Eisen, Kupfer und Lipidperoxide bei männlichen Patienten mit fortgeschrittener Koronaratherosklerose

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Andreas Klaus Stehr
aus Künzell

Gießen 2005

Aus dem Max-Planck-Institut für Klinische und Physiologische Forschung,
Bad Nauheim
Abteilung Hämostaseologie und Transfusionsmedizin

Direktor: Prof. G. Müller-Berghaus
Betreuer: Dr. I. S. Jovin

Gutachter: Prof. Dr. med. E. Baumgardt-Vogt

Gutachter: Prof. Dr. med. G. Müller-Berghaus

Tag der Disputation: 15.04.2005

Meinen Eltern

Marita und Dietmar Stehr

Inhaltsverzeichnis:

I.	**Einleitung**	**5**
	A. Lipide und Oxidation	6
	B. Eisenstatus und Oxidation	13
	C. Kupferstatus und Oxidation	18
	D. Oxidation und Atherosklerose	22
	E. Fragestellung	23
II.	**Probanden und Methoden**	**24**
	A. Studiendesign	24
	B. Patienten und Kontrollen	25
	C. Methoden	25
III.	**Ergebnisse**	**29**
	A. Studienpopulation	29
	B. Hämatologie	30
	C. Lipidstatus und Lipidperoxide	31
	D. Eisenstatus	34
	E. Kupferstatus	37
	F. Entzündungsparameter	37
	G. Endogen antioxidative Substanzen	38
	H. Korrelationen	40
IV.	**Diskussion**	**43**
	A. Hämatologie	43
	B. Lipide	43
	C. Eisenparameter	46
	D. Kupfer	47
	E. Antioxidative Substanzen	48
	F. Fazit	51
V.	**Literatur**	**52**
VI.	**Zusammenfassung**	**64**
VII.	**Danksagung**	**66**
VIII.	**Lebenslauf**	**67**

I. Einleitung

Fast die Hälfte aller Todesfälle in den westlichen, entwickelten Industrienationen, so auch in der Bundesrepublik Deutschland, wird durch Atherosklerose und ihre Komplikationen verursacht. Atherosklerose ist eine mit Lipidablagerung verbundene Erkrankung von Arterien, die zu einer durch Zellproliferation verursachten Einengung des Gefäßlumens führt **(1)**.

Eine Vielzahl traditioneller Faktoren **(2)**, wie Hyperlipidämie, erhöhte Low-Density-Lipoprotein-Cholesterin (LDL), reduzierte High-Density-Lipoprotein-Cholesterinwerte (HDL), das Missverhältnis von LDL-zu HDL-Cholesterin (LDL/HDL-Ratio) **(3)** aber auch Übergewicht, arterielle Hypertension **(4, 5, 129)**, Zigarettenrauchen **(6)**, Diabetes mellitus sind als klassische Risikofaktoren identifiziert worden **(7, 8, 61, 126, 129)**. Daneben wird die Rolle der Triglyzeride in der Entstehung der Atherosklerose unterschiedlich diskutiert, jedoch im Rahmen der Adipositas in Kombination mit einem erhöhtem LDL/HDL-Quotienten scheinen erhöhte Plasmatriglyzeride die Inzidenz einer koronaren Herzkrankheit stark zu erhöhen **(4)** wie die PROCAM-Studie zeigte **(9)**. Moderne Vorstellungen gehen von einer chronischen Entzündungreaktion **(124, 130)** des koronaren Gefäßbettes aus, die eine Reihe von weiteren Risikofaktoren wie Infektionen (Chlamydia pneumoniae, Cytomegalie-Virus), Antikörperbildung gegen Endothel und oxidativ veränderte Plasmalipide, erhöhtes Fibrinogen und ein Spektrum thrombogener Risikofaktoren einschließt **(2)**. Daneben etabliert sich zunehmend die Ansicht, dass die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies als organische Reaktion auf Scherkräfte, Überangebot an Energieträgern und individuelle Disposition zu verstehen ist **(127, 128, 129)**.
Weitere Lipid-Risikofaktoren stellen Lipoprotein (a) [Lp(a)] und die oxidativ veränderten Plasmalipide, in erster Linie das oxidativ modifizierte LDL-Cholesterin (LDLox), dar. Dem LDLox wird besonders im Initialstadium der Atherosklerose eine führende Rolle zugesprochen **(10)**.

Die Vorstellung, dass eine oxidative Veränderung der Plasmalipide, insbesondere des LDL-Cholesterins, die Entwicklung der Atherosklerose beschleunigt, ist schon etwa 20 Jahre alt. In den 80er Jahren fand man heraus, dass Plasmalipide durch

freie Radikale unterschiedlicher Herkunft sowie durch Übergangsmetalle, wie Eisen- oder Kupferionen, in ihrer Molekülform verändert werden können **(3)**. Seitdem nimmt man an, dass die oxidativ modifizierten Plasmabestandteile, insbesondere die oxidierten Lipidpartikel, eine der Hauptrollen in der Atherogenese spielen.

A. Lipide und Oxidation

1. Plasmalipide und Lipoproteinmetabolismus

Die von der Leber synthetisierten Very-Low-Density-Lipoproteine (VLDL) enthalten hauptsächlich endogene Triglyzeride und werden an das Blut abgegeben. In der ersten Kapillarpassage findet der Abbau durch die Lipoproteinlipase statt. Dabei entstehen die Intermediate-Density-Lipoproteine (IDL), die auch als VLDL-Remnants bezeichnet werden. IDL werden entweder rezeptorvermittelt direkt in die Zellen aufgenommen oder durch Abspaltung von Triglyzeriden in LDL umgewandelt, und bestehen dann aus Apolipoprotein B_{100} und Cholesterin sowie Cholesterinestern **(11)**. Der Low-Density-Lipoprotein-Partikel (LDL) ist etwa 15-25 nm groß, hat ein Lipid-Protein-Verhältnis von 78/22 und besteht damit hauptsächlich aus Apolipoprotein B_{100}, eingebettet in Cholesterin und Phospholipide und umgeben von Cholesterinestern und Triglyzeriden. Der LDL-Partikel ist relativ reich an antioxidativen Tocopherolen, ß-Karotinen und Ubiquinol-10 **(12)**. Er dient als Transportvehikel für Cholesterin im Plasma nach der Leberpassage.
Die Aufnahme in die extrahepatischen Zellen ist ein negativ rückgekoppelter Vorgang, der an Rezeptoren gebunden ist. Dabei adhäriert der LDL-Partikel an den Rezeptor, wird mit der Zellmembran in die Zelle aufgenommen und seine Bestandteile, hauptsächlich Cholesterinester, werden durch eine lysosomale Lipase hydrolysiert **(13)**. Der LDL-Partikel dient damit dem Transport von Lipiden an periphere Zellen und hat entscheidende nutritive, aber auch atherogene Eigenschaften. Native LDL-Partikel gelangen physiologischerweise durch die Endothelzelle in den subendothelialen Raum, sie kehren später aber wieder in den Blutstrom zurück. Dass dies so geschieht und die LDL-Partikel beziehungsweise das Cholesterin nicht in den glatten Muskelzellen der Gefäßwand selbst synthetisiert werden, wurde immunhistochemisch und durch Isotopen-Markierung nachgewiesen. HDL hingegen ist für den Cholesterintransport von der Peripherie

zur Leber zuständig. Es unterscheidet sich vom LDL durch einen anderen Proteinanteil, dem Apolipoprotein A, von dem es die Hauptunterfraktionen A1 und A2 gibt.
Lipoprotein(a) [Lp(a)] wird in der Leber synthetisiert. Die metabolische Rolle ist noch weitgehend unklar. Epidemiologisch bestehen jedoch keine Zweifel über seine atheroskleroseföndernde Wirkung. Einige Proteinstrukturen des Lp(a) sind mit denen des Plasminogens eng verwandt. Die Konzentration des im Plasma befindlichen Lp(a) ist weitgehend genetisch fixiert und hohe Konzentrationen sind besonders bei der früh auftretenden Koronaratherosklerose entscheidend.
Die Lipoproteinlipase ist ein Enzym, das die Herauslösung der Triglyzeride aus den triglyzeridreichen Partikeln der Chylomikronen und der VLDL katalysiert. Ihre hepatische Variante fördert den Abbau der HDL und IDL. Die Aufnahme der Plasmalipide in die Zellen erfolgt rezeptorgesteuert. Man kennt den LDL-Rezeptor, mit dessen Hilfe Cholesterin in die Zelle gelangt und gleichzeitig bei Aktivierung die endogene Produktion von Cholesterin unterbunden wird, um die Überladung mit Cholesterin zu vermeiden. Ebenso sorgen die VLDL-Rezeptoren für die Aufnahme von VLDL oder IDL in die Zelle. Des Weiteren sind eine Reihe von Scavenger-Rezeptoren bekannt, die sich auf der Oberfläche der Makrophagen befinden. Diese haben jedoch keinen Einfluss auf die Eigenproduktion von Cholesterin in den Makrophagen.

2. Die Lipid-Oxidations-Hypothese

Zahlreiche epidemiologische, klinische **(10)** und experimentelle Studien **(14)** stützen die Hypothese, die ein Missverhältnis von atherogenen Plasmalipiden zu vaskulär protektiven Lipiden für die Entstehung von Atherosklerose allgemein und der Koronaratherosklerose verantwortlich macht. Die zumeist langsam fortschreitende Erkrankung führt dazu, dass sich Krankheitssymptome erst im mittleren oder höheren Lebensalter manifestieren. Schon am Anfang des letzten Jahrhunderts fand man bei Sektionen in atherosklerotisch veränderten Aortenpräparaten erhebliche Mengen an Cholesterin und Cholesterinestern **(15)**.
Die atherogene Wirkung der erhöhten Plasma-Cholesterinkonzentration, insbesondere des Low-Density-Lipoprotein-Cholesterins (LDL) und auch schon oxidativ veränderter Plasmalipide, wurde in den 50er und 60er Jahren entdeckt

(16). Es wurde vermutet, dass aufgrund der Lipidperoxide eine Reihe sekundärer Substanzen zur Ablagerung kommen **(17, 18)**. In den 70er Jahren fanden **(13)** neben der rezeptorgesteuerten LDL-Aufnahme auch das Apolipoprotein B_{100}, das aus LDL-Partikeln stammen musste, in atherosklerotischen Plaques. Die Akkumulation der Lipide in der Gefäßwand konnte durch verminderten Efflux aus dem Gefäß oder Bindung an Mucopolysaccharidstrukturen bedingt sein **(19)**.
Mit der Elektronenmikroskopie konnte man die Herkunft der sogenannten Schaumzellen („foam cells“), die man in den Plaques fand, näher bestimmen. Zunächst ging man davon aus, dass es sich um mit kleinvakuoligen Lipidanteilen gefüllte glatte Muskelzellen handelte **(20)**, die jedoch augenscheinlich nicht mehr die Gestalt der Muskelzelle aufwiesen. Wenige Jahre später konnte man die lipidbeladenen glatten Muskelzellen der frühen Läsion („fatty streak“) von den großen Schaumzellen der fortgeschrittenen Läsionen differenzieren, man identifizierte die sogenannten „foam cells“ als mit Cholesterin und Cholesterinestern angefüllte Makrophagen **(21)**, die aus der monozytären Zellreihe hervorgegangen waren **(19, 22)**. Die Forschungsbemühungen der 80er Jahre standen ganz unter dem Einfluss der Oxidationstheorie **(23)**. Man fand in den atherosklerotischen Läsionen freie radikale Sauerstoffverbindungen, H_2O_2, radikale Fettstoffwechelprodukte und aggressive Entzündungsmediatoren, die alle ihren Teil zu einem oxidativen Milieu beitragen. Die Ablagerungen der Plaques selbst können wiederum Plasmalipide oxidieren. Man fand darin relativ hohe Konzentrationen an Eisen **(5)** und Kupfer **(24)**. Die oxidative Potenz der Übergangsmetalle **(25)**, wie Eisen und Kupfer, in Verbindung mit und ohne Lipidstoffwechselstörungen wurde von etlichen Autoren diskutiert **(7, 26, 27, 28).**
Auch wenn in jüngster Zeit oxidationsunabhängige Initiationsformen der Atherosklerose diskutiert werden, wobei der enzymatische An- und Umbau von LDL die Ablagerung bedingt, so bilden doch die Adhäsion und Aktivierung von Monozyten und deren Transformation **(132)**, die Freisetzung der Entzündungsmediatoren oder auch die Aktivierung des Komplementsystems die gemeinsame Endstrecke der Theorieansätze **(29)**.

3. Oxidation von Lipiden

In verschiedenen Oxidationsmodellen wurde die Anfälligkeit der Plasmalipide für eine Oxidation dargestellt. Meist arbeitete man mit isoliertem LDL, das einem prooxidativem Medium, das aktivierte Endothelzellen, Makrophagen, freie Radikale oder H_2O_2 enthielt, ausgesetzt wurde. Daraufhin bestimmte man die Bildung konjugierter Diene, thiobarbitursäurereaktiven Substanzen (TBARS), die Bildung von Aldehyden wie Malondialdehyd (MDA) oder die Änderung der Transmission im Fluoreszensassay bei 430nm **(30, 31)**. 1984 stellte die Arbeitsgruppe um Heinecke die unterschiedliche Oxidationsneigung von Plasmalipiden in Zellmedien heraus. In eisen- und besonders in kupferhaltigen Nährmedien fand in erheblichem Ausmaß eine Lipidoxidation statt, die mit der Messung von thiobarbitursäurereaktiven Substanzen nachgewiesen wurde. Dabei wurden in Kupfermedien doppelt so viele Oxidationsprodukte in kürzerer Zeit produziert wie in eisenhaltigen, jedoch kupferfreien Lösungen. Auch fiel auf, dass in zellfreien Medien, die Übergangsmetalle, insbesondere Kupferionen, enthielten, eine spontane Oxidation auftrat, während in metallionenfreien Lösungen, die auch frei von radikalen Verbindungen und Zellen waren, keine Modifikation stattfand **(26)**.
Mit der Zeit wurden Kupferionen zu einem Standardoxidationsmittel in zellfreien Plasmalipid-Oxidationsmodellen, indem man feste Kupfer/Lipid- Verhältnisse anwandte **(32, 33)**.

4. Lipidoxidation und Koronaratherosklerose

Die Lipidoxidation ist der entscheidende Prozess bei der Bildung von atherosklerotischen Veränderungen **(30, 34)**. Unter dem Einfluss von oxidativ wirksamen Substanzen werden zunächst die antioxidativen Substanzen des LDL-Partikels verbraucht, danach folgt die Oxidation seiner Lipidstrukturen **(35)** mit den daraus resultierenden Oberflächenveränderungen. Die oxidativ modifizierten Plasmalipide werden im Allgemeinen als LDLox bezeichnet, obwohl sie eine ausgesprochen heterogene Gruppe darstellen, und damit mitnichten ausschließlich der oxidierte Low-Density-Lipoprotein-Partikel gemeint ist **(36)**. Diese sprachliche Regelung hängt mit dem überwiegenden Anteil der LDLox Strukturen zusammen, die ihren Ursprung in den Bestandteilen des LDL-Partikels haben. Ohne Oxidation der

Plasmalipide ist ihr Shift aus dem Blutplasma in den Subendothelialraum und zurück unbehindert. Wenn LDLox in die Arterienwand aufgenommen wurde, ist die Abgabe in den Blutfluss gestört **(37)**. Man vermutet, dass sich die eigentliche Oxidation im Subendothelialspalt abspielt **(38)**.
Auch nach Oxidation von HDL-Cholesterin ist der Efflux aus den Zellen gehemmt. Die Ausdehnung der Läsion respektive die Schwere der koronaren Herzkrankheit korreliert gut mit der Anfälligkeit des LDL-Cholesterins zu Oxidation in vitro **(39)**. Dafür verantwortlich ist in erster Linie die Antigenität **(1)** des modifizierten LDL, wodurch die LDL-Partikel zum Ziel der Immunabwehr durch Gefäßwand-Makrophagen werden. LDLox wird phagozytiert. Die Makrophagen der Arterienintima können sehr effektiv phagozytieren, da sie an ihrer Oberfläche sogenannte „scavenger"- oder Acetyl-LDL-Rezeptoren exprimieren, die LDLox erkennen. Lange nahm man an, dass sie nur oxidativ veränderte Strukturen der LDL-Partikel-Peripherie erkennen, heute ist jedoch auch eine Reaktion auf lipidfreies Apolipoprotein B_{100} bekannt **(36)**. In Folge der geschilderten Vorgänge findet die Aufnahme von LDLox nicht negativ rückgekoppelt geregelt statt wie bei nativem LDL, sondern verläuft überschießend, was zur Anhäufung von Lipiden in den Makrophagen führt **(30, 34)**. Auch wird die eigene Cholesterinproduktion der Makrophagen durch die Aufnahme von LDLox nicht beeinträchtigt. Die Anhäufung von Cholesterin und LDLox äußert sich morphologisch im Auftreten von Schaumzellen (foam cells) in der Arterienintima. Damit wird zunächst einmal das modifizierte LDLox, das stark zytotoxisch ist, aus dem Kreislauf und aus dem interstitiellen Raum entfernt. Dieser Vorgang ist jedoch nicht effektiv, denn durch die weitere Aufnahme von morphologisch veränderten Lipiden werden die Makrophagen schwer geschädigt und gehen zugrunde **(3, 40)**. Durch den Untergang werden zum einen das LDLox, zum anderen auch die hochreaktiven Sauerstoffverbindungen, chemotaktische und proliferative Proteine, wie sie auch bei Infektionen oder Entzündungsreaktionen aktiv werden, freigesetzt. Der angestoßene Prozess setzt sich nun selbständig und potenziert fort. Auch an Stellen, wo Endothelzellen aus anderen Gründen geschädigt wurden, setzen diese mit Unterstützung der Makrophagen und glatter Muskelzellen in der Gefäßwand reaktive Mediatoren frei **(44, 45).** Dies verändert nachhaltig die Situation in der Arterienwand:

