

## 2. Material und Methodik

### 2.1 Studienaufbau und -durchführung

Die Untersuchung der Wirkung von Acetylcystein auf das Gefäßsystem von Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz erfolgte in einer klinischen und molekularbiologischen Teilstudie.

Zunächst erfolgte die klinische, digitale photoplethysmographische Aufzeichnung der Pulscurven einer Probandengruppe bestehend aus 20 Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz in Abwesenheit und Anwesenheit von Acetylcystein über den Verlauf der Hämodialyse. Die Patienten erhielten während zwei aufeinander folgender vierstündiger Hämodialysebehandlungen eine 5%ige Glukoselösung als Kontrolle und eine intravenöse Acetylcysteinmedikation (5 g i.v. über 4 h). Die zeitliche Zuordnung erfolgte randomisiert in einem Cross-over-Design. Zusätzlich erfolgte die Bestimmung klinischer und laborchemischer Parameter. Patientendaten hinsichtlich Gesamtdauer der Dialysetherapie (in Monaten), Dauer der Einzeldialyse (in Stunden), Art der Nierenerkrankung, kardio-, peripher- und zerebrovaskulärer Begleiterkrankungen einschließlich koronarer Herzerkrankung (KHK), Insult, peripher arterieller Verschlusskrankheit (pAVK), arterieller Hypertonie, Diabetes mellitus oder Tumorleiden wurden standardisiert abgefragt.

Im zweiten Schritt wurden Monozyten von 8 Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz isoliert. Die Hälfte dieser Patienten erhielt über den Verlauf der Hämodialyse eine 5%ige Glukoselösung als Kontrolle, die andere Hälfte erhielt eine intravenöse Acetylcysteinmedikation (5 g i.v. über 4 h). Die isolierten Monozyten wurden fluoreszenzspektrophotometrisch auf die Veränderungen der intrazellulären Calciumhomöostase in Abwesenheit und Anwesenheit von Acetylcystein untersucht. Des Weiteren wurde mittels in-cell Western Assay die Veränderung der membranären TRPC-Protein-Expression in Abwesenheit und Anwesenheit von Acetylcystein über den Verlauf der Hämodialyse untersucht.

Um das Verfahren der digitalen Photoplethysmographie als Methode zur kontinuierlichen Aufzeichnung der Pulscurve zu etablieren, wurde eine gesunde Probandengruppe photoplethysmographisch unter dem Einfluss vasokonstringierender und vasodilatierender Effekte untersucht. Die Probanden dieser Vergleichsgruppe ( $n=10$ ) waren im Mittel  $60 \pm 4$  Jahre alt (Mittelwert  $\pm$  SEM). Es bestanden keine Nierengrunderkrankungen, kardiovaskuläre oder zerebrovaskulären Ereignisse in der Vorgeschichte. Der Body-mass-Index lag bei  $25.4 \pm 0.9$  kg/m<sup>2</sup>, systolischer und diastolischer Blutdruck bei  $123 \pm 3$  mmHg bzw.  $81 \pm 2$  mmHg.

## 2.2 Patientencharakterisierung

In den klinischen Studienteil wurden 20 Patienten, in den experimentellen Studienteil 8 Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz eingebunden, die dreimal wöchentlich über im Mittel vier Stunden hämodialysierten.

Für den Vorgang der Hämodialyse wurde eine biokompatible Polysulfonmembran (F8, Fresenius Medical Care) benutzt. Das Standarddialysat beinhaltete 1.75 mmol/l Calcium und enthielt Bikarbonat.  $Kt/V$ , d.h. der Quotienten aus dem Plasmaanteil, der während der Hämodialysebehandlung von Harnstoff gereinigt wird und dem Harnstoffverteilungsvolumen, wurde gemäß der Daugirdas-Formel  $Kt/V = -\ln(R - 0.008 \times t) + (4 - 3.5 \times R) \times UF/W$  ( $R$ = Harnstoff-Reduktionsrate;  $t$ = Dialysedauer (h);  $UF$ = Volumen des Ultrafiltrats (l);  $W$ = Dialyse-Abschlussgewicht (kg)) bestimmt (Daugirdas, 1993). Zu den Einschlusskriterien gehörten neben der Volljährigkeit (Alter >18 Jahre), beiderlei Geschlecht, Zustimmungsfähigkeit sowie die schriftliche und mündliche Zustimmung (informed consent). Ausschlusskriterien waren Unverträglichkeit gegenüber Acetylcystein und schwere Leberfunktionseinschränkungen. Die Untersuchung wurde durch die zuständige Ethikkommission der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin geprüft und genehmigt.

Die klinische sowie laborchemische Charakterisierung der Probanden ist in den **Tabellen 1 bis 3** dargestellt.

**Tabelle 1:** Klinische Charakterisierung des photoplethysmographisch untersuchten Patientenkollektives (Teilstudie 1;  $n=20$ ) sowie der Patienten, die in die molekularbiologische Teilstudie eingebunden worden sind (Teilstudie 2;  $n=8$ ).

Charakteristika	Mittelwerte $\pm$ SEM	
	Teilstudie 1	Teilstudie 2
Anzahl	20	8
Alter (Jahre)	69 $\pm$ 2	69 $\pm$ 3
Anteil an Frauen (%)	20	37.5
Dauer der Einzeldialyse (Stunden)	4 $\pm$ 1	4 $\pm$ 0
Hämodialysetherapie seit (Monate)	52 $\pm$ 13	22 $\pm$ 13
Körpergewicht (kg)	69 $\pm$ 3	73 $\pm$ 8
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	21.7 $\pm$ 1.7	24.1 $\pm$ 1.9
Raucher (Absolutwert) (%)	4 (20)	0 (0)
Bluthochdruck (Absolutwert) (%)	17 (85)	8 (100)
Diabetes mellitus (Absolutwert) (%)	9 (45)	3 (37.5)
KHK (Absolutwert) (%)	14 (70)	2 (25)
pAVK (Absolutwert) (%)	12 (60)	1 (12.5)
Insult (Absolutwert) (%)	2 (10)	1 (12.5)
Tumor (Absolutwert) (%)	1 (5)	3 (37.5)

**Tabelle 2.** Laborchemische Charakterisierung des photoplethysmographisch untersuchten Patientenkollektives ( $n=20$ ) vor und nach der Hämodialyse in Abwesenheit und Anwesenheit von intravenöser Acetylcysteinmedikation.

