

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. M. Lohse

Einfluss einer fortgesetzten Benfotiamintherapie auf die
Konzentration zirkulierender Advanced Glycation
Endproducts, proinflammatorischer Zytokine und
DNA-Läsionen bei Hämodialysepatienten

Dissertation zur
Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Michaela Winkler
aus Haßfurt

Würzburg, Dezember 2007

Referentin: Prof. Dr. rer. nat. Helga Stopper

Koreferent: Prof. Dr. med. Udo Bahner

Dekan: Prof. Dr. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 9.5.2008

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Hintergrund	1
1.1.1	Charakterisierung des Dialysekollektivs	1
1.1.2	Advanced Glycation Endproducts (AGEs)	3
1.1.3	Charakterisierung von Benfotiamin	6
1.1.3.1	Besonderheiten des Vitamins	6
1.1.3.2	Beschreibung der Vorstufe Thiamin	7
1.1.3.3	Empfohlene Tagesdosis und Vitaminquellen	7
1.1.3.4	Thiaminmangelzustände	7
1.1.3.4.1	Vorkommen	7
1.1.3.4.2	Krankheitsbilder bei Thiaminmangel :	8
1.1.3.5	Wirkungsweise des Vitamins	9
1.2	Fragestellung der Arbeit	13
2	Material und Methoden	15
2.1	Medikation	15
2.2	Chemikalien und Arbeitsgeräte	15
2.2.1	Allgemeine Laborchemikalien und Verbrauchsmaterial	15
2.2.2	Arbeitsgeräte	16
2.3	Zellkultur	16
2.3.1	Kulturmedium	16
2.3.2	Verwendete Zelllinie	17
2.4	Puffer und Lösungen für den Mikrokernversuch	17
2.5	Puffer und Lösungen für den Comet Assay	17
2.6	Isolierung peripherer Blutlymphozyten	19
2.7	Mikrokerntest	19
2.7.1	Charakterisierung	19
2.7.2	Durchführung	20
2.7.3	Auswertung	21
2.8	Comet-Assay (Einzelzell-Gelelektrophorese)	21

2.8.1	Charakterisierung	21
2.8.2	Durchführung	23
2.8.3	Auswertung	23
2.9	Bestimmung der restlichen Serummarker	24
2.10	Probandenkollektiv	24
3	Ergebnisse	27
3.1	Untersuchung der peripheren Lymphozyten auf DNA-Schäden mit Hilfe der Mikrokernmethode	27
3.1.1	Bestimmung der Basiswerte	27
3.1.2	Mikrokernfrequenz während der Benfotiamin-Einnahme	27
3.2	Bestimmung des relativen DNA-Schadens der peripheren Lym- phozyten	28
3.3	Blutdruckverhalten der Dialysepatienten	30
3.4	Plasmaproteinkonzentration im Verlauf der Studie	30
3.5	CRP-Konzentration im Studienverlauf	33
3.6	Advanced Glycation Endproducts und Advanced Oxidative Pro- tein Products	33
3.7	Aktivität des Immunsystems anhand der Marker Neopterin und Interleukin-6 (IL-6)	35
3.8	Bewertung der Benfotiamintherapie durch die Patienten	35
4	Diskussion	37
5	Zusammenfassung	45
	Literaturverzeichnis	47

1 Einleitung

1.1 Hintergrund

1.1.1 Charakterisierung des Dialysekollektivs

Die Inzidenz und Prävalenz dialysepflichtiger Patienten ist weltweit steigend. In der Nierenersatztherapie durch Dialyse gab es in den letzten 40 Jahren viele Innovationen wie die Optimierung der Dialysegeräte, Membranen sowie der Dialysatenflüssigkeit (Locatelli *et al.* , 2006). Trotz dieser Fortschritte ist die Mortalität der Langzeitdialysepatienten immer noch sehr hoch. Sie ist vergleichbar mit der Mortalität von Patienten mit metastasiertem Karzinom (Yao *et al.* , 2004). Die Haupttodesursache dieser Patienten ist kardiovaskulär bedingt, wobei die ischämische Herzkrankheit an erster Stelle steht (Cheung *et al.* , 2004). Laut US Renal Data System und des Europäischen Registers für Patienten mit Nierenersatztherapie ist das Risiko dieser Patienten kardial-vaskuläre Ereignisse zu erleiden, im Vergleich zur allgemeinen Bevölkerung beträchtlich erhöht (Locatelli *et al.* , 2003). Die Ursachen hierfür sind vielfältig. Neben den klassischen Risikofaktoren wie Alter, männliches Geschlecht, Hypertonie, Fettstoffwechselstörung, Diabetes, Nikotinmissbrauch und körperliche Inaktivität sind bei Niereninsuffizienz eine Reihe nicht klassischer Risikofaktoren involviert, wie die Akkumulation von Advanced Glycation Endproducts (AGEs), Erhöhung des Homocysteins und anderer Urämietoxine wie z.B. Indoxylsulfat sowie eine erhöhte Plasmakonzentration von asymmetrischem Dimethylarginin (ADMA) (Zoccali & Kielstein, 2006). Diese Faktoren tragen zu einer beträchtlichen Erhöhung der Sauerstoffradikalbildung bei, deren Konsequenzen in Folge erniedrigter Antioxidantienkonzentration (erniedrigtes Vitamin C, erniedrigte Glutathionperoxidasekonzentration) besonders ausgeprägt sind. Hinzu kommt eine Stimulation des sympathischen Nervensystems, des Renin-Angiotensin-Systems und des Endothelins, die zusätzliche negative zirkulatorische und oxidative Effekte entfalten sowie zur Mikroinflammation beitragen. Schließlich besteht bei der Mehrzahl der Patienten ein sekundärer Hyperparathyroidismus mit Erhöhung des Plas-

1 Einleitung

maphosphatspiegels und eine erniedrigte Konzentration von Fetuin, wodurch die Kalzifikation im Gewebe beträchtlich gesteigert ist. Als Folge dieser zahlreichen Risikofaktoren ist es nicht überraschend, dass auch die Krebsinzidenz bei Dialysepatienten im Vergleich zur Normalbevölkerung deutlich gesteigert ist. Dabei treten gehäuft Karzinome der Niere, Harnblase, Prostata, Leber, des Pharynx- und Larynxbereichs sowie des blutbildenden und lymphatischen Systems auf (Maisonneuve *et al.*, 1999; Teschner *et al.*, 2002). Auffallenderweise werden die Krebsfälle vor allem im ersten Behandlungsjahr diagnostiziert. Unter den zugrunde liegenden Faktoren der Karzinogenese spielt die Schwächung des Immunsystems eine wichtige Rolle (Massry & Glassock, 2000). Die Patienten weisen sowohl eine Beeinträchtigung der zellulären wie humoralen Immunantwort auf. Die Zahl der T-Helferzellen ist reduziert, was durch die Dialysetherapie nicht verbessert wird (Schollmeyer & Bozkurt, 1988). Gleichzeitig bestehen häufig chronische Infektionen, die ebenfalls als Ursache der Karzinome verantwortlich gemacht werden. Diese Infektionen manifestieren sich u.a. gehäuft im harnableitenden System (Maisonneuve *et al.*, 1999). Dialysepatienten sind auch einem erhöhten Risiko ausgesetzt, sich mit Hepatitis B und C Viren zu infizieren. Gleichzeitig wird eine Aktivierung der meisten immunkompetenten Zellen und ein Anstieg der proinflammatorischen Zytokine wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin-1 (IL-1) und Interleukin-6 (IL-6) beobachtet. Auch die Nierenersatztherapie begünstigt infolge Bioinkompatibilität der Membranen sowie bakterieller Verunreinigungen der Dialysate diese Beobachtungen (Descamps-Latscha *et al.*, 2002). Ferner besteht bei Niereninsuffizienz ein erhöhter Anfall von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS), karzinogenen heterozyklischen Aminen und Nitrosodimethylamin. Die vermehrte Bildung von ROS wird auch durch eine ungenügende Konzentration der Antioxidantien (erniedrigte Glutathionperoxidasesynthese sowie Verlust von Antioxidantien während der Hämodialyse) begünstigt. Nicht selten besteht ein Selenmangel. Dieses Spurenelement wird für das aktive Zentrum der Glutathionperoxidase benötigt (Vamvakas *et al.*, 1998). Oxidativer Stress kann zu DNA-Läsionen mit konsekutiven Mutationen führen, wodurch sowohl die Krebsentstehung als auch die Arteriosklerose begünstigt werden (Albert *et al.*, 2003). Ferner wird der häufige sekundäre Hyperparathyreoidismus und der Mangel an 1,25-Dihydroxycholecalciferol mit dem vermehrten Auftreten von malignen Neoplasien in Verbindung gebracht (Vamvakas *et al.*, 1998). Dieser sekundäre Hyperparathyreoidismus ist ferner ursächlich für die Entstehung der renalen Osteopathie, insbesondere einer Ostitis fibrosa und Osteomalazie (Classen *et al.*, 2004). Genomschäden sind zum Teil Folge eines gestörten

DNA-Repairmechanismus, der bei terminaler Niereninsuffizienz sowie im Verlauf der Langzeitdialyse auftritt (Vamvakas *et al.* , 1998). Auch die Begleitmedikation der Patienten kann unerwünschte Effekte zeigen. Diuretika, die von vielen Patienten eingenommen werden, sind besonders bei langer Einnahmedauer mit dem Risiko von Nierenzellkarzinomen verbunden (Grossman *et al.* , 2001). Darüber hinaus sind viele Patienten in ihrer Vorgeschichte beispielsweise auf Grund einer Glomerulonephritis oder Nierentransplantation medikamentös immunsupprimiert worden. Weiterhin besteht die Gefahr eines Analgetikaabusus. Zusammenfassend leiden niereininsuffiziente Patienten an einer ausgeprägten Mikroinflammation, einer erhöhten Sauerstoffradikalbildung sowie an einer gestörten Immunfunktion.

1.1.2 Advanced Glycation Endproducts (AGEs)

Das Akronym AGE wurde initial mit dem normalen Alterungsprozess in Verbindung gebracht, da die Modifikation gealterter Proteine durch diese Verbindungen ein Signal für deren Entfernung darstellt (Raj *et al.* , 2000). Sie sind im Alter, bei Diabetes mellitus sowie progredientem Nierenversagen deutlich erhöht. Eine AGE-Akkumulation begünstigt darüber hinaus die Entzündungsreaktionen bei Polyarthritiden sowie neurologischen Erkrankungen. Dabei ist unklar, ob es sich hier nur um ein Nebenprodukt oder die Erkrankungsursache selbst handelt (Singh *et al.* , 2001). AGEs gelten auch als potentiell toxisches Urämietoxin bei terminalem Nierenversagen (Raj *et al.* , 2000; Schinzel *et al.* , 2001). Die Plasmaspiegel sind um ein Vielfaches der Norm gesteigert. Die Akkumulation von AGEs bei chronischer Niereninsuffizienz wird einerseits dem zunehmenden Verlust der renalen Clearance und andererseits der gesteigerten Neubildung durch oxidativen Stress und dem Ansteigen reaktiver Vorstufen zugeschrieben (Schwedler *et al.* , 2002; Schinzel *et al.* , 2001; Kalousová *et al.* , 2004). AGE-Moleküle zeichnen sich insbesondere durch eine gelb-braune Farbe mit charakteristischen fluoreszierenden Anteilen aus, die einem diffusen Absorptionsspektrum entsprechen (Schinzel *et al.* , 2001). Sie werden hauptsächlich in der sogenannten Maillard Reaktion gebildet. Hier verbindet sich die Aldehydgruppe der Zucker mit einer freien Aminogruppe von Proteinen, Lipiden oder Nukleinsäuren zu einer Schiff Base. Dieser Schritt ist noch reversibel, ihm schließt sich die nahezu irreversible Amadori-Umlagerung an. Hier verlagert sich die Doppelbindung zum zweiten Kohlenstoff des Zuckers, wodurch ein stabiles Ketoamin entsteht (Stryer, 1999). Die Glykosylierung ist besonders am Anfang der Maillard Reaktion konzentrationsabhängig (Singh *et al.* , 2001). Das Hämoglobin A-1c (HbA-1c), das zur Langzeitüberwa-

1 Einleitung

chung von Diabetikern verwendet wird, ist ein Beispiel dieser Reaktion. HbA-1c gehört jedoch nicht zu den AGEs. Glykosylierte Proteine werden anschließend dehydriert, oxidiert, neu arrangiert, und es findet eine Ringbildung statt (Raj *et al.*, 2000). Hierbei ist interessant, dass die AGE-Bildungsrate bei Zuckern wie Fruktose, Glucose-6-Phosphat und Glyceraldehyd-3-Phosphat viel schneller abläuft als mit Glucose als Edukt. Amadori-Produkte sind die Hauptform der zirkulierenden glykosylierten Proteine bei Diabetikern (Raj *et al.*, 2000). Es gibt aber auch viele weitere Wege der AGE-Synthese. So wurde zum Beispiel auch die sogenannte autooxidative Glykosylierung beschrieben, die durch Metalle katalysiert wird (Baynes & Thorpe, 1999). α -Dicarbonyle oder Oxoaldehyde sind als reaktive AGE-Zwischenstufen bekannt. 3-Deoxyglucoson (3-DG), Methylglyoxal (MGO) und Glyoxal sind Vertreter dieser Gruppe und entstehen auf nicht oxidativem Weg. Sie können jedoch oxidativen Stress und Apoptose induzieren. Die Strukturen von Pentosidin und Carboxymethyllysin (CML) sind am besten bekannt (Singh *et al.*, 2001). Sie sind im Blut zu 90% an Albumin gebunden, während ca. 10% frei vorliegen. Sie entstehen auf oxidativem Weg und können sich außerdem an Hämoglobin, Linsenkristallin und LDL-Cholesterin binden. CML wird gleichzeitig auch durch Lipidperoxidation aus mehrfach ungesättigten Fettsäuren gebildet (Baynes & Thorpe, 1999). AGEs können auch auf exogenem Weg, z.B. über Zigarettenrauch oder Nahrung, in den Organismus gelangen. Die orale Bioverfügbarkeit soll gering sein (Singh *et al.*, 2001), dennoch kann die jahrzehntelange tägliche Aufnahme über die Nahrung vor allem bei eingeschränkter Nierenfunktion zu klinisch signifikanten AGE-Spiegelerhöhung führen (Koschinsky *et al.*, 1997). AGE-Rezeptoren werden auf vielen Zellen exprimiert. So finden sie sich auf glatten Muskelzellen, Monozyten, Makrophagen, Endothelzellen, Podozyten, Astrozyten und Mikroglia (Singh *et al.*, 2001). Diese Rezeptoren können in zwei Gruppen aufgeteilt werden. Die eine Gruppe bildet der Rezeptor für AGE (RAGE), ein Rezeptor der Immunglobulinsuperfamilie, der zu oxidativem Stress durch die Expression von Nuclear Factor- κ B (NF- κ B) führt. Die andere Rezeptorengruppe ist für die Entgiftung von AGEs zuständig. Zu ihr gehören der Makrophagen-Scavenger-Rezeptor Klasse A Typ II (MSR-AII), Klasse B Typ I (MRS-BI) sowie die AGE-Rezeptoren 1,2 und 3 (AGE-R1, -R2, -R3) (Lu C., 2004). Auch auf T-Zellen wurden AGE-Rezeptoren entdeckt, die nach Stimulation zur Produktion und Sekretion von Interferon- γ (IFN- γ) führten (Imani *et al.*, 1993). Eine Interaktion mit Makrophagen ist wahrscheinlich, da die Zellen in chronisch inflammatorischen Regionen wie atherosklerotischen Plaques anzutreffen sind. So können AGEs zur gesteigerten Bildung von Zytokinen, Adhäsionsmolekülen

1.1 Hintergrund

und Chemokinen führen (Forbes *et al.* , 2003). AGEs spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Diabeteskomplikationen einschließlich der diabetischen Nephropathie (Heidland *et al.* , 2001). Da Proteine der extrazellulären Matrix nur langsam umgesetzt werden, sind sie ein Angriffspunkt für AGE-vermittelte Veränderungen. So wird glycosyliertes Kollagen durch intra- und intermolekulare Quervernetzungen steifer, es wird thermisch instabiler und kann schwerer proteolytisch abgebaut werden (Forbes *et al.* , 2003). Diese Veränderungen tragen zu Verdickungen der kapillären Basalmembran, Sklerosierung der Nierenglomeruli und Atheroskleroseentstehung bei (Singh *et al.* , 2001). Aber auch kurzlebige Moleküle wie Plasmaproteine und Lipide werden angegriffen. Verändertes Low-Density-Lipoprotein (LDL) wird schlecht von den mesangialen Rezeptoren erkannt und trägt so über geringere Clearance zur Hyperlipidämie und Atherosklerose bei (Vlassara & Palace, 2002). Es wird aber von Monozyten und Makrophagen aufgenommen und fügt durch Bildung freier Sauerstoffradikale den Gefäßwänden oxidative Schäden zu (Raj *et al.* , 2000). Im Tiermodell ließ sich bei experimentellem Diabetes zeigen, dass durch Aufbrechen der Quervernetzungen die Entwicklung der Albuminurie verhindert werden kann (Forbes *et al.* , 2003). AGEs werden wahrscheinlich hauptsächlich von Gewebsmakrophagen in kleine lösliche Peptide zerlegt, die dann nach glomerulärer Filtration in den Tubuli abgebaut sowie mit dem Urin ausgeschieden werden (Singh *et al.* , 2001). Die Entfernung der AGEs ist also von einer guten Nierenfunktion abhängig, denn die AGE-Clearance korreliert direkt mit der Kreatinin-Clearance (Koschinsky *et al.* , 1997). Die AGE-Clearance wird in gesunden Individuen auf etwa 0,72 ml/min geschätzt. Auch die Leber könnte theoretisch über den Scavenger-Rezeptor in Lebersinusoiden AGEs aufnehmen und zur ihrer Entfernung beitragen. Auch Insulin soll durch Steigerung der Rezeptorfunktion in diesen Eliminationsweg involviert sein (Raj *et al.* , 2000). Ein weiterer Entgiftungsweg ist der Abbau von AGEs durch spezifische Enzyme wie Reduktasen (Kalousová *et al.* , 2004). In vitro wurde unter Verwendung von Schweinenierenzellen gezeigt, dass AGEs gentoxisch wirken können (Stopper *et al.* , 2003). Dies ist wahrscheinlich rezeptorvermittelt, da sich die DNA-Schädigungen durch Coinkubation mit Proteasen (Trypsin) infolge Cleavage der äußeren Domäne des Rezeptors stark reduzieren ließen. Die genom-schädigende Wirkung der AGEs erfolgt wahrscheinlich über oxidativen Stress beziehungsweise direkt durch DNA-Modifikationen (Stopper *et al.* , 2003). AGEs können durch ihre charakteristischen Fluoreszenzeigenschaften und die Reaktion mit Antiserum gegen AGE-modifizierte Ribonuklease oder Rinderserumalbumin identifiziert werden, die Isolation ist aber wegen ihrer Instabilität und

1 Einleitung

Heterogenität schwierig (Raj *et al.* , 2000).

