

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen
Abteilung Innere Medizin IV
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H.-U. Häring

**Quantifizierung der Erythronsäure im Serum von
Diabetikern, Nicht-Diabetikern und
Dialysepatienten**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN-FAKULTÄT
der
Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
BRIGITTE RENATE REIN geb. FAIX
aus Böblingen

2003

Dekan:

Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter:

Professor Dr. R.-M. Schmülling

2. Berichterstatter:

Professor Dr. T. Risler

Meinen Eltern zum Dank

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	vii
Tabellenverzeichnis	ix
Symbolverzeichnis	xi
1 Einleitung	1
1.1 Diabetes mellitus	1
1.1.1 Definition	3
1.1.2 Klassifikation	3
1.1.3 Ätiologie und Pathogenese des Diabetes mellitus	5
1.1.3.1 Typ I-Diabetes	5
1.1.3.2 Typ II-Diabetes	5
1.1.4 Spätschäden	6
1.1.4.1 Makroangiopathie	7
1.1.4.2 Mikroangiopathie	7
1.2 Glykierung	8
1.3 AGE-Produkte	10
1.4 Glukoxidation oder oxidative Spaltung glykierter Proteine	11
1.4.1 Oxidativer Stress	13

1.4.2	Carboxymethyllysin	14
1.4.3	Erythronsäure	15
1.5	Glykierungsprodukte bei verschiedenen Erkrankungen	17
1.5.1	Glykierungsprodukte beim Diabetes mellitus	17
1.5.2	Glykierungsprodukte bei Dialysepatienten	18
1.5.3	Glykierungsprodukte bei anderen Erkrankungen	19
1.6	Quantifizierung von Glykierungsprodukten	19
1.7	Problemstellung	20
2	Material und Methoden	21
2.1	Material	21
2.1.1	Serumproben	21
2.1.2	Reagenzien	22
2.1.3	Geräte	23
2.1.4	Verbrauchsmaterialien	24
2.1.5	Standards und Lösungen	24
2.1.6	Herstellung von Diazomethan	24
2.2	Methodenfindung zur Quantifizierung der Erythronsäure	25
2.2.1	Interner Standard	26
2.2.2	Festphasenextraktion	26
2.2.2.1	Konditionierung der MM-Säulen	26
2.2.2.2	Untersuchung	27
2.2.3	Eiweißfällung	27
2.2.4	Derivatisierung	28
2.2.4.1	Methylierung mit Diazomethan	28
2.2.4.2	Aufarbeitung mit Natronlauge	28

2.2.4.3	Silylierung	29
2.2.5	Gaschromatographische Analyse	29
2.2.5.1	Gaschromatographische Trennung	30
2.2.5.2	Identifikation von Erythronsäure und Erythronsäurelaktol	31
2.2.5.3	Identifikation des Internen Standards	31
2.3	Datenerhebung	31
2.3.1	Diabetiker	31
2.3.2	Kontrollpersonen	32
2.3.3	Dialysepatienten	32
2.4	Statistische Auswertung	32
3	Ergebnisse	33
3.1	Methode zur Quantifizierung der Erythronsäure im Serum	33
3.1.1	Basismethode	33
3.1.2	Methodenfindung	33
3.1.2.1	Interner Standard	33
3.1.2.2	Festphasenextraktion	34
3.1.2.3	Eiweißfällung und Weiterbearbeitung ohne Festphasenextraktion	35
3.1.3	Derivatisierung	35
3.1.3.1	Methylierung mit Diazomethan	36
3.1.3.2	Aufarbeitung mit Natronlauge	36
3.1.3.3	Silylierung	36
3.1.4	Endgültige Methoden	36
3.1.5	Gaschromatographische Trennung	39

3.1.5.1	Massenspektrometrische Detektion	39
3.1.5.2	Quantifizierung der Erythronsäure	40
3.1.6	Eichkurve	44
3.1.6.1	Eichkurve für die Aufarbeitung mit Diazomethan . .	45
3.1.6.2	Eichkurve für die Aufarbeitung mit Natronlauge . . .	46
3.2	Datenauswertung	47
3.2.1	Diabetiker und Kontrollpersonen	49
3.2.1.1	HbA _{1c} bei Diabetikern und Kontrollpersonen	49
3.2.1.2	Erythronsäure bei Diabetikern und Kontrollpersonen	49
3.2.2	Typ I- und Typ II-Diabetiker	50
3.2.3	Diabetesdauer	51
3.2.4	Nephropathie	52
3.2.4.1	Zusammenhang zwischen Erythronsäurekonzentration und Nephropathie	53
3.2.4.2	Zusammenhang zwischen HbA _{1c} und Nephropathie .	54
3.2.5	Retinopathie	55
3.2.5.1	Zusammenhang zwischen Erythronsäurekonzentration und Retinopathie	56
3.2.5.2	Zusammenhang zwischen HbA _{1c} und Retinopathie .	58
3.2.6	Hypertonie und/oder pAVK	59
3.2.7	Klinisch-chemische Untersuchungen	60
3.2.7.1	HbA _{1c}	60
3.2.7.2	Blutglukose	61
3.2.8	Dialyse	61
4	Diskussion	65
4.1	Alter, Geschlecht und BMI	65
4.2	Diabetiker und Kontrollpersonen	67

4.2.1	HbA _{1c} bei Diabetikern und Kontrollpersonen	67
4.2.2	Erythronsäure bei Diabetikern und Kontrollpersonen	68
4.3	Diabetestyp	69
4.4	Diabetesdauer	70
4.5	Diabetische Spätschäden	71
4.5.1	Nephropathie	71
4.5.2	Retinopathie	73
4.5.3	Hypertonie und/oder pAVK	75
4.6	HbA _{1c}	75
4.7	Blutglukose	77
4.8	Dialyse	78
4.9	Oxidativer Stress	81
4.10	Exogene Zufuhr	82
5	Zusammenfassung der Ergebnisse	83
	Literaturverzeichnis	87
	Danksagung	101
	Lebenslauf	103

Abbildungsverzeichnis

1.1	Glykierung / nichtenzymatische Glykosilierung	9
1.2	Bildung der Erythronsäure durch Glukoxidation	12
3.1	Ionenchromatogramm einer Serumprobe	41
3.2	Massenspektrogramm von 1,2,6 Trihydroxyhexan	41
3.3	Massenspektrogramm des Erythronsäurelaktons	42
3.4	Ionenchromatogramm des Erythronsäurelaktons	42
3.5	Massenspektrogramm der Erythronsäure	43
3.6	Ionenchromatogramm der Erythronsäure	43
3.7	Eichkurve der Aufarbeitung mit Diazomethan	45
3.8	Eichkurve der Aufarbeitung mit Natronlauge	46
3.9	Erythronsäure bei Diabetikern und Kontrollpersonen ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) . . .	50
3.10	Erythronsäure bei Typ I- und Typ II-Diabetikern ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)	51
3.11	Erythronsäure bei unterschiedlicher Diabetesdauer ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)	52
3.12	Erythronsäure u. das Vorhandensein einer Nephropathie ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) . .	53
3.13	Erythronsäure bei versch. Stadien der Nephropathie ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) . . .	54
3.14	HbA _{1c} und das Vorhandensein einer Nephropathie ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)	55
3.15	Erythronsäure u. das Vorhandensein einer Retinopathie ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) . . .	57
3.16	Erythronsäure bei versch. Stadien der Retinopathie ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)	57

3.17 HbA _{1c} und das Vorhandensein einer Retinopathie ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)	58
3.18 Erythronsäure b. Diabetikern m./o. Gefäßerkrankungen ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) . . .	59
3.19 Erythronsäure und Diabeteseinstellung ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)	60
3.20 Erythronsäure vor und nach Dialyse ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)	62
3.21 Erythronsäure bei den verschiedenen Gruppen ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)	63

Tabellenverzeichnis

2.1	Basismethode der Urinaufarbeitung und -derivatisierung	25
3.1	Basismethode der Urinaufarbeitung und -derivatisierung	34
3.2	Aufarbeitung von Serumproben mit Festphasenextraktion	35
3.3	Endgültige Aufarbeitungsmethoden im Vergleich	38
3.4	Messwerte für die Eichkurve des Ions m/z 220 (Diazomethan)	45
3.5	Messwerte für die Eichkurve des Ions m/z 220 (NaOH)	46
3.6	Altersverteilung bei Diabetikern und Kontrollpersonen	47
3.7	Geschlechtsverteilung bei Diabetikern und Kontrollpersonen	48
3.8	Body-Mass-Index bei Diabetikern und Kontrollpersonen	48
3.9	HbA _{1c} bei Diabetikern und Kontrollpersonen	49
3.10	Erythronsäure bei Diabetikern und Kontrollpersonen	49
3.11	Erythronsäure bei Typ I- und Typ II-Diabetikern	50
3.12	Erythronsäure bei unterschiedlicher Diabetesdauer	51
3.13	Erythronsäure bei vorhandener / nicht vorhandener Nephropathie	53
3.14	Erythronsäure bei verschiedenen Stadien der Nephropathie	54
3.15	HbA _{1c} bei vorhandener / nicht vorhandener Nephropathie	55
3.16	Erythronsäure bei vorhandener / nicht vorhandener Retinopathie	56
3.17	Erythronsäure bei verschiedenen Stadien der Retinopathie	56

3.18 HbA _{1c} bei vorhandener / nicht vorhandener Retinopathie	58
3.19 Erythronsäure bei Diabetikern mit/ohne Gefäßveränderungen	59
3.20 Erythronsäure bei guter und schlechter Diabeteseinstellung	60
3.21 Erythronsäure vor und nach Dialyse	62
3.22 Erythronsäure bei Kontrollpersonen, Diabetikern u. Dialysepatienten	63

Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

Im folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen und Symbole dargestellt.

<i>A_{ES}</i>	Peakfläche (GC-MS) Erythronsäure
<i>A_{IST}</i>	Peakfläche (GC-MS) Interner Standard
<i>ADA</i>	American Diabetes Organisation
<i>AGE</i>	Advanced Glycosylation End Products
<i>AK</i>	Antikörper
<i>Aqua dest.</i>	Destilliertes Wasser
<i>BMI</i>	Body-Mass-Index
<i>BSTFA</i>	bis(Trimethyl-Silyl)Trifluoro-Acetamide
<i>CML</i>	Carboxymethyllysine
<i>CMV</i>	Zytomegalievirus
<i>DNA</i>	Desoxyribonukleinsäure
<i>EDTA</i>	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>ELISA</i>	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
<i>ES</i>	Erythronsäure

<i>eV</i>	Elektronenvolt
<i>GC</i>	Gaschromatographie
<i>GFR</i>	Glomeruläre Filtrationsrate
<i>h</i>	Stunde
<i>HIR – A/B</i>	Humaner Insulinrezeptor Isoform A/B
<i>H₂O</i>	Wasser
<i>HPLC</i>	High Pressure Liquid Chromatography
<i>IAA</i>	Insulin-Autoantikörper
<i>IgG</i>	Immunglobulin G
<i>IL – 1</i>	Interleukin 1
<i>IST</i>	Interner Standard
<i>J</i>	Jahre
<i>KOH</i>	Kaliumhydroxid = Kalilauge
<i>Konz.</i>	Konzentration
<i>l</i>	Liter
<i>LDL</i>	Low density lipoproteins
<i>M.</i>	Morbus
<i>ME</i>	Masseneinheit
<i>min</i>	Minute
<i>MODY</i>	Maturity onset diabetes of the young
<i>MS</i>	Massenspektrometrie
<i>m/z</i>	Masse / Ladung
<i>n</i>	Anzahl

N_2	Stickstoff
$NaCl$	Natriumchlorid
$NaFl$	Natriumfluorid
$NaOH$	Natriumhydroxid = Natronlauge
p	Signifikanz
$PIAA$	Proinsulin-Autoantikörper
RPF	Renaler Plasmafluß
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler
SIM	Selected Ion Monitoring
TMS	Trimethylsilyl
TNF	Tumornekrosefaktor
$TSIM$	Trimethylsilylimidazol
U/min	Umdrehungen pro Minute
WHO	World Health Organisation
\bar{x}	Arithmetisches Mittel

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus, „honigsüßer Durchfluss“, ist mit einer Prävalenz von 2 (REINWEIN UND BENKER, 1992) bis 7,5% (BOTTERMANN, 1994) die häufigste endokrine Erkrankung unserer Zeit. Dabei entfallen ca. 90% auf den Typ II-Diabetes und nur ca. 10% auf den Typ I-Diabetes. Die große Anzahl der von dieser Erkrankung betroffenen Patienten macht die Notwendigkeit intensiver Forschungsbemühungen deutlich.

Bis zur Entdeckung des Insulins durch F. G. Banting und C. H. Best im Jahre 1921 (BANTING ET AL., 1922) gab es außer einer Diät keine Behandlungsmöglichkeit. 1922 erhielt der 14-jährige Leonard Thomsen als erster Diabetiker das Hormon Insulin. Dies war ein Meilenstein in der Behandlung des Diabetes, denn nun konnte das fehlende Hormon substituiert werden und die Schwere und Häufigkeit der Hyperglykämien und der gefürchteten Ketoazidosen verminderte sich erheblich.

Dies führte zu einer steigenden Lebenserwartung der Diabetiker (JANKA, 1983), die nun unter den diabetestypischen Spätkomplikationen zu leiden hatten - der diabetischen Mikro- und Makroangiopathie. Die zur Mikroangiopathie zählende Nephropathie, Retinopathie und Neuropathie traten in den Vordergrund (MORELL, 1983, WINEGRAD, 1987). Wichtig dabei ist, dass diese Spätkomplikationen nicht nur die Lebenserwartung verkürzen, sondern auch die Lebensqualität in erheblichem Ausmaß mindern und zu Behinderungen verschiedenster Art (z.B. Erblindung, Polyneuropathie, Amputationen von Gliedmaßen, Dialysepflichtigkeit, usw.) führen können (STANDL, 1983, NATHAN, 1993).

Weitere Forschungen zeigten die Notwendigkeit einer guten Diabeteseinstellung zur Verringerung oder Vermeidung diabetischer Folgeschäden (SKYLER, 1990, STROWIG AND RASKIN, 1995). In der Folge kam es in den 70er und 80er Jahren zur Entwicklung der intensivierten Insulintherapie (SCHMALFUSS, 1999), bei der nicht die alleinige Senkung des Blutzuckers, sondern die Anpassung der Insulingabe an die Essgewohnheiten und der Grad der Aktivität entscheidend sind. Ziel ist es, einen möglichst physiologischen Insulin- und Blutzuckerlauf zu erreichen. Es hat sich gezeigt, dass die Verbesserung der Stoffwechsellage bei guter Diabeteseinstellung zu einer Verminderung mikroangiopathischer Spätschäden führt (SKYLER, 1990, REICHARD, 1995, DAHLJORGENSEN, 1998).

Die wohl größte Studie des Belgiers Pirart umfasste den prospektiven Krankheitsverlauf von 4400 Patienten in einem Zeitraum von bis zu 25 Jahren. Die Stoffwechseleinstellung wurde anhand der Blut- und Urinzuckerwerte beurteilt. Dabei zeigte sich, dass bei schlechter Diabetesführung im Zeitverlauf deutlich mehr Patienten eine Retinopathie, Nephropathie und Neuropathie entwickelten, insbesondere auch die schwereren Formen, als jene mit guter Stoffwechseleinstellung (PIRART ET AL. 1978). Zu entsprechenden Ergebnissen kommen Studien wie die der Diabetes Control and Complications Trial Research Group mit 1441 Diabetikern (DCCT, 1995), eine kleinere Studie mit 298 Probanden von Nathan und seinen Mitarbeitern (NATHAN ET AL. 1986) und die Stockholm Diabetes Intervention Studie mit 102 Diabetikern (REICHARD ET AL. 1990).

Als eine der grundlegenden Ursachen der Mikroangiopathie wird die Bildung von sog. **Advanced Glycosylation End-Products**, kurz AGE-Produkte, angesehen (BROWNLEE, 1992, BUCALA ET AL., 1995). Ihre Entstehung wird durch hyperglykämische Stoffwechsellagen begünstigt und erfolgt durch eine nichtenzymatische Reaktion zwischen Glukose und einem Protein, die man als Glykierung bezeichnet. Durch Umlagerung innerhalb des Reaktionsproduktes, der sog. Amadori-Umlagerung entsteht ein Fruktosamin (STARKE, 1995). Langsame Folgereaktionen dieses Fruktosamins wie z.B. chemische Umlagerung, Dehydrierung und Spaltung können zur Ausbildung von AGE-Produkten führen (BROWNLEE, 1990, SUGIYAMA ET AL., 1996). Die fluoreszierenden, braun gefärbten AGE-Produkte akkumulieren in langlebigen Proteinen und führen zu deren Quervernetzung (MAKITA, 1995, MAKINO ET AL., 1996). Dadurch können sich biologische und mechanische Eigenschaften der Proteine verändern, was bis zu deren Funktionsverlust führen kann (WATKINS, 1995).

AGE-Produkte entstehen beim normalen Alterungsprozess und lassen sich bei Diabetikern und urämischen Patienten sogar in erhöhter Menge nachweisen (MONNIER ET AL., 1992, ODANI, 1999).

Neben der Bildung von AGE-Produkten kann das Fruktosamin auch oxidativ gespalten werden. Dabei entsteht unter Abspaltung von Erythronsäure das Carboxymethyllysin (CML). Der erste Nachweis gelang 1974 im Urin (WADMAN, 1975). In der Folgezeit wurde CML in verschiedenen Geweben wie Linsenprotein und Gewebeskollagen nachgewiesen (AHMED ET AL., 1985). Inzwischen wird CML als Indikator für autoxidative Reaktionen angesehen (WELLS-KNECHT ET AL., 1996, SCHLEICHER ET AL., 1997).

Viel weniger Beachtung wurde dem abgespaltenen C4-Fragment Erythronsäure zuteil. Erste Nachweise dieser Substanz gelangen 1975 im Urin gesunder Probanden (THOMPSON ET AL., 1975) und im Plasma urämischer Patienten (BULTITUDE UND NEWHAM, 1975). In neuerer Zeit konnten signifikant erhöhte Erythronsäureausscheidungen im Urin diabetischer Hunde nachgewiesen werden (SHIGEMATSU ET AL., 1988) und erst vor kurzem wurden auch in der Augenflüssigkeit von Diabetikern (HARDING ET AL., 1999) erhöhte Erythronsäurekonzentrationen nachgewiesen. Inwieweit die Erythronsäure neben Carboxymethyllysin als Marker für die als Glukoxidation bezeichnete Reaktion dienen kann, muss sich noch zeigen.

1.1.1 Definition

Der Diabetes mellitus ist eine heterogene Gruppe von Störungen des Kohlenhydratstoffwechsels mit unterschiedlicher Ätiologie und Symptomatik. Allen gemeinsam ist ein relativer oder absoluter Insulinmangel (REINWEIN UND BENKER, 1992). Kennzeichnend ist eine dauerhafte Erhöhung des Blutzuckers, sowohl im Nüchternzustand als auch nach Nahrungsaufnahme, weil der Organismus aufgenommene Kohlenhydrate nicht zeitgerecht verwerten kann (BOTTERMANN, 1994).

1.1.2 Klassifikation

Die bereits 1967 von der WHO (World Health Organisation) aufgestellten Empfehlungen zur Klassifikation und Diagnostik wurden 1997 von der ADA (American Diabetes Organisation) revidiert. Diese revidierten Empfehlungen wurden 1999 von

der Deutschen Diabetes Gesellschaft (DDG) bestätigt. Die aktuelle Klassifikation ist in der folgenden Aufstellung dargestellt:

1. Typ I-Diabetes: Er bezeichnet eine immunologisch oder idiopathisch bedingte β -Zelldestruktion, die zu einem absoluten Insulinmangel führt ($< 10\%$ aller Diabetiker).
2. Typ II-Diabetes: Darunter versteht man eine Insulinresistenz mit relativem Insulinmangel bis hin zu einem vorwiegend sekretorischen Defekt mit Insulinresistenz ($> 90\%$ aller Diabetiker).
3. Andere spezifische Typen:
 - (a) Genetische Defekte in der β -Zellfunktion:
 - * Chromosom 12, HNF-1 α [frühere Bezeichnung: MODY 3]
 - * Chromosom 7, Glukokinase [frühere Bezeichnung: MODY 2]
 - * Chromosom 20, HNF-4 α [frühere Bezeichnung: MODY 1]
 - * Mitochondrale DNA
 - * Andere
 - (b) Genetische Defekte der Insulinwirkung
 - (c) Krankheiten des exokrinen Pankreas
 - (d) Endokrinopathien: Akromegalie, M. Cushing, Phäochromozytom ...
 - (e) Medikamenten- oder chemikalieninduziert: Glukokortikoide, Schilddrüsenhormone, Thiazide, Diazoxid, β -Adrenergika ...
 - (f) Infektionen: Kongenitale Rötelninfektion, CMV ...
 - (g) Seltene immunologisch bedingte Formen: Stiff-man-Syndrom, Anti-Röteln-Rezeptor-AK
 - (h) Genetische Syndrome, die gelegentlich mit Diabetes vergesellschaftet sind: Turner-Syndrom, Klinefelter-Syndrom, Down-Syndrom ...
4. Gestationsdiabetes

1.1.3 Ätiologie und Pathogenese des Diabetes mellitus

1.1.3.1 Typ I-Diabetes

Ätiologisch handelt es sich beim Typ I-Diabetes um eine chronische Autoimmunerkrankung der Langerhans-Inseln, die als Insulitis bezeichnet wird (ROEP ET AL. 1995). In den Folgejahren kommt es zu einer kontinuierlichen Zerstörung der insulinbildenden β -Zellen des Pankreas und damit zur Abnahme der Insulinsekretion (REINWEIN UND BENKER, 1992). Pathogenetisch liegt somit ein absoluter Insulinmangel vor, der substituiert werden muss.

Als Zeichen der Autoimmunreaktion lassen sich Autoantikörper gegen Inselzellen (ICA), Insulin (IAA) und Proinsulin (PIAA), sowie gegen das Inselzellprotein Glutamat-Decarboxylase (GAD-A) nachweisen (BOTTERMANN, 1994, SCHERBAUM UND SEISSLER, 1995). Die Infiltration der Langerhans-Inseln mit autoreaktiven T-Lymphozyten (SCHERBAUM UND SEISSLER, 1995) und eine zeitweise Remission des Diabetes unter immunsuppressiver Behandlung (ROUDIER ET AL., 1980) sprechen ebenso für die autoimmune Genese.

Auch genetische Faktoren spielen in der Ätiologie eine prädisponierende Rolle. So finden sich bei ca. 95 % der Typ I-Diabetiker die Histokompatibilitätsantigene HLA-DR3 und/oder HLA-DR4 (ROEP ET AL. 1995, SANDLER, 1990), und 13 % der Erkrankten weisen eine positive Familienanamnese auf (SANDLER, 1990). Virusinfektionen (GAMBLE, 1980, OLDSTONE ET AL., 1991), Operationen, Unfälle und Stresssituationen (sog. life events) werden als Induktoren bzw. Auslöser des Typ I-Diabetes diskutiert (BERGER, 1995).

1.1.3.2 Typ II-Diabetes

Beim Typ II-Diabetes geht man von einer multifaktoriellen Ätiologie aus mit Umwelteinflüssen wie Adipositas, Hyperalimentation und körperlicher Inaktivität (BOTTERMANN, 1994) sowie genetischen Faktoren, die jedoch keine HLA-Assoziation aufweisen (GRANNER UND O'BRIEN, 1992).

Bei genetischer Disposition führen Adipositas und Hyperalimentation zur Insulinresistenz von Leber-, Fett- und Muskelzelle (BECK-NIELSEN ET AL., 1992). Neben der Insulinresistenz ist die β -Zell-Dysfunktion kennzeichnend für den Typ II-Diabetes

(LEAHY, 1990). Dabei führen eine gestörte Insulinsekretion und eine herabgesetzte Insulinwirkung zu einem relativen Insulinmangel, der das Pankreas zur vermehrten Insulinsekretion anregt, so dass ein Circulus vitiosus entsteht, der schließlich dekompensiert und mit Hyperglykämie und dem Typ II-Diabetes endet (DEFRONZO ET AL., 1992, KAROW UND LANG-ROTH, 2000).

Die Insulinresistenz wird durch verschiedene Faktoren verursacht. Dazu zählen u.a. ein Insulinrezeptordefekt sowie ein Postrezeptordefekt, die beide eine gestörte Glukoseverwertung in der Zelle nach sich ziehen (BECK-NIELSEN ET AL., 1992, HÄRING, 1993). Forschungen haben außerdem gezeigt, dass gesunde Menschen auf der Zellmembran fast ausschließlich die Isoform HIR-A des Humanen-Insulin-Rezeptors exprimieren, während Typ II-Diabetiker beide Isoformen, HIR-A und HIR-B exprimieren (MOSTHAF ET AL., 1991, SESTI ET AL., 1991). Man nimmt an, dass die gesteigerte Rezeptorexprimierung von HIR-B mit der Insulinresistenz in Verbindung steht (HÄRING ET AL., 1994).

Die Insulinresistenz gilt auch als zentrale Ursache des sog. metabolischen Syndroms (Wohlstandssyndrom oder Syndrom X) (STANDL, 1996). Dies beschreibt das häufig gemeinsame Auftreten von stammbetonter Adipositas, Dyslipoproteinämie, Arteriosklerose, Hypertonie und Glukoseintoleranz bzw. Diabetes mellitus (GROOP ET AL., 1997). Dabei gilt das metabolische Syndrom heute zum einen als Vorstufe auf dem Weg zum Typ II-Diabetes, zum anderen als wichtiger Faktor bei der Entwicklung arteriosklerotischer Komplikationen an koronaren, cerebralen und peripheren Gefäßen (HÄRING, 1993).

1.1.4 Spätschäden

Wie bereits eingangs erwähnt, hängen Lebensqualität und Lebenserwartung wesentlich von den chronischen Komplikationen ab. Diese umfassen im wesentlichen die unspezifische Makroangiopathie in Form der Arteriosklerose und die diabetes-spezifische Mikroangiopathie.

Zur Mikroangiopathie zählen Nephropathie, Retinopathie, Neuropathie und der diabetische Fuß. Da bei der Auswertung der Patientendaten Makroangiopathie, Retinopathie und Nephropathie berücksichtigt wurden, werden diese Begriffe im folgenden näher erklärt.

1.1.4.1 Makroangiopathie

Die Makroangiopathie betrifft Veränderungen der größeren und großen arteriellen Gefäße. Ihre Auswirkungen zählen zu den häufigsten Todesursachen des Typ II-Diabetikers (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 1998). Sie ist gekennzeichnet durch eine Früharteriosklerose, die im Vergleich zum Nichtdiabetiker einen schwereren Verlauf nimmt. Dabei sind Frauen und Männer in gleichem Maße betroffen (REINWEIN UND BENKER, 1992).

Die Makroangiopathie manifestiert sich im wesentlichen als koronare Herzkrankheit (KHK), periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) und als Durchblutungsstörung des Gehirns mit möglichen zerebralen Insulten (Apoplex).

Bei der Entstehung der Makroangiopathie spielen Hypertonie, Fettstoffwechselstörungen, Hyperglykämie, erhöhte Gerinnungsneigung und Gefäßwandverletzungen eine wichtige Rolle (JANKA, 1983). Man geht davon aus, dass sich an winzigen Endothelverletzungen der Gefäße sofort aktivierte Thrombozyten anheften und aggregieren, die neben anderen Stoffen auch einen Wachstumsfaktor für die Proliferation glatter Muskelzellen in der Intima freisetzen. In diesen Muskelzellen kommt es zur verstärkten Akkumulation des Lipoproteins LDL und zur Schaumzellbildung (JANKA, 1983, LOPES-VIRELLA ET AL., 1996, LÜSCHER ET AL., 1996). So entsteht ein Atherom, das den Grundstein zur Arteriosklerose legt.

1.1.4.2 Mikroangiopathie

Die Mikroangiopathie betrifft die kleinen und kleinsten arteriellen Gefäße. Sie findet sich somit an allen Organen und Geweben, vor allem aber an Niere, Auge und Nerv, da sie sich dort aufgrund der besonderen Gefäßversorgung besonders früh und schwerwiegend manifestiert (YUE ET AL., 1992, STARKE, 1995). Die Pathogenese der Mikroangiopathie ist noch nicht vollständig geklärt. Eine zentrale Rolle kommt jedoch dem nichtenzymatischen Glukoseeinbau in Strukturproteine und Gefäßwände zu (BUCALA ET AL., 1995).

Nephropathie

Charakteristisch für den Diabetes ist die noduläre Form der Glomeruloklerose, die nach ihren Erstbeschreibern als Kimmelstiel-Wilson-Glomeruloklerose bezeichnet wird (KIMMELSTIEL UND WILSON, 1936). Sie ist Folge einer Proliferation von Me-

sangialzellen und einer Sklerosierung der mesangialen Matrix. Kombiniert mit der Verdickung der Basalmembranen und der Abnahme des Heparansulfat-Proteoglykans in der Matrix kommt es so zum Verlust der Filtrationsselektivität mit Mikro- und Makroproteinurie (STARKE, 1995). Die gleichzeitige Erhöhung des Filtrationsdrucks führt zu einer weiteren Schädigung der Glomeruli. Es folgt eine Blutdruckerhöhung und ein steter Progress der Nierenschädigung, der schließlich in der dialysepflichtigen Niereninsuffizienz endet (SELBY ET AL., 1990).

Retinopathie

Bei der Retinopathie findet sich zuerst ein fast selektiver Verlust der Perizyten, die die Funktion glatter Muskelzellen haben. Man vermutet, dass der dadurch bedingte Tonusverlust zur Ausbildung von Mikroaneurysmen und einer erhöhten Kapillarpermeabilität führt (HOFFMANN ET AL., 1994, STARKE, 1995).

Die Anhäufung von Proteinexsudaten und die Verdickung der Basalmembran führen zu Kapillarverschlüssen und zur retinalen Ischämie (WATKINS, 1995). Die Hypoxie führt zu einer vermehrten Ausschüttung von angiogenen Gewebefaktoren wie FGF (fibroblast growth factor), PDGF (platelet derived growth factor), TGF- β (transforming growth factor β) und IGF-I (insulin-like growth factor I) (YUE ET AL., 1992). Es kommt zur Neovaskularisation mit minderwertigen und fragilen Kapillaren, die zu Blutungen neigen und über eine erhöhte Gefäßpermeabilität zu Netzhautödem und exsudativer Parenchymzerstörung führen (MAKABE, 1975, ZATZ UND BRENNER, 1986, WATKINS, 1995).

Charakteristischerweise geht die Verschlechterung der Retinopathie einer Verschlechterung der Nephropathie voran, d.h. der Grad der Retinopathie ist in der Regel höher als derjenige der Nephropathie (STANDL, 1983).

1.2 Glykierung

Als Glykierung bezeichnet man definitionsgemäß die postribosomale Proteinmodifikation durch eine nichtenzymatische Reaktion mit Glukose oder anderen Zuckern. Dabei reagiert die freie Aminogruppe eines Proteins mit der Carbonylgruppe von Glukose zu einem Aldimin, einer labilen Schiffischen Base. Durch die sog. Amadori-Umlagerung des Aldimins zu einem Ketoamin wird aus der reversiblen eine irreversible Glukosebindung (MAKITA ET AL., 1992, BROWNLEE, 1992). Dieser Reak-

tionsweg ist im Fall von Lysin als Proteinbestandteil in Abbildung 1.1 dargestellt. Das Reaktionsprodukt wird wegen seiner Fruktosestruktur auch als Fruktoselysin bezeichnet.

Bei der Glykierung von Proteinen ist die Amadori-Umlagerung der geschwindigkeitsbestimmende Reaktionsschritt (SCHLEICHER, 1993). Glykiert werden dabei v.a. die freien Aminogruppen in den Seitenketten von Lysinen.

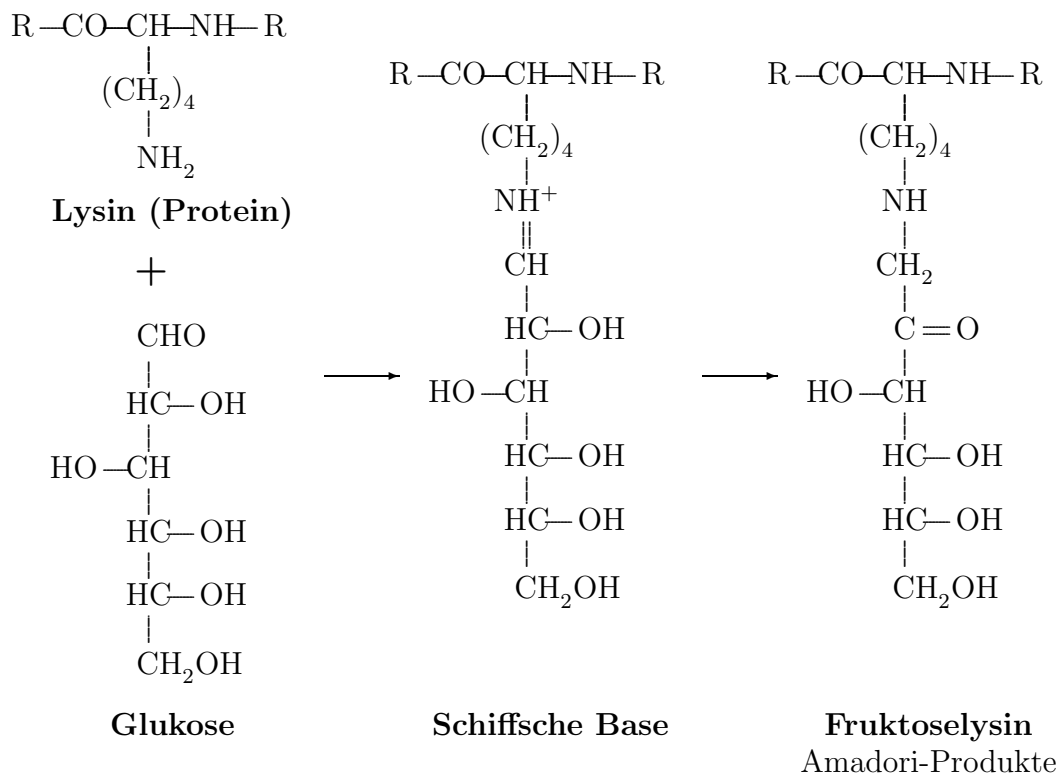


Abbildung 1.1: Glykierung / nichtenzymatische Glykosilierung

Das wohl bekannteste menschliche Glykierungsprodukt ist das HbA_{1c}, die schnell wandernde Hämoglobinkomponente in der Elektrophorese, als Ergebnis der Reaktion zwischen Glukose und Hämoglobin. Der HbA_{1c}-Wert dient als Kontrolle der Blutzuckereinstellung der vergangenen zwei bis drei Monate (BUNN ET AL., 1978, KÖNIG ET AL., 1976, MAKITA ET AL., 1992) und stellt somit ein „Blutzuckergedächtnis“ dar.