Es entsteht ein pro-oxidatives Milieu, dieses führt zur weiteren oxidativen Modifikation der LDL-Partikel respektive des Apolipoprotein B_{100} und seiner Bestandteile (Protein, Lipide, lipophile Antioxidantien). Die Modifikation beinhaltet sowohl die Oxidation als auch den An- und Umbau des LDL-Partikels, wodurch vermutlich unter Verwendung von Lysinresten und anderen Protein- und Fettsäurebruchstücken neue Epitope **(41)** entstehen oder durch Konformationsänderung freigelegt werden **(42,43)**. Die Läsionen in diesem Stadium nennt man fatty streaks, deren Rückbildung noch möglich ist, wie man bei Tierversuchen oder während Hungerperioden beim Menschen zeigte.
Wird der Endothelüberzug der fatty streaks durch die weitere Anhäufung von zytotoxischem LDLox im subendothelialen Raum zerstört, erfahren die Läsionen eine dramatische Progredienz. Durch die Endothelschäden bilden die Schaumzellen jetzt mit den Resten des untergegangenen Endothels, teils aktivierten, teils nekrotischen Makrophagen, T- Zellen und bindegewebigen Zellprodukten den gefäßluminalen Abschluss der Gefäßwand. Diese dem zirkulierenden Blut zugewandte Oberfläche bietet ideale Voraussetzungen zur Thrombozytenadhäsion. Mit der Adhäsion geht auch eine Aktivierung der Thrombozyten einher, die die Sezernierung verschiedener Wachstumsfaktoren wie platelet derived growth factor (PDGF) zur Folge hat **(44, 45)**. Nach neuerer Erkenntnis ist LDLox aber auch per se chemotaktisch für Makrophagen und Monozyten, die nach Aktivierung zytotoxische Verbindungen und Enzyme sezernieren, aber auch weitere Entzündungsmediatoren, wie MCP-1 und colony stimulating factor (CSF), und damit die Migration der ortständigen Makrophagen verhindern. Zusätzlich regen sie die Diapedese weiterer Blutmonozyten an und beschleunigen ihre Umwandlung **(46)**. Zellmediatoren wie tumor necrosis factor (TNF-α), Interleukin 1 (IL-1), transforming growth factor (TGF-ß1), wirken chemotaktisch auf Migration oder Proliferation der beteiligten Zellen. Aber auch einzelne Oxidationsprodukte der mehrfach ungesättigten Fettsäuren, wie das 4-Hydroxynonenal, haben diese Wirkung auf polymorphkernige Leukozyten **(47)**. Im weiteren Verlauf entwickelt sich daraus eine Läsion, in deren Bereich eine Proliferation glatter Muskelzellen stattfindet. Die fatty streaks und besonders die sich daraus entwickelnden fatty plaques werden durch Aktivierung von Fibroblasten mit einer bindegewebigen Kappe überzogen, die unter dem Einfluss der untergehenden Makrophagen und der damit verbundenen Freisetzung

proteolytischer Enzyme rupturieren kann. Diese Ruptur führt meist zur Bildung eines Parietalthrombus. Ebenfalls ist das Ablösen kalzifizierter Plaquebestandteile möglich, die dann Verschlüsse in der Peripherie verursachen. Der Untergang der Endothelien und der phagozytierenden Zellen zieht neben der Freisetzung der Enzyme auch eine Freisetzung von Cytotoxinen und, für die Progredienz der Atherosklerose wichtig, die Freisetzung freier Sauerstoffradikale oder deren Vorstufen sowie die Freisetzung von Metallionen aus ihren intrazellulären Speichern nach sich. Glatte Muskelzellen sind ebenfalls in der Lage, oxidative Prozesse zu starten, sie benötigen dazu jedoch Metallionen **(36)**, die sie durch den Untergang von Zellen erhalten. Diese Situation wird besonders verstärkt durch kurzzeitige Verschlüsse mit nachfolgender Reperfusion **(48, 49)**. Zusätzlich führt die Immunogenität der oxidativ modifizierten Low-Density-Lipoprotein-Partikel zur leichten Immunreaktion. Leicht heißt in diesem Falle, dass eine exzessive klonale Expansion der spezifischen B-Lymphozyten aus ungeklärten Gründen nicht stattfindet, jedoch Antikörper gegen LDLox gefunden wurden, die eine ausgeprägte Kreuzantigenität zu apoptotischen Zellen aufweisen **(36)** und zur Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen führt **(50)**. Durch diese Antigen-Antikörper-Komplexe werden wieder Monozyten zu Makrophagen transformiert und die ohnehin in Gang gekommene Entzündungsreaktion wird verstärkt sowie zusätzlich das bereits subendothelial gelegene LDLox in der Arterienwand durch T-Lymphozyten angegriffen, was zu weiterer Zellschädigung führt. Man vermutet, dass die Makrophagen durch ihren Fc-Rezeptor zusätzlich LDLox-Antikörper-Komplexe aufnehmen und dadurch die Bildung von Schaumzellen verstärkt wird. Das LDLox besitzt ebenfalls gerinnungsaktivierende Eigenschaften, die neben der rein mechanischen Einengung des Gefäßes, mit der Entstehung von Strömungsverlangsamung und der damit schon prokoagulativen Situation, ein zusätzliches Thromboserisiko bergen. Als Endstadium findet sich ein Verschluss des betroffenen Gefäßes mit der daraus resultierenden Ischämie des nachfolgenden Stromgebietes.

B. Eisenstatus und Oxidation

I. Eisenstatus

Viele Proteine enthalten Eisen, weil die überwiegend negative Ladung der Aminosäuren oder der in ihnen gebundene Schwefel Eisenionen oder andere Metallionen binden kann. Eisen ist in den physiologischen Transport- oder Resorptionsabläufen entweder zweifach oder dreifach positiv geladen.
Der menschliche Organismus verfügt etwa über 3-5 g Gesamteisen **(51)**. Dieses setzt sich zusammen aus Funktionseisen, ungefähr 70%, das in Hämoglobin (60%), Myoglobin (5%) und eisenabhängigen Enzymen (2%), sowie dem Speichereisen, das intrazellulär fest an Protein gebunden vorliegt **(52)**. Der Eisenhaushalt des Menschen ist sehr fein in engen Grenzen geregelt. Da er aber nicht über spezifische rückgekoppelte Ausscheidungsmechanismen verfügt, sondern nur durch Aufnahme seine Eisenverluste, die durch Abschilferung von Schleimhaut- oder Hautzellen entstehen, wieder zu decken sucht, kann man nicht von Regelung im engsten Sinne sprechen. Dennoch ist die Resorption und Aufnahme in die Zelle stark am Bedarf orientiert, so dass der menschliche Organismus in der Lage ist, bei gesteigertem Bedarf die Eisenhomöostase zu gewährleisten. Das hauptsächlich 3-wertige Nahrungseisen (Fe^{3+}) wird im sauren Milieu des Magens von seinen Proteinen gelöst und durch meist gleichzeitig aufgenommene reduzierende Substanzen (Ascorbinsäure, Cystein) in die zweiwertige Form (Fe^{2+}) überführt **(53)**. Das im Fleisch enthaltene Häm-Eisen ist zweiwertig und wird deswegen im Allgemeinen auch besser resorbiert, weil es in der Proteinbindung verbleibt, damit hydrophob vorliegt und gut membrangängig ist. Deswegen ist offenbar die Ernährung durch Fleisch und Fisch mit dem hohen Anteil an Häm-Eisen entscheidender als das Gesamtnahrungseisen für die Resorption und damit für die Verfügbarkeit im Organismus **(54)**. Im Gegensatz dazu ist pflanzliches Eisen durch die meist mit dem gleichen Nahrungsmittel aufgenommenen pflanzlichen Chelatbildner (Oxalate, Phosphate) weit weniger verfügbar als Häm-Eisen. Die eigentliche Resorption läuft vermutlich in drei Phasen ab: Zunächst wird Eisen von der Mucosazelle des Magens oder des Duodenums mit oder ohne Hilfe von Transferrin aufgenommen. Danach wird es zusammen mit Bikarbonat an mukosales Transferrin gebunden und zur gefäßluminalen Seite transportiert, um schließlich an Serumtransferrin, die Plasmavariante des Transferrins, gebunden zu zirkulieren. Die Sättigung des

Transferrins beträgt zwischen 20 und 50% **(55)**. Transferrin ist ein Einzelstrangmolekül mit zwei Eisenbindungsstellen und der stärkste bekannte biologische Eisenchelator. Durch die Bindung des Eisens an Transferrin erfährt das Protein eine Konformationsänderung und es werden Regionen des Moleküls freigelegt, die von einem Rezeptor (TfR) auf einer Zelloberfläche erkannt und gebunden werden können. Dieser Rezeptor wird von Zellen exprimiert, die einen Eisenbedarf haben **(52, 53)**. Nach Bindung an den Rezeptor **(56)** wird der ganze Komplex in die Zelle aufgenommen. Es entsteht ein Endosom mit saurem Medium. Bei pH 5,6 wird das Fe^{3+} vom Transferrin gelöst und gelangt auf bisher nicht bekanntem Weg in das Cytoplasma, wobei es reduziert wird. Der Transferrinrezeptor wird mit dem Apo-Transferrin, das noch fest am Rezeptor gebunden ist, bei weiterem Bedarf erneut in die Membran integriert, wobei sich das Transferrin bei Plasma-pH von 7,4 vom Rezeptor löst und zirkuliert **(57)**. Durch eisenabhängige Regulationsproteine (IRP) wird die Translation von Ferritin- und Transferrinrezeptor-mRNA gesteuert. Ist viel Eisen in die Zelle gelangt, so wird Ferritin produziert und TfR nicht weiter translatiert, im umgekehrten Fall wird der Rezeptor in die Zellmembran integriert und die mRNA des Ferritins supprimiert. Damit ist die Aufnahme im gesunden Körper streng an den Bedarf gebunden **(52)**.

Der Verlust an Eisen kommt durch den Verlust an Zellen im Rahmen der Abschilferung von Zellen der Schleimhaut und Epidermis zustande **(58)**. Dazu kommen noch die Verluste durch Schweiß und die Ausscheidung über die Gallenflüssigkeit, die bei gesunden Menschen ein Viertel bis die Hälfte der intestinalen Tagesresorption beträgt **(59)** sowie der Verlust über den Urin (ca. 0,1 mg/d). Die Ausscheidung mit dem Urin ist stark bedingt durch die Konzentration der im Plasma befindlichen Phosphate oder Oxalate, die das freie Plasmaeisen binden können und es so mit dem Harn ausscheidbar machen.

Insgesamt gehen täglich ungefähr 0,8-1,0 mg Eisen verloren. Das bezieht sich jedoch nur auf männliche Personen und die in Bezug auf den Eisenhaushalt ihnen vergleichbaren Frauen nach der Menopause. Der tägliche Bedarf an Eisen ist jedoch viel größer. Bei durchschnittlich 5 Litern Blut mit etwa 750g Hämoglobin und einem Hb-Fe von 2,5 g, von dem täglich ungefähr 0,8% ab- und wieder aufgebaut werden, ergibt sich ein täglicher Bedarf von 20 mg. Dazu kommt noch der Eisenanteil der eisenhaltigen Enzyme (5%). Der Gesamtumsatz beträgt also

25 mg. Eisen ist für den Organismus essentiell, daher wird es nahezu vollständig aus den abgebauten Proteinen reutilisiert. Damit bleibt es bei dem Tagesbedarf von 1-2 mg. Bei menstruierenden Frauen geht zusätzlich etwa 1mg Fe/d während der Monatsblutungen verloren. Man kann sich vorstellen, dass bei stärkeren, verletzungsbedingten oder chronischen Blutungen die Eisenverluste entsprechend ansteigen und gegebenenfalls symptomatisch werden. Zunächst beobachtet man einen sinkenden Serumferritinspiegel (bis ca. 15-20 ng/ml) und möglicherweise auch eine Verringerung der Transferrinsättigung unter 30%. Sinkt diese gar unter 16%, ist die basale Erythropoese nicht mehr gewährleistet. Eine erniedrigte Transferrinsättigung kombiniert mit einer vermehrten Transferrinkonzentration ist beweisend für einen Eisenmangelzustand. Ist zusätzlich auch die Hämoglobin-konzentration vermindert, spricht man von einer Eisenmangelanämie **(60)**. Da der Körper überschüssig resorbiertes Eisen nicht ausscheiden kann und durch starke Eisenverluste (z.B. Blutungen) vital gefährdet ist, wird dieses Eisen in dreiwertiger Form an Ferritin gebunden und gespeichert. Ferritin ist ein in der Leber gebildetes Makromolekül **(61)**, das aus 24 Untereinheiten gebildet wird und bei einer Molekülmasse von 440 kD im Inneren seiner Kugelform etwa 4500 Eisenatomen in Form von Eisenoxyhydroxydphospat Platz bietet. Das Speichermolekül befindet sich hauptsächlich intrazellulär. Es besteht eine Mikroheterogenität, was bedeutet, dass mehrere Isoferritine existieren, die sich durch das Verhältnis ihrer Untereinheiten unterscheiden. Dadurch ergeben sich oberflächliche Ladungsunterschiede, die sowohl für die Lokalisation als auch für die Funktion verantwortlich zu sein scheinen. In der Diskussion sind auch unterschiedliche Ferroxidase-Aktivitäten der Untereinheiten **(62, 63)**.

Die Inaktivierung von Eisenionen hängt von der Ferroxidase-Aktivität ab. Isoferritine mit überwiegend L - (light, 19.5 kD) Ketten kommen in den Speicherorganen Leber und Milz vor, die hohen H - (heavy, 21 kD) Anteile findet man in allen Geweben, besonders jedoch in Herz und RES. Bei Gewebsschäden (z.B. Entzündungen und Traumen) werden diese Ferritine ins Plasma ausgeschwemmt. Es gibt jedoch ein Isoferritin, das sich durch eine glykolysierte L -Kette auszeichnet, die für die Serumvariante spezifisch ist **(64)**. Referenzbereiche für Serumferritin werden unterschiedlich angegeben: Einige Autoren geben 100 ng/ml ± 60 ng/ml als Normwert an **(65)**, Werte von 160 - 180 ng/ml gelten als nicht mehr physiologisch **(66)**. Ferritin enthält etwa 25% seiner Masse in Form von

Eisen. Bei einer zweiten Speichermolekülform, dem Hämosiderin, handelt es sich vermutlich um ein Kondensat aus mehreren Ferritinmolekülen, dessen Gewichtsanteil an Eisen ca. 50% beträgt. Es besteht ein Austausch von Eisen zwischen Hämosiderin und Ferritin **(55, 62)**. Man kann eine Eisenüberladung („iron overload“) regelmäßig bei Patienten beobachten, die aus verschiedenen Gründen (z.B. Polytraumen, Thalassämien u.a.) häufig Erythrozytenkonzentrate erhalten haben **(67)** oder die an einer genetischen Hämochromatose (GH) leiden, die mit einer gesteigerten enteralen Eisenabsorption einhergeht **(59)**. Hier werden Werte über 700 ng/ml bis 6000 ng/ml Serumferritin gemessen. Um den Ort der Störung zu diagnostizieren, misst man die Transferrinsättigung. Steigt sie auf 70-80%, spricht dies für parenchymatöses Speichern. Ein Gesamtkörpereisen von mehr als 5 g, beziehungsweise 140 mg/kg Körpergewicht bedeutet Eisenspeicherung oder Eisenüberladung. Im umgekehrten Falle kann bei Personen mit Resorptionsstörungen oder bei einem akuten oder chronischen Blutverlust das Fe^{3+} aus seinem Ferritinspeicher in der Leber enzymatisch durch Ferritinreduktase zu Fe^{2+} reduziert und damit aus seiner Proteinbindung gelöst werden. Es wird dann an Serumtransferrin gebunden, wird dabei wieder 3-wertig, und kann zu Zellen mit Eisenbedarf transportiert werden **(68)**. Mit dem Alter wächst auch der Eisenspeicher. Man geht davon aus, dass 1 ng/ml Serumferritin eine Speichereisenmenge von 8-10 mg Fe schätzt. Mit der Zeit füllen sich die Eisenspeicher bei Männern mit etwa 1,3 ng/ml pro Jahr und bei postmenopausalen Frauen mit etwa 1,8 ng/ml pro Jahr **(60, 27)**. Ferritin, das von Zellen aller Organsysteme produziert werden kann, wird auch in Makrophagen exprimiert und steigt bei jedem Erythrozyteneisenabfall an. Der Anstieg wird bei Entzündungen noch verstärkt **(69)**, was man sich durch den Einfluss von Entzündungsmediatoren (besonders IL-1 und TNF-α) erklärt. Serumferritin ist ebenfalls ein sogenanntes Akutphase-Protein, das im Falle einer Entzündung oder eines Neoplasmas vermehrt exprimiert wird. Man hat entdeckt, dass schon innerhalb der ersten 24h einer Entzündung die Konzentration an Ferritin ansteigt. Des weiteren beobachtet man bei einer Entzündung eine Hypoferriämie, die für eingedrungene Mikroorganismen und auch Tumorzellen ein ungünstiges Medium darstellt, und von der angenommen wird, dass sie zu den unspezifischen Abwehrmechanismen des Körpers gehört **(64)**.Trotz entleerter Eisenspeicher tritt keine oder nur in äußerst seltenen Fällen eine Eisenmangelanämie auf. Sowohl für die Serumeisen- als

auch für die Serumferritinkonzentration besteht eine zirkadiane Periodik mit einem nächtlichen Minimum und einem Maximum in den Morgenstunden zwischen ca. 8 und 10 Uhr **(28)**. Um den Eisenstatus eines Patienten zu bestimmen, empfiehlt es sich den Terminus „Eisenstatus“ zunächst einmal zu definieren: Die meisten Untersucher verstehen darunter eine Zusammenfassung und Interpretation von Parametern, die den individuellen Eisenhaushalt eines Patienten charakterisieren. Darunter fallen Hämoglobinkonzentration, mittleres korpuskuläres Volumen (MCV) und Hämatokrit, zur Diagnose einer eventuellen Anämie; das Serumeisen, die Protoprophyrinkonzentration der Erythrozyten als Anhaltspunkt für eine eventuelle Erythropoesestörung; die Transferrinkonzentration und seine Sättigung als Hinweis auf die Transportkapazität des Plasmas und schließlich die Serumferritin-konzentration zur Abschätzung der intrazellulären Eisenspeicher. Die Definition des „Normalen Eisenstatus" in Hinblick auf das Risiko der Atherosklerose ist schwierig, da im Sinne einzelner Arbeitsgruppen, die den Zusammenhang zwischen dem Eisenhaushalt und dem kardiovaskulären Risiko untersuchen, das Fehlen von Eisenspeichern als "normal" gefordert wird, da ihrer Meinung nach schon das Vorhandensein von Eisenspeichern ein koronares Risiko birgt **(70, 71)**.

II. Eisen und Oxidation

Eisenionen sind in der Lage, Elektronen zu übertragen. Sie sind in ganze Systeme von Redoxreaktionen eingeschaltet. Aber sie sind streng an Proteine oder Enzyme gebunden, und der Organismus ist darauf ausgerichtet, auch kleinste freie Mengen dieser Ionen aus dem Plasma zu entfernen. Deshalb ist zum Beispiel das Transferrin nur schwach (20-50%) gesättigt, damit es sofort Ionen aufnehmen kann, sollten diese ungebunden zirkulieren **(72)**. Diese relativ feste Bindung, wie sie auch für Kupferionen an Albumin und Eisen an Serumferritin beobachtet wird, reicht jedoch nicht aus, diese gänzlich zu inaktivieren **(73)**.

Die folgende Gleichung zeigt die Entstehung von Lipidperoxiden durch an einen Proteinkomplex gebundene dreiwertige Eisenionen:

$$R\text{-}COOH + Fe^{3+}\text{ - Komplex} \longrightarrow R\text{-}CO^{\cdot} + [\,Fe(IV) = O\,]\text{ - Komplex} + H^{+}$$

$$\longrightarrow R\text{-}COO^{\cdot} + Fe^{2+}\text{- Komplex} + H^{+}$$

R-COOH = Fettsäure

Ebenfalls können unter dem Einfluss freier Eisenionen Sauerstoffradikale entstehen. Dies wird durch die erstmals 1894 veröffentlichte, nach seinem Entdecker benannte FENTON-Gleichung beschrieben:

$$Fe(II) + H_2O_2 \longrightarrow {\cdot}OH + OH^{-} + Fe(III)$$

Dabei entsteht das Hydroxylradikal und ein Hydroxydion.
Die Haber-Weiss-Reaktion beschreibt die durch Eisen katalysierte Entstehung von Hydroxyl-Radikalen aus H_2O_2 und O_{2-}:

(1) $Fe^{3+} + {\cdot}O^{2-} + H_2O \longrightarrow Fe^{2+} + H_2O_2$

(2) $Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + {\cdot}OH + OH^{-}$

Diese Reaktion ist allerdings, besonders mit an Eiweiß gebundenem Eisen, ein sehr ineffektiver Prozess.