1.1.3 Charakterisierung von Benfotiamin

1.1.3.1 Besonderheiten des Vitamins

Benfotiamin (S-Benzoylthiaminmonophosphat BTMP) gehört zur Stoffgruppe der Allithiamine. Es wurde erstmals 1960 synthetisiert. Bei dieser Substanz handelt es sich um das Prodrug des wasserlöslichen Thiamin oder Vitamin B1. Die Absorption des letzteren folgt einer Sättigungskinetik und ist so selbst in gesunden Individuen relativ gering (Woelk *et al.* , 1998). Die Vorstufe Benfotiamin ist dagegen lipophil und durchdringt somit leichter die Blut-Gewebeschanke. Es ermöglicht im Vergleich zu Thiamin um den Faktor 5 gesteigerte Blut- und Gewebekonzentrationen (Schreeb *et al.* , 1997). Weiterhin können auch im Liquor höhere Spiegel erreicht werden und Benfotiamin verbleibt darüber hinaus länger im Organismus (Woelk *et al.* , 1998; Frank *et al.* , 2000) konnte in einer Studie an Dialysepatienten zeigen, dass die Thiamindiphosphatkonzentration in Erythrozyten nach Benfotiamingabe um 170% anstieg. Nach Thiaminnitratsubstitution dagegen stieg sie lediglich um 40% an. Darüber hinaus besitzt Benfotiamin im Tiermodell weniger toxische Eigenschaften als Thiamin (Woelk *et al.* , 1998). Nach oraler Gabe wird die Substanz im Darm durch Phosphatasen in das lipidlösliche S-Benzoyl-Thiamin dephosphoryliert und anschließend resorbiert. Zur reduktiven enzymatischen Spaltung in Thiamin werden in der Zelle Glutathion und Cystein verbraucht. Die Plasmakonzentration steigt ohne Sättigungskinetik proportional zur Dosis nach 1-3 Stunden auf den Maximalwert an. Benfotiamin ist sowohl zur Therapie als auch zur Prophylaxe von Vitamin B1-Mangelzuständen zugelassen. Zu diesen zählen Mangel- und Fehlernährung, langandauernde parenterale Ernährung, Nulldiät, Malabsorption, chronischer Alkoholismus und Diabetes. Abgesehen von einzelnen Überempfindlichkeitsreaktionen wie Nesselsucht und Hautausschlag sind keine Nebenwirkungen bekannt. Die Standarddosis beträgt bei einfachem Vitamin B1-Mangel 150 mg Benfotiamin täglich. Bei Polyneuropathien ist anfänglich die doppelte Dosis für ca. drei Wochen indiziert. In der Neurologie wird es besonders auch zur Behandlung der Wernicke Enzephalopathie eingesetzt. Einige klinische Studien zeigten, dass sich selbst bei kurzzeitiger Behandlung mit Benfotiamin neuropatische Symptome qualitativ und quantitativ besserten (Stracke *et al.* , 2001).

1.1.3.2 Beschreibung der Vorstufe Thiamin

Im Zuge der Identifikation der Beri-Beri Erkrankung als Vitaminmangelkrankung wurde Thiamin (Aneurin) erstmals 1936 synthetisiert. Das Molekül besteht aus einem Pyrimidinring (2,5-dimethyl-6-aminopyrimidin) und einem Thiazoliumring (4-methyl-5-hydroxyethylthiazol), die durch eine Methylenbrücke verbunden sind. In Leber und Nervengewebe wird Thiamin durch die Thiamindiphosphokinase in Thiamindiphosphat umgewandelt. Der gesamte Thiamingehalt des menschlichen Körpers beträgt etwa 30 mg. In Herz, Leber, Niere und Gehirn finden sich die höchsten Thiaminkonzentrationen gefolgt von Leukozyten und Erythrozyten (WHO, 1999). Das Vitamin liegt hauptsächlich als Diphosphat vor, achtzig Prozent des Thiamingehalts im Blut findet sich in den Erythrozyten (Frank *et al.*, 2000). Die Konzentration des Thiamintriphosphat wird im Gewebe von Säugetieren durch eine spezielle Thiamintriphosphatase gesteuert. Die Bedeutung dieses Moleküls ist aber noch weitgehend unklar (Lonsdale, 2006). Täglich werden etwa 1,5 mg Thiamin abgebaut und 100-200 μg renal ausgeschieden (Schmidt, n.d.). Thiamin kann aber auch durch reaktive Sauerstoffradikale zu den biologisch unwirksamen Produkten Thiochrom und Oxodihydrothiochrom oxidiert werden (Hammes *et al.*, 2003).

1.1.3.3 Empfohlene Tagesdosis und Vitaminquellen

Laut WHO sollten erwachsene Frauen 0,9 mg und Männer 1,2 mg Thiamin pro Tag zu sich nehmen (WHO, 1999). Die empfohlene Tagesdosis beträgt 1-1,5 mg pro Tag, wobei diese Empfehlung nur für gesunde Individuen gilt. Thiaminquellen sind mageres Schweinefleisch, Weizenkeime, Eier, Fisch, Geflügel, Bohnen, Erbsen, Nüsse und ganze Körner. Es ist dagegen kaum in Milchprodukten und Gemüse enthalten. Erhitzen der Nahrung führt genauso wie Polyphenole in Kaffee oder Tee zu Vitamininaktivierung (Lonsdale, 2006).

1.1.3.4 Thiaminmangelzustände

1.1.3.4.1 Vorkommen Thiaminmangel tritt vor allem bei Individuen auf, deren Ernährung hauptsächlich auf Kohlenhydraten beruht. Beri-Beri ist noch endemisch in Asien anzutreffen, da sich große Teile der Bevölkerung von geschältem Reis ernähren und das Vitamin hauptsächlich in der Schale lokalisiert ist. Darüber hinaus verschärft roher Fisch teilweise zusätzlich die Mangelsituation, da er bakterielle Thiaminasen enthalten kann, die das Vitamin spalten, bevor es resorbiert werden kann (WHO, 2004). In industrialisierten Ländern ist ein mani-

1 Einleitung

fester Mangel vor allem mit chronischem Alkoholabusus und damit verbundener Malnutrition assoziiert. Weiterhin konnte auch bei hypermetabolischen Zuständen, bei parenteraler Ernährung, chronisch dialysierten Patienten und bei Zustand nach Gastrektomie ein Mangelzustand beobachtet werden. Besonders bei Diabetikern sind niedrige Thiaminspiegel aufgefallen (Thornalley *et al.*, 2007). Außerdem sind einige Fälle nach Wurmbefall bekannt (WHO, 2004). Aber auch die hochkalorische Fehlernährung in Industrieländern kann zu einem relativen Thiaminmangel führen, da diese Kalorien hauptsächlich zu Glukose abgebaut werden (Lonsdale, 2006). Autopsiestudien lassen vermuten, dass Thiaminmangel zu Lebzeiten oft nicht diagnostiziert oder fehlinterpretiert wird.

1.1.3.4.2 Krankheitsbilder bei Thiaminmangel : Die Beri-Beri Erkrankung kann sich bei Erwachsenen in zwei verschiedenen Formen manifestieren. Zum einen als periphere Neuropathie oder auch trockenes Beri-Beri und zum anderen als Herzversagen oder kardiovaskuläres Beri-Beri (Kawano *et al.*, 2005). Letztere Erkrankungsform tritt in westlichen Ländern hauptsächlich in Verbindung mit chronischem Alkoholabusus auf und kann zusätzlich in eine fulminante und chronische Form unterteilt werden. Das fulminante Herzversagen ist vergesellschaftet mit Ödemen, die besonders in den Beinen auftreten. Weiterhin sind gesteigertes Herzminutenvolumen, Ventrikelsuffizienz, Dilatation von Arteriole, Lungenstauung sowie gesteigertes Serumlactat und Pyruvat zu beobachten (WHO, 1991). Die periphere Neuropathie zeichnet sich durch Parästhesien der Extremitäten, reduzierte Reflexauslösbarkeit, fortschreitende schwere Muskelschwäche und Muskelschwund aus. Außerdem besteht gesteigerte Infektanfälligkeit. Meist zeigen sich jedoch Mischbilder der verschiedenen Erkrankungsformen mit mehreren Symptomen. Im Zuge eines endemischen Thiaminmangels in Cuba wurden beispielsweise periphere Neuropathie, retrobulbäre Optikusneuropathie, sensorische periphere Neuropathie, sensorineurale Taubheit, spastische Paraparese, Dysphagie und Dysphonie beschrieben. Zu den Hauptdiagnosekriterien der Beri-Beri Krankheit gehören Hyporeflexie, Hypästhesie, Ödeme, niedriger diastolischer Blutdruck und Wadendruckschmerz, wobei zur Diagnosestellung zwei Symptome positiv sein müssen (Lonsdale, 2006). Chronischer Alkoholismus kann in der westlichen Welt als Paradebeispiel für Thiaminmangelscheinungen gelten, denn es wird nicht nur zu wenig Vitamin aufgenommen, es kann auch schlecht resorbiert und in die Zellen aufgenommen werden. Darüber hinaus können es die Zellen schlechter verwerten (Martin *et al.*, 2003). Das Wernicke-Korsakow Syndrom wird hauptsächlich bei Alkoholikern

beobachtet, die einen autosomal-rezessiven Defekt der Transketolase besitzen. Es manifestiert sich mit Verwirrheitszuständen, Orientierungsverlust, Ophthalmoplegie, Nystagmus, Diplopie, Ataxie und Gedächtnisverlust. Im Gehirn finden sich hyperämische Läsionen des Hirnstamms, Hypothalamus, Thalamus und den Corpora mamillaria (WHO, 1991). In unseren Breiten ist es jedoch, vom Alkoholismus-verursachten Krankheitsbild abgesehen, sehr selten dem Vollbild einer der genannten Erkrankungen zu begegnen. Der Mangel bewegt sich eher im Grenzbereich. Aber auch ein zusätzliches Defizit an anderen Vitaminen und Spurenelementen kann mögliche Krankheitssymptome modifizieren. Nach 2 bis 3 Wochen einer thiamindefizienten Ernährung kann es zu ersten Symptomen wie Appetitlosigkeit, Schwächegefühl, Muskelkater, Brennen an Händen und Füßen, Verdauungsstörungen und Depressionen kommen. Nach 6 bis 8 Wochen können als einzig verbliebene Zeichen leichter Blutdruckabfall und Gewichtsverlust beobachtet werden (WHO, 1999). Interessanterweise kann grenzwertiger Thiaminmangel sogar zu aggressiven Verhaltensweisen führen, die oft als funktionell eingestuft werden (Lonsdale, 2006). Für diese Studie von Bedeutung ist außerdem, dass ca. 25% aller urämischen Patienten an Neuropathien leiden. Diese können durch intravenöse Thiamindiphosphatgabe verbessert werden, indem die Thiaminspiegel in Plasma und Erythrozyten sowie die Transketolaseaktivität gesteigert werden (Frank *et al.*, 2000). Thiaminmangel wird darüber hinaus im Zusammenhang mit dem plötzlichen Kindstod, Schlaf-Apnoe und der Leigh- Krankheit bei Kindern diskutiert (Lonsdale, 2006).

1.1.3.5 Wirkungsweise des Vitamins

Vitamin B fungiert im menschlichen Organismus unter anderem als Co-Enzym der folgenden vier Enzyme (vgl. Abb. 1.1):

- Pyruvat-Dehydrogenase
- α -Ketoglutarat-Dehydrogenase
- Verzweigtketten- α -Keto-Dehydrogenase
- Transketolase

Diese Enzyme haben die Gemeinsamkeit, dass sie mit Hilfe von Thiamindiphosphat aktivierte Aldehydeinheiten übertragen. Bei der Pyruvat-Dehydrogenase handelt es sich um einen Enzymkomplex, der die irreversible Bildung von Acetyl-CoA aus Pyruvat katalysiert. Acetyl-CoA wird in den Mitochondrien

1 Einleitung

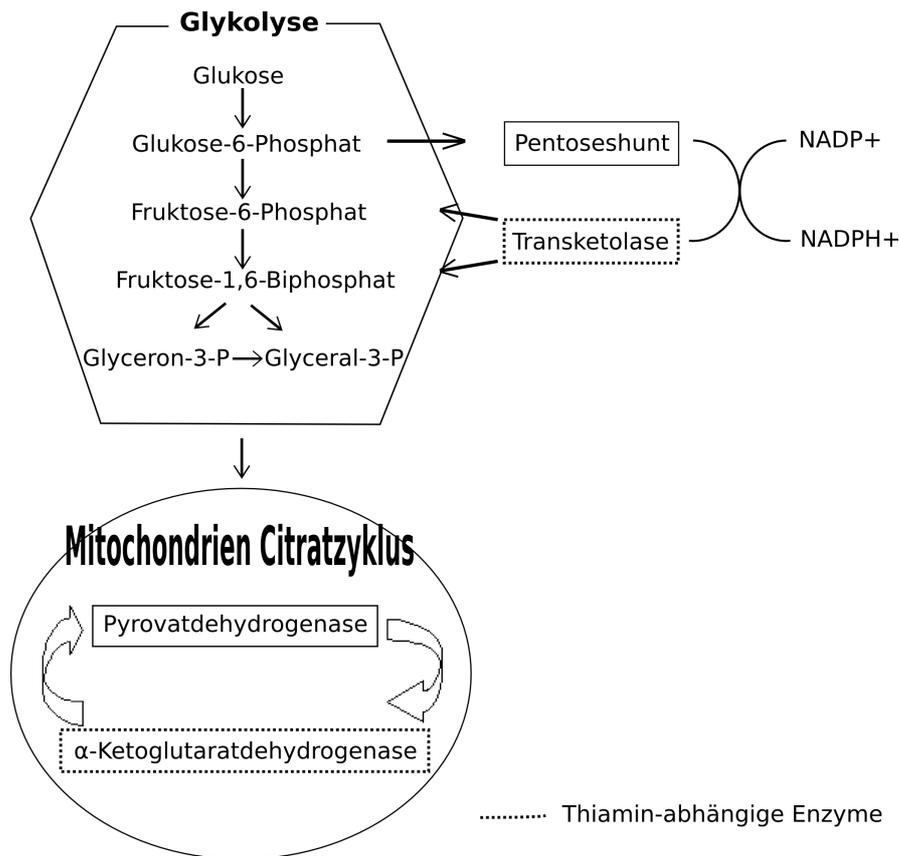


Abbildung 1.1: Überblick über den Einfluss von Thiamin im Glukosestoffwechsel

für den Citratzyklus benötigt (Stryer, 1999). Die α -Ketoglutarat-Dehydrogenase ist ebenfalls ein Enzymkomplex des Citratzyklus und gleichzeitig ein wichtiger Kontrollpunkt, da sie durch ihre Produkte Succinyl-CoA und NADH gehemmt wird. Mit der Verzweigtketten- α -Keto-Dehydrogenase werden die Aminosäuren Leucin, Valin und Isoleucin abgebaut. Die Transketolase ist ein wichtiger Bestandteil des nichtoxidativen Zweiges des Pentosephosphatweges und gehört zur Gruppe der Transferasen. Sie ist ein dimeres Enzym und benötigt als Cofaktoren neben dem Thiamindiphosphat ein divalentes Kation (Esakova *et al.*, 2004; Kochetov, 2001). Die Transketolaseaktivität der Erythrozyten ist neben der Thiaminkonzentration im Plasma auch ein gängiger Parameter, um die Thiaminversorgung des Organismus zu ermitteln (Forth *et al.*, 2001). Der Pentosephosphatweg findet im Zytosol aller Körperzellen statt und erfüllt zwei wichtige Aufgaben: Zum einen wird der Elektronentransporter NADPH/H⁺ hergestellt. Dieser wird außer für reduktive Biosynthesen von Fettsäuren, Cholesterin und Steroiden für die Biotransformation in Leber und Entgiftung von Peroxiden in Erythrozyten benötigt. Zum anderen entsteht Ribose-5-Phosphat, das zur Synthese von

RNA, DNA und Nucleotid-Coenzymen verwendet wird (Horn, 2002). Netto entstehen über diesen Weg aus drei Molekülen Ribose-5-Phosphat zwei Moleküle Fructose-6-Phosphat und ein Molekül Glycerinaldehyd-3-Phosphat. Der Transketolase kommt hier zusammen mit der Transaldolase die wichtige Aufgabe zu, den Pentosephosphatweg reversibel mit der Glykolyse zu verbinden. Dies wird gewährleistet, indem sie folgende Reaktionen katalysiert:

- Xylulose-5-Phosphat + Ribose-5-Phosphat \leftrightarrow Glycerinaldehyd-3-Phosphat + Sedoheptulose-7-phosphat
- Xylulose-5-Phosphat + Erythrose-4-phosphat \leftrightarrow Glycerinaldehyd-3-Phosphat + Fructose-6-Phosphat

Die Endprodukte Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Fructose-6-Phosphat können als Zwischenstufen der Glykolyse weiter verarbeitet werden. Glukosemetabolite können also in Pentosen zerlegt werden, die unter anderem für Endothelzellen weniger toxisch sind (Gadau *et al.*, 2006). Hyperglykämie kann in Gefäßendothelien darüber hinaus funktionell einen Thiaminmangel hervorrufen, wobei der Mechanismus dieses Vorgangs noch ungeklärt ist (Hammes *et al.*, 2003). In Tierversuchen zeigte der Einsatz von Thiamin bzw. seiner Vorstufe bereits eine deutliche Wirkung auf die Eindämmung von Schäden durch oxidativen Stress und Hyperglykämie. Durch Thiamindiphosphat ließ sich die Transketolaseaktivität in Glukose inkubierter Erythrozyten steigern. Gleichzeitig senkte es dort die Methylglyoxalbildung (Shangari *et al.*, 2003). Besonders der Einsatz von Benfotiamin lieferte in diabetischen Ratten interessante Ergebnisse. Benfotiamin blockierte über die Transketolaseaktivierung vier Stoffwechselwege, die für die typischen Hyperglykämieschädigungen verantwortlich gemacht werden. Zu diesen gehört der Polyolweg, der Hexosaminweg, der Diacylglycerol-Proteinkinase C-Weg und die Bildung von AGEs. Außerdem konnte in tierischen Retinae die durch Hyperglykämie induzierte NF- κ B-Aktivierung verhindert werden (Hammes *et al.*, 2003). Das Schlüsselenzym des Polyolweges, Aldosereduktase, wandelt D-Glukose in D-Sorbitol um. Dieses Enzym hat eine geringe Affinität zu Glukose. Im hyperglykämischen Zustand wird die Hexokinase jedoch schnell gesättigt, so dass mehr Glukose über die Aldosereduktase verstoffwechselt wird. Letztere wird besonders für die diabetische Retinopathie verantwortlich gemacht, da ihre Hemmung zur Reduzierung vaskulärer Komplikationen führt (Berrone *et al.*, 2006). Sorbitol wird darüber hinaus nur langsam verstoffwechselt und akkumuliert in der Zelle, da es durch die Zellmembranen schlecht

