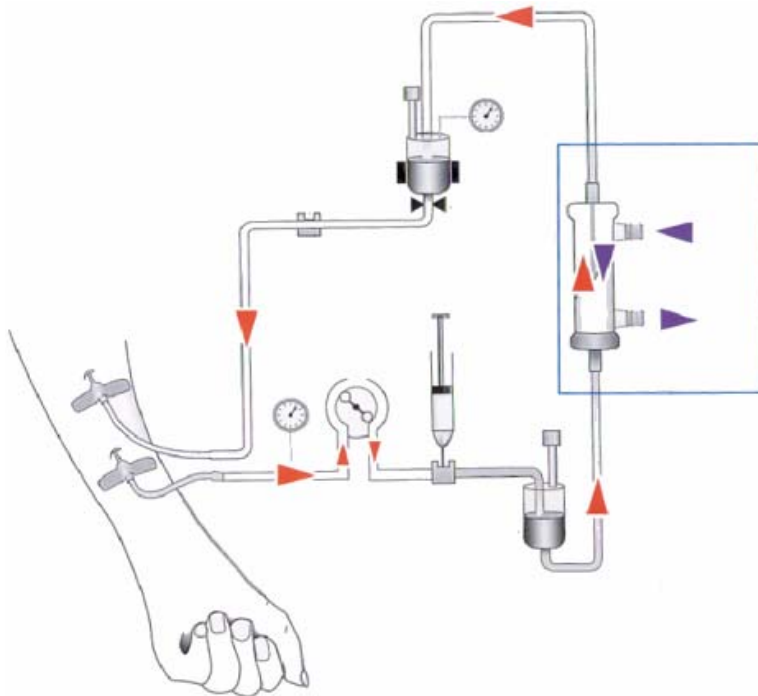


Abbildung 3.19: Schematischer Aufbau eines Dialysegerätes [Schönweiß, 1998]: nach Austritt aus dem Körper wird das Blut durch einen Druckmesser, eine Schlauchpumpe, eine Heparinzufuhrstelle und Blasenfänger zum Dialysator () befördert. Anschließend gelangt es über einen Blasenfänger und eine Infusionsstelle wieder zurück in den Körper

Als zum oxidativen Stress beitragende Faktoren werden bei HD-Patienten nicht nur die Grunderkrankung, unzureichende Biokompatibilität der Dialysator-Materialien und die Behandlung der renalen Anämie diskutiert, sondern auch der Verlust von Antioxidantien durch die HD und erhöhter Verbrauch durch den oxidativen Stress (kleine Moleküle wie Vitamin C oder Harnsäure werden aus dem Blut entfernt, was die antioxidative Abwehr schwächt) und eine eventuelle mikrobiologische Kontamination des Dialysates (durch Endotoxine wird das Immunsystem aktiviert). Durch die proteinreduzierte Diät (Mangel/Fehlernährung) können

Theorie

entzündungsähnliche Reaktionen im Körper entstehen. Die aufgrund der Diät eingeschränkte Kaliumzufuhr (geringer Obstverzehr) führt zu einer geringen Aufnahme von Vitamin C und pflanzlichen Phenolen. Aufgrund der stark beanspruchten Immunabwehr besteht bei HD-Patienten zudem eine erhöhte Infektionsanfälligkeit. Desweiteren werden AGEs, die auch bei nicht-diabetischen niereninsuffizienten Personen gebildet werden, aufgrund ihrer Größe bei der HD nur unzureichend eliminiert, aktivieren über spezifische Rezeptoren (RAGE) Makrophagen und Endothelzellen und stehen so auch im Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen. [Canaud et al., 1999; Galli et al., 2000 ; Kaysen, 2000; Kaysen, 2001 ; Boaz et al., 2001; Hasselwander et al., 1998; Weiss, 1999; Vlassara et al., 2002; Raj et al., 2000; Nawroth et al., 1999; Miyata et al., 2000]

Erhöhter oxidativer Stress zeigt sich bei zahlreichen Biomarkern, die im Vergleich zu gesunden Menschen signifikant vor HD verändert sind (Tab. 3.7), wobei der Rückgang von GSSG [Ceballos-Picot et al., 1996] mit einer deutlichen Verminderung der Gesamtglutathion-Konzentration aufgrund verringerter Neusynthese erklärt wurde. Eiselt et al. [Eiselt et al., 2000] schreiben die im Vergleich zu den anderen erwähnten Untersuchungen [Ceballos-Picot et al., 1996; Pasaoglu et al., 1996; Eiselt et al., 2001; Rico et al., 2006] ansteigenden Aktivitäten von SOD und GPx einer enzym-induzierenden Wirkung der ROS zu.

Tabelle 3.7: Übersicht über verschiedene Biomarker, die im Blut von HD-Patienten im Vergleich zu gesunden Menschen verändert sind

Biomarker	Veränderung	Literatur
GSSG, GSH, SOD, GSR	↓	Ceballos-Picot et al., 1996
GSH, GPx, SOD	↓	Eiselt et al., 2001; Rico et al., 2006
SOD, GPx	↑	Eiselt et al., 2000
GSH, GSR, GPx	↓	Hassan et al., 1995; Pasaoglu et al., 1996
SOD, CAT, GPx, Vit. E	↓	Dursun et al. 2002
GSH	↓	Ozden et al., 2002 ; Ross et al., 1997 ; Tarnng et al., 2000 ; Wlodek et al., 2006
GSSG	↑	Tarnng et al., 2000 ; Rico et al., 2006
Vitamin C	↓	Descombes et al., 1993 ; Clermont et al., 2000 ; Tarnng et al., 2000 ; Morena et al., 2002
Ascorbyl-Radikale	↑	Clermont et al., 2000
TBARS, MDA	↑	Hassan et al., 1995 ; Donica, 2001 ; Eiselt et al., 2001 ; Gerardi et al., 2002 ; Sommerburg et al., 2000 ; Usberti et al., 1999 ; Weinstein et al., 2000 ; Rico et al., 2006
NF-κB	↑	Hofmann et al., 1999 ; Rodriguez-Ayala et al., 2005
Mikrokerne	↑	Stopper et al., 1999
DNA-Strangbrüche	↑	Stopper et al., 2001 ; Kan et al., 2002 ; Müller et al., 2004
8-OH-dG	↑	Tarnng et al., 2000 ; Rico et al., 2006

3.1.3.2. Anämie und Eisen-Medikamente

Die Anreicherung toxischer Stoffwechselprodukte führt bei HD-Patienten zur Störung von Organfunktionen und Regulationssystemen, was sich als Anämie (Blutarmut, Verminderung der Erythrozytenzahl und Hämoglobinkonzentration) manifestieren kann. Das Hormon Erythropoietin (EPO), das im Knochenmark die Produktion von Erythrozyten anregt, wird in der Nierenrinde produziert. Diese Synthese ist durch die verminderte Nierenfunktion gestört. Auch die Lebenszeit von Erythrozyten ist bei diesen Patienten etwa um die Hälfte erniedrigt. Diese Effekte werden verstärkt durch einen Eisenmangel, der hauptsächlich auf einen ständigen Blutverlust durch die HD und die notwendige Diät zurückzuführen ist. [Pschyrembel, 1993; Sarre et al., 1988; Schönweiß, 1998]

Therapiert wird die Anämie durch die intravenöse Applikation von EPO. Bei Eisenmangel allerdings ist dies ineffektiv, da auch Eisen für eine funktionierende Erythropoese unerlässlich ist. Deshalb muss Eisen in Form von Infusionen appliziert werden [Parrinen et al., 2000]. Medikamente zur intravenösen Eisentherapie von Anämie-Patienten enthalten dreiwertiges Eisen in Form von polynuklearen Kohlenhydratkomplexen. Diese haben sehr hohe Komplexbildungskonstanten was verhindern soll, dass Eisenionen ungezielt freigesetzt werden und ihre toxische Wirkung im Körper entfalten können [Geisser et al., 1992]. Als Eisenpräparate stehen unter anderem die getesteten Medikamente Ferrlecit[®], Venofer[®] und CosmoFer[®] zur Verfügung. Bei Ferrlecit[®] handelt es sich um einen Eisen(III)-hydroxid-Gluconat-Komplex (350 ± 23 kDa) mit einem pH-Wert von 7,7 - 9,7, der annähernd der Formel $[\text{NaFe}_2\text{O}_3(\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_7)(\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11})_5]_{n=200}$ entspricht. Die Eliminations-Halbwertszeit von Eisen aus dem Gluconat-Komplex beträgt etwa eine Stunde [www.rxlist.com]. Venofer[®] ist ein Eisen(III)-hydroxid-Saccharose-Komplex (pH = 10,5 – 11,1) mit der Formel $[\text{Na}_2\text{Fe}_5\text{O}_8(\text{OH}) \cdot 3(\text{H}_2\text{O})]_n \cdot m(\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11})$ und einem Gewicht von 34 - 60 kDa. Die Eliminations-Halbwertszeit liegt bei etwa 6 Stunden [www.rxlist.com]. In CosmoFer[®] liegt ein fraktionierter, niedermolekularer Eisen(III)-hydroxid-Dextran-Komplex mit pH ≈ 6 und einem Gewicht von etwa 100 kDa vor. Die Formulierung von CosmoFer[®] zeichnet sich durch einen starken kolloidalen Komplex des Eisen-Kerns mit den ihn umgebenden, als Abschirmung dienenden Dextran-Ketten [www.pharmacosmos.com]. Dieser Eisen-Kohlehydrat-Komplex ist wesentlich stabiler (Eliminations-Halbwertszeit etwa 5 – 20 h) als Eisen-Gluconate und – Saccharate [Geisser et al., 1992; Zager et al., 2002; Zager et al., 2004].

Die Infusionsregime variieren sehr stark von monatlich, wöchentlich bis täglich, Infusion über die Dialysedauer (4 Stunden) oder 5 Minuten [McDougall, 2000; Kosch et al., 2001]. Die schnelle Infusion von Ferrlecit[®] führt zu einer Transferrin-Übersättigung [Zanen et al., 1996] und zu Bleomycin Detectable Iron (BDI; freies Eisen im Plasma) [Parrinen et al., 2000; Gupta, 2000] und zu einer Erhöhung der Lipid- und Proteinoxidation [Roob et al., 2000; Tovbin et al., 2002]. Erhöhte Eisenkonzentrationen im Körper (body iron store) korrelieren desweiteren mit einer gesteigerten Krebsinzidenz [Stephens et al., 1988; Nelson, 2001].

3.1.3.3. Folgen

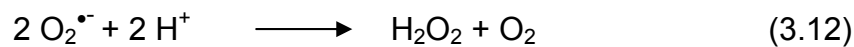
Der erhöhte oxidative Stress bei Dialysepatienten wird für eine Reihe gehäuft auftretender Folgeerkrankungen mitverantwortlich gemacht. An erster Stelle stehen kardiovaskuläre Erkrankungen, einschließlich beschleunigter Atherosklerose, die bei diesen Patienten im Vergleich zur Normalbevölkerung 10 bis 20 Jahre früher auftreten und die für etwa 60% der Todesfälle verantwortlich sind [Canaud et al., 1999]. Weiterhin treten Infektionen aufgrund der verringerten Immunkompetenz gehäuft auf. Auch das Krebsrisiko ist bei Patienten mit chronischem Nierenversagen erhöht. In einer umfassenden Studie mit über 800.000 Patienten waren überwiegend Niere, Blase, Schilddrüse und andere endokrine Organe betroffen [Maisonneuve et al., 1999; Vamvakas et al. 1997].

3.2. Antioxidative Abwehrmechanismen

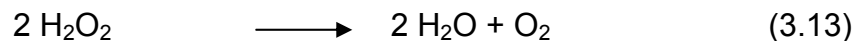
3.2.1. Primäre endogene Abwehr

3.2.1.1. Enzymatischer Abbau von ROS

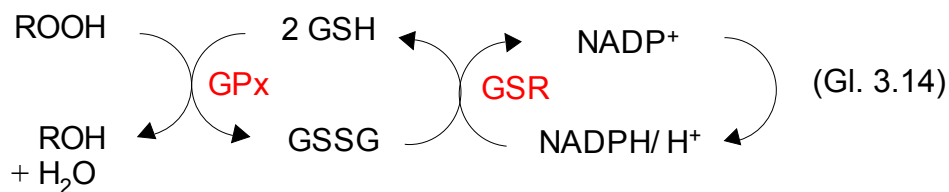
In Eukaryonten sind drei Isoformen der so genannten **Superoxid-Dismutase** (SOD) bekannt: Mangan-SOD, Kupfer/Zink-SOD und extrazelluläre SOD [Kelly et al., 1998]. Alle drei Formen besitzen die Fähigkeit, $O_2^{\bullet-}$ zu H_2O_2 und O_2 zu dismutieren (Gl. 3.12).



Die **Katalase** (CAT) kann das von der SOD gebildete H_2O_2 schnell und effektiv zu Wasser und O_2 umsetzen (Gl. 3.13). Sie enthält entweder Mangan oder eine Häm-Gruppe im katalytischen Zentrum und kommt hauptsächlich in den Peroxisomen vor [Halliwell et al., 1999].



Glutathion-Peroxidasen (GPx) reduzieren organische Peroxide (ROOH) und H_2O_2 . Die Reduktionsäquivalente werden von dem nicht-enzymatischen Antioxidans Glutathion (GSH, siehe 3.2.1.3) bereitgestellt. Die Regenerierung des GSSG wird durch die Glutathion-Reduktase (GSR) mit dem Cofaktor NADPH gewährleistet. (Gl. 3.14) [Kelly et al., 1998].



3.2.1.2. Proteine

a) Aktivitätsminimierung von Oxidantien

Das Glykoprotein Transferrin bindet freie Eisenionen im Blutplasma (Konzentration: 1,2-3,7 g/L), die in dieser Form nicht mehr redoxaktiv sind und in der Zelle als Ferritin gespeichert werden, das mit seinem Umbauprodukt Hämosiderin etwa 20% des

gesamten Eisenpools ausmacht [Eisenbrand et al., 2005]. Kupferionen binden an das Plasmaprotein Albumin und an das spezifische Transport- und Speicherprotein Caeruloplasmin und werden so inaktiviert [Halliwell et al., 1999].

b) Schutz durch andere Mechanismen

Einige Hitzeschockproteine wie die Chaperone schirmen neu gebildete Proteine vor ihrer Umgebung ab, so dass sie sich richtig falten können [Stryer, 1996]. Auch die DNA im Zellkern wird durch Proteine (z.B. Histone) geschützt [Berg et al., 2003].

3.2.1.3. Niedermolekulare Substanzen

Die Eigenschaft dieser Substanzen beruht hauptsächlich auf der Bildung von resonanz-stabilisierten Radikalen, die nicht zu Wasserstoffabstraktionen oder Elektronentransfers fähig sind. Diese Stoffe werden unterteilt in endogene, also vom Körper selbst produzierte Antioxidantien und exogene, über die Nahrung aufgenommene Stoffe (siehe 3.3).

a) Glutathion (L- γ -Glutamyl-L-cysteinylglycin, GSH), ein Tripeptid mit einer Sulfhydrylgruppe (Abb. 3.20), wird in der Leber durch die Verknüpfung von L-Glutaminsäure mit L-Cystein (katalysiert durch das Enzym γ -Glutamylcysteinylgase, γ -GCL) und darauf folgende Kondensation mit Glycin synthetisiert [Eisenbrand und Metzler, 2005].

Glutathion kann in den Zellen in reduzierter (GSH) oder in oxidiert (GSSG) Form vorliegen, wobei der Anteil des GSH etwa 90% des Gesamtglutathions (tGSH) ausmacht und als GSH-Status bezeichnet wird (reduziertes Glutathion in % Gesamtglutathion). Die Thiolgruppe reduziert zahlreiche ROS ($^1\text{O}_2$, HO^\bullet , $\text{O}_2^{\bullet-}$) und wird dabei zu GSSG oxidiert. Die Abnahme an reduziertem Glutathion kann in einer Senkung des GSH-Status resultieren, die die antioxidative Kapazität der Zelle verringert und so zu oxidativem Stress führt. Der oxidative Stress wiederum verursacht eine GSH-Depletion [Kelly et al., 1998]. Es wurde gezeigt, dass eine GSH-Depletion durch Behandlung von Zellen u.a. mit Alkenalen mit einer höheren Sensitivität gegenüber Oxidantien (Endpunkt: oxidative DNA-Schäden) einher geht [Glaab et al., 2001; Janzowski et al., 2003].

Die Oxidation von GSH zu GSSG ist reversibel und stellt so ein Puffersystem für den Redoxzustand der Zelle dar. Eine bedeutende Rolle spielt GSH auch bei der

Entgiftung elektrophiler Fremdstoffe. Es werden wasserlösliche Metabolite gebildet und elektrophile Substanzen gebunden. Die meisten reagieren bereits nicht-enzymatisch mit GSH, die Reaktion wird jedoch häufig durch Glutathion-S-Transferasen beschleunigt [Eisenbrand und Metzler, 2005]. Neben der Aktivität der GSR spielt auch die Synthese von GSH eine große Rolle für die Widerstandsfähigkeit gegenüber oxidativem Stress.

Die Thiolgruppe dieses Moleküls besitzt antioxidative Aktivität und reduziert zahlreiche ROS, wobei zwei Moleküle GSH selbst zu GSSG oxidiert werden. In dieser oxidierten Form sind zwei Tripeptide über eine Disulfidbindung verknüpft (Abb. 3.20).

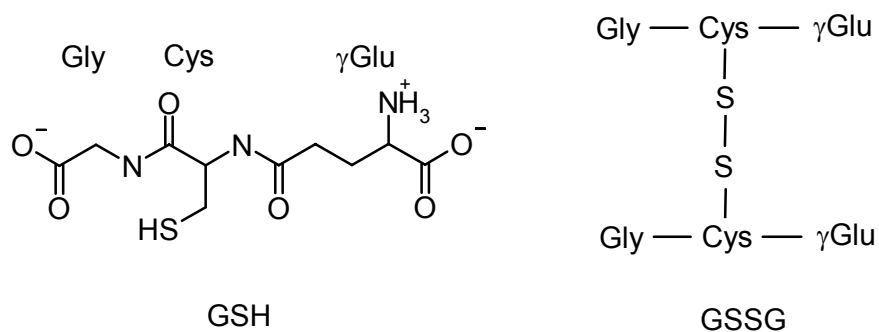


Abbildung 3.20: Struktur von reduziertem Glutathion (GSH) und oxidiertem Glutathion (GSSG)
[Halliwell et al., 1999]

Glutathion liegt in tierischen Zellen in hoher Konzentration vor (bis 5mM) und wirkt als Sulfhydrylpuffer. Intrazellulär beträgt der Anteil von GSH am Gesamtglutathion (tGSH:GSH+GSSG) etwa 90% (GSH-Status). Diese Homöostase wird durch die GSR aufrechterhalten. Eine Senkung dieses GSH-Status oder eine GSH-Depletion kann durch oxidativen Stress verursacht werden oder diesen zur Folge haben [Kelly et al., 1998].

Die protektiven Eigenschaften des Glutathions zeigen sich in seiner Funktion als Co-Faktor bei Enzymen zur Abwehr von oxidativem Stress, beim Abfangen von Hydroxylradikalen und Singulett-Sauerstoff, der Regenerierung von Antioxidantien wie Vitamin C und E, sowie der Entgiftung elektrophiler Fremdstoffe und der Ausscheidung entstandener wasserlöslicher Metabolite als Mercaptursäuren mit dem Urin [Valko et al., 2006; Eisenbrand und Metzler, 2005; Stryer, 1996].

Im Blut ist besonders viel GSH enthalten, da hier mit den O₂-transportierenden Erythrozyten besonders gefährdete Zellen vorliegen. Vollblut enthält 1-2 mM GSH, wobei im Plasma nur 1-3 μM vorhanden sind. Dies bedeutet, dass sich nahezu die

gesamte Menge in den Blutzellen befindet [Ceballos-Picot et al., 1996; Pasaoglu et al., 1996; Ross et al., 1997; Halliwell et al., 1999; Ozden et al., 2002].

Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Glutathionsynthese wird durch die γ -GCL katalysiert [Meister et al., 1983]. Wie auch andere Enzyme mit präventiver Wirksamkeit (z. B. GPx, Hämoxxygenase-1) [Chen et al., 2005] wird die γ -GCL über das „antioxidant response element“ (ARE) reguliert.

b) Bilirubin ist das Endprodukt des Hämabbaus und ist intensiv gelb gefärbt. Es liegt im Plasma hauptsächlich Albumin-gebunden in Konzentrationen von 3-21 $\mu\text{mol/L}$ vor. *In vitro* wurde gezeigt, dass Bilirubin Peroxyl-Radikale und $^1\text{O}_2$ abfangen kann. Die Bedeutung *in vivo* ist allerdings noch unklar [Berg et al., 2003; Halliwell et al., 1999].

c) Harnsäure und Xanthin werden durch die Xanthin-Oxidase (Purinabbau) aus Hypoxanthin gebildet. In vielen Spezies, nicht aber im Mensch und anderen Primaten, wird Harnsäure über Allantoin zu Harnstoff und Glyoxylat abgebaut. Im Menschen liegt Harnsäure normalerweise in Plasmakonzentrationen von 120-360 μM vor. Sie bildet nach Abfangen von Radikalen oder Oxidation durch ROS ein resonanz-stabilisiertes Harnstoffradikalanion (Abb. 3.21), das nicht mehr zu einer Wasserstoffabstraktion fähig ist. Durch Zwei-Elektronen-Übertragung kann Harnsäure weiter oxidiert werden. [Becker, 1993; Berg et al., 2003]. Neben den vieldiskutierten pathophysiologischen Effekten bei Gicht, Atherosklerose und koronaren Herzerkrankungen ist Harnsäure ein Antioxidanz. Durch Zwei-Elektronen-Übertragung kann Harnsäure auch weiter oxidiert werden. [Becker, 1993; Stryer, 1996]

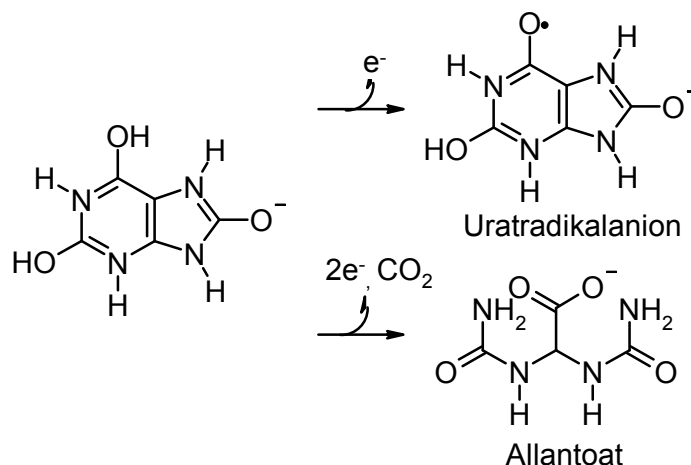


Abbildung 3.21: Harnsäure und Radikalabbauprodukte [nach Becker, 1992]

3.2.2. Sekundäre endogene Abwehr

Neben der direkten Detoxifikation von reaktiven Sauerstoffspezies durch antioxidative Enzyme und Moleküle (siehe 3.2.1), hat der Organismus auch Strategien zur Reparatur entstandener Schäden an Lipiden oder Makromolekülen (DNA, Proteine) entwickelt [Pacifici et al., 1991; Chiou et al., 2000].

3.2.2.1. DNA-Reparatur

DNA-Reparatursysteme erkennen modifizierte und fehlgepaarte DNA-Basen. Solche Modifikationen sind vor allem oxidierte Basen [Christmann et al., 2003]. Durch Erkennen und Herausschneiden geschädigter Base durch die DNA-Glykosylase entstehen apurine/apyrimidine (AP-) Stellen und die Reparaturkaskade der base excision repair (BER), das wichtigste Reparatursystem bei oxidativer DNA-Schädigung, wird in Gang gesetzt (Abb. 3.22).

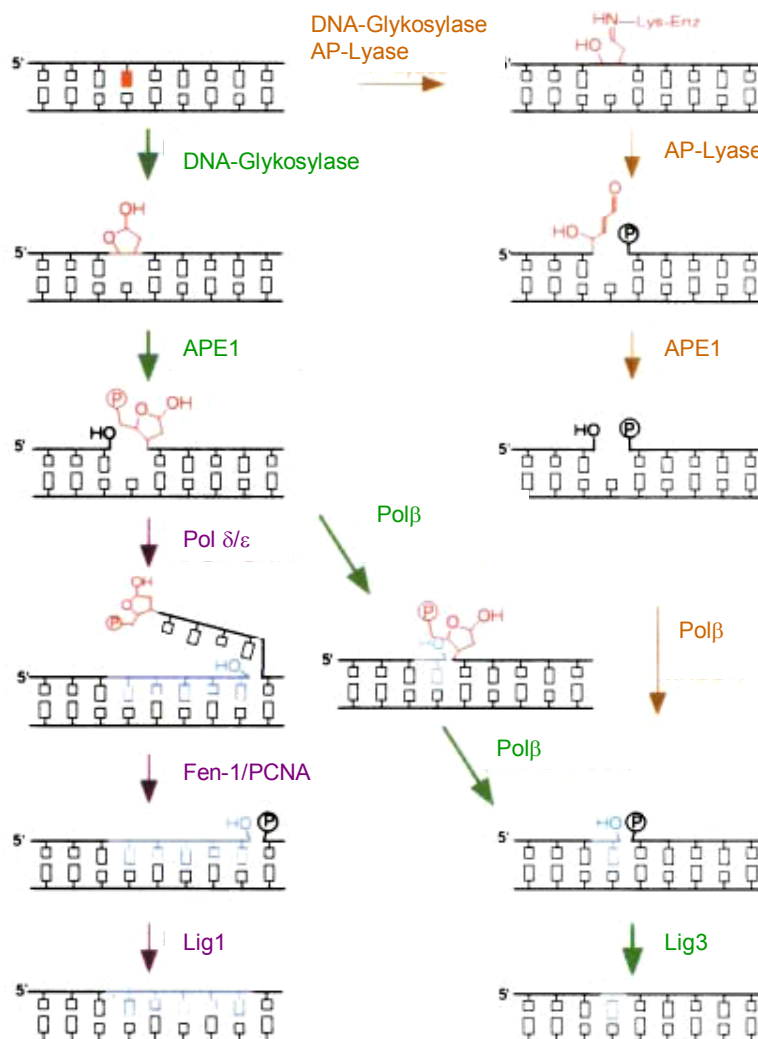


Abbildung 3.22: Schematische Darstellung der BER [nach Christmann et al., 2003]

An der AP-Stelle wird durch die AP-Endonuklease ein Strangbruch eingeführt. Anschließend schneidet eine Polymerase den Zucker heraus und führt das neue, korrekte Nukleotid ein. Eine Ligase schließt die Lücke wieder. Die Nukleotid-ausschneidereparatur („Nucleotid Excision Repair“, NER) funktioniert ähnlich, ist aber aufwändiger, da das herausgeschnittene Stück etwa 30 DNA-Basen lang ist [Hoeijmakers, 2001].

Das Reparatursystem wird unterstützt durch einen p53-vermittelten (vorübergehenden) Zellzyklusarrest. Dadurch kann die Zellteilung und die Weitergabe der DNA-Schäden an Tochterzellen verzögert und der Schaden repariert werden. Ist das Ausmaß der Schäden zu schwer, geht die Zelle in den programmierten Zelltod (Apoptose) über [Hoeijmakers, 2001].

3.2.2.2. Proteine: Reparatur und Degradation

ROS-induzierte oxidative Proteinschäden können zu Aktivitätsminderung oder Funktionsverlust von Enzymen und Rezeptoren führen und somit erhebliche Einschränkungen der Funktionsfähigkeit einer Zelle zur Folge haben. Der menschliche Organismus hat Reparaturmechanismen für einige dieser Schäden entwickelt: Glutathion und Thioredoxin können oxidativ gebildete Disulfidbrücken re-reduzieren, die durch „cross-linking“ zwischen Cystein-SH-Gruppen entstehen, die Methionin-Sulfoxid Reduktase reaktiviert Peptide/Proteine, die durch die oxidative Bildung von Methioninsulfoxid aus Methionin geschädigt wurden. Bei irreversiblen oxidativen Modifikationen oder einer falschen Faltung bei Neusynthese werden betroffene Proteine meistens (z. B. durch Ubiquitinierung) für den lysosomalen oder proteasomalen proteolytischen Abbau markiert. [Halliwell et al., 1999]

3.2.2.3. Modulation der Signaltransduktion/Cell Response

Neben der Beseitigung von ROS und der Reparatur von bereits geschädigten Makromolekülen spielt auch die Regulation von detoxifizierenden Enzymen z.B. durch sog. Antioxidative response elements (AREs; oder auch Electrophile Response Elements, EpREs) in der Chemoprävention eine große Rolle. Zu den ARE-regulierten Proteinen gehören ein Enzym der Glutathionsynthese (γ -GCL, siehe 3.2.1.1), Redoxproteine mit aktiven Sulfhydrylgruppen (z.B. Thioredoxin) und Fremdstoff-metabolisierende Enzyme (Glutathion-S-transferasen, Glutathionreduktase, UDP-Glucuronyltransferasen, NAD(P)H-Chinon-Oxidoreduktase (NQO1) und

Hämoxygenase-1). Sie besitzen detoxifizierende und antioxidative Funktionen, wodurch sie die Zelle vor genotoxischer Schädigung schützen [Lee et al., 2005; Nguyen et al., 2003]. Eine ARE-vermittelte Regulation von Genen zur Expression von DNA-Reparaturenzymen wird ebenfalls diskutiert [Li et al., 2002].

AREs können durch eine Reihe strukturell unterschiedlicher Substanzen aktiviert werden. Dazu gehören planare Flavonoide und phenolische Antioxidantien, Chinone, Mercaptane, thiolhaltige Strukturen (z. B. Isothiocyanate), Schwermetalle und Hämkomplexe. Die meisten aktivierenden Substanzen zeigen elektrophile und sulfhydrylbindende Eigenschaften [Lee et al., 2005; Nguyen et al., 2003]. Substanzen, die ausschließlich ARE aktivieren, werden als „monofunktionelle Induktoren“ bezeichnet, z.B. Quercetin und Propylgallat. „Bifunktionelle“ Induktoren induzieren Phase-I-Enzyme über den Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AhR) und nach Metabolisierung Phase-II-Enzyme über AREs, z.B. Benzylisothiocyanat und Cumarin [Nguyen et al., 2003]. „Dual“ wirkende Induktoren hemmen Phase-I-Enzyme, induzieren jedoch Phase-II-Enzyme. Zu diesen gehören z.B. 4-Methoxyphenol und *tert*-Butylhydroxyanisol [Henderson et al., 2000; Lee et al., 2005].

Der „nuclear transcription factor erythroid 2p45 (NF-E2)-related factor 2“ (Nrf2) ist ein Transkriptionsfaktor, der in der ARE-vermittelten Zellantwort auf oxidativen Stress und Fremdstoffe eine bedeutende Rolle spielt. Bekannte Nrf2-Aktivatoren sind z.B. Oltipraz, Sulforaphan und Curcumin [Lee et al., 2005]. In der inaktiven Form liegt Nrf2 an Keap1 gebunden im Zytoplasma vor. Nach Dissoziation des Komplexes durch Wechselwirkung der Aktivatoren mit den Cysteinresten oder nach Phosphorylierung des Komplexes kann Nrf2 in den Kern translozieren und an das ARE binden. Dort bindet das Nrf2-Protein an die entsprechende Sequenz und reguliert die Aktivität des ARE [Lee et al., 2004].

AREs stehen somit eng im Zusammenhang mit der Koordination endogener und exogener Abwehrmechanismen, da sie in den Promotorregionen vieler Gene zu finden sind, die durch oxidativen oder chemischen Stress induziert werden können. Zahlreiche Untersuchungen geben Hinweise, dass über die Nahrung aufgenommene Polyphenole die Transkription von antioxidativen und detoxifizierenden Abwehrsystemen über AREs aktivieren können. Diskutierte Interaktionen (Abb. 3.23) sind die Veränderung der Bindung von Keap1, so dass Nrf2 frei wird und die Aktivierung von MAPK Proteine, die in die Stabilisierung von Nrf2 involviert sind [Masella et al., 2005].

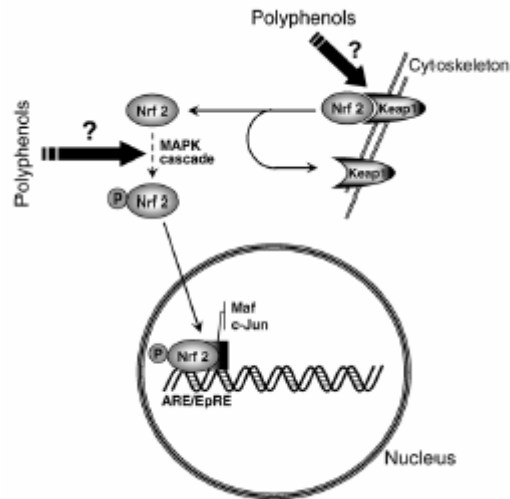


Abbildung 3.23: Vorgeschlagene Induktion von Phase II Genexpression durch Polyphenole über ARE [Masella et al., 2005]

3.3. Exogene Antioxidantien

Exogene Antioxidantien sind niedermolekulare Substanzen, die mit der Nahrung oder als Supplemente aufgenommen werden. Ihre Eigenschaft als „Radikalfänger“ beruht vor allem auf der Bildung von resonanzstabilisierten Radikalen, die nicht zu weiteren Wasserstoffabstraktionen oder Elektronentransfers fähig sind.

3.3.1. Vitamin C

Die wasserlösliche Ascorbinsäure (Vitamin C) ist ein 2,3-Endiol-L-Gulonsäure-Lacton. Die wichtigsten Quellen sind u. a. Kartoffeln, Zitrusfrüchte und Äpfel [Biesalski et al., 2002]. Ascorbinsäure kann direkt ROS abfangen und ist außerdem Cofaktor zahlreicher Enzyme (z.B. Prolin- und Lysin-Hydroxylase). L-Ascorbinsäure ist bei der Regeneration von Tocopherol-Radikalen beteiligt, welche bei der Reaktion von membranständigem Tocopherol mit Sauerstoffradikalen entstehen. Dadurch kann Ascorbinsäure eine „Tocopherol-Sparwirkung“ ausüben [Biesalski et al., 2002]. Ascorbinsäure hat zwei ionisierbare Hydroxylgruppen und ist somit eine Disäure. Bei physiologischem pH-Wert liegt Vitamin C zu 99,9% als Ascorbat (AH^-) und in kleinen Konzentrationen als Dehydroascorbat (A) (0,05%) und als AH^{2-} (0,004%) vor.

Ascorbat reagiert als Ein-Elektronen-Donor mit freien Radikalen zu resonanzstabilen Tricarbonylascorbat-Radikal (AH^{\bullet}) und nicht protonierende Form ($AH^{\bullet-}$). Das Semidehydroascorbatradikal ist somit das Produkt der Ascorbatoxidation durch ROS (Abb. 3.24) [Valko et al., 2006].

Theorie

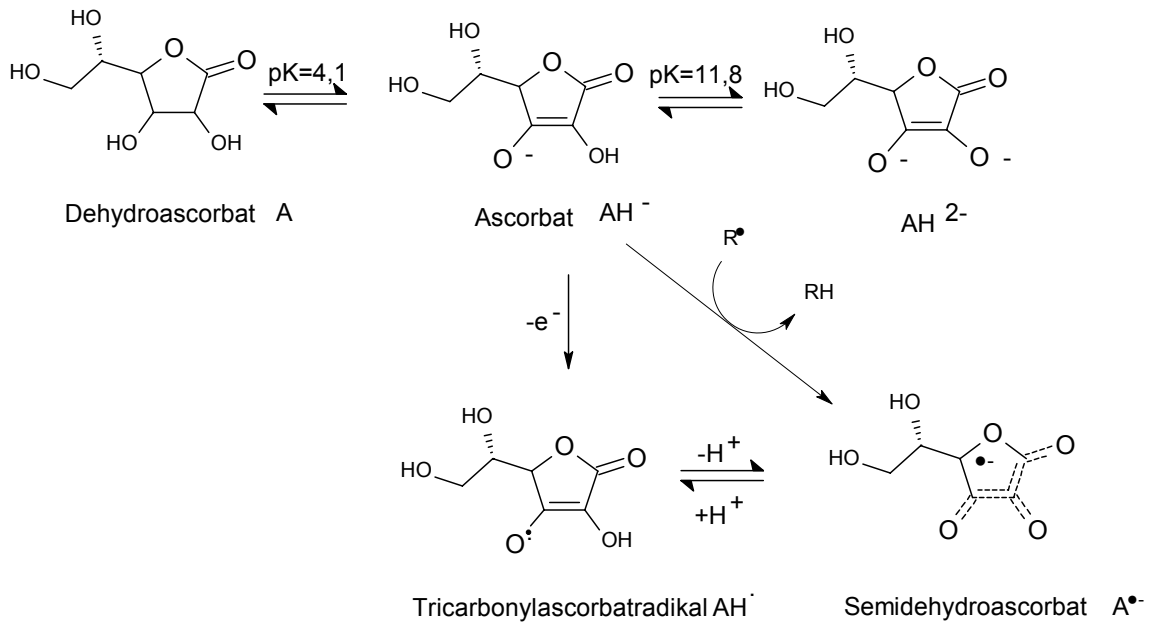
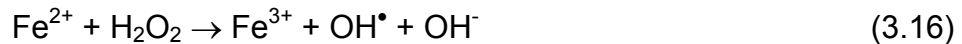
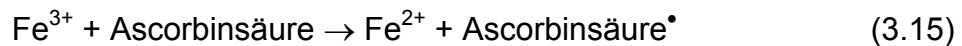


Abbildung 3.24: Struktur von Ascorbat und seinen Oxidationsprodukten [Valko et al., 2006]

In vitro zeigt Ascorbinsäure in Gegenwart von Kupfer und Eisen prooxidative Eigenschaften. Sie reduziert Fe^{3+} zu Fe^{2+} (Gln. 3.15) und fördert damit die Bildung von $OH^•$ aus H_2O_2 (Gln. 3.16) [Halliwell et al., 1999].



3.3.2. Vitamin E

„Vitamin E“ ist eine Sammelbezeichnung für alle fettlöslichen **Tocopherole** und **Tocotrienole**, die qualitativ die biologische Aktivität von α -Tocopherol, der bedeutendsten in der Natur vorkommenden Verbindung mit Vitamin-E-Aktivität, zeigen. Die Aufnahme erfolgt in der Regel über Fette und Öle.

Vitamin E besteht aus einem Chromanring (mit unterschiedlichem Methylierungsmuster) und einer lipophilen Phytolseitenkette (Abb. 3.25).

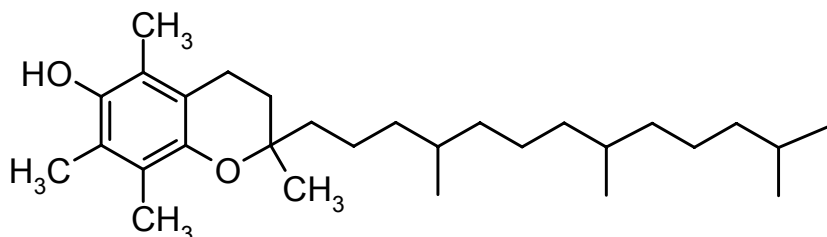


Abbildung 3.25: Struktur von α -Tocopherol [Biesalski et al., 2002]

α -Tocopherol ist Bestandteil aller biologischen Membranen. Der hydrophobe Schwanz des α -Tocopherols ist in der Membran verankert, der Chromanol-Ring, der die phenolische OH-Gruppe enthält, ist außen an der Lipidmembran positioniert und interagiert mit der wässrigen Phase. Die OH-Gruppen sind für die Aktivität der Radikalfänger verantwortlich [Halliwell et al., 1999].

Vitamin E verringert die LPO, indem es ein Proton an das Radikal abgibt und selbst zum Vitamin E-Radikal wird (Abb. 3.26). Dies ist reaktionsträge und kann schon aufgrund der Lage innerhalb der Membran keine weitere LPO verursachen. Vitamin E unterbricht somit die LPO, übernimmt z. B. die Energie der angeregten Elektronen von $^1\text{O}_2$ und gibt diese Energie strahlungslos ab (Quenching) oder fängt $^1\text{O}_2$ durch Addition ab. Tocopheryl-Radikale werden mit einem Ascorbat-abhängigen Redoxsystem wieder regeneriert. Ein Tocopherol Molekül kann zwei ROS-Moleküle abfangen. [Halliwell et al., 1999; Kelly et al., 1998]

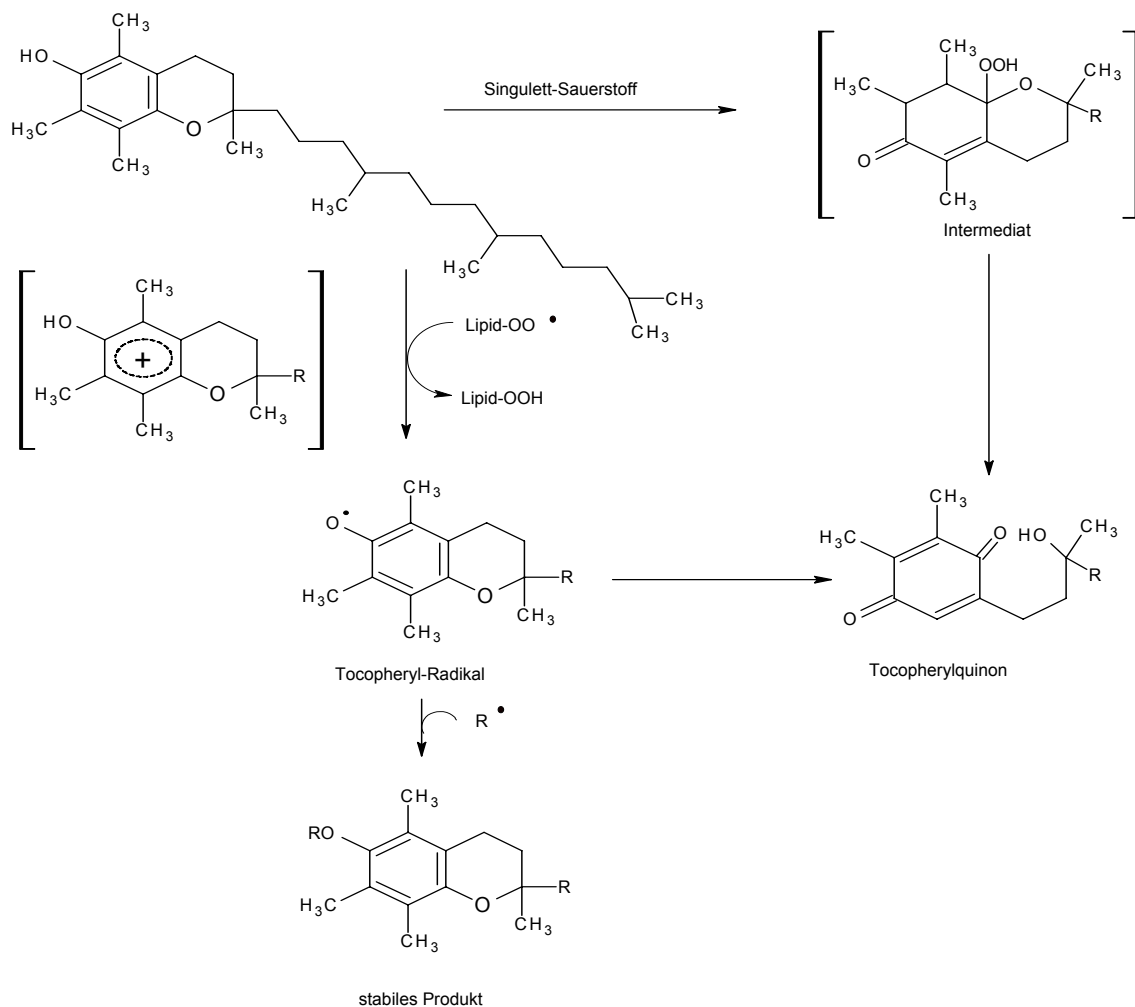


Abbildung 3.26: Reaktion von α -Tocopherol mit ROS [Halliwell et al., 1999]

Der Plasmaspiegel liegt bei etwa 10 mg/l [Diem et al., 1975]. In vitro besitzt Vitamin E, sowie Vitamin C durch metallkatalysierte Reduktion (Gln. 3.15 und 3.16) prooxidative Eigenschaften, jedoch nicht unter physiologischen Bedingungen [Carr et al., 1999; Valko et al., 2006].

3.3.3. Carotinoide

Carotinoide sind Pigmentstoffe aus Pflanzen und Mikroorganismen. Chemisch betrachtet zählen die Carotinoide zu den Terpenoiden. Dabei handelt es sich hauptsächlich um Tetraterpene, die aus 8 Isopreneinheiten aufgebaut sind. Die allgemeine Aufteilung erfolgt in sauerstofffreie Carotine und sauerstoffhaltige Xanthophylle. Gegenwärtig sind etwa 650 Carotinoide bekannt, wovon etwa 50 auf Grund ihrer chemischen Struktur in Vitamin A umgewandelt werden können.

Carotinoide zeichnen sich durch ein zentrales System konjugierter Doppelbindungen aus, das an beiden Enden verschiedene Substituenten tragen kann. Der bekannteste Vertreter aus der Substanzklasse ist β -Carotin (Abb. 3.27) [Biesalski et al., 2002; Halliwell et al., 1999].

Die antioxidative Aktivität von Carotinoiden beruht auf der konjugierten Struktur der Doppelbindungen mit delokalisierten ungepaarten Elektronen, die für das physikalische Quenching von Singulett-Sauerstoff und für die Entfernung von oxidierten freien Radikalen, wie Peroxid-, Hydroxyl- und Sauerstoffanionradikalen verantwortlich ist. Mögliche Mechanismen für die Reaktion von Carotinoiden mit freien Radikalen (ROO^\bullet ; RO^\bullet) sind: Wasserstoffabstraktion, Elektrontransfer und Radikaladdition (siehe Gln. 3.8 bis 3.11). Beim Elektrontransfer entsteht ein Carotinoid-Kationradikal ($\text{Car}^{+\bullet}$, Abb. 3.27), welches durch Dismutation oder mittels Abfangen durch α -Tocopherol entfernt wird. Bei Radikaladdition wird das freie Radikal an die Seitenkette addiert ($\text{Car}(\text{ROO})^\bullet$, Abb. 3.27) [Kelly et al., 1998; Halliwell et al., 1999; Chaudiere et al., 1999].

Theorie

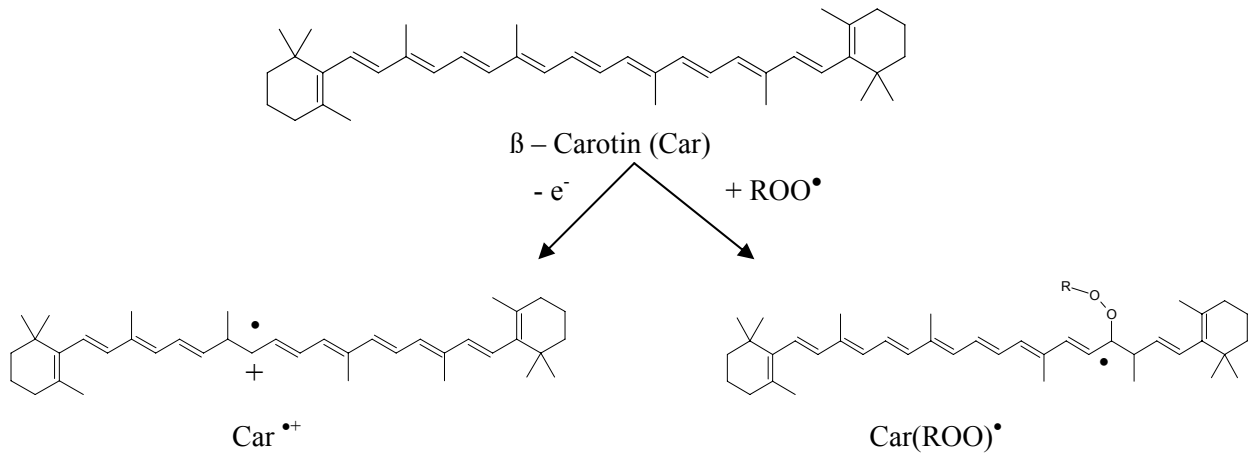
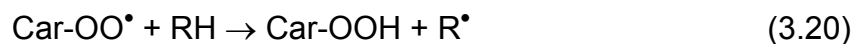


Abbildung 3.27: Reaktionswege von β-Carotin [Chaudiere et al., 1999]

Bei der Quenching-Reaktion gehen die Carotinoide in einen angeregten Triplettzustand über. In der nachfolgenden Reaktion erreichen die Carotinoide nach Abgabe von Wärme wieder den Grundzustand (Gln. 3.17 und 3.18).



Bei hohem Sauerstoffpartialdruck kann das Carotinoidradikal (Car[•]) mit Sauerstoff reagieren, wobei ein Carotinoid-Peroxyradikal entsteht, das prooxidative Eigenschaften hat und unter anderen Lipidoxidation verursachen kann (Gln. 3.19 und 3.20) [Valko et al., 2006].



3.3.4. Flavonoide und Polyphenole

Viele epidemiologische Studien zeigen eine Verbindung zwischen einer obst- und gemüsereichen Ernährung und einer verminderten Inzidenz für Krebs, kardiovaskulären und andere chronischen Krankheiten [Block et al., 1992; Hertog et al., 1993; Hertog et al., 1995; Steinmetz et al., 1991]. Obst, Gemüse und die aus ihnen hergestellten Säfte gelten daher als antioxidativ wirksame Lebensmittel

[Biesalski et al., 2004]. Die Zusammenhänge zwischen Ernährung und der Entwicklung von Krebs werden allerdings kontrovers diskutiert, ebenso wie die Bewertung der krebspräventiven Nahrungskomponenten [Abrahamse et al., 1999]. In epidemiologischen Untersuchungen konnte bei Fall-Kontroll-Studien eine Reduktion des Krebsrisikos (Oesophagus, Lunge, Magen, Colon) bei Konsum von Obst und Gemüse nachgewiesen werden, bei Kohorten-Studien war dieser Zusammenhang ebenfalls nachweisbar, allerdings weniger stark ausgeprägt [Riboli et al., 2003]. Die AICR (American Institute for Cancer Research) hat bei Fall-Kontroll- und Kohorten-Studien deutliche Zusammenhänge zwischen der Aufnahme von Früchten und der Prävention verschiedener Krebsarten (Mund/Rachenraum, Oesophagus, Magen und Lunge) festgestellt [AICR, 2007]. Es zeigt sich, dass sich die Hinweise auf gesundheitsfördernde Wirkungen von Obst- und Gemüsekonsum mit zunehmender Anzahl an Untersuchungen erhärten.

Lebensmittel (z.B. Mehrfruchtsaft), die häufig in humanen Interventionsstudien eingesetzt werden, haben eine Vielzahl von Inhaltsstoffen, die einen Rückschluss auf die Wirksamkeit einer bestimmten Substanzklasse erschweren. Die einzelnen Substanzen wiederum können selbst oder in Wechselwirkung mit anderen Substanzen vielzählige Wirkungen entfalten [Thompson et al., 1999]. Untersuchungen mit Einzelsubstanzen (z.B. β -Carotin in der CARET-Studie) [Omenn et al., 1994] zeigen dagegen zum Teil in hohen Dosierungen, wie sie durch Supplementierung von Nahrungsergänzungsmitteln durchaus erreichbar sind [Ford et al., 2005], adverse Effekte (Erhöhung des Lungenkrebsrisikos) [Omenn et al., 1996]. In vitro wirken Flavonoide (Quercetin, Myricetin und Kapferol) prooxidativ, indem sie in Gegenwart von Cu^{2+} - und Fe^{3+} -Ionen DNA-Strangbrüche und Lipidperoxidation verursachen. Die Wirkung von Flavonolen und Flavonen im Organismus als Antioxidans oder Prooxidans hängt von deren Konzentration und dem Redoxpotential möglicher Reaktionspartner ab [Böhm et al., 1998].

Die Gruppe der sekundären Pflanzenstoffe, der die phenolischen Verbindungen angehören, ist sehr heterogen. Polyphenolische Verbindungen werden aus Phenylalanin über den Shikimat- und Phenylpropan-Weg in Pflanzen synthetisiert [Golding et al., 2001]. Sie erzeugen vielfältige Farbe, sorgen mit für die Komplexität von Lebensmitteln und haben auch geschmackliche Relevanz. Ihre Anzahl wird auf mindestens 30.000 Stoffe geschätzt und im Gegensatz zu Primärmetaboliten im humanen Stoffwechsel (z.B. Zucker, Fruchtsäuren), sind Vorkommen und

Konzentration der Sekundärmetabolite in den Pflanzen stark abhängig von der Art der Pflanze, der Sorte und dem physiologischen Reifegrad. Des Weiteren werden die Gehalte von Umweltfaktoren wie Klima, Anbau, Sonnenbestrahlung und Stress beeinflusst. Aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften sind sekundäre Pflanzenstoffe oftmals sehr empfindlich und die Endkonzentrationen abhängig von der Verarbeitung. Im Folgenden sollen die Mehrfruchtsaft-relevanten Verbindungen zunächst kurz allgemein beschrieben werden. Ein besonderer Fokus liegt anschließend auf den Anthocyanen, die eine der für eine antioxidative Wirkung vielversprechendsten Flavonoid-Klassen des in dieser Arbeit verwendeten Mehrfruchtsaftes darstellt, da sie in hohen Konzentrationen vorkommen und deutliches antioxidatives, chemopräventives und antiinflammatorisches Potential besitzen.

3.3.4.1. Struktur, Vorkommen, Aufnahmemengen von Flavonoiden

Flavonoide sind weit verbreitete nichtnutritive sekundäre Pflanzenstoffe. Sie stellen die in der Nahrung am häufigsten vorkommenden Polyphenole dar und werden von Pflanzen beispielsweise zum Schutz vor UV-Strahlung oder wegen ihrer antibakteriellen/-viralen Wirkung genutzt [Manach et al., 2004]. Sie dienen als Abwehr-, Farb-, Duft- und Aromastoffe und gelten als Antioxidantien, da sie nach Wasserstoffabstraktion an den phenolischen OH-Gruppen resonanzstabilisierte Radikale bilden und mit Metallionen Chelatkomplexe eingehen können. Zusätzliche antioxidative Eigenschaften sind die Hemmung der Aktivität von Enzymen, die zur Bildung von ROS führen können, z. B. Xanthin-Oxidase und NADPH-Oxidase. Außerdem induzieren Flavonoide entgiftungsfördernde Enzyme, wie z. B. Glutathion-S-Transferase, UDP-Glucuronosyltransferase und γ -Glutamylcystein Synthetase [Lee-Hilz et al., 2006].

Zur Zeit sind schätzungsweise 4000 verschiedene Flavonoide bekannt [Manach et al., 2004], wobei allein in den letzten fünf Jahren mehr als 450 neue Flavonoide in der Literatur beschrieben wurden [Williams et al., 2004]. Die Flavonoide sind Diphenylpyrane, die aus zwei Benzolringen (A u. B) bestehen, die an einen heterozyklischen Pyran- oder Pyronring gebunden vorliegen. Allen Flavonoiden ist die Grundstruktur des Flavans, mit zwei aromatischen Ringen (A u. B) und einem an den A-Ring kondensierten O-heterozyklischen Ring (C) gemeinsam (Abb. 3.28).

Theorie

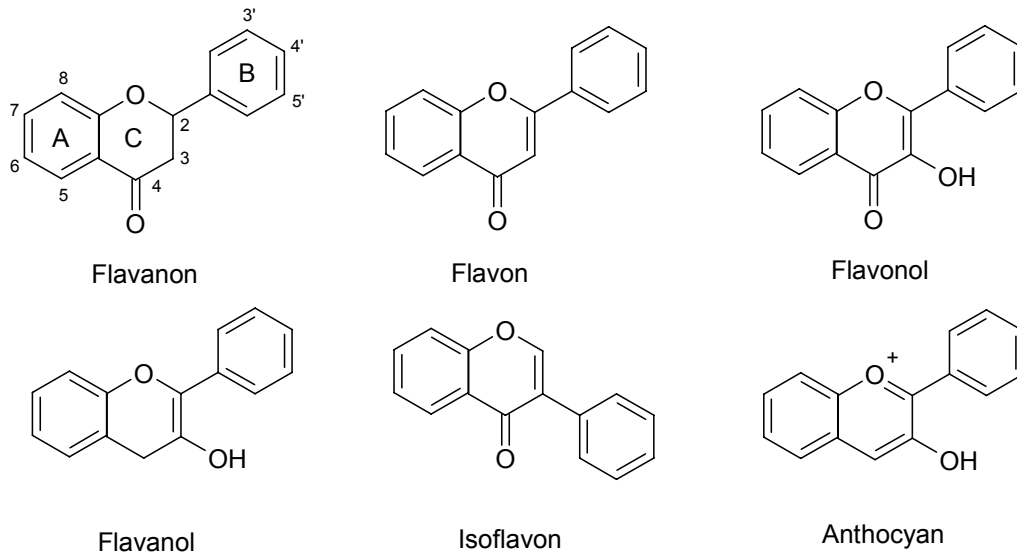


Abbildung 3.28: Grundstrukturen der verschiedenen Flavonoidklassen

Aufgrund des Oxidationsgrades im Pyranring (C-Ring) werden folgende Hauptgruppen unterschieden (Abb. 3.28) [Hollman, 1997]:

- Flavanone, mit einer Oxo-Gruppe in 4-Position (z. B. Hesperetin, Naringenin),
- Flavone, mit einer Oxo-Gruppe in 4-Position und einer Doppelbindung zwischen C2 und C3 (z. B. Luteolin, Apigenin),
- Flavonole (3-Hydroxyflavon), mit einer Oxo-Gruppe in 4-Position, einer Doppelbindung zwischen C2 und C3, sowie einer Hydroxygruppe in 3-Position (z. B. Quercetin, Rutin),
- Flavanole (Catechine), mit einer Hydroxygruppe in 3-Position (z. B. Catechin, Theaflavin),
- Isoflavone, mit einer Oxo-Gruppe in 4-Position und einer Doppelbindung zwischen C2 und C3, jedoch befindet sich der B-Ring hier in 3-Position (z. B. Genistein, Daidzein),
- Anthocyane, mit einem aromatischen C-Ring und positiv geladenem Sauerstoff, sowie einer Hydroxylgruppe in 3-Position (z. B. Cyanidin, Delphinidin).

Einige Beispiele für die Hauptquellen von Flavonoiden sind in der folgenden Tabelle (Tab 3.8) dargestellt.

Tabelle 3.8: Einige Quellen pflanzlicher Phenole [Watzl et al., 2001; Hollmann et al., 1999; Halliwell et al., 1999]

Pflanzliche Phenole	Hauptvorkommen
Flavone	Petersilie, Stangensellerie, Thymian
Flavonole	Zwiebeln, Beeren, Brokkoli, Apfel, Kirschen, Tee, Rotwein
Flavanone	Zitrusfrüchte
Flavanole	grüner und schwarzer Tee, Rotwein
Catechine	Apfel, Tee
Anthocyane	rote Trauben, Rotwein, Kirschen, Himbeeren, Erdbeeren
Isoflavone	Sojabohnen, Leguminosen

Als Voraussetzung für die Radikalfängereigenschaften der Flavonone, Flavanone, Flavonole und Isoflavone wurden folgende Strukturmerkmale identifiziert (Abb. 3.29) [Rice-Evans et al., 1996]:

- eine *o*-Dihydroxystruktur (Catechol-Struktur) im B-Ring (die gleichzeitige Anwesenheit einer 3'-OH und 4'-OH-Gruppe), **(a)**.
- eine Doppelbindung in Position 2, 3 in Kombination mit einer 4-Oxo-Gruppe, **(b)**.

Flavonole wie beispielsweise Quercetin besitzen das stärkste antioxidative Potential. Anthocyane besitzen neben **(a)** aufgrund ihrer charakteristischen Ladung im C-Ring **(c)** (Abb. 3.29) die Fähigkeit zur Konjugation und damit auch ohne 4-oxo-Gruppe im C-Ring eine hohe antioxidative Kapazität [Rice-Evans et al., 1996]. Das Merkmal **(c)** befähigt Anthocyane (neben der Polymerisierung) zu Interaktionen mit der DNA, was zur Stabilisierung der Helix führt [Kong et al., 2003]. Flavanole, denen die Merkmale **(b)** und **(c)** fehlen, zeigen deutlich niedrigere Werte. [Rice-Evans et al., 1996]

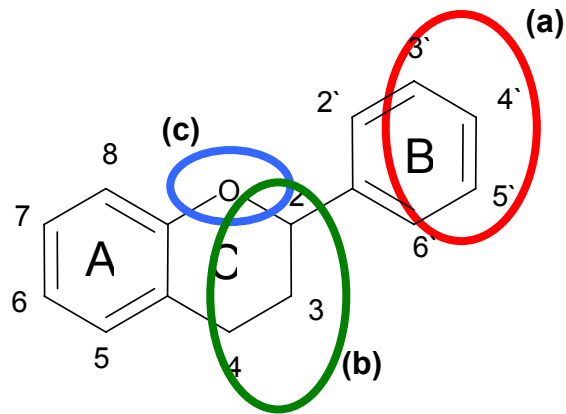


Abbildung 3.29: Strukturelle Voraussetzungen für die Radikalfängereigenschaften von Flavonoiden [Rice-Evans et al., 1996]

In der Natur kommen die meisten Flavonoide nicht frei als Aglykon, sondern an einen Zucker gebunden, als Glykoside vor. Die Zucker-Reste können sehr stark variieren, mehr als 80 verschiedene Zucker sind bisher in Flavonoidglykosiden nachgewiesen worden. Außerdem können diese zusätzlich mit verschiedenen organischen Säuren verestert sein [Manach et al., 2004; Watzl et al., 2001].

Je nach Ernährungsgewohnheiten verschiedener Bevölkerungsgruppen schwankt die Aufnahmemenge beträchtlich. Untersuchungen bzw. Abschätzungen zur täglichen Aufnahme von Flavonoiden mit der Nahrung gestalten sich dabei schwierig. Flavonoide kommen in vielen Lebensmitteln vor, jedoch kann sich die Flavonoidzusammensetzung deutlich unterscheiden. Dies führt zu starken individuellen, ernährungsbedingten Schwankungen. Für die Niederlande wurde mit einer Schwankungsbreite von 0 bis 120 mg/Tag die tägliche Flavonol- und Flavonaufnahme von 23 mg/Person berechnet. In Bayern wurde für die Aufnahme an Flavonoiden ein Wert von insgesamt 54 mg/Tag, mit einer Schwankungsbreite von 7 bis 202 mg ermittelt [Kulling et al., 2003; Manach et al., 2004; Watzl et al., 2001; Wiseman et al., 2001]. Für Flavonole sind Mengen bis zu 68 mg/d beschrieben [Radtke et al., 2002]. Gestützt durch epidemiologische Studien sind Flavonoide als bedeutende Verbindungsklasse in Früchten und Gemüse in Zusammenhang mit positiven ernährungsphysiologischen Eigenschaften gebracht worden. So wird postuliert, dass Flavonoide durch ihre antioxidative, antikanzerogene, antivirale, antiatherogene, antiallergene, antiinflammatorische und immunstimulierende Eigenschaften eine protektive Wirkung *in vivo* und/oder *in vitro* besitzen. Des Weiteren kann eine Vielzahl von Flavonoiden die Aktivität unterschiedlichster

Enzyme oder Zellrezeptoren modulieren. Unklar bleibt dennoch, ob die Flavonoide bzw. welche Verbindungen oder Kombinationen von Substanzen aus Früchten und Gemüse, diese protektiven Wirkungen besitzen und welcher Wirkmechanismus zugrunde liegt. [Depeint et al., 2002, Duthie et al., 2003, Galati et al., 2004, Manach et al., 2004]

3.3.4.2. Anthocyane

Die Anthocyane sind eine bedeutende Untergruppe der Flavonoide. Der Name ergibt sich aus den griechischen Wörtern *“anthos”* für Blume und *“kyanos”* für blau. Anthocyane kommen in der Natur als wasserlösliche Pigmente im Zellsaft der Vakuolen zahlreicher Pflanzen, überwiegend in den Außenbereichen wie Epidermis- und Subepidermiszellen der Früchte vor [Mazza et al., 1993].

Chemisch gesehen sind Anthocyane Polyhydroxy- bzw. Polymethoxyderivate des 2-Phenylbenzopyrylium-Salzes und tragen im sauren Milieu eine positive Ladung (Abb. 3.30).

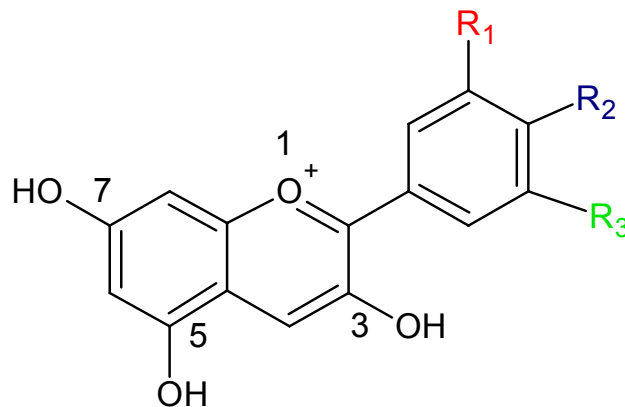


Abbildung 3.30 Struktur von Anthocyanen, R=Rest

Es sind 17 natürlich vorkommende Anthocyane bekannt, sechs davon kommen in höheren Pflanzen vor (Tab. 3.9) [Kong et al., 2003].

Tabelle 3.9: Wichtige Vertreter der Anthocyane; R=Rest [Kong et al., 2003]

Anthocyan	R ₁	R ₂	R ₃
Cyanidin	-OH	-OH	-H
Delphinidin	-OH	-OH	-OH
Malvidin	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃
Pelargonidin	-H	-OH	-H
Peonidin	-OCH ₃	-OH	-H
Petunidin	-OCH ₃	-OH	-OH

Die drei nicht-methylierten Anthocyanidine (Cyanidin, Delphinidin, Pelargonidin) sind am weitesten verbreitet [Kong et al., 2003].

Sie liegen in der Natur meist als Glykoside vor, was durch die Bezeichnung als „Anthocyanin“ im Namen deutlich gemacht wird. Meist handelt es sich um das 3-Glykosid, das aus unterschiedlichsten Zuckern (Glukose, Galaktose, Rhamnose, Xylose, Arabinose) besteht [Hou, 2003a]. Eine Glykosylierung kann seltener auch in 5-,7- [Kong et al., 2003] oder 4'- [Fossen et al., 2003] Position vorliegen [Kong et al. 2003, Fossen et al. 2003].

An die an der 3-Position angehängten Zuckerreste können (meist in 6''-Position) organische Säuren angehängt sein („acetylierte Anthocyane“). Insgesamt sind bisher etwa 400 verschiedene Verbindungen dieser Substanzunterklasse gefunden worden. Das Farbspektrum der Anthocyane variiert von blau bis dunkelrot. Sie akkumulieren in den Vakuolen der Pflanzenzellen und verursachen dort (teils als Komplexe mit Flavonen und Metallionen) die Farbe der Blüten. Im Herbstlaub treten sie hervor, wenn das grüne Chlorophyll abgebaut ist.

Ihre Funktionen innerhalb der Pflanze sind das Anlocken von Tieren zur Bestäubung/ Samenverbreitung durch die Farbe, antioxidative und antibakterielle Wirkung und der Schutz vor Parasiten [Kong et al., 2003].

a) Tägliche Aufnahme und Bioverfügbarkeit

Die tägliche Aufnahmemenge wird auf 2,7 mg/d (D) geschätzt [Watzl et al., 2002], ältere Schätzungen gehen von 180-215 mg/d (USA) [Kuhnau, 1976] aus. Dabei steigt die tägliche Aufnahmemenge durch kommerziell erhältliche Extrakt-Präparate [Hou, 2003a]. Auch saisonal bedingt können über rote Früchte bis zu mehreren hundert mg pro Tag und Person aufgenommen werden [Sanchez-Moreno et al.,

2003]. Mindestens 10% der Bevölkerung in Deutschland nehmen allerdings überhaupt keine Anthocyane auf [Watzl et al., 2002].

Anthocyane besitzen eine sehr geringe Bioverfügbarkeit. Bezogen auf die verabreichten Anthocyanmengen liegt die prozentuale Wiederfindung in Humanversuchen zwischen 0,02 und 1,8% und im Tierversuch zwischen 0,61 und 1,82% [Fleschhut et al., 2005; Felgines et al., 2003, Ichiyanagi et al., 2006].

Alle Studien über die Aufnahme von Anthocyanen zeigen eine schnelle Resorption und Ausscheidung, v.a. in intakter, unmetabolisierter Formen, die im Plasma einer Kinetik erster Ordnung folgt [Cao et al., 2001]. Auch Miyazawa et al. fanden diese schnelle Verstoffwechslung mit sehr kurzen Halbwertszeiten sowohl beim Menschen als auch im Tierversuch [Miyazawa et al., 1999]. Bub et al. konnten zeigen, dass im Urin von Probanden bereits 24 h nach Aufnahme anthocyanreicher Getränke keine Anthocyane mehr nachweisbar waren [Bub et al., 2001]. In weiteren Untersuchungen wurden Halbwertszeiten verschiedener Anthocyane zwischen 0,8 und 2,2 h beim Menschen und 0,8 und 2,1 h bei der Ratte gefunden [Cao et al., 2001, Frank et al., 2003, Matsumoto et al., 2001]. Die maximalen Plasmakonzentrationen nach oraler Aufnahme monoglukosylierter Anthocyane waren im Tierversuch nach 15 bis 120 min [Matsumoto et al., 2001, Miyazawa et al., 1999, Tsuda et al., 1999] und beim Menschen nach 60 bis 120 min [Bub et al., 2001, Cao et al., 2001, Matsumoto et al., 2001, Murkovic et al., 2000, Nielsen et al., 2003, Rechner et al., 2002] erreicht und lagen je nach verabreichter Dosis bei 13–3000 ng/ml bzw. 35–170 ng/ml.

b) Stabilität und Metabolismus

Im wässrigen Milieu liegen Anthocyane in Abhängigkeit vom pH-Wert in vier verschiedenen Formen vor, wobei je nach pH-Wert das Gleichgewicht in Richtung verschiedener Einzelstrukturen verschoben ist (Abb. 3.31). Das rot gefärbte, mesomeriestabilisierte Benzopyrylium- oder Flavylum-Kation überwiegt bei sehr niedrigen pH-Werten (pH 1–3). Dieses ist nur in sehr saurem Milieu stabil und geht mit steigendem pH-Wert durch Anlagerung eines Hydroxid-Anions an das C2-Atom in eine farblose Carbinolbase (Chromenol) über. Die chinoide Form bzw. ionische Anhydrobase entsteht bei pH-Werten >6 durch Wasserabspaltung, was zu einer Farbvertiefung nach Purpur führt. Bei pH-Werten oberhalb von 7 kann sich die tiefblau gefärbte, ionische Anhydrobase durch Ringöffnung in das gelbe Chalkon umlagern. Diese Farbänderungen treten bei den einzelnen Anthocyanen bei

Theorie

unterschiedlichen pH-Werten ein [Belitz et al., 2001, Lapidot et al., 1999, Mazza et al., 1993]. In der Natur kommen Anthocyane in der Regel im moderat sauren Zellsaft als Flavyliumkation oder als Chromenol vor.

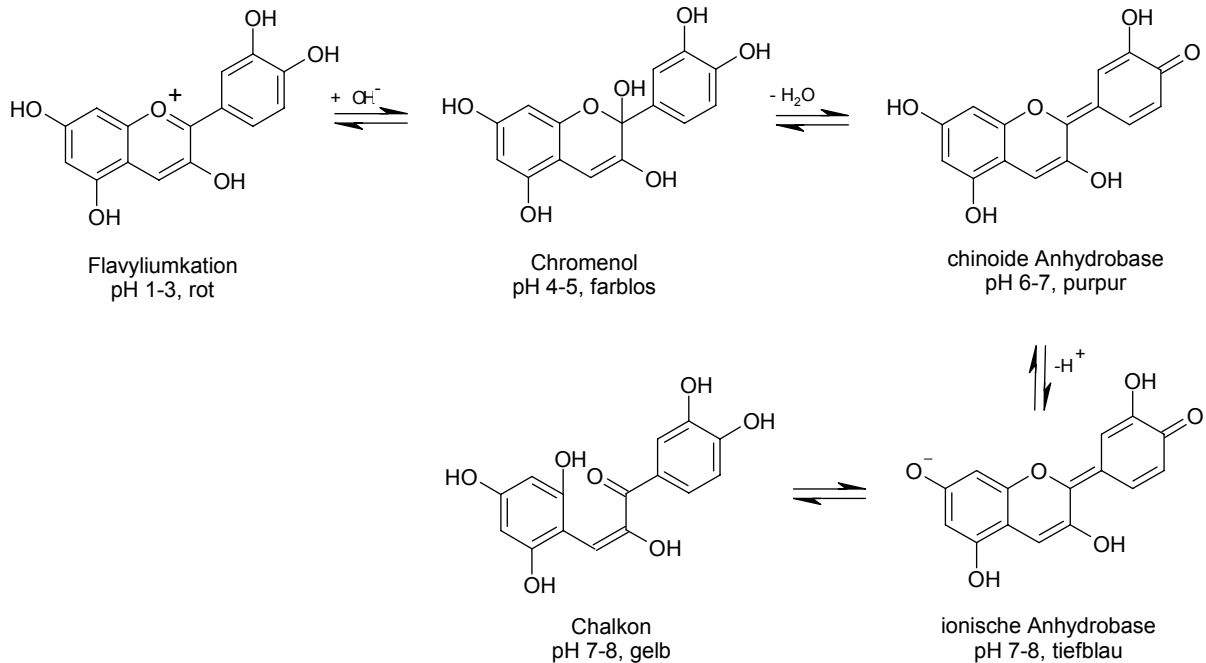


Abbildung 3.31: pH-Abhängigkeit der Struktur der Anthocyane [nach Fleschhut, 2004]

Inter- und intramolekulare Copigmentierung von Anthocyanen mit anderen Polyphenolen bewirkt neben einem Anstieg der Farbintensität (hyperchromer Effekt) und einer Verschiebung des Absorptionsmaximums zu höheren Wellenlängen (bathochromer Effekt) auch eine Stabilisierung des Moleküls. Die Substituenten am B-Ring sind ein weiterer Einflussfaktor auf die Stabilität; je mehr Hydroxy- oder Methoxy-Gruppen an 3'- bzw. 5'-Position vorliegen (bei neutralem pH-Wert), desto instabiler ist das Molekül [Fleschhut et al., 2006]. Damit zeigt sich Pelargonidin mit zwei Wasserstoffatomen am stabilsten. Des Weiteren haben in 3-Position am C-Ring gebundene Glykoside eine stabilisierende Wirkung.

Die chemische Stabilität der Anthocyane ist gering und sie zerfallen v.a. bei höheren pH-Werten. Zur Chemie des Zerfalls ist die am weitesten akzeptierte Theorie in Abbildung 3.32 dargestellt [Harper, 1968]. Nach der Ringöffnung entstehen über die Zwischenstufe des α -Diketons ein Aldehyd und eine phenolische Carbonsäure. Erst die Glykosylierung bedingt eine Stabilität des entstehenden Anthocyanins. Da der entstehende Aldehyd aus dem A-Ring des Anthocyanins hervorgeht, ist er für alle

Theorie

Aglyka identisch. Dagegen ist die aus dem B-Ring gebildete Carbonsäure für das jeweilige Anthocyanidin charakteristisch (z.B. Protocatechusäure bei Cyanidin, Syringasäure bei Malvidin).

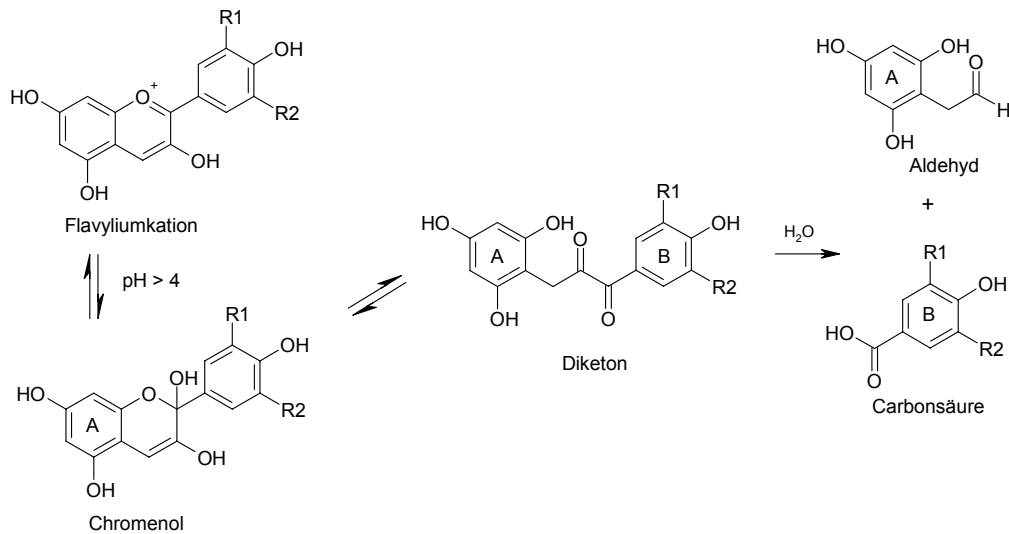


Abbildung 3.32: Zerfall-Mechanismus der Anthocyane [Harper, 1968]

Obwohl die Aufklärung der Resorptions- und Metabolisierungswege bei vielen anderen Flavonoiden sehr weit fortgeschritten ist und z.B. die Resorption von Quercetin-Glykosiden aus dem Dünndarm und über den Na^+ -abhängigen Glukosetransporter SGLT1 als intaktes Glykosid nachgewiesen wurde [Hollman et al., 1995], sind die diesbezüglichen Kenntnisse bei Anthocyanen noch sehr begrenzt. Eine Aufnahme erfolgt wahrscheinlich als Glykosid schon über die Magenwand (Ratte) und kann nach sehr kurzer Zeit im Plasma nachgewiesen werden [Talavera et al., 2003]. Die Resorptionsrate ist dabei von den Zuckerresten abhängig, möglich erscheint auch eine Resorption über Glukose-Transporter [Watzl et al., 2002]. Fleschhut zeigte, dass Anthocyane keine Phase-I-Metabolisierung durch CYP 450-abhängige Monooxygenasen erfahren und dass sie in Gegenwart von intestinalen Bakterien rasch zu phenolischen Säuren abgebaut werden. Zudem sind sie Substrate der UDP-Glucuronyltransferasen. Eine Metabolisierung erfolgte sowohl als Aglyka als auch in der Form der Monoglykoside. Es entstanden einfache Glucuronsäure-Konjugate oder gemischte Glukosid-Glucuronide. Dieser Konjugationsschritt ereignete sich nicht nur in Leber und Niere, sondern auch in Bereichen des Gastrointestinaltraktes [Fleschhut, 2004]. Die Elimination erfolgt vor allem über Galle und Urin nach einer Kinetik 1. Ordnung [Cao et al., 2001, Talavera et al., 2003]. Die höchsten Konzentrationen (orale Aufnahme) finden sich nach ca. 15-

70 min im Blutplasma und baute sich innerhalb der nächsten zwei Stunden ab [Cao et al., 2001, Murkovic, 2002, Murkovic et al., 2000]. Messungen der ausgeschiedenen Metabolite in Exkrementen lassen auf eine mäßige Absorption von nur etwa 5 % schließen; damit ergibt sich eine Bioverfügbarkeit von 0,05 – 1,2% [Murkovic, 2002]. Die Konzentration im Plasma nach Aufnahme einer größeren Menge Anthocyane über Saft, Rotwein oder Früchte bewegt sich im nano- bis mikromolaren Bereich [Watzl et al., 2002, Kay et al., 2004]. Trotz dieser geringen Bioverfügbarkeit werden im Plasma biologisch aktive Konzentrationen erreicht. Die Resorption scheint als Glykosid direkt zu erfolgen und keine Spaltung zu Aglykon und Zucker zu benötigen; es wurden nach Aufnahme von ca. 1,5 g Anthocyanidinen 100 µg der Glykoside pro Liter Plasma gemessen [Cao et al., 1999, Netzel et al., 2001]. Sulfat-Konjugate [Felgines et al., 2003], Glucuronsäure-Konjugate [Bub et al., 2001] und atypische Peaks [Cao et al., 2001], bei denen es sich um weitere Metabolite handelt, wurden im Urin gefunden. Einige wurden als Fragmente der B- und C-Ringe der Anthocyane identifiziert [Cao et al., 2001, Fleschhut et al., 2006]. Bei Gabe von Cyanidin-3-Glucosid tauchte in der Galle das methylierte Derivat Peonidin-3-Glucosid auf [Talavera et al., 2003]. Untersuchungen mit Ileostomie-Patienten, die 300 g eines anthocyanreichen Blaubeerextrakts aufnahmen (7834 mg/kg Anthocyane), zeigten, dass 28-85% der aufgenommenen Anthocyane, abhängig vom enthaltenen Zucker, den Ileostomabeutel unverändert erreichten (Arabinoside > Galactoside > Glykoside) [Kahle et al., 2006]. Gleichzeitige Alkoholaufnahme (z.B. bei Genuss von anthocyanreichem Rotwein) behindert die Resorption nicht [Bub et al., 2001, Murkovic, 2002].

c) Toxizität

Anthocyane sind als Lebensmittelzusatzstoff (E 163) zugelassen. Das Joint Expert Committee of Food Additives der WHO kommt in seiner toxikologischen Bewertung zu dem Schluss, dass Anthocyane eine nur sehr geringe Toxizität besitzen. Darum wurden keine Mengenbeschränkung und kein ADI-Wert festgelegt, sondern nur eine Empfehlung ausgesprochen (empfohlener ADI-Wert von 0-2,5 mg/kg KG für den Menschen) [WHO, 1982]. Dieser beruht auf einer Untersuchung mit einem Traubenhautextrakt (3% Anthocyane) an Ratten, in der bei einer Konzentration von 7500 mg/kg KG keine toxischen Effekte auftraten.

Eine einmalige orale Gabe von 2 g/kg KG (Ratte) bzw. 3 g/kg KG (Hund) Beerensextrakt (enthielt zu 36% Anthocyane) ergab keinerlei Toxizität. Auch bei Einsatz von 0,125-0,5 g/kg KG an Ratten und 0,8-3,2 g/kg KG an Hunden über 6 Monate fanden sich keinerlei Hinweise auf Toxizität, Mutagenität oder Teratogenität [Morazzoni et al., 1996].

Untersuchungen zur akuten Toxizität eines anthocyanreichen Beerensextrakts („OptiBerry“) nach OECD-Richtlinien für Chemikaliertestung führten zu dem Schluss, dass der orale LD₅₀-Wert über 5 g/kg KG (Ratte) liegen muss, da bei dieser getesteten Konzentration keine akuten toxischen Wirkungen auftraten. Eine dermale Applikation von 2 g/kg KG (Ratte) führte ebenfalls zu keiner akuten toxischen Wirkung. Versuche mit Kaninchen resultierten in einer Einstufung des Extraktes als leicht irritierend für die Haut und minimal irritierend für das Auge [Bagchi et al., 2006].

d) Physiologische Wirkungen

Viele Einzelexperimente und Studien, sowohl *in vivo* als auch *in vitro*, weisen auf eine Vielzahl positiver Wirkungen am Menschen bei erhöhter Anthocyanaufnahme hin [Hou, 2003a; Kong et al., 2003; Zafra-Stone et al., 2007]. Zu nennen sind vor allem starke antioxidative Wirkungen, Verbesserung der kognitiven Wahrnehmung (Nachtsehen, altersbedingte Defizite in neuralen/motorischen Parametern), Schutz vor und positive Wirkungen bei Herz-Kreislauf-Erkrankungen, antibakterielle und antivirale sowie antiinflammatorische (COX- und iNOS-Hemmung) und anti-karzinogene (anti-mutagene, wachstumshemmende, apoptoseinduzierende) Wirkungen.

Diese positiven Wirkungen sind dabei durch die Struktur beeinflusst: der Effekt ist umso größer, je mehr Hydroxy-Gruppen das Aglykon und je weniger Zuckersubstituenten das Anthocyanin besitzt.

Die im Vergleich zu α -Tocopherol stärkere antioxidative Wirkung der Anthocyane (TEAC 2,9 - 4,4 mmol/L Trolox) beruht auf der Abgabe von Wasserstoffatomen aus den phenolischen Hydroxylgruppen an radikalische ROS und damit auf der Unterbrechung von Radikalkettenreaktion [Lemanska et al., 2001]. Diese Fähigkeit hängt von der Anzahl, vor allem aber von der Position der Hydroxylgruppen ab: Benachbarte (vicinale) Hydroxylgruppen zeigen eine bessere antioxidative Kapazität als nicht benachbarte. Phenolische Verbindungen mit entsprechender struktureller Voraussetzung sind außerdem in der Lage zum Elektronentransfer und/ oder Chelate

mit Übergangsmetallionen zu bilden [Lindberg-Madsen et al., 2000; Kong et al., 2003; Melidou et al., 2005]. Der Transfer von Elektronen oder Wasserstoffatomen von den Hydroxylgruppen auf die freien Radikale konnte in vitro auch für Anthocyane gezeigt werden [Satue-Gracia, 1997; Wang et al., 1997; Pool-Zobel et al., 1999; Noda et al., 2002; Garcia-Alonso et al., 2005]. Sie können somit freie Radikale abfangen und das entstehende Anthocyan-Radikal durch das konjugierte Doppelbindungssystem stabilisieren und so die Radikal-Kettenreaktionen unterbrechen. Neben der Chelatbildung sind die Anthocyane zudem in der Lage, durch Copigmentierung einen „Ascorbinsäure-Copigment-Metall-Anthocyanin-Komplex“ zu bilden, der die Ascorbinsäure vor Oxidation durch z.B. Kupfer-Ionen schützen kann [Sarma et al., 1997; Kojo, 2004].

In verschiedenen in vitro-Experimenten konnte die ROS-abfangende Eigenschaft der Anthocyane bestätigt werden. Es konnte gezeigt werden, dass Anthocyan-Pigmente in liposomalen die Bildung von MDA nach UVB-Bestrahlung reduzieren [Tsuda et al., 1996], acylierte Anthocyane wirkten als nicht-kompetitiver Inhibitor auf die enzymatische und nicht-enzymatische Oxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren, häufigem Bestandteil von Zellmembranen [Narayan et al., 1999]. In Tierversuchen an Ratten bewirkten Anthocyan-3-glukoside bei Vitamin E-depletierten und damit für oxidativen Stress anfälligen Ratten einen signifikanten Anstieg der antioxidativen Kapazität im Plasma, sowie einen Rückgang der Hydroperoxid- und 8-Oxo-deoxyguanosin-Konzentration in der Leber [Ramirez-Tortosa et al., 2001]. Weitere Studien mit Ratten, die unter oxidativem Stress litten, konnten die Wirkung von Anthocyanen als potente Antioxidantien bestätigen [Rice-Evans et al., 1995; Tsuda et al., 1998; Tsuda et al., 2000]. Der Schutz von LDL vor Oxidation durch hydrophile Antioxidantien wie Anthocyane unterliegt keiner direkten Wechselwirkung mit dem LDL, sondern erklärt sich durch einen synergistischen Effekt, indem sie lipophile Antioxidantien (z.B. α -Tocopheryloxylradikal) wieder regenerieren. Dabei zeigen Anthocyane eine höhere Wirkpotenz als Vitamin C [Cao et al., 1997; Murkovic, 2002].

Untersuchungen an Menschen zeigen dagegen ein widersprüchliches Bild. Nach Aufnahme von anthocyanreichen Fruchtsaft fanden Castilla et al. einen Rückgang der LDL-Oxidation [Castilla et al., 2006], Netzel et al. einen Anstieg der antioxidativen Kapazität im Serum [Netzel et al., 2002]. Dies widerspricht jedoch Ergebnissen von Young et al., die in einem ähnlichen Versuch [Young et al., 1999] und

Untersuchungen mit Rotwein [Arendt et al., 2005] keine Erhöhung der antioxidativen Kapazität finden konnten.

Da Anthocyane außer den erwähnten antioxidativen Eigenschaften auch potente Hemmstoffe des Tumorzell-Wachstums [Zafra-Stone et al., 2007] und der in der Karzinogenese involvierten Enzyme iNOS und COX-II darstellen [Liang et al., 1999], ist ihre genaue Rolle bei der Karzinogenese von großem Interesse und wird intensiv beforscht. In der Krebsentstehung können sie an verschiedenen Zeitpunkten wirksam werden [Hou, 2003a]:

- a) anti-Initiation (antimutagene und antioxidative Effekte)
- b) anti-Promotion (anti-inflammatorische (COX, NO) und antitransformatorische Effekte (ROS, MAP-Kinasen, AP-1), Wachstumshemmung (EGFR [Meiers et al., 2001])
- c) anti-Progression (Apoptoseinduktion [Hou et al., 2003b], Metastasierungsinhibition)

e) Adverse Effekte

Flavonoide und Polyphenole haben reaktive, funktionelle Gruppen, so dass nicht nur antioxidative und protektive, sondern auch adverse Effekte, z.B. prooxidatives Verhalten, zu erwarten sind.