Etwas weniger bekannt ist das Fruktosamin, ein Produkt aus Serumproteinen und Glukose. Aufgrund der kürzeren Halbwertszeit der Serumproteine im Vergleich zum Hämoglobin der Erythrozyten repräsentiert das Fruktosamin den Blutzuckerspiegel

der vergangenen zwei Wochen. Weitere Proteine, die in glykierter Form vorliegen sind Albumin (DOLHOFER UND WIELAND, 1980), Immunglobulin G (IgG), Lipoproteine wie das LDL (LOPES-VIRELLA ET AL., 1996) und Enzyme wie die Aldoserduktase (VOGT ET AL. 1982).

Glykierungsprodukte unterliegen einem chemischen Fließgleichgewicht zwischen Bildung und Abbau, d.h. ihre Menge steigt bei Hyperglykämie an und fällt bei Normoglykämie wieder ab. Diese Eigenschaft, nicht in Kollagen oder anderen langlebigen Gewebsproteinen zu akkumulieren, ist die Voraussetzung für die Nutzung des HbA_{1c} als Parameter der Blutzuckereinstellung der vergangenen 8-12 Wochen.

1.3 AGE-Produkte

Advanced Glycosylation End-Products (AGE-Produkte) entstehen durch Folgereaktionen der nichtenzymatischen Glykierung von Proteinen. Über Wochen und Monate gehen die Glykierungsprodukte eine Reihe komplexer Folgereaktionen wie chemische Umwandlung, Dehydrierung, Kondensation und Spaltung ein und bilden schließlich die eingangs erwähnten AGE-Produkte (BROWNLEE, 1990, SUGIYAMA ET AL., 1996). Charakteristisch für die fluoreszierenden, braun gefärbten Produkte ist ihre Akkumulation in langlebigen Proteinen und die Ausbildung von Quervernetzungen (AGE-Crosslinks).

1912 entdeckte L.C. Maillard bei Lebensmitteln erstmals die seither nach ihm benannte Maillard-Reaktion mit der Bildung von Bräunungsprodukten bei der Reaktion von Aminen und Kohlenhydraten (MAILLARD, 1912).

Beim Mensch führt diese Maillard-Reaktion zur Bildung der AGE-Produkte. Da deren Bildung irreversibel ist, gibt es hier kein Fließgleichgewicht zwischen Bildung und Abbau. Folglich führen langdauernde Hyperglykämien zwar zur Bildung der AGE-Produkte, eine Korrektur des Blutzuckerspiegels jedoch nicht zu deren Abfall auf Normalwerte (BROWNLEE, 1992). Stattdessen akkumulieren sie über Jahre in langlebigen Proteinen und werden heute für verschiedene pathologische Veränderungen mitverantwortlich gemacht (BUCALA ET AL., 1995, VLASSARA, 1992).

Im Laufe der Jahre wurde eine Vielzahl neuer Verbindungen identifiziert, die aus diesen komplexen Abläufen hervorgehen (BROWNLEE, 1990). Das erste stabile Amadori-Produkt, ein Ketoimin, kann in weiteren Reaktionen direkt (Imidazol-Typ) oder

über reaktive Zwischenprodukte wie 3-Deoxyglucoson (Pyrrol-Typ) (DYER ET AL., 1991, ZITIERT NACH McCANCE 1993, YAMADA ET AL., 1994) zur Ausbildung von AGE-Crosslinks führen (BROWNLEE, 1990). Dabei entstehen Imidazolderivate, sowie Pyrrole und Pentosidin.

AGE-Produkte finden sich beim normalen Alterungsprozess. In menschlichen Linsenproteinen konnte eine positive Korrelation von AGE-Produkten und dem Alter der Linsen nachgewiesen werden (ARAKI ET AL., 1992). Ebenso konnte bei der Bestimmung von Pentosidin im Urin gesunder Probanden ein exponentieller Anstieg mit zunehmendem Alter nachgewiesen werden (TAKAHASHI ET AL., 1993A).

Weitere Versuche haben gezeigt, dass bei Diabetikern und urämischen Patienten AGE-Produkte sogar in erhöhter Menge vorkommen (MONNIER ET AL., 1992, ODA-NI, 1999, TAKAHASHI ET AL., 1993B).

1.4 Glukoxidation oder oxidative Spaltung glykierter Proteine

Fruktoselysine können neben der geschilderten nichtoxidativen Bildung der AGE-Produkte auch oxidativ gespalten werden. Dabei entstehen die sog. Glukoxidationsprodukte, zu denen das C2-Fragment Carboxymethyllysin (CML) sowie das C4-Fragment Erythronsäure gehören (AHMED ET AL., 1985). Diese Reaktion wird in Abbildung 1.2 veranschaulicht. Der Vorteil der Erythronsäure und des Carboxymethyllysin gegenüber anderen oxidativen Spaltprodukten ist ihre ausgesprochene metabolische und chemische Reaktionsträgheit sowie ihre Resistenz gegenüber Hydrolyse.

Carboxymethylierte Proteine entstehen durch Glukoxidation des Amadoriproduktes (WELLS-KNECHT ET AL., 1995, MONNIER ET AL., 1996), durch Autoxidation von Glukose (WELLS-KNECHT ET AL., 1995, MONNIER ET AL., 1996) oder durch Lipidperoxidation (FU ET AL., 1996). Die schwankenden Angaben in der Literatur über das Verhältnis der Anteile aus den verschiedenen Reaktionswegen zueinander zeigen, dass die Mechanismen zur Bildung der auch als Early Glycosylation Products bezeichneten Substanzen noch nicht vollständig geklärt sind und abhängig von der Glukosekonzentration variieren können (WELLS-KNECHT ET AL., 1995). Early Glycosylation Products wie CML und Pentosidin sind nicht spezifisch für

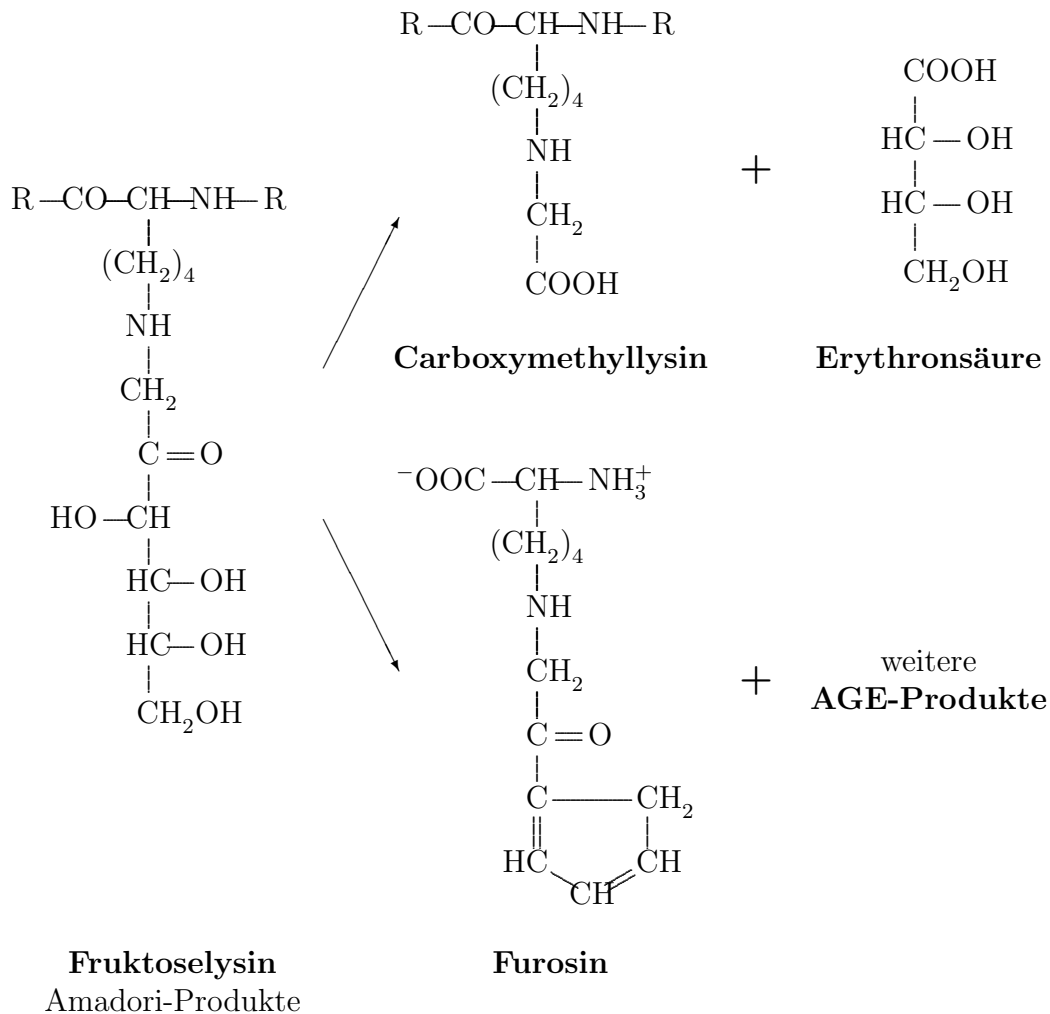


Abbildung 1.2: Bildung der Erythronsäure durch Glukoxidation

Glukose, so dass verschiedene reduzierende Zucker als Vorläufer der Glukoxidation dienen können (MONNIER ET AL., 1996).

Inzwischen hat man herausgefunden, dass die Akkumulation der Glukoxidationsprodukte im Alter durch Diabetes erhöht wird. Zudem korreliert die Konzentration der Glukoxidationsprodukte Carboxymethyllysine und Pentosidine mit der Schwere der Folgeschäden bei Diabetikern (WELLS-KNECHT ET AL., 1996).

Neben CML und Erythronsäure gibt es weitere reaktive Oxidationsprodukte wie 3-Deoxyglucoson, Glyoxal und Methylglyoxal. Folgeprodukte sind Imidazolone, Carboxymethyllysine, Glyoxallysine- und Methylglyoxallysine-Dimere (WELLS-KNECHT ET AL., 1996).

1.4.1 Oxidativer Stress

Oxidativer Stress beruht auf einem Missverhältnis zwischen oxidativen und antioxidativen Faktoren. Zu ersteren gehören freie Radikale und reaktive Sauerstoffmetabolite, wie Superoxidradikale, Wasserstoffperoxid und Lipidperoxide, die bei verschiedenen enzymatischen und nichtenzymatischen Reaktionen entstehen (BAYNES, 1991). Diesen und noch reaktiveren Verbindungen wie z.B. Hydroxylradikalen stehen antioxidative Faktoren gegenüber. Sie beseitigen reaktive Stoffe und limitieren damit den Zell- und Gewebeschaden (FIORILLO ET AL., 1998). Antioxidative Faktoren sind Inhibitoren wie Enzyme, die die Ansammlung reaktiver Substanzen begrenzen und Transportproteine, die die als Katalysatoren dienenden freien Metallionen binden. Daneben machen Radikalfänger wie die Vitamine C und E oder Harnsäure die Hydroxylradikale unschädlich, in dem sie Reaktionen mit ihnen eingehen.

Die nicht inaktivierten Radikale und andere reaktive Metabolite verursachen chemische Modifikationen von Molekülen wie z.B. Proteinen, Lipiden, Nukleinsäuren oder Glykierungsprodukten. Hieraus resultieren Schäden wie Oxidation, Fragmentation, Crosslinking oder Fluoreszenz, die die Zell- und Gewebefunktion beeinträchtigen und so zu pathologischen Veränderungen führen können (BAYNES, 1991).

Heutzutage werden Alterungsprozesse und verschiedene pathologische Prozesse einschließlich Arteriosklerose, Karzinogenese, dialysepflichtige Niereninsuffizienz, rheumatoide Arthritis, Hämochromatose und Diabetes mellitus (HALLIWELL UND GUTTERIDGE, 1989) mit oxidativem Stress in Verbindung gebracht.

Beim Diabetes führt er über Hyperglykämie, Glykierung und Glukoxidation zur Beeinträchtigung von Enzymen (FUJII ET AL., 1996), Struktur- und Funktionsproteinen sowie zur Ausbildung von Crosslinks, was zur Pathogenese der Mikro- und Makroangiopathie beitragen soll (YAN ET AL., 1994).

Mit unterschiedlichen Ansätzen wurde versucht, oxidativen Stress nachzuweisen. Dabei zeigten in vitro-Versuche, dass die Bildung von Glukoxidationsprodukten (z.B. CML, Erythronsäure) nur in einer sauerstoffhaltigen Umgebung möglich ist, während die Glykierung auch ohne Sauerstoff erfolgt (AHMED ET AL., 1985, FU ET AL., 1992). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass das einmal gebildete kollagengebundene Carboxymethyllysin unter Sauerstoffmangel nicht wieder abgebaut wird (FU ET AL., 1992) und es sich somit um eine irreversible Reaktion handelt. An-

dere in vitro-Versuche haben bei glykierten Proteinen eine deutliche Erhöhung der Radikalbildung nachgewiesen (MULLARKEY ET AL., 1990). Bei der Untersuchung von antioxidativen Faktoren konnte Vitamin E die CML-Bildung um 70-90 % hemmen, Inhibitoren wie Katalase und Superoxiddismutase erreichten eine Senkung um ca. 50 % (SCHLEICHER ET AL., 1997). Dies lässt den Schluss zu, dass ein Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und der Bildung von Glukoxidationsprodukten besteht.

Eine andere Arbeitsgruppe konnte sogar in vivo signifikant erhöhte Wasserstoffperoxidwerte im Serum schlecht eingestellter Diabetiker nachweisen, die nach intensiver Insulintherapie zwar deutlich rückläufig, aber verglichen mit den Nicht-Diabetikern immer noch erhöht waren (WIERUSZ-WYSOCKA ET AL., 1995). Insgesamt ist aber weiterhin unklar, ob die glykierten Proteine nur als Substrat oder aber als Katalysatoren der Glukoxidation dienen (BAYNES, 1991).

1.4.2 Carboxymethyllysin

Carboxymethyllysin (CML) wurde 1975 erstmals in menschlichem Urin isoliert und identifiziert. Man fand es bei gesunden wie auch bei kranken Personen (WADMAN, 1975). Erst später konnte gezeigt werden, dass CML und Erythronsäure Produkte der oxidativen Spaltung von Fruktoselysin, den glykierten Lysinresten von Proteinen sind (AHMED ET AL., 1985). Daneben entsteht CML auch bei der Maillard-Reaktion (GLOMB UND MONNIER, 1995, MONNIER ET AL., 1996) und bei der Lipidperoxidation (FU ET AL., 1996, KATO ET AL., 1996).

Inzwischen wurde CML in verschiedenen menschlichen Geweben und Substanzen nachgewiesen. Man fand es im Urin (WADMAN, 1975, AHMED ET AL., 1988, KNECHT ET AL., 1991), im Serum (BERG ET AL., 1998), an Hämoglobin gebunden (CAI UND HURST, 1999), in Linsenproteinen (DUNN ET AL., 1989), Sehnenkollagen (AHMED ET AL., 1985) und in Hautkollagen (DUNN ET AL., 1991).

Im Urin von Diabetikern konnten im Vergleich zu dem der Nicht-Diabetiker signifikant erhöhte CML-Konzentrationen im Urin nachgewiesen werden (KNECHT ET AL., 1991). Auch im Serum von Kindern und Erwachsenen mit Typ I-Diabetes konnten signifikant erhöhte Konzentrationen von CML festgestellt werden (BERG ET AL., 1998). Dies lässt den Schluss zu, dass bei Diabetikern die Umsetzung der Fruktoselysine durch Glukoxidation im Vergleich zu Nicht-Diabetikern erhöht ist.

Untersuchungen zum Einfluss der Diabeteseinstellung auf die Menge an gebildetem Fruktoselysin und CML in Hautkollagen zeigten, dass die Menge an Fruktoselysin bei verbesserter Zuckereinstellung sinkt, die Menge an CML aber unverändert bleibt (LYONS ET AL., 1991).

Untersuchungen bei Dialysepatienten haben zwei- bis dreifach erhöhte CML-Konzentrationen in deren Serum nachgewiesen verglichen mit dem gesunder Normalpersonen (SCHLEICHER ET AL., 1997, DEGENHARDT ET AL., 1997). Dies wird in Kapitel 1.5.2 weiter ausgeführt.

Die Glukoxidation gilt auch als Teil des normalen Alterungsprozesses. Da die CML-Bildung eine irreversible Reaktion ist, akkumuliert es mit zunehmendem Alter in langlebigen Gewebsproteinen. Die Arbeitsgruppe um Baynes fand in Linsenprotein und Hautkollagen eine signifikante Korrelation der CML-Konzentration mit dem Alter (DUNN ET AL., 1989, DUNN ET AL., 1991). Schleicher et al. untersuchten verschiedene fetale Gewebeproben und Gewebe höherer Altersgruppen auf CML. Während bei jungen Erwachsenen geringe und bei Personen über 50 Jahren deutlich höhere CML-Werte gefunden werden konnten, war ein CML-Nachweis in fetalem Gewebe nicht möglich (SCHLEICHER ET AL., 1997). Eine Altersabhängigkeit der CML-Konzentration in kurzlebigen Serumproteinen konnte dagegen nicht nachgewiesen werden (SCHLEICHER ET AL., 1997). Aufgrund der Bildung von CML mittels oxidativer Spaltung und den in Kapitel 1.4.1 genannten Punkten wird Carboxymethyllysin heute als Biomarker für oxidativen Stress angesehen (WELLS-KNECHT ET AL., 1996, SCHLEICHER ET AL., 1997).

1.4.3 Erythronsäure

Erythronsäure entsteht wie Carboxymethyllysin bei der oxidativen Spaltung des Amadori-Produkts Fruktoselysin (KNECHT ET AL., 1991). Im Gegensatz zu dem inzwischen relativ bekannten CML hat die Erythronsäure als Partner dieser Reaktion bisher wenig Beachtung gefunden.

Bei der Erythronsäure handelt es sich um eine organische Säure mit vier Kohlenstoffatomen, die als Lakton in Ringform und als offene Kette vorliegen kann (AHMED ET AL., 1988). Chemisch und metabolisch ist die Erythronsäure relativ inert, d.h. sie weist eine ausgesprochene Reaktionsträgheit auf (AHMED ET AL., 1985). Dies bedeutet auch, dass die einmal erfolgte Bildung nicht mehr rückgängig gemacht werden kann.

In vitro wird die Erythronsäure bei der Erhitzung von Lebensmitteln gebildet. In vivo wurde sie bereits 1974 als normaler Bestandteil des menschlichen Urins in einer Konzentration von $24 \pm 10 \mu\text{g}/\text{mg}$ Kreatinin (THOMPSON ET AL., 1975) nachgewiesen. Im Serum wurde sie in deutlich erhöhter Konzentration bei urämischen Patienten nachgewiesen (BULTITUDE UND NEWHAM, 1975).

Spätere Untersuchungen haben unterschiedliche Erythronsäurekonzentrationen bei gesunden Normalpersonen bzw. Tieren und den an Diabetes erkrankten Menschen und Tieren gezeigt. So fand man bei diabetischen Hunden mit durchschnittlich $72 \mu\text{g}$ Erythronsäure / mg Kreatinin eine beinahe doppelt so hohe Konzentration an Erythronsäure im Urin wie bei gesunden Hunden mit durchschnittlich $35 \mu\text{g}$ Erythronsäure / mg Kreatinin (SHIGEMATSU ET AL., 1988). Harding wies deutlich erhöhte Erythronsäurekonzentrationen im menschlichen Plasma von Diabetikern ($2,03 \pm 1,51 \text{ mmol/l}$) gegenüber dem der Nicht-Diabetiker ($1,42 \pm 0,69 \text{ mmol/l}$) nach. In der Augenflüssigkeit von Diabetikern wurden mit $1,61 \pm 1,19 \text{ mmol/l}$ erhöhte Erythronsäurekonzentrationen verglichen mit $1,38 \pm 1,61 \text{ mmol/l}$ bei Nicht-Diabetikern gemessen (HARDING ET AL., 1999). Beide Unterschiede waren jedoch nicht signifikant, es fand sich aber eine signifikante Korrelation zwischen der Blutglukose und der Glukosemenge in der Augenflüssigkeit.

Carboxymethyllysin entsteht durch oxidative Spaltung von Amadori-Produkten, durch Weiterreaktion aus der Glykierung, in geringer Menge über die Autoxidation von Glukose (GLOMB UND MONNIER, 1995) und in nicht unerheblicher Menge durch Lipidperoxidation (FU ET AL., 1996, REQUENA ET AL., 1996). Im Gegensatz dazu kennt man bei der Erythronsäure nur den endogenen Bildungsweg über die Glukoxidation. Da diese bei oxidativem Stress vermehrt abläuft, könnte die Erythronsäure neben CML ein allgemeiner Biomarker für oxidativen Stress sein, wobei der Vorteil gegenüber anderen oxidativen Spaltprodukten die ausgeprägte Reaktionssträgheit ist. Inwieweit die Erythronsäure auch durch Zufuhr exogener Substanzen gebildet wird und somit eine endogene Produktion überlagern würde, ist noch nicht untersucht.

Obwohl die Erythronsäure bereits in mehreren Arbeiten quantifiziert wurde, fehlt bisher eine richtige Methode zu deren Bestimmung, da diesen Arbeiten entweder ein interner Standard fehlt (BULTITUDE UND NEWHAM, 1975, HARDING ET AL., 1999) oder die entsprechende Eichkurve (THOMPSON ET AL., 1975, SHIGEMATSU ET AL., 1988, HARDING ET AL., 1999), so dass die Erythronsäuremenge nicht genau bestimmt werden kann.

1.5 Glykierungsprodukte bei verschiedenen Erkrankungen

1.5.1 Glykierungsprodukte beim Diabetes mellitus

Durch die Akkumulation von AGE-Produkten in langlebigen Proteinen und der Ausbildung von Crosslinks zwischen den Proteinen können sich biologische und mechanische Eigenschaften von Proteinen verändern, was bis zu deren Funktionsverlust führen kann (MAKITA, 1995, WATKINS, 1995). Dabei laufen komplexe Zellinteraktionen ab, die über AGE-spezifische Zelloberflächenrezeptoren (RAGE) gesteuert werden (BROWNLEE ET AL., 1988, HORI ET AL., 1996). Infolgedessen kommt es auch zu einer erhöhten Bildung und Freisetzung von Zytokinen (TNF, IL-1) und Wachstumsfaktoren (VLASSARA, 1992), einer erhöhten Gefäßpermeabilität und einer Inaktivierung von Stickstoffmonoxid NO, das als vasodilatierender und anti-proliferativer Faktor gilt (HOGAN ET AL., 1992, BUCALA ET AL., 1995). Damit einher geht die Verdickungen der Basalmembran sowie ein verlangsamter Abbau und verstärkter Aufbau der Gewebematrix (MONNIER ET AL., 1992, STARKE, 1995).

Die verstärkte Bildung von Glykierungsprodukten gilt heute als eine der Hauptursachen für die Entstehung und den Progress der typischen Gefäßkomplikationen (Mikro- und Makroangiopathie) bei Diabetikern.

Inzwischen fand man erhöhte Pyrralin- (MIYATA UND MONNIER, 1992) und Pentosidkonzentrationen (MONNIER ET AL., 1992, MCCANCE ET AL., 1993) im Serum von Diabetikern. Zudem wurden auch signifikant erhöhte CML-Konzentrationen im Serum von Diabetikern verglichen mit dem der Nicht-Diabetiker gefunden (BERG ET AL., 1998). Dabei sind Glykierungsprodukte nicht nur im Blut, sondern auch im Gewebe in erhöhter Menge zu finden. So zeigte die Arbeit von McCance und seinen Mitarbeitern bei der Bestimmung von CML in Hautkollagen eine Signifikanz im Bezug auf den Schweregrad von Retinopathie und Nephropathie der untersuchten Diabetiker (MCCANCE ET AL., 1993). Zu vergleichbaren Ergebnissen kam später eine weitere Arbeitsgruppe bei der Quantifizierung von AGE-Produkten in Hautkollagen mit Hilfe eines Immunassays der einen polyklonalen Antikörper (standardisiert auf Rinderalbumin) verwendet (BEISSWENGER ET AL., 1995). Trotzdem kann aufgrund der Vielzahl der Glykierungsprodukte keine allgemein gültige Aussage gemacht werden.

1.5.2 Glykierungsprodukte bei Dialysepatienten

Die größten Mengen an AGE-Produkten und Glukoxidationsprodukten finden sich bei urämischen Patienten (MONNIER ET AL., 1996). Man nimmt an, dass bei einer Niereninsuffizienz zum einen die Vorstufen der AGE-Produkte, wie auch die AGE-Produkte selbst nicht oder nur unzureichend ausgeschieden werden und dass die Urämie einen deutlich erhöhten oxidativen Stress für den Organismus bedeutet (ODETTI ET AL., 1992). Beides würde auch erklären, dass sich beim Wegfall des oxidativen Stresses in Form einer Nierentransplantation die Pentosidinwerte im Serum wieder normalisieren (MAKITA, 1995).

Die 1975 erstmals von Bultitude und Newham beschriebene Erythronsäure fand sich im Serum urämischer Patienten in signifikant erhöhter Konzentration gegenüber dem gesunder Probanden (BULTITUDE UND NEWHAM, 1975). Monnier et al. fanden bei Hämodialysepatienten 23fach erhöhte Plasmapentosidinwerte im Vergleich zu Gesunden und doppelt so hohe Werte bei Diabetikern (ODETTI ET AL., 1992, MONNIER ET AL., 1992). Eine immerhin rund 16fache Erhöhung der Pentosidinkonzentration im Serum von Dialysepatienten gegenüber der der Normalpersonen fand Takahashi et al., wobei eine Zunahme der Pentosidinwerte in Abhängigkeit von der Dialysedauer auffiel (TAKAHASHI ET AL., 1993B).

Bei der Quantifizierung von AGE-Produkten bzw. CML konnten zwei andere Arbeitsgruppen bei Dialysepatienten eine drei- bis vierfach erhöhte Menge im Serum feststellen. Signifikante Unterschiede zwischen Hämodialyse und Peritonealdialyse fanden sich dabei nicht (PAPANASTASIOU ET AL., 1994, DEGENHARDT ET AL., 1997). Im Gegensatz dazu wies eine andere Forschungsgruppe bei Peritonealdialysepatienten niedrigere Pentosidinwerte im Serum nach als bei Hämodialysepatienten (FRIEDLANDER ET AL., 1996, MONNIER ET AL., 1996). Papanastasiou et al. fanden nach Dialyse einen Abfall der AGE-Produkte im Serum um ein Drittel bis zur Hälfte. Zu vergleichbaren Ergebnissen kommt auch Z. Makita (MAKITA, 1995).

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass verschiedene Arbeitsgruppen im Vergleich zu Normalpersonen signifikant erhöhte Konzentrationen verschiedener AGE-Produkte im Serum von Dialysepatienten nachgewiesen haben. Nicht eindeutig geklärt ist dabei, ob zusätzlich noch ein Unterschied zwischen Hämodialyse und Peritonealdialyse besteht und worin die genaue Ursache der so deutlichen Erhöhung der Glukoxidations- und AGE-Produkte liegt.

1.5.3 Glykierungsprodukte bei anderen Erkrankungen

AGE-Produkte entstehen nicht nur beim Diabetes mellitus oder der Urämie. Forschungen haben gezeigt, dass sie auch bei der Pathogenese des Morbus Alzheimer beteiligt sind (HARRINGTON UND COLACO, 1994). Dabei ist die Rolle der Glykierung in der Pathogenese des Alzheimer noch nicht eindeutig. Sie ist jedoch die einzige einzelne Proteinmodifikation, die die Bildung der beiden charakteristischen histopathologischen Alzheimerläsionen - die senilen Plaques und die Neurofibrillenbündel mit typischer helikaler Struktur - erklären würde (COLACO ET AL., 1996).

Diese intra- und extrazellulären Proteinansammlungen werden charakterisiert durch ihre Aggregation, Unlöslichkeit, Proteasenresistenz und einen verzögerten Umsatz (YAN ET AL., 1995). Entsprechende Merkmale finden sich auch bei glykierten extrazellulären Matrixproteinen. Mit Antikörpern konnten die AGE-Produkte Pentosidin und Pyrralin in den Neurofibrillen und senilen Plaques nachgewiesen werden, die in gesunden Nervenzellen (Neuronen) des gleichen Gehirns nicht oder nur in geringer Menge gefunden wurden (SMITH ET AL., 1994). In Bezug auf die Beteiligung der Glykierung bei anderen Krankheiten, kann diese ein genereller Mechanismus der Amyloidose sein (COLACO UND HARRINGTON, 1994) und somit bei einer Reihe von neuropathologischen Funktionsstörungen eine Rolle spielen.

1.6 Quantifizierung von Glykierungsprodukten

Die Vielzahl der verschiedenen AGE-Produkte und Glukoxidationsprodukte mit ihren teilweise nicht bekannten Reaktionswegen bereiten enorme Schwierigkeiten bei der Quantifizierung. Dabei entstanden unterschiedliche Tests wie Fluoreszenzmessungen und Immunassays mit Antikörpern für eine bestimmte Gruppe von AGE-Produkten.

Bei der Identifikation und Quantifizierung der AGE-Produkte werden direkte und indirekte Methoden angewandt. Dabei weisen die direkten Methoden die gesuchte Einzelsubstanzen nach, während bei den indirekten Methoden das gesuchte AGE-Produkt erst über die Zugabe eines Indikators (z.B. Antikörper, Fluoreszenzstoffe...) erfasst werden kann.

Zu den direkten Methoden gehören die Gaschromatographie-Massenspektrometrie / GC-MS (BULTITUDE UND NEWHAM, 1975, LYONS ET AL., 1991, FU ET AL., 1996), die Hochdruckflüssigkeitschromatographie / HPLC (AHMED ET AL., 1985, TAKAHASHI ET AL., 1993B, GLOMB UND MONNIER, 1995) und die Elektrophorese zum Nachweis des HbA_{1c}.

Bei den indirekten Testverfahren handelt es sich beispielsweise um Fluoreszenzmessungen (MONNIER ET AL., 1986, PAPANASTASIOU ET AL., 1994) oder um immunologische Verfahren wie z.B. ELISA, die mit Hilfe von verschiedenen Antikörpern ein bestimmtes oder auch eine ganze Gruppe von AGE-Produkten nachweisen (ARAKI ET AL., 1992, KATO ET AL., 1996, REDDY ET AL., 1995, MATSUMOTO ET AL., 1997, SCHLEICHER ET AL., 1997).

1.7 Problemstellung

Im Rahmen dieser Arbeit soll eine Methode zur Quantifizierung der Erythronsäure im Serum etabliert werden, mit deren Hilfe Serumproben von Nicht-Diabetikern, Diabetikern und Dialysepatienten gemessen und ausgewertet werden können. Anforderungen an die Methode sind eine einfache und kostengünstige Durchführung und dass die Erythronsäure bei der GC-MS-Analyse nur als Lakton oder offene Säure vorliegt.

Danach stellt sich die Frage, ob sich die Erythronsäurekonzentration im Serum von Diabetikern und Nicht-Diabetikern signifikant unterscheidet und ob die Diabetesstellung, gemessen am HbA_{1c} und dem Blutzucker, einen Einfluss auf die Erythronsäuremenge hat.

Zudem soll ein möglicher Zusammenhang zwischen der gemessenen Erythronsäurekonzentration und verschiedenen Personendaten (Alter, Geschlecht, BMI) sowie Daten der Diabeteserkrankung (Diabetestyp, Diabetesdauer, Vorhandensein von Nephropathie, Retinopathie und Neuropathie) geprüft werden.

Bei den Ergebnissen aus der Untersuchung der Dialysepatienten vor und nach Dialyse interessiert zum einen die Relation der Erythronsäurekonzentration bei Urämie verglichen mit Diabetikern und Kontrollpersonen und in welchem Umfang die Erythronsäure durch die Dialyse eliminiert wird.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Serumproben

Patienten

Im Rahmen der routinemäßigen Kontrolle der Diabetiker in der Diabetesambulanz der Medizinischen Klinik Tübingen wurden insgesamt 139 Patientenseren gewonnen, ohne dass eine zusätzliche Blutentnahme notwendig wurde. Dabei waren die Patienten über die Verwendung des Serums zu wissenschaftlichen Zwecken informiert und hatten ihr Einverständnis gegeben. Nach Ende der Ambulanzzeit erfolgte die Erfassung der Patientennamen, bei denen eine routinemäßige Abnahme von Serum- und EDTA-Blut erfolgt war. Bei den im Labor ausgesuchten Blutproben wurde nach Messung des HbA_{1c} und teilweiser Bestimmung von Blutglukose und Kreatinin das Serum abpipettiert und bei -20 °C eingefroren. Zur Aufarbeitung wurde die gewünschte Anzahl an Serumproben bei Zimmertemperatur langsam aufgetaut und nach der Untersuchung wieder eingefroren. Zur Gewinnung weiterer Informationen wurden aus den angelegten Ambulanzakten die zum Zeitpunkt der Blutabnahme aktuellen Patientendaten wie Alter, Körpergewicht, Diabetestyp, Diabetesdauer und diabetische Folgeschäden gewonnen. Alle dabei erfassten Daten wurden streng vertraulich behandelt.

Kontrollpersonen

Die 95 Kontrollpersonen waren nicht hospitalisierte Personen, meist mit einem Alter über 40 Jahren, bei denen kein Diabetes mellitus bekannt war. Die Teilnahme als Kontrollperson erfolgte auf freiwilliger Basis und nach eingehender Aufklärung. Zum Ausschluss eines manifesten Diabetes wurde bei der Blutabnahme neben dem Serumblut auch ein EDTA-Blut zur Bestimmung des HbA_{1c} abgenommen. Darüber hinaus wurde bei einem Teil der Kontrollpersonen der aktuelle Blutglukosewert mit Hilfe eines Blutzucker-Teststreifen oder eines NaFl-Röhrchens bestimmt. Um eine eingehendere Analyse durchführen zu können, wurden bei den Kontrollpersonen zusätzlich Daten über Alter, Körpergewicht und -größe, eigene Krankheiten und die der Eltern und Großeltern mittels eines Fragebogens erhoben. Alle hierbei erfassten Daten wurden ebenfalls streng vertraulich behandelt.

Dialysepatienten

Die 35 Seren von Dialysepatienten wurden im Rahmen anderer Studien bzw. Dissertationen gesammelt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Da die Proben aus auswärtigen Krankenhäusern stammten, konnten keine weiterführenden Daten erhoben werden.

