

Entwicklung klinischer Methoden zur vermehrten Abtrennung proteingebundener Urämie-Toxine im Rahmen einer extrakorporalen Therapie

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Falko Böhringer
(geb. Brettschneider)

aus Berlin
2013

Zeitraum der Bearbeitung: Mai 2008 bis Dezember 2011 und April 2012
bis Mai 2013

in der Medizinischen Klinik für Nephrologie der Medizinischen Fakultät
Charite – Universitätsmedizin Berlin

in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Joachim Jankowski

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Joachim Jankowski

2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Volker Haucke

Datum der Disputation: 30.04.2014

Inhaltsverzeichnis

1.	 EINLEITUNG	1
1.1	Niereninsuffizienz	1
1.2	Nierenersatztherapie	2
1.3	Extrakorporale Verfahren	4
1.4	Urämie-Toxine	5
1.4.1	Proteingebundene Urämie-Toxine	5
1.4.2	Phenyllessigsäure	7
1.4.3	p-Kresylsulfat	8
1.4.4	Indoxylsulfat	9
1.4.5	p-Hydroxyhippursäure	10
1.5	Limitationen der konventionellen Dialysetherapie	11
1.6	Bindung proteingebundener Urämie-Toxine an Plasmaproteine	12
1.7	Abschwächung der Bindung proteingebundener Urämie-Toxine an Plasmaproteine	13
1.8	Zielsetzung der Dissertationsarbeit	14
2.	 METHODEN	16
2.1	Reversed-Phase-Chromatographie	16
2.2	Größenausschluss-Chromatographie	17
2.3	Elektrospray-Ionisations Massenspektrometrie	17
2.4	Die NMR-Spektroskopie	18
2.5	UV/VIS-Spektroskopie	18
2.6	Aufbau von Hämodialysegeräten	19
2.7	Aufbau des FPAD-Systems	20
3.	 EXPERIMENTELLER TEIL	23
3.1	Darstellung von aromatischen Sulfonsäureestern (p-Kresylsulfat)	23
3.2	Elutionsmittelvergleiche in der Ionenpaar-Reversed-Phase-Chromatographie	24
3.2.1	Ionenpaar-Reversed-Phase-Chromatographie von Dinukleotiden unter Verwendung der Ionenpaar-Reagenz Triethylammoniumacetat	24
3.2.2	Ionenpaar-Reversed-Phase-Chromatographie von Dinukleotiden unter Verwendung der Ionenpaarreagenz Tetrabutylammoniumsulfat	24
3.2.3	Ionenpaar-Reversed-Phase-Chromatographie von Peptiden unter Verwendung der Ionenpaar-Reagenz Trifluoressigsäure	25
3.2.4	Ionenpaar-Reversed-Phase-Chromatographie von tryptischen Peptiden unter Verwendung der Ionenpaar-Reagenz Trifluoressigsäure	25
3.2.5	Ionenpaar-Reversed-Phase-Chromatographie von Proteinen unter Verwendung der Ionenpaar-Reagenz Trifluoressigsäure	26
3.3	Entwicklung eines Dialyseverfahrens zur vermehrten Abtrennung proteingebundener Urämie-Toxine bei erhöhter Ionenstärke	26
3.3.1	Bestimmung des proteingebundenen Anteils von Phenyllessigsäure, Indoxylsulfat und p-Kresylsulfat in Abhängigkeit von steigenden Kochsalzkonzentrationen	26
3.3.2	Bestimmung der Enzymaktivität ausgewählter Plasmaproteine bei erhöhter Ionenstärke	27
3.3.3	Bestimmung des Effekts erhöhter Ionenstärke auf die Struktur von Plasmaproteinen	29
3.3.4	Bestimmung der Abtrennrate von Phenyllessigsäure, Indoxylsulfat und p-Kresylsulfat während einer <i>in vitro</i> -Hämodialyse einer Proteinlösung unter hypertonen Kochsalzbedingungen	30
3.3.5	Entwicklung eines modifizierten extrakorporalen Hämodialyseverfahrens mit prädilutischer hypertoner Kochsalzinfusion	32
3.3.6	Bestimmung einer hämokompatiblen Kochsalzkonzentration bei einer <i>in vitro</i> -Hämodialyse mit prädilutischer, hypertoner Kochsalzinfusion	34
3.3.7	Bestimmung der Hämolyserate einer <i>in vitro</i> -Hämodialyse mit prädilutischer, hypertoner Kochsalzinfusion	35
3.3.8	Bestimmung der Hämolyserate einer <i>in vitro</i> -Blutrezirkulation mit hypertoner Kochsalzaddition	35
3.4	Entwicklung eines Dialyseverfahrens mit vermehrter Abtrennung proteingebundener Urämie-Toxine durch Einsatz elektromagnetischer HF-Felder	36

3.4.1	<i>In-vitro</i> -Dialyse einer mit proteingebundenen Urämie-Toxinen versetzten Albuminlösung in Anwesenheit elektromagnetischer HF-Felder	36
3.4.2	Entwicklung eines automatisierten Testsystems zur Identifizierung elektromagnetischer Feldfrequenzen, die eine vermehrte Abtrennung von proteingebundenen Urämie-Toxinen während der Dialyse bewirken	37
3.4.3	Durchführung eines Rezirkulationsexperiments unter Verwendung des Testsystems	42
3.4.4	Durchführung eines Rezirkulationsexperimentes mit humanem Plasma unter Verwendung des elektrischen Feldaufbaus	42
3.4.5	Bestimmung des Einflusses eines hochfrequenten elektrischen Feldes auf die Enzymaktivität von Plasmaproteinen	43
3.4.6	Bestimmung des Einflusses eines hochfrequenten elektrischen Feldes auf die dreidimensionale Struktur von Plasmaproteinen	44
3.5	Entwicklung, Validierung und Etablierung eines adsorptiven Verfahrens in der extrakorporalen Nierenersatztherapie zur vermehrten Abtrennung proteingebundener Urämie-Toxine	45
3.5.1	Bestimmung von Adsorptionscharakteristika eines neutralen Adsorbers und eines kationischen Adsorbers	45
3.5.2	Das FPAD-Verfahren in der extrakorporalen Nierenersatztherapie im Rahmen einer klinischen Studie	46
3.5.3	Durchführung der FPAD-Behandlung und Dialysebehandlung	47
4.	ERGEBNISSE	49
4.1	Darstellung aromatischer Sulfonsäureester (p-Kresylsulfat)	49
4.2	Elutionsmittelvergleiche in der Ionenpaar-Reversed-Phase-Chromatographie	50
4.3	Entwicklung eines Dialyseverfahrens mit vermehrter Abtrennung proteingebundener Urämie-Toxine bei erhöhter Ionenstärke	56
4.3.1	Proteinbindung von Phenylelessigsäure, Indoxylsulfat und p-Kresylsulfat bei erhöhter Ionenstärke	56
4.3.2	Enzymaktivitäten ausgewählter Plasmaproteine nach Inkubation bei erhöhter Ionenstärke	60
4.3.3	Strukturanalyse ausgewählter Plasmaproteine nach Inkubation bei erhöhter Ionenstärke	62
4.3.4	Abtrennrates proteingebundener Urämie-Toxine bei einer <i>in vitro</i> -Dialyse bei erhöhten Kochsalzbedingungen	66
4.3.5	Hämolysate von humanem Vollblut bei einer <i>in-vitro</i> -Hämodialyse bei erhöhter Ionenstärke	69
4.4	Entwicklung eines Dialyseverfahrens mit vermehrter Abtrennung proteingebundener Urämie-Toxine durch Einsatz hochfrequenter elektromagnetischer Felder	72
4.4.1	Einfluss hochfrequenter elektromagnetischer Felder auf die Freisetzungsrates proteingebundener Urämie-Toxine aus der Proteinbindung	72
4.4.2	Entwicklung eines Testsystems zur Identifizierung elektromagnetischer HF-Feldfrequenzen auf die Abtrennrates proteingebundener Urämie-Toxine	73
4.4.3	Abtrennung proteingebundener Urämie-Toxine aus humanem Plasma in Anwesenheit elektrischer HF-Felder	76
4.4.4	Abtrennung proteingebundener Urämie-Toxine aus einer Albuminlösung in Anwesenheit elektrischer und magnetischer HF-Felder	77
4.4.5	Einfluss hochfrequenter elektrischer Feldfrequenzen auf die Enzymaktivität ausgewählter Plasmaproteine	79
4.4.6	Einfluss hochfrequenter elektrischer Feldfrequenzen auf die dreidimensionale Struktur von rezirkuliertem Albumin	80
4.5	Entwicklung, Validierung und Etablierung eines adsorptiven Verfahrens in der extrakorporalen Nierenersatztherapie	81
4.5.1	Adsorptionseigenschaften der Adsorber-Resine des FPAD-Verfahrens	81
4.5.2	Etablierung eines adsorptiven Verfahrens zur extrakorporalen Nierenersatztherapie im Rahmen einer klinischen Studie	86
5.	DISKUSSION	95
5.1	Entwicklung eines Dialyseverfahrens mit vermehrter Abtrennung proteingebundener Urämie-Toxine bei erhöhter Ionenstärke	96
5.2	Entwicklung eines Hämodialyseverfahrens mit vermehrter Abtrennung proteingebundener Urämie-Toxine durch elektromagnetische HF-Felder	100

5.3	Entwicklung, Validierung und Etablierung eines adsorptiven Verfahren in der klinischen Nierenersatztherapie mit verbesserter Abtrennung proteingebundener Urämie-Toxine	103
6.	ZUSAMMENFASSUNG	106
7.	SUMMARY	109
8.	WISSENSCHAFTLICHE VERÖFFENTLICHUNGEN	112
8.1	Wissenschaftliche Artikel	112
8.2	Präsentationen	112
8.3	Patente	112
9.	LITERATURVERZEICHNIS	113
10.	ANHANG	122
10.1	Danksagung	122
10.2	Abkürzungsverzeichnis:	123
10.3	Pufferzusammensetzungen	123

1. Einleitung

Die Nieren spielen eine zentrale Rolle bei der Entgiftung des Körpers, indem sie harnpflichtige Substanzen, die als Urämie-Toxine bezeichnet werden [1, 2], aus dem Blut entfernen. Darüber hinaus sind Nieren bei der Regulation des Flüssigkeits-, Elektrolyt- und Hormonhaushalts zentral beteiligt [3]. Können die Nieren diese Funktionen nicht mehr erfüllen, würde die Person aufgrund der intrinsisch induzierten Vergiftung und der Regulationsprobleme des Flüssigkeits-, Elektrolyt- und Hormonhaushalts versterben [3, 4]. Die betroffene Person ist daher auf die Dialyse / Nierenersatztherapie oder auf eine Nierentransplantation angewiesen. Da jedoch gegenwärtig ein Mangel an Spenderorganen besteht, kommt für den Großteil der betroffenen Personen mit chronischer Niereninsuffizienz nur die Nierenersatztherapie in Form der Dialyse in Frage [5].

1.1 Niereninsuffizienz

Weltweit steigt die Inzidenz von Nierenerkrankungen [6-8], weil chronische Nierenerkrankungen (chronic kidney disease, CKD) mit anderen vermehrt auftretenden Krankheiten wie Adipositas [9, 10], Hypertonie [11], kardiovaskulären Erkrankungen (cardiovascular disease, CVD) [12, 13] und Diabetes mellitus [14] assoziiert sind. Klinisch wird zwischen *akuter* und *chronischer Niereninsuffizienz* unterschieden. Die *akute Niereninsuffizienz* ist ein durch externe Ereignisse wie Unfälle, Medikamenten-, Drogenabusus oder Multi-Organversagen induziertes Nierenversagen. Dagegen wird die *chronische Niereninsuffizienz* durch einen progressiven Untergang des Nierengewebes und eine verminderte glomeruläre Filtrationsmenge charakterisiert [5]. Chronisch-niereninsuffiziente Patienten sind auf regelmäßige Dialysebehandlungen angewiesen. Die konventionelle Dialyse kann das Überleben eines chronisch-niereninsuffizienten Patienten sichern, allerdings ist die Lebenserwartung chronisch-niereninsuffizienter Patienten drastisch reduziert, da im Laufe der Nierenersatztherapie ein progressiver Verlauf von kardiovaskulären Erkrankungen besteht. 50 % der Todesfälle von terminal-niereninsuffizienten Patienten in der westlichen Welt sind auf kardiovaskuläre Erkrankungen zurückzuführen [12, 15]. Chronische Nierenerkrankungen und kardiovaskuläre Erkrankungen sind miteinander assoziiert(), da eine verminderte Nierenfunktion die Progression kardiovaskulärer Erkrankungen fördert und kardiovaskuläre Dysfunktionen ihrerseits die fortschreitende Verminderung der Nierenfunktion begünstigen. So tritt eine links-ventrikuläre Hypertrophie, eine Gewebsvergrößerung der linken Herzkammer, bei 80 % der chronisch-niereninsuffizienten Patienten am Anfang der Nierenersatztherapie auf, ein akutes Koronarsyndrom und ein Myokardinfarkt haben eine jährliche Inzidenz von 10 % in dieser Patienten-

gruppe [16-18]. Darüber hinaus hat diese Patientengruppe ein erhöhtes Schlaganfallrisiko [19]. Die kardiovaskulären Erkrankungen führen zu einer gegenüber der Normalbevölkerung stark erhöhten Mortalität dieses Patientenkollektivs [20]. Ursächlich für die erhöhte Morbidität und Mortalität chronisch-niereninsuffizienter Patienten ist die unzureichende Funktionalität der konventionellen Dialysetherapie. Während die Nierenfunktion eine von regulativen Mechanismen gesteuerte Kombination aus aktiven und passiven Transportprozessen darstellt, ist die konventionelle Dialyse eine auf Konzentrationsdifferenzen basierende Filtration oder vielmehr eine Diffusion durch eine semipermeable Membran. Deswegen imitiert die konventionelle Dialyse die natürliche Nierenfunktion nur unzureichend.

Obwohl niedermolekulare, hydrophile Urämie-Toxine effektiv durch konventionelle Dialyseverfahren aus dem Körper des Patienten entfernt werden können [21], werden niedermolekulare hydrophobe und aromatische Urämie-Toxine nur unzureichend entfernt [22, 23]. Hydrophobe, aromatische Urämie-Toxine sind Stoffwechselendprodukte der Aminosäuredegradation und liegen aufgrund ihrer physikochemisch erhöhten Hydrophobizität zu einem erheblichen Teil proteingebunden im Blut des Patienten vor [17, 24-26]. Die Proteinbindung erhöht die effektive molekulare Größe der hydrophoben Urämie-Toxine, sodass sie nur vermindert die Poren der Dialysemembran passieren können. Während der Dialyse wird daher nur der ungebundene Anteil der proteingebundenen Urämie-Toxine aus dem Blut des Patienten entfernt, der proteingebundene Anteil verbleibt dagegen im Körper [23]. Da aus dem Reservoir des proteingebundenen Anteils kontinuierlich Urämie-Toxine von den Proteinen freigesetzt werden, stellen sich kurze Zeit nach Beendigung der Dialysebehandlung gemäß des Massenwirkungsgesetzes hohe Konzentrationen an ungebundenen Urämie-Toxinen ein [16, 21, 27].

1.2 Nierenersatztherapie

Die Nierenersatztherapie in Form konventioneller Dialyseverfahren stellt einen osmotischen Vorgang in Form einer Diffusion durch eine semipermeable Membran dar. Niedermolekulare Moleküle werden dabei mittels Diffusion und Filtration über eine Konzentrationsdifferenz aus dem Blut ins Dialysat überführt, während Blutzellen und hochmolekulare Moleküle wie Proteine im Blut verbleiben. Die Nierenersatztherapie wird begonnen, wenn die Nierenleistung soweit vermindert ist, dass Serum-Kreatinin-Konzentrationen von mehr als $10 \text{ mg}\cdot\text{dl}^{-1}$ und Harnstoff-Konzentrationen von mehr als $100 \text{ mg}\cdot\text{dl}^{-1}$ auftreten und weitere urämische Phänomene wie Azidose, Hyperhydratation oder Hyperkaliämie diagnostiziert werden [5].

Grundsätzlich wird zwischen der Peritonealdialyse und der extrakorporalen Dialysetherapie unterschieden: Die Peritonealdialyse nutzt das stark durchblutete Bauchfell des Patienten als Membran zum Übergang harnpflichtiger Urämie-Toxine in das im Bauchraum befindliche Dialysat [3, 28]. Durch hypertone Dialysate können auch Volumenänderungen des Flüssigkeitshaushalts des Patienten vorgenommen werden. Die extrakorporale Hämodialyse, die Hämodiafiltration und die Hämofiltration verwenden ein externes Dialysegerät und eine synthetische, semipermeable Membran außerhalb des Körpers. Der Hämodialyse liegen diffusive Vorgänge zu Grunde. Bei der Hämofiltration wird ein konvektiver Flüssigkeitstransport verwendet, der über einen Transmembrandruck einer Ultrafiltrationspumpe auf der Dialysatseite aufgebaut wird [5]. Das entfernte Volumen des konvektiven Transports wird anschließend durch eine Elektrolytlösung ersetzt. Auf diese Weise sind schnelle Volumenänderungen des Patientenblutvolumens möglich. Die Hämodiafiltration stellt eine Kombination aus beiden Methoden dar [3, 29-32]. **Abbildung 1** zeigt das Prinzip der drei konventionellen Verfahren.

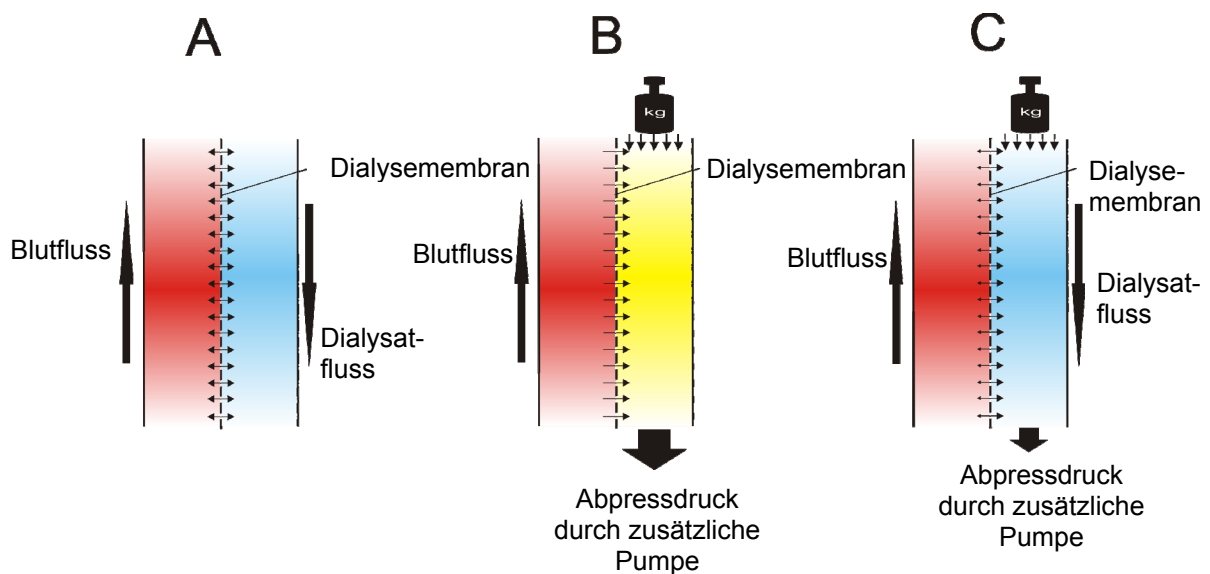


Abbildung 1: Das Prinzip von konventionellen Dialyseverfahren, (A) Hämodialyse, (B) Hämofiltration und (C) Hämodiafiltration. (A) Der Hämodialyse liegen allein diffusive Vorgänge zu Grunde, es ist keine Volumenänderung des Blutes möglich. (B) Die Hämofiltration beruht auf konvektiven Vorgängen, es wird keine Dialysatflüssigkeit verwendet, flüssige Bestandteile des Blutes werden abgetrennt und das abgetrennte Volumen postdialytisch zugeführt. (C) Die Hämodiafiltration besteht aus einer Kombination von HD und HF, sie kombiniert diffusive Vorgänge der Hämodialyse und konvektive Vorgänge der Hämofiltration.

1.3 Extrakorporale Verfahren

In der extrakorporalen Nierenersatztherapie wird das Blut des Patienten durch die Verwendung eines Dialysators von Urämie-Toxinen gereinigt. In den Dialysatoren werden synthetische Dialysemembranen verwendet, die aus Poly(ether)sulfon/ Polyvinylpyrrolidon (PES)/(PVP)- Kapillarmembranen aufgebaut sind [33]. Sie weisen eine hohe Biokompatibilität auf, da Poly(ether)sulfon- und Polyvinylpyrrolidon-Oberflächen nur geringe Koagulations- und Komplementsystemaktivierung induzieren [33, 34]. Moderne Dialysemembranen mit höheren Ausschlussgrenzen von 17-23 kDa werden als High-Flux-Membranen bezeichnet, während klassische Membranen Ausschlussgrenzen von 14-17 kDa aufweisen und als Low-Flux-Membranen bezeichnet werden [35]. Das Prinzip der Dialyse ist in **Abbildung 2** dargestellt.

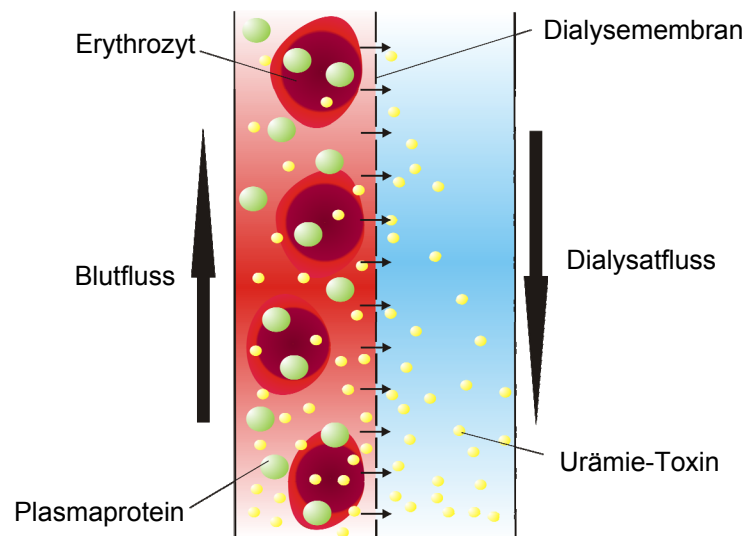


Abbildung 2: Das Prinzip der Dialyse, schematische Darstellung der diffusiven und konvektiven Vorgänge an der Dialysemembran. Niedermolekulare Substanzen können die Membranporen passieren und werden diffusiv oder konvektiv in das Dialysat überführt. Blutzellen und Proteine können die Dialysemembran nicht passieren und verbleiben im Blut.

Während das Blut des Patienten durch das Lumen der Kapillarmembranfasern fließt, werden die Fasern von Dialysat umspült. Das Dialysat ist eine keimfreie, umkehrosmotisch aufbereitete Lösung, die Elektrolyte und Nährstoffe in isotonischen Konzentrationen aufweist. Die extrakorporale Nierenersatztherapie wird dreimal die Woche ambulant mit einer Dauer von 4-5 Stunden durchgeführt [3]. Die Nachtdialyse mit einer Dauer von 8 Stunden verbessert die Lebensqualität und die Lebenserwartung des Patienten, da sie die kontinuierliche gesunde

Nierenfunktion besser imitiert [36-38].

1.4 Urämie-Toxine

Urämie-Toxine sind harnpflichtige Stoffwechselprodukte, die über die Niere ausgeschieden werden. Die Urämie-Toxine stellen aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften wie Polarität, Hydrophobizität und molekulare Masse eine inhomogene Gruppe dar. Gegenwärtig sind ca. 100 Substanzen beschrieben [39] [1, 40, 41], die zu den Urämie-Toxinen gezählt werden. *Vanholder et al.* klassifizieren diese Urämie-Toxine in drei Gruppen: (A) niedermolekulare wasserlösliche Urämie-Toxine, (B) niedermolekulare, hydrophobe und proteingebundene Urämie-Toxine und (C) Urämie-Toxine mittlerer molekularer Größe von mehr als 500 Da [1, 40, 41]. Urämie-Toxine der wasserlöslichen, niedermolekularen Gruppe und Urämie-Toxine mittlerer molekularer Größe lassen sich mit herkömmlichen Dialyseverfahren effizient entfernen [22, 32] (**Tabelle 1**). Sie können durch die Poren konventioneller High-Flux-Dialysemembranen transportiert und abgetrennt werden. Niedermolekulare, hydrophobe und proteingebundene Urämie-Toxine lassen sich mit konventionellen Dialyseverfahren nur unzureichend entfernen [22]. Aufgrund ihrer Proteinbindung besitzen hydrophobe, niedermolekulare Urämie-Toxine eine effektive molekulare Masse, die den Transport durch die Poren der Dialysemembranen nicht ausreichend zulässt.

Tabelle 1: Unterschiede der Abtrennung von hydrophilen und hydrophoben, niedermolekularen Urämie-Toxinen durch konventionelle Dialyseverfahren [22]

Urämie-Toxin	Abtrennung (%)
Harnstoff	76 ± 6
Kreatinin	67 ± 7
Indoxylsulfat	35 ± 15
p-Kresylsulfat	29 ± 14
β-2-Mikroglobulin	58 ± 14

1.4.1 Proteingebundene Urämie-Toxine

2001 benannten Vanholder et al. die proteingebundenen Urämie-Toxine die „vergessenen Toxine“ [42]. Denn seit Entwicklung und Etablierung der extrakorporalen Nierenersatztherapie in den 1950er Jahren wurde der Fokus der Dialysebehandlung auf die Abtrennung niedermolekularer, wasserlöslicher, nicht-proteingebundener Urämie-Toxine gelegt. Die Effektivität einer Dialysebehandlung allein durch die Abtrennrate niedermolekularer wasserlöslicher

Substanzen wie Harnstoff zu bewerten, scheint nicht auszureichen, da vermehrte Abtrennraten von Harnstoff ($Kt/V_{\text{Harnstoff}}$) die Morbidität und Mortalität chronisch-niereninsuffizienter Patienten nicht reduzieren können [42-44]. Die hohe Morbidität und Mortalität der chronisch-niereninsuffizienten Patienten von 15 - 25 % pro Jahr [45] wird nicht durch niedermolekulare, wasserlösliche Urämie-Toxine hervorgerufen, sondern durch Urämie-Toxine, die mit konventionellen Dialyseverfahren nur unzureichend abgetrennt werden können (

Abbildung 3).

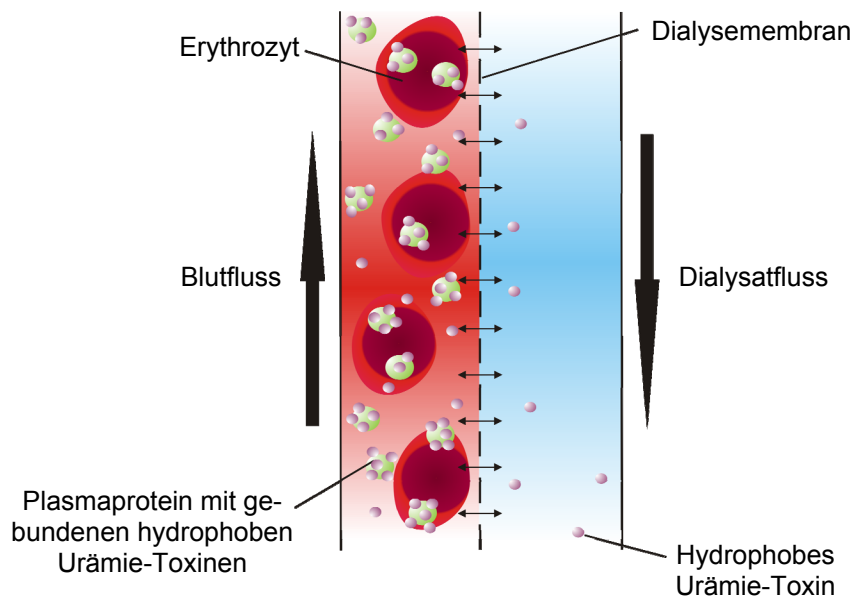


Abbildung 3: Abtrennung hydrophober, proteingebundener Urämie-Toxine bei der Dialyse. Bedingt durch die Proteinbindung sind hydrophobe, proteingebundene Urämie-Toxine nicht membrangängig. Da nur der ungebundene Anteil der hydrophoben proteingebundenen Urämie-Toxine in das Dialysat überführt wird, ist die Entfernung proteingebundener Urämie-Toxine mittels Dialyse unzureichend.

Hydrophobe Urämie-Toxine sind zu einem erheblichen Teil proteingebunden im Blut des Patienten. Für Indoxylsulfat und p-Kresylsulfat sind proteingebundene Anteile von 89 und 91 % beschrieben [46]. Der hydrophilen Abstoßung zur umgebenden wässrigen Lösung folgend, binden hydrophobe Urämie-Toxine an hydrophobe Bereiche der Plasmaproteine. Da viele hydrophobe Urämie-Toxine durch ionisierte funktionelle Gruppen charakterisiert sind, bilden sich zusätzlich ionische Bindungen aus. Die Assoziation an Plasmaproteine erhöht die effektive molekulare Masse der hydrophoben Urämie-Toxine. Da während der Dialyse kein Proteinverlust auftreten darf, sind die Membranporen der Dialysemembranen durch geeigne-

te Ausschlussgrenzen für Proteine nicht durchlässig. Die Proteinbindung der hydrophoben Urämie-Toxine ist aber für die unzureichende Entfernung der hydrophoben Urämie-Toxine nur aus dem Blut chronisch-niereninsuffizienter Patienten ursächlich. Durch die unzureichende Entfernung akkumulieren proteingebundene Urämie-Toxine im Körper des Patienten. Chronisch-niereninsuffiziente Patienten weisen daher Plasmakonzentrationen dieser Urämie-Toxine auf, die, verglichen mit den Normalwerten des nierengesunden Menschen, um das 100-fache erhöht vorliegen können [47].

Die proteingebundenen Urämie-Toxine Phenyllessigsäure, Indoxylsulfat, p-Kresylsulfat und p-Hydroxyhippursäure sind repräsentative Vertreter der Gruppe der proteingebundenen Urämie-Toxine und werden in den folgenden Abschnitten hinsichtlich physikochemischen Eigenschaften und ihrer pathologischen Wirkungen im chronisch-niereninsuffizienten Patienten charakterisiert beschrieben.

1.4.2 Phenyllessigsäure

Phenyllessigsäure stellt einen repräsentativen Vertreter der Gruppe der hydrophoben, proteingebundenen Urämie-Toxine dar. Phenyllessigsäure ist das Stoffwechselprodukt der Aminosäure Phenylalanin. Phenylalanin wird endogen zum Neuraamin Phenylethylamin decarboxyliert, das oxidativ zu Phenyllessigsäure desaminiert wird [48, 49] (**Abbildung 4**). Sie hat eine molekulare Masse von 236,1 Da und ist aus einem aromatischen Phenylring und einer C₁-konjugierten Acetateinheit aufgebaut. Die Säurekonstante der Carboxylgruppe der Acetateinheit hat eine pK_s-Wert von 4,25 [50], sodass die Carboxylgruppe unter physiologischen Bedingungen dissoziiert vorliegt. Trotz der ionisierten funktionellen Gruppe besitzt Phenyllessigsäure überwiegend hydrophobe Eigenschaften.

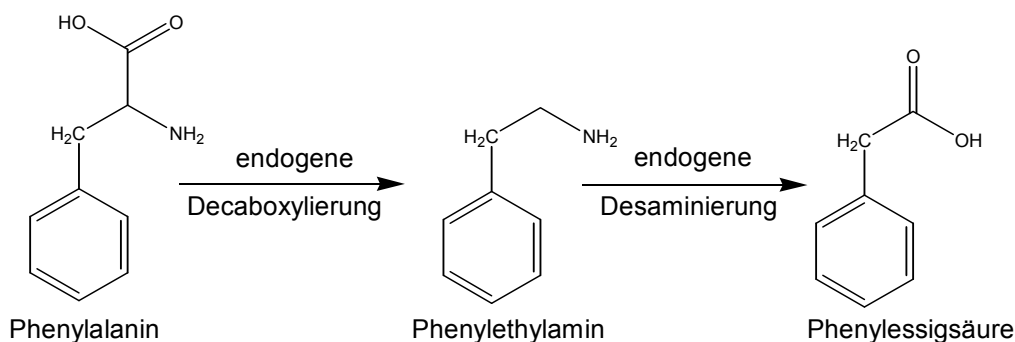


Abbildung 4: Endogener, sequenzieller Abbau von Phenylalanin zu Phenylethylamin und Phenyllessigsäure [48, 49]

Die Phenylelessigsäure-Konzentration liegt im Serum chronisch-niereninsuffizienter Patienten erhöht vor [17]. Eine Senkung der Phenylelessigsäure-Konzentration durch proteinarme Diäten ist nicht erfolgreich, da endogenes Phenylethylamin die Quelle für Phenylelessigsäure darstellt [51, 52]. Phenylelessigsäure gilt als Inhibitor der induzierbaren Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS) [17]. Stickstoffmonoxid (NO) ist als vasodilatativer Neurotransmitter bekannt [53-57] und eine Hemmung der iNOS führt zur Vasokonstriktion und Hypertonie. Darüber hinaus wurde Phenylelessigsäure als Inhibitor der kalziumabhängigen ATPase bei chronisch-niereninsuffizienten Patienten beschrieben, die den Kalziumeinstrom in die Blutzellen reguliert [58]. Darüber hinaus könnte Phenylelessigsäure einen Einfluss auf das zerebrale urämische Syndrom haben, bei dem pathologische Veränderungen des Kalziumeinstroms in die Neuronen des Gehirns der Patienten auftreten [59, 60]. Weitere pathologische Eigenschaften der Phenylelessigsäure sind die Induzierung der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) in glatten Gefäßmuskelzellen (*smooth vascular muscle cells*, VSMC) und in Endothelzellen [61, 62] sowie die Sekretion des *tumor necrosis factors* (TNF- α) aus Endothelzellen [63]. Aufgrund dieser Erkenntnisse kann die Phenylelessigsäure als vasotoxischer, urämischer Mediator bezeichnet werden.

1.4.3 p-Kresylsulfat

Die Aminosäure Tyrosin wird durch endogenen intestinalen mikrobiellen Abbau zu p-Kresol metabolisiert [64]. p-Kresol wird im Körper von niereninsuffizienten Patienten nur in geringen Konzentrationen nachgewiesen [23, 65], da p-Kresol in der Leber zu p-Kresylsulfat und p-Kresylglucoronid derivatisiert wird (**Abbildung 5**) [66] p-Kresylsulfat stellt dabei das Hauptderivat des p-Kresols dar [67]. p-Kresylsulfat hat in protonierter Form eine molekulare Masse von 188 Da und besteht aus einem aromatischen Phenylring mit einer 4'-substituierten Methylgruppe und einer 1'-substituierten Sulfatgruppe. Aufgrund des aromatischen Rings zeigt p-Kresylsulfat überwiegend hydrophobe Eigenschaften, durch die negative Ladung der substituierten Sulfatgruppe hat p-Kresylsulfat zusätzlich hydrophile Eigenschaften. p-Kresylsulfat wird über die organischen Anionentransporter (*organic anion transporter*, OAT) in die renalen Tubuluszellen aufgenommen und kann innerhalb der Zellen seine nephrotoxische Wirkung entwickeln [68]. p-Kresylsulfat gilt als progressiver Faktor chronischer Nierenerkrankungen [69] und induziert die Bildung freier Radikale in Leukozyten [70]. p-Kresylsulfat fördert die Bildung endothelialer Mikropartikel, die als Indikator für die Schädigung des Endothels gelten [71]. Endotheliale Schädigung und Leukozytenaktivierung haben einen Effekt auf die Gefäßschädigung, die ein Hauptgrund für die Morbidität und Mortalität chronisch-niereninsuffizienter Patienten ist [67, 72, 73].

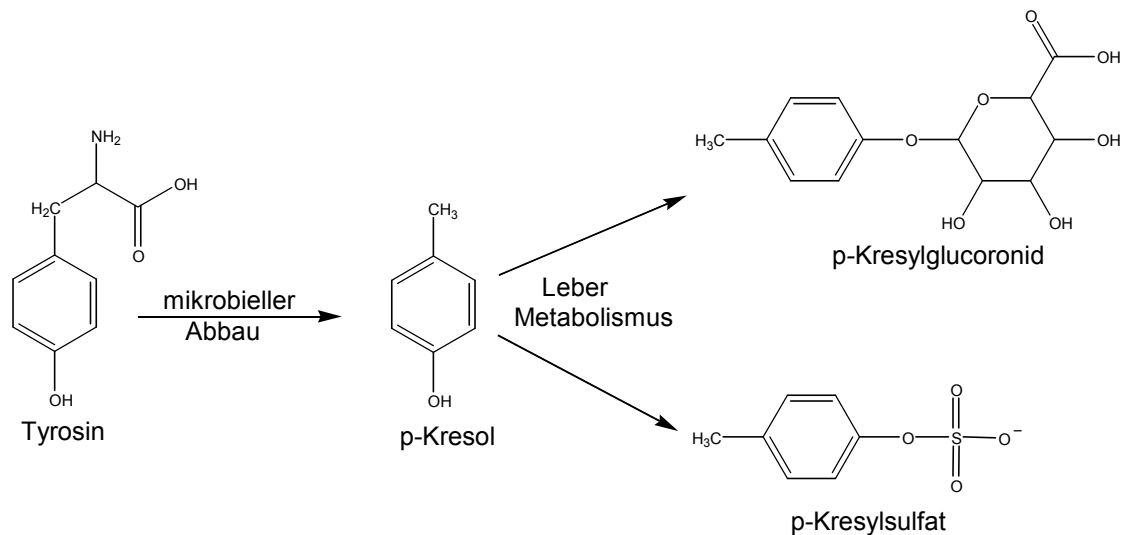


Abbildung 5: Endogener, sequenzieller Abbau von Tyrosin zu p-Kresylsulfat und p-Kresylglucuronid [66] [67]

1.4.4 Indoxylsulfat

Indoxylsulfat ist ein weiterer repräsentativer Vertreter der Gruppe der hydrophoben, aromatischen und proteingebundenen Urämie-Toxine. Indoxylsulfat entsteht im Körper durch intestinalen, mikrobiellen Abbau der Aminosäure Tryptophan zu Indol, das in der Leber zu Indoxyl oxidiert und dann zur Entgiftung durch eine Sulfotransferase mit einer Sulfatgruppe verestert wird (**Abbildung 6**) [25, 74]. In protonierter Form hat Indoxylsulfat eine molekulare Masse von 212 Da und besteht aus einem hydrophoben Indolring mit 3'-substituierter Sulfatgruppe, die dem Molekül geringe hydrophile Eigenschaften gibt. Indoxylsulfat wird mittels konventioneller Dialyseverfahren nur unzureichend aus dem Blut abgetrennt und liegt daher bei chronisch-niereninsuffizienten Patienten in erhöhten Konzentrationen im Blut vor [25]. Indoxylsulfat gilt als stark stimulierender Faktor progressiver chronischer Nierenerkrankungen. Es führt unter anderem zu glomerulärer Sklerose [75, 76] und tubulo-interstitieller Fibrose und senkt somit die glomeruläre Filtrationsrate. Hierdurch kommt es zu fibrotischen und pathophysiologischen Veränderungen des Nierengewebes, die zum Verlust von Nephronen und zur verminderten glomerulären Filtrationsrate führen. In *in vitro*-Studien konnte gezeigt werden, dass Indoxylsulfat die Proliferation proximaler Tubuluszellen inhibiert, indem es Zellstress des endoplasmatischen Retikulums induziert [77]. Indoxylsulfat induziert die endotheliale Dysfunktion [78], indem es die endotheliale Proliferation und Migration inhibiert. Gleichzeitig induziert Indoxylsulfat die Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) [79], wodurch die Bildung von vaskulären Plaques und Gefäßläsionen begünstigt wird. In glatten Gefäßmuskelzellen induziert Indoxylsulfat die Expression der Osteoblasten-spezifischen Proteine

