

N^ε-(Carboxymethyl)Lysin und 3-Nitrotyrosin im Atemkondensat
von Patienten mit chronischem Nierenversagen

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades
einer Doktorin der Medizin
genehmigte Dissertation

vorgelegt von
Cindy Brodowsky
aus
Heerlen, Niederlande

Berichter: Herr Universitätsprofessor
Dr. med. Thomas Kraus

Herr Universitätsprofessor
Dr. med. Gerhard Andreas Wiesmüller

Tag der mündlichen Prüfung: 4. Juni 2009

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online
verfügbar.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
1.1. Anlass und Hintergrund der Arbeit	5
1.2. Atemkondensat.....	6
1.2.1. Definition und Entstehung	6
1.2.2. Die Atemkondensatgewinnung	6
1.2.3. Nachteile und Probleme der Atemkondensatanalyse	7
1.2.4. Alternativen zur Atemkondensatanalyse.....	8
1.2.5. Wo und bei welchen Erkrankungen wird dieses Verfahren eingesetzt?.....	9
1.3. Chronisches Nierenversagen	10
1.3.1. Definition, Äthiologie, Folgen	10
1.3.2. Nierenersatztherapie.....	11
1.4. Oxidativer Stress - Definition	12
1.5. N ^ε -(Carboxymethyl)Lysin	13
1.5.1. Advanced Glycation End Products	13
1.5.2. Entstehung und Eigenschaften von N ^ε -(Carboxymethyl)Lysin.....	13
1.5.3. Nachweis von N ^ε -(Carboxymethyl)Lysin	16
1.5.4. Bei welchen Erkrankungen ist N ^ε -(Carboxymethyl)Lysin erhöht?....	17
1.5.5. N ^ε -(Carboxymethyl)Lysin im Atemkondensat.....	19
1.6. 3-Nitrotyrosin	20
1.6.1. Entstehung und Eigenschaften von 3-Nitrotyrosin.....	20
1.6.2. Nachweis von 3-Nitrotyrosin	21
1.6.3. Bei welchen Erkrankungen ist die 3-Nitrotyrosinkonzentration erhöht?	22
1.6.4. 3-Nitrotyrosin im Atemkondensat.....	22
1.7. Aminosäuren	24
1.7.1. Lysin.....	24
1.7.2. Tyrosin	25
1.7.3. Prolin	26
1.8. Zielsetzung der Arbeit.....	27

2. Material und Methode	28
2.1. Die niereninsuffiziente Gruppe	28
2.1.1. Allgemeine Angaben	28
2.1.2. Ursache und Therapie der Niereninsuffizienz	28
2.1.3. Vorerkrankungen	29
2.1.4. Ausgeschlossene Patienten	30
2.2. Die gesunde Kontrollgruppe	31
2.2.1. Allgemeine Angaben	31
2.2.2. Vorerkrankungen	31
2.3. Ein- und Ausschlusskriterien	31
2.4. Einverständnis	32
2.5. Ethikkommission	32
2.6. Ablauf der Messung	33
2.6.1. Anamneseerhebung	33
2.6.2. Atemkondensat	33
2.6.3. Blutprobe	35
2.6.4. Urinprobe	36
2.7. Laborchemische Messungen der einzelnen Marker	37
2.7.1. Vorbemerkungen	37
2.7.2. Bestimmung von CML im Urin und Serum	37
2.7.3. Bestimmung von Kreatinin im Urin	38
2.7.4. Bestimmung von Kreatinin im Serum	38
2.7.5. Bestimmung von CML und Lysin im Atemkondensat	38
2.7.6. Bestimmung von Prolin, Tyrosin und 3-Nitrotyrosin im Atemkondensat	39
2.8. Statistische Auswertung	39
3. Ergebnis	40
3.1. Allgemeine Angaben der Gruppen	40
3.2. Bestimmung der Marker für oxidativen Stress in Serum, Urin und Atemkondensat	42
3.2.1. N ^ε -(Carboxymethyl)Lysin	42
3.2.2. 3-Nitrotyrosin	46
3.2.3. Aminosäuren	46

3.3. Einfluss des Lebensalters.....	48
3.4. Einfluss des BMI.....	50
3.5. Einfluss des Geschlechts	50
3.6. Einfluss von Diabetes mellitus.....	51
3.7. Einfluss der Immunsuppressiva.....	52
3.8. Einfluss der Atemgrößen	53
3.9. Einfluss von Nikotinabusus.....	55
3.9.1. 3-Nitrotyrosin im Atemkondensat.....	55
3.9.2. N ^ε -(Carboxymethyl)Lysin im Atemkondensat.....	57
3.9.3. Aminosäuren im Atemkondensat	58
3.9.4. N ^ε -(Carboxymethyl)Lysin im Serum und Urin	61
3.10. Varianzanalytisches Modell	63
4. Diskussion	68
4.1. N ^ε -(Carboxymethyl)Lysin im Serum.....	68
4.2. N ^ε -(Carboxymethyl)Lysin im Urin.....	70
4.3. N ^ε -(Carboxymethyl)Lysin im Atemkondensat	71
4.4. 3-Nitrotyrosin im Atemkondensat	73
4.5. Aminosäuren im Atemkondensat.....	74
4.6. Interpretation der Befunde der Atemkondensatanalyse	75
4.7. Durchführung der Atemkondensatsammlung	75
4.8. Einschränkungen der Studie	76
5. Zusammenfassung.....	77
6. Literaturverzeichnis	80
7. Danksagung	89
8. Erklärung § 5 Abs.1 zur Datenaufbewahrung	90
9. Lebenslauf.....	91

1. Einleitung

1.1. Anlass und Hintergrund der Arbeit

Erkrankungen wie Asthma bronchiale, Diabetes mellitus, chronische Niereninsuffizienz und Arteriosklerose sind mit erhöhtem oxidativen Stress assoziiert. Marker dafür sind unter anderem N^ε-(Carboxymethyl)Lysin (CML) und 3-Nitrotyrosin.

Die Analyse von Atemkondensat ist eine nicht-invasive, direkte Untersuchungsmethode, die in der Pulmologie und in der Arbeitsmedizin zur Diagnostik und Therapieüberwachung verwendet werden kann und ist zur Zeit Objekt intensiver Forschung. Im Atemkondensat lassen sich Marker für oxidativen Stress nachweisen. Oftmals bezieht sich jedoch die Forschung auf respiratorische Erkrankungen, die mit erhöhtem oxidativem Stress in der Lunge einhergehen, und Marker dafür lassen sich in erhöhter Konzentration im Atemkondensat nachweisen.

Bei der chronischen Niereninsuffizienz kann man die Marker für oxidativen Stress in erhöhter Konzentration im Blut nachweisen. Diese Erkrankung betrifft aber nicht nur die Nieren, sondern beeinflusst alle Organsysteme des Menschen.

Ob und wie die chronische Niereninsuffizienz die Konzentration der Marker für oxidativen Stress im Atemkondensat beeinflusst, wurde nach bestem Wissen bisher noch nicht untersucht und war Anlass dieser Arbeit.

1.2. Atemkondensat

1.2.1. Definition und Entstehung

Atemkondensat ist der ausgeatmete, kondensierte Wasserdampf mit den darin gelösten Stoffen, wie nichtflüchtige Teilchen und Gase.

Im Atemkondensat können gasförmige Stoffe wie Stickstoffmonoxid (NO), Kohlenstoffmonoxid (CO) und Kohlenwasserstoffe [1], aber auch nichtflüchtige Stoffe wie Entzündungsmediatoren (Prostaglandine, Leukotriene, Zytokine, Isoprostane), Nitrat, Nitrit, S-Nitrosothiol, 3-Nitrotyrosin, Elektrolyte, Marker der Lipidperoxidation (Malondialdehyd, MDA) [1], Lipide, Adenosin, Serotonin, Histamin, Acetylcholin, Surfactant [2], Aminosäuren und N^ε–(Carboxymethyl)Lysin (CML) nachgewiesen werden [3].

Es stellt sich die Frage, wie diese partikelförmigen Stoffe in das Atemkondensat gelangen können. Die Ausatemluft ist zu >90% wasserdampfgesättigt. Man geht davon aus, dass auf der Oberfläche der Atemwegsschleimhaut kleine Tröpfchen gebildet werden, in denen die nichtflüchtigen Stoffe enthalten sind [5]. Sie werden von der Oberfläche losgelöst und ausgeatmet und bilden mit dem Wasserdampf zusammen das Atemkondensat [2,5]. Diese Tröpfchen spiegeln die Zusammensetzung der extrazellulären Flüssigkeit der Atemwegsoberfläche [6] und somit auch die aktuelle Stoffwechsellage der Lunge wider. Dieser Anteil beträgt jedoch lediglich <0,1 bis 2% des gesamten Atemkondensats [5].

Atemkondensat entsteht in den kleinen Atemwegen der Lungenperipherie [6]. Somit hilft die Analyse seiner Zusammensetzung, die physiologischen und pathophysiologischen Vorgänge in den kleinen Atemwegen zu verstehen.

1.2.2. Die Atemkondensatgewinnung

Atemkondensat kann man sammeln, indem man die Ausatemluft kühlt, so dass der Wasserdampf mit den darin enthaltenen Partikeln aus den tiefen Atemwegen kondensieren kann [1,2,5,6,7].

Einfache Systeme dafür bestehen aus einem Schlauch mit einem daran angeschlossenen Behälter. Der Schlauch wird gekühlt, und durch ihn wird die Ausatemluft geleitet. Der Wasserdampf mit den gelösten Stoffen kann kondensieren und aufgefangen werden [6]. Kommerzielle Systeme machen es möglich, Atemkondensat standardisiert aufzufangen.

Mit der Analyse des Atemkondensats ist man in der Lage, direkt Sekretionsprodukte der Atemwege zu gewinnen und zu untersuchen [7]. Das Verfahren ist nicht-invasiv und einfach durchzuführen, birgt keinerlei Risiken oder Nebenwirkungen und ist auch ambulant nutzbar. Es ist leicht reproduzierbar und sogar bei Kindern und Neugeborenen einzusetzen. Es ist ebenfalls möglich, Atemkondensat von intubierten oder tracheotomierten Patienten zu gewinnen [2,6]. Die etwas erhöhte Atemarbeit wirkt sich selbst bei Patienten mit respiratorischen Störungen und sogar bei Kindern mit akut exazerbiertem Asthma bronchiale nicht negativ auf die Lungenfunktion aus [8].

1.2.3. Nachteile und Probleme der Atemkondensatanalyse

Ein Nachteil ist, dass das Atemkondensat mit Stoffen verunreinigt sein kann, die nicht aus den tiefen Atemwegen, sondern zum Beispiel aus Mundhöhle, Nasenhöhle oder Rachen stammen [6,9]. Verunreinigungen der Proben mit Speichel sind ebenfalls möglich [2,7,9].

Die geringen Konzentrationen der nachzuweisenden Stoffe und die variable Verdünnung sind ebenfalls ein Problem. Bei einer Veränderung der Konzentration kann zum einen eine tatsächliche Konzentrationsveränderung in den sekretierten Tröpfchen ursächlich sein, zum anderen aber auch eine veränderte Sekretionsmenge [4,5] oder ein veränderter Wasserdampfanteil in der Ausatemluft. Der Nachweis solch geringer Konzentrationen ist auch nicht mit jedem Messverfahren möglich [2,7].

Volatile Anteile im Atemkondensat sind auch schwierig zu messen, da sie schnell aus der flüssigen Phase des Atemkondensats verfliegen [7].

Die Atemkondensatgewinnung muss unter standardisierten Bedingungen durchgeführt werden, da die Ergebnisse sonst nicht vergleichbar sind [2,6].

1.2.4. Alternativen zur Atemkondensatanalyse

Zur Diagnostik von Atemwegserkrankungen stehen verschiedene Mittel zur Verfügung. Eine Röntgenaufnahme oder ein Computertomogramm des Thorax, Lungenfunktionsprüfungen und Laboruntersuchungen sind aus dem klinischen Alltag nicht wegzudenken. Sie alle können aber nur indirekte Hinweise auf pathologische Vorgänge in den Atemwegen geben, direkt messen kann man diese nicht [2].

Die Analyse von Atemkondensat ist nicht die einzige Möglichkeit, Entzündung oder oxidativen Stress zu quantifizieren. Weitere Methoden sind die bronchoalveoläre Lavage (BAL), die Analyse von Sputum und die Analyse der Ausatemluft.

Für eine BAL wird mit einem Bronchoskop gezielt ein Haupt- oder Lappenbronchus aufgesucht und gespült. Eine Bronchoskopie ist allerdings mit den entsprechenden Risiken, wie Blutungs- und Perforationsgefahr, Pneumothorax, Infektion, Bronchospasmus und den Gefahren einer Sedierung und Hypoxie verbunden [7].

Im Sputum lassen sich Entzündungsmediatoren, Mikroorganismen und Entzündungszellen nachweisen [7]. Morgensputum, das sich über die Nacht angesammelt hat, ist für viele Patienten schwierig zu produzieren. Es enthält oft Speichel und spiegelt auch nur die Situation der Trachea und den großen Bronchien wider [7].

In der Ausatemluft können nur gasförmige Stoffe wie NO, CO oder Wasserstoffperoxid (H_2O_2) nachgewiesen werden.

1.2.5. Wo und bei welchen Erkrankungen wird dieses Verfahren eingesetzt?

In den 80er Jahren war das Atemkondensat Gegenstand der Forschung vor allem in der ehemaligen Sowjetunion. International wird die Methode der Atemkondensatsammlung sowie Nutzen und Bedeutung für den klinischen Gebrauch in den Bereichen Pulmologie und Arbeitsmedizin seit etwa der Jahrtausendwende erforscht [2].

Atemkondensate können vor allem zur Diagnose und Überwachung der Therapie von Asthma bronchiale, chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (COPD), adult respiratory distress syndrome (ARDS), Berufskrankheiten und Cystischer Fibrose (CF, Mukoviszidose) verwendet werden [2]. Charakteristika all dieser Erkrankungen sind die chronische Entzündung der Atemwege und erhöhter oxidativer Stress [1].

1.3. Chronisches Nierenversagen

1.3.1. Definition, Äthiologie, Folgen

Die chronische Niereninsuffizienz ist die Folge einer irreversiblen Verminderung der glomerulären, tubulären und endokrinen Funktion beider Nieren. Folgen sind dann Versagen der exkretorischen Nierenfunktion, Störungen im Wasser-, Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushalt, Abnahme der inkretorischen Nierenfunktionen, wie Sekretion von Erythropoetin, Vitamin D oder Renin, und toxische Organschäden durch die retinierten harnpflichtigen Substanzen.

Das chronische Nierenversagen als Endstadium (Stadium 5) ist erreicht, wenn die glomeruläre Filtrationsrate unter $15 \text{ ml/min/1,73m}^2$ liegt (NKF KDOQI Guidelines, 2002, Tab. 1). In diesem Stadium ist die Einleitung einer Nierenersatztherapie notwendig. Am häufigsten führen Nierenerkrankungen wie diabetische Nephropathie, primäre und sekundäre Glomerulonephritiden, chronische tubulo-interstitielle Erkrankungen, vaskuläre oder hypertensive Nephropathien und polyzystische Nierenerkrankungen zum chronischen Nierenversagen [10].

Stadium	GFR	Proteinurie	keine Proteinurie
1	>89	Nierenerkrankung mit normaler Nierenfunktion	Normalbefund
2	60-89	Nierenerkrankung mit milder Nierenfunktionseinschränkung	milde Nierenfunktionseinschränkung, aber keine Nierenerkrankung
3	30-59	Nierenerkrankung mit moderater Nierenfunktionseinschränkung	
4	15-29	Nierenerkrankung mit schwerer Nierenfunktionseinschränkung	
5	<15	chronisches Nierenversagen	

Tabelle 1: Stadien der chronischen Niereninsuffizienz nach der National Kidney Foundation 2002

1.3.2. Nierenersatztherapie

Beim chronischen Nierenversagen ist neben der konservativen Therapie, wie Behandlung der Grunderkrankung, arterielle Blutdruckeinstellung, Prophylaxe und Therapie einer renalen Anämie, renalen Osteopathie und kardialer Risikofaktoren, eine Nierenersatztherapie notwendig.

Eine Möglichkeit ist die Hämodialyse, wobei die Prinzipien Diffusion und Ultrafiltration kombiniert werden. Das Blut ist über eine semipermeable Membran vom Dialysat getrennt. An dieser Membran können harnpflichtige Substanzen wie Harnstoff, Kreatinin und Kalium mittels Diffusion in das Dialysat gelangen, wobei die Geschwindigkeit abhängig vom Konzentrationsunterschied zwischen den beiden Kompartimenten ist. Der Druckunterschied zwischen Blut und Dialysat sorgt dafür, dass Wasser mit den darin gelösten Stoffen mittels Ultrafiltration in das Dialysat gelangen kann. Die Porengröße der Membran bestimmt hierbei die Größe der Stoffe, die mit dem Wasser transportiert werden, große Proteine und Zellbestandteile werden zurückgehalten. Die Menge der so eliminierten Stoffe ist hier abhängig vom transportiertem Wasservolumen. Die intermittierende Hämodialyse ist das am weitesten verbreitete Verfahren, das üblicherweise dreimal wöchentlich für 4-8 Stunden in Dialysezentren oder zuhause angewendet wird. Im stationären intensivmedizinischen Bereich können auch kontinuierliche Verfahren wie Hämofiltration, Hämodialyse oder Hämodiafiltration genutzt werden.

Ein anderes ambulantes Verfahren ist die Peritonealdialyse, wo das Peritoneum als Dialysemembran fungiert. Das Dialysat wird kontinuierlich oder intermittierend über einen implantierten Katheter in die Bauchhöhle gegeben, verweilt dort 3-8 Stunden und wird danach wieder entfernt. In dieser Zeit findet der Stoffaustausch mittels Diffusion, osmotischer Ultrafiltration und konvektivem Stofftransport zwischen peritonealen Kapillaren und Dialysat statt, wobei die Menge und Art der Stoffe abhängig vom Peritoneum selbst und der Zusammensetzung des Dialysats ist. Die Peritonealdialyse wird von den Patienten selbst zuhause oder ambulant durchgeführt [10,11].

Die Therapie mit der größten Freiheit für den Patienten ist die Nierentransplantation. Nach Überprüfung der Gewebekompatibilität, Dringlichkeit und Wartezeit sowie dem Ausschluss von Kontraindikationen kann einem Empfänger eine Niere von einem geeigneten Spender transplantiert

werden. Um nach der Transplantation die Gefahr einer Abstoßung zu minimieren, ist eine dauerhafte Immunsuppression notwendig [12].

1.4. Oxidativer Stress - Definition

Oxidativer Stress ist ein Ungleichgewicht aus erhöhter Produktion von oxidativen Radikalen und Mangel an antioxidativen Mechanismen [13]. Erkrankungen wie Diabetes mellitus, Arteriosklerose, chronische Niereninsuffizienz, Asthma bronchiale und COPD sind mit erhöhtem oxidativem Stress assoziiert.

1.5. N^ε-(Carboxymethyl)Lysin

1.5.1. Advanced Glycation End Products

N^ε-(Carboxymethyl)Lysin (CML) gehört zur Gruppe der Advanced Glycation End Products (AGE). AGEs haben eine bräunliche Farbe, fluoreszieren und sind meist fest in Proteine integriert [14,15]. Sie modifizieren die Funktion und Expression von intra- und extrazellulären Proteinen, wie zum Beispiel antioxidativen und metabolischen Enzyme, Membrankanälen, Lipoproteinen, Transkriptionsproteinen und Strukturproteinen. Dies führt zu endothelialen Dysfunktionen, veränderten Lipoproteinfunktionen, Inflammation und oxidativem Stress [16]. AGEs stehen im Verdacht, Anteil an der Pathogenese von kardiovaskulären Komplikationen bei Diabetes mellitus und chronischer Niereninsuffizienz zu haben [13,15,17,18].

1.5.2. Entstehung und Eigenschaften von N^ε-(Carboxymethyl)Lysin

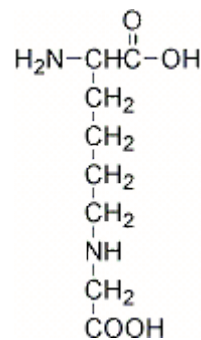


Abbildung 1: N^ε-(Carboxymethyl)Lysin

Die Entstehung von CML in vitro und in vivo ist Gegenstand vieler Forschungsprojekte weltweit. Viele verschiedene Reaktionswege sind bekannt, aber noch längst nicht alle Möglichkeiten sind entdeckt. Dargestellt werden die bekanntesten Prinzipien.

CML entsteht durch die nicht-enzymatische Glykierung von Proteinen im Rahmen der Maillard-Reaktion. Reduzierende Zucker reagieren mit Aminosäuren und bilden eine Schiffsche Base (ein Aldimin), die zu einem Amadoriprodukt (ein Ketoamin, zum Beispiel Fruktoselysin) umgelagert wird. Im Fall von CML ist die Aminosäure Lysin und der reduzierende Zucker zum Beispiel Glukose. Das Amadoriprodukt wird oxidativ gespalten, und es entsteht CML [17] (Abb. 2). Der Prozess geschieht langsam [15].

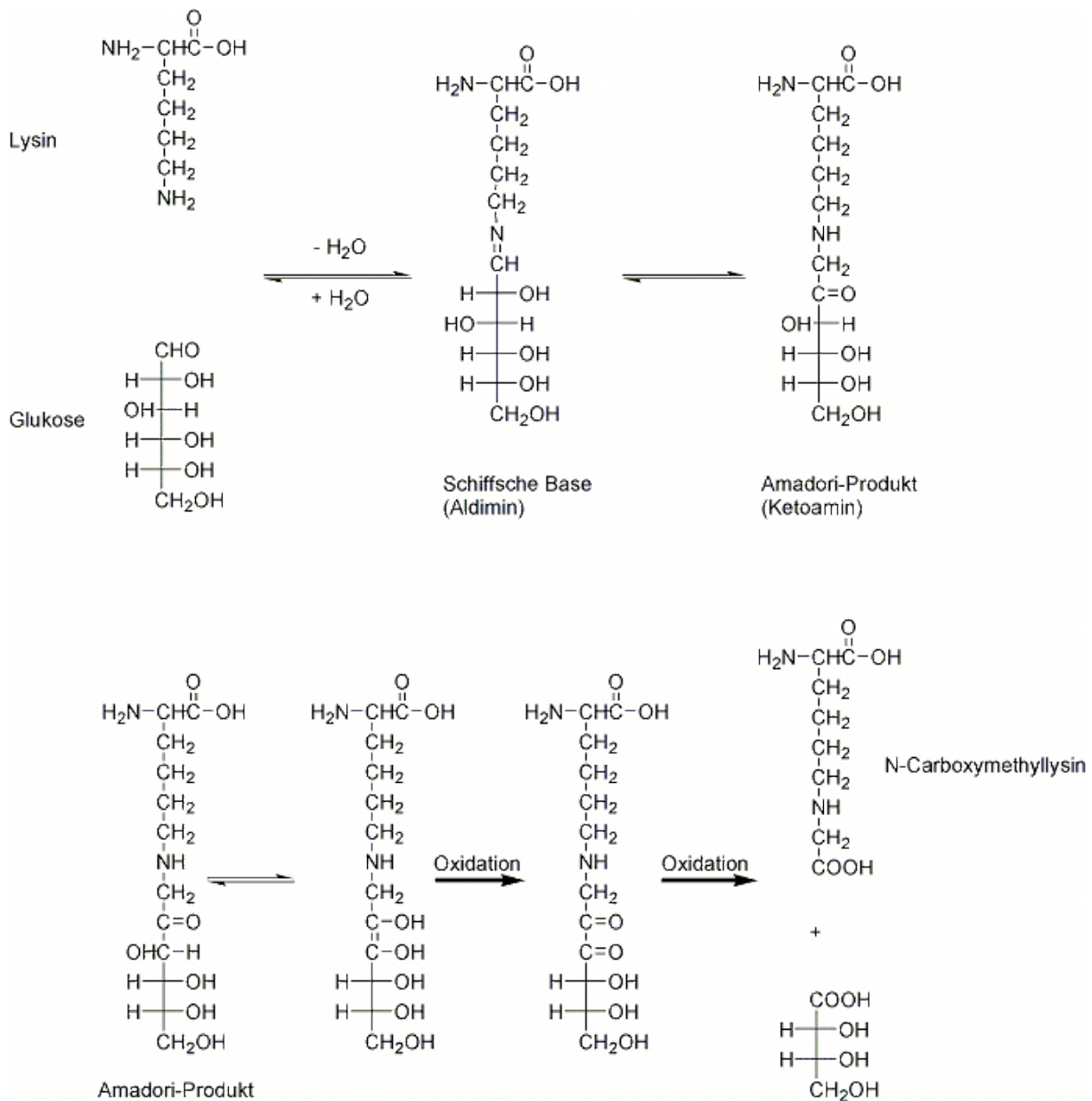


Abbildung 2: Die Maillard-Reaktion. Entstehung von CML durch die oxidative Spaltung des Amadori-Produkts.