2.1.2 Reagenzien

Folgende Reagenzien wurden verwendet:

- Aqua bidest. (H_2O)
- D-Erythronsäure- γ -Lakton ($C_4H_6O_4$) > 99 %
 γ -Hydroxy-Buttersäure-Lakton ($C_4H_6O_2$) > 99 %
Fluka Chemie, Buchs
- Methanol (CH_3OH), reinst
Natronlauge ($NaOH$), 1 mol/l
2-Propanol (C_3H_7OH), reinst
Salzsäure (HCl) 25 %
Merck, Darmstadt
- Pyridin (C_5H_5N) wasserfrei, 99,8 %
BSTFA, bis(Trimethyl-Silyl)Trifluoro-Acetamide ($C_8H_{18}F_3NO_2Si_2$)

TSIM, Trimethyl-Silyl-Imidazole ($C_6H_{12}N_2Si$)
Sigma-Aldrich, Steinheim

- 1,2,6-Trihydroxyhexan ($C_6H_{14}O_3$), approx. 95 %
Sigma Chemical Co., St. Louis USA

2.1.3 Geräte

Folgende Geräte wurden verwendet:

- Gaschromatograph mit massenspezifischem Detektor:
Gaschromatograph HP 5890
Massenspezifischer Detektor HP 5971
Automatischer Probengeber HP 7673
Steuereinheit Chemstation HP Hewlett-Packard, Avondale, USA
- GC-Säule: Rtx 5, 30 m x 0,25 mm x 0,5 μ m
Rtx 200, 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m
(Säulenfilm aus Trifluoropropyl-methyl-polysiloxan)
Restek, Bad Soden
- Rotations-Vakuum-Konzentrator
Christ Alpha RVC, Rotator
Christ Alpha LDL1, Vakuumgerät
Christ, Osterode / Harz
- Thermoblock mit Abblasvorrichtung
Liebisch, Bielefeld
- Vortex Super Mixer
Lab-Line Instruments, Illinois, USA
- Zentrifuge Hettich Rotana / RPC
Zentrifuge Hettich Microliter
Hettich, Tuttlingen

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Zu den Verbrauchsmaterialien gehörten:

- 1 ml Injektionsflaschen, 11,6 x 32 mm
Mikroeinsätze, runder Boden, ohne Rand, 31 x 5 mm
Bördelkappen N11, Kopfbreit 6 mm, mit Dichtschutz 1,3 mm
Klaus Ziemer GmbH, Mannheim
- Multimode-Säulen zur Festphasenextraktion, Isolute XL
300 mg, 10 ml
ICT, Bad Homburg

2.1.5 Standards und Lösungen

Als Standards und Lösungen wurden verwendet:

- Interner Standard:
26 mg 1,2,6-Trihydroxyhexan in 150 ml H₂O
54 mg γ -Hydrox-Buttersäure-Lakton in 250 ml H₂O
- Eichlösung:
40 mg D-Erythronsäure- γ -Lakton in 200 ml H₂O
- sonstige Lösungen:
0,1 n Natronlauge
- Diazomethan

2.1.6 Herstellung von Diazomethan

Die Herstellung von Diazomethan erfolgte durch die alkalische Spaltung von Nitrosomethylharnstoff.

- 100 ml Diethylether + 35 ml 40 % KOH in einem 250 ml Erlenmeyerkolben mit Glattschliff ins Eisbad stellen.
- 10 g Nitrosomethylharnstoff vorsichtig zugeben und 2 h stehen lassen.
- Etherische Phase mit gelöstem Diazomethan in einen trockenen Erlenmeyerkolben mit KOH-Plätzchen überführen.

Bei allen Arbeitsgängen wurden die üblichen Sicherheitsmaßnahmen (Handschuhe, Schutzbrille usw.) eingehalten. Außerdem war das Arbeiten unter dem Abzug notwendig, da sowohl Diazomethan als auch Nitrosomethylharnstoff zu den Kanzerogenen (krebserregende Stoffe) gehören. Um der bestehenden Explosionsgefahr vorzubeugen, war die Aufbewahrung bei -20°C geboten (CAI UND HURST, 1999).

2.2 Methodenfindung zur Quantifizierung der Erythronsäure

Als Ausgangsbasis der Versuche diente die in Tabelle 2.1 dargestellte Aufarbeitungsmethode von Urin, die durch entsprechende Derivatisierung eine GC-MS-Analytik ermöglichte. Das gesetzte Ziel bestand darin, den Versuchsaufbau so zu modifizieren, dass man möglichst einfach und kostengünstig Erythronsäure im Serum quantifizieren kann. Da die Erythronsäure als Laktone oder offene Säure vorliegen kann, waren die Versuchsbedingungen so zu wählen, dass ausschließlich das Laktone oder die Säure vorliegt. Dies führt zu einer vereinfachten Auswertung der gewonnenen Daten, da nur ein Peak zu integrieren ist.

Aufarbeitung
<ul style="list-style-type: none"> • 3 ml Urin + IST über eine MM-Säule laufen lassen. • Probe 8 h bei 60°C und 5 mbar lyophilisieren.
Derivatisierung
<ul style="list-style-type: none"> • Zugabe von $200\ \mu\text{l}$ BSTFA/Pyridin (2,5 : 1) • 1 h bei 90°C im Heizblock inkubieren • Probe bei 60°C mit N_2 abblasen • Zugabe von $400\ \mu\text{l}$ Acetonitril; kurz erwärmen • Probe in ein Eppendorfcup pipettieren und 5 min zentrifugieren • Überstand in ein Injektionsgefäß mit Mikroeinsatz überführen
GC-MS-Analyse

Tabelle 2.1: Basismethode der Urinaufarbeitung und -derivatisierung

2.2.1 Interner Standard

Für die Aufarbeitung mit Serum benötigt man einen geeigneten Internen Standard (IST). Die Aufgabe bestand nun darin, einen IST zu finden, der ohne Überlagerung mit der Erythronsäure, dem Erythronsäurelaktol oder störenden Begleitstoffen zu einer guten Darstellung und sicheren Identifikation führt. Eine Substanz kann als IST verwendet werden, wenn sie eine chemische Ähnlichkeit mit der Erythronsäure aufweist und nicht physiologisch im Serum vorhanden ist. Als Substanzen getestet wurden 1,2,6-Trihydroxyhexan $C_6H_{14}O_3$ und γ -Hydroxy-Buttersäure-Laktol $C_4H_6O_2$.

2.2.2 Festphasenextraktion

Die Festphasenextraktion ist eine Methode zur Trennung einer gesuchten Substanz aus einem Gemisch verschiedenster Substanzen, die bereits bei der Basismethode erfolgreich angewendet wurde. Hierbei erfolgt eine physikalische Trennung zwischen einer flüssigen und einer festen Phase. Dabei können zwei Prinzipien genutzt werden: 1) Der zu isolierende Stoff (Isolat) kann eine stärkere Wechselwirkung mit der festen Phase, dem sog. Sorbens aufweisen, so dass sich das Isolat auf der Oberfläche anreichern kann, während die anderen Probenbestandteile ungehindert das Sorbensbett durchlaufen. Je nach Wahl der Sorbentien können dabei sehr selektive Extraktionen erzielt werden. 2) Das Isolat weist praktisch keine Wechselwirkungen mit dem Sorbensmaterial auf und durchläuft ungehindert die Säule, wobei die anderen Probenbestandteile vom Sorbens gebunden werden (ICT, 1993).

Bei den in der Basismethode verwendeten MM-Säulen handelt es sich um eine Kombination aus SAX- (Anionenaustauscher), SCX- (Kationenaustauscher) und C18- (unpolare Verbindungen) Säulen. Bei der Verwendung der MM-Säule zur Bestimmung der Erythronsäure passiert nur das Erythronsäurelaktol ungehindert die Säule, während die offene Säure vom Sorbens zurückgehalten wird. Das Bestreben liegt also darin, die offene Säure in das Laktol umzuwandeln.

2.2.2.1 Konditionierung der MM-Säulen

Das Silikasorbens besteht aus einer gebundenen Phase und dem darunterliegenden Silikagel. Die Konditionierung hat zwei Funktionen: Das Harz der Säule soll gereinigt und Störsubstanzen, die aus der Herstellung der Säulen zurückgeblieben sind,

entfernt werden. Zudem schafft die Solvatisierung eine Umgebung, die zur Retention der Isolate geeignet ist. Die Solvatisierung ermöglicht erst die reproduzierbaren Wechselwirkungen eines Isolates mit dem Sorbens.

Bei der hier verwendeten MM-Säule erfolgt die Konditionierung mit 2 x 2 ml Methanol und anschließend mit 2 x 2 ml H₂O. Auf das Anlegen eines Vakuums konnte dabei verzichtet werden, da die Schwerkraft genügt, um die beiden Lösungsmittel durch das Sorbensmaterial fließen zu lassen. Wichtig war es, die Säulen am Ende der Konditionierung nicht trockenlaufen zu lassen.

2.2.2.2 Untersuchung

Zuerst wurde untersucht, ob die MM-Säulen ebenfalls zur Bestimmung der Erythronsäure im Serum geeignet sind, oder ob mit einer anderen Säule bzw. einer Kombination aus SAX-, SCX- und C18-Säulen ein besseres Ergebnis erzielt werden kann. Zudem wurde getestet, ob eine Eiweißfällung vor der Festphasenextraktion sinnvoll ist, um den Gehalt an Störsubstanzen bereits vor dem Säulendurchlauf zu vermindern. In weiteren Versuchen wurde durch Zugabe weniger Tröpfchen Salzsäure (25%) zum Serum versucht, die offene Erythronsäure durch Ansäuern in das Lakton überzuführen, welches die Säule ungestört durchläuft, während weitere Störsubstanzen im Sorbensmaterial festgehalten werden.

2.2.3 Eiweißfällung

Der Proteinanteil im Urin ist mit weniger als 0,08 g/l vernachlässigbar gering. Im Serum dagegen findet sich mit 66 - 83 g/l erheblich mehr Eiweiß. Um Überlagerungen verschiedenster Substanzen im Chromatogramm zu vermeiden, wird eine Eiweißentfernung bzw. -fällung notwendig, bei der ein Teil der hochmolekularen Stoffe entfernt wird und die an Eiweiß gebundenen Stoffe gelöst werden.

Für die Eiweißfällung wurden die Substanzen Acetonitril und Isopropanol getestet. Dabei wird das Serum nach Zugabe des IST mit dem entsprechenden Fällungsmittel versetzt und anschließend 7 min bei 3000 Umdrehungen / min zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wird zur weiteren Verarbeitung abpipettiert. Außerdem wurde untersucht, ob eine alleinige Eiweißfällung genügt, um Störsubstanzen zu eliminieren, oder ob danach noch die Festphasenextraktion notwendig ist.

2.2.4 Derivatisierung

Die Derivatisierung dient der Vorbereitung zur GC-MS-Analyse. Dazu soll die Probe in leicht verdampfbare und trotzdem stabile Verbindungen überführt werden. Häufige Arten der Derivatisierung sind die Methylierung und die Silylierung.

2.2.4.1 Methylierung mit Diazomethan

Diazomethan ist eine oft eingesetzte Methylierungssubstanz (CAI UND HURST, 1999, HARDING ET AL., 1999). Durch die Methylierung mit Bindung von CH_2 an das Erythronsäurelaktone entstehen Methylester, die in charakteristischer Weise zerfallen und dabei charakteristische Fragmente im Massenspektrum zeigen. Durch das alkalische Milieu der Kaliumhydroxidplättchen im Diazomethan erfolgt die Umwandlung des Erythronsäurelaktone in die offene Erythronsäure. Variiert wurde dabei die zugegebene Menge von Diazomethan und die Zeit der Inkubation mit Diazomethan.

Nach der Lyophilisation wird die getrocknete Probe unter dem Abzug durch Zugabe von ca. 1 ml Diazomethan gelöst und bei geschlossenem Schliffglas für unterschiedliche Zeit bei Raumtemperatur inkubiert, um eine vollständige Umsetzung der zu analysierenden Verbindung zu gewährleisten. Danach werden die Proben mit N_2 abgeblasen.

2.2.4.2 Aufarbeitung mit Natronlauge

Problematisch bei der Verwendung des Diazomethan ist seine Kanzerogenität und seine Explosionsgefahr, weshalb mit der Flüssigkeit nur unter dem Abzug gearbeitet werden darf und sie immer bei -20°C gelagert werden muss. Da sich die Alkalisierung des Diazomethans entscheidend auf die Probengüte ausgewirkt hatte, versuchte man nun, die Ringöffnung mit der alleinigen Zugabe von Natronlauge zu erreichen.

In den Versuchen erfolgte nach Mischung von IST und Serum die Eiweißfällung mit Isopropanol und anschließend die Zugabe unterschiedlicher Mengen 0,1 n Natronlauge. Nach Lyophilisation und Silylierung mittels einer entsprechenden Substanz konnte die GC-MS-Analyse durchgeführt werden.

2.2.4.3 Silylierung

Nach der Umsetzung der Probe mit Diazomethan oder alternativ Natronlauge erfolgt die Silylierung. Sie dient der Umsetzung von Hydroxylgruppen und Carboxylgruppen und erhöht dadurch die Flüchtigkeit der Probe, was eine Voraussetzung für die GC-MS-Analyse darstellt. Für die Silylierung können eine Reihe von Substanzen verwendet werden. Bei der Methodenfindung wurden die Substanzen BSTFA (bis(Trimethyl-Silyl)Trifluoro-Acetamid $C_8H_{18}F_3NO_2Si_2$) und TSIM (Trimethyl-Silyl-Imidazol $C_6H_{12}N_2Si$) verwendet. Dabei ist TSIM stärker basisch als BSTFA und wirkt auch stärker. Beiden Stoffen gemeinsam ist die Reaktion mit Bildung eines Trimethylsilylestere, wodurch sich die Molekülmasse erhöht.

Die beiden verwendeten Silylierungssubstanzen wurden z.T. untereinander kombiniert und immer in Verbindung mit Pyridin oder Acetonitril als Katalysatoren bzw. Protonenakzeptoren benutzt. Variiert wurden dabei auch das Verhältnis von Silylierungsmittel zu Pyridin bzw. Acetonitril, die Inkubationszeit und die Inkubationstemperatur.

Anschließend wurde das Probenvolumen durch Zugabe von etwas Pyridin bzw. Acetonitril vergrößert. Nach Umpipettierung in ein Eppendorfcup und fünfminütigem Zentrifugieren konnte der Überstand zur Messung in eine für die GC-MS-Analyse geeignete Injektionsflasche mit Mikroeinsatz überführt werden. Die aufgearbeiteten Proben wurden luftdicht verschlossen bei -20°C aufbewahrt.

2.2.5 Gaschromatographische Analyse

Zum besseren Verständnis soll zuerst das Grundprinzip eines Gaschromatographen mit massenspezifischem Detektor (GC-MS) erläutert werden.

Bei der GC-MS erfolgt die Einspritzung einer flüssigen Probe über den Injektor. Die Probe wird sofort verdampft. Mit Hilfe eines Trägergases (hier Helium) wird die Probe durch die GC-Säule geleitet. Auf der Innenseite dieser Säule befindet sich ein dünner Flüssigkeitsfilm, auf dem die unterschiedlichen Probensubstanzen verschiedene lange retiniert werden. Dadurch kommt es zu einem zeitlich verzögerten Austritt der Moleküle aus der Säule. Mit Hilfe einer Ionenquelle werden diese Moleküle dann im Massenspektrometerdetektor mit Elektronen beschossen. Die dabei entstehenden Ionen werden in Richtung des Multipliers beschleunigt. Auf ihrer Flugbahn sind die

Ionen einem Hochfrequenzfeld ausgesetzt, das sie proportional zur Ladung und umgekehrt proportional zu ihrer Masse ablenkt. Somit treffen zu einem bestimmten Zeitpunkt nur Ionen einer bestimmten Masse auf, deren Menge quantifiziert wird.

2.2.5.1 Gaschromatographische Trennung

Bei der Optimierung der GC-MS Analyse bildeten die im folgenden beschriebenen Gerätebedingungen die Ausgangsbasis:

- Automatischer Probengeber: Injektionsvolumen $1 \mu\text{l}$, splitlose Injektion
- Säule: Rtx 5, $30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm} \times 0,5 \mu\text{m}$
- Säulenvordruck: 6-10 kPa
- Injektorblocktemperatur: 255°C
- Temperaturprogramm: 90°C (1 min) $\xrightarrow{40^\circ \text{C}/\text{min}}$ 150°C (2 min)
 $150^\circ \text{C} \xrightarrow{4^\circ \text{C}/\text{min}}$ $190^\circ \text{C} \xrightarrow{50^\circ \text{C}/\text{min}}$ 310°C (10 min)
- Gesamtlaufzeit: 27 min
- MS-Interface-Temperatur: 280°C
- Temperatur der Ionenquelle (indirekt): $160 - 180^\circ \text{C}$
- Elektronenstoßionisierung: 70 eV
- Multiplierspannung: 1 500 V

Ausgehend von diesem Temperaturprogramm wurden die verschiedenen Parameter so verändert, dass eine Trennung der Substanzen erreicht wird und eine massenspektrometrische Auswertung möglich ist. Die Messung erfolgte im sog. Single Ion Modus (SIM), bei dem nur die gewünschten Einzelionen einer Substanz gemessen werden und nicht ein ganzer Massenbereich, wie es beim Scan-Modus der Fall ist. Kriterien bei der Auswahl geeigneter Einzelionen sind eine hohe Intensität und eine ausreichende Spezifität, so dass Störungen mit anderen Substanzen möglichst ausgeschlossen sind. So wurden für das Erythronsäurelaktone die Ionen m/z 247 und 262 verwendet, bei der offenen Erythronsäure m/z 220, 292 sowie 409 und für den Internen Standard die Ionen m/z 85 und 129.

2.2.5.2 Identifikation von Erythronsäure und Erythronsäurelaktone

Zur primären Identifikation der Erythronsäure wurde ein Massenspektrum der Substanz erstellt. Dabei wurden 2 ml der Erythronsäurelösung lyophilisiert und anschließend derivatisiert. Daraufhin erfolgte die Messung am GC-MS.

Da in der Probe die offene Säure wie auch das Erythronsäurelaktone vorhanden ist, erhält man von beiden Massenspektren, mit deren Hilfe die Ionen zur Identifikation und Quantifizierung ermittelt werden. Außerdem erhält man die Retentionszeit der jeweiligen Substanz.

2.2.5.3 Identifikation des Internen Standards

Zur Identifikation des IST wurden 2 ml der Lösung des Internen Standards lyophilisiert und derivatisiert. Durch die nachfolgende Messung der Probe am GC-MS erhielt man Retentionszeit und Massenspektrum des IST.

2.3 Datenerhebung

2.3.1 Diabetiker

Insgesamt wurden im Laufe der Arbeit Serumproben von 139 Diabetikern aufgearbeitet und ausgewertet. Da praktisch alle Patienten aus der Diabetesambulanz stammten, konnten anhand der Krankenakten zahlreiche persönliche, klinische und klinisch-chemische Daten gesammelt werden, die zum Zeitpunkt der Blutabnahme aktuell waren.

Bei den persönlichen Daten wurden Alter, Geschlecht, Größe und Gewicht erfasst. Die klinischen Daten umfassten die Erstdiagnose des Diabetes und damit auch die bekannte Diabetesdauer, Diabetestyp, Stadium von Nephropathie, Retinopathie und Neuropathie, weitere Erkrankungen und die Diabetestherapie. Bei den klinisch-chemischen Daten wurden die aktuelle Blutglukose, das HbA_{1c} und das Kreatinin berücksichtigt. Bei Seren, die zweimal aufgearbeitet wurden, ging das arithmetische Mittel der beiden Erythronsäurewerte in die Auswertung ein.

2.3.2 Kontrollpersonen

95 Personen beteiligten sich als nicht diabetische Kontrollpersonen. Davon konnten bei 49 Angaben über Geschlecht, Alter, Größe, Gewicht und bestehende Erkrankungen einschließlich der familiäre Diabetesbelastung bei Eltern und Großeltern über einen Fragebogen erfasst werden. Bei diesen 49 Kontrollpersonen wurde auch das HbA_{1c} gemessen. Bei den übrigen 46 Kontrollpersonen lagen Geburtsdatum und Geschlecht vor.

2.3.3 Dialysepatienten

Von den 35 Dialysepatienten, bei denen Serum vor und nach der Dialyse entnommen wurde, konnten keine Daten ermittelt werden, da die Proben aus auswärtigen Krankenhäusern stammten und kein Zugriff auf die Krankenakten möglich war.

2.4 Statistische Auswertung

Bei der Auswertung der Ergebnisse wurden folgende Tests verwendet:

- Berechnung univarianter Statistiken: Mittelwert (\bar{x}), Standardabweichung (SD), Standardfehler (SEM). Dabei zeigt die Standardabweichung die Streuung der Einzelwerte um den Mittelwert an, während der Standardfehler die „Sicherheit“ des Mittelwertes angibt.
- Häufigkeitsauszählung zur Beschreibung der Verteilung.
- Korrelationsanalyse: Um die Abhängigkeit zweier Parameter zu testen, wurde eine Korrelationsanalyse erstellt.
- t-Test für verbundene und unverbundene Stichproben: Bei Paarvergleichen wurden je nach Problemstellung der t-Test für verbundene (Erythronsäure vor und nach Dialyse) oder für unverbundene Stichproben angewandt.
- Varianzanalyse: Um die Unterschiede zwischen den Gruppen zu bestimmen wurde die Einwegvarianzanalyse mit dem Zusatz von Scheffe verwendet, bei Mehrfachvergleichen erfolgte die Zweiwegvarianzanalyse.

Die Berechnungen wurden mit dem Statistik-Programm SPSS (Statistical Package for Social Sciences) durchgeführt. Als Signifikanzniveau wurde $\alpha = 0,05$ gewählt, wobei Werte von $0,05 \leq p \leq 0,1$ einen Trend darstellen.

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Methode zur Quantifizierung der Erythronsäure im Serum

Die endgültige Analyse der Serumproben von Diabetikern, Kontrollpersonen und Dialysepatienten erfolgte anhand von zwei verschiedenen Methoden. Beide basieren auf der Öffnung des Laktoringes und der ausschließlichen Quantifizierung der offenen Erythronsäure.

3.1.1 Basismethode

Die Tabelle 3.1 zeigt die Methode, die als Ausgangsbasis für die durchgeführten Versuche diente. Davon ausgehend wurden die Versuchsanordnungen zur Quantifizierung der Erythronsäure im Serum entwickelt.

3.1.2 Methodenfindung

3.1.2.1 Interner Standard

Anhand der durchgeführten Versuche wurde 1,2,6-Trihydroxy-Hexan als Interner Standard gewählt. Hierbei erhält man eine problemlose Darstellung des IST im Chromatogramm ohne Überlagerung der Retentionszeiten von IST und Erythronsäure, gleichgültig, ob diese als Laktone oder als Säure vorliegt.

Für die Probenaufarbeitung wurde bei der Aufarbeitung mit Festphasenextraktion noch 200 μl IST in einer Konzentration von 26 mg/l zugesetzt. Diese Menge konnte

Aufarbeitung
<ul style="list-style-type: none"> • 3 ml Urin + IST über eine MM-Säule laufen lassen • Probe 8 h bei 60 ° C und 5 mbar lyophilisieren
Derivatisierung
<ul style="list-style-type: none"> • Zugabe von 200 μl BSTFA/Pyridin (2,5 : 1) • 1 h bei 90 ° C im Heizblock inkubieren • Probe bei 60 ° C mit N₂ abblasen • Zugabe von 400 μl Acetonitril; kurz erwärmen • Probe in ein Eppendorfcup pipettieren und 5 min zentrifugieren • Überstand in ein Injektionsgefäß mit Mikroeinsatz überführen
GC-MS-Analyse

Tabelle 3.1: Basismethode der Urinaufarbeitung und -derivatisierung

bei der Aufarbeitungen ohne Festphasenextraktion bis auf 50 μ l IST derselben Konzentration herabgesetzt werden und wurde den Serumproben zu Beginn der Aufarbeitung zugesetzt. Jede weitere Verdünnung der Probe wirkt sich somit nicht mehr auf das Ergebnis aus, da das Verhältnis zwischen Erythronsäure und IST konstant bleibt.

3.1.2.2 Festphasenextraktion

Mit der Festphasenextraktion konnte die Basismethode so verändert werden, dass man das Erythronsäurelaktone im Serum quantifizieren konnte. Dabei konnten weiterhin die MM-Säulen verwendet werden. Aus dem Gemisch von Serum und IST wurde das Eiweiß mit Isopropanol gefällt und der Überstand mit 4-5 Tröpfchen HCl (25 %) angesäuert. Das Ansäuern führte zur Umwandlung eventuell offener Erythronsäure in das Laktone, das die Säule ungestört durchlaufen konnte, während weitere Störsubstanzen im Sorbensmaterial der MM-Säule zurückgehalten wurden. Vor der Derivatisierung wurden alle Proben zum Trocknen und Einengen acht Stunden lang bei 60 ° C und 5 mbar Druck lyophilisiert. Durch die Umwandlung eventuell offener Erythronsäure in das entsprechende Laktone war nur noch die Auswertung eines Peaks notwendig. Die Versuchsanordnung ist in Tabelle 3.2 veranschaulicht.

Nachteilig an dieser Methode war der für die Aufarbeitung größerer Mengen an Patientenserum notwendige finanzielle Aufwand für die verwendeten MM-Säulen. Deshalb

Aufarbeitung
<ul style="list-style-type: none"> • 1 ml Serum + 200 μl IST. • Eiweißfällung mit 3 ml Isopropanol, vortexen • Probe 7 min bei 3 000 U/min zentrifugieren • Überstand mit 4-5 Trpf. HCl (25%) aus einer kleinen Pipette ansäuern • Angesäuerte Probe über die MM-Säule laufen lassen • Lyophilisation 8 h bei 60° C und 5 mbar
Derivatisierung
<ul style="list-style-type: none"> • Zugabe von 100 μl BSTFA/Pyridin (2,5 : 1) • 1 h bei 90° C im Heizblock inkubieren • Probenvolumen mit 50 μl erweitern, kurz erwärmen • Probe in ein Eppendorfcup pipettieren und 5 min zentrifugieren • Überstand in ein Injektionsgefäß mit Mikroeinsatz überführen

Tabelle 3.2: Aufarbeitung von Serumproben mit Festphasenextraktion

wurden in weiteren Versuchen die beiden endgültigen Methoden zur Quantifizierung der Erythronsäure im Serum entwickelt.

3.1.2.3 Eiweißfällung und Weiterbearbeitung ohne Festphasenextraktion

Aufgrund der sauberen Fällung des Eiweißes und der einfachen Handhabung wurde für die Aufarbeitung der Seren eine Eiweißfällung mit Isopropanol gewählt, wobei für 1 ml Serum die dreifache Menge an Alkohol eingesetzt wurde. Bei geringeren Mengen an Serum behält man das Verhältnis Serum : Isopropanol von 1 : 3 bei. In der Aufbereitung wird die Probe (Serum + IST) nach Zugabe des Fällungsmittels gevortext und anschließend 7 min bei 3000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird zur weiteren Verarbeitung abpipettiert. Vor der Derivatisierung werden alle Proben zum Trocknen und Einengen vier Stunden lang bei 60° C und 5mbar Druck lyophilisiert.

3.1.3 Derivatisierung

Für die GC-MS-Analyse einer Probe ist diese in flüchtige, gasförmige jedoch stabile Verbindungen zu überführen. Dies erfordert eine Derivatisierung. Bei beiden Aufarbeitungsmethoden besteht die Derivatisierung in einer Silylierung, zusätzlich wird bei einer der Methoden Diazomethan zur Methylierung verwendet.

3.1.3.1 Methylierung mit Diazomethan

Eine der verwendeten Aufarbeitungsmethoden nutzt Diazomethan zur Methylierung. Ein wichtiger Faktor ist dabei sicher das alkalische Milieu, das durch die Kaliumhydroxidplätzchen erzeugt wird. Dadurch erfolgt die Umwandlung des Erythronsäurelaktons in die offene Erythronsäure. Nach der Aufarbeitung werden die lyophilisierten Proben mit einem Überschuss an Diazomethan (ca. 1 ml) versetzt. Dabei bleibt die gelbe Farbe des Diazomethan erhalten und es kommt zu keiner Entfärbung. Nach einstündiger Inkubation unter dem Abzug bei Raumtemperatur erfolgt das Abblasen mit N_2 .

3.1.3.2 Aufarbeitung mit Natronlauge

Die Versuche, Diazomethan durch eine ungefährlichere Substanz zu ersetzen waren erfolgreich. Die Messungen erbrachten eine vollständige Umsetzung des Erythronsäurelaktons in die offene Erythronsäure durch Natronlauge. Die Zugabe von 200 μ l 0,1 n Natronlauge nach der Enteiweißung erbrachte dabei die besten Ergebnisse mit einer vollständigen Öffnung des Laktons. Mehr Natronlauge führte zu unbrauchbaren Chromatogrammen und bei weniger Lauge genügte die Menge zur vollständigen Umsetzung nicht, so dass sich noch Laktone fand. Die Methylierung mit Diazomethan wurde dadurch überflüssig, so dass nach dem Lyophilisieren der Probe direkt die Silylierung erfolgen konnte.

3.1.3.3 Silylierung

Die Versuche zur Optimierung der Silylierung erbrachten die besten Ergebnisse bei der Verwendung von 150 μ l BSTFA und Pyridin im Verhältnis 1:1. Als Inkubationszeit wählte man 1 h bei einer Temperatur von 90 °C. Anschließend wurden 50 μ l Pyridin zur Vergrößerung des Probenvolumens zugegeben. Kürzere Inkubationszeiten bei 60 °C reichen bereits zur Silylierung aus, da diese gleich zu Beginn der Reaktionszeit fast vollständig abläuft. Um eine maximale Silylierung zu erreichen, wurde jedoch die längere Inkubationszeit von 1 h bei einer Temperatur von 90 °C gewählt.

3.1.4 Endgültige Methoden

Für die Aufarbeitung der Serumproben wurden zwei Methoden angewandt, die beide den gestellten Anforderungen entsprechen. Beide haben die Ringöffnung des Laktons

zum Ziel, so dass nur die offene Erythronsäure quantifiziert werden muss. Zudem sind beide kostengünstig und einfach durchzuführen. Der Veruchsablauf sieht dabei wie folgt aus:

1. Methode mit Diazomethan

Bei der *Aufarbeitung* pipettiert man in ein Zentrifugenglas zu 1 ml Serum und 50 μl IST (26 mg/l Trihydroxyhexan) 3 ml Isopropanol zur Eiweißfällung, zentrifugiert die Probe 7 min bei 3000 U/min und gibt den Überstand in ein Schliffglas. Daraufhin erfolgt die Lyophilisation für 4 h bei 60 °C und 5 mbar Druck.

Bei der *Derivatisierung* wird ausschließlich unter dem Abzug gearbeitet. Dabei wird mit einer Glaspipette ca. 1 ml Diazomethanlösung in jedes Schliffglas gegeben, gevortext und das Schliffglas mit Deckel für 1 h bei Raumtemperatur unter dem Abzug inkubiert. Anschließend erfolgt das Abblasen mit N_2 im unbeheizten Thermoblock. Es folgt die Zugabe von 150 μl des BSTFA / Pyridin-Gemisches im Verhältnis 1:1 und die Inkubation in dem nun auf 90 °C vorgeheizten Thermoblock. Nach 1 h werden 50 μl Pyridin zupipettiert, um das Reagenzvolumen zu erhöhen. Dann wird die Probe noch einmal für 5 min im Thermoblock erwärmt und anschließend in ein Eppendorfcup überführt. Nach fünfminütigem Zentrifugieren wird die Probe in das vorbereitete GC-MS-Gefäß gegeben.

Mit dieser Aufarbeitung ist es gelungen, den Laktanring völlig zu öffnen, so dass nur noch offene Erythronsäure zu messen ist. Problematisch an der Aufarbeitung ist jedoch die Zugabe des Diazomethan. Die Kaliumhydroxidplättchen im Diazomethan schaffen ein alkalisches Milieu. Gelangen zu viele Partikel des $\text{K}(\text{OH})_2$ mit dem Diazomethan in die Probe, wird durch das stark alkalische Milieu die Erythronsäure zerstört, bei zu wenig alkalischen Partikeln erfolgt die Reaktion nur unvollständig. Dies bedeutet, dass man entweder gute Proben mit sauberen Peaks erhält oder eindeutig unbrauchbare Ergebnisse vorfindet. Dies und die Kanzerogenität und Explosionsgefahr des Diazomethans führten zur Entwicklung der Aufarbeitung mit Natronlauge.

2. Methode mit Natronlauge

1 ml Serum und 50 μl IST werden mit 3 ml Isopropanol enteiweißt und der Überstand in ein Schliffglas pipettiert. Anschließend gibt man 200 μl 0,1 n Natronlauge zu. Nach vierstündigem Lyophilisieren bei 60 °C erfolgt die Derivatisierung ohne Diazomethan, d.h. es wird gleich mit 150 μl BSTFA/Pyridin (1:1) silyliert und die

Methode mit Diazomethan	Methode mit Natronlauge
<ul style="list-style-type: none"> • 1 ml Serum + 50 μl IST + 3 ml Isopropanol • vortexen, 7 min zentrifugieren • Überstand umpipettieren • 4 h lyophilisieren bei 60° C und 5 mbar Druck 	<ul style="list-style-type: none"> • 1 ml Serum + 50 μl IST + 3 ml Isopropanol • vortexen, 7 min zentrifugieren • Überstand umpipettieren • alkalisieren mit 200 μl 0,1 n NaOH • 4 h lyophilisieren bei 60° C und 5 mbar Druck
Derivatisierung	Derivatisierung
<ul style="list-style-type: none"> • Zugabe von 1 ml Diazomethan • Inkubation bei RT für 1 h • Trockenblasen mit N₂ • Zugabe von 150 μl BSTFA/Pyridin im Verhältnis 1:1 • Inkubation im Thermoblock bei 90° C für 1 h • Zugabe von 50 μl Pyridin • Kurzes Erwärmen im Thermoblock • Umpipettieren in ein Eppendorfcup • 5 min zentrifugieren • Überstand in GC-MS-Gefäß überführen • Messung am GC-MS 	<ul style="list-style-type: none"> • Zugabe von 150 μl BSTFA/Pyridin im Verhältnis 1 : 1 • Inkubation im Thermoblock bei 90° C für 1 h • Zugabe von 50 μl Pyridin • Erwärmen im Thermoblock • Umpipettieren in ein Eppendorfcup • 5 min zentrifugieren • Überstand in GC-MS-Gefäß überführen • Messung am GC-MS

Tabelle 3.3: Endgültige Aufarbeitungsmethoden im Vergleich

Proben 1 h bei 90° C im Thermoblock inkubiert. Nach Ablauf dieser Stunde werden noch 50 μ l Pyridin zur Vergrößerung des Volumens zugesetzt und die Proben 5 min im Thermoblock erwärmt. Daraufhin wird die Flüssigkeit in ein Reaktionsgefäß abpipettiert, 5 min zentrifugiert und der Überstand in das GC-MS-Gefäß gefüllt.

Bei der *Messung im Gaschromatographen mit massenspezifischem Detektor* konnte bei den eben beschriebenen Aufarbeitungen nur noch offene Erythronsäure nachgewiesen werden, jedoch kein Lakton. Somit ist das gewünschte Ziel erreicht und man muss zur Auswertung nur noch den IST und den Säurepeak integrieren, um vergleichbare Erythronsäurekonzentrationen zu bestimmen.