C. Kupferstatus und Oxidation

1. <u>Kupferstatus</u>

Kupfer (Cu) ist ein wichtiger Bestandteil von Enzymen, die in Redoxreaktionen eingeschaltet sind. Die Kupferionen gehen aufgrund ihrer positven Ladung relativ feste, koordinierte Komplexbindungen mit ihren Protein-Partnern ein.
Diese Enzyme sind Oxidasen, wie Cytochrom-c-Oxidase, Monoamin-Oxidase, Katalase, die das hohe Redoxpotential der Kupferionen in die Lage versetzt,

Elektronen zu übertragen. Im Falle der kupferhaltigen Enzyme findet diese Übertragung meist auf Sauerstoffatome statt. Cytochrom-c-Oxidase ist ein Enzym der Atmungskette und mitochondrial gelegen. Die Monoamin-Oxidase (MAO) spielt im Stoffwechsel der Katecholamine eine bedeutende Rolle, sie desaminiert zum Beispiel Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin, natürlich auch viele andere Monoamine. Die in den Peroxisomen vorkommende Katalase, deren aktive Gruppe Häm ist, die aber auch Kupfer enthält, hilft beim Abbau des toxischen Wasserstoffperoxids. Man findet die Enzyme in allen Geweben des Körpers, meist intrazellulär je nach Stoffwechselfunktion in den Mitochondrien oder am endoplasmatischen Retikulum. Andere kupferhaltige Enzyme wie Ferrioxidasen finden sich im Plasma, wo sie im Eisenhaushalt wichtige Funktionen übernehmen. In den Erythrozyten gibt es ein weiteres Kupferenzym, die Zn,Cu-Superoxid-Dismutase (SOD), die neben Kupfer auch Zink enthält und Superoxidradikalen zu Wasserstoffperoxid umwandelt **(74)**. Die Lysyl-Oxidase sorgt in der Elastin- und Kollagenbiosynthese für die Quervernetzung der Fasern. Die Resorption des in der Nahrung enthaltenen Kupfers findet im Magen und oberen Dünndarm statt. Über den eigentlichen Resorptionsvorgang ist nur wenig bekannt. Man weiß jedoch, dass das resorbierte Kupfer in den Enterozyten an Metallothionin und dann im Plasma locker an Albumin und Transcuprein gebunden ist. Auch das niedrigmolare Histidin soll eine Transportfunktion haben. Die Kupferionen gelangen mit dem Portalblut in die Leber. Die Leber stellt das Zentralorgan des Kupferstoffwechsels dar. Von dort wird es in alle subzellulären Strukturen transportiert, wieder durch Metallothionein gespeichert und schließlich im Rahmen der Proteinbiosynthese in die entsprechenden Enzyme eingebaut. Caeruloplasmin ist ein 132kD großes Glykoprotein **(75)**, wird in der Leber gebildet und gelangt ins Plasma. Dort kann es 6 bis 7 Kupferatome transportieren **(76)**. Auch enthalten einige Kupferenzyme funktionelle eisenhaltige Häm-Gruppen. Die Gesamtkupfermenge des menschlichen Körpers beträgt etwa 40 bis 80mg. Mit steigendem Alter erhöht sich die Menge an Kupfer im Körper **(77)**. Davon zirkulieren 10% im Blut, 11% sind im Zentralnervensystem gespeichert respektive dort an Enzymen gebunden (MAO, Dopamin-Hydroxylase), 44% sind im Muskelgewebe lokalisiert, genauer in Superoxid-Dismutase (SOD) und in Enzymen der Atmungskette. Der Rest verteilt sich auf Bindegewebe und bindegewebige Anteile aller übrigen Gewebe. Der Plasmakupferspiegel, der sich aus einem direkt

reagierenden Anteil, dem Kupfer in lockerer Albumin- oder Transcuprein-Bindung, und dem indirekt reagierenden Anteil der kupferhaltigen Enzyme im Plasma, bei dem die Proteine erst säuredenaturiert werden müssen, zusammensetzt, beträgt 0,8 bis 1,5 mg/l. Zum Teil liegt Kupfer auch in niedermolekularer Form vor, so dass es durch die Niere abfiltriert werden kann. Daraus resultiert ein Verlust von etwa 30 bis 60 µg/Tag. Auch der physiologische Haarausfall trägt zum Verlust in unterschiedlicher Höhe bei. Den größten Teil des täglichen Gesamtverlustes machen aber die biliäre Ausscheidung (80%) und die Abschilferungen der Schleimhäute und der Zellverlust als Ganzes aus (20%). Insgesamt wird der tägliche Kupferverlust und damit der Bedarf auf etwa 2 mg geschätzt. Bei einer Resorptionsquote von 40-60% bedeutet das, dass ein gesunder Erwachsener täglich ungefähr 3-5 mg Cu aufnehmen muss, um seinen Bedarf zu decken **(78).** In krankheitsbedingten Situationen (Morbus Wilson) finden sich erniedrigte Caeruloplasmin-Konzentrationen mit hohen freien Kupferkonzentrationen. Oftmals tritt aber auch eine Metallothioninform auf, die durch eine Mutation Kupfer stärker bindet, wodurch Kupfer, das so gebunden die Leber erreicht, nicht in die Kupfer-enzyme eingebaut wird und damit durch seine unphysiologisch hohe Konzentration Zellschäden hervorruft. Es wurden auch Transportstörungen auf Ebene der Lysosomen in der Leber beobachtet, die dazu führen, dass Kupfer nicht mehr biliär ausgeschieden werden kann. In diesem Falle versucht man durch Gabe von Chelatbildnern Kupfer in Komplexen zu binden und so ausscheidungs-fähig zu machen sowie die Resorption zu reduzieren. Kupfermangelsituationen sind beim Menschen äußerst selten. Aus den oben genannten Enzymgruppen, die Kupfer enthalten, kann man sich verschiedene Funktionsstörungen erschließen. Da bei der Ferri-Oxidase I Kupfer- und Eisenstoffwechsel verknüpft sind, vermutet man bei Mangel an funktionstüchtiger Ferri-Oxidase I einen gestörten Eisen-haushalt, der sich unter Umständen in einer Eisendefizienz oder einer Eisen-mangelanämie äußern könnte. Ebenso sind Knocheninstabilität und Bindegewebs-schwäche vorstellbar. Zur Abschätzung der Kupfersituation kann man das Gesamtplasmakupfer, das heißt die Summe aus direktem, an Transcuprein und Albumin gebundenen, und indirektem Kupfer, das sich aus den stabilen Eiweißverbindungen der kupferhaltigen Enzyme nur nach Denaturierung der Proteine bestimmen lässt, heranziehen. Dazu ist allerdings zu sagen, dass die Menge des täglich ausgetauschten Coeruloplasmins, das den maßgeblichen Teil

am indirekt zu messenden Kupfer ausmacht, so klein ist, dass sie im Vergleich zum direkt messbaren Kupferanteil nicht ins Gewicht fällt und eine Bestimmung keine Indikation mehr hat **(53)**.

2. Kupfer und Oxidation

Die Oxidation von LDL-Partikeln durch kupferionenhaltiges Medium ist schon seit mehreren Jahren bekannt. Heute stellt sie eines der Standardverfahren zur Beobachtung von Oxidationsvorgängen am isolierten LDL-Partikel **(34)** dar. In den Studien, die Esterbauer anführt, versuchte man erfolgreich, die Stadien der Oxidation und die Entstehung der Oxidationsprodukte zu untersuchen, indem man den Oxidationsvorgang durch Zugabe von Cu^{2+}-Ionen in einem festen Lipoprotein/Cu-Verhältnis startete.

Entsprechend der Haber-Weiss-Reaktion durch Eisenionen lässt sich auch eine Reaktion durch Kupferionen beschreiben:

(1) $Cu^{2+} + {\cdot}O^{2-} + H_2O \longrightarrow Cu^{+} + H_2O_2$

(2) $Cu^{+} + H_2O_2 \longrightarrow Cu^{2+} + {\cdot}OH + OH^{-}$

Kupfer(II)Ionen können durch Makrophagen reduziert werden **(80)**.

Cu^{+} - Ionen reagieren sehr schnell mit Lipidhydroperoxiden.
Die Lipidoxidation durch Kupferionen stellt sich folgendermaßen dar:

$R\text{-}COOH + Cu^{+} \longrightarrow R\text{-}CO^{\cdot} + OH^{-} + Cu^{++}$

Mit der Entstehung von $R\text{-}CO^{\cdot}$ startet die Lipidoxidation innerhalb des LDL-Partikels **(33)**. In vitro Verhältnisse lassen sich jedoch nur bedingt auf die Situation in vivo übertragen. Es finden sich erstaunlich viele Kupferionen direkt im LDL-Partikel **(81)**, während dort nur extrem geringe Mengen Eisens messbar sind. Kupferionen sind im Vergleich zu Eisenionen sehr viel „aggressiver“ bei in vitro Oxidationsmodellen **(35, 82, 83)**.

3. Endogene oxidationsbeeinflussende Plasmasubstanzen

Unabhängig von Enzymsystemen, die die Aufgabe haben, reaktive Sauerstoffspezies zum Schutz des Organismus zu eliminieren, gibt es eine Anzahl von Proteinen oder weiteren Plasmasubstanzen, die antioxidative Wirkung zeigen, indem sie entweder selbst oxidiert werden und damit durch einen Verbrauch an pro-oxidativen Stoffen andere Plasmabestandteile wie Lipide etc. vor Oxidation schützen oder pro-oxidative Faktoren binden und damit deaktivieren. Als Beispiele seien hier Albumin, Harnsäure und Bilirubin genannt **(84)**.

Harnsäure, die durch die Xanthin-Oxidase und –Dehydrogenase vermittelte Oxidation von Hypoxanthin und Xanthin entsteht, kann einzelne Sauerstoffradikale, Hydroxyl- und Peroxylradikale binden. Ebenfalls kann es Übergangsmetallionen in einer Ionenbindung halten und damit am Elektronentransfer hindern. Eine Reaktion mit Harnsäure führt zum Uratradikal, das durch Askorbinsäure wieder reduziert werden kann.

Bilirubin als Abbauprodukt des Häm ist ein lipophiles, stark reduzierendes Agens, das Alpha-Tocopherol reduziert und damit dessen antioxidative Wirkung aufrechterhalten kann. Alpha-Tocopherol gilt als das Hauptantioxidans des LDL-Partikels. An Albumin gebunden ist es wasserlöslich und in allen extrazellulären Flüssigkeiten zu finden **(61)**.

Albumin kann Übergangsmetalle in einer Ionenbindung inaktivieren. Es dient als schnell ersetzbarer Eiweißkörper eine erste Barriere gegen Oxidation.

D. Oxidation und Atherosklerose

Die Bildung und die Aufrechterhaltung der Plasmalipidoxidation in der Arterienwand obliegen hauptsächlich zellulären Strukturen **(44)**, wobei den Makrophagen und neutrophilen Granulozyten eine tragende Rolle zukommt **(85)**. Die glatten Muskelzellen können nur indirekt durch die Generation von Sauerstoffradikalen das pro-oxidative Milieu unterstützen. Dieser Vorgang ist allerdings metallionenabhängig **(86)**. Während einer koronaren Okklusion und Ischämie und der darauf folgenden Reperfusion werden Radikale gebildet **(87)**. LDLox inhibiert die Wirkung des NO und verhindert damit die Relaxation des betroffenen Gefäßes **(88, 89)** sowie die Hemmung der Thrombozytenaktivierung

(90). Dagegen scheint HDL-Cholesterin, das per se keine gefäßrelaxierende Wirkung hat, diesen Effekt des LDLox wieder aufzuheben **(91)**. Lipidperoxide hemmen ebenfalls die Wirkung von Antithrombin III, was zu einer vermehrten Thrombozytenaggregation führen kann **(92)**.

E. Fragestellung

Eisen und Kupfer spielen eine weitreichende Rolle in physiologischen und pathologischen Oxidationsvorgängen. Die Oxidation der Plasmalipide ist in die Entstehung und Progression der Koronaratherosklerose involviert. Es stellen sich damit folgende Fragen:

- Haben Patienten mit Koronaratherosklerose erhöhte Plasmaeisen-konzentrationen respektive Eisenspeicher?
- Haben Patienten mit Koronaratherosklerose erhöhte Plasmakupfer-konzentrationen?
- Lässt sich ein Zusammenhang zwischen Lipidperoxiden und den genannten Metallen nachweisen?
- Haben Patienten mit Koronaratherosklerose verminderte endogene anti-oxidativ wirksame Plasmasubstanzen?

II. Probanden und Methoden

A. Studiendesign

Die Studie wurde im Design einer Fall-Kontroll-Studie durchgeführt. Alle teilnehmenden Individuen wurden über Zweck und Durchführung der Studie aufgeklärt und erteilten schriftliche Einwilligungserklärungen zur Studienteilnahme. Mittels eines Anamnesebogens wurden die zuvor definierten allgemeinen Ausschlusskriterien ermittelt:

- Akuter oder chronischer Blutverlust (durch akute Blutungen, Operationen oder chronische Magen-Darm- Erkrankungen),
- Blutspenden in anderen Institutionen,
- erhaltene Bluttransfusion,
- akute oder chronische Entzündungen in Verbindung mit entsprechenden Laborparametern [C-Reaktives Protein > 2mg/l und/oder Leukozyten > 10.000/µl],
- Einnahme von Eisen- und/oder Vitaminpräparaten.

Für die Kontrollprobanden wurden weitere spezielle Ausschlusskriterien festgesetzt:

- Mangelndes körperliches Wohlbefinden, Leistungsknick,
- pectanginöse Beschwerden,
- stattgehabter Myokardinfarkt oder kardiale Anamnese,
- Veränderungen im EKG oder Beschwerden während eines Belastungs-EKG (insbesondere Abbruch),
- Medikamentenanamnese.

B. Patienten und Kontrollen

1. Patienten

Teilnehmende Patienten waren Männer, die sich einer koronaren Bypass-Operation unterziehen mussten. In die Studie wurden alle diejenigen Patienten integriert, die entweder zur Operation stationär aufgenommen wurden oder sich aber zur ersten Eigenblutspende 4 bis 6 Wochen vor ihrem Operationstermin in der Abteilung für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin vorstellten. Nach Anwendung der Ausschlusskriterien verblieben 71 Männer als Patientengruppe.

2. Kontrollen

Als Kontrollgruppe wurden ebenfalls Männer herangezogen, die sich wegen einer routinemäßigen betriebsärztlichen Untersuchung in der Praxis des Berufsgenossenschaftlich-Arbeitsmedizinischen Dienstes BAD e.V., Giessen vorstellten. Nach Anwendung der Ausschlusskriterien für Kontrollprobanden verblieben nach Altersmatching ± 5 Jahre ebenfalls 71 Personen in der Studie.

C. Methoden

1. Probengewinnung

Patienten wie Probanden wurde, wegen tagesperiodischer Schwankungen der Eisenparameter, in einem Zeitraum von 8 bis 10 Uhr, neben der transfusions-medizinischen beziehungsweise betriebsärztlichen Routine, venöses Blut in eine 7,5ml Gel-Serum- und eine 7,5ml EDTA-Monovette® (Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland) entnommen. Die Venenpunktion erfolgte am liegenden Patienten nach möglichst kurzer Stauzeit.

Die EDTA-Probe wurde nach vorsichtigem Durchmischen sofort bei 4°C gekühlt. Innerhalb kurzer Zeit wurde das Plasma separiert und zur späteren Bestimmung der Lipidperoxid-Konzentration bei - 75°C tiefgefroren. Um die Lagerungsbe-

dingungen zu verbessern und die in vitro Oxidation des Plasmas unwahrscheinlich zu machen, wurde die Oberfläche der Probe vor dem Einfrieren mit gasförmigem Stickstoff überschichtet **(94)**. Ebenfalls wurde eine Serumprobe eingefroren. Die Bestimmung der untersuchten Parameter erfolgte sofort im Rahmen der Routine-Labordiagnostik im Zentrallabor der Kerckhoff-Klinik, Bad Nauheim.

2. Blutbild

Ein kleines Blutbild (Leuko-, Erythro- und Thrombozytenzahl, Hämatokrit, Hämoglobinkonzentration, mittleres korpuskuläres Volumen, mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration) wurde mit SYSMEX® K 1000 (Sysmex, Hamburg, Deutschland) bestimmt.

3. Lipidparameter

Mit dem Analysesystem Hitachi® 717 (Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland) wurden Gesamtserumcholesterin nach der CHOD-PAP-Methode, HDL-Cholesterin durch die Fällungsreaktion mit Phosphorwolframsäure und Magnesiumchlorid sowie die Triglyzeridkonzentration mit der Glyzerin-Farbreaktion nach den Anweisungen des Herstellers im Rahmen der Laborroutine bestimmt.

Die LDL-Cholesterin-Konzentration wurde mit der Formel nach Friedewald **(95)** berechnet. Die Bestimmung von Apolipoprotein B_{100} erfolgte mit dem Trübungstest Tina quant® für Hitachi 911 nach Anweisung des Herstellers (Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland).

Diese Bestimmungen wurden im Rahmen der Laborroutine ausgeführt.

4. Plasmalipidperoxide (LPO)

Für die Bestimmung der Konzentration der Lipidperoxide (LPO) in EDTA - Plasma bedienten wir uns der Hämoglobin-Methylblau-Methode, auf deren Grundlage der K - Assay® LPO-CC (Kamiya Biomedical Company, Thousand Oaks, CA, USA) arbeitet. Ein farbloses Derivat des Methylenblaus, das 10-N-Methylcarbomyl-3,7-dimethylamino-10-H-phenothiacin (MCDP), reagiert mit Lipidhydroperoxiden in Anwesenheit von Hämoglobin als Katalysator infolge Abspaltung eines Molekül-

teils zu einem farbigen Derivat. Diese Reaktion erzeugt einen Farbumschlag, dessen Intensität der Konzentration der Hydroperoxide in der Messlösung direkt proportional ist. Die photometrische Bestimmung der Methylenblaukonzentration (Absorption bei 675 nm) ergibt damit die Konzentration an Hydroperoxiden im Plasma. Dieser Test misst spezifisch die Lipidperoxide, andere Oxidationsprodukte wie Formaldehyd, Malondialdehyd oder H_2O_2 ergeben keine Farbreaktion **(96, 97, 98)**. Der Test wurde nach Anweisung der Firma Kamiya Biomedical Company für das Hitachi 911 Analysesystem (Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland) adaptiert. Diese sah eine interne Verdünnungsreihe in 6 Stufen mit einer 50 µmolaren Cuminperoxid-Lösung vor. Die Hauptwellenlänge des Messvorgangs betrug 660 nm, die Nebenwellenlänge 800 nm. EDTA-Plasma**,** Reagenz 1 (Ascorbinoxidase,14 U/ml; Lipoproteinlipase, 1,3 U/ml in 100mM Goods Puffer) und Reagenz 2 (MCDP 0,04mM, Hämoglobin, 67,5 µg/ml in 100mM Goods Puffer) wurde in Verhältnissen 1:30:60 pipettiert, mit Inkubationszeiten von 5 Minuten nach der Pipettierung von R 1 respektive 10 Minuten nach Pipettierung von R 2 bis zum Messvorgang.

