

Aus dem Bereich Klinische Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Fachbereich 2

Kliniken für Kinder- und Jugendmedizin

Die Bestimmung der Kupfer/Zink - Superoxid Dismutase im Serum und Liquor cerebrospinalis von Kindern mit der Frage des diagnostischen Stellenwertes

Dissertation zu Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2006

Vorgelegt von:

Daniela Nicole Kiefer

Geb. am 30.05.1979 in Saarlouis

1. Tag der Promotion:
2. Dekan:
3. Berichterstatter:

INHALTSVERZEICHNIS

1.	ZUSAMMENFASSUNGEN (DEUTSCH/ENGLISCH)	2
1.1	Die Bestimmung der Kupfer/Zink - Superoxid Dismutase im Serum und Liquor cerebrospinalis von Kindern mit der Frage des diagnostischen Stellenwertes	2
1.2	The destination of the copper/zinc Superoxide Dismutase in serum and in cerebrospinal fluid of children with the question of the diagnostic value	3
2.	EINLEITUNG	4
2.1	Charakterisierung der Superoxid Dismutase	4
2.2	Die Erstbeschreibung der Superoxid Dismutase	5
2.3	Eigenschaften und Funktionen der verschiedenen Superoxid Dismutasen	7
2.4	Die Entwicklung eines schnell durchzuführenden ELISA - Tests zum Nachweis der Cu – Zn – SOD	9
2.5	Die Superoxid Dismutase im Liquor cerebrospinalis	10
2.7	Fragestellung	11
3.	MATERIAL UND METHODIK	12
3.1	Materialien	12
3.2	Methodik	12
3.2.1	Testprinzip	12
3.2.1.1	Prinzip eines Enzyme - linked immunosorbent assay (ELISA)	12
3.2.1.2	Prinzip des Serazym Human Cu/Zn SOD ELISA	13
3.2.2	Bestandteile des Testbestecks	14
3.2.3	Testdurchführung	16
3.2.4	Testauswertung	20
3.2.5	Qualitätskriterien für den Test	21
3.2.6	Statistische Auswertung	21
4.	ERGEBNISSE	22
4.1	Ergebnisse im gesamten Kollektiv	22
4.2	Ergebnisse im Liquor cerebrospinalis	27
4.3	Ergebnisse im Serum	33
5.	DISKUSSION	41
5.1	Diskussion der Ergebnisse im Liquor cerebrospinalis	41
5.2	Diskussion der Ergebnisse im Serum	45
6.	LITERATURVERZEICHNIS	51
7.	DANK	57
8.	LEBENS LAUF	58

1. Zusammenfassungen (deutsch/englisch)

1.1 Die Bestimmung der Kupfer/Zink - Superoxid Dismutase im Serum und Liquor cerebrospinalis von Kindern mit der Frage des diagnostischen Stellenwertes

Gegenstand der Studie war die Bestimmung der Kupfer/Zink- Superoxid Dismutase (Cu/Zn- SOD, EC 1.15.1.1) bei 358 Kindern, einem antioxidativen Enzym zur Eliminierung freier Sauerstoffradikale. Dabei wurde bei 293 Kindern das Enzym im Serum und bei 65 Kindern im Liquor cerebrospinalis bestimmt.

Ziel der Untersuchungen war, herauszufinden, ob bei verschiedenen Erkrankungen die SOD verändert ist und somit ein labordiagnostischer Parameter besonders für entzündliche Prozesse zur Verfügung stünde sowie ev. auch Rückschlüsse auf den Verlauf einer Erkrankung gezogen werden können. Die Cu/Zn- SOD wurde mittels eines enzymimmunometrischen 1-Schritt Assays (ELISA) bestimmt.

Es konnte festgestellt werden, dass die Cu/Zn- SOD im Liquor cerebrospinalis signifikant höher liegt als im Serum ($p < 0,0001$).

Außerdem konnte innerhalb des „Liquorkollektives“ eine signifikante Erhöhung der Cu/Zn- SOD ($p < 0,007$) bei Kindern mit bakterieller Meningitis gemessen werden, im Vergleich zu Kindern die an einer cerebral bedingten Entwicklungsverzögerung oder an Migräne litten. Bei der Messung des Enzyms im Serum bei verschiedenen Erkrankungen (auch bei bakterieller Meningitis), konnte hingegen keine Cu/Zn- SOD Erhöhung gefunden werden.

Es kann daraus gefolgert werden, dass bei bakterieller Meningitis ein starker oxidativer Stress im zentralen Nervensystem besteht, der zu vermehrten zytotoxischen Reaktionen mit Zelluntergang führt.

Aufgrund unserer Ergebnisse ist auch zu vermuten, dass bei Kindern mit einer cerebralen Entwicklungsverzögerung die antioxidativen Abwehrmechanismen im ZNS beeinträchtigt sind, so dass neuronale Zellschäden entstehen können, welche die Entwicklung der Kinder beeinträchtigen. Therapeutische Möglichkeiten ergeben sich aus diesen Befunden jedoch nicht. Die Bestimmung der Cu/Zn – SOD stellt bislang keine Bereicherung der Diagnostik dar.

1.2 The destination of the copper/zinc Superoxide Dismutase in serum and in cerebrospinal fluid of children with the question of the diagnostic value

Object of the study was the destination of the copper/zinc Superoxide Dismutase (Cu/Zn-SOD, EC 1.15.1.1), an antioxidative enzyme to eliminate free superoxide radicals in human organism, of altogether 358 children. The enzyme was examined in the serum of 293 children and in the cerebrospinal fluid of 65 children.

Aim of the examinations was finding out whether the SOD is changed in different illnesses and so a labordiagnostical parameter especially for inflammatory processes is available and ev. by which conclusions can be drawn on the course of an illness. The Cu/Zn-SOD was determined by means of an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).

It could be noticed that the Cu/Zn-SOD is in the cerebrospinal fluid significantly more highly than in the serum ($p < 0,0001$).

In addition, a significant rise of the Cu/Zn-SOD ($p < 0,007$) could be established with children with a bacterial meningitis within the "cerebrospinal fluid collective", in comparison to children suffering from a cerebral caused development delay or migraine. At the measuring of the enzyme in the serum at different illnesses (also at bacterial meningitis) no Cu/Zn-SOD increasing could, however, be found.

It can be concluded that there is a strong oxidative stress in the central nervous system in bacterial meningitis which leads to increased cytotoxic reactions with cell decline.

Due to our results it has also to be suspected that the antioxidative defence mechanisms in the central nervous system in children with a cerebral development delay are impaired so that neuronal cell damages which impair the development of the children can arise. Therapeutical possibilities do not arise from these results however. The determination of the Cu/Zn-SOD does not represent any enriching of the diagnostics till now either.

2. Einleitung

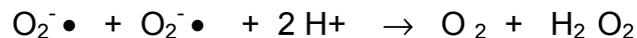
2.1 Charakterisierung der Superoxid Dismutase

Superoxid und andere reaktive Sauerstoff – Metaboliten entstehen als normale Zwischenprodukte des zellulären Metabolismus. Diese Metaboliten sind sehr reaktiv und können jede biochemische Komponente in den Zellen angreifen.

Zu deren Abwehr verfügen die Zellen über viele antioxidative Enzyme, wie z.B. die Superoxid Dismutasen (SOD), die Katalase und die Glutathionperoxidase. Bei intaktem Stoffwechsel der Zellen inaktivieren diese Enzyme rasch alle toxischen Sauerstoff- Metaboliten.

Unter pathologischen Bedingungen wie z.B. bei Entzündungs- und zytotoxischen Reaktionen steigt jedoch die Zahl der Sauerstoff – Radikale sehr stark an, so dass zur Detoxikation ausreichend antioxidative Enzyme zur Verfügung stehen müssen.

Die Superoxid Dismutase, die in der vorliegenden Studie untersucht wurde, katalysiert dabei folgende Reaktion:



Superoxidradikale werden in Wasserstoffperoxid überführt, wodurch der Start der Lipidperoxidation verhindert wird, die schweren Schaden an der Zellmembran verursachen kann (McCORD and FRIDOVICH, 1969). In Abbildung 1 ist die Superoxid Dismutase mit ihren antioxidativen Reaktionswegen dargestellt.

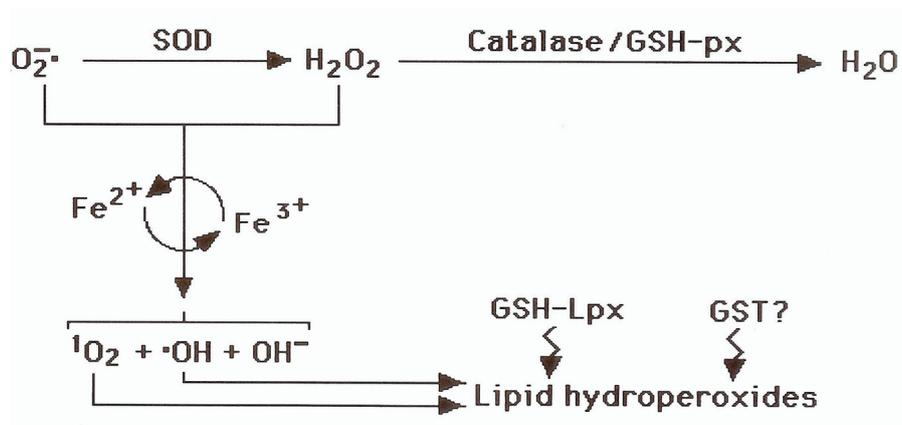


Abbildung 1

Die Superoxid Dismutase und ihre antioxidativen Reaktionswege. Abkürzungen: GSH-Lpx, Glutathionlipidhydroperoxidase; GSH-px, Glutathionperoxidase; GST, Glutathion-S-Transferase; $^1\text{O}_2$, einzelnes Sauerstoffatom; OH^- , Hydroxylion; $\bullet\text{OH}$, Hydroxylradical; $\text{O}_2^{\bullet-}$, Superoxid; H_2O_2 , Wasserstoffperoxid; SOD, Superoxid Dismutase (modifiziert nach JAMES, 1994, Parasitology today)

2.2 Die Erstbeschreibung der Superoxid Dismutase

Bereits 1939 wurde ein blaues Kupferprotein aus Rinder- Erythrozyten isoliert (MANN et al., 1939). Dieses kristalline Protein, das „Hemocuprein“ genannt wurde, enthielt 0,34 % Kupfer und hatte ein Molekulargewicht von etwa 34 kDa (kilo Dalton). Für dieses Protein konnte damals keine enzymatische Aktivität gemessen werden.

Im Jahr 1959 wurde ein Kupferprotein aus menschlichen Erythrozyten entdeckt (MARKOWITZ et al., 1959; KIMMEL et al., 1959), das „Erythrocuprein“ genannt wurde. Es war in seinem Kupfergehalt und in seiner Größe dem Hemocuprein ähnlich. Auch für Erythrocuprein konnte zunächst keine enzymatische Funktion nachgewiesen werden.

Schließlich konnten ähnliche Kupferproteine auch aus anderen Geweben nachgewiesen werden, z.B. ein Kupferprotein, das aus dem menschlichen Gehirn isoliert wurde und „Cerebrocuprein“ genannt wurde (PORTER et al., 1957). Ein so genanntes „Hepatocuprein“ wurde in Rinderleber (MANN et al., 1939) und in Pferdeleber (MOHAMED et al., 1953) gefunden. Bei keinem dieser Proteine wurde, wie auch bei den erythrozytären Proteinen, eine enzymatische Aktivität entdeckt.

1969 gelang es McCORD und FRIDOVICH (McCORD, FRIDOVICH, 1969) nachzuweisen, dass es sich bei den Kupfer enthaltenden Proteinen um ein Enzym handelt, das die Dismutation von freien Superoxid Radikalen katalysiert. Sie nannten das Enzym daher „Superoxid Dismutase“.

1970 wurden weitere Superoxid Dismutasen entdeckt, die Mangan (KEELE et al., 1970) oder Eisen (YOST et al., 1973) enthielten. Sie konnten zunächst nur in Prokaryonten nachgewiesen werden. Die Mangan – Superoxid Dismutase (Mn – SOD) wurde 1973 auch in den Mitochondrien von Eukaryonten gefunden (WEISINGER et al., 1973). Die Eisen – Superoxid Dismutase (Fe – SOD) und die Mn – SOD zeigten gewisse Übereinstimmungen in den DNA - Sequenzen nicht jedoch im Vergleich zur Cu/ Zn – SOD (STEINMANN et al., 1973).

Eine neue Form der SOD, welche Nickel enthält, wurde 1996 in *Streptomyces species* nachgewiesen (YOUN et. al, 1996).

1980 bis 1982 wurde eine weitere Unterform der Superoxid Dismutasen entdeckt. Dabei handelt es sich um die so genannte EC – SOD, eine Superoxid Dismutase, die vor allem in extracellulären Flüssigkeiten vorkommt und, ähnlich wie die Cu – Zn – SOD, Kupfer und Zink enthält. Sie hat jedoch ein höheres Molekulargewicht von etwa 130 kDa (MARKLUND, 1980; MARKLUND et al., 1982).

Ebenfalls 1980 wurde die komplette Aminosäuren – Sequenz der menschlichen Cu – Zn – SOD entschlüsselt (BARRA et al., 1980). Dabei konnten teilweise identische Sequenzen im Vergleich mit Pferde -, Rinder – und Hefen- Aminosäure- Sequenzen der SOD gefunden werden. Abbildung 2 zeigt die Aminosäure-Sequenzen der SOD von Mensch, Pferd, Rind und Hefe im Vergleich.

Hefe	VQ AV A VLKG DAC V S G VVK FE QASESEFTTVSYE I AGNSF
Rind	TK AV C VLKG DGF V Q G TIH FE AKG DFVVVTGSI TG LT
Pferd	LK AV C VLKG DCF V H G VIH FE QQQEGGFVVLKGF I EG LT
Mensch	TK AV C VLKG NGF V Q G IIN FE QKESNGFVKVWGS I KG LT
Hefe	NAER GFH I H E FGD A T N GC VS AG P HFNF FKKT HG A F T DE V
Rind	EGDH GFH V H Q FGD N T Q GC TS AG P HFNF LSKK HG G F K DE E
Pferd	KGDH GFH V H E FGD N T Q GC TT AG Q HFNF LSKK HG G F K DE E
Mensch	EGLH GFH V H E FGD N T A GC TS AG F HFNF LSRK HG G F K DE E
Hefe	RHVGD M GNV KT DE NG V A KGSFK D SL I K L I G FTSVV GR SV V I
Rind	RHVGD L GNV TA DK NG V A IVDIV D FL I S L SG EYSII GR TM V V
Pferd	RHVGD L GNV TA DE NG K A DVDMK D SV I S L SG KHSII GR TM V V
Mensch	RHVGD L GNV TA DK NG V A DVSIE D SV I S L SG DHCII GR TL V V
Hefe	H AGQ DDLG K G DT EES L KTGNAG F R F ACGVIG LTN
Rind	H EKf DDLG R G GN EES T KTGNAG S R L ACGVIG IAK
Pferd	H EKQ DDLG K G GN EES T KTGNAG S R L ACGVIG IAF
Mensch	H EKA DDLG K G GN EES T KTGNAG S R L ACGVIG IAQ

Abbildung 2

Modifiziert nach BARRA et al. (1980): Vergleich der Primärstruktur der Cu – Zn – SOD von Hefen, Rindern, Pferden und Mensch. Identische Aminosäuren sind fett gedruckt markiert.

2.3 Eigenschaften und Funktionen der verschiedenen Superoxid Dismutasen

Wie bereits unter 2.2 erwähnt, existiert die Superoxid Dismutase in drei verschiedenen Formen: der Kupfer – Zink – Superoxid Dismutase (Cu – Zn – SOD), der Mangan – Superoxid Dismutase (Mn – SOD) und der Extrazellulären Superoxid Dismutase (EC – SOD).

Die Cu – Zn – SOD ist im Zytoplasma von Zellen lokalisiert. Sie ist ein Dimer aus zwei identischen nicht glycosilierten Polypeptidketten mit 153 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von jeweils 16 kDa (BARRA et al., 1980). Die Synthese wird durch ein Gen auf dem distalen Abschnitt des Chromosoms 21 (21q 22.1) gesteuert (SINET et al., 1976).

Die Kupfer – Zink – Superoxid Dismutase wird nicht durch proentzündliche Zytokine induziert im Gegensatz zur Mangan abhängigen Superoxid Dismutase. Ihre Konzentration ist daher nahezu unabhängig vom Aktivierungsgrad der Zellen. Somit eignet sich die Quantifizierung der Cu – Zn – SOD für den Nachweis zytotoxischer Reaktionen, bei denen sie aus den geschädigten Zellen freigesetzt wird. Diese zytotoxischen Reaktionen spielen eine wesentliche Rolle in der Abwehr von Mikroorganismen und der Eliminierung geschädigter Zellen.