1 Einleitung

diffundieren kann. Es trägt dadurch zu den langfristigen Komplikationen bei diabetischer Stoffwechsellaage bei (Berrone *et al.*, 2006). Fruktose-6-Phosphat wird im hyperglykämischen Zustand vermehrt der Glykolyse entzogen und dem Hexosaminweg zugeführt (Brownlee, 2001). Dieser trägt sowohl durch Veränderungen der Genexpression als auch von Proteinfunktionen zur Entwicklung diabetischer Komplikationen bei. So werden beispielsweise vermehrt Tumor Growth Faktor- α (TGF- α), Transforming Growth Faktor- β 1 (TGF- β 1) und Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) gebildet. Außerdem wird die Aktivität der endothelialen NO-Synthetase durch O-Acetylglucosaminylierung im aktiven Zentrum gehemmt (Brownlee, 2001). Diacylglycerol (DAG), das bei Hyperglykämie vermehrt de novo aus Dihydroxyacetonphosphat synthetisiert wird, aktiviert Proteinkinase C. Hiervon sind vor allem die β - und δ -Isoformen betroffen. Dieses Enzym kann darüber hinaus auch durch Bindung an AGE-Rezeptoren und gesteigerte Aktivität des Polyolweges stimuliert werden, wobei dieser Mechanismus vermutlich durch reaktive Sauerstoffspezies vermittelt wird (Brownlee, 2001). Proteinkinase C führt zu Abnormalitäten im Blutfluss, indem die endotheliale NO-Synthetase supprimiert und Endothelin 1 vermehrt ausgeschüttet wird. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) führt bei gesteigerter Bildung in glatten Muskelzellen zu erhöhter vaskulärer Permeabilität (Brownlee, 2001). Weiterhin steigert Proteinkinase-C über NF- κ B die Expression proinflammatorischer Zytokine. Darüber hinaus erhöht das Enzym die Akkumulation von Matrixproteinen in der Mikrozirkulation, indem es die Expression von TGF- β 1, Fibronektin und Typ IV Kollagen fördert (Brownlee, 2001). Benfotiamingabe reduzierte in peripheren Nerven diabetischer Ratten die AGE-Bildung. Dagegen war Thiamin in diesem experimentellen Modell unwirksam, wobei der Mechanismus unklar ist. Darüber hinaus konnte beim experimentellen Diabetes der Ratte das Auftreten der diabetischen Retinopathie durch Benfotiamin verhindert werden (Hammes *et al.*, 2003). Die unterschiedlichen und unabhängigen Stoffwechselwege führen schließlich über einen final common pathway zur vermehrten Produktion reaktiver Sauerstoffradikale (Berrone *et al.*, 2006). Letztere können die Glyceraldehydphosphatdehydrogenase teilweise hemmen. Das Glyceraldehyd-3-Phosphat, das hierdurch vermehrt anfällt, kann die AGE-Bildung und Proteinkinase C-Aktivität steigern sowie einen erhöhten Fluss durch den Hexosaminweg induzieren (Berrone *et al.*, 2006). Im Rattenmodell konnte darüber hinaus bei Thiaminrestriktion, abgesehen von einer reduzierten erythrozytären Transketolaseaktivität eine gesteigerte Zahl aberranter Krypten im Colon festgestellt werden. Letztere gelten als Marker für Kolonkarzinogenese (Shangari *et al.*, 2003).

1.2 Fragestellung der Arbeit

Bei experimentellem Diabetes der Ratte wurde der Nachweis geführt, dass höher dosiertes Vitamin B1, verabreicht als Thiamin oder Benfotiamin, in der Lage ist, die Manifestation der diabetischen Nephropathie, der Neuropathie und der inzipienten Nephropathie zu verhindern (Hammes *et al.* , 2003; Babaei-Jadidi *et al.* , 2004). Die günstigen Effekte werden dabei insbesondere mit Erhöhung der Transketolaseaktivität, die bei Diabetes deutlich reduziert ist, interpretiert (Hammes *et al.* , 2003). Auch beim Menschen besteht bei Diabetes eine erniedrigte Transketolaseaktivität. Dieses Enzym ist interessanterweise auch bei fortgeschrittener Niereninsuffizienz in seiner Aktivität reduziert (Pietrzak *et al.* , 2000) und könnte hierdurch unter Umständen zu den negativen Stoffwechseleffekten der Urämie, einschließlich den genotoxischen Wirkungen des urämischen Milieus (Stopper *et al.* , 2004), beitragen. Hauptziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung einer möglichen Modulation von molekularen DNA-Schäden in peripheren Blutlymphozyten durch fortgesetzte Gabe von höherdosiertem Benfotiamin, das sich in bisherigen klinischen Untersuchungen durch eine gute Verträglichkeit ausgezeichnet hat. Daher wurde der Effekt von Benfotiamin an Urämiepatienten mit und ohne Diabetes geprüft. Das Vorliegen der DNA-Schäden der Patienten wurde in peripheren Blutlymphozyten mit zwei gut etablierten Methoden wie der Einzelzellgelelektrophorese (Comet-Assay) und der Mikrokernmethode untersucht. Weiterhin wurde die Plasmakonzentration der Advanced Glycation Endproducts (AGEs) durch Messung der AGE-assoziierten Fluoreszenz gemessen. Zur Beurteilung des oxidativen Stresses diente die Bestimmung der Advanced Oxidation Protein Products (AOPPs). Um Einblick in die aktuelle Mikroinflammation der Patienten zu erhalten, wurden C-reaktives-Protein (CRP), Neopterin und Interleukin-6 bestimmt.

1 Einleitung

2 Material und Methoden

2.1 Medikation

Benfotiamin wurde in Form von milgamma® mono 150 Tabletten für diese Studie verwendet, das von der Firma Wörwag Pharma (Böblingen) vertrieben wird. Die Patienten erhielten es in der Packungsgröße N3, die 100 Dragees mit jeweils 150 mg Benfotiamin enthält. Die Patienten begannen mit einer Dosis von 300 mg täglich, nach 2 Monaten erfolgte eine Dosissteigerung auf 450 mg pro Tag für weitere 3 Monate. Nach Studienende haben einige Patienten diese Dosis noch für weitere 2 Monate eingenommen. Die klinische Prüfung des Benfotiamin in dieser Fragestellung war von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Universität Würzburg genehmigt worden.

2.2 Chemikalien und Arbeitsgeräte

2.2.1 Allgemeine Laborchemikalien und Verbrauchsmaterial

Alle Chemikalien wurden von den Firmen Sigma Chemie GmbH (Taufkirchen), Roth (Karlsruhe), Biochrom (Berlin) sowie Aldrich-Chemie (Steinheim) bezogen. Puffersalze stammten von Merck AG (Darmstadt) und die Lösungsmittel von Roth (Karlsruhe). Für spezielle Mediumzusätze wurden Produkte der Firma HyClone (Logan, Utah, USA) verwendet.

Allgemeine Verbrauchsmaterialien stammten von der Firma Hartenstein (Würzburg). Die Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur wurden von Greiner (Nürtingen), die Lithium Heparin Monovetten von Sarstedt (Nümbrecht-Rommelsdorf) bezogen.

Hochreines Wasser wurde aus der hauseigenen Reinstwasser – Anlage entnommen (Milliporesystem).

Puffer und Lösungen wurden autoklaviert oder durch Millipore Filter steril filtriert.

2 Material und Methoden

2.2.2 Arbeitsgeräte

Autoklav Melag Typ 28, Melag, Deutschland

Brutschrank Typ B 5060 EK-CO₂, Heraeus, Deutschland

Coulter-Counter Z1 bzw. Z2, Coulter Electronics, UK

Fluoreszenzmikroskop Nikon, Deutschland

Lichtmikroskop Zeiss, Deutschland

Netzgeräte Power Pac 300, Biorad, Deutschland Power Supply 500/500, Roth, Deutschland

Pipetten Gilson, Frankreich; Eppendorf, Hamburg, Deutschland; Labsystem, Finnland

Sterile Werkbank Gelaire BH 26, Flow Laboratories, Deutschland

Sterilisator Heraeus, Deutschland

Wasserbad GFL, Burgwedel, Deutschland

Zentrifuge Universal K2S, Hettich, Tuttlingen, Deutschland

Zytozentrifuge Cytospin 3, Shandon, UK

2.3 Zellkultur

2.3.1 Kulturmedium

Zur Isolation und Kultivierung humaner Lymphozyten wurden 500 ml des Mediums RPMI 1640 mit folgenden Substanzen versetzt:

- 75 ml hitzeinaktiviertes (30 Minuten, 56°C) Pferdeserum
- 5 ml Natrium-Pyruvat (100mM)
- 5ml L-Glutamin (200mM)
- 2ml Penicillin-Streptomycin (10.000 I.U./ml Pen., 10.000 µg/ml Strept.) (GIBCO, Maryland, USA)
- 500myg Tylosin (8mg/ml)
- 5ml MEM (100% Konzentration an "non essential amino acids")

2.3.2 Verwendete Zelllinie

Als Negativkontrollen, die für den Comet-Assay erforderlich waren, dienten Mauslymphomzellen der Linie L516Y. Für die Positivkontrollen wurden die Lymphomzellen über 4 Stunden mit 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Methylmethansulfanat geschädigt.

2.4 Puffer und Lösungen für den Mikrokernversuch

- Acridin-Orange Lösung: 450 μl 1%ige Acridin-Orange Stammlösung (Sigma) auf 71, 5 ml Sörensen-Puffer. Dieser Fluoreszenzfarbstoff wurde zur Färbung der Zellen für die Mikrokernauswertung verwendet.
- Sörensen-Puffer: Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat : 5,84 g in 492ml H₂O (bidest) Kaliumhydrogenphosphat: 4,61g in 508 ml H₂O (bidest) pH Wert des Puffers: 6,8

Dieser Puffer diente dem Waschen der Objektträger beim Färben der Mikrokernpräparate.

2.5 Puffer und Lösungen für den Comet Assay

- PBS (Phosphate Buffered Saline)
 - NaCl p.a. 8000 mg
 - KCl p.a. 200 mg
 - Na₂HPO₄·2H₂O 1150 mg
 - KH₂PO₄ 200 mg
 - CaCl₂·2H₂O 130 mg
 - MgCl₂·6H₂O 100 mg
 - Hochgereinigtes Wasser ad 1000 ml
 - pH-Wert des Puffers: 7,0
 - steril filtrieren
- PBS/CMF:
 - NaCl p.a. 8000 mg
 - KCl p.a. 200mg
 - Na₂HPO₄·2H₂O 572 mg

2 Material und Methoden

- KH₂PO₄ 200 mg
- Hochgereinigtes Wasser ad 1000 ml
- pH Wert des Puffers: 7,0
- autoklavieren
- Lysepuffer-Stammlösung
 - NaCl 2,25 M
 - EDTA 100 mM (Sigma Chemica Co., Taufkirchen)
 - Tris 10 mM (Sigma Chemical Co., Taufkirchen)
 - Natrium-Sacrosinat 0,9 % (Sigma Chemical Co., Taufkirchen)
 - Hochgereinigtes Wasser
 - pH-Wert des Puffers: 10,0
 - Um ihn als Lyselösung verwenden zu können, muss dieser Puffer bei jedem Versuch frisch angesetzt werden unter Zusatz von:
 - * Triton X-100 1 % (Sigma Chemical Co., Taufkirchen) DMSO 10% (Sigma Chemical Co., Taufkirchen)
- Elektrophoresepuffer:
 - NaOH 300 mM
 - EDTA 1 mM
 - pH Wert des Puffers : 10,0
 - Hochgereinigtes Wasser
 - Autoklavieren
- Neutralisationspuffer:
 - Tris 400 mM
 - Hochgereinigtes Wasser
 - pH-Wert des Puffers : 7,5
 - Autoklavieren
 - Agarose 0,75% (HMP) (Roth, Karlsruhe)
 - * Agarose (HMP) 750 mg
 - * PBS/CMF 100 ml
 - * Aufkochen (Mikrowelle)
 - Agarose 0,5% (LMP) (Sigma Chemical Co., Taufkirchen)
 - * Agarose (LMP) 50 mg

2.6 Isolierung peripherer Blutlymphozyten

- * PBS/CMF 10 ml
- * Aufkochen (Mikrowelle)

2.6 Isolierung peripherer Blutlymphozyten

Zunächst wurde für jeden Patienten ein 15 ml Zentrifugenröhrchen der Marke Greiner mit 6 ml raumtemperiertem Histopaque© 1077 gefüllt. Das frische Vollblut wurde anschließend gut gemischt, um den Dichtegradienten vorsichtig mit 6 ml davon zu überschichten. Die Röhrchen wurden nun mit 1600 U/min genau 30 Minuten zentrifugiert. Dazu wurde Raumtemperatur eingestellt, um ein Verklumpen der Zellen bei niedriger Temperatur zu verhindern. Mit Hilfe einer Pasteurpipette konnte nun das Blutplasma, das sich in der obersten Schicht des Röhrchens befand, abgenommen und für jeden Patienten in jeweils zwei Cryoröhrchen umgefüllt werden. Das Plasma wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert. Die Lymphozyten befanden sich in der undurchsichtigen Interphase, welche ebenfalls mit Hilfe der Pasteurpipette aufgenommen werden konnte. Sie wurden in ein neues Zentrifugenröhrchen pipettiert, in welches zusätzlich 10 ml Lymphozytenmedium gegeben wurde. Anschließend wurden die Zellen durch vorsichtige Resuspension vereinzelt und erneut 10 Minuten bei 1300 U/min zentrifugiert. Der Überstand, der sich über dem Zellpellet gebildet hatte, wurde verworfen und die Zellen erneut mit 10 ml Lymphozytenmedium resuspendiert. Nach dem zehnmütigen Zentrifugieren bei 1300 U/min wurde der Überstand wieder verworfen, aber das Pellet nun mit 3 ml Lymphozytenmedium resuspendiert. Aus der Suspension wurden 200 µl in ein Zählglas mit 9,8 ml isotoner Lösung gegeben, um mit dem Coulter-Counter die Zellzahl bestimmen zu können. Die Zellzahl wurde auf 1×10^6 Zellen pro Milliliter eingestellt und die Zentrifugenröhrchen auf Eis gelagert. Anschließend konnten die Zellsuspensionen direkt für den Comet-Assay und den Mikrokernversuch weiterverarbeitet werden.

2.7 Mikrokerntest

2.7.1 Charakterisierung

Der Mikrokerntest dient dem Nachweis von DNA- Schädigungen in sich teilenden Zellen, wobei Chromosomenbrüche und spontane Chromosomenverluste erfasst werden. Er kann sowohl *in vitro* als auch *in vivo* als Gentoxizitätstest ge-

2 Material und Methoden

nutzt werden. Er besitzt den Vorteil, dass er leicht durchzuführen und zu automatisieren ist (Stopper & Muller, 1997).

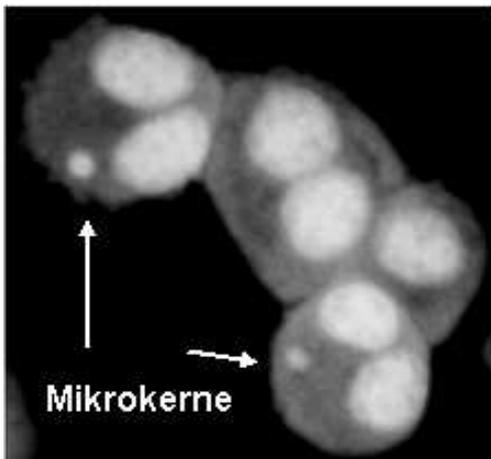


Abbildung 2.1: Mikrokerne mit Acridin-Orange gefärbten L5178Y (Foto: Stopper/ Full)

Ein Mikrokernel definiert sich als abgerundete, DNA enthaltende und von einer Membran umgebene Struktur, die ähnliche Farbintensität wie der Zellkern aufweist (vgl. Abb. 2.1). Er ist von diesem getrennt, jedoch nicht mehr als 2 Hauptkerndurchmesser entfernt im Plasma zu finden. Seine Größe darf die eines Drittel-Zellkerns nicht überschreiten. Er entsteht während der Mitose durch Ausschluss ganzer Chromosomen oder Chromosomenfragmente, worauf seine ultrastrukturelle Ähnlichkeit mit dem Zellkern hinweist (Schiffmann & Boni, 1991). Die spontane Mikrokernelfrequenz in peripheren Lymphozyten steigt mit dem Alter an (Bolognesi *et al.*, 1999). Es ist aber noch unklar, ob Mikrokerne selbst an der Karzinogenese beteiligt sind, da unbekannt ist, was mit ihnen im weiteren Zellzyklus passiert. Es ist zum Beispiel noch nachzuweisen, ob das Genmaterial wieder in den Kern integriert werden kann oder verloren geht (Stopper & Muller, 1997). In präkanzerösen Geweben wurde jedoch eine erhöhte Mikrokernelfrequenz nachgewiesen. Es kann dort aber nicht vorhergesagt werden, ob und wann eine Tumorerkrankung ausbricht (Bloching *et al.*, 2000; Delfino *et al.*, 2002). Ein großer Teil der endogenen DNA-Schäden entsteht durch reaktive Sauerstoffspezies, die vom Körper nicht entgiftet werden konnten. Große Mengen dieser Radikale verursachen Einzelstrang- oder Doppelstrangbrüche, welche dann gesteigerte Mikrokernelraten bedingen. Bei Krebspatienten, die eine Zytostatika- oder Radiotherapie erhielten, waren sie ebenfalls erhöht. Hämodialysepatienten zeigten dagegen erst nach zehn Jahren Dialysedauer leicht gestiegene Werte, während die Mikrokerne vor dieser Zeitspanne nicht gesteigert waren (Stopper *et al.*, 1999).

2.7.2 Durchführung

In dieser Studie wurde der cytokinesis-block micronucleus assay (CBMN) nach der Methode von Fenech durchgeführt (Fenech, 2000). Dazu wurden die isolierten humanen Lymphozyten mit 10 µg/ml Phytohämagglutinin zur Teilung sti-

2.8 Comet-Assay (Einzelzell-Gelelektrophorese)

muliert und bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Nach 42-44 Stunden wurde 5 µg/ml Cytochalasin B zugesetzt, welches Aktinfilamente auflöst, und die Zellen so an weiterer Zytokinese hindert. Danach war eine weitere Inkubation für 24 Stunden erforderlich. Pro Patient wurden mindestens 4 Cytospin Präparate erstellt, wobei auf einen Objektträger bei 1000 Umdrehungen in der Minute in 5 Minuten ca. 20 000 Zellen aufgetragen wurden. Die Objektträger wurden in Methanol fixiert und bei -20°C gelagert. Vor der Auswertung wurden die Zellen mit Acridin Orange angefärbt. Hierfür wurden die Präparate für 3 Minuten in die Färbelösung getaucht um dann anschließend zweimal jeweils für 5 Minuten durch ein Bad in Sörensen-Puffer entfärbt zu werden.