Charakteristika	in Abwesenheit von Acetylcystein		in Anwesenheit von Acetylcystein	
	vor Hämodialyse	nach Hämodialyse	vor Hämodialyse	nach Hämodialyse
Anzahl	20		20	
Ultrafiltration/Körpergewicht (100xl/kg)	3.9 ± 0.3		3.5 ± 0.2	
Kt/V	1.28 ± 0.08		1.08 ± 0.19	
Systolischer Blutdruck (mmHg)	137 ± 5	136 ± 6	138 ± 6	137 ± 6
Diastolischer Blutdruck (mmHg)	68 ± 3	68 ± 3	71 ± 4	67 ± 2
Pulse pressure (mmHg)	69 ± 4	68 ± 5	67 ± 4	69 ± 4
Hämatokrit (%)	29 ± 0	30 ± 0	31 ± 0	30 ± 0
Leukozyten (/nl)	6.9 ± 0.7	7.5 ± 0.8	6.7 ± 0.6	6.8 ± 0.7
Hämoglobin (g/dl)	9.6 ± 0.4	10.1 ± 0.4	10.2 ± 0.4	10.2 ± 0.4
Thrombozyten (/nl)	195 ± 22	193 ± 20	202 ± 26	210 ± 24
Serum-Kreatinin (µmol/l)	605 ± 46	255 ± 29	582 ± 41	253 ± 22
Serum-Harnstoff (mmol/l)	21 ± 2	6 ± 1	20 ± 2	12 ± 5
Gesamt-Eiweiß (g/l)	63 ± 1	67 ± 2	64 ± 1	67 ± 2
Serum-Natrium (mmol/l)	136 ± 1	137 ± 1	136 ± 1	140 ± 1
Serum-Kalium (mmol/l)	4.8 ± 0.1	3.9 ± 0.1	5.0 ± 0.1	4.0 ± 0.1
Serum-Calcium (mmol/l)	2.4 ± 0.0	2.7 ± 0.0	2.4 ± 0.0	2.7 ± 0.0
Serum-Phosphat (mmol/l)	1.5 ± 0.1	0.9 ± 0.1	1.5 ± 0.1	0.8 ± 0.1
Plasma-Homocystein (µmol/l)	20.2 ± 2.0	13.4 ± 1.7	21.7 ± 2.3	2.7 ± 0.3

**Tabelle 3:** Laborchemische Charakterisierung der Hämodialysepatienten ( $n=8$ ), aus deren Blut Monozyten zur molekularbiologischen Untersuchung isoliert wurden vor und nach der Hämodialyse in Abwesenheit und Anwesenheit von intravenöser Acetylcysteinmedikation.

Charakteristika	in Abwesenheit von Acetylcystein		in Anwesenheit von Acetylcystein	
	vor Hämodialyse	nach Hämodialyse	vor Hämodialyse	nach Hämodialyse
Anzahl	4		4	
Ultrafiltration/Körpergewicht (100xl/kg)	3.0 ± 1.0		2.8 ± 0.6	
Kt/V	1.12 ± 0.37		1.25 ± 0.25	
Systolischer Blutdruck (mmHg)	150 ± 25	153 ± 23	133 ± 12	133 ± 20
Diastolischer Blutdruck (mmHg)	81 ± 11	80 ± 11	70 ± 7	74 ± 9
Pulse pressure (mmHg)	69 ± 15	73 ± 13	67 ± 4	60 ± 12
Hämatokrit (%)	33 ± 3	33 ± 3	25 ± 3	30 ± 4
Leukozyten (/nl)	11.9 ± 3.3	15.3 ± 7.0	11.8 ± 2.3	11.7 ± 2.7
Hämoglobin (g/dl)	10.1 ± 0.8	10.6 ± 1.2	9.3 ± 0.8	9.9 ± 0.9
Thrombozyten (/nl)	297 ± 107	283 ± 83	249 ± 34	261 ± 29
Serum-Kreatinin (µmol/l)	659 ± 25	312 ± 78	516 ± 128	259 ± 112
Serum-Harnstoff (mmol/l)	45 ± 3	21 ± 6	35 ± 12	14 ± 6
Gesamt-Eiweiß (g/l)	59 ± 2	68 ± 10	56 ± 2	61 ± 13
Serum-Natrium (mmol/l)	131 ± 2	133 ± 3	136 ± 1	137 ± 1
Serum-Kalium (mmol/l)	5.9 ± 0.3	4.1 ± 0.2	4.5 ± 0.4	3.9 ± 0.3
Serum-Calcium (mmol/l)	2.6 ± 0.1	2.6 ± 0.1	2.6 ± 0.0	2.6 ± 0.0
Serum-Phosphat (mmol/l)	1.5 ± 0.3	1.0 ± 0.1	1.4 ± 0.3	1.0 ± 0.4
Plasma-Homocystein (µmol/l)	22.8 ± 6.0	14.5 ± 1.9	21.5 ± 0.4	3.2 ± 0.5

### 2.3 Geräte, Reagenzien, Antikörper und Lösungen

Folgende Geräte, Reagenzien, Antikörper und Lösungen wurden im Verlauf der Studie zu Hilfe genommen.