In Bezug auf adverse Effekte gibt es für die Anthocyane *in vivo* derzeit keine Hinweise und *in vitro* kaum Untersuchungen. Satué-Gracia et al. bestimmten in *in vitro*-Untersuchungen den Einfluss von Anthocyanen (10, 20, 30 μM) auf die Bildung von konjugierten Dienen und Hexenal in einem Sojabohnen-Liposomen-System, in dem die Oxidation durch Kupfer katalysiert ablief. Bei Verwendung von 3 μM bzw. 10 μM Kupfer zeigten Delphinidin und Cyanidin, sowie Pelargonidin bei 3 μM Kupfer keine Inhibition der konjugierten Diene- und Hexenal-Bildung, sondern waren inaktiv oder sogar prooxidativ. Diese Wirkung wurde bei Malvidin dagegen nicht beobachtet und mit seiner geringeren Polarität begründet [Satue-Gracia, 1997]. Auch in einem Linolsäure-Emulsionssystem, in dem mittels HPLC die MDA-Bildung (kupferkatalysiert) gemessen wurde, zeigten Anthocyane prooxidative Wirkungen, die allerdings in relativ hohen Konzentrationsbereichen lagen (200-3000 μM) [Fukumoto et al., 2000].

Andere Flavonoide, wie z.B. Quercetin, sind gut auf ihre adverse Wirkung untersucht [Metodiowa et al., 1999]. Die relevanten Strukturmerkmale sind dort die freie Hydroxylgruppe an C3, die Doppelbindung an C2-C3 mit der Ketogruppe an C4 und auch die Catecholgruppe im B-Ring. Aufgrund ihrer Fähigkeit zum Redox-Cycling zeigen sie unerwünschte Eigenschaften, die in erster Linie auf ihre elektrophilen Metabolisierungsprodukte (Chinone, Methide) zurückzuführen sind. Es besteht die Möglichkeit erhöhter ROS-Produktion oder einer Adduktbildung mit Glutathion.

Die Anthocyane kommen in vielen einheimischen Obstsorten, speziell in einigen Beerenfrüchten und auch Südfrüchten in zum Teil beträchtlichen Mengen vor. Zudem beinhalten zahlreiche industriell gefertigte Produkte diese Flavonoide, da sie zugelassene Farbstoffe (E163) sind. Abhängig von den Ernährungsgewohnheiten ist deshalb mit der Aufnahme von mehreren mg Anthocyanen pro Tag zu rechnen. Insbesondere im Hinblick auf Nahrungs-Supplemente sind Anthocyane zudem als wahre „Antioxidantienwunder“ in der Diskussion. Sie werden als eine zentrale mögliche Erklärung für das „French Paradoxon“ herangezogen; allerdings sind sie als Hauptträger der protektiven Eigenschaften des Rotweins sehr umstritten, da sie schlecht bioverfügbar sind [Bub et al., 2001]. Zur Abschätzung der Relevanz bereits durchgeführter Untersuchungen zum Schutz vor oxidativem Stress sollten weitere Daten zu Bioverfügbarkeit und Metabolismus erhoben werden.

f) Humane Interventionsstudien mit anthocyanhaltigen Produkten

Es wurden bereits einige Humanstudien mit gesunden Probanden und anthocyanhaltigen Lebensmitteln/Produkten wie Säften, Extrakten, Zubereitungen und Rotwein durchgeführt. Ein Vergleich der Studien mit unterschiedlichsten Design ist dabei sehr schwierig, da sich das Probandenkollektiv teilweise stark voneinander unterscheidet (Anzahl, Geschlecht, Alter), die Interventionsdauer (einmalig, mehrere Tage/Wochen) und –art (Menge, Matrix) variiert und die Biomarker mit verschiedensten Methoden bestimmt wurden. Einheitlich ist die Beobachtung, dass keine ungünstigen Effekte in den Studien auftraten. Die meisten Interventionen befassten sich mit der Bioverfügbarkeit der Anthocyane [Miyazawa et al., 1999; Bub et al., 2001; Cao et al., 2001; Matsumoto et al., 2001; Rechner et al., 2002; Nielsen et al., 2003; Kay et al., 2004]. Diese ist insgesamt gesehen sehr gering. Manach et al., die die Daten von 13 humanen Interventionsstudien zusammengefasst haben, kommen zu dem Ergebnis, dass durch 50 mg Aglyka-Äquivalent nach einer Zeit von $T_{\max} = 1,5 \pm 0,4$ h, eine Konzentration von $C_{\max} = 0,03 \pm 0,02$ $\mu\text{mol/L}$ im Plasma

erreicht wird und dass nur $0,4 \pm 0,3\%$ der Ausgangssubstanzen im Urin nachgewiesen werden [Manach et al., 2005]. Nur wenige Arbeitsgruppen hatten mehr als drei Endpunkte in ihre Untersuchungen einbezogen. Es erscheint jedoch von großer Bedeutung eine Kombination von Biomarkern, sowie verschiedene Verfahren für denselben Endpunkt zu verwenden, um aussagekräftige Rückschlüsse auf eine mögliche protektive Wirkung im Organismus machen zu können. Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass in vivo von anthocyanhaltigen Produkten positive Effekte auf den menschlichen Körper ausgehen [Nigdikar et al., 1998; Young et al., 1999; Leighton et al., 1999; Mazza et al., 2002; Netzel et al., 2002; Bub et al., 2003; Riso et al., 2005; Weisel et al., 2006, Castilla et al., 2006]. Auch als Therapieansatz zur Reduktion bzw. Protektion von Zellschäden im kranken Organismus erscheint der Einsatz von Anthocyanen damit sinnvoll [Castilla et al., 2006].

g) Interventionsstudien mit HD-Patienten und Antioxidantien

HD-Patienten leiden aufgrund ihrer Pathogenese und der Dialysebehandlung an erhöhtem oxidativen Stress [Maisonneuve et al. 1999; Stenvinkel et al. 2003]. Antioxidantien wie die Vitamine C und E, Folsäure und α -Liponsäure sowie Acetylcystein (ACC) werden zur Behandlung der gesteigerten oxidativen Belastung eingesetzt (Tab. 3.10).

Tabelle 3.10: Interventionsstudien zum Einfluss von Antioxidantien auf den oxidativen Stress bei HD-Patienten; DHA: Docosahexaensäure (ω -3-Fettsäure)

Biomarker	Veränderung	Antioxidans	Literatur
GPx, SOD	↑	Vit. E	Giray et al. 2003
TBARS	↓		
Homocystein, MDA, LDL-Oxidation	↓	Vit. E, Folsäure	Bayes et al. 2001
DNA-Strangbrüche	↓	Vit. E	Kan et al. 2002, Domenici et al. 2005
MDA, GSH, SOD	↓ ↔	Vit. E	Cristol et al. 1997
MDA	↓	Vit. E	Roob et al. 2000
LDL-Oxidation	↑	Vit. E	Ohkawa et al. 2004
Proteincarbonyle, F2-Isoprosrane, CRP	↔	Vit. E, DHA	Himmelfarb et al. 2007
GSH, GSR, GPx, MDA	↑ ↓	Vit. A, C, E	Hassan et al. 1995
Proteincarbonyle, GSH-Status, CRP	↔	Vit. C	Fumeron et al. 2005
Hämatokrit, Ferritin, EPO-Dosis	↔	Vit. C	Taji et al. 2004
NF- κ B	↓	α -Liponsäure	Hofmann et al. 1999
Homocystein, Blutdruck	↓	ACC	Scholze et al. 2004

Aus diesen Daten ist erkennbar, dass Vitamin E bei HD-Patienten zuverlässig die LPO (MDA, TBARS) und DNA-Strangbrüche reduziert. Außerdem verringert es, ähnlich wie ACC, den Homocysteinspiegel, einen Risikofaktor für Herz- und Gefäßerkrankungen. Für Glutathion, glutathion-assoziierte Enzyme und die SOD sind die Aussagen uneinheitlich und bezüglich der Proteincarbonyle ergab sich kein Effekt. Okhawa et al. berichten sogar von einem negativen Einfluss von Vitamin E auf die LDL-Oxidation bei HD-Patienten, wohingegen bei Gesunden ein Rückgang der LDL-Oxidation beobachtet wurde [Ohkawa et al. 2004]. Bezüglich des Einflusses von Vitamin E auf die NF- κ B DNA- Bindungsaktivität wurden bisher keine

Untersuchungen durchgeführt. Mit Vitamin C als Supplement zeigten sich keine Auswirkungen auf verschiedene Biomarker.

Interventionsstudien mit Flavonoiden bei HD-Patienten sind in Tabelle 3.11 zusammengefasst. Ihre geringe Zahl und die unterschiedlichen untersuchten Biomarker erschweren jedoch den Vergleich mit anderen Antioxidantien.

Tabelle 3.11: Interventionsstudien mit Flavonoiden bei HD-Patienten

Biomarker	Veränderung	Flavonoid(Quelle)	Literatur
Überlebensrate	↑	Olivenöl	Facchini et al. 2003
TEAC	↑	konz. roter	Castilla et al. 2006
LDL Oxidation	↓	Traubensaft	
Thiolstatus	↑	Silibinin/Silymarin	Dietzmann et al. 2002

Patienten mit Diabetes Mellitus leiden, ähnlich wie HD-Patienten, unter gesteigertem oxidativem Stress. Bei Interventionen mit Aroniasaft (200 ml, entspricht 1 g an Anthocyanen) oder Granatapfelsaft (40 g, entspricht 350 mg an Polyphenolen) beobachtete man bei Diabetikern einen Rückgang der Blutzucker- und Cholesterinkonzentrationen während der Saftaufnahme [Simeonov et al., 2002; Esmailzadeh et al., 2004]. Untersuchungen von Giammarioli et al. ergaben eine Reduktion des MDA-Gehaltes und einen Anstieg des Glutathionspiegels nach 3-monatiger Aufnahme von 700-1000 g Obst und Gemüse [Giammarioli et al., 2004].

3.4. Mehrfruchtsaft

3.4.1. Polyphenolprofil von Mehrfruchtsäften

Im Folgenden soll kurz auf das Polyphenolprofil der einzelnen Fruchtsorten für den in dieser Arbeit verwendeten Mehrfruchtsaft eingegangen werden. In Tabelle 3.13 sind die Gehalte an gefundenen Anthocyanen aufgelistet.

Rote Trauben

Die Weintraube (*Vitis vinifera*) enthält eine Vielzahl von antioxidativ wirksamen Sekundärstoffen, wie Phenolcarbonsäuren, Anthocyane (1,5 g/kg), Flavonole (20-40 mg/kg), Flavan-3-ole (20-100 mg/kg, Strukturen siehe 3.3.4.1), einschliesslich der Proanthocyanidine (Procyanidine B1-B4), Ellagsäure und Ellagtannine, Stilbene (50-100 µg/g Resveratrol u.a.) [De la Lastra et al., 2005, Eder et al., 2002], sowie kleine Mengen an Carotinoiden. Die Hydroxyzimtsäuren, wie p-Cumarsäure, Kaffeesäure und Ferulasäure, sowie deren Ester mit der Weinsäure (Cutarsäure, Caftarsäure und Fertarsäure) sind die wichtigsten antioxidativen Inhaltsstoffe. Es kommen auch noch verschiedene Abkömmlinge der Hydroxybenzoesäure in kleineren Mengen vor. Der bekannteste Vertreter ist die Gallussäure. Von besonderer Bedeutung sind die Anthocyanin-3-glykoside (vor allem von Malvidin und Delphinidin), sowie ihre acylierten Formen. Zu den Flavonoiden zählen auch die Flavonole, die frei oder an Zuckerbausteine gebunden (Flavonolglykoside) vorkommen. Die wichtigsten sind die Abkömmlinge des Quercetins. Weitere Verbindungen aus der Gruppe der Flavonole sind Myricetin und Kämpferol. Eine weitere gesundheitlich relevante Gruppe von Polyphenolen der Weintraube sind die als „Catechine“ bekannten Flavan-3-ole. Sie kommen nicht glykosidisch gebunden vor. Ihre monomeren Bausteine sind (+)-Catechin und (-)-Epicatechin. So entstehen dimere, oligomere und polymere Procyanidine, die in Weintrauben auch von geschmacklicher Bedeutung sind (Adstringenz). Besonders in Traubenkernen kommen sie in großer Menge vor und bilden das „phenolische“ Grundgerüst von Traubenkernextrakten. Resveratrol kommt in der Weintraube nicht in freier Form sondern als Glykosid vor. Es gehört zur Gruppe der Stilbene, von denen einige in der Weintraube nachweisbar sind.

Brombeeren

Über die phenolischen Inhaltsstoffe der Brombeere (*Rubus spp.*) und deren Gehalte in der frischen Frucht gibt es wenige Informationen. Es gibt weltweit viele verschiedene Brombeersorten, die sich in ihren Gehalten an phenolischen Inhaltsstoffen teilweise erheblich unterscheiden können. Sechs Klassen an pflanzlichen Polyphenolen wurden bisher in Brombeeren identifiziert [Herrmann, 1992]: Anthocyane, Hydroxyzimtsäurederivate, Hydroxybenzoesäurederivate, monomere Flavan-3-ole, Procyanidine, Flavonolderivate. Über das Vorkommen und die Identität der Anthocyane herrscht keine völlige Klarheit. Sicher identifiziert sind bisher Cyanidin-3-glukosid als Hauptanthocyan (64-221 mg/100g Frucht) sowie Cyanidin-3-rutinosid in kleineren Mengen [Mazza et al. 1993]. Es wurden zwar in verschiedenen Sorten noch andere Anthocyane nachgewiesen, konnten aber nicht eindeutig charakterisiert werden [Sapers et al., 1986, Torre et al., 1977]. Sicher ist bisher nur, dass es sich um Cyanidinderivate handelt. Es werden auch acylierte Cyanidinglykoside vermutet [Sapers et al., 1986].

Sauerkirschen

Über die phenolischen Inhaltsstoffe der Sauerkirsche (*Prunus cerasus L.*), einer Steinfrucht, und ihrer Gehalte in den frischen Kirschen gibt es ebenfalls wenige und teils gegensätzliche Informationen. Bisher wurden fünf Klassen an Polyphenolen nachgewiesen [Herrmann, 1996]: Hydroxyzimtsäurederivate, monomere Flavan-3-ole, Procyanidine, Flavonole, Anthocyane. Der Gesamtanthocyanengehalt von Süß- und Sauerkirschen wird von [Clifford, 2000] mit einer Spannweite von 50–4500 mg/kg Frischgewicht angegeben.

Schwarze Johannisbeeren

Über die phenolischen Inhaltsstoffe der schwarzen Johannisbeere (*Ribes nigrum L.*) und deren Gehalte in der frischen Frucht ist relativ wenig bekannt. Sie wird vor allem wegen ihres hohen Gehaltes an L-Ascorbinsäure geschätzt und zeichnet sich durch vergleichsweise hohe Gehalte an Polyphenolen und Anthocyanen aus. Genaue Angaben zum Gesamtphenolgehalt von frischen schwarzen Johannisbeeren konnten nicht gefunden werden. Sechs Klassen an pflanzlichen Phenolen wurden bisher in schwarzen Johannisbeeren identifiziert [Herrmann, 1997]: Anthocyane, Hydroxyzimtsäurederivate, Hydroxybenzoesäurederivate, monomere Flavan-3-ole, Procyanidine und Flavonolderivate. Die meisten Daten sind über die Anthocyane der schwarzen Johannisbeere verfügbar. Reife Beeren enthalten etwa 2500 mg/kg

Anthocyane und die Beerenhaut besteht zu mind. 2,5% des Frischgewichtes aus diesen Farbstoffen [Koeppen et al., 1977]. Cyanidin- und Delphinidin-3-Rutinosid bilden den Hauptanteil an Anthocaynen [Mazza et al. 1993]. Bei den farblosen Polyphenolen weisen die Hydroxyzimtsäurederivate, Ester mit Chinasäure und Glukose sowie Glykoside, die höchsten Gehalte auf. Die Gehalte an Hydroxybenzoesäurederivaten und Flavan-3-olen sind vergleichsweise gering. Über die Gehalte an Flavonolderivaten, Glykoside des Myricetins, Quercetins und Kaempferols, werden keine detaillierten Angaben gemacht, allerdings wird ein Gesamtflavonolgehalt von 9 mg/kg angegeben [Wildanger et al., 1973]. Über die Gehalte an Procyanidinen ist bisher kaum etwas bekannt. Wilska-Jeszka et al. geben für fünf untersuchte Sorten Gesamtgehalte an Procyanidinen von 372–619 mg/kg Frischgewicht an [Wilska-Jeszka et al., 1996].

Holunderbeeren

Die Holunderbeere (*Sambucus nigra*) ist in Europa, Nordafrika, West- und Mittelasien beheimatet. Der Holunder ist ein bis zu sieben Meter hoher Baum mit gegenständig angeordneten Blättern. Die kleinen, gelblich-weißen Blüten sind in großen, trugdoldigen, flachen Blütenständen angeordnet. Sie haben einen charakteristischen Geruch und schmecken schleimig-süß. Die getrockneten Blüten sind auch als Fliedertee bekannt. Die Beeren haben eine glänzend-schwarze bis schwarz-violette Färbung. Sie schmecken süß-säuerlich und sind nur nach Erhitzen genießbar.

In prähistorischen Stätten konnte durch den Fund von Holundersamen die frühe menschliche Nutzung dieses Baums belegt werden. In der Antike benutzte man den Holunder zum Schwarzfärben der Haare und schon Schriften dieser Zeit erwähnen ihn erstmals als Heilmittel. Hauptwirkstoffe sind ätherische Öle und Flavonoide sowie organische Säuren und Gerbstoffe [www.onmeda.de]. Die Anthocyangehalte schwanken zwischen 570 und 1005 mg/100 g Frischgewicht [Eder et al. 1996]. Cyanidin-3-Glucosid und Cyanidin-3-Sambubiosid stellen mit etwa 85-95% des Gesamtgehaltes den Hauptanteil an Anthocyanen, als Nebenbestandteile wurden Cyanidin-3-Sambubiosid-5-Glukosid und Cyanidin-3,5-Diglukosid gefunden [Mazza et al. 1993]. Als Humanmetabolite sind hauptsächlich Peonidin-3-Glukosid und -Sambubiosid sowie Peonidin-Monoglucuronide identifiziert worden [Wu et al. 2002].

3.4.2. Herstellung und Zusammensetzung des roten Mehrfruchtsaftes für die Interventionsstudie bei HD-Patienten

Der Mehrfruchtsaft der Interventionsstudien wurde in der Forschungsanstalt Geisenheim (Institut für Weinanalytik und Getränkeforschung) unter der Leitung von Prof. Dietrich hergestellt und analysiert. Er setzte sich aus rotem Traubensaft (40%), Brombeersaft (20%), Sauerkirschsafte (15%), schwarzem Johannisbeersaft (15%) und Holunderbeersaft (10%) zusammen.

Die Trauben bzw. die Beeren wurden schonend gemahlen, um den Eintrag von Bitterstoffen aus den Kernen zu vermeiden. Zudem enthalten schwarze Johannisbeeren wie die meisten Beeren verhältnismäßig große Mengen Pektin, was eine effektive Entsaftung der Maische stört. Um das Pektin zu entfernen, wurde die Maische auf 50°C erwärmt und mit Enzympräparaten versetzt, die pektinabbauende Pektinasen enthalten. Die Erwärmung war notwendig, da Pektinasen bei dieser Temperatur die höchste Aktivität besitzen. Ein speziell bei schwarzen Johannisbeeren angewandter Produktionsschritt war die Nachextraktion des Tresters mit heißem Wasser, um die Farbausbeute zu verbessern. Die Herstellung von Brombeersaft ist vergleichbar mit der Herstellung von schwarzem Johannisbeersaft allerdings ohne Nachextraktion, während bei der Herstellung von Sauerkirschsafte die Maischeerhitzung und -enzymierung entfällt. [Will et al., 2003-2005]

Für den Saft ergab sich folgende Zusammensetzung (Tab. 3.12), identifiziert und quantifiziert durch HPLC/DAD in der Forschungsanstalt Geisenheim (Geisenheim Research Center). Die Gehalte an Anthocyanen sind in Tabelle 3.13 dargestellt.

Theorie

Tab. 3.12: Analysedaten des roten Mehrfruchtsaftes

Analyse-ID (GLIMS)		6671
Datum		12.12.2005
Antioxidative Kapazität (TEAC) ber. Trolox	mmol/l	31,3
Dichte	20/20	1,05518
Brix	°	13,52
Leitfähigkeit		3810
Extrakt	g/L	143,4
zuckerfreier Extrakt	g/L	38,4
Glucose	g/L	52,7
Fructose	g/L	52,3
Saccharose	g/L	n.n.
Gesamtsäure pH 7,0 ber. Ws	g/L	12,00
Gesamtsäure pH 8,1 ber.Citronensäure	g/L	10,93
Gesamtsäure pH 8,1 ber. Äpfelsäure	g/L	11,44
pH - Wert		3,27
flüchtige Säure	g/L	0,09
L-Milchsäure	g/L	0,14
D-Milchsäure	g/L	0,09
L-Äpfelsäure	g/L	5,0
Citronensäure	g/L	4,3
Farbe 420		11,65
Farbe 520		22,72
Farbe 620		3,50
L* (Minolta) ^a		21,16
a* (Minolta) ^a		0,52
b* (Minolta) ^a		0,57
Gesamtphenole	mg/L	3478
Ascorbinsäure	mg/L	268
Calcium	mg/L	153
Kalium	mg/L	1743
Magnesium	mg/L	131

^a: CIELAB-Farbraumsystem (1976); Helligkeits-Koordinate L*: Werte von 0 = schwarz bis 100 = weiß;
 Farbkoordinaten a* (rot/grün) und b* (gelb/blau): Werte von -60 bis +60 [www.cie.co.at];
 Spectroradiometer von Fa. Minolta

Theorie

Tab. 3.13: Anthocyangehalte des roten Mehrfruchtsaftes

Anthocyan	RT (min)	mg/L
Cyanidin-3-samb-5-glc	14,58	7,5
Delphinidin-3-glc	16,36	15,5
Delphinidin-3-rut	17,05	27,7
Cyanidin-3-(2 ^G -glc-rut)	17,33	21,4
Cyanidin-3-glc	18,14	27,8
Cyanidin-3-samb	18,37	67,1
Cyanidin-3-rut	19,15	24,9
Petunidin-3-glc	19,59	6,1
Peonidin-3-glc	21,62	29,5
Malvidin-3-glc	22,52	48,4
Delphinidin-3-(6"-coumaroyl)-glc ¹	23,57	1,1
Cyanidin-3-(6"-coumaroyl)-glc ¹	24,32	2,7
Peonidin-3-acetyl-glc ¹	28,72	3,8
Malvidin-3-acetyl-glc ¹	28,96	7,7
Malvidin-3-coumaroyl-glc ¹	30,41	9,7
Summe		301,0

3.5. Testmethoden

3.5.1. Testsysteme

3.5.1.1. Zell-Linie U937

Diese Suspensions Zelllinie wurde 1974 angelegt aus einem Rippenfell-Bluterguss eines 37-jährigen Mannes mit generalisiertem diffusem histiozytischem Lymphom. U-937 ist eine von wenigen humanen Zelllinien, die noch über viele Monozyteneigenschaften entsprechend dem histiozytären Original verfügt. [Nilsson et al., 1974]

3.5.1.2. Blut (Vollblut, Plasma, Serum, isol. Lymphos)

Etwa 8% des Körpergewichts macht das Blut aus. Es besteht aus dem Blutplasma und den Blutzellen: Erythrozyten (rote Blutkörperchen), Leukozyten (weiße Blutkörperchen), Thrombozyten (Blutplättchen), dargestellt in Abbildung 3.33 [Faller et al., 1999].

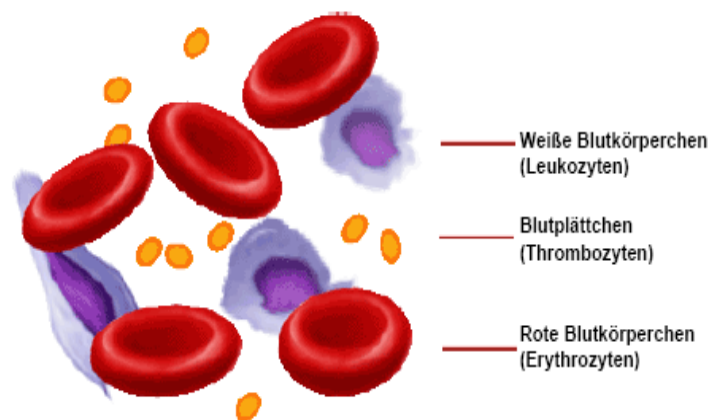


Abbildung 3.33: Blutbestandteile

Erythrozyten (4,5-5,5 Mio/ μ L Blut)

Sie entstehen im roten Knochenmark aus den kernhaltigen Stammzellen und bestehen fast ausschließlich aus Hämoglobin, welches O_2 reversibel binden kann. Sie haben eine scheibenförmige Gestalt und sind beidseitig eingedellt. Nach ca. 120

Tagen werden sie in Milz und Leber abgebaut. Ihre Hauptfunktion ist der Transport der Atemgase.

Leukozyten (4.000-8.000 / μ L Blut)

Die weißen Blutkörperchen lassen sich in die Granulozyten, die Lymphozyten und die Monozyten unterteilen. Sie bilden zusammen mit den lymphatischen Organen das Immunsystem und besitzen amöboide Eigenbeweglichkeit, mit deren Hilfe sie die Wände der Blutkapillaren durchwandern können. Ihre Bildung erfolgt ebenfalls im roten Knochenmark. Die Granulozyten unterteilen sich ihrerseits aufgrund der Anfärbbarkeit der Granula noch einmal in neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten. Sie besitzen alle einen charakteristischen, mehrfach segmentierten Kern. Die Neutrophile (60-70% der Leukozyten) sind Fresszellen der unspezifischen Immunabwehr, die Eosinophile (2-3% der Leukozyten) haben als Zellen der unspezifischen Abwehr die Aufgabe, die Antigen-Antikörper-Komplexe zu phagozytieren, während die Basophile (0,5-1% der Leukozyten) für die Auslösung allergischer Reaktionen durch Histamin und die Blutgerinnungshemmung durch Heparin verantwortlich sind. Die Lymphozyten (20-30% der Leukozyten) sind die Zellen der spezifischen Immunabwehr (zelluläre u. humorale Abwehr), deren Reifung als T-Lymphozyten im Thymus und als B-Lymphozyten im Knochenmark erfolgt. Die T-Lymphozyten stimulieren (T-Helferzellen) oder hemmen (T-Suppressorzellen) das Immunsystem und zerstören (T-Killerzellen) körpereigene virusinfizierte oder entartete Zellen in direktem Kontakt. Die B-Lymphozyten sind vor allem in die Antigenpräsentation eingebunden. Die Monozyten (4-5% der Leukozyten) verlassen nach 20-30 h das Blutgefäßsystem und bilden sich im Gewebe zu Makrophagen um. Sie stellen Zellen der unspezifischen Immunabwehr (Phagozytose u. lysosomale Verdauung) mit Beteiligung an der spezifischen Abwehr (Antigenpräsentation) dar.

Thrombozyten (150.000-350.000 / μ L Blut)

Die Blutplättchen entstehen im Knochenmark aus Riesenzellen, die als kernlose Plättchen ins Blut ausgeschwemmt werden. Ihre Aufgabe ist die Blutstillung und Auslösung der Blutgerinnung, indem sie sich bei Verletzungen an der Gefäßwand ablagern, zerfallen und dabei Enzyme freisetzen. Nach 5-10 Tagen werden sie in der Milz abgebaut.

Blutplasma/serum

Bei Plasma handelt es sich um Blut ohne Blutzellen, bei dem die Gerinnung durch Zugabe von Gerinnungshemmern (z. B. EDTA) verhindert wird. Es besteht zu 90%

aus Wasser und zu 10% aus gelösten Stoffen, von denen 70% Plasmaproteine (Albumine, α -, β -, γ -Globuline), 20% niedermolekulare Stoffe (Nahrungsstoffe, Stoffwechselprodukte, Vitamine, Spurenelemente, Hormone, Enzyme) und 10% Elektrolyte (Na-, Ca-, Cl-, K-, Mg-, PO₄-Ionen) sind. Die Hauptaufgabe des Plasmas sind Transportvorgänge und die Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Druckes. Im Unterschied zu Plasma wird Serum durch Zentrifugation von geronnenem Blut, bei dem die zellulären Bestandteile zu einem sogenannten Blutkuchen verbacken sind, gewonnen. Blutserum entspricht bis auf die verbrauchten Gerinnungsfaktoren (v.a. Fibrin und Fibrinogen) dem Blutplasma. [Dörner, 2001]

3.5.2. DNA-Schäden

Zur Detektion von DNA-Strangbrüchen wurde in dieser Arbeit die alkalische Einzelzellgelelektrophorese, auch Comet Assay genannt, herangezogen. Der Comet Assay ist zurückzuführen auf eine Beobachtung von Rydberg und Johanson, dass die Zellkerne nach Behandlung von Zellen mit ionisierender Strahlung mit zunehmender Dosis immer diffuser im Mikroskop erschienen [Rydberg et al., 1978]. Ostling und Johanson entwickelten daraus eine Technik, bei der die DNA durch Elektrophorese in Abhängigkeit von der Strahlendosis unterschiedlich weit aus dem Zellkern heraustrat [Ostling et al., 1984].

Zur Durchführung des Comet Assay werden die zu untersuchenden Zellen in ein Agarosegel eingebettet und lysiert. Anschließend wird in einer Elektrophoresekammer unter alkalischen Bedingungen die DNA denaturiert (entwunden), eine Elektrophorese durchgeführt, die Objektträger neutralisiert und die DNA mit Ethidiumbromid gefärbt (Abb. 3.34).

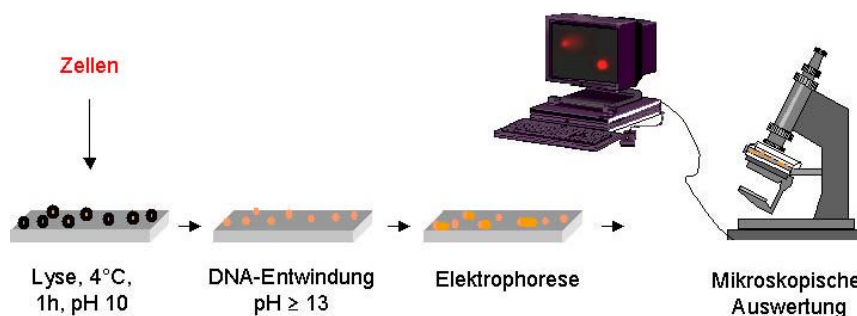


Abbildung 3.34: Durchführung des Comet Assays (schematische Darstellung)

An einem Fluoreszenzmikroskop werden die DNA-Schäden mit Hilfe einer Digitalkamera Computer-gestützt ausgewertet. Die DNA ungeschädigter Zellkerne erscheint als runder Punkt, geschädigte DNA bildet charakteristische Formen, die Kometen ähneln (Abb. 3.35) und dem Test seinen Namen gaben. Als Maß für die DNA-Strangbrüche wurde die Fluoreszenzintensität im Schweif (Maß für den prozentualen Anteil an DNA im Kometen-Schweif, „tail intensity“, TI%) verwendet.

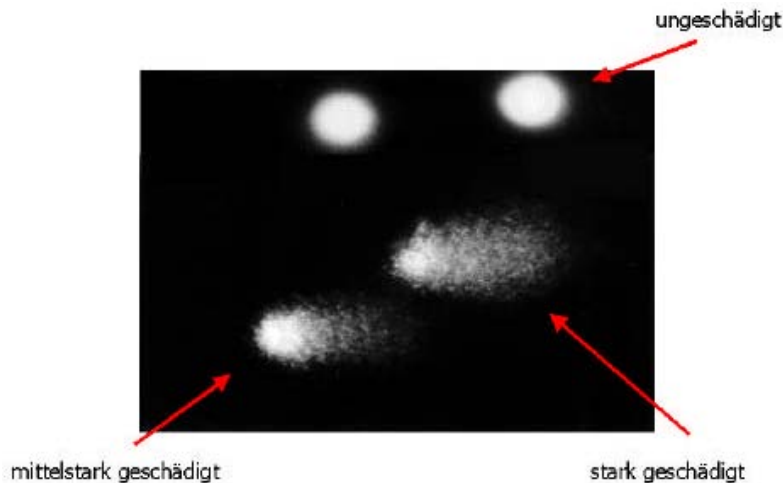


Abbildung 3.35: Beispiele für Kometen unter dem Fluoreszenzmikroskop mit unterschiedlichem Schädigungsmaß

Neben der oben beschriebenen Methode können durch Variation des pH-Wertes weitere Informationen über die Art der Strangbrüche erhalten werden [Horvathova et al., 1998]: Bei einer DNA-Denaturierung unter neutralen Bedingungen werden nur DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) erfasst. Im alkalischen Milieu dagegen (DNA liegt in Einzelsträngen vor) werden neben DSB ab einem pH-Wert von 12,1 auch Einzelstrangbrüche (SSB) und ab einem $\text{pH} \geq 13$ alkali-labile Stellen detektiert [Fairbairn et al., 1995]. Der Comet Assay wird mittlerweile überwiegend im alkalischen Milieu ($\text{pH} \geq 13$) durchgeführt [Fairbairn et al., 1995, Kassie et al., 2000, Singh et al., 1988].

Um zusätzlich eine Aussage über das Ausmaß oxidativer DNA-Schäden zu erhalten, ist es möglich, die Zellkerne in den Agarosegelen mit Reparaturenzymen wie Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (FPG) oder Endonuklease III zu behandeln. Durch die DNA-Glykosylaseaktivität werden oxidierte Basen (v.a. 8-OxoG durch FPG) sowie deren ringgeöffnete Imidazole herausgeschnitten, wobei eine Lücke verbleibt. Durch die AP-Lyaseaktivität kann nun die Entfernung des Deoxyribosephosphats erfolgen, woraus ein Strangbruch resultiert [Laval, 1996] und

zu einer Verstärkung der Schweifintensität führt (Abb. 3.36). Die Differenz aus Strangbrüchen nach Enzymbehandlung und direkten Strangbrüchen (ohne Enzymbehandlung) wird als spezifisch oxidative DNA-Schäden interpretiert [Collins, 2000].

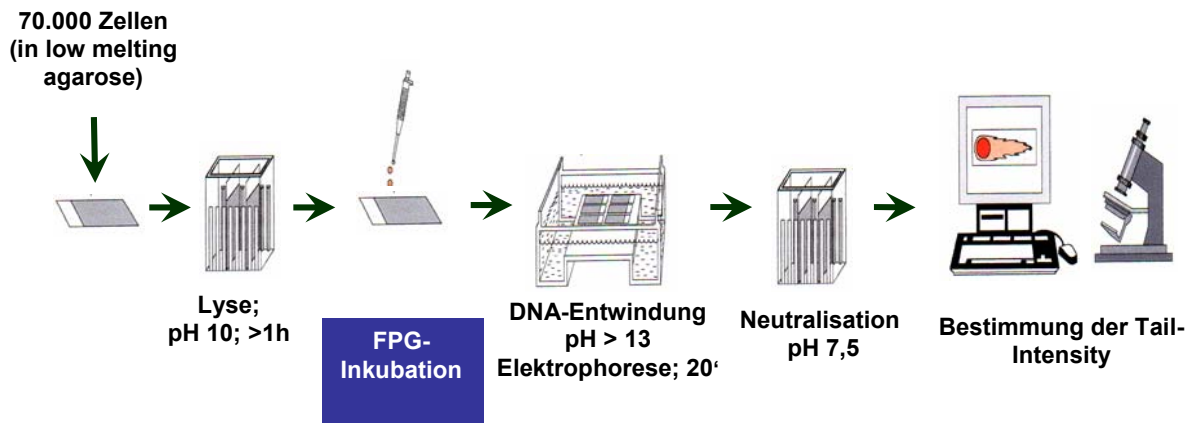


Abbildung 3.36: Durchführung des Comet Assays zur Detektion von Gesamtschäden (schematische Darstellung)

3.5.3. Glutathion

Der Glutathiongehalt in Vollblut wurde mit einem Verfahren bestimmt, das sich an die Bestimmung von Akerboom und Sies anlehnt und von Gallagher et al. modifiziert wurde [Akerboom et al., 1981; Gallagher et al., 1994]. Bei diesem Verfahren wird der Gesamtglutathiongehalt über einen kinetischen Test bestimmt, in dem GSH, GSSG und Glutathionreduktase (GSR) kontinuierlich in einer NADPH-abhängigen Reaktion 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) zum chromophoren 5-Thio-2-Nitrobenzoat (TNB) reduzieren (Abb. 3.37).

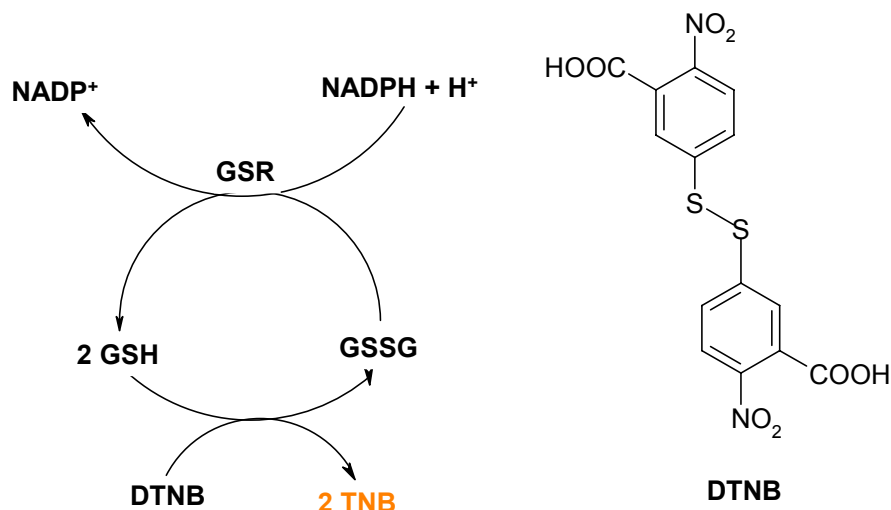


Abbildung 3.37: Schematische Darstellung der Reaktion von GSH mit DTNB

Die Bildung von TNB kann über die Extinktion bei 412 nm zeitlich verfolgt werden. Die Geschwindigkeit der TNB-Bildung, also die Extinktionszunahme in einer bestimmten Zeit, ist proportional zur tGSH-Konzentration, da alle übrigen Reaktionspartner (NADPH, GSR, DTNB) in einem deutlichen Überschuss vorhanden sind. Die Berechnung der tGSH Konzentration erfolgt durch Vergleich mit entsprechenden Standardlösungen.

Zur Messung von GSSG wird GSH mit dem Nukleophil 2-Vinylpyridin kovalent gebunden (Abb. 3.38) und anschließend die oben beschriebene Messung durchgeführt. Durch Differenzbildung werden der GSH-Anteil und der GSH-Status [%] (Quotient GSH/tGSH) berechnet.

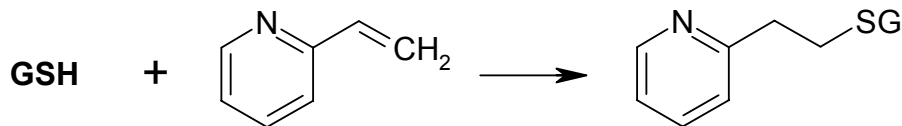


Abbildung 3.38: Derivatisierung von GSH durch Reaktion mit 2-Vinylpyridin

3.5.4. MDA

Zur Bestimmung von Malondialdehyd (MDA) als ein Marker der Lipidperoxidation wird die Thiobarbitursäurereaktion verwendet. Hierbei reagiert ein Molekül MDA mit zwei Molekülen Thiobarbitursäure unter Bildung eines pink fluoreszierenden Komplexes (Abb. 3.39).

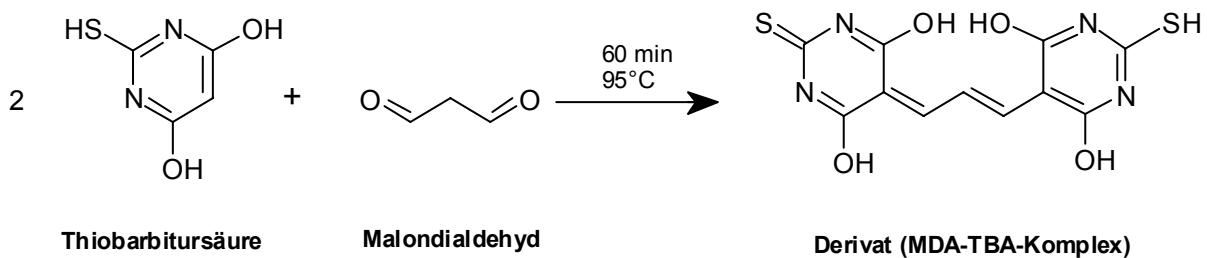


Abbildung 3.39: Derivatisierung von Malondialdehyd mit Thiobarbitursäure

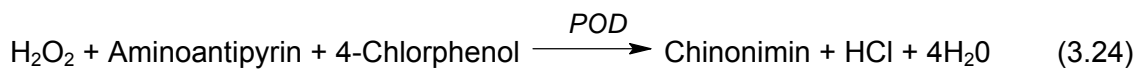
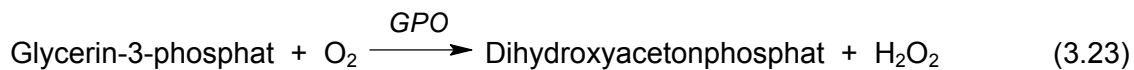
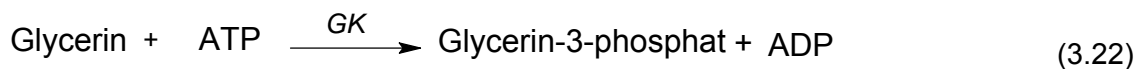
Neben MDA reagieren auch andere Verbindungen mit TBA, zusammengefasst werden sie als Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen (TBARS) bezeichnet. Zu ihnen zählen andere Aldehyde sowie Strukturen, die nicht bei der LPO entstehen, z.B. Ketone, Ketosteroide, Säuren, Ester, Zucker, Imide und Amide, u.a. [Guillen-Sans et al., 1998], so dass die fluorimetrische Bestimmung der TBARS sehr unspezifisch ist. Eine spezifische Erfassung des MDA gelingt nach flüssigkeitschromatographischer

Auftrennung (HPLC, Fluoreszenzdetektor: Anregung. 532 nm, Emission. 553 nm) [Draper et al., 1993].

Ist eine Kettenreaktion im Gange, laufen auch nach Plasmagewinnung unspezifische Reaktionen weiter. Durch Zugabe eines Antioxidans, z.B. *tert*-Butylhydroxytoluol (BHT) nach der Gewinnung werden solche Reaktionen verhindert und es wird nur der in vivo vorhandene MDA/TBARS-Gehalt gemessen [Draper et al., 1993].

3.5.5. Triglyceride

Die Triglyceride im Blutplasma werden nach enzymatischer Spaltung photometrisch bestimmt [Fossati et al., 1982]. Zunächst werden die Triglyceride zu Glycerin und freien Fettsäuren durch Lipoproteinlipase (LPL) hydrolysiert (Gl. 3.21). Danach phosphoryliert die Glycerinkinase (GK) das Glycerin zu Glycerin-3-phosphat (Gl. 3.22).



Im nächsten Schritt katalysiert die Glycerinphosphatoxidase (GPO) die Generierung von Wasserstoffperoxid aus Glycerin-3-phosphat (Gl. 3.23), welches unter der katalytischen Wirkung der Peroxidase mit 4-Aminoantipyrin und 4-Chlorphenol weiter-reagiert (Gl. 3.24; Abb. 3.40).

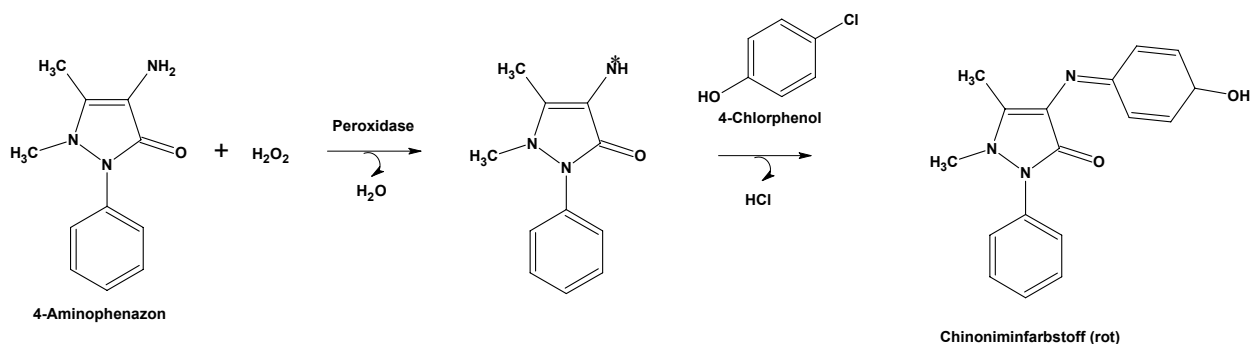


Abbildung 3.40: Endpunktbestimmung nach Trinder [Trinder, 1969]

Die Trinder-Reaktion dient als Nachweis für Triglyceride. Die Extinktion des farbigen Chinonimins ist bei $\lambda = 546 \text{ nm}$ der im Plasma enthaltenen Triglyceridmenge proportional [Trinder, 1969; Fossati et al., 1982].

3.5.6. Proteincarbonyle

Die am häufigsten verwendete Methode beruht auf der Reaktion der Proteincarbonyle mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH). Das DNPH reagiert dabei in saurer Lösung mit der Carbonylgruppe unter Bildung eines Hydrazons. Der Mechanismus der Reaktion ist in Abbildung 3.41 dargestellt.

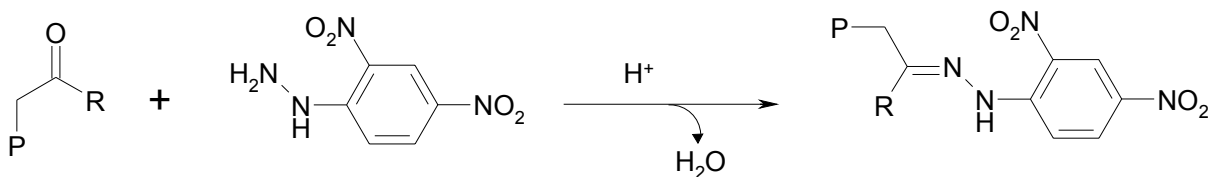


Abbildung 3.41: Mechanismus der Derivatisierung der Proteincarbonyle mit DNPH; P: Protein

Das dabei entstehende Hydrazone ist aufgrund der Dinitrophenylgruppe gelb gefärbt. Dadurch ist es möglich den Carbonylgehalt durch spektrophotometrische Messung der Absorption bei 370 nm zu bestimmen, nachdem der überschüssige Farbstoff ausgewaschen wurde [Levine et al., 1990].

3.5.7. NFκB

Die in dieser Arbeit verwendete Methode, um die DNA-Bindungsaktivität von NF-κB zu bestimmen, basiert auf dem Prinzip des ELISAs (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). NF-κB bindet hier im Gegensatz zu dem üblichen ELISA nicht an immobilisierte Antikörper, sondern an immobilisierte doppelsträngige Oligonukleotide mit der NF-κB-Bindungssequenz. Erfasst wurden in dieser Arbeit nur DNA-gebundene p65-Untereinheiten. Bevor die DNA-Bindungsaktivität des Transkriptionsfaktors bestimmt werden kann, muss zuerst durch eine spezielle Aufarbeitung der Nuklearextrakt gewonnen werden, der alle Transkriptionsfaktoren aus dem Zellkern enthält. Dieser lässt sich unter Zusatz von Proteaseinhibitoren für sechs Monate stabil bei -80°C lagern. Nach Proteingehaltsbestimmung des Kernextraktes erfolgt die Durchführung des ELISAs. Das folgende Schaubild (Abb. 3.42) gibt einen Überblick über die beim ELISA notwendigen Arbeitsschritte.

Theorie

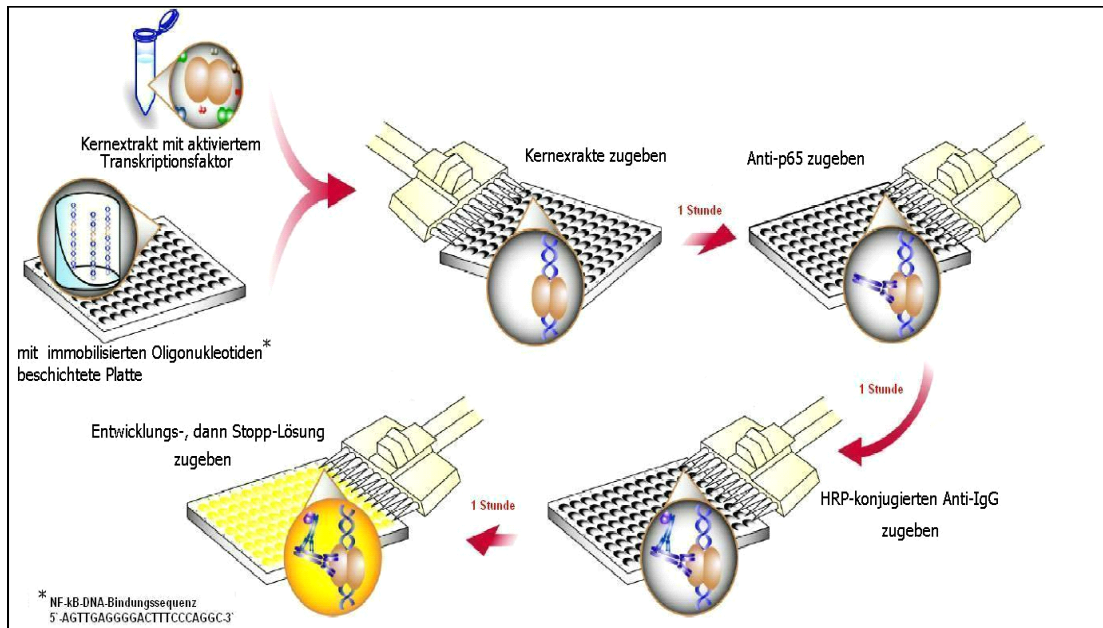


Abbildung 3.42: Arbeitsschema des ELISA [modifiziert nach Fa. Active Motif]

Die Detektion erfolgt durch eine Absorptionsmessung, die dabei verwendete Farbreaktion (Abb. 3.43) beruht auf der Umwandlung eines Farbstoffes durch die Meerrettichperoxidase. Sie läuft nach folgendem Schema ab:

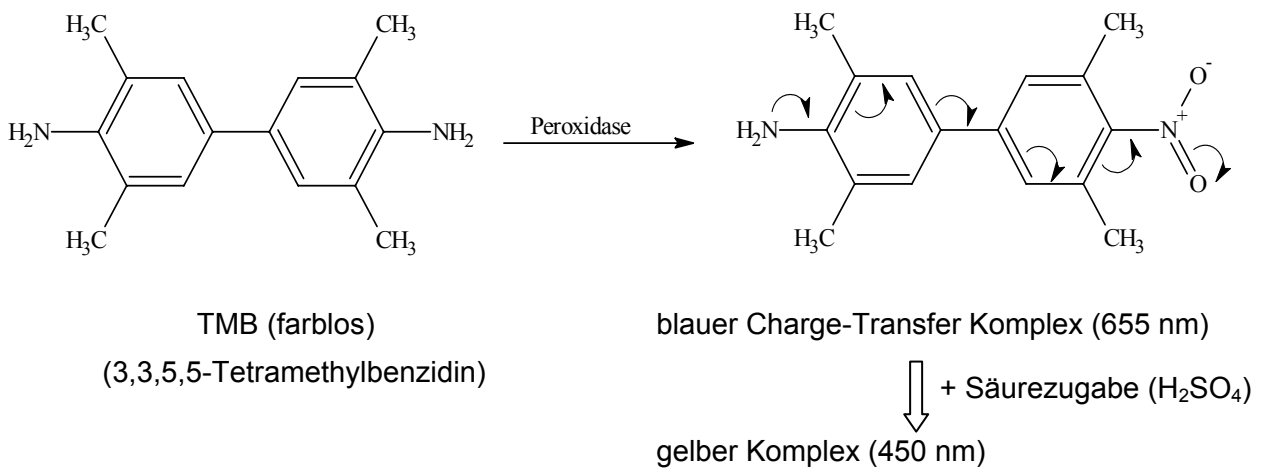


Abbildung 3.43: Farbreaktion des ELISA

3.5.8. TEAC

Zur Untersuchung der Wirksamkeit von Antioxidantien gibt es eine Reihe von Tests, die es ermöglichen, Aussagen über die Effektivität der einzelnen antioxidativ wirksamen Substanzen zu machen. Diese zellfreien Tests basieren auf der Generierung eines meist farbigen, stabilen, langlebigen Radikals, welches im Verlauf des Assays abgefangen oder durch Anwesenheit des Antioxidans verzögert gebildet wird. Der TEAC-Test (Trolox equivalent antioxidative capacity) [Miller et al., 1993, Re et al., 1999] wurde in der vorliegenden Arbeit zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität von Blutplasma und verschiedenen Fruchtsäften eingesetzt. Er beruht auf der Generierung des stabilen ABTS-Radikals durch die Oxidation von 2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonat) (Abb. 3.44):

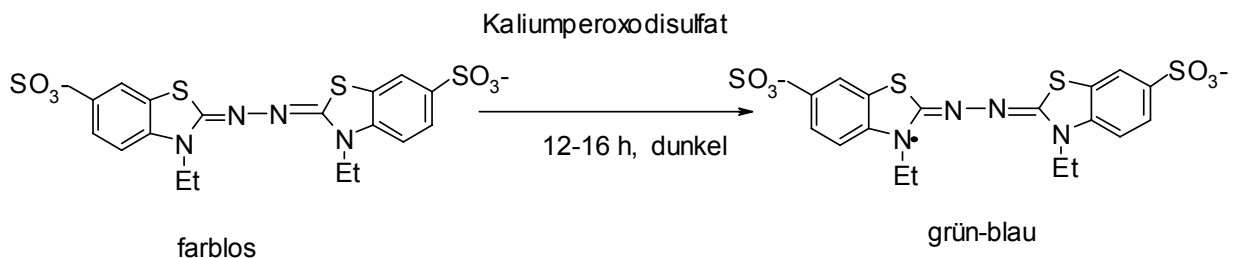


Abbildung 3.44: Oxidation von ABTS

Die Generierung dieses langlebigen Radikals kann auf zwei Wegen erfolgen. ABTS kann mit Metmyoglobin in einer Pufferlösung gemischt werden, zum Starten der Reaktion wird anschließend H_2O_2 hinzu gegeben [Miller et al., 1993]. Alternativ kann ABTS zusammen mit Kaliumperoxodisulfat ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) in Wasser gelöst werden [Re et al., 1999].

Das ABTS-Kation hat drei Absorptionsbanden mit Maxima bei 645, 734 und 815 nm. Zur Bestimmung des TEAC-Wertes wird dieses zum Antioxidans gegeben. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass nur die Fähigkeit zum Abfangen des Radikals beobachtet wird. Bei früheren Tests wurde ein langlebiges Radikal erst in Gegenwart der Antioxidantien generiert. Dies kann zu einer Überschätzung der antioxidativen Kapazität der jeweiligen Substanzen führen, da bei diesen Assays zusätzlich die Inhibition der Radikalbildungsreaktion erfasst wird. So kommt es dazu, dass auch bei Substanzen, die eigentlich nicht in der Lage sind, Radikale abzufangen, eine antioxidative Kapazität festgestellt wurde (z.B. KCN) [Van den Berg et al., 1999].

Beim TEAC-Test wird Trolox, ein wasserlösliches Vitamin E-Analogon, als Vergleichssubstanz verwendet. Der TEAC-Wert gibt an, welche Trolox-Konzentration

[mM] nötig ist, um dieselbe Wirksamkeit zu erreichen wie eine Lösung der Konzentration 1 mM (Reinsubstanzen) oder 1 mg/ml (Mischungen) der untersuchten Probe [Pellegrini et al., 1998].

Während des Messzeitraums von 6 min. finden sowohl schnelle als auch langsame Radikalabfangreaktionen statt. Zur Standardisierung wurde ein einheitlicher Zeitpunkt gewählt, um die einzelnen Antioxidantien miteinander vergleichen zu können [Re et al., 1999].

3.5.9. Harnsäure

Das wasserlösliche Antioxidanz Harnsäure wurde photometrisch im Blutplasma bestimmt [Mohanty et al., 1997], das durch Zentrifugation gewonnen wurde. Hierbei wurde die Harnsäure mit dem Enzym Urikase zu Allantoin und H_2O_2 umgesetzt (Abb. 3.45).

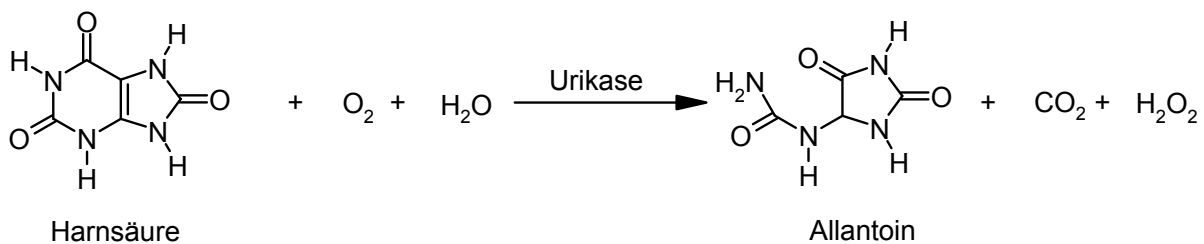


Abbildung 3.45: Urikase-vermittelte Umwandlung von Harnsäure zu Allantoin

Das H_2O_2 reagiert danach in einer stöchiometrischen Reaktion (1:1) in Gegenwart des Enzyms Meerrettich-Peroxidase mit 10-acetyl-3,7-Dihydroxyphenoxazine (Amplex Red Reagent, Fa. Invitrogen) zu einem rot fluoreszierenden Oxidationsprodukt, Resorufin (Abb. 3.46), dessen Absorption bei 560 nm gemessen wird.

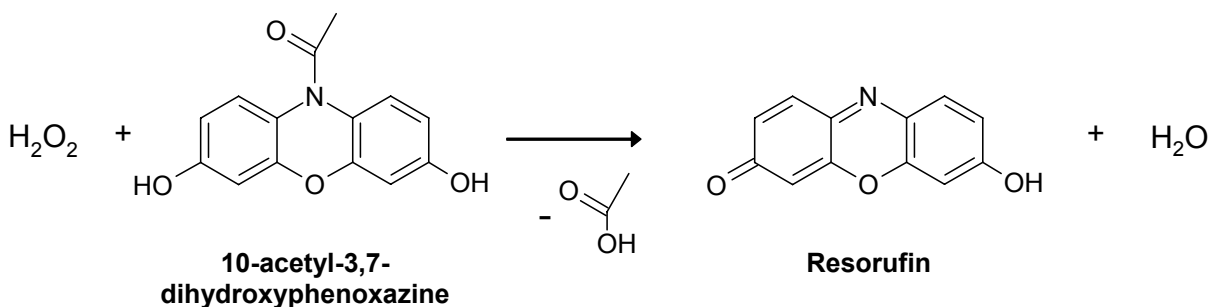


Abbildung 3.46: Farbreaktion der Harnsäurebestimmung

3.5.10. Anthocyanbestimmung in Blutserum mit HPLC

Zur Identifizierung der gelösten Anthocyane mussten zuerst die Feststoffe mittels Koagulation des entnommen Blutes in einer Serum-Monovette und anschliessender Zentrifugation abgetrennt werden.

Aus dem so gewonnenen Serum wurden störende gelöste Stoffe durch eine Festphasenextraktion (solid phase extraction, SPE) abgetrennt [Mazza et al. 2002]. Danach erfolgte eine Auftrennung der einzelnen Anthocyane mittels Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography, HPLC). Alle Bearbeitungsschritte nach der Serum-Gewinnung wurden von Herrn M. Ackermann an der TU Würzburg (siehe 4.1.2.2) durchgeführt.

4. Material und Methoden

4.1. Durchgeführte Untersuchungen

4.1.1. Vergleich von verschiedenen Eisenpräparationen

4.1.1.1. In vitro-Untersuchungen

a) Zell-Linie U937

Diese Suspensions-Zelllinie wurde 1974 angelegt aus einem Rippenfell-Bluterguss eines 37-jährigen Mannes mit generalisiertem diffusem histiozytischem Lymphom. U-937 ist eine von wenigen humanen Zelllinien, die noch über viele Monozyteneigenschaften entsprechend dem histiozytären Original verfügen [Nilsson et al., 1974].

Kultivierung der Zellen:

Die Kultivierung der Suspensionszell-Linie U-937 erfolgt in 500 ml Kulturflaschen unter sterilen Bedingungen im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von 80%. Als Medium wurde RPMI 1640 +L Glutamine mit einem Zusatz FKS und Antibiotika (Penicillin-Streptomycin) verwendet. Alle Arbeiten erfolgen unter der Sterilbank. Alle Lösungen für den Zellkontakt und die Inkubation waren autoklaviert und alle verwendeten Materialien wurden zuvor mit 70% Ethanol desinfiziert. [Lindl, 2000]

Mediumwechsel und Passagieren:

Die Zellsuspension wurde in sterile 50-ml PP-Röhrchen überführt und bei RT und 200 x g für 5min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in frischem N-Medium resuspendiert und wieder in die Flasche gefüllt.

Zum Passagieren wurden 49ml frisches N-Medium in einer großen Kulturflasche vorgelegt und 1ml Zellsuspension dazupipettiert. [Lindl, 2000]

Präparationen:

Aus den drei Eisenmedikamenten Ferrlecit[®], CosmoFer[®] und Venofer[®], sowie FeCl₃ wurden mit physiologischer Kochsalzlösung effektive Eisen-Konzentrationen von 100 µg/ml und 10 µg/ml hergestellt. Blindproben wurden mit reiner NaCl-Lösung (0.9 %) versetzt.

Material und Methoden

Inkubation und Aufarbeitung:

U937 Zellen (4 Mio) wurden mit der Eisenverbindung 15 bzw. 120 min in 1 mL PBS bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 50 µl Inkubat für die Bestimmung der Zellviabilität und der (oxidativen) DNA-Schäden eingesetzt. Zur MDA-Bestimmung wurde das Inkubat (950 µL) zentrifugiert (350 x g), der Überstand verworfen, das Zellpellet in 400µL BHT-Lösung resuspendiert, mit Ultraschall behandelt, schockgefroren und bis zur Protein- und MDA-Bestimmung bei -80°C gelagert.

Als Biomarker wurden der Comet Assay (4.3.1.) und die Malondialdehydbestimmung (4.3.3.) genutzt.

b) Für die Untersuchungen mit isolierten **Lymphozyten und Vollblut** wurde gesunden Probanden Blut entnommen und anschließend mit verschiedenen Eisen-Präparationen inkubiert. Die Blutentnahmen erfolgten in EDTA-Monovetten. Die Konzentrationen der Verbindungen im Inkubationsansatz (berechnet als elementares Eisen) betragen 1, 10 und 100 µg/mL. Der Konzentrationsbereich wurde in Anlehnung an eine theoretische Maximalkonzentration (10 µg/mL) gewählt, die in vivo bei Verteilung einer 60 mg Dosis ausschließlich in Blut (6 L) erreicht werden kann. Blindproben wurden mit reiner NaCl-Lösung (0.9 %) versetzt.

Isolierte Lymphozyten:

Präparationen: Ferrlecit[®], CosmoFer[®] und Venofer[®], wasserfreies Fe(III)-Chlorid.

Inkubation und Aufarbeitung: Primäre humane Lymphozyten (2 Mio Zellen, isoliert mittels Dichtegradientenzentrifugation, 4.2.2.4) wurden direkt nach Gewinnung mit der Eisenverbindung in 0,5 mL 0,9%-iger NaCl-Lösung bei 37°C für 5-60 min inkubiert. Anschließend wurden 50 µL Inkubat für die Bestimmung der DNA-Schäden eingesetzt. 400 µL Inkubat wurden zentrifugiert (250xg), und 190 µL des zellfreien Überstandes mit 10 µL BHT-Lösung versetzt, und bei -80°C bis zur MDA-Bestimmung gelagert.

Vollblut:

Präparationen: Ferrlecit[®], CosmoFer[®] und Venofer[®]

Inkubationsbedingungen: 900 µL Vollblut wurden mit 100 µL der Eisenverbindung (gelöst in 0,9%-iger NaCl) bei 37°C für 15-120 min inkubiert. Anschließend wurden 50 µL Inkubat für den Comet Assay eingesetzt. Aus 950 µL Inkubat wurde Plasma

gewonnen, dieses mit BHT-Lösung versetzt und bei -80°C bis zur MDA-Bestimmung gelagert.

Als Biomarker wurden der Comet Assay (4.3.1.) und die Malondialdehydbestimmung (4.3.3.) genutzt.

4.1.1.2. HD-Patienten

Die vorgenommenen Untersuchungen wurden an fünf Patienten mit deren Einverständnis auf der Dialysestation der medizinischen Klinik III des Westpfalzkrankenhauses Kaiserslautern durchgeführt. Die Blutentnahmen erfolgten in EDTA-Monovetten. Ausgewählte Parameter sind in Tabelle 4.1 dargestellt.

Auswahlkriterien:

- Stabiler Gesundheitszustand
(die detaillierten Ausschlusskriterien sind in Anhang 11.3.1 aufgelistet)
- Nichtraucher
- Normale Essgewohnheiten

Tabelle 4.1: Ausgewählte Parameter der Untersuchungen bei Ferrlecit®-Infusion (5 Patienten)

Patient	Geschlecht	Alter	BMI	Diabetes	iv Eisen (pro Woche)
1	m	45	29,55	nein	1x 62,5 mg
2	w	82	29,01	ja	1x 62,5 mg
3	w	79	30,12	nein	1x 62,5 mg
4	m	78	23,36	ja	1x 62,5 mg
5	m	57	23,04	nein	3x 62,5 mg

Die Untersuchungen erfolgten einmalig und je nach Patient wurde zu verschiedenen Zeiten Blut abgenommen:

- A)** 1h vor HD-Ende: Direkt vor Beginn der Eisengabe
- B)** 30 min vor HD-Ende: Direkt nach Ende der Eisengabe
- C)** 20min vor HD-Ende: 10 min nach Ende der Eisengabe
- D)** Direkt vor HD-Ende: 30 min nach Ende der Eisengabe

Bei den ersten 3 Patienten erfolgte die Blutentnahme zu den Zeitpunkten **A)** und **B)**, bei den Patienten 4 und 5 waren es die Zeiten **A)**, **C)** und **D)**.

Es wurde das Eisen-Medikament Ferrlecit® verwendet, Als Biomarker wurden Comet Assay (4.3.1), Glutathionspiegel/-status (4.3.2) und Malondialdehyd (4.3.3) genutzt.

4.1.2. Interventionsstudie mit rotem Mischfruchtsaft

4.1.2.1. Interventionsstudie

Voruntersuchungen zur Wirksamkeit des Saftes wurden mit zwei HD-Patienten am Westpfalzkrankenhaus in Kaiserslautern durchgeführt und beinhalteten ein verkürztes Interventionsschema (2 bzw. 3 Wochen Run-in ohne Saft, 4 Wochen Saftaufnahme; 0,2l/Tag). Die Blutentnahmen erfolgten einmal wöchentlich unmittelbar vor und nach der HD. Der für die Voruntersuchung verwendete rote Mehrfruchtsaft stammte aus einer Charge der vorausgegangenen Studie „Untersuchungen zur antioxidativen Wirkung von flavonoid-/polyphenolreichen Mischfruchtsäften bei Probanden“ [Weisel et al., 2006].

Auf der Basis dieser Voruntersuchungen und der bereits durchgeführten Probandenstudie [Weisel et al., 2006] wurde die Studie mit mindestens 20 HD-Patienten (3 Wochen Run-in, 4 Wochen Saftaufnahme, 3 Wochen Wash-out) konzipiert. Die Blutabnahme erfolgt einmal pro Woche zu Beginn der HD.

Als Biomarker dienten DNA-Schädigung (Comet Assay, siehe 4.3.1), Glutathionspiegel/-status (siehe 4.3.2) Lipidperoxidation (Malondialdehyd, siehe 4.3.3) und Proteinoxidation (Proteincarbonyle, siehe 4.3.5). Die Analysen der Blutproben erfolgten nach Abschluss der Interventionsstudie patientenweise, d. h. Messung 1: Patient X: Wochen 1-10 usw. Damit wurde gewährleistet, dass methodische Schwankungen der jeweiligen Bestimmung, die auftreten können, wenn die Messungen der Werte der einzelnen Wochen an verschiedenen Tagen erfolgt (siehe Inter-Assay-Variationskoeffizient, 4.4.2), in den Hintergrund traten.

Für die Studie (Ethikvotum Nr. 837.361.02 (3579)) wurden ausschließlich Patienten unter Berücksichtigung folgender Kriterien am Westpfalzkrankenhaus, Medizinische Klinik III und am Kuratorium für Dialyse und Nierentransplantation e.V. (KfH) in Kaiserslautern rekrutiert:

- Stabiler Gesundheitszustand
(die detaillierten Ausschlusskriterien sind in Anhang 11.3.1, Daten bezüglich der Grund- und Begleiterkrankungen, klinischer Monatswerte, Medikation und die Ernährungsprotokolle sind in den Anhängen 11.4.1 – 11.4.4 aufgeführt)
- Nichtraucher
- Normale Essgewohnheiten

Material und Methoden

Eine Zusammenfassung ausgewählter Parameter der Studienteilnehmer zeigt die Tabelle 4.3. Der Body Mass Index (BMI) berechnet sich aus der Körpermasse, geteilt durch die Körpergröße im Quadrat [kg/m^2].

Tabelle 4.2: Ausgewählte Parameter der Studienteilnehmer

Patient	Geschlecht	Alter	BMI	Diabetes	iv Eisen (pro Woche)	Dialysemembran
1 (A)	m	60	23,72	nein	-	Cellulose Acetat
2 (B)	m	45	29,55	nein	1x 62,5 mg	Triacetat
3 (C)	w	60	23,9	nein	-	Polysulfon
4 (D)	m	75	28,52	ja	1x 62,5 mg	Polysulfon
5 (E)	m	57	23,04	nein	3x 62,5 mg	Triacetat
6 (F)	m	53	30,37	nein	2x 62,5 mg	Polysulfon
7 (G)	w	69	21,8	nein	-	Polysulfon
8 (H)	m	72	25,6	ja	1x 62,5 mg	Polysulfon
9 (I)	m	70	27,17	ja	1x 62,5 mg	Triacetat
10 (J)	m	79	25,26	nein	-	Triacetat
11 (K)	w	79	30,12	nein	1x 62,5 mg	Polysulfon
12 (L)	m	77	28,41	nein	1x 62,5 mg	Polyamid
13 (N)	w	73	36,55	ja	1x 62,5 mg	Polysulfon
14 (P)	w	48	22,85	nein	-	Polyethylenglycol
15 (Q)	m	21	20,91	nein	2x 40 mg	Polyamid
16 (R)	m	62	24,34	nein	1x 40 mg	Polyamid
17 (S)	m	46	22,64	nein	-	Polyamid
18 (T)	m	52	26,96	nein	1x 62,5 mg	Polysulfon
19 (U)	w	47	29,02	nein	1x 40 mg	Polyamid
20 (X)	m	52	24,86	nein	1x 40 mg jede 2. Woche	Polyamid
21 (Y)	w	56	21,28	nein	1x 40 mg	Polyamid

Der Durchführungszeitraum der Studie war 11.01.2006 bis 28.12.2006 (Anhang 11.3.2). Der zehnwöchige Studienverlauf gliederte sich jeweils in drei Phasen (Abb. 4.1): Woche 1-3 als Run-in-Phase (R), in der sich, bedingt durch die vorgeschriebene Diät, die individuellen Variationen bei den Messwerten reduzieren sollen; Woche 4-7 als Saftaufnahme-Phase (S) und Woche 8-10 als Wash-out-Phase (W). Während der vierwöchigen Saftaufnahme-Phase konsumierten die Probanden täglich eine Saftmenge von 200 mL in zwei gleichen Portionen. Dabei wurde darauf geachtet, dass eine der beiden Saftportionen etwa eine Stunde vor Dialysebeginn aufgenommen wird, da nach etwa einer Stunde die höchste Anthocyankonzentration im Blutplasma zu erwarten ist [Kay et al. 2004].

Material und Methoden

Teilnehmer	Woche 1-3	Woche 4-7	Woche 8-10
21 „stabile“ Patienten	Run-in (R)	Saftaufnahme (S)	Wash-out (W)

Abb. 4.1: Studiendesign

Die Patienten wurden angehalten ihre Ernährungsgewohnheiten beizubehalten, jedoch auf die Aufnahme von Supplementen (z.B. Vitamine) und Nahrungsmitteln mit einem hohen Gehalt an Anthocyanen (z.B. rote Beeren und daraus hergestellte Produkte) zu verzichten. Dazu erhielten sie eine Liste mit Ernährungsvorgaben (siehe Anhang 11.3.3) und einen Terminplan zur Orientierung (siehe Anhang 11.3.4). Die Patienten mussten jede Woche am Tag vor der Blutabnahme (bei Nachtschichtpatienten am Tag der Blutentnahme) ein Ernährungsprotokoll ausfüllen. Um einen möglichst reibungslosen Ablauf für die Patienten zu gewährleisten, wurden ihnen ausführliche Informationsunterlagen mit zu vermeidenden Lebensmitteln, ein Ablaufplan und Formblätter zum Eintragen des Gesundheitszustandes, des Ernährungsprotokolls und der Saftverträglichkeit ausgehändigt. Der für die Interventionsstudie verwendete Saft wurde am 07.12.2005 an der Getränkeforschungsanstalt Geisenheim hergestellt und abgefüllt.

Es wurden folgende Biomarker verwendet:

- DNA-Schädigung (Comet Assay, 4.3.1) in Vollblut
- Glutathionspiegel/-status (4.3.2) in Vollblut
- Lipidperoxidation (Malondialdehyd, 4.3.3) in Plasma; Analyse der Patienten A - J von N. Ruppel [Ruppel, 2006], der Patienten P - Y von V. Blatz [Blatz, 2007].
- Proteinoxidation (Proteincarbonyle, 4.3.5) in Plasma; Analyse der Patienten A - J von N. Ruppel [Ruppel, 2006].
- antioxidative Kapazität (TEAC, 4.3.7) in Plasma; Analyse der Patienten P - Y von V. Blatz [Blatz, 2007].
- Triglyceride (4.3.4) in Plasma; Analyse der Patienten A - J von N. Ruppel [Ruppel, 2006], der Patienten P - Y von V. Blatz [Blatz, 2007].
- Harnsäure (4.3.8) in Plasma
- NF-κB DNA-Bindungsaktivität (4.3.6) in isolierten Lymphozyten; Analyse der Patienten P - Y von V. Blatz [Blatz, 2007].

Des Weiteren fand in Kooperation mit Herrn Matthias Ackermann (Doktorand im Arbeitskreis Prof. Schreier) vom Lehrstuhl für Lebensmittelchemie der TU Würzburg eine Untersuchung (HPLC/UV-Detektor) bezüglich der sich im Blutserum der HD-Patienten befindlichen Anthocyane statt (4.3.9). Herr Ackermann erhielt Serumproben der Patienten (siehe 4.2.1.2) und sollte untersuchen, ob die Anthocyankonzentration im Blut der Patienten während der Saftaufnahme-Phase der Studie ansteigt.

4.1.2.2. Vergleich der antioxidativen Kapazität des Studiensaftes mit anderen Fruchtsäften

Für eine Einordnung der antioxidativen Kapazität des Studiensaftes wurde ein Vergleich mit 14 käuflich erwerbenden Fruchtsäften durchgeführt. Diese stammten aus Supermärkten, Reformhäusern und Apotheken. Als Marker wurde der TEAC verwendet.

4.2. Gewinnung und Aufarbeitung der Blutproben

Geräte und Verbrauchsmaterialien

- Mikroskop: Auflicht (Zeiss), mit 10fach-Objektiv (Phasenkontrasteinrichtung)
- Zentrifugen: Heraeus Instruments Biofuge fresco
 Sigma 3-1
- Biofreezer: MDF-U6086S (Sanyo)
- Multipette: Eppendorf, Abimed
- Pipettierhilfe: Pipettus-Akku (Technomara)
- Wasserbad: Julabo SW-20C
- Hämozytometer: Neubauer-Zählkammer
- Kryoröhrchen steril, PP-Röhrchen 15 ml, 50 mL steril, 1,5 bzw. 2,2 mL
 Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen (Greiner, Sarstedt)
- Spritzen, Kanülen (Braun)
- EDTA – Monovetten (Sarstedt)
- Serum – Monovetten (Sarstedt)

Material und Methoden

Chemikalien und Lösungen:

Medium: RPMI 1640 mit L-Glutamin (Gibco)

Zusätze: 5 mL Penicillin/Streptomycin (Gibco/Invitrogen:

10.000 units/mL Penicillin G Natrium;

10.000 units/mL Streptomycin-sulfat)

- EDTA, NaCl, KCl, NaOH, KH_2PO_4 , Methanol, jeweils p.A.-Qualität (Merck)

- Na_2HPO_4 , p.A. (Riedel-de-Häen)

- Ethanol, p.A.; HEPES (Roth)

- Histopaque[®] -1077 (Sigma-Aldrich)

- t-Butylhydroxytoluol (BHT)-Lösung: 1%ig in Ethanol (w/v)

Gebrauchslösung: 0,05 %ig in aqua bidest.

- 5-Sulfosalicylsäure (5-SSA) 10%ig: 100 g 5-SSA in 1 L aqua bidest.

Lagerung bei 4°C

- PBS (Stammlösung 10x):

- 90 g NaCl

- 7,26 g Na_2HPO_4

- 2,1 g KH_2PO_4

mit aqua bidest. auf 1L auffüllen; pH 7,2-7,4

vor Gebrauch 1/10 verdünnen und steril

autoklavieren

4.2.1. Blutentnahme

4.2.1.1. Blutmengen für die Untersuchung der Eisenpräparationen

Bei den HD-Patienten wurden 3 ml Blut pro Messzeitpunkt entnommen:

Benötigte Blutmenge bei Patient 1 :

- Comet Assay: 10 x 100 µl Vollblut
- Glutathion: 4 x 300 µl Vollblut
- MDA: 10* x 50 µl Plasma => 500 µl Vollblut bei Pat 1
*zur Optimierung der MDA-Bestimmung

Benötigte Blutmenge bei den Patienten 2 und 3:

- Comet Assay: 5 x 100 µl Vollblut
- Glutathion: 4 x 300 µl Vollblut
- MDA: 5 x 50 µl Plasma => 250 µl Vollblut

Benötigte Blutmenge bei den Patienten 4 und 5:

- Comet Assay: 1 x 200 µl Vollblut
- Glutathion: 4 x 300 µl Vollblut
- MDA: 3 x 50 µl Plasma => 150 µl Vollblut

Die Blutentnahmen erfolgten durch das Pflegepersonal des Westpfalzkrankenhauses Kaiserslautern.

Für die in vitro-Untersuchungen in Vollblut und die Isolierung/Verwendung von Lymphozyten erfolgten die Blutentnahmen je nach Bedarf bei gesunden Probanden (max. 3 Monovetten, dies entspricht 27 ml Vollblut) durch qualifiziertes Personal.

4.2.1.2. Blutmengen für die Saftstudie

1. Glutathionstatus:

4 x 100 µl* => 400 µl Vollblut (Kryoröhrchen)

2. Comet-Assay:

Einfachbestimmung (100 Zellen ohne FPG, 200 Zellen mit FPG)

=> 50 µl Vollblut (1,5 ml Reaktionsgefäß)

3. MDA-Bestimmung:

80 µl Plasma (4 x 20 µl)*

=> 200 µl Vollblut (1,5 ml Reaktionsgefäß mit
Schraubverschluss)

4. Proteincarbonyl:

800 µl Plasma (8 x 100 µl)*

=> 2 ml Vollblut (2,2 ml Reaktionsgefäß)

5. Harnsäurebestimmung:

80 µl Plasma (4 x 20 µl)*

=> 175 µl Vollblut (1,5 ml Reaktionsgefäß)

6. TEAC-Bestimmung:

80 µl proteinfreies Plasma (4 x 20 µl)*

=> 175 µl Vollblut (1,5 ml Reaktionsgefäß)

7. NfκB – Status:

3 Mio Lymphozyten (Doppelbestimmung)

=> 4 ml Vollblut (1,5 ml Reaktionsgefäß)

8. Anthocyananalytik:

1,5 ml Serum => 3 ml Vollblut (2,2 ml Reaktionsgefäß)

→ **10 ml Vollblut**

*: 3fach-Bestimmung + Rückstellprobe

Die Blutabnahmen erfolgten durch qualifiziertes Pflegepersonal der jeweiligen Einrichtung kurz vor Beginn der Dialyse. Den Patienten wurde 6,5 mL Blut in eine EDTA-Monovette und 3,5 ml Blut in eine Serum-Monovette abgenommen.

4.2.2. Bearbeitung der Blutproben nach der Entnahme

4.2.2.1. Vollblut

Für den Comet Assay wurden aus den EDTA-Monovetten 50 μ L Blut in 1,5 mL Reaktionsgefäße pipettiert und bis zur weiteren Aufarbeitung (siehe 4.3.1) auf Eis gelagert.

Für die Bestimmung von GSH und GSSG wurden in Kryoröhrchen 0,4 mL 10% SSA zur Proteinfällung vorgelegt und bis zur Blutentnahme bei 4°C gekühlt. Pro Probe wurden 100 μ L frisch entnommenes Blut in jedes vorbereitete Kryoröhrchen gegeben, kurz vermischt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren.

4.2.2.2. Plasma

Für die Gewinnung von Plasma erfolgte eine Zentrifugation (5 min, 300 x g, RT) von 2 mL Blut aus der EDTA-Monovette in 2,2 mL Reaktionsgefäßen. Das überstehende Plasma wurde vorsichtig in die vorbereiteten, gekühlten Reaktionsgefäße überführt (siehe 4.2.1.2.). Die Proben für die Malondialdehydbestimmung wurden mit dem Antioxidationsmittel tert-Butylhydroxytoluol (BHT, 0,05%) versetzt, bei den TEAC – Proben wurden die Proteine mit 10%iger 5-SSA (1:1) gefällt und zentrifugiert (10.000 x g, 4°C, 10 min). Das Plasma für die Bestimmungen der Proteincarbonyle, der Triglyceride und des Harnsäuregehaltes blieben unbehandelt. Die Proben konnten nun bis zur weiteren Bearbeitung bei -80°C aufbewahrt werden.

4.2.2.3. Serum

Für die Gewinnung von Serum erfolgte eine Zentrifugation (5 min, 300 x g, RT) der Serum – Monovette, das Serum (etwa 1,5 ml) wurde anschließend in 2,2 mL Reaktionsgefäße pipettiert und bei -80°C gelagert.

4.2.2.4. Isolierung von peripheren mononuklearen Blutzellen (PBMCs)

Das nach 4.2.1.2 gewonnene Vollblut wurde bis zur Aufarbeitung im Wasserbad bei 37°C aufbewahrt. Die Isolierung der PBMCs erfolgte mittels Gradientenzentrifugation [Sigma-Aldrich; Boyum, 1968].

In einem 15 mL-Zentrifugenröhrchen wurde pro Proband je 7 mL Histopaque[®] vorgelegt, auf Raumtemperatur (abgedunkelt) erwärmen lassen und vorsichtig mit 7

mL Blut überschichtet. Es wurde 25 min bei 400 x g (RT) ohne Bremse zentrifugiert. Danach waren vier Schichten im Röhrchen erkennbar (Abb. 4.2).

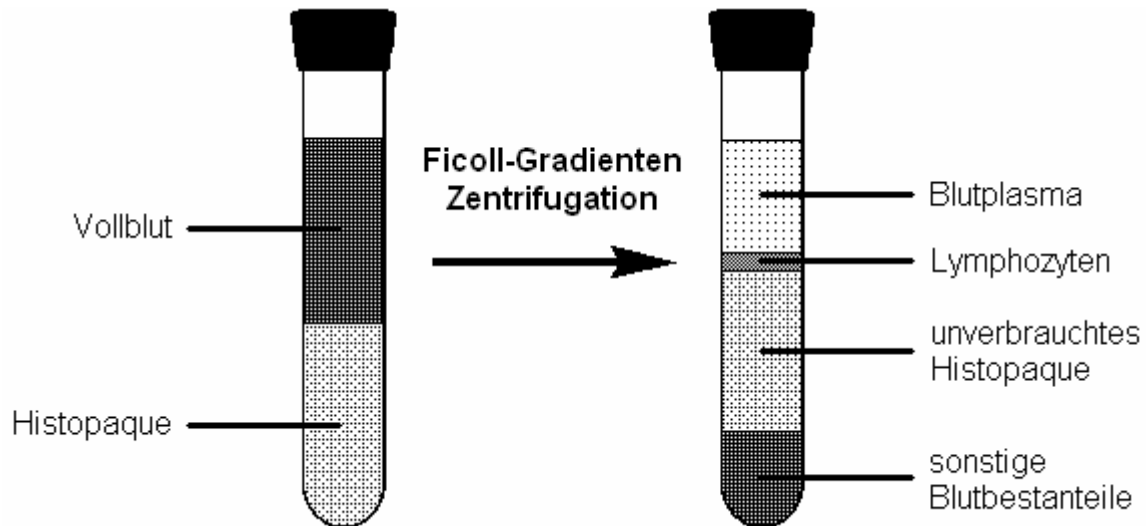


Abb. 4.2: Ficoll-Gradientenzentrifugation zur Lymphozyten-Gewinnung aus Vollblut

Die dünne, trübe, Lymphozyten enthaltende Schicht wurde mit Hilfe einer Pasteurpipette abgenommen, in 10 mL temperiertes N-Medium in einem 15 mL-Reaktionsröhrchen überführt und resuspendiert. Die Suspension wurde bei 250 x g (RT, mit Bremse, 10 min) zentrifugiert und der Überstand über dem Pellet verworfen. Das Pellet wurde in 6 mL N-Medium resuspendiert und erneut bei 250 x g (RT, 10 min, mit Bremse) zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut entfernt, das Pellet mit 1 mL N-Medium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt.

Die aus der Gradientenbildung erhaltene Schicht aus mononukleären Zellen stellte eigentlich ein Gemisch verschiedener Zelltypen dar. Der Hersteller gibt aber in seiner Produktbeschreibung einen Mindestgehalt von 80% Lymphozyten an. Der Rest bestand aus Monozyten.

4.2.2.5. Bestimmung der Zellzahl mittels Hämozytometer (Neubauer – Zählkammer)

Als Erstes wurde die Zählkammer-Oberfläche mit 70%igem Ethanol vorsichtig gereinigt, dann ein Deckglas leicht angefeuchtet, auf die Zählkammer gelegt und zur Haftung leicht angedrückt. Die Pipette mit 20 µl der Lymphozyten-Suspension

Material und Methoden

(mindestens 10^5 Zellen) wurde an die Kante der Zählkammer gelegt und langsam soweit entleert, dass die Zählkammer komplett gefüllt, aber nicht überfüllt war.

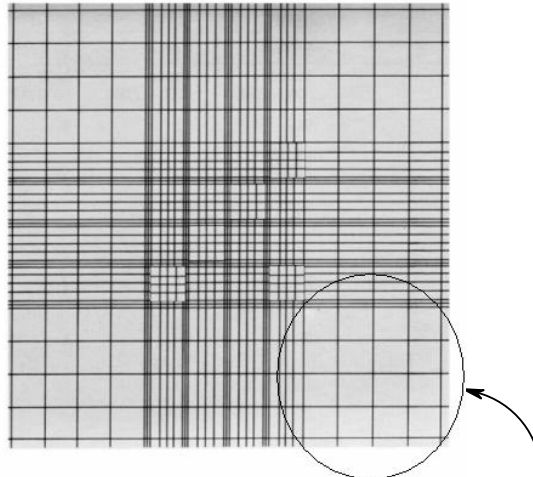


Abb. 4.3: Neubauer-Zählkammer [Lindl, 2000]

Zur Zellzahlbestimmung erfolgte nun das Auszählen der vier äußeren großen „16er-Quadrate“ (Zellen auf den Linien nur einmal zählen!). Nach der Multiplikation des Mittelwertes der vier Quadrate mit 10^4 erhielt man die Zellkonzentration (Zellen/ml).