2.7.3 Auswertung

Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden pro Ansatz und Patient etwa 2000 doppelkernige Zellen ausgezählt. Hierbei wurden außerdem die Leukozyten mit jeweils nur einem, drei oder vier Kernen erfasst. Die Mikrokerne wurden ausschließlich in doppelkernigen Zellen ausgewertet, um nur teilungsfähige Zellen unabhängig von ihrer Zellzyklusgeschwindigkeit erfassen zu können.

2.8 Comet-Assay (Einzelzell-Gelelektrophorese)

2.8.1 Charakterisierung

Der alkalische Comet-Assay nach der Methode von Singh et al. bietet sich besonders für Biomonitoring Studien als preiswertes, hoch sensitives Verfahren an. Er verspricht eine hohe Datenausbeute in einer relativ kurzen Zeitspanne, da im Vorfeld keine Zellkultur erforderlich ist (Faust *et al.* , 2004). Die Zellen werden in Agarose eingebettet, lysiert und einem elektrischen Feld ausgesetzt. Aufgrund ihrer negativen Ladung wandert die DNA in Richtung Anode, wobei kleinere Bruchstücke sich weiter vom Zellkern entfernen. Nach Anfärbung mit einem DNA-Farbstoff lässt sich unter dem Fluoreszenzmikroskop eine Konstellation erkennen, die einem Kometenschweif ähnelt (vgl. Abb. 2.2 B). In den isolierten Lymphozyten werden mit diesem Vorgehen sowohl DNA-Strang-Brüche, alkalilabile Stellen als auch aufgelockertes Chromatin erfasst. Besonders bei urämischen Patienten wurde mit diesem Verfahren ein Anstieg von Genschäden festgestellt (Stopper *et al.* , 2001). Der prädiktive Wert des Tests ist jedoch unbekannt, da er nicht in prospektiven Kohortenstudien überprüft wurde. Der Basalwert von DNA-Schäden in humanen Lymphozyten steht sowohl mit körperlicher

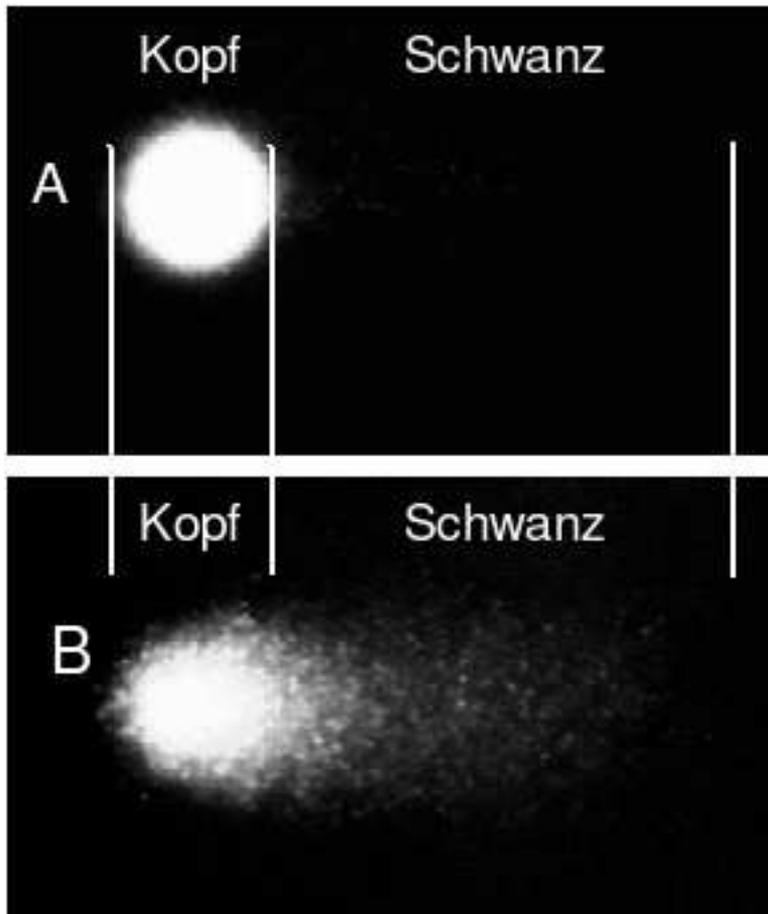


Abbildung 2.2: Comet-Assay mit unbehandelten (Bild A) und mit Methylmethanesulfonat (MMS) vorgeschädigten (Bild B) L5178Y. (Foto: Arbeitsgruppe Stopper)

2.8 Comet-Assay (Einzelzell-Gelelektrophorese)

Belastung, Luftverschmutzung und Sonnenlichteinwirkung als auch der Ernährung in Verbindung (Møller, 2006).

2.8.2 Durchführung

Zunächst wurden 20 µl der aus Vollblut isolierten Lymphozyten in 180 µl LMP Agarose suspendiert um anschließend wiederum 45 µl des Gemisches auf aufgeraute Objektträger (Labcraft, Dakin Fully Frosted, Curtin Matheson Scientific Inc., Huston, Texas) aufzutragen. Die Gelschicht wurde mit einem Deckglas abgedeckt, welches nach kurzer Erhärtungszeit sofort wieder entfernt wurde, um Risse zu vermeiden. Die so präparierten Objektträger mussten nun bei 4°C mindestens eine Stunde in ein vor Lichteinfall geschütztes Gefäß mit alkalischer Lyselösung verbracht werden. Im nächsten Schritt wurden die Ansätze kurz abgetropft und für das sogenannte „unwinding“ 20 Minuten in eine abgedunkelte und mit Eis auf 4 °C temperierte Elektrophoresekammer gelegt. Anschließend wurde für weitere 20 Minuten eine Spannung von 300 mA angelegt. Die Stromstärke von 25 V konnte über das Puffervolumen eingestellt werden. Nach dem Abtropfen wurden die Proben noch für 5 Minuten mit Neutralisationspuffer behandelt und konnten nach weiterem Abtropfen mit 10 µl Ethidiumbromid angefärbt werden.

2.8.3 Auswertung

Zur Auswertung wurden pro Patient 50 Zellen (25 je Objektträger) unter dem Fluoreszenzmikroskop mit 200-facher Vergrößerung erfasst. Zur Bildverarbeitung wurde das Programm Komet 5 Kintetic Imaging (LTD, Liverpool, UK) verwendet. Zunächst wurde der gesamte Komet markiert und die Intensität der Fluoreszenz dieser Fläche gemessen, was der Gesamt-DNA der Zelle entspricht. Anschließend wurde nur der Kometenschweif ausgewählt um die Intensität der gewanderten DNA erfassen zu können. Sie setzte sich aus der Summe der Graustufen jedes Pixels des gewählten Feldes zusammen. Aus diesen Daten konnte der relative Zellschaden, also der Anteil der geschädigten DNA an der Gesamt-DNA ermittelt werden. Berechnet wurden jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung.

2.9 Bestimmung der restlichen Serummarker

Die Patientenseren wurden bei Dr. Katarina Sebekova, Slovak Medical University, im Institut für Präventive und Klinische Medizin, Bratislava, Slowakei ausgewertet. Dort wurden AGE-assoziierte Fluoreszenz, Advanced Oxidation Protein Products (AOPPs), Interleukin-6 (IL-6) und Neopterin bestimmt.

2.10 Probandenkollektiv

An dieser Studie nahmen 15 Patienten aus dem chronischen Dialyseprogramm (8 Männer, 7 Frauen) teil. Ihr Alter betrug im Mittel $63 \pm 15,72532$ [SD]. Die Probanden waren durchschnittlich seit $5,73 \pm 4,99$ [SD] Jahren in Dialysebehandlung. Fünf Patienten litten unter Diabetes mellitus, zehn waren nicht zuckerkrank. Klinische Charakteristika sind in Tabelle 2.1 zusammengefasst. Die Probanden wurden drei mal wöchentlich mit Polysulfonmembrandialysatoren hämodialysiert. Die Blutproben wurden vor Beginn der Hämodialyse vom Pflegepersonal abgenommen. Tabelle 2.2 zeigt einen Überblick der zusätzliche Medikation der Patienten.

Geschlecht	Alter	Primäre Nierenerkrankung	Dialyseart	Dialyse (Jahre)
m	49	Glomerulonephritis	HD	4
m	69	Glomerulonephritis	HD	4
w	83	Andere	HD	9
m	79	Glomerulonephritis	HD	5
w	40	Glomerulonephritis	HD	2
w	59	Primäre Nierenerkrankung	HD	5
w	79	Diabetische Nephropathie	HD	2
m	66	Glomerulonephritis	HD	8
m	54	Glomerulonephritis	HD	22
m	70	Diabetische Nephropathie	HD	2
m	29	Nephrosklerose	HD	7
w	54	Primäre Nierenerkrankung	HD	4
m	82	Diabetische Nephropathie	HD	3
m	69	Primäre Nierenerkrankung	HD	6
w	63	Diabetische Nephropathie	HD	3

Tabelle 2.1: Charakteristika des Patientenkollektivs

Medikament	Anzahl der Patienten
Beta Blocker	11
Calciumantagonist	4
Angiotensin I Antagonist	2
ACE Hemmer	5
Diuretika	10
Statine	4
Erythropoetin	1

Tabelle 2.2: Basis-Medikation der Patienten

2 Material und Methoden

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung der peripheren Lymphozyten auf DNA-Schäden mit Hilfe der Mikrokernmethode

3.1.1 Bestimmung der Basiswerte

Für die Basiswerte wurden im vierzehntägigen Abstand dreimal Blutproben gewonnen und auf DNA-Schäden untersucht, bevor die Probanden mit der Befotiamineinnahme begannen. Bei vier Patienten erfolgte eine weitere Messung, da bei ihnen in der Kontrollphase eine zunehmende Mikrokernfrequenz aufgefallen war. Hiermit sollte eine unspezifische Frequenzerhöhung z.B. durch Infektionen ausgeschlossen werden, da einige Kranke über entsprechende Symptome geklagt hatten. Abbildung 3.1 zeigt, dass die Mikrokerne leicht angestiegen sind, was möglicherweise auf das Vorliegen von latenten Infekten hinweisen könnte.

3.1.2 Mikrokernfrequenz während der Benfotiamin-Einnahme

Nachdem die Benfotiaminmedikation an die Patienten ausgehändigt worden war, wurde eine Messpause von sechs Wochen eingelegt, um dann in ca. einmonatigem Abstand weitere Blutproben zu gewinnen. Insgesamt wurde das Blut zu sieben Zeitpunkten ausgewertet. Pro Patient wurde der Mittelwert aus zwei Objektträgeruntersuchungen unter Auszählung der Mikrokerne in jeweils 1000 doppelkernigen Zellen ermittelt. Wie in Abbildungen 3.2 und 3.3 zu sehen, kann eine Abnahme der Mikrokernrate im Vergleich zum Zeitraum vor Medikamenteneinnahme verzeichnet werden. Dabei fällt jedoch auf, dass der Abfall bei den diabetischen Patienten deutlicher und schneller auftritt. Am Ende der Studie erklärten sich neun Probanden bereit die Medikation fortzusetzen. Zu diesem letzten Zeitpunkt wurden die Mikrokerne in 3000 doppelkernigen Zellen (DK) bestimmt, um bei einem einzigen Messzeitpunkt einen verlässlicheren Wert zu erhalten. Diese Auswertung wurde in kodierter Form durchgeführt. Aus Abbildung 3.4 geht hervor, dass die Mikrokernrate der fünf Patienten, die die Medikamenteneinnahme

3 Ergebnisse

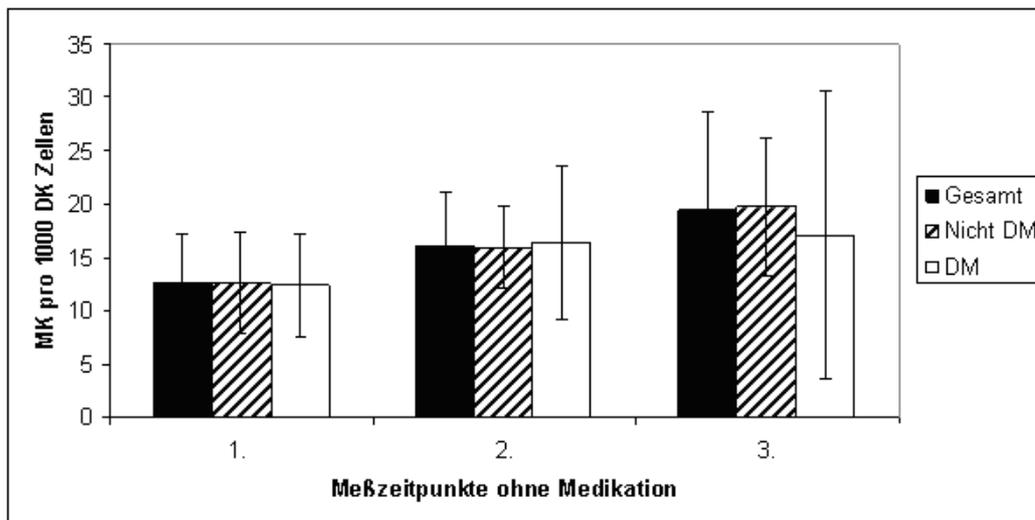


Abbildung 3.1: Anzahl der Mikrokerne (MK) pro 1000 DK Zellen aller fünfzehn Patienten vor Medikationsbeginn (Mittelwert +/- Standardabweichung)

me vor sechs Wochen beendet hatten, mit durchschnittlich 10 MK höher liegt als die der Probanden unter weiter fortgesetzter Medikation mit 7 MK. Der Effekt gewinnt zusätzlich an Bedeutung, da die Patientengruppe, die Benfotiamin absetzte, unter Therapie im Vorfeld sogar etwas niedrigere Mikrokerne aufweist als ihre Vergleichsgruppe.

3.2 Bestimmung des relativen DNA-Schadens der peripheren Lymphozyten

Zur Ermittlung eines validen Grundwertes wurden die isolierten Lymphozyten jeweils zu drei Zeitpunkten mit Hilfe des alkaline Comet-Assays untersucht, bevor mit der Benfotiamineinnahme begonnen wurde. Dabei wurde für jeden Ansatz eine Positiv- sowie eine Negativkontrolle verwendet. Hierzu dienten Maus-Lymphomzellen, die für die Negativkontrolle unbehandelt verwendet wurden und für die Positivkontrolle mit MMS vorgeschädigt worden waren. Die relativen DNA-Schäden der Patienten wurden in Bezug auf die Positivkontrolle angegeben, da bei dem ersten Auswertungstag die Negativkontrolle verloren ging. Unter Medikation wurde ebenfalls zu drei Terminen gemessen. Die DNA-Schäden fielen auf die einzelnen Probanden bezogen unterschiedlich aus (Abbildung 3.5), wobei jedoch insgesamt ein Anstieg der Schädigung festzustellen ist (Abbildung 3.6). Lediglich bei fünf Patienten kam es zu dem erwarteten Abfall des prozen-

3.2 Bestimmung des relativen DNA-Schadens der peripheren Lymphozyten

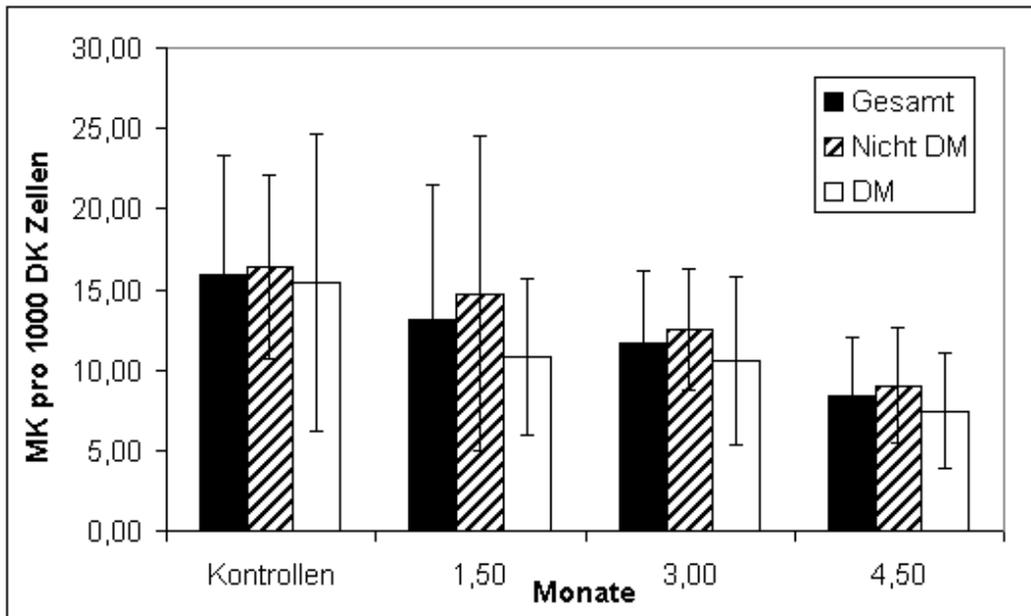


Abbildung 3.2: Zeitverlauf der Mikrokerne unter Benfotiaminbehandlung im Vergleich zum Grundwert. Trennung nach diabetischen und nicht diabetischen Dialysepatienten. (Mittelwert +/- Standardabweichung)

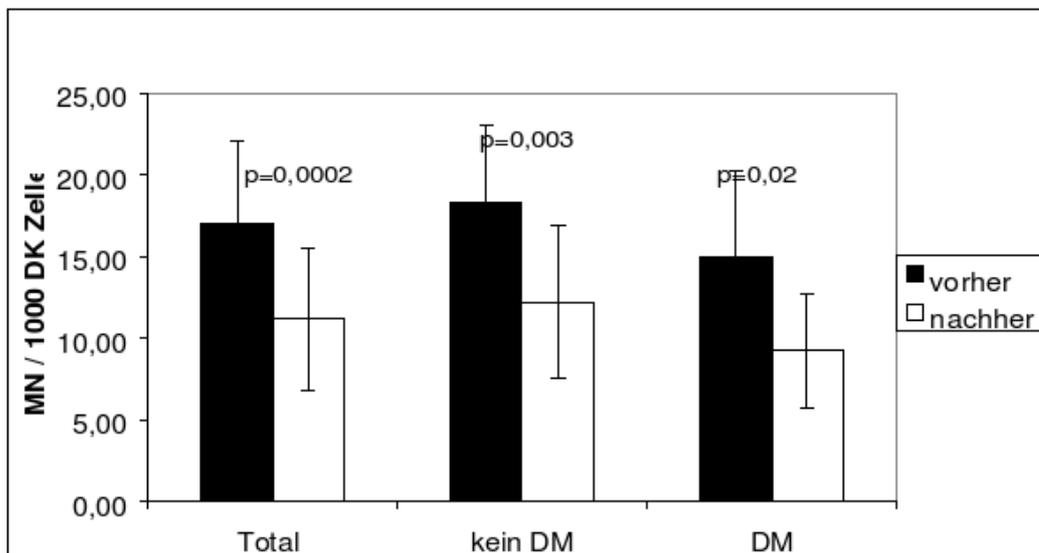


Abbildung 3.3: Mittelwerte der Mikrokerne vor und nach Intervention bei diabetischen und nicht diabetischen Dialysepatienten. (Mittelwert +/- Standardabweichung)

3 Ergebnisse

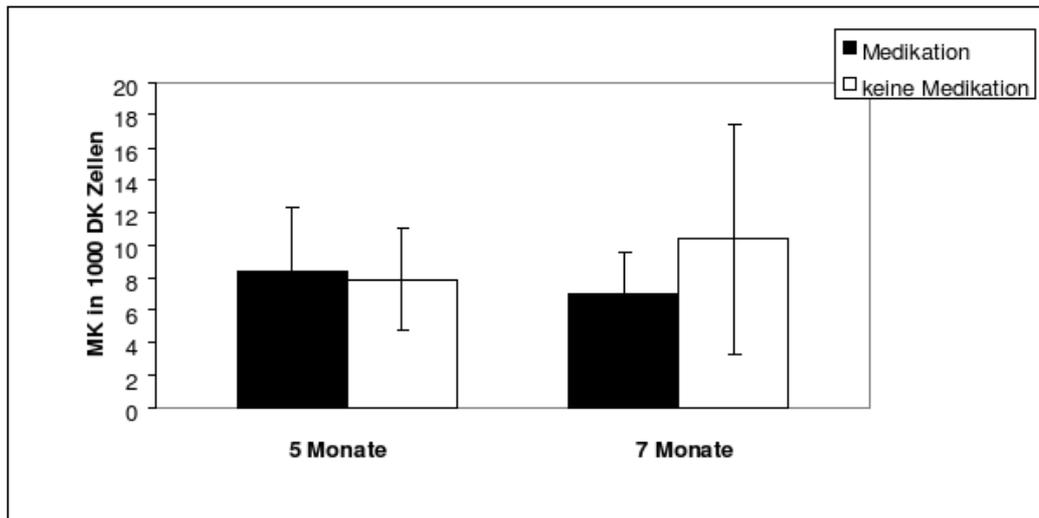


Abbildung 3.4: Verhalten der Mikrokerne vor und während der fortgesetzten Benfotiaminmedikation. Darstellung des letzten Zeitpunktes vor Absetzen der Medikation und zum Ende der Studie. (Mittelwert +/- Standardabweichung)

tualen DNA-Schadens.