Auch die Oxidation von Glukose oder Lipiden führt zur Bildung von CML [13,17]. Die Oxidation kann zum Beispiel metallionen-katalysiert sein. Es entsteht ein Aldehyd, Glyoxal, das mit Lysin zu CML reagieren kann [17] (Abb. 3). Die Oxidation von LDL (low density lipoproteins) und die Peroxidation von ungesättigten Fettsäuren führt ebenfalls über die Bildung von Glyoxal zu CML [13,16] (Abb. 3).

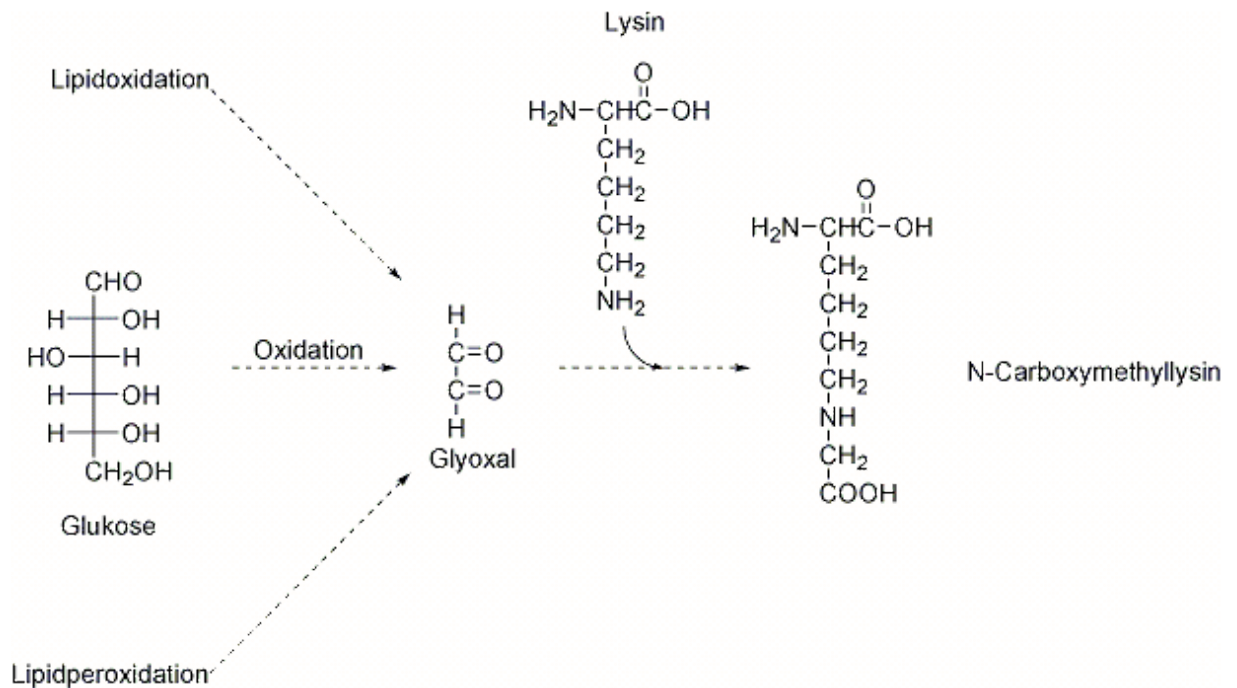


Abbildung 3: Entstehung von CML durch Glukose- bzw. Lipidoxidation/-peroxidation. Auf Grund der Übersichtlichkeit sind nicht alle Reaktionsschritte aufgeführt.

Peroxynitrit (ONOO^-), ein hochreaktives Zwischenprodukt aus dem Stickstoffmonoxidstoffwechsel, ist in der Lage, Amadoriprodukte oxidativ zu spalten und CML zu bilden [15]. Auch die metallionen-unabhängige Oxidation von Glukose ist durch ONOO^- möglich. Dies führt wieder zur Bildung von Glyoxal und anderen Zwischenprodukten, die dann mit Lysin zu CML reagieren können [15]. Auf die Entstehung von Peroxynitrit wird später im Kapitel Nitrotyrosin noch genauer eingegangen.

Die Myeloperoxidase (MPO) ist ein Enzym, das in neutrophilen Granulozyten und Makrophagen vorkommt. Die MPO kann unter H_2O_2 -Verbrauch über die Bildung von Glykoaldehyd CML generieren [14].

CML ist das bekannteste AGE. Im Gegensatz zu anderen AGEs fluoresziert CML nicht und ist farblos [18]. Es akkumuliert in verschiedenen Geweben, zum Beispiel in Haut, Lunge, Niere, Leber, Milz, Arterien und Kapillaren [19]. CML scheint sich vor allem im Bereich der extrazellulären Matrix und elastischen Fasern und Membranen anzulagern.

CML lässt sich vermehrt im Bereich von arteriosklerotischen Veränderungen der großen (Aorta) und kleinen Arterien und Arteriolen (Niere [19] und Herz [15]) nachweisen. Bei leichten Veränderungen akkumuliert nur wenig CML in der extrazellulären Matrix, bei schwerer Arteriosklerose größere Mengen von CML im Bereich der Plaques. Dann ist es nicht nur in der extrazellulären Matrix,

sondern auch in den Makrophagen, Schaumzellen und glatten Muskelzellen zu finden [19,20]. Das hat lokale Folgen. Die Makrophagen werden aktiviert, es kommt zur Zytokinausschüttung und erhöhtem oxidativen Stress. Durch die Akkumulation in der extrazellulären Matrix trägt CML dazu bei, dass es zur weiteren Stenosierung und letztlich zum Verschluss des Gefäßes kommt [18].

CML ist, außer im Gewebe, im Serum und Urin nachweisbar. Über 95% des CML liegt im Serum an Proteine gebunden vor [17], die dadurch irreversibel modifiziert werden [19].

Die Reaktion von CML mit dem AGE-Rezeptor (RAGE) setzt verschiedene Signalkaskaden in Gang [15], zum Beispiel Regulation der Transkription proinflammatorischer Gene [21].

Eliminiert wird CML von den Nieren [22,23] und vermutlich auch von der Leber [24].

1.5.3. Nachweis von N^ε-(Carboxymethyl)Lysin

Bei den meisten Forschungsprojekten wird CML im Plasma mittels spezifischem Enzymimmunoassay (ELISA, enzyme-linked immuno sorbent assay) nachgewiesen. ELISA ist eine sensitive, kostengünstige Methode und auch bei großen Mengen von Proben einfach anzuwenden. Nachteil des ELISA ist die weniger hohe Spezifität und die Tatsache, dass nicht mehrere Stoffe gleichzeitig nachgewiesen werden können [25]. Eine weitere Möglichkeit, CML nachzuweisen, ist die Gaschromatographie/ Massenspektrometrie (GC-MS) [3]. Hochsensitiv und -spezifisch ist die Flüssigkeitschromatographie/Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS). Der Vorteil dieser Methode ist, dass mehrere Stoffe gleichzeitig nachgewiesen werden können, zum Beispiel CML und Lysin. Das Problem beim CML im Atemkondensat ist die geringe Konzentration. Durch die Gefriertrocknung der Proben ist der Nachweis aber auch bei solch geringen Konzentrationen möglich [3].

1.5.4. Bei welchen Erkrankungen ist N^ε-(Carboxymethyl)Lysin erhöht?

Nachgewiesen ist eine erhöhte CML-Konzentration im Plasma, beziehungsweise Serum, bei chronischer Niereninsuffizienz [17,22,23,26,27,], in höherem Lebensalter [19], bei Leberzirrhose [24] und bei Diabetes mellitus [19].

Beim Diabetes mellitus wird eine erhöhte Konzentration von CML im Plasma mit der Pathogenese von mikro- und makroangiopathischen Komplikationen in Verbindung gebracht. Eine dieser Komplikationen ist die diabetische Nephropathie, die zum chronischen Nierenversagen führen kann. Diabetes mellitus mit oder ohne Nephropathie ist ein Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen und mit erhöhtem oxidativen Stress assoziiert. Sowohl beim Typ 1 [28] als auch beim Typ 2 [29] findet man im Vergleich zu Gesunden keine signifikant erhöhten CML-Konzentrationen im Plasma, wenn eine normale Nierenfunktion vorliegt. Wenn diese eingeschränkt ist, was in den entsprechenden Studien als $GFR < 80 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ [28], beziehungsweise Serum Kreatinin $> 1,3 \text{ mg/dl}$ [29] definiert ist, steigt die CML-Konzentration deutlich an. Im Gewebe, vor allem aber in Kapillaren, Arteriolen und Arterien, lässt sich bei Diabetikern mehr CML nachweisen als bei gleichaltrigen Nicht-Diabetikern [19]. Bei Kindern fällt das Lebensalter als Ursache für eine erhöhte CML-Bildung weg. Kinder mit Diabetes mellitus Typ 1 ohne Nephropathie haben eine ähnliche CML-Konzentration wie gesunde Kinder, der Unterschied ist nicht signifikant [30].

Die erhöhte CML-Konzentration im Plasma von Patienten mit Leberzirrhose liegt vermutlich auch an der eingeschränkten Ausscheidung durch die Leber. Viele Patienten haben durch ihre Erkrankung zusätzlich eine eingeschränkte Nierenfunktion, die auch eine erhöhte CML-Konzentration verursachen könnte. Das die Leber auch für die Ausscheidung des CMLs verantwortlich sein könnte, zeigt die Beobachtung, dass die CML-Konzentration nach einer Lebertransplantation deutlich abfällt, obwohl die eingeschränkte Nierenfunktion noch weiterhin besteht [24]. Zwischen Patienten mit eingeschränkter Leberfunktion durch Erkrankungen wie Hepatitis C, Fettleber und Fettleberhepatitis und Gesunden lassen keine signifikanten Unterschiede in den CML-Konzentrationen im Plasma nachweisen, so dass man daraus schließen könnte, dass CML erst bei sehr schweren Leberfunktionseinschränkungen akkumuliert [31].

Bei Patienten mit schwerer Herzinsuffizienz ist die CML-Konzentration im Plasma deutlich niedriger als bei Gesunden, obwohl diese Erkrankung auch mit erhöhtem oxidativem Stress assoziiert ist und oft zusätzlich eine eingeschränkte Nierenfunktion vorliegt. Allerdings sind Patienten mit einer schweren Herzinsuffizienz auch hypervolämisch und hypoproteinämisch, was zu einem Verdünnungseffekt und erniedrigter Proteinbindung führt und die niedrige CML-Konzentration erklären könnte. Im Gegensatz dazu ist die CML-Konzentration nach Herztransplantation höher als bei den herzinsuffizienten Patienten und den Gesunden. Hier ist die Plasmaproteinkonzentration wieder im Normbereich. Die eingeschränkte Nierenfunktion besteht weiterhin, und die Immunsuppression könnte die CML-Konzentration auch beeinflussen [32].

Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz haben eine erhöhte CML-Konzentration im Serum, beziehungsweise Plasma. Als Ursache dafür wird zum einen die unzureichende Ausscheidung von CML durch die Niere und zum anderen der erhöhte oxidative Stress mit erhöhter Neubildung von CML diskutiert [22,23,27,30]. Ursache für den erhöhten oxidativen Stress scheint die Urämie selbst, der chronische Entzündungszustand und die Mangelernährung zu sein [26]. Diese und konventionelle Risikofaktoren wie Diabetes mellitus könnten eine Rolle für die Pathogenese von kardiovaskulären Erkrankungen bei Dialysepatienten spielen [26,31]. Die genauen Konsequenzen der CML-Akkumulation sind allerdings nicht genau bekannt [23]. Eine erhöhte CML-Konzentration im Plasma/Serum scheint aber nicht zu einer erhöhten Mortalität zu führen [26,27].

Im Vergleich zu Gesunden lässt sich schon in nicht-dialysepflichtigen Stadien der chronischen Niereninsuffizienz eine erhöhte CML-Konzentration nachweisen [26]. Signifikant höher wird diese, wenn es zum chronischen Nierenversagen und zur Dialysepflichtigkeit kommt [26,27]. Ob Peritonealdialyse oder Hämodialyse spielt dabei keine Rolle, zwischen beiden Verfahren gibt es keinen signifikanten Unterschied [22]. Auch die Dialysemembran bei der Hämodialyse beeinflusst die CML-Konzentration nicht [26]. CML korreliert negativ mit der glomerulären Filtrationsrate, wie auch immer diese berechnet wird (Kreatinin-Clearance, Cockcroft-Gault-Formel) [23,30] und positiv mit dem Serum Kreatinin [22,27,30].

Patienten nach einer erfolgreichen Nierentransplantation haben im Vergleich zu Dialysepatienten niedrigere CML-Konzentrationen, aber immer noch höhere als

Gesunde [26,30]. Auch bei Kindern lässt sich dies auf einem insgesamt niedrigeren Niveau beobachten [22]. Ursache dafür kann die immer noch eingeschränkte Nierenfunktion sein, aber auch die Immunsuppression mit Glukokortikoiden und/oder Ciclosporin A könnte oxidativen Stress verursachen [22].

Bei der Bewertung der Studienergebnisse sind die Faktoren Alter, Rauchen und Erkrankungen wie Diabetes mellitus zu betrachten, die alle einen individuellen Einfluss auf die CML-Konzentration haben könnten. Bei gesunden und dialysepflichtigen Kindern korreliert die CML-Konzentration mit dem Alter, bei Erwachsenen nicht mehr [22]. Nikotinabusus beeinflusst die CML-Konzentration nicht, weder bei Dialysepatienten noch bei Gesunden [27], und die CML-Konzentration von Dialysepatienten mit Diabetes mellitus unterscheidet sich nicht signifikant von der dialysepflichtiger Nichtdiabetiker [33].

1.5.5. N^ε-(Carboxymethyl)Lysin im Atemkondensat

CML im Atemkondensat wurde erstmals vom Institut für Arbeitsmedizin und Sozialmedizin der RWTH Aachen nachgewiesen. Bislang gibt es dazu sehr wenige Veröffentlichungen. Der Nachweis gelang mit dem beschriebenen Verfahren bei acht von zehn gesunden Probanden und bei elf Patienten mit Erkrankungen wie COPD (n=10), Diabetes mellitus Typ 2 (n=4) und Pneumonie (n=1). Bei letzterem ließ sich eine besonders hohe CML-Konzentration nachweisen [34]. Das Nachweisverfahren wurde noch weiterentwickelt [3], und weitere Forschungsprojekte zu CML im Atemkondensat wurden begonnen, deren Ergebnisse noch nicht veröffentlicht wurden.

1.6. 3-Nitrotyrosin

1.6.1. Entstehung und Eigenschaften von 3-Nitrotyrosin

Nitrotyrosin ist ein Marker für oxidativen Stress und entsteht durch die Nitrierung der Aminosäure Tyrosin.

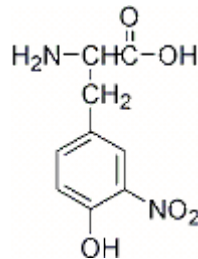


Abbildung 4: 3-Nitrotyrosin

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein hochreaktives Gas mit niedrigem Molekulargewicht [9]. Es ist relativ langlebig, hat eine hohe Diffusionsrate [35] und entsteht aus der Hydroxylierung von L-Arginin durch die Stickstoffmonoxidsynthetase (NOS) [36]. NO wirkt vaso- und bronchodilatierend, hemmt die Aggregation und Adhäsion von Thrombozyten, wirkt als Neurotransmitter und Signalmolekül [9], fördert die Mukosekretion und reguliert die mukociliäre Clearance [36]. Es wird auch bei chronischen Entzündungen und Infektionen freigesetzt [9] und spielt eine Rolle bei der unspezifischen Immunabwehr, indem es antimikrobiell gegen pathogene Keime wirkt [9] und die Leukozytenaktivität und –adhäsion hemmt [35]. NO ist aber auch beteiligt an der Bildung von reaktiven Zwischenprodukten und kann durch diese die Lunge schädigen [35].

Die NOS liegt in Form von drei Isoenzymen vor, neuronale NOS, induzierbare NOS und endotheliale NOS [9]. Alle Formen kommen unter anderem in den Epithelzellen der Alveolen und der Atemwege, in Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, Mastzellen, Gefäßendothelzellen und glatten Muskelzellen vor [35].

In den Entzündungszellen, besonders in den eosinophilen Granulozyten, werden nicht nur NO, sondern, mittels NADPH-Oxidase, auch oxidative Radikale wie Superoxid (O₂⁻) gebildet [9,36]. NO und O₂⁻ reagieren zu dem hochreaktiven Peroxynitrit (ONOO⁻) [9,37], das mit einer Halbwertszeit von etwa einer Sekunde zu den langlebigen Radikalen gehört. Die lange Halbwertszeit

ermöglicht dem ONOO^- , Strecken in der Größe eines Zelldurchmessers per Diffusion zu überwinden [15]. ONOO^- ist wahrscheinlich unter anderem auch verantwortlich für Lipidperoxidation, Oxidation von Proteinen, Vitaminen und DNA [15], die Zerstörung des Atemwegsepithels [38] und die Zerstörung von Proteinen und Lipiden in Zellmembranen und führt zu Hypereagibilität der Atemwegsschleimhäute und erhöhter Rekrutierung von Entzündungszellen [9]. ONOO^- entsteht aber auch bei der Oxidation von Nitrit (NO_2^-) durch die Myeloperoxidase (MPO) [35] oder die Eosinophilperoxidase (EPO), die in verschiedenen Leukozyten zu finden sind [36,39]. ONOO^- ist in der Lage, Tyrosin zu nitrieren und bildet so Nitrotyrosin [9], das frei oder proteingebunden vorliegen kann [40].

Es scheint so, dass Nitrotyrosin nicht einfach nur ein inaktiver Marker, sondern auch ein Mediator bei Entzündungsreaktionen ist, indem es die Phosphorylierung der Tyrosinkinasen verhindert und viele Enzyme inaktivieren kann [35].

1.6.2. Nachweis von 3-Nitrotyrosin

Nitrotyrosin im Atemkondensat kann man mittels spezifischem Enzymimmunoassay (ELISA, enzyme-linked immuno sorbent assay) [41], Gaschromatographie/ Tandem-Massenspektrometrie (GC-MS/MS) und Hochleistungsflüssigchromatographie/ Massenspektrometrie bestimmen. Zum Nachweis von niedrigen Konzentrationen, wie im Fall von Nitrotyrosin im Atemkondensat von Gesunden, eignet sich die Flüssigkeitschromatographie/Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS), da sie hochsensitiv und zuverlässig ist [40].

1.6.3. Bei welchen Erkrankungen ist die 3-Nitrotyrosinkonzentration erhöht?

Bei Gesunden ist Nitrotyrosin im Plasma nicht nachweisbar [44,45]. Im Vergleich dazu ist die Nitrotyrosinkonzentration im Plasma bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz [44], rheumatoider Arthritis [45], septischem Schock [44] und Diabetes mellitus Typ 2 [45] erhöht. 90% des Nitrotyrosins im Plasma ist proteingebunden [46]. Es findet sich auch im Bereich von arteriosklerotischen Veränderungen [45] sowie im Endokard von Patienten mit dilatativer und ischämischer Kardiomyopathie [47].

Ursachen für die erhöhte Nitrotyrosinkonzentration im Plasma bei chronischer Niereninsuffizienz kann sein, dass Nitrotyrosin nicht über die Nieren eliminiert werden kann und/oder durch den erhöhten oxidativen Stress vermehrt produziert wird [44].

Auch im Urin ist Nitrotyrosin nachweisbar. Bei der Interpretation der Ergebnisse muss man allerdings bedenken, dass der Nitrotyrosinmetabolismus in der Niere nicht genau bekannt ist [46]. Da Proteine normalerweise nicht über die Niere ausgeschieden werden, ist im Urin fast nur freies Nitrotyrosin nachzuweisen [46].

Ob Nitrotyrosin allerdings auch im Atemkondensat von niereninsuffizienten Patienten nachgewiesen werden kann, ist bisher noch nicht untersucht worden.

1.6.4. 3-Nitrotyrosin im Atemkondensat

Im Atemkondensat ist Nitrotyrosin erhöht bei Asthma bronchiale [37,41], bei Cystischer Fibrose (CF, Mukoviszidose) [42] und chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (COPD) [9].

Asthma bronchiale ist mit erhöhtem oxidativem Stress assoziiert. Es liegt eine chronische Entzündung der Atemwege vor, wobei die eosinophilen Granulozyten und andere Entzündungszellen große Mengen hochreaktiver oxidativer Radikale produzieren. Die NO-Produktion ist bei Asthmatikern ebenfalls erhöht. Somit wird auch vermehrt Peroxynitrit produziert, dessen Menge mit der bronchialen Hyperreaktivität bei Asthmatikern korreliert. Das führt zur vermehrten Bildung von Nitrotyrosin [37], welches sich im Atemkondensat [37,41], im Gewebe [38] und in der BAL [39] nachweisen lässt. Beim Asthma bronchiale eignet sich Nitrotyrosin im Atemkondensat als Marker für die Diagnose und zur Therapiekontrolle, da bei einer oralen oder inhalativen

Glukokortikoidtherapie die Konzentration von Nitrotyrosin im Atemkondensat geringer ist als bei Asthmatikern, die nicht mit Glukokortikoiden behandelt werden, oder Gesunden. Am höchsten ist die Nitrotyrosinkonzentration im Atemkondensat bei Asthmatikern mit glukokortikoidfreier Therapie [41]. Der Effekt von inhalativen Glukokortikoiden ist auch immunhistochemisch im Epithel der Atemwege und in den Entzündungszellen nachzuweisen, denn das bei Asthmatikern im Vergleich zu Gesunden deutlich erhöhte Nitrotyrosin im Gewebe nimmt nach inhalativer Glukokortikoidtherapie ab [38]. Es scheint so zu sein, dass Glukokortikoide den oxidativen Stress durch die Entzündung unterdrücken [41].

Cystische Fibrose ist mit rezidivierenden bronchialen Infekten durch die zähe Schleimproduktion und erhöhtem oxidativem Stress assoziiert, was zur Zerstörung der Atemwege führt. Im Atemwegsepithel und den Entzündungszellen wurden erhöhte Mengen von Nitrotyrosin nachgewiesen [42]. Glukokortikoide haben keinen Einfluss auf die Nitrotyrosinkonzentration im Atemkondensat [42]. Eine denkbare Ursache dafür kann sein, dass hier eine andere Art von Entzündung vorliegt, ähnlich der bei der COPD [42].