5. Eisenparameter

Die Bestimmung der Eisenparameter erfolgte im Routinelabor

a) Serumeisen

Die Werte für Serumeisen wurden durch die Ferrozin-Methode modifiziert für Hitachi® 717 (Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland) ermittelt unter Beachtung der Herstellerhinweise.

b) Transferrin

Die Bestimmung von Transferrin erfolgte gemäß den Laboranleitung des Herstellers mittels des immunologischen Trübungtests Tina quant® für Hitachi 911, (Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland). Die Transferrinsättigung wurde näherungsweise durch Quotienten aus Serumeisenkonzentration in µg/dl und der Transferrinkonzentration in mg/dl multipliziert mit dem Faktor 70.9 berechnet **(99)**.

c) Serumferritin

Die Serumferritinkonzentration wurde durch einen ELISA/Einschritt-Sandwich-Assay mit Streptavidin - Technologie, Enzymun-Test® für ES 700 (Boehringer Mannheim Immundiagnostica, Mannheim, Deutschland) nach Anweisungen des Herstellers bestimmt.

6. Kupfer

Die Bestimmung der Gesamtserumkupferkonzentration erfolgte nach Enteiweissung mit der Bathocuproin-Methode **(100)**, manuell angewendet in Merckotest® Kupfer (Merck, Darmstadt, Deutschland). Nach Laboranweisung des Herstellers wurde eine 500µl-Serumprobe zunächst mit 500µl Reduktionslösung (1molare HCl, 90 mmolare Hydrochinonlösung) für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann mittels 20%iger Trichloressigsäure und nachfolgender Zentrifugation enteiweisst. Schließlich wurden 500µl des Überstandes mit 200µl Farbreagenz (0,9 mmolare Bathocuproindisulfonsäurelösung, 3,0 molare Ammoniumacetatlösung) für 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 492 nm Wellenlänge mit dem 6010 Photometer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) gegen eine Blindprobe gemessen. Der Quotient aus Probenextinktion und Standardextinktion multipliziert mit der Standardkonzentration (200µg/dl) ergab die Gesamtkupferkonzentration der Serumprobe.

7. Antioxidativ wirksame Substanzen

Die Harnsäurekonzentration wurde durch den Chinonimin-Farbtest, die Gesamtbilirubinkonzentration nach der DPD-Methode und das Serumalbumin nach der Bromcresolgrün-Methode ermittelt. Diese Testmethoden wurden nach Anweisungen des Herstellers auf Hitachi® 717 (Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland) im Rahmen der Laborroutine durchgeführt.

8. Entzündungsparameter

Das C-reaktive-Protein wurde mit dem immunologischen Trübungtest Tina quant® für Hitachi 911 gemäß den Anweisungen des Herstellers (Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland) durch das Routinelabor bestimmt.

9. Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte unter Verwendung des Statistikprogrammes SPSS for Windows 10.0. Die Normalverteilung der Parameter wurde mit dem Test nach Kolmogorov-Smirnov überprüft. Bei normalverteilten Parametern wurde der Student´s t-Test eingesetzt, nicht normalverteilte wurden nach Mann-Whitney beziehungsweise nach Wilcoxon auf Unterschiedlichkeit getestet. Korrelationen wurden nach der Spearman-Methode untersucht. Bei einer Fehlerwahrscheinlichkeit von 5% ($p < 0,05$) wurde ein Ergebnis als statistisch signifikant betrachtet.

III. Ergebnisse

A. Studienpopulation

1. Patienten

Von den 99 Patienten, die zur Koronarbypass-Operation angemeldet waren und an der Studie teilnahmen, wurden 28 Personen ausgeschlossen, weil sie Ausschlusskriterien erfüllten. Damit verblieben 71 Fälle in der Patientengruppe mit einem Durchschnittsalter von 55.9 ± 7.4 Jahre (MW±SD). In dieser Gruppe waren 19 Nichtraucher, 46 ehemalige Raucher und 6 aktive Raucher. 11 Patienten litten unter manifestem Diabetes mellitus und 35 wiesen einen abgelaufenen Myokardinfarkt in der Krankengeschichte auf.

2. Kontrollen

In der Kontrollgruppe waren 71 gesunde Männer ohne klinische oder elektrophysiologische Hinweise auf eine koronare Herzkrankheit. Diese Personen waren nach Alter ± 5 Jahre mit der Patientengruppe gematched. Das Durchschnittsalter war 55,6 ± 6,5 Jahre (MW±SD). Von den 71 verbleibenden Personen in der Kontrollgruppe hatten 33 nie geraucht, 21 rauchten nicht mehr und 17 waren aktive Raucher. Drei Kontrollprobanden litten unter einem manifesten Diabetes mellitus.

Demographische Daten der beiden untersuchten Gruppen sind in Tabelle 1 dargestellt.

B. Hämatologie

Patienten und Kontrollgruppe zeigten keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf Hämoglobingehalt, Hämatokrit, Erythrozyten-, Leukozyten- oder Thrombozytenzahl. Ebenfalls waren die Zellvolumina (MCV) und der zelluläre Hämoglobingehalt (MCHC) nicht verändert. Eine Werteübersicht findet sich in Tabelle 2 (S.31).

Tabelle 1: Demographische Daten der Studienteilnehmer

	Kontrollen	Patienten
N	71	71
Alter (Jahr)	55.6 ± 6.5	55.9 ± 7.4
body mass index (kg x m^{-2})	27.42 ± 3.50	26.68 ± 3.04
Raucher	17	6
Nichtraucher	33	19
ehemaliger Raucher	21	46
Diabetes mellitus	3	11
Arterieller Hypertonus	0	37
Schweregrad der KHK bei Patienten		
Ein-Gefäß-KHK	---	18
Zwei-Gefäß-KHK	---	36
Drei-Gefäß-KHK	---	17
akuter Myokardinfarkt in Anamnese	---	32

Tabelle 2: Ergebnisse des Blutbildes der Studienteilnehmer

	Kontrollen	Patienten	Signifikanz
Hämoglobin [g/dl]	15.0 ± 1.0	15.3 ± 1.0	n.s.
Hämatokrit [%]	45.1 ± 3.0	44.4 ± 3.0	n.s.
Erythrozytenzahl[mio/µl]	5.02 ± 0.3	4.88 ± 0.42	n.s.
MCV [fl]	89.7 ± 3.8	90.9 ± 4.4	n.s.
MCHC [g/dl]	33.4 ± 0.9	34.3 ± 1.7	n.s.
MCH [pg/Erythrozyt]	29.9 ± 1.3	31.4 ± 1.5	n.s.
Leukozytenzahl [T/µl]	5.9 ± 1.3	6.5 ± 1.5	n.s.
Thrombozytenzahl [T/µl]	220 ± 42	210 ± 54	n.s.

C. Lipidstatus und Lipidperoxide

1. Plasmalipide

Die Serumlipidkonzentrationen beider Gruppen unterschieden sich in allen Parametern signifikant. Die Triglyzeride wurden bei den Patienten mit 220 ± 142 mg/dl höher gemessen als bei den Kontrollen, deren Proben 163 ± 96 mg/dl enthielten (p=0,005; Abbildung 1). Für das Gesamtcholesterin (p=0,025) ergab sich bei den Patienten ein Wert von 242 ± 61 mg/dl und 223 ± 37mg/dl bei den Kontrollen. Die Patienten hatten durchschnittlich mehr LDL-Cholesterin (p=0,01), das mit 162 ± 47mg/dl und mit 145 ± 35 mg/dl bei den Kontrollen gemessen wurde (Abbildung 2). Die Patienten zeigten bei der Untersuchung mit durchschnittlich 37 ± 13mg/dl weniger HDL-Cholesterin (p<0,0001) als die Kontrollen, bei denen HDL-Cholesterin-Werte von 46 ± 10mg/dl gemessen wurden.

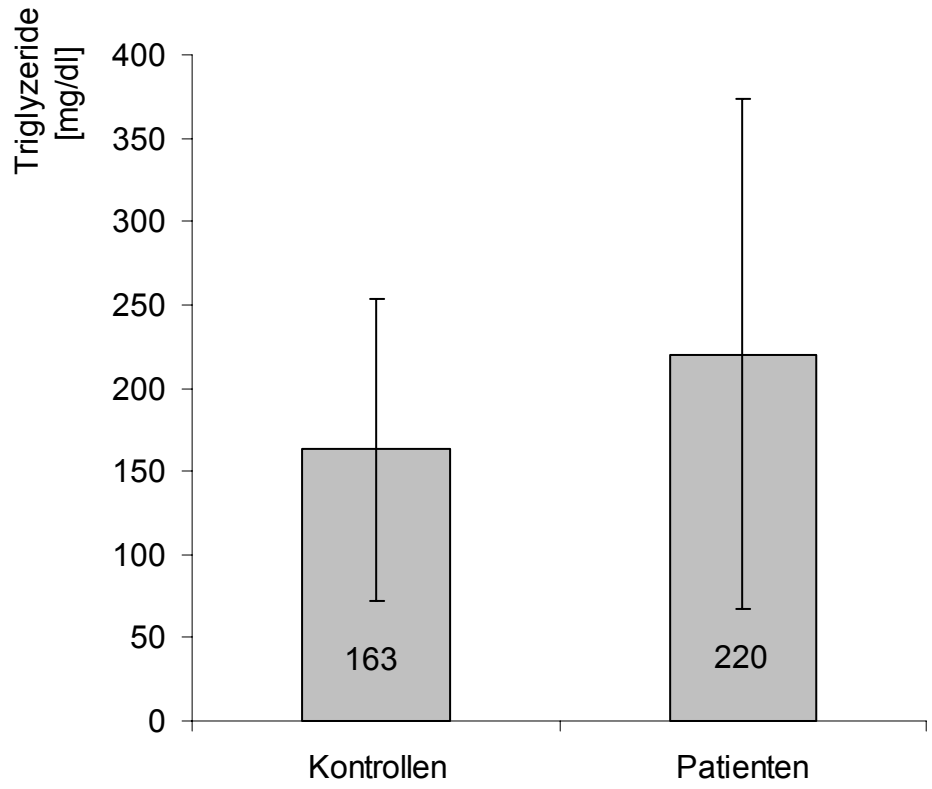

Abbildung 1: Triglyzeridkonzentration der Studienteilnehmer (MW ± SD, p=0,005)

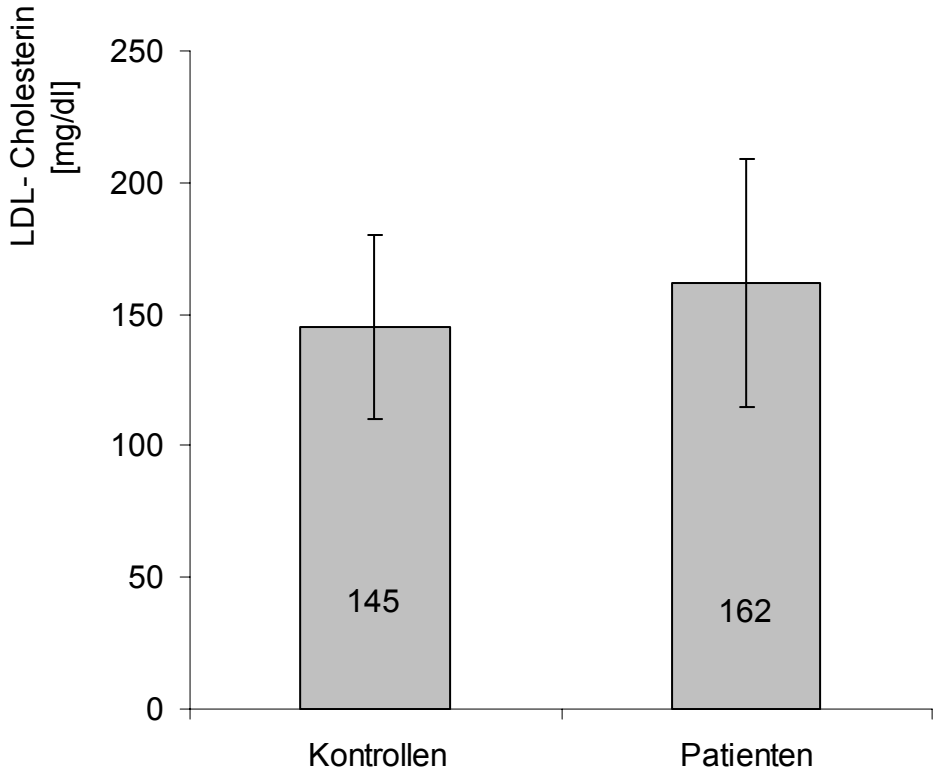

Abbildung 2: Low-Density-Lipoprotein-Cholesterinwerte der Studienteilnehmer (MW ± SD, p=0,01)

2. Lipidperoxide

Es zeigte sich, dass die Patientengruppe eine deutlich erhöhte Plasmalipidperoxidkonzentration aufwies, der Median lag bei 2,95 nmol/ml (Wertebereich von 1,3 bis18,1 nmol/ml), während die Proben der Kontrollen einen Median von 1,6 nmol/ml (Wertebereich 0,9-9,6 nmol/ml) aufwiesen (p<0,0001; Abbildung 3).

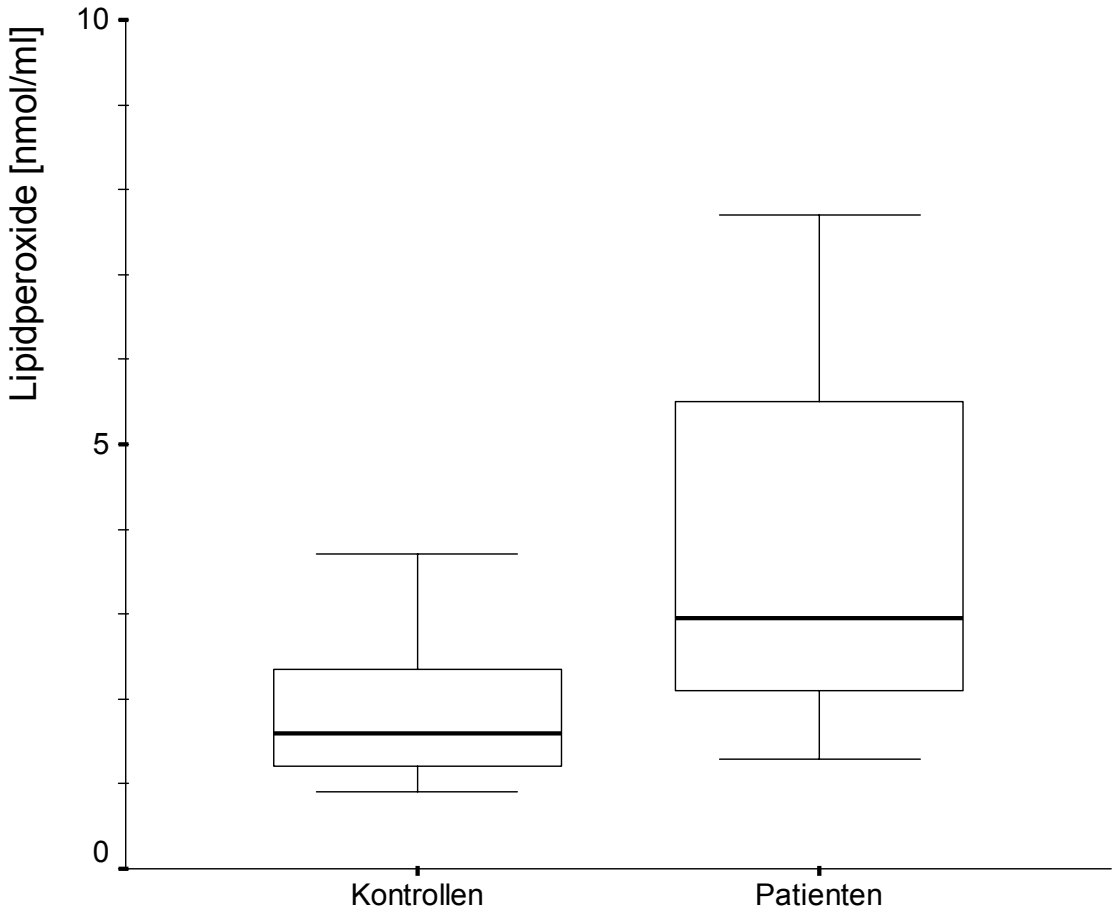

Abbildung 3:Lipidperoxidkonzentration im Boxplot dargestellt mit Median, 25%-75%-Perzentile, sowie dem Wertebereich (p<0,0001)

D. Eisenstatus

Ein Unterschied in Bezug auf den Eisenhaushalt ließ sich weder beim Serumeisenspiegel (Abbildung 4) noch bei der Serumferritinkonzentration (Abbildung 5) nachweisen, jedoch gab es eine signifikante Abweichung zwischen den Gruppen bei der Transferrinkonzentration und einen Trend für die Transferrinsättigung.
Die Transferrinkonzentration betrug 238mg/dl ± 38mg/dl bei den Patienten und 288mg/dl ± 58mg/dl in der Kontrollgruppe (p<0,0001).

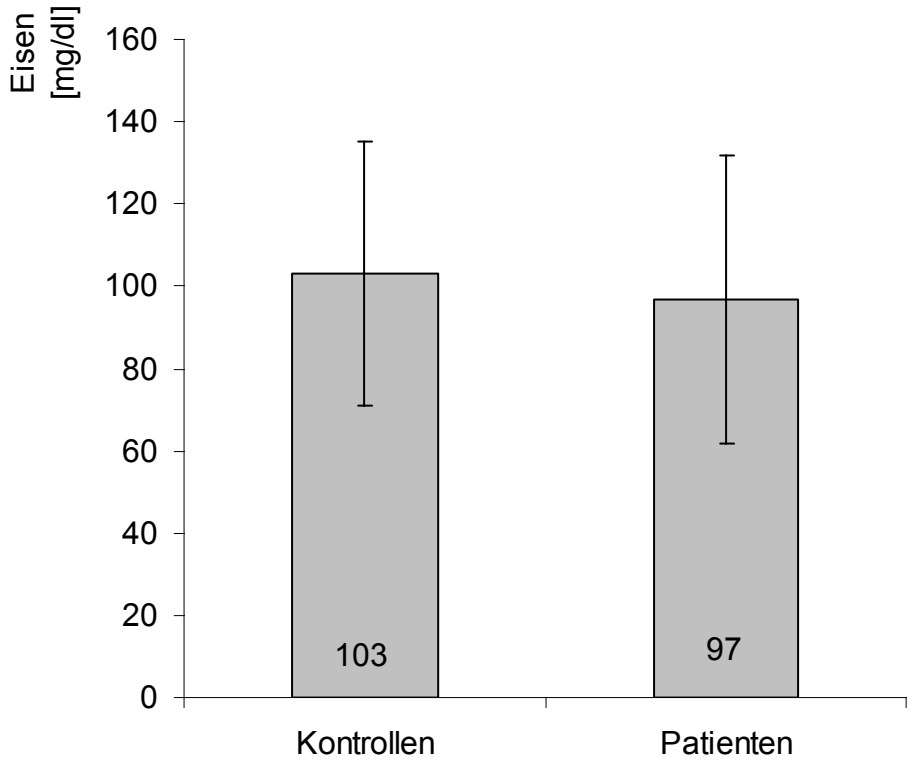

Abbildung 4: Plasmaeisenkonzentration der Studienteilnehmer (MW ± SD, nicht signifikant)

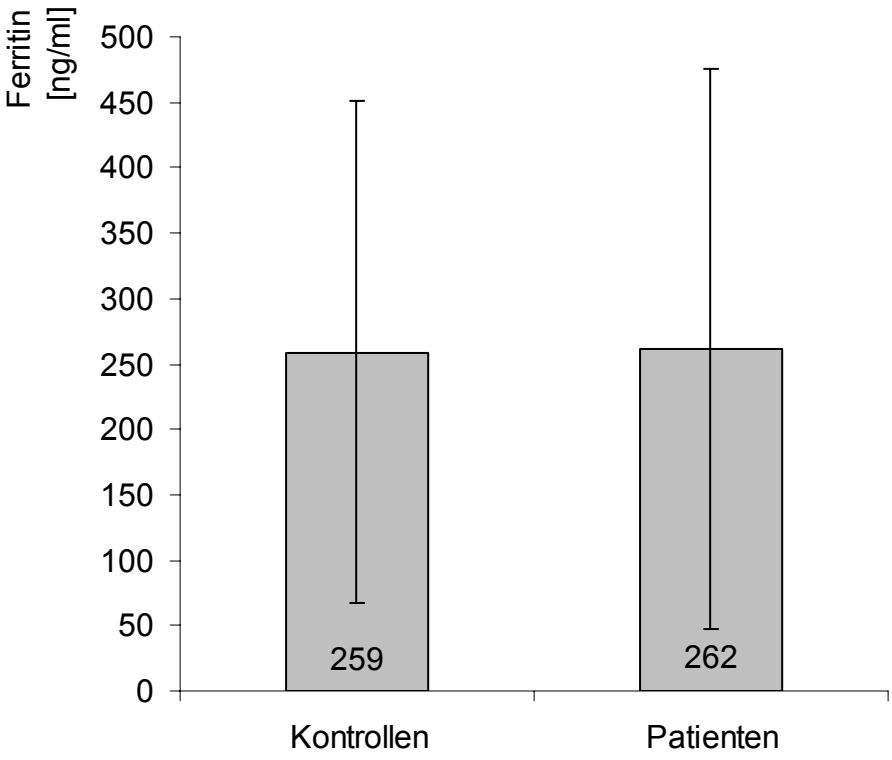

Abbildung 5: Serumferritinkonzentration der Studienteilnehmer (MW ± SD, nicht signifikant)

Die Sättigung des Transferrins wurde rechnerisch ermittelt und unterschied sich nicht signifikant (p=0,09), wobei sie bei den Patienten tendenziell höher war als bei den Kontrollen (Abbildung 6).