Alle im Rahmen dieser Arbeit gemessenen Proben wurden mit diesen beiden Methoden gemessen. Da sich beide Versuchsanordnungen in vielen Punkten gleichen, werden in Tabelle 3.3 die Gemeinsamkeiten und Unterschiede in übersichtlicher Form dargestellt. Bei der Bewertung der Methoden sind beide als nahezu gleichwertig zu betrachten. Die Methode mit Diazomethan hat jedoch den Nachteil, dass man mit einer gesundheitsgefährdenden Substanz arbeitet (CAI UND HURST, 1999). Wenn auch Sicherheitsmaßnahmen wie das Tragen von Schutzbrille und Handschuhen, das Arbeiten unter dem Abzug und die kühle Lagerung des Diazomethan im Gefrierschrank die Gefahr mindern, so kann sie doch nicht vollständig beseitigt werden.

Wesentlich unkomplizierter ist die Verwendung der 0,1 n NaOH, bei der nur das Tragen einer Schutzbrille zu empfehlen ist, um Verletzungen der Augen zu vermeiden. Beiden Methoden gemeinsam ist die Verwendung von Pyridin als Mischung mit BSTFA im Verhältnis 1:1. Hierbei ist ebenso mit Schutzbrille und unter dem Abzug zu arbeiten, denn Pyridin gehört zu den Substanzen, die Fertilitätsschäden verursachen können.

3.1.5 Gaschromatographische Trennung

3.1.5.1 Massenspektrometrische Detektion

Für die massenspektrometrische Detektion erfolgt die Messung der Proben im sog. Singel Ion Modus (SIM). Hierbei werden nur bestimmte Einzelionen der offenen Erythronsäure, des Erythronsäurelaktone und des IST gemessen und nicht ein ganzer Massenbereich. Dadurch erhöhen sich Empfindlichkeit und Messgenauigkeit. Bei der Auswahl der Einzelionen ist eine hohe Intensität und Spezifität nötig, damit es nicht zu Störungen mit ähnlichen Massenfragmenten anderer Substanzen kommt. Abbildung 3.1 zeigt das typische Ionenchromatogramm einer Serumprobe. Im Zuge der vielen Messungen verschoben sich die Retentionszeiten kontinuierlich, so daß keine allgemein gültige, exakte Retentionszeit für die jeweilige Substanz angegeben werden kann.

Für die GC-MS-Analyse der Substanzen wurden Ionen verwendet, die sowohl eine sichere Identifikation als auch eine einfache Quantifizierung ermöglichen. Bei der Erythronsäure wurden die Ionen m/z 220, 292 und 409 verwendet und beim Erythronsäurelaktone m/z 247 und 262. Zur Quantifizierung des Internen Standards

1,2,6-Trihydroxyhexan wurde das Ion m/z 85 wegen seiner Intensität und das Ion m/z 129 zur Identifikation benutzt. Abbildung 3.2 zeigt das Massenspektrum des Internen Standards.

Bei der Optimierung der GC-MS Analyse ergaben sich folgende Bedingungen:

- Automatischer Probengeber: Injektionsvolumen $1 \mu\text{l}$, splitlose Injektion
- Säule: Rtx 200, $30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm} \times 0,25 \mu\text{m}$
- Säulenvordruck: 6-10 kPa
- Injektorblocktemperatur: 255°C
- Temperaturprogramm:
 $120^\circ \text{C} \xrightarrow{2^\circ \text{C}/\text{min}} 156^\circ \text{C} \xrightarrow{60^\circ \text{C}/\text{min}} 320^\circ \text{C} (9 \text{ min})$
- MS-Interface-Temperatur: 280°C
- Temperatur der Ionenquelle (indirekt): $160 - 180^\circ \text{C}$
- Elektronenstoßionisierung: 70 eV
- Multiplierspannung: 1500 V

3.1.5.2 Quantifizierung der Erythronsäure

Zur Quantifizierung der Erythronsäure wurde der Interne Standard herangezogen. Für alle Proben wurde 1,2,6-Trihydroxyhexan als IST verwendet. Die Bestimmung der Erythronsäurekonzentration erfolgt über die Peakflächenverhältnisse mit Hilfe des Quotienten aus der Peakfläche der Erythronsäure zur Peakfläche des IST. Für die Erythronsäure wurde ausschließlich der Quotient m/z 220/85 gewählt. Die Abbildungen 3.3 und 3.4 zeigen das Massenspektrogramm und das Ionenchromatogramm des Erythronsäurelaktos. Entsprechend zeigt Abbildung 3.5 das Massenspektrum der Erythronsäure und Abbildung 3.6 das dazugehörige Ionenchromatogramm.

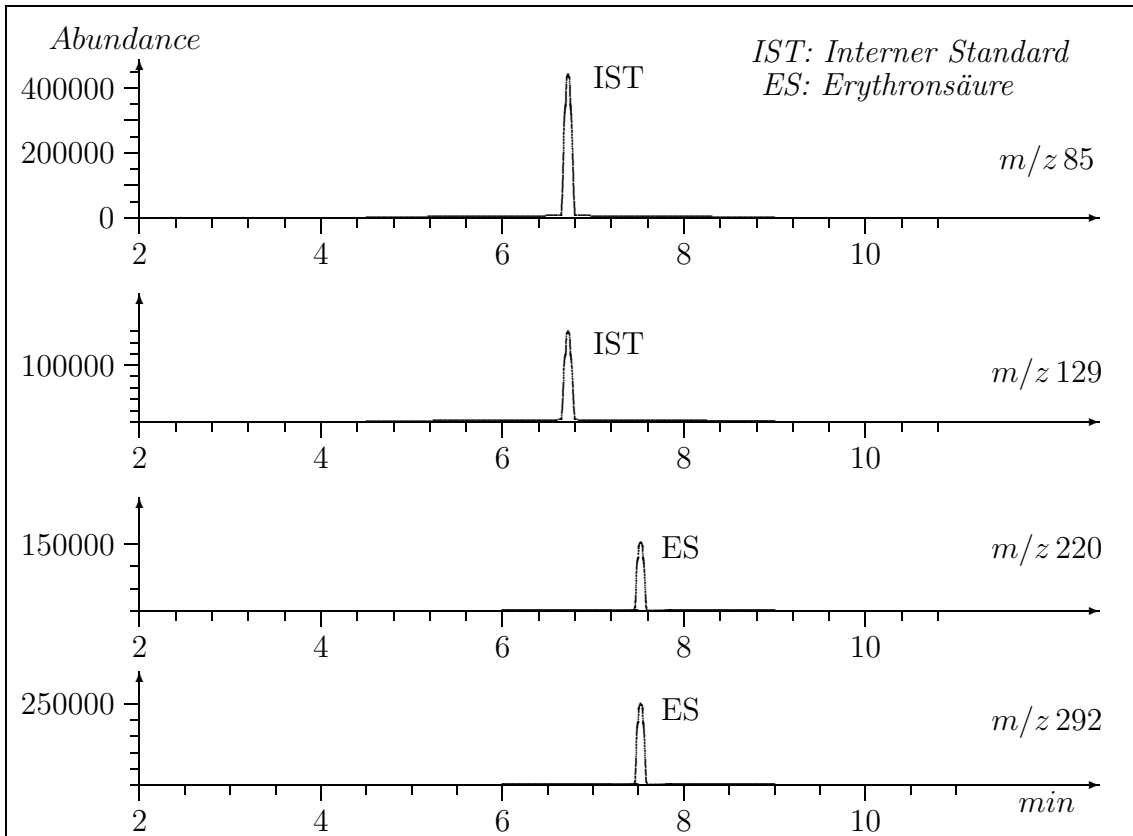


Abbildung 3.1: Ionenchromatogramm einer Serumprobe

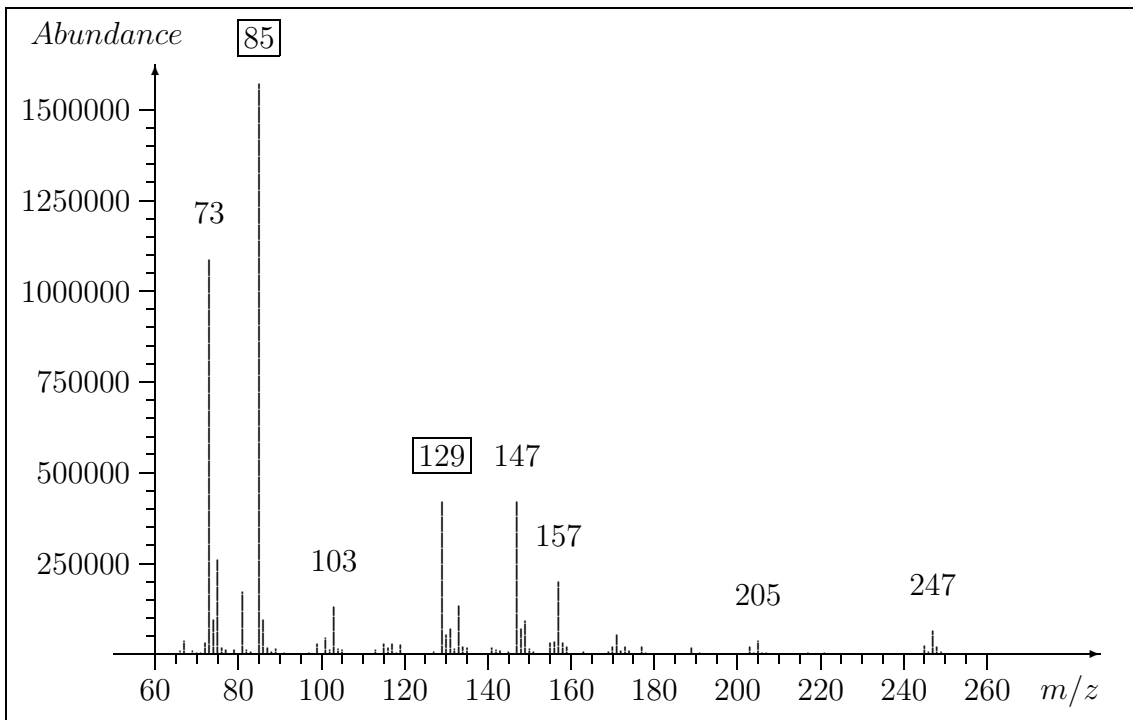


Abbildung 3.2: Massenspektrogramm von 1,2,6 Trihydroxyhexan

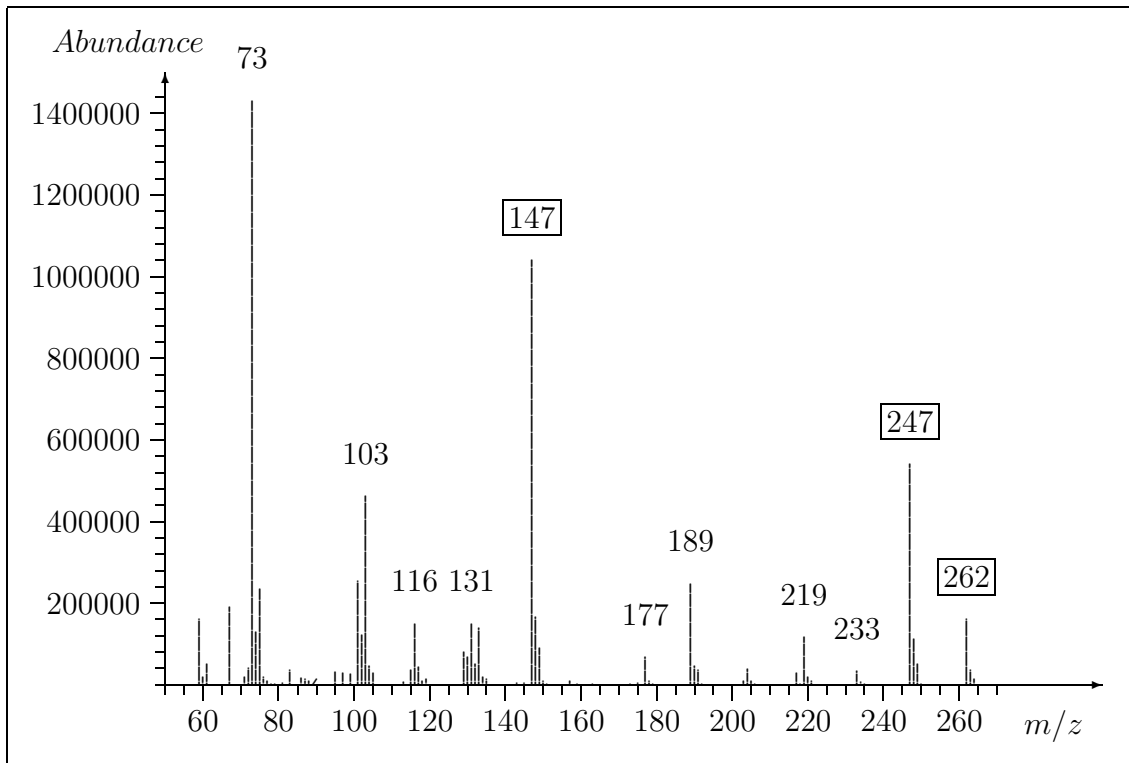


Abbildung 3.3: Massenspektrogramm des Erythronsäurelaktons

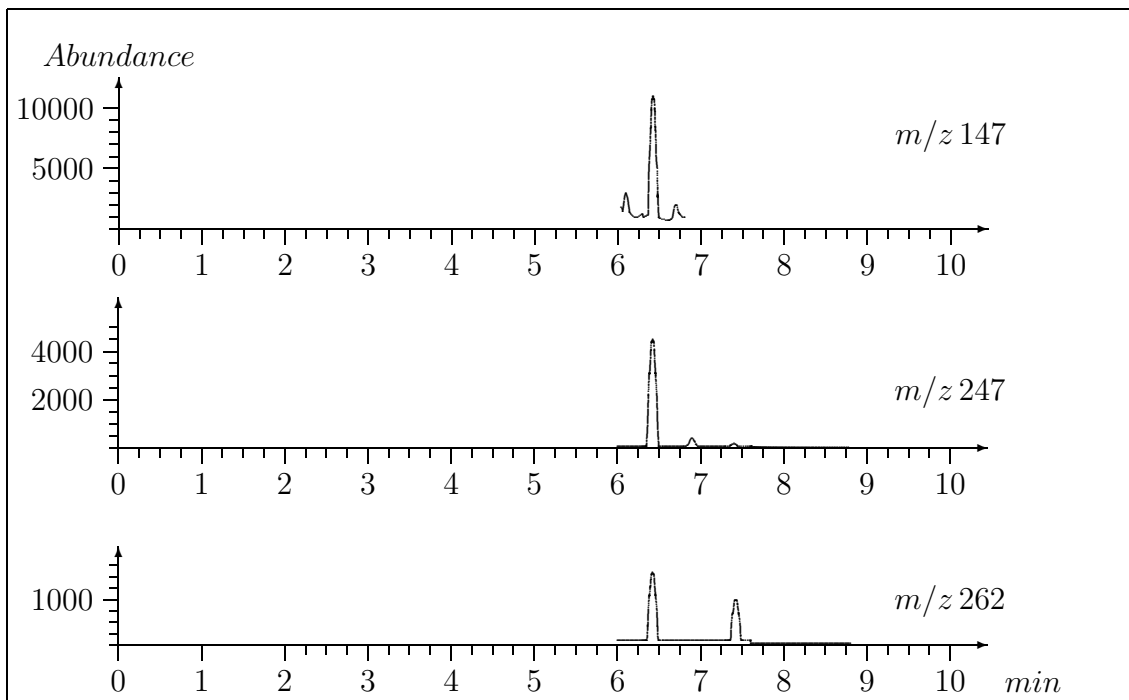


Abbildung 3.4: Ionenchromatogramm des Erythronsäurelaktons

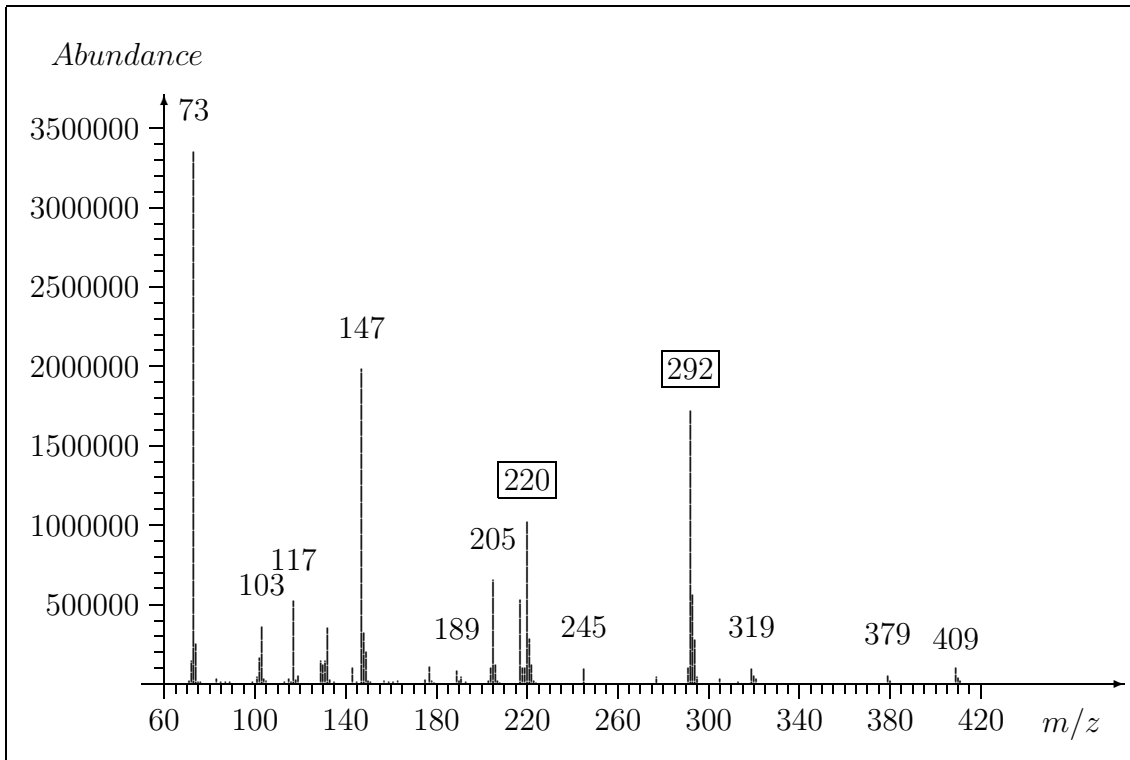


Abbildung 3.5: Massenspektrogramm der Erythronsäure

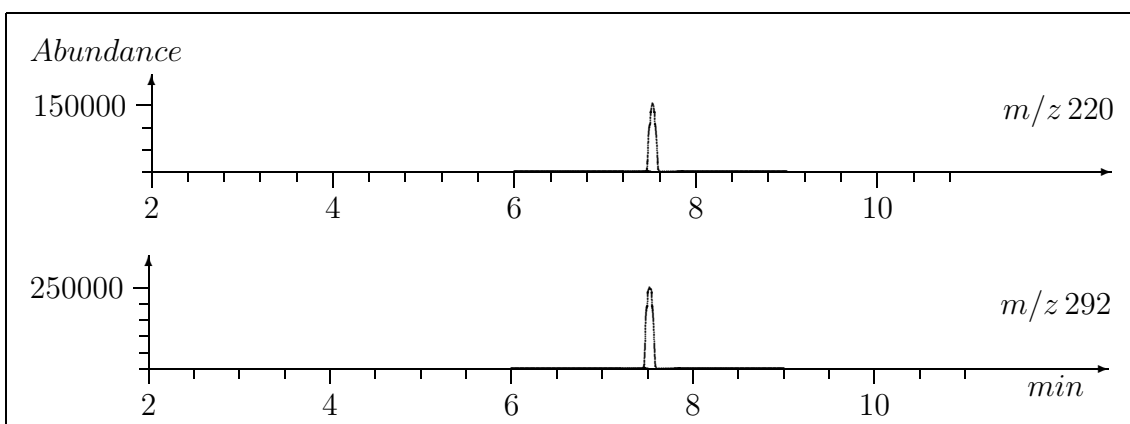


Abbildung 3.6: Ionenchromatogramm der Erythronsäure

3.1.6 Eichkurve

Für die Aufarbeitung mit Diazomethan und die Aufarbeitung mit Natronlauge soll exemplarisch eine Eichkurve mit den entsprechenden Messwerten gezeigt werden. Dabei wurde die Messung zur Berücksichtigung von Matrixeffekten an aufgestockten Poolserumproben durchgeführt. Zu 1 ml Poolserum wurden 400 μl einer Erythronsäureverdünnungslösung und 50 μl IST zugegeben. Die Menge des IST wurde auf das Volumen des verwendeten Serums bezogen. Daraufhin erfolgte die Eiweißfällung. Die weitere Aufarbeitung verlief nach dem jeweiligen in Tabelle 3.3 dargestellten Schema. Die Verdünnungsreihe der Erythronsäure (ES) sieht dabei wie folgt aus:

Konz [ES]	ES-Lösung (40 mg in 200 ml H ₂ O)	H ₂ O dest.
5 mg / l	25 μl	975 μl
10 mg / l	50 μl	950 μl
20 mg / l	100 μl	900 μl
30 mg / l	150 μl	850 μl
40 mg / l	200 μl	800 μl

Zur Erstellung der Eichkurve wurde das Verhältnis $A_{\text{ES}} / A_{\text{IST}}$ für jede verwendete Erythronsäurekonzentration bestimmt. Durch die so ermittelten Punkte wurde eine Regressionsgerade gelegt. Grundlage der Regressionsgeraden ist die allgemeine Geradengleichung:

$$y = m \cdot x + b$$

(m : Steigung; b : y -Achsenabschnitt). Angewandt auf die Regressionsgerade bedeutet dies:

$$A_{\text{ES}} / A_{\text{IST}} = m \cdot \text{ES-Konz. [mg/l]} + b$$

Da der Leerwert der Menge an Erythronsäure entspricht, die im Poolserum physiologisch vorhanden war, wurde dieser Wert von jedem Flächenverhältnis $A_{\text{ES}} / A_{\text{IST}}$ abgezogen. Die zu errechnende Gerade wurde als Ursprungsgerade definiert. Aus der Steigung m der Regressionsgeraden kann der RGP (Regressionsparameter) errechnet werden. Der Kehrwert der Steigung wird als Eichfaktor bezeichnet. Die Erythronsäurekonzentration einer gemessenen Probe ergibt sich aus dem Flächenverhältnis $A_{\text{ES}} / A_{\text{IST}}$ multipliziert mit dem Eichfaktor. Der Eichfaktor gilt dabei nur für die Serumproben, die mit der entsprechenden Eichkurve gemessen wurden.

3.1.6.1 Eichkurve für die Aufarbeitung mit Diazomethan

Die Messwerte einer Eichkurve aus der Aufarbeitungsreihe mit Diazomethan sind in Tabelle 3.4 aufgelistet. Die Steigung m beträgt 0,1432. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,9938. Der Linearitätsbereich erstreckt sich bis 100 mg/l. Bei den weiteren verwendeten Eichkurven war die Korrelation i.d.R. $> 0,990$.

Erythronsäure in mg/l	0	2	4	8	12	16	24
Verhältnis ES zu IST	0	0,479	0,711	0,952	1,768	2,225	3,587

Tabelle 3.4: Messwerte für die Eichkurve des Ions m/z 220 (Diazomethan)

Für die Identifizierung und Quantifizierung wurden die Ionen m/z 220, 292 und 409 für die offene Erythronsäure und die Ionen m/z 85 und 129 für den Internen Standard Trihydroxyhexan verwendet. Für die endgültige Berechnung der Erythronsäurekonzentration wurden die Ionen m/z 85 für den IST und 220 für die Erythronsäure verwendet. Zur Darstellung der Eichkurve in Abbildung 3.7 wird die Erythronsäurekonzentration gegen das Flächenverhältnis A_{ES}/A_{IST} aufgetragen.

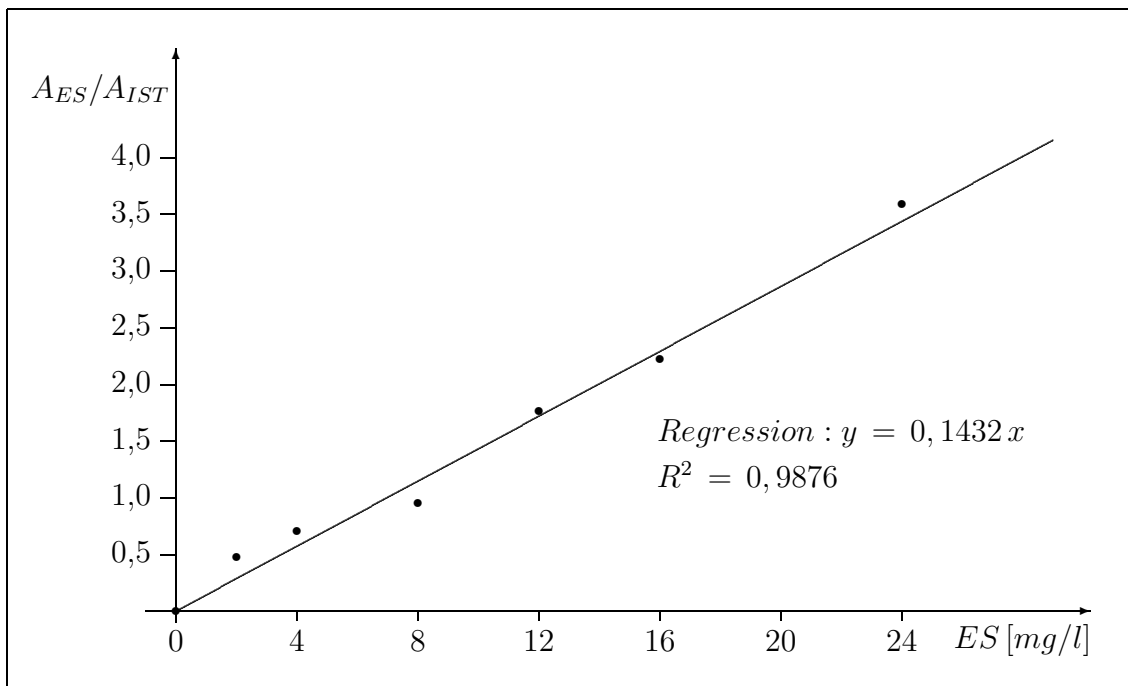


Abbildung 3.7: Eichkurve der Aufarbeitung mit Diazomethan

3.1.6.2 Eichkurve für die Aufarbeitung mit Natronlauge

Auch für die Aufarbeitung mit Natronlauge soll beispielhaft eine der verwendeten Eichkurven gezeigt werden. Die Tabelle 3.5 zeigt die Messwerte der Eichkurve. Die Geradensteigung m beträgt 0,2005.

Erythronsäure in mg/l	0	2	4	8	16
Verhältnis ES zu IST	0	0,572	0,855	1,540	3,281

Tabelle 3.5: Messwerte für die Eichkurve des Ions m/z 220 (NaOH)

Wie auch bei der Aufarbeitung mit Diazomethan war die Integration bei den Ionen m/z 85 für den IST und m/z 220 für die offene Erythronsäure am besten, so dass immer diese Ionen für die Auswertung der GC-MS-Analyse verwendet wurden. Die Abbildung 3.8 zeigt die erhaltene Eichkurve mit einer Korrelation von 0,9984. Auch die anderen verwendeten Eichkurven hatten i.d.R. eine Korrelation $> 0,990$.

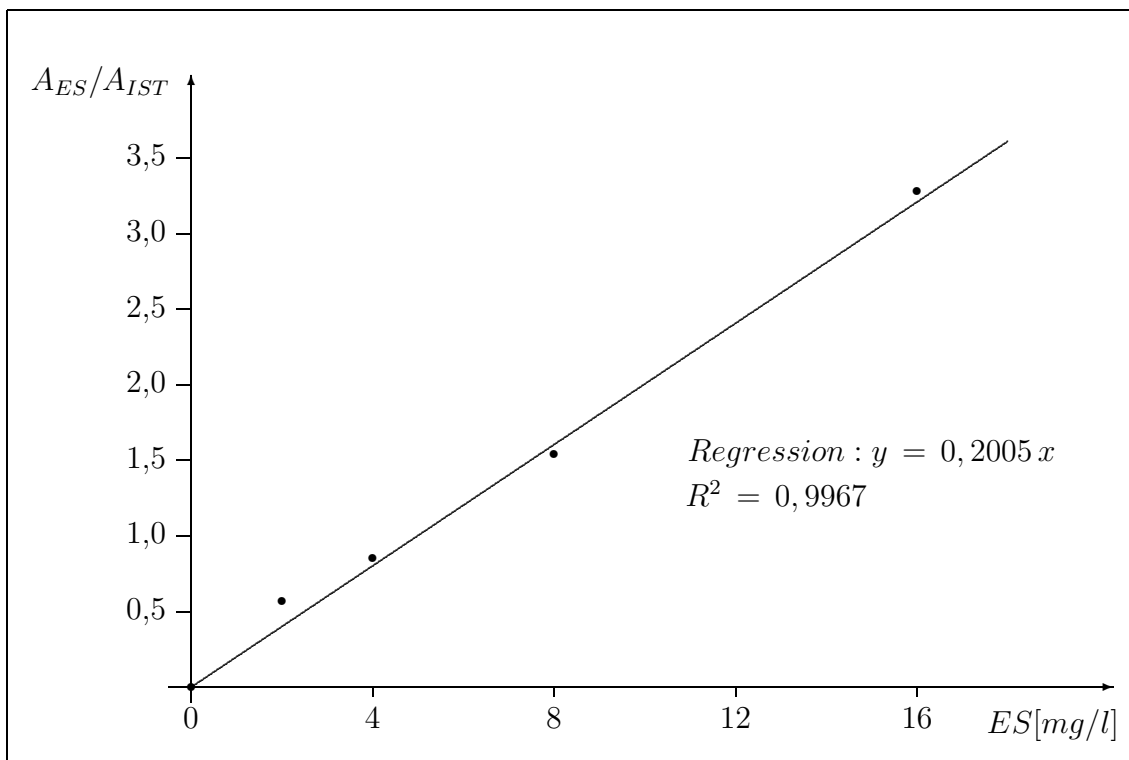


Abbildung 3.8: Eichkurve der Aufarbeitung mit Natronlauge

3.2 Datenauswertung

Das Alter der Diabetiker beträgt durchschnittlich $53,8 \pm 1,25$ Jahre ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) und das der Kontrollpersonen $47,4 \pm 1,75$ Jahre, was einen signifikanten Unterschied darstellt. Bei den Kontrollpersonen ist die Altersgruppe der 20- bis 30-jährigen stärker vertreten als bei den Diabetikern. Bei den über 60-jährigen finden sich mehr Diabetiker als Kontrollpersonen. Die Altersverteilung in den drei Altersgruppen mit den dazugehörigen Mittelwerten der Erythronsäure, den Standardabweichungen und -fehlern stellt sich in der Tabelle 3.6 wie folgt dar.

Altersstufen	n	%	\bar{x} [mg/l]	SD	SEM
20-40 J. Diabetiker	29	21,2	1,37	0,863	0,160
Kontrollpers.	32	34,4	0,94	0,435	0,077
40-60 J. Diabetiker	51	37,2	1,35	0,997	0,140
Kontrollpers.	37	39,8	0,84	0,501	0,082
>60 J. Diabetiker	57	41,6	1,51	0,889	0,118
Kontrollpers.	24	25,8	1,04	0,464	0,095

Tabelle 3.6: Altersverteilung bei Diabetikern und Kontrollpersonen

Der Einfluss des Alters auf die Erythronsäurekonzentration im Serum wurde mit einer Varianzanalyse mit den Faktoren Alter und Gruppe (Diabetiker, Kontrollpersonen) geprüft. Dabei sind die Unterschiede der Erythronsäurekonzentration in den Altersstufen nicht signifikant ($p = 0,345$), die Unterschiede bei Diabetikern und Kontrollpersonen jedoch signifikant ($p < 0,05$). Eine weitere Prüfung ergab, dass die Unterschiede der Erythronsäure zwischen den Gruppen nicht vom Alter abhängig sind. Es ist davon auszugehen, dass die unterschiedliche Altersverteilung bei Diabetikern und Kontrollpersonen keinen nachweisbaren Einfluss auf die Erythronsäurekonzentration hat.

Auch bei der Geschlechtsverteilung findet sich ein signifikanter Unterschied zwischen Diabetikern und Kontrollpersonen. Den 64 Diabetikerinnen (46 %) und 74 Diabetikern (54 %) stehen 64 weibliche (68 %) und 30 männliche (32 %) Kontrollpersonen gegenüber. Bei einer Kontrollperson war das Geschlecht nicht bekannt. Die durchgeführte Varianzanalyse mit den Faktoren Geschlecht und Gruppe (Diabetiker, Kontrollpersonen), die auf den Daten der Tabelle 3.7 basiert, zeigt signifikante Unterschiede im Bezug auf die Erythronsäurekonzentration zwischen den Gruppen

($p < 0,05$), jedoch keine Signifikanz zwischen den beiden Geschlechtern ($p = 0,743$). Weiterhin ergibt der Test, dass die Unterschiede der Erythronsäure bei Diabetikern und Kontrollpersonen nicht von der ungleichen Geschlechtsverteilung abhängig sind.

Geschlecht	n	%	\bar{x} [mg/l]	SD	SEM
weiblich Diabetiker	64	46,4	1,50	1,127	0,141
	Kontrollpers.	64	68,1	0,88	0,520
männlich Diabetiker	74	53,6	1,35	0,691	0,080
	Kontrollpers.	30	31,9	1,03	0,320

Tabelle 3.7: Geschlechtsverteilung bei Diabetikern und Kontrollpersonen

Beim Körpergewicht liegen die Diabetiker mit durchschnittlich $80,1 \text{ kg} \pm 7,3$ ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) deutlich über dem der Kontrollpersonen mit $70,4 \text{ kg} \pm 8,5$. Da man das Körpergewicht immer in Relation zur Körpergröße beurteilen sollte, wurden für alle Personen, bei denen Körpergewicht und -größe bekannt waren, der sog. Body-Mass-Index (BMI) als Quotient aus Körpergewicht [kg] und dem Quadrat der Körpergröße [m]² errechnet. Dabei gilt ein BMI von 20-25 als normalgewichtig, ein BMI von ≥ 25 -30 als Adipositas Grad 1, ein BMI von ≥ 30 -40 als Adipositas Grad 2 und ein BMI ≥ 40 als Adipositas Grad 3. Die Verteilung der Diabetiker und Kontrollpersonen auf die verschiedenen BMI-Stufen mit den dazugehörigen Mittelwerten, Standardabweichungen und Standardfehlern ist in Tabelle 3.8 zusammengestellt.