Das Rauchen von Zigaretten ist auch mit erhöhtem oxidativem Stress verbunden, schon allein weil Zigarettenrauch große Mengen an oxidativen Radikalen und NO enthält. Aber weder chronischer noch akuter Nikotinabusus erhöht die Nitrotyrosinkonzentration im Atemkondensat [40,43]. Mögliche Ursachen dafür können sein, dass das NO aus dem Zigarettenrauch die endogene NO-Produktion durch die NOS inhibiert, oder dass der Zigarettenrauch die Nitrotyrosinbildung hemmt [43].

1.7. Aminosäuren

1.7.1. Lysin

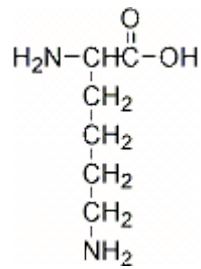


Abbildung 5: Lysin

Lysin ist eine essentielle Aminosäure mit einer polaren, basisch hydrophilen Seitenkette. Die Seitenkette ist unter physiologischen Bedingungen positiv geladen. Lysin leitet sich von Capronsäure ab, deren endständige Methylgruppe mit einer Aminogruppe substituiert ist [48,49].

Lysin wird in Pflanzen und Mikroorganismen aus Aspartat gebildet [50].

Abgebaut wird Lysin hauptsächlich in den Mitochondrien der Leberzellen. Nach irreversibler Transaminierung der ϵ -Aminogruppe und anderen Zwischenschritten entsteht Acetyl-CoA, das in Ketonkörper umgewandelt und damit zur Energiegewinnung benutzt werden kann [50,51].

Das Hydroxyderivat von Lysin ist ein Kollagenbestandteil. Durch die oxidative Desaminierung der ϵ -Aminogruppe des Lysins und Hydroxylysins bilden sich Quervernetzungen, und das fertige Kollagen wird unlöslich [52].

1.7.2. Tyrosin

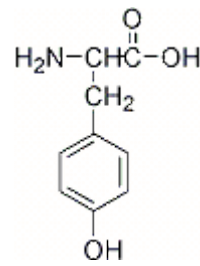


Abbildung 6: Tyrosin

Tyrosin ist eine bedingt essentielle Aminosäure und entsteht aus Phenylalanin, das in Parastellung hydroxyliert wird. Es ist eine polare Aminosäure mit aromatischer, sauer hydrophiler Seitenkette. Allerdings liegt Tyrosin unter physiologischen Bedingungen nicht ionisiert vor und ist folglich ungeladen [48,49].

Tyrosin wird im Cytosol der Leberzellen gebildet, wo Phenylalanin durch die Phenylalaninhydroxylase irreversibel hydroxyliert wird. Phenylalanin ist eine essentielle Aminosäure, da dessen aromatische Seitenkette nicht vom Körper selbst synthetisiert und Phenylalanin auch nicht aus Tyrosin produziert werden kann [50,51].

Der Abbau beginnt ascorbinsäureabhängig im Cytosol und den Mitochondrien der Leberzellen. Tyrosin wird zuerst transaminiert und dann zu Fumarat, ein Bestandteil des Citratzyklus, und Acetoacetat, das in Ketonkörper umgewandelt werden kann, abgebaut. Beide Abbauprodukte können in den peripheren Organen zur Energiegewinnung genutzt werden [50,51].

Tyrosin ist die Vorstufe von Dopa, Dopamin, Noradrenalin, Adrenalin, Melanin und der Schilddrüsenhormone Trijodthyronin (T₃) und Thyroxin (T₄) [50,51].

Eine der bekanntesten Störungen im Phenylalaninstoffwechsel ist die Phenylketonurie. Bei dieser autosomal-rezessiv vererbten Erkrankung ist das Enzym Phenylalaninhydroxylase defekt. Tyrosin wird dann zur essentiellen Aminosäure, da es durch den Enzymdefekt nur sehr langsam gebildet werden kann. Das im Körper angereicherte Phenylalanin wird zu Ketonkörpern abgebaut und im Urin ausgeschieden [50,51].

1.7.3. Prolin

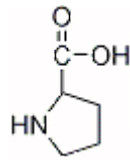


Abbildung 7: Prolin

Prolin ist eine nicht essentielle, apolare Aminosäure mit zyklischem Aufbau, und ist die Carbonsäure des Pyrrolidinrings, also eigentlich eine Iminosäure. Die Seitenkette ist hydrophob und durch die Ringform starr [48,49].

Prolin entsteht entweder aus der Reduktion von Glutamat oder aus der Transaminierung von Ornithin. Das entstandene Zwischenprodukt kondensiert intramolekular zu Pyrrolincarboxylat, das zu Prolin hydriert wird [50,51].

Beim Abbau wird der Ring hydrolytisch gespalten und zu α -Ketoglutarat abgebaut, welches ein Bestandteil des Citratzyklus ist und in diesen zur Energiegewinnung einfließen kann [50,51].

Prolin ist die Vorstufe von Hydroxyprolin, das erst nach Einbau in eine Peptidkette durch Hydroxylierung des Prolins entsteht, da es für Hydroxyprolin keine tRNA gibt. Freies Hydroxyprolin kann darum auch nicht wieder in eine Peptidkette eingebaut werden. Es muss abgebaut und ausgeschieden werden [50,51,52].

Prolin und Hydroxyprolin sind mit 25% neben Glycin Hauptbestandteile des Kollagens. Hydroxyprolin gilt als Marker für den Knochen- und Bindegewebsabbau, da es nur in Kollagen vorkommt [52].

1.8. Zielsetzung der Arbeit

Zusammenfassend kann man sagen, dass das Atemkondensat die aktuelle Stoffwechsellage der Lunge widerspiegelt. Dessen Gewinnung und Analyse kann in der Pulmologie und Arbeitsmedizin zur Diagnostik und Therapieüberwachung eingesetzt werden und ist eine nicht-invasive, ergänzende Untersuchungsmethode. Bei vor allem respiratorischen Erkrankungen wurden erhöhte Konzentrationen von Markern für oxidativen Stress im Atemkondensat nachgewiesen.

Zwei dieser Marker sind CML und Nitrotyrosin. Beim chronischen Nierenversagen als Endstadium der chronischen Niereninsuffizienz sind die Konzentrationen dieser beiden Marker im Blut erhöht.

Als Ziel dieser Arbeit wird der Einfluss des chronischen Nierenversagens auf die Konzentration der Marker für oxidativen Stress im Atemkondensat untersucht.

Es ergeben sich die folgenden Hypothesen:

Die CML- und Nitrotyrosinkonzentration im Atemkondensat, im Urin und im Serum sind bei Patienten mit chronischem Nierenversagen höher als bei der gesunden Kontrollgruppe.

Sollte sich dies bestätigen, so könnte man Rückschlüsse auf den Einfluss der chronischen Niereninsuffizienz auf den Stoffwechsel der Lunge ziehen. Man müsste das Ergebnis bei der Befundinterpretation der Atemkondensatanalyse berücksichtigen, wenn diese Einzug in den klinischen Alltag erhält.

Möglicherweise lassen sich im Rahmen dieser Arbeit weitere Kofaktoren finden, die die Zusammensetzung des Atemkondensats beeinflussen.

2. Material und Methode

2.1. Die niereninsuffiziente Gruppe

2.1.1. Allgemeine Angaben

Bei der untersuchten Gruppe handelte es sich um Patienten (n=27) mit chronischem Nierenversagen, die sich einer ambulanten Nierenersatztherapie unterziehen. Es waren sechs Patienten der Medizinischen Klinik II des Universitätsklinikums Aachen (Klinikdirektor Univ.-Prof. Dr. med. J. Floege) und 21 Patienten des KfH-Nierenzentrums des KfH Kuratoriums für Dialyse und Nierentransplantation e.V. in Aachen (ärztlicher Leiter Prof. Dr. med. S. Heidenreich) bereit, an der Studie teilzunehmen.

Von den 27 Patienten sind 22 männlich und fünf weiblich. Zum Zeitpunkt der Untersuchung waren sie im Mittel $56,4 \pm 14,8$ (26-82) Jahre alt.

2.1.2. Ursache und Therapie der Niereninsuffizienz

Ursache für das chronische Nierenversagen sind unterschiedliche Grunderkrankungen wie diabetische Nephropathie bei vier Patienten, chronische Glomerulonephritis bei zehn Patienten, Schrumpfnieren bei unterschiedlichen Ursachen bei zwei Patienten, Zystennieren bei zwei Patienten, Morbus Wegener bei einem Patienten, akutes Nierenversagen unterschiedlicher Genese bei drei Patienten und sonstige Ursachen bei fünf Patienten. Neun Patienten hatten noch Restdiurese.

Sieben Patienten hatten schon eine und jeweils ein Patient zwei bzw. drei Nierentransplantationen, sind aber nach Transplantatabstoßung bzw. Transplantatversagen wieder dialysepflichtig geworden.

Die Patienten in dieser Gruppe hatten eine durchschnittliche glomeruläre Filtrationsrate (GFR) von $5,5 \pm 1,9$ (3,7-13,1) ml/min/1,73m² (korrigierte MDRD-Formel, Levey 2005).

26 Patienten wurden dreimal pro Woche hämodialysiert, ein Patient viermal. Sie waren durchschnittlich seit $6,7 \pm 5,4$ (0,5-19) Jahren dialysepflichtig.

2.1.3. Vorerkrankungen

Die Gruppe hatte einen durchschnittlichen Body Mass Index (BMI) von $23,6 \pm 2,4$ ($19,6-29,4$) kg/m^2 , wobei 19 Patienten nach der aktuellen Gewichtsklassifikation der WHO von 2000 normalgewichtig und acht Patienten präadipös waren.

5 Patienten rauchten (durchschnittlich $18,4 \pm 14,9$ ($5,2-38,3$) packyears), 13 rauchten nicht mehr ($18,9 \pm 24,3$ ($1,7-84$) packyears) und 9 haben noch nie geraucht.

Bei insgesamt sechs Patienten war ein Diabetes mellitus bekannt, fünf Patienten hatten einen Typ 2 und ein Patient einen Typ 1. Letzterer ist Zustand nach Pankreastransplantation und somit normoglykämisch ohne weitere Therapie. Drei der sechs Patienten hatten als Komplikation eine diabetische Polyneuropathie und zwei eine diabetische Retinopathie. Vier der Typ 2-Diabetiker wurden mit Insulin, einer diätetisch behandelt.

24 Patienten hatten eine bekannte arterielle Hypertonie, die meist mit einer Kombination aus β -Blockern, Diuretika, ACE-Hemmern, Calcium-Antagonisten, AT 2-Blocker und/oder sonstigen Antihypertensiva therapiert wurde. Bei sieben Patienten war eine koronare Herzerkrankung (KHK) bekannt, und fünf Patienten hatten bereits einen Myokardinfarkt erlitten. Zwei Patienten hatten in der Vergangenheit eine transitorisch ischämische Attacke (TIA). Keiner litt an chronischen Atemwegserkrankungen wie Asthma bronchiale oder chronischer Bronchitis.

An renaler Anämie litten 13 Patienten, an sekundärem Hyperparathyreoidismus 11 Patienten und an renaler Osteopathie/Osteoporose fünf Patienten. Alle niereninsuffizienten Patienten wurden entsprechend ihrer Mangelzustände und niereninsuffizienzassoziierten Erkrankungen mit Calcium, Magnesium, Folsäure, Vitamin D und sonstigen Vitaminen, Eisen, Erythropoetin und Phosphatbindern behandelt.

Vier Patienten erhielten auf Grund von Nierentransplantationen Decortin, ein sonstiges Immunsuppressivum oder beides.

2.1.4. Ausgeschlossene Patienten

Ursprünglich hatten insgesamt 30 Patienten der Teilnahme an der Studie zugestimmt. Bei drei Patienten konnte die Untersuchung jedoch nicht zuende durchgeführt werden. Bei einer Patientin konnte die Atemkondensatsammlung nicht stattfinden, da sie auf Grund einer Shuntthrombose im rechten Oberschenkel nicht halb aufrecht sitzen konnte und es nicht möglich war, die Atemkondensatsammlung durchzuführen. Als diese ausgeheilt war, kam es bei einem erneuten Versuch, Atemkondensat zu sammeln, zu einer dialysebedingten Hypotonie, die eine Schocklagerung zur Folge hatte. Beim dritten Versuch litt die Patientin an einem respiratorischen Infekt. Dies alles hatte die Einigung zur Folge, dass diese Patientin nicht mehr an der Studie teilnehmen würde. Bei einer weiteren Patientin musste die Atemkondensatsammlung abgebrochen werden, da es zu dialysebedingter Übelkeit kam. Das sei bei dieser Patientin bereits öfter vorgekommen und bekannt. Eine dritte Patientin atmete nur durch die Nase. Sie gab an, das Gefühl zu haben nur durch den Mund nicht genügend Luft zu bekommen. Dadurch war eine Atemkondensatsammlung nicht möglich.

Die drei Patientinnen hatten ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme am Forschungsvorhaben gegeben. Alle Marker aus den vorhandenen Proben wurden darum auch bestimmt, sie gehen aber nicht in die Auswertung ein, und im Rahmen dieser Arbeit besteht die niereninsuffiziente Gruppe aus 27 Patienten.

2.2. Die gesunde Kontrollgruppe

2.2.1. Allgemeine Angaben

Bei der Kontrollgruppe handelte es sich um nierengesunde Probanden (n=28), 14 männliche und 14 weibliche. Sie waren im Mittel $45,9 \pm 11,5$ (30-64) Jahre alt.

2.2.2. Vorerkrankungen

Die Gruppe hatte einen durchschnittlichen BMI von $26,0 \pm 3,9$ (20,2-35,7) kg/m². 12 Probanden waren normalgewichtig und 13 präadipös. Zwei Probanden litten an Adipositas I. Grades und einer an Adipositas II. Grades (nach WHO, 2000).

In der Kontrollgruppe gab es 8 Raucher (durchschnittlich $17,4 \pm 16,2$ (1-43) packyears), 8 rauchen nicht mehr ($27,4 \pm 22,7$ (6,6-70) packyears) und 13 haben noch nie geraucht.

Keiner litt an Diabetes mellitus, arterieller Hypertonie, KHK oder hatte bereits einen Myokardinfarkt erlitten. Ein Proband hatte einen Schlaganfall in der Vorgeschichte gehabt (atypisch, Thrombose bei persistierendem Foramen ovale), bei ihm war keine Arteriosklerose bekannt. Keiner litt an chronischen Atemwegserkrankungen wie Asthma bronchiale oder chronischer Bronchitis. Keiner litt zum Zeitpunkt der Untersuchung an einer sonstigen, ernsthaften Erkrankung.

2.3. Ein- und Ausschlusskriterien

In die Untersuchung eingeschlossen wurden Patienten mit einem chronischen Nierenversagen, die eine ambulante Hämodialyse erhalten und nierengesunde Probanden. Die Kontrollgruppe sollte im Vergleich zur Dialysegruppe etwa dasselbe Durchschnittsalter haben.

Von der Untersuchung ausgeschlossen waren Patienten mit chronischen Atemwegserkrankungen wie Asthma bronchiale und chronisch obstruktiver Lungenerkrankung. Ebenfalls ausgeschlossen waren Patienten mit behandlungspflichtigen Allergien, akutem Heuschnupfen oder aktuellen Infekten der oberen Atemwege.

Die Raucher wurden gebeten, zwei Stunden vor der Messung nicht mehr zu rauchen.

Bei den Dialysepatienten wurden diejenigen ausgeschlossen, die aufgrund ihrer Shuntlokalisation oder Hypotonie nicht eine halbliegende bzw. halbsitzende Position einnehmen konnten.

2.4. Einverständnis

Alle Patienten gaben nach ausführlicher Erläuterung ihr schriftliches Einverständnis. Ebenfalls informiert wurden die beiden ärztlichen Leiter der für die Dialyse zuständigen Zentren, und beide gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Durchführung der Untersuchung an ihren Patienten und in ihren Räumlichkeiten.

2.5. Ethikkommission

Die Ethikkommission an der Medizinischen Fakultät der RWTH Aachen stimmte dem Forschungsvorhaben zu.

2.6. Ablauf der Messung

2.6.1. Anamneseerhebung

Bei allen Patienten und Probanden wurde vor Beginn der Messung eine vollständige Anamnese erhoben. Sie umfasste Herz-Kreislaufferkrankungen, Atemwegserkrankungen, Erkrankungen des Zentralen Nervensystems, des Verdauungssystems und des Blutes, Stoffwechselerkrankungen, Erkrankungen des Auges und des Bewegungsapparats, Erkrankungen der Nieren und ableitenden Harnwege, Allergien, vorausgegangene Operationen, aktuelle Medikation, Familienanamnese, Angaben über Nikotin- und Alkoholgenuß und sportliche Aktivität.

2.6.2. Atemkondensat

2.6.2.1. Technische Grundlagen

Für die Atemkondensatsammlung wurden der Kondensator ECoScreen 1 der Fa. Cardinal Health (Höchberg, Deutschland) und das Flussmessgerät ECoVent ebenfalls von der Fa. Cardinal Health verwendet.

Der ECoScreen 1 besteht aus einem In-/Ex-Ventilblock mit einem über Krümmer verbundenen Mundstück und einem Teflon-beschichteten Lamellenkondensator mit angeschlossener Probennahmekappe, welcher in die an das Kälteaggregat angeschlossene Kühlmanschette gesteckt wird. Alle Bestandteile wurden nach jedem Gebrauch nach Empfehlung des Herstellers desinfiziert.

An den Ausatemschenkel des Ventilblocks wurde der ECoVent angeschlossen, mit dem es möglich ist, verschiedene respiratorische Parameter zu messen, wie das geatmete Volumen, die vergangene Zeit, den expiratorischen Peakfluss, das Atemminutenvolumen, das Atemzugvolumen und die Atemfrequenz. Das Gerät gibt nach dem Erreichen eines vorher eingegebenen Zielvolumens einen Signalton ab.

Der Proband atmet Frischluft ein. Die ausgeatmete Luft gelangt durch den Lamellenkondensator in die Kühlmanschette, wo sie auf ca. $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt wird und kondensiert. Anschließend strömt sie durch den ECoVent in die Umgebung. Das Kondensat wird in der Probenkappe, die auf den Lamellenkondensator aufgesteckt wird, aufgefangen.

2.6.2.2. Durchführung

Die Durchführung der AK-Sammlung entsprach den „Richtlinien zur Sammlung von Atemkondensat“ des Instituts für Arbeitsmedizin und Sozialmedizin des Universitätsklinikums Aachen.

Die Probanden wurden gebeten, ohne Verwendung einer Nasenklammer und ohne zu speicheln bis zum Erreichen eines Gesamtvolumens von 200 l ruhig durch das Mundstück ein- und auszuatmen. Dafür benötigten die Teilnehmer der Studie (n=55) im Durchschnitt $24,75 \pm 11,40$ (11,0-58,0) Minuten. Es entstanden im Schnitt $3,34 \pm 1,0$ (0,5-7,0) ml Atemkondensat. Während der Messung wurden zu drei verschiedenen Zeitpunkten die respiratorischen Parameter registriert.

Bei der niereninsuffizienten Gruppe fand die Sammlung während der laufenden Hämodialyse in dem entsprechenden Dialysezentrum statt, bei der Kontrollgruppe in der Ambulanz des Instituts für Arbeitsmedizin und Sozialmedizin im Universitätsklinikum Aachen.

Bei den Dialysepatienten vergingen zwischen Dialysebeginn und Beginn der Atemkondensatsammlung $82,1 \pm 51,5$ (5-215) Minuten.

2.6.2.3. Weitere Verarbeitung des Atemkondensats

Unmittelbar nach Beendigung der Sammlung wurden immer 500 µl des Atemkondensats mit einer geeichten Pipette (Reference® (variabel) 100-1000 µl, Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland) in 1,5 ml Reagiergefäße (Fa. Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) aliquotiert. Danach wurden sie sofort bei –86 °C in einem Tiefkühlschrank (Thermo Scientific Forma® Freezer, Model 982, Fa. Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) bis zur weiteren Verwendung eingefroren. Bei den Atemkondensatsammlungen im KfH-Nierenzentrum war die sofortige Lagerung im Tiefkühlschrank nicht möglich, so dass die Reagiergefäße mit den Atemkondensatproben in Trockeneis (Fa. Linde-Gas, Pullach, Deutschland) aufbewahrt und transportiert wurden. Das Trockeneis erreichte auch Temperaturen von –80 °C.

2.6.3. Blutprobe

2.6.3.1. Blutentnahme

Den Dialysepatienten wurde arteriovenöses Blut unter sterilen Kautelen aus dem Shunt entnommen. Dies geschah im Rahmen der Shuntpunktion zu Dialysebeginn. Bei der Kontrollgruppe wurde venöses Blut unter sterilen Kautelen aus einer Armvene vor bzw. kurz nach Beginn der Atemkondensatsammlung entnommen. Bei beiden Gruppen wurde jeweils eine 9 ml S-Monovette® mit Kalium-EDTA und einer 4,9 ml Serum-Gel S-Monovette® (Fa. Sarstedt) verwendet. Bis zur Probenverarbeitung wurde das Blut bei ca. 4 °C in einem Kühlschrank aufbewahrt.

2.6.3.2. Weitere Verarbeitung der Blutprobe

Direkt nach Abschluss der Atemkondensatsammlung wurde das EDTA-Blut bei 2400 Umdrehungen/min (800 G) 10 Minuten zentrifugiert. Verwendet wurde die Multispeed reffridgerated Centrifuge (Model PK131R, Fa. ALC, Monzese, Italien). Jeweils 1000 µl des Plasmas wurden mit einer Pipette (Reference® (fix) 1000 µl, Fa. Eppendorf) in 1,5 ml Reagiergefäße (Fa. Sarstedt) aliquotiert. Das Plasma wurde sofort bei –26°C in einem Tiefkühlschrank (economic NoFrost, Fa. Bosch, Stuttgart, Deutschland) eingefroren. Danach wurden die Erythrozyten dreimal bei 2400 Umdrehungen/min (800 G) für 10 Minuten mit 0,9% NaCl-Lösung gewaschen. Anschließend wurde den gewaschenen Erythrozyten Aqua dest. zugefügt, wodurch die Erythrozyten zerstört wurden. Die so entstandenen Hämolysate wurden ebenfalls bei –26°C in dem Tiefkühlschrank eingefroren.

Die Serum-Monovetten® wurden bei 3000 Umdrehungen/min (1000 G) 10 Minuten zentrifugiert. Danach wurden jeweils 1000 µl des Serums mit einer Pipette (Reference® (fix) 1000 µl, Fa. Eppendorf) in 1,5 ml Reagiergefäße (Fa. Sarstedt) aliquotiert. Das Serum wurde ebenfalls sofort bei –26°C eingefroren, der Rest verworfen.

2.6.4. Urinprobe

Alle Probanden der Kontrollgruppe sowie die Dialysepatienten mit Restdiurese gaben eine Urinprobe ab. Die Probanden der Kontrollgruppe füllten selbst 10 ml des Urins nach Erläuterung des Systems in Urin-Monovetten® (Fa. Sarstedt) ab. Den Dialysepatienten mit Restdiurese wurden sterile Urin-Gefäße mit Schraubverschluss (100 ml, Fa. Sarstedt) gegeben, in die sie unmittelbar vor der Anreise zur Dialyse eine Urinprobe abgaben. Davon wurden wieder 10 ml in die Urin-Monovetten® (Fa. Sarstedt) gegeben. Anschließend wurden die Urinproben bei -26°C bis zur weiteren Verwendung im Tiefkühlschrank (economic NoFrost, Fa. Bosch) eingefroren.