3.3 Blutdruckverhalten der Dialysepatienten

Elf Patienten zeigten Blutdruckwerte über 140/95, während nur vier normotensiv waren. Pro Patient wurden vor und während der Behandlung jeweils drei Wertepaare aus systolischem und diastolischem Blutdruck nach Riva Rocci bestimmt. Aus Abbildung 3.7 geht hervor, dass der Blutdruck über die gesamte Studiedauer hinweg stabil blieb. Er betrug im Mittel 148 [±20]/ 81 [±14] mmHg [SD].

3.4 Plasmaproteinkonzentration im Verlauf der Studie

Wie in Abbildung 3.8 gezeigt, hat die Gesamteiweißkonzentration im Plasma gering zugenommen. Dieser Effekt zeigt sich besonders bei den Diabetikern, während sich bei den Nichtdiabetikern keine Änderung auftrat. Betrachtet man jedoch die Albuminkonzentration, so ist diese in beiden Patientengruppen gering angestiegen.

3.4 Plasmaproteinkonzentration im Verlauf der Studie

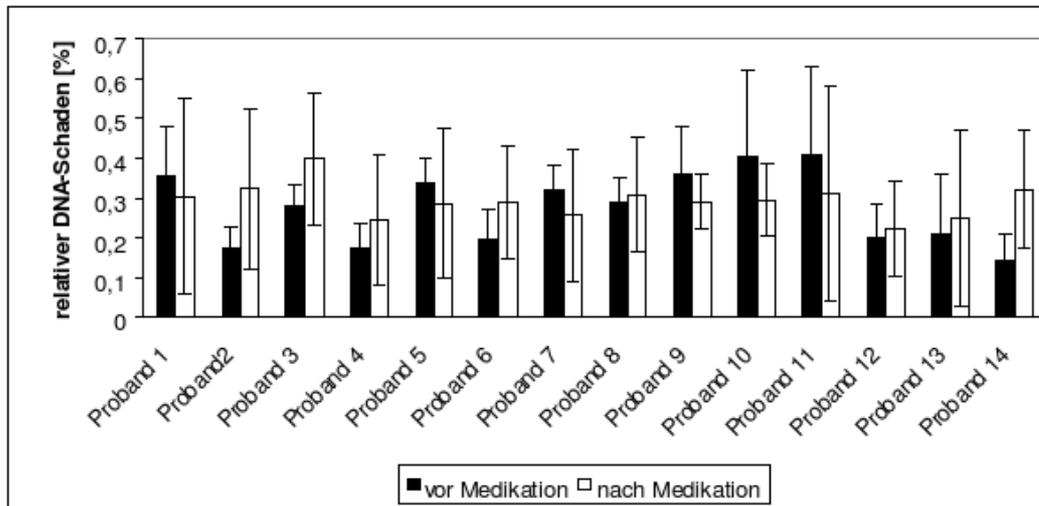


Abbildung 3.5: DNA-Schaden im Comet-Assay aller Probanden zum Zeitpunkt vor und nach Benfotiamin-Einnahme jeweils bezogen auf die Positivkontrolle

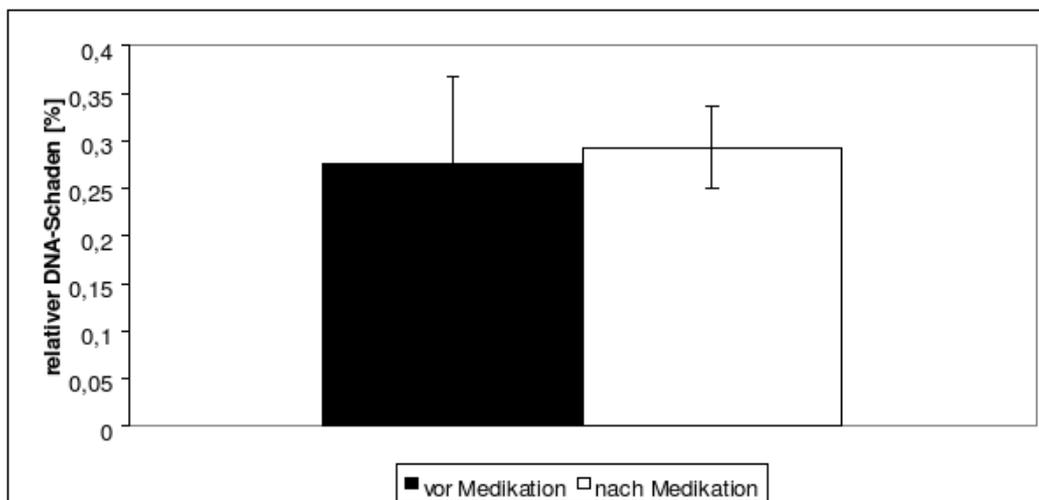


Abbildung 3.6: Mittelwert des DNA-Schadens (Comet-Assay) aller Patienten in Prozent bezogen auf die Positivkontrolle im Vergleich zum Zeitpunkt vor und während Medikation

3 Ergebnisse

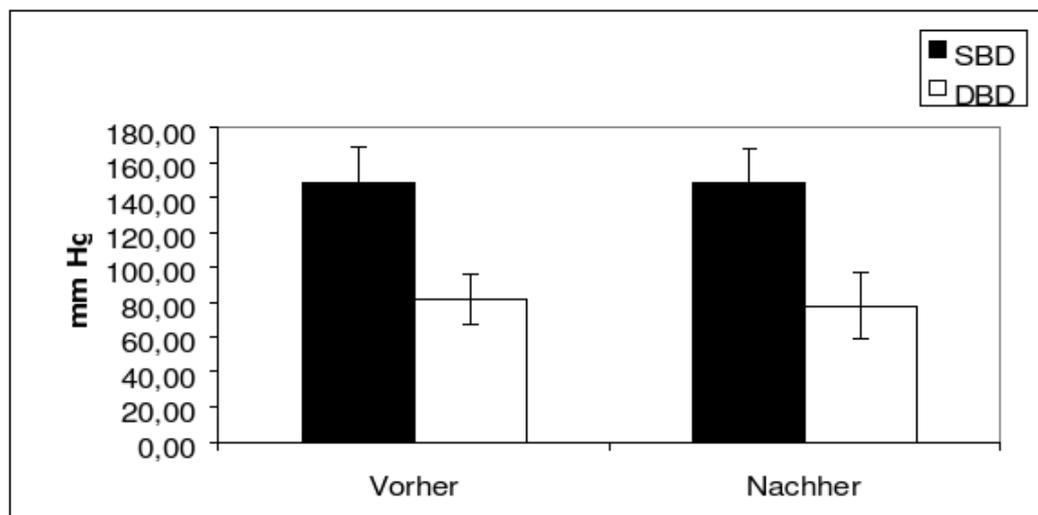


Abbildung 3.7: Systolischer (SBD) und diastolischer (DBD) Blutdruck der Probanden vor und während Benfotiamingabe. (Mittelwert +/- Standardabweichung)

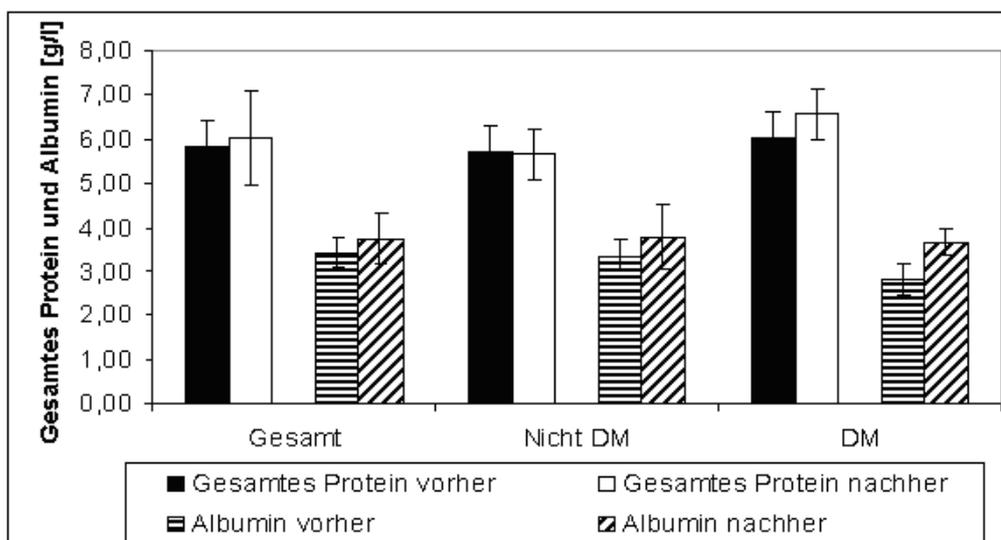


Abbildung 3.8: Plasmaprotein und Albumin der Patienten vor und am Ende der Studie. (Mittelwert +/- Standardabweichung)

3.5 CRP-Konzentration im Studienverlauf

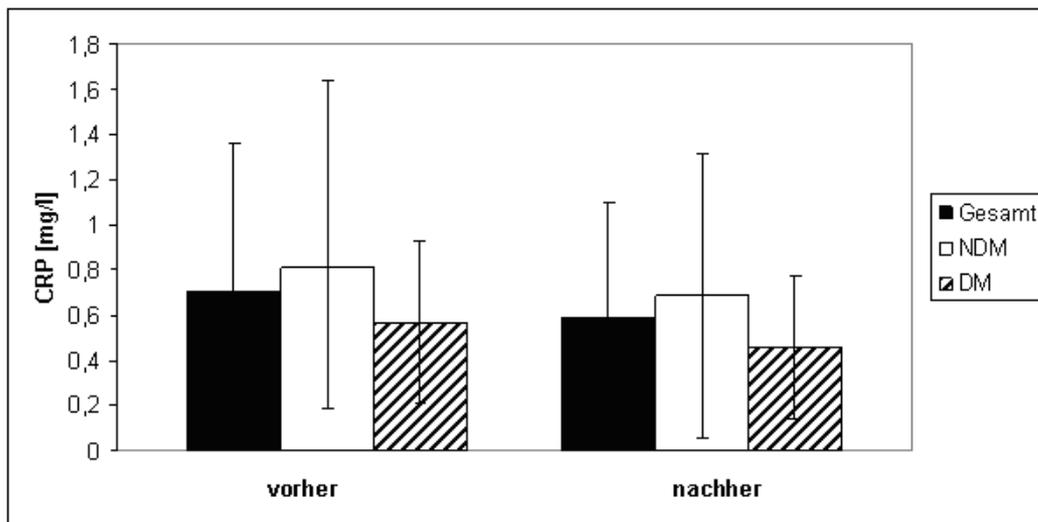


Abbildung 3.9: CRP [mg/l] vor und unter der Benfotiamintherapie in der Gesamtgruppe, sowie bei den Diabetikern (DM) und Nichtdiabetikern (NDM) $n = 14$. (Mittelwert \pm Standardabweichung)

3.5 CRP-Konzentration im Studienverlauf

Die Plasma-CRP-Konzentration von vierzehn Probanden zeigte eine Senkung im Verlauf der Studie, was die Annahme auf eine leichte Verbesserung der Entzündungssituation zulässt (vgl. Abb. 3.9). Die Werte der Diabetiker liegen vor und während der Benfotiaminbehandlung tendenziell niedriger als die der Nichtdiabetiker, was auf eine Besserung der Mikroinflammation hindeutet.

3.6 Advanced Glycation Endproducts und Advanced Oxidative Protein Products

Von den fünfzehn Studienpatienten konnte bei den fünf Diabetikern ein Rückgang der AGE-Konzentration bezogen auf die Gesamtproteinkonzentration im Plasma festgestellt werden. Bei den zehn Nichtdiabetikern wurde ein leichter Konzentrationsanstieg verzeichnet. Die Werte setzen sich jeweils aus zwei Messpunkten vor und zwei während Medikation zusammen. Die Konzentration der Advanced Oxidation Protein Products (AOPPs) stieg ebenfalls tendenziell an. Die Diabetiker wiesen zum Ende der Studie die höchsten Werte auf.

3 Ergebnisse

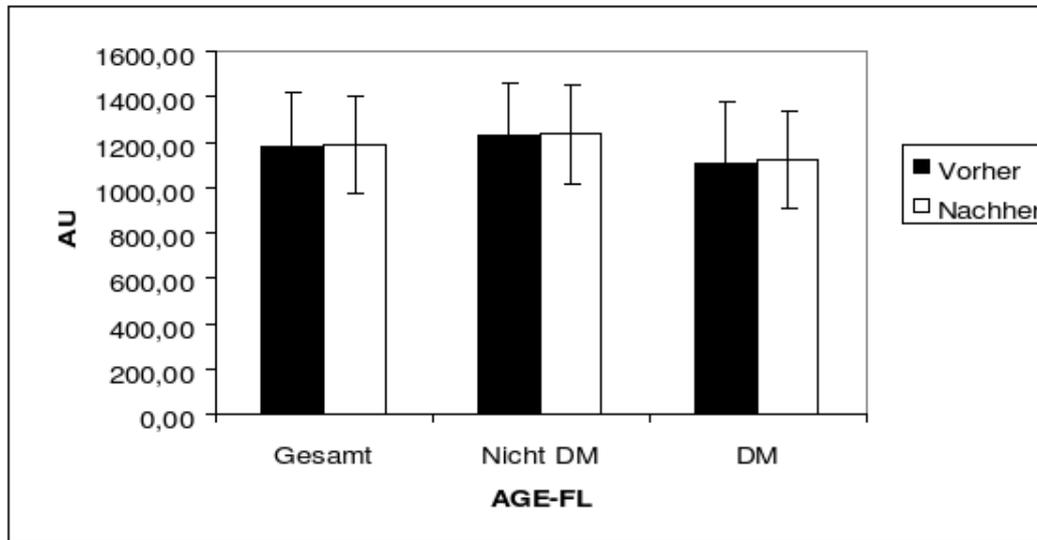


Abbildung 3.10: AGE-Plasmakonzentration [AU] unterteilt in Diabetiker und Nicht-Diabetiker vor und nach Benfotiamingabe. (Mittelwert +/- Standardabweichung)

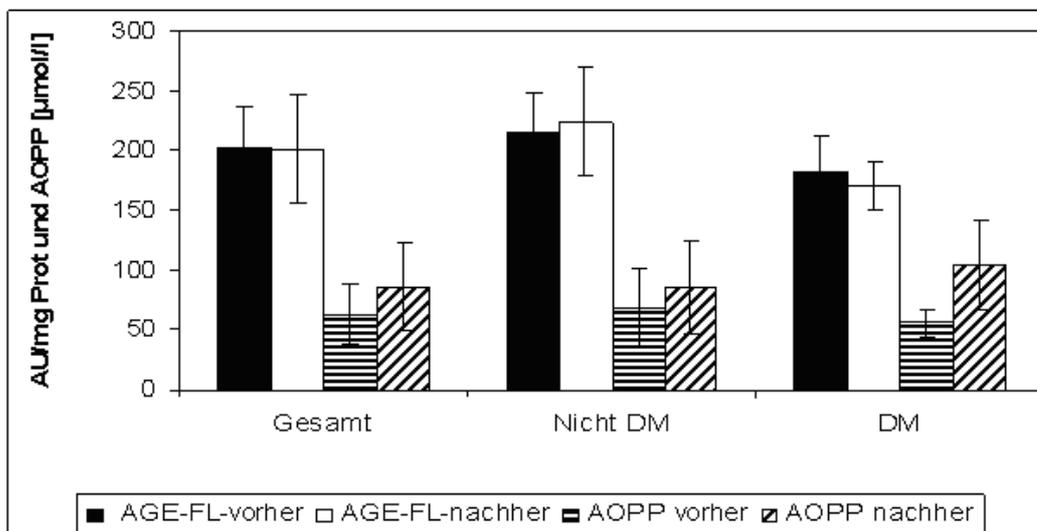


Abbildung 3.11: AGE-Plasmakonzentration [AU pro mg Protein] bezogen auf die Plasmaproteinkonzentration vor und nach Intervention. AOPP Konzentration vor und nach Benfotiaminsubstitution. (Mittelwert +/- Standardabweichung)

3.7 Aktivität des Immunsystems anhand der Marker Neopterin und Interleukin-6 (IL-6)

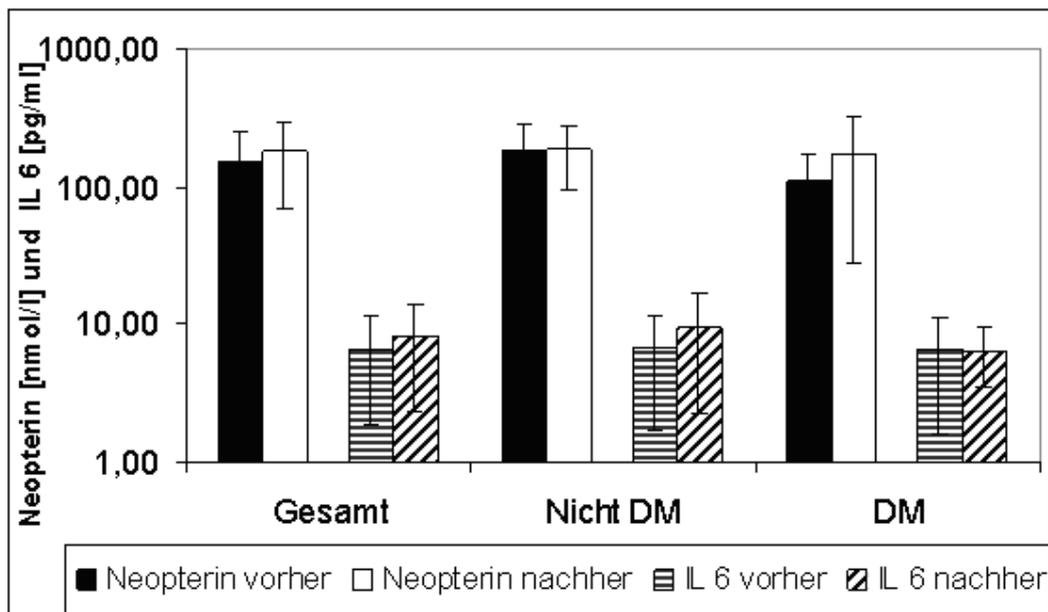


Abbildung 3.12: Neopterin [nmol/l] und Interleukin-6 [pg/ml] aller Patienten, der Nicht-Diabetiker und Diabetiker vor und nach Benfotiamingabe. (Mittelwert +/- Standardabweichung)

3.7 Aktivität des Immunsystems anhand der Marker Neopterin und Interleukin-6 (IL-6)

Neopterin, das als Marker der Immunreaktion von Monozyten und Makrophagen produziert wird, war nicht signifikant erhöht (vgl. Abb. 3.12). Es stieg bei den Diabetikern tendenziell an. IL-6 zeigte sich im Studienverlauf insgesamt erhöht. Lediglich die Diabetiker zeigten einen nahezu konstanten Spiegel.