Body-Mass-Index	n	%	\bar{x} [mg/l]	SD	SEM
BMI 0 Diabetiker	24	18,3	1,50	1,022	0,209
	Kontrollpers.	43	60,6	0,88	0,544
BMI 1 Diabetiker	47	35,9	1,28	0,772	0,113
	Kontrollpers.	23	32,4	0,96	0,562
BMI 2 Diabetiker	54	41,2	1,41	0,714	0,097
	Kontrollpers.	5	7,0	1,00	0,000
BMI 3 Diabetiker	6	4,6	1,33	0,516	0,211
	Kontrollpers.	0	0	0	0

Tabelle 3.8: Body-Mass-Index bei Diabetikern und Kontrollpersonen

Auch hier wurde eine Varianzanalyse mit den Faktoren BMI und Gruppe (Diabetiker, Kontrollpersonen) durchgeführt. Als Ergebnis erhält man eine Signifikanz der Erythronsäurewerte bei den beiden Gruppen ($p < 0,05$), mit $p = 0,89$ jedoch keinen signifikanten Unterschied der Erythronsäure bezüglich des BMI. Damit haben die Unterschiede beim BMI keinen Einfluss auf die Erythronsäurewerte.

3.2.1 Diabetiker und Kontrollpersonen

3.2.1.1 HbA_{1c} bei Diabetikern und Kontrollpersonen

Um zu prüfen, ob Diabetiker und Kontrollpersonen sich in ihrem HbA_{1c} überhaupt unterscheiden, erfolgte ein t-Test für unverbundene Stichproben, der mit $p < 0,0005$ einen hochsignifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen zeigt. Die verwendeten Daten finden sich in Tabelle 3.9. Damit ist gewährleistet, dass sich Diabetiker und Kontrollpersonen in ihrem Kohlenhydratstoffwechsel unterscheiden und eine ausreichende diabetische Stoffwechsellage aufweisen.

Proband	\bar{x} [%]	SD	SEM	n	p
Diabetiker	8,00	1,518	0,133	131	< 0,0005
Kontrollpers.	5,23	0,381	0,042	82	

Tabelle 3.9: HbA_{1c} bei Diabetikern und Kontrollpersonen

3.2.1.2 Erythronsäure bei Diabetikern und Kontrollpersonen

Die Erythronsäurekonzentration im aufgearbeiteten Serum der 139 Diabetiker und 95 Kontrollpersonen wurde ermittelt und in Tabelle 3.10 einander gegenübergestellt.

Proband	\bar{x} [mg/l]	SD	SEM	n	p
Diabetiker	1,40	0,892	0,076	139	< 0,0005
Kontrollpers.	0,94	0,372	0,038	95	

Tabelle 3.10: Erythronsäure bei Diabetikern und Kontrollpersonen

Mit $p < 0,0005$ weisen die Diabetiker signifikant höhere Erythronsäurekonzentrationen auf, die durchschnittlich um 48 % über denen der Kontrollpersonen liegen. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.9 graphisch dargestellt.

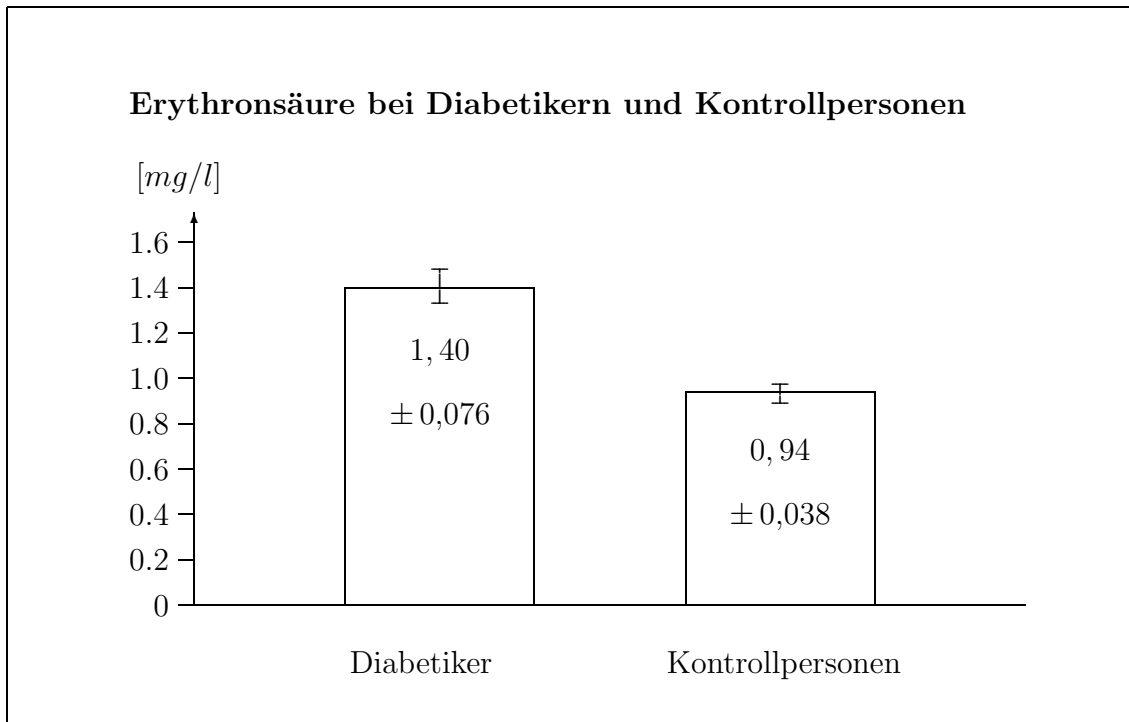


Abbildung 3.9: Erythronsäure bei Diabetikern und Kontrollpersonen ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)

3.2.2 Typ I- und Typ II-Diabetiker

In der Stichprobe der Diabetiker befinden sich 24 Typ I-Diabetiker und 102 Typ II-Diabetiker. Der Einfluss des Diabetestyps auf die Erythronsäurekonzentration wurde mit Hilfe eines t-Tests für unverbundene Stichproben überprüft. Der t-Test mit $p=0,64$, d.h. $p > 0,05$ ergibt keine Abhängigkeit der Erythronsäurewerte vom Diabetestyp. Tabelle 3.11 zeigt die Verteilung der Diabetiker mit allen relevanten Daten, die in Abbildung 3.10 veranschaulicht werden.

Diabetiker	\bar{x} [mg/l]	SD	SEM	n	p
Typ I	1,50	0,956	0,195	24	0,64
Typ II	1,40	0,904	0,089	102	

Tabelle 3.11: Erythronsäure bei Typ I- und Typ II-Diabetikern

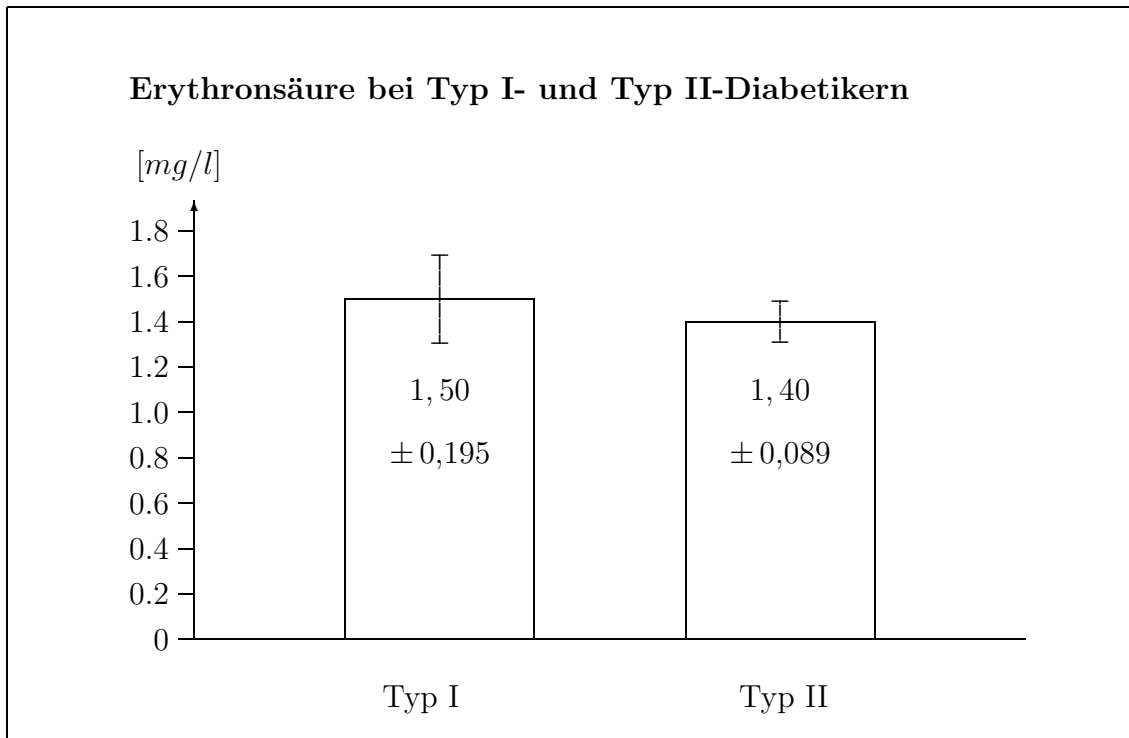


Abbildung 3.10: Erythronsäure bei Typ I- und Typ II-Diabetikern ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)

3.2.3 Diabetesdauer

Die Diabetiker wurden hinsichtlich ihrer Diabetesdauer in 5 Gruppen eingeteilt. Der Einfluss der Diabetesdauer auf die Erythronsäurekonzentration wurde mit Hilfe einer Einwegvarianzanalyse mit dem Zusatz von Scheffe ermittelt. Die verwendeten Daten sind in Tabelle 3.12 aufgelistet. Bezüglich der Diabetesdauer zeigt die Einwegvarianzanalyse keinen signifikanten Unterschied ($p=0,28$) zwischen den Gruppen. Die Abbildung 3.11 macht dies noch einmal in graphischer Form deutlich.

Diabetesdauer	\bar{x} [mg/l]	SD	SEM	n	p
< 5 Jahre	1,42	0,747	0,128	34	0,28
≥ 5 Jahre < 10	1,15	0,519	0,100	27	
≥ 10 Jahre < 15	1,54	1,258	0,262	23	
≥ 15 Jahre < 20	1,70	1,044	0,233	20	
≥ 20 Jahre	1,31	0,897	0,183	24	

Tabelle 3.12: Erythronsäure bei unterschiedlicher Diabetesdauer

Zusätzlich wurde die Abhängigkeit zwischen der Diabetesdauer und der Erythronsäurekonzentration mit einer Korrelationsanalyse überprüft. Dabei erhält man einen

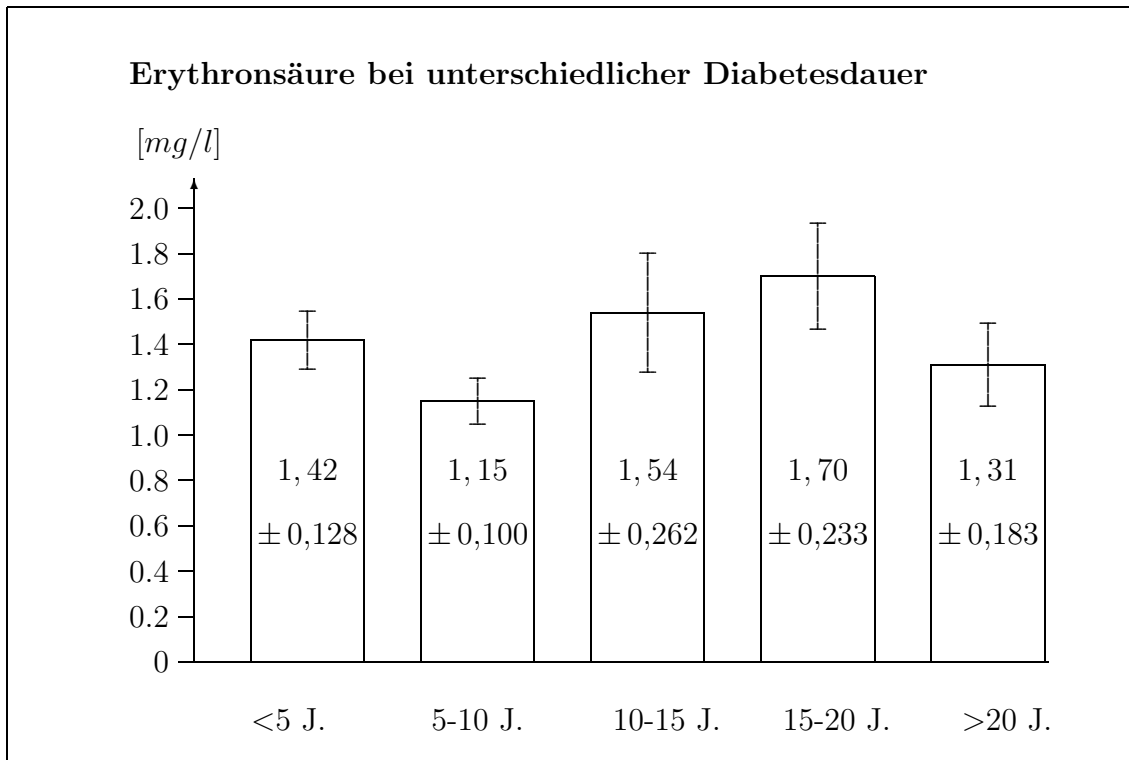


Abbildung 3.11: Erythronsäure bei unterschiedlicher Diabetesdauer ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)

Korrelationskoeffizienten von $r = 0,0171$ ($p = 0,85$). Beide Tests zeigen, dass die Diabetesdauer keinen signifikanten Einfluss auf die Erythronsäurekonzentration hat.

3.2.4 Nephropathie

Die Nephropathie wird in fünf Stadien eingeteilt. Dabei gelten klinische, histologische und laborchemische Kriterien. Die in den Patientenakten dokumentierten Nierenschädigungen durch den bestehenden Diabetes wurden den folgenden **Stadien der Nephropathie** zugeordnet:

- I** Hypertrophie u. Hyperfiltration (große Nieren, RPF u. GFR \uparrow)
- II** Histologische Nierenveränderungen ohne klinische Manifestation (Verdickung der kapillaren Basalmembran, Ausweitung des Mesangiums)
- III** Beginnende Nephropathie (beginnende Mikroalbuminurie und Hypertonie)
- IV** Klinisch manifeste Nephropathie (persistierende Proteinurie, RPF u. GFR \downarrow , Hypertonie in ca. 60 %)
- V** Terminale Niereninsuffizienz (GFR < 10 ml/min, Hypertonie in ca. 90 %)

3.2.4.1 Zusammenhang zwischen Erythronsäurekonzentration und Nephropathie

Zuerst wurde geprüft, ob sich die Erythronsäurekonzentrationen im Serum nieren-geschädigter Diabetiker signifikant von denen nierengesunder Diabetiker unterscheiden. Mit den Daten aus Tabelle 3.13 zeigt der t-Test für unverbundene Stichproben mit $p = 0,32$ keine Signifikanz. Dies ist in Abbildung 3.12 graphisch veranschaulicht.

Nephropathie	\bar{x} [mg/l]	SD	SEM	n	p
nein	1,42	0,902	0,099	83	0,32
ja	1,29	0,528	0,080	44	

Tabelle 3.13: Erythronsäure bei vorhandener / nicht vorhandener Nephropathie

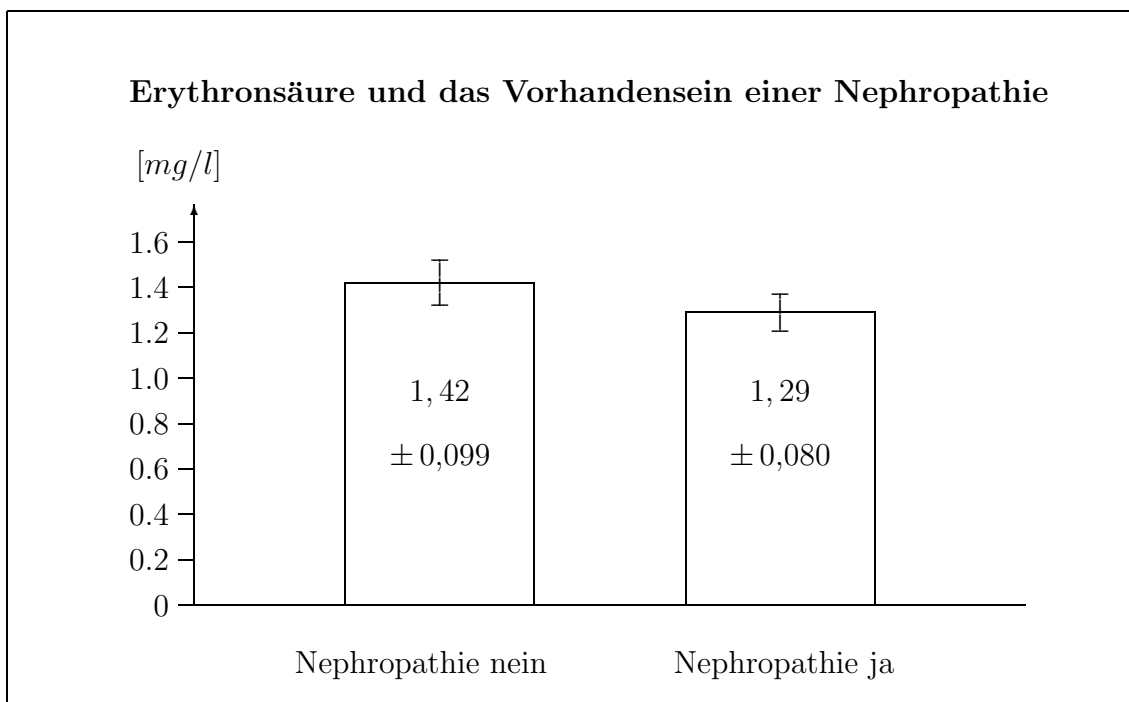


Abbildung 3.12: Erythronsäure u. das Vorhandensein einer Nephropathie ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)

Eine Überprüfung des Einflusses der Nephropathiestadien auf die Erythronsäure war nur bedingt möglich. Stadium I und II werden im klinischen Alltag i.d.R. nicht diagnostiziert und können somit nicht in die Auswertung miteinbezogen werden. Niereninsuffiziente Diabetiker im Stadium V entfallen ebenfalls, da deren Erythron-säurewerte aufgrund der schlechten Ausscheidungsfunktion deutlich erhöht sind.

Die Aufteilung der Diabetiker in die verschiedenen Nephropathiegrade und ihre Versuchsergebnisse finden sich in Tabelle 3.14 und die entsprechende Graphik in Abbildung 3.13. Es erfolgte eine Varianzanalyse zwischen den nierengesunden (Stadium 0) und den nierenkranken Diabetikern im Stadium III und IV. Auch diese Prüfung ergibt mit $p = 0,65$ keine Signifikanz.

Stadium der Nephropathie	\bar{x} [mg/l]	SD	SEM	n	p
0	1,42	0,902	0,099	83	0,65
III	1,26	0,520	0,089	34	
IV	1,38	0,575	0,182	10	

Tabelle 3.14: Erythronsäure bei verschiedenen Stadien der Nephropathie

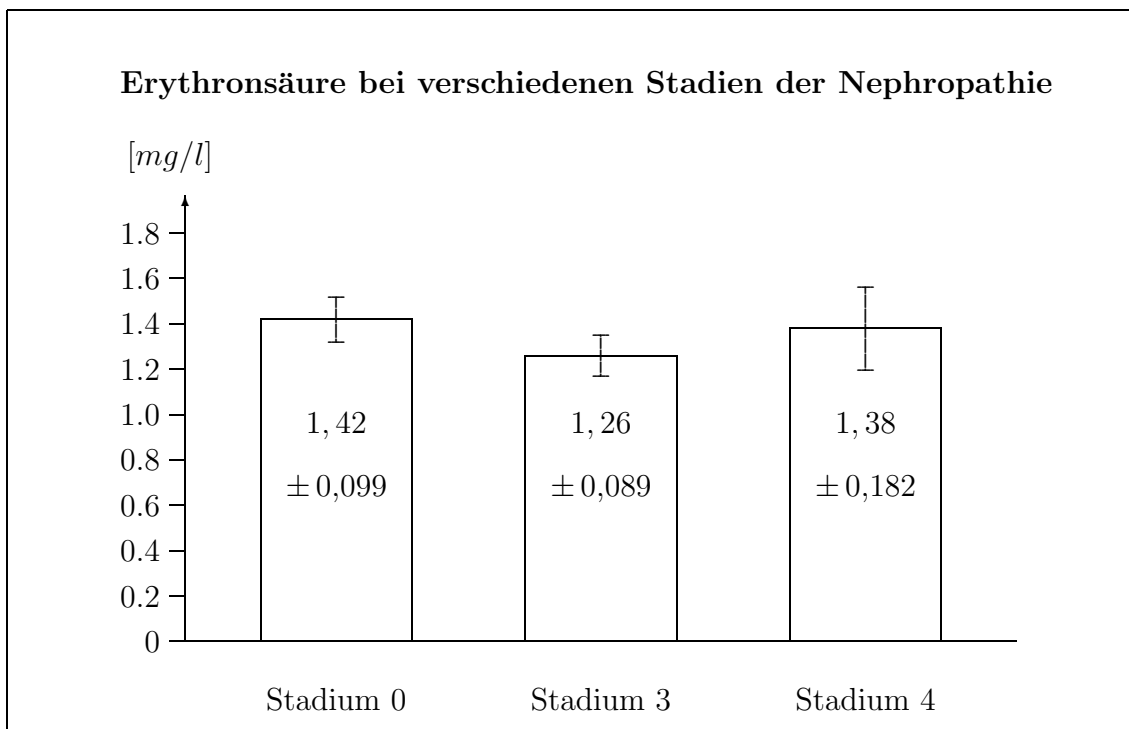


Abbildung 3.13: Erythronsäure bei versch. Stadien der Nephropathie ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)

3.2.4.2 Zusammenhang zwischen HbA_{1c} und Nephropathie

Das HbA_{1c} ist ein anerkannter Laborwert, der bei Diabetikern meist pathologisch erhöht ist und als Marker für die Diabeteseinstellung der vergangenen 8 bis 12 Wochen

verwendet wird. Wenn man davon ausgeht, dass v.a. Patienten mit schlechter Diabeteseinstellung eine Nephropathie entwickeln, so müsste bei diesen Patienten auch das $\text{HbA}_{1\text{c}}$ erhöht sein, was wiederum die Bildung der Erythronsäure begünstigen könnte. Es wurde überprüft, ob sich ein statistischer Zusammenhang zwischen dem $\text{HbA}_{1\text{c}}$ und dem Vorhandensein bzw. Fehlen der Nephropathie nachweisen lässt. Die entsprechenden Daten finden sich in Tabelle 3.15. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.14 dargestellt. Der t-Test für unverbundene Stichproben zeigt mit $p = 0,69$ keine Signifikanz.

Nephropathie	\bar{x} [%]	SD	SEM	n	p
nein	7,95	1,515	0,175	75	0,69
ja	8,07	1,527	0,230	44	

Tabelle 3.15: $\text{HbA}_{1\text{c}}$ bei vorhandener / nicht vorhandener Nephropathie

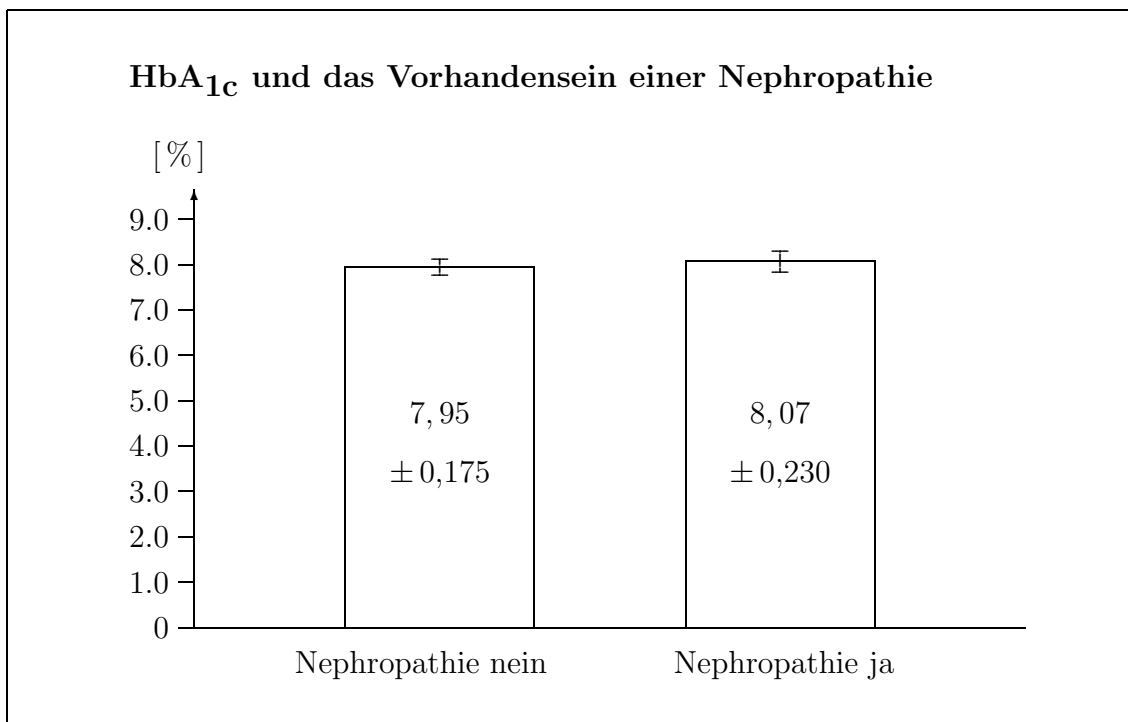


Abbildung 3.14: $\text{HbA}_{1\text{c}}$ und das Vorhandensein einer Nephropathie ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)

3.2.5 Retinopathie

Die in den Patientenakten dokumentierten Augenschädigungen durch den bestehenden Diabetes wurden den folgenden **Stadien der Retinopathie** zugeordnet:

- I** Nichtproliferative Retinopathie (Hintergrundretinopathie mit Mikroaneurysmen und kleinen intraretinalen Blutungen)
- II** Proliferative Retinopathie; diabetische Makulopathie (Neovaskularisationen, Z.n. Laserkoagulation)
- III** Zentralvenenverschluss, Venenastverschluss
- IV** Glaskörperblutung, Vitrektomie

3.2.5.1 Zusammenhang zwischen Erythronsäurekonzentration und Retinopathie

Zuerst erfolgte ein Vergleich der Erythronsäurekonzentrationen im Serum der Diabetiker mit nicht vorhandener Retinopathie mit jenen, die eine Retinopathie aufwiesen. Der durchgeführte ungepaarte t-Test ergab mit $p = 0,69$ keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen (s. Tabelle 3.16 und Abbildung 3.15).

Retinopathie	\bar{x} [mg/l]	SD	SEM	n	p
nein	1,38	0,909	0,093	95	0,69
ja	1,45	0,863	0,130	44	

Tabelle 3.16: Erythronsäure bei vorhandener / nicht vorhandener Retinopathie

Eine Überprüfung des Einflusses der Retinopathiestadien auf die Erythronsäure war für alle Stadien möglich. Da nur je zwei Diabetiker in Stadium III und IV sind, wurden diese beiden Stadien zusammengefasst. Mit den Ergebnissen aus Tabelle 3.17 erfolgte eine Varianzanalyse zwischen augengesunden Diabetikern (Stadium 0) und denjenigen mit einer Retinopathie Grad I bis IV. Das Ergebnis zeigt die Abbildung 3.16. Die Prüfung ergibt mit $p = 0,67$ keine Signifikanz.

Stadium der Retinopathie	\bar{x} [mg/l]	SD	SEM	n	p
0	1,38	0,909	0,093	95	0,67
I	1,33	0,685	0,130	28	
II	1,77	1,261	0,364	12	
III+IV	1,33	0,174	0,087	4	

Tabelle 3.17: Erythronsäure bei verschiedenen Stadien der Retinopathie

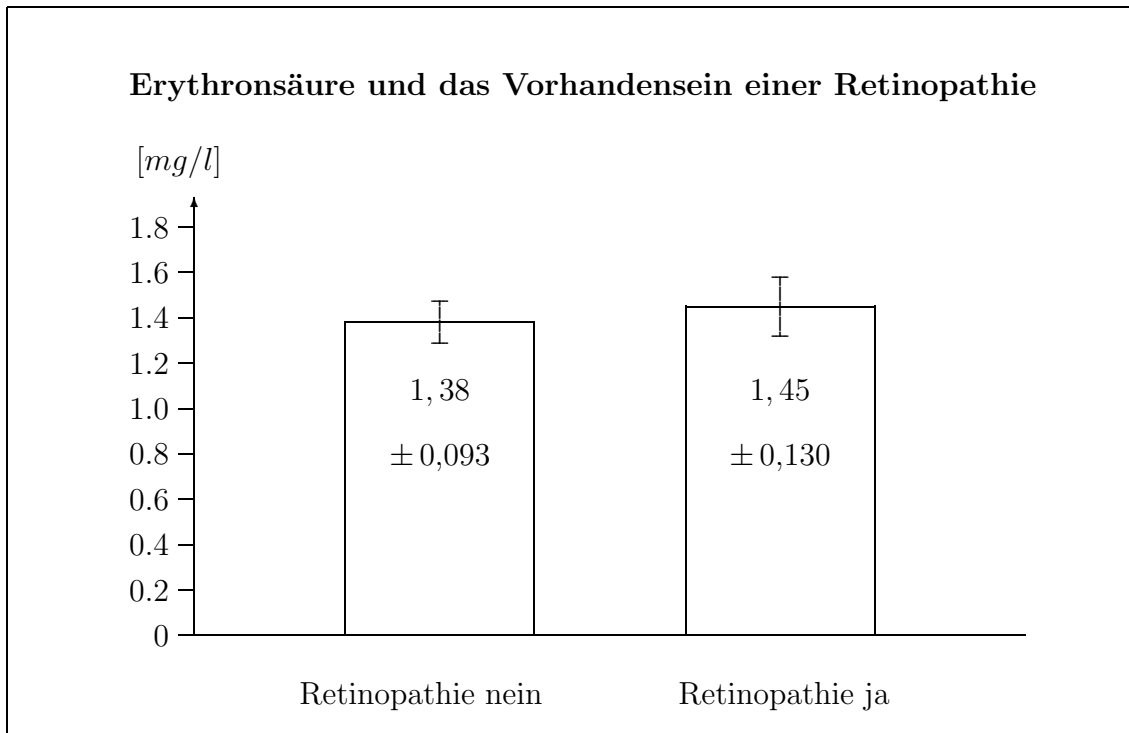


Abbildung 3.15: Erythronsäure u. das Vorhandensein einer Retinopathie ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)

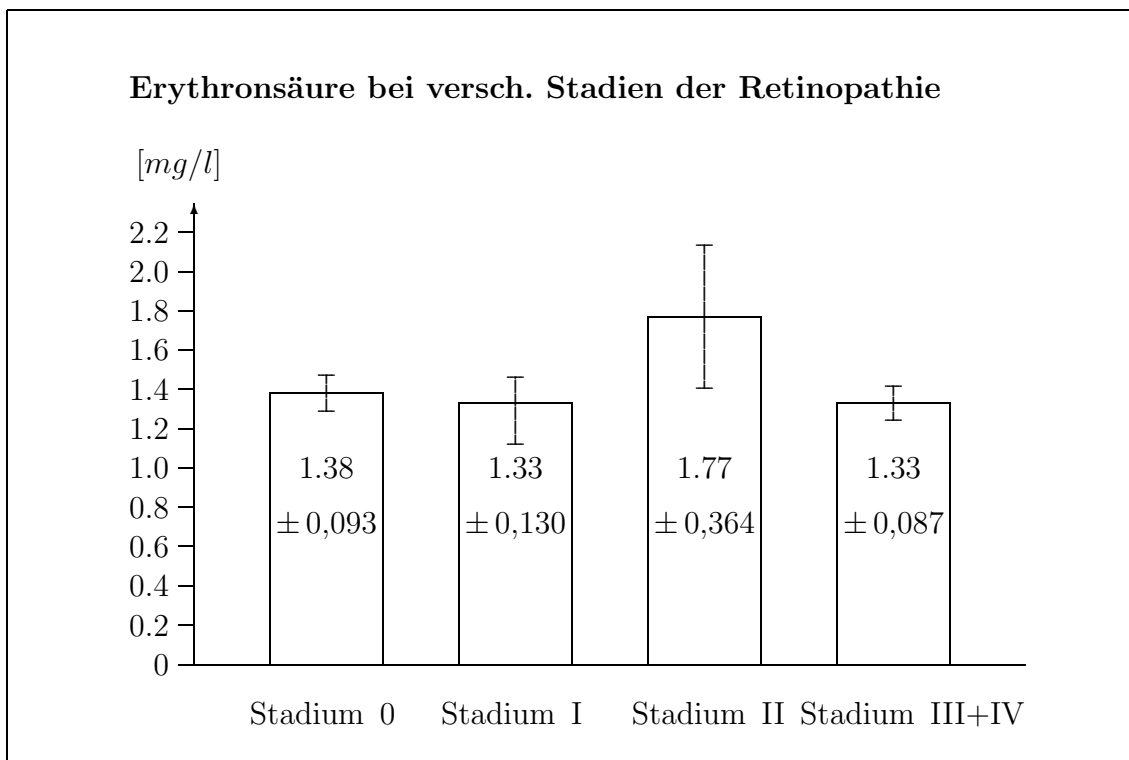


Abbildung 3.16: Erythronsäure bei versch. Stadien der Retinopathie ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)

3.2.5.2 Zusammenhang zwischen HbA_{1c} und Retinopathie

Wie schon bei der Nephropathie so soll auch bei der Retinopathie ein möglicher Zusammenhang zwischen schlechter Diabeteseinstellung mit dadurch erhöhtem HbA_{1c} und der Ausbildung einer Retinopathie überprüft werden. Eine Signifikanz bei der Überprüfung könnte für die Bewertung der Ergebnisse aus Absatz 3.2.5.1 richtungsweisend sein.

Für die Auswertung, ob das HbA_{1c} bei fehlender oder vorhandener Retinopathie einen signifikanten Unterschied zeigt, wurde ein t-Test für unverbundene Stichproben angewendet, der mit $p = 0,18$ keine Signifikanz erbrachte. Die dazugehörigen Daten sind in Tabelle 3.18 aufgelistet und in Abbildung 3.17 dargestellt.