#### • Geräte

Pulsoximeter	Vitaguard VG3000; getemed, Teltow, Deutschland
Sensor	LNOP-Adt SpO <sub>2</sub> sensor; Masimo Corporation, USA
Fluoreszenzspektrophotometer	Fluoroskan Ascent FL; Labsystems, Helsinki, Finnland
In-cell Western Assay	Odyssey infrared imaging system; Licor GmbH, Bad Homburg, Deutschland

#### • Reagenzien

Histopaque <sup>®</sup> -1077	Sigma-Aldrich; Steinheim, Deutschland
Dynabeads <sup>®</sup> -M-450 CD14	Dynal Biotech ASA; Oslo, Norwegen
Fura-2 Pentaacetoxymethylester	Calbiochem; San Diego, CA, USA
Thapsigarginlösung	Calbiochem; San Diego, CA, USA
Formaldehydlösung	Hedinger; Stuttgart, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich; Steinheim, Deutschland
Licor blocking buffer	LI-COR GmbH; Bad Homburg, Deutschland
Chlortetracyclin	Sigma-Aldrich; Steinheim, Deutschland

#### • Antikörper

rabbit anti-human TRPC3-, TRPC5-, TRPC6-Antikörper	Alomone Labs; Jerusalem, Israel
goat anti-human Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase-Antikörper	Santa Cruz Biotechnology; CA, USA
IRDye800CW-infrared fluorescent dye-conjugated sheep anti-rabbit-IgG-Antikörper	biomol/Rockland; Hamburg, Deutschland
Alexa Fluor 680–allophycocyanin donkey anti-goat IgG-Antikörper	Molecular Probes; Eugene, USA

- Lösungen

## Hank's balanced salt solution (HBSS)

136,00 mM	NaCl <sub>2</sub>	7,94 g/l
5,40 mM	KCl	0,40 g/l
0,44 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,06 g/l
0,34 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,06 g/l
5,60 mM	D-Glucose	1,00 g/l
1,00 mM	CaCl <sub>2</sub>	0,147 g/l
1,00 mM	MgCl <sub>2</sub>	0,203 g/l
10,00 mM	HEPES	2,383 g/l

ad 1000 ml Aqua dest.

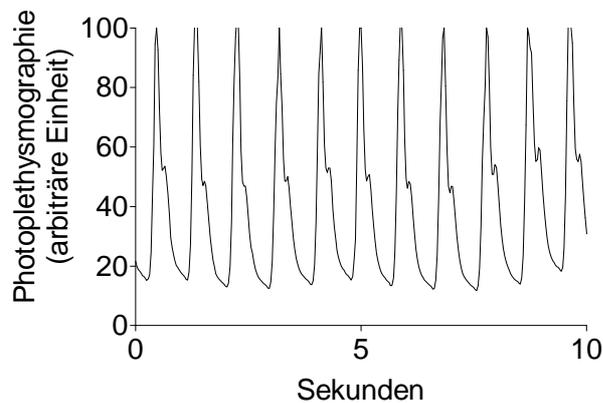
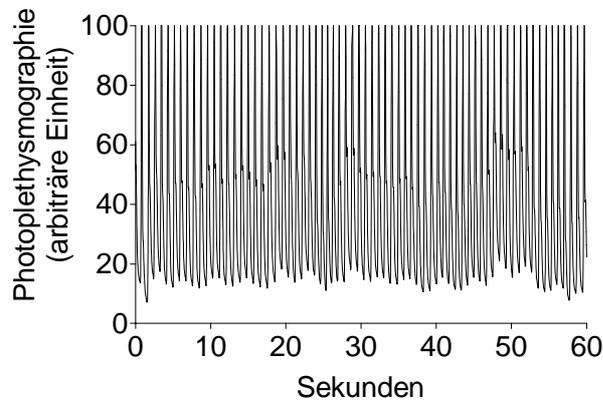
Die Einstellung erfolgte mit 1 M Natronlauge auf pH 7,4.

## 2.4 Digitale Photoplethysmographie

Das nicht-invasive Verfahren der digitalen photoplethysmographischen Pulscurvenmessung zur Aufzeichnung reaktiver Gefäßeigenschaften und Überprüfung der Endothelfunktion von Hämodialysepatienten beruht auf der physikalischen Grundlage, dass rotes bzw. infrarotes Licht stärker von Blut als vom umliegenden Gewebe absorbiert wird (Goldman et al., 2000). Mittels einer Leuchtdiode wird rotes und infrarotes Licht in den zu untersuchenden Abschnitt gesendet. Je nach Füllungszustand des jeweiligen Kapillarbettes am Ohrläppchen, Fingerbeere oder Zehe wird mehr oder weniger Licht absorbiert, reflektiert oder transmittiert. Gegenüber der Leuchtdiode befindet sich ein Photosensor, der das transmittierte Licht misst. Je stärker die Durchblutung des Untersuchungsgebietes, desto stärker ist die Absorption des infraroten Lichtes durch das Blut und desto weniger Licht wird transmittiert. Es besteht also ein direkter Zusammenhang zwischen dem sich mit dem Pulsschlag ändernden Blutvolumen und dem am Photosensor eingehenden Impuls, der verrechnet und als mathematische Kurve wiedergegeben wird – die Pulswellenkurve.

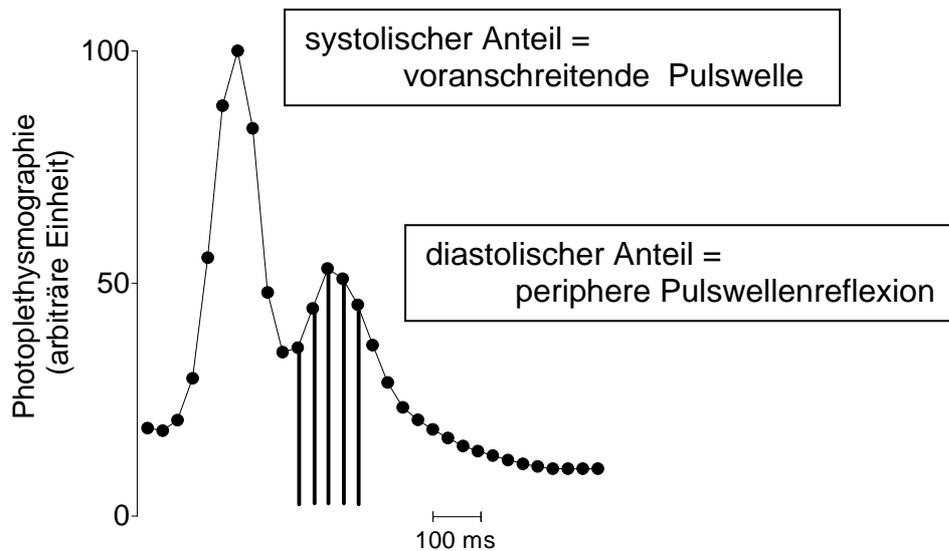
Das beschriebene Verfahren der digitalen Photoplethysmographie wurde bereits erfolgreich in anderen Studien an nierengesunden Probanden zur Gefäßuntersuchung verwendet und etabliert (Chowienzyk et al., 1999; Millasseau et al., 2000; Scholze et al., 2004; Takazawa et al., 1998).