Zwischen der Mn – SOD und der Fe – SOD existiert eine augenscheinliche DNA – Sequenzgleichheit, für die ein gemeinsamer evolutionärer Ursprung für wahrscheinlich gehalten wird (BANNISTER et al., 1991; SMITH et al., 1992). In Eukaryonten wird die Mn – SOD von einem nukleären Gen codiert und ihre Aktivität ist in den meisten Zellen auf die Mitochondrien beschränkt. Ein Vorkommen der Fe – SOD wurde in Pflanzen (SMITH et al., 1992; VAN CAMP et al., 1990) und einigen Protozoen (BARRA et al., 1990; BRUCHHAUS et al., 1992; LE TRANT et al., 1983) beschrieben. Die Mn – SOD findet man nicht nur in menschlichen Zellen, sondern in fast allen Eukaryonten. Bakterielle Mn/ Fe – SOD kann sowohl homodimer als auch tetramer sein, während die Mn – SOD in den Mitochondrien von Eukaryonten tetramer ist (BORGSTAHL et al., 1992), ebenso wie die zytosolische Fe – SOD in Pflanzen und Protozoen (BARRA et al., 1990). Die monomere Form der Mn/ Fe – SOD hat ein Molekulargewicht von ca. 20 – 24 kDa und enthält ein Metallion pro Monomer. Dabei ist das jeweilige Metall spezifisch und ein Austausch gegen ein anderes Metall bedeutet einen Aktivitätsverlust des Enzyms (BEYER et al., 1991). Mn/ Fe – SOD besteht hauptsächlich aus α -Helices mit der Metallbindung an drei Histidinresten und einem Aspartat (FRIDOVICH, 1986).

Die EC – SOD ist die vorherrschende SOD – Unterform im Extrazellulärraum. Sie enthält ebenfalls Kupfer und Zink, hat jedoch ein Molekulargewicht von etwa 134 k Da (MARKLUND, 1982; MARKLUND et al., 1982). Sie ist ein sekretorisches Glykoprotein, besitzt eine Heparin- bindende Domäne (MARKLUND et al., 1982) und ist hauptsächlich an die extrazelluläre Matrix von Geweben gebunden. Im Hinblick auf ihre Affinität zu Heparin ist sie heterogen und kann in fünf Fraktionen (I – V) unterteilt werden (SANDSTRÖM et al., 1993; OURY et al., 1994).

Interessant ist die Rolle der Superoxid Dismutase für die Diagnostik der Trisomie 21. Die Trisomie 21 („Down Syndrom“) ist mit Abstand die häufigste Chromosomenaberration (Inzidenz 1/600 bis 1/800 Lebendgeburten) mit mehr oder minder schwerer psychomotorischer Retardierung, angeborenen Herzfehlern und weiteren Fehlbildungen, Immundefekten und erhöhter Leukoserate. In 95 % der Fälle wird das Down Syndrom durch ein zusätzliches Chromosom 21 verursacht. Dabei handelt es sich um die freie Trisomie oder numerische Chromosomenaberration. In 5 % der Fälle wird die Trisomie durch ein zusätzliches Bruchstück des Chromosoms 21 verursacht, die strukturelle Chromosomenaberration.

Das Gen für die Synthese der Cu – Zn – SOD ist in oder nahe dem für das Down Syndrom verantwortlichen Genkomplex auf dem Chromosom 21 lokalisiert; der Gen – Dosis – Effekt wurde für die Cu – Zn – SOD beim Down Syndrom nachgewiesen (SINET et al., 1976). Da die immunchemische Quantifizierung der Cu – Zn – SOD der Erythrozyten prä- und postnatal bei Trisomie 21 signifikant erhöhte Konzentrationen sowohl bei Bezug auf die Zellzahl als auch den Hämoglobingehalt ergab (PORSTMANN et al., 1990; PORSTMANN et al., 1991), gilt die Quantifizierung des Cu – Zn – SOD Gehaltes in Erythrozyten als ein sehr zuverlässiger Parameter für das Vorliegen numerischer und struktureller Chromosomenaberrationen.

1993 fand man, dass die Cu – Zn – SOD auch eine Rolle in der Pathogenese der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS) spielt (DENG et al., 1993). Die ALS ist die häufigste motorische Systemkrankheit. Ihre Inzidenz wird auf 1-2 pro 100.000 Einwohner geschätzt. Dabei findet man eine Kombination von nukleärer Atrophie und Degeneration der Pyramidenbahnen, so dass es bei dem voll ausgebildeten Krankheitsbild gleichzeitig zu Muskelatrophie und spastischen Lähmungen kommt. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 65 Jahren. Die Erkrankung verläuft meist rasch, nur ein Drittel der Erkrankten überlebt 5 Jahre nach Diagnosestellung.

Man unterscheidet bei der ALS eine sporadische und eine familiäre Form. Die familiäre Form wird autosomal dominant vererbt. Da der Genlokus auf Chromosom

21 in der Region, die die Cu – Zn – SOD kodiert, liegen soll, nimmt man an, dass eine verminderte Aktivität der Cu – Zn – SOD für die Entstehung einer amyotrophen Lateralsklerose mit verantwortlich ist.

Mittlerweile wurden mehr als 100 Mutationen im Cu – Zn – SOD Gen gefunden, die für ca. 20 % der familiären ALS verantwortlich sind. Es werden immer weitere Gendefekte identifiziert, wie zuletzt eine seltene Genmutation in einer chinesischen Familie, die an einer über 5 Generationen reichenden familiären ALS leidet (ZHANG et al., 2005).

2.4 Die Entwicklung eines schnell durchzuführenden ELISA - Tests zum Nachweis der Cu – Zn – SOD

Im Jahr 1990 entwickelten Porstmann et al. einen schnellen immunenzymometrischen Assay (Enzyme Linked Immunosorbent Assay – ELISA, PORSTMANN et al., 1990).

Dazu produzierten sie monoklonale IgG Antikörper aus Mäusen durch Immunisierung mit rekombinanter Cu – Zn – SOD. Diese Antikörper waren gegen vier verschiedene Epitope auf der Cu – Zn – SOD aus menschlichen Erythrozyten gerichtet.

Die Antikörper reagierten gut mit dem rekombinanten Protein und der menschlichen Cu – Zn – SOD. Dabei wurden Bindungskonstanten von 8.8×10^8 bis zu 2.2×10^{10} l/mol erzielt. Sie geben Auskunft über die Stärke der Bindung zwischen Rezeptor und Ligand, in diesem Fall zwischen Antikörper und Protein bzw. menschlicher Cu – Zn – SOD. Nach Vermischung verhinderten diese Antikörper die Bindung von polyklonalen Antikörpern von Kaninchen und Schafen, die gegen die erythrozytäre Cu – Zn – SOD wirkten. Während ein Antikörper gegen eine gemeinsame homologe Region von Rinder Cu – Zn – SOD und menschlicher Cu – Zn – SOD gerichtet war, reagierten alle anderen Antikörper ausschließlich oder bevorzugt mit der menschlichen Cu – Zn – SOD. Nur ein Epitop auf dem menschlichen Cu – Zn – SOD Molekül war auf zwei verschiedenen Seiten zugänglich. Man konnte dies zeigen in einem Zwei – Seiten – Assay mit ein und demselben Antikörper, der sowohl als Sicherungs- als auch als Indikator- Antikörper verwendet wurde. In dem indirekten Zwei–Seiten–Assay mit unbeladenen monoklonalen Antikörpern wurde ein additiver Effekt erreicht, so dass eine Kurve resultierte, die stufenweise dosisabhängig

ansteigt. Dieser Effekt konnte durch eine Mischung der Antikörper gegen verschiedene Epitope erreicht werden. So wurde ein schneller Zwei – Seiten – Enzym Immunoassay mit Antikörpern gegen zwei verschiedene Epitope entwickelt. Dabei lag die Nachweisgrenze bei 0,5 µg SOD/ l.

2.5 Die Superoxid Dismutase im Liquor cerebrospinalis

Das Gehirn ist reich an oxidierbaren Substraten, vor allem an mehrfach ungesättigten Fettsäuren und Katecholaminen. Daher verbraucht es sehr viel Sauerstoff, so dass auch viele Sauerstoffradikale anfallen, die Schäden verursachen können. Die Radikale, die bei der Reduktion von Sauerstoff zu Wasser entstehen, sind meist Superoxid ($O_2^{\cdot-}$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Wasserstoffradikale ($OH\cdot$). Sie können mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren, DNS, Enzymen oder anderen Molekülen reagieren und Zellschäden mit erheblichen Funktionsstörungen bis hin zum Zelltod verursachen.

Zur Eliminierung dieser schädigenden Substrate verfügt das Gehirn ebenso wie alle anderen Körperflüssigkeiten über die Superoxid Dismutase. Daneben sind auch Moleküle wie Glucose, Albumin, Harnsäure, Coeruloplasmin, Transferrin, Vitamin A, E und C sowie Thiolgruppen (-SH) enthaltende Moleküle bei der Abwehr von Radikalen eingeschaltet.

1992 untersuchten LABOYRIE et al. den Liquor cerebrospinalis auf seinen Gehalt an Cu – Zn – SOD (LABOYRIE et al., 1992). Er eliminiert nicht nur schädigende Verbindungen, sondern erfüllt auch eine nutritive und protektive Funktion.

LABOYRIE et al. fanden einen hoch signifikanten Unterschied zwischen der Konzentration an Cu – Zn – SOD im Serum und derjenigen im Liquor cerebrospinalis. Sie untersuchten den Liquor cerebrospinalis und das Blut von 36 Patienten, von denen 6 Patienten einen lumbalen Bandscheibenvorfall, 3 eine Polyneuropathie, 7 einen cerebralen Insult, 10 Kopfschmerzen unklarer Genese und 10 verschiedene Erkrankungen im Bereich des ZNS hatten. In ihren Ergebnissen stellten sie eine Cu – Zn – SOD Konzentration im Plasma von $91,6 \pm 18,2$ ng SOD/ml und eine Konzentration im Liquor cerebrospinalis von $286,2 \pm 33,5$ ng SOD/ml fest, ohne Unterschiede im Bezug auf die verschiedenen Diagnosen.

ADACHI et al. untersuchten 2001 ebenfalls den Liquor cerebrospinalis, auf extracelluläre SOD (EC-SOD) in Proben von Kindern (ADACHI et al., 2001). Die

Liquorproben stammten von Kindern die wegen Verdacht auf Meningitis lumbal punktiert wurden. Sie fanden eine mittlere Konzentration der EC-SOD im Liquor cerebrospinalis von $29,9 \pm 9,8$ ng/ml bei Knaben und eine Konzentration von $30,1 \pm 9,7$ ng/ml bei Mädchen, also praktisch identische Befunde.

2.7 Fragestellung

Zu Beginn des neuen Jahrtausends wurden zahlreiche Studien über die SOD veröffentlicht. Dabei wurde aber zumeist die EC-SOD untersucht, oder aber Untersuchungen bei Erwachsenen durchgeführt. Nur wenige Publikationen sind über die Cu – Zn – SOD bei Kindern - insbesondere im Liquor cerebrospinalis - zu finden.

In der vorliegenden Untersuchung wurden Seren und Liquores cerebrospinalis von Kindern mit verschiedenen Erkrankungen auf ihren Gehalt an Cu – Zn – SOD untersucht mit der Frage,

- a) ob die Cu – Zn –SOD (ebenso wie die EC – SOD) bei Kindern im Liquor cerebrospinalis erhöht ist – also ein diagnostisches Kriterium darstellt - , insbesondere bei bestimmten Erkrankungen des ZNS (z.B. Meningitis, Encephalitis, Hydrocephalus) und sich daraus ergäbe, eventuell zusätzlich mit antioxidativen Substanzen zu behandeln um die Heilungschancen zu verbessern (z.B. bei eitriger Meningitis).
- b) ob signifikante Unterschiede an Cu – Zn – SOD im Serum bei verschiedenen Erkrankungen vorliegen, die eventuell auch einen prognostischen Rückschluss auf den Verlauf zulassen.
- c) ob bei Kindern mit angeborenen Herzfehlern, insbesondere zyanotische Herzfehler, der Messung der Cu/Zn-SOD eine klinische Bedeutung zukommt.

3. Material und Methodik

3.1 Materialien

In der vorliegenden Studie wurden Seren und Liquor cerebrospinalis auf ihren Gehalt an Kupfer - Zink – Superoxid Dismutase getestet. Dabei wurde der Serazym Human Cu/Zn SOD ELISA der Firma Seramun Diagnostica GmbH verwendet.

Die Proben, welche analysiert wurden, stammen von Patienten, vorwiegend Kindern, im Alter von 0 bis 33 Jahren.

Die Kinder litten an folgenden verschiedenen Erkrankungen: 50 mit Cystischer Fibrose, 30 mit Diabetes mellitus Typ 1, 96 mit angeborenen Herzfehlern, 45 mit Juveniler chronischer Polyarthrit, 13 mit endokrinen Störungen, 7 mit Hämophilie A, 7 mit Galaktosämie, 9 mit M.Crohn sowie 34 mit differierenden neurologischen Erkrankungen wie z.B. Meningitis.

Die Kinder, deren Liquor cerebrospinalis untersucht wurde, hatten folgende neurologische Diagnosen: 7 mit Meningitis purulenta, 12 mit cerebraler Entwicklungsverzögerung, 12 mit Hydrozephalus, 9 mit cerebralem Krampfleiden, 12 mit peripherer Facialisparesis, 11 mit Migräne, 7 Kinder wiesen einen unauffälligen Liquor cerebrospinalis auf.

Die untersuchten Proben wurden bis zur Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ tiefgekühlt gelagert, der Serazym Human Cu/Zn SOD ELISA bei $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2 Methodik

3.2.1 Testprinzip

3.2.1.1 Prinzip eines Enzyme - linked immunosorbent assay (ELISA)

Beim ELISA wird der Antikörper für das nachzuweisende Protein an eine feste polymere Matrix gebunden (Abbildung 3). Gibt man jetzt einen Tropfen der zu untersuchenden Probe auf die Platte, so bilden sich Antigen – Antikörper –

Komplexe. Nach dem Waschen der Platte zur Entfernung ungebundener Moleküle, fügt man einen zweiten Antikörper hinzu, der eine andere Stelle auf dem Antigen erkennt, dann wäscht man erneut. Die an die Platte gebundene Menge dieses zweiten Antikörpers ist der Menge des gebundenen Antigens proportional. Der zweite zugegebene Antikörper ist mit einem Enzym verknüpft, welches mit großer Geschwindigkeit ein zugegebenes farbloses Substrat in ein farbiges Produkt oder ein nicht fluoreszierendes Substrat in ein intensiv fluoreszierendes Produkt umwandeln kann

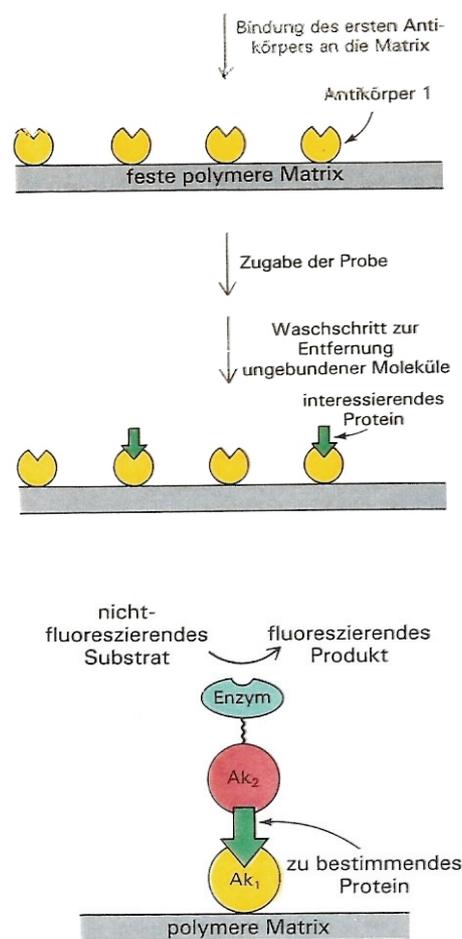


Abbildung 3
Prinzip eines ELISA

3.2.1.2 Prinzip des Serazym Human Cu/Zn SOD ELISA

Der Serazym Human Cu/Zn SOD ELISA ist ein schneller immunenzymometrischer Ein – Schritt Assay auf der Basis hochaffiner polyklonaler und monoklonaler Antikörper gegen Cu/Zn SOD.

Dabei werden die zu untersuchenden Proben, im vorliegenden Fall Serum und Liquor cerebrospinalis, simultan mit Peroxidase-markierten monoklonalen anti - Cu/Zn SOD – Antikörpern in die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen, die mit polyklonalen anti-human Cu/Zn SOD Antikörpern beschichtet sind, pipettiert. Nach 20 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur (20- 25 °C) werden die ungebundenen Komponenten aus den Vertiefungen abgesaugt, die Vertiefungen fünfmal mit Waschpuffer gewaschen und mit Substrat für die enzymatische Reaktion gefüllt. Nach zehn Minuten Reaktionszeit bei Raumtemperatur erfolgt der Reaktionsstopp durch Zugabe von Schwefelsäure in die Vertiefungen. Die Extinktion der von blau nach gelb verfärbten Lösungen wird nun durch Wellenlängenmessung bei 450 nm bei einer Referenzwellenlänge von 620 nm bestimmt, so dass ein ΔE resultiert. Anhand der Extinktionen der mitgeführten Cu/Zn SOD – Standardkonzentrationen lässt sich eine Bezugskurve berechnen, mit deren Hilfe aus der Extinktion der untersuchten Probe auf die Cu/Zn SOD – Konzentration geschlossen werden kann.

