

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

Alle verwendeten Materialien, Chemikalien und Zellkulturmedien wurden, soweit nicht anders beschrieben, von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland) bezogen. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die während der Experimente verwendeten Geräte und Instrumente (Tab.1).

Blutdruckmessgerät	Life Science Instruments, Kalifornien, USA
Combitips plus, 0,5/2,5/5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Cryo Tube™ Vials	NUNC™ Brand Products, Dänemark
Einweghandschuhe	Kimberly-Clark, Roswell, USA
Einwegspritze 1 ml	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Einwegspritzen 1/10/20 ml	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Electrophorese Netzteil EPS 300	Pharmacia Biotech, Deutschland
Eppendorf Pipette/Multipette	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Tips 0,5-20/50-1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Tubes 0,5/1,5/2,0 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
HiTrap Protein G HP	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Homogenisator	Labortechnik, Mülheim, Deutschland
Inkubator "HERA Cell"	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Laminar Flow	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Megafuge 2.0R	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Metabolische Käfige	3701M081, Tecniplast, Buguggiate, Italian
Metallsiebe (ISO 3310-1 Prüfsiebe)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Microplate Reader (MRX)	DYNEX Technologies, Sullyfield Circle, USA
Microtiter Plate Shaker TITRAMAX 101	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Mikroskop	Leica Microscopie & Systeme GmbH, Wetzlar, Deutschland
Mikroskop Deckgläser	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig

Mikrotom	Microm International GmbH, Walldorf, Deutschland
Mikrowelle	Bosch, Deutschland
Minishaker MS1	IKA Works Inc. Wilmington, Deutschland
Multi-adapter für S-Monovette	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
NUNC-Immuno 96-Well Shape Plates	NUNC A/S, Roskilde, Dänemark
Objektträger, Super Frost Plus	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Operationsbesteck: Schere, Pinzette etc.	Medicalis Medizintechnologie, Garbsen, Deutschland
Parafilm	American National Can™, Greenwich, USA
pH-Meter	Wissenschaftlich Technische Werkstätten, Weilheim, Deutschland
Pipette à 2, 5, und 25 ml	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Polaroidkamera	Polaroid GmbH, UK
Polypropylene Conical Tube, 15/50ml	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Rüttler Big squid	IKA-WERKE GmbH, Staufen, Deutschland
Rüttler Edmund Bühler	Johanna Otto GmbH, Hechingen, Deutschland
S-Monovette 9ml with EDTA	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Spritzenfilter	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel, Deutschland
Thermomixer Compact	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
TRIO-Thermoblock	Biotron GmbH, Deutschland
Vortex-2-Genie	Scientific Industries (SI), USA
Zellkultur Container	NUNC™ Brand Products, Dänemark
Zellkulturplatten	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Zentrifuge 5417R	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland

Tab. 1: Verwendete Geräte und Instrumente

## 2.2 Tierversuch

Die Tierversuche und die damit verbundenen Experimente wurden von der Senatsverwaltung für Gesundheit und Soziales des Landes Berlin geprüft und genehmigt (Tierversuchsantrag Nr.0051/04). Alle Eingriffe an lebenden Tieren wurden unter Beachtung

des § 9 Abs. 1 und 2 des Tierschutzgesetzes durchgeführt. Als Doktorand arbeitete ich mit einer Ausnahmegenehmigung und unter Aufsicht des Betreuers PD Dr. med. Harm Peters, qualifiziert für Eingriffe an lebenden Tieren gemäß dem § 9 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes [28]. Die anfallenden toten Tiere und Tierkörperteile wurden gemäß § 8 Abs. 1 und 2 des Tierkörperbeseitigungsgesetzes vorschriftsmäßig entsorgt [29].

## **2.2.1 Tiere und Tierhaltung**

Für die Tierversuche wurden 81 männliche Wistar Ratten der Firma Charles River (Sulzfeld, Deutschland) mit einem Anfangsgewicht von 180-220 g verwendet. Die Haltung der Tiere erfolgte paarweise in Käfigen mit freiem Zugang zu Futter und Trinkwasser unter vollklimatisierten Bedingungen mit einem 12 Stunden Tag-Nachtrhythmus in der Zentralen Versuchstierhaltung in der Tucholsky Straße, 10117 Berlin. Die Tiere wurden täglich zur Kontrolle der Gewichte und der Futter- und Trinkmengen visitiert.

## **2.2.2 Herstellung des OX-7 Antikörpers**

### **2.2.2.1 Zellkultur**

Zur Induktion der akuten Anti-Thy1-Glomerulonephritis wurde ein OX-7 Antikörper hergestellt. Für die Herstellung des Zellkulturmediums wurden, soweit nicht anders vermerkt, Produkte der Fa. Biochrom KG, Berlin, Deutschland verwendet.

Für die Erstkultivierung wurde folgendes Kulturmedium vorbereitet: RPMI- Medium 1640 mit 10%igem fetalem Kälberserum, 1,6% G-50 Glucoselösung, 0,3% HEPES und 60000 IU Penicillin sowie 60 mg Streptomycin pro Liter. Die bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagerten Zellen des OX-7-Stamms (Hybridoma Zellen der Firma Center of Applied Microbiology & Research, Saisbry UK) wurden zum Ansatz einer Zellkultur zügig unter warmem, fließendem Wasser aufgetaut. Anschließend gaben wir unter sterilen Bedingungen milliliterweise das Kulturmedium bis zu einem Endvolumen von 20 ml zu.

Dieser Ansatz wurde für 3 min bei 2500 U/min zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 15 ml Kulturmedium resuspendiert und bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  in Kulturflaschen (Nunclon™ Surface, Nunc Brand Products, Dänemark) inkubiert. Umtägig erfolgten mikroskopische Kontrollen mit Bestimmung von vitalen und avitalen Zellen mittels Trypan Blue Färbung (Sigma, Taufkirchen, Deutschland). Neben regelmäßigen pH-Wert Kontrollen (pH-Meter ph 526,

WTW, Weilheim, Deutschland) wurden die Zellen alle zwei Tage passagiert und insoweit vermehrt und separiert, dass nach einem Zeitraum von 14 Tagen 16 Kulturflaschen à 100 ml vorlagen. Der Inhalt dieser Flaschen wurde dann in ein miniPERM-Zellkulturgefäße (Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland) überführt.