Retinopathie	\bar{x} [%]	SD	SEM	n	p
nein	7,87	1,495	0,160	87	0,18
ja	8,25	1,550	0,234	44	

Tabelle 3.18: HbA_{1c} bei vorhandener / nicht vorhandener Retinopathie

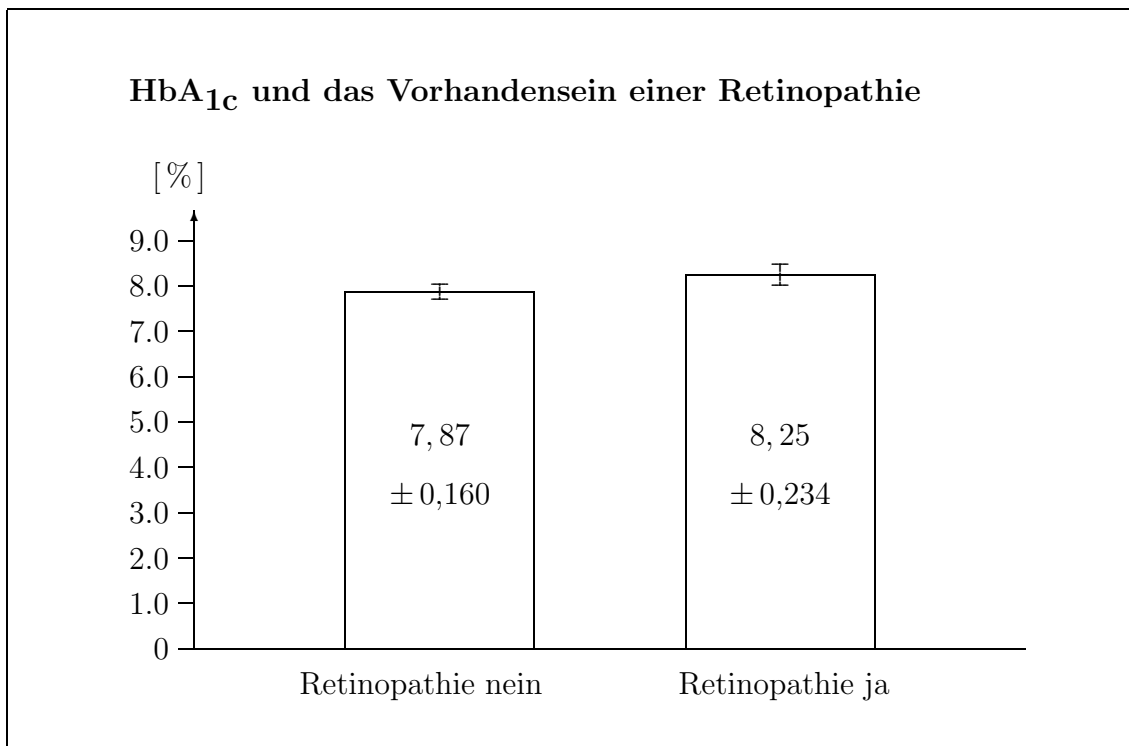


Abbildung 3.17: HbA_{1c} und das Vorhandensein einer Retinopathie ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)

3.2.6 Hypertonie und/oder pAVK

Bei der Makroangiopathie wurden die Diabetiker mit Hypertonie und/oder peripherer arterieller Verschlusskrankheit in die Gruppe „krank“ und in die Gruppe „gesund“ mit Diabetikern ohne diese Erkrankungen eingeteilt. Zum Vergleich der Erythronsäurekonzentrationen im Serum dieser beiden Gruppen erfolgte ein t-Test für unverbundene Stichproben. Dieser zeigte mit $p = 0,18$ ($p > 0,05$) keinen signifikanten Unterschied der Erythronsäure bei Diabetikern mit vorhandener und nicht vorhandener Hypertonie und/oder pAVK. In der folgenden Tabelle 3.19 sind alle relevanten Daten aufgelistet und Abbildung 3.18 zeigt das entsprechende Säulendiagramm.

Diabetiker	\bar{x} [mg/l]	SD	SEM	n	p
„ gesund “	1,59	0,714	0,093	59	0,18
„ krank “	1,48	1,004	0,116	75	

Tabelle 3.19: Erythronsäure bei Diabetikern mit/ohne Gefäßveränderungen

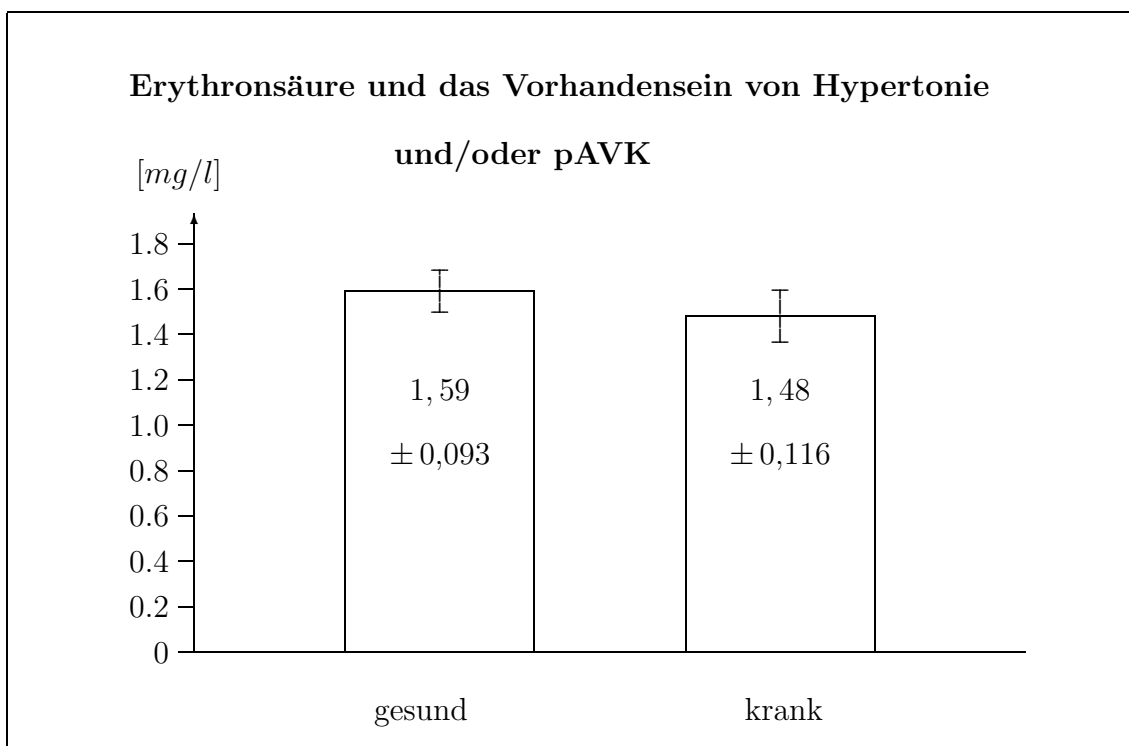


Abbildung 3.18: Erythronsäure b. Diabetikern m./o. Gefäßerkrankungen ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)

3.2.7 Klinisch-chemische Untersuchungen

3.2.7.1 HbA_{1c}

Bei der Untersuchung eines möglichen Einflusses des HbA_{1c} auf die Höhe der Erythronsäure wurden die Diabetiker in zwei Gruppen aufgeteilt. Als gut eingestellte Diabetiker wurden diejenigen mit einem HbA_{1c} von $\leq 7,5\%$ gewertet, Werte über $7,5\%$ galten als schlechte Einstellung. Der t-Test für unverbundene Stichproben zeigt mit $p=0,92$ keinen signifikanten Zusammenhang zwischen HbA_{1c} und Erythronsäure. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.20 aufgelistet und in Abbildung 3.19 veranschaulicht.

HbA _{1c}	\bar{x} [mg/l]	SD	SEM	n	p
$\leq 7,5\%$	1,384	0,912	0,119	59	0,92
$> 7,5\%$	1,304	0,607	0,072	72	

Tabelle 3.20: Erythronsäure bei guter und schlechter Diabeteseinstellung

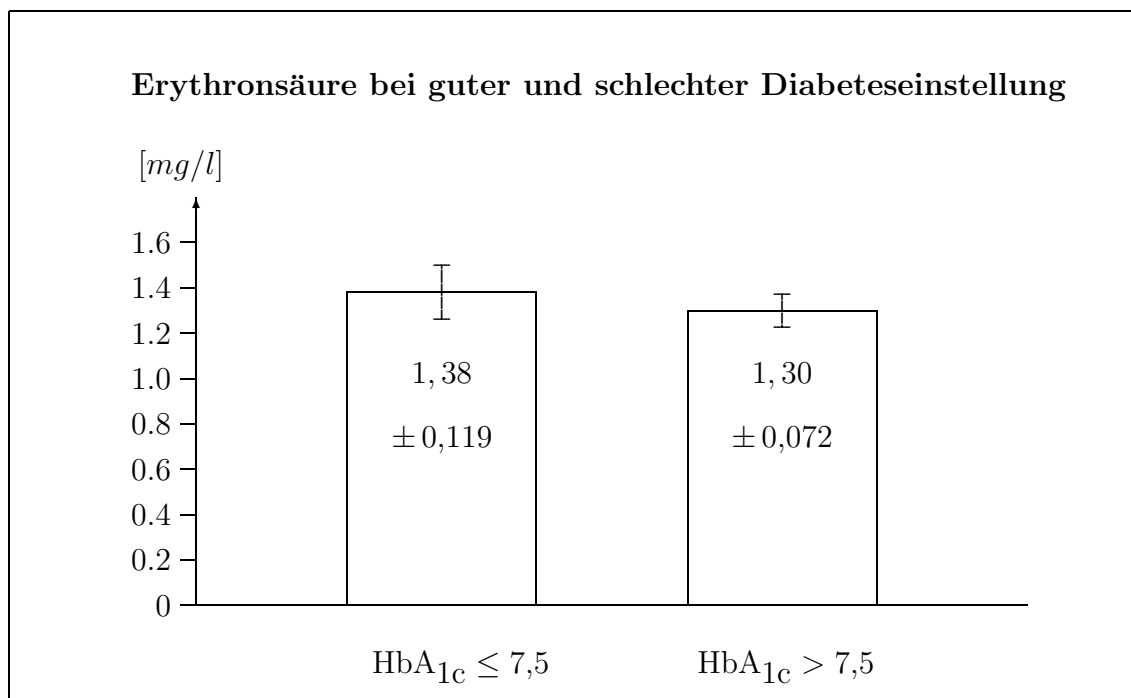


Abbildung 3.19: Erythronsäure und Diabeteseinstellung ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)

Da die Wahl des HbA_{1c}-Grenzwertes zwischen guter und schlechter Diabeteseinstellung für den t-Test willkürlich war, erfolgte eine ergänzende Korrelationsanalyse, die die Auswirkung des HbA_{1c} auf die Erythronsäure überprüft. Dabei erhält man folgende Ergebnisse:

Korrelationskoeffizient $r = 0,016$ ($p = 0,86$)

Somit ergibt sich auch hier kein signifikanter Einfluss ($p > 0,05$) des HbA_{1c} auf die Erythronsäurekonzentration.

3.2.7.2 Blutglukose

Zusammenhang zwischen Erythronsäure und Blutglukose

Auch bei der Prüfung des Einflusses der Blutglukose auf die Erythronsäure wurde eine Korrelationsanalyse durchgeführt. Dabei ergibt sich keine Signifikanz ($p > 0,05$) zwischen dem aktuellen Blutzuckerwert und der Erythronsäurekonzentration.

Korrelationskoeffizient $r = 0,066$ ($p = 0,47$)

Zusammenhang zwischen HbA_{1c} und Blutglukose

Um festzustellen, ob die Diabetiker überhaupt erhöhte Blutzuckerwerte aufweisen und sich diese dann in einem erhöhten HbA_{1c} widerspiegeln, wurde eine Korrelationsanalyse zur Prüfung des Einflusses des Blutzuckers auf den HbA_{1c} durchgeführt. Dabei ergibt sich mit $p < 0,00005$ wie erwartet eine hochsignifikante Korrelation zwischen dem aktuellen Blutzuckerwert und dem HbA_{1c}.

Korrelationskoeffizient $r = 0,655$ ($p < 0,00005$)

3.2.8 Dialyse

Um zu sehen, welchen Einfluss eine intakte Nierenfunktion und eine ausreichende Diurese auf die im Serum vorhandene Erythronsäure haben, wurde die Erythronsäurekonzentration bei 35 dialysepflichtigen Patienten vor und nach Dialyse bestimmt. Die Tabelle 3.21 zeigt die ermittelten Werte der Messungen im Überblick und Abbildung 3.20 veranschaulicht die deutlichen Unterschiede der Erythronsäurewerte vor und nach Dialyse.

Mit $p < 0,0005$ zeigt der t-Test für verbundene Stichproben signifikant höhere Erythronsäurewerte vor Dialyse als bei Diabetikern und Kontrollpersonen. Dies zeigt,

Dialyse	\bar{x} [mg/l]	SD	SEM	n	p
vor Dialyse	8,17	2,252	0,381	35	< 0,0005
nach Dialyse	3,35	1,126	0,190	35	

Tabelle 3.21: Erythronsäure vor und nach Dialyse

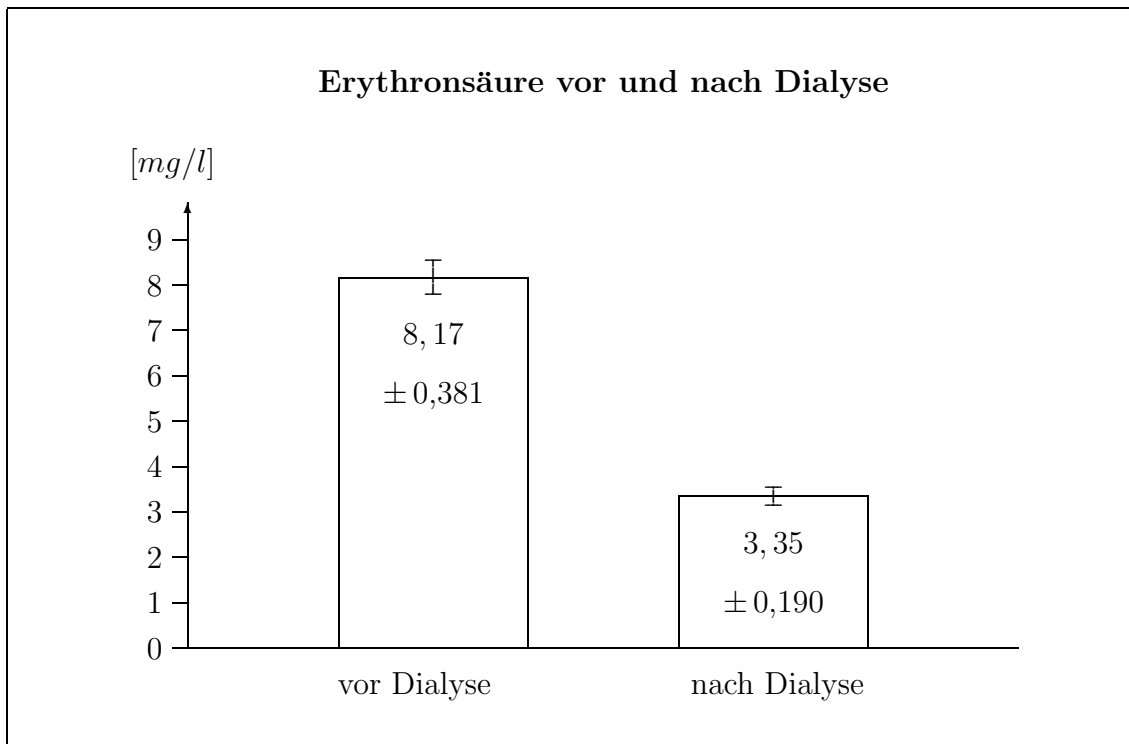


Abbildung 3.20: Erythronsäure vor und nach Dialyse ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)

dass die Erythronsäure in Abhängigkeit von der Nierenfunktion ausgeschieden wird, wobei die Dialyse durchschnittlich ca. 60% der im Serum vorhandenen Erythronsäure entfernt. Doch selbst nach Dialyse ist die Erythronsäurekonzentration noch deutlich gegenüber den Diabetikern erhöht. Zur besseren Gesamtübersicht folgt deshalb in Tabelle 3.22 und Abbildung 3.21 die Darstellung von Kontrollpersonen, Diabetikern und Dialysepatienten im Vergleich.

Die Tabelle und das Schaubild ermöglichen einen direkten Überblick über alle Personengruppen und zeigen die deutlichen Unterschiede der Erythronsäurekonzentration zwischen diesen Gruppen. Selbst nach Dialyse ist die Erythronsäure noch 2,4 Mal höher als bei den Diabetikern, vor Dialyse sogar 5,8 Mal höher. Im Vergleich zu den Kontrollpersonen erhöhen sich die Faktoren auf 3,6 nach und 8,7 vor Dialyse.

Gruppe	\bar{x} [mg/l]	SD	SEM	n	p
Kontrollen	0,94	0,372	0,038	95	< 0,05
Diabetiker	1,40	0,892	0,076	139	
nach Dialyse	3,35	1,126	0,190	35	
vor Dialyse	8,17	2,252	0,381	35	

Tabelle 3.22: Erythronsäure bei Kontrollpersonen, Diabetikern u. Dialysepatienten

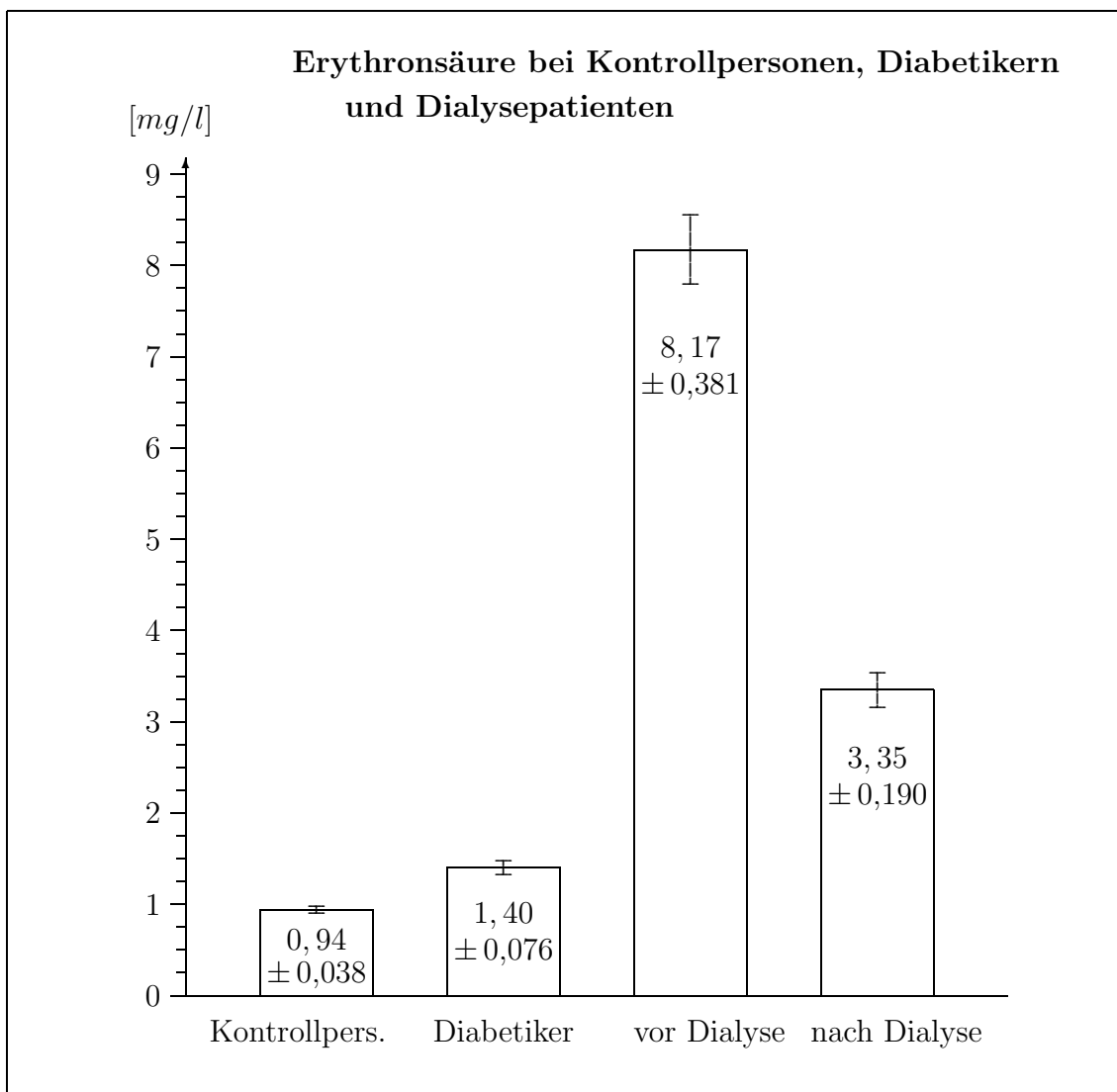


Abbildung 3.21: Erythronsäure bei den verschiedenen Gruppen ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)

Kapitel 4

Diskussion

4.1 Alter, Geschlecht und BMI

Da sich die Patienten- und Kontrollgruppe signifikant in Alter, Geschlecht und Body-Mass-Index unterscheiden, wurde zunächst überprüft, ob eine Signifikanz zwischen diesen Parametern und der gemessenen Erythronsäurekonzentration im Serum besteht. Dabei fand sich nach Durchführung der entsprechenden Varianzanalysen keine signifikante Korrelation zwischen einem dieser Parameter und der Erythronsäurekonzentration.

Bei den zugänglichen Untersuchungsergebnissen anderer Studien wurde nie die Beziehung des Body-Mass-Index bzw. des Gewichts mit der gemessenen Menge an AGE-Produkten, CML oder Erythronsäure untersucht. Ein Vergleich mit anderen Studien scheidet somit aus.

Bei der Überprüfung des Einflusses des Geschlechts fanden Papanastasiou und seine Mitarbeiter bei der Messung von AGE-Produkten im Serum mittels eines Immunoassays mit Antikörpern gegen glykiertes Rinderalbumin keine Korrelation mit dem Geschlecht (PAPANASTASIOU ET AL., 1994). Eine andere Studie, die CML im Serum bestimmte, konnte ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen dem Geschlecht und der CML-Menge nachweisen (BERG ET AL., 1998). Auch bei der Quantifizierung von CML und Pentosidin in Hautkollagen ergab sich keine Abhängigkeit vom Geschlecht (MCCANCE ET AL., 1993). Dies bestätigt das Ergebnis der vorliegenden Arbeit, die keine Korrelation zwischen der Erythronsäurekonzentration im Serum und dem Geschlecht feststellen konnte. Dieses Ergebnis erscheint auch nachvollzieh-

bar, da es nach dem heutigen Stand der Forschung keinen Hinweis dafür gibt, dass die Bildung von Glykierungsprodukten über Geschlechtshormone oder über andere geschlechtsspezifische Reaktionswege gesteuert wird.

Das Alter der Probanden ist mithin der am häufigsten untersuchte Faktor. Im Rahmen dieser Arbeit fand sich keine Korrelation zwischen dem Alter und der Erythronsäuremenge. Die meisten Studien haben u.a. den Zusammenhang zwischen dem Alter der Untersuchungspersonen und der Konzentration der nachgewiesenen Glykierungsprodukten untersucht. Dabei kommen viele zu dem Ergebnis, dass das Alter nicht mit der Konzentration der Glykierungsprodukte korreliert. So veröffentlichte Papanastasiou et al. Ergebnisse von gemessenen AGE-Produkten im Serum von Gesunden, Diabetikern und urämischen Patienten, die keine Korrelation mit dem Alter aufzeigen konnten (PAPANASTASIOU ET AL., 1994). Bei der Quantifizierung von CML im Serum von Diabetikern und Kontrollpersonen konnten andere Forschungsgruppen ebenfalls keine Korrelation mit dem Alter aufzeigen (BERG ET AL., 1998, SCHLEICHER ET AL., 1997) und eine andere Arbeitsgruppe fand bei der Untersuchung des Urins diabetischer und gesunder Patienten zwar erhöhte CML-Werte bei Diabetikern, es konnte jedoch kein Anstieg der CML-Menge mit zunehmendem Alter nachgewiesen werden (KNECHT ET AL., 1991). Beisswenger et al. konnten bei der Untersuchung von Hautproben auf AGE-Produkte (Immunoassay mit polyklonalem Antiserum, standardisiert auf glykiertes Rinderserumalbumin) ebenfalls keine Korrelation mit dem Alter der Diabetiker und Kontrollpersonen ermitteln (BEISSWENGER ET AL., 1995).

Andere Arbeitsgruppen wiederum konnten eine signifikante Erhöhung von Glykierungsprodukten mit zunehmendem Alter nachweisen. Dazu gehört die Arbeit von Takahashi et al., die eine signifikante Pentosidinerhöhung im Serum mit zunehmendem Alter der Kontrollpersonen (33 Probanden) nachweisen konnte, was bei den urämischen Patienten nicht der Fall war (TAKAHASHI ET AL., 1993B). Dabei ist zu beachten, dass Pentosidin auch aus anderen Zuckern entstehen kann (MONNIER ET AL., 1992). Die Arbeitsgruppe um Baynes fand in Linsenproteinen und Hautkollagen eine signifikante Korrelation der CML-Konzentration mit dem Alter (DUNN ET AL., 1989, DUNN ET AL., 1991) und Araki et al. konnte eine Zunahme der AGE-Produkte in menschlichen Linsenproteinen nachweisen, die mit Hilfe eines ELISA mit mono- und polyklonalen Anti-AGE-Antikörpern gegen glykiertes Rinderserumalbumin bestimmt wurden (ARAKI ET AL., 1992). Auch Schleicher et al.

untersuchten verschiedene fetale Gewebeproben und Gewebe höherer Altersgruppen auf CML. Während bei jungen Erwachsenen geringe und bei Personen über 50 Jahren deutlich höhere CML-Werte gefunden werden konnten, war ein CML-Nachweis in fetalem Gewebe nicht möglich (SCHLEICHER ET AL., 1997).

Abschließend kann gesagt werden, dass ein Zusammenhang zwischen dem Geschlecht und der Bildung von Glykierungsprodukten nach heutigem Stand der Forschung unwahrscheinlich ist. Eine endgültige Aussage über den Einfluss des Gewichts bzw. Body-Mass-Index kann nicht getroffen werden, da es dazu zu wenig Untersuchungen gibt.

Anders dagegen der Zusammenhang von Alter und Glykierungsprodukten. Eine Korrelation zwischen der Erythronsäurekonzentration und dem Alter erscheint nicht unwahrscheinlich, da die Glykierungsprodukte mit der Zeit akkumulieren. Dabei handelt es sich jedoch um eine Anreicherung in langlebigen Gewebeproteinen und nicht in kurzlebigen Serumproteinen. Dies kann bedeuten, dass Glykierungsprodukte durch ihre Ausbildung von Crosslinks in Gewebeproteinen mit zunehmendem Alter durchaus ansteigen können, dies aber im Serum nicht der Fall sein muss, da Serumproteine eine deutlich kürzere Lebenszeit haben.

4.2 Diabetiker und Kontrollpersonen

4.2.1 HbA_{1c} bei Diabetikern und Kontrollpersonen

Der durchgeführte t-Test für unverbundene Stichproben hat einen hochsignifikanten Unterschied des HbA_{1c} bei Diabetikern und Kontrollpersonen aufgezeigt. Dies bedeutet, dass die Diabetiker trotz ihrer Diabeteseinstellung nicht die physiologische Kohlenhydratstoffwechselsituation der Nicht-Diabetiker erreichen. Wäre in beiden Gruppen das HbA_{1c} identisch oder sehr ähnlich, so könnte man auch nicht unbedingt mit einer erhöhten Erythronsäurekonzentration im Serum der Diabetiker rechnen. Die diabetische Stoffwechselsituation der Patienten gemessen am HbA_{1c} ist jedoch Zeichen für stattgehabte rezidivierende Hyperglykämien, die die Grundlage zur Bildung von AGE-Produkten (BROWNLEE, 1992) und Glukoxidationsprodukten (WELLS-KNECHT ET AL., 1995) wie der Erythronsäure sind.

4.2.2 Erythronsäure bei Diabetikern und Kontrollpersonen

Bei der Auswertung der Ergebnisse fand sich eine signifikante Erhöhung der Erythronsäurekonzentration im Serum der Diabetiker im Vergleich zu den nicht diabetischen Kontrollpersonen. Dabei hatten die Kontrollpersonen durchschnittlich 0,94 mg/l Erythronsäure im Serum und die Diabetiker eine Konzentration von 1,40 mg/l. Somit wiesen die Diabetiker durchschnittlich fast 50 % mehr Erythronsäure im Serum auf als die Kontrollpersonen.

Erhöhte Mengen von Glykierungsprodukten bei Diabetikern fanden sich auch bei zahlreichen anderen Arbeiten, die AGE-Produkte, CML oder Erythronsäure quantifiziert haben. Bei der Untersuchung von Normalpersonen und Diabetikern fand Papanastasiou bei der Quantifizierung von AGE-Produkten (Immunassay mit Antikörpern gegen glykiertes Rinderserumalbumin) im Serum von Diabetikern fast doppelt so hohe Werte, verglichen mit den Normalpersonen (PAPANASTASIOU ET AL., 1994). Ein Vergleich des AGE-Produktes Pentosidin im Serum von Diabetikern und Kontrollpersonen ergab 2,5fach erhöhte Werte bei den Diabetikern (ODETTI ET AL., 1992). Weitere Untersuchungen von Urin diabetischer und gesunder Personen, erbrachten leicht erhöhte CML-Werte bei den Diabetikern, die jedoch signifikant waren (KNECHT ET AL., 1991). Bei der Urinuntersuchung diabetischer Hunde fanden sich doppelt so hohe Erythronsäurekonzentrationen wie bei den gesunden Artgenossen (SHIGEMATSU ET AL., 1988). Bei der Bestimmung von AGE-Produkten in Hautbiopsien mit Hilfe eines Immunassays und eines polyklonalen Antiserums, standardisiert auf glykiertes Rinderserumalbumin, hatten Diabetiker dreifach höhere Werte als Kontrollpersonen (BEISSWENGER ET AL., 1995).

Neueste Forschungsergebnisse haben auch erhöhte Erythronsäurewerte im Serum und in der Augenflüssigkeit von Diabetikern nachgewiesen (HARDING ET AL., 1999). Dabei fand sich im Serum von Nicht-Diabetikern durchschnittlich 1,42 mmol/l, bei Diabetikern 2,03 mmol/l Erythronsäure. Aufgrund der starken Schwankungen waren die Ergebnisse aber statistisch nicht signifikant. Verglichen mit den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit mit Erythronsäurekonzentrationen zwischen 0,32 und 15 mg/l sind die Erythronsäurekonzentrationen von Harding um ein Vielfaches höher, da 2,03 mmol/l bei einem molaren Gewicht von 118 mg/mol einer Konzentration von 240 mg/l entsprechen. Harding führte eine Zuckerbestimmung mittels HPLC und anschließender GC-MS-Analyse durch, wobei einige Peaks auffielen, die nicht identifiziert werden konnten. Aus der Molekülmasse und einigen auffallenden Ionen

schloss er dann auf ein Gemisch von Erythronsäure und Threonsäuren. Ein interner Standard war nicht vorhanden, ebenso fehlte eine Eichkurve für die Erythronsäure. Da die Erythronsäure nur im Gemisch mit den Threonsäuren bestimmt wurde, liegt hier keine geeignete Methode zur Quantifizierung der Erythronsäure im Serum vor.

Obwohl die Erythronsäure bereits in mehreren Arbeiten quantifiziert wurde, fehlt bisher eine richtige Methode zu deren Bestimmung, da diesen Arbeiten entweder ein interner Standard (BULTITUDE UND NEWHAM, 1975, HARDING ET AL., 1999) oder die entsprechende Eichkurve fehlt (THOMPSON ET AL., 1975, SHIGEMATSU ET AL., 1988, HARDING ET AL., 1999). Somit ist es in der hier vorliegenden Arbeit zum ersten Mal gelungen, eine Methode zur Quantifizierung der Erythronsäure im Serum zu entwickeln, mit dazugehörigem IST und einer Eichkurve zur Berechnung der Erythronsäurekonzentrationen aus den in der GC-MS-Analyse erhaltenen Ergebnissen.

Abschließend kann man davon ausgehen, dass Glykierungsprodukte bei Diabetikern signifikant erhöht sind. Dies erstreckt sich nicht nur auf die bekannteren AGE-Produkte, sondern auch auf die Produkte oxidativer Spaltung wie CML und Erythronsäure. Unterschiedlich ist dabei das Ausmaß der Erhöhung, die wesentlich von der untersuchten Einzelsubstanz (CML, Erythronsäure, Pentosidin...), der verwendeten Methode (GC-MS, HPLC, ELISA...) und dem Untersuchungsmaterial (Serum, Urin, Gewebe...) abhängig ist. Unklar ist aber weiterhin, ob als Ursache nur die Hyperglykämie oder der sog. oxidative Stress oder eine Kombination aus beidem in Frage kommt (siehe auch 4.6 und 4.7). Wahrscheinlich ist, dass Hyperglykämie und oxidativer Stress gemeinsam an der vermehrten Bildung der Erythronsäure bei Diabetikern beteiligt sind, die Hyperglykämie aber die dominierende Rolle spielt.

4.3 Diabetestyp

Bei der Untersuchung des Diabetestyps im Rahmen dieser Arbeit fand sich keine signifikante Korrelation zu der gemessenen Erythronsäurekonzentration. Aus den verwendeten Studien ergibt sich ebenfalls kein Hinweis auf einen Unterschied bei der Menge der Glykierungsprodukte und dem Diabetestyp. In der Regel werden bei den Untersuchungen Diabetiker allgemein und Nicht-Diabetiker verglichen (KNECHT ET AL., 1991, ODETTI ET AL., 1992, SCHLEICHER ET AL., 1997), häufig wurden aber nur Typ I-Diabetiker untersucht (MCCANCE ET AL., 1993, BEISSWENGER ET AL.,

1995, BERG ET AL., 1998). Nur in der Arbeit von Sell und seinen Mitarbeitern wurden die in der glomerulären Basalmembran erhöhten Pentosidinwerte mit dem Diabetestyp korreliert. Dabei zeigte sich keine Abhängigkeit vom Diabetestyp (SELL ET AL., 1993). Dies erscheint auch verständlich, da den verschiedenen Diabetestypen zwar unterschiedliche Entstehungsmechanismen zugrundeliegen, die aber alle zu den gleichen Stoffwechseleränderungen führen. Dass diese beim insulinpflichtigen Diabetiker in jüngeren Jahren auftreten als beim Typ II-Diabetiker, liegt an dem deutlich niedrigeren Manifestationsalter der Erkrankung bei Typ I-Diabetikern. Wichtiger als der Diabetestyp erscheint daher die Diabetesdauer und die Einstellung des Diabetes, da mit zunehmender Krankheitsdauer auch die Wahrscheinlichkeit von Spätkomplikationen steigt und die Diabeteseinstellung ebenfalls das Auftreten von Spätfolgen beeinflusst.

4.4 Diabetesdauer

Wie bereits im vorigen Abschnitt erwähnt, kann die Diabetesdauer bei der Bildung von Glykierungsprodukten neben anderen Faktoren eine Rolle spielen. In der Ergebnisauswertung dieser Arbeit findet sich jedoch kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Erythronsäurekonzentration im Serum der Diabetiker und der Diabetesdauer. Bezüglich anderer Glykierungsprodukte gibt es inzwischen jedoch einige Arbeiten, die erhöhte Mengen von CML mit zunehmendem Alter nachgewiesen haben (DUNN ET AL., 1991, SCHLEICHER ET AL., 1997).