**Abbildung 3** zeigt als Beispiel kontinuierlich digital photoplethysmographisch aufgezeichnete Pulscurven über ein Zeitintervall von 60 (**A**) bzw. 10 Sekunden (**B**).



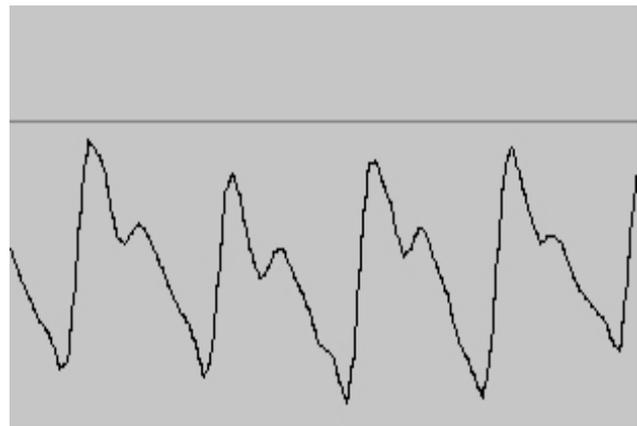
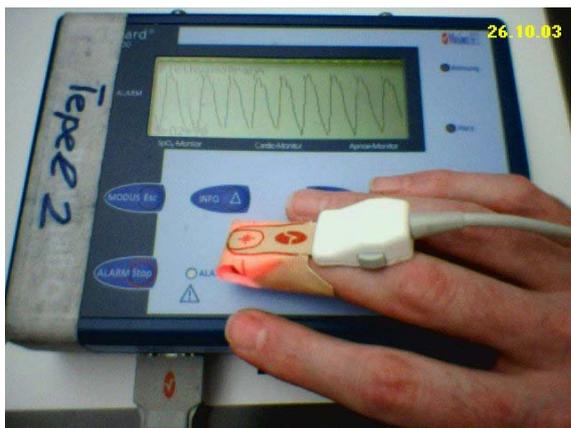
**Abbildung 3.** Darstellung repräsentativer Pulswellen, die mittels digitaler Photoplethysmographie über 60 Sekunden (**A**) bzw. 10 Sekunden (**B**) aufgezeichnet wurden.

**Abbildung 4** zeigt die genauere Darstellung einer einzelnen Pulskurve. Wie in der Literatur bereits beschrieben (Takazawa et al., 1998) besteht die digitale Volumenpulskurve aus zwei Anteilen. Der initiale, systolische Anteil der digitalen Volumenpulskurve wird durch die voranschreitende Pulskurve bestimmt. Der spätere, diastolische Anteil der digitalen Volumenpulskurve entsteht vor allem durch die Pulscurvenreflexion in der Peripherie. Diese erfolgt wahrscheinlich vorwiegend an kleinen Arterien insbesondere der unteren Körperabschnitte (Chowienczyk et al., 1999; Millasseau et al., 2003).



**Abbildung 4.** Schematische Darstellung einer repräsentativen, digital photoplethysmographisch ermittelten Pulskurve und Erklärung ihrer einzelnen Anteile. Der initiale, systolische Anteil beschreibt die voranschreitende Pulswelle. Der spätere diastolische Anteil beschreibt vor allem die Pulscurvenreflexion in der Peripherie. Der Mittelwert aus den markierten Punkten 93 ms bis 218 ms nach dem Wendepunkt des absteigenden Anteils der Pulskurve ergibt den Reflective Index.

In dieser Studie wurde zur digitalen Photoplethysmographie ein Pulsoximeter (Vitaguard VG3000; getemed, Teltow) und ein am Mittel- oder Zeigefinger befestigter Sensor (LNOP-Adt SpO<sub>2</sub> sensor; Masimo Corporation, CA, USA) verwendet. **Abbildung 5** zeigt die Mess-Apparatur in situ.



**Abbildung 5:** Apparatur (linke Abbildung) zur digitalen Photoplethysmographie zur Messung und Analyse digitaler Pulskurven (rechte Abbildung) während Hämodialysetherapie bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz.

Gleichzeitig mit dem Anschluss an den Dialysator wurden die Probanden mit dem Pulsoximeter verbunden, dessen Leuchtdiode am zweiten oder dritten Finger auf der gegenüberliegenden Seite des Shuntarmes befestigt wurde. Das Gerät zeichnet 32 Daten pro Sekunde auf und speichert diese in Episoden von 150 Sekunden. Einige Episoden nach Beginn der Messungen, d.h. nach Eintritt eines stabilen Dialyse- und Untersuchungszustandes des Patienten wurde die Durchblutung des Armes kontralateral zum Shuntarm für 5 Minuten unterbunden. Dazu wurde eine Blutdruckmanschette verwendet, die am proximalen Oberarm befestigt und über den arteriellen Druck der A. radialis aufgepumpt wurde. Dieser Vorgang wurde am Ende der Dialyse wiederholt. In Folge der Stauung entsteht eine lokale Ischämie distal des Staus. Nach Lösen der Stauung kommt es zur reaktiven Hyperämie, wodurch der Scherstress in den betroffenen Gefäßen ansteigt und flussabhängige Vasodilatation (flow-mediated vasodilation) hervorgerufen wird (Joannides et al., 1995; Pyke et al., 2005). Dieser Test der reaktiven Hyperämie wurde erstmals von Celermajer et al. (1992) zur nicht-invasiven Erzeugung endothelialer, flussabhängiger Vasodilatation durchgeführt. Das Ausmaß der flussabhängigen Vasodilatation spiegelt die Funktion der endothelialen Vasodilatation wieder und gilt als ein prognostischer Marker für die Güte der Endothelfunktion (Bonetti et al., 2003; Moens et al., 2005; Nakanishi et al., 2002). Für diese Gefäßreaktion wird vor allem NO (Stickstoffmonoxid identisch mit Endothelium derived relaxing factor) neben anderen Vasodilatoren wie Prostaglandin ( $\text{PGI}_2$ ), Endothelium-derived hyperpolarizing Faktor (EDHF), Endothelin (ET-1) oder Acetylcholin (ACh) als der wichtigste Mediator verantwortlich gemacht (Joannides et al., 1995, Pyke et al., 2005). Der Scherstress bewirkt am Endothel einen Anstieg der endothelialen NO-Produktion und -Sekretion (Corretti et al., 2002; Govers et al., 2001), welches durch Erhöhung des cGMP-Spiegels der Erhöhung der intrazellulären Calciumionenkonzentration in glatten Gefäßmuskelzellen entgegen wirkt. Der Calcium-abhängige Kontraktionsmechanismus wird verhindert. Es kommt zur NO-abhängigen Vasodilatation (Koeppen et al., 2004).