3.2.2 Bestandteile des Testbestecks

- 1 Mikrotiterstreifen und Streifenhalter
12 Streifen mit jeweils 8 Vertiefungen, beschichtet mit polyklonalen Antikörpern gegen human Cu/Zn SOD, vakuumversiegelt mit Trockenbeutel

- 2 50 ml Waschpuffer 10-fach
Konzentrat für 500 ml, pH 7,4 \pm 0,1

Trispuffer	0,1	mol/l
Natriumchlorid	2,5	mol/l
Tween 20	1,0	% (w/v)
Thiomersal	0,01	% (w/v)

- 3 50 ml Verdünnungsmedium
gebrauchsfertig, pH 7,4 \pm 0,1

Trispuffer	0,01	mol/l
Natriumchlorid	0,25	mol/l
Haemaccel r 35	5	% (v/v)
Tween 20	0,1	% (v/v)

	Phenolrot	0,001	% (w/v)
	Thiomersal	0,01	% (w/v)
4	0,5 ml Cu/Zn SOD Standard 11-fach konzentrierte Lösung		
	Trispuffer	0,01	mol/l
	Natriumchlorid	0,25	mol/l
	Cu/Zn SOD	0,55	µg/ml
	Rinderserum-Albumin	5	% (w/v)
	Saccharose	4	% (w/v)
	Kathon*	1,0	% (v/v)
5	0,5 ml Cu/Zn SOD Kontrolle 1, 11-fach konzentrierte Lösung		
	Trispuffer	0,01	mol/l
	Natriumchlorid	0,25	mol/l
	Cu/Zn SOD	0,22	µg/ml
	Rinderserum-Albumin	5	% (w/v)
	Saccharose	4	% (w/v)
	Kathon*	1,0	% (v/v)
6	0,5 ml Cu/Zn SOD Kontrolle 2, 11-fach konzentrierte Lösung		
	Trispuffer	0,01	mol/l
	Natriumchlorid	0,25	mol/l
	Cu/Zn SOD	0,11	µg/ml
	Rinderserum-Albumin	5	% (w/v)
	Saccharose	4	% (w/v)
	Kathon*	1,0	% (v/v)
7	0,3 ml anti-human Cu/Zn SOD- POD- Konjugat , 101-fach konzentrierte Lösung		
	Trispuffer	0,01	mol/l
	Natriumchlorid	0,25	mol/l
	Rinderserum-Albumin	5	% (w/v)

Saccharose	4	% (w/v)
Kathon*	1,0	% (v/v)
Anti-human Cu/Zn SOD-POD		

8	15 ml TMB/ Substratlösung gebrauchsfertig		
	Zitratpuffer, pH 4,1 ± 0,1	25	mmol/l
	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin	1,0	mmol/l
	Wasserstoffperoxid	2,4	mmol/l
	Kathon*	0,008	% (v/v)
9	15 ml Stopplösung gebrauchsfertig		
	Schwefelsäure	0,25	mol/l

* ein Stoff aus der Gruppe der Isothiazone, ein Konservierungsstoff

3.2.3 Testdurchführung

Zunächst wurden die benötigten Reagenzien folgendermaßen vorbereitet:

50 ml gebrauchsfertiger Waschpuffer wurden mit 450 ml frischem, keimfreiem destilliertem Wasser verdünnt;

50 µl Cu/Zn SOD Standard wurden mit 500 µl Verdünnungsmedium verdünnt, so dass ein Standard 1 mit 50 ng/ml entstand;

Weiterhin wurden 200 µl des Standard 1 mit 200µl des Verdünnungsmediums verdünnt, so dass ein Standard 2 mit 25 ng/ml resultierte;

Nachfolgend wurden wiederum 200 µl des Standard 2 mit 200µl des Verdünnungsmediums vermischt, so dass ein weiterer Standard 3 mit 12,5 ng/ml entstand; Standard 4 (6,25 ng/ml) und Standard 5 (3,125 ng/ml) wurden ebenso durch Anreichern der Standards 3 und 4 mit 200µl des Verdünnungsmediums erzeugt.

Zur Qualitätssicherung der Tests wurden jeweils Cu/Zn SOD Kontrollen hergestellt. Dabei wurden 25 µl der Cu/Zn SOD Kontrolle 1 mit 250 µl des Verdünnungsmediums verdünnt, so dass eine Kontrolle 1 mit 20 ng/ml entstand; Kontrolle 2 mit 10 ng/ml wurde durch Zugabe von 250 µl des Verdünnungsmediums zu 25 µl Cu/Zn SOD Kontrolle 2 erzeugt.

80 µl Anti-human Cu/Zn SOD-POD-Konjugat wurden mit 8,00 ml Verdünnungsmedium verdünnt.

Die gefrorenen Proben wurden im Wasserbad auf Raumtemperatur erwärmt und gut gemischt.

Die Serum Proben wurden anschließend unverdünnt weiterverwendet, während von den Proben aus Liquor cerebrospinalis jeweils Verdünnungsreihen angelegt wurden, da sich bereits nach den ersten Tests zeigte, dass der Gehalt an Cu - Zn – SOD im Liquor cerebrospinalis weitaus höher liegt, als die Nachweisgrenze des Tests von 50 ng/ml. Dabei wurde zunächst 1: 10 verdünnt, indem 50 µl Liquor cerebrospinalis mit 450 µl NaCl – Lösung 0,9% vermischt wurden. Dann wurde 1: 20 verdünnt, indem 100 µl der Verdünnung 1: 10 mit 100 µl NaCl – Lösung 0,9% vermengt wurden.

Nach Abschluss aller Vorbereitungen, wurden jeweils 50 µl der gebrauchsfertigen Konjugatlösung in alle Vertiefungen der Mikrotiterplatte (Abbildung 4) mittels einer Multipette (Abbildung 5, links) pipettiert.



Abbildung 4
Mikrotiterplatte



Abbildung 5
Multikanalpipette(links) und Eppendorfpipetten

Dann wurden ein Leerwert des Verdünnungsmediums, die Standards und Kontrollen, sowie die Proben mittels einer Multikanalpipette (Abbildung 6) in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte überführt.



Abbildung 6
Multikanalpipette

Dabei wurden wiederum jeweils 50 µl pipettiert unter Verwendung neuer Pipettenspitzen für jede Reihe der Mikrotiterplatte.

Von allen Standards, Proben, Kontrollen sowie vom Leerwert wurden Doppelbestimmungen angelegt.

Dann wurde die Mikrotiterplatte mit selbstklebender Folie abgedeckt und anschließend bei 20-25 °C auf einem Mikrotiterplattenschüttler bei 200 U/min für 20 ± 1 Minute inkubiert.

Inzwischen wurde ein Automatikwascher (Abbildung 7) mit dem zuvor vorbereiteten Waschpuffer gepipet.



Abbildung 7
Automatikwascher

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Mikrotiterplatte in den Automatikwascher eingesetzt und dann fünfmal mit je 400 μl Waschlösung pro Vertiefung gewaschen. Dabei wurde darauf geachtet, dass nach 10 bis 15 Sekunden der Waschpuffer aus den Vertiefungen komplett abgesaugt wurde.

Nach Beendigung des automatischen Waschvorgangs wurde die restliche Waschlösung durch Ausklopfen der Mikrotiterplatte auf Filterpapier entfernt.

Im nächsten Arbeitsgang wurden je 100 μl gebrauchsfertige TMB/Substratlösung mittels einer Multipette in alle Vertiefungen pipettiert.

Es folgte eine weitere Inkubation bei 20-25 $^{\circ}\text{C}$ auf einem Mikrotiterplattenschüttler bei 200 U/min im Dunkeln für 10 ± 1 Minuten.

Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde die Reaktion mittels der Stopplösung beendet. Dazu wurden 100 μl je Vertiefung pipettiert. Dadurch färbte sich das vorher blaue Reaktionsprodukt in ein gelbes Endprodukt.

Die Messung der Extinktionen der Proben erfolgte bei 450 nm Wellenlänge bei einer Referenzwellenlänge von 620 nm, so dass ein ΔE entsteht.

Die Bestimmung der Extinktionen erfolgte innerhalb von maximal 30 Minuten nach Zugabe der Stopplösung mit Hilfe eines Photometers der Firma DRG (Abbildung 8).



Abbildung 8
Photometer

3.2.4 Testauswertung

Die Mittelwerte der Extinktionen aus den Doppelbestimmungen der Standards, der Kontrollen und der untersuchten Proben, wurden mit Hilfe eines Computerprogrammes der Firma WREG – DRG bestimmt.

Durch Auftragen der Extinktionswerte der entsprechenden Standards 1 bis 5 auf der y – Achse gegen die Cu – Zn – SOD – Konzentrationen der Standards auf der x – Achse wurde eine Bezugskurve (Abbildung 9) erstellt.

Typische Bezugskurve Cu/Zn-SOD-EIA

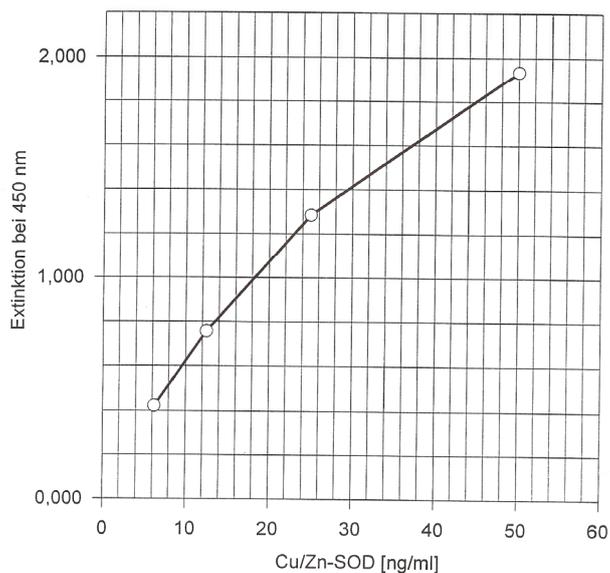


Abbildung 9

Typische Bezugskurve des Cu/Zn-SOD enzym immunometric assay

Anhand dieser Bezugskurve wurde nun der Cu – Zn – SOD – Gehalt der Proben aus den Extinktionsmittelwerten ermittelt. Dabei wurden verdünnte Proben mit den jeweiligen Verdünnungsfaktoren multipliziert, um den Cu – Zn – SOD – Gehalt der Originalproben zu berechnen.

3.2.5 Qualitätskriterien für den Test

Zur Qualitätskontrolle des Tests wurden Gültigkeitskriterien angelegt, so dass nur im Falle der Erfüllung dieser Kriterien eine Auswertung des Tests erfolgte.

Doppelbestimmungen aller Proben und Standards wurden angelegt und bei beiden Proben die Extinktion bestimmt. Der Mittelwert aus den beiden Extinktionen wurde anschließend berechnet. Zeigte sich eine Standardabweichung größer 30% in den ermittelten Werten der Doppelbestimmungen, wurde die jeweilige Probe verworfen.

Der Test wurde ausgewertet, wenn der Extinktionsmittelwert des Verdünnungsmediums $\leq 0,10$ war, der Extinktionsmittelwert des Standards 1 (50 ng/ml) $\geq 1,50$ lag. Die Kontrolle 1 musste > 17 ng/ml und < 23 ng/ml sein, sowie die Kontrolle 2 > 8 ng/ml und < 13 ng/ml

3.2.6 Statistische Auswertung

Die Auswertung der Konzentrationen der Proben an Cu – Zn – SOD erfolgte mittels des Statistikprogrammes SPSS 11.5 (Statistical Package for the Social Sciences). Dabei wurden grundsätzlich zwei Kollektive, nämlich ein Kollektiv, bei dem das zu untersuchende Enzym im Serum bestimmt wurde, im Folgenden „Serumkollektiv“ genannt, und ein Kollektiv, bei dem das zu untersuchende Enzym im Liquor cerebrospinalis untersucht wurde, im Folgenden „Liquorkollektiv“ genannt, unterschieden.

4. Ergebnisse

4.1 Ergebnisse im gesamten Kollektiv

Die Auswertung der mit Serazym Human Cu/Zn SOD ELISA gewonnenen Ergebnisse erfolgte mit Hilfe des Programmes SPSS 11.5 (Statistical Package for the Social Sciences).

Insgesamt wurden 364 Proben untersucht, davon 65 Liquor cerebrospinalis – Proben und 299 Serum – Proben (Tabelle 1).

Anzahl der untersuchten Proben mit Geschlechtsverteilung in den unterschiedlichen Gruppen

Gruppe	Anzahl	männlich	weiblich
Serum	299	146	153
Liquor cerebrospinalis	65	27	38
Gesamt	364	173	191

Tabelle 1

Tabelle 2 stellt die Häufigkeiten der unterschiedlichen Diagnosen in Serum- und Liquor- Gruppe dar.

Häufigkeiten der einzelnen Diagnosen

Diagnose		Häufigkeit absolut	Prozent
Serum-Gruppe	Cystische Fibrose	50	13,7
	Diabetes mellitus	30	8,2
	Endokrinologische Diagnosen	13	3,6
	Hämophilie	7	1,9
	Kardiologische Diagnosen	96	26,4
	M.Crohn	9	2,5
	Juvenile idiopathische Arthritis	45	12,4
	Galaktosämie	7	1,9
	Neurologische Diagnosen	34	9,3
	Gesunde Neugeborene	8	2,2
Liquor-Gruppe	Meningitis	7	1,9
	Entwicklungsverzögerung	12	3,3
	Hydrocephalus	7	1,9
	Epilepsie	9	2,5
	Periphere Facialisparese	12	3,3
	Migräne	11	3,0
	Liquor cerebrospinalis unauffällig	7	1,9
Gesamt		364	100,0

Tabelle 2

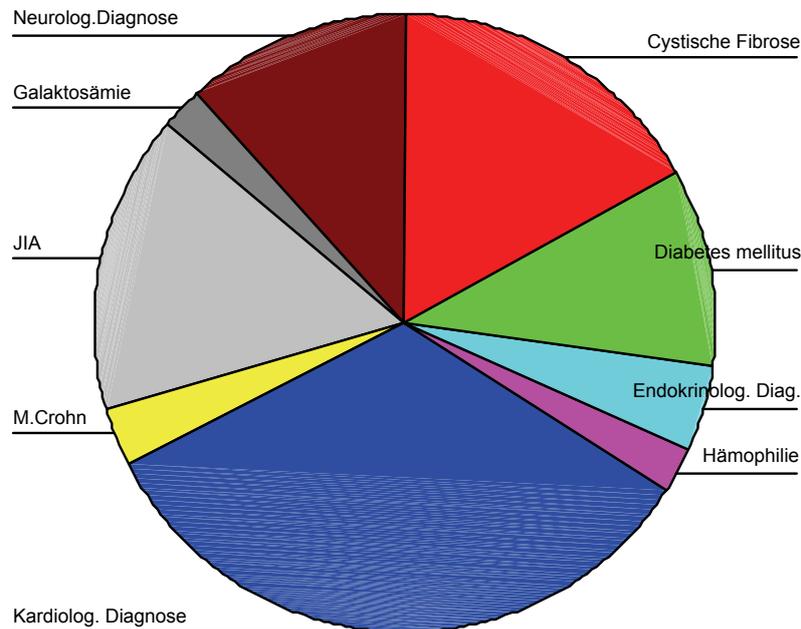


Abbildung 10
Anteil der verschiedenen Diagnosegruppen im Serumkollektiv

Die Altersverteilung in den Gruppen ist in Tabelle 3 dargestellt.

Altersmittelwerte in den Gruppen

Gruppe	Mittelwert des Alters in Jahren	Anzahl der Kinder	Standardabweichung
Serum-Gruppe	8,99	291	5,82
Liquor-Gruppe	9,02	64	4,86
Insgesamt	8,79	355	5,75

Tabelle 3

In der „Serum-Gruppe“ liegt der Altersmittelwert der 291 untersuchten Kinder bei 8,99 Jahren mit einer Standardabweichung von 5,82 Jahren. Ähnliche Werte konnten in der „Liquor-Gruppe“ ermittelt werden mit einem Mittelwert von 9,02 Jahren und einer Standardabweichung von 4,86 Jahren. Da bei insgesamt 96 Kinder im Gesamtkollektiv eine kardiologische Diagnose vorlag (und diese teilweise stark voneinander abwichen) wurde das kardiologische Kollektiv wiederum unterteilt in folgende Diagnosegruppen:

10 Kinder mit einer Fallot'schen Tetralogie, 21 Kinder mit einem Atrium – Septum – Defekt Typ II, 6 Kinder mit einer Trisomie 21, 11 Kinder mit einer Transposition der großen Arterien, 30 Kinder mit komplexen Herzfehlern und 10 Kinder mit Klappenvitien, 4 Kinder mit Ventrikel- Septum- Defekt und 4 Kinder mit Aortenisthmusstenose. Die einzelnen Diagnosegruppen wurden wieder auf Abweichungen und Unterschiede in ihrem Gehalt an Cu – Zn – SOD untersucht.