Bei der Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Diabetesdauer und einer Erhöhung der Glykierungsprodukte konnten zwei Forschungsgruppen bei der Quantifizierung von CML im Serum von Diabetikern keine Korrelation mit der Diabetesdauer aufzeigen (SCHLEICHER ET AL., 1997, BERG ET AL., 1998). Ebenso konnte bei der Bestimmung von Fruktoselysin in Hautkollagen kein signifikanter Unterschied mit zunehmender Krankheitsdauer nachgewiesen werden (DYER ET AL., 1991A). Andererseits fanden Beisswenger et al. eine signifikante lineare Erhöhung von AGE-Produkten in Hautkollagen von Diabetikern mit zunehmender Diabetesdauer. Dies wurde mit Hilfe eines Immunassays mit einem polyklonalen Antiserum, standardisiert auf glykiertes Rinderserumalbumin nachgewiesen (BEISSWENGER ET AL., 1995).

Insgesamt liegen zu wenig Untersuchungen vor, die die Rolle der Diabetesdauer bezüglich der Bildung von Glykierungsprodukten untersucht haben, so dass keine

endgültige Aussage gemacht werden kann. Dabei ist aber anzunehmen, dass die Menge von Glykierungsprodukten im Serum nicht von der Diabetesdauer abhängig ist, da dort nur kurzlebige Proteine zu finden sind. Das HbA_{1c} als bekanntestes Glykierungsprodukt im Serum akkumuliert auch nicht in Abhängigkeit von der Diabetesdauer, sondern in Abhängigkeit von der Diabeteseinstellung eines relativ kurzen Zeitraumes (2-3 Monate), der der „Lebenszeit“ des Hämoglobins entspricht. Bei der Quantifizierung von Glykierungsprodukten im Gewebe, die zur Ausbildung von Crosslinks führen und sich mit zunehmendem Alter anreichern, kann durchaus eine signifikante Korrelation mit der Diabetesdauer möglich sein, da es im Erkrankungsverlauf immer wieder zu Hyperglykämien kommt, die die Bildung der Glykierungsprodukte fördern. Dabei spielt die Güte der Diabeteseinstellung sicherlich eine entscheidende Rolle (LYONS ET AL., 1991, BEISSWENGER ET AL., 1995).

4.5 Diabetische Spätschäden

4.5.1 Nephropathie

Bei der Auswertung fand sich keine Korrelation zwischen der Erythronsäurekonzentration im Serum und dem Fehlen oder Vorhandensein einer Nephropathie bei den untersuchten Diabetikern. Bei der Untersuchung der verschiedenen Stadien der Nephropathie zeigte die durchgeführte Varianzanalyse keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Erythronsäurekonzentration, wobei diese durch die in Kapitel 3.2.4.1 genannten Punkte auch nicht verwertbar ist.

McCance et al. konnten bei Typ I-Diabetikern mit Mikro- oder Makroalbuminurie signifikant erhöhte Werte an Fruktoselysin, CML und Pentosidin in Hautkollagen nachweisen, verglichen mit den Ergebnissen der nierengesunden Diabetiker (MCCANCE ET AL., 1993). Ohne die Ergebnisse der wenigen Patienten mit Makroalbuminurie zeigten die Patienten mit Mikroalbuminurie weiterhin signifikant erhöhte Werte von CML und Pentosidin verglichen mit den Diabetikern mit normaler Albuminausscheidung, die Konzentration an Fruktoselysin war jedoch nicht mehr signifikant erhöht. Betrachtete man dagegen nur die Patienten mit Mikro- und Makroalbuminurie, so fand sich keine signifikante Korrelation der Glykierungsprodukte im Hautkollagen mit der Albuminausscheidung im 24-Stunden-Urin (MCCANCE ET AL., 1993).

Beisswenger et al. fanden kurze Zeit später mit Hilfe eines Immunassays mit polyklonalem Antikörper, standardisiert auf Rinderserumalbumin, eine hochsignifikante

positive Korrelation von AGE-Produkten in Hautkollagen bei Diabetikern mit normaler Albuminausscheidung und solchen mit Mikro- und Makroalbuminurie. Dabei waren die Ergebnisse hochsignifikant über alle Gruppen hinweg und zwischen den drei Gruppen. Interessanterweise fand sich hier aber im Vergleich zu der Studie von McCance auch eine signifikante Korrelation von AGE-Produkten in Hautkollagen und der Albuminausscheidung in einem Stadium, bevor eine manifeste Mikroalbuminurie eingetreten war, was aber nicht für Pentosidin in Hautkollagen galt (BEISSWENGER ET AL., 1995).

Dass die Menge von AGE-Produkten mit dem Schweregrad der Gewebeschädigung in der mesangialen Matrix korreliert, konnte Sakai und seine Mitarbeiter feststellen, die einen von Mäusen stammenden monoklonalen Anti-AGE-Antikörper benutzten (SAKAI ET AL., 1996). Bei der Untersuchung von Normalpersonen, Diabetikern und Dialysepatienten fand Papanastasiou eine signifikante Erhöhung von AGE-Produkten (Immunassay mit Antikörpern gegen glykiertes Rinderserumalbumin) im Serum von Diabetikern mit normaler Nierenfunktion, verglichen mit Normalpersonen. Noch höhere Werte wurden bei Dialysepatienten nachgewiesen, unabhängig davon, ob diese Diabetiker oder Nicht-Diabetiker waren (PAPANASTASIOU ET AL., 1994).

Man nimmt an, dass erhöhte Blutzuckerspiegel bei beginnender Nephropathie die Bildung der AGE-Produkte beschleunigen und deren Akkumulation im Nierengewebe verstärken können (MAKITA, 1995, SUGIYAMA ET AL., 1996). Eine zusätzliche Verschlechterung der Nierenfunktion kann diese Akkumulation noch verstärken und zu einer schnelleren Zunahme von Nierenläsionen führen. Man findet AGE-Produkte vermehrt im verbreiterten Mesangium, Gefäßwänden und sklerosierten Glomeruli (MAKINO ET AL., 1996, SUGIYAMA ET AL., 1996). Auch Pentosidin wurde im Gewebe und Serum urämischer Patienten in erhöhter Menge nachgewiesen (SELL UND MONNIER, 1990, TAKAHASHI ET AL., 1993B).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch der Zusammenhang zwischen dem HbA_{1c} und dem Vorhandensein bzw. Fehlen der Nephropathie bei den Diabetikern untersucht. Dabei zeigte sich keine Korrelation. Dies zeigt nur, dass nicht unbedingt mit einer Erythronsäureerhöhung bei den hier gemessenen nierengeschädigten Diabetikern gerechnet werden kann. Es lässt sich jedoch nicht ausschließen, dass bei einem anderen Patientenkollektiv eine Korrelation zwischen dem HbA_{1c} und der Nierenschädigung der Diabetiker vorhanden ist, was in weiteren Studien zu untersuchen

wäre. Möglicherweise besteht auch eine Korrelation bezüglich der Serumkonzentration von Glukoxidationsprodukten und der Nierenfunktion der Diabetiker, die nur mit den an dieser Studie teilnehmenden Personen nicht gezeigt werden konnte. Welche Rolle dem oxidativen Stress bei der Entwicklung der Nephropathie neben der Hyperglykämie zukommt, ist ebenfalls noch nicht abschließend geklärt, da sich dieser nicht anhand eines normalen Laborparameters feststellen lässt.

Eine erhöhte Serumkonzentration von Glykierungsprodukten bei Diabetikern mit vorhandener Nephropathie verglichen mit nierengesunden Diabetikern wurde in den verwendeten Studien jedoch nie beschrieben oder untersucht, so dass keine gesicherte Aussage darüber gemacht werden kann, ob im Serum von Diabetikern mit einer Mikro- oder Makroalbuminurie die Konzentration von Glykierungsprodukten erhöht ist gegenüber nierengesunden Diabetikern oder nicht. Da die Nephropathie ein sich schleichend verschlechternder Prozess ist, müssen die Glykierungsprodukte im Serum nicht unbedingt linear mit dem Schweregrad der Nephropathie ansteigen. Aufgrund der mangelnden Ausscheidung kommt es jedoch bei fortschreitender Verschlechterung der Nierenfunktion nachweislich zu einer verminderten Ausscheidung von Glykierungsprodukten und vermutlich über eine Erhöhung des oxidativen Stresses auch zu deren vermehrter Bildung (ODETTI ET AL., 1992). Dass Glykierungsprodukte bei Dialysepflichtigkeit deutlich erhöht sind, steht dabei außer Frage, da hier u.a. die Ausscheidung der AGE-Produkte und ihrer Vorstufen fast vollständig zum Erliegen kommt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bereits mehrfach eine signifikante Korrelation von gewebsgebundenen Glykierungsprodukten bei Diabetikern mit vorhandener bzw. nicht vorhandener Nephropathie nachgewiesen wurde (MCCANCE ET AL., 1993, BEISSWENGER ET AL., 1995), dieser Nachweis bei AGE- bzw. Glukoxidationsprodukten im Serum bisher jedoch aussteht. Dabei ist ebenfalls nicht geklärt, ob deren Erhöhung durch die diabetische Stoffwechsellage allein oder durch eine Zunahme des oxidativen Stresses bedingt ist.

4.5.2 Retinopathie

Die Serumkonzentrationen der Erythronsäure zeigen nach Auswertung der Patientendaten keine Korrelation mit dem Fehlen oder Vorhandensein einer Retinopathie bei den untersuchten Diabetikern. Auch bei der Untersuchung der verschiedenen Retinopathiegrade zeigte sich kein signifikanter Unterschied, wobei allerdings auch die

Patientenzahlen im Stadium II bis IV der Retinopathie mit insgesamt 16 zu gering sind, um ein aussagefähiges Ergebnis zu erhalten.

Wie bei der Nephropathie, so wurde auch hier ein möglicher Zusammenhang zwischen dem HbA_{1c} und dem Vorhandensein bzw. Fehlen der Retinopathie bei Diabetikern untersucht. Dabei zeigte sich keine Signifikanz. Auch hier ist nicht auszuschließen, dass bei einem anderen Patientenkollektiv, insbesondere bei einer größeren Anzahl von Patienten mit ausgeprägteren Augenschäden eine positive Korrelation vorhanden ist. Sicherlich muss auch hier noch geprüft werden, welche Rolle der oxidative Stress in der Pathogenese der Retinopathie spielt.

Bei den Untersuchungsergebnissen anderer Studien fanden sich keine vergleichbaren Messungen von Glykierungsprodukten oder Glukoxidationsprodukten im Serum von Diabetikern, die auf einen Zusammenhang bezüglich der Retinopathie untersucht worden waren. Die folgenden Studien untersuchten Hautkollagen auf verschiedene Glykierungsprodukte hin und kamen zu einem übereinstimmenden Ergebnis. Monnier et al. fanden eine positive Korrelation zwischen Pentosidinwerten und dem Schweregrad der Retinopathie (MONNIER ET AL., 1992). McCance et al. konnten erhöhte Werte an Fruktoselysin, CML und Pentosidin nachweisen, die mit dem Schweregrad der Retinopathie korrelierten (keine Retinopathie verglichen mit nicht-proliferativer und proliferative Retinopathie) (MCCANCE ET AL., 1993). Ähnlich wie McCance fanden auch Beisswenger et al. eine hochsignifikante Korrelation von AGE-Produkten (Immunassay mit polyklonalem Antiserums, standardisiert auf glykiertes Rinderserumalbumin) im Hautgewebe mit den eben genannten Schweregraden der Retinopathie (BEISSWENGER ET AL., 1995).

Die genannten Studienergebnisse zeigen, dass ein Zusammenhang zwischen der Menge an gewebegebundenen Glykierungsprodukten und den Spätkomplikationen des Diabetes sehr wahrscheinlich ist. Ob dieses Ergebnis aber auch auf Untersuchungen zu Glukoxidationsprodukten im Serum übertragbar ist, sei dahingestellt. Auch hier ist anzunehmen, was bei den Untersuchungen zu Alter und Diabetesdauer bereits genannt wurde, nämlich dass die kurzlebigen Serumproteine nicht die über Jahre entstandenen Gewebeverhältnisse widerspiegeln müssen. Ein direkter Zusammenhang zwischen dem Grad der Retinopathie und der Erythronsäurekonzentration im Serum ist daher weniger wahrscheinlich, als ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Grad der Nephropathie und der Erythronsäurekonzentration im Serum, da die Nierenfunktion über die Ausscheidung die Konzentration der Blutbestandteile be-

einflusst. Erythronsäurekonzentrationen im Hautkollagen wurden zwar noch nicht untersucht, erhöhte Werte bei diabetischen Augenschäden sind aber durchaus möglich.

4.5.3 Hypertonie und/oder pAVK

Im Rahmen dieser Arbeit zeigt sich nach Auswertung der Erythronsäurekonzentrationen bei Patienten mit einer Makroangiopathie im Sinne einer arteriellen Hypertonie und/oder peripheren arteriellen Verschlusskrankheit kein signifikanter Zusammenhang. Dies ist auch verständlich, da die Entwicklung einer Makroangiopathie einen jahrelangen Prozess darstellt, der nicht durch den aktuellen Serumwert der Erythronsäure repräsentiert wird. Wie auch bei der Retinopathie und Nephropathie wäre es aber durchaus möglich, dass ein Zusammenhang zwischen der gewebegebundenen Erythronsäure und dem Vorhandensein einer Makroangiopathie besteht. Ob dies allerdings auch für die entsprechenden Serumwerte der Glykierungsprodukte gilt, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden.

Man nimmt an, dass erhöhte Pentosidinwerte in Plasmaproteinen bei Diabetikern und Urämikern ein Faktor bei der Entwicklung der Arteriosklerose ist. Dabei kommt es durch die verstärkte Bildung von Glykierungsprodukten und deren Crosslinks zu einer Beschleunigung arteriosklerotischer Gefäßveränderungen (BROWNLEE, 1992). CML und Pentosidin korrelierten bei McCance et al. mit dem systolischen Blutdruck, doch nach Alterskorrektur der Werte fanden sich keine signifikanten Unterschiede (MCCANCE ET AL., 1993). Da die Makroangiopathie diabetesunspezifisch ist, standen die diabetesspezifische Nephro- und Retinopathie bisher im Mittelpunkt der Forschungsbemühungen. Eine genaue Abklärung der Zusammenhänge zwischen Glykierungsprodukten und der Makroangiopathie steht also ebenfalls noch aus.

4.6 HbA_{1c}

Das HbA_{1c} ist ein Glykierungsprodukt, das einem Fließgleichgewicht zwischen Bildung und Abbau unterliegt. In der Klinik ist es der wichtigste Parameter zur Kontrolle der mittelfristigen Blutzuckereinstellung. Es akkumuliert aber nicht über die Jahre sondern ändert sich in Abhängigkeit der Lebenszeit der Erythrozyten (ca. 120 Tage), in denen das glykierte Hämoglobin zu finden ist.

Bei der Auswertung der Ergebnisse dieser Arbeit zeigte sich weder in dem t-Test für unverbundene Stichproben noch in der Korrelationsanalyse ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Höhe des HbA_{1c} der Diabetiker und der gemessenen Erythronsäurekonzentration.

Zu dem gleichen Schluss kommen auch bis auf wenige Ausnahmen die Untersuchungsergebnisse anderer Studien, die Glykierungsprodukte in Serum, Urin und Hautkollagen untersucht haben. So war die Menge an Plasmapentosidin bei Diabetikern nicht mit dem HbA_{1c} assoziiert (MONNIER ET AL., 1992). Berg und seine Mitarbeiter konnten bei der Quantifizierung von CML im Serum von Typ I-Diabetikern ebenfalls keinen Zusammenhang mit dem HbA_{1c} nachweisen (BERG ET AL., 1998). Auch bei der Bestimmung von CML im Urin von Diabetikern und Kontrollpersonen zeigte sich keine Korrelation mit dem glykierten Hämoglobin (KNECHT ET AL., 1991). McCance fand keine Korrelation zwischen der Höhe des HbA_{1c} und der Retinopathie bei der Bestimmung von CML in Hautkollagen von Diabetikern, obwohl er eine Signifikanz zwischen CML und den verschiedenen Stadien der Retinopathie nachweisen konnte (MCCANCE ET AL., 1993).

Die Meinungen sind aber nicht einheitlich. Die Forschungsgruppe um Baynes führte einen Versuch durch, in dem Fruktoselysin, Pentosidin und CML in Hautkollagen von Typ I-Diabetikern bestimmt wurden und nach vier Monaten intensivierter Insulintherapie nochmals gemessen wurden. Dabei zeigte sich zu Beginn der Studie eine signifikante Korrelation zwischen der Menge des glykierten Kollagens und dem HbA_{1c}. Am Ende der Studie konnte ein signifikanter HbA_{1c}-Abfall nachgewiesen werden, sowie ein signifikanter Abfall des Glykierungsprodukts Fruktoselysin, jedoch keine Änderung der Pentosidin- und CML-Werte im Hautkollagen (LYONS ET AL., 1991).

In einer Arbeit von Beisswenger wurden AGE-Produkte im Hautkollagen (ELISA mit polyklonalem Antikörper, standardisiert auf Rinderalbumin) von gut, mäßig und schlecht eingestellten Diabetikern gemessen, die anhand ihres HbA_{1c} einer Diabetikergruppe zugeordnet wurden. Nach ein und drei Jahren konstanter Diabeteseinstellung (gut, mäßig, schlecht) wiesen die gut und mäßig eingestellten Diabetiker signifikant weniger AGE-Produkte im Hautkollagen auf, als die schlecht eingestellten Patienten (BEISSWENGER ET AL., 1995). In einer Studie fand sich bei der Untersuchung von CML im Serum von 29 Diabetikern eine leichte positive Korrelation mit dem HbA_{1c} (SCHLEICHER ET AL., 1997).

Tierversuche mit diabetischen Ratten unterschiedlicher Diabeteseinstellung zeigten eine signifikant exponentielle Zunahme der Kollagenpentosidine nach sechsmonatiger schlechter Diabeteseinstellung (gemessen am HbA_{1c}), während die gut eingestellten Ratten nur einen leichten Pentosidanstieg im Kollagen zu verzeichnen hatten (ODETTI ET AL., 1996). Das HbA_{1c} zeigte zwar einen deutlichen, jedoch nicht exponentiellen Anstieg wie das Pentosidin, was mit dem vorhandenen Sättigungsgleichgewicht der Amadoriprodukte erklärt, wodurch das HbA_{1c} einen Gesamtwert von 15% meist nicht überschreitet. Pentosidin und andere Glykierungsprodukte haben entweder gar kein Sättigungsgleichgewicht oder eines, das deutlich über dem des Hämoglobins liegt (ODETTI ET AL., 1996). Ob dieser Tierversuch aber auf den Menschen übertragen werden kann, muss sich erst noch in weiteren Untersuchungen zeigen.

Zusammenfassend konnten die meisten Studien keine Signifikanz zwischen der Menge an Glykierungsprodukten und dem HbA_{1c} nachweisen. Die Arbeiten von Beisswenger und Schleicher zeigten eine grenzwertige Korrelation zwischen den beiden Faktoren. Eine eindeutige Signifikanz konnte erst nach längerer gleichmäßig guter, mäßiger bzw. schlechter Diabeteseinstellung belegt werden (BEISSWENGER ET AL., 1995). Man kann also davon ausgehen, dass einmal gebildete Glykierungsprodukte durch spätere bessere Diabeteseinstellung nicht abgebaut werden, aber eine weitere Zunahme derselben verhindert oder zumindest vermindert wird (LYONS ET AL., 1991). Dies gilt in erster Linie für Untersuchungen von Gewebe wie Hautkollagen mit seinen langlebigen Proteinen. Bei der Untersuchung von Serum auf Glykierungsprodukte ist eine Korrelation mit dem HbA_{1c} durchaus vorstellbar, da dessen Bildung wie auch die Bildung der Glykierungsprodukte langsam erfolgt und nicht den starken Schwankungen des Blutzuckers folgt, beide Substanzen als Serumbestandteile aber auch nicht unbegrenzt Zeit im Serum verbleiben.

4.7 Blutglukose

Anhand der Untersuchungsergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche konnte kein Einfluss des aktuellen Blutzuckerspiegels auf die Erythronsäurekonzentration im Serum gezeigt werden. Dies wird auch von anderen Arbeiten bestätigt, die diesen Zusammenhang beleuchtet haben. So findet sich bei der Messung von AGE-Produkten im Serum von Gesunden, Diabetikern und Dialysepatienten keine Korrelation mit dem aktuellen Blutzucker (PAPANASTASIOU ET AL., 1994).

Ebenso zeigt die Bestimmung von Pentosidin und CML in Hautkollagen keine signifikante Korrelation mit den gemessenen Blutzuckerwerten (LYONS ET AL., 1991). Dies erscheint logisch, da der aktuelle Blutzucker innerhalb weniger Stunden extremen Schwankungen durch Nahrungsaufnahme und Nahrungskarenz unterliegt und damit nur eine kurzfristige Momentaufnahme darstellt.

Trotzdem sind längerfristig erhöhte Blutzuckerwerte bei der Bildung von Glykierungsprodukten wie der Erythronsäure von essentieller Bedeutung, weil sie über eine vermehrte Glykierung und damit erhöhten Bildung von Amadoriprodukten zu einer steigenden Erythronsäurebildung führen. Die langsame Erythronsäurebildung läuft aber nicht parallel bei erhöhten Blutzuckerspiegeln ab, sondern immer verzögert. Die starken tageszeitlichen Schwankungen des Blutzuckers lassen daher keinen direkten Rückschluss auf die Höhe der Erythronsäurekonzentration zu. Zudem kann bei verbesserter Stoffwechseleinstellung die Blutglukose deutlich schneller abgesenkt werden, als dies bei der Erythronsäure im Serum möglich ist. Lyons et al. konnte in seiner Arbeit nachweisen, dass der einmal durch die Glykierung von Gewebsproteinen gesetzte Schaden durch eine verbesserte Diabeteseinstellung nicht voll reversibel ist, aber limitiert werden kann (LYONS ET AL., 1991). Sollten andere Untersuchungen eine Signifikanz zwischen der Erythronsäurekonzentration im Serum und der Blutglukose nachweisen, dann am ehesten deshalb, weil Patienten mit schlechter Diabeteseinstellung generell höhere Blutzuckerwerte und evtl. auch höhere Erythronsäurewerte im Serum aufweisen können als Patienten mit guter Diabeteseinstellung.

4.8 Dialyse

Man kann davon ausgehen, dass die Erythronsäure als wasserlösliche Substanz über die Niere ausgeschieden wird. Schon Ahmed et al. konnten CML und Erythronsäure als physiologische Bestandteile des Urins nachweisen (AHMED ET AL., 1988). Später wurde die Erythronsäure auch im Urin diabetischer Hunde und bei an Diabetes erkrankten Menschen in signifikant erhöhter Menge nachgewiesen werden (SHIGEMATSU ET AL., 1988). Bestätigt wurde dies durch die Ergebnisse von Knecht und seinen Mitarbeitern, die eine signifikante Erhöhung von CML im Urin von Diabetikern feststellten, jedoch keine CML-Erhöhung mit zunehmendem Alter nachweisen konnten (KNECHT ET AL., 1991). Eine Studiengruppe konnte sogar eine signifikante Korrelation von AGE-Produkten im Serum und dem Kreatinin nachweisen (PAPA-

NASTASIOU ET AL., 1994). Der Nachweis höchster Mengen an AGE-Produkten und Glukoxidationsprodukten gelang zwischenzeitlich bei der Untersuchung von Dialysepatienten unabhängig davon, ob diese Diabetiker oder Nicht-Diabetiker waren (PAPANASTASIOU ET AL., 1994, TAKAHASHI ET AL., 1993B, DEGENHARDT ET AL., 1997). Es ist noch nicht vollständig geklärt, ob hier neben der fehlenden Ausscheidungsfunktion der Nieren nicht auch andere Faktoren wie oxidativer Stress eine führende Rolle spielen (ODETTI ET AL., 1992).

Bei der Auswertung der Erythronsäurekonzentrationen im Serum von Dialysepatienten fallen deutlich erhöhte Ergebnisse verglichen mit denen der Normalpersonen und Diabetikern auf. Vor Dialyse ist die Erythronsäurekonzentration 5,8 mal höher als bei den Diabetikern und selbst nach Dialyse ist sie noch um den Faktor 2,4 höher. Ein Vergleich mit den Kontrollpersonen zeigt 8,7fach höhere Werte vor und 3,6fach höhere Werte nach Dialyse. Damit heben sich die Ergebnisse bei Dialysepatienten deutlich von denen der Kontrollpersonen und Diabetikern ab. Die Dialyse führt dabei zu einem durchschnittlichen Abfall der Erythronsäurekonzentration um ca. 60%.

Dies bestätigt die Ergebnisse vieler anderer Studien, die AGE-Produkte allgemein oder Pentosidin und CML im Speziellen in deutlich erhöhtem Ausmaß bei Dialysepatienten nachgewiesen haben. Papanastasiou et al. wiesen vor Dialyse fast vierfach erhöhte Konzentrationen von AGE-Produkten im Serum nach gegenüber Normalpersonen und eine Reduktion um ca. ein Drittel bis zur Hälfte während der Dialyse. Ein signifikanter Unterschied zwischen den diabetischen und den nichtdiabetischen Dialysepatienten, sowie zwischen Hämo- und Peritonealdialyse konnte nicht nachgewiesen werden (PAPANASTASIOU ET AL., 1994). Auch ein Vergleich von Patienten mit unbehandeltem Nierenversagen und Dialysepatienten zeigte keinen signifikanten Unterschied in der gemessenen Konzentration der AGE-Produkte im Serum (PAPANASTASIOU ET AL., 1994).

Bei der Bestimmung von Pentosidin im Plasma fand Odetti et al. sogar 23fach erhöhte Werte bei Dialysepatienten verglichen mit den Kontrollpersonen (ODETTI ET AL., 1992). Ähnliche Ergebnisse konnte Takahashi et al. nachweisen mit rund 16fach erhöhten Pentosidinwerten im Serum von Dialysepatienten gegenüber Gesunden. Wie Papanastasiou et al. konnte er keinen signifikanten Unterschied zwischen diabetischen und nichtdiabetischen Dialysepatienten finden. Während Takahashi eine positive Korrelation zwischen der Pentosidinmenge und dem Alter bei Diabetikern

feststellte, war dies bei den Dialysepatienten nicht möglich (PAPANASTASIOU ET AL., 1994, TAKAHASHI ET AL., 1993B).

Bei der Untersuchung von CML im Serum von Dialysepatienten wies Schleicher et al. 1997 zwei- bis dreifach erhöhte Konzentrationen an Carboxymethyllysin nach und fast zeitgleich konnten Mitarbeiter von Baynes dreifach höhere CML-Werte im Serum von Dialysepatienten bestimmen (SCHLEICHER ET AL., 1997, DEGENHARDT ET AL., 1997). Wie bei Papanastasiou et al. war kein signifikanter Unterschied bei Peritoneal- und Hämodialysepatienten vorhanden (PAPANASTASIOU ET AL., 1994, DEGENHARDT ET AL., 1997). Mahiout et al. fanden bei längerer Peritonealdialyse eine deutliche Zunahme der AGE-Produkte in der Peritonealflüssigkeit. Man nimmt an, dass AGE-Produkte in der Peritonealmembran gebildet werden und während einer längeren Dialyse ausgewaschen werden (MAHIOUT ET AL., 1996). Im Gegensatz zu Papanastasiou und Degenhardt wurden in einer Studie von Friedlander et al. niedrigere Pentosidinwerte im Serum von Peritonealdialysepatienten nachgewiesen als in dem der Hämodialysepatienten (PAPANASTASIOU ET AL., 1994, DEGENHARDT ET AL., 1997, FRIEDLANDER ET AL., 1996).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass alle Glykierungsprodukte, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß, im Serum von Dialysepatienten deutlich erhöht sind, unabhängig davon, ob die Dialysepatienten Diabetiker oder Nicht-Diabetiker sind (PAPANASTASIOU ET AL., 1994, TAKAHASHI ET AL., 1993B). Daraus lässt sich schließen, dass die Hyperglykämie ein Hauptfaktor bei der Entstehung von Glykierungsprodukten bei Diabetikern und Dialysepatienten ist. Bei den Dialysepatienten scheint jedoch der oxidative Stress eine zentrale Rolle zu spielen, da hier kein signifikanter Unterschied zwischen diabetischen und nichtdiabetischen Patienten nachgewiesen wurde (WADA ET AL., 1999).

Bei Dialysepatienten muss von anderen Ursachen ausgegangen werden. Dabei spielen zwei Faktoren eine wesentliche Rolle. Zum einen nimmt man an, dass die Erhöhung der AGE- oder Glukoxidationsprodukte auf deren verminderte oder erloschene Ausscheidung wie auch ihrer Vorstufen zurückzuführen ist. Zum anderen spielt der bei der Urämie deutlich erhöhte oxidative Stress eine zentrale Rolle (ODETTI ET AL., 1992). Man nimmt an, dass in der Urämie die wachsende Menge von Carbonylgruppen aus Kohlenhydraten und Lipiden zu einer gesteigerten Bildung von AGE-Produkten führt (sog. Carbonyl stress) (WADA ET AL., 1999). Der in der Urämie deutlich erhöhte Anteil von reaktiven oxidativen Substanzen führt somit zu

einer verstärkten Bildung der Erythronsäure und anderer Glukoxidationsprodukte und ihrer Vorstufen. Da die Erythronsäure zu den wasserlöslichen Substanzen zählt, wird sie über die Nieren ausgeschieden. Da dies in der Urämie wiederum nicht oder nur eingeschränkt möglich ist, entsteht hier ein sog. Circulus vitiosus mit weiterer Erhöhung der reaktiven Substanzen und Zunahme der Erythronsäure.

4.9 Oxidativer Stress

Oxidativer Stress ist wie in Kapitel 1.4.1 beschrieben, ein Missverhältnis zwischen oxidativen und antioxidativen Faktoren. Ein Überwiegen oxidativer Substanzen führt über die Veränderung von Molekülen zu den unterschiedlichsten Zell- und Gewebeschäden sowie zu Funktionsstörungen, die pathologische Veränderungen bewirken (BAYNES, 1991).

In der hier vorliegenden Arbeit wurde der oxidative Stress im eigentlichen Sinne nicht gemessen. Die Erythronsäure entsteht aber durch oxidative Spaltung von Fruktose-lysin in der Glukoxidation, einer Reaktion, die ohne Sauerstoff nicht möglich ist (AHMED ET AL., 1985, FU ET AL., 1992). Es fällt auf, dass die Erythronsäurekonzentrationen bei den Diabetikern gegenüber den Kontrollpersonen deutlich erhöht sind und dass die Ergebnisse der Dialysepatienten noch um ein Vielfaches höher liegen als bei den Diabetikern. Vor allem das Ergebnis der Dialyseproben lässt sich nicht mehr allein mit einer erhöhten Bildung von Glukose im Rahmen der Hyperglykämie erklären, da sich in der Literatur kein Unterschied zwischen den Glykierungsprodukten diabetischer und nichtdiabetischer Dialysepatienten zeigt (PAPANASTASIOU ET AL., 1994, TAKAHASHI ET AL., 1993B). Neben einer verminderten Ausscheidungsfunktion der nierengängigen Substanzen spielt der oxidative Stress vielleicht sogar die zentrale Rolle bei der Bildung der Glykierungsprodukte bei Dialysepatienten.

Ergebnisse anderer Studien zeigen, dass bei der Bildung von Glykierungsprodukten auch eine deutliche Erhöhung der freien Radikale vorliegt (MULLARKEY ET AL., 1990). Die Anwesenheit von antioxidativen Faktoren wie Vitamin E, Katalase und Superoxiddismutase führte zu einer deutlich verminderten CML-Bildung (SCHLEICHER ET AL., 1997). Weiter wurden in vivo signifikant erhöhte Wasserstoffperoxidwerte im Serum schlecht eingestellter Diabetiker nachweisen, die nach intensivierter Insulintherapie rückläufig, aber verglichen mit den Nicht-Diabetikern immer noch erhöht waren (WIERUSZ-WYSOCKA ET AL., 1995). Es erscheint wahr-

scheinlich, dass CML in erhöhter Menge in entzündetem Gewebe zu finden ist, da dort die Menge an freien Radikalen und reaktiven Metaboliten erhöht ist (AHMED ET AL., 1985) und durch die Interaktion der AGE-spezifischen Zellrezeptoren der erhöhte oxidative Stress zur vermehrten Chemotaxis von Entzündungszellen kommt (YAN ET AL., 1994).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass oxidativer Stress im Rahmen der Hyperglykämien bei Diabetikern auftritt und als sog. carbonyl stress bei Dialysepatienten. Dies führt zu einer Erhöhung der Glykierungsprodukte im Serum und zu deren Akkumulation in langlebigen Gewebsproteinen, was v.a. bei Diabetikern und Dialysepatienten zu über der Norm liegenden Werten führt. Der Anteil des oxidativen Stresses am Gesamtergebnis der Glykierungsprodukte ist bisher aber nicht bekannt. Individuelle Varianten des oxidativen Stresses können die Folgen der Hyperglykämie verändern und damit ansatzweise erklären, weshalb die Beziehung zwischen Diabeseinstellung und Folgeschäden nicht so einfach ist (MCCANCE ET AL., 1993).

Während Glykierungsprodukte wie CML und Pentosidin nicht nur aus Glukose, sondern auch aus anderen Zuckern entstehen und auch über mehrere Reaktionswege gebildet werden kann (z.B. Glukoxidation, Lipidperoxidation), wird die Erythronsäure nur über den in dieser Arbeit beschriebenen endogenen Reaktionsweg gebildet und evtl. über die Nahrungsaufnahme exogen zugeführt. Nachdem CML als endogener Biomarker für oxidativen Stress angesehen werden kann, könnte dies also auch für die Erythronsäure gelten.

4.10 Exogene Zufuhr

Die Erythronsäure wird auch bei der Zubereitung von Lebensmitteln gebildet, wenn dabei eine Bräunung auftritt. Bei den im Verlauf dieser Arbeit durchgeführten Versuchen wurden Bier, Cola, Bratensaft und Glukoselösung erhitzt und die Erythronsäure bestimmt. In Cola und Bratensaft fand sich keine nachweisbare Erythronsäure, während in Bier und Bratensaft Spuren von Erythronsäure nachgewiesen werden konnten. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob die Bildung von Erythronsäure auch durch die Zufuhr exogener Substanzen erfolgen und somit eine endogene Produktion überlagern kann.

