

3. Ergebnisse

3.1 Effektivität der Hämodialyse

Das Patientenkollektiv ($n=20$), das in den klinischen Studienteil zur digitalen photoplethysmographischen Pulskurvenmessung einbezogen wurde, war im Mittel 69 ± 2 Jahre alt und dialysierte seit 52 ± 13 Monaten. Eine genauere klinische und biochemische Charakterisierung zeigen **Tabellen 1** und **2**. Bei einer Dialysezeit von 4 ± 1 Stunden war die Ultrafiltration/kg Körpergewicht unter Kontrollbedingungen 3.9 ± 0.3 100xl/kg. Kreatinin (von 605 ± 46 $\mu\text{mol/l}$ auf 255 ± 29 $\mu\text{mol/l}$), Harnstoff (von 21 ± 2 mmol/l auf 6 ± 1 mmol/l), Kalium (von 4.8 ± 0.1 mmol/l auf 3.9 ± 0.1 mmol/l), Phosphat (von 1.5 ± 0.1 mmol/l auf 0.9 ± 0.1 mmol/l) und Homocystein (von 22.2 ± 2.0 $\mu\text{mol/l}$ auf 13.4 ± 1.7 $\mu\text{mol/l}$) zeigten eine signifikante Reduktion ($p < 0.001$) über den Verlauf der Hämodialyse unter Kontrollbedingungen. Für Gesamteiweiß (von 63 ± 1 g/l auf 67 ± 2 g/l), Natrium (von 136 ± 1 mmol/l auf 137 ± 1 mmol/l) und Calcium (von 2.4 ± 0.0 mmol/l auf 2.7 ± 0.0 mmol/l) ergab sich dagegen ein signifikanter Anstieg ($p < 0.001$) über den Verlauf der Hämodialyse unter Kontrollbedingungen.

In Anwesenheit von intravenöser Acetylcysteinmedikation über den Verlauf der Hämodialyse war die Ultrafiltration/kg Körpergewicht 3.5 ± 0.2 100xl/kg. Kreatinin (von 582 ± 41 $\mu\text{mol/l}$ auf 253 ± 22 $\mu\text{mol/l}$), Harnstoff (von 20 ± 2 mmol/l auf 12 ± 5 mmol/l), Kalium (von 5.0 ± 0.1 mmol/l auf 4.0 ± 0.1 mmol/l), Phosphat (von 1.5 ± 0.1 mmol/l auf 0.8 ± 0.1 mmol/l) und Homocystein (von 21.7 ± 2.3 $\mu\text{mol/l}$ auf 2.7 ± 0.3 $\mu\text{mol/l}$) zeigten eine signifikante Reduktion ($p < 0.001$) über den Verlauf der Hämodialyse. Für Gesamteiweiß (von 64 ± 1 g/l auf 67 ± 2 g/l), Natrium (von 136 ± 1 mmol/l auf 140 ± 1 mmol/l) und Calcium (von 2.4 ± 0.0 mmol/l auf 2.7 ± 0.0 mmol/l) ergab sich dagegen ein signifikanter Anstieg ($p < 0.001$) über den Verlauf der Hämodialyse.

Die signifikante Reduktion von Kreatinin, Harnstoff und Kalium ist in **Abbildung 7** für die Kontrollgruppe und in **Abbildung 8** für die Gruppe mit Acetylcysteinmedikation als Beispiel für den Erfolg und die Effizienz der Hämodialyse, während der die digitale photoplethysmographische Pulskurvenmessung durchgeführt wurde, dargestellt. Alle drei Parameter gelten als Marker für die Güte einer Hämodialysetherapie.

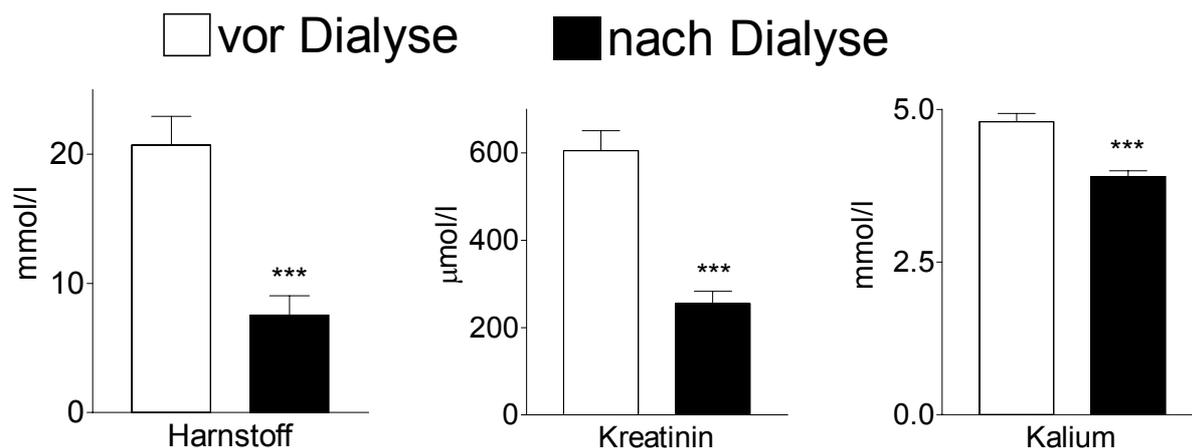


Abbildung 7: Reduktion der Laborparameter Harnstoff (mmol/l), Kreatinin ($\mu\text{mol/l}$) und Kalium (mmol/l) während des Verlaufes einer Hämodialyse bei 20 Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz unter Kontrollbedingungen. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt (***) $p < 0,001$.

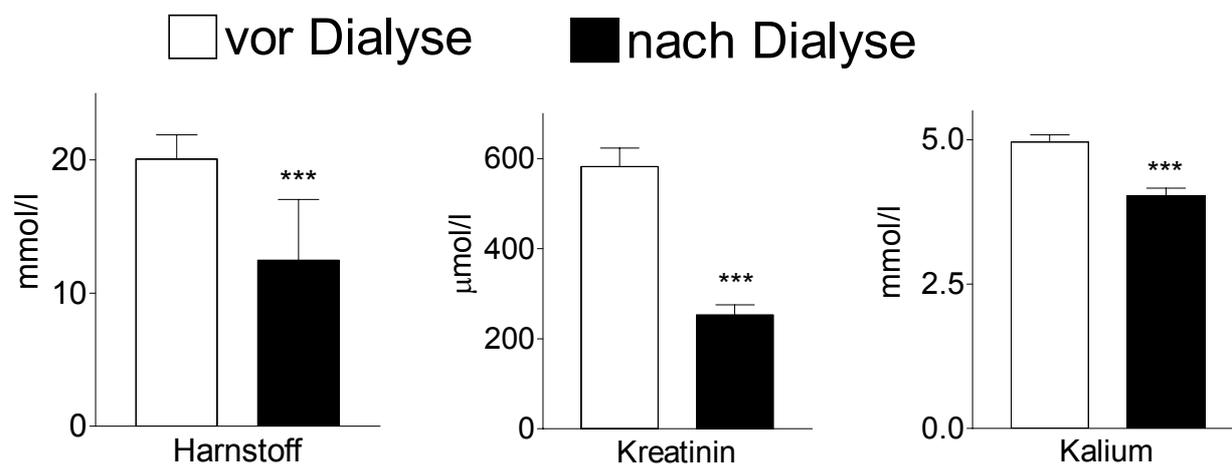


Abbildung 8: Reduktion der Laborparameter Harnstoff (mmol/l), Kreatinin ($\mu\text{mol/l}$) und Kalium (mmol/l) während des Verlaufes einer Hämodialyse bei 20 Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz in Anwesenheit von Acetylcystein. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt (***) $p < 0,001$.

Das Patientenkollektiv ($n=8$), das in den experimentellen Studienteil zur Untersuchung der intrazellulären Calciumhomöostase einbezogen wurde, war im Mittel 69 ± 3 Jahre alt und dialysierte seit 22 ± 13 Monaten. Eine genauere klinische und biochemische Charakterisierung zeigen **Tabellen 1** und **3**. Bei einer Dialysezeit von 4 ± 0 Stunden war die Ultrafiltration/kg Körpergewicht unter Kontrollbedingungen 3.0 ± 1.0 100xl/kg. Kreatinin (von 659 ± 25 $\mu\text{mol/l}$ auf 312 ± 78 $\mu\text{mol/l}$), Harnstoff (von 45 ± 3 mmol/l auf 21 ± 6 mmol/l), Kalium (von 5.9 ± 0.3 mmol/l auf 4.1 ± 0.2 mmol/l), Phosphat (von 1.5 ± 0.3 mmol/l auf 1.0 ± 0.1 mmol/l) und Homocystein (von 22.8 ± 6.0 $\mu\text{mol/l}$ auf 14.5 ± 1.9 $\mu\text{mol/l}$) zeigten eine signifikante Reduktion ($p < 0.001$) über den Verlauf der

Hämodialyse unter Kontrollbedingungen. Für Gesamteiweiß (von 59 ± 2 g/l auf 68 ± 10 g/l), Natrium (von 131 ± 2 auf 133 ± 3) und Calcium (von 2.6 ± 0.1 auf 2.6 ± 0.1) ergab sich dagegen ein signifikanter Anstieg ($p < 0.001$) über den Verlauf der Hämodialyse unter Kontrollbedingungen.

In Anwesenheit von intravenöser Acetylcysteinmedikation über den Verlauf der Hämodialyse war die Ultrafiltration/kg Körpergewicht 2.8 ± 0.6 100xl/kg. Kreatinin (von 516 ± 128 $\mu\text{mol/l}$ auf 259 ± 112 $\mu\text{mol/l}$), Harnstoff (von 35 ± 12 mmol/l auf 14 ± 6 mmol/l), Kalium (von 4.5 ± 0.4 mmol/l auf 3.9 ± 0.3 mmol/l), Phosphat (von 1.4 ± 0.3 mmol/l auf 1.0 ± 0.4 mmol/l) und Homocystein (von 21.5 ± 0.4 $\mu\text{mol/l}$ auf 3.2 ± 0.5 $\mu\text{mol/l}$) zeigten eine signifikante Reduktion ($p < 0.001$) über den Verlauf der Hämodialyse. Für Gesamteiweiß (von 56 ± 2 g/l auf 61 ± 13 g/l), Natrium (von 136 ± 1 mmol/l auf 137 ± 1 mmol/l) und Calcium (von 2.6 ± 0.0 mmol/l auf 2.6 ± 0.0 mmol/l) ergab sich dagegen ein signifikanter Anstieg ($p < 0.001$) über den Verlauf der Hämodialyse.

3.2 Photoplethysmographische Pulskurvenaufzeichnung

3.2.1 Pulskurvenaufzeichnung bei gesunden Probanden

Um das Verfahren der digitalen Photoplethysmographie als Methode zur Aufzeichnung der Pulskurve zur kontinuierlichen Überwachung der reflektiven Gefäßseigenschaften zu etablieren, wurden zunächst Pulskurven bei einer gesunden Probandengruppe ($n=10$, Alter 60 ± 4 Jahre, BMI 25.4 ± 0.9 kg/m², systolischer Blutdruck 123 ± 3 mmHg) aufgezeichnet. Der Reflective Index wurde als ein Maß für den Gefäßtonus aus den erhobenen Daten bestimmt. **Abbildung 9** zeigt die Reflective Indizes für alle Pulswellen ($n=328$), die über einen Zeitraum von 5 Minuten kontinuierlich photoplethysmographisch aufgezeichnet wurden. Der Mittelwert der während dieses Zeitraumes aufgezeichneten Reflective Indizes betrug dabei 46.2 ± 0.3 (arbiträre Einheit). Der Median lag bei 46.6, das 25. Perzentil bei 42.2 und das 75. Perzentil bei 50.6.

In den folgenden Analysen wurde der Reflective Index immer als Mittelwert aus allen Pulswellen, die innerhalb einer Episode von 150 Sekunden aufgezeichnet wurden, angegeben.