2.7. Laborchemische Messungen der einzelnen Marker

2.7.1. Vorbemerkungen

Die verschiedenen Marker wurden alle nach den gültigen institutseigenen Methodenvorschriften im Labor des Instituts für Arbeitsmedizin und Sozialmedizin des Universitätsklinikums Aachen bestimmt. Die Methoden wurden teilweise von den Mitarbeitern des Instituts neu entwickelt oder verbessert. Die Verfahren sind sicher und empfindlich und die Nachweisgrenzen ausreichend. Durch den massenspektrometrischen Nachweis und einen isotope-markierten Internen Standard ist eine hohe Spezifität und Präzision der einzelnen Verfahren gewährleistet.

2.7.2. Bestimmung von CML im Urin und Serum

CML im Urin und Serum wurde mittels Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS-SIM) gemessen. Verwendet wurde der Gaschromatograph 6890 mit massenselektivem Detektor 5973 (Hewlett-Packard).

Das CML aus der Probe wurde in wässriger Lösung mit Ethylchlorformiat derivatisiert und die entstandenen Derivate in Chloroform extrahiert. Die Chloroformphase wurde im Stickstoffstrom getrocknet und der Rückstand in Dimethylformamid aufgenommen. Das derivatisierte CML wurde anschließend mittels Gaschromatographie getrennt und massenspektrometrisch detektiert.

Als interner Standard wurde den Urin- und Serum-Proben d-4-CML zugesetzt. Die Berechnung der Konzentration erfolgte gegen die jeweils erstellten Kalibrierkurven, die mit Hilfe von Vergleichsstandards erstellt wurden. Die Vergleichsstandards wurden in verdünntem Poolurin beziehungsweise desaktiviertem Rinderserum angesetzt und genauso behandelt wie die zu analysierenden Proben. Die Nachweisgrenzen von CML liegen bei 0,05 mg/l Urin und 0,1 mg/l Serum. Die Methode basiert auf einem Verfahren [53], dass durch Dr. rer. nat. Schettgen (Institut für Arbeitsmedizin und Sozialmedizin, UKA) weiterentwickelt wurde.

2.7.3. Bestimmung von Kreatinin im Urin

Kreatinin im Urin wurde mittels Photometrie bestimmt. Verwendet wurde das Plattenphotometer Mulitskan Ascent (Labsystems).

Kreatinin reagiert in alkalischer Lösung mit Pikrinsäure zum gelb-orangen Meisenheimer-Komplex (Jaffé-Reaktion), dessen Extinktion bei 492 nm photometrisch gemessen wurde.

Die Berechnung der Konzentration erfolgte gegen die erstellte Kalibrierkurve aus den in Wasser angesetzten Vergleichsstandards. Die Nachweisgrenze liegt bei 0,1 g/l Urin. Dieses Verfahren [54] wird weltweit so eingesetzt.

2.7.4. Bestimmung von Kreatinin im Serum

Kreatinin im Serum wurde durch das Zentrallabor des Universitätsklinikums Aachen nach den dort geltenden Standards bestimmt.

2.7.5. Bestimmung von CML und Lysin im Atemkondensat

CML und Lysin im Atemkondensat wurden mittels Hochleistungsflüssigchromatographie/Tandem-Massenspektrometrie (HPLC-MS/MS) gemessen. Verwendete Messgeräte waren der Hochleistungsflüssigchromatograph 1100 series (Agilent) mit integriertem Probengeber und der MS/MS-Detektor API-3000 (Applies Biosystems).

Das Atemkondensat wurde gefriergetrocknet und dann in das Eluentengemisch der HPLC aufgenommen, mittels Hydrophilic Ion Liquid Interaction Chromatography (HILIC) getrennt und tandem-massenspektrometrisch detektiert. Das Eluentengemisch besteht aus 5 mM Ammoniumacetat in Aqua bidest. und 0,025% Ameisensäure in Acetonitril im Verhältnis 40:60. CML und Lysin wurden simultan quantifiziert.

Als interner Standard wurde den Atemkondensatproben d-4-CML und d-4-Lysin zugesetzt. Die Berechnung der Konzentration erfolgte gegen die jeweils erstellten Kalibrierkurven, die aus den in Aqua bidest. angesetzten Vergleichsstandards erstellt wurden. Die Nachweisgrenze von CML liegt bei 10 ng/l Atemkondensat und von Lysin bei 0,5 µg/l Atemkondensat. Diese Methode wurde von Dr. rer. nat. Schettgen entwickelt [3].

2.7.6. Bestimmung von Prolin, Tyrosin und 3-Nitrotyrosin im Atemkondensat

Prolin, Tyrosin und Nitrotyrosin wurden ebenfalls mittels HPLC-MS/MS bestimmt. Bei diesem Verfahren wurde auch trans-Hydroxyprolin mitbestimmt. Verwendete Messgeräte waren dieselben wie beim CML und Lysin im Atemkondensat.

Auch hier wurde das Atemkondensat gefriergetrocknet, in das Eluentengemisch der HPLC aufgenommen, mittels HILIC getrennt und tandem-massenspektrometrisch detektiert. Das Eluentengemisch besteht aus 5 mM Ammoniumacetat in Aqua bidest. und 0,025% Ameisensäure im Verhältnis 20:80. Die Marker wurden auch hier simultan bestimmt.

Als interner Standard wurde den Atemkondensatproben Prolin ^{13}C , cis-Hydroxyprolin, d-4-Tyrosin und d-4-Nitrotyrosin zugesetzt. Die Berechnung der Konzentration erfolgte gegen die jeweils erstellten Kalibrierkurven, die mit Hilfe von Vergleichsstandards erstellt wurden. Die Vergleichsstandards wurden in Atemkondensat angesetzt und genauso behandelt wie die zu analysierenden Proben. Die Nachweisgrenzen von Prolin und Tyrosin liegen bei 0,5 µg/l Atemkondensat und von Hydroxyprolin und Nitrotyrosin bei 5 ng/l Atemkondensat. Dieses Verfahren wurde von Dipl.-Biol. Conventz (Institut für Arbeitsmedizin und Sozialmedizin, UKA) im Rahmen ihrer Promotionsarbeit entwickelt [55].

2.8. Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurde SPSS 14.0 für Windows (Version 14.0.1, Fa. SPSS inc., Chicago, USA, Dez. 2005) verwendet. Der Vergleich von Mittelwerten wurde mit dem T-Test bei unabhängigen Stichproben durchgeführt. Zum Nachweis einer Beziehung zwischen kontinuierlichen Variablen wurde Pearson-Korrelation und linearer Regression verwendet. In dieser Variablenselektionsphase wurde ein Signifikanzniveau von 25% verwendet.

Bei der Auswertung der Literatur und der Ergebnisse wurden Parameter gefunden, die die Konzentration der Marker möglicherweise beeinflussen. Den Daten zu diesen Parametern wurde ein mehrfaktorielles varianzanalytisches Modell angepasst, dessen Spezifikation sich aus den entsprechenden Tabellen ergibt. Dabei wurde ein exploratives Signifikanzniveau von 5% verwendet. Die Berechnung erfolgte mit der Prozedur ANOVA von SPSS 14.0.

3. Ergebnis

Die Ergebnisse werden als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung (Minimum-Maximum) dargestellt.

3.1. Allgemeine Angaben der Gruppen

Die Dialysepatienten waren $56,4 \pm 14,8$ (26-82) Jahre alt, die gesunde Kontrollgruppe $45,9 \pm 11,5$ (30-64) Jahre alt, womit die Dialysepatienten signifikant älter waren ($p=0,005$). Sie hatten einen BMI von $23,6 \pm 2,4$ (19,6-29,4) kg/m^2 , die Kontrollgruppe einen von $26,0 \pm 3,9$ (20,2-35,7) kg/m^2 . Die Dialysepatienten hatten somit einen signifikant niedrigeren BMI ($p=0,008$).

Für die Atemkondensatsammlung benötigten die niereninsuffizienten Patienten $27,52 \pm 12,31$ (11,0-58,0) min. Die Atemfrequenz betrug $14,81 \pm 3,54$ (9,2-21,8) /min, das Atemminutenvolumen $8,84 \pm 3,63$ (2,8-18,8) l/min, das Atemzugvolumen $0,70 \pm 0,39$ (0,18-1,73) l und der expiratorische Peakfluss $0,50 \pm 0,32$ (0,2-1,6) l/s. Es konnten $3,44 \pm 0,68$ (1,5-4,5) ml Atemkondensat gewonnen werden.

Die Kontrollgruppe benötigte für die Sammlung $21,63 \pm 9,59$ (12,0-45,0) min. Die Atemfrequenz betrug $16,91 \pm 4,76$ (8,9-25,9) /min, das Atemminutenvolumen $11,09 \pm 4,82$ (3,7-21,0) l/min, das Atemzugvolumen $0,75 \pm 0,32$ (0,34-1,55) l und der expiratorische Peakfluss $0,56 \pm 0,22$ (0,2-0,9) l/s. $3,23 \pm 1,20$ (0,5-7,0) ml Atemkondensat konnten gesammelt werden. Bezüglich dieser Parameter gab es zwischen den beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede. Eine Übersicht gibt Tabelle 2.

		Dialysegruppe	Kontrollgruppe	p-Werte
Alter	[Jahre]	56,4 ± 14,8	45,9 ± 11,5	*0,005
BMI	[kg/m ²]	23,6 ± 2,4	26 ± 3,9	*0,008
Geschlecht	[m/w]	22/5	14/14	*0,022
Dauer Sammlung	[min]	27,52 ± 12,31	21,63 ± 9,59	0,422
BF	[1/min]	14,81 ± 3,54	19,91 ± 4,76	0,069
MV	[l/min]	8,84 ± 3,63	11,09 ± 4,82	0,056
VT	[l]	0,7 ± 0,39	0,75 ± 0,32	0,593
PEF	[l/s]	0,5 ± 0,32	0,56 ± 0,22	0,405
Menge AK	[ml]	3,44 ± 0,68	3,23 ± 1,20	0,422

Tabelle 2: Übersicht allgemeine Angaben der Gruppen, BF= Atemfrequenz, MV= Atemminutenvolumen, VT= Atemzugvolumen, PEF= expiratorischer Peakfluss (T-Test bei unabhängigen Stichproben, Geschlecht: Chi²), * p<0,05

3.2. Bestimmung der Marker für oxidativen Stress in Serum, Urin und Atemkondensat

CML und Kreatinin, beziehungsweise Lysin konnte in allen Serumproben (n=55) und allen Atemkondensatproben (n=55) gemessen werden. Im Urin konnte CML und Kreatinin in allen Proben der Kontrollgruppe (n=28) und in allen Proben der Dialysepatienten mit Restdiurese (n=9) gemessen werden. Nitrotyrosin, Tyrosin und Prolin konnten bei jeweils einer Atemkondensatprobe der Dialysegruppe und der Kontrollgruppe nicht gemessen werden, da zu wenig Material vorhanden war.

3.2.1. N^ε-(Carboxymethyl)Lysin

Bei den Dialysepatienten betrug die CML-Konzentration im Serum $0,94 \pm 0,18$ (0,58-1,22) $\mu\text{g/ml}$, bei der gesunden Kontrollgruppe $0,37 \pm 0,02$ (0,34-0,42) $\mu\text{g/ml}$. Dieser Unterschied ist signifikant ($p=0,000$). Die Kreatinin-Konzentration war mit $10,76 \pm 2,45$ (4,6-14,2) mg/dl bei den Dialysepatienten und $0,85 \pm 0,16$ (0,5-1,2) mg/dl bei der Kontrollgruppe ebenfalls signifikant unterschiedlich ($p=0,000$).

Die Konzentrationen von CML und Kreatinin korrelieren positiv ($R=0,935$; $R^2=0,874$; $p=0,004$) (Abb. 8), die CML-Konzentration und die GFR negativ miteinander ($R=0,668$; $R^2=0,447$; $p=0,000$) (Abb. 9). Letzteres wurde nur für die Dialysegruppe berechnet, da die MDRD-Formel, mit der die GFR berechnet wurde, nicht für Nierengesunde evaluiert wurde. Es konnte kein signifikanter Unterschied innerhalb der Dialysegruppe bezüglich der CML-Konzentration im Serum festgestellt werden, wenn man diese in Patienten mit und ohne Restdiurese aufteilt ($p=0,53$).

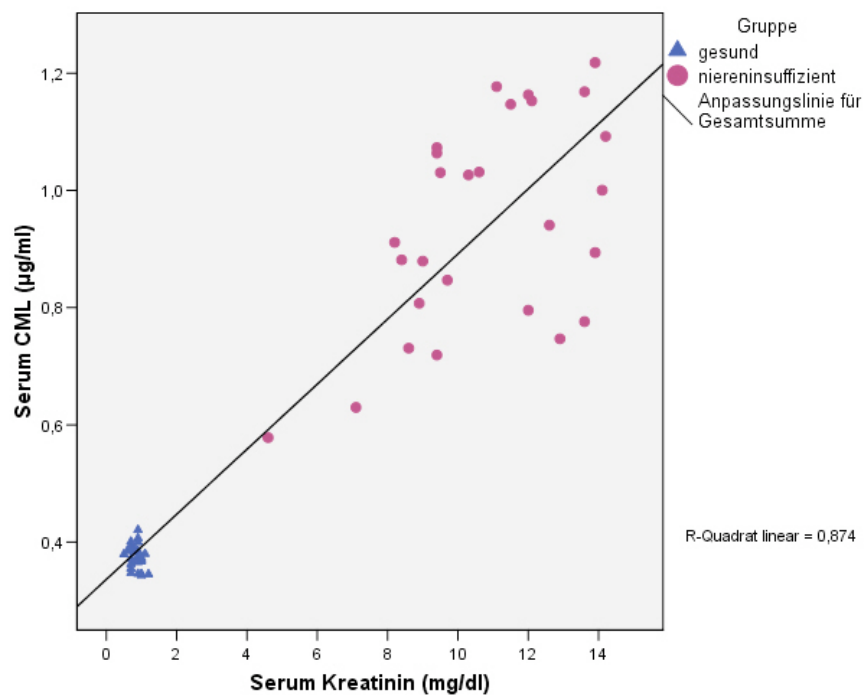


Abbildung 8: Korrelation der CML-Konzentration mit der Kreatininkonzentration im Serum

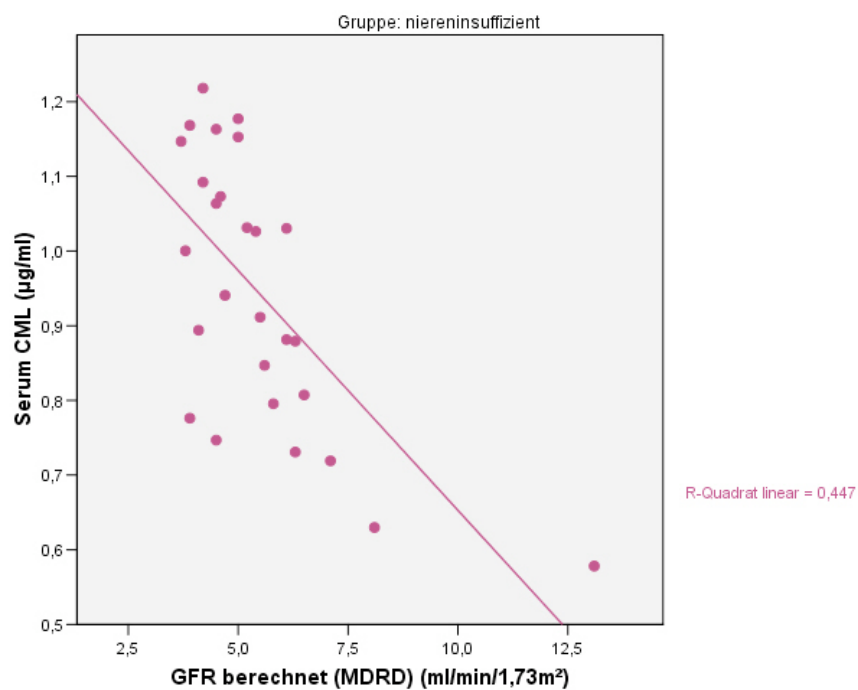


Abbildung 9: Korrelation der CML-Konzentration im Serum mit der GFR berechnet nach der MDRD-Formel in der niereninsuffizienten Gruppe

Im Urin der niereninsuffizienten Patienten (n=9) fand sich eine CML-Konzentration von $1,83 \pm 0,91$ (0,5-3,2) mg/l und bei der Kontrollgruppe von $1,49 \pm 1,32$ (0,12-4,75) mg/l. Dieser Unterschied ist nicht signifikant ($p=0,480$). Die Kreatinin-Konzentration im Urin der niereninsuffizienten Patienten war mit $0,92 \pm 0,68$ (0,21-2,07) g/l ebenfalls nicht signifikant höher ($p=0,868$) als bei der Kontrollgruppe mit $0,88 \pm 0,57$ (0,13-2,17) g/l. Der Bezug auf den Kreatiningehalt im Urin ist ein übliches Normierungsverfahren zur Kompensation unterschiedlich stark konzentrierten Urins. Es ergibt sich bei den Nierenpatienten eine CML-Konzentration von $2,84 \pm 1,61$ (0,4-4,81) mg/g Kreatinin und bei den Gesunden von $1,61 \pm 0,73$ (0,59-3,11) mg/g Kreatinin, was gerade nicht signifikant ($p=0,054$) ist.

In der Gesamtgruppe korreliert CML im Urin positiv mit CML im Serum ($R=0,565$; $R^2=0,319$; $p=0,000$) (Abb. 10). Betrachtet man beide Gruppe getrennt, so lässt sich keine signifikante Korrelation erkennen (Niereninsuffiziente Gruppe: $p=0,188$, Kontrollgruppe: $p=0,113$). CML im Urin korreliert nicht mit dem CML im Atemkondensat (Niereninsuffiziente Gruppe: $p=0,092$, Kontrollgruppe: $p=0,695$, gesamte Gruppe: $p=0,244$).

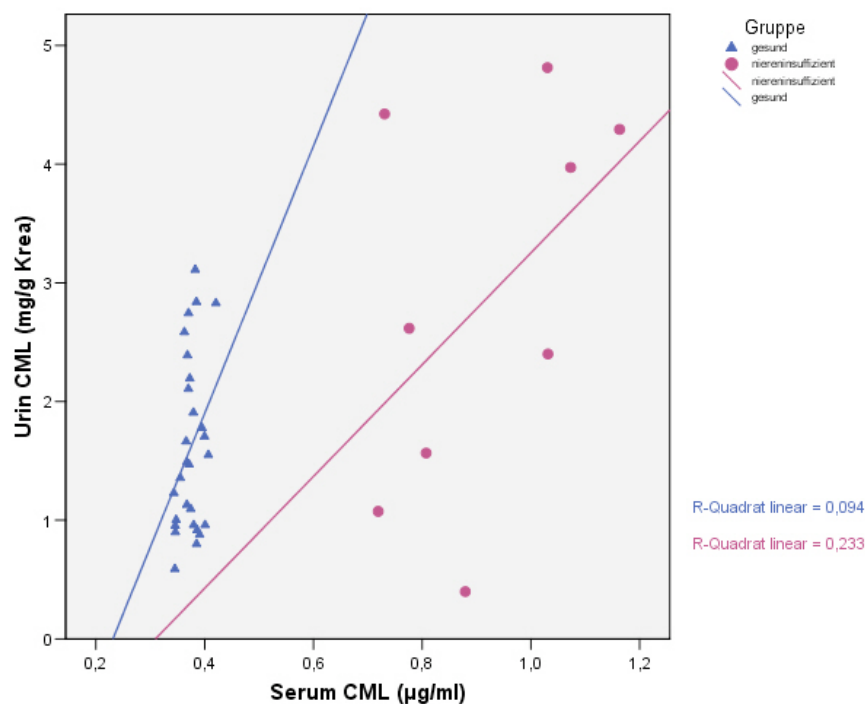


Abbildung 10: Korrelation der CML-Konzentration im Serum mit der CML-Konzentration im Urin

Im Atemkondensat der niereninsuffizienten Patienten betrug die CML-Konzentration $23,14 \pm 26,05$ (5,0-134,0) pg/ml. Im Vergleich zur Kontrollgruppe, bei der die CML-Konzentration $32,14 \pm 45,17$ (5,0-253,0) pg/ml betrug, ist dies nicht signifikant ($p=0,372$). Die Lysin-Konzentration war bei den niereninsuffizienten Patienten mit $16,30 \pm 14,30$ (3,56-69,6) ng/ml signifikant ($p=0,005$) niedriger als bei der Kontrollgruppe mit $34,48 \pm 29,05$ (5,52-125,0) ng/ml. Wenn man hier das Verhältnis von CML und Lysin betrachtet, so fand man einen nicht signifikanten Unterschied ($p=0,083$) zwischen den niereninsuffizienten Patienten mit $1,75 \pm 1,47$ (0,19-5,54) mg/g Lysin und der Kontrollgruppe mit $1,17 \pm 0,85$ (0,17-3,19) mg/g Lysin.

Die CML-Konzentration im Atemkondensat korrelierte nicht mit der CML-Konzentration im Serum (Kontrollgruppe: $p=0,386$, Dialysegruppe: $p=0,735$, gesamte Gruppe: $p=0,386$) (Abb. 11).

Eine Übersicht über alle Ergebnisse gibt Tabelle 3.

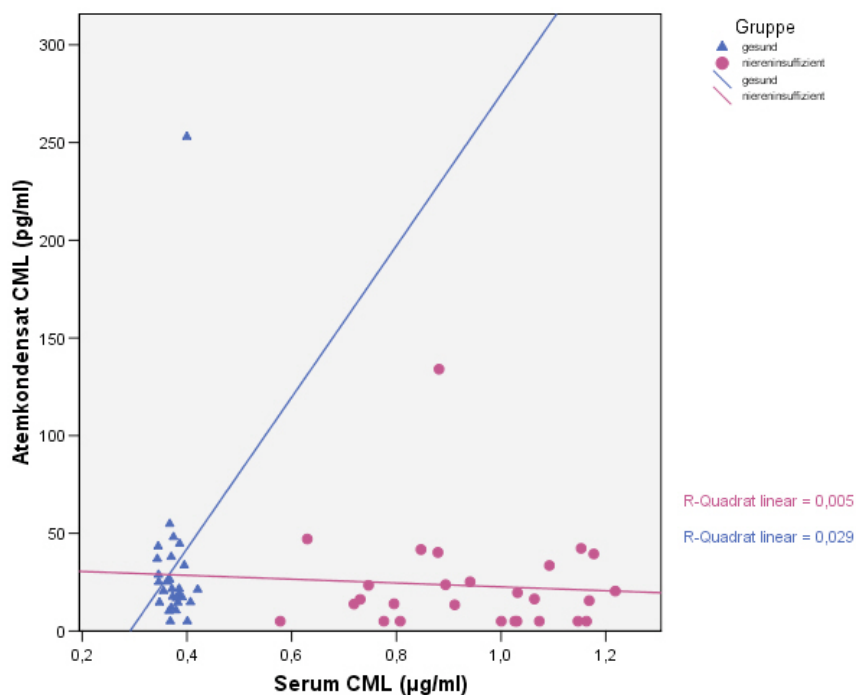


Abbildung 11: Korrelation der CML-Konzentrationen im Serum und im Atemkondensat

3.2.2. 3-Nitrotyrosin

Die Nitrotyrosinkonzentration im Atemkondensat war bei den Dialysepatienten mit $222,85 \pm 428,43$ (16,88-2252,75) pg/ml niedriger als bei der Kontrollgruppe mit $253,48 \pm 361,65$ (5,0-1686,53) pg/ml. Dieser Unterschied ist allerdings nicht signifikant ($p=0,779$). Signifikant niedriger ($p=0,035$) war jedoch die Tyrosin-Konzentration bei den Dialysepatienten mit $9,50 \pm 7,39$ (1,91-33,53) ng/ml im Vergleich zur Kontrollgruppe mit $21,59 \pm 21,15$ (2,4-99,06) ng/ml. Wenn man das Verhältnis von Nitrotyrosin zu Tyrosin betrachtet, war dieser Unterschied von $40,96 \pm 107,47$ (0,91-557,66) mg/g Tyrosin bei den Dialysepatienten und $17,20 \pm 17,14$ (0,05-58,54) mg/g Tyrosin bei der Kontrollgruppe nicht signifikant ($p=0,262$). Eine Übersicht über die Ergebnisse gibt Tabelle 3.