3.8 Bewertung der Benfotiamintherapie durch die Patienten

Abschließend erhielten die Patienten einen Fragebogen um ihre subjektiven Eindrücke bezüglich der Medikamentenwirkung zu erfassen. Die Mehrzahl der Kranken gab eine Appetitsteigerung an. Einige Patienten berichteten auch über ein verbessertes Wohlbefinden und eine erhöhte körperliche Leistungsfähigkeit. Auf die Schlafqualität hatte die Medikation keinen erkennbaren Effekt.

3 Ergebnisse

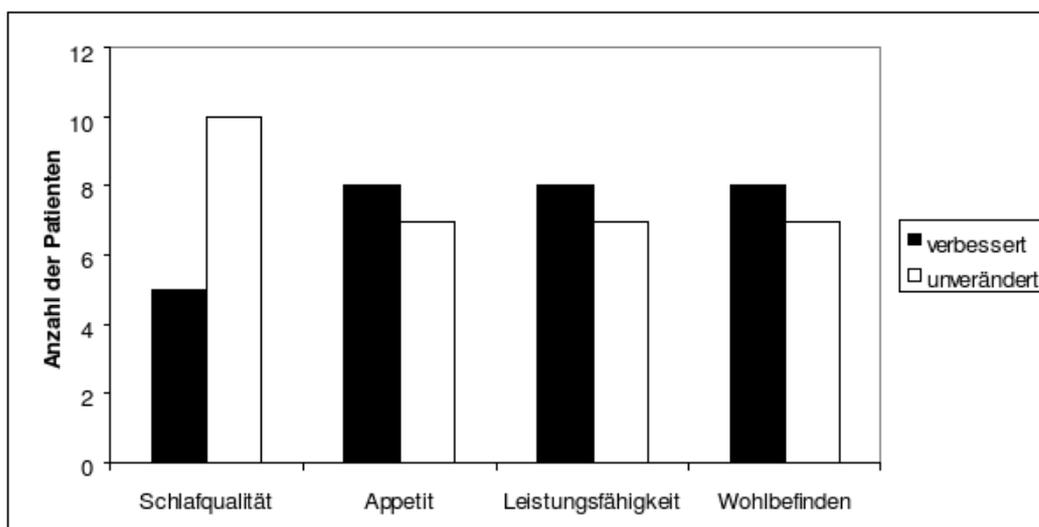


Abbildung 3.13: Befragung der Patienten bezüglich ihres subjektiven Eindrucks auf die Medikamentenwirkung.

4 Diskussion

Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz leiden an einer akzellerierten Atherosklerose sowie erhöhter Karzinominzidenz. Diese Pathologie wird vor allem durch die Kombination von Oxidativem- und Carbonylstress mit konsekutiven DNA-Läsionen hervorgerufen, sowie durch eine Mikroinflammation, die durch die urämischen Retentionsprodukte, insbesondere die Akkumulation von AGEs, ausgelöst wird. Erschwert wird die klinische Situation durch ein geschwächtes antioxidatives Entgiftungssystem in Folge eines Vitamin C und Selenium Defizits, aber auch einer ungenügenden Konzentration von Glutathionperoxidase. Weitere Risikofaktoren sind das fortgeschrittenes Lebensalter, komplizierender Bluthochdruck und das Vorliegen einer diabetischen Stoffwechsellage. Nicht zuletzt werden die Patienten während der notwendigen extrakorporalen Hämodialysebehandlung durch zusätzliche Sauerstoffradikalfreisetzung belastet. (Locatelli *et al.* , 2003). Um die schlechte Prognose dieser Patienten zu verbessern, liegt es nahe, neben einer effizienten Dialysebehandlung und Blutdruckeinstellung auch den Effekt von Antioxidantien zu prüfen. So konnten durch orale Vitamin B-Substitution dieser Patienten sowie durch den Einsatz Vitamin-E beschichteter Dialysemembranen verschiedene biochemische Parameter einschließlich das Ansprechen der Erythropoese auf Erythropoetin verbessert werden (Locatelli *et al.* , 2003; Yoshida *et al.* , 2002). Eine weitere Möglichkeit ist durch den Einsatz höher dosierter B-Vitamine denkbar. Tierexperimentell waren insbesondere durch Einsatz von hochdosiertem Vitamin B1 bzw. Benfotiamin verschiedene Komplikationen des Diabetes gebessert worden, wie die inzipiente Nephropathie, Retinopathie und Neuropathie (Hammes *et al.* , 2003). In einer aktuellen Studie beschleunigte das Vitamin auch die Heilung ischämischer Hinterläufe diabetischer Mäuse (Gadau *et al.* , 2006). Die besonders nachhaltige Wirkung des Benfotiamins bei experimentellem Diabetes wird vor allem mit einer Erhöhung der erniedrigten Transketolaseaktivität interpretiert. Diese Aktivitätserhöhung soll die stimulierte Proteinkinase-C-Aktivität reduzieren und zugleich den Anfall von AGEs vermindern. Nachdem bei terminaler Niereninsuffizienz auch ohne Vorliegen einer diabetischen Stoffwechselstörung die Aktivität der Transketolase erniedrigt

4 Diskussion

ist (Frank *et al.* , 2000), erschien es uns folgerichtig, an diesem Patientengut den Einfluss einer höher dosierten Benfotiamintherapie auf biochemische Alterationen, insbesondere die Beeinflussung von DNA-Läsionen in peripheren Blutlymphozyten zu prüfen. Als Testmethode der DNA-Schädigung wurde die sehr bewährte Mikronukleustestmethode sowie die Einzelzellgelelektrophorese (Comet-Assay) herangezogen. Beide Testsysteme lassen sich leicht durchführen und sind als genotoxische Endpunkte etabliert (Stopper & Muller, 1997). Chromosomenaberrationen in humanen Lymphozyten stellen ein signifikant erhöhtes Risiko dar, an Krebs zu erkranken. Diese Beziehung ist von Alter und Geschlecht der Patienten sowie dem Zeitpunkt der Erfassung unabhängig (Bonassi *et al.* , 2000). Die Häufigkeit der Mikrokerne ist zum Alter positiv korreliert (Bolognesi *et al.* , 1999). In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die hochdosierte Benfotiamintherapie im Verlauf von viereinhalb Monaten zu einer Reduktion der DNA-Schäden im Mikronukleustest führte. So fiel in diesem Zeitraum die Zahl von durchschnittlich 17 Mikrokerneln in 1000 doppelkernigen Zellen auf 10 Mikrokerne ab. Der Ausgangswert ist jedoch für Hämodialysepatienten vergleichsweise niedrig. Andere Studien ermittelten bei Dialysepatienten durchschnittlich 40 Mikrokerne pro 1000 doppelkernige Zellen (Stopper *et al.* , 2004). Auffallend war in unserer Untersuchung, dass bei Diabetikern der Abfall der Mikrokerne ausgeprägter und schneller verlief als bei den Nicht-Diabetikern. So erreichten die Diabetiker bereits nach 1,5 Monaten einen Abfall auf 11 Mikrokerne, während die Nicht-Diabetiker den Ausgangswert von 15 Mikrokerneln nur knapp unterschritten hatten. Bei Studienende erreichten die Nicht-Diabetiker ein Niveau von durchschnittlich 12 Mikrokerneln. Interessanterweise stiegen bei den Patienten, die sich am Studienende gegen eine weitere Medikamenteneinnahme entschieden hatten, die Mikrokerne wieder deutlich an. Bei den Patienten mit fortgesetzter Benfotiaminmedikation zeigte sich dagegen eine weitere Verbesserung auf ca. 7 Mikrokerne. Mithin scheint Benfotiamin einen Rückgang der DNA-Läsionen in peripheren Lymphozyten zu bewirken. Der arterielle Blutdruck blieb während der Behandlung mit durchschnittlich 148/82 mmHg weitgehend unbeeinflusst, so dass diese Größe als modulierender Faktor der DNA-Läsionen zu vernachlässigen ist.

Theoretisch könnte als Ursache der Abnahme der Mikrokerne auch eine zunehmende Übung bei deren Auswertung in Frage kommen. Um diesen Effekt zu vermeiden, wurde gegen Studienende kodiert ausgewertet. Dennoch wäre eine weitere Studie mit Kontrollgruppen nötig, um diesen Unsicherheitsfaktor sicher ausschließen zu können.

Als weiteres Testsystem für die Beurteilung der DNA-Schädigung diente der alkalische Comet-Assay. Mit dieser Methode können Einzel- und Doppelstrangbrüche sowie alkalilabile Stellen in der DNA erfasst werden (Stopper *et al.* , 2001). Er wird klinisch vor allem zum Biomonitoring von DNA-Schäden bei Krebpatienten sowie zur Erfassung von DNA-Schäden bei antineoplastischer Chemotherapie oder Bestrahlung eingesetzt (Faust *et al.* , 2004). Von Vorteil ist hier seine hohe Sensitivität und die Kostengünstigkeit. In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass DNA-Läsionen in peripheren Blutlymphozyten zu glomerulären Filtrationsrate invers korreliert sind. Nach langjähriger Dialysetherapie (über zehn Jahre) wurden im Comet-Assay die höchsten Werte erreicht (Stopper *et al.* , 2004). In der vorliegenden Arbeit zeigte sich mit diesem Testsystem unter der Benfotiamingabe entgegen unserer Erwartung ein Anstieg der prozentualen DNA-Läsionen. Individuell bestanden jedoch unterschiedliche Reaktionen. So konnte bei fünf Patienten eine Senkung beobachtet werden. Es ist außerdem zu berücksichtigen, dass nach Medikationsbeginn nur zu zwei Zeitpunkten eine Auswertung erfolgte. Außerdem bestanden technische Probleme. So musste anstelle der üblichen Negativkontrolle die Positivkontrolle herangezogen werden woraus Fehlermöglichkeiten resultieren können.

Viele Dialysepatienten leiden unter einer Mangelernährung, die einen wichtigen Risikofaktor für die Prognose darstellt. Zur Erfassung der Malnutrition dient neben dem klinischen Bild die Bestimmung der Serumproteine und hier insbesondere des Albumins (Basile, 2003). Dieses Protein gehört zu den wichtigsten extrazellulären Abwehrmechanismen gegen oxidativen Stress. Es stellt im Plasma die Hauptquelle an Thiolgruppen dar (Mircescu *et al.* , 2005). Bei Patienten mit terminalem Nierenversagen ist Albumin auf Grund der Malnutrition sowie als negatives Akutphasenprotein in Folge von Mikroinflammation reduziert. Es wurde in einigen Studien als stärkster Risikoindikator für Morbidität und Mortalität identifiziert (Mircescu *et al.* , 2005). Unter der Benfotiamintherapie ist die Gesamtproteinkonzentration der Patienten leicht angestiegen. Auch hier zeigen die Diabetiker eine stärkere Tendenz. Die Albuminkonzentration hat sich ebenfalls leicht erhöht und näherte sich dem Normbereich (> 36 g/dl). Die tendenzielle Steigerung der Plasmaproteine könnte auf einer Benfotiamin induzierten Senkung der Mikroinflammation und des oxidativen Stresses beruhen. Die Konstanz des Körpergewichtes der behandelten Patienten spricht allerdings gegen die Rolle einer Appetitsteigerung. AGEs spielen in der Pathogenese der kardiovaskulären Komplikationen des Diabetes und des terminalen Nierenversagen eine wichtige Rolle, was sich in Studien über Alterungsprozesse erhärtete (Schin-

4 Diskussion

zel *et al.* , 2001). Auch die Niere wird durch die AGE-Akkumulation geschädigt (Schinzel *et al.* , 2001). Bei Patienten unter Nierenseratztherapie durch Dialyseverfahren trägt β 2-Mikroglobulin in Folge nicht enzymatischer Glykosylierung von AGEs zur dialyseassoziierten Amyloidose bei (Raj *et al.* , 2000). Das derart veränderte β 2-Mikroglobulin steigert die Chemotaxis von Monozyten, die daraufhin vermehrt proinflammatorische Zytokine sezernieren (Schinzel *et al.* , 2001). Konsekutiv wird vermehrt Interleukin-1- β (IL1 β), Tumornekrosefaktor α (TNF α) und Interleukin 6 (IL 6) produziert. Ferner wird die Produktion von Kollagenasen in Synovialzellen gesteigert, die unter Umständen als Mediatoren die Entzündungsreaktion steigern und zur erosiven Arthropathie beitragen können (Raj *et al.* , 2000). Die meisten Hinweise der toxischen AGE- Wirkung wurden im Tierexperiment gewonnen (Schinzel *et al.* , 2001). Bei Ratten konnte Vlassara bereits 1992 zeigen, dass die Verabreichung von AGE-modifiziertem Albumin eine Glomerulosklerose und Albuminurie induziert. Die Basalmembran der Nieren war verdickt, die extrazelluläre mesangiale Matrix vermehrt und das gesamte glomeruläre Volumen um 50% gesteigert. Angesichts ihrer toxischen Wirkungen ist es wichtig die erhöhten AGE-Spiegel bei terminaler Niereninsuffizienz zu senken. Leider ist die konventionelle Hämodialysebehandlung wenig effektiv (Raj *et al.* , 2000). Während im Verlaufe einer Hämodialyse die Serumkonzentration von Kreatinin um ca. 75% gesenkt werden konnte, wurde für die Plasma-AGEs nur eine kurzzeitige Verminderung um 25% erzielt, die vor allem die freien AGEs und AGE-Peptide betrifft (Raj *et al.* , 2000). Durch Dialysebehandlung mit high-flux Membranen können die niedermolekularen AGEs (MW < 10,000 kD) gesenkt werden, die eiweißgebundenen AGEs bleiben stattdessen unverändert erhöht (Schinzel *et al.* , 2001). Fortgesetzter Einsatz von high-flux Dialysatoren erbrachte im Vergleich zu low-flux Systemen eine Verringerung der Serum AGE-Werte um 33%. Diese stiegen aber bereits 3 Stunden nach Beendigung der Dialyse partiell wieder an (Raj *et al.* , 2000). In der vorliegenden Studie lies sich unter der Benfotiaminbehandlung keine signifikante Beeinflussung der AGE-assoziierten Fluoreszenz erkennen (1178,93 AU versus 1186,61 AU). Diabetiker zeigten eine Tendenz zu niedrigeren AGE Werten (ihr Ausgangswert lag bei 1107,33 AU während letztere bei 1232,63 AU lagen). Angesichts der kleinen Fallzahl (5 Patienten) lassen sich jedoch keine sicheren Aussagen treffen. Was die Beziehung zwischen Plasma-AGEs und Mortalität bei terminalem Nierenversagen betrifft, so liegen inzwischen drei Studien vor. In zwei Untersuchungen wurde eine direkte Beziehung zwischen AGE-Akkumulation und Mortalität nachgewiesen (Meerwaldt *et al.* , 2005; Wagner *et al.* , 2006) während in einer Arbeit von Schwedler

et al eine inverse Beziehung zwischen AGEs und Mortalität nachgewiesen wurde ((Schwedler *et al.* , 2002). Möglicherweise sind die unterschiedlichen Resultate mit einer differentiellen diätetischen AGE-Zufuhr zu erklären. Interessanterweise konnte in der vorliegenden Studie eine leichte Abnahme des C-reaktiven Proteins festgestellt werden, was zusammen mit dem Anstieg der Gesamteiweißkonzentration für eine günstige Beeinflussung der Mikroinflammation sprechen könnte. Allerdings waren diese tendenziellen Veränderungen ohne Beeinflussung der AGE-assoziierten Fluoreszenz aufgetreten. Das würde bedeuten, dass der günstige Effekt des Benfotiamin nicht allein über eine Modulation des AGE-Spiegels zu erklären ist, wie in früheren Tierversuchen von Hammes *et al.* Auch in einer aktuellen Arbeit wurde die Senkung des oxidativen Stresses durch Benfotiamin im Gehirn diabetischer Mäuse ohne begleitende Veränderungen der AGE-, Gewebefaktor- und TNF- α Spiegel erreicht (Wu & Ren, 2006). Eine andere Erklärungsmöglichkeit bieten neueste Befunde von Schmidt *et al.*, die *in vitro* eine direkte antioxidative Wirkung von Benfotiamin auf oxidativen Stress dokumentieren konnte.