Bei Stauung proximal des Untersuchungsgebietes konnte mittels NO-Synthetase-Inhibitor gezeigt werden, dass die Vasodilatation als Folge der reaktiven Hyperämie nicht ausschließlich NO-vermittelt ist. Die entstehende lokale Ischämie distal der Stauung führt zur Freisetzung ischämischer, vasodilatierender Metabolite wie Kalium, Adenosin oder ATP und zur Änderung des pH-Wertes. Des Weiteren kann der Verlust des Muskeltonus bei proximaler Stauung für eine myogen induzierte, stärkere

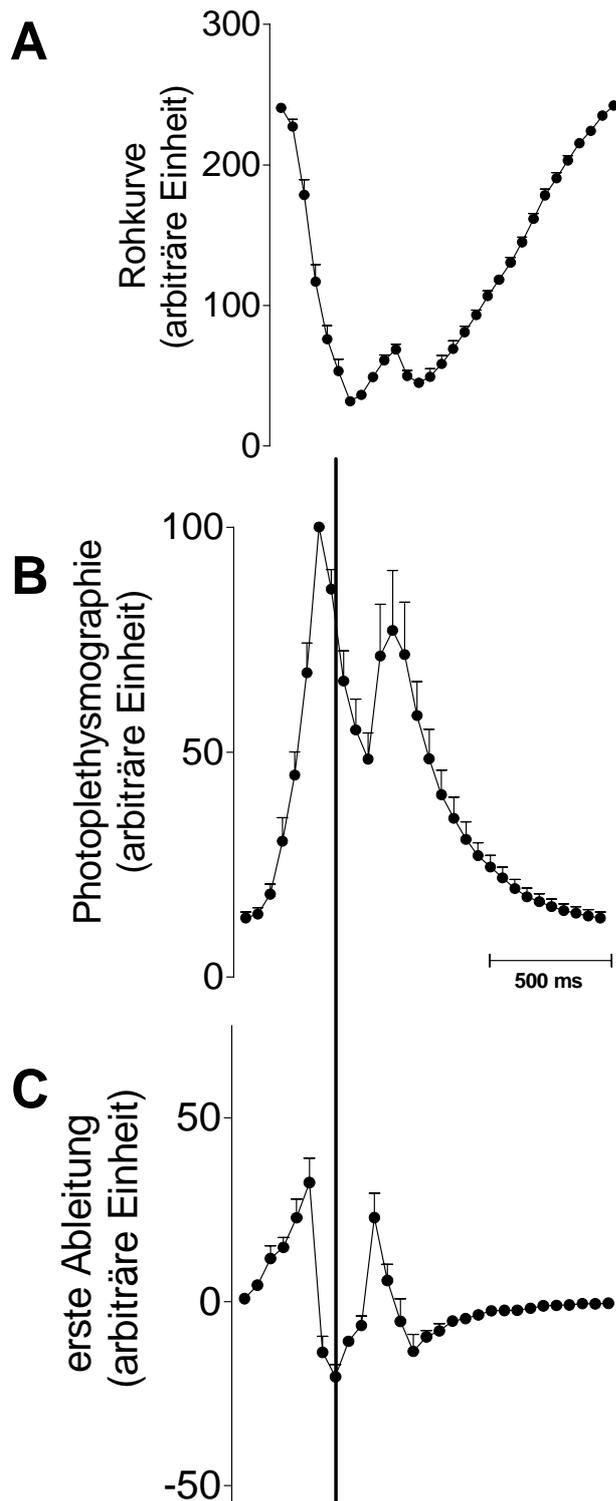
Vasodilatation verantwortlich gemacht werden (Doshi et al., 2001). Bei proximaler Stauung ist die abgebildete endotheliale flussabhängige Vasodilatation nicht ausschließlich auf die biologische Verfügbarkeit von NO zurückzuführen.

## 2.5 Bearbeitung der photoplethysmographischen Rohdaten

Nach Beendigung der digitalen photoplethysmographischen Datenaufzeichnungen wurden die Daten zur weiteren Bearbeitung mit einem speziellen Auswertungsprogramm auf einen PC transferiert und anschließend mit GraphPad Prism 3.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) statistisch analysiert. Um leicht auswertbare und vergleichbare Daten zu erhalten, wurde aus diesen Rohdaten der *Reflective Index* als ein Maß des Gefäßtonus entwickelt. Der Reflective Index leitet sich wie folgt aus den photoplethysmographisch erhobenen und aufgezeichneten Daten her. **Abbildung 6** beschreibt den Prozess schematisch.