3.2.3. Aminosäuren

Im Atemkondensat war die Lysin-Konzentration bei den Dialysepatienten mit $16,30 \pm 14,30$ (3,56-69,6) ng/ml signifikant niedriger ($p=0,005$) als bei der Kontrollgruppe mit $34,48 \pm 29,05$ (5,52-125,0) ng/ml.

Bei den niereninsuffizienten Patienten war die Tyrosin-Konzentration im Atemkondensat mit $9,50 \pm 7,39$ (1,91-33,53) ng/ml signifikant niedriger ($p=0,009$) als bei den gesunden Probanden mit $21,59 \pm 21,15$ (2,4-99,06) ng/ml.

Bei der Prolin-Konzentration im Atemkondensat war der Unterschied zwischen der Dialysegruppe mit $9,40 \pm 7,78$ (1,66-35,9) ng/ml und der Kontrollgruppe mit $19,79 \pm 17,57$ (2,83-78,13) ng/ml ebenfalls signifikant ($p=0,008$). Eine Übersicht über die Ergebnisse gibt Tabelle 3.

Marker	Probe	Dialysegruppe	Kontrollgruppe	p-Werte
CML [$\mu\text{g/ml}$]	Serum	$0,94 \pm 0,18$	$0,37 \pm 0,02$	*0,000
Kreatinin [mg/dl]	Serum	$10,76 \pm 2,45$	$0,85 \pm 0,16$	*0,000
CML [mg/l]	Urin	$1,83 \pm 0,91$	$1,49 \pm 1,32$	0,480
Kreatinin [g/l]	Urin	$0,92 \pm 0,68$	$0,88 \pm 0,57$	0,868
CML/Krea [mg/g Krea]	Urin	$2,84 \pm 1,61$	$1,61 \pm 0,73$	0,054
CML [pg/ml]	AK	$23,14 \pm 26,05$	$32,14 \pm 45,17$	0,372
Lysin [ng/ml]	AK	$16,30 \pm 14,30$	$34,48 \pm 29,05$	*0,005
CML/Lysin [mg/g Lys]	AK	$1,75 \pm 1,47$	$1,17 \pm 0,85$	0,083
Prolin [ng/ml]	AK	$9,40 \pm 7,78$	$19,79 \pm 17,57$	*0,008
3-NT [pg/ml]	AK	$222,85 \pm 428,43$	$253,48 \pm 361,65$	0,779
Tyrosin [ng/ml]	AK	$9,50 \pm 7,39$	$21,59 \pm 21,15$	*0,009
3-NT/Tyrosin [mg/g Tyr]	AK	$40,96 \pm 107,47$	$17,20 \pm 17,14$	0,262

Tabelle 3: Übersicht Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung aller Marker in beiden Gruppen (T-Test bei unabhängigen Stichproben), * $p < 0,05$

3.3. Einfluss des Lebensalters

Die Dialysepatienten waren signifikant älter ($p=0,005$) als die gesunden Probanden. Unterscheidet man nicht zwischen Dialysegruppe und Kontrollgruppe, korreliert CML im Serum ($R=0,282$; $R^2=0,079$; $p=0,037$) (Abb. 12, Tab. 4)) und Kreatinin im Serum ($R=0,270$; $R^2=0,073$; $p=0,046$) positiv mit dem Alter. Das rührt vermutlich daher, dass die Gruppe mit der signifikant höheren CML- und Kreatininkonzentration gleichzeitig die signifikant ältere war. Somit musste es eine positive Korrelation geben, wenn man nicht zwischen den beiden Gruppen unterscheidet und das gesamte Kollektiv betrachtet. Bei der getrennten Betrachtung von Dialyse- und Kontrollgruppe korrelierte CML ($p=0,266$ bzw. $p=0,518$) und Kreatinin ($p=0,071$ bzw. $p=0,481$) nicht mit dem Alter.

Beim CML im Atemkondensat ist das anders. Beim gesamten Kollektiv ($n=55$) ließ sich keine Korrelation nachweisen ($p=0,417$), bei den niereninsuffizienten Patienten korrelierte CML negativ mit dem Alter ($R=0,392$; $R^2=0,154$; $p=0,043$) (Abb. 13, Tab. 4).

Alle anderen Marker im Atemkondensat korrelieren nicht mit dem Alter der Probanden.

Gruppe	p-Werte		
	CML Serum	CML Urin	CML Atemkondensat
Dialysegruppe	0,266	0,823	*0,043
Kontrollgruppe	0,518	0,735	0,454
alle	*0,037	0,996	0,417

Tabelle 4: Korrelation von CML mit dem Lebensalter (Pearson-Korrelation), * $p<0,05$

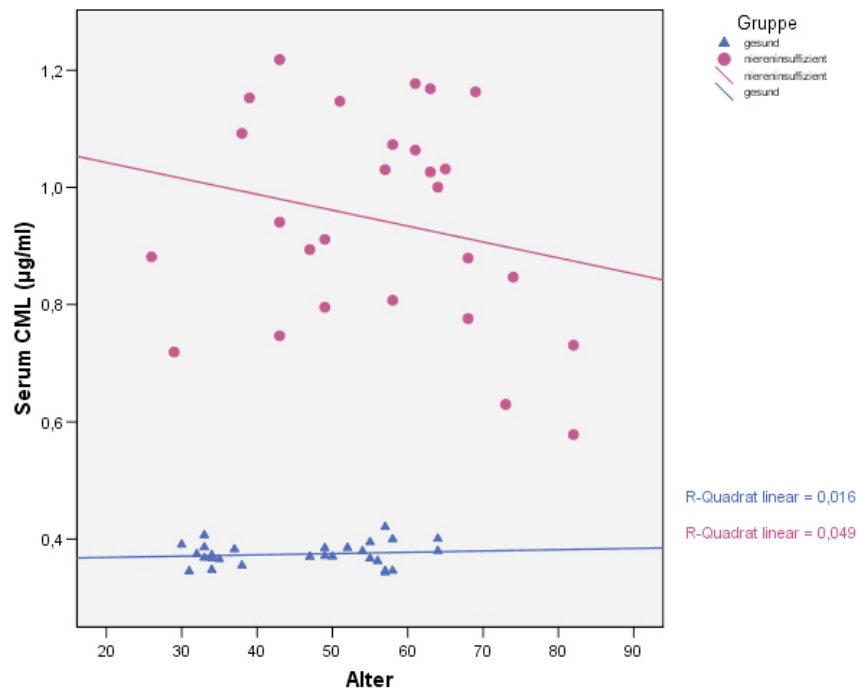


Abbildung 12: Korrelation CML im Serum mit dem Lebensalter

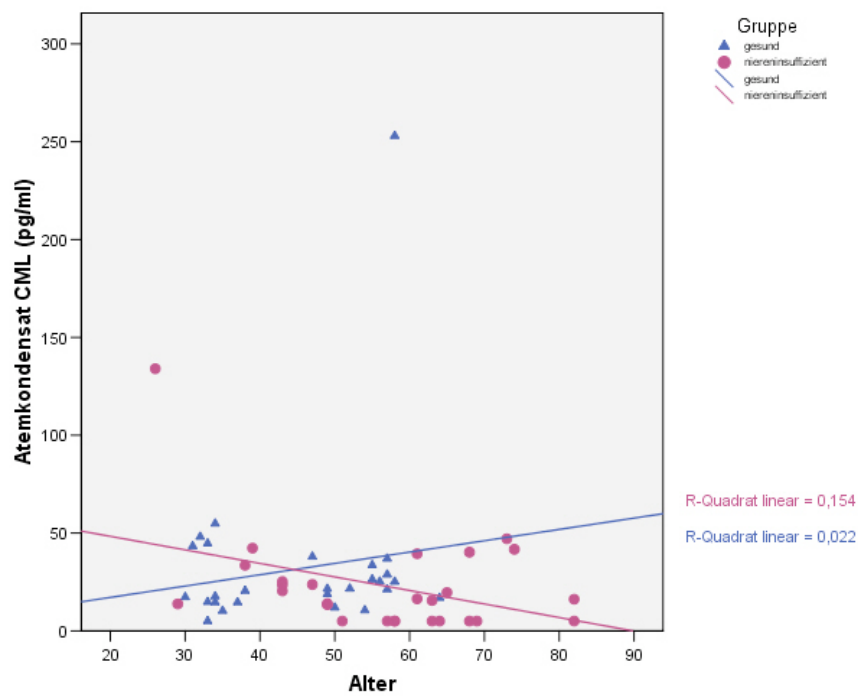


Abbildung 13: Korrelation CML im Atemkondensat mit dem Lebensalter

3.4. Einfluss des BMI

Die niereninsuffiziente Gruppe hatte einen signifikant niedrigeren BMI. Betrachtet man die gesamte Gruppe (n=55), so erkennt man eine negative Korrelation zwischen dem BMI und der CML-Konzentration im Serum ($R=0,327$; $R^2=0,107$; $p=0,015$). Das ist dadurch zu erklären, dass die Gruppe mit der signifikant höheren CML-Konzentration auch einen signifikant niedrigeren BMI hat. Somit muss es bei der Betrachtung der gesamten Gruppe zu einer negativen Korrelation kommen. Ähnliches stellt man bei der Kreatininkonzentration im Serum fest. Auch hier lässt sich eine negative Korrelation erkennen ($R=0,356$; $R^2=0,127$; $p=0,008$). Betrachtet man beide Gruppen getrennt, so korreliert weder die CML- ($p=0,943$ bzw. $p=0,513$), noch die Kreatininkonzentration ($p=0,440$, bzw. $p=0,206$) im Serum mit dem BMI. Alle weiteren Marker für oxidativen Stress korrelieren ebenfalls nicht mit dem BMI.

3.5. Einfluss des Geschlechts

In der Dialysegruppe gab es mehr männliche (n=22) als weibliche (n=5) Patienten. Zwischen beiden Geschlechtern gab es innerhalb der Dialysegruppe keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Marker im Serum und im Atemkondensat. Im Urin konnten keine Unterschiede berechnet werden, da es nur eine Frau mit Restdiurese gab.

Innerhalb der Kontrollgruppe hatten die männlichen Probanden im Serum eine CML-Konzentration von $0,37 \pm 0,02$ ($0,34-0,42$) $\mu\text{g/ml}$ (n=14) und eine Kreatininkonzentration von $0,94 \pm 0,14$ ($0,70-1,20$) mg/dl . Die weiblichen Probanden hatten eine CML-Konzentration von $0,38 \pm 0,02$ ($0,36-0,41$) $\mu\text{g/ml}$ (n=14) und eine Kreatininkonzentration von $0,76 \pm 0,13$ ($0,50-0,90$) mg/dl . In beiden Fällen gibt es einen signifikanten Unterschied (CML: $p=0,039$, bzw. Kreatinin: $p=0,002$). Alle weiteren Marker unterschieden sich nicht signifikant.

3.6. Einfluss von Diabetes mellitus

Schließt man die Patienten mit Diabetes mellitus von der Auswertung aus, so kommt man zu folgenden Ergebnissen. Es fällt auf, dass das Verhältnis von CML und Lysin im Atemkondensat in der Dialysegruppe OHNE Diabetiker (n=21) jetzt $2,10 \pm 1,49$ (0,57-5,54) mg/g Lysin beträgt. Es ist signifikant größer als bei der Kontrollgruppe mit $1,17 \pm 0,85$ (0,17-3,19) mg/g Lysin ($p=0,016$).

Bei allen anderen Markern ändern sich die Ergebnisse zwar auch, aber es kommt zu keinen weiteren signifikanten Unterschieden, als die bereits bekannten. Eine Übersicht gibt Tabelle 5.

Betrachtet man nun isoliert die Dialysegruppe und vergleicht die Diabetiker mit den Nichtdiabetikern, so stellt man fest, dass sich das Verhältnis von CML und Lysin im Atemkondensat noch deutlicher unterscheidet. Bei den Dialysepatienten ohne Diabetes mellitus (n=21) findet man $2,10 \pm 1,49$ (0,57-5,54) mg/g Lysin, bei den Dialysepatienten mit Diabetes mellitus $0,54 \pm 0,22$ (0,19-0,75) mg/g Lysin. Dieser Unterschied ist signifikant ($p=0,000$). Bei allen anderen Markern gibt es keine signifikanten Unterschiede (Tab. 6).

Marker	Probe	Dialysegruppe		p-Werte
		OHNE Diabetiker	Kontrollgruppe	
CML [$\mu\text{g/ml}$]	Serum	$0,96 \pm 0,18$	$0,37 \pm 0,02$	*0,000
Kreatinin [mg/dl]	Serum	$11,15 \pm 2,30$	$0,85 \pm 0,16$	*0,000
CML [mg/l]	Urin	$2,16 \pm 0,89$	$1,49 \pm 1,32$	0,249
Kreatinin [g/l]	Urin	$1,13 \pm 0,72$	$0,88 \pm 0,57$	0,352
CML/Krea [mg/g Krea]	Urin	$2,80 \pm 1,73$	$1,61 \pm 0,73$	0,157
CML [pg/ml]	AK	$26,66 \pm 28,32$	$32,14 \pm 45,17$	0,628
Lysin [ng/ml]	AK	$15,32 \pm 15,08$	$34,48 \pm 29,05$	*0,005
CML/Lysin [mg/g Lys]	AK	$2,10 \pm 1,49$	$1,17 \pm 0,85$	*0,016
Prolin [ng/ml]	AK	$8,85 \pm 7,93$	$19,79 \pm 17,57$	*0,007
3-NT [pg/ml]	AK	$229,15 \pm 484,06$	$253,48 \pm 361,65$	0,884
Tyrosin [ng/ml]	AK	$9,12 \pm 7,71$	$21,59 \pm 21,15$	*0,008
3-NT/Tyrosin [mg/g Tyr]	AK	$46,54 \pm 122,55$	$17,20 \pm 17,14$	0,224

Tabelle 5: Übersicht Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung aller Marker der Dialysegruppe OHNE Diabetiker Typ 1 und 2 und der Kontrollgruppe (T-Test bei unabhängigen Stichproben), * $p<0,05$

Marker	Probe	Dialysegruppe		p-Werte
		kein Diabetes (n=21)	Diabetes (n=6)	
CML [$\mu\text{g/ml}$]	Serum	0,96 $\pm$ 0,18	0,90 $\pm$ 0,18	0,535
Kreatinin [mg/dl]	Serum	11,15 $\pm$ 2,30	9,42 $\pm$ 2,68	0,129
CML [mg/l]	Urin	2,16 $\pm$ 0,89	1,17 $\pm$ 0,58	0,129
Kreatinin [g/l]	Urin	1,13 $\pm$ 0,72	0,49 $\pm$ 0,38	0,198
CML/Krea [mg/g Krea]	Urin	2,80 $\pm$ 1,73	2,93 $\pm$ 1,69	0,918
CML [pg/ml]	AK	26,66 $\pm$ 28,32	10,80 $\pm$ 9,16	0,194
Lysin [ng/ml]	AK	15,32 $\pm$ 15,08	19,74 $\pm$ 11,64	0,515
CML/Lysin [mg/g Lys]	AK	2,10 $\pm$ 1,49	0,54 $\pm$,022	*0,000
Prolin [ng/ml]	AK	8,85 $\pm$ 7,93	11,22 $\pm$ 7,64	0,532
3-NT [pg/ml]	AK	229,15 $\pm$ 484,06	201,82 $\pm$ 163,30	0,894
Tyrosin [ng/ml]	AK	9,12 $\pm$ 7,71	10,74 $\pm$ 6,69	0,648
3-NT/Tyrosin [mg/g Tyr]	AK	46,54 $\pm$ 122,55	22,35 $\pm$ 11,49	0,638

Tabelle 6: Übersicht Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung der Dialysegruppe: Patienten OHNE und MIT Diabetes mellitus (T-Test bei unabhängigen Stichproben), * $p < 0,05$

3.7. Einfluss der Immunsuppressiva

Schließt man die immunsupprimierten Patienten von der Auswertung aus, so ändern sich in der Dialysegruppe (n=23) zwar die Mittelwerte, die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen bleiben aber genauso signifikant oder nicht signifikant wie mit ihnen.

3.8. Einfluss der Atemgrößen

Es stellt sich die Frage, inwieweit die Atemfrequenz (BF), das Atemminutenvolumen (MV), das Atemzugvolumen (VT) und der expiratorische Peakfluss (PEF) die einzelnen Marker beeinflussen. Dazu wurde die Korrelation zwischen Gesamtmenge des Markers in der Atemkondensatprobe und den Atemgrößen berechnet. Der Gesamtmenge der einzelnen Marker ist in Tabelle 7 dargestellt.

Gesamtmenge Marker in der Probe	Dialysegruppe	Kontrollgruppe	p-Werte
CML [pg]	80,81 ± 103,32	114,82 ± 206,9	0,447
Lysin [ng]	55,70 ± 45,61	109,59 ± 113,36	*0,026
Prolin [ng]	32,45 ± 25,50	64,38 ± 68,25	*0,030
Nitrotyrosin [pg]	765,93 ± 1499,0	719,41 ± 860,46	0,890
Tyrosin [ng]	33,00 ± 25,55	70,37 ± 84,27	*0,035

Tabelle 7: durchschnittlicher Gesamtmenge der Marker in den Atemkondensatproben (T-Test bei unabhängigen Stichproben), * $p < 0,05$

Auch hier zeigt sich, dass sich bei den Dialysepatienten in der Atemkondensatprobe signifikant weniger Aminosäuren Lysin, Prolin und Tyrosin befanden (alle $p < 0,05$) als bei den gesunden Probanden. Beim CML und Nitrotyrosin war der Unterschied nicht signifikant ($p = 0,447$, bzw. $p = 0,890$).

Lysin, Prolin und Tyrosin korrelierten positiv mit der Atemfrequenz (Lysin: $R = 0,357$; $R^2 = 0,127$; $p = 0,016$; Prolin: $R = 0,356$; $R^2 = 0,127$; $p = 0,017$; Tyrosin: $R = 0,330$; $R^2 = 0,109$; $p = 0,024$), CML und Nitrotyrosin nicht. In der Dialysegruppe korrelierte CML positiv mit dem expiratorischen Peakfluss ($R = 0,493$; $R^2 = 0,243$; $p = 0,009$), alle übrigen Marker nicht. Zwischen dem Atemminuten- und Atemzugvolumen und den Markern im Atemkondensat bestanden keine signifikanten Korrelationen. Eine Übersicht gibt Tabelle 8.

Gruppe		p-Werte				
		CML	Lysin	Prolin	NT	Tyrosin
Dialysegruppe (n=27)	BF	0,547	0,418	0,780	0,146	0,521
	MV	0,329	0,938	0,965	0,960	0,740
	VT	0,404	0,907	0,862	0,544	0,806
	PEF	*0,009	0,983	0,568	0,718	0,888
Kontrollgruppe (n=28)	BF	0,144	0,107	0,074	0,685	0,118
	MV	0,613	0,876	0,825	0,891	0,746
	VT	0,135	0,148	0,106	0,773	0,148
	PEF	0,558	0,800	0,932	0,395	0,995
alle (n=55)	BF	0,062	*0,016	*0,017	0,220	*0,024
	MV	0,959	0,698	0,699	0,937	0,863
	VT	0,466	0,299	0,307	0,463	0,286
	PEF	0,346	0,671	0,576	0,967	0,752

Tabelle 8: Korrelation der Marker im Atemkondensat mit den respiratorischen Größen, dargestellt sind die p-Werte (Pearson-Korrelation), BF= Atemfrequenz, MV= Atemminutenvolumen, VT= Atemzugvolumen, PEF= expiratorischer Peakfluss, * p<0,05

3.9. Einfluss von Nikotinabusus

Bei der Untersuchung, inwieweit das Rauchen die Marker im Atemkondensat beeinflusst, wird nicht zwischen Nie-Rauchern und Nicht-mehr-Rauchern unterschieden. Bei den Nicht-mehr-Rauchern hat der letzte über ein Jahr vor der Untersuchung das Rauchen aufgegeben, so dass man diese beiden Gruppen als eine Gruppe betrachten kann. Im folgenden werden sie als Nichtraucher bezeichnet.

3.9.1. 3-Nitrotyrosin im Atemkondensat

Bei den Dialysepatienten hatten die Raucher eine deutlich höhere Nitrotyrosinkonzentration ($651,35 \pm 1069,80$ (45,46-2252,75) pg/ml, n=4) im Atemkondensat als die Nichtraucher ($144,94 \pm 116,98$ (16,88-434,58) pg/ml, n=22). Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant ($p=0,414$). In der Kontrollgruppe war es umgekehrt. Die Raucher hatten eine niedrigere Nitrotyrosinkonzentration ($154,60 \pm 124,22$ (24,44-362,54) pg/ml, n=7) im Atemkondensat als die Nichtraucher ($288,08 \pm 411,39$ (5,00-1686,53) pg/ml, n=20). Das war aber ebenfalls nicht signifikant ($p=0,411$).

Die rauchenden Dialysepatienten hatten aber auch eine deutlich höhere Nitrotyrosinkonzentration als die gesunden Raucher. Dieser Unterschied war aber auch nicht signifikant ($p=0,422$), genau wie zwischen den gesunden und niereninsuffizienten Nichtrauchern ($p=0,147$). Nichtrauchende Dialysepatienten und rauchende Gesunde hatten ähnliche Nitrotyrosinkonzentrationen (Abb. 14). Das Nitrotyrosin/Tyrosin-Verhältnis betrug bei den niereninsuffizienten Rauchern $150,32 \pm 271,68$ (6,35-557,66) mg/g Tyrosin, bei den niereninsuffizienten Nichtrauchern $21,07 \pm 22,63$ (0,91-108,55) mg/g Tyrosin. Das ist auch nicht signifikant ($p=0,412$). Bei den gesunden Rauchern war das Nitrotyrosin/Tyrosin-Verhältnis $16,34 \pm 14,90$ (1,94-44,65) mg/g Tyrosin, bei den gesunden Nichtrauchern $17,51 \pm 18,21$ (0,05-58,54) mg/g Tyrosin, was ebenfalls nicht signifikant ist ($p=0,881$).

Nitrotyrosin/Tyrosin war bei den niereninsuffizienten Rauchern nicht signifikant höher als bei den gesunden Rauchern ($p=0,397$), bei niereninsuffizienten und gesunden Nichtrauchern gab es ebenfalls keinen signifikanten Unterschied ($p=0,579$).