Dieses besteht aus einem Kultur- und einem Versorgungsmodul. In das Kulturmodul wurden 35 ml der Zellsuspension mit einer Inseminationsdichte von  $0,5 \times 10^6$  Zellen gegeben. Das Modul wurde wie oben beschrieben kultiviert und für eine optimale Oxygenierung auf eine im Brutschrank befindliche Drehvorrichtung montiert. Der Mediumwechsel erfolgte abhängig vom Zellwachstum täglich bzw. umtäglich bis zu einer Zellzahl von  $11,5 \times 10^6$ . Dann erfolgte die Gewinnung einer antikörperhaltigen Zellsuspension durch Entnahme von jeweils 17 ml aus dem Kulturmodul. Diese 17 ml wurden mit Kulturmedium wieder auf ein Gesamtvolumen von 35 ml aufgefüllt, so dass das Gesamtvolumen OX-7-haltigen Kulturüberstandes 327 ml betrug.

### **2.2.2.2 Aufreinigung des Kulturüberstandes**

Zur Aufreinigung der Immunglobuline und der Trennung von Fremdeiweißen wurde der Zellkulturüberstand über eine HiTrap-Protein G-Säule (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) geleitet. Hierbei wurden 20 mM Natriumphosphat (Sigma) Binding Puffer (pH 7,0), 0,1 M Glycine-HCl (Sigma) Elutions Puffer (pH 2,7) und 1 M Tris-HCl-Lösung (pH 9,0) (Sigma) zur Probenrekonstitution verwendet. Der Kulturüberstand wurde mit einer Geschwindigkeit von 0,5 ml/min über die Säule geleitet. Am Ende konnten 130 ml Lösung mit einer Immunglobulinkonzentration von 1 mg/ml gewonnen werden. Das Eluat wurde anschließend 24 h in PBS lysiert (Slide-A-Lyzer, Pierce, Rockford, USA), aliquotiert und bei minus 70°C eingefroren.

### **2.2.3 Antikörper mAb 1-22-3**

Die chronisch-progressive Glomerulosklerose wurde durch chirurgische Entfernung einer Niere und die intravenöse Injektion des monoklonalen Antikörpers mAb 1-22-3 (4 mg/kg Körpergewicht in PBS gelöst) in die laterale Schwanzvene nach Desinfektion wie oben beschrieben induziert. Dieses Modell wurde von der Arbeitsgruppe um H. Shimizu und F. Kawachi erstmalig beschrieben [27]. Sie stellten uns freundlicherweise auch den Antikörper mAb 1-22-3 in lyophilisierter Form zur Verfügung. Wie OX-7 bindet auch mAb 1-22-3 an ein Thy1-ähnliches Antigen auf der Oberfläche von Mesangialzellen der Niere und verursacht eine komplement- und NO-abhängige Mesangialzellyse.

### **2.2.4 Induktion der Erkrankung**

Für die Versuche am akuten Modell der Anti-Thy1-Glomerulonephritis erhielten die Tiere eine intravenöse Injektion des aufgetauten Antikörpers OX-7 in die laterale Schwanzvene nach Desinfektion des Injektionsfeldes mit 70%igem Alkohol. Jedes Tier erhielt 1 mg/kg Körpergewicht in PBS gelösten OX-7. Zur Injektion wurden die Tiere in eine leichte Äthernarkose versetzt. Die Kontrolltiere erhielten eine Injektion des gleichen Volumens PBS.

Für die Versuche am Modell der chronisch-progressiven Glomerulosklerose erhielten die Tiere den aufgetauten, in PBS gelösten Antikörper mAb 1-22-3 in einer Konzentration von 4 mg/kg Körpergewicht. Kontrolltieren mit und ohne Uninephrektomie wurde das gleiche Volumen PBS intravenös injiziert.

### **2.3 Futter und Trinkwasser**

Die Tiere erhielten Futter des Typs Zuchtdiät für Ratten #1311 der Firma Altromin (Lage, Deutschland) mit einem Proteinanteil von 22,5 % (Tab.2). Alle Tiere hatten ständig freien Zugang zu Futter und Trinkwasser.

## Zuchtdiät für Ratten und Mäuse # 1311

### Gehalt an Inhaltsstoffen:

Rohprotein	22,50%
Lysin	1,20%
Rohfett	5%
Rohfaser	4,50%
Rohasche	6,50%
Kalzium	0,90%
Phosphor	0,70%

### Zusatzstoffe:

Vitamin A	15000 IE
Vitamin D3	600 IE
Vitamin E	75 mg
Kupfer	5 mg

Tab.2: Zusammensetzung der Zuchtdiät für Ratten #1311 der Firma Altromin, Lage, Deutschland

### 2.3.1 Wirkstoff FTY720

In unserem Versuch wurde das Immunsuppressivum FTY720, 2-amino-2-[2-(4-octylphenyl)ethyl]propan-1,3-diol-Hydrochlorid verwendet um den Einfluss von Lymphozyten auf die Phasen der Mesangialzelllyse und Matrixexpansion bei akuter Anti-Thy1-Glomerulonephritis und auf die Progression chronisch-progressiver Glomerulosklerose zu untersuchen.

FTY720 ist ein Struktur analogon des Medikaments Myriocin (ISP-1), welches als Metabolit des Askomyzeten *Isaria sinclairii* im alten China neben Ginseng und Hirschgeweih als Garant für ewige Jugend galt [30]. Das Molekulargewicht beträgt 343,94. Bei Raumtemperatur ist FTY720 weiß und fest, der Schmelzpunkt liegt bei 259°C und die Wasserlöslichkeit liegt bei > 200g/l [31].

FTY720 und insbesondere seine phosphorylierte Form agieren in vivo als Agonist an vier von fünf Sphingosin-1-Phosphat Rezeptoren (vormals Endothelzell-Differenzierungs-Gen-Rezeptor (EDG)). Diese Rezeptoren werden auf Lymphozyten und Endothelzellen exprimiert und vermitteln die FTY720-Effekte auf Lymphozyten. So ist das Medikament in der Lage selektiv

und reversibel die Lymphozytenzahl im peripheren Blut durch eine Umverteilung in Milz, periphere Lymphknoten und Peyersche Plaques zu senken. Zurzeit ist unklar, ob dieser Effekt durch einen vermehrten Einstrom (homing) oder durch eine Behinderung des Ausstroms von Lymphozyten aus den sekundären Lymphorganen erreicht wird. Granulozyten und Monozyten werden durch FTY720 nicht beeinflusst [24]. Die verwendete Dosierung von 0,3 mg/kg Körpergewicht/Tag wurde auf der Basis von Publikationen gewählt, welche bei dieser Dosierung über eine effektive Lymphozytendepletion bei der Ratte berichteten [24]. Als Startdosis wurde für die FTY720-behandelten Tiere für die ersten 24 Stunden der Behandlung eine Dosierung von 1,5 mg/kg Körpergewicht/Tag gewählt.