Die unbearbeiteten Rohkurven (Rohkurve, **A**) stellen den Kehrwert der eigentlichen Pulskurve dar. Der Kehrwert der Rohdaten wurde gebildet und somit die eigentliche Pulskurve aus den aufgezeichneten Daten erhalten (Photoplethysmographie, **B**). Der Tiefpunkt der Rohdatenkurve entspricht also dem Hochpunkt der Umkehrung. Um den Wendepunkt des absteigenden Anteils dieser Pulskurve zu ermitteln, wurde im folgenden Schritt die erste Ableitung (erste Ableitung, **C**) der Kehrwertdaten gebildet. Der Tiefpunkt dieser ersten Ableitung entspricht dem Wendepunkt des absteigenden Anteils der Pulskurve. Dieser Wendepunkt ist zur Berechnung des Reflective Indexes ausschlaggebend.

Der Reflective Index wird aus den Mittelwerten der Datenpunkte 93 ms bis 218 ms nach dem Wendepunkt (dritter bis siebenter Punkte nach dem Wendepunkt) des absteigenden Anteils der Pulskurve ermittelt. In **Abbildung 4** sind diese Punkte durch Markierung hervorgehoben.



**Abbildung 6:** Schematische Darstellung der Rohdaten  $\pm$  SEM (Rohkurve, **A**) von zehn digital photoplethysmographisch ermittelten Pulskurven, deren Kehrwert (Photoplethysmographie, **B**) sowie die erste Ableitung (erste Ableitung, **C**) zur Ermittlung des Reflective Indexes. Die durchgehende Linie kennzeichnet den Wendepunkt des absteigenden Anteils der Pulskurve (Photoplethysmographie, **B**) sowie die korrespondierenden Tiefpunkte in der ersten Ableitung (erste Ableitung, **C**).

Der Reflective Index beschreibt den so genannten „Schulterbereich“ („notch“) des diastolischen Anteils der Pulscurve, der durch die Pulscurvenreflexion vor allem an den kleinen, peripheren Gefäßen entsteht. Anhand des derart ermittelten Reflective Indexes lässt sich die periphere Gefäßsituation des Probanden beurteilen (Burkert et al., im Druck).

## 2.6 Aufbereitung der Monozyten

Zur Darstellung der Veränderung der intrazellulären Calciumhomöostase sowie der TRPC-Proteinexpression über den Verlauf der Hämodialyse in Abwesenheit und Anwesenheit von Acetylcystein wurden den Hämodialysepatienten jeweils vor und nach der Hämodialyse 20 ml Vollblut aus dem arteriellen Teil des arteriovenösen Shuntes entnommen. Daraus wurden Monozyten isoliert (Tepel et al., 1995).

Zunächst wurde das Plasma bei 2300 U/min für 10 min abzentrifugiert und verworfen. Die verbliebenen Blutzellen wurden im Verhältnis 1:1 mit „Hank’s balanced salt solution“ (HBSS) (in mmol/l NaCl 136, KCl 5,4, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,44, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,34, D-Glukose 5,6, MgCl<sub>2</sub> 1,0, Hepes 10,0, pH 7,4) versetzt. Das Substrat wurde zur Dichte-Gradienten-Zentrifugation vorsichtig über Histopaque<sup>®</sup>-1077 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) aufgetragen. Das Zentrifugationsmedium Histopaque<sup>®</sup> weist eine Dichte von  $\rho=1,077$  g/ml auf. Es enthält Polysucrose und Natriumdiatrizoat.

Es erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 2300 U/min für 15 min. Entsprechend ihrer spezifischen Dichte bilden die mononukleären Zellen nach diesem Arbeitsschritt einen milchigen Leukozytenring oberhalb des Zentrifugationsmediums. Die Schicht unterhalb des Mediums enthält Erythrozyten, die durch Histopaque<sup>®</sup> aggregieren und sedimentieren. Die Schicht unmittelbar über den Erythrozyten bilden vorwiegend Granulozyten. Über den mononukleären Zellen befindet sich Plasma. Lediglich der Ring aus mononukleären Zellen wurde entnommen und wiederum im Verhältnis 1:1 mit HBSS versetzt und bei 2900 U/min für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die verbliebenen Zellen mit 1 ml HBSS resuspendiert. Im folgenden Schritt erfolgte die Separation der Monozyten aus dem mononukleären Zellverband bestehend aus Natürlichen Killerzellen, T- und B-Lymphozyten durch Dynabeads<sup>®</sup>-M-450 CD14 (Dynal Biotech ASA, Oslo, Norwegen). Dynabeads sind uniforme, superparamagnetische, monodisperse, polymere Polystyren-Beads mit einem Durchmesser von 4.5  $\mu$ m. Sie sind mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper

gegen CD14-Membranantigen beschichtet, welches hauptsächlich von humanen Monozyten und Makrophagen exprimiert wird. Es erfolgte die Inkubation mit 25  $\mu$ l Dynabeads pro 1 ml Zellsuspension für 60 min bei 4°C. Die Bead-umhüllten monozytären Zellen wurden durch Magneten (Dynal MPC) von den übrigen Zellen getrennt. Natürliche Killerzellen, T- und B-Lymphozyten wurden verworfen. Die Bead-umhüllten monozytären Zellen standen zur Weiterverarbeitung zur Verfügung.

## 2.7 Fluoreszenzspektrophotometrie

Die Untersuchung der intrazellulären Calciumhomöostase am Beispiel isolierter Monozyten erfolgte durch Fluoreszenzspektrophotometrie. Es wurde ein Fluoreszenzspektrophotometer Fluoroskan Ascent FL von Labystems, Helsinki, Finnland verwendet.