Außerdem wurde der Gehalt an Cu – Zn – SOD im Serum von 8 neugeborenen, gesunden Kindern bestimmt. Diese Gruppe von Kindern wird im Folgenden „Gesunde Gruppe der Neugeborenen“ genannt.

Bei der Auswertung der Befunde in den unterschiedlichen Gruppen hinsichtlich der Konzentration an Cu – Zn – SOD wurden die Werte logarithmiert, da sich zeigte, dass sowohl im Serum als auch im Liquor cerebrospinalis keine Normalverteilung vorliegt (Abbildung 11). Der logarithmierte Cu – Zn – SOD Wert wird nachfolgend mit „LogCu/Zn-SOD-Wert“ bezeichnet.

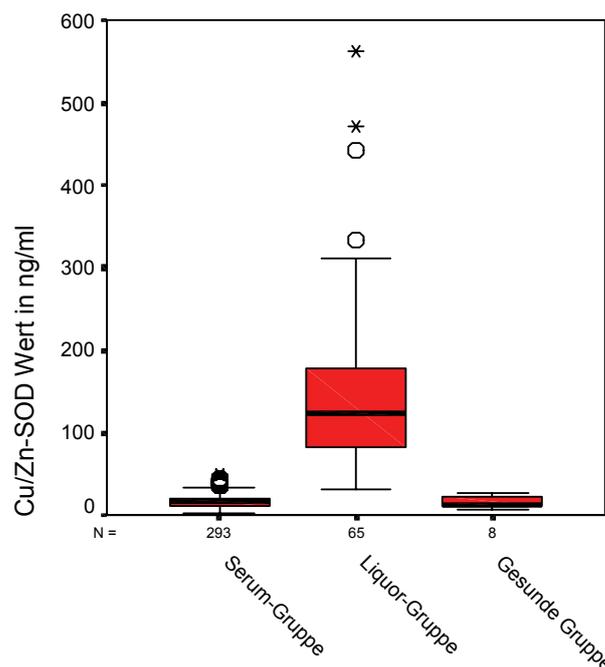


Abbildung 11

Darstellung des Cu/Zn- SOD Wertes in Abhängigkeit von der Diagnose Gruppe in Form von Box and Whisker plots

Die Konzentration der Cu – Zn – SOD in den unterschiedlichen Gruppen stellt sich nach Logarithmierung wie folgt dar (Abbildung 12):

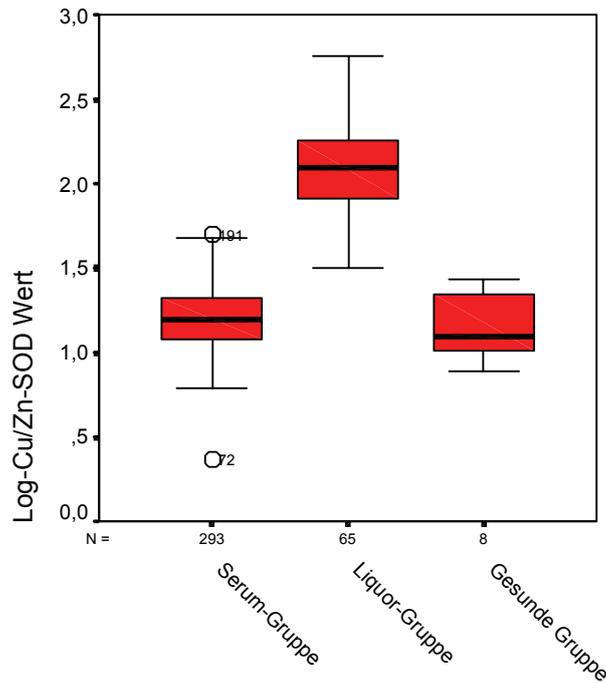


Abbildung 12

Darstellung des LogCu/Zn- SOD Wertes in Abhängigkeit von der Diagnose Gruppe in Form von Box and Whisker plots

Bei den 291 untersuchten Serum – Proben ergab sich ein Mittelwert der LogCu/Zn-SOD von 1,20 mit einer Standardabweichung von 0,19. Die 65 untersuchten Liquor cerebrospinalis Proben zeigten einen weitaus höheren Mittelwert der LogCu/Zn-SOD mit 2,10 und einer Standardabweichung von 0,26. Der Mittelwert der 8 untersuchten Proben von gesunden Neugeborenen ergab mit 1,15 mit einer Standardabweichung von 0,20 einen ähnlichen Wert wie bei den Kindern der Serum-Gruppe (Tabelle 4).

Vergleich der LogCu/Zn- SOD Werte in den verschiedenen Gruppen

Gruppe	Anzahl der untersuchten Proben	Mittelwert des LogCu/Zn-SOD Wertes	Standardabweichung	Standardfehler	95%-Konfidenzintervall für den Mittelwert		Minimum	Maximum
					Untergrenze	Obergrenze		
Serum-Gruppe	291	1,20	0,19	0,01	1,18	1,22	0,36	1,70
Liquor-Gruppe	65	2,10	0,26	0,03	2,03	2,16	1,50	2,75
Gesunde Gruppe	8	1,15	0,20	0,07	0,99	1,31	0,89	1,43
Gesamt	364	1,36	0,40	0,02	1,32	1,40	0,36	2,75

Tabelle 4

Die tatsächlich gemessenen Mittelwerte der Cu/Zn-SOD in ng/ml in den verschiedenen Gruppen ohne Logarithmierung sind in Tabelle 5 angegeben.

Mittelwert der Cu/Zn-SOD in ng/ml in den verschiedenen Gruppen

Gruppe	Mittelwert in ng/ml	Anzahl der untersuchten Proben	Standardabweichung
Serum-Gruppe	17,45	291	8,05
Liquor-Gruppe	150,15	65	103,58
Gesunde Gruppe	15,52	8	7,09
Insgesamt	40,98	364	67,19

Tabelle 5

Zur Frage, ob zwischen den verschiedenen Gruppen ein signifikanter Unterschied in ihrem Gehalt an Cu – Zn – SOD besteht, wurde eine einfaktorische ANOVA (Analysis of variance) angewandt (Tabelle 6).

Die Prozedur einfaktorische ANOVA führt eine einfaktorische Varianzanalyse für eine quantitative abhängige Variable mit einer einzelnen (unabhängigen) Faktorvariablen durch. Mit der Varianzanalyse wird die Hypothese überprüft, dass mehrere Mittelwerte gleich sind. Dieses Verfahren ist eine Erweiterung des T-Tests bei zwei Stichproben. Zusätzlich zur Feststellung, dass Differenzen zwischen Mittelwerten vorhanden sind, kann man auch bestimmen, welche Mittelwerte abweichen. Für den Vergleich von Mittelwerten gibt es zwei Arten von Tests: A – priori – Kontraste und Post – Hoc - Tests. Kontraste sind Tests, die vor der Ausführung des Experiments eingerichtet werden, Post – Hoc – Tests werden nach dem Experiment ausgeführt. Sie können auch auf Trends für mehrere Kategorien testen.

Sobald man festgestellt hat, dass es Abweichungen zwischen den Mittelwerten gibt, kann man mit Post – Hoc – Spannweiten – Tests und paarweisen multiplen Vergleichen untersuchen, welche Mittelwerte sich unterscheiden. Spannweitentests ermitteln homogene Untergruppen von Mittelwerten, die nicht voneinander abweichen. Mit paarweisen Mehrfachvergleichen testet man die Differenz zwischen gepaarten Mittelwerten. Die Ergebnisse werden in einer Matrix angezeigt, in der Gruppenmittelwerte, die auf einem Alpha-Niveau von 0,05 signifikant voneinander abweichen, durch Sterne markiert sind.

Es ergab sich ein signifikanter Unterschied im Gehalt an Cu – Zn – SOD zwischen der Serum –Gruppe und der Liquor-Gruppe ($p < 0,0001$). Im anschließend durchgeführten post – hoc – Test zum Vergleich der einzelnen Gruppen gegeneinander wurde die Scheffé – Prozedur angewandt. Dabei zeigten sich die in Tabelle 6 aufgeführten Ergebnisse. Zwischen Liquor cerebrospinalis und Serum ergab sich ein signifikanter Unterschied ($p < 0,0001$), der sich sowohl bei den kranken Kindern, als auch bei den gesunden Neugeborenen zeigte.

Dagegen wurde kein signifikanter Unterschied in dem Gehalt an Cu – Zn – SOD zwischen der Gruppe der kranken Kinder, deren Serum untersucht wurde und der Gruppe der gesunden Neugeborenen festgestellt ($p < 0,801$)

Mehrfachvergleiche zwischen den verschiedenen untersuchten Gruppen

GRUPPE	GRUPPE	Mittlere Differenz	Standard - fehler	Signifikanz	95%-Konfidenzintervall	
					Untergrenze	Obergrenze
Serum	Liquor	-0,89	0,02	0,000	-0,96	-0,82
	Gesund	0,04	0,07	0,801	-0,13	0,22
Liquor	Serum	0,89	0,02	0,000	0,82	0,96
	Gesund	0,94	0,07	0,000	0,75	1,13

Tabelle 6

Signifikante Ergebnisse sind fett gedruckt

Nach der statistischen Beurteilung der unterschiedlichen Kollektive wurden die Kollektive gesondert auf Besonderheiten und Unterschiede in den einzelnen Diagnose-Gruppen analysiert. Besonderes Augenmerk galt dabei dem Kollektiv, bei welchem der Liquor cerebrospinalis untersucht wurde.

4.2 Ergebnisse im Liquor cerebrospinalis

Wie bereits oben erwähnt wurden im Liquor- Kollektiv 7 verschiedene Diagnose-Gruppen unterschieden (Abbildung 13):

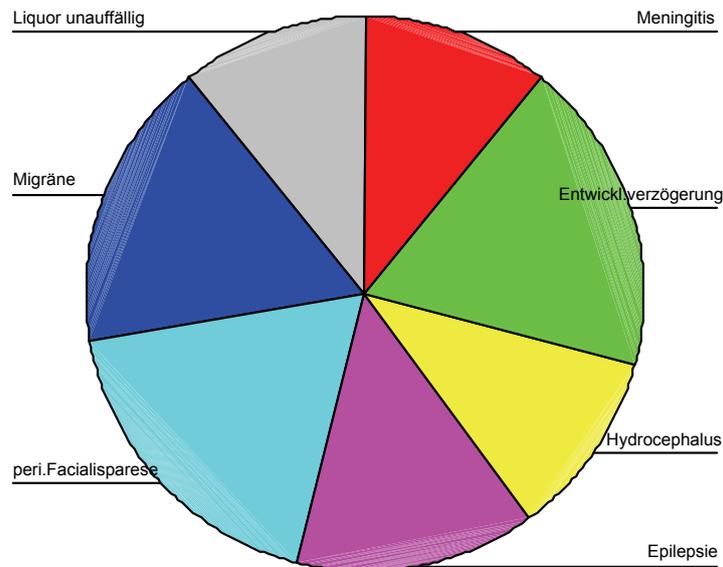


Abbildung 13

Anteil der verschiedenen Diagnosegruppen im Liquorkollektiv

Die Altersverteilung der Kinder mit verschiedenen Diagnosen ist in Tabelle 7 dargestellt.

Altersmittelwerte in den Diagnose-Gruppen der Kinder deren Liquor cerebrospinalis untersucht wurde

Diagnose	Altersmittelwert in Jahren	Anzahl der Kinder	Standardabweichung
Meningitis	9,68	7	5,59
Entwicklungsverzögerung	5,75	12	4,15
Hydrocephalus	11,45	7	5,74
Epilepsie	8,27	9	4,28
periphere Facialisparesie	10,38	12	3,70
Migräne	11,45	11	4,17
Patienten mit unauffälligem Liquor	5,89	6	4,82
Insgesamt	9,02	64	4,86

Tabelle 7

Für den Liquor cerebrospinalis ergaben sich folgende Mittelwerte für die Cu/Zn-SOD in ng/ml bzw. den LogCu/Zn-SOD -Wert (Tabelle 8):

Vergleich der Mittelwerte der Cu/Zn-SOD sowie des LogCu/Zn-SOD Wertes in den verschiedenen Diagnosegruppen des Liquorkollektives

Diagnose		Gemessene SOD in ng/ml	LogCu/Zn-SOD-Wert zur statistischen Auswertung
Meningitis	Mittelwert	276,15	2,40
	Anzahl der untersuchten Fälle	7	7
	Standardabweichung	131,97	0,21
Entwicklungsverzögerung	Mittelwert	93,76	1,93
	Anzahl der untersuchten Fälle	12	12
	Standardabweichung	46,09	0,18
Hydrocephalus	Mittelwert	232,82	2,26
	Anzahl der untersuchten Fälle	7	7
	Standardabweichung	171,67	0,35
Epilepsie	Mittelwert	184,35	2,21
	Anzahl der untersuchten Fälle	9	9
	Standardabweichung	92,43	0,22
Periphere Facialisparesie	Mittelwert	123,75	2,05
	Anzahl der untersuchten Fälle	12	12
	Standardabweichung	61,18	0,20
Migräne	Mittelwert	113,11	2,00
	Anzahl der untersuchten Fälle	11	11
	Standardabweichung	44,62	0,24
Liquor unauffällig	Mittelwert	97,63	1,98
	Anzahl der untersuchten Fälle	7	7
	Standardabweichung	18,96	0,08

Insgesamt	Mittelwert	150,15	2,09
	Anzahl der untersuchten Fälle	65	65
	Standardabweichung	103,58	0,26

Tabelle 8

Ein Vergleich der Werte, die in den verschiedenen Diagnosegruppen für den LogCu/Zn-SOD-Wert gefunden wurden, ist in Abbildung 14 in Form von Box and Whisker plots dargestellt.

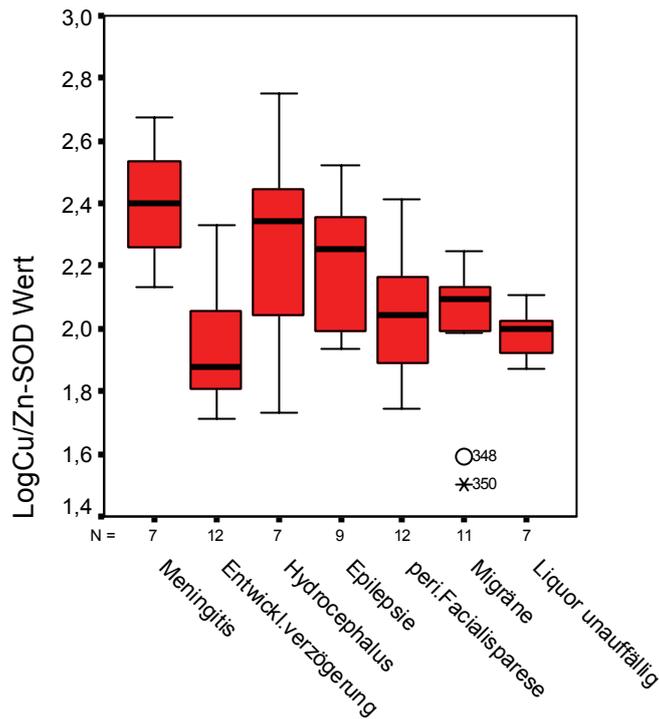


Abbildung 14

Darstellung des LogCu/Zn- SOD Wertes in Abhängigkeit der Diagnose im Liquorkollektiv in Form von Box and Whisker plots

Die oben genannten Werte wurden einer Signifikanzprüfung unterzogen. Zur Prüfung der Signifikanz wurde wieder eine einfaktorische ANOVA angewandt, wie bereits oben erläutert.

Der LogCu/Zn-SOD-Wert ist mit $p < 0,0001$ zwischen den Diagnose-Gruppen des Liquor- Kollektives signifikant unterschiedlich. Bei der Überprüfung des Ergebnisses im post- hoc- Test, mittels der Scheffé- Prozedur, wurde jede Diagnose-Gruppe mit jeder anderen Diagnose- Gruppe gegeneinander verglichen. Die Ergebnisse dieses Mehrfachvergleiches sind in Tabelle 9 ersichtlich.

Bei den Kindern, die an einer Meningitis purulenta erkrankt waren, konnte eine signifikante Erhöhung des Cu – Zn – SOD Wertes gegenüber den Werten der Kinder,

die an einer Entwicklungsverzögerung leiden, gefunden werden ($p < 0,007$). Ebenso war die Erhöhung des Cu – Zn – SOD Wertes der Kinder mit Meningitis purulenta signifikant gegenüber den Werten der Kinder, die an Migräne litten ($p < 0,047$). Trotz größerer Schwankungen der gewonnenen Mittelwerte zwischen den einzelnen Diagnose- Gruppen ergaben sich keine weiteren signifikanten Unterschiede bei den Mehrfachvergleichen.

Neben der Untersuchung der Cu – Zn – SOD im Liquor cerebrospinalis wurden weitere Parameter des Liquors untersucht, nämlich der Eiweiß- und Glucosegehalt in Serum und Liquor cerebrospinalis, das Gesamtalbumin, die Leukozyten- und Erythrozytenzahl des Liquor cerebrospinalis, der Liquorlactatgehalt sowie das IgG. Aus den gewonnenen Daten wurden die Liquor/Serum-Quotienten für Albumin und IgG ermittelt.

Mittelwerte und Standardabweichungen der verschiedenen Parameter des Liquor cerebrospinalis sind in Tabelle 10 dargestellt.

Mehrfachvergleiche zwischen den Diagnosegruppen des Liquorkollektives

Diagnose 1	Diagnose 2	Signifikanz	95%-Konfidenzintervall	
			Untergrenze	Obergrenze
Meningitis	Entwicklungsverzögerung	0,007	0,08	0,85
	Hydrocephalus	0,961	-0,29	0,57
	Epilepsie	0,835	-0,22	0,59
	periphere Facialisparese	0,100	-0,03	0,73
	Migräne	0,047	0,00	0,78
	Liquor unauffällig	0,066	-0,01	0,85
Entwicklungsverzögerung	Hydrocephalus	0,161	-0,71	0,06
	Epilepsie	0,225	-0,64	0,07
	periphere Facialisparese	0,946	-0,44	0,21
	Migräne	0,996	-0,40	0,26
	Liquor unauffällig	1,000	-0,43	0,33
Hydrocephalus	Epilepsie	1,000	-0,36	0,45
	periphere Facialisparese	0,675	-0,17	0,59
	Migräne	0,472	-0,14	0,64
	Liquor unauffällig	0,486	-0,15	0,71
Epilepsie	periphere Facialisparese	0,811	-0,19	0,52
	Migräne	0,609	-0,15	0,57
	Liquor unauffällig	0,618	-0,17	0,64
Periphere Facialisparese	Migräne	1,000	-0,29	0,38
	Liquor unauffällig	0,999	-0,32	0,45
Migräne	Liquor unauffällig	1,000	-0,37	0,41

Tabelle 9
Signifikante Ergebnisse sind fett gedruckt markiert

Mittelwerte der weiteren untersuchten Parameter im Liquor cerebrospinalis

Untersuchte Parameter	Mittelwert	Anzahl der untersuchten Proben	Standardabweichung
Alter (Jahre)	9,02	64	4,86
Körpergröße (m)	1,26	48	0,31
Körpergewicht (kg)	34,08	54	19,49
Body-Mass-Index (kg/m ²)	18,69	48	4,68
Eiweiß im Serum (g/l)	72,56	16	6,96
Eiweiß im Liquor (mg/dl)	30,49	57	33,46
Glucose im Liquor (mg/dl)	56,00	57	11,06
Lactat im Liquor (mmol/l)	1,33	31	0,54
Zellen im Liquor pro 3 µl	393,44	57	2610,21
Erythrozyten im Liquor	0,43	28	1,89
Albumin im Liquor (mg/dl)	18,28	37	13,49
Albumin im Serum (g/dl)	4,29	36	0,52
Liquor/Serum-Quotient für Albumin	4,51	30	3,33
IgG im Liquor (mg/dl)	2,04	47	1,88
IgG im Serum (g/dl)	0,98	44	0,28
Liquor/Serum-Quotient für IgG	2,20	35	2,31
Glucose im Serum (mg/dl)	86,43	21	27,48

Tabelle 10

Nicht bei allen Kindern wurde aber eine vollständige Untersuchung des Liquor cerebrospinalis mit den oben aufgeführten Parametern durchgeführt, woraus unterschiedliche Probenanzahlen in der Tabelle resultieren.

Zum Überprüfen, ob ein Zusammenhang zwischen dem Cu – Zn – SOD Wert des Liquor cerebrospinalis und einem anderen Liquorparameter besteht, wurden folgende Streudiagramme erstellt (Abbildung 15, 16, 17, 18). Es konnten keine linearen Zusammenhänge zwischen Cu – Zn – SOD und anderen Parametern des Liquor cerebrospinalis festgestellt werden.

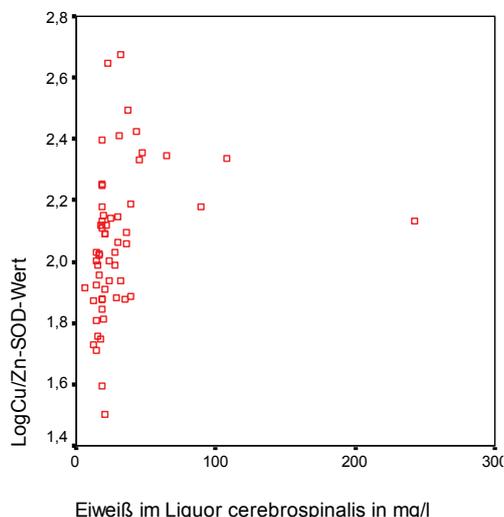


Abbildung 15

Abhängigkeit des LogCu/Zn-SOD Wertes vom Eiweißgehalt des Liquor cerebrospinalis in mg/l

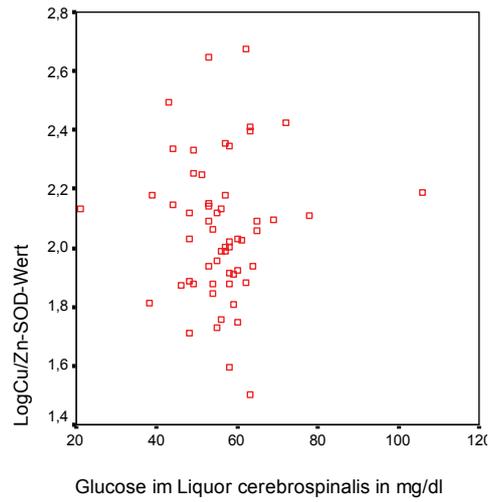


Abbildung 16

Abhängigkeit des LogCu/Zn-SOD Wertes vom Glucosegehalt des Liquor cerebrospinalis in mg/dl

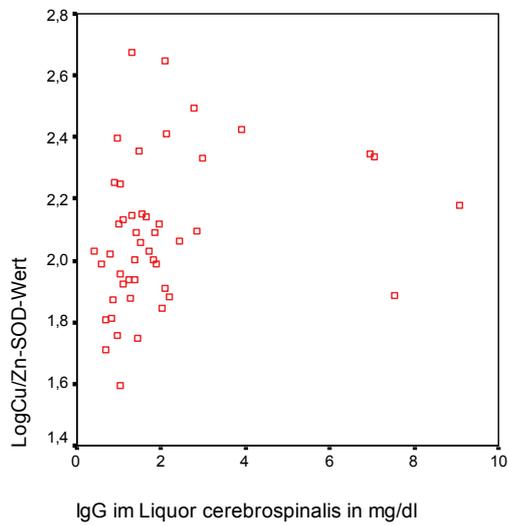


Abbildung 17

Abhängigkeit des LogCu/Zn-SOD Wertes vom IgG-Gehalt des Liquor cerebrospinalis in mg/dl

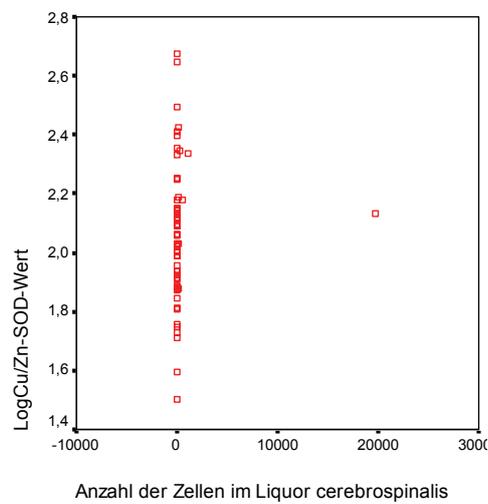


Abbildung 18

Abhängigkeit des LogCu/Zn-SOD Wertes von der Zellzahl des Liquor cerebrospinalis

4.3 Ergebnisse im Serum

Bei der Darstellung des Gesamtkollektives unter Punkt 4.1 wurde bereits die Aufteilung des Serumkollektives in die verschiedenen Diagnosegruppen erläutert. Im Folgenden soll näher auf die gewonnenen Ergebnisse, eingegangen werden.

Die Altersverteilung für die unterschiedlichen Diagnosegruppen im Serumkollektiv zeigte folgende Ergebnisse (Tabelle 11):

Altersverteilung der Kinder des Serumkollektives

Diagnose	Mittelwert des Alters in Jahren	Anzahl der untersuchten Kinder	Standardabweichung
Cystische Fibrose	12,29	50	6,22
Diabetes mellitus Typ 1	11,76	30	3,54
Endokrinologische Diagnosen	10,29	13	2,86
Hämophilie A	11,50	7	2,97
Kardiologische Diagnosen	5,36	96	5,59
M.Crohn	14,13	9	3,01
Juvenile idiopathische Arthritis	11,07	45	4,12
Galaktosämie	5,96	7	4,84
Neurologische Diagnosen	7,65	34	4,96
Gesunde Neugeborene	0,00	8	0,00
Insgesamt	8,75	299	5,92

Tabelle 11

In der Gruppe der Kinder mit neurologischer Diagnose sind z. B. junge Patienten mit Epilepsie, Hirntumoren wie Kraniopharyngeom , Schädelhirntrauma und cerebral bedingter Entwicklungsverzögerung vereint. Unter endokrinologischer Diagnose sind Kinder mit adrenogenitalem Syndrom, Minderwuchs und Autoimmunthyreoiditis zusammengefasst.

In Tabelle 12 ist ein Vergleich der Mittelwerte der Cu - Zn – SOD sowie des LogCu/Zn-SOD Wertes in den verschiedenen Diagnosegruppen des Serumkollektives aufgeführt.

Vergleich der Mittelwerte der Cu/Zn-SOD sowie des LogCu/Zn-SOD Wertes in den verschiedenen Diagnosegruppen des Serumkollektives

Diagnose		LogCu/Zn-SOD-Wert zur statistischen Auswertung	Gemessene SOD in ng/ml
Cystische Fibrose	Mittelwert	1,19	16,60
	Anzahl der untersuchten Fälle	50	50
	Standardabweichung	0,16	7,27
Diabetes mellitus Typ 1	Mittelwert	1,13	14,83
	Anzahl der untersuchten Fälle	30	30
	Standardabweichung	0,21	6,08
Endokrinologische Diagnosen	Mittelwert	1,24	18,33
	Anzahl der untersuchten Fälle	13	13
	Standardabweichung	0,13	6,44
Hämophilie A	Mittelwert	1,16	15,16
	Anzahl der untersuchten Fälle	7	7
	Standardabweichung	0,14	5,69
Kardiologische Diagnosen	Mittelwert	1,26	20,38
	Anzahl der untersuchten Fälle	96	96
	Standardabweichung	0,21	10,07
M.Crohn	Mittelwert	1,14	14,54
	Anzahl der untersuchten Fälle	9	9
	Standardabweichung	0,14	5,06
Juvenile idiopathische Arthritis	Mittelwert	1,16	15,78
	Anzahl der untersuchten Fälle	45	45
	Standardabweichung	0,18	6,74
Galaktosämie	Mittelwert	1,03	11,63
	Anzahl der untersuchten Fälle	7	7
	Standardabweichung	0,19	5,50
Neurologische Diagnosen	Mittelwert	1,20	16,95
	Anzahl der untersuchten Fälle	34	34
	Standardabweichung	0,15	5,39
Gesunde Neugeborene	Mittelwert	1,15	15,52
	Anzahl der untersuchten Fälle	8	8
	Standardabweichung	0,20	7,09
Insgesamt	Mittelwert	1,20	17,40
	Anzahl der untersuchten Fälle	299	299
	Standardabweichung	0,19	8,02

Tabelle 12

Abbildung 19 zeigt einen Vergleich der Log Cu/Zn-SOD Werte der unterschiedlichen Diagnosegruppen des Serumkollektives.

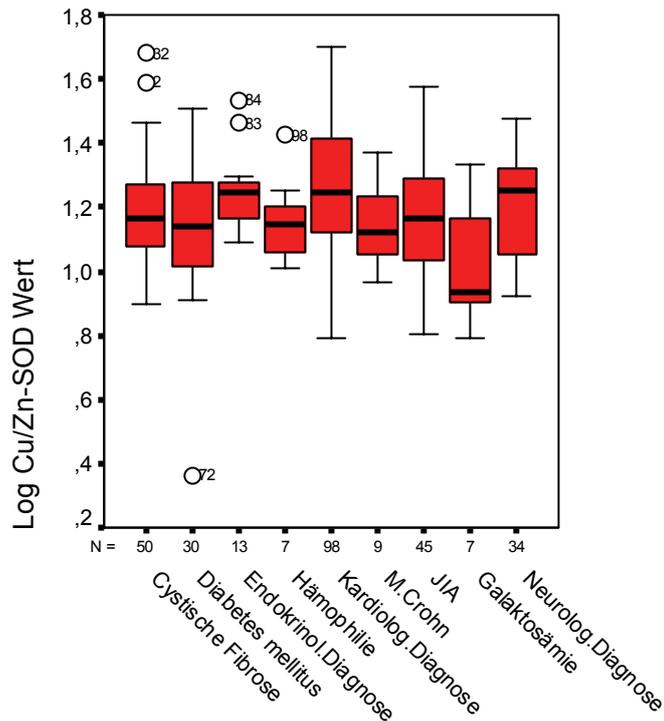


Abbildung 19

Darstellung des LogCu/Zn- SOD Wertes in Abhängigkeit der Diagnose im Serumkollektiv in Form von Box and Whisker plots

Die Frage, ob zwischen den verschiedenen Diagnosegruppen des Serumkollektives signifikante Unterschiede für die Cu – Zn – SOD besteht, erfolgte wieder mit der einfaktoriellen ANOVA und der Scheffé – Prozedur als post – hoc –Test. Die errechneten Ergebnisse sind in Tabelle 13 dargestellt.

Mehrfachvergleiche zwischen den Diagnosegruppen des Serumkollektives

Diagnose	Diagnose	Signifikanz	95%-Konfidenzintervall	
			Untergrenze	Obergrenze
Cystische Fibrose	Diabetes mellitus	0,99	-0,12	0,24
	Endokrino!. Diagnosen	1,00	-0,29	0,18
	Hämophilie	1,00	-0,28	0,34
	Kardiologische Diagnosen	0,84	-0,20	0,06
	M.Crohn	1,00	-0,23	0,32
	JIA	1,00	-0,13	0,19
	Galaktosämie	0,85	-0,15	0,47
	Neurologische Diagnosen	1,00	-0,19	0,15
	Gesunde Neugeborene	1,00	-0,25	0,33
Diabetes mellitus Typ 1	Endokrino!. Diagnosen	0,94	-0,37	0,14
	Hämophilie	1,00	-0,35	0,29
	Kardiologische Diagnosen	0,25	-0,29	0,03
	M.Crohn	1,00	-0,30	0,28

	JIA	1,00	-0,21	0,15
	Galaktosämie	0,99	-0,22	0,42
	Neurologische Diagnosen	0,98	-0,27	0,12
	Gesunde Neugeborene	1,00	-0,33	0,28
Endokrinol. Diagnosen	Hämophilie	1,00	-0,27	0,44
	Kardiologische Diagnosen	1,00	-0,24	0,21
	M.Crohn	1,00	-0,23	0,43
	JIA	0,99	-0,16	0,32
	Galaktosämie	0,72	-0,14	0,57
	Neurologische Diagnosen	1,00	-0,21	0,29
	Gesunde Neugeborene	0,99	-0,25	0,43
Hämophilie A	Kardiologische Diagnosen	0,99	-0,40	0,20
	M.Crohn	1,00	-0,37	0,40
	JIA	1,00	-0,31	0,31
	Galaktosämie	0,99	-0,28	0,54
	Neurologische Diagnosen	1,00	-0,36	0,27
	Gesunde Neugeborene	1,00	-0,39	0,40
Kardiol. Diagnosen	M.Crohn	0,94	-0,15	0,39
	JIA	0,44	-0,04	0,24
	Galaktosämie	0,32	-0,07	0,53
	Neurologische Diagnosen	0,99	-0,10	0,21
	Gesunde Neugeborene	0,98	-0,17	0,39
M.Crohn	JIA	1,00	-0,30	0,26
	Galaktosämie	0,99	-0,27	0,50
	Neurologische Diagnosen	1,00	-0,35	0,22
	Gesunde Neugeborene	1,00	-0,38	0,36
JIA	Galaktosämie	0,96	-0,18	0,44
	Neurologische Diagnosen	0,99	-0,22	0,13
	Gesunde Neugeborene	1,00	-0,29	0,30
Galaktosämie	Neurologische Diagnosen	0,79	-0,50	0,14
	Gesunde Neugeborene	0,99	-0,52	0,27
Neurologische Diagnosen	Gesunde Neugeborene	1,00	-0,25	0,35

Tabelle 13

Es konnten keine signifikanten Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den einzelnen Gruppen gefunden werden.

Bei insgesamt 96 Kindern lag eine kardiologische Diagnose vor, die im Einzelnen bereits auf Seite 23/24 dargestellt wurden (Tabelle 14).

Häufigkeiten der unterschiedlichen kardiologischen Diagnosen

Diagnose	Häufigkeit	Prozent
M.Fallot	10	10,4
Atrium-Septum-Defekt, TypII	21	21,9
Trisomie 21	6	6,3
Transposition der großen Arterien	11	11,5
Komplexe Herzfehler	30	31,3
Klappenvitien	10	10,4
Aortenisthmusstenose	4	4,2
Ventrikel-Septum-Defekt	4	4,2
Gesamt	96	100,0

Tabelle 14

Da bei den Kindern mit der Trisomie 21 die kardiologische Diagnose im Vordergrund stand, wurden sie in das kardiologische Kollektiv aufgenommen und nicht als eine eigene Diagnosegruppe des Serumkollektives behandelt.

Die Geschlechtsverteilung im kardiologischen Kollektiv war mit 52% Knaben und 48% Mädchen sehr homogen.

Bei einem Mittelwert insgesamt von 20,37 ng/ml SOD und 1,26 für den LogCu/Zn-SOD Wert fällt auf, dass bei den Kindern mit einer Trisomie 21 der SOD Mittelwert mit 27,56 ng/ml und einem LogCu/Zn-SOD von 1,41 deutlich erhöht ist.

Vergleich der Mittelwerte der Cu/Zn-SOD sowie des LogCu/Zn-SOD Wertes in den verschiedenen Diagnosegruppen des kardiologischen Kollektives

Diagnose		LogCu/Zn-SOD-Wert zur statistischen Auswertung	Gemessene SOD in ng/ml
M.Fallot	Mittelwert	1,31	23,64
	Anzahl der untersuchten Fälle	10	10
	Standardabweichung	0,24	13,06
Atrium-Septum-Defekt, TypII	Mittelwert	1,21	18,11
	Anzahl der untersuchten Fälle	21	21
	Standardabweichung	0,20	9,49
Trisomie 21	Mittelwert	1,41	27,56
	Anzahl der untersuchten Fälle	6	6
	Standardabweichung	0,17	10,23
Transposition der großen Arterien	Mittelwert	1,29	20,87
	Anzahl der untersuchten Fälle	11	11
	Standardabweichung	0,17	7,19
Komplexe Herzfehler	Mittelwert	1,23	18,77
	Anzahl der untersuchten Fälle	30	30
	Standardabweichung	0,20	8,69
Klappenvitien	Mittelwert	1,25	22,26
	Anzahl der untersuchten Fälle	10	10

	Standardabweichung	0,31	15,16
Ventrikel-Septum-Defekt	Mittelwert	1,23	18,15
	Anzahl der untersuchten Fälle	4	4
	Standardabweichung	0,16	7,31
Aortenisthmusstenose	Mittelwert	1,32	21,63
	Anzahl der untersuchten Fälle	4	4
	Standardabweichung	0,14	7,50
Insgesamt	Mittelwert	1,26	20,38
	Anzahl der untersuchten Fälle	96	96
	Standardabweichung	0,21	10,07

Tabelle 15

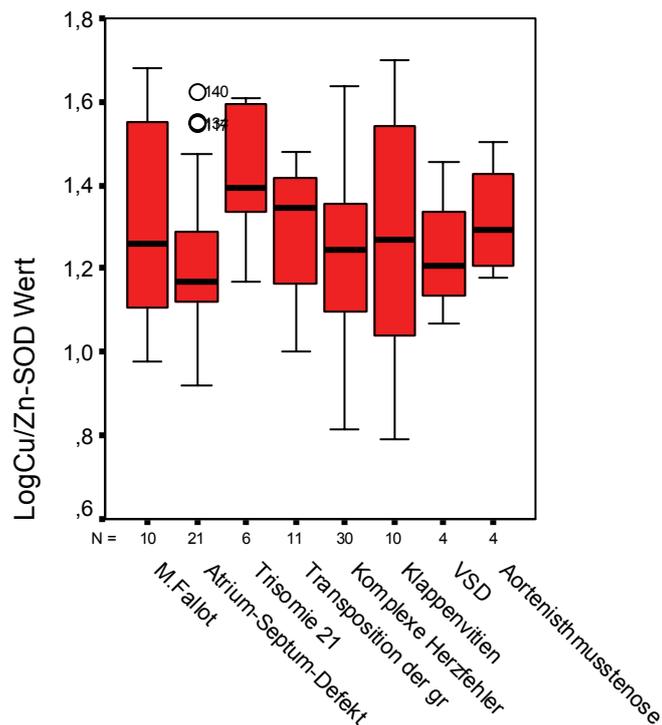


Abbildung 20

Darstellung des LogCu/Zn- SOD Wertes in Abhängigkeit der Diagnose im kardiologischen Kollektiv in Form von Box and Whisker plots

Die Cu – Zn – SOD Werte bei den verschiedenen kardiologischen Diagnosen waren nicht signifikant ($p < 0,261$) verändert (geprüft mit einer einfaktoriellen ANOVA).

Die Durchführung des post-hoc Testes erfolgte mit den Mehrfachvergleichen der Scheffé – Prozedur, die in Tabelle 16 dargestellt sind. Auch bei dieser zweiten Prüfung konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Mehrfachvergleiche zwischen den Diagnosegruppen des kardiologischen Kollektives

Diagnose	Diagnose	Signifikanz	95%-Konfidenzintervall	
			Untergrenze	Obergrenze
M.Fallot	ASD II	0,97	-0,21	0,41
	Trisomie 21	0,99	-0,52	0,32
	TGA	1,00	-0,33	0,38
	Komplexe Herzfehler	0,99	-0,21	0,38
	Klappenvitien	1,00	-0,30	0,43
	Ventrikel-Septum-Defekt	1,00	-0,40	0,56
	Aortenisthmusstenose	1,00	-0,48	0,48
ASD II	Trisomie 21	0,73	-0,58	0,17
	TGA	0,99	-0,38	0,22
	Komplexe Herzfehler	1,00	-0,25	0,21
	Klappenvitien	1,00	-0,35	0,27
	Ventrikel-Septum-Defekt	1,00	-0,47	0,42
	Aortenisthmusstenose	0,99	-0,55	0,33
Trisomie 21	TGA	0,98	-0,29	0,53
	Komplexe Herzfehler	0,80	-0,18	0,54
	Klappenvitien	0,94	-0,25	0,58
	Ventrikel-Septum-Defekt	0,97	-0,34	0,70
	Aortenisthmusstenose	0,99	-0,42	0,62
TGA	Komplexe Herzfehler	0,99	-0,22	0,34
	Klappenvitien	1,00	-0,31	0,39
	Ventrikel-Septum-Defekt	1,00	-0,42	0,53
	Aortenisthmusstenose	1,00	-0,50	0,45
Komplexe Herzfehler	Klappenvitien	1,00	-0,31	0,28
	Ventrikel-Septum-Defekt	1,00	-0,43	0,43
	Aortenisthmusstenose	0,99	-0,52	0,34
Klappenvitien	Ventrikel-Septum-Defekt	1,00	-0,46	0,49
	Aortenisthmusstenose	1,00	-0,54	0,41
Ventrikel-Septum-Defekt	Aortenisthmusstenose	1,00	-0,65	0,49

Tabelle 16

Neben der Konzentration an Cu – Zn – SOD in den Serumproben wurden weitere Laborparameter der Proben durch Krankenaktenstudium ermittelt. In Tabelle 17 sind die Mittelwerte der weiteren Parameter mit ihren Standardabweichungen dargestellt.

Mittelwerte der im Serum bestimmten Parameter

Untersuchte Parameter	Mittelwert	Anzahl der untersuchten Proben	Standardabweichung
Körpergröße(m)	1,16	165	0,38
Körpergewicht (kg)	27,11	167	19,98
Body-Mass-Index (kg/m ²)	17,17	165	3,78
Hämoglobin (g/dl)	13,15	159	1,91
Leukozyten x 10 ⁹ /l	8480,31	159	3881,23
Thrombozyten x 10 ⁹ /l	314,30	159	109,59
Bilirubin (mg/dl)	0,64	70	1,05
C- reaktives Protein (mg/l)	4,11	131	5,04
Kreatinkinase (U/l)	87,23	78	65,24
Lactatdehydrogenase (U/l)	319,02	97	158,07
Eiweiß im Serum (g/l)	63,86	81	15,01
Alkalische Phosphatase (U/l)	289,22	103	120,54
Glutamatdehydrogenase (U/l)	5,40	37	9,02
GOT (U/l)	24,82	120	14,89
GPT (U/l)	16,94	119	14,37

Tabelle 17

Die unterschiedlichen Anzahlen der untersuchten Proben ergeben sich aus den in Krankenakten ermittelten Daten. Nicht bei jeder Serumprobe wurden alle Parameter bestimmt. Es zeigten sich keine linearen Abhängigkeiten der Cu – Zn – SOD von anderen Serumparametern.

5. Diskussion

Über die Funktion der Superoxid Dismutase liegen heute gut fundierte Kenntnisse vor. Sie ist für die Entgiftung des schädigenden Superoxids verantwortlich.

In den hier durchgeführten Untersuchungen wurden Serumproben und Proben des Liquor cerebrospinalis von Kindern mit verschiedenen Erkrankungen des zentralen Nervensystems und anderer Erkrankungen auf ihre Cu – Zn – SOD Konzentration getestet. Da es sich um zwei unterschiedliche Kollektive handelt, sollen die Ergebnisse getrennt diskutiert werden.

5.1 Diskussion der Ergebnisse im Liquor cerebrospinalis

Bei der Untersuchung des Liquor cerebrospinalis zeigten sich zwischen den einzelnen Diagnosegruppen teilweise stark differierende Mittelwerte für die Cu/Zn-SOD. Die sehr hohe Standardabweichung der hier gemessenen SOD, lässt sich durch die in diesem Kollektiv zusammengefassten, auch ätiologisch unterschiedlichen, neurologischen Diagnosen erklären.

In früheren Untersuchungen der Cu – Zn – SOD im Liquor cerebrospinalis fand LABOYRIE et al. (1992), bei Erwachsenen, eine Cu – Zn – SOD Konzentration im Plasma von $91,6 \pm 18,2$ ng SOD/ml und im Liquor cerebrospinalis von $286,2 \pm 33,5$ ng SOD/ml. LABOYRIE et al. konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede im Cu- Zn – SOD Gehalt im Liquor cerebrospinalis bei verschiedenen cerebralen Erkrankungen nachweisen.

Die eigenen Untersuchungen ergaben einen Mittelwert von $17,45 \pm 8,04$ ng SOD/ml für Serum und $150,15 \pm 103,58$ ng SOD/ml für Liquores.

Bei Kindern, deren Liquor cerebrospinalis in allen anderen Parametern unauffällig war, fand sich ein Mittelwert von $97,63$ ng SOD/ml. Kinder mit neurologischen Erkrankungen (periphere Facialisparesie und Migräne) zeigten Mittelwerte von $123,75$ ng SOD/ml und $113,11$ ng SOD/ml. Da sich auch bei diesen Kindern keine weiteren pathologischen Ergebnisse in der Liquoruntersuchung ergaben, können diese Mittelwerte als Normalwerte für die Cu – Zn – SOD im Liquor cerebrospinalis angesehen werden. Dies lässt bei Kindern, die an der häufig auftretenden peripheren Facialisparesie oder an Migräne leiden den möglichen Schluss zu, dass bei diesen Erkrankungen freie Sauerstoffradikale keine ursächliche Rolle spielen, oder aber der

oxidative Stress im Liquor cerebrospinalis nicht zu messen ist, sondern aufgrund der peripheren Nervenstörungen eher im Blut, oder in Gewebeproben selbst auftritt.

Im Gegensatz konnte ein stark erhöhter Gehalt des Liquor cerebrospinalis an SOD bei jungen Patienten mit entzündlichen Erkrankungen des Gehirns festgestellt werden. Dieses Ergebnis korreliert mit vorhergegangenen Untersuchungen, bei denen gezeigt werden konnte, dass die Aktivität der SOD bei Kindern mit bakterieller Meningitis im Liquor cerebrospinalis stark erhöht ist, gegenüber den Referenzuntersuchungen bei gesunden Kindern (RAY et al., 2000, Yoshida et al., 1994). Außerdem war die SOD auch im Vergleich zu Untersuchungen bei Kindern mit tuberkulöser Meningitis erhöht. Man folgerte, dass vermehrte Produktion von Antioxidantien und Aktivitätsminderung antioxidativer Enzyme einen Indikator für antioxidativen Stress darstellen. Folglich vermutete man, dass oxidativer Stress durch Zugabe natürlicher antioxidativer Enzyme, Vitamine oder synthetische Antioxidantien reduziert werden kann, und somit ein prognostisch günstigerer Verlauf gefördert werden kann.

Christen et al. (2001) demonstrierten, dass bakterielle Meningitis bei jungen Ratten mit oxidativem Stress im Parenchym des Gehirns verbunden ist. In einer Studie von Tsukahara et al. (2002) wurde festgestellt, dass sowohl eine Erhöhung der oxidativen als auch der antioxidativen Aktivität im ZNS bei Kindern mit bakterieller Meningitis besteht, nicht jedoch bei Kindern mit aseptischer Meningitis.

Auch bei Untersuchungen des Serums von Kindern, die an bakterieller Meningitis oder Encephalitis erkrankt sind, wurde eine erhöhte Aktivität der SOD festgestellt (ÇAKSEN et al., 2003).

In den eigenen Untersuchungen wurde ein Mittelwert von $276,15 \pm 131,97$ ng SOD/ml bei Kindern mit Meningitis purulenta gefunden. Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied zu den Befunden der Kinder mit einer cerebralen Entwicklungsverzögerung ($p < 0,007$), sowie zu den Kindern mit Migräne ($p < 0,047$). *Somit scheint das Enzym ein Marker für erhöhte Entzündungsaktivität zu sein, da im Rahmen von entzündlichen Prozessen vermehrt Sauerstoffradikale, hier speziell im Gehirn, anfallen.*

Bakterielle oder virale Entzündungen verursachen zytotoxische Reaktionen mit Freisetzung der Cu – Zn – SOD aus dem Zytoplasma der geschädigten Zellen und damit einen stark erhöhten Gehalt des Liquor cerebrospinalis an Cu – Zn – SOD .

Kinder mit geistiger Entwicklungsstörung hatten einen Mittelwert von $93,76 \pm 46,19$ ng SOD /ml.

Es ist möglich, dass ein verminderter Gehalt des Liquor cerebrospinalis an Cu- Zn – SOD einen verminderten Gehalt der Hirnzellen an antioxidativem Enzym widerspiegelt, was eine verminderte Entgiftung von Sauerstoffradikalen zur Folge hat und damit die Gehirnfunktion bzw. der Reifungsprozess des Gehirnes geschädigt bzw. aufgehalten wird. Bei den Kindern mit Entwicklungsverzögerung kann man also vermuten, dass ähnlich wie bei den Patienten, die an einer amyotrophen Lateralsklerose leiden, ein Mangel an SOD vorliegt, so dass das Gehirn vermehrt schädigenden Sauerstoffradikalen ausgesetzt ist. Andererseits muss man diskutieren, dass es sich bei der cerebralen Entwicklungsstörung allein um eine von zytotoxischen Reaktionen unabhängige Erkrankung handelt, so dass der geringe Gehalt des Liquor cerebrospinalis an Cu – Zn – SOD lediglich das Fehlen vermehrter zytotoxischer Reaktionen widerspiegelt.

Bei den Kindern, die mit einem Hydrocephalus geboren wurden, zeigte sich ähnlich wie bei den Kindern mit Meningitis, eine hohe Konzentration an Cu – Zn – SOD im Liquor cerebrospinalis mit einem Wert von $232,82 \pm 171,67$ ng SOD/ml. Der Unterschied gegenüber den übrigen Diagnosegruppen war jedoch statistisch nicht signifikant.

Da diese Kinder meist mit einem Shuntsystem versorgt sind, kann man diskutieren, dass durch den unmittelbar in Hirnnähe gelegenen Fremdkörper zelluläre Abwehrmechanismen in Gang treten, durch die zytotoxische Reaktionen induziert werden, so dass es zu einer Erhöhung der Cu – Zn – SOD im Liquor cerebrospinalis kommt. 1993 wurde der Ort der höchsten Cu –Zn –SOD –Konzentration im zentralen Nervensystem von Ratten mit kongenitalem Hydrocephalus untersucht (MORI et al. 1993). Vor allem im Plexus choroideus wurde eine Verminderung der Cu – Zn – SOD bei den Tieren festgestellt, so dass vermutet wurde, dass die Funktion des Plexus choroideus durch vermehrte reaktive Sauerstoff- Metaboliten beeinträchtigt wird. Diese Verminderung der SOD spiegelt sich allerdings nicht im Liquor cerebrospinalis von Kindern. Ob auch beim Menschen reaktive Sauerstoff- Metaboliten für die Entstehung eines kongenitalen Hydrocephalus mitverantwortlich sind bleibt unklar.

Bei den Patienten, die an einem cerebralem Anfallsleiden erkrankt sind, lag der Mittelwert der Cu – Zn –SOD bei $184,35 \pm 92,43$ ng SOD/ml. Damit zeigte sich auch in der vorliegenden Studie wie in bereits vorhergegangenen Untersuchungen (DE DEYN et al.1998; TURKDOGAN et al. 2002) keine signifikante Konzentrationsänderung der Cu – Zn – SOD im Liquor cerebrospinalis im Vergleich zu anderen cerebralen Erkrankungen. 2002 (TURKDOGAN et al.) konnte aber eine

erhöhte Konzentration der SOD bei Kindern mit Epilepsie nachgewiesen werden, bei denen in der Magnetresonanztomographie des Gehirns keine Strukturdefekte vorlagen, während bei Kindern mit nachgewiesenen Strukturdefekten die SOD normal war. Auch die eigenen Werte waren gegenüber denen der Kinder mit unauffälligem Liquor cerebrospinalis erhöht, aber nicht statistisch signifikant. Man könnte daher vermuten, dass das cerebrale Anfallsleiden bei Patienten ohne Strukturdefekt des Gehirnes durch anderweitige Schädigung der neuronalen Strukturen, z. B. durch Sauerstoffradikale auftritt.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass durch reaktive Sauerstoffspezies und zytotoxische Reaktionen Schädigungen im Gehirn entstehen können, die zu Fehlfunktionen mit verminderter Hirnleistung führen. Insbesondere bei bakterieller Meningitis mit stark erhöhten SOD Werten im Liquor cerebrospinalis bietet sich eine Behandlung mit natürlichen oder synthetischen Antioxidantien an.

5.2 Diskussion der Ergebnisse im Serum

Bei der Untersuchung der Seren wurden Proben von Kindern mit unterschiedlichen Erkrankungen verwendet. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf Kinder mit kardiologischen Diagnosen gelegt, da aus vorhergegangenen Untersuchungen hervorging, dass erwachsene Patienten mit einer koronaren Herzkrankheit niedrigere Werte der Cu-Zn-SOD aufwiesen, so dass sie dem oxidativen Stress nur unzureichend gewachsen sind (Siriken et al., 1994).

50 Kinder litten an Cystischer Fibrose, 30 an Diabetes mellitus Typ 1, 96 an unterschiedlichen kardiologischen Erkrankungen (siehe Seite 36), 45 an Juveniler chronischer Polyarthrit, 13 an endokrinologischen Erkrankungen, 7 an Hämophilie A, 7 an Galaktosämie, 9 an M.Crohn sowie 34 an unterschiedlichen neurologischen Erkrankungen (siehe Seite 33).

Ein signifikanter Unterschied an SOD konnte ($p < 0,0001$) zwischen Serum und Liquor cerebrospinalis festgestellt werden. Dieses Ergebnis stimmt mit Untersuchungen anderer Autoren (LABOYRIE et al. 1992, ADACHI et al. 2001) überein. Während LABOYRIE die Cu – Zn – SOD untersuchte, jedoch bei erwachsenen Patienten, bestimmte ADACHI die EC- SOD bei Kindern. LABOYRIE stellte eine Cu – Zn – SOD Konzentration im Plasma von $91,6 \pm 18,2$ ng SOD/ml fest. In der vorliegenden Untersuchung ergab sich ein Mittelwert von $17,45 \pm 8,04$ ng SOD/ml für Seren. Bei gesunden Neugeborenen wurde ein Mittelwert von $15,52 \pm 7,09$ ng SOD/ml gemessen.

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Ergebnissen bei Kindern mit unterschiedlichen Diagnosen innerhalb dieses „Serumkollektivs“.

Lediglich bei Kindern mit einer angeborenen Herzerkrankung war ein gering erhöhter nicht signifikanter Mittelwert für die Cu – Zn – SOD mit $20,37$ ng SOD/ml festzustellen.

Eine in früheren Untersuchungen beschriebene Enzymverminderung bei Kindern mit **M. Crohn** (PHYLACTOS et al. 2001) konnte durch die eigenen Ergebnissen nicht bestätigt werden. Möglicherweise hängt die Enzymkonzentration aber auch vom Aktivitätsgrad der Erkrankung ab, da bei vermehrter entzündlicher Aktivität ein Mehrfaches an Sauerstoffradikalen anfällt, welche entgiftet werden müssen.

Auch bei Kindern mit **cystischer Fibrose** wurde in vorhergehenden Studien eine Verminderung der Cu – Zn – SOD allerdings in neutrophilen Granulozyten und in

Erythrozyten beschrieben (PERCIVAL et al. 1995). Dieses Ergebnis wurde in erneuten Studien (MADARASI et al. 2000; BEST et al. 2004) bestätigt. Außerdem wurde gezeigt, dass der Enzymstatus nicht durch Kupfer- oder Zinkeinnahme beeinflusst werden kann. Die eigenen Untersuchungen konnten keine signifikante Verminderung der Cu – Zn – SOD im Serum von Kindern mit cystischer Fibrose reproduzieren. Dies lässt darauf schließen, dass zwar bei cystischer Fibrose eine Störung der Kupfer- Zink Homöostase besteht, diese jedoch nicht mit einem erhöhten Maß an zytotoxischen Reaktionen einhergeht, so dass es nicht zu einer Freisetzung der zytosolischen Cu – Zn – SOD in das Plasma der Patienten kommt. Dies scheinen auch weitere Studien zu bestätigen (WOOD et al., 2002,2003), bei denen gezeigt wurde, dass im Stadium der akuten Exazerbation der Erkrankung, z.B. bei Infektion der Atemwege, ein erhöhter oxidativer Stress vorliegt (messbar durch erhöhte Plasma- Fettsäuren), der jedoch nicht mit einer Beeinflussung der SOD im Plasma einhergeht.

Im Jahr 2000 wurde eine Studie veröffentlicht (OOKAWARA et al., 2000), bei der eine signifikante Verminderung der EC-SOD bei Kindern mit einem **Typ 1 Diabetes** nachgewiesen wurde. Bei den 30 hier untersuchten Kindern war aber kein signifikanter Unterschied der Cu – Zn – SOD im Serum gegenüber anderen Erkrankungsgruppen oder den gesunden Neugeborenen festzustellen.

Es konnte gezeigt werden (ODA et al., 1994), dass die SOD durch Glykosilierung, welche auch in vivo bei erhöhten Blutzuckerwerten stattfindet, in ihrer Enzymaktivität einbüßt. Daher kann vermutet werden, dass bei insulinpflichtigem wie auch bei nicht insulinpflichtigem Diabetes mellitus die antioxidative Enzymaktivität geschwächt wird, wobei die zytosolische Cu – Zn – SOD im Gegensatz zu der extrazellulären SOD im Serum nicht vermindert bzw. erhöht ist.

Weiterhin wurden 7 Kinder mit **Galaktosämie**, einer relativ seltenen Erkrankung mit einem Mangel an Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase, einem Enzym im Galaktose- Stoffwechsel, auf den Gehalt ihres Serums an Cu – Zn – SOD untersucht. Mit einem Mittelwert von $11,62 \pm 5,5$ ng SOD/ml zeigten diese Kinder vergleichsweise niedrige Werte, wobei der Unterschied zu den Werten bei gesunden Neugeborenen oder Kindern mit anderen Erkrankungen nicht statistisch signifikant war. Möglicherweise kommen diese erniedrigten Cu – Zn – SOD Werte ähnlich wie beim Diabetes mellitus durch Inaktivierung bzw. Funktionseinschränkung des Enzyms durch einen zu hohen Anteil an Galaktose im Blut zustande. So könnte man zu dem Schluss gelangen, dass bei diesen Patienten, ähnlich wie bei den Kindern

mit geistiger Entwicklungsverzögerung, auch eine Verminderung der SOD im Liquor cerebrospinalis vorliegt, so dass die geistige Entwicklungsverzögerung, die bei diesen Kindern häufig zu beobachten ist, zu erklären wäre.

Bei 45 Kinder mit **juveniler chronischer Polyarthrit** fand sich ein Mittelwert von 15,77 ng SOD/ml, also weder eine Erhöhung noch eine Erniedrigung des Cu – Zn – SOD Wertes, auch keine signifikante Abweichung im Vergleich zu den anderen untersuchten Krankheitsgruppen. In einer vorhergegangenen Studie dagegen (Gotia et al., 2001) wurde eine Erhöhung der SOD bei einer Gruppe von 20 Jugendlichen mit juveniler chronischer Arthritis festgestellt, mit einer deutlichen Erhöhung des SOD Wertes bei Patienten vor Behandlung der akuten Entzündung. Da bei unseren Patienten keine Differenzierung bezüglich des Aktivitätsgrades der Erkrankung vorgenommen wurde, kann der unauffällige Mittelwert auch daraus resultieren, dass Proben von Kindern sowohl mit hoher als auch mit sehr niedriger Krankheitsaktivität untersucht wurden. Eine Erhöhung der SOD lässt auf starken oxidativen Stress und vermehrte zytotoxische Reaktionen bei der juvenilen chronischen Arthritis schließen, die aus der Zerstörung des Gelenkknorpels bei chronischer Entzündung folgen können. Dies bestätigen auch kürzlich durchgeführte Untersuchungen der Synovialflüssigkeit von Patienten mit Osteoarthritis des Knies (OSTALOWSKA et al., 2005). Es zeigt sich eine signifikante Erhöhung des antioxidativen Enzymstatus in der Synovialflüssigkeit der kranken Patienten.

Bei den 7 Kindern mit **Hämophilie A** zeigte sich mit einem Mittelwert von $15,16 \pm 5,69$ ng SOD/ml ebenfalls keine wesentliche Abweichung der Cu – Zn – SOD im Serum. Die genetisch bedingte Erkrankung ist nicht durch zytotoxische Reaktionen oder oxidativen Stress ausgelöst. Es wurde aber nachgewiesen, dass eine Aktivierung des extrinsischen Gerinnungssystem in Verbindung mit erhöhtem oxidativem Stress, somit einer Erhöhung der SOD, einen wesentlichen Faktor in der Pathogenese der Arteriosklerose darstellt (PAWLAK et al., 2004).

34 Kinder mit sehr unterschiedlichen **neurologischen Diagnosen** wiesen einen Mittelwert von $16,95 \pm 5,39$ ng SOD/ml auf und zeigten keine signifikanten Abweichungen gegenüber den gesunden Kindern. Aufgrund der Heterogenität dieses Kollektives lässt sich hier aber keine sichere Aussage über den antioxidativen Status dieser Kinder treffen.

Kindern mit **kardiologischen Diagnosen** im „Serumkollektiv“ wurden in weitere Diagnosegruppen unterteilt und noch einmal gesondert auf statistisch signifikante Unterschiede bezüglich der SOD untersucht. Es handelte sich hier um ein sehr

großes Kollektiv. Es wurde eine Unterteilung in 8 Diagnosegruppen vorgenommen, die im Folgenden genannt sind:

10 Kinder mit einer Fallot'schen Tetralogie, 21 Kinder mit einem Atrium – Septum – Defekt Typ II, 6 Kinder mit einer Trisomie 21, 11 Kinder mit einer Transposition der großen Arterien, 30 Kinder mit komplexen Herzfehlern und 10 Kinder mit Klappenvitien, 4 Kinder mit Ventrikel- Septum- Defekt und 4 Kinder mit Aortenisthmusstenose.

Gegenüber den anderen Diagnosegruppen konnte keine statistisch signifikante Abweichung der Cu – Zn – SOD Werte gefunden werden ($p < 0,05$). Ebenso wenig zwischen den einzelnen kardiologischen Untergruppen ($p < 0,261$). Ein Mittelwert von $20,38 \pm 10,07$ ng SOD/ml wurde für das kardiologische Kollektiv ermittelt. Dies lässt zunächst darauf schließen, dass bei Herzerkrankungen ein vermehrter oxidativer Stress vorliegt bzw. bei Dekompensation auftritt.

Bereits 1994 (SIRIKEN et al., 1994) wurde vermutet, dass vermehrter oxidativer Stress ein wesentlicher Faktor in der Entstehung der Arteriosklerose ist. Damals konnte jedoch kein aussagekräftiges Ergebnis bezüglich der SOD bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit erzielt werden. In einer neueren Studie wurde aber gezeigt, dass die Arterioskleroseentstehung bei Mäusen mit Apolipoprotein - E - Mangel, und vermehrter SOD - und Katalaseproduktion verzögert ist (YANG et al., 2004).

Die 6 Kinder mit Trisomie 21 wurden dem kardiologischen Kollektiv zugeordnet, weil sie sich aufgrund ihrer Herzerkrankung in Behandlung befanden. Sie wiesen innerhalb des kardiologischen Kollektives mit einem Wert von $27,56 \pm 10,23$ ng SOD/ml den höchsten Mittelwert auf, der statistisch jedoch nicht signifikant war. Dennoch spiegelt dieses Ergebnis den für das Down- Syndrom nachgewiesenen Gen- Dosis- Effekt wider, wodurch es zu einem vermehrten Auftreten der Cu – Zn – SOD bei diesen Patienten kommt. Das nicht signifikante Ergebnis ist möglicherweise auch dadurch zu erklären, dass in unserer Studie die Cu – Zn – SOD im Serum und nicht im Zytosol untersucht wurde.

Den zweithöchsten Mittelwert in der kardiologischen Gruppe zeigten jene 10 Kinder, bei denen eine Fallot'sche Tetralogie vorliegt mit einem Wert von $23,64 \pm 13,06$ ng SOD/ml. Aber auch dieses Ergebnis war statistisch nicht signifikant. Da es sich bei der Fallot'schen Tetralogie um einen zyanotischen Herzfehler handelt, der häufig mit einer reaktiven Erhöhung des Hämoglobin Wertes einhergeht, muss man diskutieren, dass die leichte Erhöhung der Cu – Zn – SOD im Serum dieser Kinder durch diese Vermehrung der Erythrozyten zustande kommen kann. Die Hypoxie scheint aber

keine vermehrten zytotoxischen Reaktionen zu verursachen, die zu einer stärkeren Erhöhung der SOD im Serum führt. Da es sich bei den von uns untersuchten Kindern zumeist auch um bereits operierte Kinder handelt, also ohne Polyglobulie, lässt sich dieser Zusammenhang nur vermuten. In einer früheren Studie wurde gezeigt, dass im Myokard von Patienten mit Fallot'scher Tetralogie ein Sauerstoff - abhängiges Risiko für eine Schädigung durch freie Radikale während und sofort nach einer kardiovaskulären Korrekturoperation besteht, da der Enzymstatus mit dem Sauerstoffgehalt des Blutes korrelierte; dabei war aber keine Änderung des antioxidativen Enzymstatus vor, während und nach Operation (TEOH et al., 1992) festzustellen.

Bei 11 Patienten mit einer Transposition der großen Arterien wurde ein Mittelwert von $20,87 \pm 7,19$ ng SOD/ml bestimmt, er entspricht damit fast dem Mittelwert des gesamten „kardiologischen Kollektives“.

Des Weiteren wurden 10 Kindern mit unterschiedlichen Herzklappenfehlern, 20 Kindern mit einem Atrium- Septum- Defekt vom Typ II und 4 Kinder mit einem Ventrikel-Septum-Defekt untersucht. Hier konnten mit Mittelwerten von $22,26 \pm 15,16$ ng SOD/ml, $18,11 \pm 9,49$ ng SOD/ml und $18,15 \pm 7,31$ ng SOD/ml ebenso keine signifikanten Abweichungen festgestellt werden. Dies legt den Schluss nahe, dass es sich hier um Fehlbildungen handelt, die aufgrund der mechanischen Störung des Blutflusses klinische Symptome verursachen, die jedoch nicht durch zytotoxische Reaktionen oder Myokardschäden bedingt sind. Das heißt, die Schädigung liegt hier nicht auf Zellebene vor.

Die 30 Kinder, bei denen komplexe Herzfehler vorliegen (z.B. Tricuspidalklappendysplasie mit Pulmonalatresie mit rudimentärem rechtem Ventrikel, ASD II und persistierendem Ductus arteriosus oder Mitralatresie mit persistierendem Foramen ovale, Transposition der großen Gefäße, hochgradiger Pulmonalstenose und Fehlmündung der rechten oberen Lungenvene in den rechten Vorhof), zeigten ebenfalls keine statistisch signifikante Erhöhung oder Erniedrigung der Cu – Zn – SOD im Serum. Ihr Mittelwert liegt bei $18,77 \pm 8,69$ ng SOD/ml. Es bestätigt sich wiederum, dass bei kardialen Vitien keine vermehrten zytotoxischen Reaktionen auftreten. Die Rolle der SOD bei Herzerkrankungen scheint vielmehr im kardiovaskulären Bereich zu liegen, wo durch verstärkten oxidativen Stress oder Mangel an antioxidativen Mechanismen vermehrte Arteriosklerose mit drohender Myokardischämie die Folge ist.

Auch bei 4 Kindern mit Aortenisthmusstenose war der Mittelwert mit $21,63 \pm 7,50$ ng SOD/ml nicht signifikant erhöht. Aufgrund der verminderten Perfusion der unteren Körperhälfte bei hochgradiger Ausprägung dieser Fehlbildung, hätte man einen erhöhten Cu – Zn – SOD Wert erwarten können, da durch Hypoxie Zellschäden entstehen mit Freisetzung der Cu – Zn – SOD aus dem Zytoplasma. Diese Annahme konnte jedoch durch unsere Untersuchungen nicht bestätigt werden.

Die eingangs gestellten Fragen, mit denen diese Untersuchungen der SOD durchgeführt wurden, können aufgrund der erarbeiteten Ergebnisse folgendermaßen beantwortet werden:

- a) Die Cu/Zn- SOD ist bei entzündlichen Erkrankungen des Gehirns wie Meningitis purulenta ebenso wie die EC- SOD erhöht. Daraus kann man den Schluss ziehen, dass es sinnvoll sein kann, Patienten mit diesen Erkrankungen mit Antioxidantien wie z.B. Vitamin A, C oder E oder aber gentechnisch hergestellter SOD zu behandeln. Eine Bereicherung der Diagnostik stellt die SOD – Messung nicht dar.
- b) Die Untersuchung des Serums auf SOD bei verschiedenen Erkrankungen ergab keine signifikanten Unterschiede, so dass aufgrund der hier gewonnenen Ergebnisse keine prognostischen Rückschlüsse auf den Verlauf einer Erkrankung gezogen werden können.
- c) Bei angeborenen Herzfehlern war kein statistisch signifikanter Unterschied der SOD zwischen den verschiedenen Vitien messbar; somit ist auch keine Aussage über eine Wirksamkeit einer Behandlung mit Antioxidantien möglich.

6. Literaturverzeichnis

- 1) Adachi T, Nakamura M, Yamada H, Futema A, Kato K, Hirano K (1994) Quantitative and qualitative changes in extracellular – superoxide dismutase in patients with various diseases. *Clin Chim Acta* 229: 123-131
- 2) Adachi T, Masuda K, Hara H, Yamamoto M, Mitsui N, Os-ishi T, Okazaki M (2000) Plasma – extracellular – superoxide dismutase in healthy newborns and infants/children. *Clin Chim Acta* 295: 203-205
- 3) Adachi T, Yamamoto M, Hara H, Masuda K, Mitsui N, Os-ishi T, Okazaki M (2001) Extracellular – superoxide dismutase in cerebrospinal fluid from infants/children. *Clin Chim Acta* 308: 191-193
- 4) Bannister WH, Bannister JV, Barra D, Bond J, Bossa F (1991) Evolutionary aspects of superoxide dismutase: the copper/zinc enzyme. *Free Rad Res Commun* 12: 349-361
- 5) Barra D, Martini F, Bannister JV, Schininà ME, Rotilio G, Bannister WH, Bossa F (1980) The complete amino acid sequence of human Cu/Zn superoxide dismutase. *FEBS Letters* 120: 53-56
- 6) Barra D, Schinina ME, Bossa F, Puget K, Durosay P, Guissani A, Michelson AM(1990) A tetrameric iron superoxide dismutase from the eucaryote *Tetrahymena pyriformis*. *J Biol Chem* 265:17680-17687
- 7) Best K, McCoy K, Gemma S, Disilvestro RA (2004) Copper enzyme activities in cystic fibrosis before and after copper supplementation plus or minus zinc. *Metabolism* 53:37-41
- 8) Beyer WF, Fridovich I (1991) In vivo competition between iron and manganese for occupancy of the active site region of the manganese-superoxide dismutase of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 266: 303-308
- 9) Borgstahl GE, Parge HE, Hickey MJ, Beyer WF Jr, Hallewell RA, Tainer JA. (1992) The structure of human mitochondrial manganese superoxide dismutase reveals a novel tetrameric interface of two 4-helix bundles. *Cell* 71: 107-118
- 10) Bruchhaus I, Brattig NW, Tannich E (1992) Recombinant expression, purification and biochemical characterization of a superoxide dismutase from *Entamoeba histolytica*. *Arch Med Res* 23: 27-29

- 11)Çaksen H, Dede S, Cemek M, Dulger H, Cemek F (2003) Evaluation of antioxidant status in children with acute bacterial meningitis and encephalitis. Intern J Neurosci 113: 1497-1504
- 12)Christen S, Schaper M, Lykkesfeldt J, Siegenthaler C, Bifrare YD, Banic S, Leib SL, Tauber MG (2001) Oxidative stress in brain during experimental bacterial meningitis: differential effects of alpha-phenyl-tert-butyl nitron and N-acetylcysteine treatment. Free Radic Biol Med 31:754-62
- 13)De Deyn PP, Hiramatsu M, Borggreve F, Goeman J, D'Hooge R, Saerens J, Mori A (1998) Superoxide dismutase activity in cerebrospinal fluid of patients with dementia and some other neurological disorders. Alzheimer Dis Assoc Disord 12:26-32
- 14)Fridovich I (1986) Superoxide dismutases. Adv Enzymol 58: 61-97
- 15)Gotia S, Popovici I, Hermeziu B (2001) Antioxidant enzymes levels in children with juvenile rheumatoid arthritis. Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi. 105:499-503.
- 16)James ER (1994) Superoxide Dismutase. Parasitol today 10: 481-484
- 17)Keele BB Jr., McCord JM, Fridovich I (1970) Superoxide dismutase from escherichia coli B. A new manganese-containing enzyme. J Biol Chem 245: 6176-6181
- 18)Kimmel JR, Markowitz H, Brown DM (1959) Some Chemical and Physical Properties of Erythrocyte. J Biol Chem 234:46
- 19)Laboryie, Roos, Verspaget (1992) Copper – zinc superoxide dismutase in cerebrospinal fluid: implications for oxygen-radical stress in the central nervous system. Clin Neurol Neurosurg 94: 106-107
- 20)Le Trant N, Meshnick SR, Kitchener K, Eaton JW, Cerami A (1983) Iron-containing superoxide dismutase from Crithidia fasciculata. Purification, characterization, and similarity to Leishmanial and trypanosomal enzymes. J Biol Chem 258: 125-130
- 21)Madarasi A, Lugassi A, Greiner E, Holics K, Biro L, Mozsary (2000) Antioxidant status in patients with cystic fibrosis. Ann Nutr Metab 44:207-11
- 22)Maneva A, Michailova D, Sarbenova M, Christozova I, Taleva B (1995) Superoxide dismutase and lipid-bound sialic acid in sera from children with cancers and juvenile chronic arthritis. Eur J Cancer Prev 4:429-435
- 23)Mann T, Keilin D (1939) Proc Roy Soc Ser B Biol Sci 126, 303; Zitiert nach: McCord JM, Fridovich I (1969) Superoxide Dismutase. An enzymic function for Erythrocyte (Hemocuprein).J Biol Chem 224: 6049-6055

- 24) Marklund SL (1980) Distribution of CuZn superoxide dismutase and Mn superoxide dismutase in human tissues and extracellular fluids. *Acta Physiol Scand Suppl* 492: 19-23
- 25) Marklund SL (1982) Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc Natl Acad Sci* 79:7634-8
- 26) Marklund SM, Holme E, Hellner L (1982) Superoxide dismutase in extracellular fluids. *Clin Chim Acta* 126:41-51
- 27) Markowitz H, Cartwright GE, Wintrobe MM (1959) Studies on Copper Metabolism. XXVII. The isolation and properties of an erythrocyte cuproprotein (Erythrocyuprein) *J Biol Chem* 234: 40-45
- 28) McCord JM, Fridovich I (1969) Superoxide Dismutase. An enzymic function for Erythrocyuprein (Hemocupyrein). *J Biol Chem* 224: 6049-6055
- 29) Mohamed MS, Greenberg DM (1954) Isolation of purified copper protein from horse liver. *J Gen Physiol* 37:433-9
- 30) Mori K, Miyake H, Kurisaka M, Sakamoto T (1993) Immunohistochemical localization of superoxide dismutase in congenital hydrocephalic rat brain. *Childs Nerv Syst* 9:136-41
- 31) Oda A, Bannai C, Yamaoka T, Katori T, Matsushima T, Yamashita K (1994) Inactivation of Cu,Zn-superoxide dismutase by in vitro glycosylation and in erythrocytes of diabetic patients. *Horm Metab Res* 26:1-4
- 32) Ookawara T, Matsuura N, Oh-ishi T, Okazaki M, Kizaki T, Suzuki P, Hitomi Y, Suzuki K, Ohno H (2000) Serum extracellular superoxide dismutase in pediatric patients with various diseases as judged by an ELISA. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 107: 291-296
- 33) Ostalowska A, Birkner E, Wiecha M, Kasperczyk S, Kasperczyk A, Kapolka D, Zon-Giebel A (2006) Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in synovial fluid of patients with primary and secondary osteoarthritis of the knee joint. *Osteoarthritis Cartilage* 14:139-45
- 34) Oury TD, Chang LY, Marklund SL, Day BJ, Crapo JD (1994) Immunocytochemical localization of extracellular superoxide dismutase in human lung. *Lab Invest* 70:889-98
- 35) Pawlak K, Pawlak D, Mysliwiec M (2004) Extrinsic coagulation pathway activation and metalloproteinase-2/TIMPs system are related to oxidative stress and atherosclerosis in hemodialysis patients. *Thromb Haemost* 92:646-53

- 36) Percival SS, Bowser E, Wagner M (1995) Reduced copper enzyme activities in blood cells of children with cystic fibrosis. *Am J Clin Nutr* 62:633-8
- 37) Phylactos AC, Fasoula IN, Arnaud-Battandier F, Walker-Smith JA, Fell JM (2001) Effect of enteral nutrition on antioxidant enzyme systems and inflammation in paediatric Crohn's disease. *Acta Paediatr* 90:883-8
- 38) Porstmann T, Wietschke R, Grunow R, Jahn S, Porstmann B, Schmechta H, Pergande M, Van Baehr R (1990) Production and characterization of monoclonal antibodies against human Cu/Zn – superoxide dismutase and the establishment of a super – rapid enzyme – linked immunosorbent assay (SURALISA). *J Immunol Methods* 127: 1-10
- 39) Porstmann T, Wietschke R, Cobet G, Lorenz K, Grunow R, Jahn S, Bollmann R, Stamminger G, von Baehr R (1990) Immunochemical quantification of Cu/Zn superoxide dismutase in prenatal diagnosis of Down's syndrome. *Hum Genet* 85:362-6
- 40) Porstmann T, Wietschke R, Cobet G, Stamminger G, Bollmann R, Rogalski V, Pas P (1991) Cu/Zn superoxide dismutase quantification from fetal erythrocytes – an efficient confirmatory test for Down's syndrome after maternal serum screening and sonographic investigations. *Prenat Diagn* 11:295-303
- 41) Porter H, Folch J (1957) Cerebrocuprein I. A copper-containing protein isolated from brain. *J Neurochem* 1:260-71.
- 42) Ray G, Satinder A, Mamta J, Sanjay B (2000) Evaluation of free radical status in childhood meningitis. *Ann Trop Paediatr* 20:115-120
- 43) Sandstrom J, Karlsson K, Edlund T, Marklund SL (1993) Heparin-affinity patterns and composition of extracellular superoxide dismutase in human plasma and tissues. *Biochem J* 294:853-7
- 44) Sinet PM, Couturier J, Dutrillaux B, Poissonnier M, Raoul O, Rethore MO, Allard D, Lejeune J, Jerome H (1976) Trisomy 21 and superoxide dismutase-1 (IPO-A). Tentative localization of sub-band 21Q22.1. *Exp Cell Res* 97:47-55.
- 45) Siriken F, Tokgözoğlu SL, Renda N, Adabag S (1994) Erythrocyte CuZn superoxide dismutase and the extent of coronary atherosclerosis. *Clin Chem* 40:1597
- 46) Smith MW, Doolittle RF (1992) A comparison of evolutionary rates of the two major kinds of superoxide dismutase. *J Mol Evol* 34: 175-184
- 47) Steinmann HM, Hill RL (1973) Sequence homologies among bacterial and mitochondrial superoxide dismutases. *Proc Natl Acad Sci USA* 70: 3725-3729

- 48)Teoh KH, Mickle DA, Weisel RD, Li RK, Tumiatu LC, Coles JG, Williams WG (1992) Effect of oxygen tension and cardiovascular operations on the myocardial antioxidant enzyme activities in patients with tetralogy of Fallot and aorta-coronary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 104:159-64
- 49)Tsukahara H, Hanuta T, Todoroki Y, Hiraoka M, Noiri E, Maeda M, Mayumi M (2002) Oxidant and antioxidant activities in childhood meningitis. *Life sciences* 71: 2797
- 50)Turkdogan D, Toplan S, Karakoc Y (2002) Lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities in childhood epilepsy. *J Child Neurol* 17:673-6
- 51)Van Camp, W. Bowler C, Villarroel R, Tsang EW, Van Montagu M, Inze D. (1990) Characterization of iron superoxide dismutase cDNAs from plants obtained by genetic complementation in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 9903-9907
- 52)Weisinger RA, Fridovich I (1973) Mitochondrial Superoxide Dismutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. *J Biol Chem* 248: 4793-4796
- 53)Wood LG, Fitzgerald DA, Gibson PG, Cooper DM, Garg ML (2002) Increased plasma fatty acid concentrations after respiratory exacerbations are associated with elevated oxidative stress in cystic fibrosis patients. *Am J Clin Nutr* 75:668-75
- 54)Wood LG, Fitzgerald DA, Lee AK, Garg ML (2003) Improved antioxidant and fatty acid status of patients with cystic fibrosis after antioxidant supplementation is linked to improved lung function. *Am J Clin Nutr* 77:150-9
- 55)Yang H, Roberts LJ, Shi MJ, Zhou LC, Ballard BR, Richardson A, Guo ZM (2004) Retardation of atherosclerosis by overexpression of catalase or both Cu/Zn-superoxide dismutase and catalase in mice lacking apolipoprotein E. *Circ Res* 95:1075-81
- 56)Yoshida E, Mokuno K, Aoki S, Takahashi A, Riku S, Murayama T, Yanagi T, Kato K (1994) Cerebrospinal fluid levels of superoxide dismutases in neurological diseases detected by sensitive enzyme immunoassays. *J Neurol Neurosci* 124:25-31.
- 57)Yost FJ Jr., Fridovich I (1973) An Iron-containing Superoxide Dismutase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 248: 4905-4908
- 58)Youn HD, Kim EJ, Roe JH, Hah YC, Kang SO (1996) A novel nickel-containing superoxide dismutase from *Streptomyces* spp. *Biochem J* 318:889-96

59)Zhang H, Zhao H, Lu M, Zhang Y, Wang L, Zhang J, Ma D, Fan D (2005) A rare Cu/Zn superoxide dismutase mutation causing familial amyotrophic lateral sclerosis with variable age of onset and incomplete penetrance in China. Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord 6:234-8

7. Dank

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Drs. h.c. F.C. Sitzmann für die Bereitstellung des Themas und die Geduld bei der Umsetzung der Arbeit bedanken.

Weiterhin möchte ich mich herzlich bei Frau Sigrid Ströhlein für die Hilfe, Tipps und schönen Stunden im Labor bedanken.

Ebenso gilt mein Dank Frau Behrens für die außerordentliche Hilfsbereitschaft bei dem Durchforsten von Akten.

Ganz besonders danken möchte ich meinen Freund Marc für die umfassende Hilfe bei den zahlreichen Computerproblemen, die Geduld während der Fertigstellung der Arbeit und die jederzeitige Unterstützung nicht nur im Rahmen der Dissertation.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern, meinem Bruder und meiner Großmutter sowie in Erinnerung meinem verstorbenen Großvater danken, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre. Danke für die Unterstützung, den Rückhalt und dafür, dass ihr an mich geglaubt habt.

8. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Kiefer
Vorname: Daniela Nicole
Geburtsdatum: 30.05.1979
Geburtsort: Saarlouis
Familienstand: ledig

Schulbildung:

08/1985-06/1989 Grundschule Saarwellingen
08/1989-06/1998 Robert-Schuman-Gymnasium Saarlouis
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung:

10/1998-10/2004 Universität des Saarlandes, Abteilung Homburg
Studium der Humanmedizin
09/2000 Ärztliche Vorprüfung
08/2001 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09/2003 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2003 -09/2004 Praktisches Jahr am Knappschafts Krankenhaus Püttlingen
Wahlfach: Neurologie
10/2004 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Seit 12/2004 Assistenzärztin der Abteilung Innere Medizin,
Marienkrankenhaus St.Elisabeth Wadern/ St.Josef Losheim
am See

Famulaturen:

03/2001 DRK-Krankenhaus Saarlouis, Abteilung für Innere Medizin
03/2002 St.Elisabeth-Klinik Saarlouis, Abteilung für Gynäkologie
und Geburtshilfe
08/2002 St.Elisabeth-Klinik Saarlouis, Abteilung für
Anästhesiologie und Intensivmedizin
09/2002 Praxis für Radiologie und Nuklearmedizin, Saarlouis

Doktorarbeit:

04/2001 Experimentelle Doktorarbeit bei Prof. Dr. Drs. h.c. F.C.
Sitzmann, Kinderklinik Homburg
Thema: Die Bestimmung der Kupfer/Zink-Superoxid
Dismutase im Serum und Liquor cerebrospinalis von
Kindern mit der Frage des diagnostischen Stellenwertes