### 2.3.2 Wirkstoffzubereitung

In das trockene Futtermehl wurde eine entsprechende Menge FTY720 (Tab.3) gegeben und anschließend für 10 min mit einem Schneebesen vorsichtig, aber gründlich verrührt. Anschließend wurde portionsweise unter weiterem Rühren mit einem elektrischen Handmixer Trinkwasser hinzugegeben und der Teig mit der Hand nochmals für 5 min geknetet, dann ausgerollt. Aus der ca. 1 cm dicken Teigfläche wurden mit Backformen Plätzchen ausgestochen, welche zum Trocknen auf Metallgitter ausgelegt und einem gleichmäßigen, von einem Ventilator erzeugten Luftstrom ausgesetzt wurden.

Vor dem eigentlichen Versuchsbeginn erhielten alle Tiere Plätzchen ohne Wirkstoff, um sich an die Futterzubereitung gewöhnen zu können. Vorversuche ergaben, dass der durchschnittliche Futtermittelverbrauch der Tiere bei 25 g/Tag lag. Die verabreichte Wirkstoffmenge basiert auf diesem Verbrauch, wurde allerdings der tatsächlich von den Tieren verzehrten Menge immer wieder neu angepasst.

<b>FTY720 Gabe</b>	Modell der <b>akuten</b> Anti-Thy1- Glomerulonephritis	Modell der <b>chronisch-progressiven</b> Glomerulosklerose
Startdosis	1,5 mg/kg Körpergewicht	1,5 mg/kg Körpergewicht/Tag
Erhaltungsdosis	0,3 mg/kg Körpergewicht	0,3 mg/kg Körpergewicht/Tag

Tab.3: Zieldosierung von FTY720 bei akuter Anti-Thy1-Glomerulonephritis und chronisch-progressiver Glomerulosklerose

## 2.4 Studienprotokolle

### 2.4.1 Protokoll 1 – Einfluss von FTY720 auf die Mesangialzelllyse bei akuter Anti-Thy1-Glomerulonephritis

Der Versuchsaufbau in Protokoll 1 diente der Untersuchung des Einflusses von FTY720 auf die Mesangialzelllyse bei akuter Anti-Thy1-Glomerulonephritis. Die Tiere wurden für 5 Tage vor Injektion des Anti-Thy1-Antikörpers mit FTY720 vorbehandelt. 24 Stunden nach Induktion der akuten Anti-Thy1-Glomerulonephritis wurden bei allen Tieren Parameter der Mesangialzelllyse untersucht. Als Vergleichsgruppen für FTY720-behandelte Tiere dienten eine Gruppe kranker, unbehandelter Tiere und gesunde Kontrollen ohne Therapie (Tab.4).

Gruppe	Glomerulonephritis ja/ nein	Therapie	Tierzahl
Gruppe 1 (keine aGN)	nein	keine	4
Gruppe 2 (aGN)	ja	keine	10
Gruppe 3 (aGN+FTY720)	ja	FTY720	10

Tab.4: Behandlungsgruppen in Protokoll 1

### 2.4.2 Protokoll 2 – Einfluss von FTY720 auf die Matrixexpansion bei akuter Anti-Thy1-Glomerulonephritis

Der Versuchsaufbau in Protokoll 2 diente der Untersuchung des Einflusses von FTY720 auf die Phase der Matrixexpansion bei akuter Anti-Thy1-Glomerulonephritis. Die Tiere wurden 24 Stunden nach Induktion der akuten Anti-Thy1-Glomerulonephritis für 7 Tage mit FTY720 behandelt. Am Tag 7 wurden den Tieren beide Nieren und Blut für weitere Untersuchungen entnommen. Als Vergleichsgruppen für FTY720-behandelte Tiere dienten eine Gruppe kranker, unbehandelter Tiere und gesunde Tiere ohne Therapie (Tab.5).



<b>Gruppe</b>	<b>Glomerulonephritis ja/ nein</b>	<b>Therapie</b>	<b>Tierzahl</b>
Gruppe 1 (keine aGN)	nein	keine	5
Gruppe 2 (aGN)	ja	keine	13
Gruppe 3 (aGN+FTY720)	ja	FTY720	13

Tab.5: Behandlungsgruppen in Protokoll 2

### 2.4.3 Protokoll 3 – Einfluss von FTY720 auf die Progression chronischer Anti-Thy1-Glomerulosklerose

In Protokoll 3 sollte der Einfluss von FTY720 auf die Progression chronischer Anti-Thy1-Glomerulosklerose untersucht werden. Die Tiere wurden für die Induktion der Erkrankung uninephrektomiert und erhielten den Anti-Thy1-Antikörper mAb 1-22-3. 7 Tage nach Induktion einer chronisch-progressiven Glomerulosklerose wurde die FTY720-Gabe begonnen und für 20 Wochen fortgeführt. Alle 4 Wochen wurden die Proteinurie mittels metabolischer Käfige bestimmt. Nach 20 Wochen wurden den Tieren Nieren und Blut zur weiteren Untersuchung entnommen. Als Vergleichsgruppen für FTY720-behandelte Tiere dienten eine Gruppe kranker, unbehandelter Tiere und gesunde Tiere mit einer oder zwei Nieren ohne Therapie (Tab.6).

<b>Gruppe</b>	<b>Uninephrektomie ja/ nein</b>	<b>Glomerulonephritis ja/ nein</b>	<b>Therapie</b>	<b>Tierzahl</b>
Gruppe 1 (2-Nieren)	nein	nein	keine	4
Gruppe 2 (1-Niere)	nein	nein	keine	4
Gruppe 3 (cGS)	ja	ja	keine	9
Gruppe 4 (cGS+FTY720)	ja	ja	FTY720	9

Tab.6: Behandlungsgruppen in Protokoll 3

## **2.5 Versuchsparmeter**

### **2.5.1 Blutdruckmessung**

Die Messung des systolischen Blutdrucks erfolgte plethysmographisch mit einem Gerät der Firma Life Science Instruments Ltd. (Kalifornien, USA). Der Sensor dieses Geräts wurde ca. 1 cm oberhalb der Schwanzwurzel positioniert. Vorbereitend wurden die Tiere in Acrylglasröhren in eine temperierte Kammer (Ambient Chamber) gebracht. Dies führte zu einer für die Blutdruckmessung erforderlichen Vasodilatation. Es erfolgten mindestens drei aufeinander folgende morgendliche Messungen, deren Mittelwert ausgewertet wurde. Vor den eigentlichen Messungen wurden die Tiere zur Vermeidung von Stressartefakten an den Aufenthalt in den Acrylglasröhren gewöhnt.