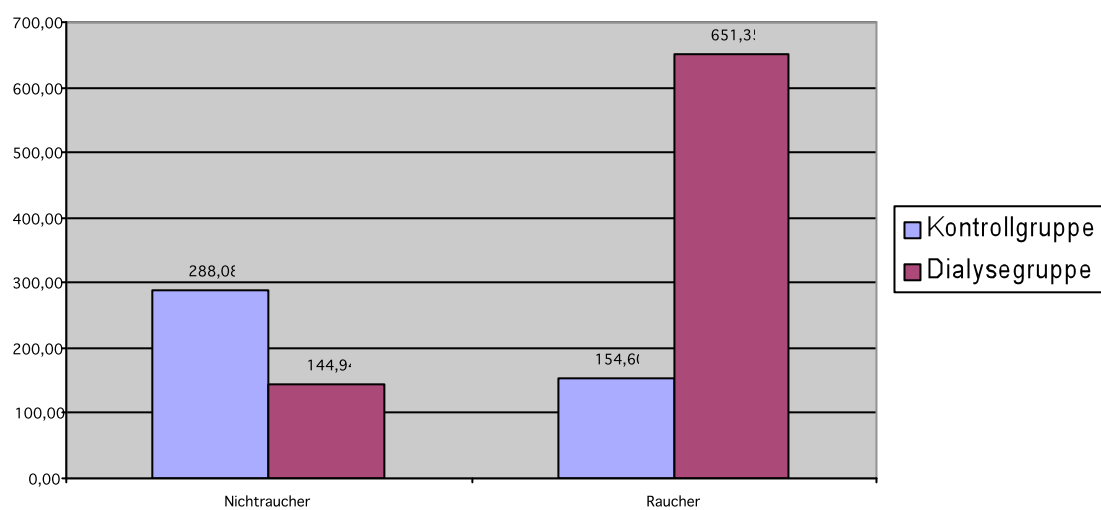


Abbildung 14: Die Nitrotyrosinkonzentrationen [pg/ml] im Atemkondensat bei Rauchern und Nichtrauchern

3.9.2. N^ε-(Carboxymethyl)Lysin im Atemkondensat

Die rauchenden Dialysepatienten hatten eine höhere CML-Konzentration ($29,06 \pm 14,0$ (13,90-47,10) pg/ml, n=5) als die nichtrauchenden ($21,79 \pm 28,15$ (5,0-134,0) pg/ml, n=22), aber auch dies war nicht signifikant ($p=0,583$). Die Raucher der Kontrollgruppe hatten eine niedrigere CML-Konzentration ($21,34 \pm 11,47$ (5,00-43,30) pg/ml, n=8) als die Nichtraucher ($36,46 \pm 52,75$ (5,0-253,0) pg/ml, n=20), was auch nicht signifikant war ($p=0,434$).

Niereninsuffiziente Raucher hatten eine nicht signifikant ($p=0,300$) höhere CML-Konzentration, niereninsuffiziente Nichtraucher eine nicht signifikante ($p=0,262$) niedrigere CML-Konzentration als die jeweilige gesunde Kontrollgruppe. Gesunde Raucher und niereninsuffiziente Nichtraucher hatten ähnlich hohe CML-Konzentrationen im Atemkondensat (Abb. 15).

Das CML/Lysin-Verhältnis betrug bei den niereninsuffizienten Rauchern $2,58 \pm 1,14$ (1,31-3,96) mg/g Lysin, bei den niereninsuffizienten Nichtrauchern $1,56 \pm 1,49$ (0,19-5,54) mg/g Lysin, was kein signifikanter Unterschied ist ($p=0,166$). Ebenfalls nicht signifikant ($p=0,285$) ist der Unterschied zwischen den gesunden Rauchern ($1,45 \pm 1,09$ (0,17-3,19) mg/g Lysin) und den gesunden Nichtrauchern ($1,06 \pm 0,73$ (0,30-2,95) mg/g Lysin).

CML/Lysin war bei den niereninsuffizienten Rauchern nicht signifikant höher als bei den gesunden Rauchern ($p=0,102$), genau wie zwischen niereninsuffizienten und gesunden Nichtrauchern ($p=0,172$).

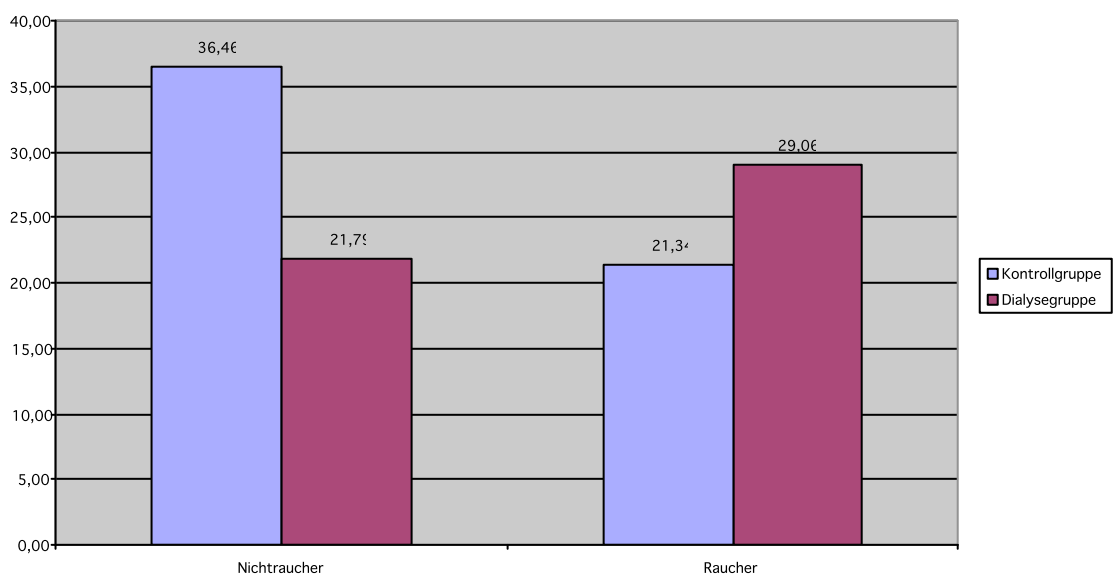


Abbildung 15: Die CML-Konzentrationen [pg/ml] im Atemkondensat bei Rauchern und Nichtrauchern

3.9.3. Aminosäuren im Atemkondensat

Die Ergebnisse für Lysin, Prolin und Tyrosin waren alle ähnlich.

Die niereninsuffizienten Raucher hatten eine niedrigere Lysinkonzentration ($13,31 \pm 8,66$ (4,77-26,90) ng/ml, n=5) als die Nichtraucher ($16,98 \pm 15,37$ (3,56-69,60) ng/ml, n=22), gesunde Raucher eine niedrigere ($23,45 \pm 16,53$ (5,52-49,60) ng/ml, n=8) als Nichtraucher ($38,89 \pm 32,04$ (5,87-125,0) ng/ml, n=20). Beides war nicht signifikant ($p=0,613$ bzw. $p=0,210$).

Nichtrauchende Dialysepatienten hatten eine signifikant niedrigere Lysinkonzentration im Atemkondensat als gesunde Nichtraucher ($p=0,010$), bei den Rauchern war der Unterschied allerdings nicht signifikant ($p=0,176$) (Abb. 16).

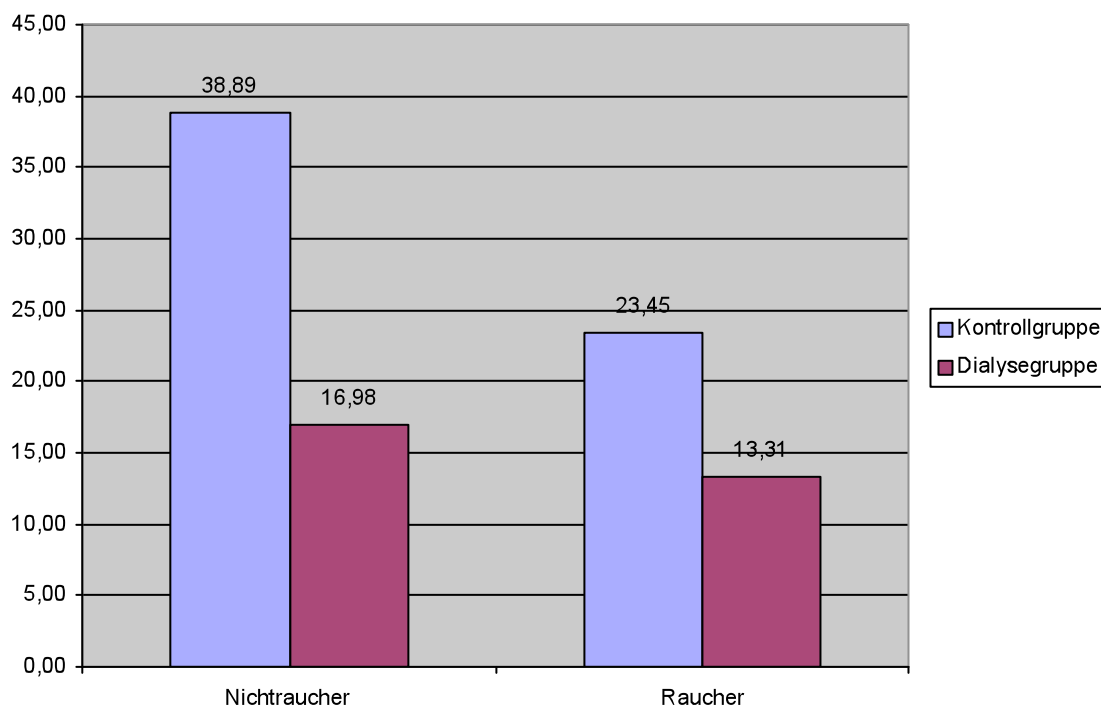


Abbildung 16: Die Lysinkonzentrationen [ng/ml] im Atemkondensat bei Rauchern und Nichtrauchern

Rauchende Dialysepatienten hatten eine nicht signifikant ($p=0,524$) niedrigere Prolinkonzentration ($7,05 \pm 2,40$ (3,91-9,05) ng/ml, $n=4$) als nichtrauchende ($9,82 \pm 8,37$ (1,66-35,90) ng/ml, $n=22$), gesunde Raucher eine niedrigere ($12,96 \pm 9,72$ (3,50-27,29) ng/ml, $n=7$), aber auch nicht signifikante niedrigere ($p=0,240$) Prolinkonzentration als gesunde Nichtraucher ($22,18 \pm 19,22$ (2,83-78,13) ng/ml, $n=20$).

Niereninsuffiziente Raucher hatten eine nicht signifikant niedrigere Prolinkonzentration als gesunde ($p=0,169$). Die Nichtraucher hatten einen signifikanten Unterschied ($p=0,013$) (Abb. 17).

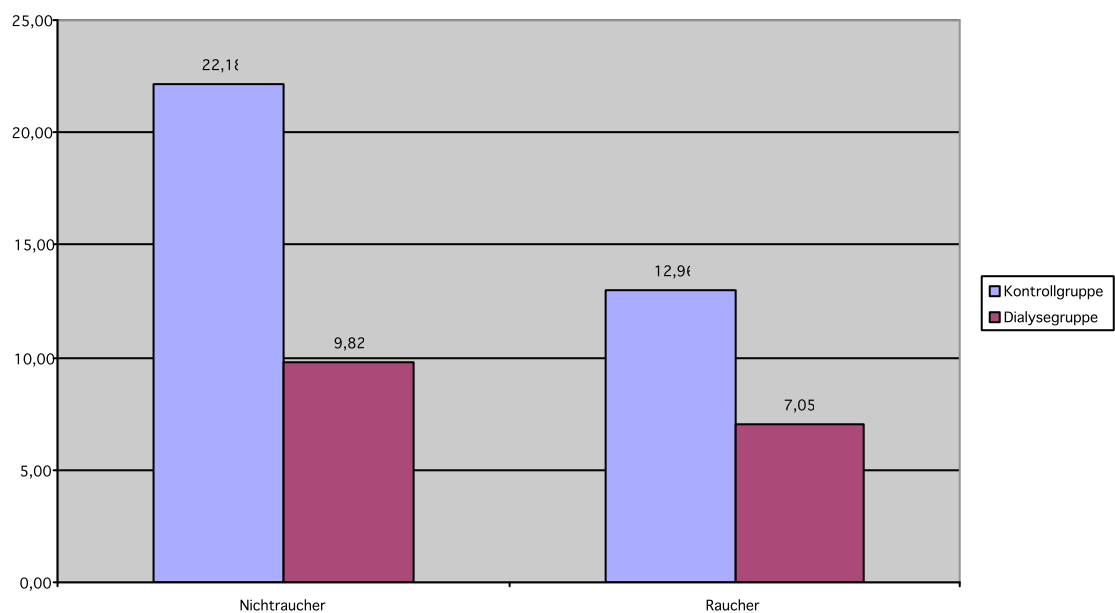


Abbildung 17: Die Prolinkonzentrationen [ng/ml] im Atemkondensat bei Rauchern und Nichtrauchern

Niereninsuffiziente Raucher hatten eine niedrigere Tyrosinkonzentration ($6,94 \pm 2,0$ (4,04-8,36) ng/ml, n=4) als die Nichtraucher ($9,96 \pm 7,93$ (1,91-33,53) ng/ml, n= 22). Dieser Unterschied war nicht signifikant ($p=0,463$). Gesunde Raucher hatten eine niedrigere Tyrosinkonzentration ($13,36 \pm 10,85$ (2,78-34,17) ng/ml, n=7) als Nichtraucher ($24,47 \pm 23,26$ (2,40-99,06) ng/ml, n=20), was ebenfalls nicht signifikant war ($p=0,239$).

Rauchende Dialysepatienten hatten eine nicht signifikant niedrigere ($p=0,281$) Tyrosinkonzentration im Atemkondensat als gesunde, nichtrauchende Dialysepatienten hingegen eine signifikant niedrigere ($p=0,014$) als Gesunde (Abb. 18).

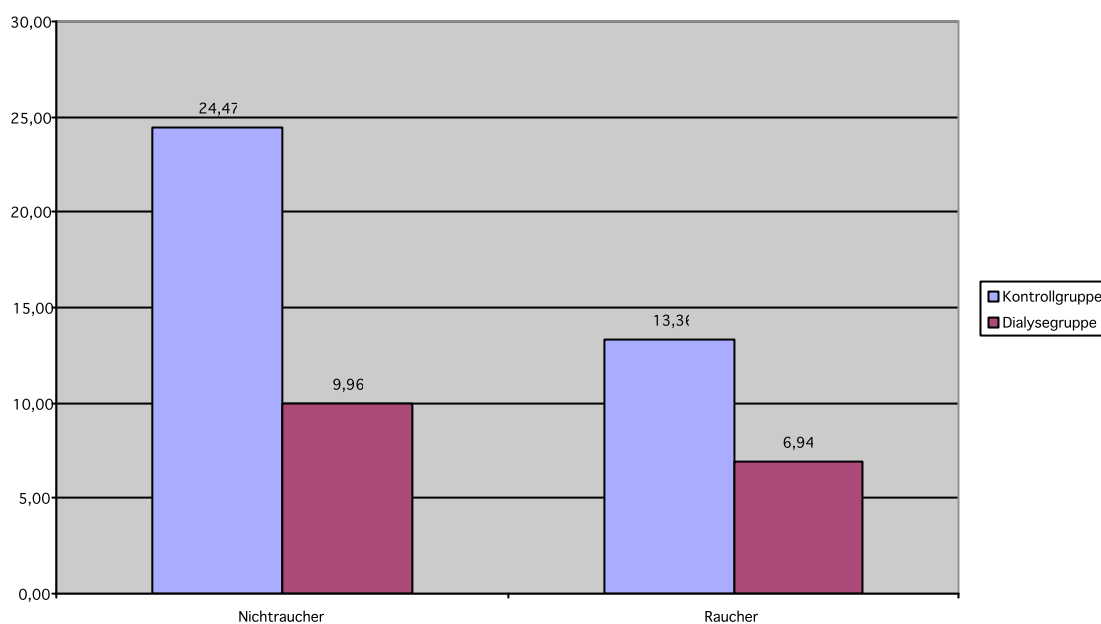


Abbildung 18: Die Tyrosinkonzentrationen [ng/ml] im Atemkondensat bei Rauchern und Nichtrauchern

Zusammenfassend kann man sagen, dass es bei den Nichtrauchern einen signifikanten Unterschied zwischen niereninsuffizienten und gesunden Probanden gab, alle anderen Unterschiede waren zwar teilweise groß, aber nicht signifikant.

3.9.4. N^ε-(Carboxymethyl)Lysin im Serum und Urin

Bei den niereninsuffizienten Rauchern ($0,88 \pm 0,21$ (0,63-1,22) $\mu\text{g/ml}$, $n=5$) und den Nichtrauchern ($0,96 \pm 0,17$ (0,58-1,18) $\mu\text{g/ml}$, $n=22$) gab es keinen signifikanten Unterschied in der CML-Konzentration im Serum ($p=0,418$). Bei den gesunden Rauchern ($0,37 \pm 0,02$ (0,34-0,41) $\mu\text{g/ml}$, $n=8$) und den Nichtrauchern ($0,38 \pm 0,02$ (0,34-0,42) $\mu\text{g/ml}$, $n=20$) gab es ebenfalls keinen signifikanten Unterschied ($p=0,239$). Die rauchenden Dialysepatienten hatten eine signifikant höhere CML-Konzentration als die gesunden ($p=0,006$), genau wie die nichtrauchenden Dialysepatienten eine signifikant höhere als die gesunden Nichtraucher hatten ($p=0,000$) (Abb. 19).

Von den niereninsuffizienten Patienten mit Restdiurese waren acht Nichtraucher und ein Raucher. Somit konnten die niereninsuffizienten Raucher und Nichtraucher, sowie die gesunden und niereninsuffizienten Raucher bezüglich der CML-Konzentration im Urin nicht verglichen werden. Die niereninsuffizienten Nichtraucher ($3,14 \pm 1,42$ (1,07-4,81) mg/g Kreatinin , $n=8$) und die gesunden Nichtraucher ($1,60 \pm 0,70$ (0,80-2,84) mg/g Kreatinin , $n=20$) unterschieden sich signifikant ($p=0,018$). Bei den gesunden Nichtrauchern ($1,60 \pm 0,70$ (0,80-2,84) mg/g Kreatinin , $n=20$) und gesunden Rauchern ($1,64 \pm 0,86$ (0,59-3,11) mg/g Kreatinin , $n=8$) gab es keinen signifikanten Unterschied ($p=0,883$) (Abb. 20).

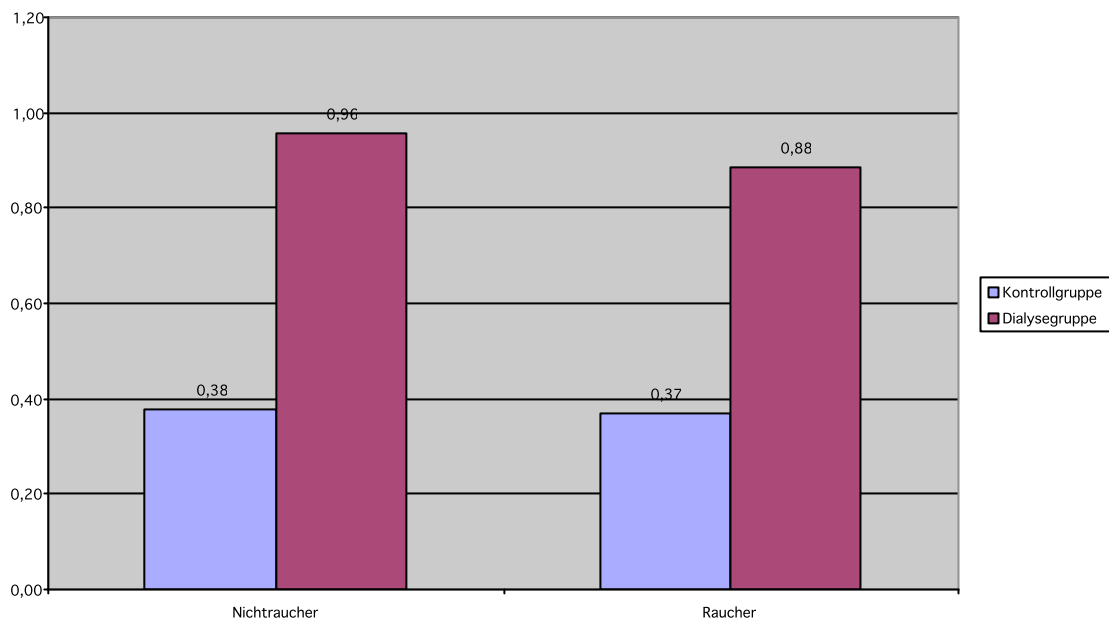


Abbildung 19: Die CML-Konzentrationen [$\mu\text{g/ml}$] im Serum bei Rauchern und Nichtrauchern

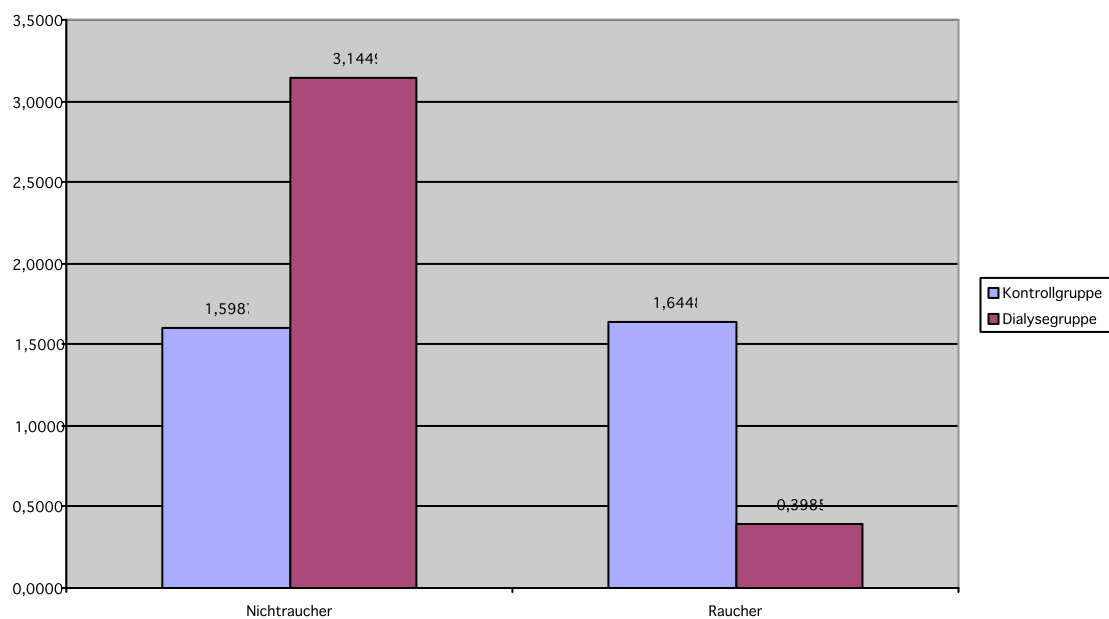


Abbildung 20: Die CML-Konzentrationen [mg/g Kreatinin] im Urin bei Rauchern und Nichtrauchern. Man beachte, dass der Wert bei den niereninsuffizienten Rauchern kein Mittel-, sondern ein Einzelwert ist, da es nur einen niereninsuffizienten Raucher mit Restdiurese gab.

3.10. Varianzanalytisches Modell

Um die möglichen Beeinflussungen der einzelnen Marker noch weiter zu spezifizieren und um nichts zu übersehen, wird eine mögliche Beeinflussung mit dem mehrfaktoriellen varianzanalytischen Modell noch einmal überprüft. In das Varianzanalytische Modell wurden die Parameter Niereninsuffizienz, Lebensalter, Geschlecht, BMI, Diabetes mellitus, Immunsuppression und Nikotinabusus aufgenommen. Auf Grund der Übersichtlichkeit wird auf die Darstellung des nicht standardisierten Koeffizienten B mit Standardfehler, des standardisierten Koeffizienten Beta und der T-Statistik verzichtet.