Bei dem angewandten Verfahren handelt es sich um ein optisches Messverfahren zur Konzentrationsbestimmung fluoreszierender Substanzen anhand ihrer Absorption bzw. Extinktion monochromatischen Lichtes. Farbstoffmoleküle, die durch eine Lichtquelle wie z.B. eine Xenon-Lampe angeregt werden, absorbieren Strahlung einer bestimmten Wellenlänge. Das Xenon-Licht wird durch einen Exzitationsfilter auf eine spezifische Wellenlänge reduziert. Wird die spezifische Wellenlänge von den Farbstoffmolekülen absorbiert, überführt es diese in einen energiereicheren Zustand (Exzitationsstrahlung). Bei der Rückkehr der Moleküle aus dem angeregten Zustand in den Grundzustand wird die entsprechende Differenzenergie in Form von Photonen freigesetzt, was als Fluoreszenz bezeichnet wird (Haeckel et al., 1989). Erfolgt diese Rückkehr vom angeregten Zustand in den Grundzustand über mittlere Energiezustände, entsteht ein vollständiges Fluoreszenzspektrum (Holleman et al., 1985). Ein Teil der Strahlungsenergie, die von den Molekülen absorbiert wird, geht als Bewegungsenergie verloren. Dies erklärt, dass die Fluoreszenz, die von dem Molekül emittiert wird, eine längere Wellenlänge als die Exzitationsstrahlung hat. Die Intensität der von dem Fluoreszenzspektrophotometer in dem Emissionsspektrum gemessenen Fluoreszenz erlaubt einen Rückschluss auf die Anzahl der in der Probe befindlichen Moleküle und somit eine Bestimmung der Konzentration.

In der vorliegenden Arbeit sollte die intrazelluläre, zytosolische Calciumionenkonzentration am Beispiel isolierter Monozyten vor und nach Hämodialysebehandlung in Ab- und Anwesenheit von Acetylcystein fluoreszenzspektrophotometrisch bestimmt werden. Die fluoreszierende Eigenschaft des Calcium-sensitiven Farbstoffes Fura-2 Pentaacetoxymethylester (Calbiochem, San Diego, CA, USA) wurde sich zunutze gemacht. Dieser Fluoreszenzfarbstoff wurde in Form von lipophilem Acetoxymethylester (AM), der zellmembranpermeabel und insensitive für Ionen ist, appliziert. Im Zytosol der Monozyten wird der Ester durch intrazelluläre Esterasen gespalten, wodurch die freie Säure des Fluoreszenzfarbstoffes gebildet wird, die ionensensitiv und nicht mehr zellmembranpermeabel ist (Moore et al., 1990).

1 ml der isolierten Monozyten wurde nach Resuspension in physiologischer Elektrolytlösung mit 2 µl Farbstoff Fura-2-AM für 1 Stunde bei 4°C inkubiert und anschließend bei einer Exzitationsstrahlung von 340 bzw. 485 nm mit einer Emission von 510 nm fluoreszenzspektrophotometrisch gemessen. Zur Quantifizierung der intrazellulären Calciumionenkonzentration Fura-2-AM beladener Monozyten wurde die Fluoreszenz-Ratio-Methode angewandt (Rodland et al., 1997; Scholze et al., 2005). Hierbei wird der Quotient aus der gemessenen Fluoreszenz bei 340 nm und 485 nm gebildet. Bei einer Exzitationswellenlänge von 340 nm wird die calciumgebundene Form des Farbstoffes angeregt. Mit steigender Calciumionenkonzentration kommt es zu einem Anstieg der Fluoreszenz bei 340 nm. Bei 485 nm dagegen ist die Fluoreszenz, die vom Farbstoff ausgeht, Calcium-unabhängig. Eventuelle Fehlerquellen, wie z.B. Unterschiede in der Farbstoffkonzentration oder Farbstoffverteilung innerhalb der Zellen, unterschiedliche Zelldurchmesser, Ausbleichen oder Ausströmen des Farbstoffs werden mit Hilfe dieser Ratio-Messung eliminiert.

Jede Fura-2-AM beladene Monozytenprobe vor und nach der Hämodialyse in Abwesenheit und Anwesenheit von Acetylcystein wurde in drei 100 µl umfassende Wells aufgeteilt und 180 s fluoreszenzspektrophotometrisch gemessen. Nach 180 s wurden 3 µl Thapsigargin (30 µmol/l; Calbiochem, San Diego, CA, USA) bzw. 3 µl einer Calciumlösung (30 mmol/l) dazugegeben und für weitere 360 s fluoreszenzspektrophotometrisch gemessen.

Thapsigargin, ein Sesquiterpen-Lakton aus der Pflanze *Thapsia garganica*, ist ein Tumorpromotor, der intrazelluläres Speichercalcium ohne Inositolphosphat-Bildung oder Stimulation der Proteinkinase C freisetzen kann und den Einstrom extrazellulärer Calciumionen triggert (Takemura et al., 1989). Es inhibiert spezifisch alle Isoformen der Thapsigargin-sensitiven SERCA (sarkoendoplasmatische Reticulum Calcium-ATPase) vom P-Typ irreversibel und führt zu einer erhöhten intrazellulären Calciumionenkonzentration in Folge der SERCA-Inhibition durch Verminderung der Calciumionenaufnahme in intrazelluläre Speicher. Diskutiert wird ebenfalls ein Thapsigargin-induzierter Calciumioneneinstrom über die Plasmamembran, getriggert durch so genannte Speicher-gesteuerte Calciumkanäle (SOCC) (Rodland et al., 1997; Sagara et al., 1992; Thastrup et al., 1990; Zhong et al., 1998).

In einem weiteren Untersuchungsschritt wurde zur fluoreszenzspektrophotometrischen Darstellung des Calciumgehaltes in den intrazellulären Speichern der isolierten Monozyten Chlortetracyclin in einer Endkonzentration von 0.1 mmol/l zu den Proben dazugegeben. Chlortetracyclin komplexiert wie alle Substanzen der Antibiotikumgruppe der Tetracycline zweiwertige Ionen wie Calcium und lagert sich in intrazellulären Calciumspeichern ab (Marcotte et al., 1990). Tetracycline zeigen unter UV-Lichtanregung eine schwache, gelbe Fluoreszenz mit einem Absorptionsmaximum bei 370 nm und einem korrespondierenden Emissionsmaximum bei 515 nm. Diese Fluoreszenz verstärkt sich durch die Komplexbildung von Calciumionen, wobei sich das Emissionsmaximum um 10 nm in den längerwelligen Bereich auf 525 nm verschiebt (Jacob, 1991). Erst durch diese Verstärkung der Fluoreszenz ist sie für diagnostisch spektroskopische Nachweise verwendbar. Die Messungen in der vorliegenden Arbeit wurden mit einer Exzitationswellenlänge von 380 nm bei einer Emission von 510 nm durchgeführt.