4.2.2.6. Bestimmung der Zellviabilität

Mittels Trypanblauausschluss-Test können lebende von toten Zellen unterschieden und so die Lebendzellzahl bzw. Viabilität bestimmt werden. Hierfür wurden in einem Mikroreaktionsgefäß ein Aliquot Zellsuspension mit einem Aliquot Trypanblau-Lösung gemischt und in die Zählkammer gebracht. Aufgrund der permeablen Membran von geschädigten Zellen lagert sich der Farbstoff in diese ein, sie erscheinen blau gefärbt. Lebende Zellen erscheinen im Mikroskop hell leuchtend. Die Viabilität ergibt sich aus dem Verhältnis der intakten, viablen Zellen zur Gesamtzellzahl und wird in % angegeben. [Lindl, 2000]

4.2.2.7. Bearbeitung der Lymphozyten als Kontrollen für den Comet Assay

Nach der Bestimmung der Zellzahl wurden die Lymphozyten in Aliquots zu je 50.000 Zellen aufgeteilt und im Verhältnis 20:1 mit Einfriermedium versetzt (90 % fötales Kälberserum FKS und 10 % Dimethylsulfoxid DMSO). Es folgte das langsame Einfrieren im Biofreezer mittels „Nalgene Cryo 1°C“ freezing container (Abkühlung mit $1^\circ\text{C}/\text{min}$).

4.3. Versuchsdurchführungen

4.3.1. Einzelzell-Gelelektrophorese (Comet Assay)

Geräte und Verbrauchsmaterialien:

- Objektträger einseitig komplett mattiert; 26 x 76 x 1,0 mm (Menzel, Braunschweig)
- Deckgläser 24 x 24 mm (Menzel, Braunschweig)
- Elektrophoresekammer für horizontale Gelelektrophorese (Biorad Sub Cell GT)
- Wasserbad (Julabo)
- Färbekammern für die Mikroskopie
- Zeiss Axioskop 10; Filter Set 15 (Anregung BP 546/12; Emission LP 590)
- Videokamera: MARLIN F-046B (Allied Vision Technologies)
- Auswertungsprogramm: Comet Assay IV (Perceptive Instruments, Suffolk, England)

Chemikalien und Lösungen:

- Phosphatpuffer (PBS):
 - 8,0 g NaCl
 - 0,2 g KCl
 - 0,2 g KH_2PO_4
 - 1,15 g Na_2HPO_4
 - mit aqua bidest. auf 1L auffüllen, mit 1N NaOH auf pH 7,4 einstellen
- Agarose:
 - Low melting point [37°C] (LMA) (Biorad)
 - Normal melting point [42°C] (NMA) (Biorad)
- NMA (Beschichtung der Objektträger): 0,5% in PBS
- LMA (Suspendieren der Zellen): 0,7% in PBS
- Lyse-Puffer: (Stammlösung) :
 - 2,5 M = 146,1 g NaCl
 - 100 mM = 37,2 g EDTA-Dinatriumsalz
 - 10 mM = 1,2 g Tris
 - in 1 L aqua bidest. lösen und mit NaOH auf pH 10 einstellen, danach 10 g N-Lauryl – sarcosin-Na-Salz dazugeben, mit aqua bidest. auf 1 L auffüllen
- Lyse-Gebrauchslösung: 89 ml Lyse-Stammlösung

Material und Methoden

- 10 ml DMSO
1 ml Triton X-100 (Aldrich)
- Enzympuffer (Stammlösung): 40 mM = 9,5 g HEPES
0,1 mM = 7,46 g KCl
0,5 mM = 0,146 g EDTA
0,2 mg/L = 0,2 g BSA
mit aqua bidest. auf 1 L auffüllen, mit KOH aufpH 8 einstellen; 35 ml-Aliquots bei -20°C lagern
- Gebrauchslösung: Verdünnung der Stammlösung 1:10
- FPG-Enzym: 200 µL Enzympuffer
200 µL Glycerin
auf 2 mL mit aqua bidest auffüllen
davon 990 µL + 10 µL Enzym; entspricht einer Verdünnung von 1:100.
25 µL- Aliquots im Tiefkühlschrank bei -84°C lagern
- Enzym-Gebrauchslösung: 25 µL Enzym + 725 µL Enzympuffer
= Verdünnung 1:30; insgesamt 1:3000
- Elektrophoresepuffer (Stammlösung): 10 mM = 200 g NaOH auf 500 mL aqua bidest.
200 mM = 14,9 g EDTA auf 200 mL aqua bidest.
- Gebrauchslösung: 30 mL NaOH-Lösung
5 mL EDTA-Lösung
auf 1 L mit aqua bidest auffüllen, kühl stellen
- Neutralisationspuffer: 0,4 M = 48,5 g Tris
mit aqua bidest. auf 1 L auffüllen, mit HCl auf pH 7,5 einstellen
- Ethidiumbromid(Stammlösung): 10 mg in 50 mL aqua bidest.
Gebrauchslösung: Verdünnung 1:10 mit aqua bidest.

Durchführung:

Die Durchführung des alkalischen Comet Assays entspricht weitestgehend der Beschreibung nach Collins et al., die schematisch in Abbildung 3.35 dargestellt ist [Collins et al., 1996].

Vor der Durchführung wurden die Objektträger mit NMA präpariert: 40 µL wurden auf die matte Seite pipettiert, ausgestrichen und trocknen gelassen. Sodann wurden darauf zweimal nebeneinander je 65 µL NMA pipettiert und sofort mit je einem Deckglas bedeckt. Die Aufbewahrung, die max. eine Woche betragen sollte, erfolgte bei 4°C in angefeuchteten Präparationskästen.

Die Lymphozytenkontrolle wurde nun aus dem Biofreezer geholt und zum Auftauen sofort mit 1200 µl N-Medium (vorgewärmt auf 37°C) versetzt und gemischt. Nach einer Zentrifugation (250 g, RT, 5 min) und dem Verwerfen des Überstandes wurden die Lymphozyten mit 150 µl N-Medium resuspendiert. 25 µl dieser Suspension wurden anschliessend in 65 µl LMA eingebettet und analog der Blutproben weiterbearbeitet.

Zur Verarbeitung der Blutproben wurden die beiden Deckgläser von den präparierten Objektträgern entfernt, zweimal je 6 µL Blut mit 65 µL LMA vermischt, auf den Objektträger pipettiert und wieder mit den Deckgläsern bedeckt. Nach Festwerden der LMA und nach Abziehen der Deckgläser wurden die Objektträger in eine mit Lysepuffer gefüllte Kammer gestellt und für mindestens 1 h bei 4°C belassen. Nach der Lyse wurden die Objektträger dreimal für jeweils fünf Minuten mit Enzympuffer gewaschen.

Auf die Objektträger wurden nun 50 µL Enzympuffer als Kontrolle bzw. 50 µL FPG-Lösung pipettiert und nach Auflegen von Deckgläsern wurden diese 30 min im Wasserbad bei 37°C belassen. Danach wurden die Deckgläser wieder entfernt und die Objektträger in die horizontale Elektrophoresekammer gelegt. Bedeckt mit Elektrophoresepuffer (pH=13) wurde 20 min inkubiert (Entwindung der DNA) und anschließend die Elektrophorese bei einer Spannung von 25 V (0,86 V/cm) und einer Anfangsstromstärke von 300 mA gestartet. Die Dauer betrug 20 min.

Nun wurden die Objektträger dreimal mit Neutralisationspuffer neutral gewaschen. Am Ende wurde der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid auf die Gele aufgetragen (40 µl) und mit Deckgläsern bedeckt.

Die Visualisierung erfolgte mit einem Zeiss Axioskop I, die Auszählung der Zellen bzw. die Quantifizierung mit dem Computerprogramm Comet Assay IV. Dazu wurden

je Gel 50 Zellen ausgezählt, das Programm errechnete die entsprechenden Parameter. Zur Auswertung wurde die tail intensity (die prozentuale Fluoreszenzintensität des Schweifes relativ zur Gesamtintensität) herangezogen.

4.3.2. Glutathion

Geräte und Verbrauchsmaterialien:

- Multiplattenreader (Sirius HT) mit Software KC4 v.3.3. BioTek®
- 96-Lochplatte (Greiner)
- Mikroreaktionsgefäße 2,2 und 1,5 mL (Greiner)
- Minifuge (Heraeus)
- Megafuge 1.0R (Heraeus)
- Multipette (Abimed)

Chemikalien und Lösungen:

- Puffer A: 1,7 g KH_2PO_4 , 234 mg $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, in 100 mL aqua bidest. lösen, Lagerung bei 4 °C
- Puffer B: 2,175 g K_2HPO_4 , 234 mg $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, in 100 mL Aqua bidest. lösen, Lagerung bei 4 °C
- Gebrauchslösung:(Puffer A+B): 15 mL Puffer A + 85 mL Puffer B; pH 7,5
am Tag des Versuchs frisch ansetzen
- NaHCO_3 , 0,5%ig: 500 mg NaHCO_3 lösen in 100 mL aqua bidest.
Lagerung bei 4 °C
- NADPH-Lösung: 20 mmol/L in 0,5%iger NaHCO_3 -Lösung = 18 mg NADPH/ mL
- DTNB-Lösung: 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure) (Sigma):
6 mmol/L; 24 mg DTNB lösen in 10 ml Puffer A+B,
frisch ansetzen
- Glutathion-Reduktase (GSR): 0,5 U Glutathion-Reduktase/ 10 µL Puffer A+B
(Sigma-Aldrich)
- 5-Sulfosalicylsäure (5-SSA): 10%ig: 100 g 5-SSA in 1 L aqua bidest.
5%ig: 50 g 5-SSA in 1 L aqua bidest.
Lagerung bei 4°C

Material und Methoden

- Glutathion, oxidiert (GSSG) (Acros)
- Glutathion, reduziert (GSH) (Sigma-Aldrich)
- 2-Vinylpyridin (Fluka)
- Triethanolamin (TEA) (Fluka), 50%ig in aqua bidest.

Durchführung:

Nach dem Auftauen der Proben (gewonnen gemäß 4.2.2.1) erfolgte eine Zentrifugation bei 4°C und 6000 Upm für 10 min. Der Überstand wurde mit einer Pipette vorsichtig abgenommen und zur tGSH-Bestimmung wurden 100 µL mit 900 µL 5% SSA verdünnt (Endverdünnung 1:50). Da GSSG in wesentlich niedrigeren Konzentrationen vorlag, wurde es nur bis zu einer Endverdünnung von 1:25 verdünnt (200 µL Überstand + 800 µL 5% SSA).

Messung von tGSH (Glutathionspiegel):

Ausgehend von einer GSH-Stammlösung von 1 mM wurden mit 5% SSA Glutathion-Standards folgender Konzentrationen [µM GSH] hergestellt: 160; 80; 40; 20; 10; 5; 0 (Blank).

Messung per Mikroplattenphotometer:

Die tGSH-Messung erfolgte analog der Methode, die von Gallagher beschrieben wurde [Gallagher et al., 1994]:

In die 96-Lochplatte wurden 10 µl Probe oder Standard vorgelegt, pro Well dann die Reaktionsmischung aus 164 µl Puffer A+B, 20 µl DTNB (6 mM), 4 µl NADPH (20 mM) und 2 µl GSR (50 U/ml) zugegeben. Alle Standards und Proben wurden als Doppelbestimmung vermessen.

Folgende Parameter sind im Protokoll festgelegt (Tabelle 4.4):

Tabelle 4.3: Messparameter für die Glutathionbestimmung

Messmodus:	Absorption
Lesemodus:	Endpunkt
Temperatur:	25°C
Wellenlänge:	412 nm
Lesemodus:	Top

Auswertung:

Zur Auswertung wurde die Differenz der Extinktionen bei t=5 min und t=0 min gebildet: $\Delta E = E(t=5 \text{ min}) - E(t=0 \text{ min})$

Diese Werte wurden noch korrigiert, indem der ΔE -Wert des Blindwerts subtrahiert wurde. Die korrigierten ΔE -Werte der GSH-Standards wurden in einem Diagramm gegen ihre Konzentrationen aufgetragen und so die Regressionsgerade bestimmt. Anhand der Geradengleichung ließen sich nun die Extinktionen (korr. ΔE -Werte) der Proben in die tGSH-Konzentration (in μM) umrechnen.

Messung von GSSG:

Ausgehend von einer GSSG-Stammlösung von 1 mM wurden mit 5% SSA GSSG-Standards folgender Konzentrationen [μM GSSG] hergestellt: 40; 20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0 (Blank).

Derivatisierung:

Zur Derivatisierung des Glutathions wurden in dieser Reihenfolge (Tabelle 4.5)

Tabelle 4.4: Derivatisierung des Glutathions

Probe/ Standard/ Blank	500 μL
2-Vinylpyridin	20 μL
50% TEA	100 μL

in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß gegeben und gut geschüttelt. Die Derivatisierung erfolgte im Thermomixer für 1 h bei 26°C und 600 Upm.

Messung

Der Messablauf entsprach weitgehend dem der tGSH-Messung, jedoch wurden 20 μl Probe oder Standard mit einem entsprechend geringeren Anteil Puffer A+B (154 μl) in der Reaktionsmischung versetzt und die Messungen erfolgten bei t=0 min und t=10 min.

Bestimmung des Glutathionstatus (Gl. 4.1):

$$\text{Status [\%]}: \frac{\text{tGSH} - 2x \text{ GSSG}}{\text{tGSH}} \times 100 \quad (4.1)$$

4.3.3. Malondialdehyd

Geräte und Verbrauchsmaterialien:

- Reaktionsgefäße 1,5 mL (Greiner), Schraubröhren, 1,5 mL (Sarstedt)
- Vortexer-Rühraufsatz (Roth)
- Thermomixer Comfort (Eppendorf)
- Schwarze 96-Lochplatten (Nunc)
- Multiplattenreader (Sirius HT)
- HPLC-Anlage (Jasco)
 - Pumpe PU 1580,
 - Degaser DG 1580-53,
 - Gradientenmischer LG 1580-02,
 - Fluoreszenzdetektor FP 1520,
 - UV-Detektor UV 1575,
 - Autosampler AS 1550
- Säulen: Lichrospher 100 (5 µm) RP-18 ec 250mm x 4 mm [Merck] oder
Nucleosil 100 (5 µm) RP-18 ec 250mm x 4 mm (Macherey-Nagel)
- Autosampler-Vials, 1,5 mL ; 300 µL-Inserts, Septen, Ø 9 mm (Jasco)

Chemikalien und Lösungen:

- t-Butylhydroxytoluol (BHT)-Lösung: 1%ig in Ethanol (w/v)
Gebrauchslösung: 0,05 %ig in aqua bidest.
- MDA-Detektionskit (Sobioda)
- n-Butanol (Merck)

Durchführung

95 µL Plasma, aus 4.2.2.2 erhalten, wurden mit 5 µL BHT versetzt und für fünf Sekunden mit dem Vortexer gemischt. Daraus wurden vier 20 µL-Aliquots für die spätere Aufarbeitung in Schraubröhrchen pipettiert. Diese Proben wurden nun bei -80°C bis zur Messung gelagert.

Messung:

Der Gehalt an Malondialdehyd wurde analog der Vorgehensweise von Weisel et al. [Weisel et al., 2006] durchgeführt. Der Gehalt von Malondialdehyd (MDA) in Plasma wurde mit einem kommerziell erhältlichen Kit der Firma Sobioda in veränderter Durchführung bestimmt. Die verwendeten HPLC-Parameter sind in Tabelle 4.6 dargestellt.

Tabelle 4.5: HPLC-Parameter bei der MDA-Bestimmung

Säulen		
	Merck*	Macherey-Nagel*
Füllmaterial	LiChroSpher RP18 ec	Nucleosil RP18 ec
Länge	250 mm	
Durchmesser	4 mm	
Porengröße	5 µm	
Korngröße	100 Å	
Fließmittel		
Phosphat-Puffer (pH = 7,4)	57%	53%
Methanol	43%	47%
Flow	1,0 ml/min	0,9 ml/min
Fluoreszenzdetektor		
Emissionswellenlänge	553 nm	
Anregungswellenlänge	532 nm	
Injektionsvolumen pro Probe	50 µl	

*: Beide Säulen lieferten vergleichbare Ergebnisse

Zwei Teile der Thiobarbitursäure wurden zu einem Teil Perchlorsäure gegeben und gemischt. Davon wurden 160 µL zu den 20 µL Probe oder Standard in ein Schraubröhrchen pipettiert. Der Ansatz wurde nach dem Vortexen bei 600 Upm 1 h auf 95°C erhitzt, anschließend 5 min auf Eis gekühlt und zentrifugiert (5 min, 2600 x g). Nach Zugabe von 400 µL Butanol wurde 1 min mit dem Vortexer gemischt und

5 min bei 2600 x g zentrifugiert. Aus der Butanolphase wurden 2x 150 µl entnommen und in je ein HPLC-Vial mit 300 µl Einsatz gegeben und vermessen. Die Identifikation erfolgte über die Retentionszeit, die Quantifizierung durch Vergleich der Peakflächen mit denen externer MDA-TBA-Standards. Es wurden Doppelbestimmungen mit maximal zehn Proben durchgeführt, die direkt vermessen wurden, um eine ausreichende Stabilität des Derivats zu gewährleisten.

4.3.4. Triglyceride

Die enzymatisch-photometrische Bestimmung des Triglyceridgehaltes erfolgte mit dem „Fluitest[®] TG; Triglyceride GPO-PAP“-Kit der Fa. Biocon[®] Diagnostik. Die Lagerung erfolgte bei 4°C im Kühlschrank. Zugrunde liegen die Arbeiten von Fossati et al. [Fossati et al., 1982].

Chemikalien und Lösungen:

Reagenz 1: - Pipers Puffer pH = 7,2 (50 mmol/l)

- p-Chlorphenol

Reagenz 2: - Lipoproteinlipase (150000 U/l)

- Glycerokinase (800 U/l)

- Glycerol-3-P-Oxidase (4000 U/l)

- Peroxidase (440 U/l)

- 4-Aminoantipyrin (0,7 mmol/l)

- ATP (0,3 mmol/l)

Durchführung:

Der mitgelieferte Kalibrator der gleichen Firma wurde nach Zugabe von 3 ml des mitgelieferten Lösungsmittels ca. 30 min lang unter gelegentlichem Schwenken im Dunkeln gelöst, die Lösung in 50 µl Portionen aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Zu je 10 µl der zu untersuchenden Probe, dem Kalibrator und dem Blank (aqua bidest.) wurde 1 ml Reaktionsreagenz, bestehend aus einer Flasche Reagenz 2 gelöst in der entsprechenden Menge Reagenz 1 zugegeben, gemischt und 10 Minuten bei RT inkubiert. Je 200 µl wurden in eine 96-Well-Platte pipettiert und photometrisch bei 546 nm gemessen. Bei jeder Probe wurde eine Vierfachbestimmung vorgenommen.

Berechnung der Triglyceridkonzentration:

Der TG-Gehalt wurde nach der in der Beschreibung des Kits angegebenen Gleichung (Gl. 4.2) berechnet, wobei die Konzentration des Kalibrators 175 mg/dl betrug:

$$\text{TG [mg/dl]} = \frac{\Delta E_{\text{Probe}}}{\Delta E_{\text{Kalibrator}} \times \text{Konz. Kalibrator [mg/dl]}} \quad (4.2)$$

Die errechneten Werte werden mit Gl. 4.3 umgerechnet, um die molare Konzentration zu erhalten:

$$\text{TG [mg/dl]} \times 0,01126 = \text{TG [mmol/l]} \quad (4.3)$$

4.3.5. Proteincarbonyl

Geräte und Verbrauchsmaterialien:

- Zentrifuge
- Ultraschallbad
- Photometer
- Sterilfilter 0,45 µm, (Sartorius)
- 2,2 ml Reaktionsgefäße

Chemikalien und Lösungen:

- Guanidinhydrochlorid 6 M (57,32 g auf 100 ml aqua bidest)
- 2,5 M HCl
- 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH), gesättigte Lsg. in 2,5 M HCl (50 mg / 12 ml; etwa 21 mM)
- Trichloressigsäure (TCA), 20%ig und 10%ig in aqua bidest
- Ethylacetat p. a.
- Ethanol p. a.
- Rinderserumalbumin (BSA), Stammlösung, 2mg/ml in aqua bidest

Durchführung:

Die Durchführung erfolgte weitgehend den Vorgaben von Levine et al. [Levine et al., 1990]. Neben den Plasmaproben wurde bei jedem Versuch eine Vergleichsprobe eines gesunden Probanden mitgeführt. Pro zu untersuchender Probe wurden zwei der acht eingefrorenen Aliquots benötigt, eines als „Sample“ und eines als „Control“. Das Sample wurde mit 400 µl filtrierter DNPH-Lösung, die Control mit 400 µl 2,5 M HCl versetzt und im Dunkeln bei RT für eine Stunde inkubiert; dabei alle 15 Minuten vortexen.

Danach erfolgte die Zugabe von je 1 ml 20 %ige TCA und eine fünfminütige Präzipitation der Proteine auf Eis (ab hier immer auf Eis arbeiten). Nach anschliessender Zentrifugation (10.000 g für 10 min bei 4°C) wurde der Überstand verworfen, 1 ml 10 %ige TCA zugegeben und das Pellet mittels Vortexen und Ultraschallbad suspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (s. o.) wurde der Überstand verworfen, 1 ml Ethanol/Ethylacetat-Mischung (1:1) dazugegeben und resuspendiert. Dieser Waschvorgang wurde einmal wiederholt, anschließend mit 1 ml Ethanol p.a. resuspendiert und zentrifugiert.

Das Pellet wurde nun Pellet in 0,5 ml Guanidinhydrochlorid-Lösung gelöst und nochmals zentrifugiert (Abtrennen von Unlöslichem). Nach dem Umfüllen der Proben in frische gekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäße wurden pro Probe zweimal 220 µl in eine 96-well-Platte verteilt und direkt und unverdünnt bei 370 nm im Multiplaterereader gemessen.

Die Berechnung der Konzentration erfolgte mittels des molaren Absorptionskoeffizienten (0,5 cm Weglänge durch die Probe, siehe Gl. 4.4):

$\text{Protein Carbonyle (nmol/ml)} = (\text{KA}) / (0,011 \mu\text{M}^{-1})$ <p>KA : korrigierte Absorption (Sample – Kontrolle)</p>	(4.4)
---	-------

Proteinbestimmung (nach Bradford):

Geräte und Verbrauchsmaterialien:

- Multiplattenreader (Sirius HT)
- 96-Lochplatten (Greiner)
- Mikroreaktionsgefäße 1,5 ml (Greiner)
- Multipette: (Eppendorf, Abimed)

Chemikalien und Lösungen:

- BioRad Protein Dye-Reagenz (BioRad):

Gebrauchslösung: Gemisch aus BioRad Protein Dye-Reagenz und aqua bidest. im Verhältnis 1:5

- Proteinstandards: BSA 2 mg/mL (Sigma)

Durchführung:

Für die Proteinbestimmung erwies sich eine Verdünnungen von 1:50 für Sample und Kontrolle als optimal. Wichtig war dabei, dass die Standards im gleichen Verhältnis von Guanidin x HCl zu aqua bidest (1:50) gemischt wurden. Der erste Standard (0,5 mg/ml) enthielt 50 µl BSA-Stammlösung und 150 µl Mischung I (730 µl Bidest und 20 µl Guanidin x HCl). Davon wurden 100 µl in Verhältnis 1:1 mit Mischung II (980 µl Bidest und 20 µl Guanidin x HCl) versetzt, alle weiteren Verdünnungen erfolgen mit Mischung II im selben Verhältnis. Inklusive eines Blindwertes ergab sich eine Standardreihe mit den Konzentrationen 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125; 0 [mg/ml]. Direkt vor der Zugabe zu den Proben wurde das Dye-Reagenz verdünnt, zu je 10 µl Standard oder Probe pro Well dann 200 µl verdünntes Reagenz mit der Mehrkanalpipette zugegeben, gemischt und fünf Minuten bis eine Stunde danach bei 595 nm in Doppelbestimmung gemessen.

Die Berechnung des Proteingehaltes erfolgte anhand der mitgeführten Standards. Der Carbonylgehalt der Proteine in Nanomol Carbonyle pro Milligramm Protein ergab sich nach Gl. 4.5.

Berechnung des Protrincarbonylgehaltes (Gl. 4.5):

$$\frac{\text{Carbonylgehalt (nmol Carbonyle / mg Protein)}}{\text{Carbonylgehalt (nmol/ml) / Proteingehalt (mg/ml)}} = \quad (4.5)$$

4.3.6. NF- κ B-Status

Die Durchführung dieses Assays wurde erstmals von Chaturvedi et al. beschrieben [Chaturvedi et al., 2000]. Aus den isolierten Lymphozyten (siehe 0) wird zunächst durch eine spezielle Aufarbeitung der Nuklearextrakt gewonnen, der alle Transkriptionsfaktoren aus dem Zellkern enthält. Anschließend wird der Proteingehalt des Nuklearextraktes bestimmt, da bei der Durchführung des ELISA pro well eine Menge von 5 μ g Protein eingesetzt werden soll. Die NF- κ B-DNA-Bindungsaktivität, hervorgerufen durch die verschiedenen Inkubationssubstanzen, wird mit dem TransAM-Kit der Fa. Active Motif nachgewiesen. Dabei wird das Proteindimer NF- κ B aus dem Nuklearextrakt, aufgrund seiner Fähigkeit an eine spezifische NF- κ B-Oligonukleotid-Bindung (5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3') zu binden, detektiert und quantifiziert. Es folgt die Zugabe eines Antikörpers gegen die NF- κ B-Untereinheit, die bestimmt werden soll. Da das Dimer p65/p50 am häufigsten in Säugetierzellen vorkommt, wird die Bestimmung mit dem Antikörper gegen p65 durchgeführt. Nach einer einstündigen Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgt die Zugabe eines sekundären Antikörpers, der mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt ist. Diese kann das nachfolgend eingesetzte farblose Reagenz zu einem photometrisch bestimmbareren Stoff umsetzen. Die gemessene Absorption ist proportional zur Menge der NF- κ B-Untereinheit.

Geräte und Verbrauchsmaterialien:

- Sterilbank: Heraeus Instruments Herasafe HS 12
 Heraeus Instruments Laminair HLB 2472 BS
- ELISA-Kit "TransAM NF κ B p65" (Active Motif)
- Absaugkanüle (20G), (Roth)
- Einmalkanüle (27G), (Roth)
- Insulinspritze (1 ml), (Roth)
- Vortexer (Heidolph)
- Multiplattenreader (Sirius HT)
- Multipette (Eppendorf, Abimed)
- Zentrifuge Biofuge fresco (Heraeus)

Chemikalien und Lösungen:

- HEPES, pH 7,9 (1 M): 23,83 g HEPES
80 ml aqua bidest.
 - pH mit 10 M NaOH auf 7,9 einstellen
 - mit aqua bidest. auf 100 ml auffüllen, autoklavieren
 - Lagerung bei RT

- KCl (2 M): 149,91 g KCl
60 ml aqua bidest.
 - mit aqua bidest. auf 100 ml auffüllen, autoklavieren
 - Lagerung bei RT

- NaCl (5 M): 29,22 g NaCl
80 ml aqua bidest.
 - mit aqua bidest. auf 100 ml auffüllen, autoklavieren
 - Lagerung bei RT

- EDTA, pH 8 (0,5 M): 46,525 g Dinatrium-EDTA
5 g NaOH
200 ml aqua bidest.
 - pH mit 10 M NaOH auf 8,0 einstellen
 - mit aqua bidest. auf 250 ml auffüllen, autoklavieren
 - Lagerung bei RT

- EGTA, pH 7 (0,1 M): 1,902 g EGTA
40 ml aqua bidest.
 - pH mit 10 M NaOH auf 7,0 einstellen
 - mit aqua bidest. auf 50 ml auffüllen, autoklavieren
 - Lagerung bei RT

- DTT (1 M): 8 ml autoklaviertes aqua bidest.
1,545 g DTT
 - sterilfiltrieren (0,45 µm)
 - in 200 µl -Aliquots bei -20°C lagern

- PMSF (100 mM): 0,0871 g Phenylmethylsulfonylfluorid

Material und Methoden

- 5 ml Isopropanol
 - in 600 µl -Aliquots bei -20°C lagern
- 10% NP-40:
 - 1 ml Igepal (=Nonidet P-40)
 - 9 ml autoklaviertes aqua bidest.
 - durch leichtes Schwenken im Falconröhrchen lösen
 - in 500 µl- Aliquots bei 4°C lagern
- Benzamidin (250 mg/ml):
 - 3,26 g Benzamidin · HCl · xH₂O
 - 10 ml autoklaviertes aqua bidest.
 - in 250 µl- Aliquots bei -20°C lagern
- Leupeptin (1mg/ml):
 - 5 mg Leupeptin
 - 5 ml aqua bidest.
 - in 250 µl- Aliquots bei -20°C lagern
- Aprotinin (1mg/ml):
 - 10 mg Aprotinin
 - 10 ml autoklaviertes aqua bidest.
 - in 250 µl- Aliquots bei -20°C lagern

Gebrauchslösungen:

- Zell-Lyse-Puffer:
 - 1 ml 1M HEPES, pH 7,9
 - 500 ml 2M KCl
 - 20 µl 0,5M EDTA, pH 8
 - 100 µl 0,1M EGTA, pH 7
 - 96,28 ml autoklaviertes aqua bidest.
 - bei 4°C lagern;
 - kurz vor Gebrauch zu 9,79 ml Puffer zugeben:
 - 100 µl 1M DTT
 - 500 µl 100 mM PMSF
 - 200 µl 1 mg/ml Leupeptin
 - 200 µl 1 mg/ml Aprotinin
 - 200 µl 250 mg/ml Benzamidin

Material und Methoden

- Nuklearextraktions-Puffer: 1 ml 1M HEPES, pH 7,9
 - 4 ml 5M NaCl
 - 100 μ l 0,5M EDTA, pH 8
 - 500 μ l 0,1M EGTA, pH 7
 - 43,1 ml autoklaviertes aqua bidest.
 - bei 4°C lagern
- Gebrauchslösung: zu 0,983 ml Puffer zugeben:
 - 10 μ l 1M DTT
 - 10 μ l 100mM PMSF
 - 2 μ l 1mg/ml Leupeptin
 - 2 μ l 1mg/ml Aprotinin
 - 2 μ l 250mg/ml Benzamidin

Durchführung:

a) Nuklearextraktion

Die Kernextraktion wurde modifiziert nach [Chaturvedi et al., 2000] durchgeführt. Drei Millionen der nach der Isolation erhaltenen Lymphozyten (siehe Kapitel 0) wurden bei 400 x g für 10 min. bei 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde mit 0,8 ml kaltem PBS resuspendiert und bei 500 x g für 5 min. bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Kanüle und Pumpe an der Sterilbank abgesaugt. Es folgte ein weiterer Waschschrift mit 0,8 ml PBS mit anschließendem Zentrifugieren bei 600 x g für 5 min. bei 4°C. Nach dem Absaugen des Überstandes wurden je 0,8 ml Zell-Lyse-Puffer auf das Pellet gegeben. Die Zellen wurden vereinzelt und 15 min. anschwellen gelassen.

Es wurden je 25 μ l 10 % NP-40 zugegeben. Zur völligen Zellzerstörung wurde heftig auf einem Vortex durchmischt, anschließend die Lösung viermal durch eine dünne Kanüle in eine Spritze gesaugt und mit schnellem Druck wieder ins Gefäß gespritzt, so dass die Scherkräfte auf die Zelle maximal wirkten. Die Zytoplasmafraktion wurde nach dem Zentrifugieren bei 10.500 rpm für 1 min. bei 4°C vollständig abgesaugt. Es wurden 30-40 μ l NEP auf das Pellet gegeben und 30 min. inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurde mit einem Vortex durchmischt. Anschließend wurden DNA und Histone bei 13.000 rpm für 5 min bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand stellte den Nuklearextrakt dar. Von dem Überstand wurden 3 μ l für die Proteinbestimmung in ein

vorgekühltes Eppendorfgefäß überführt (weiter siehe 0). Der restliche Nuklearextrakt wurde bis zur weiteren Bearbeitung bei -80°C eingefroren.

b) Nachweis von p65 mittels ELISA

Die benötigten Mengen der zu verwendenden Puffer und Lösungen wurden vor Versuchsbeginn mit Hilfe einer in der Anleitung mitgelieferten Tabelle ermittelt (Tabelle 4.7) und hergestellt:

Tabelle 4.6: Reagenzienmengen ELISA, Fa. Active Motif

REAGENZ	KOMPONENTEN	für 1 well	für 1 Streifen (8 wells)
Complete Lysis Buffer	DTT	0,11 µl	0,9 µl
	Protease inh. Cocktail	0,23 µl	1,8 µl
	Lysis Buffer AM2	22,20 µl	177,3 µl
	Gesamt	22,50 µl	180 µl
Complete Binding Buffer	DTT	0,07 µl	0,54 µl
	Herring sperm DNA	0,34 µl	2,7 µl
	Binding Buffer AM3	33,40 µl	267 µl
	Gesamt	33,80 µl	270 µl
1x Wash Buffer	aqua bidest	2025,00 µl	16200 µl
	10x Washing Buffer AM2	225,00 µl	1800 µl
	Gesamt	2250,00 µl	18000 µl
1x Antibody Binding Buffer	aqua bidest	202,50 µl	1620 µl
	10x Ab Binding Buffer AM2	22,50 µl	180 µl
	Gesamt	225,00 µl	1800 µl
Developing solution	Gesamt	112,50 µl	900 µl
Stop solution	Gesamt	112,50 µl	900 µl
Antibody solution (1:1000)	1x Antibody Binding Buffer	99,9 µl	799,2 µl
	Antibody	0,1 µl	0,8 µl
	Gesamt	100 µl	800 µl

c) Bindungsreaktion

In jedes, mit spezifischer NF-κB-Oligonukleotidsequenz beschichtetes Well, welches gemessen werden sollte, wurden 30 µl Bindungspuffer vorgelegt. In jedes Probenwell wurden 20 µl Probe pipettiert. Diese wurden zuvor so mit Lysepuffer verdünnt, dass in 20 µl Probelösung eine Menge von 5 µg Protein enthalten waren. Bei jeder Messung wurde ein so genannter Blank mitgeführt, bei dem statt Probelösung 20 µl

Lysepuffer pipettiert wurden. Als Positivkontrolle diente ein $\text{TNF}\alpha$ -aktivierter HeLa-Extrakt (Active Motif). Hierzu wurden 2 μl HeLa-Extrakt mit 18 μl Lysepuffer verdünnt. Nach dem Pipettieren wurde die 96-well-Platte mit einem mitgelieferten Deckel bedeckt und für 1 h bei RT inkubiert. Die Platte wurde dazu auf einem Vortex mit Hilfe eines speziellen Aufsatzes bei niedrigster Umdrehungszahl geschüttelt (100 rpm). Zwischenzeitlich wurde der Antikörperpuffer nach dem Schema der Anleitung aliquotiert.

Nach der Inkubation entleerte man den Inhalt der Wells über einer Spüle und entfernte überschüssige Flüssigkeit mit einem saugenden Papiertuch. Es wurde dreimal mit je 200 μl Waschpuffer gewaschen, überschüssiger Puffer mit einem Papiertuch entfernt.

Bindung des primären Antikörpers:

Je nach zu bestimmender Untereinheit wurde der entsprechende Antikörper 1:1000 mit Puffer verdünnt. Pro Well konnte nur eine Untereinheit bestimmt werden. In dieser Arbeit wurde die p65-Untereinheit quantifiziert. Pro Well wurden 100 μl der Antikörperlösung hinzugegeben. Die Platte wurde abgedeckt und ohne Schütteln bei RT für 1 h inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Inhalt der Wells entleert und es folgten drei Waschschrte mit je 200 μl Waschpuffer.

Bindung des sekundären Antikörpers:

Nach dem Entleeren der Wells wurden je 100 μl HRP-konjugierter Antikörper hinzugegeben. Die Platte wurde abgedeckt und ohne Schütteln bei RT für 1 h inkubiert. Währenddessen wurden die lichtempfindliche Entwicklungslösung und die Stopplösung nach dem Schema des Kits aliquotiert. Im Anschluss an die Inkubation wurde die Platte viermal mit Waschpuffer gewaschen.

d) Farbreaktion

Für diese Reaktion wurden pro Well 100 μl Reagenz zugegeben. Als die blaue Färbung maximal war, wurde pro Well 100 μl Stopplösung pipettiert. Die Absorption wurde bei 450 nm (Referenzwellenlänge 655 nm) mit einem Plattenreader gemessen. Für die Auswertung wurde $\Delta\text{OD}_{450\text{ nm}}$ abzüglich des Blanks ermittelt.

Material und Methoden

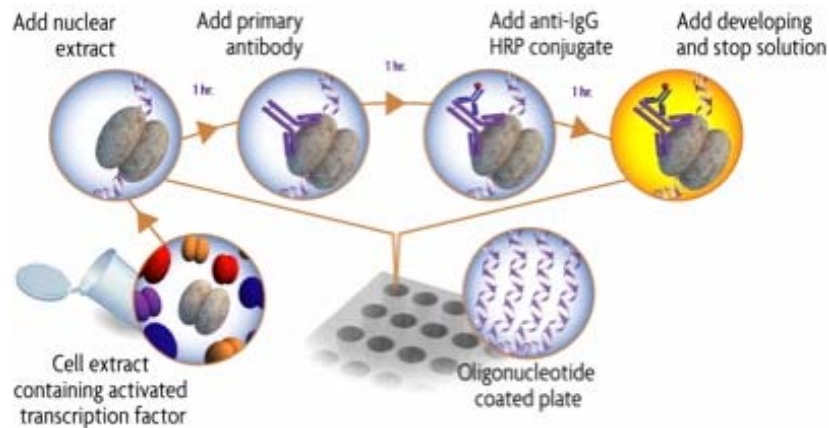


Abbildung 4.4: Fließschema des ELISA [Fa. Active Motif].

Proteinbestimmung (nach Bradford)

Geräte und Verbrauchsmaterialien:

- Multiplattenreader (Sirius HT)
- 96-Lochplatten (Greiner)
- Mikroreaktionsgefäße 1,5 ml (Greiner)
- Multipipette: (Eppendorf, Abimed)

Chemikalien und Lösungen:

- BioRad Protein Dye-Reagenz (BioRad):

Gebrauchslösung: Gemisch aus BioRad Protein Dye-Reagenz und aqua bidest. im Verhältnis 1:5

- Proteinstandards: BSA 2 mg/mL (Sigma)

Durchführung:

Um Messwerte im mittleren Bereich der Eichgrade zu erhalten, wurde der Proteinstandard 1:4 verdünnt (50 µl Standard + 150 µl aqua bidest.). Man erhielt einen 0,5 mg/ml Proteinstandard. In die rechts außen liegende Reihe (A12-H12) einer 96-well-Platte wurde nach dem Schema der Tabelle 4.8 pipettiert:

Tabelle 4.7: Pipettierschema für den Bradford-Assay

	Protein/well [µg]	Aqua bidest. [µl]	0,5 mg/ml Standard [µl]
A12	0	100	0
B12	0,5	95	5
C12	1,0	90	10
D12	1,5	85	15
E12	2,0	80	20
F12	2,5	75	25
G12	3,0	70	30
H12	3,5	65	35

Je 3 µl des Nuklearextraktes wurden in dem Eppendorfgefäß mit je 57 µl aqua bidest. verdünnt. Der Inhalt wurde auf drei Wells verteilt (20 µl in A4-A6 und so weiter). Das BioRad Protein-Dye-Reagenz wurde 1:5 mit aqua bidest. verdünnt. In jedes Well wurde mit Hilfe einer Multikanalpipette oder eines Dispensers 200 µl verdünntes Reagenz gegeben. Luftblasen, die die photometrische Messung beeinflussen könnten, wurden mit einer Kanüle zerstochen. Die Platte wurde im Plattenreader bei 595 nm photometrisch vermessen. Der Protein-Dye-Farbkomplex ist nach Angaben der Fa. BioRad 1 h stabil.

Auswertung:

Aus den Extinktionswerten der Standardlösungen wurde eine Standardgerade erhalten. Nach linearer Regression wurden die entsprechenden Extinktionen der Proben in die errechnete Gleichung eingesetzt und so der jeweilige Proteingehalt [µg/mL] bestimmt.

4.3.7. TEAC

Geräte und Verbrauchsmaterialien:

- Multiplattenreader (Sirius HT)
- 96-Lochplatte, unsteril (Greiner)
- Achtkanalpipette (Abimed)
- Zentrifuge Sigma 3-1 (Sigma)

Chemikalien und Lösungen:

- 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure)-diammoniumsalz ABTS(Sigma)
7 mM in aqua bidest.
- Aktivierung der Radikallösung durch Kaliumperoxodisulfat (Sigma)
2,45 mM in ABTS-Lösung
über Nacht im Dunkeln aufbewahren
Gebrauchslösung: ca. 1:40 Verdünnung: Absorption auf $0,70 \pm 0,02$ einstellen
- Trolox: Stammlösung 30 mM in DMSO
- 5-Sulfosalicylsäure (5-SSA) 10%ig: 100 g 5-SSA in 1 L aqua bidest.
- PBS (Stammlösung 10x) : 90 g NaCl
7,26 g Na_2HPO_4
2,1 g KH_2PO_4
mit aqua bidest. auf 1L auffüllen; pH 7,2-7,4
vor Gebrauch 1/10 verdünnen und steril
autoklavieren

Durchführung:

Die Methode entspricht weitgehend der Beschreibung von [Re et al., 1999]. Die aufgetauten, proteinfreien Plasmaproben wurden 1:50 mit PBS verdünnt, die Standards hatten die Konzentrationen 2 ; 1,5 ; 1,0 ; 0,75 ; 0,5 ; 0,3 ; 0,1 [mM]. Desweiteren wurden zwei Blindwerte (DMSO und PBS) mitgeführt. Zur Messung des TEAC-Wertes wurden aus jeder Lösung 2 μl – Portionen entnommen und als sechsfach-Bestimmung in eine 96-well-Platte pipettiert. Die äußeren Wells der Platte blieben frei. Zu den vorgelegten 2 μl in der Platte wurden nun 98 μl PBS und 200 μl der eingestellten und auf 30°C temperierten ABTS-Radikal-Lösung hinzu gegeben.

Die Messung erfolgte nach 6 min bei der Wellenlänge 734 nm am Mikroplattenphotometer.

Auswertung:

Für die Bestimmung der TEAC-Werte wurde zunächst das Ausmaß der Entfärbung, bezogen auf die DMSO-Kontrolle [E%], berechnet (Gl. 4.6):

$$E\% = \frac{Ex_K - Ex_S}{Ex_K} \times 100 \quad (4.6)$$

Ex_K = Absorption der DMSO-Kontrolle

Ex_S = Extinktion der Trolox-Standards

Die E%-Werte der Trolox-Standards werden in einem Diagramm gegen ihre Konzentration aufgetragen und so ihre Regressionsgerade bestimmt. Anhand der Geradengleichung lassen sich nun die Extinktionen der Proben (E%) in TEAC-Werte [mmol/l] umrechnen.

4.3.8. Harnsäure

Die Bestimmung des Harnsäure-Gehaltes wurde mit dem Amplex Red Uric Acid/Uricase Assay Kit der Firma Molecular Probes durchgeführt. Die Lagerung des Kits erfolgte dunkel und trocken bei -20°C.

Chemikalien und Lösungen:

- Amplex Red Reagent (MG= 257)
- DMSO
- Meerrettich-Peroxidase (Horseradish peroxidase, HRP)
- Wasserstoffperoxid, ~ 3%ig
- 5X reaction buffer
- Uricase
- Harnsäure (10 mM)

Gebrauchslösungen:

- Direkt vor dem Benutzen 1 aufgetautes Vial Amplex Red Reagent mit 100 µl DMSO mischen. Reicht für ~200 Messungen
- 1X reaction buffer:
4 ml 5X reaction buffer + 16 ml aqua bidest, reicht für ~100 Messungen

Material und Methoden

- 100 U/ml Lösung der HRP:
Inhalt des Vials mit 200 μ l 1X reaction buffer auffüllen
- Herstellung einer 20 mM H_2O_2 – Lösung:
Genauere Konzentration auf der Flasche verwenden, um durch verdünnen mit aqua bidest. eine 20 mM Lösung anzusetzen (direkt vor der Verwendung)
- 100 U/ml Uricase-Lösung:
Das Vial mit 100 μ l aqua bidest versetzen, reicht für alle Messungen

Verdünntes Amplex Red Reagent, HRP und Uricase wurden bei -20°C gelagert.

Reagenzien-Mix:

- 50 μ l Amplex Red Reagent – Lösung (100 μ M)
- 20 μ l der HRP – Lösung (0,4 U/ml)
- 20 μ l der Uricase – Lösung (0,4 U/ml)
- 4,91 ml 1X reaction buffer

Diese 5 ml sind ausreichend für ~100 Messungen (eine 96 well-Platte)

Standardreihe:

Der mitgelieferte Harnsäurestandard wurde so mit 1X reaction buffer verdünnt, dass die Konzentrationen von 500, 100, 50, 10, 5 und 1 [μ M] entstanden. Als Blindwert wurde 1x reaction buffer, als Positivkontrolle 10 μ M H_2O_2 in 1X reaction buffer verwendet.

Durchführung:

Das Endvolumen von 100 μ l pro Well setzte sich folgendermaßen zusammen: 50 μ l Probe (zuvor 1:5 mit 1X reaction buffer verdünnt) oder Standard wurden vorgelegt, dazu je 50 μ l Reagenzien-Mix pipettiert. Danach wurde lichtgeschützt für 30 min bei 37°C inkubiert (Wasserbad).

Die Messung erfolgte direkt anschliessend fluorimetrisch (Excitation: 530-560 nm, Emission: ~ 590 nm). Für die Auswertung wurden die Probenwerte mit der Standardreihe verglichen.

4.3.9. Anthocyan-Analytik

Geräte und Verbrauchsmaterialien :

HPLC:	Analytische HPLC von Alexys Leyden, AC 100
Autosampler:	Alexys Leyden
Pumpe:	Alexys Leyden LC 100 HPLC Pumpe
Detektor:	Shimadzu SPD-10A UV/VIS Detektor
Pumpensteuerung:	Alexys Data System Antec Leyden B. V., Vers. 1.0.145
Säule:	Agilent Zorbax SB-C8 RP; 4,6 mm x 150 mm; Porengröße: 3,5 µm

Chemikalien, Lösungen, Materialien:

SPE-Kartuschen:	Sep-Pak Vak 3cc C18 (Waters)
Zentrifugen-Filtereinheiten:	Microcon® YM-10 Länge: 45 mm Filtermaterial: regenerierte Cellulose Filterfläche: 0,32 cm ² Durchmesser 12,3 mm Molekulargewichtsgrenze: 10000 kDa
Fliesmittel:	A: 10% Ameisensäure in Wasser B: Acetonitril

Durchführung:

Probenaufarbeitung:

Die Proben wurden von Herrn Matthias Ackermann (AK Prof. Schreier, TU Würzburg) mittels Festphasenextraktion und Mikrofiltration aufgereinigt [Mazza et al., 2002]. Die Festphasenextraktion wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

1. Konditionierung mit 7 ml Methanol
2. Equilibrierung mit 7 ml Oxalsäure (10 mM)
3. Aufbringen des Probevolumens (1,5 ml Blutserum)
4. Waschen mit 7 ml Oxalsäure (10 mM)
5. Elution der Anthocyane mit 7 ml Methanol
6. Einengen des Eluates unter Stickstoff

Material und Methoden

Für die Mikrofiltration wurde bei 7000 x g und RT für 5 min zentrifugiert und danach 3x mit 10%iger methanolischer Ameisensäure gewaschen.

Messung:

Während der anschließenden einstündigen Messung wurde folgender Gradient gefahren (Tab. 4.9):

Tabelle 4.8: HPLC-Gradient bei der Anthocyanbestimmung [modifiziert nach Mazza et al., 2002]

t [min]	0	7	12	17	22	32	38	42	45	50	52	54
% B	1,0	2,0	2,5	3,5	5	10	15	20	25	30	99	1,0

Der Fluss betrug 1,5 ml/min, das Injektionsvolumen 25 µl, die Detektion erfolgte bei 520 nm (UV/VIS). Für diese Methode wurden als Nachweisgrenze (s/n= 3): 3,06 ng/ml Probe und als Bestimmungsgrenze (s/n= 5): 6,44 ng/ml Probe angegeben.

4.4. Statistik

Die Messwerte sind als absolute Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben.

4.4.1. Ausreißer-Test (Nalimov)

Bei Mehrfachbestimmungen der Messwerte wurde der Ausreißer-Test nach Nalimov (Gln. 4. 4) durchgeführt. Geprüft wurde, ob die einzelnen Werte aufgrund ihrer hohen Abweichung aus der Mittelwertbildung ausgenommen werden sollen. Für den Test müssen mindestens Daten aus 3 Bestimmungen ($n > 2$) vorliegen. Die Kontrolle erfolgt auf den kleinsten und größten Wert, anschließend wird eine Prüfgröße PG nach der Formel berechnet (Gl. 4.7):

$$PG = \frac{|x^{\bullet} - \bar{x}|}{s_x} * \sqrt{\frac{N}{N-1}} \quad (4.7)$$

x^{\bullet} =ausreißverdächtiger Wert

\bar{x} =Mittelwert

s_x =Standardabweichung

N =Anzahl der Proben

Die errechnete Prüfgröße (PG) wird mit einem Tabellenwert (mit P = 95%) verglichen. Ist der Prüfwert kleiner als der Tabellenwert, liegt nach Nalimov kein Ausreißer vor. [Gottwald, 2000]

4.4.2. Variationskoeffizient

Die Bestimmung des Variationskoeffizienten (VK) ist zur Beurteilung einer verwendeten Methode hilfreich. Ob die Streuung von Messwerten als stark oder gering anzusehen ist, erweist sich oft erst, wenn man die Streuung im Verhältnis zum arithmetischen Mittel betrachtet. Der Quotient wird als Variationskoeffizient bezeichnet (Gl. 4. 8):

$$VK(\%) = \frac{s_x}{\bar{x}} \times 100 \quad (4.8)$$

\bar{x} = Mittelwert; s_x = Standardabweichung

Die Größe des Variationskoeffizienten macht dabei eine Aussage über die Reproduzierbarkeit der Methode möglich. In der Praxis interpretiert man VK bis zu 10% als geringe Variabilität, zwischen 10% und 25% als normal und über 25% als starke Streuung des Beobachtungsmaterials. Hierbei wird zwischen zwei Arten von Koeffizienten unterschieden [Berghold, 2004].

Intra-Assay Variationskoeffizient

Hierzu wird ein und dieselbe Probe mehrmals mit der gleichen Methode gemessen. Die Messungen erfolgen möglichst zeitnahe am gleichen Tag. Anhand der Messwerte wird der intra-assay-Koeffizient (Gln. 4. 8) bestimmt. In biologischen Systemen sollte der Variationskoeffizient zwischen 5% und 10% liegen.

Inter-Assay Variationskoeffizient

Zur Bestimmung des inter-assay-Koeffizienten wird die gleiche Probe bei verschiedenen Messungen an unterschiedlichen Tagen vermessen. Liegt der inter-assay-Variationskoeffizient unter 20%, so kann die Methode als zuverlässig angesehen werden [Berghold, 2004].

4.4.3. Normalverteilung

Die mit Abstand am häufigsten von statistischen Verfahren geforderte Verteilung ist die Normalverteilung. Sie beschreibt die Verteilung der Grundgesamtheit, d. h. unter Berücksichtigung aller Elemente der Datenreihe bei „unendlich vielen“ Messwerten. Ihr graphisches Aussehen erinnert an eine Glocke, sie wird demnach auch häufig „Glockenkurve“ bzw. „Gauß-Kurve“ genannt und gehorcht der von Gauß aufgestellten Funktionsgleichung (Gl.4.9):

$$y = \frac{1}{\sigma\sqrt{2*\pi}} * e^{-\frac{(x-\mu)^2}{2*\sigma^2}} \quad (4.9)$$

e = Eulersche Zahl (2,718)

σ = Streuungskenngröße (theoret. Standardabweichung der Grundgesamtheit)

x = Abszissenwert

y = Ordinatenwert (Wahrscheinlichkeitsdichte $\Delta W/\Delta x$)

μ = Lagenkenngröße („wahrer Wert“)

Um zu testen, ob vorliegende Daten normalverteilt sind, können u. a. der Kolmogorov-Smirnov-Test, der Shapiro-Wilk-Test oder Anderson-Darling-Test herangezogen werden. [Gottwald, 2000].

Anderson-Darling Test

Dieser Test prüft die Daten auf die Normalverteilung nach folgender Formel (Gln. 4.10 und 4.11):

$$A^2 = -N - S \quad (4.10)$$

$$S = \sum_{i=1}^N \frac{(2i-1)}{N} [\ln F(Y_i) + \ln (1 - F(Y_{N+1-i}))] \quad (4.11)$$

F = Verteilungsfunktion

Y_i = Daten

N = Stichprobenumfang

4.4.4. Signifikanztests

Um die erhaltenen Messwerte statistisch einordnen zu können, werden Signifikanztests eingesetzt. Dabei werden mit Hilfe von formulierten Hypothesen Gleichheit bzw. Unterschiede oder Effekte innerhalb der Messreihe überprüft. Die Null-hypothese H_0 ist zumeist die Formulierung der Gleichheit, die Gegenhypothese H_1 die Formulierung eines Unterschieds oder Effekts. Die Hypothesen werden in der Regel zweiseitig formuliert (Gleichheit vs. Unterschied). Statistische Tests bedienen sich oft folgender Schlussweise: Zunächst wird eine Nullhypothese aufgestellt, mit dem Ziel diese Hypothese zu verwerfen, um die Gegenhypothese annehmen zu können.

Die Wahl des Signifikanztests ist davon abhängig, ob sich die zu testende Hypothese auf eine Stichprobe bezieht, oder ob mehrere Stichproben verglichen werden sollen. Ebenso muss berücksichtigt werden, ob es sich beim Vergleich der Messwerte um abhängige oder unabhängige Stichproben handelt. Einigen Signifikanztests liegt die Voraussetzung einer Normalverteilung zugrunde. Die zu betrachtenden Zielvariablen sollen auf diese geprüft werden. Liegt eine Normalverteilung und Varianzhomogenität vor, kann ein parametrische Test, z. B. der Studenten t-Test eingesetzt werden,

anderenfalls muss der nichtparametrische Test, z. B. der Wilcoxon-Test herangezogen werden.

Das Ergebnis eines Signifikanztests wird häufig als p-Wert bezeichnet. Ist der p-Wert kleiner als das gewählte Signifikanzniveau α (häufig $\alpha = 0,05$), so wird die Nullhypothese abgelehnt, das Ergebnis gilt dann als statistisch signifikant.

[Bender et al., 2001]

4.4.4.1. Parametrische Tests: t-test

Mit Hilfe der t-Test-Prozeduren können Aussagen über die Gleichheit bzw. Verschiedenheit einer oder mehrerer Stichproben anhand der ihrer Mittelwerte oder deren Differenz getroffen werden. Die Mittelwerte aus Stichproben sind Schätzwerte für die entsprechenden Erwartungswerte der Grundgesamtheit. Es stehen verschiedene Prozeduren zur Durchführung eines t-Tests zur Verfügung:

t-Test bei einer Stichprobe

Mit dieser Prozedur kann anhand der Beobachtungen einer Stichprobe getestet werden, mit welcher Wahrscheinlichkeit der Mittelwert einer beobachteten Variablen in der Grundgesamtheit einen vorgegebenen Wert über- oder unterschreitet.

t-Test bei unabhängigen Stichproben

Hierbei wird nicht ein Mittelwert daraufhin getestet, ob dieser einen bestimmten Wert erreicht, sondern er vergleicht zwei Mittelwerte miteinander und testet, ob diese in der Grundgesamtheit gleich groß sind. Diese Mittelwerte müssen aus zwei unabhängigen Stichproben stammen. Es werden also die Mittelwerte einer Variablen in zwei Fallgruppen miteinander verglichen.

t-Test bei gepaarten Stichproben

Dieser Test vergleicht ebenfalls zwei Mittelwerte miteinander, allerdings ist dieser Test darauf ausgerichtet, dass die Stichproben systematisch miteinander verbunden sind. Hierbei werden die Mittelwerte zweier Variablen (derselben Fallgruppe) miteinander verglichen.

Die allgemeine Formel (Gl. 4.12) für den t-Wert lautet:

$$t = \frac{\bar{x} - \mu}{\frac{\sigma^2}{\sqrt{n}}} \quad (4.12)$$

\bar{x} = Mittelwert der Stichproben \bar{x}_1

μ = Mittelwert der Stichproben \bar{x}_2

n = Anzahl der Stichproben

σ = Varianz

Wie man den t-Wert interpretiert, hängt von der aufgestellten Hypothese ab. Bei ungerichteten Hypothesen (H_1 kann größer oder kleiner sein als H_0) führt man einen zweiseitigen T-Test durch. Bei gerichteten Hypothesen (H_1 kann nur größer/kleiner sein als H_0) führt man einen einseitigen t-Test durch. Dieser hat eine höhere statistische Aussagekraft, als ein zweiseitiger t-Test, da hier strengere Anforderungen an die Verteilung der Werte in der Grundgesamtheit gestellt werden. Zur Durchführung eines t-Tests wird die Normalverteilung vorausgesetzt, d. h. die zu vergleichenden Stichproben müssen jeweils einer annähernd normalverteilten Grundgesamtheit entstammen. [Brosius, 1998]

Im Fall der Normalverteilung wurden die Unterschiede der untersuchten Marker der Interventionsstudie zwischen „Run in“ und Saftaufnahme (R/S), Saftaufnahme und „Wash out“ (W/S) und „Run in“ und „Wash out“ (R/W) mit dem gepaarten einseitigen t-Test überprüft.

4.4.4.2. Nichtparametrische Tests: Wilcoxon matched pairs signed rank test

Nichtparametrische Tests dienen, wie auch die parametrischen Testverfahren, dazu, aufgrund der Daten einer Stichprobe Rückschlüsse auf die Eigenschaften der Werte in der Grundgesamtheit zu ziehen. Der wesentliche Unterschied zu den parametrischen Tests besteht darin, dass die Differenzen der Wertepaare nicht normalverteilt sind.

Wilcoxon-Test für gepaarte/abhängige Stichproben

Im Gegensatz zum T-Test für abhängige Stichproben betrachtet man hier nicht nur die Richtung der Unterschiede zwischen den Wertepaaren (Vorzeichen), sondern

auch die Höhe der Abweichung. Die Differenzen der Wertepaare werden aufgrund ihrer absoluten Größe in eine Rangreihe gebracht, dann wird das Vorzeichen der Differenz dem Rangplatz hinzugefügt.

Der Test sieht für eine größere Stichprobe folgendermaßen aus (Gln. 4.13 und 4.14):

$$z = \frac{T - E(T)}{\sigma_T} \quad (4.13)$$

$$E(T) = \frac{N(N + 1)}{4}; \quad \sigma_T = \frac{N(N + 1)(2N + 1)}{24} \quad (4.14)$$

T = Teststatistik (Summe der Ränge mit dem weniger häufigen Vorzeichen)

N = Umfang der Stichproben

E(T) = Verteilung von T

σ_T = Streuung von T

Signifikanz bei z-Werten <0,05

[Brosius, 1998; Sachs, 2003]

4.4.5. ANOVA

Als **Varianzanalyse** bezeichnet man eine große Gruppe datenanalytischer und mustererkennender statistischer Verfahren, die zahlreiche unterschiedliche Anwendungen zulassen. Ihnen gemeinsam ist, dass sie die Varianz analysieren, um Aufschlüsse über die hinter den Daten steckenden Gesetzmäßigkeiten zu erlangen. Die Varianzanalyse wird häufig auch als **ANOVA**, (**analysis of variance**) bezeichnet. Varianzanalysen erklären die Varianz einer metrischen Zufallsvariable durch den Einfluss einer oder mehrerer Gruppenvariablen. Stets wird eine Prüfgröße berechnet. Für die Interpretation der Ergebnisse wurden die zweifaktorielle Varianzanalyse (two-way ANOVA, Gl. 4.15) und die dreifaktorielle Varianzanalyse (three way ANOVA, ohne Berücksichtigung von Interaktionen, Gl. 4.16) genutzt. Untersucht wurden die Einflüsse der unterschiedlichen Lebensweise der einzelnen Patienten und der Studienphasen (2-way ANOVA) sowie des Geschlecht, der intravenösen Applikation von Eisen-Medikamenten und dem Bestehen einer diabetischen Erkrankung auf die verschiedenen Biomarker.

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + Z_{ijk_{ij}}, \quad i = 1, \dots, I, \quad j = 1, \dots, J, \quad k_{ij} \geq 1 \quad (\text{Gl. 4.15})$$

Y_{ijk} : Zielvariable; annahmegemäß in den Gruppen normalverteilt

i : Anzahl der Faktorstufen des ersten Faktors (A)

j : Anzahl der Faktorstufen des zweiten Faktors (B)

k_{ij} : Anzahl der Beobachtungen pro Faktorstufe (hier für alle Kombinationen von Faktorstufen gleich)

α_i : Effekt der i -ten Faktorstufe des Faktors A

β_j : Effekt der j -ten Faktorstufe des Faktors B

$Z_{ijk_{ij}}$: Interaktion (Wechselwirkung) der Faktoren auf der Faktorstufenkombination (i,j) . Die Interaktion beschreibt einen besonderen Effekt, der nur auftritt, wenn die Faktorstufenkombination (i,j) vorliegt.

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + Z_{ijkl_{ijk}}, \quad (\text{Gl. 4.16})$$

$$i = 1, \dots, I, \quad j = 1, \dots, J, \quad k = 1, \dots, K, \quad l_{ijk} \geq 1$$

Y_{ijkl} : Zielvariable; annahmegemäß in den Gruppen normalverteilt

i : Anzahl der Faktorstufen des ersten Faktors (A)

j : Anzahl der Faktorstufen des zweiten Faktors (B)

k : Anzahl der Faktorstufen des dritten Faktors (C)

l_{ijk} : Anzahl der Beobachtungen pro Faktorstufe

α_i : Effekt der i -ten Faktorstufe des Faktors A

β_j : Effekt der j -ten Faktorstufe des Faktors B

γ_k : Effekt der k -ten Faktorstufe des Faktors C

$Z_{ijkl_{ijk}}$: Interaktion der Faktoren auf der Faktorstufenkombination (i,j,k) . Die Interaktion beschreibt einen besonderen Effekt, der nur auftritt, wenn die Faktorstufenkombination (i,j,k) vorliegt.

Die Prüfung auf Normalverteilung der Messwerte (Anderson-Darling Test) und die Varianzanalyse (ANOVA) wurden von Dr. Jean-Pierre Stockis (Fachbereich Mathematik der TU Kaiserslautern) durchgeführt.

5. Ergebnisse und erste Diskussion

5.1. Eisenpräparationen

5.1.1. In vitro-Untersuchungen

5.1.1.1. Zell-Linie U937

a) DNA-Schäden

Die Modulation der DNA-Schädigung in U937 Zellen durch Inkubation mit den Eisenverbindungen ist in den Abb. 5.1.A dargestellt. Die Ergebnisse der DNA-Schädigung zeigten für die Eisenkomplexe deutliche substanz- und konzentrationsabhängige Unterschiede: Ferrlecit[®] > Venofer[®] > Cosmofer[®]; 100 µg/mL > 10 µg/mL. Die Erhöhung der Inkubationszeit von 15 auf 120 min hatte bei Ferrlecit[®] und Venofer[®] (c = 100 µg/mL Fe) eine höhere DNA-Schädigung zur Folge, jedoch nicht bei Cosmofer[®]. Mit Fe(III)-Chlorid wurden die höchsten DNA-Schäden induziert.

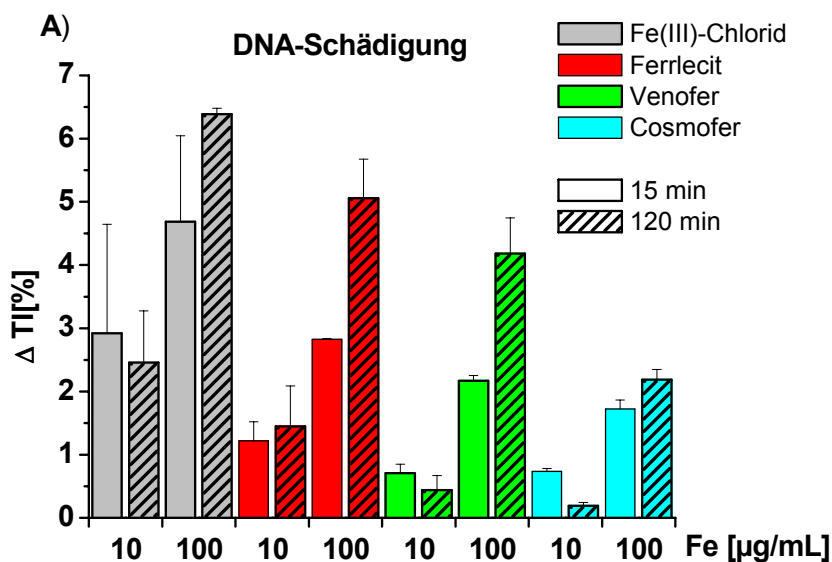


Abb. 5.1.A: (Oxidative) DNA-Schädigung in U937-Zellen nach 15 und 120 min Inkubation mit Ferrlecit[®], Venofer[®], Cosmofer[®] und Fe(III)-Chlorid in den Konzentrationen 10 und 100 µg/ml. Dargestellt ist die Differenz der Tail Intensities von Messwert und jeweiliger unbehandelter Kontrolle als ΔTI [%]. Berechnet sind Mittelwerte und Range aus zwei unabhängigen Versuchen. Werte der unbehandelten Kontrollen: 6,4-7,7 TI%

b) Malondialdehyd

Der LPO-Marker MDA (Abb. 1.B) wurde in nahezu identischem Ausmaß durch die Komplexe Ferrlecit[®] und Venofer[®] gebildet. Nach Inkubation mit Cosmofer[®] lagen die MDA-Gehalte im Bereich der unbehandelten Kontrolle. Untersuchungen mit Fe(III)-Chlorid ergaben die im Vergleich niedrigsten Werte bei der 15-minütigen Inkubation, nach 120 min jedoch sind die Ergebnisse vergleichbar mit den Werten von Ferrlecit[®] und Venofer[®].

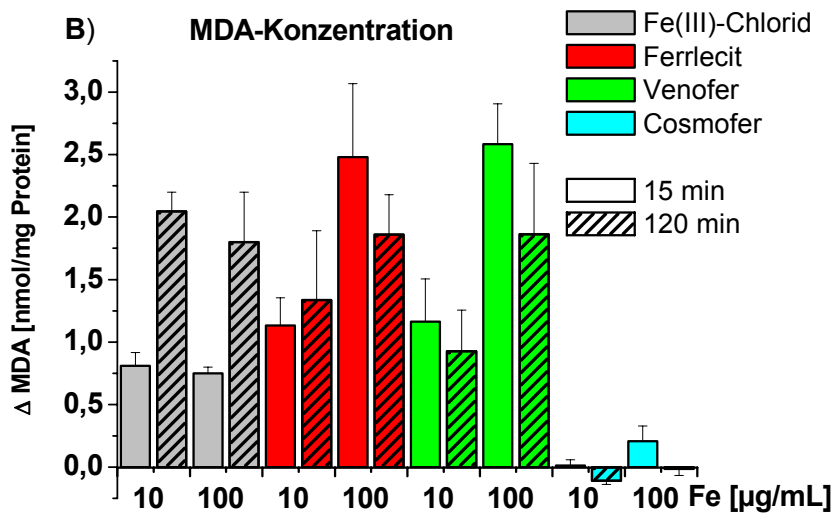
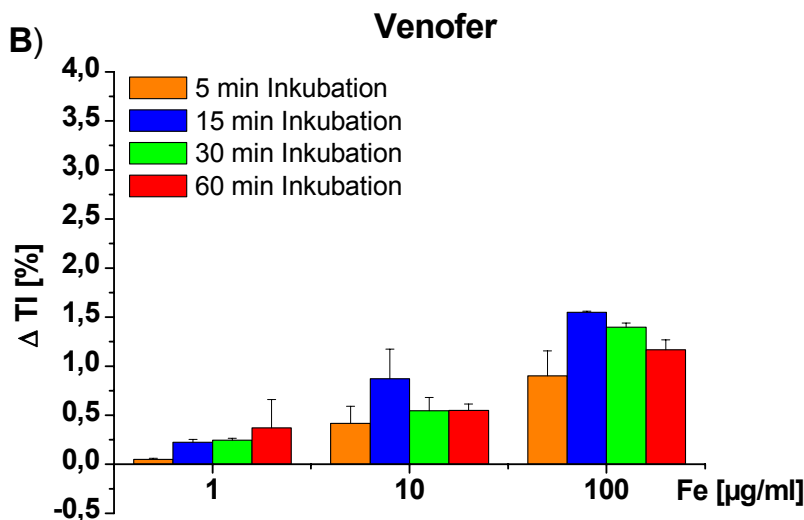
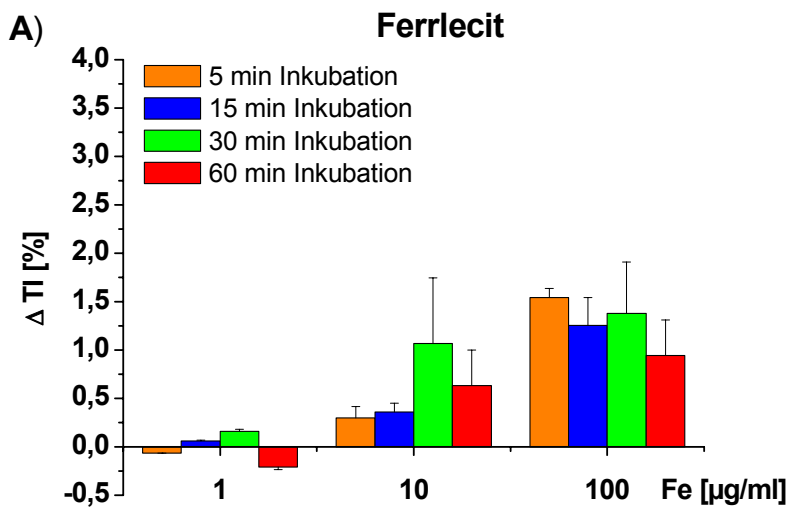


Abb. 5.1.B: MDA-Konzentration in U937-Zellen nach 15 und 120 min Inkubation mit Ferrlecit[®], Venofer[®], Cosmofer[®] und Fe(III)-Chlorid in den Konzentrationen 10 und 100 µg/ml. Dargestellt ist die Differenz der MDA-Konzentration von Messwert und unbehandelter Kontrolle als ΔMDA [nmol/mg Protein]. Berechnet sind Mittelwerte und Range aus zwei unabhängigen Versuchen. Werte der unbehandelten Kontrollen: 4-0,5 nmol/mg Protein

5.1.1.2. PBMCs

a) DNA-Schäden

In primären humanen Lymphozyten wurde für das Ausmaß der Induktion von DNA-Schäden durch die Eisenkomplexe (Abb. 5.2. A-C) folgendes Ranking erhalten: Ferrlecit[®] \approx Venofer[®] > Cosmofer[®]. Die Effekte waren konzentrationsabhängig. Eine Abhängigkeit der DNA-Schädigung von der Inkubationszeit (5 bis 60 min) wurde nicht beobachtet. Eisen(III)-Chlorid (Abb. 5.2. D) verursachte deutlich höhere Schäden als die Eisenkomplexe.



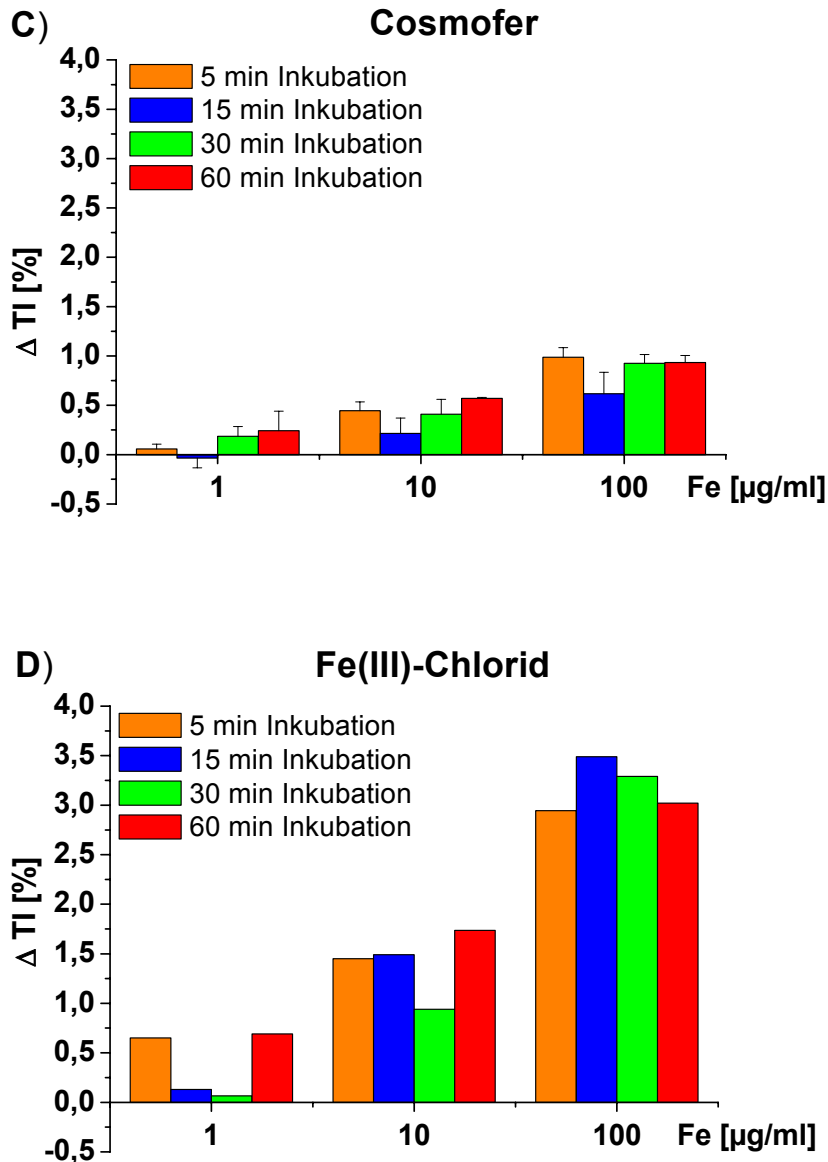
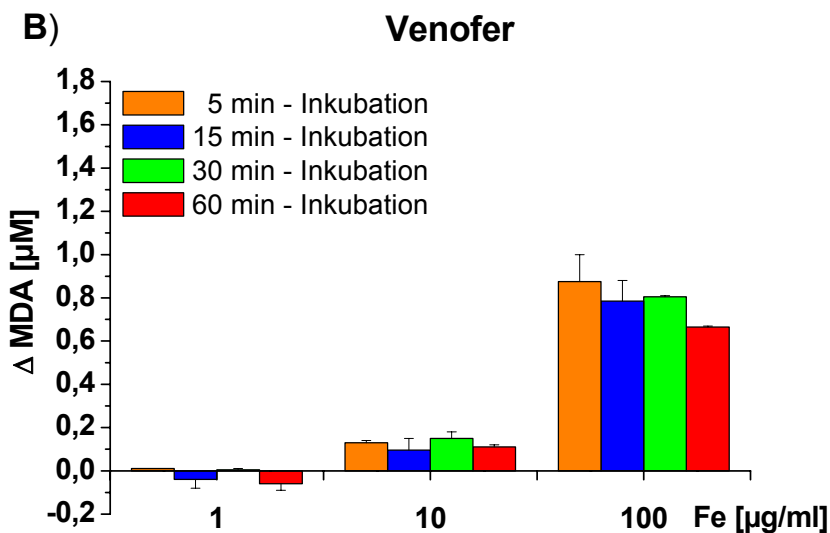
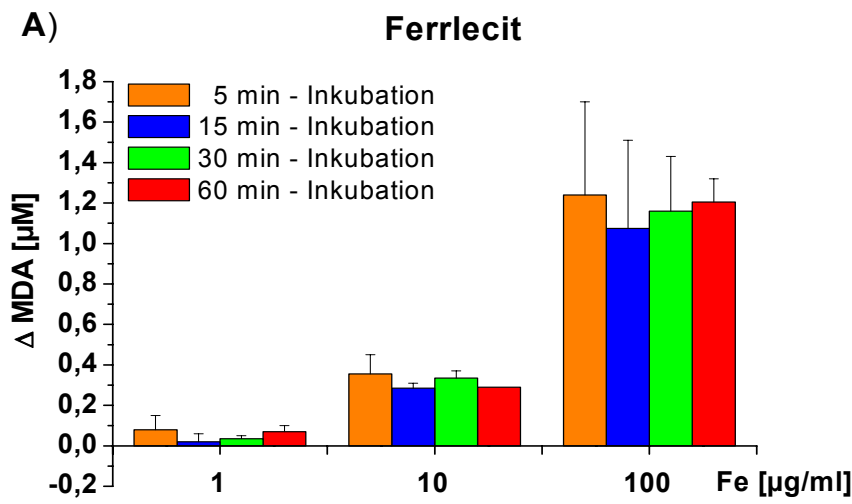


Abb. 5.2.A-D: (Oxidative) DNA-Schädigung in primären Lymphozyten nach 5 bis 60 min Inkubation mit A) Ferrlecit[®], B) Venofer[®], C) Cosmofer[®] und D) Fe(III)-Chlorid. Dargestellt ist die Differenz der Tail Intensities (TI%) von Messwert und unbehandelter Kontrolle als $\Delta TI\%$. Berechnet sind Mittelwerte und Range aus zwei unabhängigen Experimenten, außer für D): n=1. TI % der unbehandelten Kontrollen: A) 3,3-5,3 B): 4,5-5,3; C): 4,4-5,0; D): 5,3-5,9

b) Malondialdehyd

Die MDA-Bildung variierte substanzabhängig bei Inkubation von Lymphozyten mit den Eisenkomplexen (Abb. 5.3. A-C): 100 µg/ml: Ferrlecit® > Venofer® > Cosmofer®; 10 µg/ml: Ferrlecit® > Venofer® ≈ Cosmofer®. Eisen(III)-Chlorid (100 µg/ml, Abb. 5.3.D) generierte unter diesen Bedingungen deutlich weniger MDA als Ferrlecit. Eine Abhängigkeit der MDA-Bildung von der Inkubationszeit war analog zur DNA-Schädigung in Lymphozyten nicht nachweisbar.



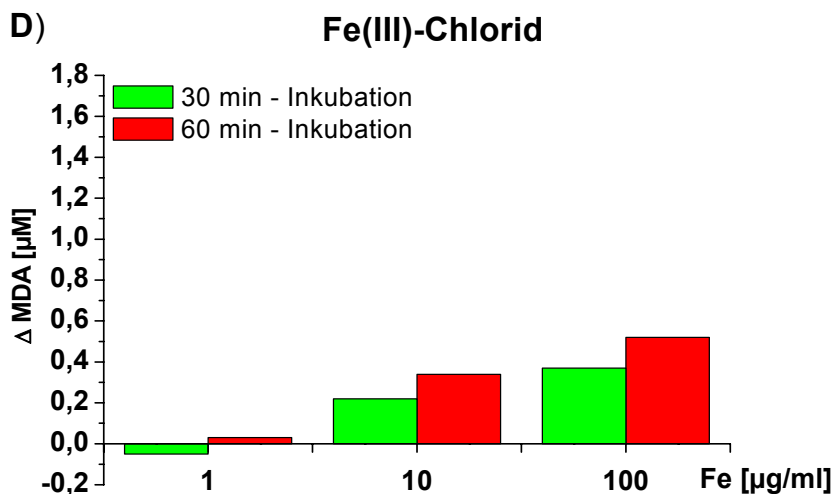
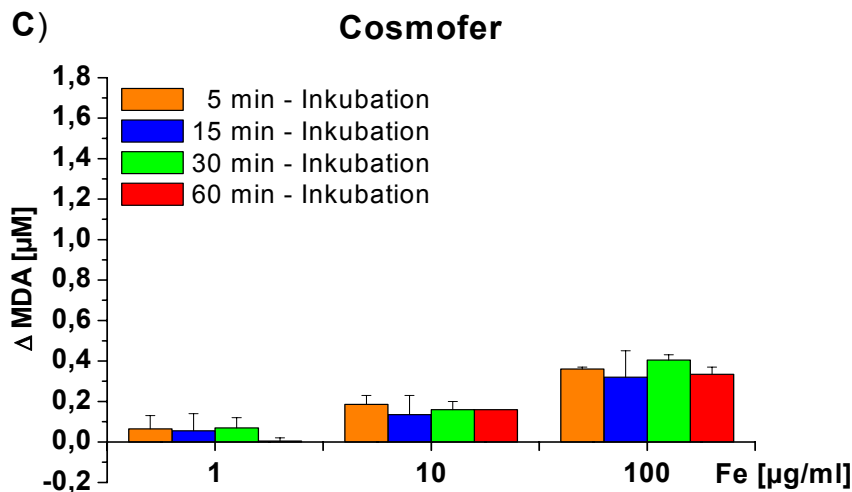
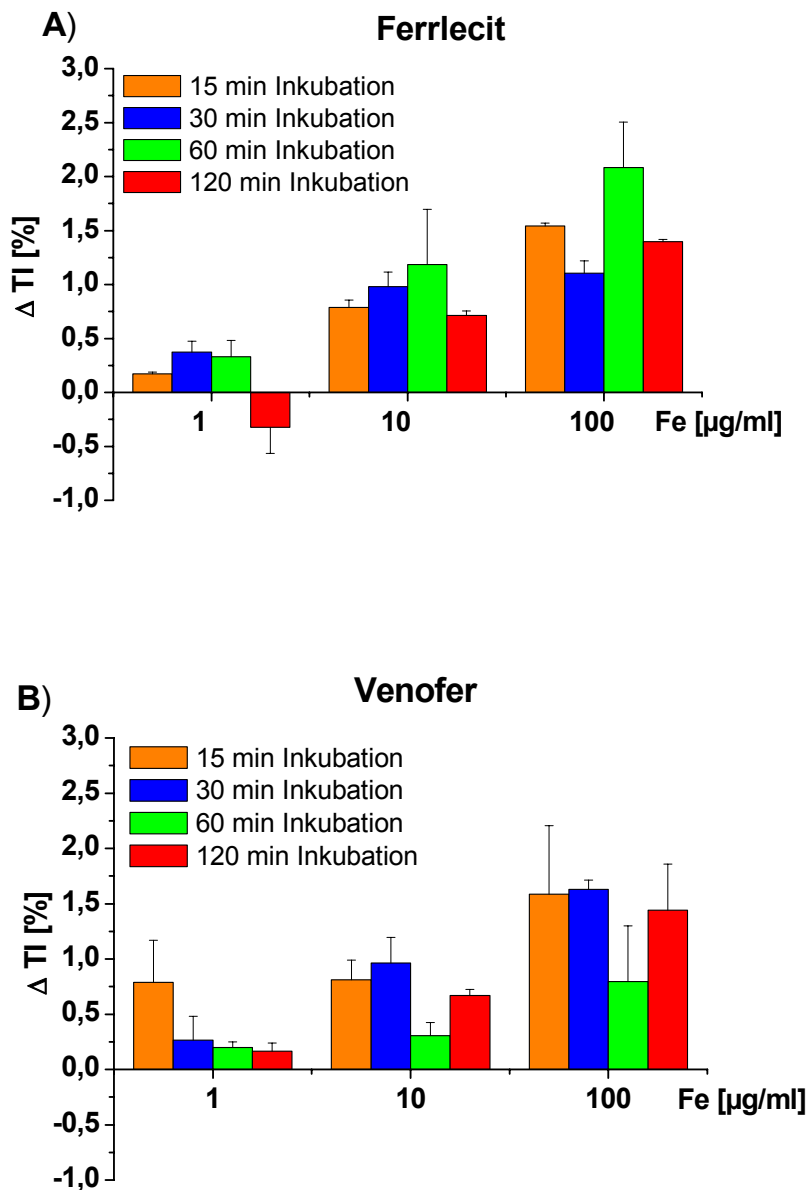


Abb. 5.3.A-D: MDA-Bildung in primären Lymphozyten nach 5 bis 60 min Inkubation mit A) Ferrlecit[®], B) Venofer[®], C) Cosmofer[®] und D) Fe(III)-Chlorid. Dargestellt ist die Differenz der MDA-Konzentration (im Inkubationsmedium) von Messwert und unbehandelte Kontrolle als Δ MDA [μ M]. Berechnet sind Mittelwerte und Range aus zwei unabhängigen Versuchen außer für D): n=1. MDA [μ M] der Kontrollwerte: A):0,1-0,3; B):0,02-0,2; C):0,1-0,3; D):0,04/0,2

5.1.1.3. Vollblut

a) DNA-Schäden

Die Induktion (oxidativer) DNA-Schädigung durch die Eisenkomplexe bei 15 bis 120 minütiger Inkubation von Vollblut ist in Abb. 5.4 dargestellt. Die Reihung der Verbindungen nach Wirkstärke entsprach der in U937-Zellen und Lymphozyten: Ferrlecit® > Venofer® > Cosmofer®. Das Ausmaß der Schäden war proportional zur Konzentration der Verbindungen; ein Einfluss der Inkubationszeit wurde nicht beobachtet.



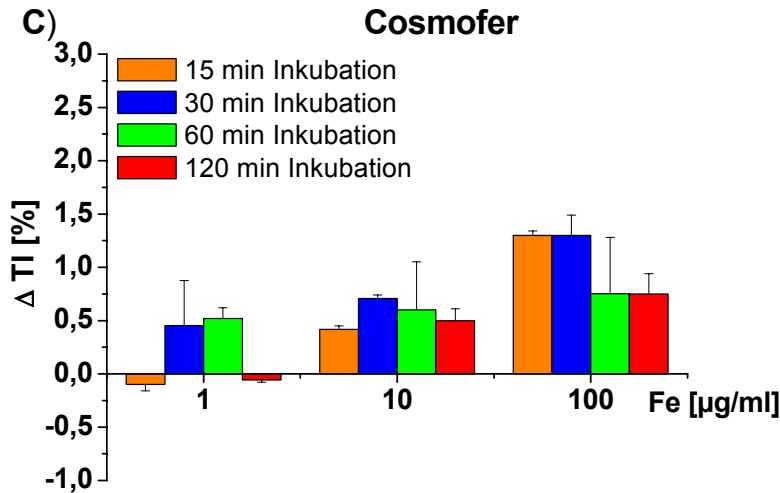
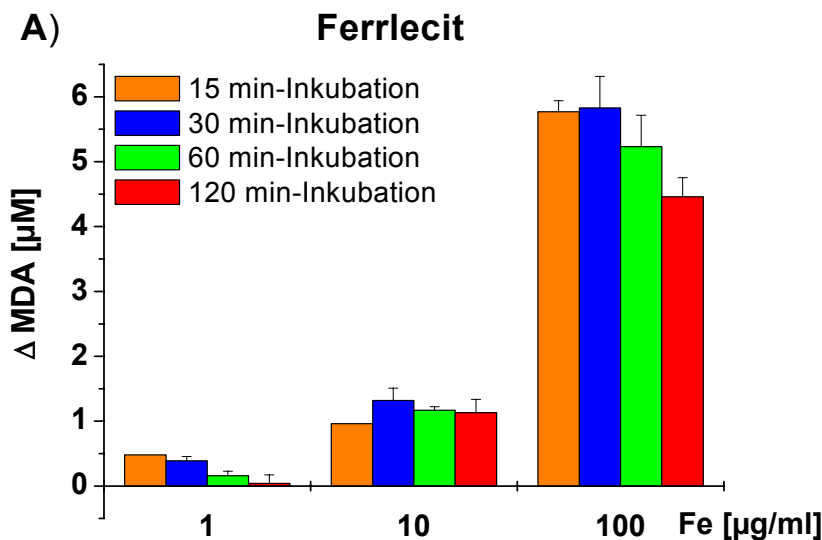


Abb. 5.4.A-C: (Oxidative) DNA-Schädigung in Leukozyten nach 15-120 min Inkubation von Vollblut mit A) Ferrlecit[®], B) Venofer[®] und C) Cosmofer[®]. Dargestellt ist die Differenz der Tail Intensities (TI%) aus Messwert minus unbehandelter Kontrolle als Δ TI%. Berechnet sind Mittelwerte und Range aus zwei unabhängigen Experimenten. TI % der Kontrollwerte: A): 3,4-5,1; B): 4,1-5,3; C): 3,0-3,8

b) Malondialdehyd

Die MDA-Konzentration in Plasma (Abb. 5.5) nach Inkubation von Vollblut war vergleichbar nach Ferrlecit[®]- und Venofer[®]-Behandlung, Cosmofer[®] dagegen induzierte wesentlich geringere MDA-Gehalte. Der Einfluss der Konzentration der Eisenkomplexe auf den MDA-Gehalt im Plasma war deutlich ausgeprägt, die Inkubationszeit hatte keinen Einfluss.