Bezüglich der Marker im Serum ergibt sich beim CML ein signifikanter Einfluss der Niereninsuffizienz auf die Konzentration ($p=0,000$), alle anderen Parameter waren nicht signifikant (Tab. 9). Beim Kreatinin ergibt sich eine signifikante Beeinflussung durch die Niereninsuffizienz ($p=0,000$), das Alter ($p=0,039$), das Geschlecht ($p=0,025$) und durch den Diabetes mellitus ($p=0,036$), wobei man bedenken muss, dass in diesem Kollektiv alle Diabetiker gleichzeitig niereninsuffizient sind (Tab. 9). Entfernt man den Parameter Diabetes mellitus aus dem varianzanalytischen Modell, so sind nur noch die Niereninsuffizienz ($p=0,000$) und das Lebensalter ($p=0,023$) signifikant. Beim Kreatinin sind die Einflüsse auf die Konzentration im Serum durch Niereninsuffizienz, Lebensalter und Geschlecht bekannt.

Varianzanalytisches Modell	p-Werte	
	CML im Serum	Kreatinin im Serum
Niereninsuffizienz	*0,000	*0,000
Alter	0,293	*0,039
Geschlecht	0,591	*0,025
Body Mass Index	0,667	0,491
Diabetes mellitus	0,391	*0,036
Immunsuppression	0,754	0,718
Nikotinabusus	0,416	0,322

Tabelle 9: Varianzanalytisches Modell CML und Kreatinin im Serum (ANOVA), * $p<0,05$

Bezüglich der Marker im Urin kann man höchstens von Tendenzen sprechen, da hier einzelne Parameter bei sehr wenigen Patienten mit Restdiurese vorkamen. Bei der Kreatininkonzentration tendenziell ein möglicher Einfluss durch Geschlecht ($p=0,043$) und Diabetes mellitus ($p=0,023$). Bei der CML-Konzentration und dem CML/Kreatinin-Verhältnis ergaben sich keine signifikanten Einflüsse (Tab. 10).

Varianzanalytisches Modell	p-Werte		
	CML im Urin	Kreatinin im Urin	CML/Kreatinin im Urin
Niereninsuffizienz	0,302	0,157	0,132
Alter	0,754	0,188	0,319
Geschlecht	0,371	*0,043	0,935
Body Mass Index	0,317	0,058	0,705
Diabetes mellitus	0,244	*0,023	0,358
Immunsuppression	0,760	0,245	0,118
Nikotinabusus	0,994	0,346	0,576

Tabelle 10: Varianzanalytisches Modell CML und Kreatinin im Urin (ANOVA), * $p<0,05$

Bei der CML-Konzentration im Atemkondensat ergab sich ebenfalls keine signifikanten Beeinflussung durch die einzelnen Parameter, wohl aber beim Verhältnis von CML zu Lysin, das durch die Niereninsuffizienz ($p=0,007$) und den Diabetes mellitus ($p=0,018$) signifikant beeinflusst wird (Tab. 11).

Varianzanalytisches Modell	p-Werte	
	CML im Atemkondensat	CML/ Lysin im Atemkondensat
Niereninsuffizienz	0,942	*0,007
Alter	0,722	0,109
Geschlecht	0,376	0,991
Body Mass Index	0,656	0,892
Diabetes mellitus	0,461	*0,018
Immunsuppression	0,975	0,702
Nikotinabusus	0,799	0,290

Tabelle 11: Varianzanalytisches Modell CML im Atemkondensat (ANOVA), $p<0,05$

Sowohl die Nitrotyrosinkonzentration, als auch das Verhältnis von Nitrotyrosin zu Tyrosin im Atemkondensat wurde durch keinen der Parameter signifikant beeinflusst (Tab. 12).

Varianzanalytisches Modell	p-Werte	
	Nitrotyrosin im Atemkondensat	Nitrotyrosin/Tyrosin im Atemkondensat
Niereninsuffizienz	0,848	0,115
Alter	0,430	0,485
Geschlecht	0,964	0,848
Body Mass Index	0,822	0,673
Diabetes mellitus	0,960	0,820
Immunsuppression	0,901	0,714
Nikotinabusus	0,509	0,110

Tabelle 12: Varianzanalytisches Modell Nitrotyrosin im Atemkondensat (ANOVA)

Die Niereninsuffizienz beeinflusst aber wieder die Konzentration der Aminosäuren Lysin ($p=0,030$), Tyrosin ($p=0,032$) und grenzwertig Prolin ($p=0,050$) im Atemkondensat, alle weiteren Parameter nicht (Tab. 13).

Varianzanalytisches Modell	p-Werte		
	Lysin im Atemkondensat	Tyrosin im Atemkondensat	Prolin im Atemkondensat
Niereninsuffizienz	*0,030	*0,032	*0,050
Alter	0,951	0,487	0,929
Geschlecht	0,966	0,500	0,632
Body Mass Index	0,951	0,849	0,892
Diabetes mellitus	0,832	0,878	0,805
Immunsuppression	0,847	0,883	0,906
Nikotinabusus	0,234	0,344	0,296

Tabelle 13: Varianzanalytisches Modell Aminosäuren im Atemkondensat (ANOVA), * $p \leq 0,05$

Für die Überprüfung der Einflüsse der Atemgrößen auf den Gesamtmenge der einzelnen Marker im Atemkondensat wurde ein eigenes varianzanalytisches Modell erstellt. Hier lassen sich keine signifikanten Einflüsse der Atemfrequenz, des Atemminutenvolumens, des Atemzugvolumens und des expiratorischen Peakflusses erkennen. Beim CML und dem expiratorischen Peakfluss gibt es im varianzanalytischen Modell zwar ein signifikantes Ergebnis, dass sich aber bei der univariaten Berechnung vorher nicht nachweisen ließ. Eine Übersicht gibt Tabelle 14.

Varianz- analytisches Modell	p-Werte				
	CML	Lysin	Prolin	NT	Tyrosin
BF	0,608	0,602	0,678	0,159	0,679
MV	0,875	0,779	0,654	0,213	0,760
VT	0,304	0,426	0,378	0,654	0,487
PEF	*0,000	0,161	0,085	0,963	0,169

Tabelle 14: Varianzanalytisches Modell Einfluss der Atemgrößen auf Gesamtmenge der Marker im Atemkondensat (ANOVA), BF= Atemfrequenz, MV= Atemminutenvolumen, VT= Atemzugvolumen, PEF= expiratorischer Peakfluss, *p<0,05

4. Diskussion

4.1. N^ε-(Carboxymethyl)Lysin im Serum

Das Ergebnis der Studie zeigt, dass die CML-Konzentration im Serum bei Patienten mit chronischem Nierenversagen signifikant höher ist als bei Gesunden. Die Kreatininkonzentration ist natürlich auch signifikant höher und korreliert positiv mit der CML-Konzentration. Auch andere Studien kamen zu diesem Ergebnis [17,22,23,26,27]. Nach den aktuellen Leitlinien wurde die GFR in dieser Studie mit der MDRD-Formel berechnet. Andere Studien verwendeten zur Bestimmung der GFR die Kreatinin-Clearance oder die Cockcroft-Gault-Formel [23,30]. Doch alle Studien kommen zum selben Ergebnis, welches besagt, dass die CML-Konzentration im Serum negativ mit der GFR korreliert. Daraus kann man schließen, dass die Ursache für die erhöhte CML-Konzentration im Serum die sehr eingeschränkte bis fehlende Elimination von CML über die Nieren ist und/ oder die vermehrte Neubildung durch den erhöhten oxidativen Stress, der unter anderem auch durch Urämie entsteht [26]. Faktoren, die die CML-Konzentration potentiell beeinflussen können, sind Lebensalter, Nikotinabusus und Vorerkrankungen wie Diabetes mellitus.

Einen Einfluss des Lebensalters auf die CML-Konzentration kann man weder bei den Dialysepatienten noch bei den Gesunden erkennen. Bei niereninsuffizienten Patienten wurde das auch in einer anderen Studie nachgewiesen [22]. Bei den ohnehin schon sehr erhöhten CML-Konzentrationen spielt das Alter als Kofaktor wahrscheinlich keine große Rolle. Bei gesunden Probanden korreliert die CML-Konzentration auch nicht mit dem Lebensalter, so dass ein Einfluss des Lebensalters auf die CML-Konzentration auch hier unwahrscheinlich ist.

Rauchen erhöht den oxidativen Stress in der Lunge. Um akuten Nikotinabusus als Ursache einer möglichen Erhöhung der Marker im Atemkondensat auszuschließen, wurden, wie in anderen Studien auch, die Raucher gebeten mindestens zwei Stunden vor der Messung nicht zu rauchen. So konnte nur der chronische Nikotinabusus die Konzentrationen der Marker beeinflussen.

Das Rauchen beeinflusst die CML-Konzentration nicht, weder bei Dialysepatienten noch bei Gesunden. Es ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen nichtrauchenden und rauchenden Dialysepatienten, bzw. Gesunden, nachweisen. Zwischen niereninsuffizienten und gesunden Rauchen bzw.

Nichtrauchern ist der Unterschied genauso signifikant wie bei Dialysepatienten und Gesunden insgesamt. Das wird bestätigt durch das Ergebnis einer anderen Studie [27].

In der Dialysegruppe gab es fünf Typ 2-Diabetiker und einen Typ 1-Diabetiker. Wenn man diese aus der Dialysegruppe ausschließt, so ist die Serumkonzentration von CML bei den niereninsuffizienten Patienten immer noch signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Die Serumkonzentrationen bei den Diabetikern unterscheidet sich nicht signifikant von der der Nichtdiabetiker ($p=0,535$). Unter Beachtung, dass die Gruppe der Diabetiker mit $n=6$ nicht sehr groß ist, könnte man daraus schließen, dass Diabetes mellitus keinen großen Einfluss auf die ohnehin schon erhöhte CML-Konzentration bei dialysepflichtiger Niereninsuffizienz hat, weder positiv noch negativ. Dies war auch das Ergebnis einer anderen Studie mit höheren Fallzahlen [33].

Das varianzanalytische Modell bestätigt, dass es statistisch einen Einfluss der Niereninsuffizienz auf die CML-Konzentration im Serum gibt. Bei den Parametern Lebensalter, Nikotinabusus und Diabetes mellitus lässt sich statistisch kein signifikanter Einfluss erkennen.

4.2. N^ε-(Carboxymethyl)Lysin im Urin

Die CML-Konzentration im Urin ist bei Dialysepatienten nicht wesentlich höher als bei der Kontrollgruppe. Auch bezogen auf die Kreatininausscheidung fand sich kein signifikanter Unterschied in der CML-Konzentration. Allerdings muss man bedenken, dass die Gruppe der Dialysepatienten mit Restdiurese mit n=9 sehr klein war.

Was man auf jeden Fall feststellen kann, ist, dass Dialysepatienten CML über den Urin, wenn auch nicht in einer signifikant höheren Konzentration, ausscheiden als die Kontrollgruppe.

Fehlt die Diurese oder ist diese stark eingeschränkt, so kann CML nicht ausgeschieden werden. Das könnte der Grund für die Akkumulation von CML im Körper von Patienten mit chronischem Nierenversagen sein. Zu diesem Ergebnis kamen auch andere Studien [22,23,27,30]. Auf die Serumkonzentration von CML hat eine vorhandene oder fehlende Restdiurese keinen Einfluss, diese ist unabhängig davon stark erhöht und es lässt sich kein signifikanter Unterschied feststellen.

Schließt man bei der Betrachtung der CML-Konzentrationen im Urin die Raucher in beiden Gruppen aus, so unterschieden sich die Dialyse- und Kontrollgruppe signifikant ($p=0,000$). Der Einfluss des Rauchens lässt sich in diesem Kollektiv nicht statistisch belegen, da es nur einen niereninsuffizienten Raucher mit Restdiurese gab.

Der Einfluss von Diabetes mellitus lässt sich mit diesem Kollektiv auch nicht beurteilen, da es nur drei Diabetiker mit Restdiurese gab.

Bei der Beurteilung dieses Ergebnisses muss man bedenken, dass man nicht weiß, wie die stark geschädigte Nieren von Patienten mit chronischem Nierenversagen CML verstoffwechseln und ausscheiden können.

Das varianzanalytische Modell lässt sich hier nicht sicher anwenden, da die Gruppe der Dialysepatienten mit Restdiurese mit n=9 zu klein ist.

4.3. N^ε-(Carboxymethyl)Lysin im Atemkondensat

CML im Atemkondensat bei Patienten mit chronischem Nierenversagen ist bisher noch in keiner Studie untersucht worden. Die Erwartung, dass die CML-Konzentration im Atemkondensat bei diesen Patienten höher ist als bei Gesunden, konnte zunächst nicht bestätigt werden. Im Gegenteil, obwohl statistisch nicht signifikant, zeigen die Daten die Tendenz, dass die CML-Konzentration bei Dialysepatienten niedriger ist als bei Gesunden. Ursache dafür könnte sein, dass das Atemkondensat der Dialysepatienten einen höheren Verdünnungsgrad haben könnte. Darum wurde nicht nur die CML-Konzentration betrachtet, sondern auch das Verhältnis von CML zu Lysin im Atemkondensat. Dieses Ergebnis erfüllte die Erwartungen schon eher, denn CML/Lysin ist bei den Dialysepatienten höher als bei den Gesunden, allerdings zeigt sich keine statistische Signifikanz ($p=0,083$).

Schließt man allerdings hier die Diabetiker aus der Dialysegruppe aus, so erkennt man, dass CML/Lysin im Atemkondensat bei der Dialysegruppe signifikant höher ist als bei der Kontrollgruppe ($p=0,016$). Vergleicht man nun innerhalb der Dialysegruppe die Diabetiker mit den Nichtdiabetikern, so zeigt sich, dass die Diabetiker eine signifikant niedrigere CML/Lysin im Atemkondensat haben als die Nichtdiabetiker ($p=0,000$). Man kann diese Ergebnisse so interpretieren, dass ein Diabetes mellitus einen Einfluss auf die CML-Konzentration hat, und zwar scheinen die Werte deutlich niedriger zu sein. Für die Beurteilung des Einflusses des chronischen Nierenversagens auf die CML-Konzentration im Atemkondensat muss man die Diabetiker daher ausschließen. Anscheinend wirkt sich ein Diabetes mellitus auf so geringe Konzentrationen wie im Atemkondensat deutlicher aus, bei hohen Konzentrationen wie im Serum ist der Einfluss wahrscheinlich weniger offensichtlich. Für eine endgültige Beurteilung des Einflusses des Diabetes mellitus auf die CML-Konzentration im Atemkondensat bei Dialysepatienten und Nicht-Dialysepatienten sind jedoch weitere Studien mit höheren Gruppengrößen nötig.

Das Ergebnis des varianzanalytischen Modells bestätigt den Einfluss der Niereninsuffizienz und des Diabetes mellitus auf CML/ Lysin im Atemkondensat. Der Bezug auf die nicht veränderte Aminosäure ist eine wichtige Normierungsmaßnahme, da bei jeder Probe nicht bekannt ist, wie stark sie durch kondensierten Wasserdampf verdünnt ist. In der Annahme, dass CML

und Lysin auch im gleichen Verhältnis sezerniert werden wie sie im Atemkondensat gemessen werden, werden die einzelnen Ergebnisse vergleichbar, wenn man diese in ein Verhältnis setzt. So ist man unabhängig von einem nur schwer berechenbarem Verdünnungsfaktor [2].

Der Einfluss des Rauchens auf die CML-Konzentration wurde bisher noch nicht untersucht. In der Kontrollgruppe war die CML-Konzentration bei den Rauchern niedriger als bei den Nichtrauchern, bei den Dialysepatienten umgekehrt. Es ließ sich aber keine Signifikanz feststellen. Die Gruppe der Raucher war mit fünf und acht Rauchern sehr klein.

Chronisches Nierenversagen ist mit erhöhtem oxidativen Stress assoziiert [22,23,27,30]. Einer der Marker für oxidativen Stress, CML, lässt sich nicht nur in signifikant erhöhter Konzentration im Serum, sondern auch im Atemkondensat von Patienten mit chronischem Nierenversagen nachweisen.

4.4. 3-Nitrotyrosin im Atemkondensat

Um oxidativen Stress nicht nur mit einem Marker zu messen, wurde auch Nitrotyrosin im Atemkondensat bestimmt, das auf einem ganz anderen Weg entsteht als das CML. Nitrotyrosin ist in der Atemkondensatanalyse ein etablierter Marker, der bei Asthma bronchiale [37,41], Cystischer Fibrose [42] und COPD [9] erhöht ist. Im Serum von Dialysepatienten ist Nitrotyrosin ebenfalls erhöht [44,45]. Der Einfluss eines chronischen Nierenversagens auf die Nitrotyrosinkonzentration im Atemkondensat wurde bisher noch nicht untersucht.

Im Gegensatz zu den Erwartungen ist die Nitrotyrosinkonzentration im Atemkondensat bei Dialysepatienten niedriger als bei Gesunden. Der Unterschied ist nicht signifikant. Um den möglicherweise erhöhten Verdünnungsgrad bei den Niereninsuffizienten zu berücksichtigen, wurde genau wie beim CML das Verhältnis zur nitrierten Aminosäure betrachtet. Nitrotyrosin/Tyrosin ist zwar bei den Dialysepatienten höher als bei der Kontrollgruppe, aber auch nicht signifikant.

Einen Einfluss von Diabetes mellitus auf die Nitrotyrosinkonzentration wurde bisher nicht beschrieben und konnte hier auch nicht nachgewiesen werden.

Auch der bei Patienten mit Asthma bronchiale beschriebene Effekt von oralen Glukokortikoiden auf die Nitrotyrosinkonzentration [41] konnte hier nicht nachgewiesen werden, es ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen immunsupprimierten und nicht-immunsupprimierten Dialysepatienten nachweisen. Das heißt zwar nicht, dass es keinen Effekt gibt, aber für den Nachweis ist eine größere Gruppe von Patienten mit einer Glukokortikoid- und sonstiger immunsuppressiven Therapie notwendig.

Auch der Einfluss des Rauchens wurde untersucht. Die höchste Nitrotyrosinkonzentration hatten die niereninsuffizienten Raucher. Aber weder im Vergleich zu den niereninsuffizienten Nichtraucher, noch zu den gesunden Rauchern war die Konzentration signifikant höher. Allerdings war die Gruppe der rauchenden Dialysepatienten mit n=4 sehr klein. Auch in einer anderen Studie wurde ebenfalls festgestellt dass das Rauchen die Nitrotyrosinkonzentration im Atemkondensat bei Gesunden nicht beeinflusst und vermutet, dass das Rauchen durch das darin enthaltene NO die endogene NO-Produktion und/oder die Nitrotyrosinproduktion hemmt [43]. Auch hier wird

durch das varianzanalytische Modell bestätigt, dass es keinen statistischen Einfluss durch Immunsuppression und Nikotinabusus gibt.

4.5. Aminosäuren im Atemkondensat

Die Lysin-, Prolin- und Tyrosinkonzentrationen im Atemkondensat waren bei der Dialysegruppe signifikant niedriger als bei der Kontrollgruppe. Ursache dafür könnte eine Hypoproteinämie durch proteinarme Ernährung oder durch die Dialyse sein. Das lässt sich im nachhinein leider nicht mehr feststellen. Auch der Vergleich mit den Serumkonzentrationen ist nicht mehr möglich, da die Probenmenge dafür nicht ausreichte. Ein Einfluss der Niereninsuffizienz wird durch das varianzanalytische Modell unterstützt.

Bei den Aminosäuren wurde der Einfluss des Rauchens bisher ebenfalls nicht untersucht. Tyrosin, Prolin und Lysin zeigen ähnliche Ergebnisse. Rauchen beeinflusst die Konzentrationen anscheinend nicht.

4.6. Interpretation der Befunde der Atemkondensatanalyse

Das Ergebnis der Studie hat eine Bedeutung für den klinischen Gebrauch der Atemkondensatanalyse. Unter Beachtung der doch relativ kleinen Gruppengrößen kann man schließen, dass ein chronisches Nierenversagen offenbar die CML-Konzentration im Atemkondensat beeinflusst, wenn die Patienten keinen Diabetes mellitus haben, so dass man das bei der Befundinterpretation der Atemkondensatanalyse berücksichtigen muss, ob ein Dialysepatient Diabetiker ist oder nicht. Die Rolle des Diabetes mellitus für die CML-Konzentration im Atemkondensat muss jedoch in weiteren Studien genauer untersucht werden.

Bei der Bestimmung der Aminosäuren im Atemkondensat lässt sich auch eine Bedeutung des chronischen Nierenversagens erkennen. Bei der Befundinterpretation muss man bedenken, dass es bei dieser Studie einen signifikanten Unterschied zwischen Dialyse- und Kontrollgruppe gibt. Für eine allgemeine Empfehlung zur Befundinterpretation sind jedoch noch weitere Studien mit größeren Gruppen nötig.

Beim Nitrotyrosin ließ sich kein Einfluss des chronischen Nierenversagens nachweisen. Es scheint also so, dass man ein chronisches Nierenversagen bei der Beurteilung der Befunde im Falle des Nitrotyrosins nicht berücksichtigen müsste.

Auch das Rauchen scheint keinen Einfluss auf die Ergebnisse für CML, Nitrotyrosin und die Aminosäuren im Atemkondensat zu haben, wenn man eine mindestens zweistündige Pause zur letzten Zigarette vor der Atemkondensatsammlung festlegt.

4.7. Durchführung der Atemkondensatsammlung

Bei allen Patienten der niereninsuffizienten Gruppe war die technische Durchführung der Atemkondensatsammlung einwandfrei möglich. Da die Patienten keine sitzende Position einnehmen konnten, wurde der Winkel des Mundstücks zum Kondensator durch den Einsatz eines zusätzlichen Krümmers verkleinert, so dass die Patienten das Mundstück bequem in halbliegender Position erreichen konnten. Auf die Atmung hatte dies keinen Einfluss. Weder bei der Dauer der Atemkondensatsammlung, noch bei der Menge des gewonnenen Atemkondensats oder durchschnittlicher Atemfrequenz, Atemminutenvolumen, Atemzugvolumen und expiratorischem Peakfluss gab

es signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. Es ist ohne weiteres möglich, bei Patienten während der Dialyse Atemkondensat zu sammeln. Auch bei anderen Patientengruppen, die auf Grund ihrer Erkrankungen nicht aufrecht sitzen können, müsste die Durchführung möglich sein.

4.8. Einschränkungen der Studie

Ursache des chronischen Nierenversagens ist mit 33% der Fälle die diabetische Nephropathie, gefolgt durch glomeruläre (19%) und vaskuläre Erkrankungen (21%). Einen kleineren Anteil stellen normalerweise die tubulointerstitiellen Erkrankungen mit 4%, die zystischen Erkrankungen mit 6% und sonstige Erkrankungen mit 17%.

Die Dialysegruppe in dieser Studie repräsentiert diese Verteilung nicht, denn hier sind die glomerulären Erkrankungen mit 40% vertreten, gefolgt von den vaskulären Erkrankungen und der diabetischen Nephropathie mit je 15%. Tubulointerstitielle (4%), zystische (7%) und sonstige Erkrankungen (19%) entsprechen eher der Normalverteilung.

Es war jedoch wichtig, eine möglichst große Anzahl von Teilnehmern zu gewinnen; eine repräsentative Auswahl war so nicht möglich und für den Zweck der Studie auch nicht nötig.

Auch die Dialysemembranen wurde bei der Auswahl der Patienten nicht berücksichtigt. In anderen Studien zeigte sich, dass die Membranen keinen Einfluss auf die CML-Konzentration im Serum haben [26]. Der Einfluss der Dialysemembran auf die Konzentrationen der Marker im Atemkondensat wurde bisher nicht untersucht.