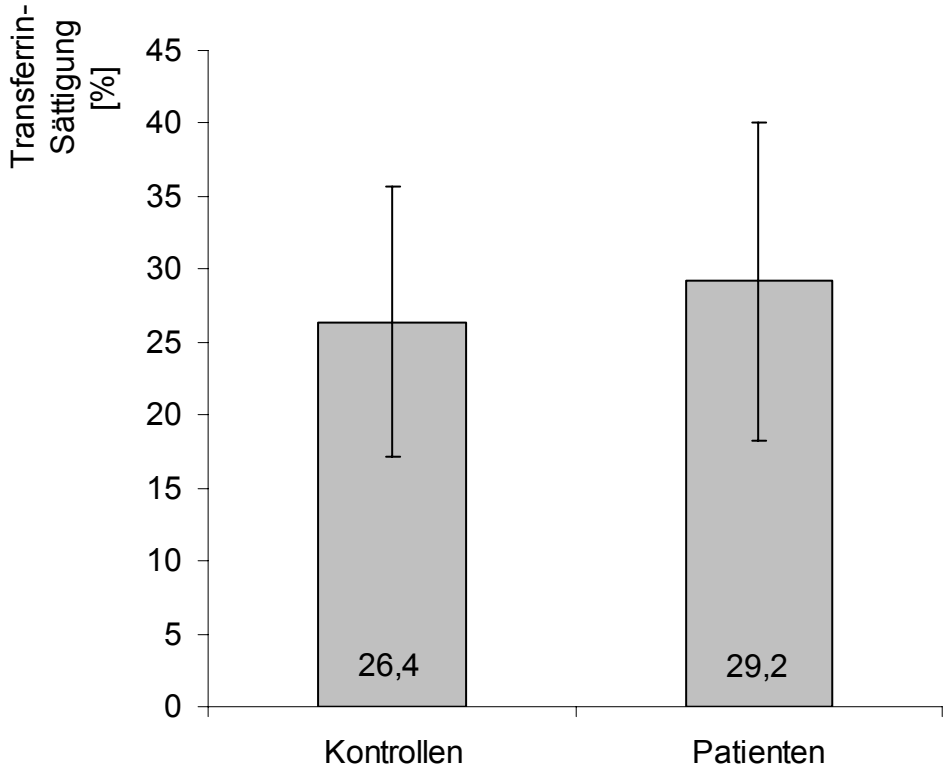

Abbildung 6: Transferrinsättigung der Studienteilnehmer (MW ± SD, p=0,09))

E. Kupferstatus

Die Studie ergab einen hochsignifikanten (p<0,0001) Unterschied in der Plasmakupferkonzentration (Abbildung 7).

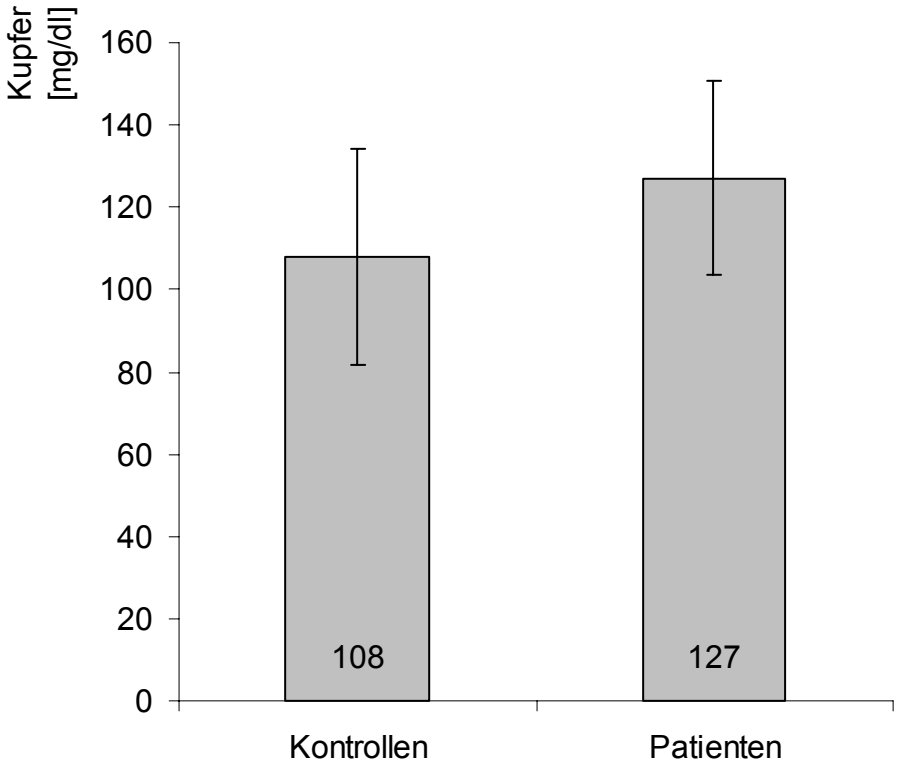

Abbildung 7: Plasmakupferkonzentration der Studienteilnehmer (MW±SD, p<0,0001)

F. Entzündungsparameter

Das C-reaktive Protein wurde zum Ausschluss einer floriden Entzündung zum Zeitpunkt der Untersuchung bestimmt. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Konzentrationen bei den Kontrollen (0,21 ± 0,20 mg/dl) und den der Patienten (0,32 ± 0,36mg/dl).
Auch in den Untergruppen der Raucher und Diabetiker ließ sich kein Unterschied herausarbeiten.

G. Endogen antioxidative Substanzen

Beide Gruppen unterschieden sich nicht signifikant in Bezug auf ihre Gesamteiweisskonzentration und ihre Gesamtbilirubinspiegel. Die Serumalbuminkonzentration der Patienten lag jedoch verglichen mit den Kontrollpersonen signifikant niedriger (p=0.009, Abbildung 8).

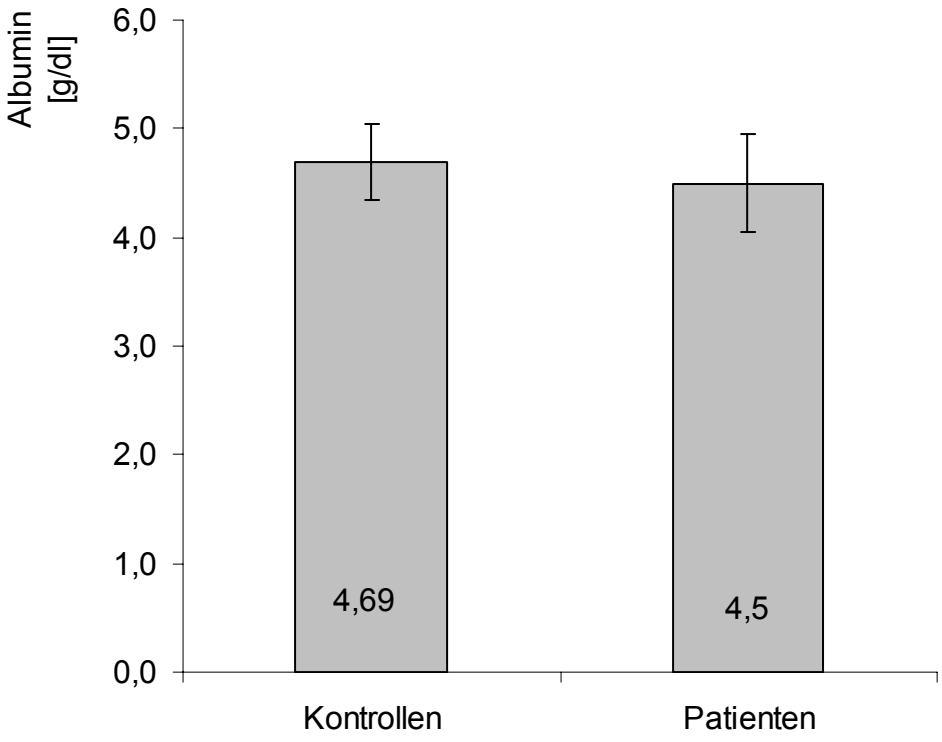

Abbildung 8: Albuminkonzentration der Studienteilnehmer (MW ± SD, p=0,009))

Ebenso war die Harnsäurekonzentration bei den Patienten geringer als bei den Kontrollen, wie Abbildung 9 zeigt (p=0,007).

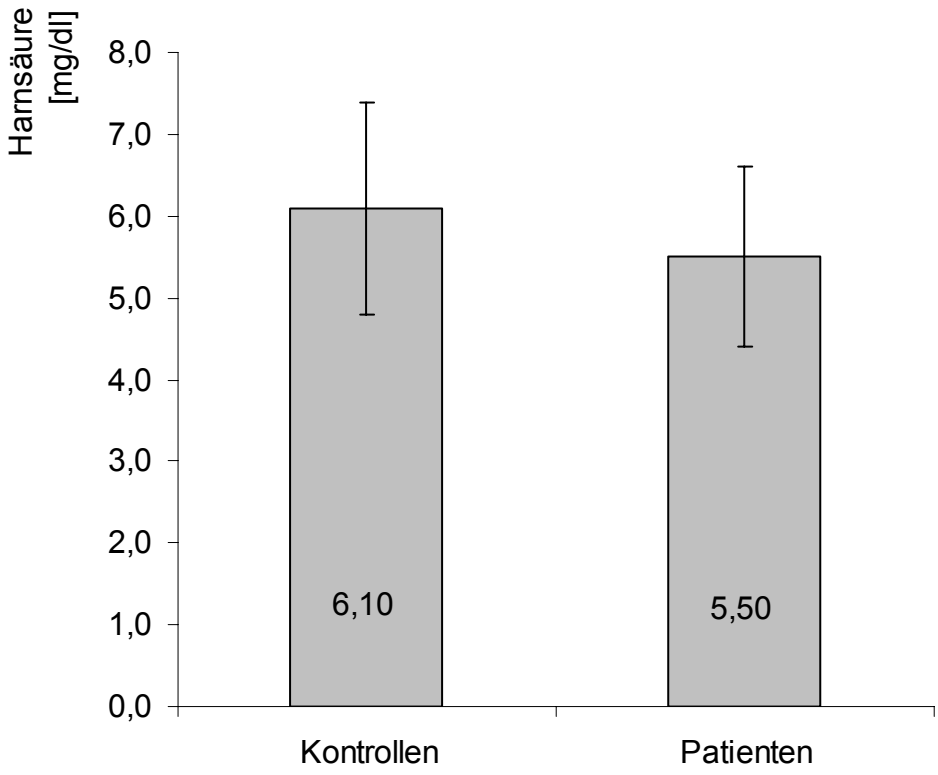

Abbildung 9: Harnsäurekonzentration der Studienteilnehmer (MW ± SD, p=0,007))

H. Korrelationen

Bei der Analyse konnte eine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Plasmakupferkonzentration und der Lipidperoxid-Konzentration im Plasma der Kontrollpersonen nachgewiesen werden (Abbildung 10).

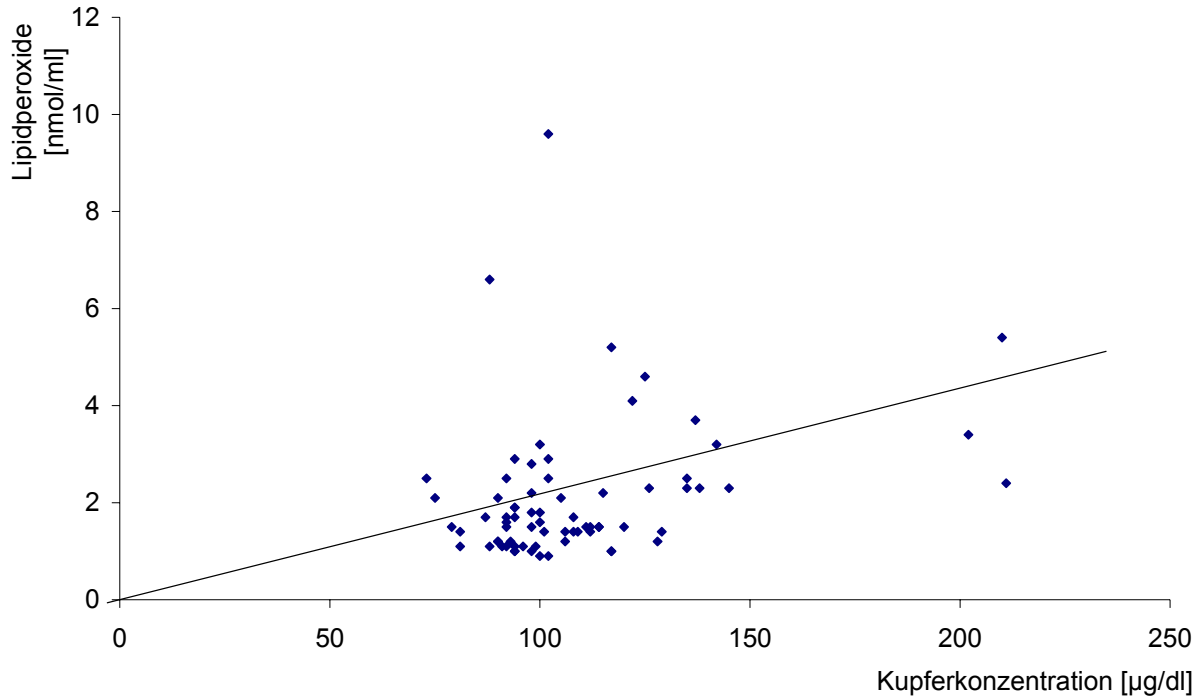

Abbildung 10: Korrelation zwischen Kupfer- und LPO-Konzentration bei Kontrollen (r=0,29; p=0,013).

Diese Korrelation war bei der Patientengruppe nicht nachzuweisen. Des Weiteren ergab sich in der Kontrollgruppe eine statistisch signifikante negative Korrelation zwischen der LPO-Konzentration und der HDL-Cholesterinkonzentration (r= - 0,26, p=0,026; Abbildung 11).

Eine weitere Korrelationen ergab sich zwischen dem C-reaktiven Protein und der Lipidperoxidkonzentration. Diese war zudem bei beiden Gruppen zu beobachten. In der Patientengruppe gab es eine positive Korrelation (r= 0,35, p= 0,003) und bei den Kontrollen ebenfalls eine positive Korrelation (r= 0,25, p= 0,03). Obwohl die CRP-Konzentration als Ausschlusskriterium für eine Entzündung diente, und

Individuen mit höheren Werten an der Studie nicht teilnahmen, konnte diese Korrelation noch nachgewiesen werden.

Während in der Kontrollgruppe einige Korrelationen mit den Lipidperoxiden nachzuweisen waren, fand sich in der Patientengruppe nur unter den eigentlich zu untersuchenden nur die zwischen der Triglyzeridkonzentration und den Lipidperoxiden (Abbildung 12)

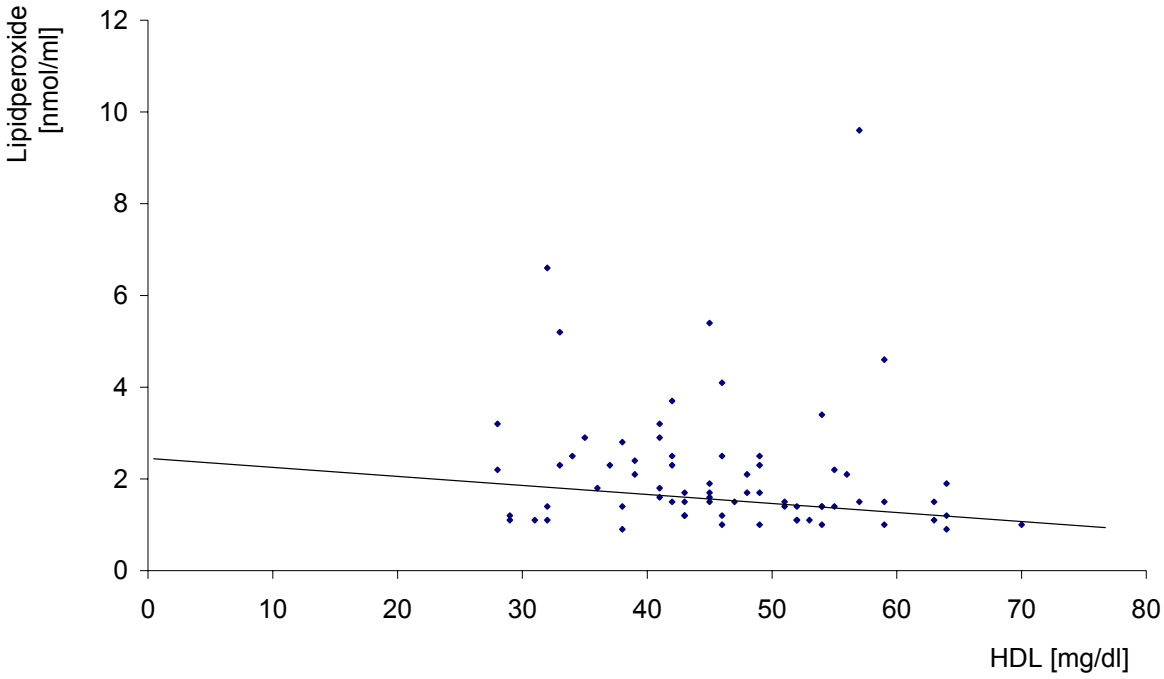

Abbildung 11: Korrelation zwischen der LPO-Konzentration und der HDL-Cholesterinkonzentration in der Kontrollgruppe (r= -0,26; p= 0,026).

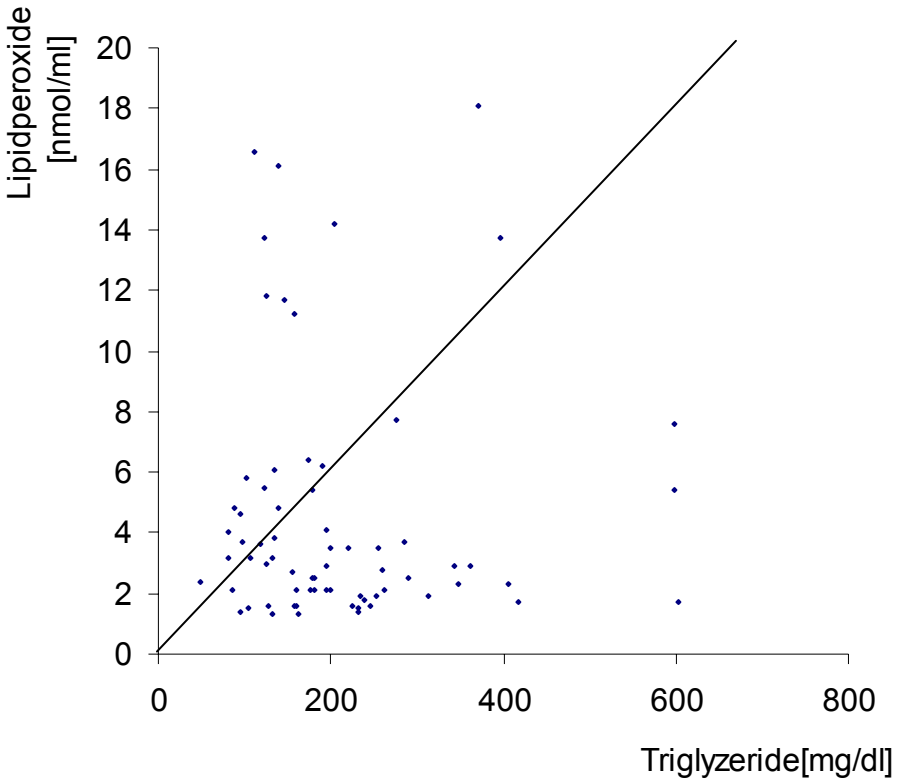

Abbildung 12: Korrelation zwischen den Triglyzerid- und den LPO-Konzentrationen der Patienten (r= 0,26, p= 0,026).

IV. Diskussion

In der vorliegenden Studie wurde versucht, den Einfluss von Übergangsmetallen auf die Oxidation von Plasmalipiden herauszuarbeiten. Dafür wurden oben genannte Ausschlusskriterien angewendet, die zu einer Studienpopulation führte anhand derer die Fragestellung gut untersucht werden konnte. Es wurde auf eine möglichst gleiche Altersverteilung geachtet. Individuen mit Hinweis auf eine akute oder chronische Entzündung wurden systematisch ausgeschlossen. Die Angaben über Diabetes mellitus oder die Rauchanamnese dienten nicht als Ausschlusskriterien sondern zur Beschreibung der Gruppen. Aufgrund der kleinen Subgruppen ließen sich keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Fragestellung feststellen.

A. Hämatologie

Personen mit erhöhtem Hämatokrit respektive Hämoglobingehalt, besonders Raucher, haben eine leicht eingeschränkte Blutviskosität und stehen damit im Verdacht, einem leicht erhöhten Risiko für Myokardischämie und zerebrale Ischämien ausgesetzt zu sein. Der Grund für die Untersuchung des Blutbildes war in dieser Studie die Abschätzung des zellulären Eisengehaltes. Ebenfalls diente es in erster Linie zum Nachweis einer Veränderung des weißen Blutbildes als Zeichen eines akuten entzündlichen Prozesses. Alle anderen Blutbildparameter zeigten keine signifikanten Unterschiede und auch keine Korrelation mit den untersuchten Parametern. Interessant ist eine Diskrepanz zwischen dem Verhältnis von Hämoglobin und Hämatokrit, das messtechnisch bedingt eigentlich gleich sein sollte, jedoch haben die Kontrollen verglichen mit den Patienten einen höheren Hämatokrit bei einer niedrigeren Gesamthämatoglobinkonzentration. Dies ist letztlich nicht befriedigend zu erklären.

B. Lipide

1. Risikofaktoren des Lipidstatus

Die Patienten zeigten im Vergleich zu den Kontrollen durchweg statistisch signifikante Unterschiede im Lipidstatus. Sie erfüllten das klassische koronare Risikoprofil mit erhöhtem Gesamtcholesterin, erhöhtem LDL-Cholesterin und erniedrigten HDL-Cholesterinwerten. Seit vielen Jahrzehnten sind diese

Parameter durch demographische, klinische und experimentelle Studien als Risikofaktoren überprüft und anerkannt. Die im Blut zirkulierenden Lipoproteine stehen in Interaktion mit den Endothelzellen. Natives LDL bewirkt die verminderte Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) aus dem Endothel. Erhöhte VLDL-Konzentrationen können die Fibrinolyse hemmen, indem sie die Freisetzung des Plasminogen-Aktivator-Inhibitors stimulieren. Ebenfalls waren die Triglyzeride gegenüber den Kontrollen erhöht; ihre Rolle ist in der Pathogenese der Atherosklerose noch umstritten, sie müssen jedoch als ernsthafter Risikofaktor in Betracht gezogen werden. Stringer konnte, ähnlich wie in der vorliegenden Studie, eine schwache Korrelation zwischen den Triglyzeriden und Lipidperoxiden nachweisen **(92)**. Besonders auffallend ist die negative Korrelation der LPO mit dem HDL-Cholesterin der Kontrollen, möglicherweise zeigt sich hier direkt die protektive Eigenschaft des HDL. Man nimmt an, dass HDL-Partikel durch ihre Assoziation mit dem antioxidativen Enzym Paraoxonase, das die Oberfläche des LDLox-Partikels verändert, anti-atherogen wirkt. Ebenfalls sorgt es für den Abtransport der Lipide aus der Arterienwand. Die genaue Art und Weise, wie HDL-Cholesterin letztendlich antioxidativ wirkt, ist jedoch noch nicht geklärt **(93)**.

Es wird diskutiert, ob das C-reaktive Protein selbst als Risikofaktor einzustufen ist. Die Datenlage der vorliegenden Studie zeigt Korrelationen zwischen CRP und LPO sowohl bei den Kontrollen als auch bei den Patienten. Auch hier muss jedoch davon ausgegangen werden, dass eine latente Entzündungsreaktion auch in einem mäßigen CRP-Anstieg nachzuweisen sein muss.
Im Allgemeinen wird die Koronaratherosklerose heute als inflammatorische Erkrankung angesehen. Die Verzahnung von Entzündung und Oxidation ist sehr eng.

2. Lipidperoxide

Die Lipidperoxide dienten in der vorliegenden Studie zum Nachweis von oxidativen Veränderungen der Plasmalipide. Die meisten klinischen und experimentellen Studien arbeiteten mit anderen Nachweismethoden, jedoch wurde ebenfalls bewiesen, dass die Methylenblau-Methode nach Ohishi **(96)** keine Defizite in der Messgenauigkeit gegenüber allen bekannten Verfahren hat **(101)**.

Darüber hinaus ist diese Messmethode spezifisch für die Lipidperoxide. Unsere Studie verwendet diese Methode zum ersten Mal zur Messung der Plasmalipidperoxidkonzentration auf einem Routinelaborautomaten. Neben der Veränderung des Plasmalipidprofils zeigten die Patienten eine hochsignifikante Erhöhung der Lipidperoxide gegenüber den Kontrollen. Die Tatsache, dass die Kontrollen eine Korrelation der Kupfer- mit der LPO-Konzentration zeigen, gibt einen möglichen Hinweis auf den Ort der Initiation des Lipidperoxidations-vorgangs.

Diese gefundene Korrelation lässt vermuten, dass Plasmalipide durch oxidative Einflüsse im Plasma verändert werden. In einem fortgeschrittenen Stadium findet man bei den Koronarpatienten zwar hohe LPO- und Kupferkonzentrationen, aber keine Korrelation der beiden Parameter. Eine denkbare Erklärung stellt sich folgendermaßen dar: Die pro-oxidative Wirkung von LDLox ist bekannt. Auch ist bekannt, dass Makrophagen LDLox durch scavenger-Rezeptoren zwar unkontrolliert aufnehmen, aber nicht in der Lage sind, diese Partikel abzubauen. Ganz im Gegenteil gehen sie an der Überladung an LDLox zugrunde und setzen neben ihren aggressiven Sauerstoffverbindungen und Enzymen auch das LDLox wieder frei. Dadurch steigt die Konzentration der LPO subendothelial stark an. Eine Freisetzung der relativ kleinen Moleküle in den Blutstrom ist wahrscheinlich. Damit messen wir erhöhte LPO im Plasma, finden aber keine Korrelationen mehr zu anderen Parametern, weil der Ort der eigentlichen Oxidation im fortgeschrittenen Stadium sich unserer Messung entzieht. Dieses ist lediglich eine Hypothese, sie lässt sich nicht aus den Daten ableiten. Die Arbeitsgruppe um Meagher und Fitzgerald gibt zu bedenken, dass die Bildung von Lipidperoxiden unter Umständen nur ein Zeichen des Zelluntergangs ist und nicht ein Mechanismus, der zu einem Zelluntergang führt **(102)**. Dies würde bedeuten, dass man mit den Lipidperoxiden in vivo nicht die Ursache der Koronaratherosklerose misst, sondern die Folge. Der Zusatz „in vivo“ ist insofern bedeutsam, als die Oxidation in vitro zweifelsfrei nachgewiesen werden konnte, jedoch hinken die Oxidationsmodelle zuweilen den Situationen, die sie simulieren sollen, hinterher.

C. Eisenparameter

Meyer stellte in einem Review alle maßgeblichen Studien zusammen, die die Rolle des Eisens in der koronaren Herzkrankheit untersuchen.
Von 23 Untersuchern konnten nur 6 einen Zusammenhang zwischen Eisenspeichern, Serumeisen und Transferrinsättigung und einem erhöhten koronaren Risiko nachweisen **(103)**. Auch die Arbeitsgruppe um Ascherio findet in Bezug auf die Eisenspeicher, gemessen als Serumferritin, keinen Unterschied im koronaren Risiko bei regelmäßigen Blutspendern mit reduziertem Ferritin und Nichtblutspendern, deren Ferritinwerte im Mittel deutlich höher lagen **(104)**, wohingegen You und Wang in einer Arbeit von 2005 Ferritin als eigenständigen Risikofaktor etabliert sehen **(131)**. Die Eisen-Hypothese wurde 1981 erstmals von Sullivan **(27)** formuliert. Er beobachtete ein erhöhtes Myokardinfarktrisiko bei Patienten mit erhöhten Ferritinwerten. Es schien plausibel, dass ein Überangebot von Eisenionen, wenn auch in gebundener Form, ein großes Redoxpotential zur Oxidation von Plasmalipiden und Plasmaeiweissen in sich birgt **(105)**. Außerdem versuchte er mit seinen Daten die geschlechts-spezifischen Unterschiede im Eisenhaushalt, respektive der unterschiedlich großen Eisen-Speicher in Form von Ferritin, für die stark differierende Inzidenz des akuten Myokardinfarktes bei Mann und Frau verantwortlich zu machen **(27, 70, 105)**. Ebenfalls hatten Salonen und seine Mitarbeiter durch Blutspende eine Senkung des Serumferritins bei Rauchern erreicht, und damit die Anfälligkeit der VLDL- und LDL-Partikel für eine oxidative Modifikation um 20% vermindert **(105)**. Es bleibt anzumerken, dass es durchaus verschiedene Bewertungskriterien von Daten der einzelnen Untersucher gibt. Die einen beobachten die Veränderung der Oxidationsanfälligkeit der Plasmalipide in vitro, andere untersuchen in epidemiologischen Studien anhand von harten Eckdaten, wie akutes ischämisches Ereignis oder der Tod aufgrund eines Myokardinfarktes, das koronare Risiko des betreffenden Kollektives. Diese vorliegende Studie findet keinen signifikanten Unterschied bei den Mittelwerten und der Verteilung von Serumeisen, Serumferritin und Transferrin.
Transferrin scheidet als möglicher Eisenionenlieferant vom Verständnis der Situation in vivo aus (auch wenn unter sehr definierten Bedingungen nach Saito und Kollegen **(107)** eine Eisenfreisetzung denkbar ist), denn jegliches Eisen wird durch den starken Eisenchelator aus dem Plasma gebunden. Es ist nicht davon auszugehen, dass eine mögliche Eisenbeteiligung am Oxidationsvorgang im

Kreislauf stattfindet **(108)**. Falls Eisen überhaupt einen Einfluss hat, so ist äußerst zweifelhaft, ob es den Prozess anstößt oder unterhält, und besonders wie und ob es in ausreichender Konzentration vorliegen kann.

Lediglich bei der Transferrinsättigung zeigt sich für den Unterschied zwischen den Gruppen ein Trend, der aber kein wissenschaftliches Signifikanzniveau erreicht. Danach ist das Transferrin der Patienten deutlich mehr gesättigt. Korrelationen sind nicht nachzuweisen. Die Datenlage ist im Einklang mit einer ganzen Reihe von Studien, die den pro-atherosklerotischen Einfluss von Speichereisen, gemessen als Ferritin **(4, 109, 110, 111, 112)** oder als erhöhte Transferrin-sättigung (>62%) **(113)** nicht bestätigen können. Auch scheint die Ferri-Oxidase-Aktivität der verschiedenen Ferritin-Untergruppen (Isoferritine) entscheidend zu sein. Endothelzellen, die Ferritin mit hoher Ferri-Oxidase-Aktivität, enthalten sind gegenüber den zytotoxischen Einflüssen des LDLox länger resistent als ferritinarme Zellen **(63)**. Zigarettenrauchen scheint die Eisenfreisetzung aus Ferritin zu begünstigen **(114)**, jedoch ließ sich daraus in den vorliegenden Daten kein Unterschied zwischen Rauchern und Nichtrauchern ableiten.

D. Kupfer

Craig et al. konnten kürzlich darstellen, dass bei gesunden Personen die Variabilität in den Konzentrationen der LPO hauptsächlich auf der unabhängigen Variabilität der Kupferkonzentrationen beruht **(101)**. Es ist deshalb zu vermuten, dass Kupferionen nicht nur in vitro pro-oxidativ sind, sondern auch in vivo oxidative Prozesse fördern. Das Transportprotein Coeruloplasmin wurde in Verbindung mit hohen LDL-Cholesterin- und niedrigen HDL-Cholesterinwerten als Risikofaktor identifiziert **(115)**, es bleibt zu vermuten, dass Kupfer-Ionen auch in der Transportbindung nicht vollständig **(73)** inaktiviert sind. Andererseits hat Coeruloplasmin Ferri-Oxidase-I-Wirkung und ist in der Lage, Eisen(II)ionen in Eisen(III)ionen zu überführen und damit Eisen effektiv zu neutralisieren. Das deckt sich auch mit den Daten dieser Studie, die eine direkte positive Korrelation zwischen der Kupferkonzentration und den Lipidperoxidspiegeln in der Kontrollgruppe nachweisen kann. Ein Nachweis in der Patientengruppe gelingt

nicht. Salonen und Mitarbeiter fanden eine an den Carotiden untersuchte Atheroskleroseprogredienz erst mit erhöhtem LDL-Cholesterin *und* erhöhten Plasmakupferspiegeln **(7, 7B)**. Ein 2004 veröffentlichter Übersichtsartikel von Stocker hält den Einfluss von Übergangsmetallen generell für unwahrscheinlich **(61)**, auch wenn eine höhere Konzentration in atherosklerotischen Gefäßpräparaten auch wieder in jüngster Zeit nachgewiesen werden konnte **(134)**. In dieser Studie wurde die Kupferkonzentration nach Enteiweissung gemessen, was bedeutet, dass auch nur der freie Kupferanteil erfasst wurde, während die Kupfermenge der vor Sauerstoffradikalen schützenden Enzyme, z.B. Cu,Zn-Superoxid-Dismutase (SOD), hier unberücksichtigt bleibt **(74, 116)**.

E. Antioxidative Substanzen

Neben den antioxidativ wirksamen Vitaminen, allen voran Ascorbinsäure, Alpha-Tocopherol und das Spektrum der Karotine, deren Rolle bei der Lipidoxidation zum Teil konträr – Alpha-Tocopherol-permeierte Lipidperoxidation **(12)** - diskutiert wird, gibt es neben der enzymgestützten Radikalenabwehr auch eine Reihe von endogen antioxidativen Substanzen, die offensichtlich recht gute antiatherogene Eigenschaften haben. Die in der vorliegenden Studie untersuchten endogenen Faktoren der Oxidationsabwehr sollen hier kurz diskutiert werden.

1. <u>Albumin</u>

Das in der Leber synthetisierte Albumin gilt als Akutphaseprotein und zeigt antioxidative Potenzen, da es die Eigenschaft hat, an der polarisierten Oberfläche Metallionen, besonders Eisen- und Kupferionen, an mehreren Bindungstellen aufzunehmen **(12, 33)**. Auch kann das Protein unterchlorige Säure binden, die bei der Entstehung von freien Sauerstoffradikalen anfällt. Die Metallionen, besonders Kupfer(II), werden jedoch nicht gänzlich inaktiviert, wodurch in Anwesenheit von H_2O_2 radikale Sauerstoffspezies entstehen können. Das Albumin wird in seiner Struktur ebenfalls oxidativ verändert, wodurch es seine Funktion verliert und abgebaut wird. Albumin kann bei intakter Leberfunktion schnell nachgebildet werden. Es dient damit als eine der antioxidativen Barrieren, die durch oxidative Mediatoren selbst verändert werden, bevor andere Strukturen wie Plasmalipide

oder Zellmembranen eine oxidative Modifikation erfahren **(73)**. Obwohl die untersuchten Personen keine ersichtlichen Gründe für eine Synthesestörung der Leber hatten, zeigten die Patienten gegenüber den Kontrollen hochsignifikant niedrigere Plasmaalbuminspiegel.

2. Bilirubin

Dem Bilirubin, das bei den Patienten unserer Untersuchung allerdings nicht signifikant niedriger war, werden antioxidative Funktionen zugeschrieben, die im Stellenwert etwa dem der Ascorbinsäure entsprechen **(117, 118)**. In der „British Regional Heart Study“, die unter anderem auch den Bilirubinspiegel als Risikofaktor untersuchte, stellte sich eine Koinzidenz zwischen sehr niedrigen Bilirubinwerten und anderen etablierten Risikofaktoren heraus. So waren überdurchschnittlich viele Probanden mit Bilirubinwerten innerhalb der 1. Percentile Raucher, litten unter Diabetes mellitus, hatten ein Risikolipidprofil, weniger Albumin und waren durchschnittlich älter. Andere Untersucher mit weniger demographischen Daten gehen davon aus, dass Bilirubin als Antioxidans im Verlauf der Erkrankung „verbraucht“ wird **(119)**, oder nur einzelne Subfraktionen antioxidative Funktionen haben **(120, 133)**.

3. Harnsäure

Harnsäure wird durch Sauerstoffradikale angegriffen und zu einer Vielzahl von Oxidationsprodukten degeneriert **(121)**. Damit verbraucht sie Aggressoren, die dann nicht mehr der Lipidoxidation zur Verfügung stehen. Harnsäure dient im Nasensekret als eines der Hauptantioxidantien **(122)**. Harnsäure kann ebenfalls Kupfer- und Eisenionen und auch den radikalen Einzelatom-Sauerstoff binden, zum Urat-Radikal oxidiert und dann durch Vitamin C wieder reduziert werden **(61)**. Die Patienten in unserer Studie hatten im Durchschnitt signifikant niedrigere Harnsäurewerte. Niedrige Harnsäurewerte werden immer wieder bei Patienten mit Atherosklerose beschrieben **(79, 110)**. Jedoch gibt es auch Autoren, die in erhöhten Harnsäurespiegeln einen Risikofaktor sehen **(123)**.

4. Transferrin

Auch die hochsignifikant niedrigere Transferrinkonzentration mag einen deutlichen Einfluss auf die Atherogenität im Patientenplasma haben, auch wenn die Transferrinsättigung sich nicht signifikant zwischen den Gruppen unterschied. Transferrin bindet als stärkster natürlicher Eisenchelator Fe(III)-Ionen und macht diese damit für den Oxidationsvorgang durch Elektronentransfer unbrauchbar, deshalb ist es durchaus vorstellbar, dass es auch effektiv die eisenbedingte Bildung freier Radikaler und damit auch die Lipidoxidation einschränkt oder gar verhindert.1994 stellte die Arbeitsgruppe um Magnusson eine verminderte Eisenbindungskapazität, eine Messgröße, die im Wesentlichen die Transferrinkonzentration abbildet, als negativen Risikofaktor heraus **(109)**. Interessant ist jedoch, dass bei der Datenlage der vorliegenden Studie das Plasmaeisen als solches keinen Risikofaktor darstellte, so dass es möglicherweise auch andere Erklärungen für die beobachteten Unterschiede gibt.

An dieser Stelle sei noch ein kurzes Wort über den Diabetes mellitus erlaubt, der zwar ein etablierter und starker Risikofaktor für die koronare Herzerkrankung ist, der aber aufgrund der Studienpopulation und der Fragestellung der vorliegenden Arbeit nicht eingehend behandelt wurde.
Übermäßige Nahrungszufuhr führt durch eine Steigerung der Umsatzrate im Zitronensäurezyklus zu einer Anhäufung von mitochondrialem NADH und zur Bildung von reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS). Um die Bildung der ROS zu begrenzen, muss die Zelle auch die Zufuhr an Energieträgern begrenzen. Es bildet sich eine Insulinresistenz aus **(125)**. Es entsteht eine Hyperglycämie, die ihrerseits eine vermehrte Bildung von Superoxid-Radikalen nach sich zieht. Auch führt der erhöhte Blutzuckerspiegel zur vermehrten Bildung von Makrophagen, die vermehrt LDLox aufnehmen und so schneller zu Schaumzellen werden **(126)**. Damit wird der atherosklerotische Prozess beschleunigt. In der Hyperglycämie sind die prokoagulatorischen Faktoren, wie Faktor VII, von Willebrand Faktor und Fibrinogen, vermehrt aktiv oder zeigen höhere Konzentrationen wohingegen Antithrombin III und Protein C verminderte Konzentrationen aufweisen, was zu deutlich vermehrten thrombotischen Ereignissen im koronaren Gefäßbett führt **(61)**.

In der vorliegenden Studie zeigten die Diabetiker unter Patienten und Kontrollen keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf LPO, Eisen und Kupfer. Ebenfalls ergaben sich bei diesen Individuen keine Unterschiede im Lipidstoffwechsel, wie man hätte annehmen können. Vermutlich waren jedoch die Untergruppen für derartige Untersuchungen zu klein.

F. Fazit

Diese Studie unterstützt die Annahme, dass Lipidstoffwechsellagen, die mit erhöhten Gesamtcholesterinwerten, erhöhter LDL-Cholesterin-Fraktion und erniedrigter HDL-Cholesterin-Fraktion einhergehen, proatherosklerotische Effekte haben. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Lipidperoxide bei koronaratherosklerotischen Patienten deutlich erhöht sind.
Eisen scheint – nach der Datenlage unserer Studie - keinen nennenswerten Einfluss auf die Lipidoxidation in vivo zu haben. Der Kupferspiegel jedoch war bei den Patienten signifikant erhöht. Auch konnten Hinweise für die Beteiligung von freien Kupferionen bei der Oxidation von Plasmalipiden bei den Kontrollpersonen gefunden werden. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die Beteiligung der Kupferionen nur in der Initiationsphase der Oxidation eine Rolle zu spielen scheint.
Ebenfalls sind die endogenen antioxidativen Substanzen deutlich verändert, so dass die Oxidationstherorie als solche in der Pathogenese der Koronaratherosklerose durch diese Untersuchung gestützt wird.

V. Literatur

1 **Wissler, RW.**
Theories and new horizons in the pathogenesis of atherosclerosis and the mechanisms of clinical effects. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 1992; Vol.116: 1281-1291

2 **Maisch, B.**
Koronare Herzkrankheit als Entzündungserkrankung des Gefäßbetts? Ursache, Folge oder Irrtum? *Herz* 1998; Band 23: 147-152

3 **Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, TE., Khoo, JC., Witztum, JL.**
BEYOND CHOLESTEROL - Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *The New England Journal of Medicine* 1989; Vol. 320: 915-924

4 **Rauramaa, R., Väisänen, S., Mercuri, M., Rankinen, T., Penttilä, I., Bond, MG.** Association of risk factors and body iron status to carotid atherosclerosis in middle-aged Eastern Finnish men. *European Heart Journal* 1994; Vol 15: 1020-1027

5 **Hunter, GC., Dubick, MA., Keen, CL., Eskelson, CD.**
Effects of hypertension on aortic antioxidant status in human abdominal aneurysmal and occlusive disease.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1991; Vol. 196: 273-279

6 **Wilhelmsen, L., Wedel, H., Tibblin, G.**
Multivariate analysis of risk factors for coronary heart disease. *Circulation* 1973; Vol. XL: 950-958

7 **Salonen, JT., Salonen, R., Korpela, H., Suntioinen, S., Tuomilehto, J.**
Serum copper and the risk of acute myocardial infarction: A prospective population study in men in eastern Finland. *American Journal of Epidemiology* 1991; Vol. 134: 268-276

7B **Salonen, JT., Salonen, R., Seppänen, K., Kantola, M., Suntioinen, S., Korpela, H.** Interactions of serum copper, selenium, and low density lipoprotein cholesterol in atherogenesis. *British Medical Journal* 1991; Vol. 302: 756-760

8 **Salonen, JT., Nyyssönen, K., Korpela, H., Tuomilehto, J., Seppänen, R., Salonen, R**. High stored iron levels are associated with excess risk of myocardial infarction in eastern finnish men. *Circulation* 1992; Vol. 86: 803-811

9 **Assmann, G., Schulte, H**.
Ergebnisse der Prospektiven Cardiovaskulären Münster (PROCAM) Studie. *Deutsches Ärzteblatt* 1993; Jg.90, Heft 42: 36-43

10 **Julius, U.**
Die Lipidhypothese der Arteriosklerose: Resümee epidemiologischer und klinischer Studien. *Markolf Hanefeld (Hrsg.) Fettstoffwechselstörungen,* 3., bearbeitete Auflage, Verlag G. Fischer, Jena, 1999: 21-41

11 **Julius, U.**
Grundlagen des Lipoproteinmetabolismus. *Markolf Hanefeld (Hrsg.) Fettstoffwechselstörungen,* 3., bearbeitete Auflage, Verlage G. Fischer, Jena, 1999: 16-20

12 **Stocker, R.**
Lipoprotein oxidation: mechanistic aspects, methodological approaches and clinical relevance. *Current Opinion in Lipidology* 1994; Vol. 5: 422-433

13 **Goldstein, JL., Brown, MS.**
The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Ann. Rev. Biochem.* 1977, Vol. 46: 897-930

14 **Vogel, RA.**
Comparative clinical consequences of aggressive lipid management, coronary angioplasty and bypass surgery in coronary artery disease. *American Journal of Cardiology* 1992; Vol. 69: 1229-1233

15 **Windaus, A.**
Über den Gehalt normaler und atheromatöser Aorten an Cholesterin und Cholesterinestern. *Hoppe-Seyler´s Zeitschrift für Physiolologische Chemie* 1910*; 67: 174-176*

16 **Gofman, JW., Lindgren, FT.**
The role of lipids and lipoproteins in atherosclerosis. *Science* 1950; Vol. 111: 166-171

17 **Glavind, J., Hartmann, S., Clemmsen, J., Jessen, KE., Dam, H.**
Studies on the role of lipoperoxides in human pathology. Presence of peroxidized lipids in the atherosclerotic aorta. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica* 1952; Vol. 30: 1-6

18 **Gofman, JW., Rubin, L.**
Hyperlipoproteinemia. *American Journal of Medicine* 1954; Vol. 17: 514-520

19 **Adams, CW.; Bayliss, OB.**
Phagocytes, lipid-removal and regression of atheroma. *Journal of Pathology* 1975; Vol.116: 225-238

20 **Geer, JC., Mc Gill, HC., Strong, JP.**
The fine structure of atherosclerotic lesions. *American Journal of Pathology* 1961; Vol. 38: 263-287

21 **Cookson, F.B.**
The origin of foam cells in atherosclerosis. *British Journal of Experimental Pathology* 1971; Vol. 52: 62

22 **Schaffner, T., Taylor, K., Bartucci, EJ.**
Arterial foam cells with distinctive immunomorphologic and histochemical features of macrophages. *American Journal of Pathology* 1980; Vol.100: 57-80

23 **Girotti, AW.**
Mechanisms of lipid peroxidation. *Free Radical Biology & Medicine* 1985; Vol. 1 (2): 87-95

24 **Smith, C., Mitchinson, MJ., Aruoma, OI., Halliwell, B.**
Stimulation of lipid peroxidation and hydroxyl-radical generation by the contents of human atherosclerotic lesions. *Biochemical Journal* 1992; Vol. 286: 901-905

25 **Aust, SD., Morehouse, LA., Thomas, CE.**
Role of metals in oxygen radical reactions. *Free Radical Biology & Medicine* 1985; Vol. 1, No. 1: 3-25

26 **Heinecke, JW., Rosen, H., Chait, A**.
Iron and copper promote modification of low density lipoprotein by human arterial smooth muscle cells in culture. *Journal of Clinical Investigation* 1984; Vol. 4: 1890-1894

27 **Sullivan, JL.**
Iron and the sex difference in heart disease risk. *The Lancet* 1981 June 1 (8233): 1293-1294

28 **Sullivan, JL.**
The iron paradigm of ischemic heart disease. *American Heart Journal* 1989; Vol. 117(5):1177-1186

29 **Bhakdi, S.**
Eine alternative Hypothese zur Pathogenese der Atherosklerose. *Herz* 1998; Ausgabe 23: 163-169

30 **Esterbauer, H., Gebicki, J., Puhl, H., Jürgens, G.**
The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radical Biology & Medicine* 1992; Vol. 13: 341-390

31 **Esterbauer, H., Waeg, G., Puhl, H., Dieber-Rotheneder, M., Tatzber, F.**
Inhibition of LDL oxidation by antioxidants. *Free Radicals and Aging (EXS)* 1992; Vol. 62 : 145-157

32 **Zhang, A., Vertommen, J., Van Gaal, L., De Leeuw, I.**
A rapid and simple method for measuring the susceptibility of low-density-lipoprotein and very-low-density-lipoprotein to copper-catalyzed oxidation. *Clinica Chimica Acta* 1994; Vol. 227: 159-173

33 **Thomas, CE., Jackson, RL.**
Lipid hydroperoxide involvement in copper-dependent oxidation of low density lipoproteins. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1991; Vol. 256: 1182-1188

34 **Esterbauer, H., Ramos, P.**
Chemistry and pathophysiology of oxidaton of LDL. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* 1996; Vol.127: 31-64

35 **Maiorino, M., Zamburlini, A., Roveri, A., Ursini, F.**
Copper-induced lipid peroxidation in liposomes, micelles, and LDL: which is the role of vitamin E? *Free Radical Biology & Medicine* 1995; Vol. 18: 67-74

36 **Chilsolm, GM., Steinberg, D.**
The oxidation modification hypothesis of atherogenesis: an overview. *Free Radical Biology &Medicine* 2000; Vol. 28: 1815-1826

37 **Heinecke, JW.**
Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis: implications for the oxidized low density lipoprotein hypothesis. *Atherosclerosis* 1998; Vol. 141: 1-15

38 **Chait, A.**
Methods for assessing lipid and lipoprotein oxidation. *Current Opinion in Lididology* 1992; Vol. 3: 389-394

39 **Regnström, J.**
Susceptibility to low-density-lipoprotein oxidation and coronary atherosclerosis in man. *The Lancet* 1992; Vol. 339: 1183-1186

40 **Steinberg, D.**
Lewis A. Conner Memorial Lecture: Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation* 1997; Vol. 95:1062-1071
,
41 **Jeng, JR., Shieh, SM., Chiu, HC.**
Decreased expression of a particular epitope on plasma apolipoprotein B of patients with coronary artery disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 1993; Vol. 1181: 287-294

42 **Witztum, JL.**
The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *The Lancet* 1994; Vol. 344: 793-795

43 **Valentinova, NV., Zi-Wei, G., Yang, M., Yanushevskaya EV., Antonov, IV., Guyton, JR., Smith, CV., Gotto, AM. Jr., Chao-yuh, Y.**
Immunoreactivity of apolipoprotein B-100 in oxidatively modified low-density lipoprotein. *Biological Chemistry* 1994; Vol. 375: 651-658

44 **Ross, R.**
Cell biology of atherosclerosis. *Annual Review of Physiology* 1995; Vol. 57: 791-804

45 **Ross, R.**
The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; Vol. 362: 801-809

46 **Schwartz, CJ., Valente, AJ., Sprague, EA.**
A modern view of atherogenesis. *The America Journal of Cardiology* 1993; Vol. 71: 9B-14B

47 **Curzio, M., Ferretti, C., Stephens, R.J., Esterbauer, H., Dianzani, MU.**
Binding of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal to human polymorphonuclear leukocytes. *Cellular Biochemistry and Function* 1994; Vol. 12: 57-62

48 **Zimmerman, BJ., Granger, DN.**
Mechanisms of Reperfusion Injury. *American Journal of Medicine* 1994; Vol. 307: 284-292

49 **Bulkley, GB.**
Reactive oxygen metabolites and reperfusion injury: aberrant triggering of reticuloendothelial function. *The Lancet* 1994; Vol. 244: 934-936

50 **Eber, B., Schumacher, M., Tatzber, F., Kaufmann, P., Luha, O., Esterbauer, H., Klein, W.**
Autoantibodies to oxidized low-density-lipoproteins in restenosis following coronary angioplasty. *Cardiology* 1994; Vol. 84: 310-315

51 **Gottschalk, R.**
Eisenstoffwechseldiagnostik. *mta* 1991; Vol. 6: 590-595

52 **Kühn, LC.**
Molecular regulation of iron proteins. *Baillière´s Clinical Haematology* 1994; Vol. 7: 763-785

53 **Löffler,G., Petrides, PE**
Eisenstoffwechsel, Kupferstoffwechsel. *Physiologische Chemie* Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 4. Auflage, 1. korrigierter Nachdruck 1990: 37, 119, 574-581ff.

54 **Ascherio, A., Willett, WC., Rimm, EB., Giovannucci, EL. ,Stampfer, MJ.**
Dietary iron intake and risk of coronary disease among men. *Circulation* 1994; Vol.89: 960-974

55 **Finch, CA., Huebers, H.**
Medical Progress - Perspectives in iron metabolism. *The New England Journal of Medicine* 1982; Vol. 306: 1520-1528

56 **Cook, JD., Skikne, BS., Baynes, RD.**
Serum transferrin receptor. *Annual Review of Medicine* 1993; Vol. 44: 63-74

57 **Aisen, P.**
The transferrin receptor and the release of iron from transferrin. Plenum Press, New York 1994: 31-40

58 **Skikne, BS., Whittaker, P., Cooke, A., Cook, JD.**
Ferritin excretion and iron balance in humans. *British Journal of Haematology* 1995; Band 90: 681-687

59 **Iancu, TC., Shiloh, H.,**
Morphologic observations in iron overload: an update. *Progress in Iron Research- Editor: C. Hershko et al, Plenum Press, NewYork 1994: 255-265*

61 **Stocker, R., Keaney, JFjr**
Role of modifications in atherosclerosis
Physiological Reviews. 2004 Vol. 84: 1381-1478

60 **Cook, JD., Finch, CA., Smith, NJ**.
Evaluation of the iron status of a population. *Blood* 1976; Vol. 48: 449-455

62 **Wick, M.**
Eisenstoffwechsel. *Labor und Diagnose (Hrsg. L. Thomas)*, TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt / Main, 5. erweiterte Auflage 2000: 275-280

63 **Juckett, MB., Balla, J., Balla, G., Jessurun, J., Jacob, HS., Vercellotti, GM.**
Ferritin protects endothelial cells from oxidized low-density-lipoprotein in vitro. *American Journal of Pathology* 1995; Vol.147: 782-789

64 **Konijn, AM.,**
Iron metabolism in inflammation. *Baillière´s Clinical Haematology* 1994; Vol. 7: 829-849

65 **Kaltwasser, JP.**
Ferritin. *Labor und Diagnose (Hrsg. L. Thomas)*, TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt / Main, 5. erweiterte Auflage 2000: 285-288

66 **Forth, W.**
Ist Eisen schädlich? *Deutsches Ärzteblatt* 1994, Ausgabe 91: A443-A444

67 **Lipschitz, DA., Cook, JD., Finch, CA**.
A clinical evaluation of serum ferritin as an index of iron stores. *The New England Journal of Medicine* 1974; Vol. 290: 1213-1216

68 **Kaltwasser, JP.**
Diagnostische Bedeutung der Ferritin-Bestimmung im Serum. *Bioscentia Bericht Nr.14* 1979: *1-8*

69 **Burt, MJ., Halliday, JW., Powell, L.W.**
Iron and coronary heart disease. *British Medical Journal* 1993; Vol. 307: 575-576

70 **Sullivan, JL.**
Effects of dietary iron intake on stored iron, free iron, and coronary disease. *Circulation* 1994; Vol. 90: 3122-3123

71 **Sullivan, JL.**
Low iron-binding capacity: an independent heart disease risk factor? *Circulation* 1994; Vol. 89: 2947-2948

72 **McCord, JM.**
Is iron sufficiency a risk factor in ischemic heart disease? *Circulation* 1991; Vol. 83: 1112-1114

73 **Rice-Evans, C., Bruckdorfer, KR**.
Free Radicals, lipoproteins and cardiovascular dysfunction. *Molecular Aspects in Medicine* 1992; Vol.13: 1-111

74 **Milne, DB.**
Assessment of copper nutritional status. *Clinical Chemistry* 1994; Vol. 40: 1479-1483

75 **Chowrimootoo GFE., Seymour, CA.**
The role of ceruloplasmin in copper excretion. *Biochemical Society Transactions* 1994; Vol. 22(2): 190S

76 **Terada, K., Kawarada, Y., Miura, N., Yasui, O., Koyama, K., Sugiyama, T.**
Copper incorporation into ceruloplasmin in rat livers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1995; Vol. 1270: 58-62

77 **Milne, DB., Johnson, PE**.
Assessment of copper status: effect of age and gender on reference ranges in healthy adults. *Clinical Chemistry* 1993; Vol. 39: 883-887

78 **Matern, S.**
Angeborene Stoffwechselerkrankungen. *Innere Medizin (Hrsg. Classen, Diehl, Kochsiek), Urban & Schwarzenberg, München* 1994: 763-769

79 **Duthie, GD., Beattie, JAG., Arthur, JR, Franklin, M., Morrice, PC.**
Blood antioxidants and indices of lipid peroxidation in subjects with angina pectoris. *Nutrition* 1994; Vol. 10: 3131-315

80 **Garner, B., Van Reyk, D., Dean, RT., Jessup, W.**
Direct copper reduction by macrophages. Its role in low density lipoprotein oxidation. *The Journal of Biological Chemistry* 1997; Vol. 272: 6927-6935

81 **Kalyanaraman, B. Antholine, WE., Parthasarathy, S.**
Oxidation of low-density-lipoprotein by Cu^{2+} and lipoxygenase: an electron spin resonance study. *Biochimica et Biophysica Acta* 1990; Vol. 1035: 286-292

82 **Kuzuya, M., Yamada, K., Hayashi, T., Funaki, C., Naito, M., Asai, K., Kuzuya, F.** Oxidation of low-density lipoprotein by copper and iron in phosphate buffer. *Biochimica et Biophysica Acta* 1991, Vol.1084: 198-201

83 **Kuzuya, M., Naito, M., Funaki, C., Hayashi, T., Asai, K., Kuzuya, F.**
Lipid peroxide and transition metals are required for the toxicity of oxidized low density lipoprotein to cultured endothelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1991; Vol. 1096: 155-161

84 **Marinela, G.**
New physiological importance of two classic residual products : carbon monoxide and bilirubin. *Biochem Mol Med* 1997; Vol.61(2): 136-142

85 **Leake, DS., Rankin, SM**.
The oxidative modification of low-density lipoproteins by macrophages. *Biochemical Journal* 1990; Vol. 270: 741-749

86 **Parthasarathy, S., Santanam, N.**
Mechanisms of oxidation, antioxidants and atherosclerosis. *Current Opinion in Lipidology* 1994; Vol. 5: 371-375

87 **Mulholland, CW., Strain, JJ.**
Serum total free radical trapping ability in acute myocardial infarction. *Clinical Biochemistry* 1991; Vol. 24: 437-441

88 **Simon, BC., Cunningham, LD., Cohen, RA**.
Oxidized low density lipoproteins cause contraction and inhibit endothelium-dependent relaxation in the pig coronary artery. *Journal of Clinical Investigation* 1990; Vol. 86: 75-79

89 **Hayashi, T., Ishikawa, T., Kuzuya, M., Naito, M., Yamada, K., Asai, K., Hidaka, H., Iguchi, A.**
Chelation of copper reduces inhibition by oxidized lipoproteins of endothelium-dependent relaxation in porcine coronary arteries. *Heart Vessels* 1994; Vol.9 : 283-291

90 **Hayashi, T., Ishikawa, T., Naito, M., Kuzuya, M., Funaki, C., Asai, K., Hidaka, H., Kuzuya, F.**
Low level hyperlipidemia impairs endothelium-dependent relaxation of porcine coronary arteries by two mechanisms. *Atherosclerosis* 1991; Vol. 87: 23-38

91 **Matsuda, Y., Hirata, K., Inoue, N., Suematsu, M., Kawashima, S., Akita, H., Yokoyama, M.**
High density lipoprotein reverses inhibitory effect of oxidized low density lipoprotein on endothelium-dependent arterial relaxation. *Circulation Research* 1993; Vol. 72: 1103-1109

92 **Stringer, MD., Görög, PG., Freeman, A., Kakkar, VV.**
Lipid peroxides and atherosclerosis. *British Medical Journal* 1989; Vol. 298: 281-284

93 **Libby, P.**
Managing the Risk of Atherosclerosis: The Role of High-Density Lipoprotein**.**
American Journal of Cardiology 2001; Vol. 88 (12A suppl): 3N-8N

94 **Schäfer Elinder, L., Walldius, G.**
Simultaneous measurement of serum probucol and lipid-soluble antioxidants. *Journal of Lipid Research* 1992; Vol. 33: 131-137

95 **Friedewald, WT., Halperin, M.**
Clofibrate in ischemic heart disease. *Annals of Internal Medicine* 1972; Vol. 72 (5): 821-823

96 **Ohishi, N., Ohkawa, H., Miike, A., Tatano, T., Yagi, K.**
A new assay method for lipid peroxides using a methylene blue derivative. *Biochemistry International* 1985; Vol. 10: 205-211

97 **Yagi, K., Kiuchi, K., Saito, Y., Miike, A., Kayahara, N., Tatano, T., Ohishi, N.**
Use of a new methylene blue derivative for determination of lipid peroxides in foods. *Biochemistry International* 1994; Vol. 28: 367-371

98 **Sugita, O., Nakano, M., Matsuto, T., Miida, T., Okada, M.**
[The measurement of antioxidant activity in human plasma using cumene hydroperoxide] englischer Abstract, *Rinsho, Byori* 1998: 271-276

99 **L. Thomas**
Transferrinsättigung (TfS). *Labor und Diagnose (Hrsg. L. Thomas)*, TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt / Main,5. erweiterte Auflage 2000: 282-284

100 **Launders, JW., Zak, B.**
Determination of serum copper and iron in a single small sample. *American Journal of Clinical Pathology* 1958; Vol. 29: 590-592

101 **Craig, WY., Poulin, SE., Palomaki, GE., Neveux, LM., Ritchie, RF., Ledue, TB.**
Oxidation-related analytes and lipid and lipoprotein concentrations in healthy subjects. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 1995; Vol. 15: 733-739

102 **Meagher, EA., Fitzgerald, GA.**
Indices of lipid peroxidation in vivo: Strength and limitations. *Free Radical Biology & Medicine* 2000; Vol. 28: 1745-1750

103 **Meyer, DG.**
The Iron-hypothesis-does iron cause atherosclerosis? *Clinical Cardiology* 1996; Vol.19: 925-929

104 **Ascherio, A., Rimm, EB., Giovannucci, E., Willet, W., Stampfer, MJ.**
Blood donation and risk of coronary heart disease in men. *Circulation* 2001; Vol. 103: 52.57

105 **Sullivan, JL.**
Stored iron and ischemic heart disease. *Circulation* 1992; Vol. 86: 1036-1037

106 **Salonen, JT., Korpela, H., Nyyssönen, K., Porkkala, E., Tuomainen, T-P., Belcher, JD., Jacobs, DR., Salonen, R.**
Lowering of body iron stores by blood letting and oxidation resistance of serum lipoproteins: a randomized cross-over trial in male smokers. *Journal of Internal Medicine* 1995; Vol. 237: 161-168

107 **Saito, M., Morehouse, LA., Aust, SD.**
Transferrin-dependent lipid peroxidation. *Free Radical Biology & Medicine* 1986; Vol. 2: 99-105

108 **Koster, JF., Sluiter, W.**
Is increased tissue ferritin a risk factor for atherosclerosis and ischemic heart disease? *British Heart Journal* 1995; Vol. 74: 208

109 **Moore, M., Folsom, AR., Barnes, RW., Eckfeldt, JH.**
No association between serum ferritin and asymptomatic carotid atherosclerosis. *American Journal of Epidemiology* 1995; Vol. 141: 719-723

110 **Magnusson, MK., Sigfusson, N., Sigvaldason, H., Johanneson, GM., Magnusson, S., Thorgeirsson, G.**
Low-iron-binding capacity as a risk factor for myocardial infarction. *Circulation* 1994; Vol. 89: 102-108

111 **Duthie, GG., Beattie, JAG., Arthur, JR., Franklin, M., Morrice, PC., James, WPT.**
Blood antioxidants and indices of lipid peroxidation in subjects with angina pectoris. *Nutrition* 1994; Vol.10: 313-316

112 **Sempos, CT.**
Body iron stores and the risk of coronary heart disease. *The New England Journal Of Medicine* 1994; Vol. 330: 1119-1124

113 **Baer, DM., Tekawa, IS., Hurley, LB.**
Iron stores are not associated with acute myocardial infarction. *Circulation* 1994; Vol. 89: 2915-2918

114 **Lapenna, D., De Gioia, S., Mezzetti, A., Ciofani, G., Consoli, A., Marzio, L., Cuccurullo, F.**
Cigarette smoke, ferritin, and lipid peroxidation. *American Journal of Respiration and Critical Care Medicine* 1995; Vol. 151: 431-435

115 **Mänttäri, M., Manninen, V., Huttunent, JK., Palosuo, T., Ehnholm, C., Heinonen, OP., Frick, M.H.**
Serum ferritin and ceruloplasmin as coronary risk factors. *European Heart Journal* 1994; Vol. 15: 1599-1603

116 **Faure, P., Corticelli, P., Richard, M.-J., Arnaud, J., Coudray, C., Halimi, S., Favier, A., Roussel, AM.**
Lipid peroxidation and trace element status in diabetic ketotic patients: influence of insulin therapy. *Clinical Chemistry* 1993; Vol.: 789-793

117 **Wu, TW., Fung, KP., Wu, J., Yang, CC., Weisel, RD.**
Antioxidation of human low density lipoprotein by unconjugated and conjugated bilirubins. *Biochemical Pharmacology* 1996; Vol. 51: 859-862

118 **Hopkins, PN., Wu, LL., Hunt, SC., James, BC., Vincent, GM., Williams, RR.**
Higher serum bilirubin is associated with decreased risk for early familial coronary artery disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 1996; Vol. 16 (2): 250-255

119 **Schwerter, HA., Jackson, WG., Tolan, G.**
Association of low serum concentration of bilirubin with increased risk of coronary artery disease. *Clinical Chemistry* 1994, Vol. 40: 18-23

120 **Moreno, LA., Sarría, A., Mur, M., Làzare, A., Roda, L., Giner, A., Bueno, M.**
Serum bilirubin concentrations in children at risk for atherosclerosis. *Clinical Chemistry* 1994, Vol. 40, No. 9: 1791-1792

121 **Harparkash, K., Halliwell, B.**
Action of biologically-relevant oxidizing species upon uric acid. Identification of uric acid oxidation products. *Chemico-Biological Interactions* 1990, Vol. 73: 235-247

122 **Peden, DB., Hohman, R., Brown, ME., Mason, RT., Berkebile, C., Fales, HM., Kaliner. MA.**
Uric acid is a major antioxidant in human nasal airway secretions. *Medical Science* 1990, Vol. 87: 7638-7642

123 **Vaccarino, V., Krumholz, HM.**
Risk factors for cardiovascular disease: One down, many more to evaluate. *Annals of Internal Medicine* 1999, Vol. 131, No.1: 62-63

124 **Mueller, CFH., Laude, K., McNally, JS., Harrison, DG.**
Redox mechanisms in blood vessels. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2005, Vol. 25: 274-278

125 **Ceriello, A., Motz, E.**
Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2004, Vol. 24: 816-823

126 **Moreno, PR., Fuster, V**
New aspects in the pathogenesis of diabetic atherothrombosis
Journal of the American College of Cardiology. 2004, Vol.44: 2293.2300

127 **Kota, BP., Huang, TH-W., Roufogalis, BD.**
An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacological Research* 2005 Vol. 51: 85-94

128 **Griendling, KK., FitzGerald, GA.**
Oxidative stress and cardiovascular disease: Part I: Basic mechanisms an in vivo monitoring of ROS
Circulation. 2003, Vol. 108: 1912-1916

129 **Griendling, KK., FitzGerald, GA.**
Oxidative stress and cardiovascular disease: Part II: Animal and human studies.
Circulation. 2003, Vol. 108: 2034-2040

130 **Madamanchi, NR., Vendrov, A., Runge, MS.**
Oxidative stress and vascular disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2005, Vol. 25: 29-38

131 **You, SA., Wang, Q.**
Ferritin in atherosclerosis. *Clinica Chimica Acta* 2005, Vol. 357: 1-16

132 **Hwang, J., Saha, A., Boo, YC., Sorescu, GP., McNally, JS., Holland, SM., Dikalov,S., Giddens,DP, Griendling, KK., Harrison, DG., Jo, H.**
Oscillatory shear stress stimulates endothelial production of O_2^- from p47phox dependent NAD(P)H oxidases, leading to monocyte adhesion. *Journal of Biological Chemistry* 2003 Vol. 278: 47291-47298

133 **Vitek, L., Jirsa, M., Brodanova, M., Kalab, M., Marecek, Z., Danzig, V., Novotny, L., Kotal, P.**
Gilbert syndrome and ischemic heart disease: a protective effect of elevated bilirubin levels. *Atherosclerosis* 2002, Vol. 160: 449-456

134 **Stadler, N., Lindner, RA., Davies,MJ.**
Direct detection and quantification of transition metal ions in human atherosclerotic plaques: evidence fort he presence of elevated levels of iron and copper. *Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2004,Vol. 24(5): 949.954

VI. Zusammenfassung

Die koronare Atherosklerose ist eine der bedeutendsten Erkrankungen in den Industrienationen. Neben einer Reihe von Risikofaktoren spielt die Hyperlipidämie, und in diesem Zusammenhang das oxidativ veränderte LDL-Cholesterin, eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose ein. Eine Reihe von experimentellen, demographischen und klinischen Studien zeigen, dass Eisen und Kupfer die Bildung von oxidativen Plasmalipiden begünstigen. Die vorliegende Studie versucht Zusammenhänge zwischen dem Eisen- bzw. Kupferhaushalt und den oxidativen Produkten der Plasmalipide, den Lipidperoxiden (LPO), aufzuzeigen. In einer Fall-Kontroll-Studie männlicher Personen, die sich entweder einer koronaren Bypassoperation (71 Patienten) oder einer arbeitsmedizinischen Gesundheitsprüfung (71 altersgleiche Kontrollpersonen) unterzogen, wurde nach Aufnahme der Anamnese unter standardisierten Bedingungen Blut abgenommen. Neben der Bestimmung des Eisen- und Kupferstatus und des Lipidperoxid-Spiegels erfolgte ebenfalls die Analyse der endogenen Antioxidantien Albumin, und Harnsäure. In der vorliegenden Studie wird zur Bestimmung der Plasmalipidperoxide erstmals die Methylenblau-Methode nach Ohishi, die verifiziert zur Bestimmung von Lipidperoxiden geeignet ist. Es zeigte sich, dass die Bypasspatienten im Mittel erhöhte Kupfer- und Lipidperoxid-Werte aufwiesen, ihr Eisenhaushalt im Durchschnitt sich aber nicht von dem der Kontrollgruppe unterschied. Albumin und Harnsäure unterschieden sich signifikant zwischen Patienten und Kontrollgruppe und waren bei den Patienten niedriger. In der Patientengruppe fand sich keine signifikante Korrelation zwischen dem Gesamtkupferspiegel und den Lipidperoxiden, auch unter allen Eisenparametern korrelierte keiner mit den Lipidperoxiden. In der Kontrollgruppe hingegen konnte eine hochsignifikante Korrelation zwischen dem Gesamtkupferspiegel und dem Lipidperoxidspiegel festgestellt werden. In Patienten mit fortgeschrittener Koronaratherosklerose ist eine erhöhte Lipidperoxid- und Kupferkonzentration im Serum festzustellen, eine Korrelation dieser Parameter aber nicht nachzuweisen. Die positive Korrelation zwischen Gesamtkupferspiegel und Lipidperoxid-Spiegel der Kontrollpersonen deutet darauf hin, dass in physiologischen Situationen, Kupfer bei der Bildung von Serum- Lipidperoxiden beteiligt zu sein scheint. Die Datenlage dieser Studie lässt keinen Rückschluss auf die Beteiligung von Eisenionen bei der Bildung von Lipidperoxiden zu.

Summary

Lipids are recognized risk factors for coronary heart disease (CHD) but only oxidized low-density lipoprotein (LDL), and not native LDL, can trigger and maintain the process that leads to the formation of atherosclerotic lesions and to clinically manifest CHD. Several studies support the hypothesis that serum components such as copper and iron can oxidize LDL in vitro and may influence the oxidation of serum lipids but their relationship with the risk of developing CHD is not clearly established. (Plasma copper has been recently shown to correlate with lipid peroxides in healthy subjects, but the relationship between body iron and copper and lipid risk factors for atherosclerosis is still unclear. We investigated whether iron stores, plasma iron, plasma copper and lipid peroxides are elevated in patients with advanced coronary atherosclerosis and how these parameters are related to the known lipid risk factors for atherosclerosis. We also measured the levels of two other antioxidants: albumin and uric acid, and assessed their relationship with plasma lipid peroxides.
Blood samples were drawn from 71 male patients scheduled for coronary bypass surgery and 71 age-matched healthy men undergoing routine occupational health checks. In comparison to the control group, the patients had significantly higher total cholesterol mean levels, higher LDL-cholesterol levels, lower HDL-cholesterol levels and higher triglyceride concentrations. The iron status expressed by total plasma iron, ferritin, transferrin and its saturation did not differ significantly between the two groups. Patients had significantly higher concentrations of plasma copper compared to the controls. Plasma lipid peroxides were also significantly increased in the patients compared to controls. The albumin level and the uric acid level were lower in the patient group compared to the control group. The lipid peroxides concentration showed a significant correlation with the plasma copper level and a significant negative correlation with the HDL-cholesterol level in the controls. No significant correlations were found between the lipid peroxides concentration and the plasma copper or iron parameters in patients. In patients with advanced coronary atherosclerosis plasma lipid peroxides and copper are elevated but other factors beside the latter seem to be more important in determining the level of plasma lipid oxidation. However, in healthy subjects copper does appear to influence plasma lipid oxidation. Our findings do not suggest that iron plays a role in the in vivo oxidation of plasma lipids.

VII. Danksagung

Ich möchte mich für die besonders gute Zusammenarbeit mit den Kollegen des Max-Planck-Instituts für Klinische und Physiologische Forschung in Bad Nauheim, der Kerckhoff-Klinik in Bad Nauheim und dem BAD Giessen eV. in Giessen bedanken.
Besonderes seien erwähnt die Drs. I.S. Jovin und U. Taborski für Anregungen und kritische Supervision der Studie, Frau Ewald für die freundliche Unterstützung im Zentrallabor der Kerckhoff-Klinik, Frau Fabian, Herr Kwasny, Frau Dr. Heidinger, Frau Dr. Fuhrmann, Dr. Szalay und Frau Dr. Hörl-Eberl für die Hilfestellung bei der Probenaquisition. Meiner Familie danke ich besonders für ihr Verständnis für meine permanente Zeitnot.

VIII. Lebenslauf

Name:	Andreas Klaus Stehr
Geb.:	13.03.1970 in Fulda
Wohnung:	An der Uferstraße 9, 06120 Halle an der Saale

Schulausbildung:

1976-1980	Grundschule Don-Bosco-Schule, Künzell Winfriedschule, Gymnasium des Landkreises Fulda mit Abschluss der Allgemeinen Hochschulreife 6/1989

Wehrdienst & Soziale Praktika

7/89-10/90	Wehrdienst anschl.Pflegedienstpraktikum Chirurgie Städtisches Klinikum Fulda und Freiwilliges Soziales Jahr HNO Städtische Kliniken, Kassel

Studium:

ab 10/1991	Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität, Giessen
04/1998	Abschluss der Ärztlichen Prüfung und vorläufige Approbation

Beruflicher Werdegang

08/98-10/01	Zentrum für Anaesthesiologie und operative Intensivmedizin, KLinikum Bad Hersfeld GmbH (Prof. Dr. med. W. Fahle)
10/01-01/03	Abteilung für Kardioanaesthesiologie und operative Intensivmedizin,Herz- und Kreislaufzentrum Rotenburg (PD Dr. med. D. Kling)
seit 7/03	Weiterbildung zum Facharzt für Anaesthesiologie und spezielle anaesthesiologische Intensivmedizin (Facharztanerkennung 5/04) Klinik für Anaesthesiologie und operative Intensivmedizin Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Prof. Dr. med. J. Radke)