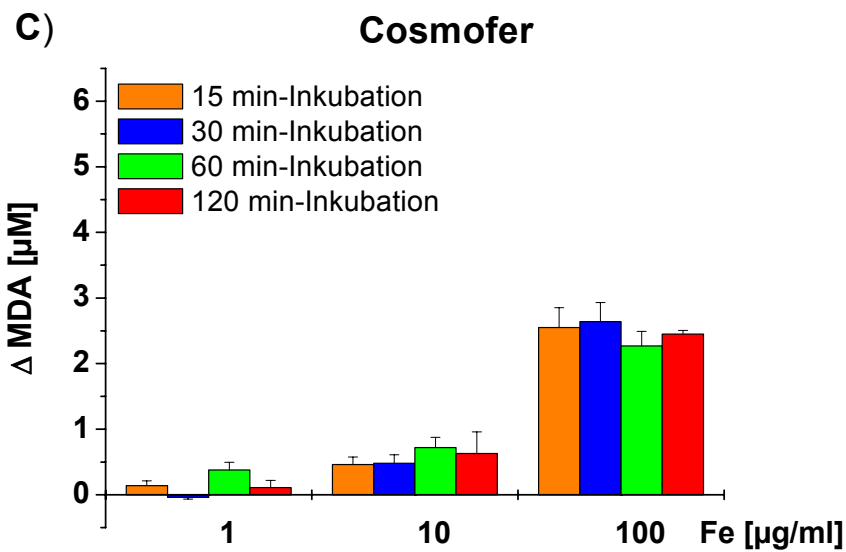
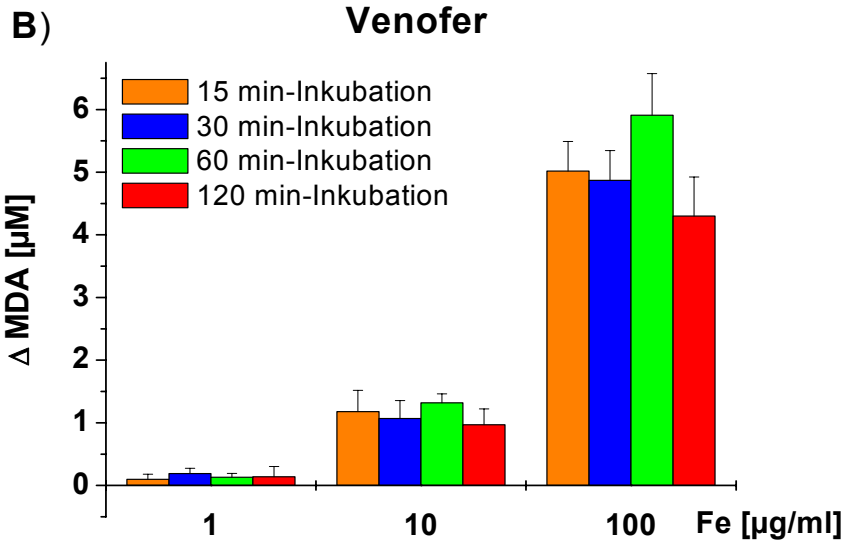


Abb. 5.5.A-C: MDA-Konzentration in Plasma nach 15 bis 120 min Inkubation von Vollblut mit A) Ferrlecit[®], B) Venofer[®], und C) Cosmofer[®]. Dargestellt ist die Differenz der MDA-Konzentration aus Messwert minus unbehandelter Kontrolle als Δ MDA [μ M]. Berechnet sind Mittelwerte und Range aus zwei unabhängigen Experimenten. MDA [μ M] der Kontrollwerte: A): 1,0-2,4; B): 0,5-1,6; C): 0,6-3,0

5.1.2. HD-Patienten

Die gezeigten in vitro Ergebnisse lassen auf erhöhten oxidativen Stress, der vor allem durch Ferrlecit[®] verursacht wird, schließen. Vergleichend wurde fünf Patienten des Westfalzklinikums (Behandlung mit Ferrlecit[®], dem Standard-Medikament) vor und nach der Applikation Blut entnommen und auf DNA-Schäden, Glutathionstatus und Malondialdehydgehalt untersucht.

5.1.2.1. DNA-Schäden

Die DNA-Schäden HD-Patienten, der eigentlichen Zielgruppe dieser Arbeit, zeigten einen deutlichen Anstieg nach der etwa 30-minütigen Ferrlecit[®]-Infusion (Abb. 5.6). Die oxidativen DNA-Schäden der Patienten 1,2 und 3 waren bereits direkt am Ende der in etwa 30minütigen Infusionsdauer des Eisen-Medikamentes erhöht (Zeitpunkt B). Die Werte der Patienten 4 und 5, die vergleichsweise hohe Ausgangschäden aufwiesen (Zeitpunkt A), waren 10 und 30 min nach dem Ende der Ferrlecit[®]-Infusion erhöht (Zeitpunkte C und D).

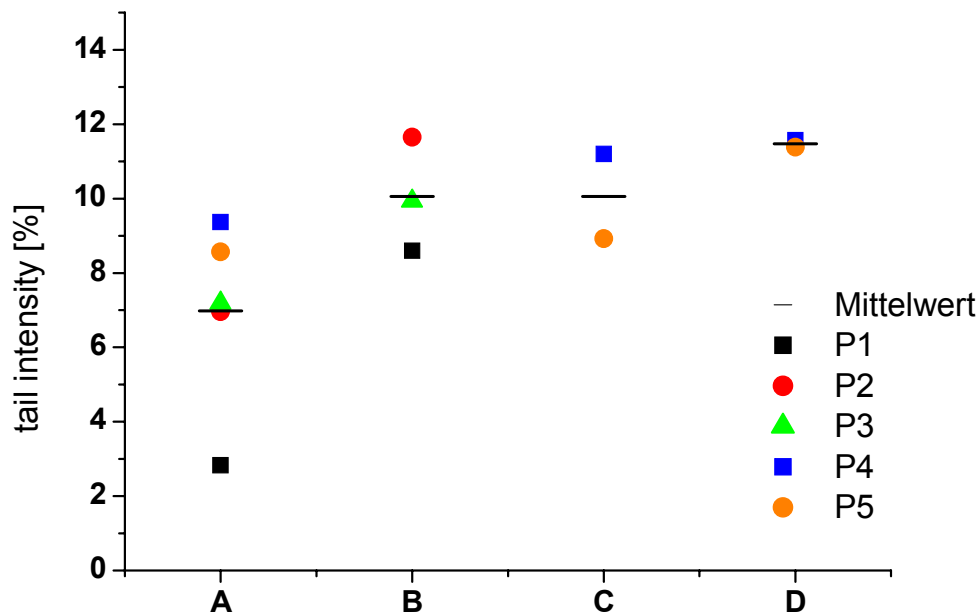


Abb. 5.6: Oxidative DNA-Schäden bei Ferrlecit[®]-Behandlung der 5 Patienten direkt vor (A, 5 Patienten), direkt nach (B, 3 Patienten), 10 min (C, 2 Patienten) und 30 min (D, 2 Patienten) nach Eisengabe (n = 1, orientierende Untersuchung); Mittelwert; 40 min Elektrophorese

5.1.2.2. Glutathionstatus

Zu keinem der untersuchten Zeitpunkte war eine deutliche Änderung des Glutathionstatus der HD-Patienten durch die Ferrlecit®-Infusion zu erkennen (Abb. 5.7). Die stärksten Veränderungen zeigten Patient 1 (+3,5%) und Patient 3 (-0,7%).

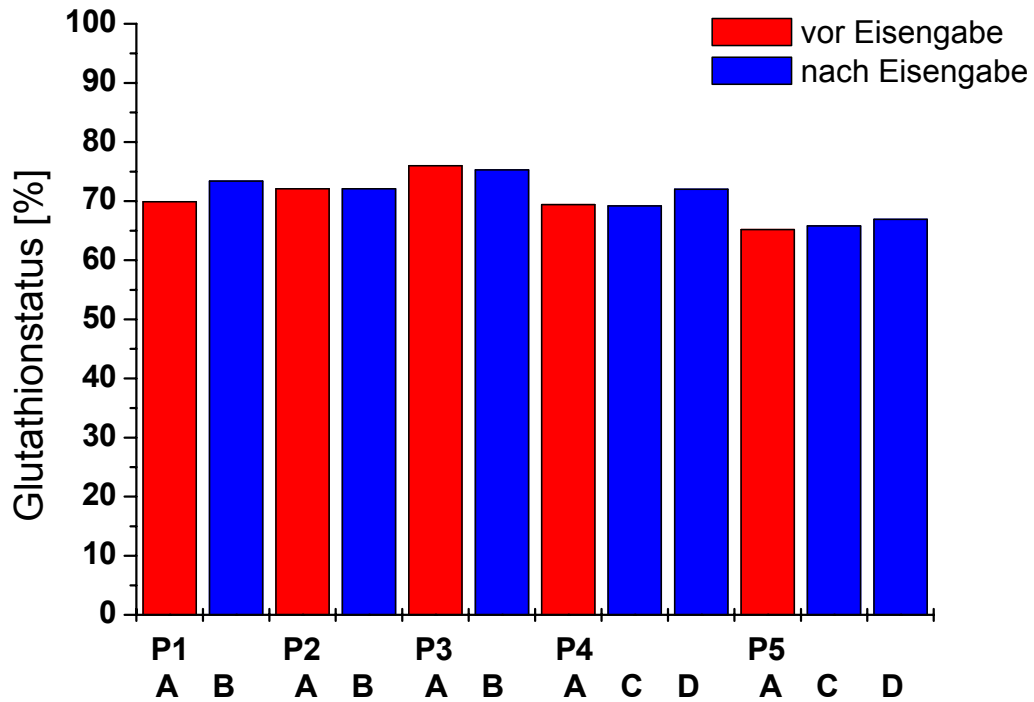


Abb. 5.7: Glutathionstatus der 5 Patienten direkt vor (A), direkt nach (B), 10 min (C) und 30 min (D) nach Ferrlecit®-Behandlung (n = 1, orientierende Untersuchung)

5.1.2.3. Malondialdehyd

Bei sämtlichen Messpunkten nach Ende der Ferrlecit[®]-Infusion konnte ein deutlicher Anstieg nachgewiesen werden (Abb. 5.8). Direkt nach der Infusion waren die Werte durchschnittlich um etwa 40% erhöht. 10 min nach der Eisengabe wurden die höchsten MDA-Konzentrationen gemessen, nach 30 min erfolgte ein leichter Rückgang. Dieser Verlauf könnte durch die hohe Reaktivität von MDA zustande kommen, bereits nach 30 min war die Maximalkonzentration erreicht. Allerdings ist wegen der ungleichen Messpunktverteilung bei der Interpretation eine gewisse Vorsicht geboten. Kein Patient wurde zu allen drei Zeitpunkten nach der Eisengabe untersucht, wodurch der zeitliche Verlauf der MDA-Konzentration verfälscht worden sein könnte. Eine generelle Erhöhung des MDA-Gehaltes durch die Ferrlecit[®]-Infusion ist nach diesen Ergebnissen jedoch klar zu erkennen.

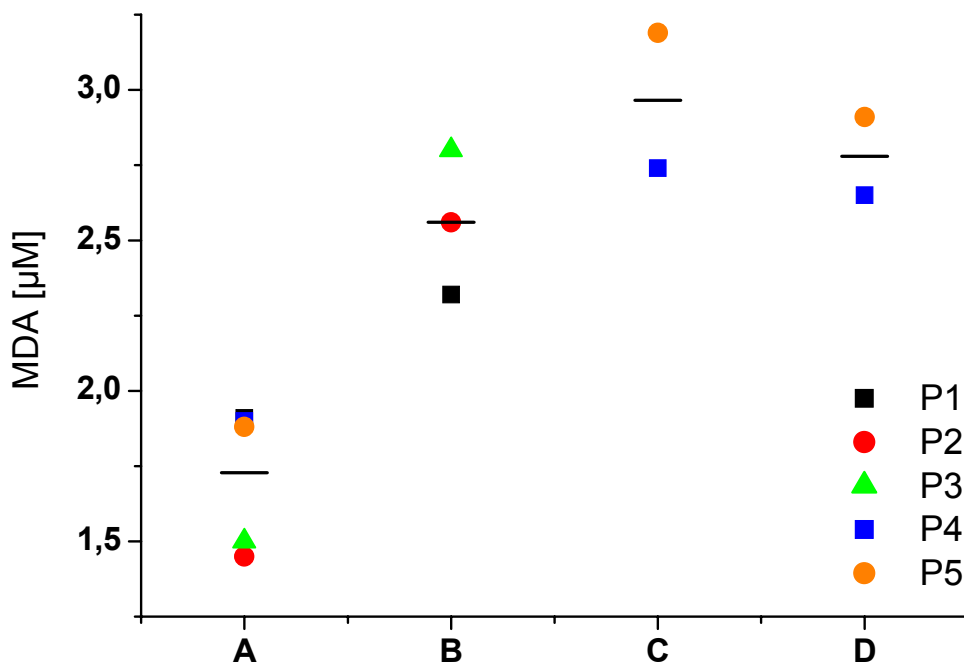


Abb 5.8: MDA-Konzentration der Patienten 1 bis 5 direkt vor (A, 5 Patienten), direkt nach (B, 3 Patienten), 10 min (C, 2 Patienten) und 30 min (D, 2 Patienten) nach Ferrlecit[®]-Behandlung (n = 1, orientierende Untersuchung), inklusive Mittelwert

5.1.3. Diskussion der Untersuchungen mit Eisenpräparationen

5.1.3.1. In vitro-Untersuchungen

Die Untersuchungen der Zellschädigung durch Ferrlecit[®] (FL), Venofer[®] (VF) und CosmoFer[®] (CF) bei U937-Zellen (5.1.1) zeigen eine biomarkerabhängige Rangfolge. Bei der DNA-Schädigung lautet sie FL > VF > CF, bei der MDA-Bildung erhält man für FL und VF ähnliche Werte, wohingegen CF nahezu kein zusätzliches MDA (im Vergleich zur Kontrolle) gebildet hat. In zusätzlichen Untersuchungen wurden die Auswirkungen von Fe(III)-Chlorid getestet; beim Comet Assay ergaben sich die im Vergleich zu den Eisen-Medikamenten höchsten DNA-Schäden. Die MDA-Bestimmung lieferte für Fe(III)-Chlorid die niedrigsten Werte bei der 15-minütigen Inkubation, nach 120 min jedoch sind die Ergebnisse vergleichbar mit den Werten von FL und VF.

Zager et al. haben bei ihren Untersuchungen zur Zellschädigung durch Eisen-Glukonat, -Saccharat und -Dextran eine ausgeprägte Abhängigkeit von den jeweils untersuchten Zellen oder Geweben beschrieben [Zager et al., 2002; Zager et al., 2004]. So verursacht Eisen-Dextran in Homogenaten des renalen Cortex und im Plasma von Mäusen die höchsten MDA-Gehalte, wohingegen es in isolierten proximalen Tubulus-Segmenten die geringsten Mengen MDA bildet [Zager et al., 2004]. Neuere Untersuchungen [Zager et al., 2006] weisen darauf hin, dass die Anwesenheit von funktionsfähigen Mitochondrien (der Normalfall in lebendem Gewebe, im Homogenat inaktiviert) den starken Effekt von Eisen-Dextran relativiert, da es keine negativen Auswirkungen auf die mitochondriale Atmungskette zu haben scheint, die anderen beiden Eisenverbindungen hier jedoch eine deutliche Erhöhung der LPO bewirken. Eine solche Abhängigkeit der Ausprägung von Schäden von den untersuchten Zellen/Geweben oder den unterschiedlichen zur Inkubation verwendeten Konzentrationen der Eisenpräparate ist auch bei den Ergebnissen der eigenen Untersuchungen erkennbar.

Für die Zell-Linie U937 und für isolierte Lymphozyten waren in der Literatur keine Angaben von MDA-Messwerten in Abhängigkeit von verschiedenen Eisenpräparaten verfügbar, deshalb erfolgt ein Vergleich mit dem MDA-Gehalt von Mäuseblut [Zager et al., 2004]. Die MDA-Konzentrationen der U-937 Zellen von 0,1 µM (CF) - 4,2 µM (VF) sind niedriger als bei Plasma-Proben von Mäusen (6 µM -10 µM), die bei isolierten Lymphozyten erhaltenen Ergebnisse zeigen ebenfalls deutlich geringere

Ergebnisse und erste Diskussion

MDA-Konzentrationen (0,5 – 1,5 μM). Dies kann durch die deutlich geringere oxidierbare Biomasse der pro Versuch verwendeten 4 Mio. U937-Zellen/ml bzw. 1 Mio. Lymphozyten/ml im Vergleich zu dem bei den Untersuchungen mit Mäusen verwendeten Plasma erklärt werden [Zager et al., 2004], allerdings können auch die bereits erwähnten gewebespezifischen Unterschiede dafür verantwortlich sein.

Bei den isolierten Lymphozyten ergab sich für die Reihenfolge der MDA-Gehalte $\text{FL} > \text{VF} > \text{CF}$ für hohe, $\text{FL} > \text{VF} \approx \text{CF}$ für niedrige Konzentrationen, beim Comet Assay $\text{FL} \approx \text{VF} > \text{CF}$. Zusätzliche Untersuchungen mit Fe(III)-Chlorid führten zu einer geringen MDA-Konzentration (Werte zwischen VF und CF), aber zur stärksten DNA-Schädigung.

Die in vitro-Inkubation von Vollblut eines gesunden Probanden zeigte, dass FL die höchsten DNA-Schäden verursacht, gefolgt von VF und CF mit den geringsten Gehalten. Für die MDA-Konzentrationen, die mit 5 – 6 μM im unteren Bereich der Literatur (in vitro und im Tierversuch) liegen [Zager et al., 2004], gilt $\text{FL} \approx \text{VF} > \text{CF}$.

Eine für alle Konzentrationen und alle untersuchte Zellsysteme gültige Rangabfolge der verschiedenen Eisen(III)-hydroxid-Kohlenhydrat-Komplexe konnte nach den vorliegenden Ergebnissen nicht aufgestellt werden, da sich die Abfolge z. T. mit der Konzentration der Eisenpräparate verändert. Die bei den U937-Zellen gezeigte Steigerung der DNA-Schäden bei längerer Inkubationszeit (2h, Abb. 5.1. A) war bei den MDA-Untersuchungen (Abb. 5.1. B) sowie bei isolierten Lymphozyten (Abb. 5.2 und 5.3) und Vollblut (Abb. 5.4 und 5.5) nicht nachweisbar. Diese inkonsistenten Ergebnisse bestärken die in der Literatur (für in vitro-Untersuchungen und Tierversuche an Mäusen) erwähnte Abhängigkeit des Schädigungsmaßes durch Eisen-Präparate von dem untersuchten Zell-System oder Gewebe (siehe S. 144) [Zager et al., 2002; Zager et al., 2004].

In verschiedenen Studien wurden die drei genannten Typen von Eisen-Medikamenten (Glukonat, Saccharat, Dextran) bereits miteinander verglichen, wobei sowohl in in vitro [Geisser et al., 1992; Zager et al., 2002; Zager et al., 2004] als auch durch in vivo-Untersuchungen [Pai et al., 2007] gezeigt werden konnte, dass die einzelnen Typen tendentiell über unterschiedlich starkes cytotoxisches Potential verfügen, wobei CF generell als die verträglichste Eisen-Präparation gilt: $\text{VF} > \text{FL} > \text{CF}$.

Es wurde auch bestätigt, dass umso weniger Eisenionen freigesetzt werden, je stabiler der betreffende Komplex ist [Zager et al., 2004], was die Vermutung, CF sei

das verträglichste der getesteten Eisenverbindungen, bestätigt: CF hat die höchste Eliminations-Halbwertszeit für Eisen (Elimination aus dem Kohlehydrat-Komplex, siehe 3.1.3.2). Der zylinderförmige Dextran-Komplex von CF erreicht durch seine dreidimensionale Struktur eine deutlich bessere Komplexbildung des Eisens als die eher kettenförmigen Glukonate und Saccharate. Somit ist bei CF die Gefahr einer Transferrinübersättigung durch zu schnelle Freisetzung des Eisens aus dem Komplex und dem damit zusammenhängenden gesteigerten oxidativen Stress (z. B. infolge der Fenton-Reaktion, siehe 3.1.1) im Vergleich zu FL und VF am Geringsten.

5.1.3.2. Untersuchungen bei HD-Patienten

Die DNA-Schäden der HD-Patienten (5.1.3) zeigten einen deutlichen Anstieg, bereits direkt nach Ende der etwa 30-minütigen Ferrlecit[®]-Infusion und bei sämtlichen Messpunkten nach Ende der Infusion konnten deutlich erhöhte Werte nachgewiesen werden.

Die MDA-Gehalte im Plasma waren ebenfalls bei allen Messpunkten nach Ende der Infusion deutlich erhöht. Eine Aussage über die genauen Werteverläufe nach der Ferrlecit[®]-Gabe (bei beiden Biomarkern) kann aufgrund der Tatsache, dass nicht alle Patienten zu allen Zeitpunkten Blut entnommen bekamen, leider nicht gemacht werden. Es ist allerdings erkennbar, dass der Großteil der Schäden innerhalb der 30 min, in der das Ferrlecit[®] appliziert wird, entsteht.

Ergebnisse von Müller et al. [Müller et al. 2004] zeigen vergleichbare MDA-Gehalte nach Ferrlecit[®]-Infusion (62,5 mg Fe), die bereits 5 min danach ihren Maximalwert erreichten. Es muss dabei jedoch berücksichtigt werden, dass die Infusion nur 5 min dauerte, was zu einer deutlich höheren Anfangskonzentration an freiem Eisen im Blut geführt haben dürfte. Der Vergleich der MDA-Gehalte vor der Eisen-Gabe mit Literaturangaben zeigt eine gute Übereinstimmung mit Müller et al. [Müller et al. 2004] und Dursun et al. [Dursun et al., 2002], liegen aber generell im unteren Wertebereich (Tab. 5.1). Der Vergleich wird jedoch dadurch erschwert, dass die in der Literatur bestimmten Lipidperoxidationsprodukte oft nicht nur MDA waren, sondern auch andere Aldehyde wie 4-Hydroxynonenal oder TBARS miterfasst wurden und dadurch, dass bei manchen Untersuchungen (Usberti et al., 1999; Donica et al., 2001; Dursun et al., 2002) keine Eisen-Medikamente verabreicht wurden.

Tabelle 5.1: Literatur-Übersicht über Konzentrationen von LPO-Produkten im Plasma von Patienten vor HD und Probanden; 4-HNE: 4-Hydroxynonenal

Zitat/Endpunkt	MDA [μM]	
	Patienten	Probanden
Eiselt et al., 2000: TBARS	3,1	3,4
Eiselt et al., 2001: TBARS	~4	3,05
Dursun et al., 2002: TBARS	1,5	1,3
Weinstein et al., 2000: TBARS	2,37	0,97
Donica, 2001: MDA, 4-HNE	10,12	2,02
Usberti et al., 1999; Gerardi et al., 2002; Usberti et al., 2002a; Usberti et al., 2002b: MDA, 4-HNE	~1,6	~0,41
Roob et al., 2000: MDA-HPLC	0,87	-
Daschner et al., 1996: MDA-HPLC	0,385	0,15
Müller et al., 2004: MDA-HPLC	1,56	1,65
Eigene Ergebnisse (MDA-HPLC)	1,73	-

Wie die Abbildung 5.7 (siehe 5.1.3.2) zeigt, wurde der Glutathionstatus der 5 HD-Patienten durch die Ferrlecit[®]-Infusion (62,5 mg Fe-Glukonat) zu keinem der untersuchten Zeitpunkte erkennbar beeinflusst. Zur Abhängigkeit des Glutathionstatus von der intravenösen Applikation von Eisen-Medikamenten sind, soweit bekannt, noch keine Untersuchungen beschrieben worden. Ebenso unverändert wie der Status war der Glutathionspiegel (tGSH) der 5 HD-Patienten, was mit den Untersuchungen von Nguyen-Khoa et al. (100 mg Maltofer[®], Eisen(III)-Polymaltose-Komplex) [Nguyen-Khoa et al., 2001] übereinstimmt. Lim et al., fanden bei HD-Patienten nach Infusion von 100 mg Fe-Saccharat allerdings signifikant erhöhte tGSH-Werte [Lim et al., 1999]. Jedoch wurden bei allen drei Studien unterschiedliche Eisen-Medikamente und z. T. andere Dosen gewählt und somit ist die Vergleichbarkeit eingeschränkt. Des Weiteren ergaben sich keine Abhängigkeiten der Glutathionperoxidase (GPx)- oder Glutathion-S-Transferase (GST)-Aktivität von einer intravenösen Eisentherapie [Lim et al., 1999; Nguyen-Khoa et al., 2001].

Ergebnisse und erste Diskussion

Ein Literaturvergleich zeigt ähnliche tGSH-Werte [Ceballos-Picot et al., 1996; Tarng et al., 2000; Ozden et al., 2002] wie in den eigenen Untersuchungen, die aber im Gesamtvergleich im unteren Wertebereich liegen (Tab. 5.2). Der gemessene Glutathionstatus ist der geringste von allen, am ehesten noch vergleichbar mit Tarng et al. [Tarng et al., 2000], was, ebenso wie der im Vergleich hohe Gehalt an GSSG, auf eine speziell bei den in der aktuellen Studie untersuchten HD-Patienten reduzierte antioxidative Abwehr hinweist. Die Konzentrationen an tGSH und GSSG variierten in der Literatur sehr stark (Faktor 4 bei tGSH und Faktor 6 bei GSSG, 25 % beim Status von HD-Patienten), was unter anderem an den unterschiedlichen Bestimmungsmethoden lag (kinetischer Assay, kommerzieller Kit mit kinetischem Assay, Derivatisierung und HPLC-Messung).

Tabelle 5.2: Literatur-Übersicht über tGSH/GSSG-Konzentrationen und Glutathionstatus im Vollblut von Patienten vor HD und Probanden

Zitat	tGSH [μM]		GSSG [μM]		Status [%]	
	HD-Patienten	Gesunde	HD-Patienten	Gesunde	HD-Patienten	Gesunde
Ceballos-Picot et al., 1996	620	766	57	87	81,6*	77,3*
Pasaoglu et al., 1996	769	1215	15,2	15,5	96*	97,4*
Ross et al., 1997	778	1276	-	-	-	-
Eiselt et al., 2000	1970	2450	-	-	-	-
Tarng et al., 2000	700	1079	93	75	73,4*	86,1*
Eiselt et al., 2001	1400	1950	-	-	-	-
Ozden et al., 2002	550	2028	-	-	-	-
Tarng et al., 2002	-	1020	-	80	-	84,3*
Müller et al., 2004	1040	1170	53	36	89,8	93,8
Eigene Ergebnisse	552	-	81	-	70,7	-

*: aus den veröffentlichten Daten berechnet

5.2. Interventionsstudie mit rotem Mischfruchtsaft

Eine Voruntersuchung an zwei HD-Patienten diente der Gewinnung weiterer Informationen bezüglich der Durchführbarkeit der Interventionsstudie (Optimierung der Blutentnahmezeiten, Prüfung auf Eignung der Biomarker). Nach drei Wochen Run-in-Phase erfolgte eine Aufnahme von 200 ml rotem Mehrfruchtsaft pro Tag über vier Wochen. Blutentnahmen erfolgten am Anfang und am Ende der HD. Untersucht wurden DNA-Schädigung und Glutathionstatus sowie Malondialdehyd- und Proteincarbonyl-Konzentrationen. Es zeigte sich, dass die Blutentnahme nach HD bei allen vier Markern keine zusätzlichen, für die Saftintervention wichtigen Informationen lieferte, deshalb wurde in der Studie nur noch vor HD Blut entnommen. In der zehnwöchigen Interventionsstudie mit 21 Probanden wurde die protektive Effizienz eines roten anthocyanreichen Mehrfruchtsaftes mit besonders hoher antioxidativer Kapazität (siehe 3.4.2) bei HD-Patienten mit erhöhtem oxidativen Stress untersucht. Es nahmen ausschließlich Nichtraucher mit normalen Essgewohnheiten und gutem Gesundheitszustand (Ausschlusskriterien siehe Anhang 11.3.1) an der Studie teil. Sie verzichteten während der Studiendauer auf die Aufnahme von Supplementen (z.B. Vitamine) und Nahrungsmitteln mit hohem Gehalt an Anthocyanen (z.B. rote Beeren und daraus hergestellte Produkte). Einmal wöchentlich wurde von den Probanden ein Ernährungsprotokoll ausgefüllt (Anhang 11.4.4).

Der zehnwöchige Studienverlauf gliederte sich jeweils in drei Phasen: Woche 1-3 als Run-in-Phase (R), Woche 4-7 als Saftaufnahme-Phase (S) und Woche 8-10 als Wash-out-Phase (W). Während der vierwöchigen Saftaufnahme-Phase konsumierten die Probanden täglich eine Saftmenge von 200 mL in zwei gleichen Portionen (siehe 4.1.2.2, Abbildung 4.1). Bestimmt wurden Biomarker der oxidativen Zellschädigung (Comet Assay, MDA, Proteincarbonyle) des zellulären Oxidationsstatus (GSH-Status), der Modulation der Zellantwort (tGSH-Bestimmung, NF κ B-Bindungsaktivität) sowie der Triglyceridgehalt, die antioxidative Kapazität (trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC) und die Harnsäurekonzentration. Die Untersuchungen wurden in Blut, Plasma oder Lymphozyten durchgeführt.

Im Folgenden werden für jeden untersuchten Biomarker Mittelwerte über alle Probanden wochen- und phasenweise sowie deren Einzelwerte dargestellt. Zur Prüfung auf Unterschiede zwischen den Interventionsphasen (Run-in/Saftaufnahme,

R/S; Wash-out/Saftaufnahme, W/S) wurden T-Test oder Wilcoxon-Test verwendet. Die Messungen erfolgten (außer bei den DNA-Schäden) nach Abschluss der Interventionsstudie patientenweise, d. h. eine Messung wird pro Patient mit Proben aller 10 Wochen durchgeführt. Damit wurde gewährleistet, dass die methodischen Schwankungen der jeweiligen Bestimmung in den Hintergrund traten.

Die einzelnen Ergebnisse der statistischen Berechnungen sind in Anhang 11.5 zusammengefasst.

5.2.1. DNA-Schäden

Die DNA-Grundschnäden zeigten während der gesamten Studiendauer keine signifikanten Änderungen und bewegen sich im Bereich der Kontrolle. Die DNA-Gesamtschnäden jedoch wurden während der Saftaufnahme deutlich reduziert (-46%, Abb. 5.9). Bei den wochenweise dargestellten Werten (Abb. 5.9.A) kann man einen leichten Anstieg der Gesamtschnäden in der Run-in Phase erkennen, gefolgt von einer Reduktion in der Woche 4. In den Wochen 5, 6 und 7 wurde ein Minimum erreicht, und in der Wash-out Phase stiegen die Gesamtschnäden wieder stetig an. Die Werte lagen in Run-in und Wash-out oberhalb, während der Saftaufnahme unterhalb der Werte der Kontrolle. Die Einzelwerte der DNA-Grundschnäden zeigten in Woche 1 noch relativ hohe inter- individuelle Schwankungen (v. a. die Patienten B und I fallen auf). Diese Schwankungen verringerten sich im Laufe der Studie und pendelten sich in einem Bereich von etwa 0,25-1 TI% ein. Ein eindeutiger Trend ist nicht zu erkennen, so zeigen beispielsweise die Patienten C und S einen Anstieg, die Patienten F und N hingegen eine Reduktion der Grundschnäden während der Saftaufnahme (Abb. 5.10 und Anhang 11.1). Bei den Gesamtschnäden ist der Rückgang der individuellen Schwankungen (abgesehen von den Patienten L und N in den Wochen 2 und 3) noch stärker ausgeprägt, in der Saftphase sind die Unterschiede zwischen den einzelnen Patienten sehr gering (Abb. 5.18 und 5.19). Der Intra-Assay Variationskoeffizient lag unter Verwendung von FPG bei 7,3%.

Ergebnisse und erste Diskussion

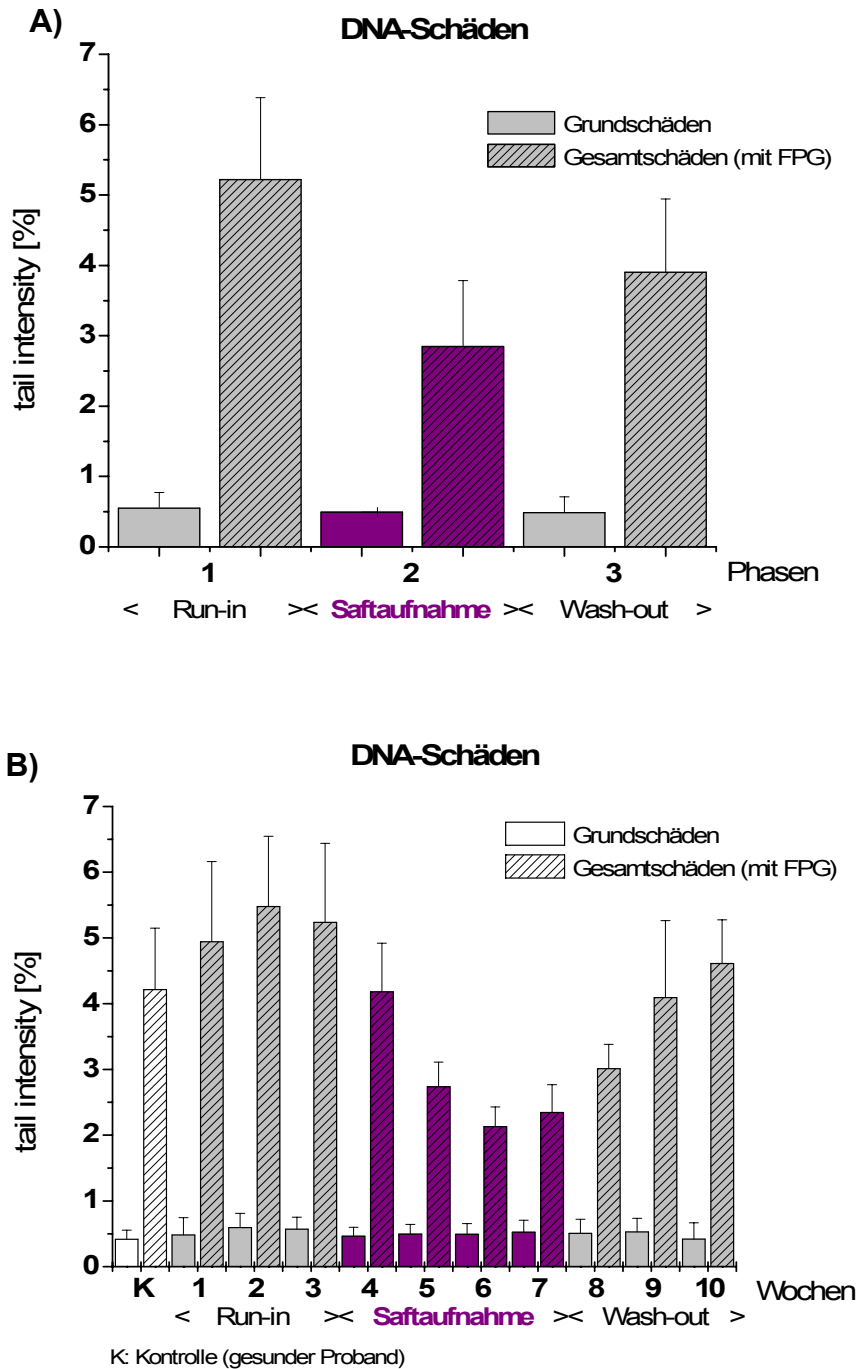


Abb. 5.9.A,B: DNA-Schäden (ohne/mit FPG), bestimmt in Vollblut. Mittelwert \pm SD; 21 Patienten; n=1; A) Phasenweise gemittelte Werte; einseitig gepaarter t-Test (Grundschiaden: R/S und W/S, $p > 0,05$; Gesamtschiaden: W/S, $p < 0,0001$); einseitiger Wilcoxon-Test (Gesamtschiaden: R/S, $p < 0,0001$); B) Wochenweise Darstellung; Kontrolle [TI%] Grundschiaden: $0,42 \pm 0,14$, Gesamtschiaden: $4,21 \pm 0,94$

Ergebnisse und erste Diskussion

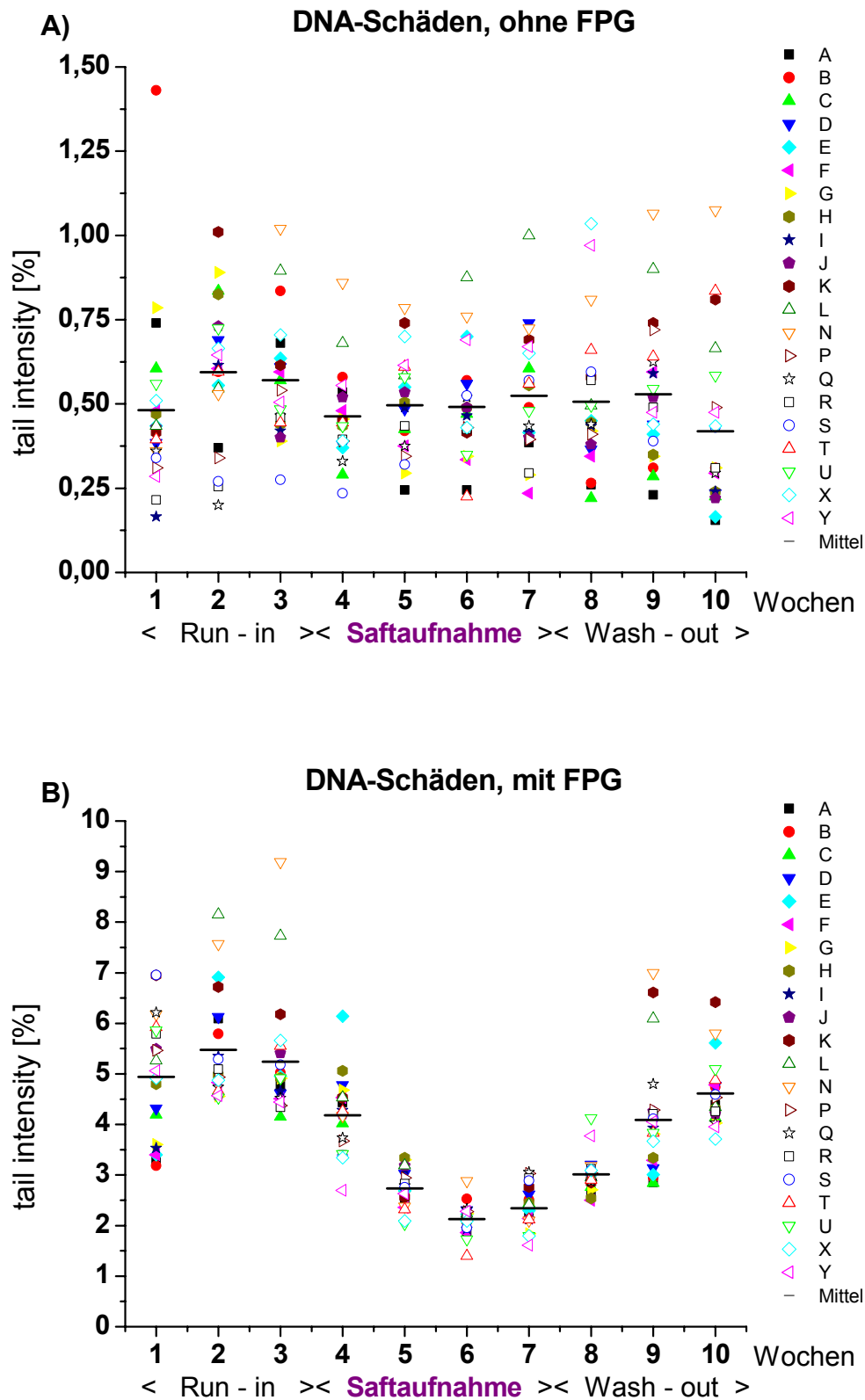


Abb. 5.10.A,B: DNA-Schäden, bestimmt in Vollblut. Darstellung der Einzelwerte der 21 Patienten und der Mittelwerte in den einzelnen Wochen; n=1; A) ohne FPG; B) mit FPG

Ergebnisse und erste Diskussion

Das Ausmaß an DNA Grund- und -Gesamtschäden während der Run-in Phase ist vergleichbar mit den Ergebnissen früherer Studien, die unterschiedliche Dialysemembranen zur Untersuchung von DNA-Schäden bei HD-Patienten benutzt haben [Kan et al., 2002; Müller et al., 2004]. Im Vergleich zu gesunden Probanden [Weisel et al., 2006] wurde vor allem bei den mit FPG behandelten Proben der Patienten deutlich höhere DNA-Schäden festgestellt, was den erhöhten oxidativen Stress bei der Hämodialyse widerspiegelt. Interventionen mit rotem Mischfruchtsaft oder anderen polyphenolreichen Säften zeigten ebenfalls eine signifikante Reduktion (oxidativer) DNA-Schädigung bei gesunden Probanden, was sowohl den Radikalfänger-Eigenschaften der Polyphenole als auch verstärkter Neusynthese endogener Antioxidantien und gesteigerter DNA-Reparaturaktivität infolge der Aufnahme von Früchten oder Fruchtsaft zugeschrieben wurde [Collins et al., 2001b; Collins et al., 2003; Weisel et al., 2006]. In Übereinstimmung mit den eigenen Ergebnissen (Werte in Woche 4) verzeichneten Bub et al. [Bub et al., 2003] einen verspäteten Rückgang der DNA-Schäden während der Saftaufnahme, was als Ergebnis einer Induktion antioxidativer Enzyme interpretiert wurde. Die verzögerte Reduktion der DNA-Schäden erklärt sich möglicherweise auch durch den Entstehungsort dieser Schäden: die ins Plasma gelangten Flavonoide müssen einige Barrieren überwinden, um die DNA zu erreichen: Plasmaproteine, Leukozytenmembran und -zytoplasma mit ihren antioxidativen Schutzmechanismen, Kernmembran und Histone.

Bei anderen Interventionsstudien mit gesunden Probanden wurden jedoch keine präventiven Effekte bezüglich der DNA-Schädigung beobachtet [Moller et al., 2003; Ramirez-Tortosa et al., 2004], weshalb man weitere Studien benötigen wird, um eine abschließende Bewertung vornehmen zu können. Eine Reduktion der DNA-Schäden bei HD-Patienten wurde durch Supplementierung mit Vitamin E erreicht [Domenici et al., 2005], Untersuchungen der DNA-Schädigung bei Aufnahme polyphenolreicher Lebensmittel allerdings wurden, soweit bekannt, bisher nicht durchgeführt.

5.2.2. Glutathion

In Abb. 5.20 ist ein signifikanter Anstieg des Glutathionspiegels (+ 13%) im Vollblut der Patienten während der Saftaufnahme zu erkennen, was auf eine Reduktion der durch den oxidativen Stress verursachten Glutathion-Depletion (infolge der Entlastung der endogenen Abwehrmechanismen durch exogene Antioxidantien) oder verstärkte Synthese hin deutet. Die Werte von Woche 1 zeigen einen geringeren Glutathionspiegel der HD-Patienten (588 μM) im Vergleich zur Kontrolle (785 μM). Während des Wash-out ging der Glutathionspiegel kontinuierlich zurück (Abb. 5.11). Bei den Einzelwerten fallen die hohen inter-individuellen Unterschiede der Patienten besonders auf (Abb. 5.12 und Anhang 11.1). Patient I hatte in Woche 1 mit einem Glutathionspiegel von 352 μM etwa 60% weniger Glutathion als Patient D (858 μM), während der Kurvenverlauf bei allen Patienten ähnlich war. Diese Differenz zwischen den Patienten ist wahrscheinlich auf individuelle metabolische Unterschiede und auf abweichende Ernährungsgewohnheiten zurückzuführen. Die höchsten Glutathionkonzentrationen wurden bei den Patienten G und L gemessen, die niedrigste bei Patient I (Abb. 5.12 und Anhang 11.1).

Das oxidierte Glutathion (GSSG) wurde durch die Saftaufnahme um 15% reduziert, bereits in Woche 4 ist ein maximaler Rückgang zu verzeichnen, in Woche 8 erreichten die Werte wieder das Ausgangsniveau (Abb. 5.13). Ähnlich wie beim Glutathionspiegel waren die inter-individuellen Unterschiede auch hier stark ausgeprägt, die Patienten I und P zeigten die niedrigsten GSSG-Konzentrationen, Patient X die höchste. Die einzelnen Werteverläufe der Patienten über die zehnwöchige Studie waren allerdings vergleichbar (Abb. 5.14 und Anhang 11.1). Dementsprechend ist in Abb. 5.15 eine hochsignifikante Verbesserung des Glutathionstatus in der Saftphase (+9%) zu erkennen, der bereits ab Woche 4 voll ausgeprägt zu sein scheint und von Woche 7 zu Woche 8 wieder sprunghaft abfällt. Die Patienten G und N hatten den höchsten, J und Y den geringsten Status (Abb. 5.16 und Anhang 11.1). Bei Patient I fiel auf, dass er sowohl den geringsten Glutathionspiegel als auch den niedrigste GSSG-Gehalt aufwies, was im Endeffekt aber zu einem durchschnittlichen Status führte.

Der Intra-Assay Variationskoeffizient für den Glutathionstatus lag bei 2,5%.

a) Glutathionspiegel

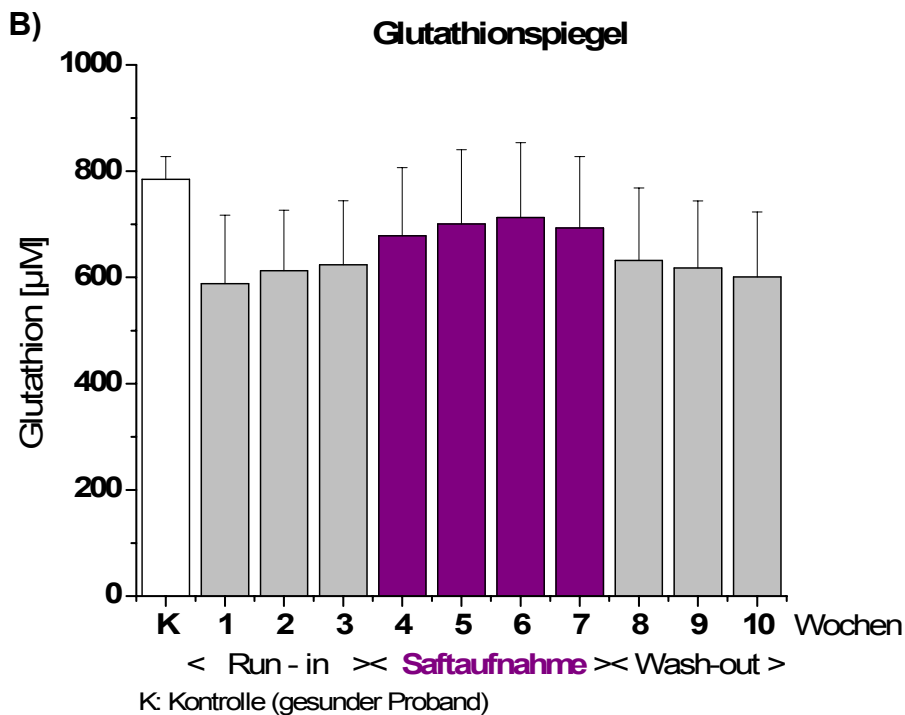
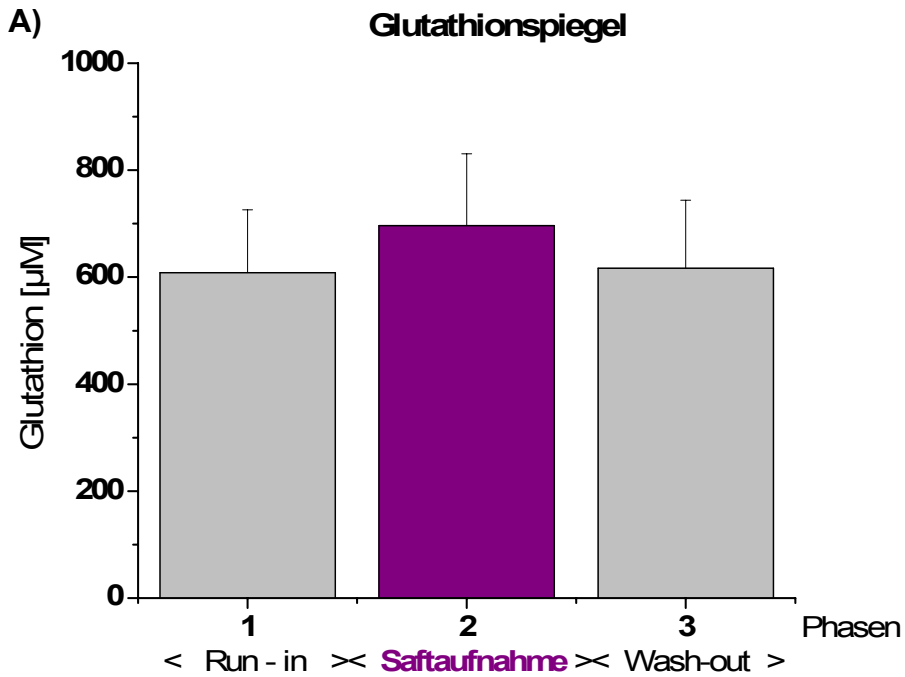


Abb. 5.11.A,B: Glutathionspiegel, bestimmt in Vollblut. Mittelwert \pm SD; 21 Patienten; n=3; A) Phasenweise gemittelte Werte; einseitig gepaarter t-Test (R/S und W/S, $p < 0,0001$; B) Wochenweise Darstellung; Kontrolle [μM]: $784,6 \pm 42,8$)

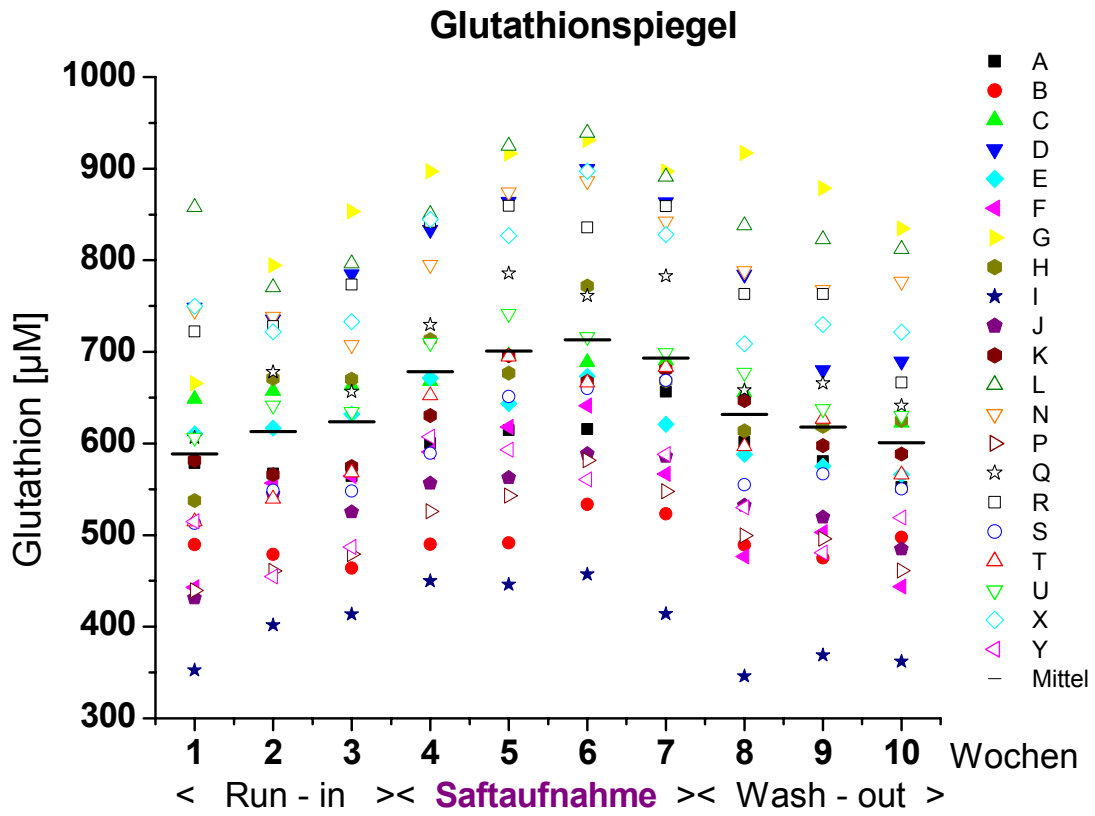


Abb. 5.12: Glutathionspiegel, bestimmt in Vollblut. Darstellung der Einzelwerte der 21 Patienten und der Mittelwerte in den einzelnen Wochen; n=3

b) Oxidiertes Glutathion (GSSG)

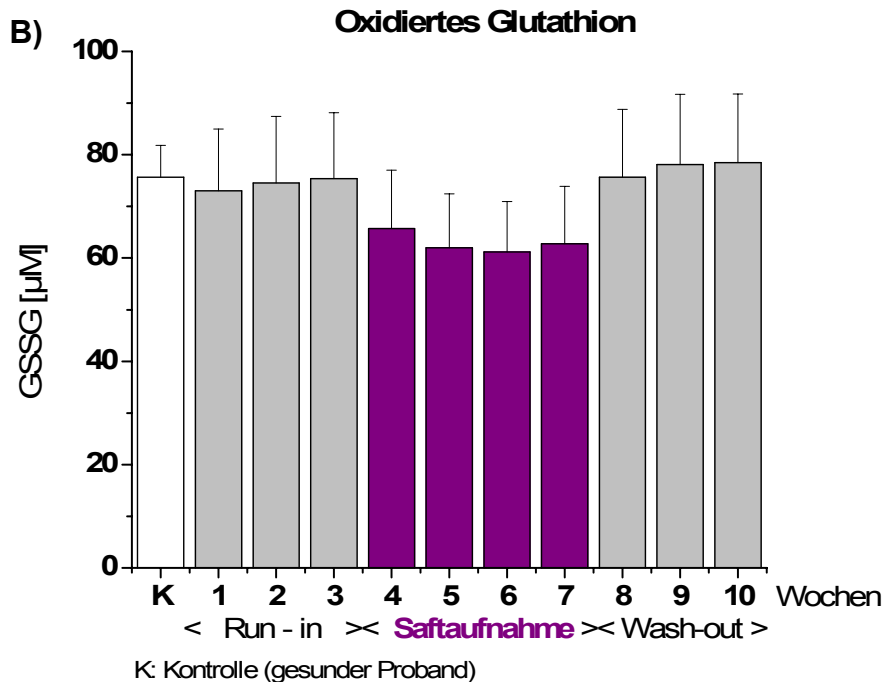
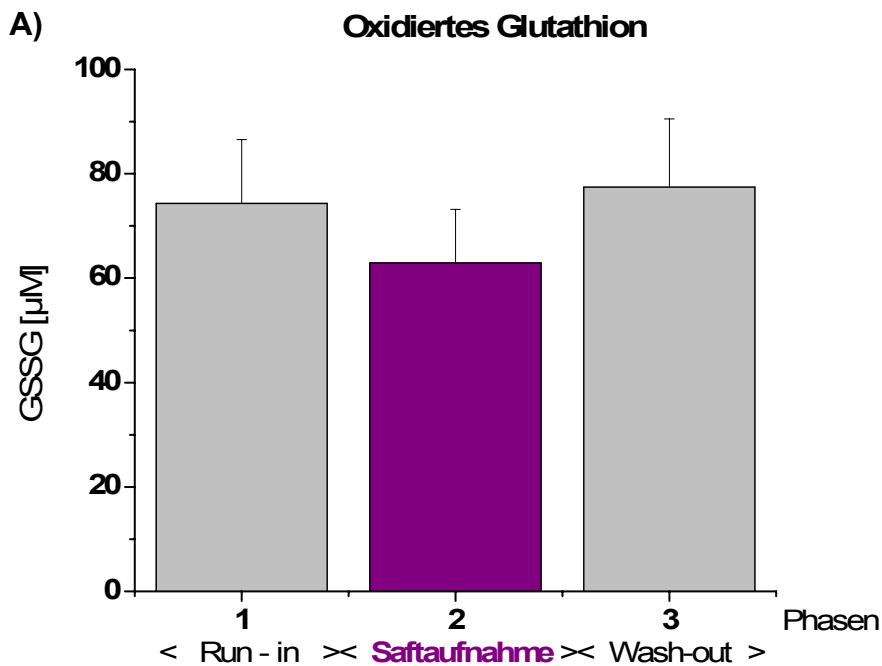


Abb. 5.13.A,B: Oxidiertes Glutathion (GSSG), bestimmt in Vollblut. Mittelwert \pm SD; 21 Patienten; n=3; A) Phasenweise gemittelte Werte; einseitig gepaarter t-Test (R/S, $p < 0,001$); einseitiger Wilcoxon-Test (W/S, $p < 0,0001$); B) Wochenweise Darstellung; Kontrolle [μM]: $75,63 \pm 6,16$

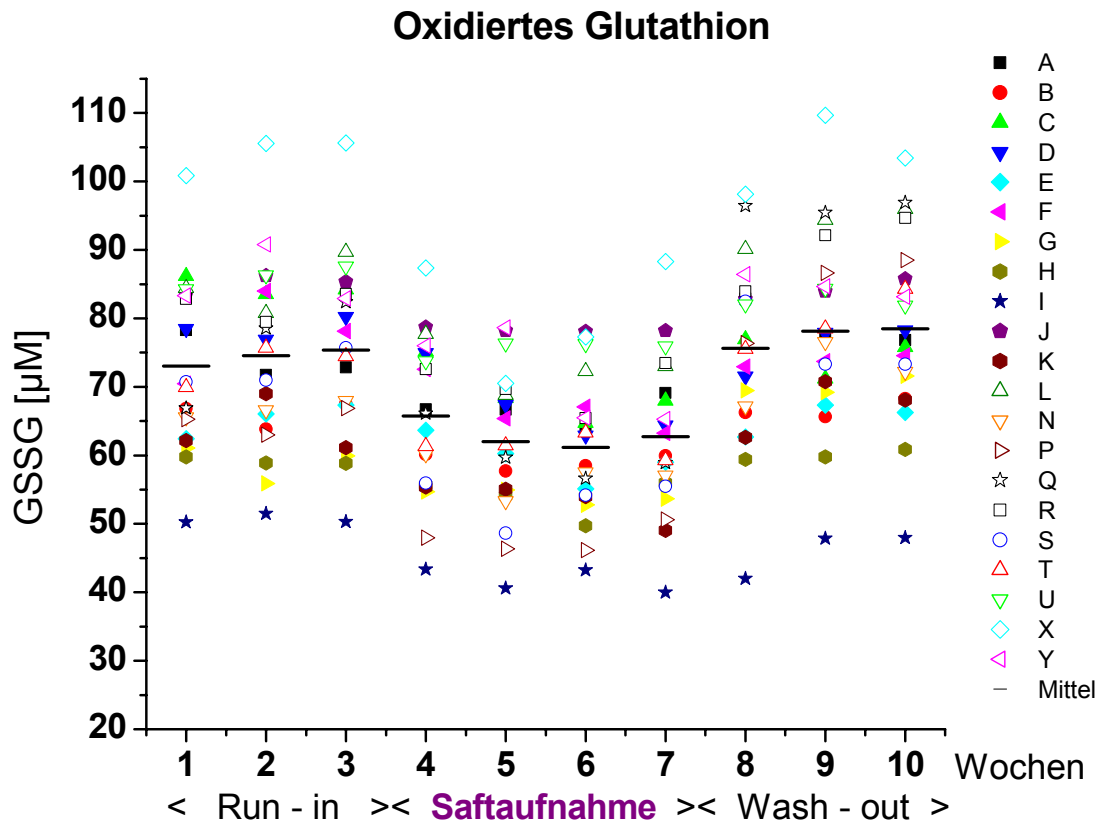


Abb. 5.14: Oxidiertes Glutathion (GSSG), bestimmt in Vollblut. Darstellung der Einzelwerte der 21 Patienten und der Mittelwerte in den einzelnen Wochen; n=3

c) Glutathionstatus

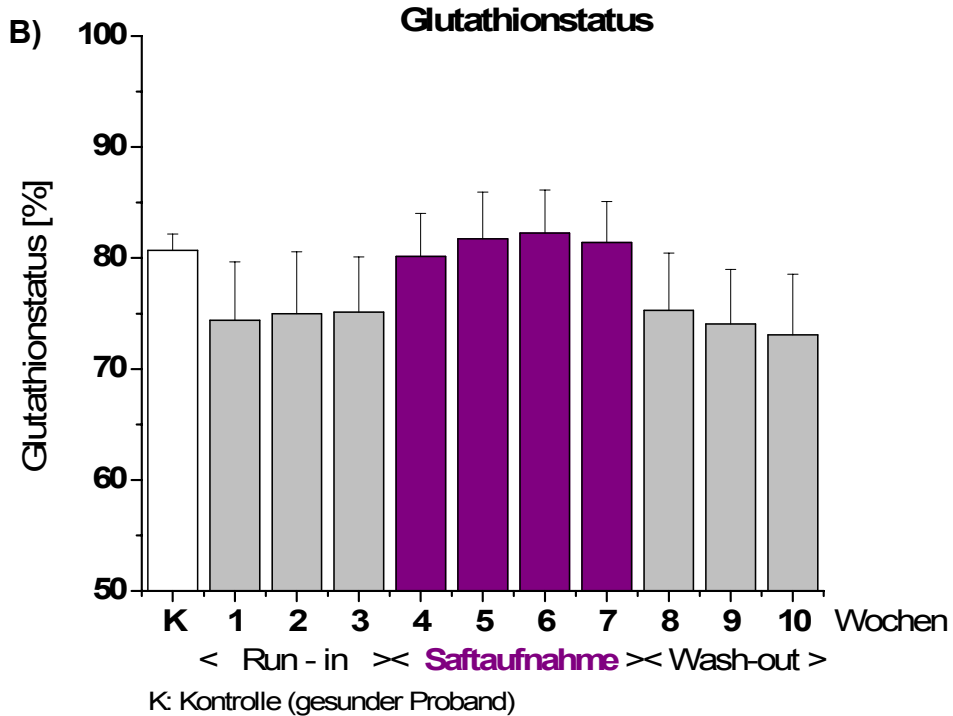
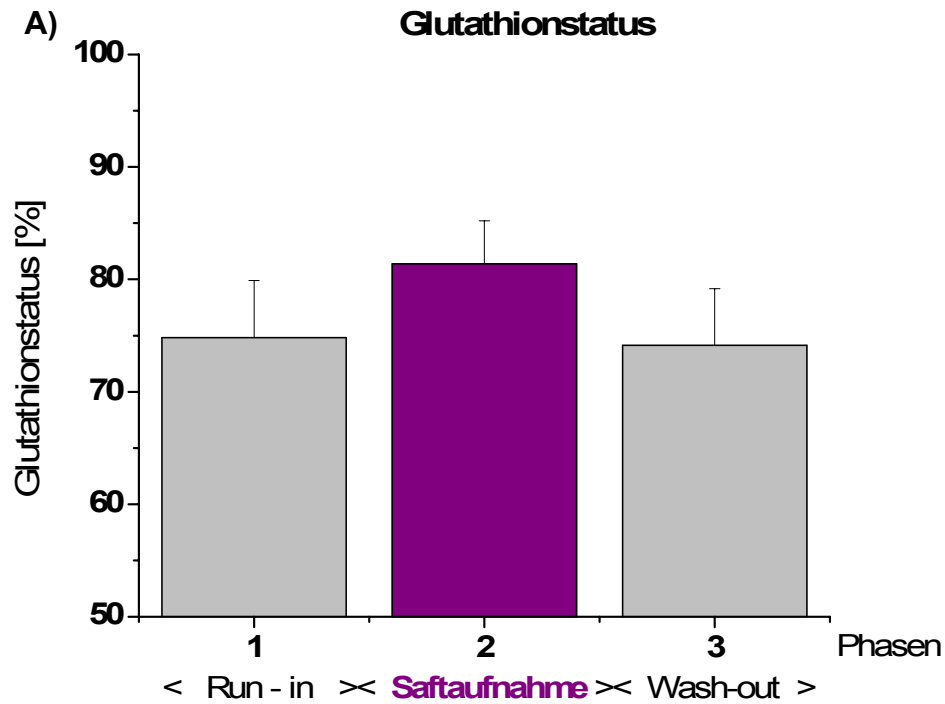


Abb. 5.15.A,B: Glutathionstatus, bestimmt in Vollblut. Mittelwert \pm SD; 21 Patienten; n=3; A) Phasenweise gemittelte Werte; einseitig gepaarter t-Test (R/S, $p < 0,0001$); einseitiger Wilcoxon-Test (W/S, $p < 0,0001$); B) Wochenweise Darstellung; Kontrolle [%]: $80,7 \pm 1,48$

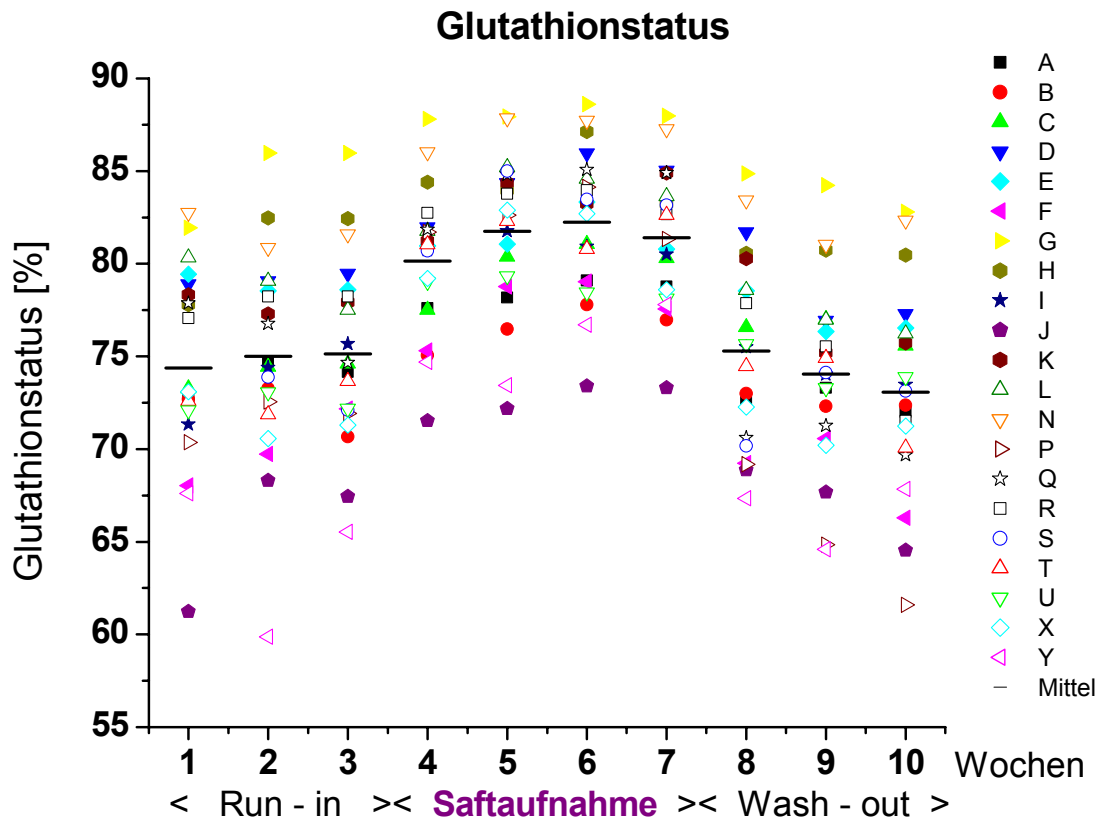


Abb. 5.16: Glutathionstatus, bestimmt in Vollblut. Darstellung der Einzelwerte der 21 Patienten und der Mittelwerte in den einzelnen Wochen; n=3

Der beobachtete Anstieg des Glutathionstatus (+7%) während der Saftaufnahme ist mit den Ergebnissen einer ähnlichen Interventionsstudie mit gesunden Probanden (+6%) vergleichbar [Weisel et al., 2006]. Bei den Patienten waren dabei sowohl der Glutathionspiegel (Erhöhung) als auch der GSSG-Gehalt (Verringerung) verantwortlich, wohingegen bei den gesunden Probanden keine Veränderungen im GSSG-Gehalt nachweisbar waren. Die Hypothese, dass eine gehemmte Glutathionsynthese ein Hauptgrund für die Glutathiondefizienz bei HD-Patienten ist, wird durch die Akkumulation des GSH-Precursors Zystein in den Erythrocyten bestätigt [Ross et al., 1997; Himmelfarb et al., 2002; Wlodek et al., 2006]. Zusätzlich kann eine Adduktbildung von GSH mit Aldehyden, die bei der LPO entstehen können, zu einem Rückgang des Glutathionspiegels führen [Janzowski et al., 2003]. Eine Ursache für die Erhöhung des Glutathionspiegels im Vollblut während der vierwöchigen Saftaufnahme kann die Steigerung der Aktivität der γ -Glutamylcystein-Synthetase (γ -GCS) als entscheidendes Enzym in der Zwei-Stufen-Synthese von

Ergebnisse und erste Diskussion

Glutathion sein, einem Enzym, dessen Aktivität bei HD-Patienten reduziert ist [Alhamdani et al., 2005]. Zahlreiche in vitro-Untersuchungen haben bereits gezeigt, dass phenolische Substanzen in der Lage sind, im Zusammenhang mit der Nrf2/ARE-codierten Aktivierung von γ -GCS, den Glutathionspiegel zu erhöhen [Rodgers et al., 1998; Myhrstad et al., 2002; Carlsen et al., 2003; Boadi et al., 2005; Moskaug et al., 2005; Schäfer et al., 2006]. Eine ähnliche Induktion glutathion-assoziiierter Enzyme und eine Erhöhung des Glutathionspiegels in HD-Patienten wurde bei Supplementierung mit den Vitaminen A, C und E [Hassan et al., 1995] und bei dem Flavonoid Silybinin [Dietzmann et al., 2002] beobachtet.

Die Varianzanalyse ergab signifikante Abhängigkeiten des Glutathionspiegels von Eisengabe ($p < 0,0001$) und Diabetes ($p < 0,05$). Patienten mit Eisen-Infusion sprachen besser auf die Saftaufnahme an, was den erhöhten Bedarf an Antioxidantion bei der intravenösen Gabe von Eisen-Medikamenten verdeutlicht. Die Diabetiker unter den Patienten (D, H, I, N) zeigten höhere durchschnittliche Gehalte. Der Gehalt an oxidiertem Glutathion wurde deutlich von Diabetes beeinflusst ($p < 0,0001$). Diabetiker hatten geringere GSSG-Konzentrationen, reagierten aber weniger positiv auf den Konsum des Mehrfruchtsaftes. Dementsprechend war auch der durchschnittliche Glutathionstatus bei Diabetikern höher ($p < 0,0001$).

Die Eisengabe hatte auf das GSSG und den Status keinen Einfluss, das Geschlecht der Patienten beeinflusste keinen der drei Marker, beim Glutathionspiegel allerdings zeigte sich eine Tendenz zu höheren Werten und stärkerer Response bei Frauen ($p = 0,06$) (siehe Anhang 11.5). Signifikante Auswirkungen von individuellen Lebensgewohnheiten/Pathogenese und der Studienphasen auf die Messwerte, berechnet mittels ANOVA, bestätigen die bereits durch den t-Test aufgezeigten Unterschiede.

5.2.3. Malondialdehyd

Die Konzentration des Lipidperoxidations-Markers MDA wurde durch die Saftaufnahme signifikant reduziert (-6%) und sank in der Wash-out Phase weiter ab (-9% im Vergleich zur Run-in-Phase, siehe Abb. 5.17).

Die Werte wiesen hohe individuelle Schwankungen auf und zeigten uneinheitliche Kurvenverläufe, Patient F hatte die höchsten Werte (1,9-2,2 μM MDA), gefolgt von R (Abb. 5.18 und Anhang 11.1). Wie aus den Ernährungsprotokollen (siehe Anhang 11.4.4) hervorgeht, fiel Patient F durch eine im Vergleich zu den anderen Studienteilnehmern ungesunde Ernährung (viel „Fast Food“) auf, des Weiteren hatte er deutliches Übergewicht (BMI=30,4). Dies könnte zumindest teilweise die erhöhten MDA-Gehalte dieses Patienten im Vergleich zu den anderen Studienteilnehmern erklären. Eine Verringerung der MDA-Konzentrationen war bei den Patienten B und Q erkennbar, wohingegen bei Patient N keine Veränderungen und bei Patient X sogar eine leichte Erhöhung beobachtet wurden. Insgesamt aber konnte eine signifikante Reduktion des MDA-Gehaltes nachgewiesen werden. Der Intra-Assay Variationskoeffizient lag bei 3,4%.

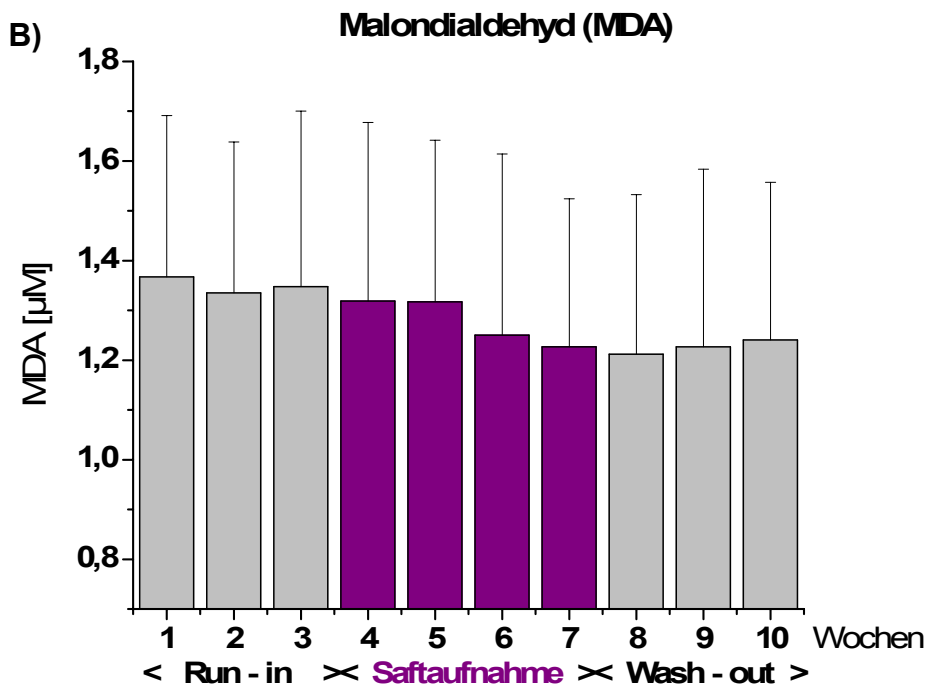
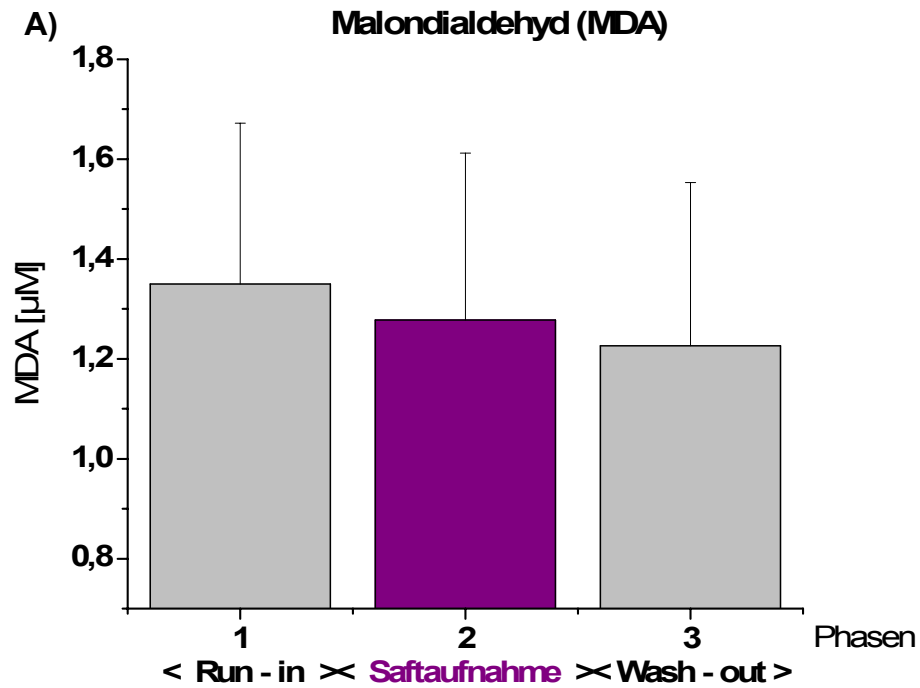


Abb. 5.17.A,B: Malondialdehyd, bestimmt in Plasma. Mittelwert \pm SD; 21 Patienten; n=2; A) Phasenweise gemittelte Werte; einseitig gepaarter t-Test (R/S, $p < 0,001$); einseitiger Wilcoxon-Test (W/S, $p < 0,05$); B) Wochenweise Darstellung

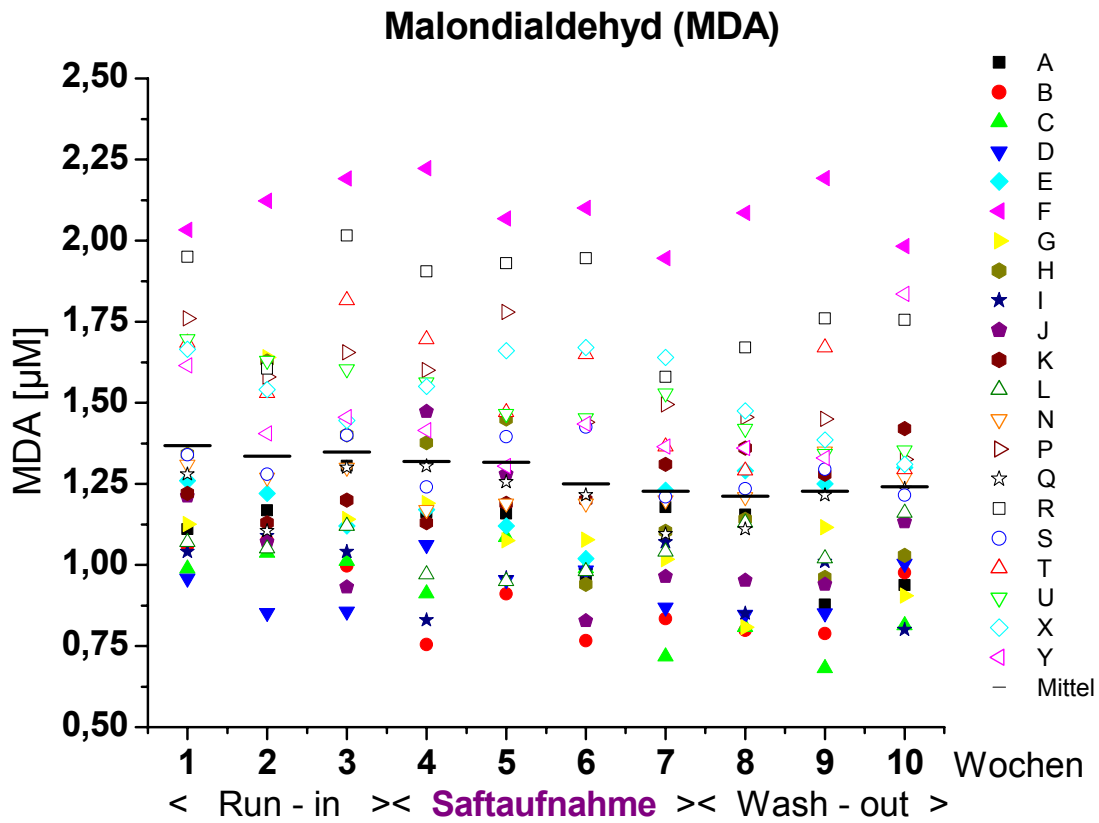


Abb. 5.18: Malondialdehyd, bestimmt in Plasma. Darstellung der Einzelwerte der 21 Patienten und der Mittelwerte in den einzelnen Wochen; n=2

Die MDA-Gehalte in der Run-in Phase waren vergleichbar mit früheren Untersuchungen bei HD-Patienten und waren gegenüber gesunden Probanden signifikant erhöht [Ozden et al., 2002], was auf die gesteigerte oxidative Belastung der Patienten hindeutet. Es konnte gezeigt werden, dass auch Vitamin E geeignet ist, die MDA-Konzentrationen in HD-Patienten zu reduzieren [Giray et al., 2003; Scholze et al., 2004]. Die MDA-Bestimmung scheint zumindest bei Bevölkerungsgruppen mit erhöhtem oxidativem Stress ein verlässlicher Biomarker zu sein. In Interventionsstudien mit gesunden Probanden sind bei der MDA-Bestimmung kontroverse Ergebnisse in der Diskussion, welche vor allem im Hinblick auf die fehlende Spezifität dieser Untersuchungsmethode geführt wird [Collins, 2005; Del Rio et al., 2005; Lykkesfeldt, 2007]. Beispielsweise wurden die MDA-Gehalte bei männlichen Nichtrauchern durch die Aufnahme von polyphenolreichem Mehrfruchtsaft reduziert [Bub et al., 2003], wohingegen sich bei einer anderen Intervention mit Fruchtsaft keine Veränderungen ergaben [Weisel et al., 2006].

Ergebnisse und erste Diskussion

In weiteren Studien, durchgeführt bei gesunden Probanden und HD-Patienten, konnte eine verminderte LDL-Oxidation durch die Aufnahme von rotem Traubensaft erreicht werden [O'Byrne et al., 2002; Castilla et al., 2006]. Die ANOVA zeigte deutlich höhere Werte für Patienten, die Eisen-Infusionen bekamen ($p < 0,0001$), was mit der Literatur übereinstimmt [Ozden et al., 2002]. Die Diabetiker ($n=4$) hatten geringere MDA-Gehalte, was mit deren höherem Glutathionstatus (siehe 5.2.2) und der damit verbundenen besseren Abwehr von ROS im Vergleich zu den anderen Patienten zusammenhängen könnte. Des Weiteren sprachen die Diabetiker besser auf den Saft an ($p < 0,0001$; siehe Anhang 11.5). Signifikante Auswirkungen von individuellen Lebensgewohnheiten/Pathogenese und der Studienphasen auf die Messwerte, berechnet mittels ANOVA, bestätigen die bereits durch den t-Test aufgezeigten Unterschiede.

5.2.4. Triglyceride

Es wurden keine signifikanten Unterschiede im Gehalt an Triglyceriden (TG) in den drei Studienphasen festgestellt (Abb. 5.19). Die Einzelwerte waren sehr uneinheitlich und erschweren somit die Interpretation der Ergebnisse. Die Patienten P und K zeigten die höchsten Werte, B und Q die niedrigsten (Abb. 5.20 und Anhang 11.1). Patient F, der durch seine erhöhten MDA-Gehalte auffiel, hatte mit 0,53 bis 1,75 mmol/l TG einen durchschnittlichen Triglyceridgehalt. Wie Abb. 5.32.B zeigt ist kein Trend innerhalb der 10 Wochen Studiendauer erkennbar. Der Intra-Assay Variationskoeffizient lag bei 1,3%.

Die hohe TG-Konzentration bei einigen HD-Patienten und die grundsätzlich erhöhte TG-Konzentration von HD-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden [Mircescu et al., 2005] kann mit der individuellen Pathogenese und den unterschiedlichen Ernährungsgewohnheiten der HD-Patienten im Zusammenhang stehen.

Die ermittelten durchschnittlichen TG-Konzentrationen liegen laut Weizel [Weizel, 2006] im normalen Bereich (Tabelle 5.3).

Tabelle 5.3: Diagnostik der Fettstoffwechselstörungen anhand der TG-Werte
[Weizel, 2006]

Status	TG [mmol/l]
normal	< 2,26
erhöhtes Risiko für Hypercholesterinämie	> 2,26
primäre Hypertriglyceridämie	2,26 – 5,65
Chylomikronämie	> 11,29

Ergebnisse und erste Diskussion

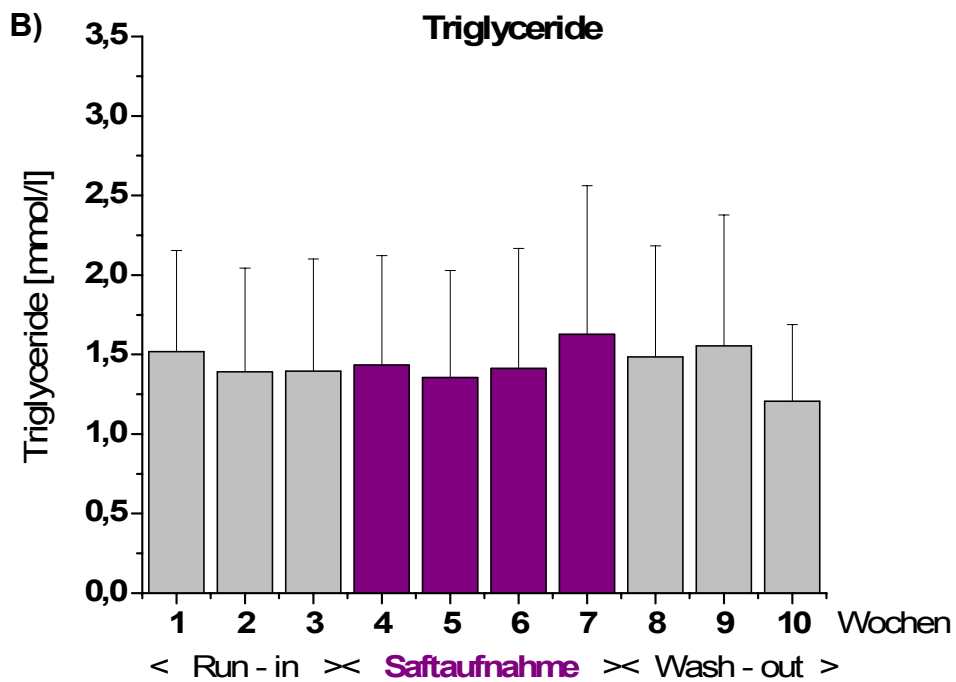
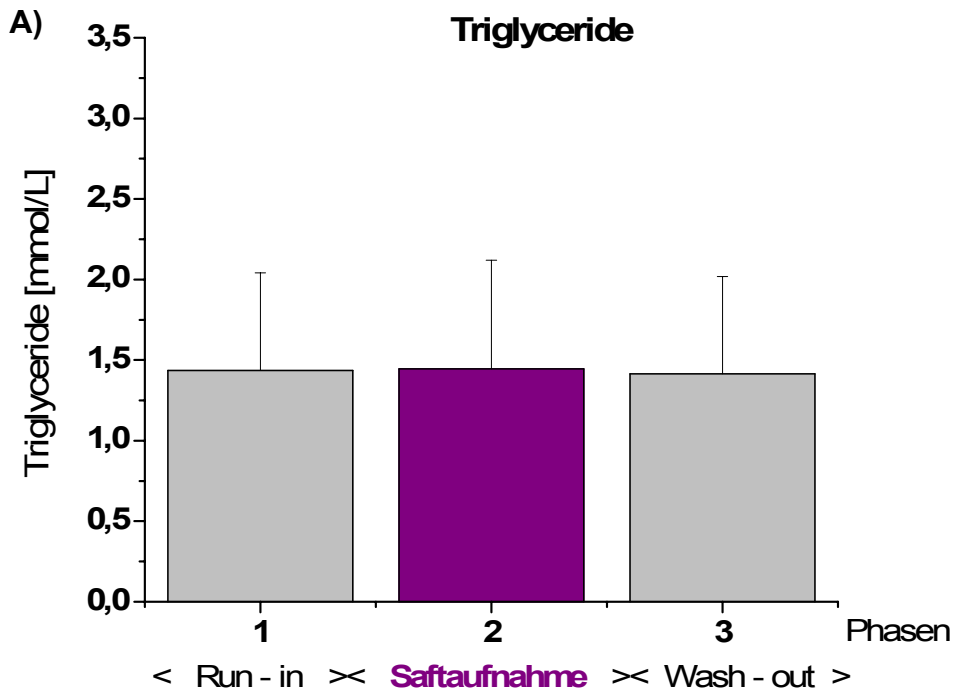


Abb. 5.19.A,B: Triglyceride, bestimmt in Plasma. Mittelwert \pm SD; 21 Patienten; n=2;
A) Phasenweise gemittelte Werte; einseitig gepaarter t-Test (R/S und W/S, $p > 0,05$); B) Wochenweise Darstellung

Ergebnisse und erste Diskussion

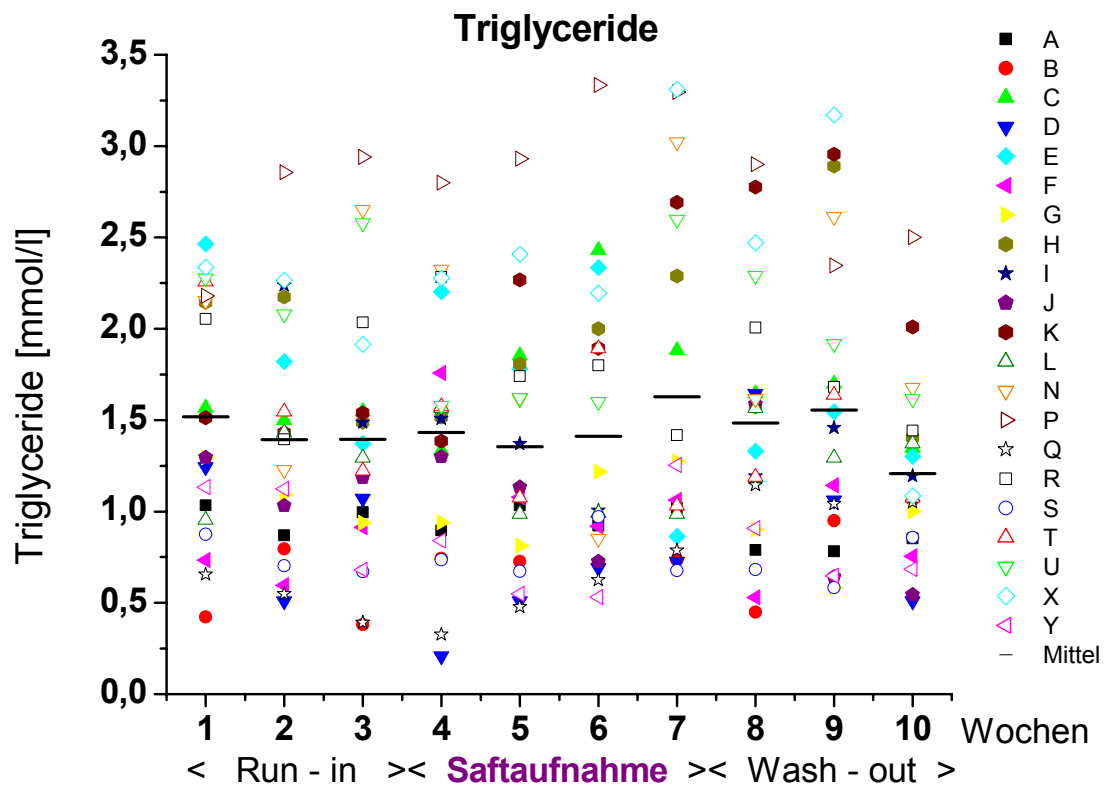


Abb. 5.20: Triglyceride, bestimmt in Plasma. Darstellung der Einzelwerte der 21 Patienten und der Mittelwerte in den einzelnen Wochen; n=2

5.2.5. MDA/Triglyceride

Eine Abhängigkeit des MDA-Gehaltes von der Konzentration der Triglyceride konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 5.21), bei physiologischen Konzentrationen an Triglyceriden scheinen nicht genug ROS vorhanden zu sein, um die Triglyceride vollständig peroxidieren zu können.

Für die meisten Patienten ergab sich ein gleichmäßiger Werteverlauf, einige zeigten aber starke Schwankungen, beispielsweise die Patienten D, F, Q und Y (Abb. 5.22 und Anhang 11.1), womöglich bedingt durch die teilweise von Woche zu Woche stark schwankenden Ernährungsgewohnheiten.

Die Patienten D und Q zeigten hohe Werte in der Run-in Phase, bei Patient D ist allerdings ein stark erhöhter Wert in Woche 3 für den erhöhten Durchschnitt verantwortlich. Die Werte von Patient Q stiegen bis Woche 4 an und verringerten sich kontinuierlich bis zum Ende der Saftaufnahme. Für Patient F, der von allen Studienteilnehmern das „ungesundeste“ Ernährungsprofil zeigte, ergab sich, wie bei der MDA-Bestimmung, der höchste Durchschnittswert über die gesamte Studie (2,45 μM MDA/mmol TG).

Es gibt keine vergleichbaren Humanstudien, die zur Charakterisierung der Lipidperoxidation die Malondialdehydkonzentration auf die Triglyceridkonzentration bezogen haben, allerdings zeigte eine Studie mit Brust- und Lungenkrebspatienten keinen Zusammenhang zwischen dem MDA- und Triglyceridgehalt, weder bei den Patienten noch bei der Kontrollgruppe (gesunde Probanden) [Goenenc et al., 2001].

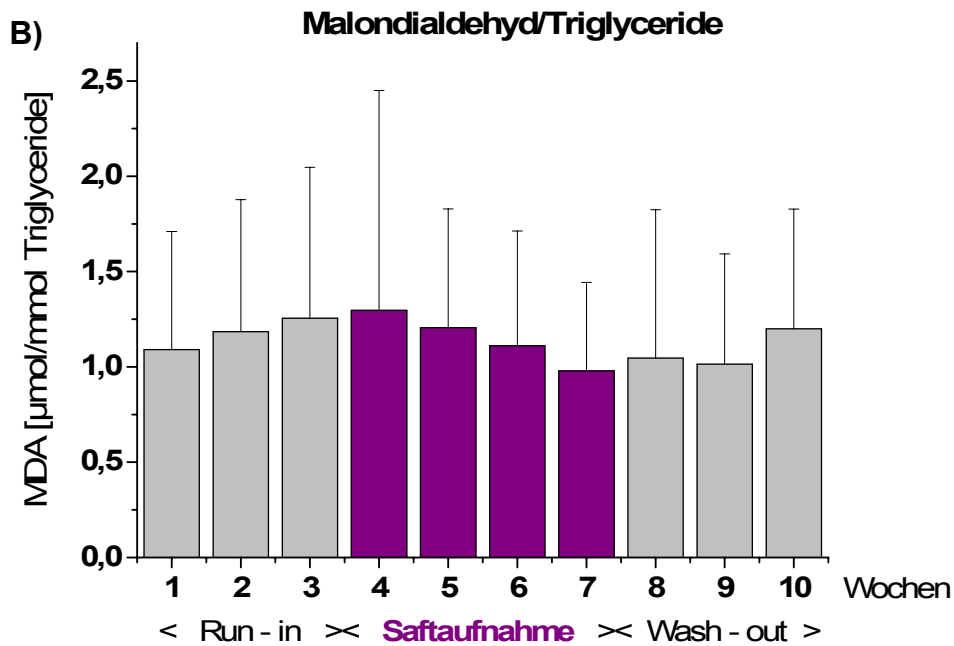
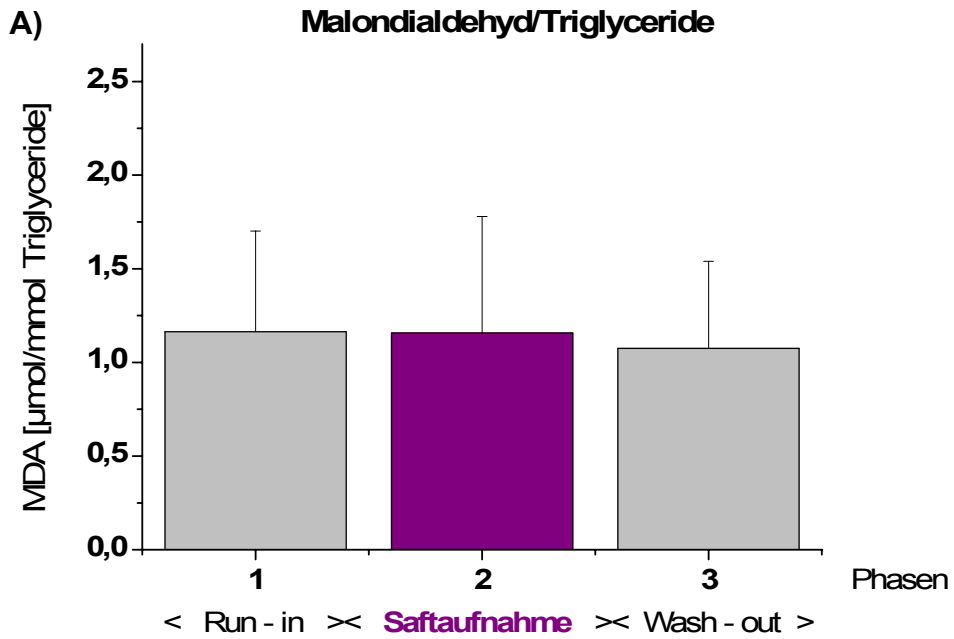


Abb. 5.21.A,B: Malondialdehyd/Triglyceride; Mittelwert \pm SD; 21 Patienten; A) Phasenweise gemittelte Werte; einseitiger Wilcoxon-Test (R/S und W/S, $p > 0,05$); B) Wochenweise Darstellung

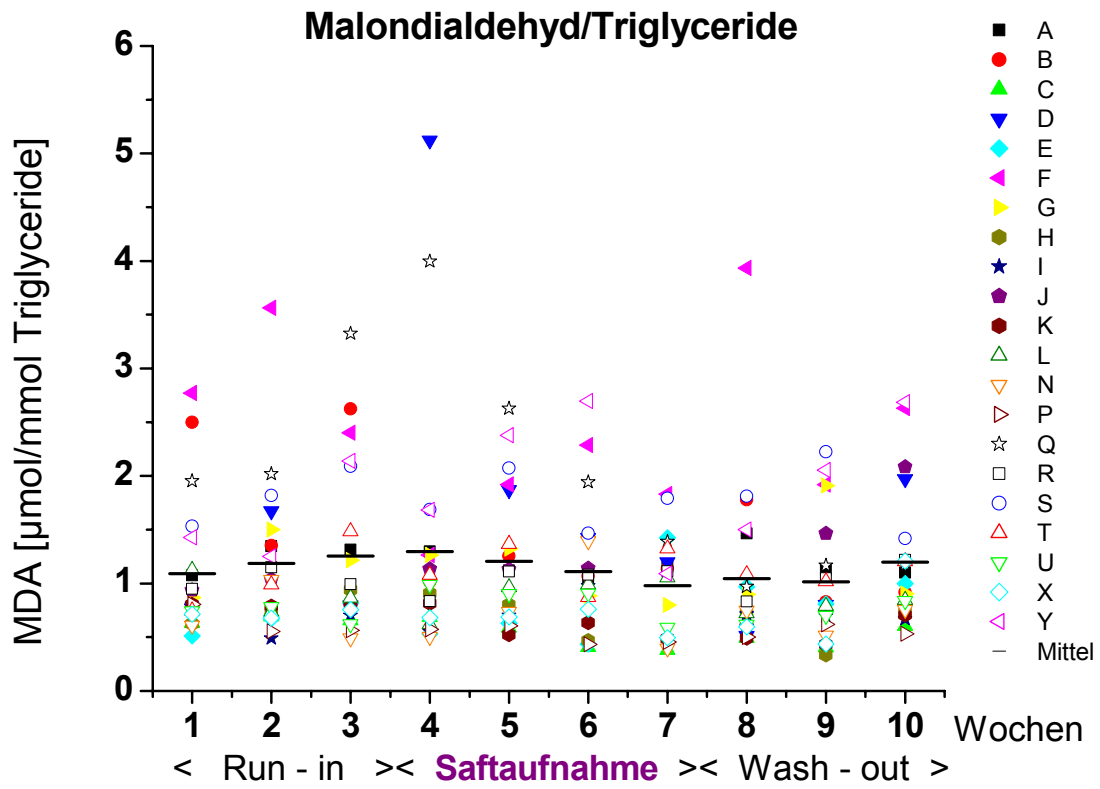


Abb. 5.22: Malondialdehyd/Triglyceride; Darstellung der Einzelwerte der 21 Patienten und der Mittelwerte in den einzelnen Wochen

5.2.6. Proteincarbonyle

Wie in Abb. 5.23.B dargestellt ist steigt der Proteincarbonyl-Gehalt während der Run-in Phase an, die anschließende Saftaufnahme führte zu einer signifikanten Reduktion (-12 %), in der Wash-out Phase stiegen die Werte wieder an.

Die Werte der meisten Patienten bewegten sich in einen ähnlichem Bereich (0,5-1,5 nmol Carbonyle/mg Protein), bei den Patienten I und J waren sie deutlich erhöht, die niedrigsten Proteincarbonyl-Konzentrationen hatten die Patienten N und P (Abb. 5.24 und Anhang 11.1). Die hohen Werte von Patient I hängen wahrscheinlich mit einer Lebertransplantation zusammen, die zwar deutlich (einige Monate) vor Beginn der Studie stattfand, wohl aber noch Auswirkungen auf den Abbau geschädigter Proteine zeigte [Borchardt, 2006]. Aus den bei Patient J registrierten persönlichen Daten (Pathogenese, Nebenerkrankungen, Medikation, Ernährung) lassen sich keine Ursachen für den erhöhten Proteincarbonyl-Gehalt ableiten.

Während der gesamten 10 Wochen der Studie lagen die Durchschnittswerte der Patienten (0,93-1,33 nmol Carbonyle/mg Protein) oberhalb derer der Kontrolle (0,79 nmol Carbonyle/mg Protein, gesunder Proband), was mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen in Einklang steht [Tovbin et al., 2002; Michelis et al., 2003].

Der Intra-Assay Variationskoeffizient lag bei 4,7%.

Ergebnisse und erste Diskussion

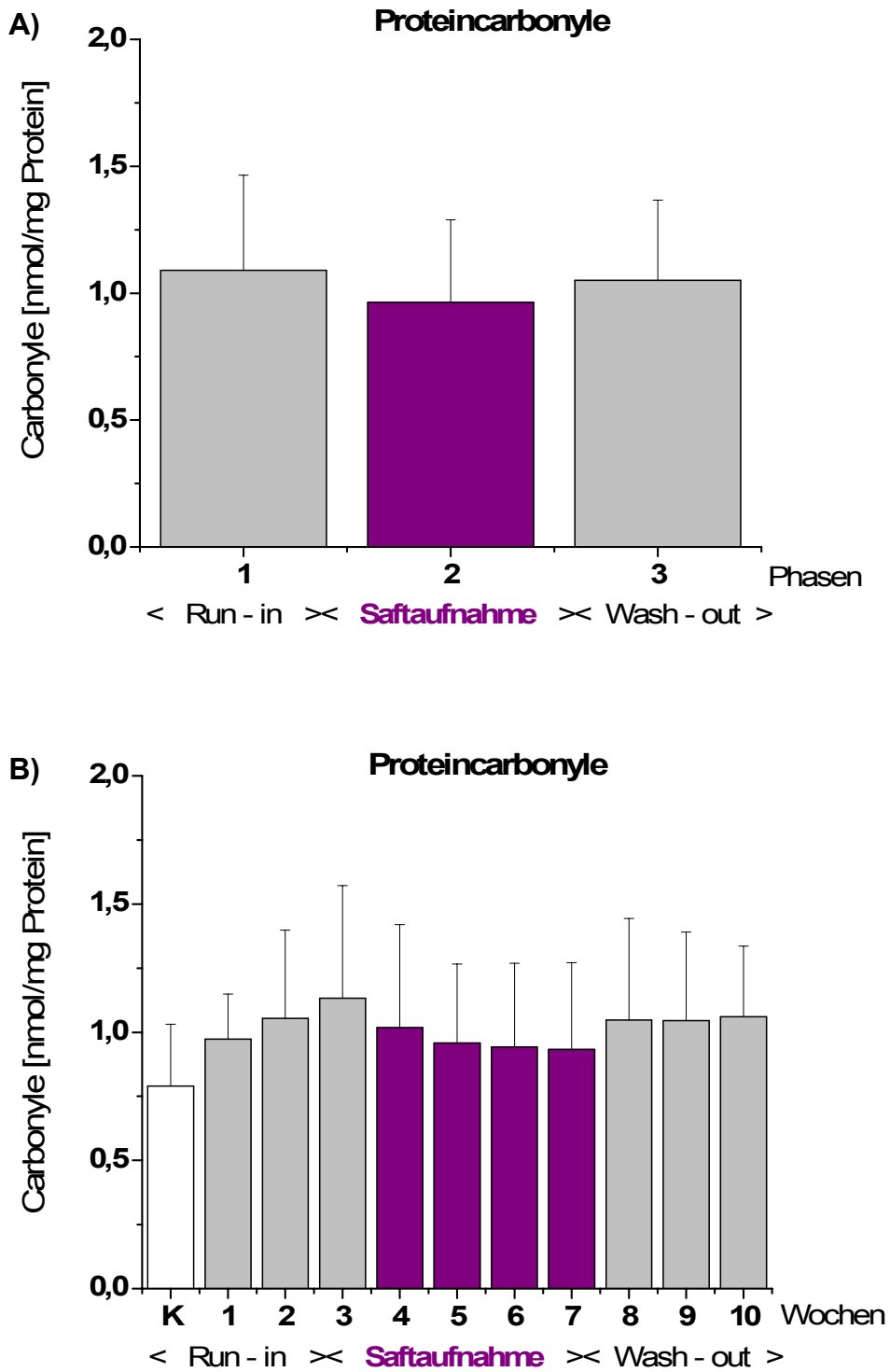


Abb. 5.23.A,B: Proteincarbonyle, bestimmt in Plasma. Mittelwert \pm SD; 21 Patienten; n=3; A) Phasenweise gemittelte Werte; einseitig gepaarter t-Test (R/S und W/S, $p < 0,0001$); B) Wochenweise Darstellung; Kontrolle [μ M]: $0,79 \pm 0,24$

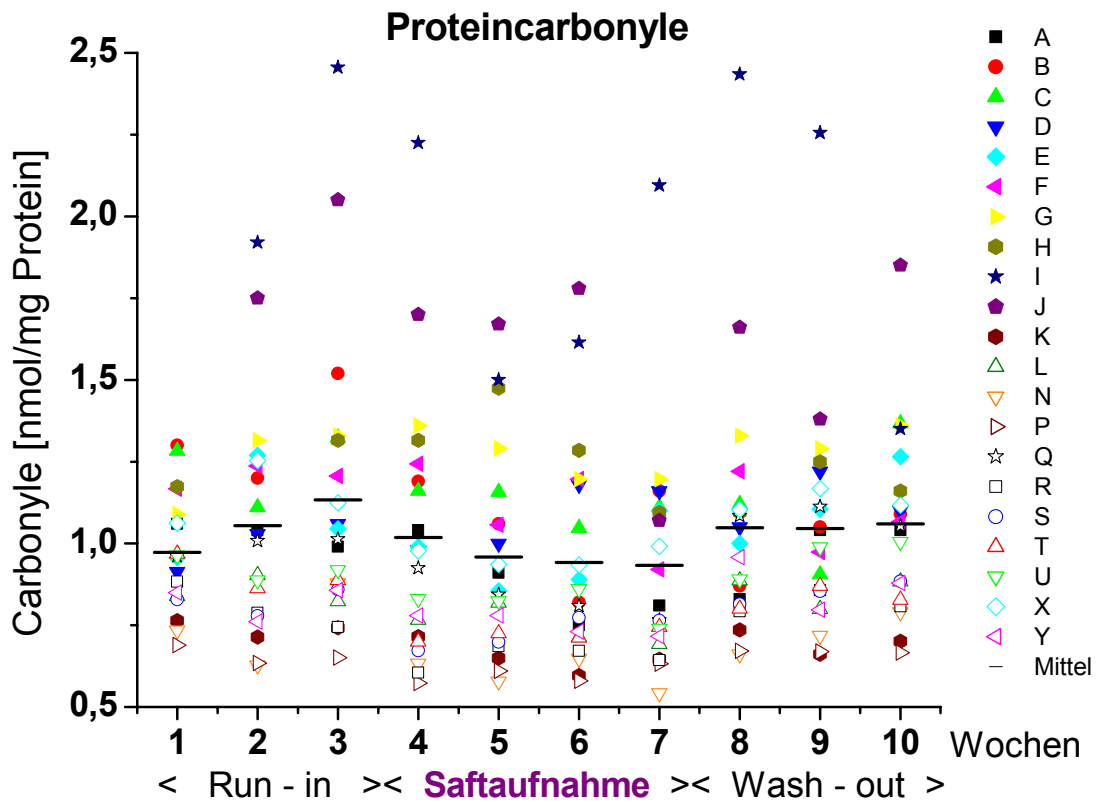


Abb. 5.24: Proteincarbonyle, bestimmt in Plasma. Darstellung der Einzelwerte der 21 Patienten und der Mittelwerte in den einzelnen Wochen; n=3

Der im Vergleich zu gesunden Probanden erhöhte Proteincarbonyl-Gehalt korreliert mit der bekannten Oxidation von Plasmaproteinen bei Personen mit gesteigertem oxidativem Stress, wie z. B. bei Diabetes oder neurodegenerativen Erkrankungen [Chevion et al., 2000]. Bei HD-Patienten wird die verstärkte Proteinoxidation mit der intravenösen Applikation von Eisen-Medikamenten in Zusammenhang gebracht [Tovbin et al., 2002; Michelis et al., 2003]. Im Gegensatz zu dem in der vorliegenden Studie deutlichen Rückgang des Carbonyl-Gehaltes durch den roten Mischfruchtsaft wurde in Interventionen mit einer ω -3-Fettsäure (Docosahexaensäure, DHA) oder den Vitaminen C und E keine Reduktion der Carbonyl-Konzentration verzeichnet [Fumeron et al., 2005; Himmelfarb et al., 2007]. Weitere Interventionsstudien, die bei Aufnahme von Früchten oder Fruchtsaft diesen Biomarker verwendet haben, sind nicht bekannt, jedoch konnte in vitro (isolierte Liposomen) ein Rückgang der Proteinoxidation durch Polyphenole nachgewiesen werden [Heinonen et al., 2007], was mit den Beobachtungen in vivo übereinstimmt. Die ANOVA ergab bei den Proteincarbonylen signifikante Abhängigkeiten von allen getesteten Faktoren.

Männliche Patienten besitzen die höheren Ausgangswerte ($p < 0,0001$) und reagieren besser auf den Saftkonsum. Bei Eisengabe zeigte sich geringere Proteinoxidation ($p < 0,005$) und bei Diabetikern war die Saftaufnahme fast wirkungslos ($p < 0,0001$; siehe Anhang 11.5). Signifikante Auswirkungen von individuellen Lebensgewohnheiten/Pathogenese und der Studienphasen auf die Messwerte, berechnet mittels ANOVA, bestätigen die bereits durch den t-Test aufgezeigten Unterschiede.

5.2.7. NF- κ B-Status

Nach der Run-in Phase, die die höchsten Werte zeigte, reduzierte sich die DNA-Bindungsaktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B signifikant während der Saftaufnahme (-19%), in der Wash-out Phase gingen die Werte weiter zurück (-24% im Vergleich zur Run-in Phase, Abb. 5.25). Es ergab sich ein uneinheitlicher Kurvenverlauf, eine Reduktion der DNA-Bindungsaktivität war bei den Patienten K und S, keine Veränderung bei H und eine Verschlechterung bei Q und X zu erkennen (Abb. 5.26 und Anhang 11.1). Insgesamt aber ergab sich eine statistisch signifikante Reduktion der DNA-Bindungsaktivität.

Der Intra-Assay Variationskoeffizient lag bei 5,0%.

Ergebnisse und erste Diskussion

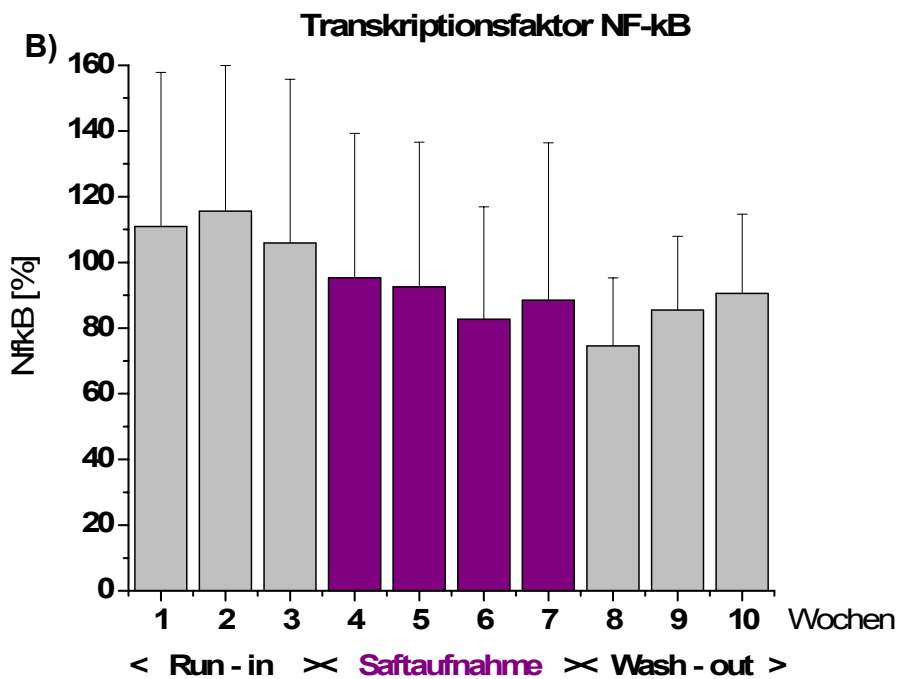
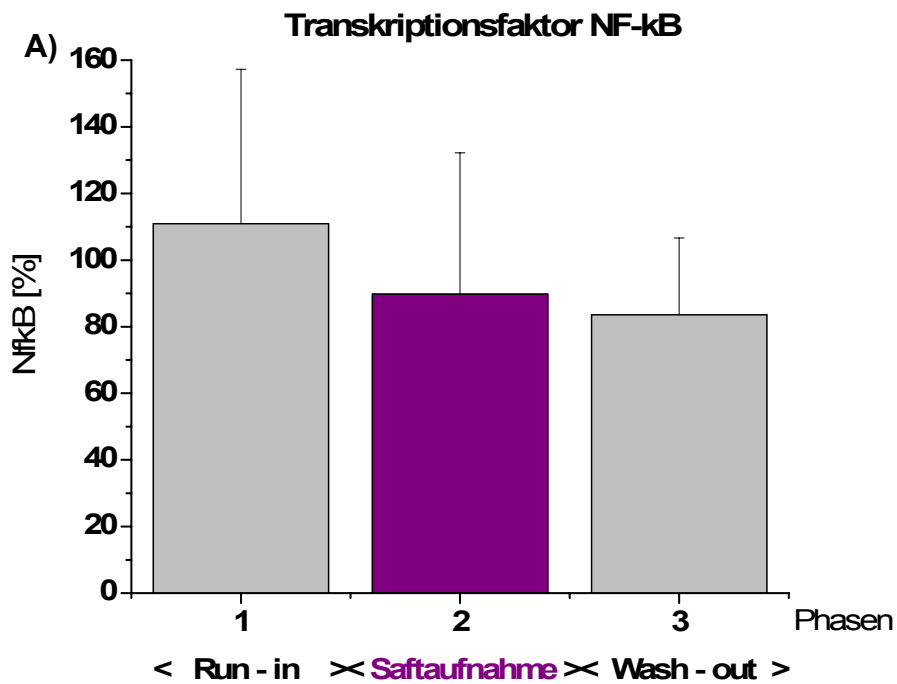


Abb. 5.25.A,B: Transkriptionsfaktor NF- κ B, bestimmt in isolierten Lymphozyten. Mittelwert \pm SD; 21 Patienten; n=1-2; A) Phasenweise gemittelte Werte; einseitig gepaarter t-Test (R/S, $p < 0,005$; W/S, $p > 0,05$); B) Wochenweise Darstellung

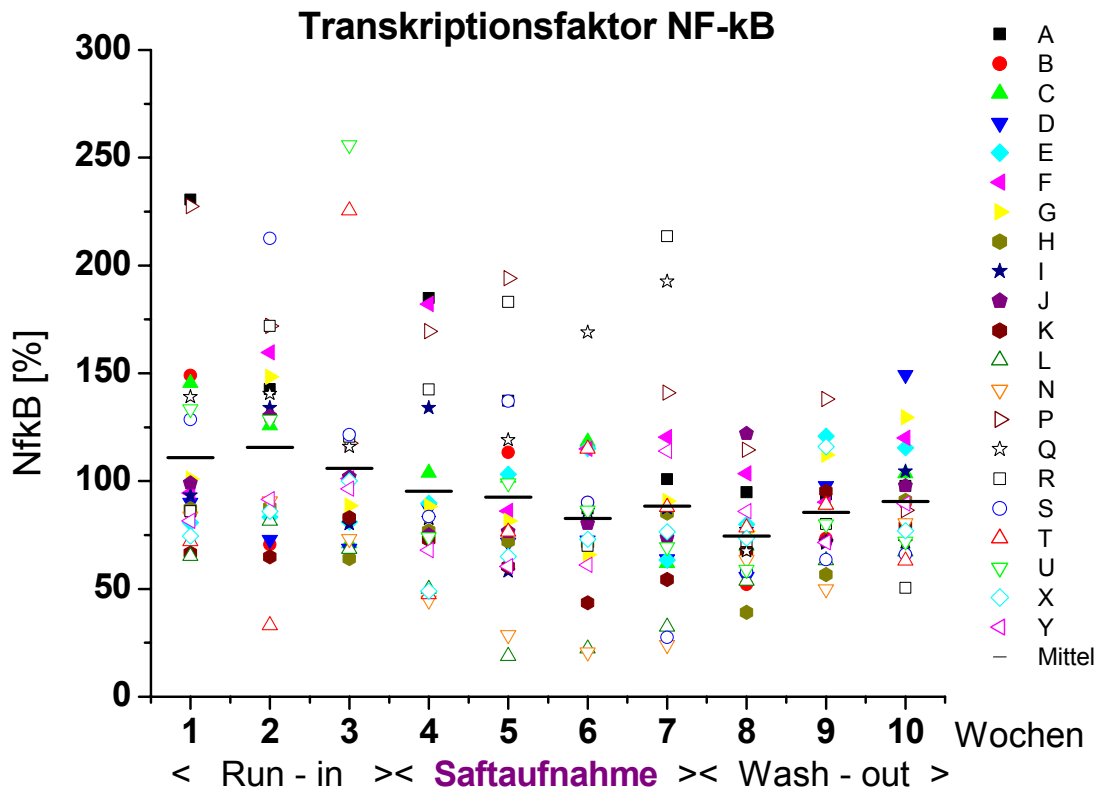


Abb. 5.26: Transkriptionsfaktor NF-κB, bestimmt in isolierten Lymphozyten. Darstellung der Einzelwerte der 21 Patienten und der Mittelwerte in den einzelnen Wochen; n=1

Eine verstärkte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB wurde für Diabetiker (Typ I und II) und Patienten, die an diabetischer Nephropathie leiden und sich regelmäßig einer HD-Behandlung müssen, beschrieben [Hofmann et al., 1999; Rodriguez-Ayala et al., 2005]. Diese Aktivierung wurde zumindest teilweise auf oxidativen Stress und eine damit verbundene, durch RAGE medierte Entzündungsreaktion mit anschließender Induktion intrazellulärer MAP Kinase-Aktivität zurückgeführt. Eine partielle, aber keine komplette Hemmung der NF-κB DNA-Bindungsaktivität (wie in der vorliegenden Arbeit) ist auch von Hofmann et al. [Hofmann et al., 1999] beschrieben worden: die Intervention mit α-Liponsäure ergab eine partielle Hemmung der NF-κB DNA Bindungsaktivität bei Patienten mit diabetischer Nephropathie. Dies bestätigt die protektiven antioxidativen und anti-inflammatorischen Wirkungen der polyphenolischen Inhaltsstoffe des Studiensaftes. In Interventionen mit gesunden Probanden konnte bei Aufnahme von polyphenolreichem Obst und Gemüse kein Rückgang festgestellt werden [Van den Berg et al., 2001b; Weisel et al., 2006]. Dies macht die NF-κB DNA Bindungsaktivität

möglicherweise zu einem speziell für Populationen mit erhöhtem oxidativem Stress nützlichen Biomarker, zumindest scheint das Kollektiv der HD-Patienten eine höhere Sensibilität für diesen Biomarker zu besitzen.

Die Varianzanalyse ergab signifikante Einflüsse von Eisengabe ($p < 0,0005$) und Diabetes ($p < 0,005$) auf die NF- κ B DNA Bindungsaktivität. Patienten mit Eiseninfusion wiesen eine geringere Aktivität auf, reagierten aber weniger auf den Mehrfruchtsaft. Bei Diabetikern zeigte sich ein damit vergleichbares Muster (siehe Anhang 11.5). Signifikante Auswirkungen von individuellen Lebensgewohnheiten /Pathogenese und der Studienphasen auf die Messwerte, berechnet mittels ANOVA, bestätigen die bereits durch den t-Test aufgezeigten Unterschiede.

5.2.8. TEAC

Bei der antioxidativen Kapazität in Plasma waren keine signifikanten Veränderungen während der gesamten Studie erkennbar (Abb. 5.27.A). Es war leichte Tendenz zur Abnahme der Werte in der Run-in Phase und es gab einen leichten Anstieg in der Saft- und Wash-out Phase (Abb. 5.27.B).

Die höchsten TEAC-Werte hatte Patient G, die Patienten T und U die niedrigsten, bei Patient I war eine Verbesserung, bei Patient X eine leichte Verschlechterung zu erkennen (Abb. 5.28 und Anhang 11.1). Die Werte der meisten Studienteilnehmer zeigten allerdings keine Veränderungen, so dass sich insgesamt keine Veränderung des TEAC durch den Studiensaft ergab. Dieser ist mit 0,7 mmol/l Trolox der niedrigste Wert, nicht nur im Vergleich zu den übrigen Werten des Patient X, sondern auch zu dem Verlauf der Werte der restlichen Patienten. Aus dem studienbegleitenden Datenmaterial ist ersichtlich, dass die Blutentnahme beim Patient X in der Woche 9 erst 3,75 h nach Beginn der Dialyse vorgenommen werden konnte (Abb. 5.28). Es ist bekannt, dass die Dialyse mit dem Verlust an v. a. wasserlöslichen Antioxidantien einhergeht und deshalb ist in diesem Fall ein so niedriger TEAC-Wert nicht unerwartet. Dieser Wert wurde bei den Berechnungen des Mittelwertes nicht berücksichtigt.

Der Intra-Assay Variationskoeffizient der Methode lag bei 5,7%.

Ergebnisse und erste Diskussion

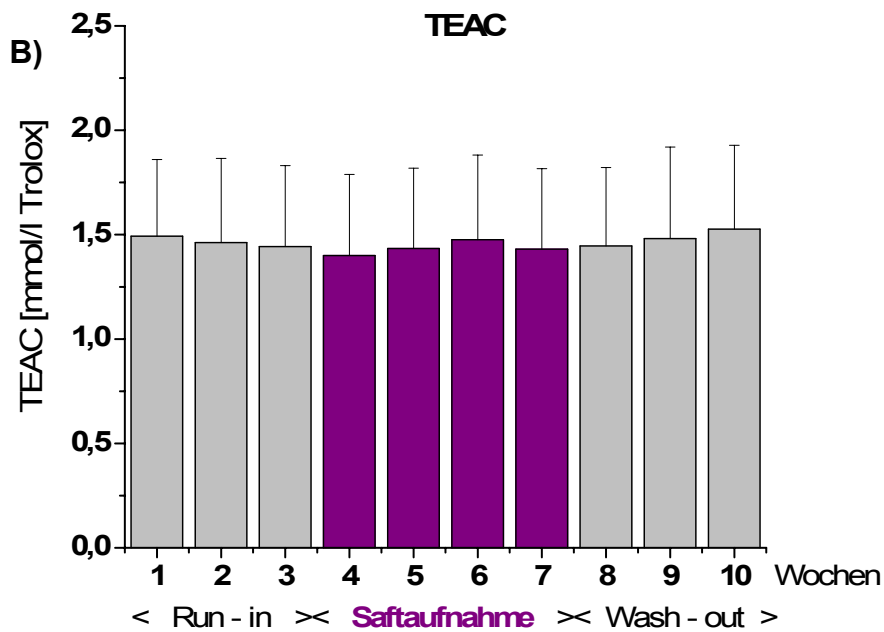
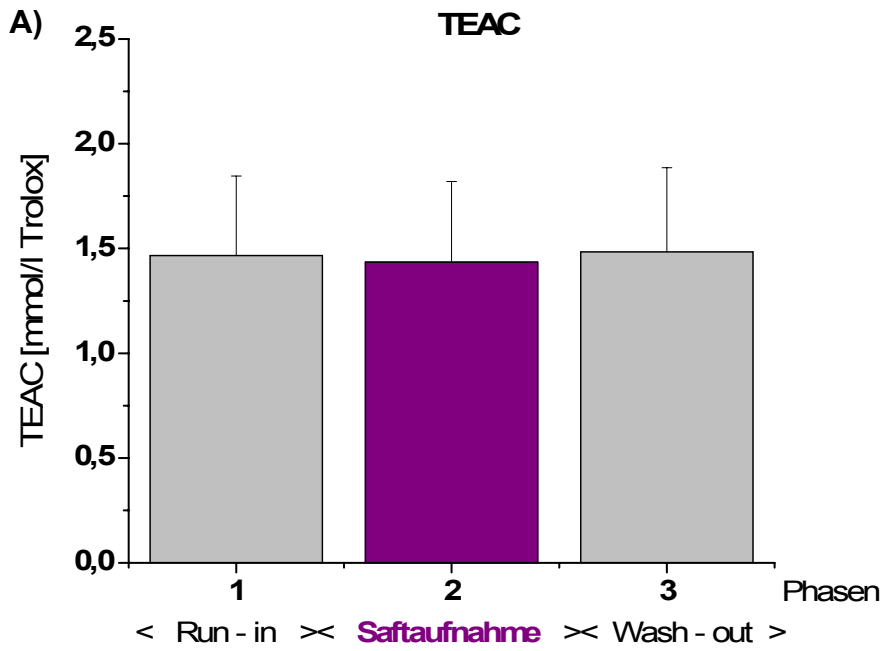


Abb. 5.27.A,B: TEAC, bestimmt in proteinfreiem Plasma. Mittelwert \pm SD; 21 Patienten; n=1-3;
A) Phasenweise gemittelte Werte; einseitig gepaarter t-Test (R/S, $p > 0,05$; W/S, $p < 0,05$); B) Wochenweise Darstellung

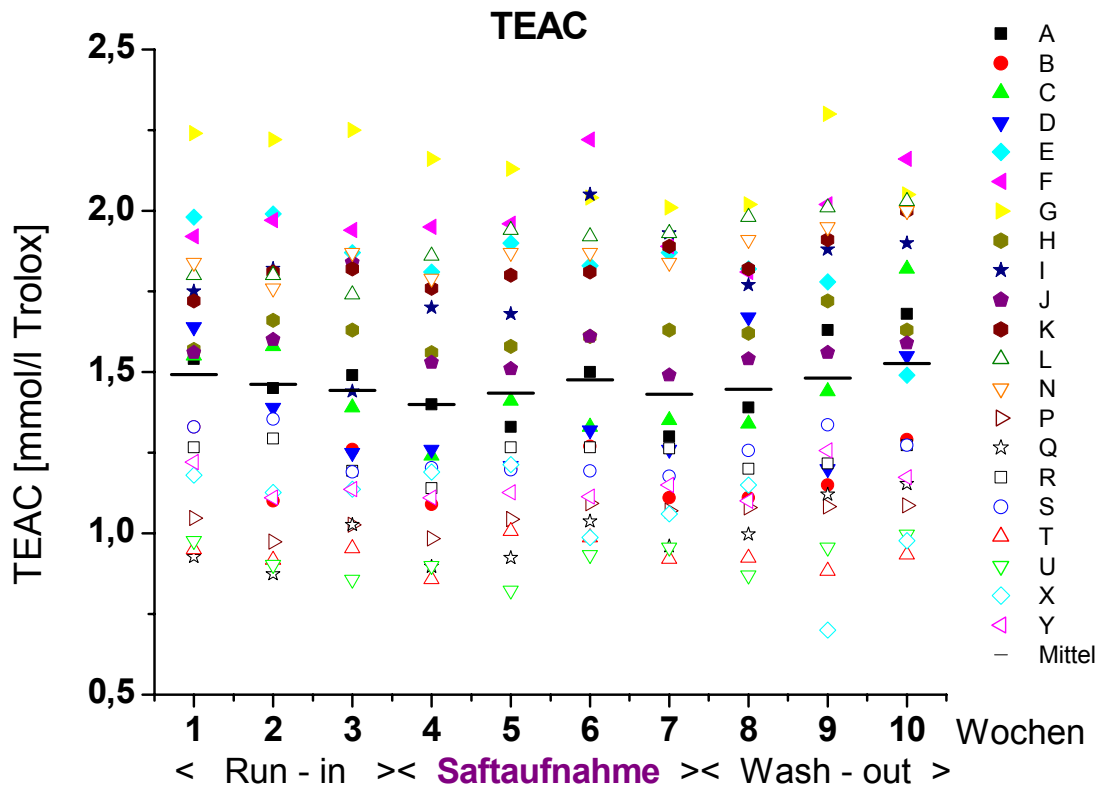


Abb. 5.28: TEAC, bestimmt in proteinfreiem Plasma. Darstellung der Einzelwerte der 21 Patienten und der Mittelwerte in den einzelnen Wochen; n=1-3

In vergleichbaren Interventionsstudien konnte ebenfalls keine Modulation der antioxidativen Kapazität im Blutplasma oder –serum durch antioxidativ wirksame Inhaltsstoffe von polyphenolreichen Lebensmitteln festgestellt werden [Collins, 2005]. Der gleichmäßige Verlauf der TEAC-Werte aller 8 HD-Patienten in allen Wochen der drei Phasen der Interventionsstudie legt die Vermutung nahe, dass große Änderungen der antioxidativen Kapazität im Blut nicht zu erwarten sind.

Bei einer Studie mit gesunden Probanden, die einmalig eine 400 ml-Portion Mehrfruchtsaft zu sich genommen haben, wurde jedoch nach 2 h ein Anstieg des TEAC im Plasma beobachtet, der weitere 4 h später wieder den Ausgangswert erreichte [Netzel et al., 2002]. Cao et al. zeigten, dass die relativ geringe Steigerung des TEAC-Wertes durch Polyphenole bei Aufnahme von Erdbeeren, Spinat oder Rotwein (ca. 10-15 %) nur maximal 4 h anhält [Cao et al., 1998]. In den meisten anderen Interventionen wurde kein Einfluss einer obst- und gemüsereichen Ernährung auf den TEAC des Blutplasmas festgestellt [Record et al., 2001; Dragsted et al., 2004; Weisel et al., 2006].

Generell scheint die Bestimmung des TEAC in Plasma nicht sensitiv genug zu sein, um die antioxidativen Eigenschaften von Nahrungsmitteln bzw. deren Inhaltsstoffe zu erfassen, da auch die Bioverfügbarkeit mitberücksichtigt werden muss. Die oft hohen TEAC-Werte der Früchte, Säfte oder einzelner Verbindungen sind in zellfreien Tests ermittelt worden und erlauben somit keinerlei Aussage über deren Aktivität nach (meistens geringer) Resorption im Organismus [Collins, 2005], was durch die Ergebnisse der aktuellen Studie bestätigt werden kann.

5.2.9. Harnsäure

Für den Harnsäuregehalt ergab sich ein leicht signifikanter Rückgang während der Saftaufnahme ($p < 0,05$), des Weiteren eine Tendenz zum Anstieg in der Wash-out Phase (Abb. 5.29). Sowohl die Absolutwerte des Harnsäuregehaltes als auch die Kurvenverläufe der Werte während der 10 Wochen Studie zeigten große inter-individuelle Unterschiede. Die Schwankungen der Ausgangswerte erklären sich möglicherweise über die mit der Ernährung aufgenommenen Vorläufer von Harnsäure über purin-reiche Lebensmittel.

Der Gehalt bei Patient E war am höchsten, bei L am niedrigsten; ein Rückgang der Harnsäure-Konzentration wurde bei den Patienten G und J, eine Verschlechterung wurde bei Patient X beobachtet. Die meisten Studienteilnehmer wiesen keine Modulation des Harnsäure-Gehaltes durch den Studiensaft auf (Abb. 5.30 und Anhang 11.1).

Der niedrige durchschnittliche Harnsäure-Gehalt könnte ein Indiz dafür sein, dass trotz der hohen individuellen Schwankungen generell eine purinarme Diät eingehalten wird, die geringere Harnsäure-Konzentrationen begünstigt. Die gemessenen durchschnittlichen Ausgangswerte der Patienten vor der HD sind mit $235 \mu\text{M}$ deutlich geringer als die in der Literatur beschriebenen Werte von $310 - 420 \mu\text{M}$ [Jackson et al., 1995; Ha et al., 1996; Müller et al., 2004]. Nach Müller et al. [Müller et al., 2004] bewegen sich diese Werte im Bereich der gesunden Probanden ($241 \mu\text{M}$). Die Werte sanken dann in der Saftaufnahme leicht auf $225 \mu\text{M}$ ab. Dieser leichte Rückgang könnte mit einem reduzierten Bedarf an körpereigenen Antioxidantien zusammenhängen, da durch den Studiensaft exogene Antioxidantien (Polyphenole) in erheblichen Mengen (etwa $3,5 \text{ g/l}$) zugeführt wurden.

Der hohe Stellenwert der Harnsäure als endogenes Antioxidans zeigt sich in den Ergebnissen von Rice-Evans et al. [Rice-Evans et al., 2000], die den Anteil der

Ergebnisse und erste Diskussion

antioxidativen Kapazität (TEAC) der Plasmabestandteile Albumin und Harnsäure an der Gesamtkapazität untersuchte. Aufgrund der hohen Konzentrationen ergaben sich Beiträge von 28% bzw. 20%.

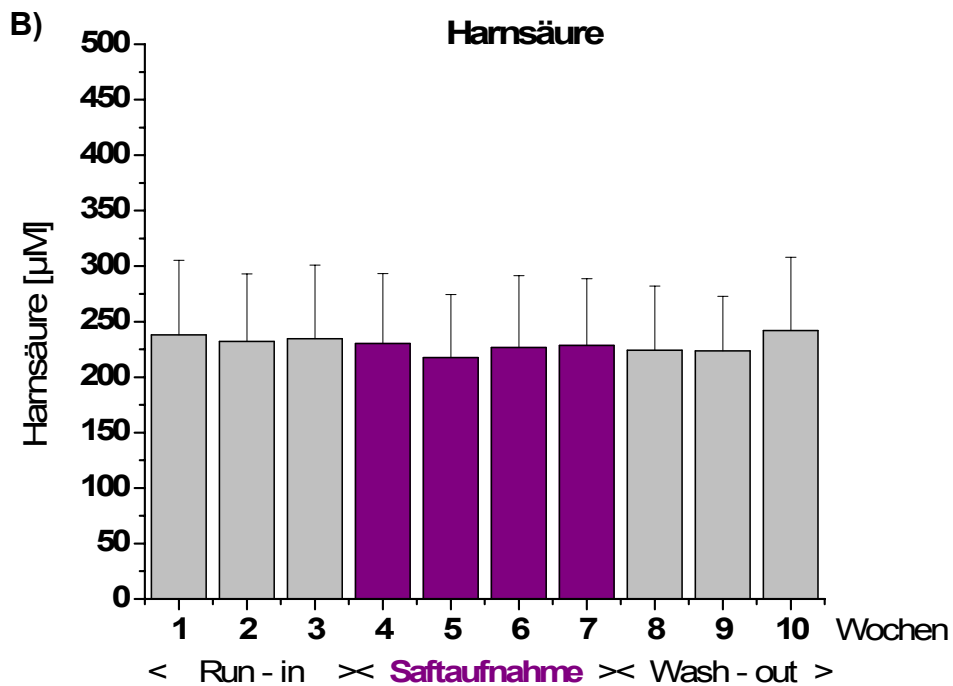
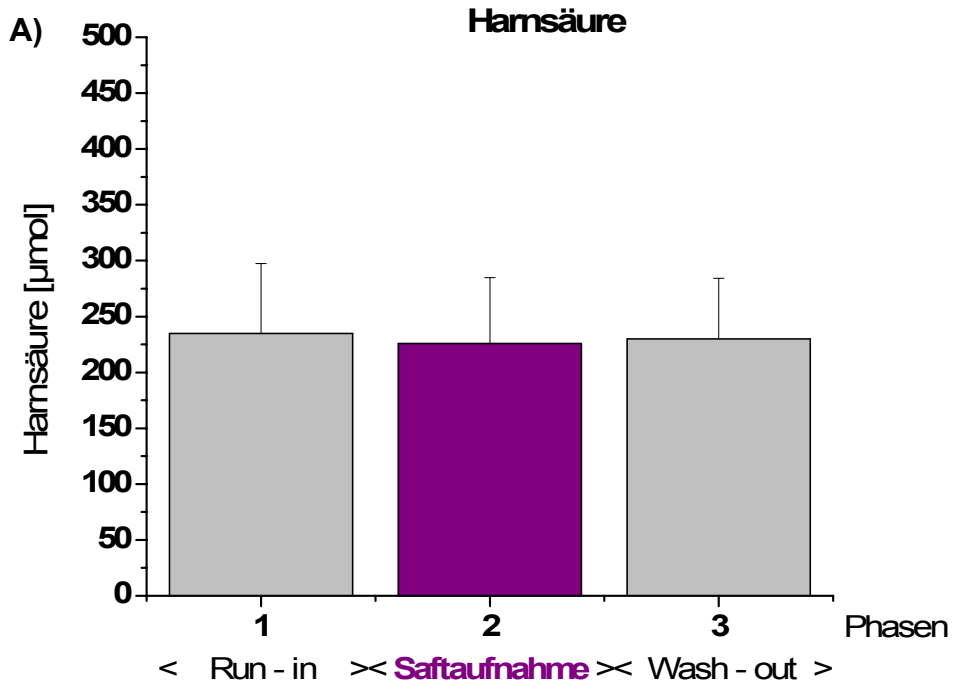


Abb. 5.29.A,B: Harnsäure, bestimmt in Plasma. Mittelwert \pm SD; 21 Patienten; n=1;

A) Phasenweise gemittelte Werte; einseitig gepaarter t-Test (R/S, $p < 0,05$; W/S, $p > 0,05$); B) Wochenweise Darstellung

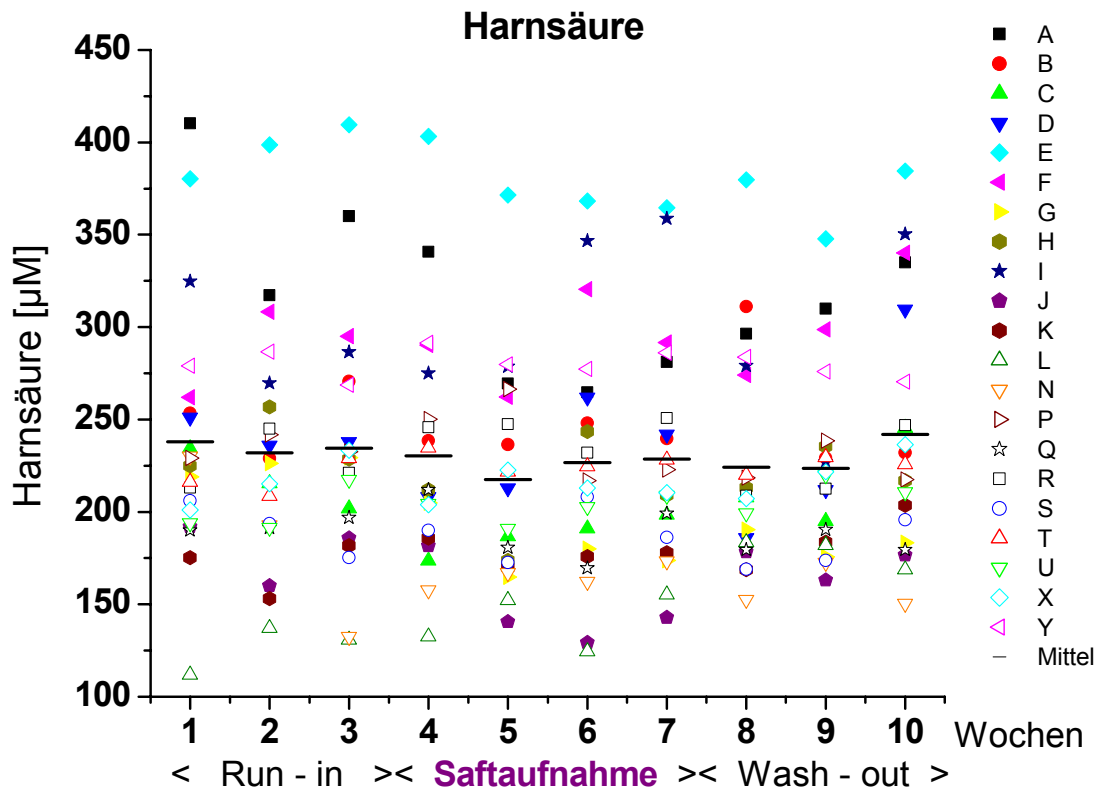


Abb. 5.30: Harnsäure, bestimmt in Plasma. Darstellung der Einzelwerte der 21 Patienten und der Mittelwerte in den einzelnen Wochen; n=1

5.2.10. Anthocyananalytik

In keiner der Serumproben der HD-Patienten konnten von Herrn Ackermann (TU Würzburg) Anthocyane nachgewiesen werden. Auch das Poolen der vier Serumproben eines Patienten, die während der Saftphase entnommen wurden, ergab keine nachweisbaren Mengen.

In der Literatur sind maximale Plasmakonzentrationen von 0,6 und 1,2 µg/l (500 ml Rotwein oder roter Traubensaft, entsprechend einer Menge von 68 bzw. 140 mg Malvidin-3-O-Glucosid) [Bub et al., 2001] nach 20 bzw. 90 min, 42 µg/l (400 ml Mehrfruchtsaft, entspricht 270 mg an Anthocyanen) [Netzel et al., 2002] nach 60 min, 13,1 µg/l (100 g getrocknete Blaubeeren, entspricht 1,16 g an Anthocyanen) [Mazza et al., 2002] nach 4 h und 275 µg/l (20 g Aronia-Extrakt, entspricht 1,3 g an Cyanidin-3-Glycosiden) [Kay et al., 2004] nach 2 h beschrieben.

In der vorliegenden Arbeit entsprach der Konsum von 100 ml Mehrfruchtsaft eine Anthocyanmenge von etwa 30 mg. Dies ist eine im Vergleich zur Literatur sehr geringe Menge. Wenn man die geringe Bioverfügbarkeit der Anthocyane (siehe

3.3.4.2) bedenkt, ist es bei der Nachweisgrenze des verwendeten HPLC-Systems (etwa 3 µg/l, siehe 4.3.9) nachvollziehbar, dass auch die gepoolten Serum-Proben für einen Nachweis zu geringe Anthocyan-Konzentrationen enthielten.

5.3. TEAC verschiedener Fruchtsäfte

Zur Einordnung der antioxidativen Kapazität des Studiensaftes (Tab. 5.4, Saft 1) fand ein Vergleich des TEAC mit dem von 12 kommerziell erhältlichen roten Fruchtsäften und 2 Apfelsäften statt (Tab. 5.4). 5 Säfte stammen aus Supermärkten, 4 aus dem Reformhaus, 3 aus der Apotheke und die Säfte 14 und 15 wurden in Geisenheim hergestellt (ähnlich wie der Studiensaft).

Den höchsten TEAC haben die Holunderbeerensäfte (9 und 10) erreicht, gefolgt von Heidelbeersaft (11). Diese Säfte werden hauptsächlich in Reformhäusern und Apotheken verkauft und sind zum Mischen mit anderen Säften oder Mineralwasser gedacht, pur sind sie sehr bitter und adstringent. Die niedrigsten Werte ergaben sich für die beiden Apfelsäfte (14 und 15) und die roten Traubensäfte (3 - 6). Die getesteten Johannisbeer- und Aroniaprodukte (7, 8 und 13) waren Nektare (Fruchtsaftgehalt 25%, 33% und 50 %), was die relativ niedrigen TEAC-Werte erklärt. Bei den reinen Säften, die allerdings sehr adstringent und pur nicht trinkbar wären, sind für Johannisbeersaft (100%) Werte im Bereich der Holunder- und Heidelbeeren und für Aroniasaft ein TEAC von etwa 45 mmol/l Trolox zu erwarten.

Die Berechnung des TEAC (ausgehend von den gemessenen Werten, Tab. 5.4) eines Mischfruchtsaftes (55% roter Traubensaft, 35% schwarze Johannisbeere, 10% Holunder), dessen Zusammensetzung in etwa dem für die Studie verwendeten Saft entspricht, ergibt einen Wert von etwa 35 mmol/l Trolox. Dies liefert eine gute Übereinstimmung mit dem Wert für den Studiensaft (31,3 mmol/l Trolox). Andere, käuflich erwerbende Mischfruchtsäfte (2 und 12) liegen bei den Werten oberhalb der roten Traubensäfte, aber erheblich unterhalb des TEAC des Studiensaftes. Für andere Säfte wie Apfel- oder Orangensaft wurden meistens deutlich geringere Werte gemessen (< 5 mmol/l Trolox) [Rechner et al., 1997; Pellegrini et al., 2003]. Im Gegensatz dazu sind die Werte der Vergleichsmessung (Tab. 5.4) bei allen Säften (inklusive der Apfelsäfte aus Geisenheim) deutlich höher, was ein Hinweis auf exzellente Qualität der untersuchten Säfte ist.

Der Studiensaft stellt somit ein „Vorzeigeprodukt“ mit sehr hohem Polyphenolgehalt und antioxidativer Kapazität sowie einem möglichst geringen Zuckergehalt

Ergebnisse und erste Diskussion

(eingestellt durch die Menge an rotem Traubensaft) bei angenehmem Geschmack dar, der im Verlauf der Studie zu teilweise hochsignifikanten Verringerungen der oxidativen Schädigung und einer Stärkung der antioxidativen Abwehr führte.

Tabelle 5.4: Antioxidative Kapazität (TEAC) von 15 Fruchtsäften

Saft	Bezeichnung	TEAC [mmol/l Trolox]
1	Roter Mehrfruchtsaft (Geisenheim, 2005)	31,3
2	Rabenhorst Vitesse (Roter Traubensaft, 20% Heidelbeersaft, Bananenmark, Vitamine B6 und B12, Folsäure)	17
3	Rio d'oro roter Traubensaft (100%)	13
4	Kumpf roter Traubensaft (100%)	14
5	Eos Bio roter Traubensaft (100%)	14
6	Rabenhorst roter Traubensaft (100%)	14,1
7	Belsina schwarze Johannisbeere (Nektar, 25%)	21
8	Kumpf schwarze Johannisbeere (Nektar, 33%)	20,5
9	Bio Garten schwarze Holunderbeere (100%)	76,8
10	Voelkel Bio schwarze Holunderbeere (100%)	78,4
11	Beutelsbacher Bio Heidelbeersaft (100%)	61,7
12	Hohes C roter Multivitaminsaft (Wasser und konzentrierter Mehrfruchtsaft: Apfel, weiße Traube, Holunderbeere, Aroniabeere, Acerolakirsche, schwarze Johannisbeere, Sauerkirsche, Zitrone; Traubenkernextrakt (0,013%), Niacin, Pantothensäure, Biotin, Vitamine E, B2, B6, B12)	18,1
13	Kelterei Walther Aronianektar (50%, Fruchtsüße aus Äpfeln)	23,3
14	Apfelsaft (Geisenheim 2005: 25% Seestermüher, 24% Topaz, 23% Bohnapfel, 18% Börtlinger, 10% Bittenfelder)	10
15	Apfelsaft (Geisenheim 2006: 45% Mauzen, 35% Tafelobst, 10% Bohnapfel, 10% Winterrambour)	10,2

6. Diskussion und Ausblick

6.1. Untersuchungen der prooxidativen Eigenschaften verschiedener Eisen-Präparationen

6.1.1. In vitro-Untersuchungen

Die geprüften Eisenkomplexe unterscheiden sich deutlich in ihrem Potenzial zur Induktion oxidativer Zellschäden: In den verwendeten in-vitro Systemen (U937 Zellen, primäre humane Lymphozyten, humanes Vollblut) erzeugt Ferrlecit[®] ausgeprägte (oxidative) DNA-Schäden und deutlich erhöhte Lipidperoxidation (Malondialdehydbildung). Venofer[®] zeigt ein vergleichbares oder geringfügig niedrigeres Schädigungspotenzial. CosmoFer[®] induziert in allen Testsystemen die geringste oxidative Schädigung. Dies deckt sich auch mit der Literatur, wobei hier Venofer[®] im Vergleich Ferrlecit[®] etwas höhere Schäden (MDA-Gehalt, LDH-Assay) verursacht [Zager et al., 2004], was wahrscheinlich mit den unterschiedlichen Eliminations-Halbwertszeiten zusammenhängt. Dem Glukonat Ferrlecit[®] und dem Saccharat Venofer[®] fehlen im Vergleich zu dem zylinderförmigen Dextranskomplex von CosmoFer[®] dreidimensionale Strukturen im Kohlenhydratanteil, so dass größere Mengen an Eisen unkontrolliert freigesetzt werden können.

Fe(III)-Chlorid, das als Beispiel einer unkomplexierten Eisen(III)-Verbindung zu Vergleichszwecken untersucht wurde, verursachte die höchsten DNA-Schäden, bei der LPO waren die Werte jedoch im Vergleich zu FL und VF geringer. Dies könnte damit erklärt werden, dass Fe(III)-Chlorid im Vergleich zu Fe(II)-Chlorid eine deutlich geringere Schädigungswirkung zu besitzen scheint: in vitro-Untersuchungen zeigen eine reduzierte (DNA-Strangbrüche) bis komplett fehlende (LPO) Wirkung von Fe(III)-Chlorid [Shires, 1982], was wahrscheinlich damit zusammenhängt, dass das Fe(III)-Chlorid erst reduziert werden muss, bevor es seine prooxidativen Wirkungen entfalten kann. Im menschlichen Körper läuft eine solche Reduktion bei einer intravenösen Eisengabe aufgrund der sich im Blut befindenden Antioxidantien (z. B. Glutathion und Harnsäure) relativ schnell ab, in vitro fehlt in Zellsystemen aber oft die entsprechende reduzierende Umgebung, um das Fe(III)-Chlorid zu aktivieren. Dies könnte auch eine Erklärung für die niedrigen MDA-Werte für Fe(III)-Chlorid in der

aktuellen Studie sein; die DNA-Schäden waren jedoch stark ausgeprägt, was auf die leichtere Erreichbarkeit des Erbmaterials bei in vitro Untersuchungen, verglichen mit einem komplexen Organismus (Tier, Mensch), bei dem z. B. eine Verteilung im Blut oder die „Abfangreaktion“ mit Ferritin die Konzentration an freiem Eisen verringert, zurückzuführen sein dürfte. In vitro gelangt ein größerer Anteil der applizierten Dosis an Eisen in den Zellkern, wobei es auf seinem Weg durch die Zelle teilweise von Enzymen und intrazellulärem Glutathion reduziert wird.

6.1.2. Untersuchungen bei HD-Patienten

Wie die Ergebnisse (siehe 5.1.2) zeigen, verursacht die Applikation von FL bei HD-Patienten deutliche Anstiege bei den DNA-Schäden und der LPO zu allen Messzeitpunkten nach Ende der Eisengabe. Diese schnelle und deutliche Erhöhung der Werte weist auf einen starken oxidativen Stress hin, das eisen-bindende Transferrin wird schon bei einer Infusionszeit von 30 Minuten übersättigt [Zanen et al., 1996]. Das freie Eisen(III) generierte über die Fentonreaktion ROS, die wiederum Membranlipide, Lipoproteine (Bildung von MDA) und DNA schädigten. Roob et al. [Roob et al., 2000] fanden im gesamten untersuchten Zeitraum (30 Minuten bis 3 Stunden nach Infusion einer Eisen-Saccharose-Komplex-Lösung) eine starke Transferrinübersättigung, freies Eisen im Plasma (BDI) und erhöhte Plasma-MDA-Gehalte.

Der Einfluss dreier unterschiedlicher Eisen-Präparationen auf verschiedene Biomarker in Blutserum, untersucht an 12 HD-Patienten [Pai et al., 2007], ergab bei der Schädigung die Abstufung Fe-Glukonat > Fe-Saccharat > Fe-Dextran (entspricht der Reihenfolge bei den in vitro-Untersuchungen der aktuellen Studie), wobei nur das Dextran keinerlei negativen Einfluss auf die Biomarker hatte. Die Applikation von Glukonat oder Saccharat führten bereits nach 30 min sowohl zu einer Sättigung des Transferrins als auch zu einer Erhöhung der Konzentration an ungebundenem Eisen (v. a. bei Glukonat), was die Generierung von ROS über die Fenton-Reaktion begünstigt. Das Glukonat steigerte zusätzlich den MDA-Gehalt (30 min nach der Applikation).

Allerdings sind auch für Dextran Komplexe Nebenwirkungen beschrieben: eine Reaktion mit körpereigenen Dextran-Antikörpern kann, v. a. bei hochmolekularen Komplexen (MW > 400 kDa), zu anaphylaktischen Schocks führen. Es wurden auch mildere allergische Reaktionen beobachtet, jedoch ebenfalls ausschliesslich bei

hochmolekularen Dextranskomplexen (untersucht an ICR-Mäusen) [Geisser et al., 1992].

Sowohl die DNA-Schädigung als auch der MDA-Gehalt haben sich in diesem Zusammenhang als nutzbringende Biomarker erwiesen und deutliche Unterschiede zwischen den untersuchten Eisen-Präparationen aufgezeigt. Die teilweise fehlenden Wiederholungsmessungen in vitro, die geringe Anzahl der untersuchten Patienten (n = 5) und die Tatsache, dass nicht bei allen Patienten zu jedem Messzeitpunkt Blut entnommen wurde beeinträchtigen jedoch die Aussagekraft der Ergebnisse.

Die Glutathion-Bestimmung scheint als Marker für oxidativen Stress in dieser Fragestellung nicht besonders wertvoll. Bei intravenöser Ferrlecit[®]-Gabe konnten keine Einflüsse auf tGSH, GSSG oder Status (0, 10 und 30 min nach Ende der Infusion) beobachtet werden. Allerdings ist das Patientenkollektiv zu klein gewesen (n = 5), um eine abschließende Beurteilung abgeben zu können.

Die Bedeutung einer Veränderung von GSH sowie der protektiven Enzyme SOD, CAT und GPx wurde in der Literatur kontrovers diskutiert: niedrigere Werte in den Patienten wiesen auf einen verringerten Schutz und damit oxidativen Stress hin, höhere Konzentrationen könnten durch eine stressbedingte Induktion erklärt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das speziell fraktionierte, niedermolekulare Eisen(III)-Dextran CosmoFer[®] (MW ~ 100 kDa) durchgehend die geringsten Schäden in den Biomarker-Untersuchungen in vitro und in vivo liefert. Von einem leichten Risiko anaphylaktischer Schocks, die allerdings hauptsächlich bei hochmolekularen Dextran-Komplexen auftreten abgesehen, scheint es praktisch keine Nebenwirkungen zu geben. Den vorliegenden Daten zufolge sollte in Zukunft CosmoFer[®] den beiden anderen untersuchten Eisen-Komplexen (Ferrlecit[®] und Venofer[®]) bei der Behandlung von Anämie vorgezogen werden.

6.2. Interventionsstudie mit rotem Mehrfruchtsaft bei HD-

Patienten

Viele epidemiologische Studien geben Hinweise, dass eine obst- und gemüsereiche Kost präventiv gegen verschiedene ROS-assoziierte Krankheiten [Steinmetz et al., 1996; Knekt et al., 1997] oder koronare Herzkrankheiten [Keli et al., 1996] wirkt. Aufgrund der komplexen Zusammensetzung von Nahrungsmitteln ist jedoch schwer zu erfassen, welche Inhaltsstoffe dabei für die Wirksamkeit maßgeblich sind.

Hauptziel dieser Arbeit war es, das antioxidative Potenzial eines roten Mehrfruchtsaftes in einer humanen Interventionsstudie mit HD-Patienten zu charakterisieren. In Tabelle 6.1 sind die wichtigsten Analysendaten des in dieser Arbeit eingesetzten Saftes aufgeführt.

Tabelle 6.1: Auszug aus den Analysendaten des Studiensaftes

Messparameter		Messwert
TEAC	mM	31,1
Gesamtphenole	mg/l	3478
∑ Anthocyane	mg/l	301
Ascorbinsäure	mg/l	268
Kalium	mg/l	1743
Glukose	g/l	52,7

Da die untersuchten HD-Patienten zwischen den Dialysen praktisch nichts renal ausscheiden, mussten bei der Festlegung des Interventionsvolumens die absolute Flüssigkeitsmenge und der Kaliumgehalt des Saftes berücksichtigt werden, die beide das Herz-Kreislaufsystem stark beeinflussen. Trotz des relativ hohen Kalium-Gehaltes gab es keine durch den Saft bedingten Anstiege bei den Kalium-Werten der Patienten, was auch an der geringen Menge von 200 ml Saft pro Tag liegt, und obwohl bei anderen Studien höhere Saftmengen aufgenommen wurden, waren auch in der aktuellen Arbeit deutliche antioxidative Effekte nachweisbar.

Die fehlende renale Ausscheidung könnte den Vorteil haben, dass schon durch geringe tägliche Saftaufnahmen relativ hohe Plasmaspiegel der Polyphenole und anderer Saftbestandteile erreicht werden und dies die Möglichkeit, messbare

Diskussion und Ausblick

Veränderungen zu detektieren, verbessert; dies konnte anhand der gewählten Untersuchungsmethoden jedoch nicht nachgewiesen werden.

Da der Saft auch für Diabetiker geeignet sein sollte, wurde der Glukosegehalt des Saftes minimiert, ohne dass er dabei zu sauer oder adstringent wurde. Es wurde auf die Zugabe von Süßstoffen verzichtet, die für eine Trinkbarkeit des Saftes notwendige Süße wurde über den Anteil an rotem Traubensaft eingestellt.

Die beeindruckend hohen TEAC- und Gesamtphenol-Werte ließen in Kombination mit dem erhöhten oxidativen Stress und der fehlenden renalen Ausscheidung der HD-Patienten eine deutliche Wirksamkeit des Saftes erwarten. Der hohe TEAC-Wert wird fast ausschließlich durch die Polyphenole verursacht, das im Saft enthaltene Vitamin C leistet nur einen Beitrag (etwa 1,5 mmol/Trolox). Der Vergleich mit anderen, käuflich erwerbten roten Fruchtsäften (siehe 5.2.3) zeigt, dass alle getesteten geschmacklich annehmbaren Säfte einen deutlich geringeren TEAC aufwiesen als der Studiensaft. Säfte mit höherem TEAC (z. B. Holunderbeerensaft) werden normalerweise als Komponenten von Mehrfruchtsäften verwendet, pur schmecken sie zu bitter und adstringent. Die antioxidative Wirksamkeit eines roten Mehrfruchtsaftes kann also durch eine gezielte Auswahl der Früchte und schonende Bearbeitung bei der Herstellung noch verbessert werden und zu einem gesteigerten gesundheitlichen Nutzwert dieses Produktes führen.

Die folgende Tabelle (Tab. 6.2) zeigt die Ergebnisse der Saftintervention bei HD-Patienten kurz zusammengefasst. Dargestellt ist die Veränderung der Biomarker in der Saftaufnahme-Phase im Vergleich mit der Run-in- bzw. Wash-out-Phase.

Tabelle 6.2: Zusammenfassung der Ergebnisse der Interventionsstudie (↗ = Erhöhung, ⇔ = kein Effekt; ↘ = Verminderung; Gelb hinterlegt sind die präventiven Effekte durch den Mehrfruchtsaft; ^a: Weitere Reduktion in der Wash-out-Phase)

Parameter	Mehrfruchtsaft	
	Vergleich: Saft / Run-in	Saft / Wash-out
DNA-Grundschiäden	↘ (Trend, p = 0,06)	⇔
DNA-Gesamtschiäden	↘ (p < 1*10 ⁻⁴)	↘ (p < 1*10 ⁻⁴)
tGSH-Spiegel	↗ (p < 1*10 ⁻⁴)	↗ (p < 1*10 ⁻⁴)
GSSG-Spiegel	↘ (p < 1*10 ⁻⁴)	↘ (p < 1*10 ⁻⁴)
GSH-Status	↗ (p < 1*10 ⁻⁴)	↗ (p < 1*10 ⁻⁴)
Malondialdehyd	↘ (p < 1*10 ⁻³)	↗ (p < 0,05) ^a
Triglyceride	⇔	⇔
Proteincarbonyle	↘ (p < 1*10 ⁻⁴)	↘ (p < 1*10 ⁻⁴)
NFκB-Status	↘ (p < 5*10 ⁻³)	⇔
TEAC	⇔	↗ (p < 0,05)
Harnsäure	↘ (p < 0,05)	⇔

Es konnte eine hochsignifikante präventive Wirkung des Mehrfruchtsaftes mit den Markern DNA-Schädigung (Gesamtschiäden), Glutathion und Proteinoxidation (Carbonyle) nachgewiesen werden (Tab. 6.2). Die DNA-Grundschiäden der Patienten zeigen einen rückläufigen Trend während der Saftaufnahme, bei den Gesamtschiäden zeigt sich ein hochsignifikanter Rückgang, was darauf hindeutet, dass die zusätzlichen Schiäden bei HD-Patienten hauptsächlich oxidativer Natur sind (z. B. ROS). Die Gesamtschiäden steigen in der Wash-out-Phase wieder an, was auf eine eher kurzzeitige Wirkung hindeutet, daher sollten antioxidativ wirksame Mehrfruchtsäfte zur Aufrechterhaltung ihres protektiven Effekts täglich konsumiert werden. Der Studiensaft mit seiner hohen antioxidativen Kapazität ist möglicherweise für ein solches Patientenkollektiv besonders gut zur Verbesserung des allgemeinen Gesundheitszustandes geeignet. Der Comet Assay zur Detektion der DNA-Schiäden hat sich als geeigneter Biomarker bei HD-Patienten erwiesen. Im Vergleich zu gesunden Probanden, bei denen der Nachweis einer Modulation aufgrund der

geringen Schädigungsausmaße erschwert ist [Collins et al., 2001a; Moller et al., 2002; Collins, 2004; Gedik et al., 2005], ist die höhere Ausgangs-Schädigung der HD-Patienten besser geeignet, eine signifikante Reduktion der DNA-Schäden zu detektieren.

Alle drei Teilbestimmungen des Biomarkers Glutathion (tGSH, GSSG, Status) zeigten hochsignifikante protektive Veränderungen, was den Nutzen dieses Markers verdeutlicht. Reduziertes Glutathion (GSH) besitzt ein sehr niedriges Redox-Potential (-240 mV) und reagiert somit sehr sensibel auf Änderungen des Redox-Status der Zelle (z. B. aufgrund erhöhter Produktion von ROS), womit es den wichtigsten zellulären antioxidativen Abwehrmechanismus darstellt. Diese Sensibilität zeigt sich auch bei der schnellen Modulation des Glutathiongehaltes/status (maximale Änderungen bereits eine Woche nach dem Beginn einer Studienphase) im Vergleich zu den DNA-Schäden, deren Verringerung in der Saftphase mit Verzögerung eintrat. Über Enzyme des GSH-Metabolismus (GPx, GSR) und der GSH-Synthese (γ -GCS) ist die antioxidative Abwehr in die Detoxifizierung von Xenobiotika und in die Regulation des AREs involviert [Masella et al., 2005].

Bei weiteren Genexpressionsanalysen (mit Proben aus der aktuellen Studie) bezüglich relevanter Gene zu oxidativem Stress und DNA-Schäden zeigen sich ebenfalls Effekte (Anstieg der Genexpression bei GPx-1, GSR und γ -GCS) durch den phenolreichen Studiensaft [Soyalan, 2006].

Die Literatur gibt Hinweise, dass Polyphenole modulierende Effekte auf diese Prozesse haben, z. B. Aktivitätssteigerungen von γ -GCS (in vitro) [Moskaug et al., 2005] sowie GPx und GSR (Humanstudie mit gesunden Probanden und Traubenschalen-Extrakt) [Young et al., 2000, Young et al., 1999]. In vitro Experimente ergaben modulatorische Wirkungen eines Mehrfruchtsaft-Extraktes auf die Transkription der γ -GCS-Untereinheiten und des Transkriptionsfaktors Nrf2, durch den in erster Linie die transkriptionelle Kontrolle des γ -GCS-Gens erfolgt [Soyalan, 2006].

Es wurden indirekte Hinweise auf die in der Literatur beschriebene Adduktbildung von GSH mit reaktiven Aldehyden [Berhane et al., 1994, Glaab et al., 2001, Janzowski et al., 2003] erhalten, da im Vergleich zu gesunden Probanden die Plasma-Konzentration an MDA bei HD-Patienten erhöht und der Glutathionstatus verringert ist, was auf eine negative Korrelation dieser beiden Biomarker hindeutet.

Dies wird bestärkt durch das gegensätzliche Verhalten dieser Werte bei Aufnahme des Studiensaftes (MDA ↓ und GSH-Status ↑). Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass andere Mechanismen als die GSH-Depletion durch reaktive Aldehyde und deren Neutralisation durch die Saftinhaltsstoffe den beobachteten Effekten zugrunde liegen.

Der Gehalt an Malondialdehyd konnte durch die Saftintervention ebenfalls signifikant gesenkt werden. Die Veränderungen der Werte waren zwar relativ gering, ergaben aber zusammen mit der hohen Messgenauigkeit der Methode (geringer CV) eindeutige Ergebnisse. Der anhaltende Rückgang der Werte in der Wash-out-Phase deutet auf eine längere Zeit anhaltende Wirkung, möglicherweise bedingt durch eine stabile Einlagerung der Flavonoide in Lipidmembranen [Saija et al., 1995].

In anderen Interventionsstudien mit anthocyanhaltigen Lebensmitteln bei gesunden Probanden, in denen Biomarker zur Lipidperoxidation bestimmt wurden, gab es in vier Studien einen präventiven Effekt durch die Intervention zu beobachten [Nigdikar et al., 1998; Young et al., 1999; Netzel et al., 2002; Bub et al., 2003], in vier anderen, zeigte sich dagegen kein Einfluss [Young et al., 2000; Ramirez-Tortosa et al., 2004; Riso et al., 2005; Duthie et al., 2006]. Dragsted et al. kritisieren an der Bestimmung von MDA bzw. den TBARS, dass sie im Kompartiment Blut nicht einheitlich verteilt sind und dort reagieren, wo sie entstehen (z.B. beim enzymatischen Abbau der Lipide) und damit nicht spezifisch genug sind [Dragsted et al., 2003].

Untersuchungen in zellfreien Systemen (Induktion der Peroxidation von Linolsäure durch Fe^{2+} und Interaktion mit Liposomen) und in vitro (Gehirnmembran von Ratten) ergaben einen Rückgang des MDA-Gehaltes bei Anwesenheit von Flavonoiden [Saija et al., 1995]. Diese interkalieren in die Lipidmembran, ohne ihre antioxidativen Eigenschaften zu verlieren und wirken somit direkt am Ort des Angriffs der ROS [Saija et al., 1995].

Die Proteinoxidation wurde durch die Saftaufnahme signifikant verringert, was sich in einem deutlichen Rückgang des Proteincarbonyl-Gehaltes äußert. Nach Ende der Saftaufnahme stiegen die Werte innerhalb einer Woche wieder auf das Niveau der Run-in-Phase an, für eine dauerhafte Reduktion der Schäden wird also regelmäßiger Konsum vorausgesetzt. Die Proteincarbonyle scheinen im Vergleich zu anderen Biomarkern der Proteinoxidation der aussagekräftigste Endpunkt zu sein [Mayne et

al., 2003], da alle ROS zu Carbonylen führen können und alle Aminosäuren anfällig für die Bildung von Carbonylen sind, obwohl bestimmte Aminosäuren bevorzugt oxidiert werden (siehe 3.1.2.3) [Shacter, 2000]. Die Messung der Proteincarbonyle hat sich somit in diesem Zusammenhang als geeigneter Biomarker erwiesen.

Interventionen mit Vitamin E-Gabe bei HD-Patienten waren, im Gegensatz zur LPO, wirkungslos bezüglich der Verringerung von Carbonylen [Fumeron et al., 2005; Himmelfarb et al., 2007], was wahrscheinlich mit der Polarität der untersuchten Substanzen zusammenhängt: die antioxidativen Eigenschaften des fettlöslichen Vitamin E (niedrige Polarität) sind auf die Lipid-Phase des Blutes beschränkt, die wasserlöslichen Proteine im Plasma (wässrige Phase, vergleichsweise hohe Polarität) können nicht in Interaktion mit Vitamin E treten. Die Flavonoide hingegen sind aufgrund ihrer mittleren Polarität in der Lage, ihre antioxidativen Fähigkeiten im gesamten Blut (Fett- und Wasserphase) zu entfalten.

Des Weiteren konnte durch den Mehrfruchtsaft eine signifikante Erniedrigung des NF- κ B-Status erreicht werden. Dieser Effekt hielt auch noch während des Wash-out an, was auf eine längerfristige Wirkung hindeutet.

In der Literatur wurde dieser Endpunkt nur in wenigen humanen Interventionen mit anthocyanhaltigen Produkten bestimmt. In einer Studie mit gesunden Probanden, die Rotwein in Kombination mit einem fettreichen Frühstück konsumierten, konnte die Aktivität des Transkriptionsfaktors gesenkt werden; es ergab sich ein Zusammenhang mit der fettreichen Kost, die den NF- κ B-Status erhöht hatte [Blanco-Colio et al., 2000]. Van den Berg et al. fanden heraus, dass der NF- κ B-Status bei Rauchern erhöht ist im Vergleich zu Nichtrauchern [van den Berg et al., 2001a]. In einer weiteren Interventionsstudie von van den Berg et al. mit Rauchern, die eine obst- und gemüsereiche Ernährung und einen Fruchtsaft zu sich nahmen, fand sich keine protektive Modulation [van den Berg et al., 2001b]. Die Arbeitsgruppe folgerte daraus, dass der erhöhte Status dennoch zu niedrig war, um durch Antioxidantien messbar beeinflusst werden zu können. Somit wären Studien mit Patienten, die krankheitsbedingt durch oxidativen Stress einen stark erhöhten NF- κ B-Status, wie z.B. Diabetiker Typ 1 und 2 [Hofmann et al., 1998] oder Hämodialysepatienten [Rangan et al., 2006] haben, wahrscheinlich besser zur Detektion einer Modulation geeignet.

Dies konnte durch die aktuelle Studie bestätigt werden, obwohl ein relativ großer Zeitraum zwischen Blutabnahme und Bestimmung des Biomarkers NF- κ B lag. Durch die zeitintensive Kernextraktion könnten in dieser Zeit zusätzliche Prozesse in den Zellen ablaufen, die eventuelle Effekte verfälschen. Laut Angaben des Herstellers ist dies bei dem verwendeten Aufarbeitungsprozess jedoch nicht zu erwarten.

Die Regulation der NF- κ B-Aktivierungskaskade ist ein sehr komplexer Vorgang [Li et al., 2002], dessen Auswirkungen auf verschiedenen Ebenen des Signalweges untersucht werden sollten. In zukünftigen Untersuchungen wäre es möglicherweise sinnvoll auf neuere Versuchssysteme zurückzugreifen (z. B. FACE, Fast activated cell-based ELISA), bei dem die aufwändige Kernextraktion entfällt.

Der TEAC zeigte einen leicht signifikanten Rückgang in der Wash-out-Phase, der durchaus ein Ergebnis der Messchwankungen, kombiniert mit der im Vergleich zu anderen Studien geringen Teilnehmerzahl ($n = 21$), sein könnte. Ebenfalls denkbar wäre ein verspätetes Einsetzen der antioxidativen Wirkung, möglicherweise ein Resultat gesteigerter Transkription von Genen der antioxidativen Abwehr. Wegen der geringen Signifikanz der Werte-Veränderung ist jedoch keine eindeutige Aussage aufgrund der erhaltenen Ergebnisse in dieser Studie möglich.

In der Literatur wird diskutiert, ob die Bindung von Flavonoiden an Proteine einen Grund für die geringe Ausprägung der antioxidativen Kapazität der Flavonoide in vivo darstellt. Es wurde beschrieben, dass sich der TEAC von Kasein oder Albumin und Flavonoiden aus grünem und schwarzem Tee nicht additiv verhalten, sondern ein Teil der antioxidativen Kapazität bei der Bindung verlorenggeht [Arts et al., 2002].

Es wurde ein leicht signifikanter Rückgang der Harnsäurekonzentration während der Saftaufnahme-Phase beobachtet, eventuell eine Folge der gesteigerten Aufnahme an Antioxidantien während der Intervention. In der Literatur ist ein starker Zusammenhang zwischen endo- und exogenen Antioxidantien beschrieben [Masella et al., 2005], so dass sich der Gehalt des endogenen Antioxidans Harnsäure [Ames et al., 1981] möglicherweise durch die Aufnahme ausreichender Mengen exogener Antioxidantien senken lässt und damit theoretisch auch eine Behandlungsmethode für Gicht darstellen könnte. Bei orientierenden Untersuchungen von Müller et al. [Müller et al., 2004] zeigte sich, dass der GSSG-Gehalt im Vollblut von HD-Patienten ($n=10$) im Vergleich zu gesunden Probanden ($n=6$) erhöht war. Einflüsse auf die

Harnsäurekonzentration wurden nicht festgestellt, allerdings war das Patientenkollektiv möglicherweise zu klein, um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten. Zusammen mit den Ergebnissen der aktuellen Studie könnte dies bedeuten, dass der Gehalt an Harnsäure zwar durch exogene Antioxidantien verringert, jedoch durch oxidativen Stress keine gesteigerte Neusynthese induziert werden kann (nicht wie bei Glutathion).

Im Vergleich zu anderen Antioxidantien (Vitamine E und C) fällt das große Wirkungsspektrum der Flavonoide auf: Vit. E verringert eindeutig die LPO bei HD-Patienten [Bayes et al., 2001; Giray et al., 2003; Himmelfarb et al., 2007], positive Effekte auf klinische Endpunkte sind umstritten [Lonn et al., 2005; Siekmeier et al., 2006]. Hochdosiertes Vit. E führte bei einer Meta-Analyse der Daten von 135769 Teilnehmern (19 klinische Studien) [Miller et al., 2005] sogar zu einer erhöhten Sterblichkeitsrate. Eine Studie von Ohkawa et al. [Ohkawa et al., 2004] deutet auf prooxidative Eigenschaften von Vit. E bezüglich der LDL-Oxidation bei HD-Patienten hin, was speziell für diese Bevölkerungsgruppe die Notwendigkeit eines Ersatzes oder einer Ergänzung der Supplementierung mit Vit. E durch Flavonoide/Anthocyane verdeutlicht. Die gesundheitsfördernde Wirkung von Vitamin C als Einzelsubstanz bei HD-Patienten wird ebenfalls kontrovers diskutiert [Chen et al., 2003; Taji et al., 2004], unumstritten jedoch ist die positive Wirkung der Vitamine C und E bei kombinierter Anwendung [Hassan et al., 1995], was auf die Regeneration von Vitamin E durch Vitamin C zurückgeführt wird [Biesalski et al., 2002; Kojo, 2004]. Bei der Modulation der Proteinoxidation waren sie (auch in Kombination) wirkungslos [Himmelfarb et al., 2007].

Im Vergleich dazu zeigen die Flavonoide, abgesehen von den kontrovers diskutierten anti-atherosklerotischen Eigenschaften, bei allen erwähnten Markern ihre protektiven Wirkungen, da sie sowohl in der wässrigen als auch in der Fett-Phase des Blutes aktiv sind. Allerdings wäre es nun nicht sinnvoll, nur noch Flavonoide als antioxidativ wirksame Substanzen zu konsumieren, obwohl sie von den hier besprochenen Antioxidantien die umfassendsten positiven Wirkungen zeigen. Sie sind eher als Ergänzung zu den bisherigen antioxidativen Vorbeugemaßnahmen und Therapien zu sehen, da sie (neben ihrer eigenen Funktion als Antioxidantien) zusätzlich die Regeneration von Vitamin E durch Vitamin C [Kojo et al., 2004] durch ihre Fähigkeit, oxidiertes Vitamin C zu reduzieren, unterstützen können [Middleton et al., 2000].

Dies kann zu einem „Spareffekt“ bei beiden Vitaminen führen und somit das Risiko von adversen Wirkungen bei hoher Dosierung vermindern.

Doch auch bei Flavonoiden ist unter bestimmten Voraussetzungen *in vitro* (hohe Konzentrationen, metabolische Aktivierung) prooxidatives Verhalten möglich. Ab Konzentrationen von 100 μM Quercetin traten in humanen Lymphozyten durch Autoxidation DNA-Schäden auf, es erfolgte mit steigender Konzentration eine Erhöhung der H_2O_2 -Konzentration, der des Superoxidradikalanions, sowie der Gehalte an TBARS, die ihrerseits wieder DNA-Schäden verursachten und die Enzymaktivität von GSTs war verringert [Yen *et al.*, 2003]. Galati *et al.* konnten zeigen, dass die Meerrettich-Peroxidase Flavonoide in Phenoxylradikale umwandelt, die teilweise in der Lage waren (z. B. ausgehend von Phloretin und Quercetin), Glutathion, NADH und Vitamin C zu oxidieren oder GSH-Addukte zu bilden [Galati *et al.*, 2002].

In einer der aktuellen Studie ähnlichen Intervention mit gesunden Probanden [Weisel *et al.*, 2006] wurden die durch die Aufnahme von Mehrfruchtsaft erhaltenen Ergebnisse mit denen eines Kontrollsaftes verglichen, bei dem mittels SPE die monomere Anthocyanfraktion um 95% und die Gesamtphenole um 82% im Vergleich zum Ausgangssaft reduziert waren. Es stellte sich die Frage, inwiefern die Polyphenole des Saftes, einschließlich noch nicht bekannter Strukturen, an den Effekten beteiligt sind. Die entsprechenden Biomarkerergebnisse, die in der Intervention mit Kontrollsaft erzielt wurden, zeigten die protektiven Effekte, die mit Mehrfruchtsaft erreicht wurden, nicht. Somit konnte die positive Wirkung des Mehrfruchtsafts der während der Herstellung des Kontrollsaftes entfernten phenolischen Fraktion zugeordnet werden. Untersuchungen zur Modulation der Genexpression in PBMCs der Studienteilnehmer bei Weisel *et al.* [Weisel *et al.*, 2006] zeigten u. a. eine signifikante Herunterregulation von GSTT2 (Glutathion-S-Transferase-Gen) während der Mehrfruchtsaftaufnahme ($p < 0,01$) [Hofmann *et al.*, 2005]. Ob die Gruppe der Anthocyane (charakteristische Flavonoide in Beerenobst), für die erwähnten positiven Befunde entscheidend verantwortlich ist, lässt sich aus diesen Ergebnissen und anderen Interventionsstudien nicht ableiten.

Des Weiteren sollten Untersuchungen mit Degradationsprodukten der Anthocyane durchgeführt werden. In verschiedenen *in vitro*-Experimenten, in denen Anthocyane in gastrointestinalen Modellen (z.B. Schweine-Caecum-Modell o. Fäzes-Modell) untersucht wurden, zeigte sich, dass die Anthocyane/Anthocyanidine aufgrund ihrer

Instabilität bei neutralem pH-Wert und unter dem Einfluss der Mikroflora, zu den sehr stabilen korrespondierenden Phenolsäuren und Aldehyden zerfallen [Keppler et al., 2005; McDougall et al., 2005; Fleschhut et al., 2006]. Damit stellt sich die Frage, ob die gut chemisch und mikrobiell stabilen Phenolsäuren oder eventuell weitere bisher nicht identifizierte Metabolite der Anthocyane in vivo für die beobachteten antioxidativen Aktivitäten, sowie andere positive physiologische Effekte verantwortlich zu machen sind [Spencer et al., 2004]. Dies könnte erklären, dass trotz der geringen Bioverfügbarkeit der Anthocyane in vivo deutliche Wirkungen beobachtet wurden, die sich in der Zellkultur mit den Ausgangssubstanzen nicht nachweisen lassen. Deshalb sollten für zukünftige in vitro-Experimente die Phenolsäuren der Anthocyane und bei in vivo-Untersuchungen deren Analytik im Plasma in Betracht gezogen werden.

Die Erfassung der biologischen Wirksamkeit von Flavonoiden/ Polyphenolen ist daher gegenwärtig das Forschungsziel vieler Studien. In der vorliegenden Arbeit wurde ein deutlicher protektiver Effekt eines roten Mehrfruchtsaftes bei HD-Patienten nachgewiesen. Deswegen sollten sich zukünftige Forschungen weniger auf hochdosierte Supplemente zur Behandlung von oxidativem Stress und seinen Folgen konzentrieren, bei denen ungünstige Wirkungen nicht auszuschließen sind, sondern im Rahmen einer obst- und gemüsereichen Ernährung auf den sinnvollen Einsatz von "funktionellen" Lebensmitteln, für die keine Hinweise auf negative Effekte vorliegen.

7. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Modulation oxidativer Zellschäden bei Hämodialysepatienten durch Pro- und Antioxidantien untersucht.

Im ersten Teil wurden die prooxidativen Auswirkungen der drei zur intravenösen Applikation bestimmten Eisenmedikamente Ferrlecit[®] (Glukonat) [ältestes Medikament], Venofer[®] (Saccharat), CosmoFer[®] (Dextran) in vitro sowie die Modulation des oxidativen Stress durch eine Ferrlecit[®]-Gabe bei HD-Patienten bestimmt.

Die Bestimmungen der DNA-Schäden mittels Comet Assay und des LPO-Produkts Malondialdehyd mittels HPLC/Fluoreszenzdetektion zeigten in vitro bei U937-Zellen, isolierten humanen Lymphozyten und ex vivo bei humanem Vollblut ein im Vergleich zu Ferrlecit[®] und Venofer[®] deutlich geringeres Schädigungspotential von CosmoFer[®]. Der Dextran-Komplex (höchste Komplexstabilität) scheint gegenüber den Glukonat- und Saccharat-Komplexen verträglicher zu sein und sollte in Zukunft bevorzugt bei der Anämie-Behandlung eingesetzt werden.

Die Ergebnisse der Untersuchungen des oxidativen Stress bei mit Ferrlecit[®] behandelten HD-Patienten zeigen deutliche Anstiege bei den DNA-Schäden und der LPO zu allen Messzeitpunkten nach Ende der Eisengabe und somit auch die Relevanz der erhaltenen in vitro Daten für die Belastungssituation in vivo. Die Abstufungen im Schädigungspotential, die bei den in vitro Tests erhalten wurden, decken sich auch mit den Untersuchungen von Pai et al. bei HD-Patienten, bei denen sich für das Ausmaß der Schädigung die Rangfolge Fe-Glukonat > Fe-Saccharat > Fe-Dextran ergab [Pai et al., 2007].

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde das antioxidative Potenzial eines roten Mehrfruchtsaftes mit hohem Anthocyan-/Polyphenolanteil in einer humanen Interventionsstudie mit Biomarkern der oxidativen Zellschädigung, des oxidativen Status der Zelle und der Zellantwort charakterisiert. Ergänzend wurden Untersuchungen zur antioxidativen Kapazität vergleichbarer Fruchtsäfte durchgeführt.

21 HD-Patienten nahmen nach einer dreiwöchigen Run-in-Phase über vier Wochen täglich 200 mL eines anthocyanreichen Mischfruchtsaftes (TEAC 31,1 mmol/L Trolox) auf. Anschließend folgte eine dreiwöchige Wash-out-Phase ohne

Zusammenfassung

Saftaufnahme. Wöchentlich wurde Blut entnommen und zur Bestimmung der Biomarker (oxidative) DNA-Schädigung, Malondialdehyd (LPO-Produkt), Proteinoxidation (Carbonyl) Glutathionspiegel/-status, DNA-Bindungsaktivität des Transkriptionsfaktors NF κ B und antioxidative Kapazität (TEAC) sowie zur Erfassung der Harnsäure-, Triglycerid- und Anthocyankonzentrationen verwendet. Die Ergebnisse zeigten eine signifikante Abnahme der oxidativen DNA-Schäden ($p < 0,0001$), der MDA-Konzentration ($p < 0,001$) und des Carbonylgehaltes ($p < 0,0001$), eine Zunahme des tGSH-Spiegels und des Glutathionstatus (je $p < 0,0001$), ein Rückgang des GSSG-Spiegels ($p < 0,0001$) und der DNA-Bindungsaktivität von NF κ B ($p < 0,0001$) während der 4-wöchigen Saftaufnahme im Vergleich zur 3-wöchigen Run-in-Phase. Ein leicht signifikanter Rückgang ergab sich für den Harnsäuregehalt ($p < 0,05$), der TEAC und die Triglyceridkonzentrationen dagegen wurde nicht beeinflusst. In der Wash-out-Phase zeigte sich, dass manche Messwerte direkt nach Ende der Saftaufnahme (GSSG, $p < 0,0001$; Proteincarbonyle, $p < 0,0001$) oder mit einer Woche Verspätung (DNA-Gesamtschäden, $p < 0,0001$) wieder anstiegen bzw. absanken (Glutathionspiegel/status, jeweils $p < 0,0001$), was für eine kurzzeitige Wirkung (< 1 Woche) spricht. Beim Malondialdehyd-Gehalt und der DNA-Bindungsaktivität von NF κ B handelt es sich offensichtlich um eine längerfristig anhaltende protektive Wirkung, die Werte verändern sich im Vergleich zur Saftaufnahme-Phase nur unwesentlich.

Für die beobachteten protektiven Effekte scheinen die phenolischen Substanzen des Mehrfruchtsaftes verantwortlich zu sein, da in einer Studie mit fast polyphenolfreiem Vergleichssaft keine Reduktion von oxidativen Schäden nachgewiesen werden konnte [Weisel et al., 2006].

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit das antioxidative Potential eines flavonoid/polyphenolreichen roten Mischfruchtsaftes zur Verringerung oxidativer Zellschädigung bei Hämodialysepatienten eindeutig nachgewiesen werden. Der Konsum von antioxidativ wirksamen Fruchtsäften ist ein vielversprechender Präventions- und Therapieansatz für Patienten, die an Niereninsuffizienz und ROS-assoziierten Krankheiten leiden. Die Aufnahme natürlicher Antioxidantien mit der Nahrung über solche Säfte scheint eine Alternative zur chronischen Anwendung von hochdosierten Supplementen zu sein.

8. Literaturverzeichnis

- Abrahamse SL, Pool-Zobel BL, Rechkemmer G. Potential of short chain fatty acids to modulate the induction of DNA damage and changes in the intracellular calcium concentration by oxidative stress in isolated rat distal colon cells. *Carcinogenesis* 1999;20:629-634.
- Agarwal S, Deschner J, Long P, Verma A, Hofman C, Evans CH, Piesco N. Role of NF- κ B Transcription Factors in Antiinflammatory and Proinflammatory Actions of Mechanical Signals. *Arthritis Rheum* 2004;50(11):3541–3548.
- Akerboom T P, Sies H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol* 1981;77:373-382.
- Alhamdani MS. Impairment of glutathione biosynthetic pathway in uremia and dialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2005;20:124-128.
- Ames BN, Cathcart R, Schwiers E, Hochstein P. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc Natl Acad Sci* 1981;78:6858-6862.
- Arendt B, Ellinger S, Kekic K, Geus L, Fimmers R, Spengler U, Mueller W, Goerlich R. Single and repeated moderate consumption of native or dealcoholized red wine show different effects on antioxidant parameters in blood and DNA strand breaks in peripheral leukocytes in healthy volunteers: a randomized controlled trial. *Nutrition Journal [serial online]* 2005;4:33. Available: <http://www.nutrition.com/content/4/1/33> via the INTERNET. Accessed 2007 Sep 7.
- Arts M, Haenen G, Wilms L, Beetstra S, Heijnen C, Voss HP, Bast A. Interactions between flavonoids and proteins: effect on the total antioxidant capacity. *J Agric Food Chem* 2002;50:1184-1187.
- Bagchi D, Roy S, Patel V, He G, Khanna S, Ojha N, Phillips C, Ghosh S, Bagchi M, Sen CK. Safety and whole-body antioxidant potential of a novel anthocyanin-rich formulation of edible berries. *Mol Cell Biochem* 2006;281:197-209.
- Baldwin A S. The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996;14:649-683.
- Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 2001;357:539-545.
- Bayes B, Pastor M, Bonal J, Junca J, Romero R. Homocysteine and lipid peroxidation in hemodialysis: role of folic acid and vitamin E. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16:2172-2175.
- Becker BF. Towards the physiological function of uric acid. *Free Radic Biol Med* 1993;14:615-631.
- Belitz HD, Grosch W, Schieberle P. *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. Springer-Verlag; Berlin, Heidelberg, New York, 2001.
- Benamira M, Johnson K, Chaudhary A, Bruner K, Tibbetts C, Marnett LJ., Induction of mutations by replication of malondialdehyde-modified M13 DNA in *Escherichia coli*: determination of the extent of DNA modification, genetic requirements for mutagenesis, and types of mutations induced. *Carcinogenesis* 1995;16:93-99.
- Bender R, Lange S. Was ist der p-Wert? *Dtsch med Wschr* 2001;126(15):39-40.
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemie*, 5th ed. Spektrum Akademischer Verlag; Heidelberg, Berlin, 2003.
- Berghold A. *Evidenzbasierte Medizin und Biostatistik: Deskriptive Statistik*. Vorlesungsskript WS 03/04; medizinische Fakultät TU Dresden, 2004.
- Berhane K, Widersten M, Engstrom A, Kozarich, JW, Mannervik B. Detoxication of base propenals and other alpha, beta-unsaturated aldehyde products of radical reactions and lipid peroxidation by human glutathione transferases. *Proc Natl Acad Sci* 1994;91:1480-1484.
- Berret BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 1997;272:20313-20316.

Literaturverzeichnis

- Biesalski HK, Grimm P. Taschenatlas der Ernährung. Georg Thieme Verlag; Stuttgart, New York, 2004.
- Biesalski HK, Köhrle J, Schümann K. Vitamine, Spurenelemente und Mineralstoffe. Georg Thieme Verlag; Stuttgart, New York, 2002 .
- Birt D, Hendrich S, Wang W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacol Ther* 2001;90:157-177.
- Blanco-Colio LM, Valderrama M, Alvarez-Sala LA, Bustos C, Ortego M, Hernandez-Presa MA, Cancelas P, Gomez-Gerique J, Millan J, Egido J. Red wine intake prevents nuclear factor-kappaB activation in peripheral blood mononuclear cells of healthy volunteers during postprandial lipemia. *Circulation* 2000;102:1020-1026.
- Blatz V. Modulation oxidativer Zellschäden bei Hämodialyse - Patienten durch einen anthocyanreichen Mehrfruchtsaft. Diplomarbeit, Technische Universität Kaiserslautern, 2007.
- Block G, Patterson B, Subar A. Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. *Nutr Cancer* 1992;18:1-29.
- Boadi WY, Iyere PA, Adunyah SE. In vitro exposure to quercetin and genistein alters lipid peroxides and prevents the loss of glutathione in human progenitor mononuclear (U937) cells. *J Appl Toxicol* 2005;25:82-88.
- Boaz M, Green M, Fainauru M, Smetana S. Oxidative stress and cardiovascular disease in hemodialysis. *Clin Nephrol* 2001;55(2):93-100.
- Böhm H, Boeing H, Hempel J, Raab B, Korke A. Flavonole, Flavone und Anthocyane als natürliche Antioxidantien der Nahrung und ihre mögliche Rolle bei der Prävention chronischer Erkrankungen. *Deutsches Institut für Ernährungsforschung* 1998;37:147-163.
- Borchardt H. Mündliche Mitteilung. Westpfalzkrankenhaus Kaiserslautern, 2006.
- Bowie A, O'Neill LA. Oxidative stress and nuclear factor-kappaB activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries. *Biochem Pharmacol* 2000;59:13-23.
- Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest* 1968;21(Suppl 97):77-89.
- Brosius F. SPSS8 Professionelle Statistik unter Windows. International Thompson Publishing, 1998.
- Bub A, Watzl B, Blockhaus M, Briviba K, Liegibel U, Müller H, Pool-Zobel BL, Rechkemmer G. Fruit juice consumption modulates antioxidative status, immune status and DNA damage. *J Nutr Biochem* 2003;14:90-98.
- Bub A, Watzl B, Heeb D, Rechkemmer G, Briviba K. Malvidin-3-glucoside bioavailability in humans after ingestion of red wine, dealcoholized red wine and red grape juice. *Eur J Nutr* 2001;40:113-120.
- Canaud B, Cristol JP, Morena M, Leray-Moragues H, Bosc JY, Vaussenat F. Imbalance of oxidants and antioxidants in haemodialysis patients. *Blood Purification* 1999;17:99-106.
- Cao G, Muccitelli HU, Sanchez-Moreno C, Prior RL. Anthocyanins are absorbed in glycosylated forms in elderly women: a pharmacokinetic study. *Am J Clin Nutr* 2001;73:920-926.
- Cao G, Prior RL. Anthocyanins are detected in human plasma after oral administration of an elderberry extract. *Clin Chem* 1999;45:574-576.
- Cao G, Russell RM, Lischner N, Prior RL. Serum antioxidant capacity is increased by consumption of strawberries, spinach, red wine or vitamin C in elderly women. *J Nutr* 1998;128:2383-2390.
- Cao G, Sofic E, Prior RL. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic Biol Med* 1997;22:749-760.
- Carlsen H, Myhrstad MC, Thoresen M, Moskaug JO, Blomhoff R. Berry intake increases the activity of the gamma-glutamylcysteine synthetase promoter in transgenic reporter mice. *J Nutr* 2003;133:2137-2140.
- Carr A, Frei B. Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *FASEB J* 1999;13:1007-1024.

Literaturverzeichnis

- Castilla P, Echarri R, Davalos A, Cerrato F, Ortega H, Teruel JL, Lucas MF, Gomez-Coronado D, Ortuno J, Lasuncion MA. Concentrated red grape juice exerts antioxidant, hypolipidemic, and anti-inflammatory effects in both hemodialysis patients and healthy subjects. *Am J Clin Nutr* 2006;84:252-262.
- Ceballos-Picot I, Witko-Sarsat V, Merad-Boudia M, Nguyen AT, Thevenin M, Jaudon MC, Zingraf J, Verger C, Jungers P, Descamps-Latscha B. Glutathione antioxidant system as a marker of oxidative stress in a chronic renal failure. *Free Rad Biol Med* 1996;21:845-853.
- Chaturvedi MM, Mukhopadhyay A, Aggarwal B. Assay for Redox-Sensitive Transcription Factor. *Methods Enzymol* 2000;319:585-602.
- Chaudiere J, Ferrari-Iliou R. Intracellular Antioxidants: from Chemical to Biochemical Mechanisms. *Food Chem Toxicol* 1999;37:949-962.
- Chen WT, Lin YF, Yu FC, Kao WY, Huang WH, Yan HC. Effect of ascorbic acid administration in hemodialysis patients on in vitro oxidative stress parameters: influence of serum ferritin levels. *Am J Kidney Dis* 2003;42:158-166.
- Chen X L, Dodd G, Thomas S, Wasserman MA, Rovin BH, Kunsch C. Activation of the Nrf2/ARE Pathway Protects Endothelial Cells from Oxidant Injury and Inhibits Inflammatory Gene Expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; available via internet: doi:10.1152/ajpheart.00651.
- Chevion M, Berenshtein E, Stadtman E. Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as a marker of damage. *Free Radic Res* 2000;33:99-108.
- Chiou T J, Tzeng WF. The roles of glutathione and antioxidant enzymes in menadione-induced oxidative stress. *Toxicology* 2000;154:75-84.
- Christmann M, Tomicic MT, Roos WP, Kaina B. Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology* 2003;193:3-34.
- Clifford MN. Anthocyanins - nature, occurrence, and dietary burden. *J Sci Food Agric* 2000;80:1063-1072.
- Collins AR. Oxidative DNA damage, antioxidants, and cancer. *BioAssays* 1999;21:238-246.
- Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol* 2004;26:249-261.
- Collins AR. Measuring in vivo oxidative damage: a practical approach. Vol. 7 (Ed.: Griffiths, H. R.); John Wiley & Sons 2000: pp. 83-93.
- Collins AR, Dusinska M, Gedik CM, Stetina R. Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker? *Environ Health Perspect* 1996;104(Suppl 3):465-469.
- Collins AR, Dusinska M, Horska A. Detection of alkylation damage in human lymphocyte DNA with the comet assay. *Acta Biochim Pol* 2001a;48:611-614.
- Collins AR, Harrington V, Drew J, Melvin R. Nutritional modulation of DNA repair in a human intervention study. *Carcinogenesis* 2003;24:511-515.
- Collins BH, Horska A, Hotten PM, Riddoch C, Collins AR. Kiwifruit protects against oxidative DNA damage in human cells and in vitro. *Nutr Cancer* 2001b;39:148-153.
- Collins T, Read MA, Neish AS, Whitley MZ, Thanos D, Maniatis T. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. *Faseb J* 1995;9:899-909.
- Collins A. Assays for oxidative stress and antioxidant status: application to research into the biological effectiveness of polyphenols. *Am J Clin Nutr* 2005;81:261S-267S.
- Cristol JP, Bosc JY, Badiou S, Leblanc M, Lorrho R, Descomps B, Canaud B. Erythropoietin and oxidative stress in haemodialysis: beneficial effects of vitamin E supplementation. *Nephrol Dial Transplant* 1997;12:2312-2317.
- Dandona P, Thusu K, Cook S, Snyder B, Makowski J, Armstrong D, Nicotera T. Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. *Lancet* 1996;347:444-445.

Literaturverzeichnis

- Daschner M, Lenhartz H, Bötticher D, Schaefer F, Wollschläger M, Mehls O, Leichsenring M. Influence of dialysis on plasma lipid peroxidation products and antioxidant levels. *Kidney Int* 1996;50:1268-1272.
- De la Lastra CA, Villegas I. Resveratrol as an anti-inflammatory and anti-aging agent: mechanisms and clinical implications. *Mol Nutr Food Res* 2005;49:405-430.
- Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2005;15:316-328.
- Dedon PC, Plastaras JP, Rouzer CA, Marnett LJ. Indirect mutagenesis by oxidative DNA damage: formation of the pyrimidopurine adduct of deoxyguanosine by base propenal. *Proc Natl Acad Sci* 1998;95:11113-11116.
- Delves PJ, Roitt IM. The immune system; first of two parts. *N Engl J Med* 2000;343:37-49.
- Depeint F, Gee JM, Williamson G, Johnson IT. Evidence for consistent patterns between flavonoid structures and cellular activities. *Proc Nutr Soc* 2002;61:97-103.
- Diem K, Lentner C. *Wissenschaftliche Tabellen. Documenta Geigy*, 7. Auflage 1975; Thieme Verlag.
- Dietzmann J, Thiel U, Ansorge S, Neumann KH, Tüger M. Thiol-inducing and immunoregulatory effects of flavonoids in peripheral blood mononuclear cells from patients with end-stage diabetic nephropathy. *Free Radic Biol Med* 2003;33:1347-1354.
- Domenici FA, Vannucchi MT, Jordao AA, Meirelles MS, Vannucchi H. DNA oxidative damage in patients with dialysis treatment. *Ren Fail* 2005;27:689-694.
- Donica H. Evaluation of lipids Peroxidation products vs. proinflammatory cytokines in hemodialized patients. *Ren Fail* 2001;23(2):231-238.
- Dörner K. *Klinische Chemie und Hämatologie*. Georg-Thieme-Verlag 2001, 4. Auflage.
- Dragsted LO. Antioxidant actions of polyphenols in humans. *Int J Vitam Nutr Res* 2003;73:112-119.
- Dragsted LO, Pedersen A, Hermetter A, Basu S, Hansen M, Haren GR, Kall M, Breinholt V, Castenmiller JJ, Stagsted J, Jakobsen J, Skibsted L, Rasmussen SE, Loft S, Sandström B. The 6-a-day study: effects of fruit and vegetables on markers of oxidative stress and antioxidant defense in healthy nonsmokers. *Am J Clin Nutr* 2004;79:1060-1072.
- Draper HH, Squires EJ, Mahmoodi H, Wu J, Agarwal S, Hadley M. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. *Free Radic Biol Med* 1993;15:353-363.
- Droge W, Schulze-Osthoff K, Mihm S, Galter D, Schenk H, Eck HP, Roth S, Gmunder H. Functions of glutathione and glutathione disulfide in immunology and immunopathology. *Faseb J* 1994;8:1131-1138.
- Dursun E, Ozben T, Süleymanlar G, Dursun B, Yakupoglu G. Effect of hemodialysis on the oxidative stress and antioxidants. *Clin Chem Lab Med* 2002;40(10):1009-1013.
- Duthie GG, Gardner PT, Kyle JA. Plant polyphenols: are they the new magic bullet? *Proc Nutr Soc* 2003;62:599-603.
- Duthie S J, Jenkinson AM, Crozier A, Mullen W, Pirie L, Kyle J, Yap LS, Christen P, Duthie GG. The effects of cranberry juice consumption on antioxidant status and biomarkers relating to heart disease and cancer in healthy human volunteers. *Eur J Nutr* 2006;45:113-122.
- Eder R. Pigments. In: Marcel Dekker, ed. *Food Analysis* (Ed.: L. Nollet). New York 1996: pp. 937-1014.
- Eder R, Wendelin S. *Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft landwirtschaftlicher Versuchsanstalten. Klosterneuburg* 2002: pp. 293-296.
- Eiselt J, Racek J, Opatrny K. Oxidative stress: the effect of erythropoietin and the dialysis membrane. *Int J Artif Organs* 2000;23(1):33-40.
- Eiselt J, Racek J, Trefil L, Oy K. Effects of a vitamin E-modified dialysis membrane and vitamin C infusion on oxidative stress in hemodialysis patients. *J Artif Organs* 2001;25(6):430-436.

Literaturverzeichnis

- Eisenbrand G, Metzler M. Toxikologie für Naturwissenschaftler und Mediziner. Wiley VCH 2005, Weinheim.
- Eisenbrand G, Schreier P. Römpf Lexikon der Lebensmittelchemie. 2.8 ed., Thieme Verlag 2005, Stuttgart.
- Erba D, Riso P, Criscoli F, Testolin G. Malondialdehyde Production in Jurkat T Cells Subjected to Oxidative Stress. *Nutrition* 2003a;19:545–548.
- Erba D, Riso P, Foti P, Frigerio F, Criscoli F, Testolin G. Black tea extract supplementation decreases oxidative damage in Jurkat T cells. *Arch Biochem Biophys* 2003b;416:196–201.
- Esmailzadeh A, Tahbat F, Gaieni I, Alavi-Majd H, Azadbakht L. Concentrated pomegranate juice improves lipid profiles in diabetic patients with hyperlipidemia. *J Med Food* 2004;7:305-308.
- Esterbauer, H., Schaur, R. J., Zollner, H., Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes, *Free Radic Biol Med* **1991**, 11, 81-128.
- Evans M, Khan N, Rees A. Diabetic dyslipidaemia and coronary heart disease: new perspectives. *Curr Opin Lipidol* 1999;10:387-391.
- Evans M, Dizdaroglu M, Cooke MS. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutation Research* 2004;567:1-61.
- Facchini FS, Saylor KL. Low-iron-available, polyphenol-enriched, carbohydrate-restricted diet to slow progression of diabetic nephropathy. *Diabetes* 2003;52:1204-1209.
- Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res* 1995;339:37-59.
- Faller A, Schünke M. Der Körper des Menschen - Einführung in Bau und Funktion. 13. Auflage, Georg Thieme Verlag 1999, Stuttgart, New York.
- Felgines C, Talavera S, Gonthier MP, Texier O, Scalbert A, Lamaison JL, Remesy C. Strawberry anthocyanins are recovered in urine as glucuro- and sulfoconjugates in humans. *J Nutr* 2003;133:1296-1301.
- Fleischhut J. Untersuchungen zum Metabolismus, zur Bioverfügbarkeit und zur antioxidativen Wirkung von Anthocyanen. Dissertation, Technische Universität Karlsruhe, 2004.
- Fleischhut J, Kratzer F, Rechkemmer G, Kulling SE. Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins in vitro. *Eur J Nutr* 2006;45:7-18.
- Ford ES, Ajani UA, Mokdad AH. Brief communication: The prevalence of high intake of vitamin E from the use of supplements among U.S. adults. *Ann Intern Med* 2005;143:116-120.
- Fossati P, Prencipe L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin Chem* 1982;28:2077-2080.
- Fossen T, Slimestad R, Andersen MO. Anthocyanins with 4'-glucosidation from red onion, *Allium cepa*. *Phytochemistry* 2003;64:1367-1374.
- Frank J, Biesalski HK, Dominici S, Pompella A. The visualization of oxidant stress in tissues and isolated cells. *Histol Histopathol* 2000;15:173-184.
- Frank T, Netzel M, Strass G, Bitsch R, Bitsch I. Bioavailability of anthocyanidin-3-glucosides following consumption of red wine and red grape juice. *Can J Physiol Pharmacol* 2003;81:423-435.
- Fukumoto LR, Mazza G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J Agric Food Chem* 2000;48:3597-3604.
- Fumeron C, Nguyen-Khoa T, Saltiel C, Kebede M, Buisson C, Drüeke TB, Lacour B, Massy ZA. Effects of oral vitamin C supplementation on oxidative stress and inflammation status in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2005;20:1874-1879.
- Galati G, Sabzevari O, Wilson JX, O'Brien PJ. Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. *Toxicology* 2002;177:91-104.
- Galati G, O'Brien PJ. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radic Biol Med* 2004;37:287-303.
- Gallagher EP, Kavanagh TJ, Eaton DI. Glutathione, oxidized Glutathione, and mixed disulfides in biological samples. *Methods Toxicol* 1994;1b:349-366.

Literaturverzeichnis

- Galli F, Ronco C. Oxidant stress in Hemodialysis. *Nephron* 2000;84:1-5.
- Gedik CM, Collins A. Establishing the background level of base oxidation in human lymphocyte DNA: results of an interlaboratory validation study. *Faseb J* 2005;19:82-84.
- Geisser P, Baen M, Schaub E. Structure / Histotoxicity relationship of parenteral iron preparations. *Drug Res* 1992;42(12):1439-1453.
- Gerardi GM, Usberti M, Martini G, Albertini A, Sugherini L, Pompella A, DiLorenzo D. Plasma total antioxidant capacity in hemodialyzed patients and its relationship to other biomarker of oxidative stress and lipid peroxidation. *Clin Chem Lab Med* 2002;40(2):104-110.
- Ghosh G, van Duyne G, Ghosh S, Sigler PB. Structure of NF-kappa B p50 homodimer bound to a kappa B site. *Nature* 1995;373:303-310.
- Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 2002;109(suppl):81-96.
- Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998;16:225-260.
- Giammarioli S, Filesi C, Vitalr B, Cantagallo A, Dragoni F, Sanzini E. Effect od high intakes of fruit and vegetables on redox-status in type 2 onset diabetes: a pilot study. *Int J Vitam Nutr Res* 2004;74(5):313-320.
- Giray B, Kan E, Bali M, Hincal F, Basaran N. The effect of vitamin E supplementation on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation levels in hemodialysis patients. *Clin. Chim. Acta* 2003;338:91-98.
- Glaab V, Collins AR, Eisenbrand G, Janzowski C. DNA-damaging potential and glutathione depletion of 2-cyclohexene-1-one in mammalian cells, compared to food relevant 2-alkenals. *Mutat Res* 2001;497:185-197.
- Goenenc A, Ozkan Y, Torun M, Simsek B. Plasma malondialdehyde (MDA) levels in breast and lung cancer patients. *J Clin Pharm Ther* 2001;26:141-144.
- Golding JB, McGlasson WB, Wyllie SG, Leach DN. Fate of apple peel phenolics during cool storage. *J Agric Food Chem* 2001;49:2283-2289.
- Gottwald W. *Statistik für Anwender*. Wiley-VCH-Verlag 2000.
- Guillen-Sans R, Guzman-Chozas M. The thiobarbituric acid (TBA) reaction in foods: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1998;38:315-330.
- Gupta A. Iron infusion into arterial blood line during haemodialysis: a novel method to remove free iron and reduce oxidative damage. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15:1482.
- Ha TK, Talwar D, Cooney J, Simpson K, O'Reilly D, Lean ME. Abnormal antioxidant vitamin and carotenoid status in chronic renal failure. *Q J Med* 1996;89:765-769.
- Halliwell B, Gutteridge JM. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd ed., Oxford University Press 1999.
- Harper K A. Structural changes of flavylum salts. IV. Polarographic and spectrophotometric examination of pelargonidin chloride. *Aust J Chem* 1968;21:221.
- Hassan M, Hussain S, Zaki M, Alsharif N, Stobs S. Protective effects of antioxidants against uremia-induced lipid peroxidation and glutathione depletion in humans. *Pharmacol Toxicol* 1995;77:407-411.
- Hasselwander O, Young IS. Oxidative stress in chronic renal failure. *Free Radic Res* 1998;29:1-11.
- Heinonen M. Antioxidant activity and antimicrobial effect of berry phenolics – a Finnish perspective. *Mol Nutr Food Res* 2007;51:684-691.
- Henderson C J, Sahraoui A, Wolf CR. Cytochrome P450s and chemoprevention. *Biochem Soc Trans* 2000;28:42-46.
- Herrmann K. Inhaltsstoffe der Johannisbeeren. *Ind Obst- Gemüseverw* 1997;82:14-20.
- Herrmann K. Inhaltsstoffe der Süß- und Sauerkirschen. *Ind Obst- Gemüseverw* 1996;81:121-129.
- Herrmann K. Über die Gehalte der hauptsächlichen Pflanzenphenole in Obst. *Flüssiges Obst* 1992;59:66-70.
- Hertog MG, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. *Nutr Cancer* 1993;20:21-29.

Literaturverzeichnis

- Hertog MG, Kromhout D, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Fidanza F, Giampaoli S, Jansen A, Menotti A, Nedeljkovic S, et al. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch Intern Med* 1995;155:381-386.
- Himmelfarb J, McMennamin E, McMonagle E. Plasma aminothioliol concentration in chronic hemodialysis patients. *Kidney Int* 2002;61:705-716.
- Himmelfarb J, Phinney S, Ikizler TA, Kane J, McMonagle E, Miller G. Gamma-tocopherol and docosahexaenoic acid decrease inflammation in dialysis patients. *J Ren Nutr* 2007;17:296-304.
- Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 2001;411:366-374.
- Hofmann MA, Schiekofer S, Isermann B, Kanitz M, Henkels M, Joswig M, Treusch A, Morcos M, Weiss T, Borcea V, Abdel Khalek AK, Amiral J, Tritschler H, Ritz E, Wahl P, Ziegler R, Bierhaus A, Nawroth PP. Peripheral blood mononuclear cells isolated from patients with diabetic nephropathy show increased activation of the oxidative-stress sensitive transcription factor NF-kappaB. *Diabetologia* 1999;42:222-232.
- Hofmann MA, Schiekofer S, Kanitz M, Klevesath MS, Joswig M, Lee V, Morcos M, Tritschler H, Ziegler R, Wahl P, Bierhaus A, Nawroth PP. Insufficient glycemic control increases nuclear factor-kappa B binding activity in peripheral blood mononuclear cells isolated from patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 1998;21:1310-1316.
- Hofmann T, Weisel T, Janzowski C, Pool-Zobel BL. Effects of polyphenols containing fruit juices on gene expression in peripheral leucocytes - development of a genomics-based biomarker (biomics). Abstract, 2nd International Conference on Polyphenols and Health in Davis 2005, California.
- Hollman PC. Bioavailability of flavonoids. *Eur J Clin Nutr* 1997;51(suppl 1):66-69.
- Hollman PC, de Vries JH, van Leeuwen SD, Mengelers MJ, Katan MB. Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am J Clin Nutr* 1995;62:1276-1282.
- Hollmann PC, Katan MB. Dietary Flavonoids: Intake, Health Effects and Bioavailability. *Food Chem Toxicol* 1999;37:937-942.
- Hörl WH. Ernährung bei akuter und chronischer Nierenersatztherapie. *Internist* 1999;40:49-54.
- Hörl WH. Iron therapy for renal anemia: how much needed, how much harmful? *Pediatr Nephrol* 2007;22:480-489.
- Horvathova E, Slamenova D, Hlincikova L, Mandal TK, Gabelova A, Collins AR. The nature and origin of DNA single-strand breaks determined with the comet assay. *Mutat Res* 1998;409:163-171.
- Hou DX. Potential mechanisms of cancer chemoprevention by anthocyanins. *Curr Mol Med* 2003a;3:149-159.
- Hou DX, Ose T, Lin S, Harazoro K, Imamura I, Kubo M, Uto T, Terahara N, Yoshimoto M, Fujii M. Anthocyanidins induce apoptosis in human promyelocytic leukemia cells: structure-activity relationship and mechanisms involved. *Int J Oncol* 2003b;23:705-712.
- Ichihyanagi T, Shida Y, Rahman MM, Hatano Y, Konishi T. Bioavailability and tissue distribution of anthocyanins in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) extract in rats. *J Agric Food Chem* 2006;54(18):6578-6587.
- Jackson P, Loughrey CM, Lightbody JH, McNamee PT, Young IS. Effect of hemodialysis on total antioxidant capacity and serum antioxidants in patients with chronic renal failure. *Clinical Chemistry* 1995;41(8):1135-1138.
- Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med* 1990;9:515-540.
- Janzowski C, Glaab V, Mueller C, Straesser U, Kamp HG, Eisenbrand G. Alpha,beta-unsaturated carbonyl compounds: induction of oxidative DNA damage in mammalian cells. *Mutagenesis* 2003;18:465-470.
- Jaruga P, Dizdaroglu M. Repair of products of oxidative DNA base damage in human cells. *Nucleic Acids Res* 1996;24:1389-1394.

Literaturverzeichnis

- Kahle K, Kraus M, Scheppach W, Ackermann M, Ridder F, Richling E. Studies on apple and blueberry fruit constituents: do the polyphenols reach the colon after ingestion? *Mol Nutr Food Res* 2006;50:418-423.
- Kan E, Uendeger U, Bali M, Basaran N. Assessment of DNA strand breakage by the alkaline COMET assay in dialysis patients and the role of Vitamin E supplementation. *Mutat Res* 2002;520:151-159.
- Karin M, How NF-kappaB is activated: the role of the IkappaB kinase (IKK) complex. *Oncogene* 1999;18:6867-6874.
- Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol* 2000;18:621-663.
- Karin M, Takahashi T, Kapahi P, Delhase M, Chen Y, Makris C, Rothwarf D, Baud V, Natoli G, Guido F, Li N. Oxidative stress and gene expression: the AP-1 and NF-kappaB connections. *Biofactors* 2001;15:87-89.
- Kassie F, Parzefall W, Knasmuller S. Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. *Mutat Res* 2000;463:13-31.
- Kay CD, Mazza G, Holub BJ, Wang J. Anthocyanin metabolites in human urine and serum. *Br J Nutr* 2004;91:933-942.
- Kaysen GA. Inflammation and oxidative stress in end-stage renal disease. *Adv Nephrol* 2000;30:201-214.
- Kaysen GA. The microinflammatory state in uremia: Causes and potential consequences. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:1549-1557.
- Keli SO, Hertog MG, Feskens EJ, Kromhout D. Dietary flavonoids, antioxidant vitamins, and incidence of stroke: the Zutphen study. *Arch Intern Med* 1996;156:637-642.
- Kelly KA, Havrilla CM, Brady TC, Abramo KH, Levin ED. Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging piscine model systems. *Environ Health Perspect* 1998;106:375-384.
- Kepler K, Humpf HU. Metabolism of anthocyanins and their phenolic degradation products by the intestinal microflora. *Bioorg Med Chem* 2005;13:5195-5205.
- Klaunig JE, Xu Y, Isenberg JS, Bachowski S, Kolaja KL, Jiang J, Stevenson DE, Walborg EF. The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis. *Environ Health Perspect* 1998;106(suppl 1):289-295.
- Knekt P, Järvinen R, Reunanen A, Maatela J. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *British Medical Journal* 1996;312:478-481.
- Koeppen BH, Herrmann K. Flavonoid glycosids and hydroxycinnamic acid esters of blackcurrants (*Ribes nigrum* L.). *Z Lebensm Unters Forsch* 1977;164:263-268.
- Kojo S. Vitamin C: basic metabolism and its function as an index of oxidative stress. *Curr Med Chem* 2004;11:1041-1064.
- Kong JM, Chia LS, Goh NK, Chia TF, Brouillard R. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* 2003;64:923-933.
- Kosch M, Bahner U, Bettger H, Matzkies F, Teschner M, Schaefer R. A randomized, controlled parallel-group trial on efficacy and safety of iron sucrose (Venofer®) vs iron gluconate (Ferrlecit®) in haemodialysis patients treated with rHuEpo. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16(6):1239-44.
- Kreutzig T. *Kurzlehrbuch Biochemie*. Jungjohann Verlagsgesellschaft 1994; 8. korrigierte Auflage.
- Kuhnau J. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet* 1976;24:117-191.
- Kulling SE, Watzl B. Phytoestrogene. *Ernährungs-Umschau* 2003;50:234-239.
- Kunsch C, Medford RM. Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. *Circ Res* 1999;85:753-766.
- Lander HM, Sehajpal P, Levine DM, Novogrodsky A. Activation of human peripheral blood mononuclear cells by nitric oxide-generating compounds. *J Immunol* 1993;150:1509-1516.

Literaturverzeichnis

- Lapidot T, Harel S, Akiri B, Granit R, Kanner J. pH-dependant forms of red wine anthocyanins as antioxidants. *J Agric Food Chem* 1999;47:67-70.
- Laval J. Role of DNA repair enzymes in the cellular resistance to oxidative stress. *Pathol Biol* 1996;44:14-24.
- Lee JM, Johnson JA. An important role of Nrf2-ARE pathway in the cellular defense mechanism. *J Biochem Mol Biol* 2004;37:139-143.
- Lee JS, Surh YJ. Nrf2 as a novel molecular target for chemoprevention. *Cancer Lett* 2005;224:171-184.
- Lee-Hilz YY, Boerboom AM, Westphal AH, van Berkel WJ, Aarts JM, Rietjens IM. Pro-oxidant activity of flavonoids induces EpRE-mediated gene expression. *Chem Res Toxicol* 2006;19:1499-1505.
- Leighton F, Cuevas A, Guasch V, Perez DD, Strobel P, San Martin A, Urzua U, Diez MS, Foncea R, Castillo O, Mizon C, Espinoza MA, Urquiaga I, Rozowski J, Maiz A, Germain A. Plasma polyphenols and antioxidants, oxidative DNA damage and endothelial function in a diet and wine intervention study in humans. *Drugs Exp Clin Res* 1999;25:133-141.
- Lemanska K, Szymusiak H, Tyrakowska B, Zielinski R, Soffers AE, Rietjens IM. The influence of pH on antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxyflavones. *Free Radic Biol Med* 2001;31:869-881.
- Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1990;49:464-479.
- Levine RL, Stadtman ER. Oxidative modification of proteins during aging. *Exp Gerontol* 2001;36:1495-1502.
- Li J, Lee JM, Johnson JA. Microarray analysis reveals an antioxidant responsive element-driven gene set involved in conferring protection from an oxidative stress-induced apoptosis in IMR-32 cells. *J Biol Chem* 2002;277:388-394.
- Liang YC, Huang YT, Tsai SH, Lin-Shiau SY, Chen CF, Lin JK. Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. *Carcinogenesis* 1999;20:1945-1952.
- Lindberg-Madsen H, Möller-Anderson C, Viborg-Jorgensen L, Skibsted LH. Radical scavenging by dietary flavonoids. A kinetic study of antioxidant efficiencies. *Eur Food Res. Technol* 2000;211:240-246.
- Lindl T. Zell- und Gewebekultur. 4. überarbeitete und erweiterte Auflage 2000; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Lim PS, Wei YH, Yu YL, Kho B. Enhanced oxidative Stress in hemodialysis patients receiving intravenous iron therapy. *Nephrol Dial Transplant* 1999;14:2680-2687.
- Loft S, Poulsen HE. Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *J Mol Med* 1996;74:297-312.
- Lonn E. The HOPE and HOPE-TOO Trial Investigators. Effects of long-term vitamin E supplementation on cardiovascular events and cancer. *JAMA* 2005;293:1338-1347.
- Lou LM, Campos B, Gimeno JA, Caverni A, Boned B. Main dietary intake deficits in Hemodialysis patients: approach to a healthy dietary model based on the Mediterranean diet. *Nefrologia* 2007;27:38-45.
- Lykkesfeldt J. Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. *Clin Chim Acta* 2007;380:50-58.
- Maisonneuve P, Agodoa L, Gellert R, Stewart JH, Buccianti G, Lowenfels AB, Wolfe RA, Jones E, Disney AP, Briggs D, McCredie M, Boyle P. Cancer in patients on dialysis for end-stage renal disease: an international collaborative study. *Lancet* 1999;354:93-99.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004;79:727-747.
- Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Remesy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr* 2005;81:230S-242S.

Literaturverzeichnis

- Manna SK, Sah NK, Newman RA, Cisneros A, Aggarwal BB. Oleandrin suppresses activation of nuclear transcription factor-kappaB, activator protein-1, and c-Jun NH2-terminal kinase. *Cancer Res* 2000;60:3838-3847.
- Marko D, Puppel N, Tjaden Z, Jakobs S, Pahlke G. The substitution pattern of anthocyanidins affects different cellular signaling cascades regulating cell proliferation. *Mol Nutr Food Res* 2004;48:318-325.
- Marnett LJ. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res* 1999;424:83-95.
- Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem* 2005;16:577-586.
- Matsumoto H, Inaba H, Kishi M, Tominaga S, Hirayama M, Tsuda T. Orally administered delphinidin 3-rutinoside and cyanidin 3-rutinoside are directly absorbed in rats and humans and appear in the blood as the intact forms. *J Agric Food Chem* 2001;49:1546-1551.
- May MJ, Ghosh S. Rel/NF-kappa B and I kappa B proteins: an overview. *Semin Cancer Biol* 1997;8:63-73.
- Mayne ST. Antioxidant nutrients in chronic disease: use of biomarkers of exposure on oxidative stress status in epidemiologic research. *J Nutr* 2003;133:933S-940S.
- Mazza G, Kay CD, Cottrell T, Holub BJ. Absorption of anthocyanins from blueberries and serum antioxidant status in human subjects. *J Agric Food Chem* 2002;50:7731-7737.
- Mazza G, Miniati E. *Anthocyanins in Fruits, Vegetables and Gains*. CRC Press Inc., Boca Raton, 1993.
- McDougall IC. Intravenous administration of iron in epoetin-treated haemodialysis patients – which drugs, which regimen? *Nephrol Dial Transplant* 2000;15:1743-1745.
- McDougall GJ, Fyffe S, Dobson P, Stewart D. Anthocyanins from red wine - Their stability under simulated gastrointestinal digestion. *Phytochemistry* 2005;66:2540-2548.
- Meiers S, Kemeny M, Weyand U, Gastpar R, von Angerer E, Marko D. The anthocyanidins cyanidin and delphinidin are potent inhibitors of the epidermal growth-factor receptor. *J Agric Food Chem* 2001;49:958-962.
- Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Annu Rev Biochem* 1983;52:711-760.
- Melidou M, Riganakos K, Galaris D. Protection against nuclear DNA damage offered by flavonoids in cells exposed to hydrogen peroxide: The role of iron chelation. *Free Radic Biol Med* 2005;39:1591-1600.
- Meneghini R. Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage. *Free Radic Biol Med* 1997;23:783-792.
- Metodiewa D, Jaiswal AK, Cenas N, Dickancaite E, Segura-Aguilar J. Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. *Free Radic Biol Med* 1999;26:107-116.
- Michelis R, Gery R, Sela S, Shurtz-Swirski R, Grinberg N, Snitkowski T, Shasha S, Kristal B. Carbonyl stress induced by intravenous iron during haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18:924-930.
- Middelton E, Kandaswami C, Theoharides T. The effect of plant flavonoides on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Res* 2000;52:673-751.
- Miller ER, Pastor-Barriuso R, Dalal D, Riemersma RA, Appel LJ, Guallar E. Meta-Analysis: high-dose vitamin E supplementation may increase all-cause mortality. *Ann Intern Med* 2005;142:37-46.
- Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci* 1993;84:407-412.
- Mircescu G, Capusa C, Stoian I, Vargolici B, Barbulescu C, Ursea N. Global assessment of serum antioxidant status in hemodialysis patients. *J Nephrol* 2005;18:599-605.
- Miyata T, Kurokawa K, van Ypersele de Strihou C. Advanced glycation and lipoxidation end products: Role of reactive carbonyl compounds generated during carbohydrate and lipid metabolism. *J Am Soc Nephrol* 2000;11:1744-1752.

Literaturverzeichnis

- Miyazawa T, Nakagawa K, Kudo M, Muraishi K, Someya K. Direct intestinal absorption of red fruit anthocyanins, cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3,5-diglucoside, into rats and humans. *J Agric Food Chem* 1999;47:1083-1091.
- Mohanty JG, Jaffe JS, Schulman ES, Raible DG. A highly sensitive fluorescent micro-assay of H₂O₂ release from activated human leukocytes using a dihydroxyphenoxazine derivative. *J Immunol Methods* 1997;202:133-141.
- Moller P, Vogel U, Pedersen A, Dragsted LO, Sandström B, Loft S. No effect of 600 grams fruit and vegetables per day on oxidative DNA damage and repair in healthy nonsmokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003;12:1016-1022.
- Moller P, Loft S. Oxidative DNA damage in human white blood cells in dietary antioxidant intervention studies. *Am J Clin Nutr* 2002;76:303-310.
- Morazzoni P, Bombardelli E. *Vaccinium myrtillus* L. *Fitoterapia* 1996;67:3-29.
- Morena M, Cristol JP, Bosc JY, Tetta C, Forret G, Leger CL, Delcourt C, Papoz L, Descomps B, Canaud B. Convective and diffusive losses of vitamin C during hemodiafiltration session: a contributive factor to oxidative stress in hemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2002;17:422-427.
- Moskaug JO, Carlsen H, Myhrstad MC, Blomhoff R. Polyphenols and glutathione synthesis regulation. *Am J Clin Nutr* 2005;81:277S-283S.
- Müller C, Eisenbrand G, Gradinger M, Rath T, Albert FW, Vienken J, Singh R, Farmer PB, Stockis JP, Janzowski C. Effects of hemodialysis, dialyser type and iron infusion on oxidative stress in uremic patients. *Free Radic Res* 2004;38:1093-1100.
- Muraoka K, Shimizu K, Sun X, Tani T, Izumi R, Miwa K, Yamamoto K. Flavonoids exert diverse inhibitory effects on the activation of NF- κ B. *Transplant Proc* 2002;34:1335-1340.
- Murken J, Cleve H. *Humangenetik*. 4. neubearbeitete Auflage 1988, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.
- Murkovic M. Physiologische Wirkungen der Anthocyane. *Ernährung & Medizin* 2002, 17, 167-172.
- Murkovic M, Adam U, Pfannhauser W. Analysis of anthocyanine glycosides in human serum. *Fresenius J Anal Chem* 2000;366:379-381.
- Musonda CA, Chipman JK. Quercetin inhibits hydrogen peroxide (H₂O₂)-induced NF- κ B DNA binding activity and DNA damage in HepG2 cells. *Carcinogenesis* 1998;19:1583-1589.
- Myhrstad MC, Carlsen H, Nordstrom O, Blomhoff R, Moskaug JO. Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the gamma-glutamylcysteine synthetase catalytical subunit promoter. *Free Radic Biol Med* 2002;32:386-393.
- Narayan MS, Naidu KA, Ravishankar GA, Srinivas L, Venkataraman LV. Antioxidant effect of anthocyanin on enzymatic and non-enzymatic lipid peroxidation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1999;60:1-4.
- Natarajan K, Manna SK, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Protein tyrosine kinase inhibitors block tumor necrosis factor-induced activation of nuclear factor- κ B, degradation of I κ B α , nuclear translocation of p65, and subsequent gene expression. *Arch Biochem Biophys* 1998;352:59-70.
- Nawroth PP, Bierhaus A, Vogel GE, Hofmann MA, Zumbach M, Wahl P, Ziegler R. Nichtenzymatische Glykierung und oxidativer Stress bei chronischen Erkrankungen und Diabetes mellitus. *Medizinische Klinik* 1999;94:29-38.
- Nelson RL. Iron and colorectal cancer risk: human studies. *Nutr Rev* 2001;59:140-148.
- Netzel M, Strass G, Janssen M, Bitsch I, Bitsch R. Bioactive anthocyanins detected in human urine after ingestion of blackcurrant juice. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2001;20:89-95.
- Netzel M, Strass G, Kaul C, Bitsch I, Dietrich H, Bitsch R. In vivo antioxidative capacity of a composite berry juice. *Food Res Int* 2002;35:213-216.
- Nguyen T, Sherratt PJ, Pickett CB. Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2003;43:233-260.

Literaturverzeichnis

- Nguyen-Khoa T, Massy ZA, De Bandt JP, Kebede M, Salama L, Lambrey G, Witko-Sarsat V, Drüeke TB, Lacour B, Thevenin M. Oxidative stress and hemodialysis: role of inflammation and duration of dialysis treatment. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16:335-340.
- Nielsen IL, Dragsted LO, Ravn-Haren G, Freese R, Rasmussen SE. Absorption and excretion of black currant anthocyanins in humans and watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *J Agric Food Chem* 2003;51:2813-2820.
- Nigdikar SV, Williams NR, Griffin BA, Howard AN. Consumption of red wine polyphenols reduces the susceptibility of low-density lipoproteins to oxidation in vivo. *Am J Clin Nutr* 1998;68:258-265.
- Nilsson K, Sundstrom C. Establishment and characteristics of two unique cell lines from patients with lymphosarcoma. *Int J Cancer* 1974;13:808-823.
- Noda Y, Kaneyuki T, Mori A, Packer L. Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: delphinidin, cyanidin, and pelargonidin. *J Agric Food Chem* 2002;50:166-171.
- O'Byrne DJ, Devaraj S, Grundy SM, Jialal I. Comparison of the antioxidant effects of Concord grape juice flavonoids and α -tocopherol on markers of oxidative stress in healthy adults. *Am J Clin Nutr* 2002;76:1367-1374.
- Ohkawa S, Yoneyama T, Shimoi K, Takita T, Maruyama Y, Kumagai H. Pro-oxidative effect of α -tocopherol in the oxidation of LDL isolated from co-antioxidant depleted non-diabetic hemodialysis patients. *Atherosclerosis* 2004;176:411-418.
- Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD, Grizzle JE, Rosenstock L, Barnhart S, Balmes J, Cherniak MG, Cullen MR, Glass A, Keogh J, Meyskens F, Valanis B, Williams HJ. The β -Carotene and Retinol Efficacy Trial (CARET) for chemoprevention of lung cancer in high risk populations: smokers and asbestos-exposed workers. *Cancer Res* 1994;54:2038s-2043s.
- Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD, Balmes J, Cullen MR, Glass A, Keogh JP, Meyskens FL, Valanis B, Williams JH, Barnhart S, Hammar S. Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *N Engl J Med* 1996;334:1150-1155.
- Onmeda, medizinisches Internetportal. http://www.onmeda.de/arztbesuch/alternative_heilverfahren/heilpflanzenlexikon/holunder.html; accessed 2007 Okt 18.
- Orange JS, Levy O, Geha RS. Human disease resulting from gene mutations that interfere with appropriate nuclear factor-kappaB activation. *Immunol Rev* 2005;203:21-37.
- Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;123:291-298.
- Ozden M, Maral H, Akaydin D, Cetinapl P, Kalender B. Erythrocyte glutathione peroxidase activity, plasma malondialdehyde and erythrocyte glutathione levels in hemodialysis and CAPD patients. *Clin Biochem* 2002;35:269-273.
- Pacifici RE, Davies KJ. Protein, lipid and DNA repair systems in oxidative stress: the free-radical theory of aging revisited. *Gerontology* 1991;37:166-180.
- Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 1999;18:6853-6866.
- Pai AB, Boyd AV, McQuade CR, Harford A, Norenberg JP, Zafer PG. Comparison of oxidative stress markers after intravenous administration of iron dextran, sodium ferric gluconate, and iron sucrose in patients undergoing hemodialysis. *Pharmacotherapy* 2007;27:343-350.
- Pande V, Ramos MJ. NF-kappaB in human disease: current inhibitors and prospects for de novo structure based design of inhibitors. *Curr Med Chem* 2005;12:357-374.
- Parrkinen J, von Bonsdorff L, Peltonen S, Grönhagen-Riska C, Rosenlöf K. Catalytically active iron and bacterial growth in serum of hemodialysis patients after i.v. iron-saccharate administration. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15:1827-1834.

Literaturverzeichnis

- Pasaoglu H, Muhtaroglu S, Günes M, Utas C. The role of oxidative state of glutathione and glutathione-related enzymes in anemia of hemodialysis patients. *Clinical Biochemistry* 1996;29(6):567-572.
- Pellegrini N, Re R, Yang M, Rice-Evans C. Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2'-azinobis(3-ethylenebenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation decolorization assay. *Methods Enzymol* 1998;299:379-389.
- Pellegrini N, Serafini M, Colombi B, Del Rio D, Salvatore S, Bianchi M, Brighenti F. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *J Nutr* 2003;133:2812-2819.
- Pharmacocosmos Pharmaceuticals. http://www.pharmacocosmos.com/intravenousironinfusion/CosmoFer_irondextran.html; accessed 2008 Jan 26.
- Pool-Zobel BL, Bub A, Schroder N, Rechkemmer G. Anthocyanins are potent antioxidants in model systems but do not reduce endogenous oxidative DNA damage in human colon cells. *Eur J Nutr* 1999;38:227-234.
- Pour Nikfardjam M, Schmitt K, Rühl EH, Patz CD, Dietrich H. Untersuchung rebsortenreiner Traubensäfte auf den Gehalt an Resveratrol-derivaten. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 2000;96:319-324.
- Prior RL. Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. *Am J Clin Nutr* 2003;78:570S-578S.
- Pryor C. Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions. *Ann Rev Physiol* 1986;48:657-667.
- Pschyrembel, *Medizinisches Wörterbuch*. 257. Auflage 1993, Walter de Gruyter Verlag.
- Radtke, J., Linseisen, J., Wolfram, G., Fasting plasma concentrations of selected flavonoids as markers of their ordinary dietary intake, *Eur J Nutr* **2002**, *41*, 203-209.
- Raj DS, Choudhury D, Welbourne TC, Levi M. Advanced glycation end products: A nephrologist's perspective. *Am J Kidney Dis* 2000;35(3):365-380.
- Ramirez-Tortosa CM, Andersen OM, Gardner PT, Morrice PC, Wood SG, Duthie SJ, Collins AR, Duthie GG. Anthocyanin-rich extract decreases indices of lipid peroxidation and DNA damage in vitamin E-depleted rats. *Free Radic Biol Med* 2001;31:1033-1037.
- Ramirez-Tortosa CM, Garcia-Alonso J, Luisa Vidal-Guevara M, Quiles JL, Jesus Periago M, Linde J, Dolores Mesa M, Ros G, Abellan P, Gil A. Oxidative stress status in an institutionalised elderly group after the intake of a phenolic-rich dessert. *Br J Nutr* 2004;91:943-950.
- Rangan GK, Kan G, Steer JH, Dogra G, Croft KD, Rhodes HC, Woodroffe AJ, Joyce DA. Altered expression of nuclear factor- κ B in peripheral blood mononuclear cells in chronic haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2006;21:1137-1139.
- Rayet B, Gelinas C. Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene* 1999;18:6938-6947.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 1999;26:1231-1237.
- Rechner A, Patz CD, Dietrich H. Beitrag zur Bewertung der antioxidativen Kapazität verschiedener Getränke. *Fluessiges Obst* 1997;64:62-65.
- Rechner AR, Kuhnle G, Hu H, Roedig-Penman A, van den Braak MH, Moore KP, Rice-Evans CA. The metabolism of dietary polyphenols and the relevance to circulating levels of conjugated metabolites. *Free Radic Res* 2002;36:1229-1241.
- Record I, Dreosti I, McInerney K. Changes in plasma antioxidant status following consumption of diets high or low in vegetables or following dietary supplementation with an antioxidant mixture. *Br J Nutr* 2001;85:459-464.
- Requena JR, Chao CC, Levine RL, Stadtman ER. Glutamic and amino adipic semialdehydes are the main carbonyl products of metal-catalyzed oxidation of proteins. *Proc Natl Acad Sci* 2001;98:69-74.

Literaturverzeichnis

- Riboli E, Norat T. Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk. *Am J Clin Nutr* 2003;78:559S-569S.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Bolwell PG, Bramley PM, Pridham JB. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radic Res* 1995;22:375-383.
- Rice-Evans CA. Measurement of total antioxidant activity as a marker of antioxidant status in vivo: procedures and limitations. *Free Radical Research* 2000;33:S59-S66.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 1996;20:933-956.
- Riso P, Visioli F, Gardana C, Grande S, Brusamolino A, Galvano F, Galvano G, Porrini M. Effects of Blood Orange Juice Intake on Antioxidant Bioavailability and on Different Markers Related to Oxidative Stress. *J Agric Food Chem* 2005;53:941-947.
- Roche GmbH. http://www.roche.de/pharma/indikation/nephrologie/pages/funktion_der_niere/index.html; accessed 2008 Jan 12.
- Rodgers EH, Grant MH. The effect of the flavonoids, quercetin, myricetin and epicatechin on the growth and enzyme activities of MCF7 human breast cancer cells. *Chem Biol Interact* 1998;116:213-228.
- Rodriguez-Ayala E, Anderstam B, Suliman M, Seeberger A, Heimbueger O, Lindholm B, Stenvinkel P. Enhanced RAGE-mediated NF- κ B stimulation in inflamed hemodialysis patients. *Atherosclerosis* 2005;180:333-340.
- Roob JM, Khoschsorub G, Tiran A, Horina JH, Holzer H, Winklhofer-Roob BM. Vitamin E attenuates oxidative stress induced by intravenous iron in patients on hemodialysis. *J Am Soc Nephrol* 2000;11:539-549.
- Ross EA, Koo LC, Moberly JB. Low whole blood and erythrocyte levels of glutathione in hemodialysis and peritoneal dialysis patients. *Am J Kidney Dis* 1997;30(4):489-494.
- Ruppel N. Untersuchungen zur antioxidativen Wirksamkeit eines polyphenolreichen Mischfruchtsaftes bei HD-Patienten mit Markern der Lipid- und Proteinoxidation. Diplomarbeit, Technische Universität Kaiserslautern, 2006.
- rxlist, Internet Drug Index. <http://www.rxlist.com/cgi/generic/sodfg.htm>; Copyright © 2008 by RxList Inc; accessed 2008 Jan 26.
- Rydberg B, Johanson KJ. In: DNA repair mechanisms. Eds.: Hanawalt PC, Friedberg EC, Fox CF. Academic press, New York, 1978, pp. 465-468.
- Sachs G. Angewandte Statistik. Anwendung statistischer Methoden. Vol. 11, Springer-Verlag 2003, Berlin.
- Saija A, Scalese M, Lanza M, Marzullo D, Bonina F, Castelli F. Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. *Free Rad Biol Med* 1995;19:481-486.
- Sanchez-Moreno C, Cao G, Ou B, Prior RL. Anthocyanin and proanthocyanidin content in selected white and red wines. Oxygen radical absorbance capacity comparison with nontraditional wines obtained from highbush blueberry. *J Agric Food Chem* 2003;51:4889-4896.
- Sapers G, Hicks K, Burgher A, Hargrave D, Sondey S, Bilyk A. Anthocyanin pattern in ripening thornless blackberries. *J Am Soc Hortic Sci* 1986;111:945-947.
- Sarma AD, Sreelakshmi Y, Sharma R. Antioxidant ability of anthocyanins against ascorbic acid oxidation. *Phytochemistry* 1997;45:671-674.
- Sarre H, Gessler U, Seybold D (Hrsg.). Nierenkrankheiten. 5. neubearbeitete und erweiterte Auflage 1988; Thieme Verlag.
- Satue-Gracia MT, Frankel EN. Anthocyanins as Antioxidants on Human Low-Density Lipoprotein and Lecithin-Liposome Systems. *J Agric Food Chem* 1997;45:3362-3367.
- Schaefer S, Baum M, Eisenbrand G, Dietrich H, Will F, Janzowski C. Polyphenolic apple juice extracts and their major constituents reduce oxidative damage in human colon cell lines. *Mol Nutr Food Res* 2006;50:24-33.

Literaturverzeichnis

- Schäfer S. Untersuchungen zur antioxidativen Wirksamkeit von polyphenolischen Apfelsaftinhaltsstoffen in humanen Kolonzellen. Dissertation, Technische Universität Kaiserslautern, 2006.
- Schiffli H, Fischereeder M, Sitter T. Biokompatibilität der Nierenersatztherapie. *Internist* 1999;40:37-48.
- Scholze A, Rinder C, Beige J, Riezler R, Zidek W, Tepel M. Acetylcysteine reduces plasma homocysteine concentration and improves pulse pressure and endothelial function in patients with end-stage renal failure. *Circulation* 2004;109:369-374.
- Schönweiß G. Dialysefibel. 2. völlig neubearbeitete und erweiterte Auflage 1998; Abakiss Verlag.
- Shacter E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metab Rev* 2000;32:307-326.
- Shires TK. Iron-induced DNA damage and synthesis in isolated rat liver nuclei. *Biochem J* 1982;205:321-329.
- Shimizu M, Deguchi A, Lim JT, Moriwaki H, Kopelovich L, Weinstein IB. (-)-Epigallocatechin gallate and polyphenon E inhibit growth and activation of the epidermal growth factor receptor and human epidermal growth factor receptor-2 signaling pathways in human colon cancer cells. *Clin Cancer Res* 2005;11:2735-2746.
- Siekmeier R, Steffen C, März W. Können Antioxidantien Atherosklerose verhindern? *Bundesgesundheitsbl.- Gesundheitsf.-Gesundheitsschutz* 2006;49:1034-1049.
- Sies H. Oxidative Stress. Academic press 1985, London.
- Sies H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med* 1991;91:31S-38S.
- Sigma-Aldrich. Beipackzettel des Produkts "Histopaque®-1077".
- Simeonov SB, Botushanov NP, Karahanian EB, Pavlova MB, Husianitis HK, Troev DM. Effect of Aronia melanocarpa juice as part of the dietary regimen in patients with diabetes mellitus. *Folia Med* 2002;44:20-23.
- Singh D, Kaur R, Chander V, Chopra K. Antioxidants in the prevention of renal disease. *J Med Food* 2006;9:443-450.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988;175:184-191.
- Soyalan B. Einfluss von Flavonoiden auf die Transkription der γ -Glutamylcystein Synthetase in humanen Kolonzellen. Diplomarbeit, Technische Universität Kaiserslautern, 2006.
- Soyalan B. Schriftliche Mitteilung. Technische Universität Kaiserslautern, 2006.
- Spencer J, Abd El Mohsen MM, Rice-Evans C. Cellular uptake and metabolism of flavonoids and their metabolites: implications for their bioactivity. *Arch Biochem Biophys* 2004;423:148-161.
- Stadtman ER, Oliver CN. Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. *J Biol Chem* 1991;266:2005-2008.
- Stadtman ER. What is aging ? http://history.nih.gov/exhibits/stadtman/nose_aging.htm, 2004; accessed 2008 Jan 12.
- Steinmetz KA, Potter JD. Vegetables, fruit, and cancer. I. Epidemiology. *Cancer Causes Control* 1991;2:325-357.
- Steinmetz KA, Potter JD. Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review. *J Am Diet Assoc* 1996;96:1027-1039.
- Stenvinkel P. Anemia and inflammation: what are the implications for the nephrologist? *Nephrol Dial Transplant* 2003;18(suppl):viii7-viii22.
- Stephens RG, Jones DY, Micozzi MS, Taylor PR. Body iron stores and the risk of cancer. *N Engl J Med* 1988;319:1047-1052.
- Stryer L. Biochemie. 4. Auflage 1996, Spektrum Akademischer Verlag.
- Suzuki YJ, Packer L. Inhibition of NF-kappa B activation by vitamin E derivatives. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;193:277-283.

Literaturverzeichnis

- Taji Y, Morimoto T, Okada K, Fukuhara S, Fukui T, Kuwahara T. Effects of intravenous ascorbic acid on erythropoiesis and quality of life in unselected hemodialysis patients. *J Nephrol* 2004;17:537-543.
- Tak PP, Firestein GS. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* 2001;107:7-11.
- Talavera S, Felgines C, Texier O, Besson C, Lamaison JL, Remesy C. Anthocyanins are efficiently absorbed from the stomach in anesthetized rats. *J Nutr* 2003;133:4178-4182.
- Tarnag DC, Huang TP, Wei YH, Liu TY, Chen HW, Chen TW, Yang WC. 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine of leukocyte DNA as a marker of oxidative stress in chronic hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2000;36(5):934-944.
- Tarnag DC, Chen HW, Huang TP, Chen CL, Liu TY, Wei YH. Increased Oxidative Damage to peripheral blood leukocyte DNA in chronic peritoneal dialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:1321-1330.
- Thompson HJ, Heimendinger J, Haegeler A, Sedlacek SM, Gillette C, O'Neill C, Wolfe P, Conry C. Effect of increased vegetable and fruit consumption on markers of oxidative cellular damage. *Carcinogenesis* 1999;20:2261-2266.
- Torre L, Barritt B. Quantitative evaluation of Rubus fruit anthocyanin pigments. *J Food Sci* 1977;42:488-490.
- Tovbin D, Mazor D, Vorobiov M, Chaimovitz C, Meyerstein N. Induction of protein oxidation by intravenous iron in hemodialysis patients: role of inflammation. *Am J Kidney Dis* 2002;40(5):1005-1012.
- Trinder P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann Clin Biochem* 1969;6:24.
- Tsai SH, Liang YC, Lin-Shiau SY, Lin JK. Suppression of TNFalpha-mediated NFkappaB activity by myricetin and other flavonoids through downregulating the activity of IKK in ECV304 cells. *J Cell Biochem* 1999;74:606-615.
- Tsuda T, Horio F, Osawa T. Absorption and metabolism of cyanidin 3-O-beta-D-glucoside in rats. *FEBS Lett* 1999;449:179-182.
- Tsuda T, Horio F, Osawa T. Dietary cyanidin 3-O-beta-D-glucoside increases ex vivo oxidation resistance of serum in rats. *Lipids* 1998;33:583-588.
- Tsuda T, Horio F, Osawa T. The role of anthocyanins as an antioxidant under oxidative stress in rats. *Biofactors* 2000;13:133-139.
- Tsuda T, Shiga K, Ohshima K, Kawakishi S, Osawa T. Inhibition of lipid peroxidation and the active oxygen radical scavenging effect of anthocyanin pigments isolated from *Phaseolus vulgaris* L. *Biochem Pharmacol* 1996;52:1033-1039.
- Usberti M, Bufano G, Lima G, Gazzotti RM, Tira P, Gerardi G, DiLorenzo D. Increased red blood cell survival reduces the need of erythropoietin in hemodialysed patients treated with exogenous glutathione and vitamin E-modified membrane. *Contrib. Nephrol.* 1999;127:208-214.
- Usberti M, Gerardi G, Gazzotti RM, Benedini S, Archetti S, Sugherini L, Valentini M, Tira P, Bufano G, Albertini A, DiLorenzo D. Oxidative stress and cardiovascular disease in dialyzed patients. *Nephron* 2002a;91:25-33.
- Usberti M, Gerardi GM, Micheli AM, Tira P, Bufano G, Gaggia P, Movilli E, Cancarini GC, De Marinis S, D'Avolio G, Broccoli R, Manganoni A, Albertini A, DiLorenzo D. Effects of a vitamin E-bonded membrane and of glutathione on anemia and erythropoietin requirements in hemodialysis patients. *J Nephrol* 2002b;15:558-564.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006;160(1):1-40.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39:44-84.
- Vamvakas S, Bahner U, Heidland A. Erhöhte Krebsinzidenz bei terminaler Niereninsuffizienz: potentielle pathogenetische Mechanismen. *Schweiz Med Wochenschr* 1997;127:597-604.

Literaturverzeichnis

- Van den Berg R, Haenen GR, van den Berg H, Bast A. Nuclear factor-kappaB activation is higher in peripheral blood mononuclear cells of male smokers. *Environ Toxicol Pharmacol* 2001a;9:147-151.
- Van den Berg R, Haenenb GM, van den Berg H, Bast A. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) next term assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chem* 1999;66:511-517.
- Van den Berg R, van Vliet T, Broekmans WM, Cnubben NH, Vaes WH, Roza L, Haenen GR, Bast A, van den Berg H. A vegetable/fruit concentrate with high antioxidant capacity has no effect on biomarkers of antioxidant status in male smokers. *J Nutr* 2001b;131:1714-1722.
- Vlassara H, Palace MR. Diabetes and advanced glycation endproducts. *J Intern Med* 2002;251:87-101.
- Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988;319:525-532.
- Wang H, Cao G, Prior RL. Oxygen Radical Adsorbing Capacity of Anthocyanins. *J Agric Food Chem* 1997;45:304-309.
- Watzl B, Briviba K, Rechkemmer G. Anthocyane. *Ernährungs-Umschau* 2002;49:148-150.
- Watzl B, Rechkemmer G. Flavonoide. *Ernährungs-Umschau* 2001;48:498-502.
- Wei YH. Mitochondrial DNA mutations and oxidative damage in aging and diseases: an emerging paradigm of gerontology and medicine. *Proc Natl Sci Counc (Repub. China)* 1998;22:55-67.
- Weinstein T, Chagnac A, Korzets A, Boaz M, Ori Y, Herman M, Malachi T, Gafter U. Haemolysis in haemodialysis patients: evidence for impaired defence mechanisms against oxidative stress. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15:883-887.
- Weisel T, Baum M, Eisenbrand G, Dietrich H, Will F, Stockis JP, Kulling S, Rüfer C, Johannes C, Janzowski C. An anthocyanin/polyphenolic-rich fruit juice reduces oxidative DNA damage and increases glutathione level in healthy probands. *Biotechnol J* 2006;1:388-397.
- Weiss MF. Pathogenic role of advanced glycation end-products (AGEs): An overview. *Perit Dial Int* 1999;19:S47-S52.
- Weizel A. Empfehlungen zur Diagnostik und Therapie von Fettstoffwechselstörungen in der ärztlichen Praxis. Deutsche Gesellschaft zur Bekämpfung von Fettstoffwechselstörungen und ihren Folgeerkrankungen DGFF (Lipidliga) e.V. München 2006.
- WHO. Anthocyanins. WHO Food Additives Series 1982, 17.
- Wildanger W, Herrmann K. Die phenolischen Inhaltsstoffe des Obstes. II. Die Flavonole des Obstes. *Z Lebensm Unters Forsch* 1973;151:103-108.
- Will F, Dietrich H. Gewinnung und Analytik von Mehrfruchtsaft und Mehrfruchtsaftextrakt. DFG-Flavonet-Projekt, 2003-2005.
- Williams CA, Grayer RJ. Anthocyanins and other flavonoids. *Nat Prod Rep* 2004;21:539-573.
- Wilska-Jeszka J, Podsedek A. In: *Proceeding of the Symposium on Polyphenols and Anthocyanins as Food colourants and Antioxidants*. Vienna 1996; pp. 87-91.
- Wiseman S, Mulder T, Rietveld A. Tea flavonoids: bioavailability in vivo and effects on cell signaling pathways in vitro. *Antioxid Redox Signal* 2001;3:1009-1021.
- Wlodek PJ, Smolenski OB, Chwatko G, Iciek MB, Milkowski A, Bald E, Wlodek L. Disruption of thiol homeostasis in plasma of terminal renal failure patients. *Clin Chim Acta* 2006;366:137-145.
- Wu X, Cao G, Prior RL. Absorption and metabolism of anthocyanins in elderly women after consumption of elderberry or blueberry. *J Nutr* 2002;132:1865-1871.
- Yang J, Lin Y, Guo Z, Cheng J, Huang J, Deng L, Liao W, Chen Z, Liu Z, Su B. The essential role of MEKK3 in TNF-induced NF-kappaB activation. *Nat Immunol* 2001;2:620-624.
- Yen GC, Duh PD, Tsai HL, Huang SL. Pro-oxidative properties of flavonoids in human lymphocytes. *Biosci Biotechnol Biochem* 2003;67:1215-1222.

Literaturverzeichnis

- Yoon JH, Baek SJ. Molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties. *Yonsei Med J* 2005;46:585-596.
- Young JF, Dragsted LO, Daneshvar B, Lauridsen ST, Hansen M, Sandstrom B. The effect of grape-skin extract on oxidative status. *Br J Nutr* 2000;84:505-513.
- Young JF, Nielsen SE, Haraldsdottir J, Daneshvar B, Lauridsen ST, Knuthsen P, Crozier A, Sandstrom B, Dragsted LO. Effect of fruit juice intake on urinary quercetin excretion and biomarkers of antioxidative status. *Am J Clin Nutr* 1999;69:87-94.
- Zafra-Stone S, Yasmin T, Bagchi M, Chatterjee A, Vinson JA, Bagchi D. Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention. *Mol Nutr Food Res* 2007;51:675-683.
- Zager RA, Johnson AC, Hanson SY, Wasse H. Parenteral iron formulations: A comparative toxicologic analysis and mechanisms of cell injury. *Am J Kidney Dis* 2002;40:90-103.
- Zager RA, Johnson AC, Hanson SY. Parenteral iron nephrotoxicity: Potential mechanisms and consequences. *Kidney Int* 2004;60:144-156.
- Zager, R. A. Parenteral iron compounds: potent oxidants but mainstays of anemia management in chronic renal disease. *Clin J Am Soc Nephrol* **2006**, 1, 24-31.
- Zanen AL, Adriaansen HJ, van Bommel EF, Posthuma R, de Jong GH. 'Oversaturation' of transferrin after intravenous ferric gluconate (Ferlecit®) in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 1996;11:820-824.

9. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 3.1: Beispiele für die Entstehung verschiedener ROS, Abwehrmechanismen und Schädigungen	7
Abbildung 3.2: Beispiele für oxidierte Pyrimidine und Purine	11
Abbildung 3.3: Modifikationen von Desoxyguanin durch OH-Radikale.....	12
Abbildung 3.4: Strukturen von MDA-DNA-Addukten	13
Abbildung 3.5: Bildung von MDA und MDA-Addukten durch Reaktion von OH-Radikal mit dem Zucker- Phosphat-Rückgrat der DNA.....	13
Abbildung 3.6: Überblick über die LPO	15
Abbildung 3.7: Entstehung von Malondialdehyd (MDA) aus Arachidonsäure.....	16
Abbildung 3.8: Keto-Enol-Tautomerie von MDA.....	17
Abbildung 3.9: Entstehung von Proteincarbonylen	19
Abbildung 3.10: Carbonylbildung bei prolin-, arginin- oder lysinhaltigen Proteinen	20
Abbildung 3.11: Mechanismus der metallkatalysierten Oxidation von Proteinen	21
Abbildung 3.12: Proteincarbonylentstehung durch Bindung von α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen an Seitenketten eines Proteins.....	21
Abbildung 3.13: Maillard-Reaktion im Körper	22
Abbildung 3.14: NF κ B Signalweg.....	23
Abbildung 3.15: Dreidimensionale Struktur von NF- κ B gebunden an DNA	24
Abbildung 3.16: Der I κ B-NF- κ B-Komplex und seine Aktivierung durch TNF α oder Interleukin-1	25
Abbildung 3.17: Mehrstufenmodell der Karzinogenese	28
Abbildung 3.18: Aufbau eines Nephrons.....	31
Abbildung 3.19: Schematischer Aufbau eines Dialysegerätes.....	33
Abbildung 3.20: Struktur von reduziertem Glutathion (GSH) und oxidiertem Glutathion (GSSG)	40
Abbildung 3.21: Harnsäure und Radikalabbauprodukte.....	41
Abbildung 3.22: Schematische Darstellung der BER.....	42
Abbildung 3.23: Vorgeschlagene Induktion von Phase II Genexpression durch Polyphenole über ARE	45
Abbildung 3.24: Struktur von Ascorbat und seinen Oxidationsprodukten	46
Abbildung 3.25: Struktur von α -Tocopherol.....	46
Abbildung 3.26: Reaktion von α -Tocopherol mit ROS	47
Abbildung 3.27: Reaktionswege von β -Carotin	49
Abbildung 3.28: Grundstrukturen der verschiedenen Flavonoidklassen.....	52
Abbildung 3.29: Strukturelle Voraussetzungen für die Radikalfängereigenschaften von Flavonoiden.....	78
Abbildung 3.30: Struktur von Anthocyanen.....	79
Abbildung 3.31: pH-Abhängigkeit der Struktur der Anthocyane.....	79
Abbildung 3.32: Zerfall-Mechanismus der Anthocyane	82
Abbildung 3.33: Blutbestandteile.....	74
Abbildung 3.34: Durchführung des Comet Assays (schematische Darstellung)	76
Abbildung 3.35: Beispiele für Kometen unter dem Fluoreszenzmikroskop mit unter- schiedlichem Schädigungsausmaß	77
Abbildung 3.36: Durchführung des Comet Assays zur Detektion von Gesamtschäden (schematische Darstellung).....	78
Abbildung 3.37: Schematische Darstellung der Reaktion von GSH mit DTNB	78
Abbildung 3.38: Derivatisierung von GSH durch Reaktion mit 2-Vinylpyridin	79
Abbildung 3.39: Derivatisierung von Malondialdehyd mit Thiobarbitursäure	79
Abbildung 3.40: Endpunktbestimmung nach Trinder	80
Abbildung 3.41: Mechanismus der Derivatisierung der Proteincarbonyle mit DNPH	81
Abbildung 3.42: Arbeitsschema des ELISA	82
Abbildung 3.43: Farbreaktion des ELISA	82
Abbildung 3.44: Oxidation von ABTS	83
Abbildung 3.45: Urikase-vermittelte Umwandlung von Harnsäure zu Allantoin.....	84
Abbildung 3.46: Farbreaktion der Harnsäurebestimmung.....	84
Abbildung 4.1: Studiendesign	91
Abbildung 4.2: Ficoll-Gradientenzentrifugation zur Lymphozyten-Gewinnung aus Vollblut	97
Abbildung 4.3: Neubauer-Zählkammer	98
Abbildung 4.4: Fließschema des ELISA	117
Abbildung 5.1.A: (Oxidative) DNA-Schädigung in U937-Zellen nach Inkubation mit Ferrlecit [®] , Venofer [®] , Cosmofer [®] und Fe(III)-Chlorid	131
Abbildung 5.1.B: MDA-Konzentration in U937-Zellen nach Inkubation mit Ferrlecit [®] , Venofer [®] , Cosmofer [®] und Fe(III)-Chlorid	132
Abbildung 5.2.A-D: (Oxidative) DNA-Schädigung in primären Lymphozyten nach Inkubation mit A) Ferrlecit [®] , B) Venofer [®] , C) Cosmofer [®] und D) Fe(III)-Chlorid	133/134

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 5.3.A-D: MDA-Bildung in primären Lymphozyten nach Inkubation mit A) Ferrlecit [®] , B) Venofer [®] , C) Cosmofer [®] und D) Fe(III)-Chlorid	135/136
Abbildung 5.4.A-C: (Oxidative) DNA-Schädigung in Leukozyten nach Inkubation von Vollblut mit A) Ferrlecit [®] , B) Venofer [®] und C) Cosmofer [®]	137/138
Abbildung 5.5.A-C: MDA-Konzentration in Plasma nach Inkubation von Vollblut mit A) Ferrlecit [®] , B) Venofer [®] und C) Cosmofer [®]	138/139
Abbildung 5.6: Oxidative DNA-Schäden bei Ferrlecit [®] -Behandlung	140
Abbildung 5.7: Glutathionstatus bei Ferrlecit [®] -Behandlung	141
Abbildung 5.8: MDA-Konzentration bei Ferrlecit [®] -Behandlung	142
Abbildung 5.9.A,B: Interventionsstudie; DNA-Schäden (ohne/mit FPG), bestimmt in Vollblut.....	150
Abbildung 5.10.A,B: Interventionsstudie; DNA-Schäden, bestimmt in Vollblut. Darstellung der Einzelwerte	151
Abbildung 5.11.A,B: Interventionsstudie; Glutathionspiegel, bestimmt in Vollblut	154
Abbildung 5.12: Interventionsstudie; Glutathionspiegel, bestimmt in Vollblut. Darstellung der Einzelwerte.	155
Abbildung 5.13.A,B: Interventionsstudie; Oxidiertes Glutathion (GSSG), bestimmt in Vollblut	156
Abbildung 5.14: Interventionsstudie; Oxidiertes Glutathion (GSSG), bestimmt in Vollblut. Darstellung der Einzelwerte	157
Abbildung 5.15.A,B: Interventionsstudie; Glutathionstatus, bestimmt in Vollblut.....	158
Abbildung 5.16: Interventionsstudie; Glutathionstatus, bestimmt in Vollblut. Darstellung der Einzelwerte	159
Abbildung 5.17.A,B: Interventionsstudie; Malondialdehyd, bestimmt in Plasma	162
Abbildung 5.18: Interventionsstudie; Malondialdehyd, bestimmt in Plasma. Darstellung der Einzelwerte	163
Abbildung 5.19.A,B: Interventionsstudie; Triglyceride, bestimmt in Plasma.....	166
Abbildung 5.20: Interventionsstudie; Triglyceride, bestimmt in Plasma. Darstellung der Einzelwerte.....	167
Abbildung 5.21.A,B: Interventionsstudie; Malondialdehyd/Triglyceride	169
Abbildung 5.22: Interventionsstudie; Malondialdehyd/Triglyceride; Darstellung der Einzelwerte	170
Abbildung 5.23.A,B: Interventionsstudie; Proteincarbonyle, bestimmt in Plasma.....	172
Abbildung 5.24: Interventionsstudie; Proteincarbonyle, bestimmt in Plasma. Darstellung der Einzelwerte	173
Abbildung 5.25.A,B: Interventionsstudie; NF- κ B, bestimmt in isolierten Lymphozyten	175
Abbildung 5.26: Interventionsstudie; NF- κ B, bestimmt in isolierten Lymphozyten. Darstellung der Einzelwerte	176
Abbildung 5.27.A,B: Interventionsstudie; TEAC, bestimmt in proteinfreiem Plasma	178
Abbildung 5.28: Interventionsstudie; TEAC, bestimmt in proteinfreiem Plasma. Darstellung der Einzelwerte	179
Abbildung 5.29.A,B: Interventionsstudie; Harnsäure, bestimmt in Plasma	181
Abbildung 5.30: Interventionsstudie; Harnsäure, bestimmt in Plasma. Darstellung der Einzelwerte	182
Abbildung 11.1.A,B: Interventionsstudie; DNA-Schäden (ohne FPG), bestimmt in Vollblut. Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Einzelwerte	225
Abbildung 11.2.A,B: Interventionsstudie; DNA-Schäden (mit FPG), bestimmt in Vollblut. Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Einzelwerte	226
Abbildung 11.3.A,B: Interventionsstudie; Glutathionspiegel, bestimmt in Vollblut. Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Einzelwerte	227
Abbildung 11.4.A,B: Interventionsstudie; Oxidiertes Glutathion, bestimmt in Vollblut. Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Einzelwerte	228
Abbildung 11.5.A,B: Interventionsstudie; Glutathionstatus, bestimmt in Vollblut. Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Einzelwerte	229
Abbildung 11.6.A,B: Interventionsstudie; Malondialdehyd, bestimmt in Plasma. Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Einzelwerte	230
Abbildung 11.7.A,B: Interventionsstudie; Triglyceride, bestimmt in Plasma. Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Einzelwerte	231
Abbildung 11.8.A,B: Interventionsstudie; : Malondialdehyd/Triglyceride; Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Einzelwerte	232
Abbildung 11.9.A,B: Interventionsstudie; Proteincarbonyle, bestimmt in Plasma. Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Einzelwerte der Patienten	233
Abbildung 11.10.A,B: Interventionsstudie; NF- κ B, bestimmt in isolierten Lymphozyten. Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Einzelwerte	234
Abbildung 11.11.A,B: Interventionsstudie; TEAC, bestimmt in proteinfreiem Plasma. Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Einzelwerte	235
Abbildung 11.12.A,B: Interventionsstudie; Harnsäure, bestimmt in Plasma. Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Einzelwerte Einzelwerte.....	236

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Beispiele für Enzyme, die $O_2^{\bullet -}$ generieren.....	9
Tabelle 3.2: Geschätzte Halbwertszeiten einiger ROS	10
Tabelle 3.3: Übersicht verschiedener oxidativer Modifikationen von Proteinen	26
Tabelle 3.4: Eine Auswahl an NF- κ B-aktivierenden Substanzen.....	27
Tabelle 3.5: Auswahl von NF- κ B-Zielgenen.....	27
Tabelle 3.6: Beispiele für Krankheiten, bei denen ein Zusammenhang mit oxidativem Stress diskutiert wird	30
Tabelle 3.7: Übersicht über verschiedene Biomarker, die im Blut von HD-Patienten im Vergleich zu gesunden Menschen verändert sind.....	35
Tabelle 3.8: Einige Quellen pflanzlicher Phenole	53
Tabelle 3.9: Wichtige Vertreter der Anthocyane	56
Tabelle 3.10: Interventionsstudien zum Einfluss von Antioxidantien auf den oxidativen Stress bei HD-Patienten	66
Tabelle 3.11: Interventionsstudien mit Flavonoiden bei HD-Patienten	67
Tabelle 3.12: Analysedaten des roten Mehrfruchtsaftes.....	72
Tabelle 3.13: Anthocyangehalte des roten Mehrfruchtsaftes	73
Tabelle 4.1: Ausgewählte Parameter der Untersuchungen bei Ferrlecit [®] -Infusion	88
Tabelle 4.2: Ausgewählte Parameter der Studienteilnehmer.....	90
Tabelle 4.3: Messparameter für die Glutathionbestimmung.....	103
Tabelle 4.4: Derivatisierung des Glutathions	104
Tabelle 4.5: HPLC-Parameter bei der MDA-Bestimmung.....	106
Tabelle 4.6: Reagenzienmengen ELISA.....	115
Tabelle 4.7: Pipettierschema für den Bradford-Assay	118
Tabelle 4.8: HPLC-Gradient bei der Anthocyanbestimmung.....	123
Tabelle 5.1: Literatur-Übersicht über Konzentrationen von LPO-Produkten im Plasma von Patienten vor HD und Probanden	146
Tabelle 5.2: Literatur-Übersicht über tGSH/GSSG-Konzentrationen und Glutathionstatus im Vollblut von Patienten vor HD und Probanden.....	147
Tabelle 5.3: Diagnostik der Fettstoffwechselstörungen anhand der TG-Werte.....	165
Tabelle 5.4: Antioxidative Kapazität (TEAC) von 15 Fruchtsäften	184
Tabelle 6.1: Auszug aus den Analysedaten der Studiensäfte	188
Tabelle 6.2: Zusammenfassung der Ergebnisse der Interventionsstudie mit Mehrfruchtsaft.....	190

10. Abkürzungsverzeichnis

8-OH-dG	8-Hydroxy-desoxyguanin
Å	Angström (10^{-10} m)
ABTS	2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonat)
ACC	Acetylcystein
ADI	acceptable daily intake
AGE	Advanced glycation endproduct
AhR	Arylhydrocarbon-Rezeptor
AKT/PKB	Proteinkinase B
AP	apurinisch/apyrimidinisch
Aqua bidest	bidestilliertes Wasser
ARE	antioxidative response element
ATP	Adenosintriphosphat
BDI	Bleomycin detectable iron
BER	base excision repair
BHT	tert-Butylhydroxytoluol
BMI	Body Mass Index
BSA	bovine serum albumin
CA	Corrected Absorbance
CAT	Katalase
CF	Cosmofer®
COX-2	Cyclooxygenase 2
CRP	C-reaktives Protein
CYP 450	Cytochrom-P450
DAD	Diodenarray-Detektor
DHA	Docosahexaensäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid
DSB	Doppelstrangbruch
DTNB	5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure)
DTT	Dithiothreitol
E%	Entfärbung im Vergleich zur Kontrolle (TEAC)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	epidermal growth factor receptor
EGTA	Ethylenglycol-O,O'-bis-[2-amino-ethyl]-N,N,N',N',-tetraessigsäure
EGCG	Epigallocatechingallat
ELISA	Enzyme Linked immunosorbent Assay
EPO	Erythropoietin

Abkürzungsverzeichnis

FACE	Fast activated cell-based ELISA
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FaPy	2,6-Diamino-4-hydroxyformamidopyrimidin
FKS	Fötales Kälberserum
FL	Ferrlecit®
FPG	Formamindopyrimidin-DNA-Glykosylase
γ -GCS	γ -Glutamylcystein-Synthetase
GK	Glycerokinase
Gl.	Gleichung
GPO	Glycerin-3-phosphatoxidase
GPx	Glutathionperoxidase
GSH	Glutathion (reduziert)
GSR	Glutathionreduktase
GSSG	Glutathion (oxidiert)
GST	Glutathion-S-Transferase
HD	Hämodialyse
HEPES	N-(2-hydroxyethyl)-piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
HNE	Hydroxynonenal
HPLC	High performance (pressure) liquid chromatography
HRP	Horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
I κ B	inhibitory κ B (Inhibitorprotein)
IKK	I κ B-Kinasekomplex
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase
kDa	Kilo-Dalton
LDL	Low Density Lipoprotein
LH	Fettsäure
LMA	low melting agarose
LOO \cdot	Fettsäureperoxyradikal
LPL	Lipoproteinlipase
LPO	Lipidperoxidation
MAPK	mitogen aktivierte Proteinkinase
MCO	metallkatalysierte Proteinoxidation
MDA	Malondialdehyd
MW	Molekulargewicht
NAD(P)	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (Phosphat)
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphathydrid
NEMO	NF κ B essential modulator
NER	nucleotid excision repair
NF κ B	nuclear factor kappa B
NIK	NF κ B induzierende Kinase

Abkürzungsverzeichnis

NLS	Nuklearlokalisationssequenz
NMA	normal melting Agarose
NQO1	NADPH-Chinon-Oxidoreduktase (DT-Diaphorase)
Nrf2	(nuclear transcription factor erythroid 2p45, NF-E2) related factor 2
OCH ₃	Methoxy-Gruppe
OD	optical density
OECD	Organisation for Economic Cooperation and Development
OH	Hydroxy-Gruppe
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphate saline buffer
PG	Prüfgröße
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
R	Run-in-Phase
RAGE	Rezeptor für AGEs
RHD	Rel-Homologie-Domäne
ROS	reactive oxygen species
RP	reversed phase
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
S	Saftaufnahme-Phase
SD	Standardabweichung
SGLT1	sodium dependent glucose transporter 1
SOD	Superoxiddismutase
SPE	solid phase extraction
SSA	Sulfosalicylsäure
SSB	single strand break
TA	Transkriptions-Aktivierungs-Domäne
TBA	Thiobarbitursäure
TBARS	Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen
TCA	Trichloressigsäure
TEA	Triethanolamin
TEAC	Trolox equivalent antioxidative capacity
TG	Triglyceride
tGSH	Gesamtglutathion
TI%	Tail intensity
TNB	5-Thio-2-Nitrobenzoat
TNF α	Tumor Nekrose Faktor alpha
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
UDP	Uracil-Diphosphat

Abkürzungsverzeichnis

VF	Venofer®
VK	Variationskoeffizient
W	Wash-out-Phase

11. Anhang

11.1. Werte-Verläufe der Patienten bei der Intervention

- Comet Assay (ohne FPG):

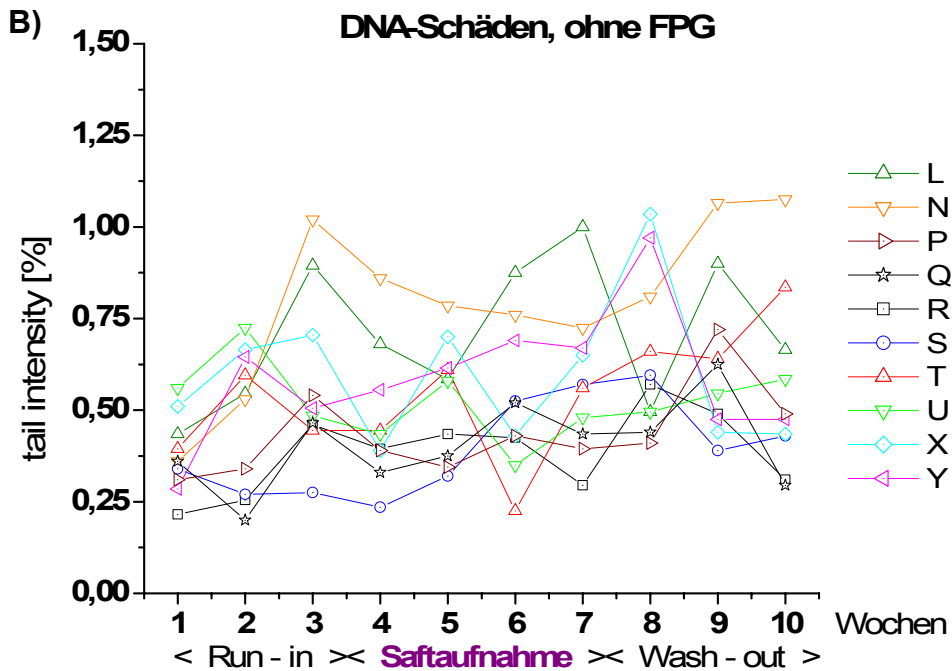
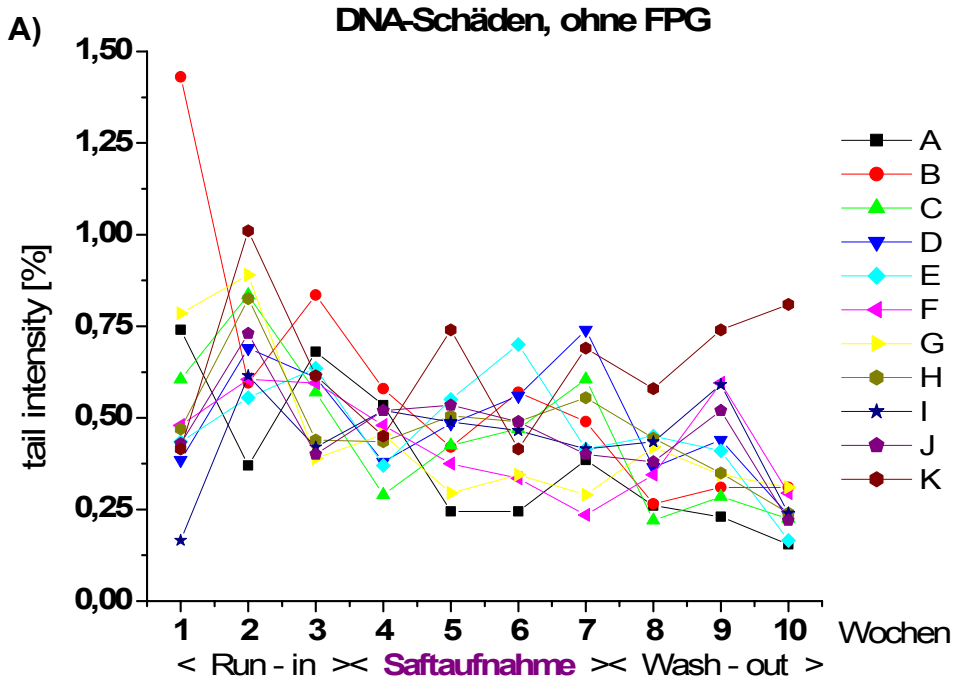


Abb. 11.1. A,B: DNA-Schäden (ohne FPG), bestimmt in Vollblut. Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Einzelwerte der Patienten, n=1. A) Patienten 1-11 (A-K); B) Patienten 12-21 (L-Y)

- Comet Assay (mit FPG):

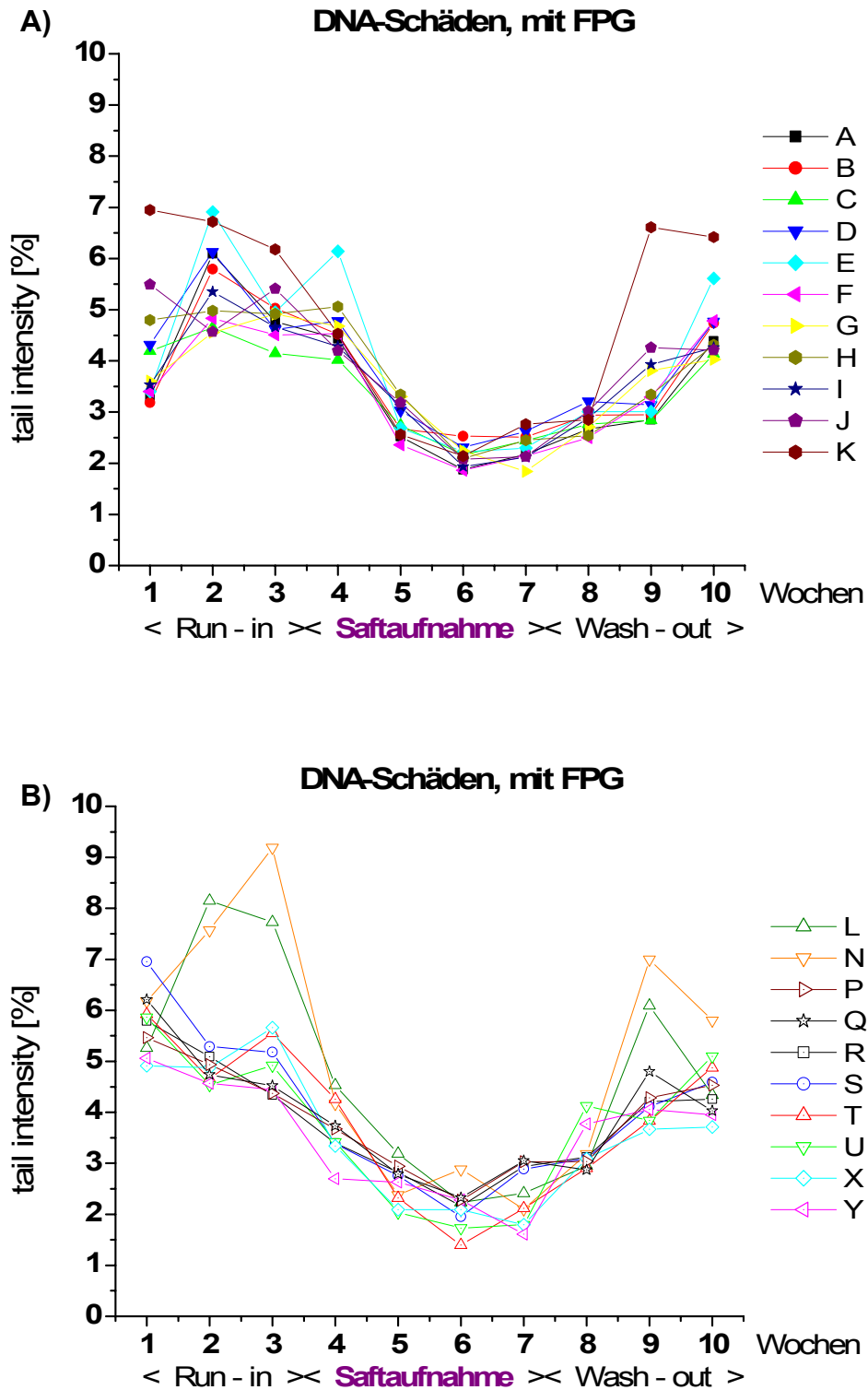


Abb. 11.2. A,B: DNA-Schäden (mit FPG), bestimmt in Vollblut. Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Einzelwerte der Patienten, n=1.
A) Patienten 1-11 (A-K); B) Patienten 12-21 (L-Y)

- Glutathionspiegel:

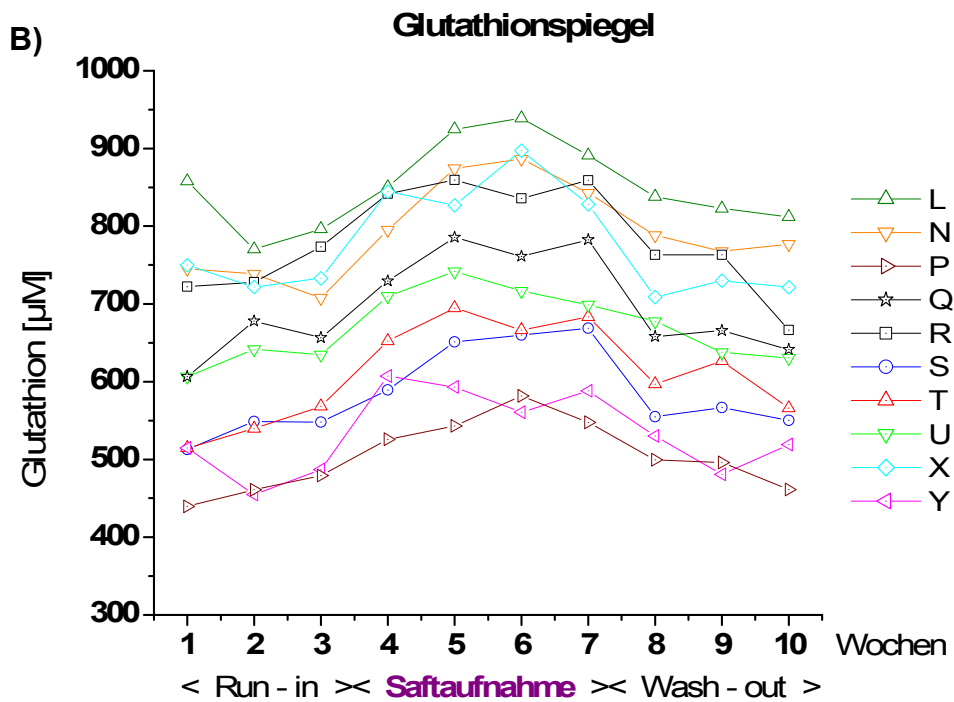
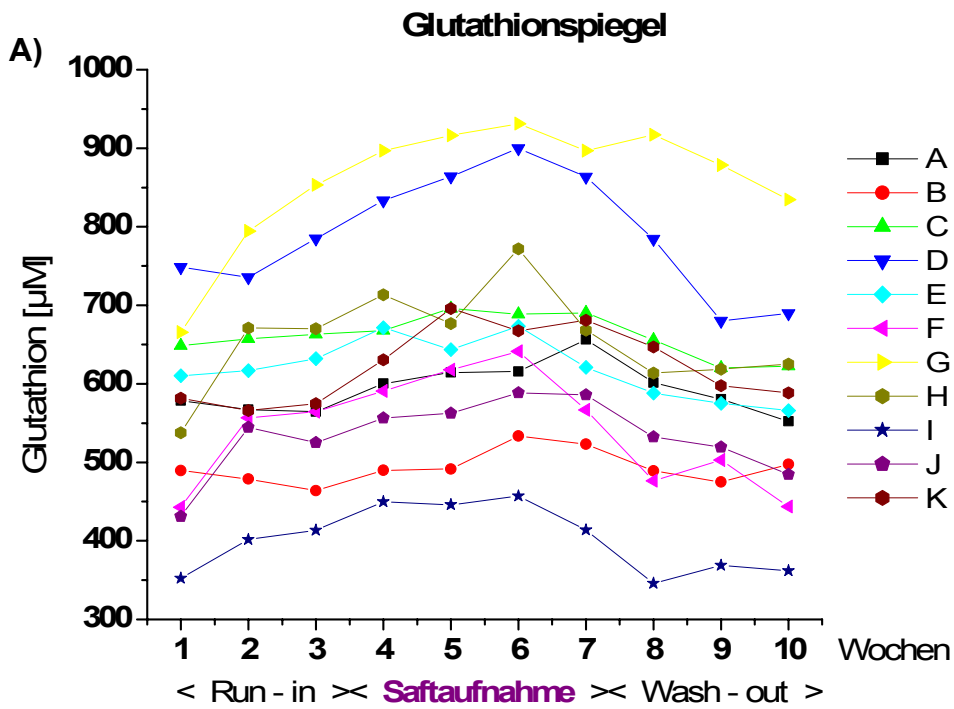


Abb. 11.3. A,B: Glutathionspiegel, bestimmt in Vollblut. Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Einzelwerte der Patienten, n=3.

A) Patienten 1-11 (A-K); B) Patienten 12-21 (L-Y)

- Oxidiertes Glutathion (GSSG):

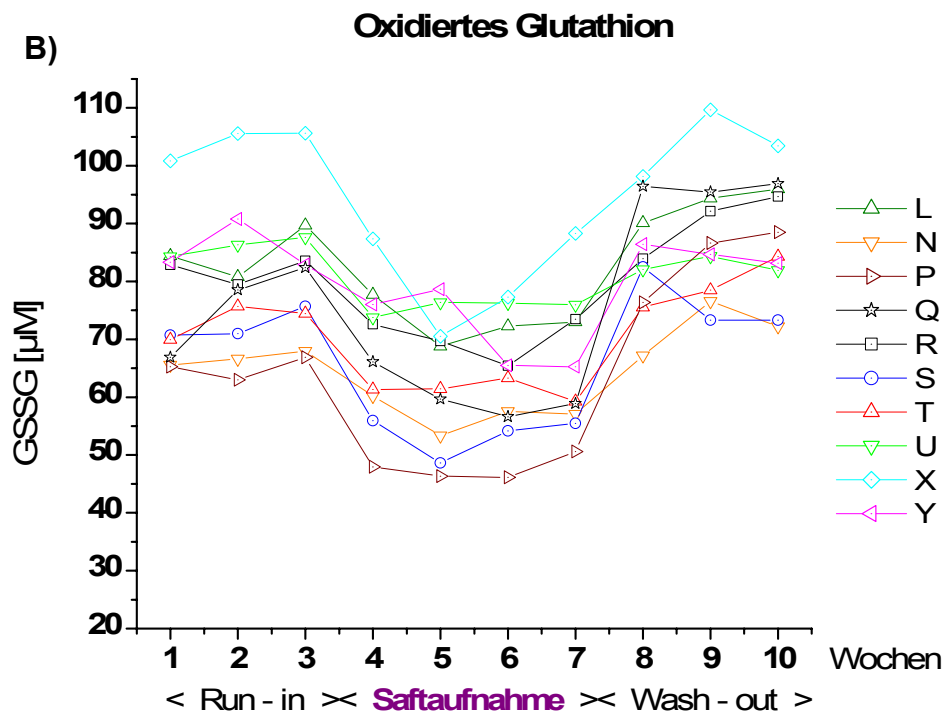
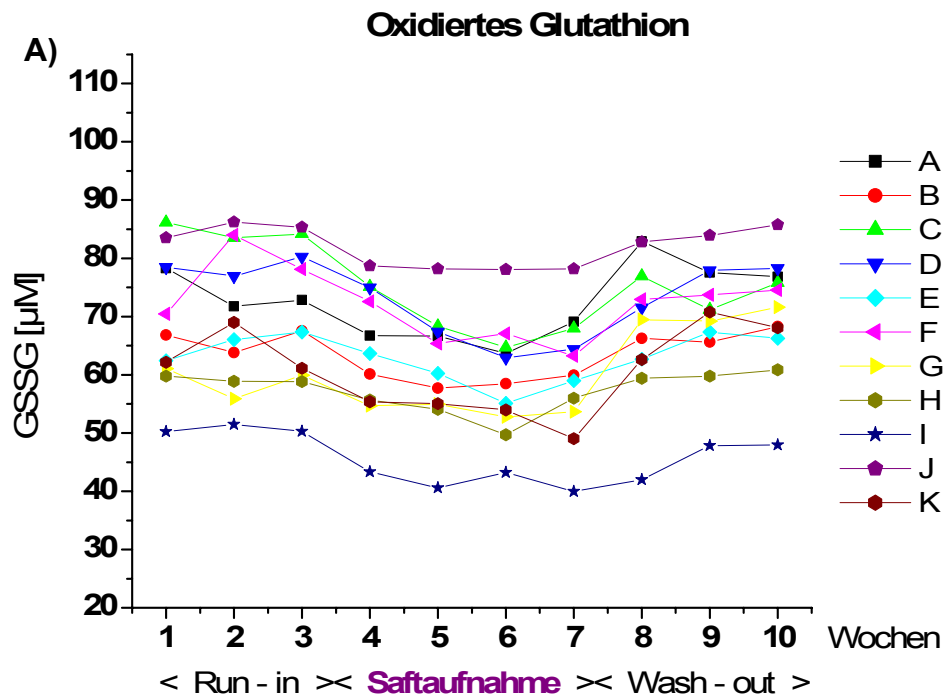


Abb. 11.4. A,B: Oxidiertes Glutathion, bestimmt in Vollblut. Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Einzelwerte der Patienten, n=3.

A) Patienten 1-11 (A-K); B) Patienten 12-21 (L-Y)

- Glutathionstatus:

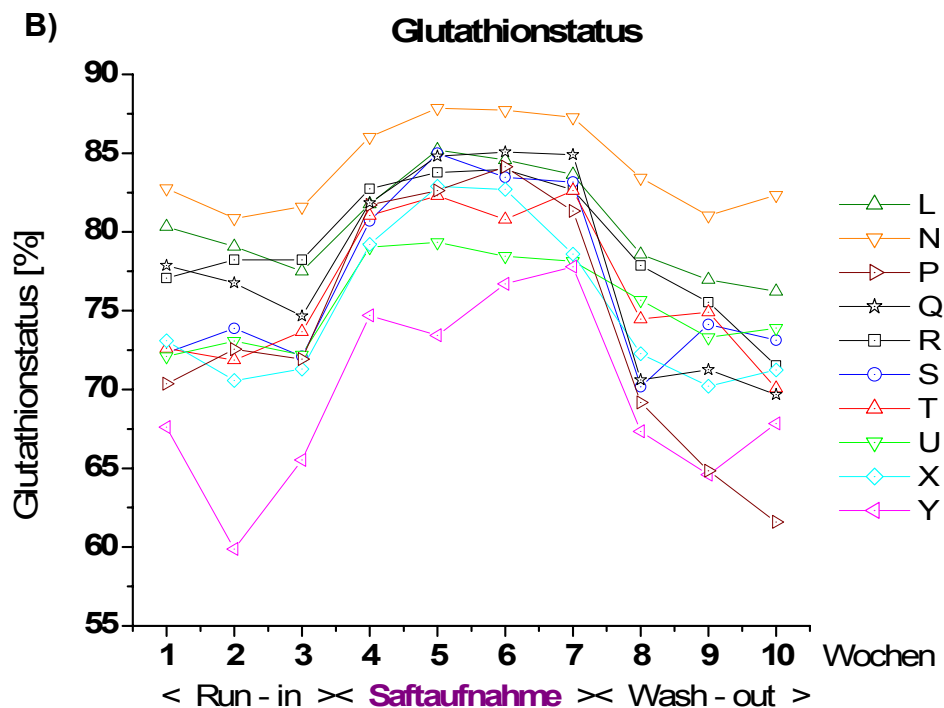
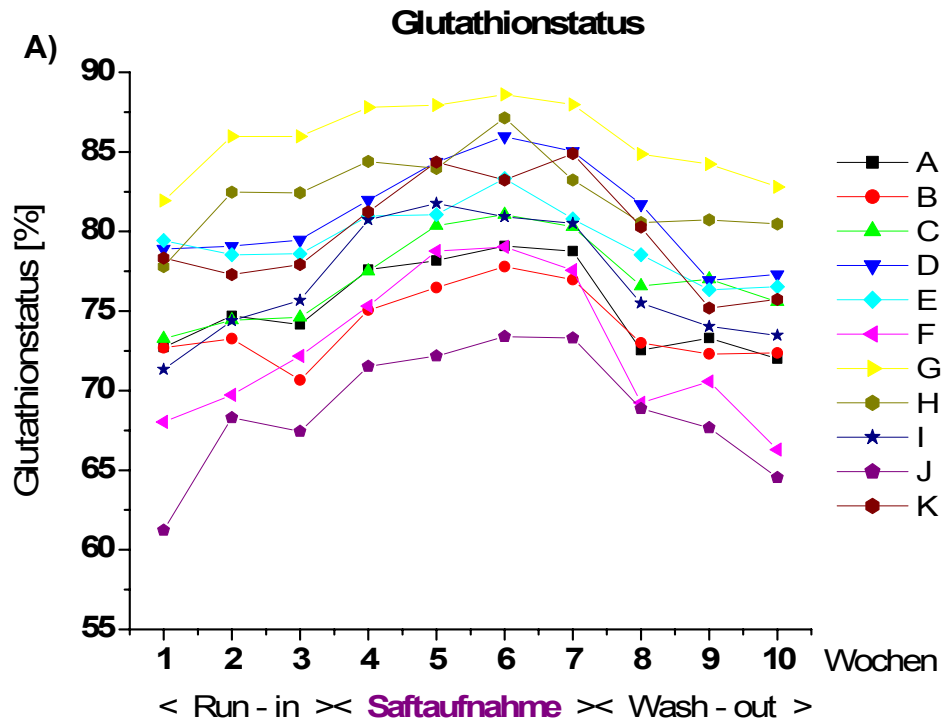


Abb. 11.5. A,B: Glutathionstatus, bestimmt in Vollblut. Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Einzelwerte der Patienten, n=3.

A) Patienten 1-11 (A-K); B) Patienten 12-21 (L-Y)

- Malondialdehyd (MDA):

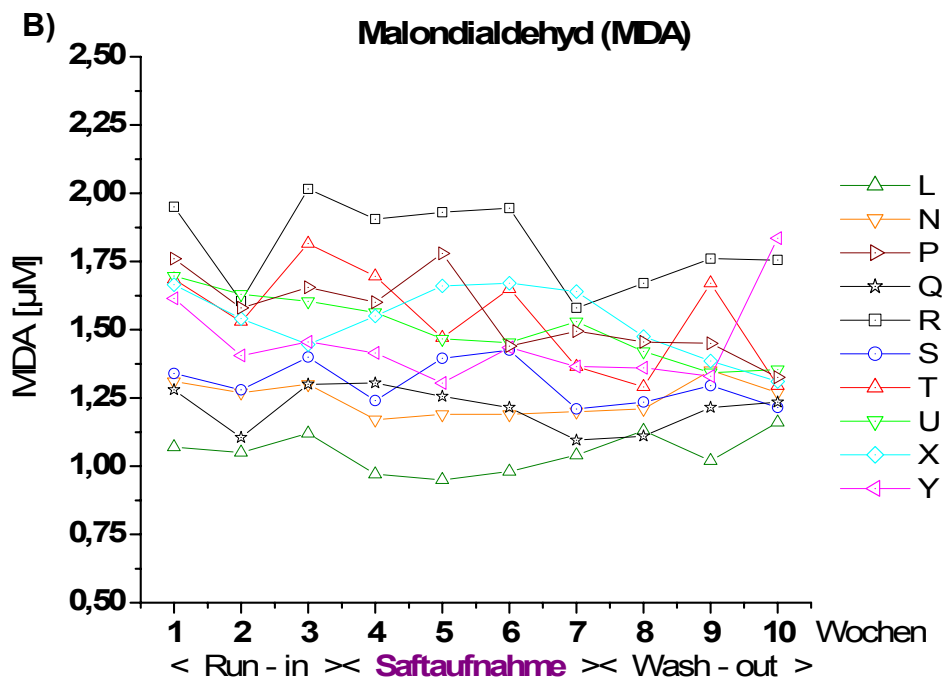
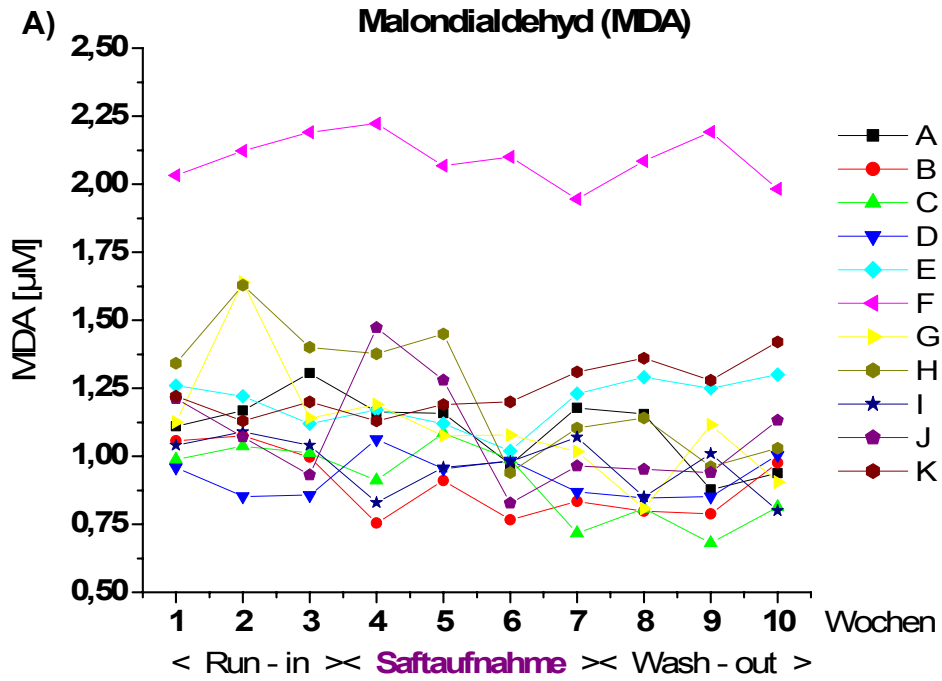


Abb. 11.6. A,B: Malondialdehyd, bestimmt in Plasma. Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Einzelwerte der Patienten, n=2.

A) Patienten 1-11 (A-K); B) Patienten 12-21 (L-Y)

- Triglyceride:

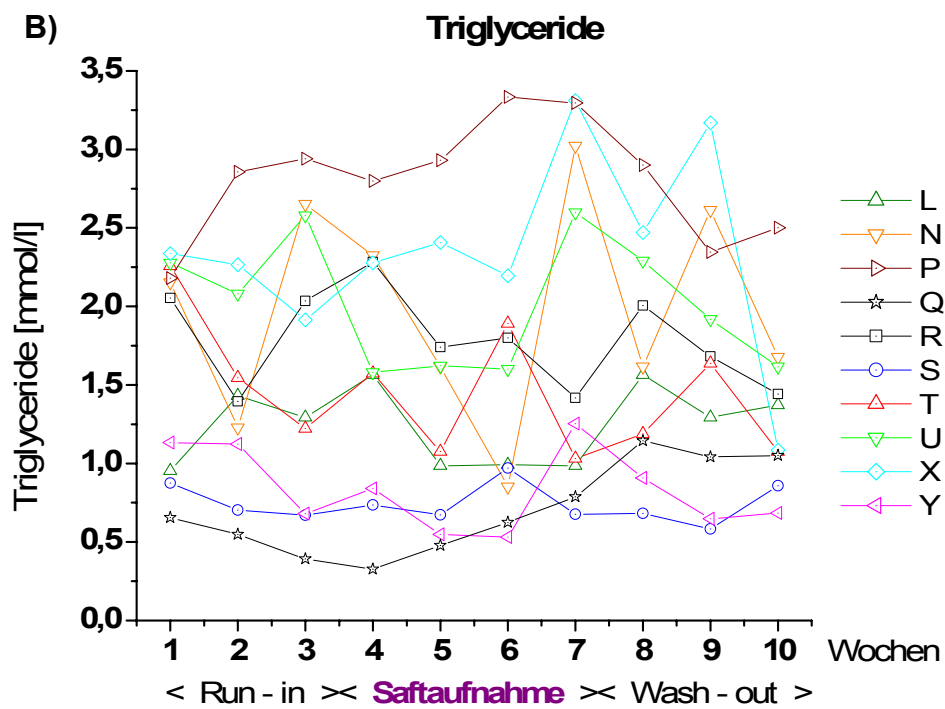
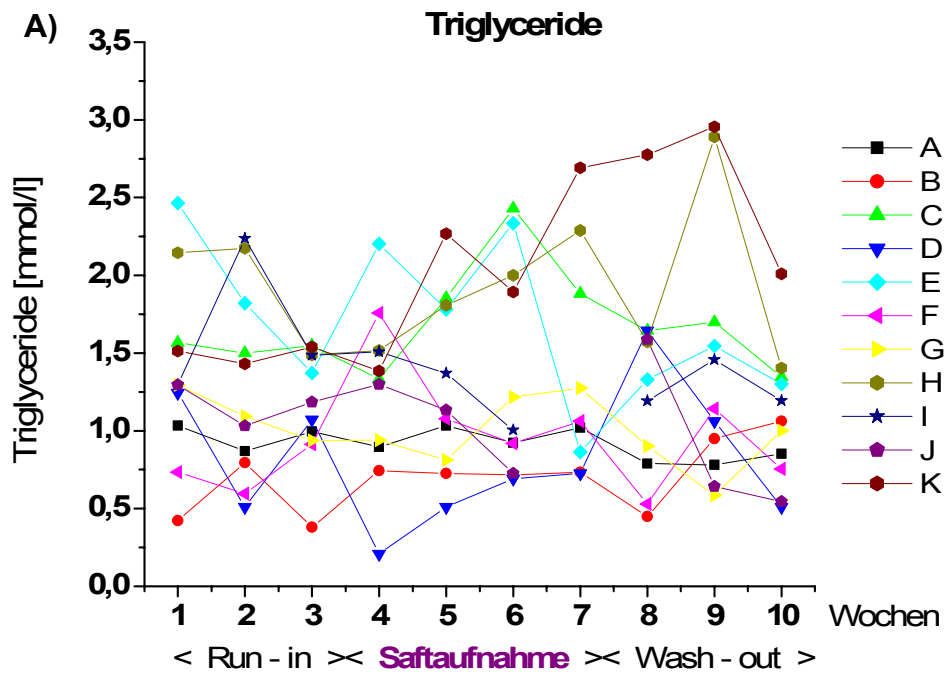


Abb. 11.7. A,B: Triglyceride, bestimmt in Plasma. Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Einzelwerte der Patienten, n=2.
 A) Patienten 1-11 (A-K); B) Patienten 12-21 (L-Y)

- MDA/Triglyceride:

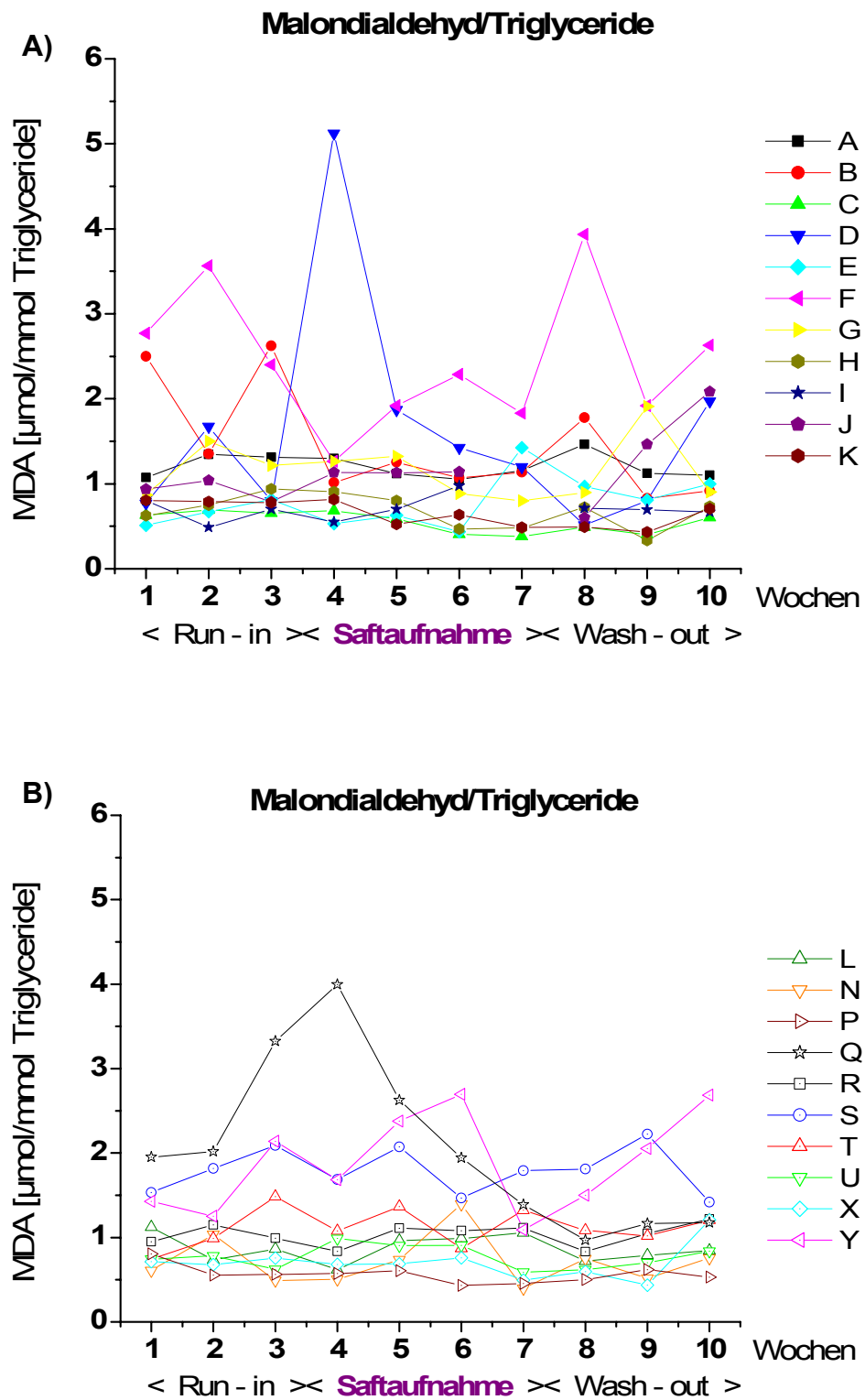


Abb. 11.8. A,B: Malondialdehyd/Triglyceride; Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Einzelwerte der Patienten.
A) Patienten 1-11 (A-K); B) Patienten 12-21 (L-Y)

- Proteincarbonyle:

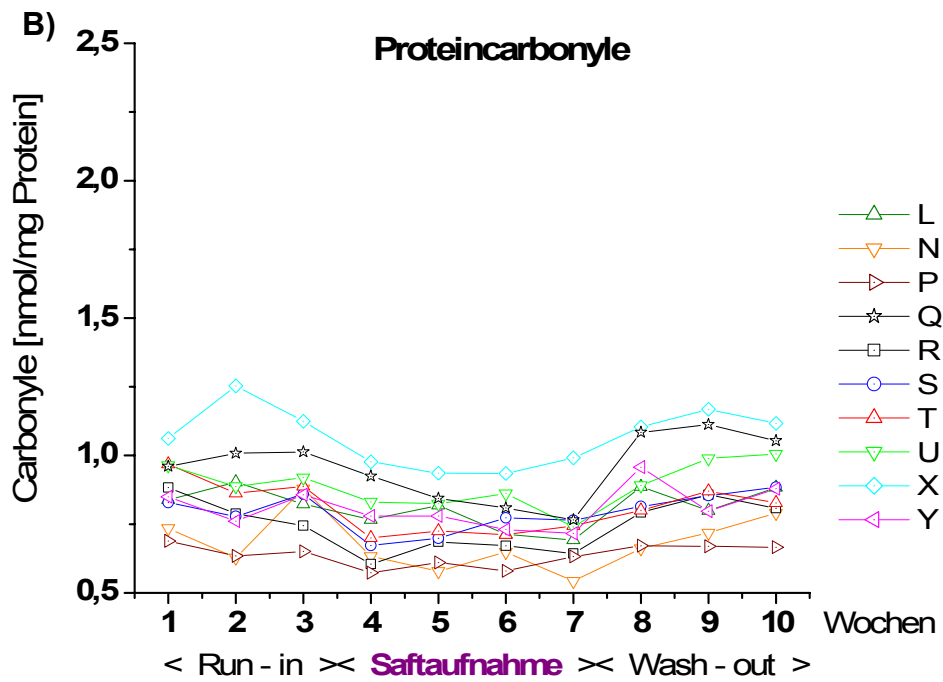
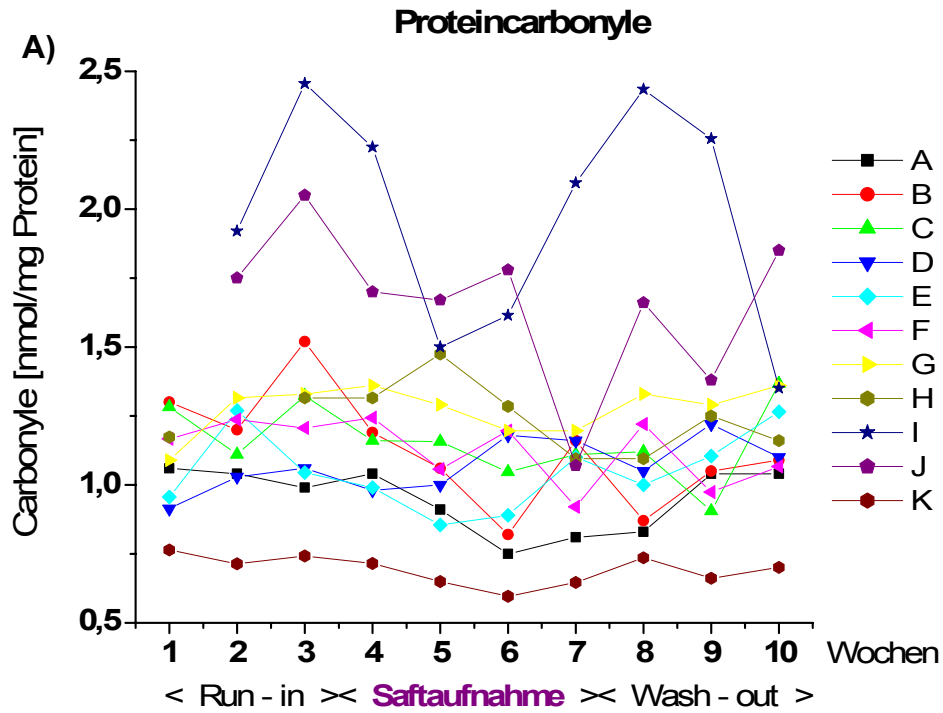


Abb. 11.9. A,B: Proteincarbonyle, bestimmt in Plasma. Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Einzelwerte der Patienten, n=3.
 A) Patienten 1-11 (A-K); B) Patienten 12-21 (L-Y)

- NF-κB-Status:

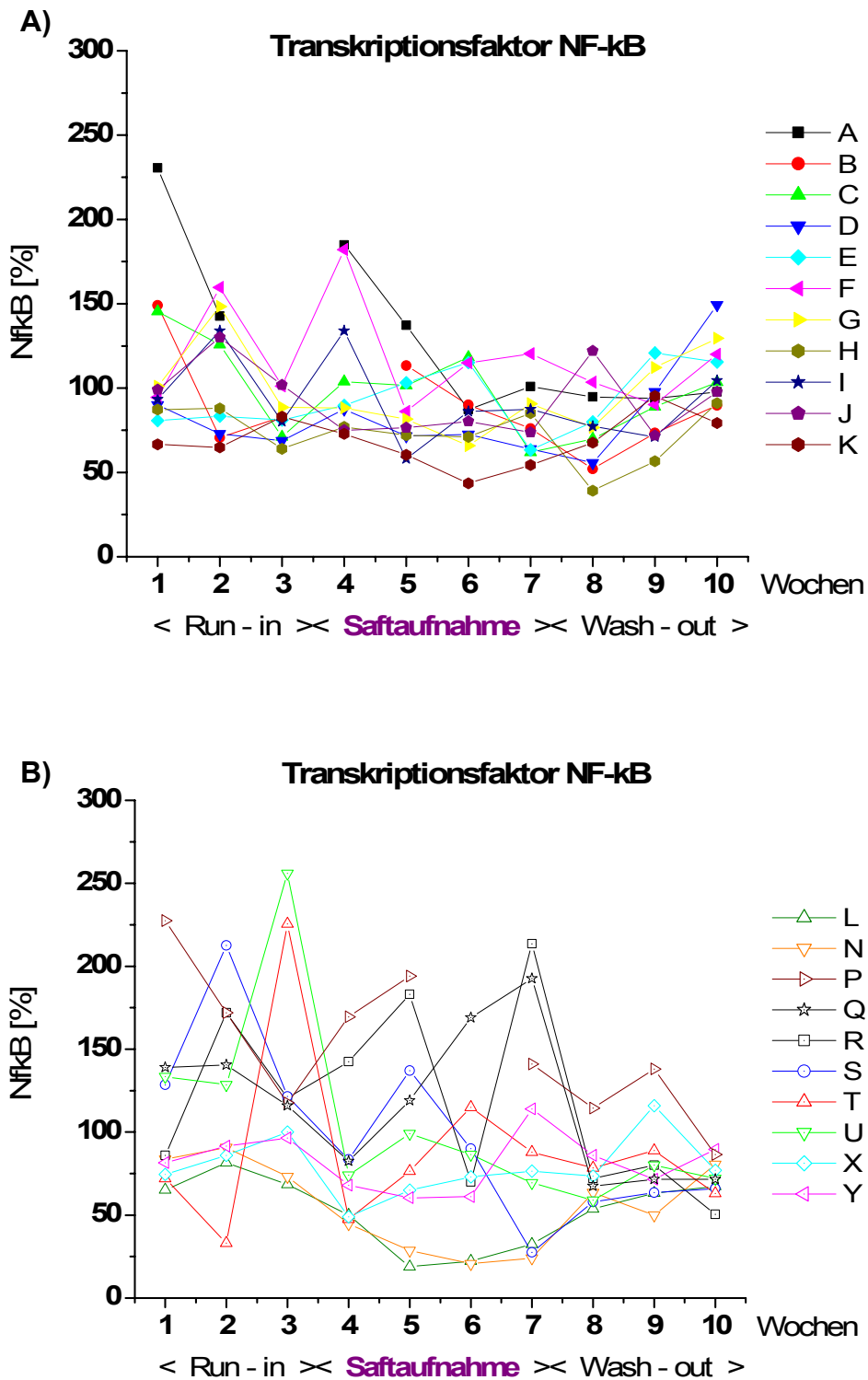


Abb. 11.10. A,B: Transkriptionsfaktor NF-κB, bestimmt in isolierten Lymphozyten. Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Einzelwerte der Patienten, n=1-2.
 A) Patienten 1-11 (A-K); B) Patienten 12-21 (L-Y)

- Antioxidative Kapazität (TEAC):

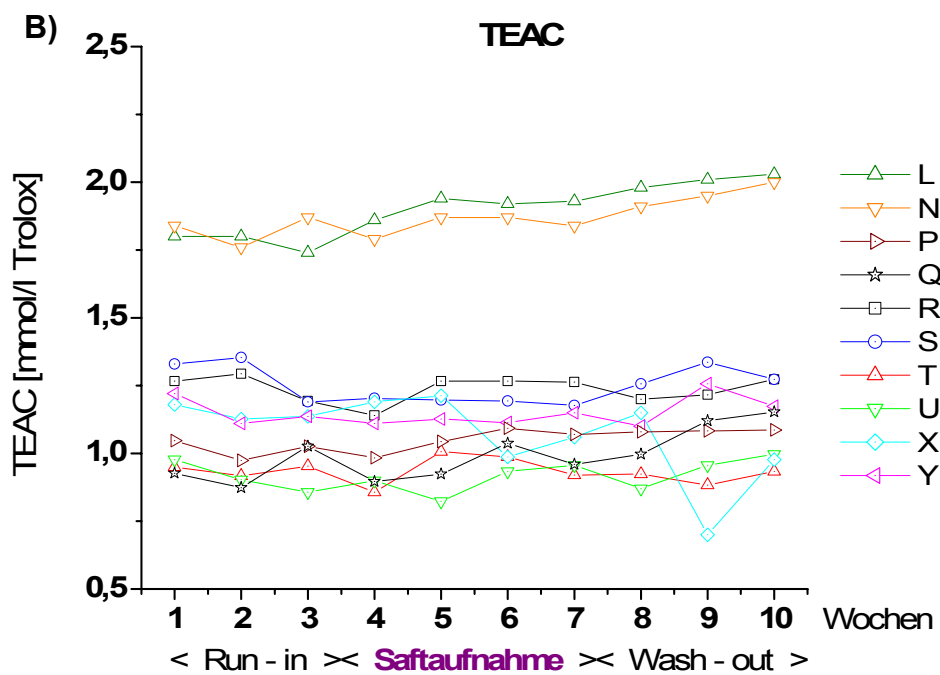
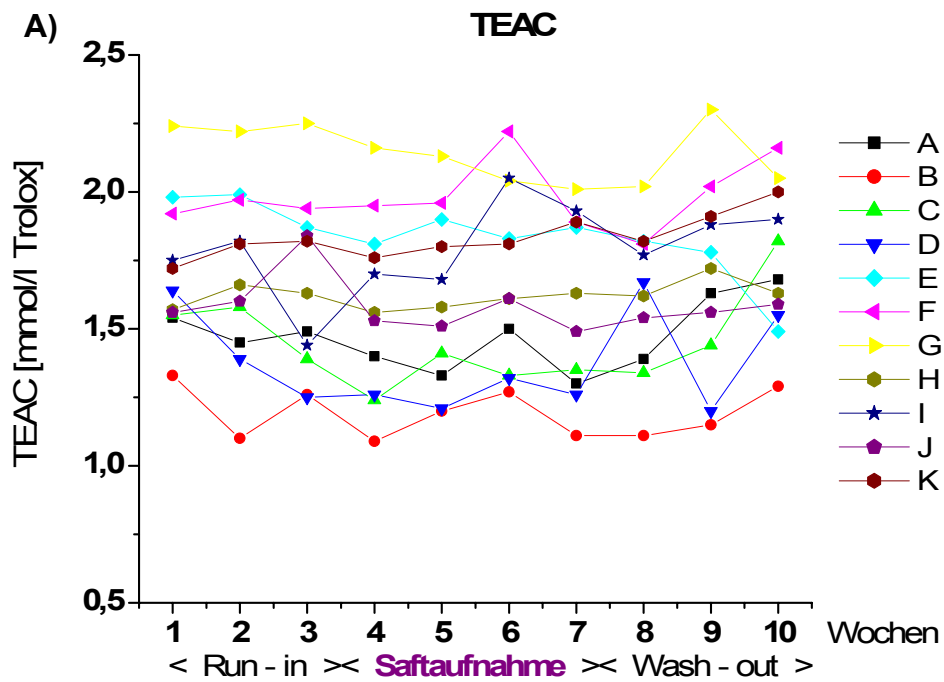


Abb. 11.11. A,B: TEAC, bestimmt in proteinfreiem Plasma. Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Einzelwerte der Patienten, n=1-3.
A) Patienten 1-11 (A-K); B) Patienten 12-21 (L-Y)

Anhang

- Harnsäure:

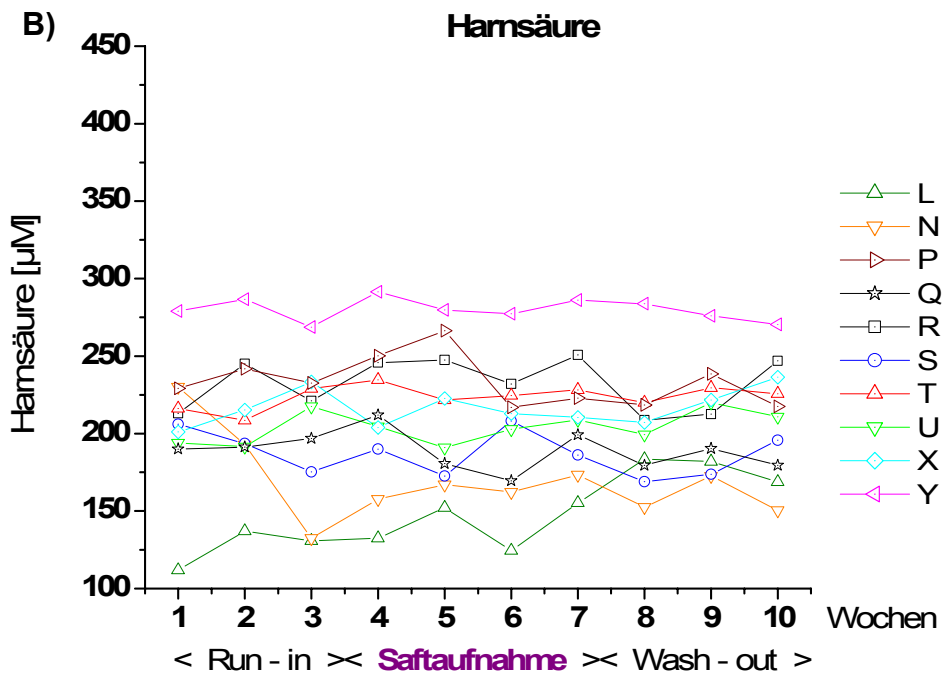
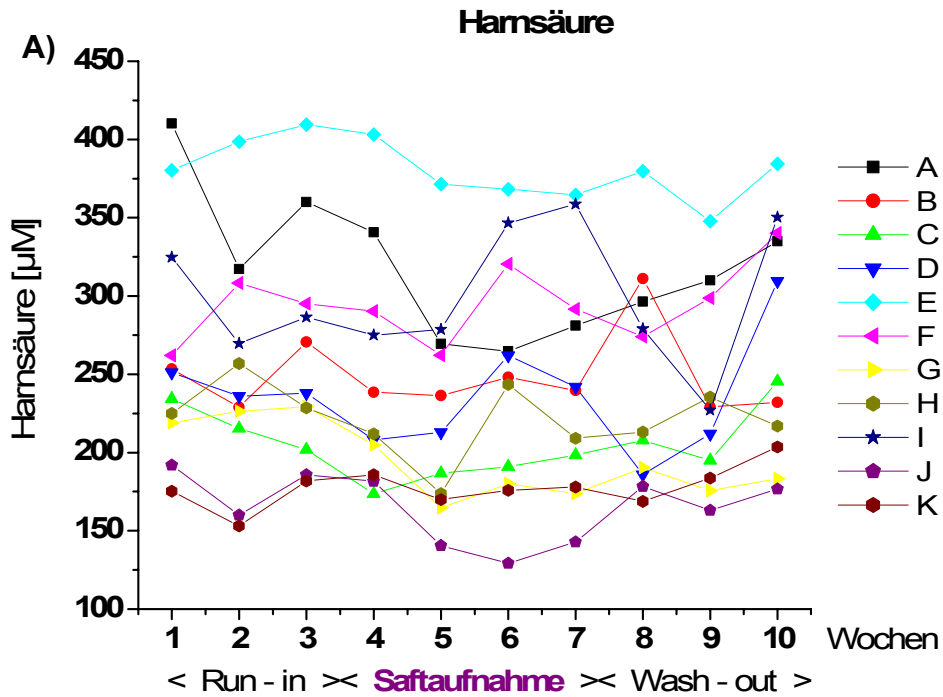


Abb. 11.12. A,B: Harnsäure, bestimmt in Plasma. Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Einzelwerte der Patienten, n=1.
A) Patienten 1-11 (A-K); B) Patienten 12-21 (L-Y)

11.2. Daten zu den Abbildungen der Ergebnisse

(Abb.5.1 bis 5.30 und 9.1 bis 9.12)

Untersuchungen mit Eisenpräparationen

Zell-Linie U937

- Comet Assay (Abb. 5.1.A)

Präparation Konzentration	[µg/ml]	Fe(III)-Chlorid		FL		VF		CF	
		10	100	10	100	10	100	10	100
Werte	15min	2,92	4,685	1,22	2,8225	0,7075	2,17	0,735	1,7225
	120min	2,4575	6,385	1,4475	5,06	0,44	4,18	0,1925	2,185
Range	15min	1,725	1,36	0,3	0,0125	0,1425	0,08	0,045	0,1425
	120min	0,8175	0,095	0,6425	0,615	0,23	0,565	0,0525	0,165

- Malondialdehyd (Abb. 5.1.B)

Präparation Konzentration	[µg/ml]	Fe(III)-Chlorid		FL		VF		CF	
		10	100	10	100	10	100	10	100
Werte	15min	0,81	0,75	1,133	2,48	1,164	2,583	0,012	0,208
	120min	2,045	1,8	1,337	1,86	0,927	1,863	-0,109	-0,015
Range	15min	0,105	0,05	0,221	0,588	0,341	0,323	0,047	0,121
	120min	0,155	0,4	0,554	0,32	0,329	0,567	0,03	0,053

Isolierte Lymphozyten:

- Comet Assay (Abb. 5.2.A-D)

Präparation Konzentration	[µg/ml]	Fe(III)- Chlorid (n=1)			FL (n=2)		
		1	10	100	1	10	100
Werte	5min	0,65	1,45	2,945	-0,0625	0,2975	1,54
	15min	0,13	1,49	3,49	0,06	0,36	1,2525
	30min	0,065	0,94	3,29	0,1575	1,07	1,38
	60min	0,69	1,735	3,02	-0,2075	0,6325	0,9425
Range	5min	-	-	-	0,0028	0,1175	0,095
	15min	-	-	-	0,008	0,09	0,2875
	30min	-	-	-	0,0225	0,675	0,53
	60min	-	-	-	0,0275	0,3675	0,3675

Präparation Konzentration	[µg/ml]	VF (n=2)			CF (n=2)		
		1	10	100	1	10	100
Werte	5min	0,0475	0,4175	0,9025	0,0575	0,445	0,9875
	15min	0,2225	0,87	1,5475	-0,035	0,215	0,6175
	30min	0,2475	0,545	1,3975	0,185	0,41	0,925
	60min	0,37	0,55	1,165	0,2425	0,57	0,9325
Range	5min	0,0125	0,1725	0,2525	0,0475	0,09	0,0975
	15min	0,0325	0,305	0,0125	0,1	0,155	0,2175
	30min	0,0175	0,135	0,0425	0,1	0,15	0,09
	60min	0,29	0,065	0,105	0,1975	0,01	0,0725

Anhang

- Malondialdehyd (Abb. 5.3.A-D)

Präparation Konzentration	[µg/ml]	Fe(III)- Chlorid (n=1)			FL (n=2)		
		1	10	100	1	10	100
Werte	5min	-	-	-	0,08	0,355	1,24
	15min	-	-	-	0,02	0,285	1,075
	30min	-0,05	0,22	0,37	0,035	0,335	1,16
	60min	0,03	0,34	0,52	0,07	0,29	1,205
Range	5min	-	-	-	0,07	0,095	0,46
	15min	-	-	-	0,04	0,025	0,435
	30min	-	-	-	0,015	0,035	0,27
	60min	-	-	-	0,03	0	0,115

Präparation Konzentration	[µg/ml]	VF (n=2)			CF (n=2)		
		1	10	100	1	10	100
Werte	5min	0,01	0,13	0,875	0,065	0,185	0,36
	15min	-0,04	0,095	0,785	0,055	0,135	0,32
	30min	0,005	0,15	0,805	0,07	0,16	0,405
	60min	-0,06	0,11	0,665	0,005	0,16	0,335
Range	5min	0	0,01	0,125	0,065	0,045	0,01
	15min	0,04	0,055	0,095	0,085	0,095	0,13
	30min	0,005	0,03	0,005	0,05	0,04	0,025
	60min	0,03	0,01	0,005	0,015	0	0,035

Vollblut

- Comet Assay (Abb. 5.4.A-C)

Präparation Konzentration	[µg/ml]	FL (n=2)			VF (n=2)			CF (n=2)		
		1	10	100	1	10	100	1	10	100
Werte	15min	0,1725	0,7875	1,5425	0,7875	0,81	1,5875	-0,1	0,4175	1,3
	30min	0,37375	0,98	1,1038	0,265	0,9625	1,63	0,4525	0,7075	1,3
	60min	0,33125	1,18625	2,085	0,2	0,3075	0,795	0,52	0,6	0,7525
	120min	0,32375	0,715	1,3963	0,165	0,67	1,4425	-0,0575	0,5	0,75
Range	15min	0,0175	0,0675	0,0275	0,3825	0,18	0,6175	0,06	0,0325	0,04
	30min	0,10125	0,135	0,1163	0,215	0,2325	0,085	0,4225	0,0325	0,19
	60min	0,15125	0,51125	0,42	0,05	0,1175	0,505	0,1	0,45	0,5275
	120min	0,24125	0,04	0,0213	0,075	0,055	0,4175	0,0225	0,11	0,19

- Malondialdehyd (Abb. 5.5.A-C)

Präparation Konzentration	[µg/ml]	FL (n=2)			VF (n=2)			CF (n=2)		
		1	10	100	1	10	100	1	10	100
Werte	15min	0,48	0,96	5,77	0,1	1,18	5,02	0,14	0,46	2,55
	30min	0,39	1,32	5,83	0,19	1,07	4,87	-0,04	0,48	2,64
	60min	0,16	1,17	5,23	0,13	1,32	5,91	0,38	0,72	2,27
	120min	0,04	1,13	4,46	0,14	0,97	4,3	0,11	0,63	2,45
Range	15min	0	0	0,17	0,08216	0,3381	0,4732	0,07227	0,11681	0,30329
	30min	0,06438	0,18877	0,4862	0,08534	0,2847	0,47598	0,02466	0,13115	0,28972
	60min	0,0694	0,05121	0,4866	0,06421	0,143	0,66293	0,11419	0,15718	0,22043
	120min	0,13285	0,20609	0,2934	0,16383	0,2519	0,62369	0,11	0,33	0,05487

Anhang

HD-Patienten

- Comet Assay (Abb. 5.6)

	Blutentnahme-Zeitpunkte	Patienten					MW
		1	2	3	4	5	
Werte [TI%]	vor Beginn der Fe-Gabe	2,83	6,96	7,19	9,37	8,57	6,984
	direkt nach Ende der Fe-Gabe	8,6	11,65	9,93	-	-	10,06
	10 min nach Ende der Fe-Gabe	-	-	-	11,2	8,92	10,06
	30 min nach Ende der Fe-Gabe	-	-	-	11,57	11,38	11,475

- Glutathionstatus (Abb. 5.7)

	Blutentnahme-Zeitpunkte	Patienten					MW
		1	2	3	4	5	
Werte [%]	vor Beginn der Fe-Gabe	69,9	72,1	76	69,4	65,2	70,52
	direkt nach Ende der Fe-Gabe	73,4	72,1	75,3	-	-	73,6
	10 min nach Ende der Fe-Gabe	-	-	-	69,2	65,8	67,5
	30 min nach Ende der Fe-Gabe	-	-	-	72	66,9	69,45

- Malondialdehyd (Abb. 5.8)

	Blutentnahme-Zeitpunkte	Patienten					MW
		1	2	3	4	5	
Werte [µM]	vor Beginn der Fe-Gabe	1,91	1,45	1,5	1,9	1,88	1,728
	direkt nach Ende der Fe-Gabe	2,32	2,56	2,8	-	-	2,56
	10 min nach Ende der Fe-Gabe	-	-	-	2,74	3,19	2,965
	30 min nach Ende der Fe-Gabe	-	-	-	2,65	2,91	2,78

Anhang

Interventionsstudie mit Mehrfruchtsaft

- Comet Assay

a) ohne FPG (Abb. 5.9.A,B; 5.10.A; 11.1.A,B)

ohne FPG [TI%]	Woche									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Patient										
A	0,74	0,37	0,68	0,535	0,245	0,245	0,385	0,26	0,23	0,155
B	1,43	0,595	0,835	0,58	0,42	0,57	0,49	0,265	0,31	0,31
C	0,605	0,835	0,57	0,29	0,425	0,47	0,605	0,22	0,285	0,225
D	0,385	0,69	0,61	0,38	0,485	0,56	0,74	0,365	0,44	0,235
E	0,435	0,555	0,635	0,37	0,55	0,7	0,415	0,45	0,41	0,165
F	0,48	0,605	0,595	0,48	0,375	0,335	0,235	0,345	0,595	0,295
G	0,785	0,89	0,39	0,455	0,295	0,345	0,29	0,42	0,345	0,31
H	0,47	0,825	0,44	0,435	0,505	0,49	0,555	0,445	0,35	0,24
I	0,165	0,615	0,42	0,52	0,49	0,465	0,415	0,435	0,59	0,24
J	0,43	0,73	0,4	0,52	0,535	0,49	0,4	0,38	0,52	0,22
K	0,415	1,01	0,615	0,45	0,74	0,415	0,69	0,58	0,74	0,81
L	0,435	0,545	0,895	0,68	0,585	0,875	1	0,495	0,9	0,665
N	0,36	0,53	1,02	0,86	0,785	0,76	0,725	0,81	1,065	1,075
P	0,31	0,34	0,54	0,39	0,345	0,43	0,395	0,41	0,72	0,49
Q	0,36	0,2	0,465	0,33	0,375	0,52	0,435	0,44	0,625	0,295
R	0,215	0,255	0,46	0,395	0,435	0,425	0,295	0,57	0,49	0,31
S	0,34	0,27	0,275	0,235	0,32	0,525	0,57	0,595	0,39	0,43
T	0,395	0,595	0,445	0,445	0,61	0,225	0,56	0,66	0,64	0,835
U	0,56	0,725	0,485	0,435	0,58	0,35	0,48	0,495	0,545	0,585
X	0,51	0,665	0,705	0,39	0,7	0,43	0,65	1,035	0,44	0,435
Y	0,285	0,645	0,505	0,555	0,615	0,69	0,67	0,97	0,475	0,475
MW	0,4814	0,5948	0,5707	0,4633	0,49595	0,49119	0,52381	0,5069	0,5288	0,41905
SD	0,2644	0,2148	0,1811	0,1363	0,14705	0,16303	0,1825	0,21493	0,2065	0,24786
		Run-in		Saftaufnahme			Wash-out			
Phasenmittel		0,54897		0,49357			0,48492			
SD		0,22457		0,15678			0,22529			

Anhang

b) mit FPG (Abb. 5.9.A,B; 5.10.B; 11.2.A,B)

mit FPG [TI%]	Woche									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Patient										
A	3,295	6,0933	4,7667	4,4333	2,52	1,87	2,18	2,67	2,85	4,39
B	3,18	5,79	5,03	4,52	2,67	2,53	2,51	2,94	2,95	4,74
C	4,19	4,65	4,15	4,02	2,74	2,16	2,44	2,76	2,84	4,13
D	4,32	6,13	4,61	4,78	3,03	2,31	2,62	3,21	3,14	4,77
E	3,4	6,91	4,95	6,14	2,69	2,22	2,3	3,01	3,01	5,61
F	3,4	4,83	4,51	4,53	2,36	1,86	2,14	2,5	3,29	4,78
G	3,6	4,56	4,91	4,68	3,3	2,24	1,84	2,71	3,81	4,03
H	4,8	4,98	4,92	5,06	3,34	2,09	2,45	2,54	3,34	4,31
I	3,53	5,35	4,66	4,28	3,11	1,93	2,12	2,88	3,93	4,26
J	5,49	4,57	5,41	4,2	3,18	2,08	2,13	3,02	4,26	4,21
K	6,95	6,72	6,18	4,53	2,56	2,14	2,76	2,85	6,61	6,42
L	5,26	8,15	7,73	4,53	3,19	2,23	2,41	2,95	6,09	4,34
N	6,18	7,57	9,19	4,17	2,38	2,88	2,1	3,18	7	5,8
P	5,4667	4,9325	4,375	3,6725	2,94	2,275	3,0275	3,035	4,2825	4,5325
Q	6,2133	4,74	4,5175	3,7325	2,7875	2,325	3,0525	2,87	4,8	4,03
R	5,7933	5,0925	4,3375	3,3975	2,8275	2,16	2,935	3,12	4,2075	4,2575
S	6,9533	5,29	5,1775	3,385	2,7575	1,955	2,89	3,095	4,1125	4,59
T	5,92	4,6575	5,55	4,255	2,3225	1,3975	2,1175	2,9025	3,83	4,8725
U	5,8625	4,5375	4,92	3,415	2,035	1,73	1,795	4,125	3,835	5,1
X	4,91	4,8725	5,66	3,34	2,0925	2,09	1,795	3,0875	3,67	3,7125
Y	5,0625	4,57	4,445	2,695	2,6325	2,28	1,61	3,7725	4,055	3,95
MW	4,9418	5,476	5,2381	4,1793	2,73643	2,13107	2,34393	3,01083	4,0911	4,61119
SD	1,2204	1,0682	1,2006	0,7421	0,3745	0,29849	0,42373	0,37087	1,1724	0,66488
		Run-in		Saftaufnahme			Wash-out			
Phasenmittel		5,2186		2,84769			3,90437			
SD		1,16707		0,93656			1,04009			

Anhang

- Glutathion

a) Glutathionspiegel (Abb. 5.11.A,B; 5.12; 11.3.A,B)

Glutathion- spiegel [μ M]	Woche									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Patient										
A	578,5	567,17	564,53	600,43	614,533	615,5	656,433	601,333	580,33	552,133
B	489,5	478,9	464,03	489,83	491,6	533,433	523,333	489,233	474,9	497,733
C	648,4	657,37	662,87	667,9	695,867	688,667	690,433	655,833	620,27	622,633
D	748,63	735,73	784,7	833,27	864,033	899,7	863,767	784,4	680,23	689,767
E	610,17	616,83	631,87	671,3	643,567	673,467	621,133	588,233	575,1	565,867
F	442,73	556,73	564,4	590,73	617,767	641,033	566,867	476,7	503	443,667
G	665,5	794,53	853,37	896,77	916,433	931,033	896,9	916,9	878,6	834,7
H	537,57	670,87	670,23	713,4	676,633	772,067	668,3	613,833	618,63	625,1
I	352,37	401,63	413,47	449,9	446,033	456,933	414	345,867	368,67	361,767
J	430,9	544,67	525,17	556,47	562,4	588,567	585,667	532,333	519,13	484,533
K	581,73	565,77	574,83	630,33	695,9	667,667	680,867	646,9	597,77	588,367
L	858,03	770,53	796,27	850,27	924,9	938,833	891,167	838,067	822,7	812,133
N	745,03	738,47	707,83	795,37	874,333	886,633	842,633	788,467	767,63	776,833
P	439,3	460,7	479,07	525,9	542,833	581,767	547,5	499,333	496,2	461,167
Q	606,3	677,93	656,37	729,57	785,767	761	782,667	657,933	665,7	641,233
R	722,23	727,9	773,37	841,93	859,533	835,8	858,933	763,033	763,07	666,533
S	512,77	548,6	548	589,4	651,333	659,8	668,9	554,733	566,7	550,2
T	514,9	539,7	568,27	652,23	694,733	666,533	683,1	596,7	626,57	565,967
U	606,3	641,47	634,7	709,8	741,7	716,367	698,933	677,5	637,83	630,633
X	749,9	721,67	733	844,67	827	897,367	828,167	709	730	721,467
Y	514,87	454,8	486,8	607,23	592,9	560,467	588,167	530,133	480,87	518,967
MW	588,36	612,95	623,48	678,41	700,943	712,983	693,232	631,737	617,8	600,543
SD	128,56	113,25	120,85	128,43	139,399	140,729	134,246	136,502	126,09	122,561
		Run-in		Saftaufnahme			Wash-out			
Phasenmittel	608,27			696,39			616,69			
SD	117,37			134,24			127,19			

Anhang

b) Oxidiertes Glutathion (Abb. 5.13.A,B; 5.14; 11.4.A,B)

GSSG [μ M]	Woche										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Patient											
A	78,303	71,763	72,837	66,72	66,6567	63,66	69,1067	82,88	77,543	76,8333	
B	66,85	63,813	67,553	60,153	57,6867	58,4533	59,92	66,24	65,63	68,2533	
C	86,19	83,543	84,173	75,133	68,3133	64,6933	67,9867	76,9167	71,19	75,82	
D	78,48	76,95	80,273	74,957	67,4033	62,93	64,37	71,5533	77,913	78,3	
E	62,4	66,033	67,32	63,663	60,2633	55,0967	58,99	62,67	67,337	66,23	
F	70,477	83,987	78,13	72,59	65,3867	67,0833	63,25	72,9433	73,74	74,5667	
G	61,05	55,883	59,913	54,68	54,9433	52,76	53,6467	69,4767	69,223	71,6167	
H	59,773	58,87	58,823	55,687	54,0933	49,7333	55,9833	59,3933	59,763	60,8833	
I	50,223	51,46	50,29	43,353	40,5633	43,2567	39,9633	42,0067	47,833	47,96	
J	83,52	86,24	85,333	78,72	78,18	78,0933	78,1833	82,8133	83,917	85,7533	
K	62,177	68,987	61,103	55,387	55,0467	53,9667	49,0567	62,6067	70,783	68,0567	
L	84,4	80,797	89,717	77,707	68,7833	72,28	73,0167	90,0967	94,34	95,9567	
N	65,57	66,633	67,983	60,167	53,35	57,5233	57,0633	67,1633	76,567	72,24	
P	65,25	63,007	66,857	47,937	46,3533	46,1233	50,6033	76,3767	86,637	88,51	
Q	66,9	78,557	82,397	66,113	59,69	56,59	58,8767	96,4433	95,427	96,8933	
R	82,86	79,463	83,56	72,557	69,6833	65,4267	73,46	83,93	92,15	94,6967	
S	70,737	70,967	75,703	55,953	48,6133	54,1633	55,4567	82,47	73,3	73,29	
T	69,92	75,7	74,433	61,347	61,4333	63,28	59,26	75,5633	78,503	84,2967	
U	84,327	86,303	87,613	73,763	76,3633	76,2767	75,9467	82,07	84,367	81,9233	
X	100,84	105,56	105,61	87,367	70,5167	77,3267	88,2833	98,17	109,67	103,453	
Y	83,317	90,8	82,927	75,993	78,6467	65,5	65,2567	86,4033	84,677	83,1433	
MW	73,027	74,539	75,36	65,712	61,9986	61,1532	62,7467	75,6279	78,119	78,5084	
SD	11,952	12,883	12,763	11,285	10,4195	9,81175	11,1337	13,1974	13,594	13,2185	
Phasenmittel	Run-in	Saftaufnahme				Wash-out					
		74,31	62,90				77,42				
	SD	12,25	10,30				13,06				

Anhang

c) Glutathionstatus (Abb. 5.15.A,B; 5.16; 11.5.A,B)

Glutathion- status [%]	Woche									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Patient										
A	72,733	74,7	74,167	77,6	78,1667	79,1	78,7667	72,5333	73,3	72
B	72,7	73,267	70,667	75,067	76,4667	77,8	76,9667	73	72,3	72,3667
C	73,267	74,433	74,6	77,5	80,3667	81,0667	80,3	76,5667	77	75,5667
D	78,9	79,067	79,467	81,967	84,3667	85,9667	85,0333	81,7	76,933	77,3
E	79,433	78,533	78,6	80,967	81,0667	83,3333	80,8	78,5333	76,333	76,5333
F	68,033	69,733	72,167	75,3	78,7667	79,0333	77,5667	69,2333	70,567	66,3
G	81,933	85,967	85,967	87,8	87,9333	88,6	87,9667	84,8667	84,233	82,8
H	77,8	82,467	82,433	84,4	83,9667	87,1333	83,2333	80,5667	80,733	80,4667
I	71,333	74,4	75,667	80,733	81,7667	80,9333	80,5	75,5	74,033	73,4667
J	61,233	68,3	67,433	71,533	72,1667	73,4	73,3	68,8667	67,667	64,5333
K	78,333	77,3	77,933	81,233	84,3667	83,2333	84,9	80,2667	75,2	75,7333
L	80,333	79,067	77,5	81,767	85,2	84,5667	83,6333	78,5667	76,967	76,2333
N	82,767	80,867	81,6	86,033	87,8667	87,7333	87,2667	83,4333	81,033	82,3333
P	70,367	72,567	71,933	81,7	82,6333	84,1333	81,3333	69,1667	64,833	61,6
Q	77,867	76,767	74,667	81,833	84,8	85,0667	84,9	70,6	71,267	69,6667
R	77,067	78,233	78,233	82,733	83,7667	83,9667	82,6667	77,8667	75,533	71,5333
S	72,333	73,867	72,1	80,7	85	83,4667	83,1667	70,1667	74,133	73,1333
T	72,6	71,867	73,667	81,033	82,3	80,8	82,6333	74,4667	74,9	70,0667
U	72,1	73,067	72,2	79,033	79,3333	78,4667	78,1333	75,6667	73,3	73,9
X	73,1	70,567	71,3	79,2	82,9	82,7	78,6	72,2667	70,2	71,2333
Y	67,6	59,867	65,533	74,7	73,4333	76,7	77,8	67,3333	64,6	67,8333
MW	74,373	74,995	75,135	80,135	81,7445	82,2476	81,4032	75,2937	74,051	73,0762
SD	5,2959	5,5709	4,9655	3,8812	4,19152	3,87566	3,67821	5,1531	4,9296	5,45404
Phasenmittel	Run-in		Saftaufnahme				Wash-out			
	74,83		81,38				74,14			
SD	5,08		3,80				5,02			

Anhang

- Malondialdehyd (Abb. 5.17.A,B; 5.18; 11.6.A,B)

MDA [μ M]	Woche									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Patient										
A	1,110	1,168	1,306	1,163	1,158	0,970	1,178	1,155	0,878	0,938
B	1,057	1,076	0,997	0,755	0,910	0,766	0,834	0,798	0,789	0,976
C	0,988	1,037	1,013	0,912	1,086	0,989	0,718	0,808	0,681	0,813
D	0,958	0,853	0,857	1,063	0,954	0,983	0,869	0,847	0,852	1,005
E	1,260	1,220	1,120	1,170	1,120	1,020	1,230	1,290	1,250	1,300
F	2,033	2,122	2,191	2,223	2,067	2,100	1,945	2,086	2,193	1,983
G	1,126	1,640	1,141	1,190	1,075	1,078	1,018	0,808	1,116	0,905
H	1,341	1,628	1,401	1,377	1,450	0,940	1,104	1,140	0,962	1,030
I	1,040	1,090	1,040	0,830	0,960	0,980	1,070	0,850	1,010	0,800
J	1,211	1,071	0,931	1,472	1,279	0,827	0,964	0,952	0,940	1,132
K	1,220	1,130	1,200	1,130	1,190	1,200	1,310	1,360	1,280	1,420
L	1,070	1,050	1,120	0,970	0,950	0,980	1,040	1,130	1,020	1,160
N	1,310	1,270	1,300	1,170	1,190	1,190	1,200	1,210	1,350	1,270
P	1,760	1,580	1,655	1,600	1,780	1,440	1,495	1,455	1,450	1,325
Q	1,280	1,105	1,300	1,305	1,255	1,215	1,095	1,110	1,215	1,235
R	1,950	1,605	2,015	1,905	1,930	1,945	1,580	1,670	1,760	1,755
S	1,340	1,280	1,400	1,240	1,395	1,425	1,210	1,235	1,295	1,215
T	1,685	1,530	1,815	1,695	1,470	1,650	1,365	1,290	1,670	1,295
U	1,697	1,630	1,603	1,563	1,467	1,453	1,530	1,420	1,343	1,353
X	1,665	1,540	1,445	1,550	1,660	1,670	1,640	1,475	1,385	1,310
Y	1,615	1,405	1,455	1,415	1,305	1,435	1,365	1,360	1,330	1,835
MW	1,367	1,335	1,348	1,319	1,317	1,250	1,227	1,212	1,227	1,241
SD	0,324	0,304	0,352	0,358	0,325	0,364	0,297	0,321	0,357	0,316
		Run-in		Saftaufnahme			Wash-out			
Phasenmittel		1,35		1,28			1,23			
SD		0,32		0,33			0,33			

Anhang

- Triglyceride (Abb. 5.19.A,B; 5.20; 11.7.A,B)

Triglyceride [mM]	Woche									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Patient										
A	1,033	0,869	0,994	0,896	1,034	0,923	1,020	0,789	0,782	0,852
B	0,423	0,795	0,380	0,743	0,726	0,717	0,734	0,449	0,950	1,063
C	1,567	1,500	1,547	1,333	1,853	2,430	1,882	1,645	1,698	1,347
D	1,244	0,510	1,071	0,207	0,510	0,691	0,726	1,645	1,063	0,510
E	2,465	1,821	1,372	2,204	1,780	2,334	0,863	1,329	1,546	1,301
F	0,734	0,595	0,913	1,757	1,077	0,918	1,063	0,530	1,142	0,754
G	1,295	1,092	0,939	0,940	0,812	1,217	1,274	0,901	0,584	1,001
H	2,145	2,175	1,488	1,518	1,806	2,001	2,288	1,573	2,891	1,403
I	1,295	2,237	1,487	1,507	1,370	1,005	--	1,192	1,458	1,195
J	1,295	1,031	1,185	1,299	1,133	0,726	--	1,588	0,642	0,544
K	1,513	1,430	1,539	1,385	2,267	1,893	2,692	2,775	2,956	2,009
L	0,953	1,430	1,294	1,565	0,985	0,992	0,985	1,565	1,294	1,372
N	2,153	1,229	2,651	2,325	1,616	0,852	3,022	1,616	2,613	1,677
P	2,180	2,857	2,940	2,799	2,931	3,335	3,295	2,901	2,347	2,501
Q	0,656	0,548	0,391	0,327	0,478	0,626	0,788	1,145	1,041	1,050
R	2,053	1,394	2,034	2,283	1,741	1,800	1,418	2,006	1,681	1,443
S	0,875	0,704	0,670	0,736	0,673	0,971	0,676	0,682	0,583	0,857
T	2,258	1,546	1,223	1,574	1,076	1,892	1,033	1,189	1,638	1,076
U	2,278	2,081	2,579	1,580	1,622	1,602	2,598	2,292	1,919	1,617
X	2,337	2,267	1,915	2,277	2,408	2,196	3,312	2,471	3,169	1,085
Y	1,132	1,124	0,681	0,842	0,549	0,532	1,253	0,907	0,648	0,684
MW	1,518	1,392	1,395	1,433	1,355	1,412	1,627	1,485	1,554	1,207
SD	0,637	0,651	0,706	0,688	0,674	0,756	0,934	0,698	0,823	0,481
Phasenmittel	Run-in		Saftaufnahme				Wash-out			
	1,44		1,45				1,42			
SD	0,61		0,67				0,60			

Anhang

- MDA/Triglyceride (Abb. 5.21.A,B; 5.22; 11.8.A,B)

MDA / Triglyceride	MDA [$\mu\text{mol}/\text{mmol}$ Triglyceride]				Woche					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Patient										
A	1,074	1,345	1,313	1,298	1,120	1,051	1,155	1,464	1,122	1,100
B	2,499	1,354	2,623	1,016	1,254	1,069	1,136	1,777	0,830	0,919
C	0,631	0,691	0,655	0,684	0,586	0,407	0,381	0,491	0,401	0,603
D	0,770	1,674	0,800	5,123	1,872	1,423	1,198	0,515	0,801	1,972
E	0,511	0,670	0,816	0,531	0,629	0,437	1,426	0,971	0,808	1,000
F	2,770	3,565	2,401	1,265	1,919	2,287	1,830	3,935	1,919	2,630
G	0,869	1,501	1,215	1,265	1,324	0,886	0,799	0,897	1,910	0,905
H	0,625	0,749	0,941	0,907	0,803	0,470	0,482	0,725	0,333	0,734
I	0,803	0,487	0,700	0,551	0,701	0,975	--	0,713	0,693	0,670
J	0,936	1,040	0,786	1,134	1,129	1,139	--	0,599	1,465	2,082
K	0,806	0,790	0,780	0,816	0,525	0,634	0,487	0,490	0,433	0,707
L	1,123	0,734	0,866	0,620	0,964	0,988	1,056	0,722	0,788	0,845
N	0,608	1,033	0,490	0,503	0,736	1,397	0,397	0,749	0,517	0,757
P	0,807	0,553	0,563	0,572	0,607	0,432	0,454	0,502	0,618	0,530
Q	1,953	2,016	3,325	3,997	2,628	1,942	1,390	0,969	1,167	1,176
R	0,950	1,151	0,991	0,834	1,109	1,081	1,114	0,833	1,047	1,217
S	1,532	1,818	2,090	1,686	2,073	1,468	1,790	1,811	2,223	1,418
T	0,746	0,990	1,485	1,077	1,367	0,872	1,322	1,085	1,020	1,204
U	0,745	0,783	0,622	0,990	0,904	0,907	0,589	0,620	0,700	0,837
X	0,713	0,679	0,755	0,681	0,689	0,761	0,495	0,597	0,437	1,207
Y	1,427	1,250	2,138	1,682	2,377	2,697	1,089	1,499	2,054	2,685
MW	1,090	1,184	1,255	1,297	1,206	1,111	0,978	1,046	1,014	1,200
SD	0,619	0,693	0,792	1,153	0,623	0,602	0,465	0,778	0,579	0,628
Phasenmittel	Run-in		Saftaufnahme			Wash-out				
	1,16		1,16			1,08				
SD	0,54		0,62			0,47				

Anhang

- Proteincarbonyle (Abb. 5.23.A,B; 5.24; 11.9.A,B)

Protein-carbonyle	[nmol/mg Protein]									
	Woche									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Patient										
A	1,060	1,040	0,990	1,040	0,910	0,750	0,810	0,830	1,040	1,040
B	1,300	1,200	1,520	1,190	1,060	0,820	1,160	0,870	1,050	1,090
C	1,283	1,110	1,323	1,160	1,157	1,047	1,110	1,120	0,905	1,367
D	0,913	1,030	1,060	0,980	1,000	1,180	1,160	1,050	1,220	1,100
E	0,957	1,270	1,045	0,990	0,855	0,890	1,100	1,000	1,105	1,265
F	1,167	1,237	1,207	1,243	1,057	1,197	0,920	1,220	0,973	1,067
G	1,090	1,315	1,330	1,360	1,290	1,197	1,197	1,330	1,290	1,360
H	1,173	--	1,315	1,315	1,475	1,285	1,095	1,095	1,250	1,160
I	--	1,920	2,455	2,225	1,500	1,615	2,095	2,435	2,255	1,350
J	--	1,750	2,050	1,700	1,670	1,780	1,070	1,660	1,380	1,850
K	0,764	0,714	0,743	0,715	0,650	0,596	0,646	0,736	0,661	0,701
L	0,838	0,903	0,823	0,766	0,819	0,713	0,692	0,887	0,799	0,883
N	0,734	0,628	0,878	0,633	0,578	0,648	0,543	0,662	0,718	0,791
P	0,689	0,634	0,650	0,573	0,610	0,580	0,632	0,671	0,669	0,666
Q	0,961	1,008	1,013	0,924	0,844	0,809	0,766	1,084	1,112	1,053
R	0,883	0,788	0,745	0,605	0,686	0,671	0,643	0,792	0,857	0,807
S	0,828	0,779	0,859	0,672	0,698	0,773	0,764	0,814	0,853	0,884
T	0,969	0,862	0,887	0,700	0,725	0,712	0,745	0,800	0,870	0,828
U	0,964	0,887	0,920	0,830	0,825	0,861	0,740	0,891	0,989	1,005
X	1,062	1,254	1,124	0,977	0,935	0,935	0,991	1,104	1,168	1,117
Y	0,849	0,761	0,857	0,780	0,779	0,730	0,716	0,957	0,797	0,879
MW	0,973	1,054	1,133	1,018	0,958	0,942	0,933	1,048	1,046	1,060
SD	0,176	0,344	0,439	0,402	0,308	0,327	0,338	0,396	0,345	0,276
Phasenmittel	Run-in		Saftaufnahme				Wash-out			
	1,09		0,96				1,05			
SD	0,37		0,33				0,31			

Anhang

- Transkriptionsfaktor NF-κB (Abb. 5.25.A,B; 5.26; 11.10.A,B)

NF-κB- Status [%]	Woche									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Patient										
A	230,50	142,70	--	184,90	137,20	87,20	100,80	94,80	93,80	97,70
B	149,00	70,60	83,10	--	113,30	90,10	76,00	52,10	73,30	89,80
C	145,40	125,80	71,00	103,80	101,50	118,30	61,90	69,90	89,00	103,50
D	90,00	72,90	68,70	87,50	71,50	72,50	63,80	55,60	97,70	149,40
E	80,80	83,30	81,10	89,80	103,20	115,20	63,40	79,90	120,90	115,40
F	94,50	159,70	101,20	182,10	86,10	114,90	120,40	103,50	90,30	120,10
G	101,00	148,30	88,60	88,30	81,60	65,90	90,80	76,70	112,20	129,60
H	87,20	88,00	64,00	77,00	72,10	71,00	85,10	39,10	56,60	91,10
I	93,30	133,90	80,00	133,90	58,20	86,20	87,50	77,30	71,00	104,40
J	99,00	130,10	101,90	75,00	76,40	80,30	73,70	122,00	71,90	97,80
K	66,67	64,82	83,03	72,84	60,49	43,52	54,32	67,59	95,37	79,30
L	65,12	81,48	68,52	50,00	18,83	22,22	32,41	53,70	63,27	67,30
N	83,64	90,74	73,15	44,75	28,70	20,68	24,07	63,58	50,00	80,56
P	227,50	172,00	117,50	169,50	194,00	--	141,00	114,50	138,00	86,50
Q	139,00	140,50	116,00	82,50	119,00	169,00	192,50	67,50	71,50	71,50
R	86,00	172,00	120,50	142,50	183,00	70,00	213,50	72,00	80,00	50,50
S	128,50	212,50	121,50	83,50	137,00	90,00	27,50	58,00	63,50	66,00
T	72,00	33,00	225,50	47,50	76,50	115,00	88,00	78,50	89,00	63,00
U	133,50	128,50	256,00	74,00	99,00	86,50	69,50	59,00	80,00	72,00
X	74,50	86,00	100,00	49,00	65,00	73,00	76,50	73,50	116,00	77,00
Y	81,50	91,50	96,50	68,00	60,50	61,00	114,00	86,00	71,50	89,50
MW	110,89	115,64	105,89	95,32	92,53	82,63	88,41	74,51	85,47	90,57
SD	46,90	44,29	49,81	44,00	44,08	34,26	47,98	20,74	22,46	24,07
Phasenmittel	Run-in	Saftaufnahme				Wash-out				
	SD	110,88	89,74				83,52			
SD	46,40	42,43				23,10				

Anhang

- Antioxidative Kapazität (TEAC) (Abb. 5.27.A,B; 5.28; 11.11.A,B)

TEAC [mmol/l Trolox]	Woche									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Patient										
A	1,540	1,450	1,490	1,400	1,330	1,500	1,300	1,390	1,630	1,680
B	1,330	1,100	1,260	1,090	1,200	1,270	1,110	1,110	1,150	1,290
C	1,550	1,580	1,390	1,240	1,410	1,330	1,350	1,340	1,440	1,820
D	1,640	1,390	1,250	1,260	1,210	1,320	1,260	1,670	1,200	1,550
E	1,980	1,990	1,870	1,810	1,900	1,830	1,870	1,820	1,780	1,490
F	1,920	1,970	1,940	1,950	1,960	2,220	1,890	1,810	2,020	2,160
G	2,240	2,220	2,250	2,160	2,130	2,040	2,010	2,020	2,300	2,050
H	1,570	1,660	1,630	1,560	1,580	1,610	1,630	1,620	1,720	1,630
I	1,750	1,820	1,440	1,700	1,680	2,050	1,930	1,770	1,880	1,900
J	1,560	1,600	1,840	1,530	1,510	1,610	1,490	1,540	1,560	1,590
K	1,720	1,810	1,820	1,760	1,800	1,810	1,890	1,820	1,910	2,000
L	1,800	1,800	1,740	1,860	1,940	1,920	1,930	1,980	2,010	2,030
N	1,840	1,760	1,870	1,790	1,870	1,870	1,840	1,910	1,950	2,000
P	1,047	0,973	1,027	0,983	1,043	1,093	1,070	1,080	1,083	1,087
Q	0,927	0,873	1,027	0,897	0,923	1,037	0,960	0,997	1,120	1,153
R	1,267	1,293	1,193	1,140	1,267	1,267	1,263	1,200	1,217	1,273
S	1,330	1,353	1,190	1,203	1,197	1,193	1,177	1,257	1,337	1,273
T	0,950	0,917	0,953	0,857	1,007	0,987	0,920	0,923	0,883	0,933
U	0,977	0,903	0,857	0,900	0,823	0,933	0,957	0,870	0,957	0,997
X	1,180	1,127	1,137	1,190	1,213	0,987	1,060	1,150	0,700	0,977
Y	1,220	1,110	1,137	1,110	1,127	1,113	1,150	1,100	1,257	1,173
MW	1,492	1,462	1,443	1,400	1,434	1,476	1,431	1,447	1,481	1,527
SD	0,368	0,403	0,388	0,389	0,385	0,405	0,385	0,375	0,438	0,401
	Run-in	Saftaufnahme				Wash-out				
Phasenmittel	1,47	1,44				1,48				
SD	0,38	0,38				0,40				

Anhang

- Harnsäure (Abb. 5.29.A,B; 5.30; 11.2.A,B)

Harnsäure [µM]	Woche									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Patient										
A	410,33	317,13	360,00	340,77	269,47	264,61	281,19	296,43	309,88	334,97
B	253,33	229,04	270,54	238,58	236,41	248,12	239,66	311,05	229,14	231,99
C	234,35	215,37	201,90	173,48	186,66	190,89	198,46	207,80	195,02	245,36
D	251,07	236,12	237,99	208,19	212,91	261,98	242,02	185,97	212,03	309,57
E	380,27	398,66	409,48	403,18	371,52	368,28	364,64	379,78	347,82	384,50
F	261,93	308,32	294,97	290,28	262,20	320,47	291,57	273,99	298,66	340,08
G	218,94	226,30	229,43	204,86	164,72	180,00	173,84	190,31	175,68	183,23
H	225,02	256,86	228,61	212,04	173,74	243,52	209,09	213,14	235,42	217,01
I	324,71	269,66	286,41	275,00	278,68	346,61	358,76	279,05	227,13	350,29
J	191,97	159,94	185,71	181,66	140,42	129,19	142,82	178,35	163,07	176,69
K	175,32	153,03	181,73	185,70	169,97	175,89	178,00	168,76	183,59	203,61
L	111,93	137,06	130,74	132,52	152,22	124,42	155,14	183,43	181,97	168,84
N	230,04	192,91	132,52	157,65	167,14	162,35	173,38	152,46	172,65	150,36
P	229,11	241,84	232,66	250,12	266,40	216,98	222,90	218,46	238,58	217,57
Q	190,05	191,23	196,85	211,95	180,58	169,63	199,22	179,39	190,34	179,39
R	213,13	245,09	221,12	245,68	247,46	232,07	250,72	208,69	212,54	246,87
S	206,03	193,60	175,25	190,05	172,59	208,10	186,20	169,04	173,77	195,67
T	216,20	208,55	228,91	234,64	221,64	224,51	228,14	219,92	229,58	225,75
U	194,02	191,54	217,53	204,54	190,87	202,82	208,84	199,28	220,02	210,75
X	201,00	215,24	233,40	203,87	222,69	212,95	210,37	207,12	221,64	236,36
Y	278,99	286,73	268,66	291,51	279,85	277,27	286,06	283,86	276,02	270,39
MW	237,99	232,11	234,50	230,30	217,53	226,70	228,62	224,11	223,55	241,87
SD	67,25	60,85	66,36	62,99	56,79	64,75	60,14	57,99	49,13	66,07
	Run-in	Saftaufnahme				Wash-out				
Phasenmittel	234,86	225,79				229,84				
SD	62,53	58,91				54,43				

11.3. Daten zur Interventionsstudie

11.3.1. Ausschlusskriterien

- Stabile HD < 3 Monate
- Ineffektive HD ($Kt/V < 1,3$)
- CRP > 30 mg/l oder das Vorliegen florider Infektionen
- Kalium < 6 mmol/l
- Hämoglobin < 10 g/dl oder > 13 g/dl
- Serum-Ferritin < 100 µg/dl oder > 800 µg/dl
- Transferrinsättigung > 50 %
- wöchentliche Eisensubstitution > 100 mg
- Einsatz der Hämodiafiltration
- Blutfluss an der Dialyse < 200 ml/min oder > 350 ml/min
- Einsatz der „single-needle“-Technik
- Hämatologische Systemerkrankungen
- Behandlung mit Immunsuppressiva (z. B. Glucosteroide)
- Zytostatische Behandlung
- schwere Begleiterkrankungen, z. B. chronische entzündliche Erkrankungen, die zu einer bedeutsamen klinischen Verschlechterung des Patienten während der Studienzeit führen könnten
- Änderung der Erythropoietin-Dosis > 30 % in den letzten acht Wochen
- Therapie mit Vitamin C, Vitamin E oder ACC.
- Schwangerschaft im ersten Trimenon

11.3.2. Durchführungszeitraum

Der Durchführungszeitraum der Studie war 11.01.2006 bis 28.12.2006. Aufgrund von organisatorischen Vorgaben erfolgte eine Unterteilung in fünf Abschnitte:

- 1.** Patienten A – J: 11.01.2006 – 17.03.2006
- 2.** Patienten K,L,N: 11.05.2006 – 17.07.2006
- 3.** Patienten P – S: 28.08.2006 – 02.11.2006
- 4.** Patienten T und U: 27.09.2006 – 30.11.2006
- 5.** Patienten X und Y: 26.10.2006 – 28.12.2006

11.3.3. Liste mit Ernährungsvorgaben

Ernährungsvorgaben während der gesamten Studiendauer (10 Wochen)

Studiensaft: täglich 100ml am Vormittag und 100ml am Nachmittag/Abend trinken

⇒ folgende Lebensmittel müssen gemieden werden (Polyphenolarme Ernährung):

Obst	Gemüse	Sonstiges
Weintrauben	Rotkohl	Rotwein
rote/blaue Beeren	Zwiebel rot	Beerensäfte
Kirschen	roter Rettich	
Pflaumen	Auberginen	
Blutorangen	rote Bohnen	
Erdbeeren	<i>Kartoffel lila</i>	
Rhabarber	Radieschen	
Passionsfrucht		
roter Apfel		
rote Birne		

⇒ möglichst eingeschränkter und gleichmäßiger Verzehr von anderen Säften, Kaffee, Tee, Obst und Gemüse (z.B.: kein Obsttag)

⇒ keine Einnahme von Supplementen (Vitaminpräparate wie BCE-Produkte, Pflanzen-Extrakte...); Mineralien erlaubt.

⇒ Wenn möglich: während den saftfreien Studienphasen (Wochen 1, 2, 3, 8, 9, 10) anstatt des Saftes Aufnahme eines polyphenolarmen Getränkes (200 ml/Tag), z. B. Wasser.

⇒ **wichtig:** etwa 1 Stunde vor der Dialyse an den Blutentnahmetagen 100ml Saft unverdünnt trinken und bei der vorausgehenden Mahlzeit an diesem Tag nur geringe Mengen von fetten Nahrungsmitteln (Butter, Käse, Sahne, Öl, Margarine, Eier, Croissants, Speck...) essen.

11.3.4. Exemplarischer Terminplan (zur Orientierung für die Patienten)

Datum	Wochentag	Blutentnahme	Saftaufnahme	polyphenolarme Ernährung
9. Jan. 06	Montag			
10. Jan. 06	Dienstag			
11. Jan. 06	Mittwoch			Ernährungsprotokoll
12. Jan. 06	Donnerstag	Vor HD-Beginn		
13. Jan. 06	Freitag			
14. Jan. 06	Samstag			
15. Jan. 06	Sonntag			
16. Jan. 06	Montag			
17. Jan. 06	Dienstag			
18. Jan. 06	Mittwoch			Ernährungsprotokoll
19. Jan. 06	Donnerstag	Vor HD-Beginn		
20. Jan. 06	Freitag			
21. Jan. 06	Samstag			
22. Jan. 06	Sonntag			
23. Jan. 06	Montag			
24. Jan. 06	Dienstag			
25. Jan. 06	Mittwoch			Ernährungsprotokoll
26. Jan. 06	Donnerstag	Vor HD-Beginn	200ml nach Blutabnahme	
27. Jan. 06	Freitag		200ml Saft	
28. Jan. 06	Samstag		200ml Saft	
29. Jan. 06	Sonntag		200ml Saft	
30. Jan. 06	Montag		200ml Saft	
31. Jan. 06	Dienstag		200ml Saft	
1. Feb. 06	Mittwoch		200ml Saft	Ernährungsprotokoll
2. Feb. 06	Donnerstag	Vor HD-Beginn	200ml Saft	
3. Feb. 06	Freitag		200ml Saft	
4. Feb. 06	Samstag		200ml Saft	
5. Feb. 06	Sonntag		200ml Saft	
6. Feb. 06	Montag		200ml Saft	
7. Feb. 06	Dienstag		200ml Saft	
8. Feb. 06	Mittwoch		200ml Saft	Ernährungsprotokoll
9. Feb. 06	Donnerstag	Vor HD-Beginn	200ml Saft	
10. Feb. 06	Freitag		200ml Saft	
11. Feb. 06	Samstag		200ml Saft	
12. Feb. 06	Sonntag		200ml Saft	
13. Feb. 06	Montag		200ml Saft	
14. Feb. 06	Dienstag		200ml Saft	
15. Feb. 06	Mittwoch		200ml Saft	Ernährungsprotokoll
16. Feb. 06	Donnerstag	Vor HD-Beginn	200ml Saft	
17. Feb. 06	Freitag		200ml Saft	
18. Feb. 06	Samstag		200ml Saft	
19. Feb. 06	Sonntag		200ml Saft	
20. Feb. 06	Montag		200ml Saft	
21. Feb. 06	Dienstag		200ml Saft	
22. Feb. 06	Mittwoch		200ml Saft	Ernährungsprotokoll
23. Feb. 06	Donnerstag	Vor HD-Beginn	200ml vor Blutabnahme	
24. Feb. 06	Freitag			
25. Feb. 06	Samstag			
26. Feb. 06	Sonntag			
27. Feb. 06	Montag			

Anhang

Datum	Wochentag	Blutentnahme	Saftaufnahme	polyphenolarme Ernährung
28. Feb. 06	Dienstag			
1. Mrz. 06	Mittwoch			Ernährungsprotokoll
2. Mrz. 06	Donnerstag	Vor HD-Beginn		
3. Mrz. 06	Freitag			
4. Mrz. 06	Samstag			
5. Mrz. 06	Sonntag			
6. Mrz. 06	Montag			
7. Mrz. 06	Dienstag			
8. Mrz. 06	Mittwoch			Ernährungsprotokoll
9. Mrz. 06	Donnerstag	Vor HD-Beginn		
10. Mrz. 06	Freitag			
11. Mrz. 06	Samstag			
12. Mrz. 06	Sonntag			
13. Mrz. 06	Montag			
14. Mrz. 06	Dienstag			
15. Mrz. 06	Mittwoch			Ernährungsprotokoll
16. Mrz. 06	Donnerstag	Vor HD-Beginn		
17. Mrz. 06	Freitag			
18. Mrz. 06	Samstag			
19. Mrz. 06	Sonntag			

Anhang

11.4. Daten der Patienten

11.4.1. Basisdaten, Grund- und Begleiterkrankungen

Patient	Geburtsdatum	Körpergröße	Dialysemembran	Grunderkrankung	Begleiterkrankung(en)
A	05.05.1946	173 cm	Baxter DICEA 170 (Celluloseacetat)	Schrumpfnieren	Bluthochdruck
B	14.10.1961	175 cm	NIPRO Surelyzer Superflux 150 LGA (Triacetat)	unbekannt	Bluthochdruck
C	30.06.1946	163 cm	Fresenius F8 HPS (Polysulfon)	Nephrektomie infolge hydronephrotischer Nephropathie	koronare Herzkrankheit
D	01.10.1931	168 cm	Fresenius F8 HPS (Polysulfon)	Diabetische Nephropathie	Bluthochdruck koronare Herzkrankheit Diabetes mellitus pAVK*
E	11.04.1949	184 cm	NIPRO Surelyzer Superflux 150 LGA (Triacetate)	Analgetische Nephropathie	/
F	15.07.1953	181 cm	Fresenius Fx80 (Polysulfon)	Schrumpfnieren	Bluthochdruck koronare Herzkrankheit pAVK*
G	22.12.1937	170 cm	Fresenius F8 HPS (Polysulfon)	Schrumpfnieren	Bluthochdruck koronare Herzkrankheit
H	03.12.1934	174 cm	Fresenius F8 HPS (Polysulfon)	Schrumpfnieren	Bluthochdruck koronare Herzkrankheit Diabetes mellitus pAVK*
I	03.12.1936	184 cm	PES 190 DL Firma delrus (Triacetat)	Diabetische Nephropathie	Bluthochdruck koronare Herzkrankheit Diabetes mellitus pAVK*
J	04.12.1927	170 cm	Nipro 190 (Triacetat)	Glomerulonephritis	Bluthochdruck koronare Herzkrankheit
K	04.04.1927	165 cm	Fresenius Fx50 (Polysulfon)	Analgetische Nephropathie	Bluthochdruck
L	31.01.1929	178 cm	Gambro 140 H (Polyamid)	Schrumpfnieren	Bluthochdruck
N	01.03.1933	165 cm	Fresenius F8 HPS (Polysulfon)	Diabetische Nephropathie	Bluthochdruck koronare Herzkrankheit Diabetes mellitus

Anhang

Patient	Geburtsdatum	Körpergröße	Dialysemembran	Grunderkrankung	Begleiterkrankung(en)
P	19.06.1958	1,60 m	Asahi Kasei Medical Co. Ltd. AM-Bio650 (Polyethylenglycol)	Schrumpfnieren	Bluthochdruck
Q	12.11.1985	1,77 m	Gambro Polyflux 140H (Polyamid)	Beidseitige Nierenhypoplasie	Bluthochdruck
R	12.06.1944	1,83 m	Gambro Polyflux 140H (Polyamid)	Schrumpfnieren	Bluthochdruck koronare Herzkrankheit pAVK*
S	29.11.1960	1,85 m	Gambro Polyflux 140H (Polyamid)	Nephrosklerose	Bluthochdruck
T	25.12.1954	1,69 m	Fresenius F8 HPS (Polysulfon)	Wegener´sche Granulomatose	/
U	08.02.1959	1,65 m	Gambro Polyflux 140H (Polyamid)	Nephrektomie	/
X	25.12.1954	1,69 m	Gambro Polyflux 140H (Polyamid)	Glomerulonephritis	Bluthochdruck koronare Herzkrankheit
Y	07.06.1950	1,70 m	Gambro Polyflux 140H (Polyamid)	Zystennieren	/

* : Periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK)

Anhang

11.4.2. Klinische Monatswerte

(Auswahl anhand der Ausschlusskriterien)

Marker:	CRP [mg/l]	Kalium [mmol/l]	Hämoglobin [g/dl]	Ferritin [µg/dl]
Ausschlusskriterium:	>30 mg/l	> 6 mmol/l	< 10 und > 13 g/dl*	< 100 und > 800 µg/dl
Patient A (Westpfalzlinikum)				
18.01.2006	4,8	4	13,6	346
15.02.2006	2,3	3,9	14,1	271
15.03.2006	5,6	4,1	13,3	250
Patient B (Westpfalzlinikum)				
18.01.2006	8,5	4,7	13,2	430
15.02.2006	3,5	4,9	13,1	405
15.03.2006	2,3	4,6	13,3	385
Patient C (Westpfalzlinikum)				
18.01.2006	1,2	5,5	11,9	166
15.02.2006	1,4	5,6	11,6	164
15.03.2006	16,9	5,4	10,5	523
Patient D (Westpfalzlinikum)				
18.01.2006	8,7	3,6	12,3	191
16.02.2006	7,9	4,1	12,5	164
15.03.2006	36,5**	4	12,1	103
Patient E (Westpfalzlinikum)				
20.01.2006	1,8	3,8	11,6	132
20.02.2006	0,6	4,3	11	/ ***
20.03.2006	1,2	4,2	12,2	133

Anhang

Marker:	CRP [mg/l]	Kalium [mmol/l]	Hämoglobin [g/dl]	Ferritin [µg/dl]
Ausschlusskriterium:	>30 mg/l	> 6 mmol/l	< 10 und > 13 g/dl*	< 100 und > 800 µg/dl
Patient F (Westpfalzkrlinikum)				
19.01.2006	16,9	5	13,9	223
16.02.2006	19,2	5,3	/ ***	/ ***
16.03.2006	19,6	5,8	13,2	443
Patient G (Westpfalzkrlinikum)				
19.01.2006	28,1	5,5	10,5	495
16.02.2006	3,4	5,8	10,8	591
16.03.2006	5,3	4,3	10,5	469
Patient H (Westpfalzkrlinikum)				
19.01.2006	27,9	4,3	12,2	302
16.02.2006	8,7	5,2	12,3	272
16.03.2006	7	4,8	12,2	227
Patient I (Westpfalzkrlinikum)				
19.01.2006	8,2	4,7	10,5	204
16.02.2006	3,4	5	10,6	210
07.03.2006	/ ***	/ ***	10,9	/ ***
Patient J (Westpfalzkrlinikum)				
19.01.2006	0,9	4,3	13	201
16.02.2006	0,9	4,1	11,8	239
16.03.2006	1,4	4,3	11,8	241
Patient K (Westpfalzkrlinikum)				
18.05.2006	6,1	4,2	12,9	386
15.06.2006	6,1	4,1	12,3	465
13.07.2006	10	4,7	13,6	605

Anhang

Marker:	CRP [mg/l]	Kalium [mmol/l]	Hämoglobin [g/dl]	Ferritin [µg/dl]
Ausschusskriterium:	>30 mg/l	> 6 mmol/l	< 10 und > 13 g/dl*	< 100 und > 800 µg/dl
Patient L (Westpfalzkrlinikum / KfH; hat in Woche 7 gewechselt)				
18.05.2006	18,7	3,8	13,1	135
15.06.2006	2,2	4,1	13,1	156
13.07.2006	2,9	4,4	12,8	166
Patient N (Westpfalzkrlinikum)				
19.05.2006	5	4,9	12,6	262
14.06.2006	3,4	5,3	12,8	269
12.07.2006	3,4	5,2	12,6	279
Patient P (KfH)				
04.09.2006	X ****	5,1	10,6	455 (Wert von 07.2006)
09.10.2006	X ****	5,2	12,8	164
06.11.2006	X ****	4,8	13,9	X ****
Patient Q (KfH)				
04.09.2006	X ****	4,8	10,6	X ****
09.10.2006	X ****	4,9	12,4	X ****
06.11.2006	X ****	4,3	13,7	X ****
Patient R (KfH)				
04.09.2006	X ****	5,5	12,6	322 (Wert von 07.2006)
09.10.2006	X ****	5,9	13	273
06.11.2006	X ****	5,2	11,9	X ****
Patient S (KfH)				
05.09.2006	X ****	5,7	10,1	443 (Wert von 07.2006)
10.10.2006	X ****	5,3	11,5	576
07.11.2006	X ****	5,5	13,4	X ****

Anhang

Marker:	CRP [mg/l]	Kalium [mmol/l]	Hämoglobin [g/dl]	Ferritin [µg/dl]
Ausschlusskriterium:	>30 mg/l	> 6 mmol/l	< 10 und > 13 g/dl*	< 100 und > 800 µg/dl
Patient T (Westpfalzkrlinikum)				
19.10.2006	18,3	3,8	10,5	/ ***
15.11.2006	29,8	4,8	10,9	626
30.11.2006	18,6	3,9	11,1	/ ***
Patient U (KfH)				
04.09.2006	X ****	5,4	11,1	109 (Wert von 07.2006)
09.10.2006	X ****	5,4	11,3	199
06.11.2006	X ****	5,6	11,3	X ****
Patient X (KfH)				
13.11.2006	X ****	5,9	12,3	377 (Wert von 10.2006)
04.12.2006	X ****	5,3	11,4	X ****
28.11.2006	X ****	5,2	11,9	X ****
Patient Y (KfH)				
13.11.2006	X ****	5,1	12,4	160 (Wert von 10.2006)
04.12.2006	X ****	5,4	12,4	X ****
28.11.2006	X ****	5,3	12,2	X ****

*: Aufgrund der geringen Anzahl potentieller Studienteilnehmer wurden hier auch höhere Werte, die oberhalb der 13 g/dl lagen, akzeptiert

** : Wert war 2 Tage vor Ende der Studie erhöht; wegen der geringen Menge an Probanden wurde dieser Wert toleriert

***: Keine Bestimmung aufgrund von fehlendem Untersuchungsmaterial (zuwenig Blut entnommen)

****: Wurde nicht bestimmt

11.4.3. Medikation

Patient A:

Medikation	Dosis (mg)	Menge (morgens-mittags-abends)
Lasix	40	2-2-0
Aquaphor	20	1-1-0
Calci-Gry	1000	1-1-1
Nebilet	5	1-0-0
Adalat	20 ret.	1-0-0
Pantozol	40	1-0-0

Patient B:

Medikation	Dosis (mg)	Menge (morgens-mittags-abends)
Lasix	250	1/2-0-0
Renagel		3-3-3
Dilatrend	25	1-0-1
Bondiol 0,25 µg		1-0-0

Patient C:

Medikation	Dosis (mg)	Menge (morgens-mittags-abends)
ASS	100	0-1-0
Nebivolol	5	0-0-1/2 (an Dialysetagen)
Allopurinol	100	0-0-1
Sortis	10	0-0-1
Pantozol	40	0-0-1
Sevelamer	800	2-2-2

Patient D:

Medikation	Dosis (mg)	Menge (morgens-mittags-abends)
Nexium 20		0-0-1
Amiodaron 200		1-0-0
Concor 5		1/2-0-0
Enalapril 5		1-0-0
Remergil 15		0-0-1/2
Zocor 40		0-0-1
Unat 10		1-0-0
Calci-Gry	1000	1-0-0
Bondiol 0,25 µg		1-0-0
Alna 0,4		0-0-1

Patient E:

Medikation	Dosis (mg)	Menge (morgens-mittags-abends)
Prograf	1	1-0-1
Urbason	2	1-0-0
Dociton	10	1-0-1
Lasix	40	1-1-0

Anhang

Patient F:

Medikation	Dosis (mg)	Menge (morgens-mittags-abends)
Lasix 500		1/4-0-0
Calci-Gry	1000	1-0-0
Munobal	5	1-0-0
Cardular	4	0-0-1
Stilnox		bei Bedarf

Patient G:

Medikation	Dosis (mg)	Menge (morgens-mittags-abends)
Beloc zok		1-0-1
Delix 5		1-0-0
Norvasc 5		1-0-0
Bondiol 0,25 µg		1-0-0
Antiphosphat		0-1-0
Unat 200		1/4-0-0 (HD-freie Tage)
ASS	100	0-1-0

Patient H:

Medikation	Dosis (mg)	Menge (morgens-mittags-abends- nachts)
Lonolox 10		1-0-1
Delix 5		1-0-1
Amlodipin 10		2-0-0
Beloc zok		1-0-0-1
Iscover 75		1-0-0
Pantozol	20	1-0-0
Bondiol 0,25 µg		1-0-0
Torem 100		1-1-0
Alna 0,4		0-0-1

Patient I:

Medikation	Dosis (mg)	Menge (morgens-mittags-abends)
ASS	100	0-1-0
Pantozol	40	1-0-1
Calci-Gry	1000	1-1-1
Dociton 10		1-1-1
Zocor 20		0-0-1

Patient J:

Medikation	Dosis (mg)	Menge (morgens-mittags-abends)
Metoprolol	50	1-0-1
Ramipril	2,5	1-0-0
ASS	100	0-1-0
Allopurinol	100	1-0-0
Sortis	20	0-0-1
CalciGry	1000	2-2-2
Omnice		1-0-1
Bondiol 0,25 µg		1-0-0

Anhang

Patient K:

Medikation	Dosis (mg)	Menge (morgens-mittags-abends)
Bondiol 0,25		2-0-0
Beloc zok		1-0-0
Pantozol	40	0-0-1
Delix 2,5		1-0-0

Patient L:

Medikation	Dosis (mg)	Menge (morgens-mittags-abends)
L-Thyroxin 175		1-0-0
Stalero 100		1-1-1
Calci-Gry	1000	1-0-1
Delix 5		1-0-0
Harzol		1-1-1
Bondiol 0,25 µg		1-0-0
Tenormin		0-1-0
ASS	100	0-1-0

Patient N:

Medikation	Dosis (mg)	Menge (morgens-mittags-abends- nachts)
ASS	100	0-1-0
Locol 80		0-0-1
Pantozol	40	1-0-0
Delix 2,5		1/2-0-0
Bondiol 0,25		1-0-0
Beloc zok mite		1-0-1
Zoloft 50		1-0-0
Stilnox		0-0-0- 1/2
Insuman comb 50		38-0-34 IE sc

Patient P:

Medikation	Dosis (mg)	Menge (morgens-mittags-abends)
Antiphosphat		3-3-3
Calciumacetat		3-3-3
Beloc zok		1-0-1
Amlodipin 5		1-0-1
Bondiol 0,25		1-0-0
Pantozol	20	0-0-1
Unizink		1-0-0
Simvastatin 20		0-0-1
Novalgin		bei Bedarf

Anhang

Patient Q:

Medikation	Dosis (mg)	Menge (morgens-mittags-abends)
Antiphosphat		2-2-2
Phosphonorm		3-3-3
Calci-Magon		2-2-2
Beloc zok mite		1-0-1
Lasix		1-0-0
Norvasc		1-0-1
Captopril 25		1-0-0
Allopurinol 100		0-0-1
Recultrol 0,25/0,5		1-0-0
Ramipril 10		1/2-0-1/2
Pantozol	20	0-0-1
Lanolox 2,5		2,5-2,5-2,5

Patient R:

Medikation	Dosis (mg)	Menge (morgens-mittags-abends)
Antiphosphat		3-3-3
Calcimagon		2-2-2
Unat 200		1/4-0-0
Mevinacor 40		0-0-1
Beloc zok 95 mg		1-0-0
Catapresan		1/2-0-1/2
Bondioli 0,25 µg		1-0-0
Unizink 50		1-0-1
Folsan	5	1-0-0
Omeprazol 20		0-0-1
Isoket ret 60		1-0-0
Mosidomin 8		0-0-1
Norvasc		0-1-0
ASS	100	0-1-0
Plavix 75		1-0-0

Patient S:

Medikation	Dosis (mg)	Menge (morgens-mittags-abends-nachts)
Antiphosphat		3-3-3
Phosphonorm		3-3-3
Calci-Magon		5/d
Mimpara	30	0-0-1
Blopress 16		1-0-1
Beloc zok		0-0-1
Diblocin		1-0-1
Claudicat ret		1-0-1
Adolat ret		1-0-0-1
Lanolox 2,5		1/2-0-1/2
Bondioli 0,25 µg		1-0-0

Anhang

Patient T:

Medikation	Dosis (mg)	Menge (morgens-mittags-abends)
Jodid 200		1-0-0
Concor 5		1-0-0
Allopurinol 100		1-0-0
Pantozol	20	0-0-1
Bondiol 0,25 µg		1-0-0
Torem 10		1-1-0
Cardular 4 mg		1-0-1
Norvasc 5		1-0-1
Spiriva		1-0-0 (an HD-Tagen)
Berodual		bei Bedarf

Patient U:

Medikation	Dosis (mg)	Menge (morgens-mittags-abends)
Calcium renal		2-2-2
Bondiol 0,25 µg		1/d
Omeprazol 20		bei Bedarf
Diclophlogent	100 ret	0,5/d
Zinkorotal		1/d
Micadis 80		0-1/2-0

Patient X:

Medikation	Dosis (mg)	Menge (morgens-mittags-abends)
Antiphosphat		3-3-3
Calcium renal		2-2-2
Calci-Magon		2/d
Bayotensin		bei Bedarf
Beloc zok mite		1-0-1
Omeprazol 20		1/d
Sortis 10		0-0-1
ASS	100	0-0-1
Allopurinol 300		1/d
Ramipril 10		1/2-0-0

Patient Y:

Medikation	Dosis (mg)	Menge (morgens-mittags-abends)
Antophosphat		1-1-1
Calcium renal		1-1-1
Calci-Magon		1-1-1
Beloc zok mite		1-0-1
Bondiol 0,25 µg		1-0-0
Pantozol	40	1/d
Allopurinol 300		0-0-1
Dolomo		1-0-1
Unizink		1/d

Anhang

11.4.4. Ernährungsprotokolle (vom Tag vor der Blutentnahme)

Patient A:

Studienwoche	Gesundheitszustand	Ernährung	Endgewicht [kg]	Ultrafiltration [L]
1	ok	Morgens: Brötchen, Marmelade, Kaffee Mittags: Bratwurst, Kartoffeln, Spinat Abends: Brot, Käse Zwischendurch: /	71	1
2	ok	Morgens: Brötchen, Marmelade, Kaffee Mittags: Cordon Bleu, Kroketten, Gemüse Abends: Brot, 2 Rindswürste Zwischendurch: 1 Stück Kuchen	71	1
3	ok	Morgens: Brötchen, Marmelade, Kaffee Mittags: Hühnersuppe Abends: Brot, Wurst, Käse Zwischendurch:	71	0
4	ok	Morgens: Brötchen, Marmelade, Kaffee Mittags: Putenfleisch, Nudeln Abends: Brot, Schinken Zwischendurch:	71	0
5	ok	Morgens: Brötchen, Marmelade, Kaffee Mittags: Rouladen, Kartoffeln, Soße Abends: Brot, Schinken Zwischendurch:	71	0
6	ok	Morgens: Brötchen, Marmelade, Kaffee Mittags: Linsensuppe, Wurst, Brot Abends: Fleischkäse, Brot Zwischendurch:	71	0,7
7	ok	Morgens: Brötchen, Marmelade, Kaffee Mittags: Gemüseintopf, Fleischeinlage Abends: Brot, Wurst, Käse Zwischendurch:	71	0
8	Blutdruck↑,	Morgens: Brötchen, Marmelade, Kaffee Mittags: Spaghetti, Tomatensoße Abends: Brot, Wurst, Käse Zwischendurch:	70,5	0
9	ok	Morgens: Brötchen, Marmelade, Kaffee Mittags: Schnitzel, Pommes Frites, Salat Abends: Wurstsalat, Brot Zwischendurch:	71	0
10	ok	Morgens: Brötchen, Marmelade, Kaffee Mittags: Rinderbraten mit Nudeln Abends: Brot, Wurst, Käse Zwischendurch:	71	0

Anhang

Patient B:

Studienwoche	Gesundheitszustand	Ernährung	Endgewicht [kg]	Ultrafiltration [L]
1	ok	Morgens: Brötchen, Marmelade, Kaffee Mittags: Spaghetti, Tomatensoße Abends: / Zwischendurch: 1 Apfel, 1 Orange	89,5	5
2	ok	Morgens: Brötchen, Marmelade, Kaffee Mittags: Rindswurst, Brötchen Abends: Brot, Käse Zwischendurch: 1 Apfel	89,5	5
3	ok	Morgens: Brötchen, Butter, Kaffee Mittags: Frikadellen, Kartoffeln Abends: / Zwischendurch: 1 Stück Kuchen, 1 Apfel	89,5	4,6
4	Krämpfe in der Hand, → NaCl 10% i.v.	Morgens: Brötchen, Butter, Kaffee Mittags: Hähnchen, Pommes Frites Abends: Brot, Butter, Wurst Zwischendurch: 2 Orangen	90,5	4,2
5	ok	Morgens: Brötchen, Marmelade, Kaffee Mittags: Fleischkäse, Ei, Brot Abends: Fisch, Butter, Brot Zwischendurch: 2 Orangen	90,5	5
6	Halsschmerzen	Morgens: Brötchen, Marmelade, Kaffee Mittags: / Abends: Maccaroniauflauf Zwischendurch: 1 Apfel, 1 Orange	90,5	4,4
7	ok	Morgens: Brötchen, Marmelade, Kaffee Mittags: Linsensuppe, Wurst, Brot Abends: Brot, Butter, Wurst Zwischendurch: 2 Orangen	90,5	4,6
8	ok	Morgens: Brötchen, Marmelade, Kaffee Mittags: Bratwurst, Kartoffeln, Gemüse Abends: / Zwischendurch: 1 Apfel, 1 Orange	90,5	4,7
9	ok	Morgens: Brötchen, Wurst, Kaffee Mittags: Rindfleisch, Nudeln Abends: Brot, Butter, Wurst Zwischendurch: 1 Apfel, 1 Orange	90,5	4,7
10	ok	Morgens: Brötchen, Marmelade, Kaffee Mittags: Schnitzel, Kartoffeln, Salat Abends: Brot, Butter, Wurst Zwischendurch: 1 Apfel, 1 Orange	90,5	4,3

Anhang

Patient C:

Studienwoche	Gesundheitszustand	Ernährung	Endgewicht [kg]	Ultrafiltration [L]
1	ok	Morgens: Brot, Butter, Kaffee Mittags: Nudeln, Soße Abends: Brot, Wurst, Käse Zwischendurch: 1 Kaffestückchen	63,5	2,5
2	ok	Morgens: Brot, Käse, Kaffee Mittags: Spinat, Ei, Brot Abends: Brot, Wurst, Käse Zwischendurch: /	63,5	2
3	Juckreiz im Arm	Morgens: Brot, Käse, Kaffee Mittags: Tortellini, Soße Abends: Brot, Wurst, 1 Tomate Zwischendurch: /	63,5	2,3
4	ok	Morgens: Brot, Käse, Kaffee Mittags: Putenschnitzel, Reis Abends: Reissalat, Brot, Wurst Zwischendurch: Pfirsichkompott*	63,5	2,9
5	Kalium erhöht (5,9)	Morgens: Brot, Butter, Kaffee Mittags: Gemüsepfanne Abends: Brot, Schinken Zwischendurch: Pfirsichkompott*	63,5	2,4
6	ok	Morgens: Brot, Käse, Kaffee Mittags: Kotelett, Kartoffeln, Schwarzwurzeln Abends: Brot, Wurst, Käse Zwischendurch: 1 Stück Kuchen	63,5	2,6
7	ok	Morgens: Brot, Butter, Kaffee Mittags: Schweinegeschnetzeltes, Reis Abends: Brot, Käse Zwischendurch: 1 Stück Kuchen	63,5	2,6
8	ok	Morgens: Brot, Käse, Kaffee Mittags: Hackfleischpfanne, Zucchini Abends: Brot, Wurst, Käse Zwischendurch: /	63,5	2,9
9	ok	Morgens: Brot, Quark, Kaffee Mittags: Rindfleisch, Kartoffeln, Rosenkohl Abends: Brot, Wurst, Käse Zwischendurch: /	63,5	2,5
10	ok	Morgens: Brot, Käse, Kaffee Mittags: Bratwurst, Kartoffeln, Gemüse Abends: Brot, Wurst, Käse Zwischendurch: /	63,5	2,8

*: hoher Kaliumgehalt der Pfirsiche führte vorübergehend zu einer Erhöhung des Kaliumgehaltes auf 5,9 mg/dl

Anhang

Patient D:

Studienwoche	Gesundheitszustand	Ernährung	Endgewicht [kg]	Ultrafiltration [L]
1	ok	Morgens: Brot, Marmelade, Kaffee Mittags: Wellfleisch, Sauerkraut, Pürree Abends: Brot, Wurst, Käse Zwischendurch: /	85	1,2
2	ok	Morgens: Brot, Butter, Kaffee Mittags: Schweinebraten, Knödel Abends: Brot, Wurst, Käse Zwischendurch: /	85	0
3	ok	Morgens: Brot, Marmelade, Kaffee Mittags: Erbsensuppe Abends: Brot, Wurst, Käse Zwischendurch: /	85	0,8
4	ok	Morgens: Brot, Marmelade, Kaffee Mittags: Tagliatelle Abends: Brot, Wurst, Käse Zwischendurch: /	84	0
5	ok	Morgens: Brot, Marmelade, Kaffee Mittags: Frikadellen, Kartoffeln Abends: Brot, Wurst, Käse Zwischendurch: /	84	1,4
6	Erkältung	Morgens: Brot, Marmelade, Kaffee Mittags: / Abends: Brot, Wurst Zwischendurch: /	84	0
7	ok	Morgens: Brot, Marmelade, Kaffee Mittags: Rindfleisch, Nudeln Abends: Brot, Wurst, Käse Zwischendurch: /	84	0
8	ok	Morgens: Brot, Marmelade, Kaffee Mittags: Kartoffel-Bohnen-Eintopf Abends: Brot, Wurst, Käse Zwischendurch: /	84	0
9	ok	Morgens: Brot, Butter, Kaffee Mittags: Linsensuppe, Brot Abends: Brot, Wurst, Käse Zwischendurch: /	80,5	2,2
10	ok	Morgens: Brot, Marmelade, Kaffee Mittags: Rouladen, Kartoffeln, Gemüse Abends: Brot, Käse Zwischendurch: /	80,5	1

Anhang

Patient E:

Studienwoche	Gesundheitszustand	Ernährung	Endgewicht [kg]	Ultrafiltration [L]
1	ok	Morgens: Brot, Marmelade, Kaffee Mittags: Schweinemedallions, Kroketten, Gemüse Abends: Brot, Wurst, Käse Zwischendurch: /	78	0
2	ok	Morgens: Brot, Marmelade, Kaffee Mittags: Gulasch, Reis Abends: Brot, Wurst, Käse Zwischendurch: /	78	0
3	ok	Morgens: Brot, Marmelade, Kaffee Mittags: Geschnetzeltes, Nudeln, Salat Abends: Brot, Käse Zwischendurch: /	78	0
4	ok	Morgens: Brot, Marmelade, Kaffee Mittags: Linsensuppe, Pfannkuchen Abends: Brot, Wurst, Käse Zwischendurch: /	78	0
5	ok	Morgens: Brot, Marmelade, Kaffee Mittags: Bratwurst, Kartoffeln, Kohlrabi Abends: Brot, Wurst, Käse Zwischendurch: /	78	0
6	ok	Morgens: Brot, Marmelade, Kaffee Mittags: Spaghetti, Tomatensoße Abends: Brot, Wurst, Käse Zwischendurch: /	78	0
7	ok	Morgens: Brot, Marmelade, Kaffee Mittags: Fisch, Nudeln, Gemüse Abends: Brot, Wurst, Käse Zwischendurch: /	78	0
8	ok	Morgens: Brot, Quark, Kaffee Mittags: Fleischspieß, Pommes Frites Abends: Brot, Wurst, Käse Zwischendurch: /	78	0
9	ok	Morgens: Brot, Marmelade, Kaffee Mittags: Putengeschnetzeltes, Reis Abends: Brot, Wurst, Käse Zwischendurch: /	78	0
10	ok	Morgens: Brot, Marmelade, Kaffee Mittags: Nudelsuppe Abends: Brot, Wurst Zwischendurch: /	78	0

Anhang

Patient F:

Studienwoche	Gesundheitszustand	Ernährung	Endgewicht [kg]	Ultrafiltration [L]
1	ok	Morgens: Müsli, Kaffee Mittags: Pizza mit Shrimps Abends: Cheeseburger Zwischendurch: /	101,5	4,1
2	ok	Morgens: Speck, Ei, Brot Mittags: Steak, Salat Abends: Shrimp Cocktail, Brot Zwischendurch: /	101,5	1,4
3	ok	Morgens: Müsli, Kaffee Mittags: Spare ribs, Kartoffeln Abends: Brot, Schinken Zwischendurch: /	101,5	2,5
4	Krämpfe im Rücken	Morgens: Müsli, Kaffee Mittags: Fisch, Kartoffeln, Gemüse Abends: Brot, Putenwurst Zwischendurch: /	101,5	2,1
5	ok	Morgens: Muffins, Kaffee Mittags: Pizza Abends: Steak, Salat Zwischendurch: /	101,5	2,8
6	ok	Morgens: Müsli, Kaffee Mittags: Lasagne Abends: Brot, Schinken Zwischendurch: /	99,5	4,5
7	ok	Morgens: Müsli, Kaffee Mittags: Cheeseburger, Pommes Frites Abends: Shrimp Cocktail, Brot Zwischendurch: /	99,5	4
8	ok	Morgens: Würstchen, Ei, Brot Mittags: Spaghetti, Tomatensoße Abends: Brot, Schinken Zwischendurch: /	99,5	3,3
9	ok	Morgens: Muffins, Kaffee Mittags: Schnitzel, Pommes Frites Abends: Salat mit Käse und Schinken Zwischendurch: /	99,5	3,5
10	ok	Morgens: Brot, Speck, Ei, Kaffee Mittags: Fischstäbchen, Kartoffeln Abends: Brot, Schinken Zwischendurch: /	99,5	3,5

Anhang

Patient G:

Studienwoche	Gesundheitszustand	Ernährung	Endgewicht [kg]	Ultrafiltration [L]
1	ok	Morgens: Brötchen, Marmelade, Kaffee Mittags: Bratwurst, Kartoffeln, Blumenkohl Abends: Brötchen, Käse Zwischendurch: /	66	1,8
2	ok	Morgens: Brötchen, Käse, Kaffee Mittags: Lasagne Abends: Brötchen, Schinken Zwischendurch: 1 Apfel	64,5	1
3	ok	Morgens: Brötchen, Marmelade, Kaffee Mittags: Bohneneintopf, Kartoffeln Abends: Brötchen, Wurst Zwischendurch: /	64	1,6
4	Blutdruck ↑	Morgens: Brötchen, Marmelade, Kaffee Mittags: Gulasch, Knödel Abends: Brotchen, Käse, Wurst Zwischendurch: /	64	2
5	ok	Morgens: Brötchen, Marmelade, Kaffee Mittags: Schnitzel, Kartoffeln, Gemüse Abends: Brötchen, Wurst Zwischendurch: /	63,5	1,6
6	ok	Morgens: Brötchen, Marmelade, Kaffee Mittags: Linsensuppe, Wurst, Brötchen Abends: Brötchen, Schinken Zwischendurch: /	63,5	1,8
7	Kalium erhöht (5,7)	Morgens: Brötchen, Marmelade, Kaffee Mittags: Ente chinesisch Abends: Brötchen, Käse, Wurst Zwischendurch: /	63,5	1,5
8	ok	Morgens: Brötchen, Marmelade, Kaffee Mittags: Kotelett, Kartoffeln, Broccoli Abends: Brötchen, Käse, Wurst Zwischendurch: /	63,5	1,7
9	ok	Morgens: Brötchen, Marmelade, Kaffee Mittags: Nudelauflauf Abends: Brötchen, Schinken Zwischendurch: /	63	1,6
10	ok	Morgens: Brötchen, Käse, Kaffee Mittags: Hähnchen, Pommes Frites Abends: Brötchen, Schinken Zwischendurch: /	63	2,3

Anhang

Patient H:

Studienwoche	Gesundheitszustand	Ernährung	Endgewicht [kg]	Ultrafiltration [L]
1	ok	Morgens: Brot, Marmelade, Kaffee Mittags: Gulasch, Reis Abends: Brot, Käse Zwischendurch: /	76	1
2	ok	Morgens: Brot, Marmelade, Kaffee Mittags: Frikadellen, Kartoffeln, Gemüse Abends: Brot, Wurst, Käse Zwischendurch: /	76	1
3	ok	Morgens: Brot, Marmelade, Kaffee Mittags: Nudeln, Rindfleisch Abends: Brot, Wurst, Käse Zwischendurch: /	76	0
4	ok	Morgens: Brot, Marmelade, Kaffee Mittags: Fleischkäse, Ei, Brot Abends: Brot, Putenurst, Käse Zwischendurch: /	76	1,7
5	ok	Morgens: Brot, Marmelade, Kaffee Mittags: Hühnerfrikassee, Nudeln Abends: Brot, Käse Zwischendurch: /	76	2,8
6	ok	Morgens: Brot, Quark, Kaffee Mittags: Bratwurst, Kartoffeln, Spargel Abends: Brot, Wurst, Käse Zwischendurch: /	76,5	1,2
7	ok	Morgens: Brot, Marmelade, Kaffee Mittags: Nudeln, Schinken, Ei Abends: Brot, Wurst, Käse Zwischendurch: /	76,5	2,5
8	ok	Morgens: Brot, Quark, Kaffee Mittags: Schweinebraten, Knödel, Sauerkraut Abends: Brot, Wurst, Käse Zwischendurch: /	76,5	1,6
9	ok	Morgens: Brot, Marmelade, Kaffee Mittags: Spaghetti, Fleischsoße Abends: Brot, Wurst, Käse Zwischendurch: /	77,5	1
10	Brachykardie (f = 52)	Morgens: Brot, Marmelade, Kaffee Mittags: Omelett, Pfifferlinge Abends: Brot, Wurst, Käse Zwischendurch: /	77,5	1,1

Anhang

Patient I:

Studienwoche	Gesundheitszustand	Ernährung	Endgewicht [kg]	Ultrafiltration [L]
1	ok	Morgens: Brötchen, Marmelade, Kaffee Mittags: Wellfleisch, Sauerkraut, Püree Abends: Brot, Butter, Käse Zwischendurch: /	92	2,5
2	ok	Morgens: Brötchen, Marmelade, Kaffee Mittags: Gulasch, Nudeln Abends: Brot, Butter, Wurst Zwischendurch: /	92	2,8
3	ok	Morgens: Brötchen, Käse, Kaffee Mittags: Frikadellen, Kartoffeln, Karotten Abends: Brot, Butter, Wurst Zwischendurch: /	92	3
4	ok	Morgens: Brötchen, Marmelade, Kaffee Mittags: Linsensuppe, Brot Abends: Brot, Butter, Käse Zwischendurch: /	92	3,2
5	Erkältung	Morgens: Brötchen, Marmelade, Kaffee Mittags: abgeschmelztes Püree Abends: Brot, Butter, Wurst, Käse Zwischendurch: /	92	3
6	ok	Morgens: Brötchen, Marmelade, Kaffee Mittags: Spaghetti, Fleischsoße Abends: Brötchen, Leberwurst Zwischendurch: /	92	3
7	Krämpfe	Morgens: Brötchen, Marmelade, Kaffee Mittags: Bratwurst, Kartoffeln, Blumenkohl Abends: Brot, Wurst Zwischendurch: /	92	2,9
8	Anämie (Hb = 5,6 g/dl)	Morgens: Brötchen, Marmelade, Kaffee Mittags: Pfannkuchen, Spinat Abends: Brot, Butter, Käse Zwischendurch: /	92	3,5
9	ok	Morgens: Brötchen, Käse, Kaffee Mittags: Erbsensuppe, Wurst Abends: Brot, Butter, Käse Zwischendurch: /	92	3,5
10	stat. Aufnahme, Anämie- Abklärung, Blutdruck ↓	Morgens: Brötchen, Marmelade, Kaffee Mittags: Spiegeleier, Kartoffeln Abends: Brot, Butter, Wurst Zwischendurch: /	92	1,7

Anhang

Patient J:

Studienwoche	Gesundheitszustand	Ernährung	Endgewicht [kg]	Ultrafiltration [L]
1	ok	Morgens: Brötchen, Marmelade, Kaffee Mittags: Spiegeleier, Spinat Abends: Brot, Butter, Wurst Zwischendurch: /	73	2,2
2	ok	Morgens: Brötchen, Käse, Kaffee Mittags: Fischsalat, Kartoffeln Abends: Brot, Butter Zwischendurch: /	73	2,2
3	ok	Morgens: Brötchen, Marmelade, Kaffee Mittags: Schinkennudeln Abends: Brot, Butter, Käse Zwischendurch: /	73	1,6
4	Bronchitis	Morgens: Brötchen, Honig Mittags: Kotelett, Kartoffeln, Spinat Abends: Brot, Butter, Wurst, Käse Zwischendurch: /	73	1,6
5	ok	Morgens: Brötchen, Marmelade, Kaffee Mittags: Bratwurst, Kartoffeln, Schwarzwurzeln Abends: Brot, Käse Zwischendurch: /	73	1,1
6	ok	Morgens: Brötchen, Marmelade, Kaffee Mittags: Nudeln, Tomatensoße Abends: Nudeln, Ei, Brot Zwischendurch: 1 Stück Kuchen	73	1,6
7	ok	Morgens: Brötchen, Marmelade, Kaffee Mittags: Kassler, Sauerkraut, Pürree Abends: Brot, Butter, Käse Zwischendurch: /	73	2,1
8	ok	Morgens: Brötchen, Marmelade, Kaffee Mittags: Bohneneintopf, Fleisch Abends: Brot, Butter, Wurst Zwischendurch: /	73	2
9	ok	Morgens: Brötchen, Marmelade, Kaffee Mittags: Nudelsuppe Abends: Brot, Butter, Wurst, Käse Zwischendurch: /	73	1,5
10	ok	Morgens: Brötchen, Marmelade, Kaffee Mittags: Rinderbraten, Knödel, Salat Abends: Brot, Butter, Käse Zwischendurch: /	73	2,1

Anhang

Patient K:

Studienwoche	Gesundheitszustand	Ernährung	Endgewicht [kg]	Ultrafiltration [L]
1	ok	Morgens: Brötchen, Marmelade, Kaffee Mittags: Kartoffeln, Senfsoße, Pudding Abends: Brot, Butter, Marmelade Zwischendurch: /	82	1
2	ok	Morgens: Brötchen, Käse, Kaffee Mittags: Wellfleisch, Bohnen, Pürree Abends: Brot, Käse Zwischendurch: /	82	1,1
3	ok	Morgens: Brötchen, Marmelade, Kaffee Mittags: Fleisch, Sauerkraut, Pürree Abends: Brot, Wurst Zwischendurch: /	82	1
4	ok	Morgens: Brötchen, Marmelade, Kaffee Mittags: Linsensuppe, Wurst Abends: Brot, Wurst Zwischendurch: /	82	1
5	ok	Morgens: Brötchen, Marmelade, Kaffee Mittags: Spinat, Kartoffeln, Ei Abends: Brot, Wurst Zwischendurch: /	82	1
6	ok	Morgens: Brötchen, Marmelade, Kaffee Mittags: Nudeln, Tomatensoße Abends: Brötchen, Käse Zwischendurch: /	82	1,8
7	ok	Morgens: Brötchen, Marmelade, Kaffee Mittags: Erbsensuppe Abends: Brot, Butter, Käse Zwischendurch: /	82	1
8	ok	Morgens: Brötchen, Marmelade, Kaffee Mittags: Pfannkuchen Abends: Brot, Wurst, Käse Zwischendurch: /	82	1,3
9	ok	Morgens: Brötchen, Marmelade, Kaffee Mittags: Wellfleisch, Sauerkraut, Pürree Abends: Brötchen, Käse Zwischendurch: /	82	0,7
10	ok	Morgens: Brötchen, Marmelade, Kaffee Mittags: Nudeln, Tomatensoße Abends: Brot, Wurst, Käse Zwischendurch: /	82	0,5

Anhang

Patient L:

Studienwoche	Gesundheitszustand	Ernährung	Endgewicht [kg]	Ultrafiltration [L]
1	ok	Morgens: Brot, Butter, Marmelade, Kaffee Mittags: Frikadellen, Kartoffeln, Karotten Abends: Brot, Butter, Käse Zwischendurch: /	90	0
2	ok	Morgens: Brot, Butter, Marmelade, Kaffee Mittags: Frikadellen, Kartoffeln, Karotten Abends: Brot, Butter, Wurst Zwischendurch: /	90	0
3	ok	Morgens: Brot, Butter, Marmelade, Kaffee Mittags: Weckknödel, Ei, Salat Abends: Brot, Butter, Käse Zwischendurch: /	90	0
4	ok	Morgens: Brot, Butter, Marmelade, Kaffee Mittags: Bratwurst, Nudeln, Zucchini Abends: Brot, Butter, Käse, Wurst Zwischendurch: /	90	1,2
5	ok	Morgens: Brot, Butter, Marmelade, Kaffee Mittags: Frikadellen, Kartoffeln, Karotten Abends: Brot, Butter, Käse, Wurst Zwischendurch: /	90	0,5
6	ok	Morgens: Brot, Butter, Marmelade, Kaffee Mittags: Bratwurst, Kartoffeln, Wirsing Abends: Brot, Käse Zwischendurch: /	90	0
7	ok	Morgens: Brot, Butter, Marmelade, Kaffee Mittags: Gulasch, Kartoffeln, Karotten Abends: Brot, Käse Zwischendurch: /	90	0
8	ok	Morgens: Brot, Butter, Marmelade, Kaffee Mittags: Bratwurst, Kartoffeln, Blumenkohl Abends: Brot, Käse Zwischendurch: /	90	0
9	ok	Morgens: Brot, Butter, Marmelade, Kaffee Mittags: Kartoffelbrei Abends: Zwieback, Tee Zwischendurch: /	89	0
10	ok	Morgens: Brot, Butter, Marmelade, Kaffee Mittags: Pfannkuchen, Pfifferlinge Abends: Brot, Butter, Käse Zwischendurch: /	90	0,6

Anhang

Patient N:

Studienwoche	Gesundheitszustand	Ernährung	Endgewicht [kg]	Ultrafiltration [L]
1	ok	Morgens: Brötchen, Quark, Kaffee Mittags: Cordon Bleu, Kroketten, Feldsalat Abends: / Zwischendurch: /	99	2,1
2	ok	Morgens: Brötchen, Quark, Kaffee Mittags: Kartoffeln, Ei, Salat Abends: Brötchen, Butter Zwischendurch: /	99	1,8
3	ok	Morgens: Brötchen, Marmelade, Kaffee Mittags: Käsespätzle, Salat Abends: / Zwischendurch: 1 Stück Rhabarberkuchen	99	2,2
4	ok	Morgens: Brötchen, Marmelade, Kaffee Mittags: Spinat, Kartoffeln, Ei Abends: Brot, Wurst, Käse Zwischendurch: /	99	1,5
5	ok	Morgens: Brötchen, Marmelade, Kaffee Mittags: Bratwurst, Kartoffeln, Kohlrabi Abends: Brot, Butter, Käse Zwischendurch: /	99,5	1,5
6	Kalium 5,3	Morgens: Brötchen, Marmelade, Kaffee Mittags: Schinken, Kartoffeln, Spargel Abends: Brot, Wurst, Käse Zwischendurch: /	99,5	0
7	Kalium 5,3	Morgens: Brötchen, Marmelade, Kaffee Mittags: Brot, Butter Abends: Brot, Wurst Zwischendurch: /	99,5	1,7
8	Kalium 5,6	Morgens: Brötchen, Marmelade, Kaffee Mittags: Heringsalat, Kartoffeln Abends: Brot, Käse Zwischendurch: /	99,5	2,7
9	Kalium 5,1	Morgens: Brötchen, Marmelade, Kaffee Mittags: Brötchen, Marmelade Abends: Brot, Käse Zwischendurch: /	99,5	1,6
10	Kalium 5,6	Morgens: Brot, Marmelade, Kaffee Mittags: 1 Apfel, 1 Birne Abends: Brot, Käse Zwischendurch: /	99,5	1,5

Anhang

Patient P:

Studienwoche	Gesundheitszustand	Ernährung	Endgewicht [kg]	Ultrafiltration [L]
1	ok	Morgens: Brot, Marmelade, Kaffee Mittags: Reissuppe, Rindfleisch Abends: Brot, Käse Zwischendurch: /	59,5	0,4
2	ok	Morgens: Brot, Käse, Kaffee Mittags: Rindergulasch, Nudeln Abends: Brot, Honig Zwischendurch: 1 Apfel, 1 Pfirsich	59,5	1
3	ok	Morgens: Brot, Honig, Kaffee Mittags: Suppe, Sauerampfer Abends: Brot, Marmelade Zwischendurch: /	58,5	1,9
4	ok	Morgens: Brötchen, Honig, Kaffee Mittags: Braten, Kartoffeln Abends: Hirsesuppe Zwischendurch: /	58,5	1,7
5	ok	Morgens: Brot, Marmelade, Kaffee Mittags: Rindfleisch, Reis Abends: Eier, Brot Zwischendurch: /	58,5	1,8
6	ok	Morgens: Brot, Schinken, Kaffee Mittags: Erbsensuppe Abends: Kartoffelpuffer Zwischendurch: Brot, Marmelade	58,5	2,4
7	ok	Morgens: Brot, Marmelade, Kaffee Mittags: Rindfleisch, Kartoffeln Abends: Brot, Honig Zwischendurch: /	58,5	2,2
8	ok	Morgens: Brot, Honig, Kaffee Mittags: Spaghetti, Tomatensoße Abends: Maccaronisuppe Zwischendurch: /	58,5	2
9	ok	Morgens: Brot, Honig, Kaffee Mittags: Gemüsesuppe Abends: Brot, Butter, Wurst, 1 Tomate Zwischendurch: /	58,5	2,3
10	ok	Morgens: Brot, Butter Mittags: Rindfleisch, Reis, Gemüse Abends: Brot, Honig Zwischendurch: /	58,5	2

Anhang

Patient Q:

Studienwoche	Gesundheitszustand	Ernährung	Endgewicht [kg]	Ultrafiltration [L]
1	ok	Morgens: Brötchen (pur), schwarzer Tee Mittags: Putenfleisch, Nudeln Abends: Brötchen (pur) Zwischendurch: /	65,5	1,7
2	ok	Morgens: Brötchen (pur), schwarzer Tee Mittags: / Abends: Schinken, Nudeln, Ei Zwischendurch: /	65,5	4,5
3	ok	Morgens: Brötchen, Käse, schwarzer Tee Mittags: Brot, Wurst Abends: 2 Stück Hefekranz Zwischendurch: /	65,5	4,1
4	ok	Morgens: Brötchen, Käse, schwarzer Tee Mittags: / Abends: Wurstsalat (phosphatfrei), Bratkartoffeln Zwischendurch: /	65,5	5
5	ok	Morgens: Brötchen (pur), schwarzer Tee Mittags: Geschnetztes, Reis Abends: Brötchen, Wurst Zwischendurch: /	65,5	5
6	ok	Morgens: Schwarzer Tee Mittags: Fisch, Reis, Sahnesoße Abends: Brot, Wurst, Käse Zwischendurch: /	65,5	3
7	ok	Morgens: Schwarzer Tee Mittags: Bratwurst, Kartoffeln Abends: Brot, Wurst, Käse Zwischendurch: /	65,5	4,8
8	ok	Morgens: Schwarzer Tee Mittags: Nudelaufwurf Abends: Brot, Wurst Zwischendurch: /	65,5	3,5
9	ok	Morgens: Brötchen, Marmelade, schwarzer Tee Mittags: Schinken, Nudeln Abends: Brot, Quark Zwischendurch: /	65,5	4,5
10	ok	Morgens: Brot, Wurst, schwarzer Tee Mittags: / Abends: Parmesanschnitzel, Kroketten Zwischendurch: /	65,5	2,5

Anhang

Patient R:

Studienwoche	Gesundheitszustand	Ernährung	Endgewicht [kg]	Ultrafiltration [L]
1	ok	Morgens: Kaffee Mittags: Brot, Marmelade Abends: Brot, Wurst Zwischendurch: /	81,5	2
2	ok	Morgens: Kaffee Mittags: Brot, Marmelade Abends: Rippchen, Sauerkraut, Püree Zwischendurch: /	81,5	2
3	ok	Morgens: Kaffee Mittags: Brot, Marmelade Abends: Chinesische Nudeln süß/sauer Zwischendurch: /	81,5	2,3
4	ok	Morgens: 2 Stück Hefekranz, Kaffee Mittags: Braten, Nudeln Abends: Frikadellen, Püree, Salat Zwischendurch: /	81,5	2
5	ok	Morgens: Brot, Marmelade, Kaffee Mittags: / Abends: Hühnersuppe Zwischendurch: /	81,5	2,8
6	ok	Morgens: Kaffee Mittags: Brot, Marmelade Abends: Bratwurst, Püree, Blumenkohl Zwischendurch: /	81,5	2
7	ok	Morgens: Brötchen, Käse, Kaffee Mittags: Kassler, Sauerkraut, Brot Abends: Brötchen, Wurst Zwischendurch: /	81,5	1,8
8	ok	Morgens: Brot, Marmelade, Kaffee Mittags: / Abends: Chinesische Nudeln süß/sauer Zwischendurch: /	81,5	3,4
9	ok	Morgens: Kaffee Mittags: Brot, Wurst Abends: 2 Rindswürste, Brötchen Zwischendurch: /	81,5	1,8
10	ok	Morgens: Brot, Marmelade, Kaffee Mittags: / Abends: Tortellini Zwischendurch: /	81,5	1,9

Anhang

Patient S:

Studienwoche	Gesundheitszustand	Ernährung	Endgewicht [kg]	Ultrafiltration [L]
1	ok	Morgens: Brötchen, Marmelade, Kaffee Mittags: Nudeln (pur, mit etwas Butter) Abends: Brötchen, Wurst Zwischendurch: /	78	3,4
2	ok	Morgens: Brötchen, Marmelade, Kaffee Mittags: Frikadellen, Kartoffeln, Zucchini Abends: Brötchen, Wurst Zwischendurch: /	78	3,8
3	ok	Morgens: Brötchen, Käse, Kaffee Mittags: Bratwurst, Kartoffeln, Zuchinisalat Abends: Brötchen, Wurst Zwischendurch: /	78	3
4	ok	Morgens: 1 Kaffestückchen, Kaffee Mittags: Reis, Chili Abends: Brötchen, Wurst Zwischendurch: 150 g Ananas	78	3,4
5	ok	Morgens: Brötchen, Käse, Kaffee Mittags: Knödel, Soße, Salat Abends: Brötchen, Wurst Zwischendurch: 1 Kaffeestückchen	78	3,2
6	ok	Morgens: Brötchen, Käse, Kaffee Mittags: Rouladen, Nudeln, Soße Abends: Brötchen, Wurst Zwischendurch: /	78	2,8
7	ok	Morgens: Brötchen, Käse, Kaffee Mittags: Nudeln, Fleischsoße Abends: Brötchen, Wurst Zwischendurch: /	77,5	3
8	ok	Morgens: / Nulldiät, da hohes Phosphat: Mittags: / Kommts aus der Nahrung oder Abends: / den Knochen ? Zwischendurch: /	77,5	1
9	ok	Morgens: Brötchen, Marmelade, Kaffee Mittags: 2 Stück Kuchen Abends: Gyros, Tsatsiki, Brot Zwischendurch: /	77,5	4,1
10	ok	Morgens: 1 Stück Kuchen, Kaffee Mittags: Rouladen, Kroketten, Salat Abends: Brötchen, Wurst Zwischendurch: /	77,5	4,7

Anhang

Patient T:

Studienwoche	Gesundheitszustand	Ernährung	Endgewicht [kg]	Ultrafiltration [L]
1	ok	Morgens: Brot, Marmelade, Kaffee Mittags: Gulasch, Reis Abends: Brot, Käse Zwischendurch: /	77	1,1
2	ok	Morgens: Brot, Käse, Kaffee Mittags: Kotelett, Erbsen, Kartoffeln Abends: Brot, Wurst, Käse Zwischendurch: /	77	0,4
3	ok	Morgens: Brot, Marmelade, Kaffee Mittags: Rindfleisch, Nudeln Abends: Brot, Wurst, Käse Zwischendurch: /	77	1,5
4	ok	Morgens: Brot, Marmelade, 1 Ei, Kaffee Mittags: Bratwurst, Spargel, Kartoffeln Abends: Brot, Wurst Zwischendurch: /	77	1
5	ok	Morgens: Brot, Marmelade, 1 Ei, Kaffee Mittags: Hühnerfrikassee, Nudeln Abends: Brot, Schinken, Käse Zwischendurch: /	77	0
6	ok	Morgens: Brot, Käse, Kaffee Mittags: Fleischkäse, Bratkartoffeln Abends: Brot, Wurst, Käse, 1 Ei Zwischendurch: /	77	3,8
7	ok	Morgens: Brot, Marmelade, Käse, Kaffee Mittags: Bratwurst, Kohlrabi, Kartoffeln Abends: Brot, Wurst Zwischendurch: /	77	1
8	ok	Morgens: Brot, Marmelade, Wurst, Kaffee Mittags: Geflügel, Kohlrabi, Kartoffeln Abends: Brot, Wurst Zwischendurch: /	77	1
9	ok	Morgens: Brot, Marmelade, 1 Ei, Kaffee Mittags: Hähnchen, Gemüse, Kartoffeln Abends: Gemüsesuppe Zwischendurch: /	77	0
10	ok	Morgens: Brot, Marmelade, Kaffee Mittags: Frikadellen, saure Bohnen, Kartoffelpüree Abends: Brot, Wurst Zwischendurch: /	77	0,5

Anhang

Patient U:

Studienwoche	Gesundheitszustand	Ernährung	Endgewicht [kg]	Ultrafiltration [L]
1	ok	Morgens: Brot, Käse, Schinken, Kaffee Mittags: Maiskolben, Gemüsesuppe Abends: / Zwischendurch: 1 Pfirsich, 1 Kaffeestückchen	79,5	3,2
2	ok	Morgens: Brötchen, Käse, Schinken, Kaffee Mittags: Tomatenrisotto Abends: / Zwischendurch: /	79,5	3,2
3	ok	Morgens: Brot, Käse, Kaffee Mittags: Linsensuppe, Wurst, Brot Abends: / Zwischendurch: 1 Stück Apfelkuchen	79,5	2,4
4	ok	Morgens: Brot, Käse, Kaffee Mittags: Nudelaufwurf Abends: Brot, Schinken Zwischendurch: /	79	2,2
5	ok	Morgens: Brot, Schinken, Kaffee Mittags: / Abends: Brot, Schinken Zwischendurch: 125g Griesbrei, 2 Mandarinen	79	2,9
6	ok	Morgens: Brot, Käse, Kaffee Mittags: Fisch, Kartoffelsalat Abends: / Zwischendurch: /	79	3,8
7	ok	Morgens: Brot, Käse, Kaffee Mittags: Fleischkäse, Bratkartoffeln, Salat Abends: Brot, Wurst Zwischendurch: 1 Mandarine, 1 Honigkuchen	79	2,9
8	ok	Morgens: Brot, Käse, Kaffee Mittags: Spiegelei, Brot Abends: Pizza (vegetarisch), Käse Zwischendurch: /	79	2,7
9	ok	Morgens: Brötchen, Marmelade, Käse, Kaffee Mittags: Kartoffelsuppe, Würstchen Abends: Brot, Käse Zwischendurch: 1 Mandarine	79	3,4
10	ok	Morgens: Brötchen, Käse, Kaffee Mittags: Pizza Abends: Brötchen, Käse Zwischendurch: 1 Orange	79	2,3

Anhang

Patient X*:

Studienwoche	Gesundheitszustand	Ernährung	Endgewicht [kg]	Ultrafiltration [L]
1	ok	Morgens: Brot, Wurst, Kaffee Mittags: Gulasch, Reis Zwischendurch: /	70	4,8
2	ok	Morgens: Brot, Wurst, Kaffee Mittags: Hühnersuppe Zwischendurch: /	70	4,1
3	ok	Morgens: Brot, Marmelade, Ei, Kaffee Mittags: Currywurst, Pommes frites Zwischendurch: /	70	3,6
4	ok	Morgens: Brötchen, Wurst, Kaffee Mittags: Rippchen, Sauerkraut, Kartoffelpüree Zwischendurch: /	70,5	5,2
5	ok	Morgens: Brötchen, Wurst, Kaffee Mittags: Pizza Zwischendurch: /	70,5	4,5
6	ok	Morgens: Brötchen, Marmelade, Kaffee Mittags: Bratwurst, Rotkraut, Kartoffelpüree Zwischendurch: /	70,5	3,6
7	ok	Morgens: Brötchen, Marmelade, Kaffee Mittags: Fleischkäse, Ei, Bohnen, Kartoffeln Zwischendurch: /	71	3,8
8	ok	Morgens: Brötchen, Marmelade, Kaffee Mittags: Nudeln, Tomatensoße Zwischendurch: /	71	4
9	ok	Morgens: Brötchen, Marmelade, Kaffee Mittags: Kotelett, Kohlrabi, Kartoffeln Zwischendurch: /	71	4
10	ok	Morgens: Brötchen, Marmelade, Kaffee Mittags: Rippchen, Kohlrabi, Kartoffelpüree Zwischendurch: /	71	4,2

*: Patient ist in der HD-Nachtschicht (ab ca. 19 Uhr), hatte noch kein Abendessen zu sich genommen

Anhang

Patient Y*:

Studienwoche	Gesundheitszustand	Ernährung	Endgewicht [kg]	Ultrafiltration [L]
1	ok	Morgens: Brot, Wurst, Kaffee Mittags: Schnitzel, Rosenkohl, Kartoffeln Zwischendurch: 1 Eis	61,5	0
2	ok	Morgens: Brot, Apfelmus, Kaffee Mittags: Kartoffelpfannkuchen, Apfelmus Zwischendurch: /	61,5	0,8
3	ok	Morgens: Brot, Wurst, Kaffee Mittags: / Zwischendurch: 1 Stück Kuchen	61,5	0,8
4	ok	Morgens: Brot, Salami, Kaffee Mittags: Maultaschen, Käsesoße Zwischendurch: /	61,5	1,2
5	ok	Morgens: 1 Kaffeestückchen, Kaffee Mittags: Rippchen, Sauerkraut, Brot Zwischendurch: / **	61,5	1
6	ok	Morgens: Brot, Käse, Kaffee Mittags: Pellkartoffeln, Quark Zwischendurch: /	61,5	1,3
7	ok	Morgens: Brötchen, Apfelmus, Kaffee Mittags: Hähnchenschenkel, Brot, Salat Zwischendurch: /	61,5	1,3
8	ok	Morgens: / Mittags: Schnitzel, Nudeln, Gemüse Zwischendurch: 1 Stück Kuchen	61,5	3
9	ok	Morgens: Brot, Wurst, Kaffee Mittags: Nudelsuppe Zwischendurch: 1 Stück Kuchen	61,5	1,3
10	ok	Morgens: Brot, Marmelade, Kaffee Mittags: Hühnerfrikassee, Knödel, Salat Zwischendurch: 1 Stück Kuchen	61,5	2,5

*: Patient ist in der HD-Nachtschicht (ab ca. 19 Uhr), hatte noch kein Abendessen zu sich genommen

** : Patient hat keinen Saft vor HD getrunken, kam direkt nach der Arbeit ins KfH

11.5. Statistische Berechnungen

11.5.1. Anderson-Darling-Test (Normalverteilung)*

Biomarker	Wertedifferenz	p-Wert	Normalverteilung
Comet Assay	R/S	0,40360	ja
	R/W	0,38850	ja
	S/W	0,51410	ja
Comet Assay +FPG	R/S	0,02819	nein
	R/W	0,06436	ja
	S/W	0,07323	ja
tGSH	R/S	0,20470	ja
	R/W	0,55740	ja
	S/W	0,30120	ja
GSSG	R/S	0,44060	ja
	R/W	0,20830	ja
	S/W	0,02210	nein
Glutathionstatus	R/S	0,36080	ja
	R/W	0,02530	nein
	S/W	0,01960	nein
Malondialdehyd (MDA)	R/S	0,54500	ja
	R/W	0,03310	nein
	S/W	0,89770	ja
Triglyceride	R/S	0,16080	ja
	R/W	0,05960	ja
	S/W	0,19610	ja
MDA/Triglyceride	R/S	<0,0001	nein
	R/W	<0,0001	nein
	S/W	<0,0001	nein
Proteincarbonyle	R/S	0,15630	ja
	R/W	0,10490	ja
	S/W	0,35380	ja
NF-κB-Status	R/S	0,38480	ja
	R/W	0,06330	ja
	S/W	0,12470	ja
TEAC	R/S	0,73090	ja
	R/W	0,23890	ja
	S/W	0,51040	ja
Harnsäure	R/S	0,14200	ja
	R/W	0,20030	ja
	S/W	0,93940	ja

*: Prüfung auf Normalverteilung bei den Werte-Differenzen der Studienphasen ($p > 0,05 \rightarrow$ Werte sind normalverteilt)

11.5.2. Einseitig gepaarter t-Test / einseitiger Wilcoxon-Test

(Signifikanz ab $p < 0,05$)

Comet Assay	p-Wert	
R-S	0,06921	t-test
W-S	0,3903	t-test
R-W	0,1282	t-test
n=21		

Malondialdehyd	p-Wert	
R-S	0,00092	t-test
W-S	0,03799	Wilcoxon
R-W	0,00057	t-test
n=21		

Comet Assay +FPG	p-Wert	
R-S	4,7680E-07	Wilcoxon
W-S	1,0620E-07	t-test
R-W	4,46E-11	t-test
n=21		

Triglyceride	p-Wert	
R-S	0,4326	t-test
W-S	0,3229	t-test
R-W	0,4012	t-test
n=21		

tGSH	p-Wert	
R-S	3,6455E-11	t-test
W-S	1,8137E-10	t-test
R-W	0,1504	t-test
n=21		

MDA/Triglyceride	p-Wert	
R-S	0,3540	Wilcoxon
W-S	0,4324	Wilcoxon
R-W	0,2474	Wilcoxon
n=21		

GSSG	p-Wert	
R-S	3,0530E-10	t-test
W-S	<0,0001	Wilcoxon
R-W	0,03435	t-test
n=21		

NF-κB-Status	p-Wert	
R-S	0,0014	t-test
W-S	0,1669	t-test
R-W	0,00085	t-test
n=21		

Status	p-Wert	
R-S	5,1962E-11	t-test
W-S	<0,0001	Wilcoxon
R-W	0,16880	Wilcoxon
n=21		

TEAC	p-Wert	
R-S	0,07109	t-test
W-S	0,01549	t-test
R-W	0,23690	t-test
n=21		

Proteincarbonyl	p-Wert	
R-S	1,1500E-05	t-test
W-S	5,8036E-05	t-test
R-W	0,0666	t-test
n=21		

Harnsäure	p-Wert	
R-S	0,0413	t-test
W-S	0,1416	t-test
R-W	0,1456	t-test
n=21		

11.5.3. ANOVA

Variable	p-Wert		Variable	p-Wert
(a) Glutathion tGSH			(b) MDA	
Phasen	<0,0001		Phasen	<0,01
Patienten	<0,0001		Patienten	<0,0001
Geschlecht	0,06		Geschlecht	0,737
Eisengabe	<0,0001		Eisengabe	<0,0001
Diabetes	<0,05		Diabetes	<0,0001
GSSG			(c) Carbonyle	
Phasen	<0,0001		Phasen	<0,0001
Patienten	<0,0001		Patienten	<0,0001
Geschlecht	0,052		Geschlecht	<0,0001
Eisengabe	0,179		Eisengabe	<0,01
Diabetes	<0,0001		Diabetes	<0,0001
GSH-Status			(d) NF-κB-Status	
Phasen	<0,0001		Phasen	<0,01
Patienten	<0,0001		Patienten	<0,001
Geschlecht	0,121		Geschlecht	0,084
Eisengabe	0,058		Eisengabe	<0,001
Diabetes	<0,0001		Diabetes	<0,01

Anhang

Zur genaueren Analyse der ANOVA-Daten wurden die Anfangswerte in der Run-in-Phase und die Differenz der Werte zwischen Run-in- und Saftaufnahme-Phase betrachtet. Aufgeteilt nach den untersuchten Faktoren (z. B. Gegenüberstellung der Glutathionstatus-Werte der 4 Diabetiker und der 17 „Nicht-Diabetiker“) wurden ersichtliche Unterschiede mittels eines einseitigen, ungepaarten t-Tests auf Signifikanz überprüft:

Biomarker	Faktor und p-Wert			Werte Phase1	Phasendifferenz	Unterschiede	t-Test (einseitig, ungepaart)
	m/w*	Fe+/Fe-**	D+/D-***				
tGSH	0,06027	4,13E-05	0,02001	[μ M] Fe+: 618,65 Fe-: 582,3 D+: 625,54 D-: 604,2	90,77 81,51 90,52 87,56	/ mit Eisen: höherer Spiegel, stärkere Verbesserung mit Diabetes: höherer Spiegel, etwas stärkere Verbesserung	>0,05 >0,05
GSSG	0,05232	0,1794	3,60E-08	[μ M] D+: 63,78 D-: 76,79	-8,75 -12,03	/ / ohne Diabetes: höherer Gehalt, stärkere Reduktion	<0,05 (Phasendifferenz)
GSH-Status	0,1214	0,05823	3,73E-06	[%] D+: 78,9 D-: 73,88	5,41 6,82	/ / ohne Diabetes: geringerer Status, stärkere Verbesserung	<0,05 (Anfangswerte und Phasendiff.)
MDA	0,7373	3,05E-05	1,85E-08	[μ M] Fe+: 1,38 Fe-: 1,26 D+: 1,17 D-: 1,39	-0,073 -0,07 -0,09 -0,07	/ ohne Eisen: geringerer Gehalt mit Diabetes: geringerer Gehalt, stärkere Reduktion	>0,05 <0,05 (Anfangswerte)
Carbonyl	6,66E-09	0,00431	9,38E-09	[nmol/mg Protein] m: 1,18 w: 0,91 Fe+: 1,07 Fe-: 1,15 D+: 0,997 D-: 0,989	-0,15 -0,08 -0,128 -0,126 -0,006 -0,124	männlich: höherer Gehalt, stärkere Reduktion ohne Eisen: höhere Werte ohne Diabetes: stärkere Reduktion	<0,05 (Anfangswerte und Phasendiff.) >0,05 >0,05
NF-κB-Status	0,84004	0,00023	0,00106	[%] Fe+: 100,24 Fe-: 141,69 D+: 85,46 D-: 118,35	-15,55 -35,93 -17,68 -22,24	/ ohne Eisen: höherer Gehalt, stärkere Reduktion ohne Diabetes: höherer Gehalt, stärkere Reduktion	<0,05 (Anfangswerte) <0,01 (Anfangswerte)

*: männlich/weiblich;

** : mit/ohne Eisen-Gabe

***: mit/ohne Diabetes

11.6. Lebenslauf

Schulbildung:

1986 – 1995 Eleonoren-Gymnasium Worms
20.06.1995 Abschluss: Abitur, Note: 1,8

Studium:

1995 – 2004 Studiengang Diplom-Lebensmittelchemie
Technische Universität Kaiserslautern
31.03.2004 Abschluss: Diplom-Lebensmittelchemiker
Note: gut

Berufstätigkeit:

15.04.2004 – 30.04.2007 Wissenschaftliche Hilfskraft (Promotion)
Technische Universität Kaiserslautern

Zusatzqualifikationen:

23.04.2005 Teilnahme an einem Kompaktkurs für
Ärzte und Wissenschaftler: „Prüfarzt in
klinischen Studien“
04.05.2006 Nachweis zur eingeschränkten
Sachkunde im Umgang mit Gefahrstoffen

11.7. Posterbeiträge und Publikationen

- **Posterbeiträge:**

- ECNIS-sponsored Workshop on Biomarker of Exposure and Cancer Risk: DNA Damage and DNA Adduct Detection & 6th GUM-32P-Postlabelling Workshop, September 29-30, **2006**, DKFZ Heidelberg:
Spormann, T., Albert, F.W., Rath, T., Dietrich, H., Will, F., Eisenbrand, G., Janzowski, C.
“Reduction of oxidative DNA damage by an anthocyanin/polyphenolic rich fruit juice in an intervention study with patients on hemodialysis”
- COST Meeting, Vienna, October 11-14, **2006**:
T. Weisel, **T. Spormann**, F.W. Albert, T. Rath, H. Dietrich, F. Will, M. Baum, G. Eisenbrand and C. Janzowski.
“Reduction of oxidative DNA damage by an anthocyanin/polyphenolic rich fruit juice in intervention studies with healthy subjects and patients on hemodialysis”
- Frontiers in Cancer Prevention Research (AACR); November 12-15, **2006**;
Boston, MA
Christine Janzowski, **Thomas Spormann**, Bülent Soyalan, Franz W. Albert, Thomas Rath, Helmut Dietrich, Frank Will, Gerhard Eisenbrand.
“Reduction of oxidative cell damage by an anthocyanin/polyphenolic rich fruit juice in an intervention study with patients on hemodialysis”
- Lebensmittelchemische Gesellschaft, Fachgruppe in der Gesellschaft Deutscher Chemiker; Regionaltagung Süd-West, 05. - 06. März **2007**, Gießen.
Spormann, T., Soyalan, B., Blatz, V., Albert, F.W., Rath, T., Dietrich, H., Will, F., Eisenbrand, G. und Janzowski, C.
„Antioxidative Wirkung eines polyphenolreichen roten Mehrfruchtsaftes in einer Interventionsstudie mit Hämodialysepatienten“
- 48. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), 13. bis 15. März **2007**, Mainz.
Spormann, T., Albert, F.W., Rath, T., Dietrich, H., Will, F., Eisenbrand, G. and

Janzowski, C.¹

“Anthocyanin/polyphenolic rich fruit juice reduces oxidative cell damage in an intervention study with patients on hemodialysis”

- Wissenschaftliches Symposium; 25 Jahre Lebensmittelchemie & Toxikologie an der TU Kaiserslautern, Fachbereich Chemie: “Food Chemistry & Toxicology – Cornerstones of Life Sciences in Chemistry“, 28.09. **2007**.

Thomas Spormann, Franz W. Albert, Thomas Rath, Helmut Dietrich, Frank Will, Jean-Pierre Stockis, Gerhard Eisenbrand, Christine Janzowski

Anthocyanin/polyphenolic rich fruit juice reduces oxidative cell damage in an intervention study with patients on hemodialysis

- **Publikationen:**

- Abstraktpublikation zu: ECNIS-sponsored Workshop on Biomarker of Exposure and Cancer Risk: DNA Damage and DNA Adduct Detection & 6thGUM 32P-Postlabelling Workshop, September 29-30, **2006**, DKFZ Heidelberg: Onlinepublikation GUM/ECNIS (DKFZ), September 2006.
- Abstraktpublikation zu: 48. Frühjahrstagung der DGPT, 13. bis 15. März **2007**, Mainz:
Anthocyanin/polyphenolic rich fruit juice reduces oxidative cell damage in an intervention study with patients on hemodialysis.
Arch Pharmacol 2007;375(1):95.
- Der Artikel „Anthocyanin/polyphenolic rich fruit juice reduces oxidative cell damage in an intervention study with patients on hemodialysis“ befindet sich in der Einreichungs-Phase („paper in submission“).

11.8. Bestätigung der Eigenleistung

Hiermit versichere ich, Thomas Spormann, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig, ohne fremde Hilfe und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln durchgeführt und bearbeitet habe.

Kaiserslautern, den 06. Juni 2008

Thomas Spormann

Zum Schluss...

...möchte ich denjenigen herzlich danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

- Dr. Janzowski für die über viele fachliche Anregungen und Diskussionen hinausgehende Betreuung während meiner Promotionszeit
- Dr. Stockis für seine kompetenten statistischen Analysen und die unermüdliche Bereitschaft, mich bei mathematischen Fragen zu beraten
- Prof. Dr. Albert für die Möglichkeit, die HD-Saft-Interventionsstudie am Westpfalzkrankenhaus Kaiserslautern und am KfH durchzuführen zu können sowie für die angenehme Zusammenarbeit und die ständige Hilfsbereitschaft
- Dr. Rath für die Unterstützung bei Planung und Koordination der Interventionsstudie
- Den Mitarbeitern der Dialyse-Station des Westpfalzkrankenhauses Kaiserslautern für die angenehme und reibungslose Zusammenarbeit
- Dr. Scherer und Dr. Kress, der ärztlichen Leitung des KfH Kaiserslautern für die Möglichkeit, die Studie am KfH fortzuführen zu können sowie Dr. Rieder für die praktische Unterstützung während der Durchführung der Studie
- Den Mitarbeitern des KfH Kaiserslautern Kaiserslautern für die angenehme und reibungslose Zusammenarbeit
- Ingrid Hemm und Heike Schramm im Sekretariat, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen
- Tamara Weisel für Einweisung in die Untersuchungsmethoden und die Unterstützung bei Planung und Vorbereitung der HD-Saft-Studie
- Der TCA Sylvia Schmidt, die mit ihrer unermüdlichen Arbeit einen erheblichen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet hat
- Bülent Soyalan für die Untersuchung der Genexpression bei Proben der Studie sowie für die interessanten und netten Gespräche
- Phillip Bellion, der immer eine Lösung hatte, wenn es bei mir am Computer geklemmt hat
- Den Diplomanden Natali Ruppel und Veronika Blatz für ihre zuverlässige Arbeit und die angenehme Atmosphäre im Labor

Zum Schluss...

- Den Forschungspraktikanten Tamara Bakuradze, Markus Schmitz, Oliver Brücher und Christoph Seubert für die gute, fruchtbare Zusammenarbeit
- Rainer Scheuermann, Aribert Vetter und Eva Gorgus, die immer eine gute Idee parat hatten und ein angenehmes Arbeitsklima aufrecht erhielten
- allen anderen AK-Mitgliedern für ihre Hilfe bei Problemen

Der größte Dank gilt meinen Eltern, die immer an mich glauben, mir mit Rat und Tat zur Seite stehen, mich immer ertragen (auch wenn es manchmal schwer fällt) und für vieles mehr.