Die Atemkondensatsammlung begann bei den Dialysepatienten nicht standardisiert zu einem bestimmten Zeitpunkt der Dialyse, sondern zwischen fünf und 215 Minuten nach Dialysebeginn. Es ließen sich keine signifikanten Korrelationen zwischen den Markern im Atemkondensat und diesen Zeiten erkennen, so dass man aus dieser Beobachtung schließen kann, dass die Dialyse als Therapiemaßnahme die Konzentrationen der Marker im Atemkondensat nicht wesentlich beeinflusst. Die Blut- und Urinproben wurden vor Dialysebeginn abgenommen, so dass es hier keine mögliche Beeinflussung durch die Dialyse geben konnte. Bei den Blut- und Urinproben gab es allerdings im Unterschied zur Kontrollgruppe nicht immer einen zweistündigen Abstand zur letzten Zigarette.

5. Zusammenfassung

Atemkondensat ist der ausgeatmete Wasserdampf mit den darin gelösten Stoffen. Auf der Atemwegsoberfläche werden kleinste Tröpfchen sezerniert, die von der Oberfläche gelöst und ausgeatmet werden. Diese Tröpfchen spiegeln die aktuelle Stoffwechsellage der Lungen wider. Das Atemkondensat kann man sammeln, indem man die Ausatemluft kühlt und das Kondensat auffängt. Dieses Verfahren ist nicht-invasiv und ohne Risiken und Nebenwirkungen für den Patienten. Nachteile des Verfahrens sind die geringen Konzentrationen der Stoffe und die variable Verdünnung durch den Wasseranteil.

Oxidativer Stress ist ein Ungleichgewicht aus erhöhter Produktion von oxidativen Radikalen und Mangel an antioxidativen Mechanismen. Mit erhöhtem oxidativen Stress assoziiert sind Erkrankungen wie chronisches Nierenversagen, Diabetes mellitus, Arteriosklerose und Asthma bronchiale.

N^ε-(Carboxymethyl)Lysin (CML) gehört zu den Advanced Glycation End Products. Es entsteht durch die Glykierung von Proteinen im Rahmen der Maillard-Reaktion, durch die Oxidation von Glukose und Lipiden und anderen Reaktionen. Es akkumuliert im Bereich von arteriosklerotischen Plaques und führt dort zur Aktivierung von Makrophagen und erhöhtem oxidativen Stress. In erhöhter Serumkonzentration kann es bei chronischer Niereninsuffizienz, Leberzirrhose und Diabetes mellitus nachgewiesen werden. Bei der chronischen Niereninsuffizienz ist die Ursache dafür die unzureichende Ausscheidung über die Niere und/ oder die erhöhte Neubildung durch den erhöhten oxidativen Stress. Lebensalter, Nikotinabusus und Diabetes mellitus beeinflusst die CML-Konzentration im Serum offenbar nicht. CML im Atemkondensat von Dialysepatienten wurde bisher nicht untersucht.

3-Nitrotyrosin entsteht durch die Nitrierung der Aminosäure Tyrosin und ist ebenfalls ein Marker für oxidativen Stress. NO und O₂⁻ reagieren zu Peroxynitrit, das mit Tyrosin zu Nitrotyrosin reagiert. Im Atemkondensat ist Nitrotyrosin erhöht bei Asthma bronchiale, Cystischer Fibrose und COPD. Rauchen erhöht die Nitrotyrosinkonzentration nicht. Bei Dialysepatienten wurde die Nitrotyrosinkonzentration im Atemkondensat bisher noch nicht untersucht. Die Serumkonzentration ist erhöht bei chronischer Niereninsuffizienz und Diabetes mellitus.

Zielsetzung der Dissertation war die Untersuchung, ob CML und Nitrotyrosin im Serum, Urin und Atemkondensat von Patienten mit chronischem Nierenversagen erhöht ist unter dem Gedanken, dass man den möglichen Einfluss des chronischen Nierenversagens bei der Befundinterpretation der Atemkondensatanalyse berücksichtigen müsste.

Dazu wurden 27 Patienten mit chronischem Nierenversagen, die sich einer ambulanten Hämodialysetherapie unterziehen, untersucht. Als Kontrollgruppe dienten 28 nierengesunde Probanden. Bei allen Teilnehmern wurde eine ausführliche Anamnese erhoben und eine Blut- und soweit möglich eine Urinprobe entnommen. Mit einem kommerziellen Atemkondensator wurde das Atemkondensat gesammelt. Bei den niereninsuffizienten Patienten geschah dies bei laufender Dialyse. Die Atemkondensat-, Blut- und Urinproben wurden noch weiter verarbeitet und bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

Die laborchemischen Messungen beruhen teilweise auf Verfahren, die von Mitarbeitern des Instituts für Arbeitsmedizin und Sozialmedizin entwickelt und veröffentlicht wurden. CML im Serum und Urin wurde mittels GC-MS(Sim) gemessen, Kreatinin in Urin mittels Photometrie, Kreatinin im Serum im Zentrallabor des UKAs, CML und Lysin, sowie Nitrotyrosin und Tyrosin zusammen mit Prolin und Hydroxyprolin mittels HPLC-MS/MS. Es hat sich gezeigt, dass diese Verfahren sicher und empfindlich und die Nachweisgrenzen ausreichend sind.

Die Dialysepatienten hatten eine signifikant höhere CML- und Kreatininkonzentration im Serum als die Kontrollgruppe. CML korrelierte positiv mit dem Kreatinin und negativ mit der GFR. Ursache für die hohe Konzentration ist wahrscheinlich die sehr eingeschränkte CML-Ausscheidung über die Nieren und/ oder die erhöhte Neubildung durch den erhöhten oxidativen Stress. Eine Beeinflussung durch das Lebensalter, das Rauchen und Diabetes mellitus war in dieser Studie nicht erkennbar.

Im Urin unterschieden sich die CML- und Kreatininkonzentrationen, sowie CML/Kreatinin nicht signifikant.

Im Atemkondensat konnte ein signifikanter Unterschied beim CML/Lysin zwischen Kontrollgruppe und Dialysegruppe nachgewiesen werden, wenn man die Patienten mit Diabetes mellitus ausschließt. CML/Lysin war bei den niereninsuffizienten Diabetikern signifikant niedriger als bei den niereninsuffizienten Nichtdiabetikern.

Bei der Nitrotyrosinkonzentration im Atemkondensat sowie Nitrotyrosin/Tyrosin unterschieden sich beide Gruppen nicht signifikant. Einen Einfluss einer Immunsuppression oder des Rauchens ließ sich hier nicht erkennen.

Die Aminosäuren Lysin, Tyrosin und Prolin ließen sich im Atemkondensat der Dialysepatienten in signifikant niedrigeren Konzentrationen nachweisen als bei der Kontrollgruppe. Rauchen hatte hier ebenfalls keinen Einfluss.

Alle Ergebnisse stellten sich auch im varianzanalytischen Modell dar.

Bei der Befundinterpretation der Atemkondensatanalyse muss man berücksichtigen, dass CML/Lysin offenbar durch chronisches Nierenversagen erhöht wird. Dazu muss man aber unterscheiden, ob der Dialysepatient Diabetiker ist oder nicht, denn ein signifikant höheres CML/Lysin konnte in dieser Studie nur bei niereninsuffizienten Nichtdiabetikern im Vergleich zur Kontrollgruppe gemessen werden. Für eine Beurteilung des Einflusses des Diabetes mellitus auf CML/Lysin sind weitere Studien nötig. Die Aminosäuren im Atemkondensat sind bei Dialysepatienten offenbar niedriger. Auf Nitrotyrosin im Atemkondensat hat chronisches Nierenversagen anscheinend keinen Einfluss.

6. Literaturverzeichnis

- [1] Kharitonov, Barnes.
Exhaled markers of inflammation.
Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology
2001; 1:217-224
- [2] Hunt.
Exhaled breath condensate: an evolving tool for non-invasive evaluation of lung disease.
Journal of Allergy and Clinical Immunology
2002; 110:28-34
- [3] Schettgen, Tings, Brodowsky, Müller-Lux, Musiol, Kraus.
Simultaneous determination of the advanced glycation end product N^ε-(carboxymethyl)lysine and its precursor lysine in exhaled breath condensate using isotope-dilution-hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to tandem-mass spectrometry.
Analytical and Bioanalytical Chemistry
2007; 387:2783-2791
- [4] Effros, Biller, Foss, Hoagland, Dunning, Castillo, Bosbous, Sun, Shaker.
A simple method for estimating respiratory solute dilution in exhaled breath condensates.
American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine
2003; 168:1500-1505
- [5] Effros, Hoagland, Bosbous, Castillo, Foss, Dunning, Gare, Lin, Sun.
Dilution of respiratory solutes in exhaled condensates.
American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine
2002; 165:663-669
- [6] Mutlu, Garey, Robbins, Danziger, Rubinstein.
Collection and analysis of exhaled breath condensate in humans.
American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine
2001; 164:731-737

- [7] Effros, Su, Casaburi, Shaker, Biller, Dunning.
Utility of exhaled breath condensates in chronic obstructive pulmonary disease: a critical review.
Obstructive, occupational, and environmental diseases
2005; 11:135-139
- [8] Baraldi, Ghio, Piovan, Carraro, Zacchello, Zanconato.
Safety and success of exhaled breath condensate collection in asthma.
Archives of Disease in Childhood
2003; 88:358-360
- [9] Liu, Thomas.
Exhaled breath condensate as a method of sampling airway nitric oxide and other markers of inflammation.
Medical Science Monitor
2005; 11(8):MT53-62
- [10] Herold (Hrsg.)
Chronische Niereninsuffizienz und Urämie; 535-541
in: *Innere Medizin*
2004, Köln.
- [11] Alexander, Daniel, Diener, Freund, Köhler, Matern, Maurer, Michel, Nowak, Risler, Schaffner, Scherbaum, Sybrecht, Wolfram, Zeitz (Hrsg.), Weber, Riegel.
6.17 Eliminationsverfahren; 1417-1433
in: *Thiemes Innere Medizin*
1999, Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart
- [12] Alexander, Daniel, Diener, Freund, Köhler, Matern, Maurer, Michel, Nowak, Risler, Schaffner, Scherbaum, Sybrecht, Wolfram, Zeitz (Hrsg.), Girndt.
6.18 Nierentransplantation; 1434-1440
in: *Thiemes Innere Medizin*
1999, Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart

- [13] Fu, Requena, Jenkins, Lyons, Baynes, Thorpe.
The advanced glycation end product, N^ε-(carboxymethyl)lysine, is a product of both lipid peroxidation and glycoxidation reactions.
The Journal of Biological Chemistry
1996; 271(17):9982-9986
- [14] Anderson, Requena, Crowley, Thorpe, Heinecke.
The myeloperoxidase system of human phagocytes generates N^ε-(carboxymethyl)lysine on proteins: a mechanism for producing advanced glycation end products at sites of inflammation.
The Journal of Clinical Investigation
1999; 104(1): 103-113
- [15] Nagai, Unno, Hayashi, Masuda, Hayase, Kinane, Horiuchi.
Peroxynitrite induces formation of N^ε-(carboxymethyl)lysine by the cleavage of amadori product and generation of glucosone and glyoxal from glucose: Novel pathways for protein modification by peroxynitrite.
Diabetes
2002; 51:2833-2839
- [16] Han, Randell, Vasdev, Gill, Gadag, Newhook, Grant, Hagerty.
Plasma methylglyoxal and glyoxal are elevated and related to early membrane alteration in young, complication-free patients with type 1 diabetes.
Molecular and Cellular Biochemistry
2007; 305(1-2):123-131
- [17] Weiss, Erhard, Kader-Attia, Wu, DeOreo, Araki, Glomb, Monnier.
Mechanism for the formation of glycoxidation products in end-stage renal disease.
Kidney International
2000; 57:2571-2585
- [18] Bierhaus, Hofmann, Ziegler, Nawroth.
AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept.
Cardiovascular Research
1997; 37:586-600

- [19] Schleicher, Wagner, Nerlich.
Increased accumulation of the glycoxidation product N^ε-(carboxymethyl)lysine in human tissues in diabetes and aging.
The Journal of Clinical Investigation
1997; 99(3):457-468
- [20] Sakata, Uesugi, Takebayashi, Nagai, Jono, Horiuchi, Takeya, Itabe, Takano, Myint, Taniguchi.
Glycoxidation and lipid peroxidation of low-density lipoprotein can synergistically enhance atherogenesis.
Cardiovascular Research
2001; 49:466-475
- [21] Kislinger, Fu, Huber, Qu, Taguchi, Yan, Hofmann, Yan, Pischetsrieder, Stern, Schmidt.
N^ε-(carboxymethyl)lysine adducts of proteins are ligands for receptor for advanced glycation end products that activate cell signaling pathways and modulate gene expression.
The Journal of Biological Chemistry
1999; 274(44):31740-31749
- [22] Šebeková, Podracká, Blažíček, Syrová, Heidland, Schinzel.
Plasma levels of advanced glycation end products in children with renal disease.
Pediatric Nephrology
2001; 16:1105-1112
- [23] Van de Kerkhof, Schalkwijk, Konings, Cheriex, van der Sande, Scheffer, ter Wee, Leunissen, Kooman.
N^ε-(carboxymethyl)lysine, N^ε-(carboxymethyl)lysine and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in relation to peritoneal glucose prescription and residual renal function; a study in peritoneal dialysis patients.
Nephrology Dialysis Transplantation
2004; 19:910-916

- [24] Šebeková, Kupčová, Schinzel, Heidland.
Markedly elevated levels of plasma advanced glycation end products in patients with liver cirrhosis – amelioration by liver transplantation.
Journal of Hepatology
2002; 36:66-71
- [25] Gonzalez-Reche, Musiol, Müller-Lux, Kraus, Göen.
Method optimization and validation for the simultaneous determination of arachidonic acid metabolites in exhaled breath condensate by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry.
Journal of Occupational Medicine
2006; 1:5
- [26] Busch, Franke, Müller, Wolf, Gerth, Ott, Niwa, Stein.
Potential cardiovascular risk factors in chronic kidney disease: AGEs, total homocysteine and metabolites, and the C-reactive protein.
Kidney International
2004; 66:338-347
- [27] Schwedler, Metzger, Schinzel, Wanner.
Advanced glycation end products and mortality in hemodialysis patients.
Kidney International
2002; 62:301-310
- [28] Lieu-A-Fa, van Hinsbergh, Teerlink, Barto, Twisk, Stehouwer, Schalkwijk.
Increased levels of N^ε-(carboxymethyl)lysine and N^ε-(carboxymethyl)lysine in type 1 diabetic patients with impaired renal function: correlation with markers of endothelial dysfunction.
Nephrology Dialysis Transplantation
2004; 19:631-636
- [29] Hirata, Kubo.
Relationship between blood levels of N^ε-(carboxymethyl)lysine and pentosidine and the severity of microangiopathy in type 2 diabetes.
Endocrine Journal
2004; 51:537-544

- [30] Misselwitz, Franke, Kauf, John, Stein.
Advanced glycation end products in children with chronic renal failure and type 1 diabetes.
Pediatric Nephrology
2002; 17:316-321
- [31] Butscheid, Schäfer, Brenner, Alscher, Mürdter, Niwa, Frischmann, Pischetsrieder, Klotz.
Unchanged serum levels of advanced glycation end products in patients with liver disease.
Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology
2007; 375:401-406
- [32] Heidland, Šebeková, Frangiosa, De Santo, Cirillo, Rossi, Cotrufo, Perna, Klassen, Schinzel, De Santo.
Paradox of circulating advanced glycation end product concentrations in patients with congestive heart failure and after heart transplantation.
Heart
2004; 90:1269-1274
- [33] Miyata, Fu, Kurokawa, van Ypersele de Strihou, Thorpe, Baynes.
Autoxidation products of both carbohydrates and lipids are increased in uremic plasma: Is there oxidative stress in uremia?
Kidney International
1998; 54:1290-1295
- [34] Gonzalez-Reche, Kucharczyk, Musiol, Kraus.
Determination of N^ε-(carboxymethyl)lysine in exhaled breath condensate using isotope dilution liquid chromatography/ electrospray ionisation tandem mass spectrometry
Rapid Communications in Mass Spectrometry
2006; 20:2747-2752
- [35] Van der Vliet, Eiserich, Shigenaga, Cross.
Reactive nitrogen species and tyrosine nitration in the respiratory tract: Epiphenomena or a pathobiologic mechanism of disease?
American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine
1999; 160:1-9

- [36] Andreadis, Hazen, Comhair, Erzurum.
Oxidative and nitrosative events in asthma.
Free Radical Biology & Medicine
2003; 35(3):213-225
- [37] Baraldi, Giordano, Pasquale, Carraro, Mardegan, Bonetto, Bastardo, Zacchello, Zanconato.
3-Nitrotyrosine, a marker of nitrosative stress, is increased in breath condensate of allergic asthmatic children.
Allergy
2006; 61:90-96
- [38] Saleh, Ernst, Lim, Barnes, Giaid.
Increased formation of the potent oxidant peroxynitrite in the airways of asthmatic patients is associated with induction of nitric oxide synthase: effect of inhaled glucocorticoid.
The FASEB Journal
1998; 12:929-937
- [39] MacPherson, Comhair, Erzurum, Klein, Lipscomb, Kavuru, Samoszuk, Hazen.
Eosinophils are a major source of nitric oxide-derived oxidants in severe asthma: Characterization of pathways available to eosinophils for generating reactive nitrogen species.
The Journal of Immunology
2001; 166(9):5763-5772
- [40] Göen, Müller-Lux, Dewes, Musiol, Kraus.
Sensitive and accurate analyses of free 3-nitrotyrosine in exhaled breath condensate by LC-MS/MS.
Journal of Chromatography B
2005; 826:261-266
- [41] Hanazawa, Kharitonov, Barnes.
Increased nitrotyrosine in exhaled breath condensate of patients with asthma.
American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine
2000; 162:1273-1276

- [42] Balint, Kharitonov, Hanazawa, Donnelly, Shah, Hodson, Barnes.
Increased nitrotyrosine in exhaled breath condensate in cystic fibrosis.
European Respiratory Journal
2001; 17:1201-1207
- [43] Balint, Donnelly, Hanazawa, Kharitonov, Barnes.
Increased nitric oxide metabolites in exhaled breath condensate after exposure to tobacco smoke.
Thorax
2001; 56:456-461
- [44] Fukuyama, Takebayashi, Hida, Ishida, Ichimori, Nakazawa.
Clinical evidence of peroxynitrite formation in chronic renal failure patients with septic shock.
Free Radical Biology & Medicine
1997; 22(5):771-774
- [45] Ceriello, Mercuri, Quagliaro, Assaloni, Motz, Tonutti, Taboga.
Detection of nitrotyrosine in the diabetic plasma: evidence of oxidative stress.
Diabetologia
2001; 44:834-838
- [46] Schwemmer, Fink, Köckenbauer, Bassenge.
How urine analysis reflects oxidative stress - nitrotyrosine as a potential marker.
Clinica Chimica Acta
2000; 297:207-216
- [47] Hunt, Aru, Hayden, Moore, Hoit, Tyagi.
Induction of oxidative stress and disintegrin metalloproteinase in human heart end-stage failure.
American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology
2002; 283:239-245
- [48] Kreuzig.
2. Aminosäuren und Proteine; 9-29
in: *Kurzlehrbuch Biochemie*
2002, 11. Auflage, Urban & Fischer, München

- [49] Löffler, Petrides.
2. Aminosäuren und Polyaminosäuren (Proteine); 33-81
in: *Biochemie und Pathobiochemie*
1998, 6. Auflage, Springer-Verlag, Berlin
- [50] Löffler, Petrides.
19. Stoffwechsel der Aminosäuren; 521-579
in: *Biochemie und Pathobiochemie*
1998, 6. Auflage, Springer-Verlag, Berlin
- [51] Kreuzig.
4. Aminosäurestoffwechsel; 53-88
in: *Kurzlehrbuch Biochemie*
2002, 11. Auflage, Urban & Fischer, München
- [52] Kreuzig.
22. Bindegewebe; 501-506
in: *Kurzlehrbuch Biochemie*
2002, 11. Auflage, Urban & Fischer, München
- [53] Petrovic, Futas, Chandoga, Jakus.
Rapid and simple method for determination of N^ε-(carboxymethyl)lysine and N^ε-(carboxymethyl)lysine in urine using gas chromatography/mass-spectrometry.
Biomedical Chromatography
2005; 19(9):649-654
- [54] Taussky.
A micro-colorimetric determination of creatinine in urine by the jaffé reaction.
The Journal of Biological Chemistry
1954; 208:153-861
- [55] Conventz, Schettgen, Brodowsky, Müller-Lux, Musiol, Kraus.
Simultaneous determination of 3-nitrotyrosine, tyrosine, hydroxyproline and proline in exhaled breath condensate by hydrophilic interaction liquid chromatography/ electrospray ionization tandem mass spectrometry
Journal of Chromatography B
2007; 860:78-85

7. Danksagung

Danken möchte ich Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Kraus für die Überlassung des Themas und für die Unterstützung zur Durchführung der Arbeit.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Dr. med. Müller-Lux für die ausgezeichnete Betreuung bedanken.

Für die gute Betreuung im Labor und die guten Ratschläge bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Arbeitsmedizin und Sozialmedizin des Universitätsklinikums Aachen, im Besonderen bei Frau Dipl.-Ing. Musiol, Herrn Dr. rer. nat. Schettgen und Frau Dipl.-Biol. Conventz.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Hilgers und Herrn Dr. phil. nat. Brand für die Durchsicht des Manuskriptes und die hilfreichen Anmerkungen. Prof. Dr. rer. nat. Hilgers und seinem Team möchte ich außerdem für die gute statistische Beratung danken.

Außerdem möchte ich mich herzlich bedanken bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Floege und bei Herrn Prof. Dr. med. Heidenreich für die Möglichkeit, die Untersuchung in ihren Räumlichkeiten und an ihren Patienten durchführen zu können, und bei allen Ärzten und Pflegekräften der Dialysestation des Universitätsklinikums Aachen und des Nierenzentrums des KfH für die gute Zusammenarbeit.

Für die moralische Unterstützung und Motivation möchte ich mich bei meiner Mutter, meiner Schwester und all meinen Freunden bedanken.

Vielen Dank.

8. Erklärung § 5 Abs.1 zur Datenaufbewahrung

Hiermit erkläre ich, dass die dieser Dissertation zugrunde liegenden Originaldaten bei mir, Cindy Brodowsky, Lousbergstr. 22, 52072 Aachen, hinterlegt sind.

9. Lebenslauf

Persönliches

Name	Cindy Brodowsky
Geburtsdatum	14.05.1980
Geburtsort	Heerlen/ Niederlande

Schullaufbahn

1986-1990	GGs Frelenberg in Übach-Palenberg
1990-1999	städt. Gymnasium Übach-Palenberg
Sommer 1999	Erreichen der allgemeinen Hochschulreife

Berufsausbildung

1999-2001	Berufsausbildung zur Rettungsassistentin
-----------	--

Studium

2001-2008	Medizin an der RWTH Aachen
Sommer 2003	Ärztliche Vorprüfung
2006-2007	Praktisches Jahr im St.-Antonius-Hospital in Eschweiler
Sommer 2008	Zweiter Abschnitt der Ärztliche Prüfung mit Erhalt der Approbation als Ärztin

Berufliche Tätigkeit

seit Sommer 2008	Assistenzärztin an der Klinik für Anästhesiologie des Universitätsklinikums Aachen
------------------	--

Nebentätigkeiten

seit 1999	ehrenamtliche Tätigkeit beim Malteser Hilfsdienst in Aachen
2001-2008	Rettungsassistentin im öffentlichen Rettungsdienst der Stadt Aachen
seit 2001	Fachdozentin an der Malteser Schule in Aachen
seit 2004	Lehrrettungsassistentin