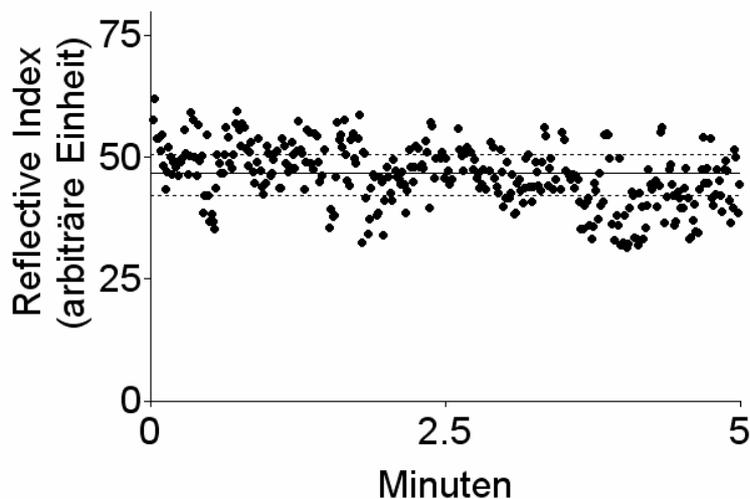


Abbildung 9. Darstellung der Reflective Indizes (arbiträre Einheit) der Pulskurven ($n=328$), die über einen Zeitraum von 5 Minuten kontinuierlich, digital photoplethysmographisch bei einem gesunden Probanden aufgezeichnet worden sind. Median (durchgezogene Linie), 25. sowie 75. Perzentil (gepunktete Linien) sind angegeben.

Im Folgenden wurden verschiedene Untersuchungen anhand der gesunden Probandengruppe durchgeführt, um die Eigenschaften des Reflective Indexes besser bewerten zu können. Der Einfluss einer erhöhten bzw. verminderten peripheren Pulscurvenreflexion auf den Reflective Index wurde untersucht. Um eine erhöhte Pulscurvenreflexion zu erzielen, wurde einerseits systemische Gefäßkontraktion mittels so genannten Cold-pressure-Tests provoziert. Hierbei wird die Hand kontralateral zur Messapparatur in Eiswasser gebadet. Durch Anlage einer über den systolischen Blutdruck aufgepumpten Blutdruckmanschette am Unterschenkel wurde ebenfalls eine erhöhte Pulscurvenreflexion erzeugt. Um im Gegensatz dazu die periphere Pulscurvenreflexion zu vermindern, wurde Glyceroltrinitrat 0.4 mg sublingual (Pohl-Boskamp, Hohenlockstedt, Germany) zur Induktion systemischer Vasodilatation verabreicht.

Abbildung 10 fasst die Ergebnisse zusammen. In Folge der erhöhten Pulswellenreflexion in der Peripherie aufgrund der systemischen Vasokonstriktion sowie durch eine suprasystolisch aufgepumpte Blutdruckmanschette am Unterschenkel kam es zu einem signifikanten Anstieg des Reflective Indexes. Beim Cold-pressure-Test zeigte sich dieser Anstieg des Reflective Indexes von 41 ± 1 auf 68 ± 1 (arbiträre Einheit; $p < 0.05$) und nach Anlage der suprasystolisch aufgepumpten Blutdruckmanschette am Unterschenkel von 41 ± 1 auf 49 ± 1 (arbiträre Einheit;

$p < 0.05$). Induktion systemischer Vasodilatation dagegen führte zu einem signifikanten Abfall des Reflective Indexes von 41 ± 1 auf 17 ± 1 (arbiträre Einheit; $p < 0.05$).

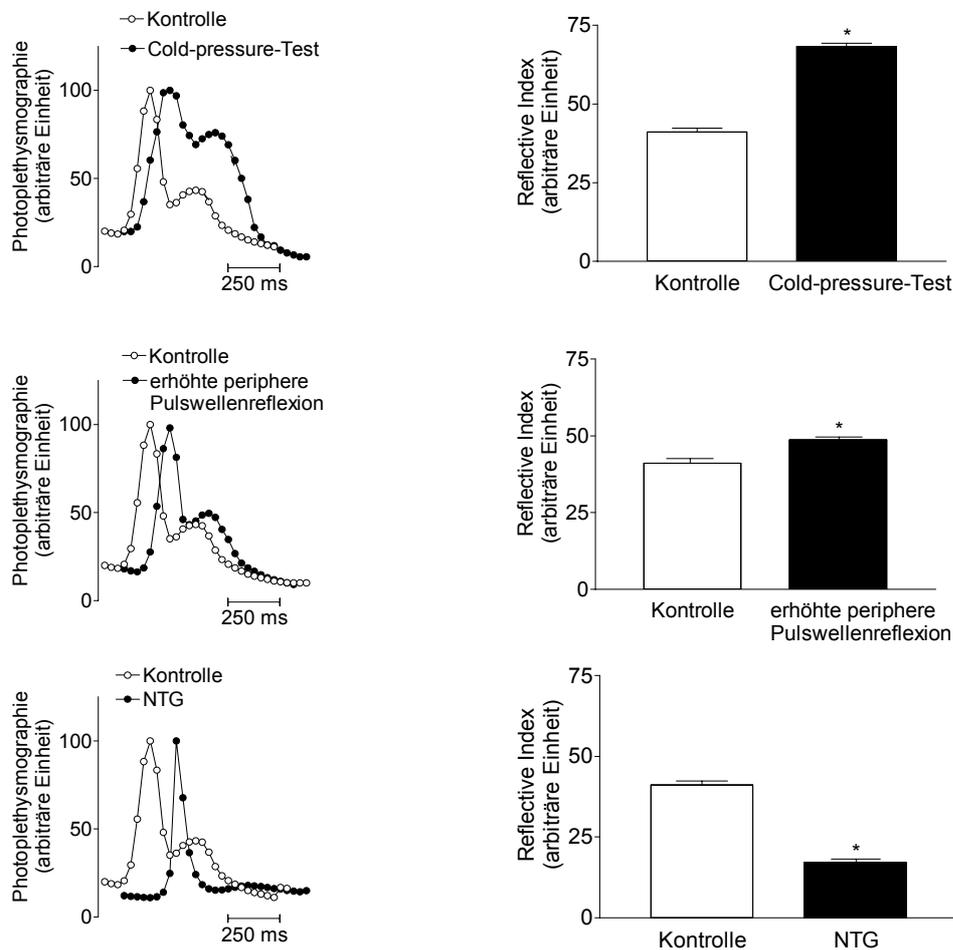


Abbildung 10. Reflective Index als ein Maß des Gefäßtonus bei gesunden Probanden ($n=10$).

A, Typische Pulskurve unter Kontrollbedingungen (offene Kreise) und während des Cold-pressure-Tests (gefüllte Kreise).

B, Mittelwert \pm SEM des Reflective Indexes (arbiträre Einheit) unter Kontrollbedingungen (offene Kreise) und während des Cold-pressure-Tests (gefüllte Kreise) ($n=10$; $*p < 0.05$).

C, Typische Pulskurve unter Kontrollbedingungen (offene Kreise) und während Anlage einer suprasystolisch aufgepumpten Blutdruckmanschette am Unterschenkel zur Erzeugung einer erhöhten peripheren Pulswellenreflexion (gefüllte Kreise).

D, Mittelwert \pm SEM des Reflective Indexes (arbiträre Einheiten) unter Kontrollbedingungen (offene Kreise) und während Anlage der suprasystolisch aufgepumpten Blutdruckmanschette am Unterschenkel zur Erzeugung einer erhöhten peripheren Pulswellenreflexion (gefüllte Kreise) ($n=10$; $*p < 0.05$).

E, Typische Pulskurve unter Kontrollbedingungen (offene Kreise) und während sublingualer Verabreichung von 0,4 mg Glyceroltrinitrat (gefüllte Kreise).

F, Mittelwert \pm SEM des Reflective Indexes (arbiträre Einheit) unter Kontrollbedingungen (offene Kreise) und während sublingualer Verabreichung von 0,4 mg Glyceroltrinitrat (gefüllte Kreise) ($n=10$; $*p < 0.05$).

Diese Untersuchungen anhand einer gesunden Kontrollgruppe zeigten, dass ein ansteigender Reflective Index als eine gesteigerte Pulscurvenreflexion in der Peripherie zu bewerten ist, wohingegen ein abfallender Reflective Index als eine verminderte Pulscurvenreflexion in der Peripherie zu deuten ist. Gesteigerte Pulscurvenreflexion in der Peripherie tritt bei systemischer Vasokonstriktion, verminderte Pulscurvenreflexion in der Peripherie tritt bei systemischer Vasodilatation auf.

3.2.2 Reliabilität der Pulscurvenaufzeichnung

Um die Genauigkeit und Zuverlässigkeit der während der Hämodialyse digital photoplethysmographisch erhobenen Daten nachzuweisen, wurde die Reliabilität der Reflective Indizes geprüft. Die Reliabilität ist ein Maß für die Wiederholbarkeit eines Testes mit identischen Ergebnissen (Retest-Stabilität). Es wurden die innerhalb von fünf Minuten während derselben Hämodialyse ermittelten Pulscurven in Form der Reflective Indizes von jedem der 20 Probanden verglichen. Weiterhin wurden zwei korrespondierende Messzeitpunkte an aufeinander folgenden Hämodialysebehandlungen verglichen. Die Daten wurden sowohl mittels Korrelation nach Spearman als auch nach der Methode von Bland-Altman geprüft.

In **Abbildung 11** sind die Details dargestellt. Es zeigte sich sowohl für den Zusammenhang der Reflective Indizes während derselben Hämodialysebehandlung (Spearman $r_s=0.89$) als auch für die Reflective Indizes zwei verschiedener Hämodialysebehandlungen (Spearman $r_s=0.70$) eine signifikante Korrelation. Dies spricht für die Reproduzierbarkeit der photoplethysmographischen Messungen.

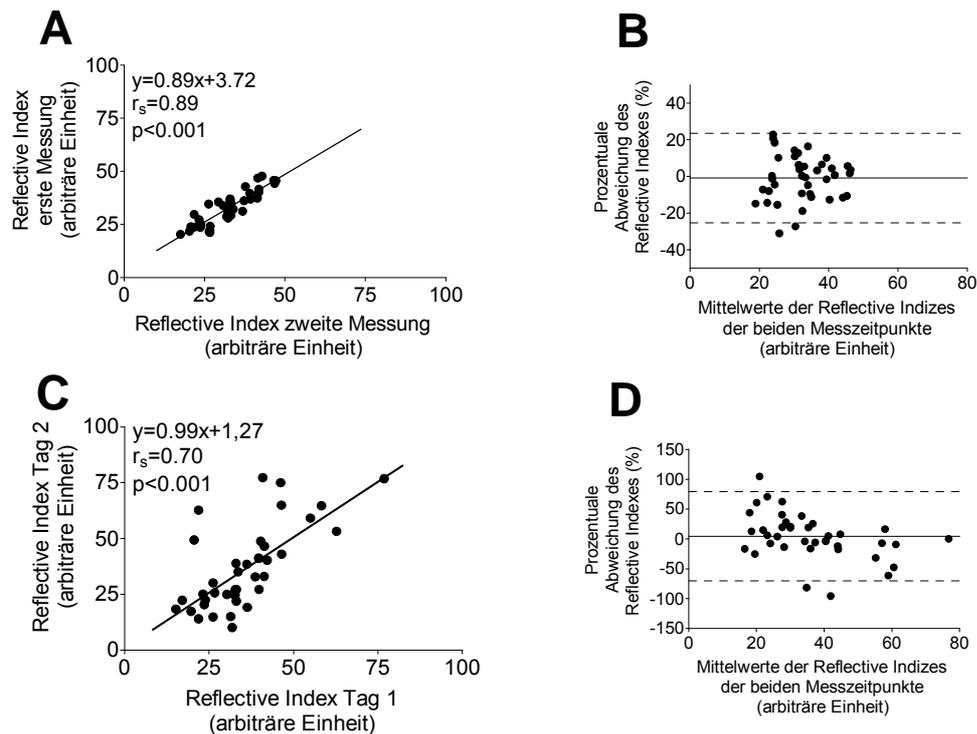


Abbildung 11. Reliabilität der digital photoplethysmographisch während der Hämodialyse von 20 Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz erhobenen Pulskurven.

A, Reliabilität der Reflective Indizes (arbiträre Einheit) zwei aufeinander folgender Messzeitpunkte während derselben Hämodialyse (erste und zweite Messung). Dargestellt ist die Regressionsgerade $y=0.89x+3.72$ sowie der Korrelationskoeffizient nach Spearman $r_s=0.89$; $p<0.001$.

B, Auftragung der Daten nach Bland-Altman. Der Mittelwert (durchgezogenen Linie) sowie das 1,96fache der Standardabweichung der prozentualen Abweichung aus den 2 Messzeitpunkten (gepunktete Linie) sind dargestellt.

C, Reliabilität der Reflective Indizes (arbiträre Einheit) zwei korrespondierender Messzeitpunkte aufeinander folgender Hämodialysebehandlungen (Tag 1 und Tag 2). Dargestellt ist die Regressionsgerade $y=0.99x+1,27$ sowie der Korrelationskoeffizient nach Spearman $r_s=0.70$; $p<0.001$.