Es ist zu fragen, warum ausschließlich bei den Diabetikern eine geringe AGE-Spiegelsenkung beobachtet wurde. Bei diesen Patienten sind auch ohne Nierenerkrankung im Gewebe hohe AGE-Spiegel nachzuweisen. (Baynes & Thorpe, 1999). Möglicherweise hat die Benfotiamingabe hier zu einer stärkeren Steigerung der Transketolaseaktivität geführt. Die Nierentransplantation ist die erfolgreichste Möglichkeit um AGE-Spiegel bei Dialysepatienten zu senken. Dennoch kann ein nicht unerheblich erhöhter AGE-Spiegel persistieren und zu Transplantationskomplikationen beitragen (Schinzel *et al.* , 2001). Die Advanced oxidation protein products (AOPPs) sind stark mit Markern der Monozytenaktivierung wie Neopterin oder Tumornekrosefaktor verbunden. Sie können als Inflammationsmediatoren dienen und korrelieren mit Dityrosin und Plasmakonzentrationen des AGEs Pentosidin (Locatelli *et al.* , 2003). Die höchsten AOPP-Werte wurden bei Dialysepatienten beobachtet (Descamps-Latscha *et al.* , 2002). AOPPs werden neuerdings als urämischer Toxine betrachtet. Diese waren in beiden Patientengruppen leicht angestiegen. Sie korrelierten aber weder mit dem Gesamtprotein noch mit dem Albumin. Daher ist davon auszugehen, dass Benfotiamin zumindest die Monozytenaktivierung nicht moduliert hat. Entzündungsmarker im Serum korrelieren bei Patienten mit terminalem Nierenversagen stark mit der kardiovaskulären Morbidität und Mortalität (Bodlaj *et al.* , 2004). Zur Beurteilung der Mikroinflammation wurden die Marker CRP, Neopterin und IL-6 der Patienten quantifiziert. Hier ist jedoch zu beachten, dass der Hämodialysevorgang selbst

4 Diskussion

inflammatorische Prozesse auslösen kann. So führen der Kontakt des Patientenblutes mit den Membranen selbst sowie mögliche bakterielle Kontamination der Dialysate oder eventuell vorliegende Shunt-Infektionen zur Erhöhung der Entzündungsparameter (Bodlaj *et al.* , 2004). Das klassische „Akute-Phase-Protein“ C-reaktives Protein (CRP) steigt nach Beginn einer Entzündungsreaktion innerhalb von 24-48 Stunden an und normalisiert sich bereits zwei Wochen nach deren Ende (Herold & Mitarbeiter, 2004). Zusammen mit dem Alter hat sich der Marker bei Dialysepatienten als Indikator für die kardiovaskuläre und allgemeine Mortalität herausgestellt (Zimmermann *et al.* , 1999). Darüber hinaus sprechen neuere Untersuchungen dafür, das CRP auch als Mediator inflammatorischer Vorgänge fungieren kann. In einer schwedischen Studie zeigte sich, dass Patienten mit hohem CRP auch hohe Parameter des oxidativen Stress aufweisen (Annuk *et al.* , 2005). Wie bereits erwähnt, zeigte sich das CRP der vorliegenden Studie nicht erhöht. Auch der Ausgangswert von durchschnittlich 0,71 mg/l spricht eher gegen das Vorliegen einer manifesten Inflammation. Peppia *et al.* hat in einer Studie bei Hämodialysepatienten bei der Hälfte seiner Probanden CRP-Werte von durchschnittlich 12 mg/l ermittelt, wobei die Zahl seiner Patienten deutlich größer war (Peppia *et al.* , 2004). Auch eine mit den vorliegenden Patientenzahlen vergleichbare Studie Bodlajs ergab höhere mittlere CRP-Level von 18 mg/l (Bodlaj *et al.* , 2004).

Neopterin ist ein Pyrimidinderivat, das hauptsächlich nach Stimulation von Monozyten und Makrophagen mit Interferon γ produziert wird. Es wird als Indikator des zellulären Immunsystems bei Autoimmunerkrankungen, der Effektivität einer Therapie und Prognose maligner Tumoren sowie zur Erfassung von Abstoßungsreaktionen nach Nierentransplantation genutzt (Yoshida *et al.* , 2002). Es korreliert ferner mit der Schwere der Atherosklerose in den Karotiden bei Hämodialysepatienten (Erten *et al.* , 2005). Der mittlere Plasma-Neopterin Spiegel ist stark mit der Schweregrad des Nierenversagens verbunden. Er steigt in fortgeschrittenen Stadien bis um den Faktor 15 an (Descamps-Latscha *et al.* , 1995; Bodlaj *et al.* , 2004). Besonders Hämodialysepatienten zeigen erhöhte Werte, was den Schluss zulässt, dass dieses Verfahren die Monozytenfunktion stimuliert (Descamps-Latscha *et al.* , 1995). Gegen Ende der Dialysebehandlung fällt der Spiegel im Allgemeinen signifikant ab, da Neopterin auf Grund seines niedrigen Molekulargewichtes (250 kDA) gut dialysabel ist (Descamps-Latscha *et al.* , 1995). Der Neopterinwert war im Verlauf dieser Studie nicht signifikant erhöht. Der Ausgangswert von knapp 150 nmol/l ist dem anderer Studiengruppen vergleichbar (Descamps-Latscha *et al.* , 1995; Bodlaj *et al.* , 2004). Ähnlich wie die Stu-

diengruppe von Bodlaj konnte auch hier zwischen Patienten mit und ohne Diabetes kein signifikanter Unterschied gefunden werden (Bodlaj *et al.* , 2004). Die Mikrokernraten zu Beginn und gegen Ende der Studie korrelierten dagegen mit dem Neopterinpiegel. Da letzterer über die Studie hinweg aber konstant blieb ist davon auszugehen, dass der Rückgang der DNA-Schäden im Mikrokerntest nicht durch Hemmung des Inflammationsstatus verursacht wurde, da dieser anscheinend stabil blieb. Die positive Benfotiaminwirkung könnte dagegen durch eine Reduktion des oxidativen Stress oder weitere unbekannte Mechanismen erfolgt sein.

Unter Berücksichtigung der aktuellen Studiendaten zum Einsatz von Benfotiamin ist jedoch davon auszugehen, dass die hier beobachteten Effekte wie Senkung der Mikrokernraten und Ansteigen der Plasmaproteinkonzentration durch Zunahme der Aktivierung der Transketolase mitbestimmt sind (Gadau *et al.* , 2006; Berrone *et al.* , 2006; Hammes *et al.* , 2003). Besonders bei chronischem Nierenversagen konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass die erythrozytäre Transketolaseaktivität im Vergleich zu gesunden Individuen deutlich geringer ist (Frank *et al.* , 2000). In einer Studie von Frank wurde festgestellt, dass die wichtigsten beiden Parameter, die die Transketolaseaktivität beeinflussen, die Thiaminblutkonzentration und die Albuminkonzentration waren. Nur mit Benfotiamin war nach Frank ein Einfluss auf die Transketolaseaktivität festzustellen. In Ratten führten hohe Benfotiamindosen in den Glomeruli zu einer Erhöhung der Transketolaseaktivität (Gadau *et al.* , 2006). Die renale Schutzwirkung von Benfotiamin bei Diabetes erfordert nicht obligatorisch die Reduktion oxidativen Stresses. Die in der vorliegenden Studie ermittelten AGE und AOPP Konzentrationen zeigten zumindest keine sichere Beeinflussung. Da es sich bei diesen Parametern jedoch nicht um direkte Endpunkte des oxidativen Stresses handelt, sollten in weiteren Studien geeignetere Methoden wie die totale antioxidative Kapazität des Plasmas oder der Gluthathionpiegel berücksichtigt werden. Angesichts der spektakulären Ergebnisse der Benfotiaminbehandlung bei der Prävention diabetischer Komplikationen wäre zu erwägen, diese auch bei diabetischen Dialysepatienten in die Grundversorgung einzuführen. Hierzu wären jedoch randomisierte Studien mit großen Patientenzahlen nötig. Bei weiteren positiven Ergebnissen wäre es weiterhin wichtig eine optimale Dosisempfehlung für Benfotiamin im klinischen Alltag zu ermitteln. Niereninsuffiziente Patienten sind nämlich prinzipiell in der Lage, ohne Substitution normale Plasma- und Erythrozythiaminkonzentrationen aufrechtzuerhalten (Frank *et al.* , 2000). Die Thiamindiphosphatbildung ist nach einer Studie von Frank in Patienten mit terminalem Nierenver-

4 Diskussion

sagen im Vergleich zu gesunden Individuen viel höher. Dabei fällt auf, dass bei kleinen Dosen die Area under the curve (AUC) und die Maximalkonzentration bei Dialysepatienten gesteigert ist. Bei stark verminderter Nierenfunktion kann die Bildung von Thiamindiphosphat als alternativer Stoffwechselweg dienen, um den Thiaminblutspiegel konstant zu halten (Frank *et al.* , 2000). Darüber hinaus stieg unter Thiaminsubstitution auffälligerweise die Tumorprogression bei Mäusen an. Auch viele Tumorpatienten im fortgeschrittenen Stadium leiden an Thiaminmangel. Bei diesen wird die Transketolase im Tumorgewebe überexprimiert und zieht wahrscheinlich viel Thiamin an sich. Sobald die Krebsmäuse aber ein Vielfaches der empfohlenen Tagesdosis erhielten, wurde das Tumorwachstum unterdrückt (Comín-Anduix *et al.* , 2001). Da das Dialysekollektiv auch eine hohe Neoplasierate aufweist, ist es essentiell eine geeignete Substitutionsdosis zu finden, um eine mögliche Tumorprogression auszuschließen. Die erforderliche Dosis könnte also im höheren Bereich liegen, was durch das nebenwirkungsarme Wirkungsprofil des Medikaments gut realisierbar erscheint. Benfotiamin hat sich zusätzlich durch antinozizeptive, anti-hyperalgetische und anti-allodyne Eigenschaften in Ratten ausgezeichnet (Sánchez-Ramírez *et al.* , 2006) und fand bei dieser Indikation bereits Anwendung bei der Linderung neuropathischer Schmerzen von Alkoholikern (Woelk *et al.* , 1998). Der Wirkmechanismus ist wahrscheinlich durch Inhibition des Diacylglycerol-Proteinkinase-C Stoffwechselwegs mitbedingt (Sánchez-Ramírez *et al.* , 2006). Da auch viele Dialysepatienten unter neuronalen Schmerzen oder u.a. auch am sogenannten restless legs Syndrom leiden, könnte mit Benfotiamin ein wichtiger und multikausaler Wirkstoff gefunden worden sein.

5 Zusammenfassung

Der Einsatz der Vitamin B 1 Vorstufe Benfotiamin hat sich im Tiermodell durch Verhinderung oder gar Aufhebung typischer diabetischer Folgeschäden wie Nephropathie, Retinopathie und Neuropathie ausgezeichnet. Diese Wirkung wird unter anderem der Aktivitätssteigerung des Enzyms Transketolase zugeschrieben, welches auch bei Dialysepatienten ohne diabetische Grunderkrankung supprimiert ist. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Auswirkungen einer oralen Benfotiaminsubstitution auf den Stoffwechsel von Langzeithämodialysepatienten zu untersuchen. Die 15 rekrutierten Patienten mit und ohne Diabetes mellitus erhielten über einen Zeitraum von 2 Monaten eine Dosis von 300 mg/d Benfotiamin, die in den folgenden 2 Monaten bis maximal 450 mg/d gesteigert wurde. Um einen Eindruck über den Verlauf der Entzündungssituation und des oxidativen Stresses zu gewinnen, wurden im Patientenvollblut AGEs und proinflammatorische Zytokine gemessen. Außerdem wurden peripheren Lymphozyten mit Hilfe des alkaline Comet-Assay und des Mikrokerntestes auf DNA-Schädigungen analysiert. In beiden Patientengruppen lässt die Senkung der Mikrokernraten den Schluss zu, dass Benfotiamin DNA-Schäden und somit eventuell das Krebsrisiko reduziert. Dieses vielversprechende Ergebnis korreliert jedoch nicht mit dem Resultat des Comet-Assay. Da hier der relative DNA-Schaden tendenziell ansteigt, sollte es Ziel weiterer Studien sein, diesen Sachverhalt an einem größeren Patientenkollektiv mit Kontrollgruppen zu überprüfen. Eventuell ist letzteres Testsystem wegen seiner hohen Sensitivität in diesem Fall nicht optimal geeignet. Außerdem sollte gezielt auf die beobachtete schnellere und stärkere Mikrokernsenkung der diabetischen Patienten eingegangen werden, da diese in der vorliegenden Studie zahlenmäßig unterrepräsentiert waren. Positiv zu bewerten ist der leichte CRP-Abfall sowie der Anstieg des Gesamtproteins und Albumin im Serum, was auf eine Reduktion der Mikroinflammation und oder eine verbesserte Ernährungssituation hinweist. Andererseits spricht der Anstieg des Neopterin- und Interleukin 6-Spiegels gegen die Veränderung des Inflammationsstatus. Entgegen der Erwartung ließ sich in dieser Studie keine Reduktion der zirkulierenden AGEs und AOPPs im Serum erzielen. Um eine Reduktion des

5 Zusammenfassung

oxidativen Stresses besser beurteilen zu können, sollten in Folgestudien direkte und leicht veränderliche Marker wie der Glutathionspiegel verwendet werden.

Zusammenfassend reduzierte Benfotiamin bei Hämodialysepatienten mit und ohne Diabetes mellitus DNA-Schäden in peripheren Lymphozyten bei unveränderter Inflammationssituation und steigerte die Plasmaproteinkonzentration. Dies wurde eventuell durch Reduktion von oxidativem Stress und oder Beeinflussung seiner Ursachen wie Reduktion von Urämietoxinen erreicht. Weitere klinische Studien sind notwendig, um dieses vielversprechende Medikament in der täglichen Praxis einsetzen zu können. Besonders vorteilhaft ist seine gute Verträglichkeit auch in hoher Dosierung. Darüber hinaus soll das Präparat auch neuropatische Schmerzen reduzieren, die sich bei Dialysepatienten häufig manifestieren, und wirkt somit multikausal.

Literaturverzeichnis

- ALBERT, F.W, JANZOWSKI, C., RATH, T., & MÜLLER, C. 2003. Oxidativer Stress bei chronischer Niereninsuffizienz. *Nephrologie im Dialog*, **1-03**, 8–11.
- ANNUK, MARGUS, SOVERI, INGA, ZILMER, MIHKEL, LIND, LARS, HULTHE, JOHANNES, & FELLSTRÖM, BENGT. 2005. Endothelial function, CRP and oxidative stress in chronic kidney disease. *J Nephrol*, **18**(6), 721–726.
- BABAEI-JADIDI, R., KARACHALIAS, N., KUPICH, C., AHMED, N., & THORNALLEY, P. J. 2004. High-dose thiamine therapy counters dyslipidaemia in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetologia*, **47**(12), 2235–2246.
- BASILE, CARLO. 2003. The effect of convection on the nutritional status of haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*, **18 Suppl 7**(Aug), vii46–9; discussion vii58–9.
- BAYNES, J. W., & THORPE, S. R. 1999. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes*, **48**(1), 1–9.
- BERRONE, ELENA, BELTRAMO, ELENA, SOLIMINE, CARMELA, APE, ALESSANDRO UBERTALLI, & PORTA, MASSIMO. 2006. Regulation of intracellular glucose and polyol pathway by thiamine and benfotiamine in vascular cells cultured in high glucose. *J Biol Chem*, **281**(14), 9307–9313.
- BLOCHING, M., HOFMANN, A., BERGHAUS, A., LAUTENSCHLÄGER, C., & GRUMMT, T. 2000. [Micronuclei as biological markers for the detection of local cancer transformation in the upper aerodigestive tract]. *HNO*, **48**(6), 444–450.
- BODLAJ, GERD, BERG, JÖRG, PICHLER, ROBERT, SAILER, THOMAS, & BIESEN-BACH, GEORG. 2004. Type 2 diabetes in patients with end-stage renal disease is not associated with further increased serum inflammatory parameters. *J Nephrol*, **17**(1), 112–117.
- BOLOGNESI, C., LANDO, C., FORNI, A., LANDINI, E., SCARPATO, R., MIGLIORE, L., & BONASSI, S. 1999. Chromosomal damage and ageing: effect on micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes. *Age Ageing*, **28**(4), 393–397.

Literaturverzeichnis

- BONASSI, S., HAGMAR, L., STRÖMBERG, U., MONTAGUD, A. H., TINNERBERG, H., FORNI, A., HEIKKILÄ, P., WANDERS, S., WILHARDT, P., HANSTEEN, I. L., KNUDSEN, L. E., & NORPPA, H. 2000. Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer independently of exposure to carcinogens. European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health. *Cancer Res*, **60**(6), 1619–1625.
- BROWNLEE, MICHAEL. 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, **414**(6865), 813–820.
- CHEUNG, ALFRED K, SARNAK, MARK J, YAN, GUOFEN, BERKOBEN, MICHAEL, HEYKA, ROBERT, KAUFMAN, ALLEN, LEWIS, JULIA, ROCCO, MICHAEL, TOTTO, ROBERT, WINDUS, DAVID, ORNT, DANIEL, LEVEY, ANDREW S, & GROUP, H. E. M. O. STUDY. 2004. Cardiac diseases in maintenance hemodialysis patients: results of the HEMO Study. *Kidney Int*, **65**(6), 2380–2389.
- CLASSEN, M., DIEHL, V., KOCHSIEK, K., & SCHMIEGEL, W. 2004. *Innere Medizin*. Urban und Fischer Verlag München, Jena, 5. Auflage.
- COMÍN-ANDUIX, B., BOREN, J., MARTINEZ, S., MORO, C., CENTELLES, J. J., TREBUKHINA, R., PETUSHOK, N., LEE, W. N., BOROS, L. G., & CASCANTE, M. 2001. The effect of thiamine supplementation on tumour proliferation. A metabolic control analysis study. *Eur J Biochem*, **268**(15), 4177–4182.
- DELFINO, VALERIA, CASARTELLI, GIANLUIGI, GARZOGGIO, BARBARA, SCALA, MARCO, MEREU, PAOLA, BONATTI, STEFANIA, MARGARINO, GIOVANNI, & ABBONDANDOLO, ANGELO. 2002. Micronuclei and p53 accumulation in pre-neoplastic and malignant lesions of the head and neck. *Mutagenesis*, **17**(1), 73–77.
- DESCAMPS-LATSCHA, B., HERBELIN, A., NGUYEN, A. T., ROUX-LOMBARD, P., ZINGRAFF, J., MOYNOT, A., VERGER, C., DAHMANE, D., DE GROOTE, D., & JUNGERS, P. 1995. Balance between IL-1 beta, TNF-alpha, and their specific inhibitors in chronic renal failure and maintenance dialysis. Relationships with activation markers of T cells, B cells, and monocytes. *J Immunol*, **154**(2), 882–892.
- DESCAMPS-LATSCHA, BÉATRICE, JUNGERS, PAUL, & WITKO-SARSAT, VÉRONIQUE. 2002. Immune system dysregulation in uremia: role of oxidative stress. *Blood Purif*, **20**(5), 481–484.
- ERTEN, YASEMIN, OZTÜRK, M. AKIF, OKTAR, SUNA, PASAOGLU, HATICE, REIS, KADRIYE ALTOK, DERICI, ULVER, ELBEG, SEHRI, GÜZ, GALIP, BALI, MUSA,

- ARINSOY, TURGAY, & SINDEL, SÜKRÜ. 2005. Association between neopterin and carotid intima-media thickness in hemodialysis patients. *Nephron Clin Pract*, **101**(3), c134–c138.
- ESAKOVA, OLGA A, MESHALKINA, LUDMILLA E, GOLBIK, RALPH, HÜBNER, GERHARD, & KOCHETOV, GERMAN A. 2004. Donor substrate regulation of transketolase. *Eur J Biochem*, **271**(21), 4189–4194.
- FAUST, FLORIANE, KASSIE, FEKADU, KNASMÜLLER, SIEGFRIED, BOEDECKER, ROLF HASSO, MANN, MARION, & MERSCH-SUNDERMANN, VOLKER. 2004. The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. *Mutat Res*, **566**(3), 209–229.
- FENECH, M. 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res*, **455**(1-2), 81–95.
- FORBES, JOSEPHINE M, COOPER, MARK E, OLDFIELD, MATTHEW D, & THOMAS, MERLIN C. 2003. Role of advanced glycation end products in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, **14**(8 Suppl 3), S254–S258.
- FORTH, W., HENSCHLER, & RUMMEL. 2001. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Urban & Fischer Verlag. 8. Auflage.
- FRANK, T., BITSCH, R., MAIWALD, J., & STEIN, G. 2000. High thiamine diphosphate concentrations in erythrocytes can be achieved in dialysis patients by oral administration of benfotiamine. *Eur J Clin Pharmacol*, **56**(3), 251–257.
- GADAU, S., EMANUELI, C., LINTHOUT, S. VAN, GRAIANI, G., TODARO, M., MELONI, M., CAMPESI, I., INVERNICI, G., SPILLMANN, F., WARD, K., & MADEDDU, P. 2006. Benfotiamine accelerates the healing of ischaemic diabetic limbs in mice through protein kinase B/Akt-mediated potentiation of angiogenesis and inhibition of apoptosis. *Diabetologia*, **49**(2), 405–420.
- GROSSMAN, E., MESSERLI, F. H., & GOLDBOURT, U. 2001. Antihypertensive therapy and the risk of malignancies. *Eur Heart J*, **22**(15), 1343–1352.
- HAMMES, HANS-PETER, DU, XUELIANG, EDELSTEIN, DIANE, TAGUCHI, TETSUYA, MATSUMURA, TAKESHI, JU, QIDA, LIN, JIHONG, BIERHAUS, ANGELIKA, NAWROTH, PETER, HANNAK, DIETER, NEUMAIER, MICHAEL, BERGFELD, REGINE, GIARDINO, IDA, & BROWNLEE, MICHAEL. 2003. Benfotiamine blocks three major pathways of hyperglycemic damage and prevents experimental diabetic retinopathy. *Nat Med*, **9**(3), 294–299.

Literaturverzeichnis

- HEIDLAND, A., SEBEKOVA, K., & SCHINZEL, R. 2001. Advanced glycation end products and the progressive course of renal disease. *Am J Kidney Dis*, **38**(4 Suppl 1), S100–S106.
- HEROLD, GERD, & MITARBEITER. 2004. *Innere Medizin*. Gerd Herold, Köln.
- HORN, F. 2002. *Biochemie des Menschen*. Thieme Verlag Stuttgart, 3. Auflage.
- IMANI, F., HORII, Y., SUTHANTHIRAN, M., SKOLNIK, E. Y., MAKITA, Z., SHARMA, V., SEHAJPAL, P., & VLASSARA, H. 1993. Advanced glycosylation endproduct-specific receptors on human and rat T-lymphocytes mediate synthesis of interferon gamma: role in tissue remodeling. *J Exp Med*, **178**(6), 2165–2172.
- KALOUSOVÁ, M., ZIMA, T., TESAR, V., STÍPEK, S., & SULKOVÁ, S. 2004. Advanced glycation end products in clinical nephrology. *Kidney Blood Press Res*, **27**(1), 18–28.
- KAWANO, HIROAKI, HAYASHI, TOMAYOSHI, KOIDE, YUJI, TODA, GENJI, & YANO, KATSUSUKE. 2005. Histopathological changes of biopsied myocardium in Shoshin beriberi. *Int Heart J*, **46**(4), 751–759.
- KOCHETOV, G. A. 2001. Functional Flexibility of the Transketolase Molecule. *Biochemistry (Moscow)*, **66**(10), 1077–1085.
- KOSCHINSKY, T., HE, C. J., MITSUHASHI, T., BUCALA, R., LIU, C., BUENTING, C., HEITMANN, K., & VLASSARA, H. 1997. Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): an environmental risk factor in diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**(12), 6474–6479.
- LOCATELLI, FRANCESCO, CANAUD, BERNARD, ECKARDT, KAI-UWE, STENVINKEL, PETER, WANNER, CHRISTOPH, & ZOCCALI, CARMINE. 2003. Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome. *Nephrol Dial Transplant*, **18**(7), 1272–1280.
- LOCATELLI, FRANCESCO, VECCHIO, LUCIA DEL, POZZONI, PIETRO, & MANZONI, CELESTINA. 2006. Nephrology: main advances in the last 40 years. *J Nephrol*, **19**(1), 6–11.
- LONSDALE, DERRICK. 2006. A review of the biochemistry, metabolism and clinical benefits of thiamin(e) and its derivatives. *Evid Based Complement Alternat Med*, **3**(1), 49–59.

- MAISONNEUVE, P., AGODOA, L., GELLERT, R., STEWART, J. H., BUCCIANTI, G., LOWENFELS, A. B., WOLFE, R. A., JONES, E., DISNEY, A. P., BRIGGS, D., MCCREDIE, M., & BOYLE, P. 1999. Cancer in patients on dialysis for end-stage renal disease: an international collaborative study. *Lancet*, **354**(9173), 93–99.
- MARTIN, PETER R, SINGLETON, CHARLES K, & HILLER-STURMHÖFEL, SUSANNE. 2003. The role of thiamine deficiency in alcoholic brain disease. *Alcohol Res Health*, **27**(2), 134–142.
- MASSRY, SHAUL G, & GLASSOCK, RICHARD J. 2000. *Massry & Glassock's Textbook of Nephrology*. 4 edn. Lippincott Williams & Wilkins.
- MEERWALDT, ROBERT, HARTOG, JASPER W L, GRAAFF, REINDERT, HUISMAN, ROEL J, LINKS, THERA P, DEN HOLLANDER, NYNKE C, THORPE, SUSAN R, BAYNES, JOHN W, NAVIS, GERJAN, GANS, RIJK O B, & SMIT, ANDRIES J. 2005. Skin autofluorescence, a measure of cumulative metabolic stress and advanced glycation end products, predicts mortality in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol*, **16**(12), 3687–3693.
- MIRCESCU, GABRIEL, CAPUȘĂ, CRISTINA, STOIAN, IRINA, VÂRGOLICI, BOGDANA, BARBULESCU, CARMEN, & URSEA, NICOLAE. 2005. Global assessment of serum antioxidant status in hemodialysis patients. *J Nephrol*, **18**(5), 599–605.
- MØLLER, PETER. 2006. The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, **98**(4), 336–345.
- PEPPA, MELPOMENI, URIBARRI, JAIME, CAI, WEIJING, LU, MIN, & VLASSARA, HELEN. 2004. Glycooxidation and inflammation in renal failure patients. *Am J Kidney Dis*, **43**(4), 690–695.
- PIETRZAK, I., CZARNECKI, R., BACZYK, K., MEYNARCZYK, M., & KACZMAREK, M. 2000. [The effect of cocarboxylase treatment on erythrocyte transketolase and blood thiamine in patients with end stage renal disease undergoing maintenance hemodialysis]. *Przegl Lek*, **57**(7-8), 369–373.
- RAJ, D. S., CHOUDHURY, D., WELBOURNE, T. C., & LEVI, M. 2000. Advanced glycation end products: a Nephrologist's perspective. *Am J Kidney Dis*, **35**(3), 365–380.
- SCHIFFMANN, D., & BONI, U. DE. 1991. Dislocation of chromatin elements in prophase induced by diethylstilbestrol: a novel mechanism by which micronuclei can arise. *Mutat Res*, **246**(1), 113–122.

Literaturverzeichnis

- SCHINZEL, R., MÜNCH, G., HEIDLAND, A., & SEBEKOVA, K. 2001. Advanced glycation end products in end-stage renal disease and their removal. *Nephron*, **87**(4), 295–303.
- SCHMIDT. *Dossier: Benfotiamin (HUMAN)*. Pharma Med.
- SCHOLLMAYER, P., & BOZKURT, F. 1988. The immune status of the uremic patient: hemodialysis vs CAPD. *Clin Nephrol*, **30 Suppl 1**, S37–S40.
- SCHREEB, K. H., FREUDENTHALER, S., VORMFELDE, S. V., GUNDERT-REMY, U., & GLEITER, C. H. 1997. Comparative bioavailability of two vitamin B1 preparations: benfotiamine and thiamine mononitrate. *Eur J Clin Pharmacol*, **52**(4), 319–320.
- SCHWEDLER, SUSANNE B, METZGER, THOMAS, SCHINZEL, REINHARD, & WAN-
NER, CHRISTOPH. 2002. Advanced glycation end products and mortality in hemodialysis patients. *Kidney Int*, **62**(1), 301–310.
- SHANGARI, N., BRUCE, W. R., POON, R., & O'BRIEN, P. J. 2003. Toxicity of glyoxals—role of oxidative stress, metabolic detoxification and thiamine deficiency. *Biochem Soc Trans*, **31**(Pt 6), 1390–1393.
- SINGH, R., BARDEN, A., MORI, T., & BEILIN, L. 2001. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia*, **44**(2), 129–146.
- STOPPER, H., & MULLER, S O. 1997. Micronuclei as a Biological Endpoint for Genotoxicity: A Minireview. *Toxicology in Vitro*, **11**(Oct), 661–667.
- STOPPER, H., MEYSEN, T., BÖCKENFÖRDE, A., BAHNER, U., HEIDLAND, A., & VAMVAKAS, S. 1999. Increased genomic damage in lymphocytes of patients before and after long-term maintenance hemodialysis therapy. *Am J Kidney Dis*, **34**(3), 433–437.
- STOPPER, H., BOULLAY, F., HEIDLAND, A., VIENKEN, J., & BAHNER, U. 2001. Comet-assay analysis identifies genomic damage in lymphocytes of uremic patients. *Am J Kidney Dis*, **38**(2), 296–301.
- STOPPER, HELGA, SCHINZEL, REINHARD, SEBEKOVA, KATARINA, & HEIDLAND, AUGUST. 2003. Genotoxicity of advanced glycation end products in mammalian cells. *Cancer Lett*, **190**(2), 151–156.

- STOPPER, HELGA, SCHUPP, NICOLE, BAHNER, UDO, SEBEKOVA, KATARINA, KLASSEN, ANDRE, & HEIDLAND, AUGUST. 2004. Genomic damage in end-stage renal failure: potential involvement of advanced glycation end products and carbonyl stress. *Semin Nephrol*, **24**(5), 474–478.
- STRACKE, H., HAMMES, H. P., WERKMANN, D., MAVRAKIS, K., BITSCH, I., NETZEL, M., GEYER, J., KÖPCKE, W., SAUERLAND, C., BRETZEL, R. G., & FEDERLIN, K. F. 2001. Efficacy of benfotiamine versus thiamine on function and glycation products of peripheral nerves in diabetic rats. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, **109**(6), 330–336.
- STRYER, L. 1999. *Biochemie*. 4 edn. Spektrum akademischer Verlag.
- SÁNCHEZ-RAMÍREZ, GABRIELA M, CARAM-SALAS, NADIA L, ROCHA-GONZÁLEZ, HÉCTOR I, VIDAL-CANTÚ, GUADALUPE C, MEDINA-SANTILLÁN, ROBERTO, REYES-GARCÍA, GERARDO, & GRANADOS-SOTO, VINICIO. 2006. Benfotiamine relieves inflammatory and neuropathic pain in rats. *Eur J Pharmacol*, **530**(1-2), 48–53.
- TESCHNER, M., GARTE, C., RUECKLE-LANZ, H., MAEDER, U., STOPPER, H., KLASSEN, A., & HEIDLAND, A. 2002. Inzidenz und Spektrum maligner Erkrankungen bei Dialysepatienten in Nordbayern. *Dtsch Med Wochenschr*, **127**(47), 2497–2502.
- THORNALLEY, P. J., BABAEI-JADIDI, R., ALI, H. AL, RABBANI, N., ANTONYSUNIL, A., LARKIN, J., AHMED, A., RAYMAN, G., & BODMER, C. W. 2007. High prevalence of low plasma thiamine concentration in diabetes linked to a marker of vascular disease. *Diabetologia*, **50**(10), 2164–2170.
- VAMVAKAS, S., BAHNER, U., & HEIDLAND, A. 1998. Cancer in end-stage renal disease: potential factors involved -editorial-. *Am J Nephrol*, **18**(2), 89–95.
- VLISSARA, H., & PALACE, M. R. 2002. Diabetes and advanced glycation end-products. *J Intern Med*, **251**(2), 87–101.
- WAGNER, ZOLTÁN, MOLNÁR, MÁRTA, MOLNÁR, GERGO A, TAMASKÓ, MÓNKA, LACZY, BOGLÁRKA, WAGNER, LÁSZLÓ, CSIKY, BOTOND, HEIDLAND, AUGUST, NAGY, JUDIT, & WITTMANN, ISTVÁN. 2006. Serum carboxymethyllysine predicts mortality in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis*, **47**(2), 294–300.
- WHO. 1991. *International Nomenclature of Diseases. Vol. IV Metabolic, Nutritional, and Endocrine Disorders*. Tech. rept. WHO.

Literaturverzeichnis

- WHO. 1999. *Thiamine deficiency and its prevention and control in major emergencies*. NHD/99.13. Tech. rept. WHO.
- WHO. 2004. *Vitamin and mineral requirements in human nutrition*. Tech. rept. WHO.
- WOELK, H., LEHRL, S., BITSCH, R., & KÖPCKE, W. 1998. Benfotiamine in treatment of alcoholic polyneuropathy: an 8-week randomized controlled study (BAP I Study). *Alcohol Alcohol*, **33**(6), 631–638.
- WU, SHAN, & REN, JUN. 2006. Benfotiamine alleviates diabetes-induced cerebral oxidative damage independent of advanced glycation end-product, tissue factor and TNF-alpha. *Neurosci Lett*, **394**(2), 158–162.
- YAO, Q., AXELSSON, J., HEIMBURGER, O., STENVINKEL, P., & LINDHOLM, B. 2004. Systemic inflammation in dialysis patients with end-stage renal disease: causes and consequences. *Minerva Urol Nefrol*, **56**(3), 237–248.
- YOSHIDA, KATSUNORI, KITAUCHI, TAKANORI, KIMURA, SHOUKI, YONEDA, TATSUO, UEMURA, HIROTSUGU, OZONO, SEIICHIROU, & HIRAO, YOSHIHIKO. 2002. Serum neopterin monitoring and vitamin E-modified, regenerated hemodialyzer membrane influence on biocompatibility. *Artif Organs*, **26**(1), 54–57.
- ZIMMERMANN, J., HERRLINGER, S., PRUY, A., METZGER, T., & WANNER, C. 1999. Inflammation enhances cardiovascular risk and mortality in hemodialysis patients. *Kidney Int*, **55**(2), 648–658.
- ZOCCALI, CARMINE, & KIELSTEIN, JAN T. 2006. Asymmetric dimethylarginine: a new player in the pathogenesis of renal disease? *Curr Opin Nephrol Hypertens*, **15**(3), 314–320.

Danksagung

Die vorliegende Promotionsarbeit wurde am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Würzburg, Lehrstuhl für Toxikologie (Vorstand: Professor Dr. W. K. Lutz) unter Anleitung von Frau Professor Dr. Helga Stopper, Professor Dr. August Heidland und Professor Dr. Udo Bahner durchgeführt. Ich möchte mich für die hervorragende und geduldige Betreuung sehr bedanken. Professor Dr. Heidland danke ich besonders für den vielen Kaffee und die konstruktiven Tipps bei der Ausarbeitung.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Stopper, die sich bei Problemen Zeit genommen haben und mir die Laborarbeit sehr erleichtert haben. Die Atmosphäre im Labor war immer sehr herzlich und man fühlte sich gut aufgehoben und integriert. Besonders Herr Michael Kessler und Frau Maria Scheurich waren immer ansprechbar und haben mir bei Problemen ihre Hilfe gerne angeboten. Sehr viel Zeit – trotz eigener Arbeitsbelastung – hat sich auch Dr. Nicole Schupp genommen um mir bei der Ausarbeitung wertvolle Tipps zu geben. Vielen Dank!

Ganz besonders möchte ich natürlich auch den Patienten des Kuratoriums für Dialyse danken, die sich freundlicherweise bereit erklärt haben an dieser Studie teilzunehmen. Sehr vielen Dank auch an die netten betreuenden Ärztinnen der Dialysestation, die mich bei der Auswahl der Patienten unterstützt haben und bei Fragen oder Problemen immer ein offenes Ohr hatten.

Abschließend ein riesiges Dankeschön an meine Eltern, die mich in aller erdenklicher Weise unterstützt haben und immer für mich da waren.

Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die Dissertation "Einfluss einer fortgesetzten Befotiamintherapie auf die Konzentration zirkulierender Advanced Glycation Endproducts, proinflammatorischer Zytokine und DNA-Läsionen bei Hämodialysepatienten" selbstständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen benutzt habe.

Ich erkläre ausserdem, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Wonfurt, den 3. Dezember 2007

Michaela Winkler

MICHAELA WINKLER

PERSÖNLICHE INFORMATION

- Familienstand: ledig
- Staatsangehörigkeit: deutsch
- Geburtsdatum: 18.01.1982
- Geburtsort: Haßfurt
- Eltern: Jürgen Winkler, Studienrat
Annemarie Winkler, Studienrätin

SCHULAUSBILDUNG

1988-1992 : Grundschule in Obertheres
1992-2001: Regiomontanus-Gymnasium Haßfurt

STUDIUM

2001-2003: Medizinstudium an der Julius-Maximilians-Universität, Würzburg, Vorklinik
2003: Physikum
ab 2001: Doktorarbeit am Toxikologischen Institut der Julius-Maximilians-Universität, Würzburg
2003-2006: Medizinstudium an der Julius-Maximilians-Universität, Würzburg, Klinik
2006-2007: Praktisches Jahr im Ausland und am Ausbildungskrankenhaus der Universität, Würzburg
1.Tertial:Pädiatrie
2.Tertial:Chirurgie
3.Tertial: Innere Medizin
2007: Staatsexamen, Neue AO

FAMULATUREN

3/2004 Kardiovaskuläres Praktikum der Herz- und Gefäßklinik GmbH Bad Neustadt
Kuratorium für Dialyse und Nierentransplantation, KfH, Würzburg
9/2004 Kinderchirurgie, Universität Würzburg
3/2005 Pädiatrie CHR Caen, Frankreich
3/2006

WEITERBILDUNG ZUM FACHARZT

Ab 12/2007 Assistenzarztstelle in der Chirurgie, CHR Sion, Wallis, Schweiz