Kapitel 5

Zusammenfassung der Ergebnisse

Anhand zahlreicher Versuche konnten zum ersten Mal zwei Methoden zur Quantifizierung der Erythronsäure im Serum etabliert werden, die einfach und kostengünstig durchführbar sind. Die Grundlage beider Methoden liegt in der Öffnung des Laktonringes im alkalischen Milieu. Nach der Probenaufarbeitung folgen Lyophilisation und Derivatisierung, bei der immer eine Silylierung erfolgt. Dabei unterscheiden sich die Aufarbeitungen nur in zwei wesentlichen Punkten. Bei der Aufarbeitung mit Diazomethan erfolgt die Öffnung des Laktonrings bei der Derivatisierung durch Zugabe von Diazomethan, das im alkalischen Milieu mit KOH-Plätzchen versehen, gelagert wird. Bei der Aufarbeitung mit Natronlauge erfolgt die Ringöffnung bereits bei der Probenaufarbeitung durch die Zugabe der Natronlauge. Danach wird die Messung im Gaschromatographen mit massenspektrometrischer Detektion durchgeführt und die erhaltenen Peaks ausgewertet.

Bei der Auswertung der Serumproben der 139 Diabetiker, 95 Kontrollpersonen und 35 Dialysepatienten zeigten sich signifikante Unterschiede im Hinblick auf die Erythronsäurekonzentration. Die Erythronsäurekonzentration ist bei Diabetikern mit $1,40 \pm 0,08 \text{ mg/l}$ ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) signifikant erhöht gegenüber den Kontrollpersonen mit $0,94 \pm 0,04 \text{ mg/l}$. Verglichen mit den Diabetikern wiesen die Dialysepatienten mit Erythronsäurekonzentrationen von $8,17 \pm 0,38 \text{ mg/l}$ vor Dialyse um den Faktor 5,8 größere Werte auf, und nach Dialyse mit $3,35 \pm 0,19 \text{ mg/l}$ immerhin noch 2,3fach höhere Werte.

Daraus lässt sich folgern, dass bei der Untersuchung von Diabetikern und Kontrollpersonen die hyperglykämische Stoffwechsellaage maßgeblich für die Bildung der

Glukoxidationsprodukte ist. Da die Glukoxidation aber auf einer oxidativen Spaltung beruht, kann man daraus auch schließen, dass die Erythronsäurebildung bei Diabetikern zum Teil auch auf einem gegenüber Nicht-Diabetikern erhöhten oxidativen Stress beruht. Unklar ist nur, in welchem Ausmaß der oxidative Stress an der Bildung der Erythronsäure beteiligt ist, bei der die Hyperglykämie mit nachfolgender Glykierung führend ist.

Die Auswertung der Ergebnisse der Dialysepatienten lässt dagegen andere Schlüsse zu. Es zeigt sich, dass eine intakte Nierenfunktion zur Eliminierung der wasserlöslichen Erythronsäure notwendig ist, da sie bei Nierenversagen nur in unzureichender Menge ausgeschieden wird und durch die Dialyse zu ca. 60 % eliminiert wird. Da in anderen Studien kein signifikanter Unterschied von Glykierungsprodukten im Serum diabetischer und nicht-diabetischer Dialysepatienten nachgewiesen werden konnte, kann man hieraus schließen, dass bei urämischen Patienten der oxidative Stress massiv erhöht ist und die Hyperglykämie nur noch eine untergeordnete Rolle spielt.

Anhand der gesammelten Patientendaten wurden Zusammenhänge zwischen der Erythronsäurekonzentration und Alter, Geschlecht, BMI, Diabetestyp, Diabetesdauer, Nephropathie, Retinopathie und Begleiterkrankungen (Hypertonie u./o. pAVK) überprüft, wobei sich keine Signifikanz nachweisen ließ. Auch die klinisch-chemischen Parameter wie HbA_{1c} und Blutglukose zeigten keine Korrelation mit der Höhe der Erythronsäure im Serum.

Ein Grund hierfür ist sicher, dass trotz der Zahl von 139 Diabetikern die untersuchten Untergruppen, wie z.B. bei den Graden der Retinopathie unterschiedlich groß sind. 95 Probanden hatten keine Retinopathie, Grad 1 fand sich bei 28, Grad 2 bei 12 und Grad 3 und 4 bei nur noch je 2 Patienten. Um eindeutige Ergebnisse zu erhalten, wären weitere Studien notwendig, die aufbauend auf den Ergebnissen dieser Arbeit ein Patientenkollektiv auswählen, das in gleichem Maß Diabetiker ohne diabetische Folgeschäden beinhaltet, wie Diabetiker mit leichten Folgeschäden (z.B. Mikroalbuminurie, nicht proliferative Retinopathie) und schweren Schädigungen (z.B. Makroalbuminurie, Niereninsuffizienz im kompensierten Stadium, proliferative Retinopathie). Am ehesten möglich erscheinen hierbei Zusammenhänge zwischen der Erythronsäurekonzentration im Serum und dem HbA_{1c}, dem Kreatinin und dem Stadium der Nephropathie. Bei signifikanten Unterschieden ließen sich die Kenntnisse über die Erythronsäure und ihren Einfluss bei Diabetikern weiter ausbauen. Da die Erythronsäure über die Nieren ausgeschieden wird, wäre in ergänzenden

Studien auch die Quantifizierung der Erythronsäure im Urin von Diabetikern und Normalpersonen interessant.

Ein direkter Vergleich der Ergebnisse aus dieser Arbeit und anderen Studien ist aufgrund der Vielzahl der gemessenen Glykierungsprodukte nur eingeschränkt möglich. Viele signifikante Ergebnisse wurden auch bei der Quantifizierung von gewebegebundenen Glykierungsprodukten erzielt, die im Gegensatz zu den an kurzlebigen Serumproteinen gebundenen Glykierungsprodukten über einen langen Zeitraum akkumulieren und damit viel nachhaltiger zu Gewebeschädigungen oder Funktionsänderungen des Gewebes führen können.

Schlussendlich könnte die Erythronsäure neben Carboxymethyllysin (insbesondere bei gleichzeitiger Bestimmung) als Marker für Glukoxidation und evtl. auch für oxidativen Stress gelten, wobei die Reaktionsträgheit der Erythronsäure von Vorteil ist und der Umstand, dass neben der exogenen Zufuhr nur der endogene Reaktionsweg über die Glukoxidation bekannt ist, während CML aus verschiedenen endogenen Reaktionen und verschiedenen Zuckern entstehen kann.

Literaturverzeichnis

Ahmed, M. U., Thorpe, S. R., Baynes, J., W. (1985): Identification of N^ε-carboxymethyllysine as a degradation product of fructoselysine in glycated protein
J. Biol. Chem. 261, 4889-4894

Ahmed, M. U., Dunn, J. A., Walla, M. D., Thorpe S. R., Baynes, J. W. (1988): Oxidative degradation of glucose adducts to protein
J. Biol. Chem. 263, 8816-8821

American Diabetes Association (1998): Consensus Development Conference on the Diagnosis of coronary heart disease in people with diabetes
Diabetes Care 21, 1551-1559

Araki, N., Ueno, N., Chakrabarti, B., Morino, Y., Horiuchi, S. (1992): Immunochemical evidence for the presence of advanced glycation end products in human lens proteins and its positive correlation with aging
J. Biol. Chem. 267, 10211-10214

Banting, F. G., Best, C. H., Collip, J. B. (1922): Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus
Can. Med. Assoc. J. 12, 141-146

Baynes, J. W. (1991): Role of oxidative stress in development of complications in diabetes
Diabetes 40, 405-412

Beck-Nielsen, H., Vaag, A., Damsbo, P., Handberg, A., Nielsen, O. H., Henriksen, J. E., Thye-Ronn, P. (1992): Insulin resistance in skeletal muscles in patients with NIDDM
Diabetes Care 15, 418-430

Beisswenger, P. J., Makita, Z., Curphey, T. J., Moore, L. L., Jean, S., Brinck-Johnsen, T., Bucala, R., Vlassara, H. (1995): Formation of immunochemical advanced glycosylation end products precedes and correlates with early manifestations of renal and retinal disease in diabetes

Diabetes 44, 824-829

Berg, T. J., Clausen, J. T., Torjesen, P. A., Dahl-Jorgensen, K., Bangstad, H.-J., Hanssen, K. F. (1998): The advanced glycation end product N^ε-(carboxymethyl)lysine is increased in serum from children and adolescents with type I diabetes

Diab. Care 21, 1997-2002

Berger, M. (1995): Symptome und klinische Zeichen bei Manifestation, 235-237
In: Diabetes mellitus

1. Auflage, Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore

Bottermann, P. (1994): Diabetes mellitus, 861 - 884

In: Classen, M., Diehl, V., Kochsiek, K.:

Innere Medizin;

3. Auflage, Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore

Brownlee, M., Cerami, A., Vlassara, H. (1988): Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications

N. Engl. J. Med. 318, 1315-1322

Brownlee, M. (1990): Advanced products of nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications, 279-292

In: Rifkin, H., Porte, D.: Diabetes mellitus theory and practice;

4. Aufl., Elsevier, New York, Amsterdam, London

Brownlee, M. (1992): Nonenzymatic glycosylation of macromolecules

Diabetes 41 [Suppl. 2], 57-60

Bucala R., Cerami A., Vlassara H.(1995): Advanced glycosylation end products in diabetic complications

Diabetes Rev. 3, 258-268

Bultitude F.W., Newham S.J. (1975): Identification of some abnormal metabolites in plasma from uremic subjects

Clin. Chem. 21, 1329-1334

Bunn, H. F., Gabbay, K. H., Gallop, P. M. (1978): The glycosylation of hemoglobin: relevance to diabetes mellitus

Science 200, 21-27

Cai, J., Hurst, H. E. (1999): Identification and quantitation of N-(Carboxymethyl)valine adduct in hemoglobin by gas chromatography/mass spectrometry

J. Mass Spectrom. 34, 537-543

Colaco, C. A. L. S., Ledesma, M. D., Harrington, C. R., Avila, J. (1996): The role of the Maillard reaction in other pathologies: Alzheimer's disease

Nephrol. Dial. Transplant. 11 [Suppl. 5], 7-12

Colaco, C. A. L. S., Harrington, C. R. (1994): Glycation: a pathological modification in neuropathies? A hypothesis

NeuroReport 5, 859-861

DahlJorgensen, K. (1998): Diabetic microangiopathy

Acta Paediatrica 87 [Suppl. 425], 31-34

The Diabetes Control and Complications Trial Research Group (1995):

The effect of intensive diabetes therapy on the development and progression of neuropathy

Ann. Intern. Med. 122, 561-568

DeFronzo, R. A., Bonadonna, R. C., Ferranini, E. (1992): Pathogenesis of NIDDM

Diabetes Care 15, 334-368

Degenhardt, T. P., Gras, L., Reddy, S., Thorpe, S. R., Diamandis, E. P., Baynes, J. W. (1997): The serum concentration of the advanced glycation end-product N^ε-(carboxymethyl)lysine is increased in uremia

Kidney Int. 52, 1064-1067

Dolhofer, R., Wieland, O. H. (1980): Increased glycosylation of serum albumin in Diabetes mellitus

Diabetes 29, 417-422

Dunn, J. A., Patrick, J. S., Thorpe, S. R., Baynes, J. W. (1989): Oxidation of glycated proteins: Age-dependent accumulation of N^ε-(carboxymethyl)lysine in lens protein

Biochemistry 28, 9464-9468

Dunn, J. A., McCance, D. R., Thorpe, S. R., Lyons, T. J., Baynes, J. W. (1991): Age-dependent accumulation of N^ε-(carboxymethyl)lysine and N^ε-(carboxymethyl)hydroxylysine in human skin collagen

Biochemistry 30, 1205-1210

Dyer, D. G., Blackledge, J. A., Thorpe, S. R., Baynes, J. W. (1991): Formation of pentosidine during nonenzymatic browning of proteins by glucose

J. Biol. Chem. 266, 11654-11660

Dyer, D. G., Dunn, J. A., Thorpe, S. R., Bailie, K. E., Lyons, T. J., McCance, D. R., Baynes, J. W. (1991): Accumulation of Maillard reaction products in skin collagen in diabetes and aging

J. Clin. Invest. 91, 2463-2469

Fiorillo, C., Oliviero, C., Rizzuti, G., Nediani, C., Pacini, A., Nassi, P. (1998): Oxidative stress and antioxidant defenses in renal patients receiving regular haemodialysis

Clin. Chem. Lab. Med. 36, 149-153

Friedlander, M. A., Wu, Y. C., Elgawish, A., Monnier, V. M. (1996): Early and advanced glycosylation end products. Kinetics of formation and clearance in peritoneal dialysis.

J. Clin. Invest. 97, 728-735

Fu, M.-X., Knecht, K. J., Thorpe, S. R., Baynes, J. W. (1992): Role of oxygen in cross-linking and chemical modification of collagen by glucose

Diabetes 41 [Suppl. 2], 42-48

Fu, M.-X., Requenat, J. R., Jenkins, A. J., Lyons, T. J., Baynes, J. W., Thorpe, S. R. (1996): The advanced glycation end product, N^ε-(carboxymethyl)lysine, is a product of both lipid peroxidation and glycooxidation reactions

J. Biol. Chem. 271, 9982-9986

Fujii, J., Myint, T., Okado, A., Kaneto, H., Taniguchi, N. (1996): Oxidative stress caused by glycation of Cu, Zn-superoxide dismutase and its effects on intracellular components

Nephrol. Dial. Transplant. 11 [Suppl. 5], 34-40

Gamble, D. R. (1980): The epidemiology of insulin dependent diabetes with particular reference to the relationship of virus infection to its aetiology

Epidemiol. Rev. 2, 49-70

Glomb, M. A., Monnier, V. M. (1995): Mechanism of protein modification by glyoxal and glycolaldehyde, reactive intermediates of the Maillard-reaction

J. Biol. Chem. 270, 10017-10026

Granner, D. K., O'Brien, R. M. (1992): Molecular physiology and genetics of NIDDM

Diabetes Care 15, 369-395

Groop, L., Forsblom, C., Lehtovirta, M. (1997): Characterization of the pre-diabetic state

Am. J. Hypertens. 10 [Suppl. S], 172-180

Häring, H.-U. (1993): Metabolisches Syndrom - Brücke zum Typ-II-Diabetes

Innere Medizin 48, 108-111

Häring, H.-U., Kellerer, M., Mosthaf, L. (1994): Modulation of insulin receptor signalling: significance of altered receptor isoform patterns and mechanism of hyperglycaemia-induced receptor modulation

Diabetologia 37 [Suppl. 2], 149-154

Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (1989): Free radicals in biology and medicine

Clarendon Press: Oxford 1989

Harding, J. J., Hassett, P., Rixon, K. C., Bron, A. J., Harvey, D. J. (1999):

Sugars including erythronic and threonic acids in human aqueous humour

Current Eye Research 19, 131-136

Harrington, C. R., Colaco, C. A. L. S. (1994): Alzheimer's disease: A glycation connection

Nature 370, 247-248

Hoffmann, U., Franzeck, U. K., Bollinger, A. (1994): Gibt es eine kutane Mikroangiopathie bei Diabetes mellitus?

Dtsch. med. Wschr. 119, 36-40

Hogan, M., Cerami, A., Bucala, R. (1992): Advanced glycosylation endproducts block the antiproliferative effect of nitric oxide

J. Clin. Invest. 90, 1110-1115

Hori, O., Yan, S. D., Ogawa, S., Kuwabara, K., Matsumoto, M., Stern, D., Schmidt, A. M. (1996): The receptor for advanced glycation end-products has a central role in mediating the effects of advanced glycation end-products on the development of vascular disease in diabetes mellitus

Nephrol. Dial. Transplant. 11 [Suppl. 5], 13-16

Internationale Chemie-Technik GmbH (1993): Handbuch zur Festphasenextraktion

ICT AG Basel, Wien

Janka, H. U. (1983): Makroangiopathie bei Diabetes mellitus

Med. Welt 34, 153-157

Karow, T., Lang-Roth, R. (2000): Diabetes mellitus, 500-507

In: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie

8. Aufl., Karow, Pulheim

Kato, Y., Tokunaga, K., Osawa, T. (1996): Immunochemical detection of carboxymethylated Apo B-100 in copper-oxidized LDL

Biochem. Biophys. Res. Commun. 226, 923-927

Kimmelstiel, P., Wilson, C., (1936): Intercapillary lesions in the glomeruli in the kidney

Am. J. Pathol. 12, 83-105

Knecht, K. J., Dunn, J. A., McFarland, K. F., McCance, D. R., Lyons, T. J., Thorpe, S. R., Baynes, J. W. (1991): Effect of diabetes and aging on carboxymethyllysine levels in human urine

Diabetes 40, 190-196

König, R. J., Peterson, C. M., Jones, R. L., Saudek, C., Lehrman, M., Cerami, A. (1976): Correlation of glucose regulation and Hemoglobin A_{1c} in Diabetes mellitus

N. Eng. J. Med. 295, 417-420

Leahy, J. L. (1990): Natural history of β -cell dysfunction in NIDDM

Diabetes Care 13, 992-1010

Lyons, T. J., Bailie, K. E., Dyer, D. G., Dunn, J. A., Baynes, J. W. (1991):

Decrease in skin collagen glycation with improved glycemic control in patients with insulin-dependent diabetes mellitus

J. Clin. Invest. 87, 1910-1915

Lopes-Virella, M. F., Klein, R. L., Virella, G. (1996): Modification of lipoproteins in diabetes

Diabetes/Metab. Rev. 12, 69-90

Lüscher, T. F., Oemar, B. S., Yang, Z., Noll, G. (1996): Molekulare und zelluläre Mechanismen der Arteriosklerose und Restenose: Möglichkeiten der Gen-therapie

Z. Kardiol. 85, 495-508

Mahiout, A., Ehlerding, G., Brunkhorst, R. (1996): Advanced glycation end-products in the peritoneal fluid and in the peritoneal membrane of continuous ambulant peritoneal dialysis patients

Nephrol. Dial. Transplant. 11 [Suppl. 5], 2-6

Maillard L.C. (1912): Action des acides amines sur les sucres; formation des melanoidines par voie methodique

C. R. Acad. Sci. 154, 66-71

Makabe, R. (1975): Klinik und Therapie der Mikroangiopathie aus der Sicht des Ophthalmologen

Med. Welt 26, 1129-1132

Makino, H., Shikata, K., Kushiro, M., Hironaka, K., Yamasaki, Y., Sugimoto, H., Ota, Z., Araki, N., Horiuchi, S. (1995): Roles of advanced glycation end-product's in the progression of diabetic nephropathy

Nephrol. Dial. Transplant. 11 [Suppl. 5], 76-80

Makita, Z., Vlassara, H., Rayfield, E., Cartwright, K., Friedman, E., Rodby, R., Cerami, A., Bucala, R. (1992): Hemoglobin-AGE: A circulating marker of advanced glycosylation
Science 258, 651-653

Makita, Z. (1995): Toxicity of glucose: is AGE the answer?
Nephrol. Dial. Transplant. 10 [Suppl. 7], 33-37

Matsumoto, K., Ikeda, K., Horiuchi, S., Zhao, H., Abraham, E. C. (1997): Immunochemical evidence for increased formation of advanced glycation end products and inhibition by aminoguanidine in diabetic rat lenses
Biochem. Biophys. Res. Commun. 241, 352-354

McCance, D. R., Dyer, D. G., Dunn, J. A., Bailie, K. E., Thorpe, S. R., Baynes, J. W., Lyons, T. J. (1993): Maillard reaction products and their relation to complications in insulin-dependent diabetes mellitus
J. Clin. Invest. 91, 2470-2478

Miyata, S., Monnier, V. (1992): Immunohistochemical detection of advanced glycosylation end products in diabetic tissues using monoclonal antibody to pyrroline
J. Clin. Invest. 89, 1102-1112

Monnier, V. M., Vishwanath, V., Frank, K. E., Elmets, C. A., Dauchot, P. J., Kohn, R. R. (1986): Relations between complications of typ I diabetes mellitus and collagen-linked fluorescence
N. Engl. J. Med. 314, 403-408

Monnier, V. M., Sell, D. R., Nagaraj, R. H., Miyata, S., Grandhee, S., Odetti, P., Ibrahim, S. A. (1992): Maillard reaction-mediated molecular damage to extracellular matrix and other tissue proteins in diabetes, aging, and uremia
Diabetes 41 [Suppl. 2], 36-41

Monnier, V. M., Nagaraj, R. H., Portero-Otin, M., Glomb, M., Elgawish, A.-H., Sell, D. R., Friedlander, M. A. (1996): Structure of advanced Maillard reaction products and their pathological role
Nephrol. Dial. Transplant. 11 [Suppl. 5], 20-26

Morell, B. (1983): Heutige Auffassungen über die Pathogenese der diabetischen Mikroangiopathie
Ther. Umsch., 40, 845-851

Mosthaf, L., Vogt, B., Häring, H. U., Ullrich, A. (1991): Altered expression of insulin receptor types A and B in the skeletal muscle of non-insulin-dependent diabetes mellitus patients

Proc. Nat. Acad. Sci. 88, 4728-4730

Mullarkey, C. J., Edelstein, D., Brownlee, M. (1990): Free radical generation by early glycation products: a mechanism for accelerated atherogenesis in diabetes

Biochem. Biophys. Res. Commun. 173, 932-939

Nathan, D.M., Singer, D.E., Godine, J.E., Hodgson Harrington, C., Perlmutter, L C (1986): Retinopathy in older type II diabetes - association with glucose control

Diabetes 35, 797-901

Nathan, D.M. (1993): Long-term complications of diabetes mellitus

N. Eng. J. Med. 328, 1676-1683

Odani, H., Matsumoto, Y., Shinzato, T., Usami, J., Maeda, K. (1999): Mass spectrometric study on the protein chemical modification of uremic patients in advanced Maillard reaction

J. Chromatogr. 731, 131-140

Odetti, P., Fogarty, J., Sell, D. R., Monnier, V. M. (1992): Chromatographic quantitation of plasma and erythrocyte pentosidine in diabetic and uremic subjects

Diabetes 41, 153-159

Odetti, P., Traverso, N., Cosso, L., Noberasco, G., Pronzato, M. A., Marinari, U.M. (1996): Good glycaemic control reduces oxidation and glycation end-products in collagen of diabetic rats

Diabetologia 39, 1440-1447

Oldstone, M. B. A., Nerenberg, M., Southern, P., Price, J., Lewicki, H., (1991): Virus infection triggers insulin dependent diabetes mellitus in a transgenic model: role of anti-self (virus) immune response

Cell 65, 319-331

Papanastasiou, P., Grass, L., Rodela, H., Patrikarea, A., Oreopoulos, D., Diamandis, E. P. (1994): Immunological quantification of advanced glycosylation end-products in the serum of patients on hemodialysis or CAPD

Kidney Int. 46, 216-222

Pirart, J., Lauvaux, J. P., Rey, W. (1978): Blood sugar and diabetic complications

N. Engl. J. Med. 298, 1149

Reddy, S., Bichler, J., Wells-Knecht, K. J., Thorpe, S. R., Baynes, J. W. (1995): N^ε-(carboxymethyl)lysine is a dominant advanced glycation end product (AGE) antigen in tissue proteins

Biochemistry 34, 10872-10878

Reichard, P., Britz, A., Carlsson, P., Cars, I., Lindblad, L., Nilsson, B. Y., Rosenqvist, U. (1990): Metabolic control and complications over 3 years in patients with insulin dependent diabetes (IDDM): the Stockholm Diabetes Intervention Study (SDIS)

Internal Medicine 228, 511-517

Reichard, P. (1995): Are there any glycemic thresholds for the serious microvascular diabetic complications?

J. Diab. Compl. 9, 25-30

Reinwein, D., Benker, G. (1992): Diabetes mellitus, 219-235 In: Klinische Endokrinologie und Diabetologie

2. Auflage, Schattauer, Stuttgart, NW

Requena, J. J., Fu, M.-X., Ahmed, M. U., Jenkins, A. J., Lyons, T. J., Thorpe, S. R. (1996): Lipidoxidation products as biomarkers of oxidative damage to proteins during lipid peroxidation reactions

Nephrol. Dial. Transplant. 11 [Suppl. 5], 48-53

Roep, B. O., Kallan, A. A., Duinkerken, G., Arden, S. D., Hutton, J. C., Bruining, G. J., Vries, R. R. P. (1995): T-cell reactivity to β -cell membrane antigens associated with β -cell destruction in IDDM

Diabetes 44, 278-283

Roudier, M., Portha, P., Picon, L. (1980): Glucocorticoid-induced recovery from streptozocin diabetes in the adult rat

Diabetes 29, 201-205

Sakai, H., Jinde, K., Suzuki, D., Yagame, M., Nomoto, Y. (1996): Localization of glycosylated proteins in the glomeruli of patients with diabetic nephropathy

Nephrol. Dial. Transplant. 11 [Suppl. 5], 66-71

- Sandler, M. (1990):** Can we predict and/or prevent type I diabetes?
S. Afr. Med. J. 78, 462-467
- Scherbaum, W. A., Seissler, J. (1995):** Cellular and humoral autoimmunity in insulin-dependent diabetes mellitus
Exp. Clin. Endocrinol 103, 88-94
- Schleicher, E. (1993):** Glykierung von Proteinen: Pathobiochemische und diagnostische Aspekte
Lab.med. 17, 381-387
- Schleicher, E. D., Wagner, E., Nerlich, A. G. (1997):** Increased accumulation of the glycooxidation product N^ε-(carboxymethyl)lysine in human tissues in diabetes and aging
J. Clin. Invest. 99, 457-468
- Schmalfuß, A. I. (1999):** Auswirkung hoher und niedriger Insulindosierungen auf die hormonelle Gegenregulation in der Hypoglykämie bei Typ-I-Diabetikern
Med. Dissertation, Universität Tübingen
- Selby, S. J., FitzSimmons, S. C., Newman, J. M., Katz, P., Sepe, S., Showstack, J. (1990):** The natural history and epidemiology of diabetic nephropathy
JAMA 263 14, 1954-1960
- Sell, D. R., Monnier, V. M. (1990):** End-stage renal disease and diabetes catalyze the formation of a pentose-derived crosslink from aging human collagen
J. Clin. Invest. 85, 380-384
- Sell, D. R., Carlson, E. C., Monnier, V. M. (1993):** Differential effects of type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus on pentosidine formation in skin and glomerular basement membrane
Diabetologia 36, 936-941
- Sesti, G., Marini, M. A., Tullio, A. N., Montemurro, A., Borboni, P., Fusco, A., Accili, D., Lauro, R. (1991):** Altered expression of the two naturally occurring human insulin receptor variants in isolated adipocytes of non-insulin-dependent diabetes mellitus patients
Biochem. Biophys. Res. Commun. 181, 1419-1424

- Shigematsu, Y., Sweeley, C. C., Schall, W. D., Gossain, V. D. (1988):** Urinary organic acids in natural early-onset insulin-dependent diabetic dogs
Acta Paediatr. Jpn. 30, 285-293
- Skyler, J. S. (1990):** Relation of metabolic control of diabetes mellitus to chronic complications, 856-868
In: Rifkin, H., Porte, D.: Diabetes mellitus theory and practice 4. Aufl., Elsevier, New York, Amsterdam, London
- Smith M. A., Taneda, S., Richey, P. L., Miyata, S., Yan, S.-D., Stern, D., Sayre, L. M., Monnier, V. M., Perry, G. (1994):** Advanced Maillard reaction end products are associated with Alzheimer disease pathology
Proc. Natl. Acad. Sci. 91, 5710-5714
- Standl, E. (1983):** Diabetische Mikroangiopathie
Med. Welt 34, 149-152
- Standl, E. (1996):** Metabolisches Syndrom und tödliches Quartett
Internist 37, 698-704
- Starke, A. A. R. (1995):** Pathobiochemie, Pathogenese und Pathophysiologie der diabetischen Mikroangiopathie, 226 - 234
In: Diabetes Mellitus
1. Auflage, Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore
- Strowig, S.M., Raskin, P. (1995):** Glycemic control and the complications of diabetes
Diabetes Rev. 3, 237-257
- Sugiyama, S., Miyata, T., Horie, K., Iida, Y., Tsuyuki, M., Tanaka, H., Maeda, K. (1996):** Advanced glycation end-products in diabetic nephropathy
Nephrol. Dial. Transplant. 11 [Suppl. 5], 91-94
- Takahashi, M., Ohishi, T., Aoshima, H., Kushida, K., Inoue, T., Horiuchi, K. (1993):** Pre-fractionation with cation exchanger for determination of intermolecular crosslinks, pyridinoline and pentosidine, in hydrolysate
J. Liq. Chromatogr. 16, 1355-1370

Takahashi, M., Kushida, K., Kawana, K., Ishihara, C., Denda, M., Inoue, T., Horiuchi, K. (1993): Quantification of the cross-link pentosidine in serum from normal and uremic subjects
Clin. Chem. 39, 2162-2165

Thompson, J. A., Markey, S. P., Fennessey, P. V. (1975): Gas-chromatographic / mass-spectrometric identification and quantitation of tetric and deoxytetric acids in urine from normal adults and neonates
Clin. Chem. 21, 1892-1898

Vlassara, H. (1992):
Receptor-mediated interactions of advanced glycosylation end products with cellular components within diabetic tissues
Diabetes 41 [Suppl. 2], 52-56

Vogt, B., Schleicher, E., Wieland, O. H. (1982): ϵ -Amino-lysine-bound glucose in human tissues obtained at autopsy
Diabetes 31, 1123-1127

Wada, T., Miyata, T., Kurokawa, K. (1999): Implication of carbonyl stress in long-term uremic complications
Nephrol. Dial. Transplant. 14 [Suppl. 1], 79-81

Wadman S.K., De Bree P.K., Van Sprang F.J., Kamerling J.P., Haverkamp J., Vliegthart J.F.G. (1975): N ^{ϵ} -(carboxymethyl)lysine, a constituent of human urine
Clin. Chim. Acta 59, 313-320

Watkins, P. J. (1995): Chronic complications of diabetes, 107-136
In: Finucane, P., Sinclair A. J.: Diabetes in old age;
John Wiley & Sons Ltd, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore

Watts, R. W. E., Hauschildt, S., Chalmers, R. A., Lawson, A. M. (1976):
Metabolic investigation's during xylitol infusion
Int. Z. Vitam. Ernährungsforsch. Beiheft 15, 216-225

Wells-Knecht, M. C., Thorpe, S. R., Baynes, J. W (1995): Formation of glycoxidation products from glucose and Amadori adducts
Diabetes 44 [Suppl 1], 116A

Wells-Knecht, K. J., Brinkmann, E., Wells-Knecht, M. C., Litchfield, J. E., Ahmed, M. U., Reddy, S., Zyzak, D. V., Thorpe, S. R., Baynes, J. W. (1996): New biomarkers of Maillard reaction damage to proteins
Nephrol. Dial. Transplant. 11 [Suppl. 5], 41-47

Wierusz-Wysocka, B., Wysocki, H., Zozulinska, D., Wykretowicz, A., Kazmierczak, M. (1995): Metabolic control quality and free radical activity in diabetic patients
Diabetes Res. Clin. Pract. 27, 193-197

Winegrad, A. I. (1987): Does a common mechanism induce the diverse complications of diabetes?
Diabetes 36, 396-406

Yamada, H., Miyata, S., Igaki, N., Yatabe, H., Miyauchi, Y., Ohara, T., Sakai, M., Shoda, H., Oimomi, M., Kasuga, M. (1994): Increase in 3-deoxyglucosone levels in diabetic rat plasma
J. Biol. Chem. 269, 20275-20280

Yan, S. D., Schmidt, A. M., Anderson, G. M., Zhang, J., Brett, J., Zou, Y. S., Pinsky, D., Stern, D. (1994): Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins
J. Biol. Chem. 269, 9889-9897

Yan, S. D., Yan, S. F., Chen, X., Fu, J., Chen, M., Kuppusamy, P., Smith, M. A., Perry, G., Godman, G. C., Nawroth, P., Zweier, J. L., Stern, D. (1995): Non-enzymatically glycosylated tau in Alzheimer's disease induces neuronal oxidant stress resulting in cytokine gene expression and release of amyloid β -peptide
Nature Medicine 1, 693-699

Yue, D. K., McLennan, S. V., Turtle, J. R. (1992) Pathogenesis of diabetic microangiopathy: The roles of endothelial cell and basement membrane abnormalities
Diabetic Medicine 9, 218-220

Zatz, R., Brenner, B. M. (1986): Pathogenesis of diabetic microangiopathy
Am. J. Med. 80, 443-453

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. med. R. M. Schmülling für die Überlassung dieses Themas und die wohlwollende Begleitung der vorliegenden Dissertation.

Dr. med. Dr. rer. nat. H. G. Wahl danke ich für die ausdauernde Betreuung, in der er mir in zahlreichen Diskussionen beratend zur Seite stand und seine Unterstützung bei experimentellen und methodischen Fragen.

Danken möchte ich auch Frau A. Wahl und Herrn R. Werner für die Hilfe bei der Durchführung der Laborarbeiten, das freundliche Arbeitsklima und die vielen aufmunternden Worte und Herrn J. Wöll für seine ständige Hilfsbereitschaft.

Herrn Dr. rer. nat. W. Renn sei gedankt für die biomathematische Beratung und die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Arbeit.

Herrn Dr. rer. pol. R. Münnich danke ich für sein Engagement und die Hilfe in allen T_EXnischen Fragen.

Mein nächster Dank gilt allen meinen Kontrollpersonen, die sich freiwillig einer Blutabnahme unterzogen haben und die notwendigen persönlichen Daten zur Verfügung gestellt haben.

Meinen Eltern Erika und Michael Faix, die mir mein Medizinstudium ermöglicht haben und jederzeit für mich da waren, gilt mein größter Dank. Ebenso meiner Schwester Claudia Münnich, die immer ein offenes Ohr und aufmunternde Worte hatte.

Meinem Mann Alexander sage ich ganz herzlichen Dank für den Ansporn und die Unterstützung, die wesentlich zur endgültigen Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Rein geb. Faix
Vorname	Brigitte
Geburtsdatum	12.12.1973
Geburtsort	Böblingen
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	verheiratet
Eltern	Michael Faix, Entwicklungsingenieur i.R. Erika Faix, Hausfrau
Geschwister	Claudia Münnich, Diplom-Kauffrau

Schulische Ausbildung

1980 - 1984	Johannes-Widmann Grundschule Sindelfingen
1984 - 1993	Gymnasium Unterrieden Sindelfingen
1993	Allgemeine Hochschulreife

Berufliche Ausbildung

ab WS 1993	Studium der Humanmedizin an der Universität Tübingen
August 1995	Ärztliche Vorprüfung
1996	Studentische Mitarbeiterin beim Scheringatlas Pathologie
1996-1998	Famulaturen in den Fächern Innere Medizin, Chirurgie, Radiologie, Neurologie und Dermatologie
März 1997	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
März 1999	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
ab April 1999	Praktisches Jahr am Städtischen Krankenhaus Sindelfingen (Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Tübingen), Wahlfach Radiologie an der Universitätsklinik Tübingen.
19.05.2000	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Juli 2000 bis Sept. 2001	ÄiP in der Neurochirurgie im Klinikum Ludwigsburg
Sept. 2001 bis Dez. 2001	ÄiP in der diagnostischen Radiologie im Städtischen Krankenhaus Sindelfingen
seit Januar 2002	Weiterbildungsassistentin in der diagnostischen Radiologie des Städtischen Krankenhauses Sindelfingen