D, Auftragung der Daten nach Bland-Altman. Der Mittelwert (durchgezogenen Linie) sowie das 1,96fache der Standardabweichung der prozentualen Abweichung aus den 2 Messzeitpunkten (gepunktete Linie) sind dargestellt.

3.2.3 Pulskurvenaufzeichnung während der Hämodialyse

Während der Hämodialyse von 20 Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz führten wir ein kontinuierliches Monitoring der Pulskurve mittels nicht-invasiver, digitaler Photoplethysmographie durch. Die Pulskurve wurde so bei jedem Herzschlag kontinuierlich aufgezeichnet. Die digitale Photoplethysmographie in unserer Studie erfolgte mit einem Pulsoximeter (Vitaguard VG3000; getemed, Teltow) und einem am Mittel- oder Zeigefinger befestigten Sensor (LNOP-Adt SpO₂ sensor; Masimo Corporation, CA, USA). Der Reflective Index als ein Maß des arteriellen Gefäßtonus bzw. der reflektiven Eigenschaften des Gefäßsystems wurde bestimmt und als Mittelwert über die Pulswellen einer Episode von 150 Sekunden zusammengefasst.

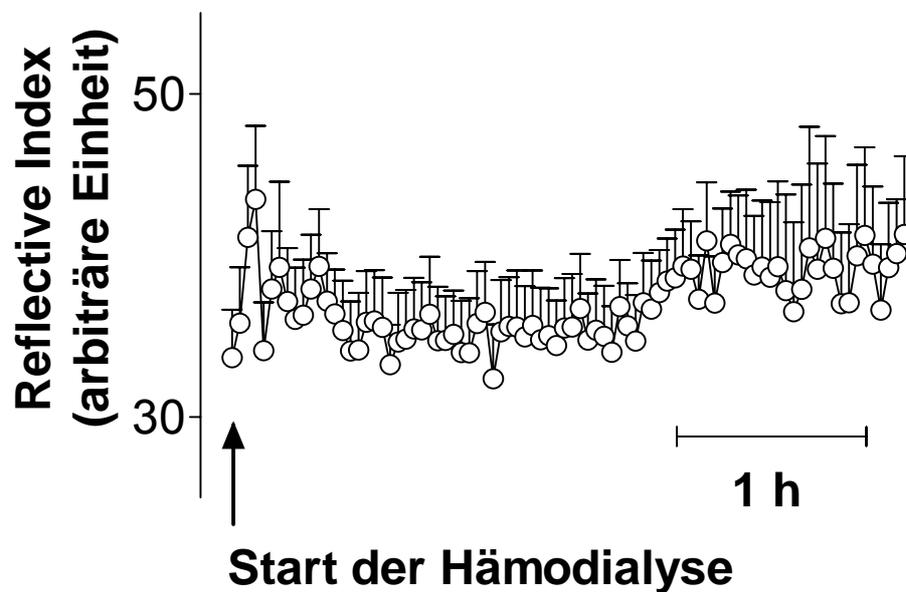


Abbildung 12. Darstellung der Reflective Indizes (arbiträre Einheit) von 20 Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz über den Verlauf der Hämodialyse. Die Pulskurven wurden digital photoplethysmographisch ermittelt. Der Reflective Index wurde als Mittelwert über 2,5 Minuten zusammengefasst. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM wiedergegeben.

Abbildung 12 zeigt den Verlauf der Reflective Indizes während einer vierstündigen Hämodialyse als Mittelwert der Reflective Indizes von 20 Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz.

Während der Hämodialyse zeigte sich ein signifikanter Anstieg des gemittelten Reflective Indexes ($n=20$; $p<0.05$) von 36 ± 3 (arbiträre Einheit) zu Beginn der

Hämodialyse auf 41 ± 3 (arbiträre Einheit) am Ende der Hämodialyse (**Abbildung 13**). Dieser Anstieg der Reflective Indizes über den Verlauf der Hämodialyse konnten bei 15 der 20 Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz nachgewiesen werden (**Abbildung 14**). Die Veränderungen des Reflective Indexes während der Hämodialyse wurden durch nur minimale, nicht-signifikante Blutdruckänderungen begleitet. Weder ein kontinuierlicher Blutdruckabfall, noch einzelne hypotensive Ereignisse konnten während des Verlaufs der Hämodialyse dokumentiert werden. Der systolische Blutdruck fiel im Mittel von 137 ± 5 mmHg zu Beginn der Hämodialyse auf 136 ± 6 mmHg am Ende der Hämodialyse. Der Pulsdruck (pulse pressure) zeigte keine signifikante Veränderung im Mittel von 69 ± 4 mmHg zu Beginn der Hämodialyse auf 68 ± 5 mmHg am Ende der Hämodialyse.

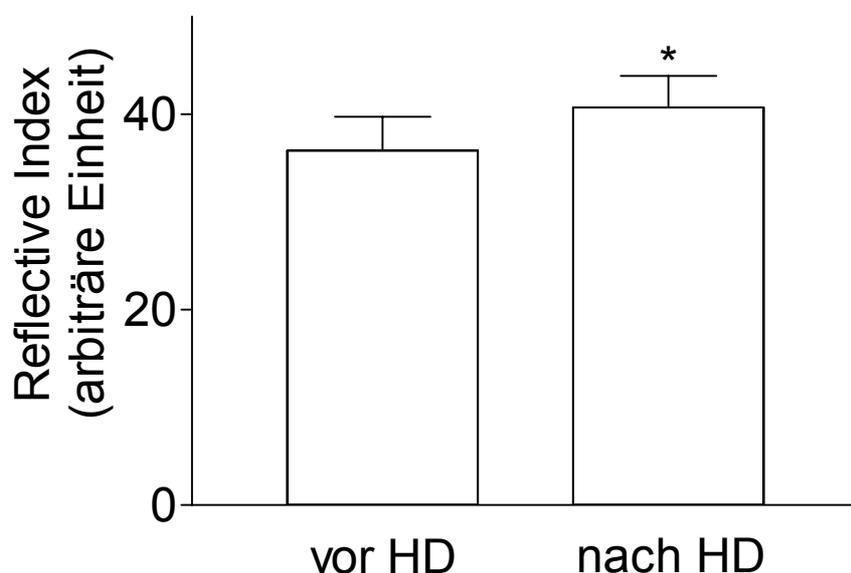


Abbildung 13. Darstellung der Mittelwerte \pm SEM der Reflective Indizes (arbiträre Einheit) der digital photoplethysmographisch bestimmten Pulskurven von 20 Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz zu Beginn und am Ende einer Hämodialyse. ($n=20$; $*p<0,05$).

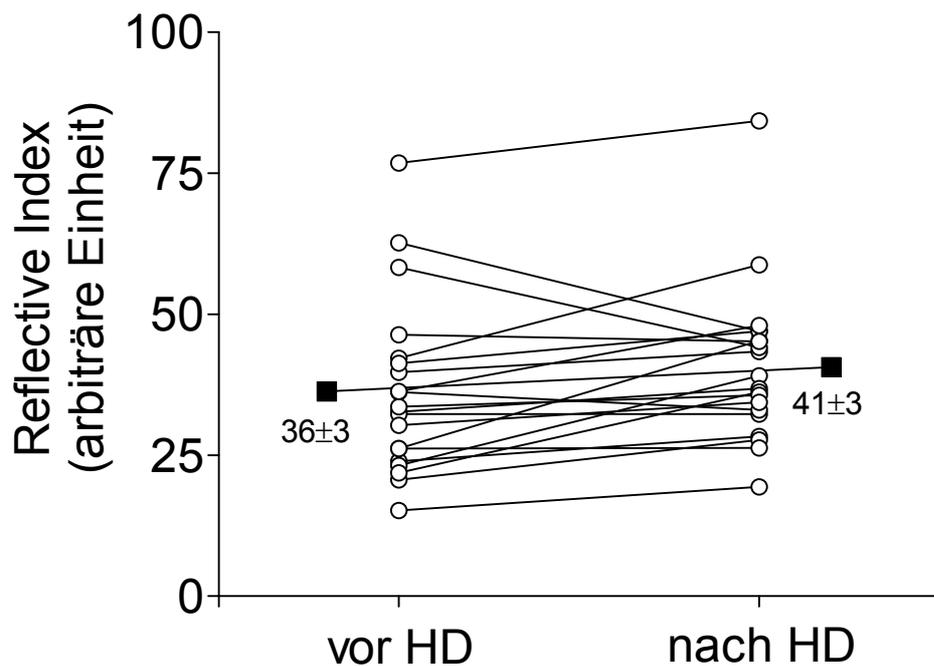


Abbildung 14. Reflective Indizes (arbiträre Einheit) zu Beginn und am Ende der Hämodialyse einzeln dargestellt für alle 20 Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz. 15 der 20 Wertepaare zeigen einen Anstieg über den Verlauf der Hämodialyse. Die Mittelwerte sind durch gefüllte Quadrate hervorgehoben.

3.2.4 Pulskurvenaufzeichnung während der Hämodialyse unter dem Einfluss von Acetylcystein

Während einer zweiten Hämodialysebehandlung erhielt dasselbe Patientenkollektiv eine intravenöse Acetylcysteinmedikation (5 g i.v. über 4 h). Die Pulskurve wurde wiederum kontinuierlich nicht-invasiv mittels digitaler Photoplethysmographie aufgezeichnet. Die Reflective Indizes wurden als Mittelwert der Pulskurven über eine Dauer von 150 Sekunden zusammengefasst.

Abbildung 15 zeigt den Verlauf des gemittelten Reflective Indexes in Anwesenheit von Acetylcystein (gefüllte Kreise) im Vergleich zu dem bereits beschriebenen Verlauf des Reflective Indexes während einer Hämodialysebehandlung ohne intravenöse antioxidative Therapie mit Acetylcystein (offene Kreise) bei 20 Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz.

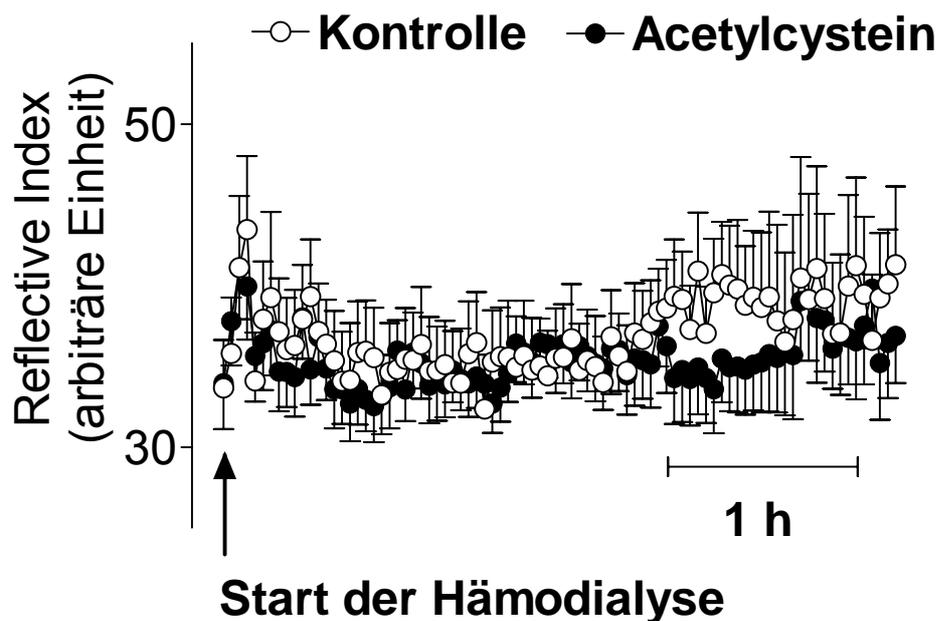


Abbildung 15. Darstellung der Reflective Indizes (arbiträre Einheit) von 20 Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz über den Verlauf einer Hämodialyse in Abwesenheit (offene Kreise) und Anwesenheit (gefüllte Kreise) von Acetylcystein. Die Pulscurven wurden digital photoplethysmographisch ermittelt. Der Reflective Index wurde als Mittelwert über 2,5 Minuten zusammengefasst. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM wiedergegeben.

In Anwesenheit von Acetylcystein zeigte sich ein nur geringer, nicht-signifikanter Anstieg des Reflective Indexes von 34 ± 2 (arbiträre Einheit) zu Beginn der Hämodialyse auf 36 ± 2 (arbiträre Einheit) am Ende der Hämodialyse (**Abbildung 16**). Dieser Anstieg konnte bei 10 der 20 Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz nachgewiesen werden (**Abbildung 17**).

Auch in Anwesenheit von Acetylcystein konnte weder ein kontinuierlich signifikanter Blutdruckabfall, noch einzelne hypotensive Ereignisse während des Verlaufs der Hämodialyse aufgezeigt werden. Der systolische Blutdruck lag im Mittel zu Beginn der Hämodialyse bei 138 ± 6 mmHg und am Ende der Hämodialyse bei 136 ± 6 mmHg. Der Pulsdruck (pulse pressure) zeigte im Mittel eine nicht-signifikante Änderung von 67 ± 4 mmHg auf 69 ± 4 mmHg.

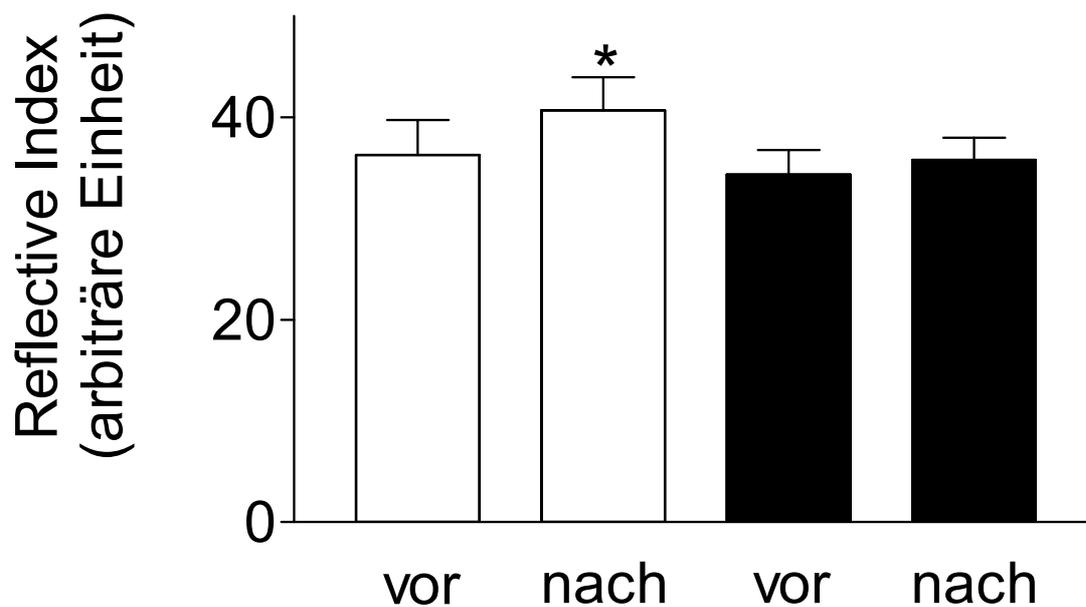


Abbildung 16. Darstellung der Mittelwerte \pm SEM der Reflective Indizes (arbiträre Einheit) der digital photoplethysmographisch bestimmten Pulscurven von 20 Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz zu Beginn und am Ende einer Hämodialyse in Abwesenheit (offene Balken) und Anwesenheit (gefüllte Balken) von Acetylcystein. ($n=20$; $*p<0,05$).

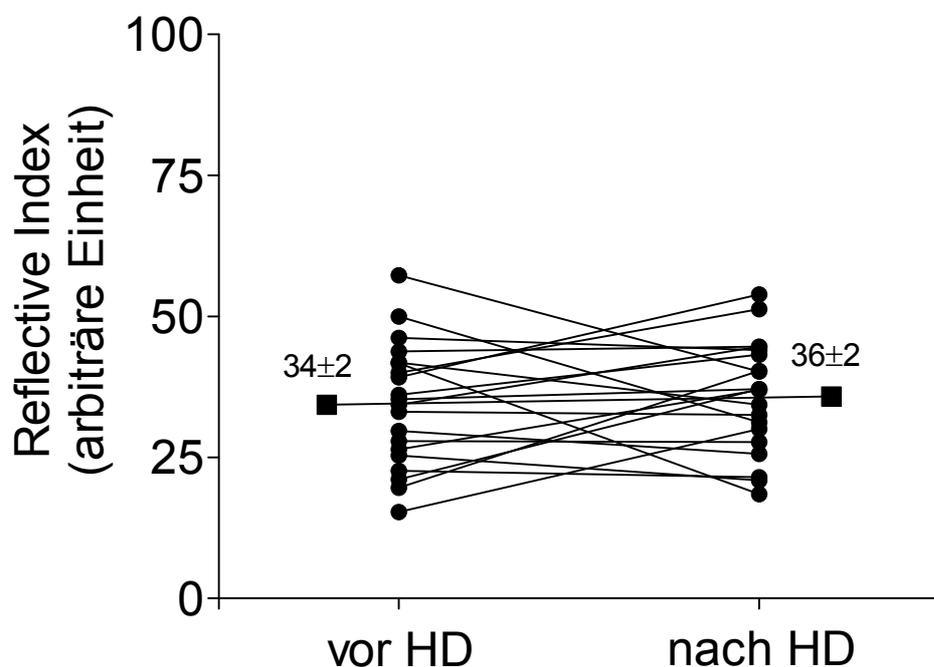


Abbildung 17. Reflective Indizes zu Beginn und am Ende der Hämodialyse einzeln dargestellt für alle 20 Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz in Anwesenheit von Acetylcystein. 10 der 20 Wertepaare zeigen einen Anstieg über den Verlauf der Hämodialyse. Die Mittelwerte sind durch gefüllte Quadrate hervorgehoben.

Abbildungen 15 und **16** verdeutlichen die Unterschiede in der Hämodynamik während der Hämodialyse in Abwesenheit und Anwesenheit von Acetylcystein. Der signifikante Anstieg des Reflective Indexes während der Hämodialyse in der Kontrollgruppe ohne intravenöse Acetylcysteinmedikation (von 36 ± 3 auf 41 ± 3 ; $n=20$; $p<0.05$) kann als erhöhte Pulskurvenreflexion in der Peripherie in Folge systemischer Vasokonstriktion gedeutet werden. Die systemische Vasokonstriktion am Ende der Hämodialyse entsteht als gegenregulatorischer Kompensationsmechanismus in Folge des Volumenverlustes während der Hämodialyse. Durch die gleichzeitige intravenöse Gabe von Acetylcystein während der Hämodialyse kann trotz vergleichbarem Volumenverlust diese vasokonstriktorische Endothelbelastung signifikant gemindert werden. Blutdruckabfälle oder subjektive hypotensive Beschwerden wurden nicht nachgewiesen. Die Hämodynamik gekennzeichnet durch den Verlauf der photoplethysmographisch aufgezeichneten Pulskurve ist in Anwesenheit von Acetylcystein stabil.

3.2.5 Beurteilung der Endothelfunktion anhand der Pulskurve

Zur Überprüfung der Endothelfunktion wurde bei jedem Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz durch reaktive Hyperämie endotheliale Vasodilatation provoziert. Endotheliale Vasodilatation gilt als zuverlässiger Marker zur Überprüfung der Endothelfunktion. Hierzu wurde der Blutfluss im Arm kontralateral zum Shuntarm durch eine suprasystolisch aufgepumpte Blutdruckmanschette für 5 Minuten unterbunden. Im Rahmen der reaktiven Hyperämie entstand Scherstress, der am Endothel zu einem Anstieg der endothelialen NO-Produktion und -Sekretion führt (Corretti et al., 2002; Govers et al., 2001). NO wirkt durch Erhöhung des cGMP-Spiegels der Erhöhung der intrazellulären Calciumionenkonzentration in glatten Gefäßmuskelzellen entgegen. Der Calcium-abhängige Kontraktionsmechanismus wird verhindert. Es entsteht NO-vermittelte endotheliale Vasodilatation (Koeppen et al., 2004), die photoplethysmographisch dargestellt werden kann und die Güte der Endothelfunktion widerspiegelt. In der vorliegenden Studie wurde diese Funktionstestung zu Beginn und am Ende der Hämodialyse in Abwesenheit und Anwesenheit von Acetylcystein bei jedem der 20 Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz durchgeführt. Die Reflective Indizes wurden in 15 Sekundenabständen nach Lösen des Staues aufgezeichnet. Die Differenz zwischen den Werten des Reflective Indexes vor Stau und 90 ($RI_{\Delta 90}$) bzw. 150

Sekunden ($RI_{\Delta 150}$) nach Stau beschreibt die endotheliale Vasodilatation. Je größer $RI_{\Delta 90}$ bzw. $RI_{\Delta 150}$, desto ausgeprägter die endotheliale Vasodilatation, desto besser die Endothelfunktion.

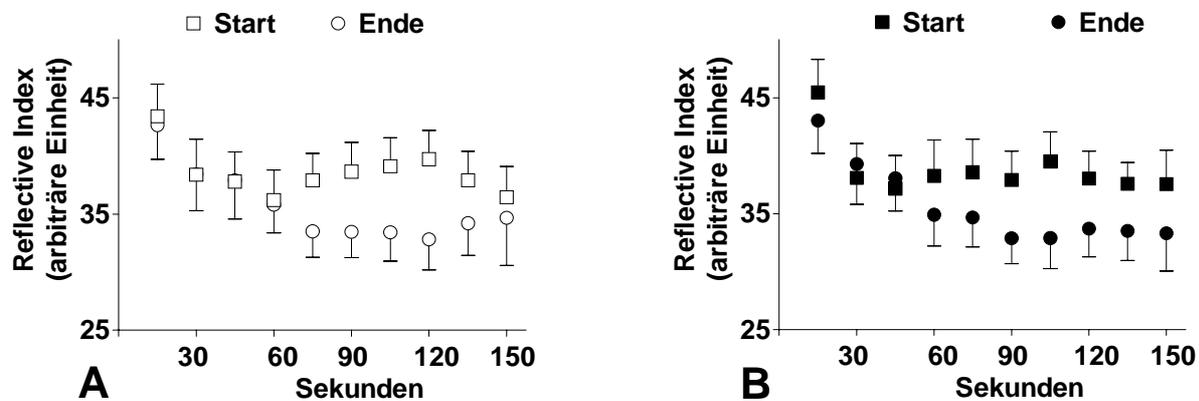


Abbildung 18. Verhalten des Reflective Indexes innerhalb der ersten 150 Sekunden nach Auslösen einer endothelialen Vasodilatation am Arm kontralateral zum Shuntarm bei 20 Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz. Der Reflective Index wurde mittels digitaler Photoplethysmographie ermittelt. Die endotheliale Vasodilatation wurde durch fünfminütiges Unterbinden der Blutversorgung am Arm kontralateral zum Shuntarm provoziert. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

A, Reflective Index (arbiträre Einheit) in Abwesenheit von Acetylcystein zu Beginn (leere Quadrate) und am Ende (leere Kreise) der Hämodialyse.

B, Reflective Index (arbiträre Einheit) in Anwesenheit von Acetylcystein zu Beginn (gefüllte Quadrate) und am Ende (gefüllte Kreise) der Hämodialyse.

Abbildung 18 zeigt den Verlauf des Reflective Indexes innerhalb der ersten 150 Sekunden nach Auslösen der endothelialen Vasodilatation in Abwesenheit (offene Symbole) und Anwesenheit (gefüllte Symbole) von Acetylcystein. Verglichen wurde die Gefäßreaktion zu Beginn (Quadrate) und am Ende (Kreise) der Hämodialyse. Sowohl in der Kontrollgruppe als auch unter dem Einfluss von Acetylcystein zeigte sich ein deutlicher Unterschied der Werte zu Beginn und am Ende der Hämodialyse. Die endotheliale Vasodilatation ist gekennzeichnet durch eine verminderte Pulscurvenreflexion in der Peripherie. Photoplethysmographisch zeigt sie sich als Abfall des Reflective Indexes. Zu Beginn der Hämodialyse reagierte das Endothel mit nur geringer Vasodilatation. Die Vasodilatation am Ende der Hämodialyse war dagegen wesentlich ausgeprägter mit unterschiedlichen Signifikanzniveaus. **Abbildung 19** und **Tabelle 4** zeigen die genauen Werte.

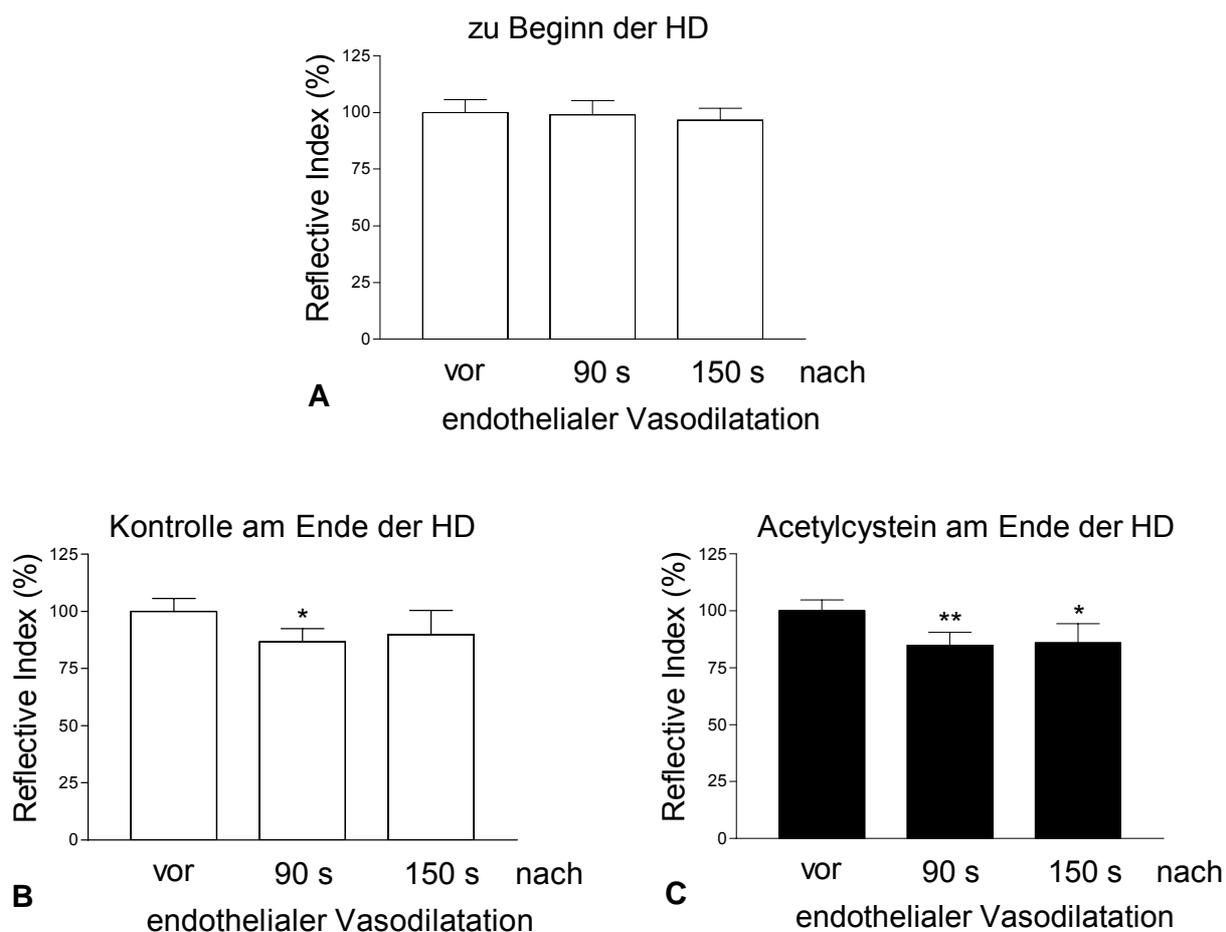


Abbildung 19. Reaktion der Reflective Indizes (%) im Rahmen der reaktiven Hyperämie zu Beginn und am Ende der Hämodialyse in Abwesenheit und Anwesenheit von Acetylcystein von Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz als Zeichen für die endotheliale Vasodilatation.

A, Die Reflective Indizes vor Stau, 90 Sekunden und 150 Sekunden nach Lösung des Staus zu Beginn der Hämodialyse in Abwesenheit und Anwesenheit von Acetylcystein ($n=40$).

B, Die Reflective Indizes vor Stau, 90 Sekunden und 150 Sekunden nach Lösung des Staus am Ende der Hämodialyse in Abwesenheit von Acetylcystein ($n=20$).

C, Die Reflective Indizes vor Stau, 90 Sekunden und 150 Sekunden nach Lösung des Staus am Ende der Hämodialyse in Anwesenheit von Acetylcystein ($n=20$).

Die Reflective Indizes wurde mittels digitaler Photoplethysmographie ermittelt. Die endotheliale Vasodilatation wurde durch fünfminütiges Unterbinden der Blutversorgung am kontralateralen Shuntarm provoziert. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. ** $p<0.01$; * $p<0.05$.

Tabelle 4: Dargestellt sind die Mittelwerte der Reflective Indizes in Prozent \pm SEM von 20 Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz in Abwesenheit und Anwesenheit von Acetylcystein vor der Prüfung der endothelialen Vasodilatation sowie 90 und 150 Sekunden danach am Start sowie am Ende der Hämodialyse. Die Werte der Reflective Indizes vor Stau wurden als 100% veranschlagt. RI Δ 90 bzw. RI Δ 150 setzen sich aus der Differenz des Reflective Indexes vor Stau und dem Reflective Index 90 bzw. 150 Sekunden nach Lösen des Staus zusammen. Die endotheliale Vasodilatation wurde mittels reaktiver Hyperämie getestet. Die Reflective Indizes wurden mittels digitaler Photoplethysmographie aufgezeichnet.

| | RI vor Stau | RI nach 90s | RI nach 150 s | RI Δ 90 | RI Δ 150 |
|-----------------|-------------|-------------|---------------|----------------|-----------------|
| Start HD | 100 \pm 6 | 99 \pm 6 | 97 \pm 5 | 1 \pm 5 | 3 \pm 5 |
| Ende HD Control | 100 \pm 6 | 87 \pm 7 | 90 \pm 11 | 13 \pm 6 | 8 \pm 8 |
| Ende HD ACC | 100 \pm 5 | 85 \pm 6 | 86 \pm 8 | 18 \pm 4 | 16 \pm 6 |

Zu Beginn der Hämodialyse (**Abb. 19 A**) fiel der Reflective Index von seinem Ausgangswert von 100 \pm 6% vor der Stauung des Blutflusses nicht-signifikant auf 99 \pm 6% 90 Sekunden nach Lösen des Staus und auf 97 \pm 5% nach 150 Sekunden ab. Am Ende der Hämodialyse (**Abb. 19 B**) fiel der Reflective Index in der Kontrollgruppe im Mittel von 100 \pm 6% vor der Stauung des Blutflusses auf 87 \pm 7% nach 90 Sekunden und auf 90 \pm 11% nach 150 Sekunden ab. Der Abfall am Ende der Hämodialyse in Abwesenheit von Acetylcystein 90 Sekunden nach endothelialer Vasodilatation ist signifikant ($p < 0.05$; $n = 20$). Dagegen fiel der Reflective Index in Anwesenheit von Acetylcystein am Ende der Hämodialyse (**Abb. 19 C**) von 100 \pm 5% auf 85 \pm 6% ($p < 0.01$; $n = 20$) nach 90 Sekunden und auf 86 \pm 8% ($p < 0.05$; $n = 20$) nach 150 Sekunden ab. In Anwesenheit von Acetylcystein am Ende der Hämodialyse ist sowohl der Abfall 90 Sekunden als auch 150 Sekunden nach endothelialer Vasodilatation signifikant ($p < 0.01$ nach 90 Sekunden, $p < 0.05$ nach 150 Sekunden; $n = 20$).

Der signifikante Abfall des Reflective Indexes als Zeichen der endothelialen Vasodilatation am Ende der Hämodialyse in beiden Probandengruppen zeigt, dass sich die Hämodialyse per se protektiv auf das Endothel auswirkt. Eine signifikante Verbesserung der endothelialen Funktion durch den Vorgang der Hämodialyse konnte nachgewiesen werden. Die intravenöse Gabe antioxidativem Acetylcysteins während des Verlaufes der Hämodialyse verstärkt diese Verbesserung der Endothelfunktion gekennzeichnet durch einen ausgeprägteren Abfall des Reflective Indexes und ein höheres Signifikanzniveau in dieser Probandengruppe.

Im Zusammenhang mit den laborchemischen Parametern von Start und Ende der Hämodialyse ergab sich eine Korrelation (Spearman $r_s=0.48$; $p<0.05$) zwischen der Abnahme der Homocysteinkonzentration und dem Grad der Endothelfunktion in Anwesenheit von Acetylcystein. In Anwesenheit von Acetylcystein konnte die Plasma-Homocysteinkonzentration von $21.3 \pm 2.3 \mu\text{mol/l}$ auf $2.7 \pm 0.3 \mu\text{mol/l}$ reduziert werden. In Abwesenheit von Acetylcystein zeigte sich eine geringere Reduktion der Plasma-Homocysteinkonzentration von $20.2 \pm 0.2 \mu\text{mol/l}$ auf nur $13.4 \pm 1.7 \mu\text{mol/l}$. Die durch intravenöse Acetylcysteinmedikation höhere Homocysteinreduktion über den Verlauf der Hämodialyse zeigte einen Einfluss auf die Verbesserung der Endothelfunktion bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz (**Abbildung 20**). In der Kontrollgruppe ohne Acetylcysteinmedikation konnte dieser Zusammenhang nicht aufgezeigt werden.

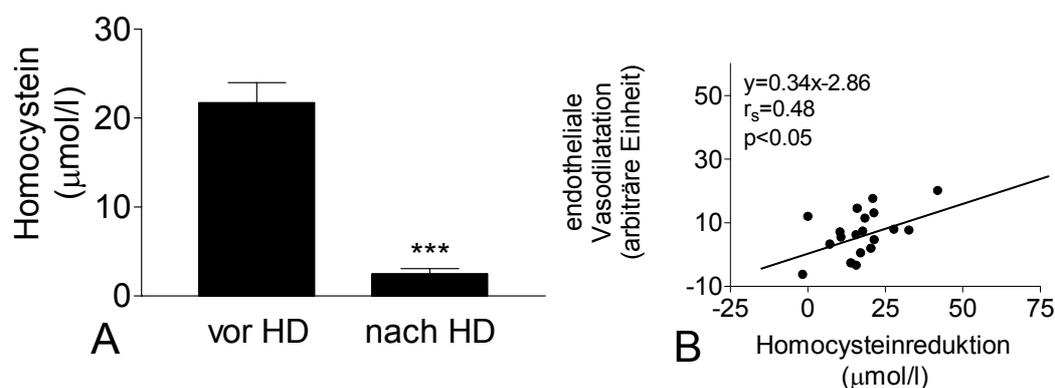


Abbildung 20. A, Signifikante Reduktion der Plasma-Homocysteinkonzentration ($\mu\text{mol/l}$) während der Hämodialyse bei 20 Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz in Anwesenheit von Acetylcystein. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt ($n=20$; $***p<0.001$). **B**, Signifikanter Zusammenhang (Spearman $r_s=0.48$, $p<0.05$; $n=20$) der Homocysteinreduktion (Plasma-Homocystein vor Hämodialyse minus Plasma-Homocystein nach Hämodialyse) während der Hämodialyse und der verbesserten endothelialen Funktion (Reflective Index 90 Sekunden nach Stau vor Hämodialyse minus Reflective Index 90 Sekunden nach Stau nach Hämodialyse) während des Verlaufs der Hämodialyse in Anwesenheit von Acetylcystein bei 20 Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz. Die endotheliale Vasodilatation wurde durch fünfminütiges Unterbinden der Blutversorgung am Arm kontralateral zum Shuntarm provoziert. Sie wurde mittels digitaler Photoplethysmographie quantifiziert. Dargestellt ist die Regressionsgerade $y=0.34x-2.86$ sowie der Korrelationskoeffizient nach Spearman $r_s=0.48$; $p<0.05$.

3.3 Fluoreszenzspektrophotometrische Darstellung der intrazellulären Calciumhomöostase

Um den Einfluss von Calcium als wichtiger intrazellulärer Botenstoff auf die Endothelfunktion von Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz zu analysieren, erfolgte die fluoreszenzspektrophotometrische Untersuchung der intrazellulären Calciumhomöostase am Beispiel isolierter Monozyten aus dem Blut von Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz. In diesem Sinne untersuchten wir den Gehalt intrazellulärer Calciumspeicher, die Thapsigargin-induzierte Leerung dieser intrazellulären Calciumspeicher sowie den Calciumioneneinstrom über die Plasmamembran. Dabei betrachteten wir die Unterschiede zu Beginn und am Ende der Hämodialyse in Abwesenheit und Anwesenheit von intravenöser Acetylcysteinmedikation über den Verlauf der Hämodialyse.

3.3.1 Einfluss von Acetylcystein auf den Gehalt der intrazellulären Calciumspeicher in vivo

Die fluoreszenzspektrophotometrische Messung des Gehaltes der intrazellulären Calciumspeicher erfolgte zu Beginn und am Ende der Hämodialyse in Abwesenheit und Anwesenheit von Acetylcystein am Beispiel isolierter Monozyten von Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz. Für die Messungen wurde sich die fluoreszierende Eigenschaft von Chlortetracyclin und dessen Ablagerung in intrazellulären Calciumspeichern zu Nutze gemacht. Chlortetracyclin geht wie alle Substanzen der Antibiotikumgruppe der Tetracycline mit zweiwertigen Ionen wie dem Calcium Verbindungen ein. Tetracycline zeigen unter UV-Lichtanregung eine schwache, gelbe Fluoreszenz. Diese Fluoreszenz verstärkt sich durch Komplexierung von Calciumionen. 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 und einer Emission von 510 nm mit einem Fluoreszenzspektrophotometer (Fluoroskan Ascent FL von Labysystems, Helsinki, Finnland) durchgeführt.

Abbildung 21 zeigt die Calciumionenkonzentration in den intrazellulären Calciumspeichern am Beispiel isolierter Monozyten von Patienten mit terminaler

Niereninsuffizienz zu Beginn und am Ende der Hämodialyse in Abwesenheit und Anwesenheit von Acetylcystein. In der Kontrollgruppe ohne intravenöse Acetylcysteinmedikation zeigte sich eine signifikante Reduktion ($p < 0.001$) der Calciumionenkonzentration in den intrazellulären Calciumspeichern von 0.80 ± 0.01 (arbiträre Einheit) zu Beginn der Hämodialyse auf 0.54 ± 0.01 (arbiträre Einheit) am Ende der Hämodialyse. In Anwesenheit von Acetylcystein zeigte sich dagegen ein signifikanter Anstieg ($p < 0.001$) der Calciumionenkonzentration in den intrazellulären Calciumspeichern von 0.79 ± 0.01 (arbiträre Einheit) vor der Hämodialyse auf 0.85 ± 0.01 (arbiträre Einheit) nach der Hämodialyse.

Der Vorgang der Hämodialyse per se führt zu einer Verminderung der Calciumionenkonzentration in den intrazellulären Speichern. Dagegen erhöht Acetylcystein die Calciumionenkonzentration in den intrazellulären Speichern über den Verlauf der Hämodialyse.

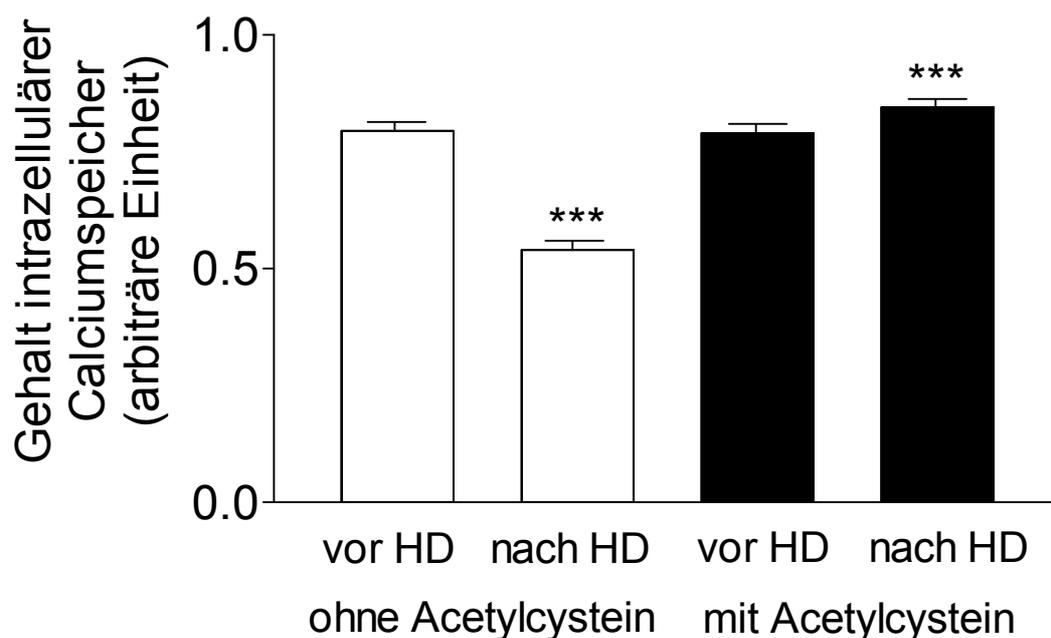


Abbildung 21. Calciumionenkonzentration der intrazellulären Calciumspeicher (arbiträre Einheit) am Beispiel isolierter Monozyten von Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz zu Beginn und am Ende der Hämodialyse in Abwesenheit (offene Balken) und Anwesenheit (gefüllte Balken) von Acetylcystein. Die Calciumionenkonzentration in den intrazellulären Calciumspeichern wurde mittels fluoreszierendem Chlortetracyclin bei einer Exzitationswellenlänge von 380 nm und einer Emission von 510 nm fluoreszenzspektrophotometrisch dargestellt. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt (***) ($p < 0.001$).

3.3.2 Einfluss von Acetylcystein auf die Thapsigargin-induzierte intrazelluläre Calciumspeicherentleerung in vivo

Die fluoreszenzspektrophotometrische Messung der Thapsigargin-induzierten Calciumspeicherentleerung erfolgte zu Beginn und am Ende der Hämodialyse in Abwesenheit und Anwesenheit von Acetylcystein am Beispiel isolierter Monozyten von Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz. Für die fluoreszenzspektrophotometrische Darstellung der Veränderung der zytosolischen Calciumionenkonzentration in Folge der Thapsigargin-induzierten Entleerung intrazellulärer Calciumspeicher wurde der fluoreszierende Farbstoff Fura-2 verwendet. Er wurde als lipophiler, nicht-fluoreszierender, membranpermeabler Acetoxymethylester (Fura-2 AM) appliziert. Nach Aufspaltung durch intrazelluläre Esterasen entstand ein membranimpermeabler, fluoreszierender Farbstoff. Das Exzitationsspektrum ist von der Bindung freier Calciumionen abhängig. Die Messungen in der vorliegenden Arbeit wurden bei einer Exzitationswellenlänge von 340 nm und 485 nm durchgeführt. Die maximale Emission erfolgte in beiden Fällen bei 510 nm. Der Quotient aus der Fluoreszenz bei 340 nm und 485 nm wurde gebildet (Fluoreszenz-Ratio). Um die intrazellulären Calciumspeicher zu leeren und den Anstieg der zytosolischen Calciumionenkonzentration nachzuweisen, wurde nach einer basalen Messung von 3 Minuten der irreversible SERCA-Hemmer Thapsigargin in einer Endkonzentration von 3 μ mol appliziert.

Abbildung 22 zeigt den Anstieg der zytosolischen Calciumionenkonzentration nach Thapsigargin-Zugabe zu Beginn und am Ende der Hämodialyse in Abwesenheit von Acetylcystein bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz. Nach Zugabe von Thapsigargin stieg die Fluoreszenz-Ratio von dem basalen Ausgangswert von 0.54 ± 0.01 (arbiträre Einheit) auf 0.86 ± 0.10 (arbiträre Einheit) zu Beginn der Hämodialyse und auf 0.74 ± 0.10 (arbiträre Einheit) am Ende der Hämodialyse. Der Unterschied zwischen der Thapsigargin-induzierten Calciumspeicherentleerung zu Beginn und am Ende der Hämodialyse ist signifikant ($p < 0.001$).

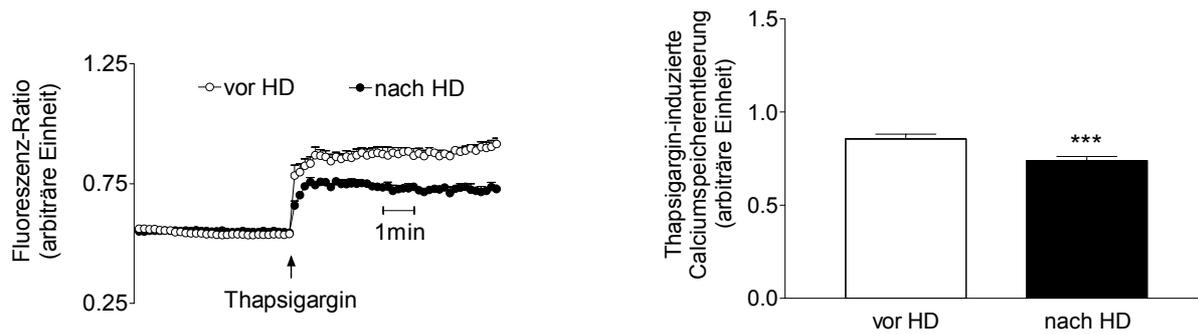


Abbildung 22. Thapsigargin-induzierte Calciumspeicherentleerung am Beispiel isolierter Monozyten von Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz zu Beginn und am Ende der Hämodialyse in Abwesenheit von Acetylcystein. Die Calciumionenkonzentration in den intrazellulären Calciumspeichern wurde mittels Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 fluoreszenzspektrophotometrisch dargestellt.

A, Basale Fluoreszenz-Ratio (arbiträre Einheit) von Fura-2 bei 340 nm und 485 nm sowie Fluoreszenzanstieg nach Thapsigargin-Zugabe vor (offene Kreise) und nach (gefüllte Kreise) der Hämodialyse.

B, Darstellung der Daten als Mittelwerte \pm SEM. Unterschiede zwischen der Fluoreszenz-Ratio nach Zugabe von Thapsigargin vor (offener Balken) und nach (gefüllte Balken) der Hämodialyse (***) $p < 0.001$.

Um den Einfluss antioxidativer Acetylcysteinmedikation während der Hämodialyse auf die intrazellulären Calciumspeicher zu untersuchen, wurde den Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz während einer zweiten Hämodialyse intravenös Acetylcystein (5 g i.v. über 4 h) verabreicht und die Thapsigargin-induzierte Calciumspeicherentleerung zu Beginn und am Ende der Hämodialyse fluoreszenzspektrophotometrisch dargestellt.

Abbildung 23 zeigt den Anstieg der intrazellulären Calciumionenkonzentration nach Thapsigargin-Zugabe. Die Fluoreszenz-Ratio zeigte einen Anstieg des basalen Ausgangswertes von 0.55 ± 0.01 (arbiträre Einheit) auf 0.63 ± 0.01 (arbiträre Einheit) zu Beginn der Hämodialyse und auf 0.84 ± 0.01 (arbiträre Einheit) am Ende der Hämodialyse. Der Unterschied zwischen der Thapsigargin-induzierten Calciumspeicherentleerung zu Beginn und am Ende der Hämodialyse ist signifikant ($p < 0.001$).

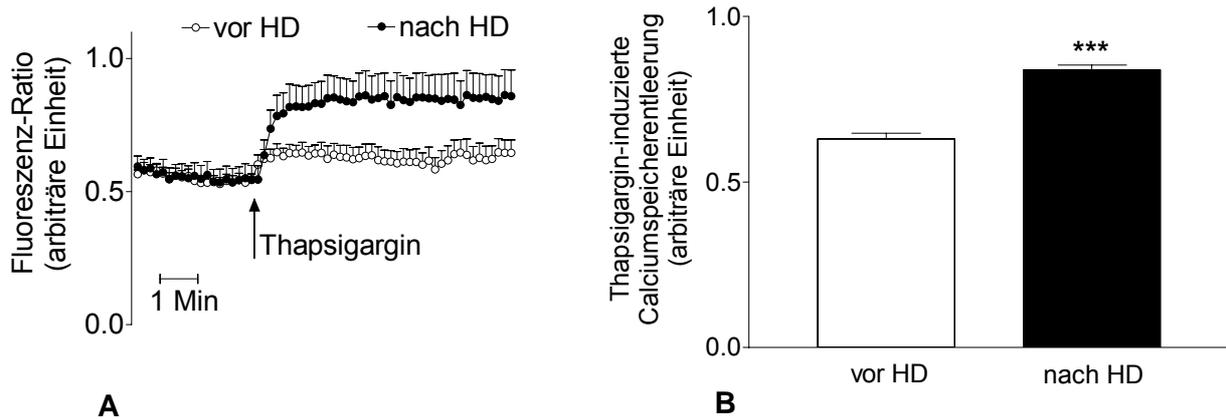


Abbildung 23. Thapsigargin-induzierte Calciumspeicherentleerung am Beispiel isolierter Monozyten von Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz zu Beginn und am Ende der Hämodialyse in Anwesenheit von Acetylcystein. Die Veränderung der zytosolischen Calciumionenkonzentration wurde mittels Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 fluoreszenzspektrophotometrisch dargestellt.

A, Basale Fluoreszenz-Ratio (arbiträre Einheit) von Fura-2 bei 340 nm und 485 nm sowie Fluoreszenzanstieg nach Thapsigargin-Zugabe vor (offene Kreise) und nach (gefüllte Kreise) der Hämodialyse.

B, Darstellung der Daten als Mittelwerte \pm SEM. Unterschiede zwischen der Fluoreszenz-Ratio nach Zugabe von Thapsigargin vor (offener Balken) und nach (gefüllte Balken) der Hämodialyse (***) $p < 0.001$.

3.3.3 Einfluss von Acetylcystein auf die Thapsigargin-induzierte intrazelluläre Calcium-Speicherentleerung in vitro

Um die ermittelten Unterschiede in der Calciumhomöostase am Beispiel isolierter Monozyten in Abwesenheit und Anwesenheit von Acetylcystein bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz zu konsolidieren, wurden Monozyten aus gesundem Probandenblut isoliert. Die Hälfte wurde für 4 Stunden bei Raumtemperatur mit Acetylcystein inkubiert. Im Anschluss erfolgte die fluoreszenzspektrophotometrische Messung der Thapsigargin-induzierten Calciumspeicherentleerung.

Abbildung 24 zeigt die Ergebnisse in vitro. Die Fluoreszenz-Ratio zeigte einen Anstieg des basalen Ausgangswertes von 1.36 ± 0.02 (arbiträre Einheit) auf 2.24 ± 0.02 (arbiträre Einheit) unter Kontrollbedingungen und auf 2.80 ± 0.07 (arbiträre Einheit) nach Inkubation mit Acetylcystein. Der Unterschied zwischen der Thapsigargin-induzierten Calciumspeicherentleerung in Abwesenheit und Anwesenheit von Acetylcystein ist signifikant ($p < 0.01$).

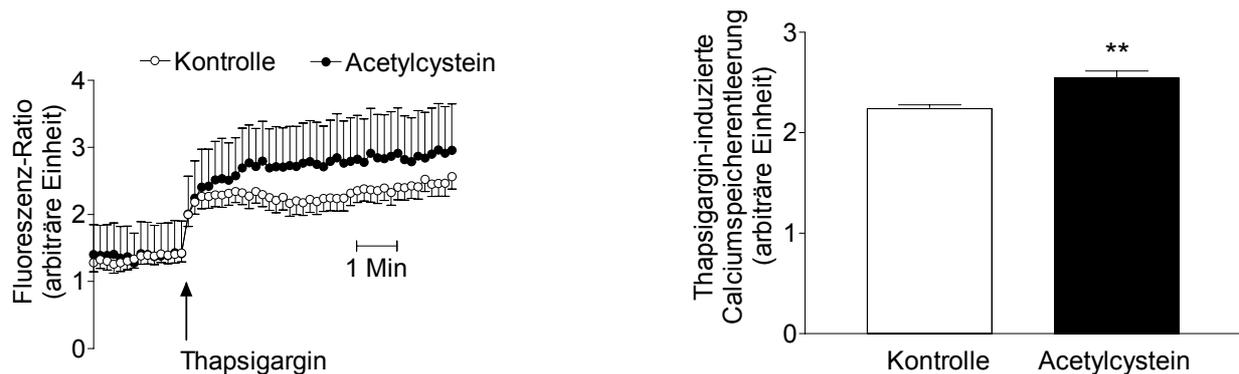


Abbildung 24. Thapsigargin-induzierte Calciumspeicherentleerung am Beispiel isolierter Monozyten *in vitro* in Abwesenheit und Anwesenheit von Acetylcystein. Die Veränderung der zytosolischen Calciumionenkonzentration wurde mittels Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 fluorezenzspektrophotometrisch dargestellt.

A, Basale Fluoreszenz-Ratio (arbiträre Einheit) von Fura-2 bei 340 nm und 485 nm sowie Fluoreszenzanstieg nach Thapsigargin-Zugabe unter Kontrollbedingungen (offene Kreise) sowie nach Inkubation mit Acetylcystein (gefüllte Kreise).

B, Darstellung der Daten als Mittelwerte \pm SEM. Unterschiede zwischen der Fluoreszenz nach Zugabe von Thapsigargin unter Kontrollbedingungen (offener Balken) und nach Inkubation mit Acetylcystein (gefüllte Balken) (** $p < 0.01$).

3.3.4 Einfluss von Acetylcystein auf den Calciumioneneinstrom *in vivo*

Die fluorezenzspektrophotometrische Messung des Calciumioneneinstroms über die Plasmamembran erfolgte zu Beginn und am Ende der Hämodialyse in Abwesenheit und Anwesenheit von Acetylcystein am Beispiel isolierter Monozyten von Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz. Für die fluorezenzspektrophotometrische Darstellung der zytosolischen Calciumionenkonzentration wurde wiederum der fluoreszierende Farbstoff Fura-2 verwendet.

Um den Calciumioneneinstrom und dessen Unterschiede zu Beginn und am Ende der Hämodialyse in Abwesenheit und in Anwesenheit von Acetylcystein nachzuweisen, wurde nach einer basalen Fluoreszenzmessung von 3 Minuten Calciumlösung in einer Endkonzentration von 30 mmol appliziert und die Änderung der Fluoreszenz-Ratio verglichen.

Abbildung 25 zeigt den Calciumioneneinstrom zu Beginn und am Ende der Hämodialyse in Abwesenheit von Acetylcystein bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz. Nach Zugabe von Calciumlösung stieg die Fluoreszenz-Ratio des basalen Ausgangswertes von 1.24 ± 0.01 (arbiträre Einheit) auf 1.95 ± 0.02 (arbiträre

Einheit) zu Beginn der Hämodialyse und auf 1.39 ± 0.01 (arbiträre Einheit) am Ende der Hämodialyse. Der Unterschied zwischen dem starken Calciumioneneinstrom zu Beginn und dem geringeren Calciumioneneinstrom am Ende der Hämodialyse ist signifikant ($p < 0.001$).

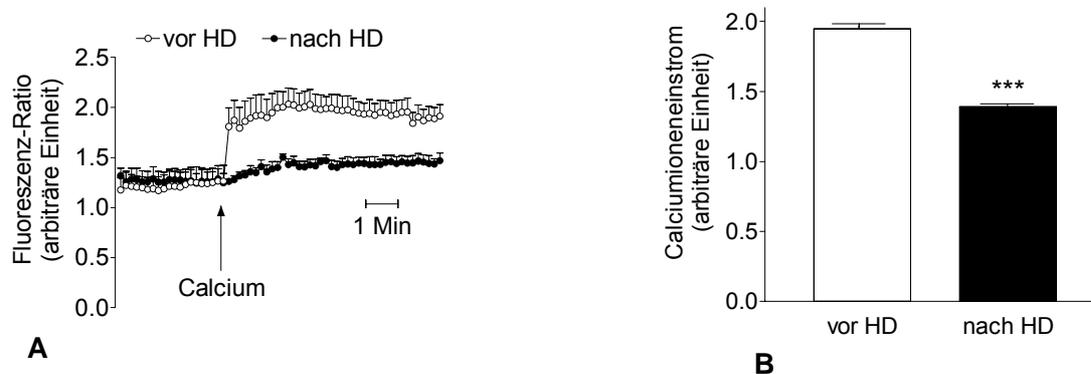


Abbildung 25. Calciumioneneinstrom am Beispiel isolierter Monozyten von Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz zu Beginn und am Ende der Hämodialyse in Abwesenheit von Acetylcystein. Die Veränderung der zytosolischen Calciumionenkonzentration wurde mittels Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 fluoreszenzspektrophotometrisch dargestellt.

A, Basale Fluoreszenz-Ratio (arbiträre Einheit) von Fura-2 bei 340 nm und 485 nm sowie Fluoreszenzanstieg nach Zugabe von Calciumlösung vor (offene Kreise) und nach (gefüllte Kreise) der Hämodialyse.

B, Darstellung der Daten als Mittelwerte \pm SEM. Unterschiede zwischen der Fluoreszenz-Ratio nach Zugabe von Calcium vor (offener Balken) und nach (gefüllte Balken) der Hämodialyse (***) $p < 0.001$.

Um den Einfluss antioxidativer Acetylcysteinmedikation während der Hämodialyse auf den Calciumioneneinstrom über die Plasmamembran zu untersuchen, wurde den Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz während der Hämodialyse intravenös Acetylcystein (5 g i.v. über 4 h) appliziert und der Calciumioneneinstrom zu Beginn und am Ende der Hämodialyse fluoreszenzspektrophotometrisch dargestellt.

Abbildung 26 zeigt den Calciumioneneinstrom zu Beginn und am Ende der Hämodialyse in Anwesenheit von Acetylcystein. Die Fluoreszenz-Ratio zeigte einen Anstieg des basalen Ausgangswertes von 0.68 ± 0.01 (arbiträre Einheit) auf 0.71 ± 0.01 (arbiträre Einheit) zu Beginn der Hämodialyse und auf 0.85 ± 0.01 (arbiträre Einheit) am Ende der Hämodialyse. Der Unterschied zwischen dem geringeren Calciumioneneinstrom zu Beginn und dem höheren Calciumioneneinstrom am Ende der Hämodialyse ist signifikant ($p < 0.001$).

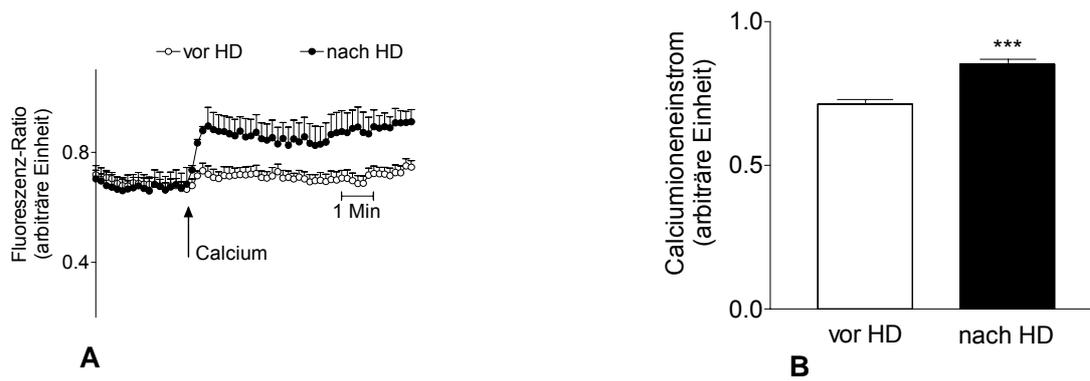


Abbildung 26. Calciumioneneinstrom am Beispiel isolierter Monozyten von Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz zu Beginn und am Ende der Hämodialyse in Anwesenheit von Acetylcystein. Die Veränderung der zytosolischen Calciumionenkonzentration wurde mittels Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 fluorenszspektrophotometrisch dargestellt.

A, Basale Fluoreszenz-Ratio (arbiträre Einheit) von Fura-2 bei 340 nm und 485 nm sowie Fluoreszenzanstieg nach Zugabe von Calciumlösung vor (offene Kreise) und nach (gefüllte Kreise) der Hämodialyse.

B, Darstellung der Daten als Mittelwerte \pm SEM. Unterschiede zwischen der Fluoreszenz-Ratio nach Zugabe von Calcium vor (offener Balken) und nach (gefüllte Balken) der Hämodialyse (***) $p < 0.001$.

Fluoreszenzspektrophotometrisch konnte gezeigt werden, dass es in Abwesenheit von Acetylcystein während der Hämodialyse zu einer Leerung der intrazellulären Calciumspeicher sowie zu einem verminderten transplasmamembranären Calciumioneneinstrom kommt. Dagegen zeigt sich in Anwesenheit von Acetylcystein während der Hämodialyse eine Füllung der intrazellulären Calciumspeicher sowie eine Zunahme des Calciumioneneinstroms über die Plasmamembran.

3.4 Einfluss von Acetylcystein auf die Expression von TRPC3-, TRPC5- und TRPC6-Proteinen

Um zu untersuchen, ob Acetylcystein seine oben beschriebene Wirkung auf die intrazelluläre Calciumhomöostase über eine direkte Interaktion mit Calcium-permeablen TRPC-Kanälen entfaltet, wurde die membranäre Expression der TRPC-Kanäle am Beispiel isolierter Monozyten von Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz untersucht. Es wurde Blut zu Beginn und am Ende einer Hämodialyse unter Kontrollbedingungen und nach intravenöser Acetylcysteinmedikation (5 g i.v. über 4 h) analysiert. Die Bestimmung erfolgte mittels in-cell Western Assay (Odyssey infrared imaging system, Licor GmbH, Bad Homburg) entsprechend den Vorschriften des Herstellers. Es wurden die TRPC3-, TRPC5- und TRPC6-Proteine sowie als Kontrolle das Referenzprotein GAPDH (Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) untersucht. Als spezifische, primäre Antikörper wurden rabbit anti-human TRPC3-, TRPC5- und TRPC6-Antikörper (1:1000; Almone Labs, Jerusalem, Israel) und goat anti-human Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase(GAPDH)-Antikörper (1:1000; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) verwendet. Als fluoreszierende, sekundäre Antikörper wurden IRDye800CW-infrared fluorescent dye-conjugated sheep anti-rabbit-IgG-Antikörper (1:1000; biomol/Rockland, Hamburg, Deutschland) sowie Alexa Fluor 680–allophycocyanin donkey anti-goat IgG-Antikörper (1:1000; Molecular Probes, Eugene, USA) eingesetzt. Die Emission des gebundenen Antikörpers IRDye800CW wurde bei 800nm bei einer Exzitationswellenlänge von 780nm, die Emission des gebundenen Antikörpers Alexa Fluor 680–allophycocyanin bei 700nm bei einer Exzitationswellenlänge von 680nm gemessen. Die Auswertung der jeweiligen TRPC-Fluoreszenz erfolgte im Verhältnis zur GAPDH-Fluoreszenz (Counts TRPC _{normiert} in arbiträrer Einheit).