## 2.8 In-cell Western Assay

Zur Darstellung der Veränderung der Expression von TRPC-Proteinen am Beispiel isolierter Monozyten über den Verlauf der Hämodialyse in Abwesenheit und Anwesenheit von Acetylcystein wurde eine spezielle Art der Immunoblot-Technik angewandt, der In-cell Western Assay (Odyssey infrared imaging system, Licor GmbH, Bad Homburg, Deutschland). Immunoblot ist eine Methode zum Nachweis bestimmter

Proteine durch Antigen-Antikörper-Reaktionen. Der in-cell Western Assay ist ein immunzytochemisches Verfahren ohne elektrophoretische Auftrennung der Proteinmoleküle. Die isolierten Monozyten wurden mit 1500 ml 3.5%-Formaldehydlösung (Hedinger, Stuttgart, Deutschland) auf 96well-Platten fixiert. Im Anschluss erfolgte die Permeabilisierung der Zellen mit 0.1%-Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Licor blocking buffer (LI-COR GmbH, Bad Homburg, Deutschland) wurde über Nacht dazugegeben. Es folgte eine zweistündige Inkubation mit den primären Antikörpern. Als primäre Antikörper wurden rabbit anti-human TRPC3-, TRPC5-, TRPC6-Antikörper (1:1000; Alomone Labs, Jerusalem, Israel) und goat anti-human Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase(GAPDH)-Antikörper (1:1000; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) als Kontrolle verwendet. Weiterhin wurden zwei sekundäre Antikörper mit verschiedenen infrared-Fluorophoren eingesetzt. Dabei war der eine sekundäre Antikörper Alexa Fluor 680–allophycocyanin donkey anti-goat IgG-Antikörper (1:1000; Molecular Probes, Eugene, USA) und der andere sekundäre Antikörper IRDye800CW-infrared fluorescent dye-conjugated sheep anti-rabbit-IgG-Antikörper (1:1000; biomol/Rockland, Hamburg, Deutschland). Die Emission von Alexa Fluor 680–allophycocyanin wurde bei 700nm bei einer Exzitationswellenlänge von 680nm, die Emission von IRDye800CW wurde bei 800nm bei einer Exzitationswellenlänge von 780nm gemessen (Chen et al., 2005; Pahnke et al., 2004). Die Auswertung der jeweiligen TRPC-Fluoreszenz erfolgte im Verhältnis zur GAPDH-Fluoreszenz.

## 2.9 Statistik

Der Hauptteil der vorliegenden Analyse beinhaltet den zur Beschreibung der Gefäßsituation von Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz aus photoplethysmographisch erhobenen Daten ermittelten Reflective Index. Um dessen Reliabilität als ein Maß für die Zuverlässigkeit und Wiederholbarkeit eines Testes zu prüfen, wurde die Retest-Reliabilität für die Übereinstimmung der Werte des photoplethysmographisch ermittelten Reflective Indexes zu verschiedenen Messzeitpunkten nach der Methode von Bland-Altman berechnet. Diese Methode ermöglicht die Überprüfung der Abweichung der zu verschiedenen Messzeitpunkten erhaltenen Daten. Es kann von einer guten Übereinstimmung ausgegangen werden, wenn der gemeinsame Mittelwert beider Messungen zwischen der Differenz der

$\pm 1,96$ fachen Standardabweichungen liegt. Diesen Bereich bezeichnet man auch als 95%-iges Konfidenzintervall.

Der Zusammenhang zweier klinischer oder laborchemischer Variablen wurde korrelationsanalytisch geprüft. Die Korrelation quantifiziert die Stärke des untersuchten Zusammenhanges. In der folgenden Studie wurde neben dem parametrischen Korrelationskoeffizient  $r$  nach Pearson aufgrund der grenzwertigen Stichprobengröße von  $n=20$  auch der nonparametrische Korrelationskoeffizient  $r_s$  nach Spearman bestimmt. Aufgrund fast identischer Ergebnisse soll dennoch im Folgenden nur vom Korrelationskoeffizient  $r_s$  nach Spearman berichtet werden, der auf den Rangplätzen der Daten basiert und verwendet wird, wenn die Normalverteilungsannahme nicht gewährleistet ist. Je näher der Betrag von  $r_s$  bei 1 liegt, desto stärker ist der Zusammenhang der untersuchten Variablen. Bei positiven Werten für  $r_s$  spricht man von gleichsinnigem, bei negativen Werten für  $r_s$  von gegensinnigem Zusammenhang der Variablen. Es wurde zweiseitig getestet.

Um die Art des untersuchten Zusammenhanges anschaulicher darstellen zu können, erfolgte die Herleitung einer Regressionsgeraden mittels Regressionsanalyse. Hierbei wurde die der y-Achse zugeordnete Variable als die vom x-Merkmal abhängige Variable betrachtet. Für den bekannten Wert eines x-Merkmales kann so ein entsprechender Wert für das y-Merkmal vorausgesagt werden.

Um signifikante Unterschiede zwischen den erhobenen klinischen und laborchemischen Daten zu Beginn und am Ende der Hämodialyse sowie zwischen der Stichprobe unter Kontrollbedingungen und der Stichprobe unter Acetylcysteinmedikation aufzuzeigen, wurde neben dem parametrischen, gepaarten Student t-Test aufgrund der grenzwertigen Stichprobengröße von  $n=20$  auch der nonparametrische, gepaarte Rangsummentest nach Wilcoxon durchgeführt. In jedem Fall wurde zweiseitig getestet. Da sich für die beiden Tests nur geringe Unterschiede ergaben, soll im Folgenden immer der Wilcoxon-Test aufgeführt werden.

Alle kontinuierlich erhobenen Daten wurden als Mittelwerte  $\pm$  SEM (Standardfehler des Mittelwertes) dargestellt. Die Auswertung und graphische Darstellung der Daten erfolgte mittels des statistischen Computerprogramms GraphPad prism 3.0 (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA).