

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Software:

digitale Photoplethysmographie

mittels Pulsoxymeter Vitaguard VG3000 GeTeMed Teltow

und Sensor LNOP-Adult SpO₂, Masimo Corp.,CA

Übertragung der Daten auf einen PC

mittels Vitawin; GeTeMed; Teltow

Bearbeitung und Analyse der Daten

mittels speziell entwickelter Software

in Microsoft Excel (Microsoft Excel for Windows, Microsoft Office 2000, Microsoft Corporation)

sowie GraphPad Prism 3.0 (GraphPad Software, San Diego,. CA)

2.2 Patienten und Untersuchungsgut

Die durchgeführte Untersuchung der Veränderungen der Gefäßregulation vergleicht vier unterschiedliche Patientengruppen. Insgesamt umfasst die Studie 364 untersuchte Patienten, wovon 145 Teilnehmer als Kontrollgruppe (Con) dienen.

40 Patienten leiden an (kompensierter) chronischer Niereninsuffizienz (CRF), weitere 124 Patienten erfahren eine Hämodialyse (HD) und 55 Patienten befinden sich im Zustand nach Nierentransplantation (NTX). Die vorliegende Untersuchung basiert auf der Auswertung von vorliegenden Rohdaten aus dem Zeitraum vom 14.01.2003 bis zum 19.06.2004.

Jeder dieser Patienten wurde über die Art und die Durchführung der Untersuchung ausführlich informiert und hatte dieser mittels einer schriftlichen Einverständniserklärung zugestimmt.

Die zuständige Ethik-Kommission der Charité bzw. des Universitätsklinikums Benjamin Franklin hatte für diese Untersuchungen ein Einverständnis erteilt.

Die Gruppe der chronisch Niereninsuffizienten teilte sich in 24 männliche (60,0%) und 16 weibliche Patienten (40,0%) In der Gruppe der hämodialysepflichtigen Patienten betrug das Geschlechterverhältnis 73 (66,97%) männlich zu 36 (33,03%) weiblich. Bei 15 der hämodialysierten Patienten konnten die vorhandenen Rohdaten keinem Patienten zugeordnet werden. Die Gruppe der Nierentransplantierten bestand aus 24 (43,64%) männlichen und 31 (56,36%) weiblichen Patienten und die Kontrollgruppe aus 71 (48,97%) männlichen und 74 (51,03%) weiblichen Teilnehmern.

Die glomeruläre Filtrationsrate und die Kreatinin-Clearance wurde bei allen Patienten abgeschätzt. Dazu wurden zwei verschiedene Algorithmen verwendet.

Die Formel nach Cockcroft-Gault (Cockcroft, Gault (1976)) schätzt die Kreatinin-Clearance unter Berücksichtigung des Alters und des Körpergewichtes, sowie der gemessenen Serum-Kreatininkonzentration des Patienten und gibt diese in Milliliter pro Minute an.

$$\text{Clearance(ml/min)} = (140 - \text{Alter}) * \text{Körpergewicht(kg)} / \text{Serum-Kreatinin(mg/dl)} * 72$$

(bei Frauen multipliziert mit dem Faktor 0,85)

Die MDRD-Formel (Modification of Diet in Renal Disease Study Group) (Levey et al (1999)) stützt sich auf das Alter des Patienten und der gemessenen Serum-Kreatininkonzentration und gibt die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) in Milliliter pro Minute bezogen auf 1,73 m² Körperoberfläche an.

$$\text{GFR(ml/min/1,73m}^2) = 186 * \text{Serum-Kreatinin(mg/dl)}^{\text{exp.-1,154}} * \text{Alter(Jahre)}^{\text{exp-0,203}}$$

(bei Frauen multipliziert mit dem Faktor 0,742)

Die Kreatinin-Clearances und die GFR der verschiedenen Patientengruppen, einschließlich der Standardfehler der Mittelwerte

(MDRD(ml/min/1,73m²) ± SEM / Cockcroft-Gault (ml/min) ± SEM) gibt **Tabelle 1** wieder.

Tabelle 1: Mittelwerte einschließlich der Standardfehler der Mittelwerte der berechneten glomerulären Filtrationsraten (GFR) nach der Formel nach der Modification of Diet in Renal Disease Study Group (MDRD) in ml/min/1,73 m² und der Kreatinin-Clearances nach der Formel nach Cockcroft-Gault in ml/min.

Tabelle 1	MDRD	Cockcroft-Gault
Kontrolle (Con)	85,45±2,2	87,04±3,6
Hämodialyse (HD)	9,91±1,0	11,63±0,9
Nierentransplantation (NTX)	36,39±3,0	42,51±3,4
Chronic Renal Failure (CRF)	28,92±0,9	30,01±1,0

Bei allen Patienten wurde während des Untersuchungszeitraum kontinuierlich die Sauerstoffsättigung mittels Pulsoxymetrie aufgezeichnet. Es wurden daraus die Mittelwerte der Sättigung einschließlich der Standardfehler der Mittelwerte (SEM) und das Minimum der aufgezeichneten Sättigungswerte berechnet. Zusätzlich wurden die Anzahl der Messepisoden à 150 Sekunden, die in ihrem Mittelwert eine Sättigung von 90% unterschreiten und die Anzahl der Messepisoden à 150 Sekunden, die in ihrem Minimum eine Sättigung von 90 % unterschreiten analysiert.

Tabelle 2 gibt eine Zusammenfassung der Daten zur Sauerstoffsättigung.

Tabelle 2: Sauerstoffsättigung während der Untersuchung. Die Tabelle enthält den Mittelwert der Sauerstoffsättigung (mean SPO2) in Prozent einschliesslich des Standardfehlers des Mittelwertes (SEM SPO2); das Minimum der registrierten Sättigungswerte (min SPO2) in Prozent; die Anzahl der Messepisoden à 150 Sekunden, die in ihrem Mittelwert (quer mean Anzahl Epi SPO2<90%) und in ihrem Minimum (quer minimum Anzahl Epi SPO2<90%) eine Sauerstoffsättigung von 90% unterschreiten.

Tabelle 2:	Hämodialyse	Chronic renal failure	Z.n.NTx	Control
mean SPO2 (%)	96,59	95,17	96,76	95,30
SEM mean SPO2	0,2	0,2	0,3	0,3
min SPO2 (%)	81,34	83,10	87,82	85,72
quer mean Anzahl Epi SPO2<90	4	6	3	9
quer minimum Anzahl Epi SPO2<90	9	29	5	14

Zum Zeitpunkt der Untersuchung wurden den Patienten zur klinischen und laborchemischen Charakterisierung die Blutdruckparameter bestimmt, Blut entnommen und das Gewicht bestimmt.

Tabelle 3 zeigt eine Zusammenfassung der Mittelwerte einschliesslich der Standardfehler der Mittelwerte (SEM) dieser klinischen-, klinisch-chemischen- und hämatologischen Daten.

Tabelle 3: Klinische und laborchemische Charakterisierung. Angegeben sind die Mittelwerte, einschließlich der Standardfehler der Mittelwerte.

Tabelle 3	Hämodialyse		Chronic renal failure		Z.n. NTx		Control	
	mean	SEM	mean	SEM	mean	SEM	mean	SEM
Alter (a)	64,92	1,23	71,77	0,68	50,87	2,03	65,21	1,20
Gewicht (kg)	69,11	1,51	77,23	0,94	68,84	1,66	75,86	1,75
RRsyst (mmHg)	142,36	2,85	139,95	1,67	139,07	2,83	134,35	1,98
RRdiast (mmHg)	74,63	1,62	72,21	1,00	78,76	1,66	73,20	1,13
RRmean (mmHg)	97,39	1,86	98,19	1,37	99,13	2,05	94,17	1,34
Pulsdruck (mmHg)	67,73	2,21	67,74	1,03	60,31	1,64	61,15	1,33
Pulsfrequenz (/min)	78,87	1,71	70,08	0,81	68,96	1,70	72,70	1,11
Leuko (/nl)	10,70	1,26	8,80	0,20	8,30	0,40	7,94	0,26
Ery (/pl)	3,30	0,07	4,02	0,05	4,27	0,09	4,43	0,10
Hb (g/dl)	9,86	0,18	11,84	0,12	12,65	0,28	13,04	0,16
Hkt (%)	29,73	0,01	36,05	0,00	37,79	0,01	38,81	0,00
MCV (fl)	90,72	0,71	88,62	0,84	88,72	0,63	88,82	0,61
MCH (pg)	30,11	0,28	30,00	0,14	35,03	5,16	32,48	1,95
Thrombo (/nl)	238,92	11,79	283,30	7,13	249,88	10,23	269,24	8,95
MPV (fl)	9,00	0,18	10,88	0,68	8,98	0,16	8,85	0,13
Kreatinin (µmol/l)	679,47	34,39	261,05	10,07	229,45	22,34	78,56	1,77
Harnstoff (mmol/l)	24,95	1,53	19,76	0,74	20,35	2,10	6,90	0,58
Harnsäure (µmol/l)	387,13	13,22	489,33	12,75	495,27	22,23	350,86	12,43
Natrium (mmol/l)	135,52	0,43	140,35	1,02	137,56	0,64	137,71	0,40
Kalium (mmol/l)	4,90	0,09	4,31	0,04	4,19	0,08	4,10	0,04
Calcium (mmol/l)	2,33	0,03	2,42	0,04	2,41	0,03	2,32	0,02
Phosphat (mmol/l)	3,30	1,54	1,35	0,03	1,24	0,05	1,15	0,02

2.3 Die digitale Photoplethysmographie

Allgemeines:

Die digitale Photoplethysmographie ist ein nicht-invasives und nahezu belastungsfreies Verfahren, um Blutvolumenänderungen in-vivo zu registrieren. Eine Quelle sendet Licht einer Wellenlänge im infraroten Bereich aus, welches je nach Beschaffenheit der durchstrahlten Materie abgeschwächt reflektiert auf einen Sensor trifft und dort registriert wird. Die Quelle und der Sensor befinden sich in einem Fingerclip integriert. Die einzige variable Größe, durch die eine Änderung der Lichtintensität bedingt sein kann, ist das durchströmende Blutvolumen pro Zeiteinheit. Somit kann man über eine Änderung der registrierten Intensität des empfangenen Lichtes indirekt auf eine Änderung des derzeitigen Blutvolumens rückschließen. .

Eine durchlaufende Pulswelle führt zu einer temporären Gefäßdehnung, dessen Ausmaß durch deren Elastizitätsparameter bestimmt ist. Je höher die Absorption des Lichtes beträgt, desto geringer ist die Reflexion. Der photoplethysmographisch gemessene Zahlenwert ist somit der Pulskurve, entsprechend des gemessenen Volumens indirekt proportional. Durch Bildung des reziproken Zahlenwertes lässt sich anschließend eine direkte Proportionalität erzeugen, die dann der eigentlichen Volumenpulswelle entspricht.

Durch Auftragung dieser Punkte in ein Koordinatensystem lässt sich somit eine fortlaufende Volumenpulswelle erstellen. (**Abbildung 3**).

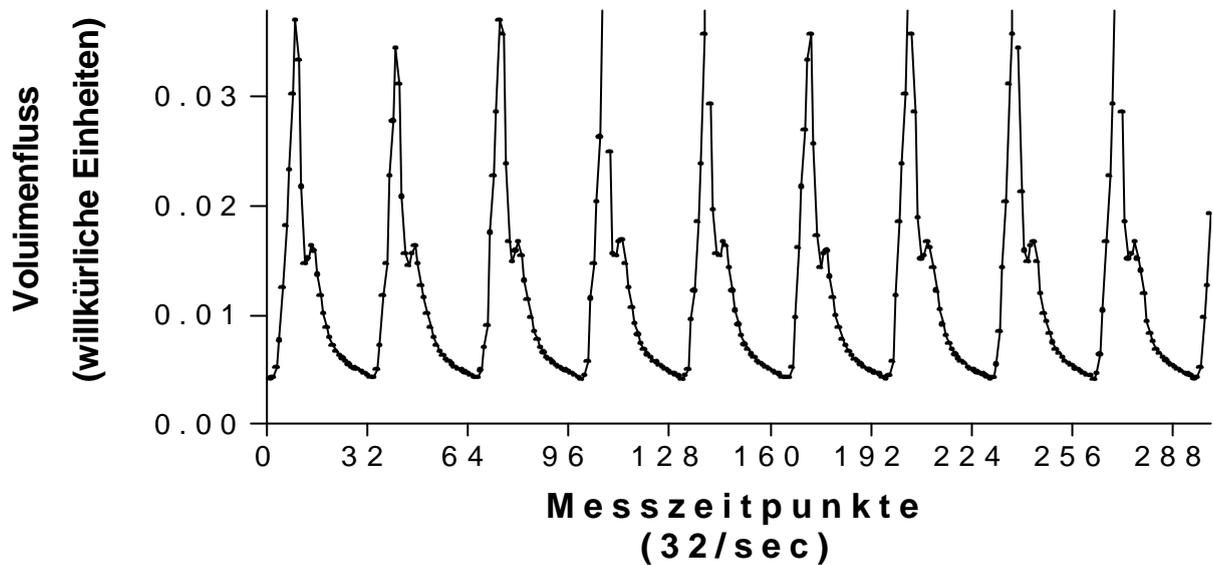


Abbildung 3: Photoplethysmographische Aufzeichnung von fortlaufenden Volumenpulswellen eines 79 jährigen hämodialysepflichtigen Patienten.

Der mit einem photoplethysmographischen Sensor (LNOP-Adult SpO₂, Masimo Corp.,CA) ausgestattete Fingerclip des verwendeten Pulsoxymeters (Vitaguard VG3000, GeTeMed, Teltow) wurde allen Patienten an den Mittelfinger geklemmt. Bei der Gruppe der hämodialysierten Patienten wurde der Finger kontralateral des Dialysezugangs gewählt, um gegenseitige Beeinträchtigungen des Messvorganges und des Dialyseverfahrens auszuschließen. Durch den Pulsoxymeter wurden dabei kontinuierlich 32 Werte pro Sekunde gemessen.

Die registrierten Daten wurden anschließend mittels eines Konvertierungsprogrammes (VitaWin; GeTeMed; Teltow) in Excel (Microsoft Excel for Windows, Microsoft Office 2000, Microsoft Corporation) eingefügt und zu einzelnen Messepisoden, bestehend aus jeweils 150 Sekunden, zusammengefasst.

Die Volumenpulskurve besteht aus zwei Anteilen (**Abbildung 4**). Der systolische Anteil, mit dem Amplitudenmaximum, wird vornehmlich über den direkten Weg, als Folge des Auswurfs arteriellen Blutvolumens aus dem linken Ventrikel während der Systole, konfiguriert. Der diastolische Anteil bildet sich infolge der Reflexion der Pulswelle in der Peripherie und hierbei vor allem in den unteren Körperabschnitten. (Millasseau et al (2002))

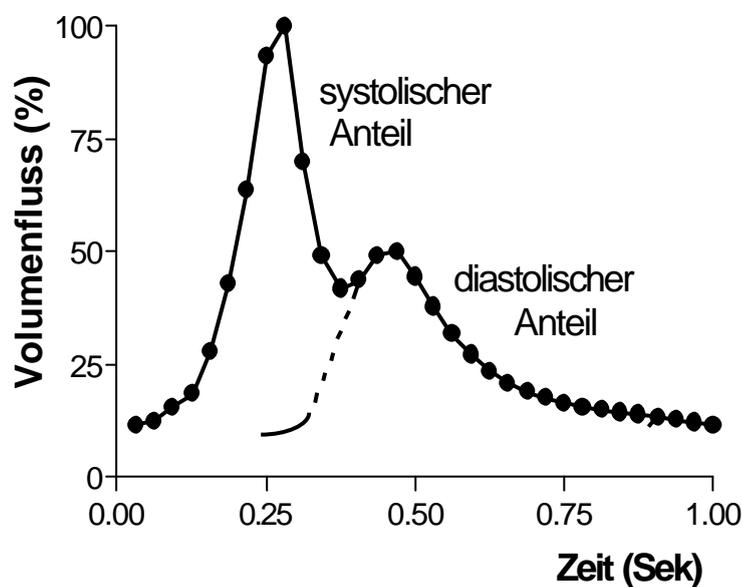


Abbildung 4: Volumenpulswelle, gemessen durch digitale Photoplethysmographie. Dargestellt ist der systolische Anteil, durch den Blutausswurf des linken Ventrikels, und nachfolgend der diastolische Anteil, in schematischer Abgrenzung (gestrichelte Linie) bedingt durch die Reflexion in der Peripherie.

Charakterisierung des absteigenden Kurvenanteils über den Vascular Index:

Die registrierte Volumenpulskurve besteht aus einem initialen, systolischen Anteil, der durch die Auswurfleistung des linken Ventrikels bestimmt wird und einer diastolischen „Schulterregion“, im absteigenden Anteil der Kurve, die durch die Reflexion der Pulswelle aus der Peripherie bedingt ist. Die Stärke dieser Reflexion wird maßgeblich von der Elastizität der peripheren Gefäße bestimmt und kann somit als Charakteristikum für den Gefäßzustand der peripheren Arterien angesehen werden.

Zur Beschreibung der diastolischen Schulterregion wurde die erste Ableitung der Pulscurve berechnet. (GraphPad Prism 3.0, GraphPad Software, San Diego, CA). (**Abbildung 5**) Das Minimum der ersten Ableitung kennzeichnet den Umkehrpunkt der Pulscurve, an den sich die Schulterregion anschließt. Die dritten bis siebenten Messwerte im Anschluss an den Wendepunkt wurden aussortiert und über die gesamte Episode gemittelt. Das prozentuale Verhältnis vom Mittelwert der Punkte drei bis sieben nach dem Wendepunkt zum absoluten Maximum, welches dem systolischen Amplitudenmaximum entspricht und zu einhundert gesetzt wird, charakterisiert nun die diastolische Schulterregion und wird im Folgenden als *Vascular Index* (RI) bezeichnet.

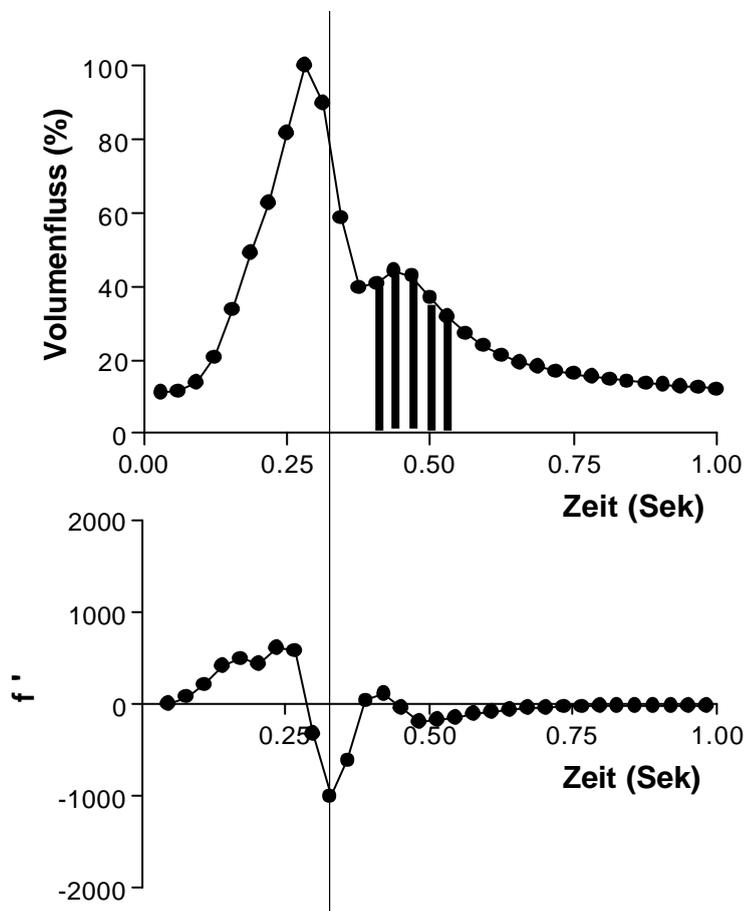


Abbildung 5: Pulscurve und deren erste Ableitung eines 79-jährigen hämodialysepflichtigen Patienten. Das Lot durch das Minimum der ersten Ableitung kennzeichnet den Wendepunkt der Pulscurve. Der dritte bis siebente Messpunkt im Anschluss an den Wendepunkt bildet die charakteristische Schulterregion. Das prozentuale Verhältnis der Mittelwerte der Schulterregion zum Amplitudenmaximum wird als *Vascular Index* bezeichnet.

Zusätzlich zum Vascular Index als Mittelwert einer Episode von 150 Sekunden, wurden zwei weitere Indices analysiert. Diese Indices dienen der gesonderten Beschreibung der Gefäßveränderungen im sofortigen Anschluss an eine Ischämiephase. Die sogenannte „flow-mediated-dilation“ (FMD) wird vor allem durch EDRF (endothelium-derived-relaxing-factor) vermittelt, welcher später als Stickstoffmonoxid (NO) identifiziert werden konnte (Palmer et al (1987). Dessen Synthese durch die NO-Synthase beruht auf der Funktionstüchtigkeit des Endothels. Somit kann man die unmittelbare Reaktion des Gefäßsystems auf eine Ischämie, die FMD, als Ausdruck der Funktionalität des Endothels betrachten. (Corretti et al (2002); Hansell et al (2004); Silber et al (2001); Joannides et al (1995); Pohl et al (1986); Kelm (2002))

Um den ipsilateralen Oberarm des mit dem Pulsoxymeter versehenen Fingers befand sich eine Blutdruckmanschette. Nach der Aufzeichnung der Basalwerte wurde diese für einen Zeitraum von fünf Minuten auf suprasystolische Werte gepumpt, um eine absolute Ischämie in dieser Zeit zu simulieren. Zur genauen Analyse der unmittelbaren Veränderungen im Anschluss an die Stauphase wurde der auszuwertende Messzeitraum auf 15 Sekunden beschränkt. Der Mittelwert der Messpunkte der Schulterregion in dieser Zeitspanne wurde wiederum als prozentualer Anteil des Pulskurvenamplitude berechnet und im Folgenden als *RIreactive-hyperemia* bezeichnet.

Zusätzlich wurde aus dieser Periode der Vascular Index mit der höchsten prozentualen Amplitude bestimmt und als *RImaximum* beschrieben.

Abbildung 6 zeigt den typisch-initialen Abfall und die asymptotische Annäherung an die Erholungswerte des Vascular Index im Anschluss an die Stauphase als Ausdruck einer reaktiven Hyperämie.

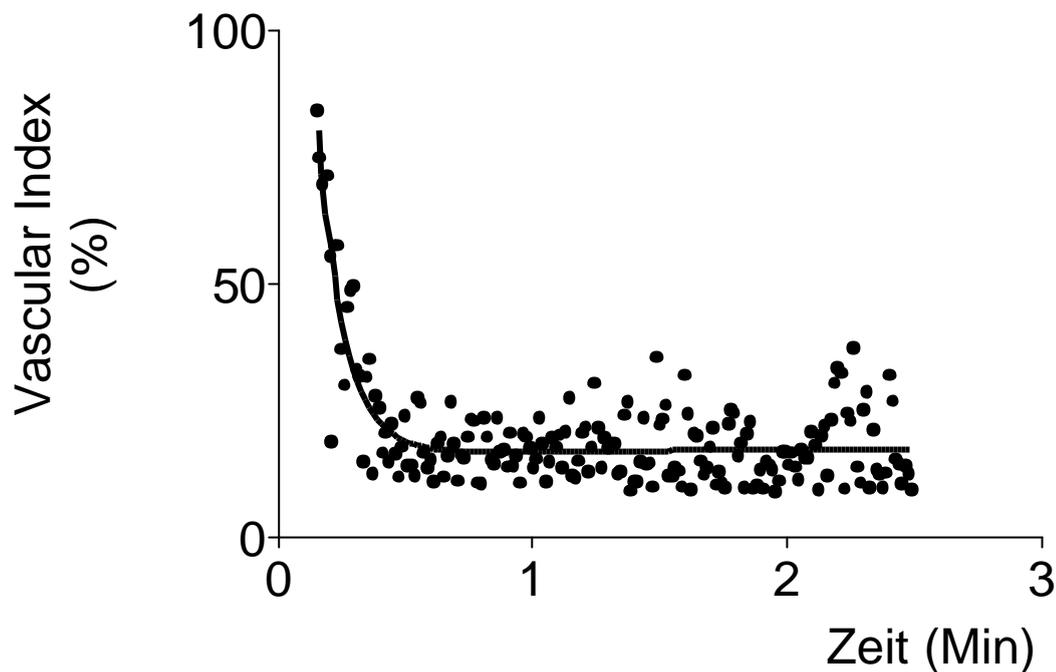


Abbildung 6: Abfall des Vascular Index einer 82 jährigen Patientin aus der Kontrollgruppe innerhalb der ersten Messepisode (150 Sekunden) im Anschluss an die Stauphase als Ausdruck der reaktiven Hyperämie

Charakterisierung der Pulskurven über die SDPTG:

(second derivative of photoplethysmography)

Um eine jeweils für den individuellen Patienten repräsentative Pulskurve darzustellen, wurden zunächst jeweils zehn aufeinanderfolgende Pulskurven gemittelt. (**Abbildung 7**)

Dadurch konnte die Anfälligkeit der Messungen gegenüber Störgrößen und Artefakten vermindert werden. Dieses Schema wurde sowohl in der Messepisode vor der Stauphase, zur Erstellung einer basalen Pulskurve, als auch in der Episode direkt im Anschluss an die Stauphase, zur Erstellung einer reaktiven Pulskurve, angewandt.

Da die originale Pulskurve nur sehr schwer zu beschreiben ist, entwickelten Takazawa et al 1998 eine Methode, die zweite Ableitung der originalen Pulskurve zu analysieren. Somit können die charakteristischen Wendepunkte der Pulskurve genauer lokalisiert, und dadurch die Pulskurve besser interpretiert werden.

Die zweite Ableitung der Pulskurve (SDPTG) besteht aus vier aufeinanderfolgenden Extremwerten, die den Umkehrpunkten der Originalkurve entsprechen. (Abbildung 7) In der Literatur werden diese Extrema nach dem Vorbild von Takazawa et al (1998) ihrem chronologischen Auftreten nach als „a“, dem initialen Maximum; „b“, dem sich anschließenden Minimum; „c“, dem erneuten Maximum und „d“, dem terminalen Minimum bezeichnet. Anschließend werden zur Charakterisierung der Pulskurven die Verhältnisse der absoluten Beträge der Punkte „b“ (B) und „d“ (D) zum absoluten Betrag des Punktes „a“ (A) berechnet (B/A und D/A).

Der Quotient „B/A“ spiegelt dabei vornehmlich die Gefäßeigenschaften der großen Gefäße wieder, da hierbei vor allem der initiale, systolische Kurventeil charakterisiert wird, während das Verhältnis „D/A“ durch Einbeziehung des distalen Pulswellenanteils eher die Verhältnisse der peripheren Gefäße berücksichtigt.

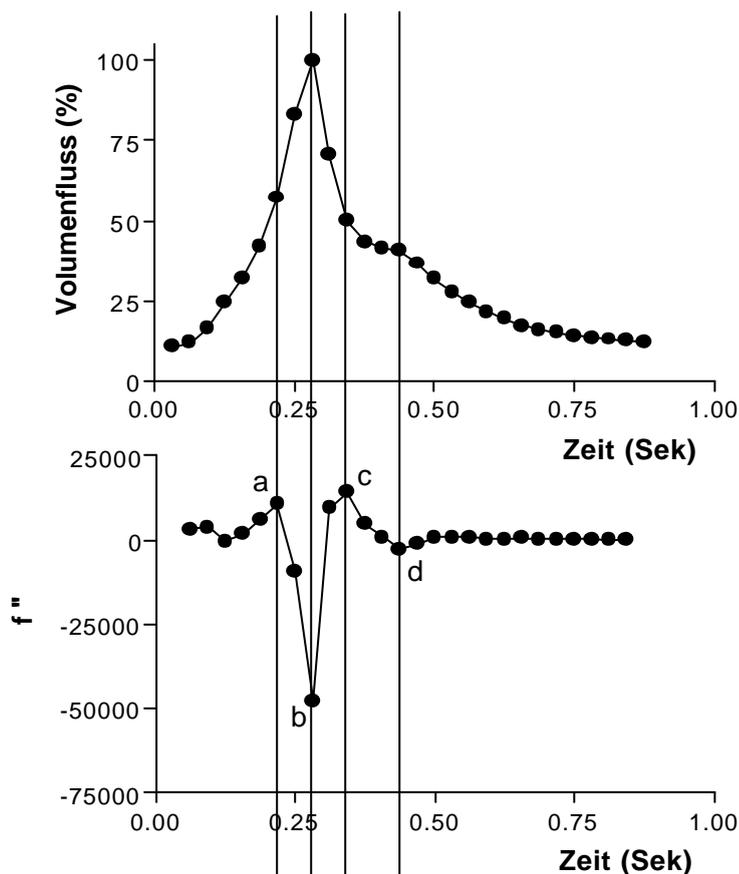


Abbildung 7: Pulskurve und deren zweite Ableitung (second derivative of photoplethysmography (SDPTG)) eines 33-jährigen nierentransplantierten Patienten. Die Extremwerte der zweiten Ableitung sind nach ihrer chronologischen Erscheinung als Punkte a-d bezeichnet und kennzeichnen die Wendepunkte in der Pulskurve.

2.4 Abschätzung der Lebenserwartung

Zur Abschätzung der Lebenserwartung und der Gefährdung hinsichtlich kardiovaskulärer Ereignisse durch die Verwendung des Vascular Index (RI) und der SDPTG wurden 90 Probanden aus der Gruppe der hämodialysepflichtigen Patientenschaft im Anschluss an die Bestimmung der Pulscurvenparameter auf das Eintreten eventueller Ereignisse oder des Todes nachkontrolliert. Dabei wurden sowohl das Gefäßsystem direkt betreffende Ereignisse, als auch das Gefäßsystem indirekt betreffende Ereignisse berücksichtigt, welche sich über eine Mikroinflammation negativ auf die Funktionalität der Gefäße auswirken

Als direkte Ereignisse wurden dabei folgende Diagnosen gewertet:

Myokardinfarkt (MI)

Angina Pectoris / Koronare Herzkrankheit (A.P./KHK)

Periphere Arterielle Verschlusskrankheit (pAVK)

Apoplex

Als indirekte Ereignisse wurden die folgenden Diagnosen gewertet:

Schwere Infektion

Maligne Entartung

Zur Beurteilung einer bestehenden Korrelation der Ereignisse und der Lebenserwartung mit dem Vascular Index wurde zunächst der Median (M) der basalen RI-Werte aus der Gruppe der 90 nachkontrollierten hämodialysepflichtigen Patienten ermittelt und das Patientengut in zwei Gruppen eingeteilt. Gruppe eins bestand aus hämodialysepflichtigen Patienten mit einem basalen RI oberhalb des ermittelten Medians ($RI_{\text{basal}} > M$) und Gruppe zwei aus solchen unterhalb des ermittelten Medians. ($RI_{\text{basal}} < M$)

Durch eine Kontingenztabelle, welche die eingetretenen Ereignisse, wie auch Todesfälle, der entsprechenden Gruppe zuordnet, konnte eine eventuell bestehende Korrelation beurteilt werden. Anschließend wurden in beiden Gruppen prozentuale Überlebenskurven erstellt, welche die individuellen Überlebenszeiträume bis zum Eintritt eines Ereignisses oder des Todes bei den einzelnen Mitgliedern einer jeweiligen Gruppe berücksichtigen.

Zur Beurteilung einer bestehenden Korrelation der Ereignisse und der Lebenserwartung mit der SDPTG wurden die ermittelten Quotienten B/A, sowie D/A herangezogen. Dabei wurden, analog zur Vorgehensweise beim Vascular Index, die Mediane der Quotienten ermittelt und das Patientengut entsprechend aufgeteilt (B/A>M; B/A<M; D/A>M; D/A<M). Anschließend wurden bei der SDPTG, wie auch schon beim Vascular Index, eventuell bestehende Korrelationen durch entsprechende Kontingenztabellen und prozentuale Überlebenskurven beurteilt.

2.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der ermittelten Daten erfolgte durch die Verwendung von GraphPad Prism 3.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) und Microsoft Excel (Microsoft Excel for Windows, Microsoft Office 2000, Microsoft Corporation). Alle kontinuierlichen Daten sind, sofern nicht gesondert angegeben, als Mittelwerte \pm der Standardfehler der Mittelwerte (SEM) angegeben. Alle Daten wurden unter Verwendung parametrischer Tests verglichen. Beim Vergleich von zwei Gruppen mittels Student t-Test und beim Vergleich von mehr als zwei Gruppen mittels ANOVA und Bonferronis multiple comparison post-Test. Ein $p < 0,05$ wurde als signifikanter Unterschied gewertet und mit einem Sternchen (*) markiert. Ein $p < 0,01$ wurde mit zwei Sternchen (**), und ein $p < 0,001$ mit drei Sternchen (***) markiert. Die einzelnen Korrelationen der Pulscurveigenschaften mit den klinischen und laborchemischen Parametern wurden unter Verwendung der linearen Regression und der nicht-parametrischen Spearman-Correlation bewertet. Die Festlegung des Konfidenz-Intervalls erfolgte auf 95%. Die Überlebenskurven wurden nach der Kaplan-Meier-Methode berechnet. Zur Abschätzung des Risikos wurde Fisher's Exact Test verwendet.