Abbildung 27 zeigt den Effekt der Hämodialyse auf die Expression der TRPC-Proteine unter Kontrollbedingungen. Im Verlauf der vierstündigen Hämodialyse kam es zu einer signifikanten Verminderung der drei TRPC/GAPDH-Ratios (TRPC3/GAPDH, TRPC5/GAPDH, TRPC6/GAPDH).

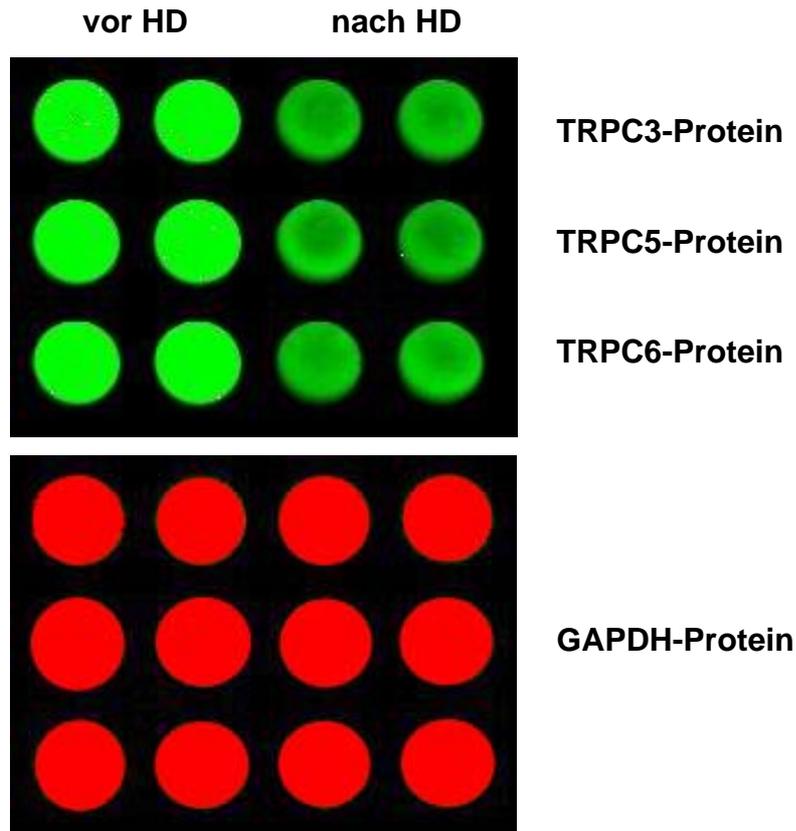


Abbildung 27. In-cell Western Assay zum gleichzeitigen Nachweis von TRPC3, TRPC5 und TRPC6 (**obere Abbildung**) mittels rabbit anti-human TRPC-Antikörpern und IRDye800CW-infrared fluorescent dye-conjugated sheep anti-rabbit-IgG antibody (grün fluoreszierend) und zum Nachweis von GAPDH (**untere Abbildung**) mittels goat anti-human GAPDH-Antikörper und Alexa Fluor 680–allophycocyanin donkey anti-goat IgG antibody (rot fluoreszierend) am Beispiel isolierter Monozyten von Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz. Die Monozytenisolierung erfolgte zu Beginn (vor HD) und am Ende der Hämodialyse (nach HD) bei $n=4$ Probanden.

Abbildung 28 zeigt diese Ergebnisse im Detail. Die TRPC3/GAPDH-Ratio zeigte eine signifikante Verminderung von 34730 ± 7834 (arbiträre Einheit) auf 21430 ± 3054 (arbiträre Einheit) (62% des Ausgangswertes) ($p < 0.05$). Die TRPC5/GAPDH-Ratio zeigte eine signifikante Verminderung von 41650 ± 7828 (arbiträre Einheit) auf 30810 ± 5605 (arbiträre Einheit) (74% des Ausgangswertes) ($p < 0.01$). Die TRPC6/GAPDH-Ratio zeigte eine signifikante Verminderung von 34370 ± 4358 (arbiträre Einheit) auf 22890 ± 2337 (arbiträre Einheit) (67% des Ausgangswertes) ($p < 0.01$).

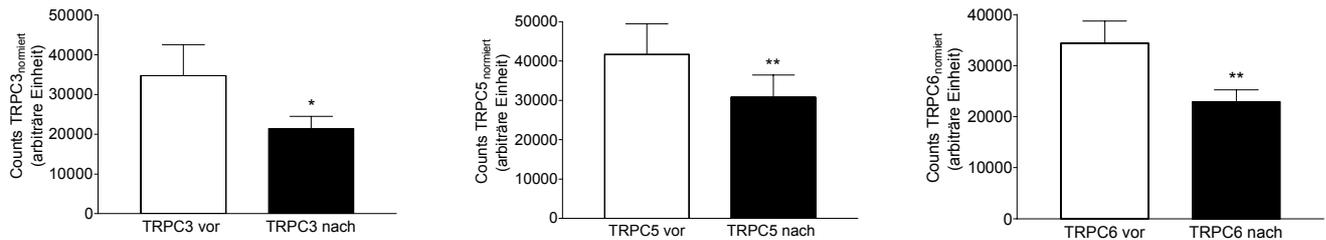


Abbildung 28. Darstellung der TRPC/GAPDH-Ratios (arbiträre Einheit) als Mittelwerte \pm SEM. Unterschiede zwischen der TRPC3-, TRPC5- und TRPC6-Expression vor (offene Balken) und nach (gefüllte Balken) der Hämodialyse unter Kontrollbedingungen ($n=4$; * $p<0.05$, ** $p<0.01$).

Diese Befunde zeigen, dass es während des Verlaufes einer Hämodialyse unter Kontrollbedingungen zu einer signifikanten Verminderung der membranären TRPC3-, TRPC5- und TRPC6-Expression am Beispiel isolierter Monozyten kommt.

Im Folgenden wurde der Effekt von Acetylcystein auf die Veränderung der membranären TRPC-Expression am Beispiel isolierter Monozyten während der Hämodialyse untersucht. **Abbildung 29** zeigt den Effekt der Hämodialyse bei gleichzeitiger intravenöser Acetylcysteinmedikation. Im Verlauf der vierstündigen Hämodialyse kam es zu minimalen, nicht-signifikanten Veränderungen der drei TRPC/GAPDH-Ratios (TRPC3/GAPDH, TRPC5/GAPDH, TRPC6/GAPDH). In **Abbildung 30** sind die Ergebnisse im Detail dargestellt. Die TRPC3/GAPDH-Ratio zeigte eine nicht-signifikante Verminderung von 37580 ± 7659 (arbiträre Einheit) auf 37170 ± 8544 (arbiträre Einheit) (99% des Ausgangswertes). Die TRPC5/GAPDH-Ratio zeigte eine nicht-signifikante Verminderung von 28590 ± 5002 (arbiträre Einheit) auf 26690 ± 4504 (arbiträre Einheit) (93% des Ausgangswertes). Die TRPC6/GAPDH-Ratio zeigte eine nicht-signifikante Verminderung von 16440 ± 1967 (arbiträre Einheit) auf 13900 ± 1700 (arbiträre Einheit) (85% des Ausgangswertes).

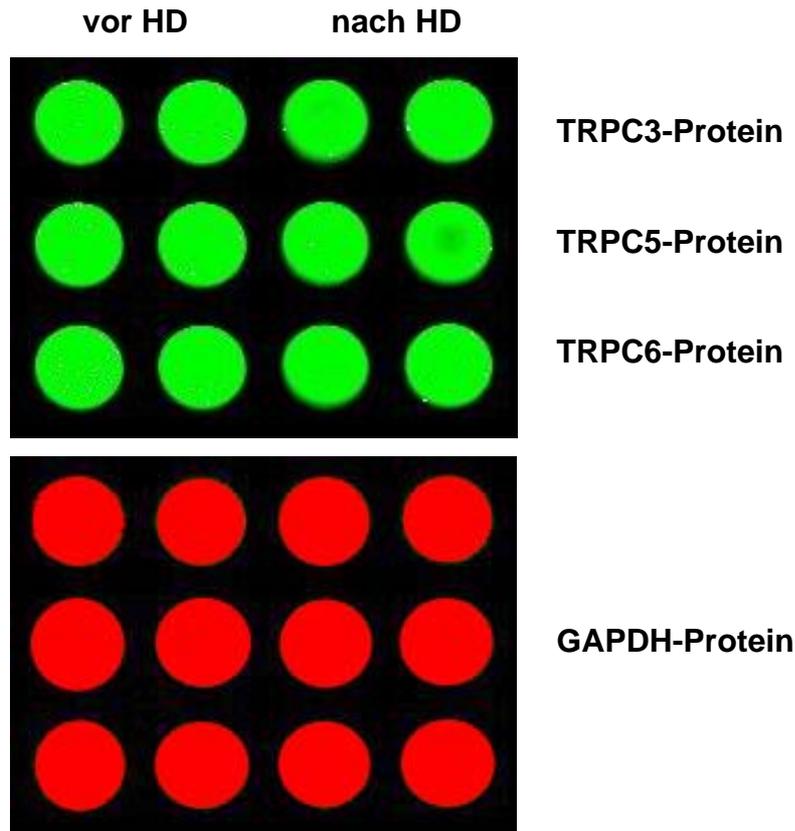


Abbildung 29. In-cell Western Assay zum gleichzeitigen Nachweis von TRPC3, TRPC5 und TRPC6 (**obere Abbildung**) mittels rabbit anti-human TRPC-Antikörpern und IRDye800CW-infrared fluorescent dye-conjugated sheep anti-rabbit-IgG antibody (grün fluoreszierend) und zum Nachweis von GAPDH (**untere Abbildung**) mittels goat anti-human GAPDH-Antikörper und Alexa Fluor 680–allophycocyanin donkey anti-goat IgG antibody (rot fluoreszierend) am Beispiel isolierter Monozyten von Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz. Die Monozytenisolierung erfolgte zu Beginn (vor HD) und am Ende der Hämodialyse (nach HD) nach intravenöser Acetylcysteinmedikation bei $n=4$ Probanden.

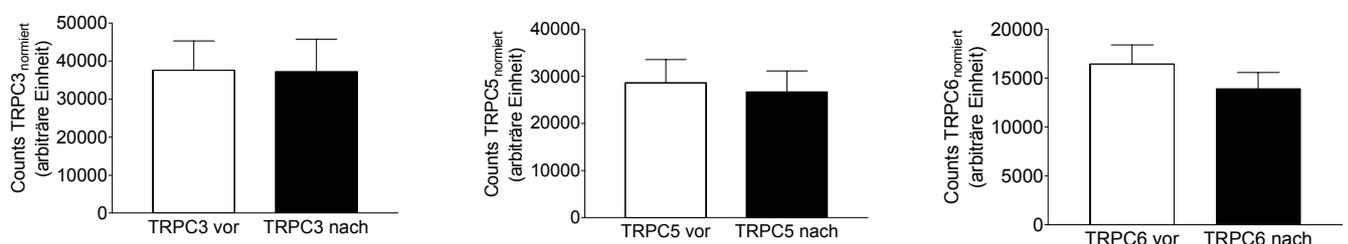


Abbildung 30. Darstellung der TRPC/GAPDH-Ratio (arbiträre Einheit) als Mittelwerte \pm SEM. Abbildung der TRPC3-, TRPC5- und TRPC6-Expression vor (offene Balken) und nach (gefüllte Balken) der Hämodialyse in Anwesenheit von Acetylcystein ($n=4$).

Diese Befunde zeigen, dass der Einfluss von intravenöser Acetylcysteinmedikation während des Verlaufes der Hämodialyse der signifikanten Verminderung der membranären TRPC3-, TRPC5- und TRPC6-Expression am Beispiel isolierter Monozyten entgegen wirkt.