In den Versuchsprotokollen 1 und 2 wurden die Messungen einen Tag vor der Nieren- und Blutentnahme durchgeführt. In Protokoll 3 erfolgten die Blutdruckmessungen in Woche 2 und Woche 20 nach Induktion der chronischen Anti-Thy1-Glomerulosklerose.

### **2.5.2 Urinsammlung**

Für die Urinsammlung wurden die Tiere einzeln für 24 Stunden in metabolische Käfige gesetzt, die durch ein Trichtersystem eine Trennung von Urin, anderen Ausscheidungen und Futterresten ermöglichten. Den Urinauffangröhrchen wurden zu Beginn der Messung 100 µl Penicillin/ Streptomycin (10.000 U/ ml, Biochrom KG, Berlin, Deutschland) zugesetzt, um einen Proteinabbau durch Bakterien zu verhindern. Nach 24 Stunden wurden die Tiere wieder in ihre normalen Käfige zurückgesetzt, die Urinmengen dokumentiert, der Urin für 5 Minuten bei 5000 U/ min zentrifugiert und der Überstand bei -20°C für die Proteinbestimmung eingefroren.

In den Versuchsprotokollen 1 und 2 erfolgte die Bestimmung der Proteinurie am Vortag der Nieren- und Blutentnahme, für das Protokoll 3 alle 4 Wochen bis Woche 20 nach Induktion der chronischen Anti-Thy1-Glomerulosklerose. Für das Protokoll 3 erfolgte zusätzlich eine Messung der Proteinurie eine Woche nach Induktion der Erkrankung aufgrund deren Ergebnisse die Tiere in die verschiedenen Behandlungsgruppen eingeteilt wurden. Das Ziel dieser initialen Messung war ein möglichst gleichmäßig verteilter Krankheitsgrad der Tiere. In den metabolischen Käfigen hatten die Tiere ebenfalls freien Zugang zu Futter bzw. Therapiefutter und Trinkwasser.

### 2.5.3 Nierenentnahme

Am Versuchsende wurden die Tiere durch intraperitoneale Injektion von Ketamin (50 mg /kg Körpergewicht, Pharmacia GmbH, Erlangen, Deutschland)/ Rompun (10 mg/kg Körpergewicht, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) in eine tiefe Narkose versetzt. Nach Überprüfung der Anästhesie erfolgte eine großzügige Desinfektion des OP-Gebietes mit Sterilium (Bode Chemie, Hamburg, Deutschland) und das Abdomen wurde durch einen suprapubisch beginnenden U-Schnitt bis zu den Rippenbögen eröffnet. Nach Zug des so entstandenen Hautlappens nach kranial wurde das Darmkonvolut vorsichtig nach rechts verlagert, um einen freien Blick auf das Retroperitoneum zu gewähren. Anschließend wurde die Aorta an der Bifurkation beginnend stumpf bis zum Abgang der beiden Arteriae renales freipräpariert. Die Aortenbifurkation wurde mit einer 27-Gauge-Butterfly-Kanüle punktiert, um dann bis zum Eintreten des Herzstillstandes Blut zu entnehmen (ca. 5-8 ml). Über die noch liegende Butterfly-Kanüle wurde bis zum erneuten Beginn der Herzaktion ca. 4°C kaltes, steriles PBS injiziert. Jetzt wurden zwischen dem unteren Leberrand und dem Abgang der beiden Arteriae renales die Vena cava inferior und die Aorta descendens stumpf abgeklemmt und die Vena cava inferior unterhalb des Abgangs der Nierenarterien inzidiert, um bei der nun folgenden Perfusion der Nieren mit ca. 50 ml 4°C kaltem, sterilen PBS ein möglichst hohes Nierenperfusionsvolumen zu erzielen. Nachdem eine Blutleere der Nieren erreicht war, wurden sie von Gefäßen und Ureter getrennt und bis zur weiteren Aufarbeitung in PBS gefüllten 50 ml Röhrchen aufbewahrt.

Von dem entnommenen Blut wurden je Tier ca. 3 ml in ein Heparinröhrchen umgefüllt und 3 ml bei 5000 U/min und 4°C für 10 min zentrifugiert, das Serum abpipettiert und dieses bei -20°C für weitere Untersuchungen eingefroren.

### 2.5.4 Nierenaufarbeitung und Isolierung der Glomerula für die Zellkultur

Für die histologischen und laborchemischen Untersuchungen wurden die entnommenen Nieren unter weitestgehend sterilen Kautelen weiter aufbereitet. Als erstes wurden die Kapsel stumpf entfernt und ein Nierenpol abgetrennt und halbiert. Eine Hälfte wurde in Histosetten formalinfixiert, die andere in Cryo Tubes in -70°C kaltem Stickstoff schockgefroren. Der Rest der Niere wurde halbiert und das Nierenbecken mit einer gewölbten kleinen Schere entfernt. Anschließend wurden beide Nierenhälften auf eine auf Eis gelagerte ca. 15 cm mal 15 cm große Glasplatte gegeben und mittels einer Laborklinge solange gehäckselt bis eine zähe homogene Masse entstanden war. Von dieser Masse wurde ein kleiner Teil für die Anlage der kortikalen Kultur abgenommen, der Rest wurde auf drei graduierte, ineinander stapelbare

Metallsiebe (ISO 3310-1 Prüfsiebe, Merck, Darmstadt, Deutschland) mit absteigender Maschengröße von 160 µm, 125 µm und 71 µm gebracht, um die Glomeruli zu isolieren. Auf dem obersten Sieb wurde die Gewebsmasse immer im Wechsel mit einem Glasspatel verteilt und anschließend mit einer PBS gefüllten Spritzflasche durch die Maschen gedrückt, bis sich auf dem obersten Sieb nur noch wenig an der bräunlichen Farbe erkennbares kortikales Gewebe befand. Jetzt wurde das Gewebe auf dem zweiten Sieb mit der PBS gefüllten Spritzflasche zusammengetrieben und einige Male stark direkt gespült. Auf dem letzten Sieb befanden sich jetzt die isolierten Glomeruli, welche zusammengetrieben wurden, um sie anschließend mit ca. 300 ml ca. 4°C kaltem PBS indirekt zu spülen. Dies entfernte verbliebene Zellreste aus dem Interstitium. Die so isolierten und gereinigten Glomeruli wurden dann in ein 50 ml fassendes Röhrchen überführt und für 10 min bei 15.000 U/min und 4°C zentrifugiert.

Beim Akutversuch und bei den nicht nephrektomierten Tieren des chronischen Versuchs wurde die zweite Niere nach Entfernung des Nierenbeckens vollständig für die Herstellung der glomerulären Kultur verwendet.

### **2.5.5 Kortikale und glomeruläre Zellkultur**

Es wurden zwei Zellkulturvarianten, eine glomeruläre und eine kortikale, mit folgendem Kulturmedium angelegt: Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM, ohne Indikator) mit 0,1 U/ml Insulin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 25 mM HEPES-Buffer. Für die kortikale Zellkultur wurde wie oben beschrieben eine abgewogene Menge homogenisierten Nierengewebes in Zellkultur gebracht und für 48 Stunden bei 37°C und einem CO<sub>2</sub> Gehalt von 5% in einer 24-Loch-Zellkulturplatte bebrütet. Die durch das Sieben gewonnenen Glomeruli wurden nach dem Zentrifugieren mit 10 µl DMEM resuspendiert und unter dem Mikroskop gezählt. Anhand des Mittelwertes nach dreimaliger Auszählung konnte die Menge Kulturmedium bestimmt werden, die erforderlich war, um eine Anzahl von ca. 2000 Glomeruli/ml zu erhalten. Auch die glomeruläre Zellkultur wurde für 48 Stunden bei 37°C und einem CO<sub>2</sub> Gehalt von 5 % in einer 24-Loch-Zellkulturplatte bebrütet. Am Ende der Bebrütungszeit wurden die Proben auf Bakterien- und Pilzwachstum kontrolliert und der Überstand nach 5 min Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4°C (Zentrifuge 5417 R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei -20°C für die weiteren Messungen eingefroren.

## **2.6 Messung der Krankheitsparameter**

Der Einfluss von FTY720 auf das Tiermodell der akuten und der chronischen Glomerulonephritis sollte sowohl durch funktionelle Parameter wie Proteinurie, Plasma- und Urinspiegel von Kreatinin und Harnstoff als auch durch histologische (PAS-Färbung), immunhistologische Methoden (CD4, CD8, ED1) und quantitative Analysen von TGF- $\beta$ 1, PAI-1, Fibronectin mittels ELISA aus glomerulären und kortikalen Zellkulturen nachgewiesen werden. Einen hohen Stellenwert hatten weiterhin die Differentialblutbildanalysen und die Untersuchungen der Lymphozytensubpopulationen mittels Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS).

### **2.6.1 Messung der Proteinurie**

Die Proteinurie wurde mit der Pyrogallol-Rot-Methode (Fluitest USP, Biocon Diagnostik, Vöhl-Marienhagen, Deutschland) aus dem 24 Stunden Sammelurin bestimmt. Das Prinzip der Messung beruht auf dem Prinzip der Extinktionsmessung von Farblösungen. Bei einer Wellenlänge von 470 nm hat der Pyrogallol-Rot-Molybdän-Komplex sein Absorptionsmaximum. Dieses ändert sich in Abhängigkeit von der Bindung an basische Aminosäuren in Richtung purpurfarben und einer Wellenlänge von 583 nm. Zwischen der Farbintensität und der Proteinkonzentration besteht direkte Proportionalität [32], so dass mithilfe einer Standardkurve in 1 g/l-Schritten von 0 bis 5 g/l, inklusive Leerwert und geeichter Kontrolle, die Proben nach Zugabe von 350  $\mu$ l gebrauchsfertigem Reagenz bei 570 nm am Plattenphotometer MRX-5000 (Dynex Technologies, Chanilly, U.S.A.) gemessen werden konnten.

### **2.6.2 Histologie**

Die histologische Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch bei 400facher Vergrößerung anhand des von Raij [33] publizierten semiquantitativen Verfahrens, bei dem pro Schnitt bei 30 zufällig ausgewählten Glomeruli der Matrixgehalt mittels Scores beurteilt wird (Tab.7).

<b>Matrixgehalt im Glomerulum</b>	<b>Score</b>
0 %	0
1-25 %	1
26-50 %	2
51-75 %	3
76-100 %	4

Tab.7: Score zur Bestimmung des glomerulären Matrixgehalts

Analog hierzu erfolgte auch die Bestimmung des Matrixgehalts im Tubulointerstitium im Versuchsprotokoll 3. Bei den immunhistologischen Färbungen wurde die glomeruläre Zellinfiltration von mind. 20 zufällig ausgewählten Glomeruli und die tubulointerstitielle Infiltration von mind. 15 zufällig ausgewählten kortikalen Gebieten bei 400facher Vergrößerung gezählt (Tab.8).

<b>Matrixgehalt im Tubulointerstitium</b>	<b>Score</b>
0 %	0
1-25 %	1
26-50 %	2
51-75 %	3
76-100 %	4

Tab.8: Score zur Bestimmung des tubulointerstitiellen Matrixgehalts

Ein unabhängiger Untersucher ist hierbei nicht über die Gruppenzugehörigkeit der Tiere informiert und kann auch anhand der Objekträgerbeschriftung keine Rückschlüsse diesbezüglich ziehen.

### **2.6.2.1 Einbettung und Anfertigung der histologischen Schnitte**

Für die histologischen und immunhistologischen Untersuchungen wurden Gefrier- und Paraffinschnitte angefertigt.

Die Nierenstückchen für die Gefrierschnitte wurden vor dem Schneiden auf eine Temperatur von  $-20^{\circ}\text{C}$  gebracht, um den Temperaturunterschied zwischen Kryotom und Gewebe möglichst gering zu halten. Geschnitten wurde mit dem Gefriermikrotom Frigocut 2700 (Leica, Wetzlar, Deutschland), die Schnittdicke betrug  $5\ \mu\text{m}$ , und die Schnitte wurden anschließend für 24 Stunden auf positiv geladenen Objektträgern (Superfrost plus, Menzel Gläser, Braunschweig, Deutschland) luftgetrocknet. Nach 10minütiger Azetonfixierung und 10minütiger Lufttrocknung bei Raumtemperatur wurden die Schnitte bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Unmittelbar vor den immunhistologischen Färbungen wurden die Schnitte auf einem Rüttler (IKA Vibrax VXR, Janke & Kunkel GmbH und KO KG, Staufen, Deutschland) zum Entparaffinisieren für jeweils 10 min zweimal in Xylol 100% und eine absteigende Ethanolreihe (2 x 100% Ethanol, 2 x 96% Ethanol, 1 x 80 % Ethanol, 1 x 50% Ethanol, 1 x Aqua dest.) überführt. Anschließend wurden sie für die immunhistologischen Färbungen für 10 Minuten in einem handelsüblichen Schnellkochtopf auf  $96^{\circ}\text{C}$  in Zitrat-Puffer ( $\text{pH}=6$ ) erhitzt und nach Abkühlung in Aqua dest. bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt.

Die Nierenstückchen für die Paraffinschnitte hingegen wurden für 12 Stunden in Formalin (J.T. Baker, Mallinckrodt Baker, B.V., Deventer, Holland) fixiert und anschließend im Einbettautomaten nach Auswaschung des Fixiermediums in kleine Paraffinblöcke gegossen. Mit dem Schlittenmikrotom Microm HM 310 (Microm International GmbH, Walldorf, Deutschland) wurden nach vorheriger Aushärtung der Blöcke auf einer Kühlplatte Schnitte mit einer Schichtdicke von  $2\ \mu\text{m}$  angefertigt, im ca.  $25^{\circ}\text{C}$  warmen Wasserbad aufgefangen und auf unbeschichtete Objektträger (Superfrost, Menzel Gläser, Braunschweig, Deutschland) aufgezogen. Jetzt wurden die Schnitte für 24 Stunden bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Wärmeofen getrocknet und fixiert. Unmittelbar vor der PAS-Färbung wurden die Schnitte mit Xylol 100% und absteigenden Ethanolreihen (2 x 100% Ethanol, 2 x 96% Ethanol, 1 x 80 % Ethanol, 1 x 50% Ethanol, 1 x Aqua dest.) entparaffinisiert.

### **2.6.2.2 Histologische Färbungen**

Bei der PAS-Färbung handelt es sich um einen histochemischen Nachweis von sauren Mucopolysacchariden, deren nichtsubstituierte Glykol-Gruppen mit wässriger Perjodsäure zu Aldehyden aufgespalten u. oxidiert werden, die sich dann mit fuchsin-schwefeliger Säure (entspricht der SCHIFF Reagenz) durch Bildung eines roten basischen Farbstoffs nachweisen lassen [34]. Dabei stellten sich dann das Bindegewebe blau, das Zytoplasma rosa, die Zellkerne blau-schwarz und die Mucopolysaccharide leuchtend magenta dar.

Die eigentliche Färbung begann nach dem oben beschriebenen Entparaffinisieren mit einem 10minütigen Bad der Schnitte in 1%iger Perjodsäure (1 g Perjodsäure auf 30 ml Aqua dest. und 70 ml 100% Ethanol). Dann wurde für 5 min mit Leitungswasser und kurz mit alkoholischer Disulfidlösung (0,5 g Kaliumdisulfid auf 30 ml Aqua dest. und 70 ml 100% Ethanol) gespült. Jetzt erfolgte für 20 min die Inkubation der Schnitte in 40°C warmer SCHIFF Reagenz (Merck, Darmstadt, Deutschland). Anschließend wurde erneut kurz in alkoholischer Disulfidlösung und für 10 min mit Leitungswasser gespült. Es folgte eine 10minütige Gegenfärbung mit Mayer's Hämatoxylin und das Bläuen in fließendem Leitungswasser ebenfalls für 10 min. Dann wurden die Schnitte nach aufsteigender Alkoholreihe und Xylolbad mit Corbitbalsam (37°C) eingedeckt.

### 2.6.3 Immunhistologie

Für die immunhistologische Färbungen von CD4- und CD8- (Lymphozyten) und ED1- (Makrophagen) positiven Zellen nutzten wir die Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase (APAAP) - Färbemethode, bei der ein zweiter Antikörper mit einem Polymer aus Alkalischer Phosphatase zu einem verstärkten intensiv rot leuchtenden Signal führt, während sich die Zellkerne mit Mayers Hämatoxylin blauschwarz darstellen.

Vor der Färbung wurden TBS-Puffer (Tris-Base) mit einem ph-Wert von 7,6 aus einem Teil 0,5 M Tris-Lösung), einem Teil 1,5 M NaCl-Lösung und acht Teilen Aqua dest. hergestellt und der monoklonale Primäantikörper Maus-Anti-Ratte ED1, CD4 bzw. CD8 (Serotec GmbH, Düsseldorf, Deutschland) im Verhältnis 1:50 mit einem Antikörperverdünnungsmedium (1 Teil inaktiviertes fetales Kälberserum, 1 Teil RPMI-Medium, 8 Teile Aqua dest.) verdünnt.

Nach dem oben beschriebenen Enparaffinisieren und Kochen in Zitratpuffer wurden die Gewebestückchen (drei je Objektträger, eine Negativkontrolle) mit einem Fettstift (DAKO Pen™, DAKO Cytomation, Hamburg, Deutschland) umrandet und in TBS-Puffer bis zur 30minütigen Inkubation mit inaktivem Kälberserum aufbewahrt. Diese hat die Aufgabe unspezifische Bindungsmöglichkeiten abzudecken. Es folgte eine 30minütige Inkubation mit dem verdünnten Maus-Anti-Ratte ED1, CD4 bzw. CD8 Primäantikörper. Danach wurden die Schnitte mit TBS-Puffer gespült und anschließend dem Sekundäantikörper Goat-anti-Rabbit EnVision™ Alkalische Phosphatase (DAKO Cytomation, Hamburg, Deutschland) ausgesetzt.

Nach wiederum 30 Minuten wurde mit TBS-Puffer gespült und die Schnitte mit Substrat-Chromogen Fast Red (Fast Red Kit, DAKO Cytomation, Hamburg, Deutschland) beträufelt, welches zuvor nach Herstellerangaben angesetzt wurde.



Unter lichtmikroskopischer Kontrolle beließen wir das Chromogen Fast Red auf dem Gewebe bis sich eine intensiv rote Färbung der Immunkomplexe zeigte. Jetzt wurde die Farbreaktion durch Spülen mit Aqua dest. gestoppt und es erfolgte eine Kernfärbung mit Mayer's Hämatoxylin für eine Dauer von 10 Minuten. Abschließend wurden die Schnitte für 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut und im wässrigen Eindeckmedium eingedeckt.

## **2.6.4 Enzym Linked Immuno Sorbent Assay – ELISA**

Mit der ELISA-Methode können Konzentrationen von Zytokinen und Proteinen im Mikro- bis Picogrammbereich gemessen werden. Das Prinzip der Methode beruht auf der Bindung eines spezifischen monoklonalen Primärantikörpers an das zu messende Antigen; der Primärantikörper wird von einem polyklonalen Sekundärantikörper gebunden. Der Sekundärantikörper ist an ein Enzym gekoppelt, das zu einem Farbumschlag beim zugegebenen Substrat führt. Dieser Farbumschlag wurde photometrisch mit dem Plattenphotometer MRX-5000 bestimmt. Mittels einer Standardkurve mit bekannten Antigenkonzentrationen und der Software BioLinx (Version 2.10, Dynatech, Denkendorf, Deutschland) konnte die Konzentration des zu messenden Proteins oder Zytokins errechnet werden.

### **2.6.4.1 TGF- $\beta$ 1-ELISA**

Das Zytokin TGF- $\beta$ 1 sollte im Kulturüberstand der glomerulären und kortikalen Kultur mittels ELISA bestimmt werden. Das Set der Firma R&D Systems (DuoSet<sup>®</sup> human TGF- $\beta$ 1, Abingdon, UK) enthielt den Captureantikörper, den Detectionantikörper, einen Standard, Streptavidinlösung und Tetramethylbenzidin (TMB) - Peroxidasesubstrat. Die gelieferten Materialien wurden nach Herstelleranleitung angesetzt und aufbewahrt. Zusätzlich wurden folgende Lösungen hergestellt:

- 1.) Blockpuffer – 5% Tween 20, 5% Sucrose in PBS
- 2.) Waschpuffer (PBST) - 0,05% Tween 20 in PBS, pH 7,4
- 3.) NaOH- 0,5 M HEPES – 75 ml Aqua dest., 12 ml 10 N NaOH, 11,9 g HEPES, mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen
- 4.) PBS
- 5.) Reagent Diluent – 1,4% bovines Serum, 0,05% Tween 20, pH 7,3
- 6.) Stopplösung – 0,18 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Als erstes wurde mit dem in PBS gelösten Captureantikörper (55,5 µl Antikörper/10 ml PBS) eine 96 well Mikrotiterplatte (Costar, EIA Plate) mit 100 µl/ Vertiefung (well) beschichtet und bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die wells mit dem Waschpuffer gewaschen (3 x 200 µl/well) und unspezifische Bindungen mit 250 µl Blockpuffer/well geblockt. In der Zwischenzeit wurde die Standardreihe mit Konzentrationen von 0 bis 2000 pg/ml vorbereitet, die Proben mit 1 N HCL aktiviert (50 µl HCL/250 µl Probe) und mit NaOH-HEPES (50 µl) wieder neutralisiert. Nach einer Stunde wurde die gecoatete Mikrotiterplatte gewaschen (3 x 200 µl/well), die Standards und die zu messenden Proben aufgetragen (100µl/well) und bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach den 2 Stunden wurde der Inhalt der Platte verworfen und die Platte mit PBST behandelt. Anschließend wurden 100 µl/well des in Reagent Diluent gelösten Detectionantikörpers (55,5 µl Antikörper/10 ml Reagent Diluent) pipettiert und ebenfalls für 2 Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach Wiederholung des bekannten Waschschriffs wurden 100 µl der Streptavidin-Arbeitslösung aufgetragen. Zwanzig Minuten wurde diese Lösung in den wells belassen, bevor nach einem weiteren Mal Waschen 100 µl TMB - Peroxidase Substrat je well pipettiert wurden. Die Farbreaktion wurde durch 50 µl Stopplösung beendet und die Extinktionen bei einer Wellenlänge von 450 nm mit dem Plattenphotometer MRX-5000 bestimmt.

#### 2.6.4.2 Fibronectin-ELISA

Für den Fibronectin-ELISA wurden folgende Lösungen verwendet:

- 1.) Coating-Puffer – 0,2 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,3g NaHCO<sub>3</sub>, 90 ml Aqua dest., ph 9,6, mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen
- 2.) Waschpuffer (PBST) - 0,05% Tween 20 in PBS, ph 7,4
- 3.) Blockpuffer – 1% bovines Serumalbumin in PBST
- 4.) Substratlösung – O-Phenylenediamine Dihydrochloride Tablet Set, Code No: P-9187, 20 ml Aqua dest., hergestellt erst unmittelbar vor Gebrauch
- 5.) Arbeitslösung des Primäantikörpers – 5 ml PBST + 15 µl FN-AK I (Konzentration 1 mg/ml), hergestellt erst unmittelbar vor Gebrauch
- 6.) Arbeitslösung des Sekundäantikörpers – 10 ml PBST 2,5 µl FN-AK II, hergestellt erst unmittelbar vor Gebrauch

Alle Inkubationsschritte wurden bei 37°C im Brutschrank durchgeführt. Die Proben wurden vor der Messung mit DMEM im Verhältnis 1:20 verdünnt. Ein Waschschrift besteht aus viermaligem Pipettieren von 200 µl PBST/well.

Fibronectin (fibronectin from rat plasma, SIGMA, F-0653) wurde mit einer Konzentration von 200 µg/ml in Coating-Puffer gelöst. Anschließend wurde eine absorbierende **erste** Mikrotiterplatte (F96 Maxisorb, Nunc, Wiesbaden) damit für 2 Stunden beschichtet. In dieser Zeit wurde eine **zweite** 96 well nicht absorbierende Mikrotiterplatte vorbereitet, in die die Standardreihe, die verdünnten Proben und der aufgelöste Primärantikörper (Rabbit/Anti-Human, Code no A:0245, DAKO A/S Denmark) pipettiert wurden. Der Überstand der **ersten** Platte wurde jetzt verworfen, die Reaktion mit Blockpuffer (150 µl/well) für 60 Minuten gestoppt und anschließend die wells gewaschen. Nun folgte der Transfer des Inhalts der **zweiten** Platte auf die **erste** Platte (95 µl/well). Nach einer Stunde Inkubation wurde der Überstand verworfen, die Platte wieder mit Waschpuffer behandelt und der aufgelöste Sekundärantikörper (Peroxidase-conjugated Affini Goat Anti Rabbit IgG, Dianova, BMA Biochemicals AG, Augst, Deutschland, Konzentration 0,3 µg/ml) aufgetragen. Eine Stunde später wurde nach einem weiteren Waschschrift 200 µl Substratlösung dazupipettiert und die Extinktion photometrisch nach 50 Minuten am MRX-5000 bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

### 2.6.4.3 PAI-1-ELISA

Das Zytokin PAI-1 wurde mit einer dem Fibronectin-ELISA sehr ähnlichen Methode gemessen. So entsprach die Zusammensetzung des Coating-Puffers, des Waschpuffers, des Blockpuffers und der Substratlösung der des Fibronectin-ELISA. Alle Inkubationsschritte wurden ebenfalls bei 37°C im Brutschrank durchgeführt. Das Waschen der wells erfolgt analog dem Fibronectin-ELISA. Die Proben wurden vor der Messung mit DMEM je nach erwarteter PAI-1-Konzentration im Verhältnis 1:2 bzw. 1:5 verdünnt. Eine absorbierende **erste** Mikrotiterplatte (F96 Maxisorb, Nunc, Wiesbaden Deutschland) wurde mit 100 µl PAI-1 (Rat-PAI-1, American Diagnostica Inc., Pflugstadt, Deutschland, Cat. #102) in einer Konzentration von 100 mg/ml Coatingpuffer für zwei Stunden beschichtet.

In dieser Zeit wurde eine **zweite** 96 well nicht absorbierende Mikrotiterplatte vorbereitet, in die die Standardreihe (100 µl/well), die verdünnten Proben (100 µl/well) und 100 µl des gelösten Primärantikörper (Rabbit/Anti-Rat PAI-1 IgG, American Diagnostica Inc, Pflugstadt, Deutschland, Cat. #1062, Konzentration 1 µg/ml) je well pipettiert wurden. Vorher wurden 80 µl Primärantikörper in 5 ml PBST gelöst.

Der Überstand der **ersten** Platte wurde jetzt verworfen, die Reaktion mit Blockpuffer (150 µl/well) für 60 min gestoppt und anschließend die wells gewaschen. Nun folgte analog zum Fibronectin-ELISA der Transfer des Inhalts der **zweiten** Platte auf die **erste** Platte (95 µl/well). Nach einer Stunde Inkubation wurde der Überstand verworfen, die Platte wieder mit Waschpuffer behandelt und der Sekundärantikörper (Peroxidase-conjugated Affini Goat Anti

Rabbit IgG, Dianova, BMA Biochemicals AG, Augst, Deutschland, Cat. #111035 Konzentration 0,3 µg/ml) aufgetragen. Eine Stunde später wurde nach einem weiteren Waschschrift 200 µl Substratlösung je well dazupipettiert und die Extinktion wie gehabt nach 50 Minuten photometrisch am MRX-5000 bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

## **2.6.5 Blutuntersuchungen**

### **2.6.5.1 Differentialblutbild**

Die Untersuchungen zum Differentialblutbild wurden mit dem vollautomatischen Flow Zytometer XE-2100 der Firma Sysmex (TOA Medical Electronics, Kobe, Japan) durchgeführt.

### **2.6.5.2 Fluorescence-activated cell sorter – FACS**

Die Durchflusszytometrie erlaubt die Beurteilung verschiedener Einzelzellsuspensionen nach ihrer Markierung mit spezifischen Farbstoffen unter Ausnutzung der Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften. Die in Lösung befindlichen, mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Antikörpern markierten Zellen werden über ein Schlauchsystem durch einen Messkopf gepresst, der eine Kapillare von 50-100 µm Durchmesser als Öffnung besitzt. Die Zellen werden in einem laminaren Flüssigkeitsstrom so geführt, dass jeweils nur eine die Öffnung passieren kann. Dadurch werden sie einzeln von einem Laserstrahl (Argon-Laser,  $\lambda=488$  nm) getroffen, wobei Fluoreszenz- oder Lumineszenzerscheinungen auftreten. Die Lichtstreuung in Vorwärtsrichtung (FSC = forward light scatter), in Seitwärtsrichtung (SSC = side scatter) und die Fluoreszenz der Zellen als Ausdruck ihrer Interaktion mit den spezifischen Antikörpern wird über ein System von Spiegeln und Filtern zu optischen Detektoren geleitet, in digitale Daten umgewandelt und mit einer Auswertesoftware analysiert.

Zur Analyse der Lymphozytensubpopulationen aus Rattenvollblut wurden Fluorochrom-conjugated FITC (Fluoresceinisothiocyanat) Anti-Ratte CD3 Antikörper, PE (Phycoerythrin) Anti-Ratte CD4 und CD8 verwendet. Für jedes Tier wurden drei Proben vorbereitet, wobei die erste nicht antikörpergelabelt war, die zweite mit einer Kombination der CD3 und CD4 Antikörper und die dritte Probe mit einer Kombination der CD3 und CD8 Antikörper. Je Probe wurden 10 µl der Antikörpersolution, 100 µl heparinisierten Vollblutes und 900 µl der Lysing-Solution in Falcon-Tubes (Cat. #2008) pipettiert und gevortext. Dieser Ansatz inkubierte für 20 Minuten in Dunkelheit bei Raumtemperatur. Danach wurden die Proben bei 1200 RPM zentrifugiert (Megafuge 2.0R, Heraeus, Hanau, Deutschland), der Überstand verworfen und das Pellet in 5

ml Waschsuspension resuspendiert. Nach zweimaligem Waschen wurde das Pellet in 200  $\mu$ l FACS-Solution gelöst und bis zur Analyse im FACSCalibur (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) bei 4 °C aufbewahrt.

Alle verwendeten Materialien, Reagenzien und Tubes wurden, soweit nicht anders beschrieben, von der Firma PharMingen, BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland) bezogen und entsprechend den Herstellerangaben vorbereitet und verwendet.

### **2.6.5.3 Serum-Kreatinin und Serum-Harnstoff**

Kreatinin und Harnstoff wurden mit Hilfe des Analysegerätes Hitachi 747-400 (Diamond Diagnostics Inc., Holliston, USA) bestimmt. Für die Kreatininbestimmung nutzt dieses Gerät die Methode nach Jaffé, bei der Kreatinin in alkalischer Lösung mit Pikrat einen gelb-orange gefärbten Komplex bildet, dessen Farbintensität photometrisch gemessen wird. Farbintensität und Kreatininkonzentration verhalten sich direkt proportional zueinander. Harnstoff wird mit einem kinetischen UV-Test gemessen. In einer ersten Reaktion werden dazu Harnstoff und Wasser mit Hilfe von Urease zu Ammonium und Kohlendioxid umgesetzt. In einem zweiten Schritt reagiert das entstandene Ammonium mit  $\alpha$ -Ketoglutarat und NADH (Nicotinamid-Adenin Dinucleotid-Hydrogen). Der Umsatz von NADH wird anschließend kinetisch gemessen.

## **2.7 Statistische Auswertung**

Die Versuchsergebnisse wurden als Gruppenmittelwert  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Die Auswertung und grafische Darstellung erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS<sup>®</sup> für Microsoft<sup>®</sup> Windows<sup>®</sup>. Nach ANOVA-Prozedur und anschließendem Mann-Whitney U Test wurde ein p-Wert von  $< 0,05$  als signifikant gewertet.