core binding factor (Cbfa1), Osteopontin und der alkalischen Phosphatase und führt somit zur osteoblastischen Transformation von VSM-Zellen [80-85]. Neben diesen pathologischen, gefäß-transformierenden Eigenschaften ist Indoxylsulfat bei der Pathogenese von oxidativem Stress beteiligt [79]. Indoxylsulfat fördert die Bildung freier Radikale und die Expression von Plasminogen-Aktivator Inhibitor PAI-1 durch Induzierung des NF-kappaB [86]. Indoxylsulfat erhöht die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in Tubuluszellen und Endothelzellen [87] durch Erhöhung der NADPH-Oxidase-Aktivität.

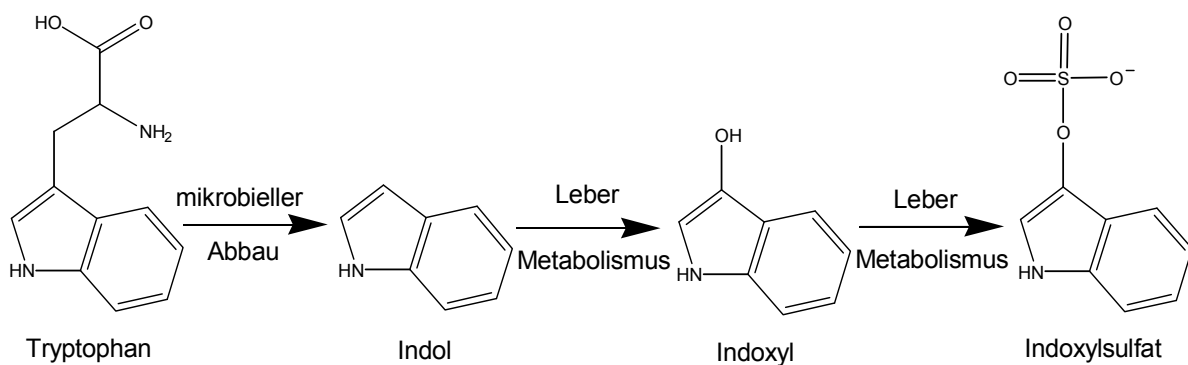


Abbildung 6: Endogener, sequenzieller Abbau von Tryptophan zu Indoxylsulfat [25, 74]

1.4.5 p-Hydroxyhippursäure

Der Stoffwechselweg, bei dem p-Hydroxyhippursäure gebildet wird, ist gegenwärtig noch nicht geklärt. Allerdings wurde p-Hydroxyhippursäure als Stoffwechselprodukt der intestinalen mikrobiellen Degradation der Aminosäure Tyrosin nachgewiesen [64]. In protonierter Form hat p-Hydroxyhippursäure eine molekulare Masse von 195,2 Da und ist durch einen hydrophoben Phenylring und eine hydrophile Hydroxylgruppe, eine hydrophile Carboxylgruppe und eine hydrophile Amidgruppe charakterisiert (**Abbildung 7**).

p-Hydroxyhippursäure wird über die organischen Anionentransporter in die proximalen Tubuluszellen aufgenommen und kann dort ihr nephotoxisches Potential ausüben [88]. p-Hydroxyhippursäure gilt als Inhibitor der kalziumabhängigen ATPase, welche den Kalziumeinstrom in die Blutzellen reguliert [89]. Dadurch scheint die p-Hydroxyhippursäure direkt am pathologisch veränderten Kalziumstoffwechsel chronisch-niereninsuffizienter Patienten beteiligt zu sein [90].

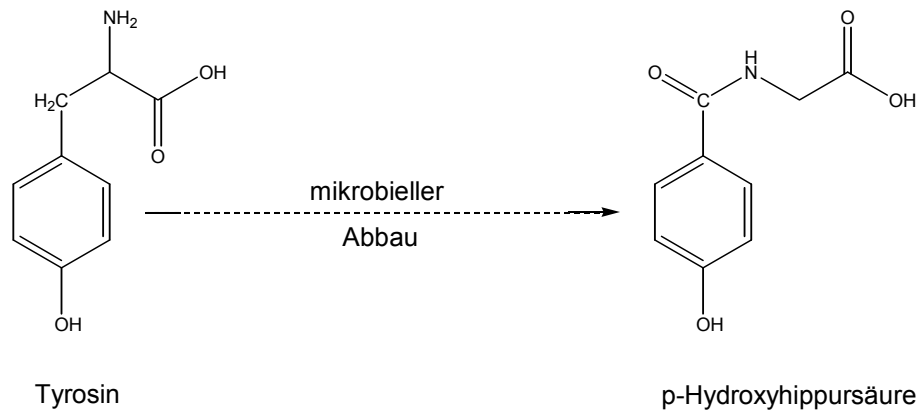


Abbildung 7: Endogener, gegenwärtig noch nicht geklärt, mikrobieller Abbau von Tyrosin zu p-Hydroxyhippursäure [64]

1.5 Limitationen der konventionellen Dialysetherapie

Gegenwärtig werden Harnstoff- und Kreatininkonzentrationen stellvertretend für sämtliche Urämie-Toxine routinemäßig bestimmt, um den Erfolg der Nierenersatztherapie zu veranschaulichen [22]. Da die Gruppe der Urämie-Toxine inhomogene Eigenschaften aufweist, ist die qualitative Bewertung der Effektivität eines Dialyseverfahrens, die auf den Abtrennraten von wasserlöslichen Urämie-Toxinen wie Harnstoff und Kreatinin basiert, jedoch ungenau und unzureichend [44] [91, 92]. Obwohl niedermolekulare und wasserlösliche Urämie-Toxine zufriedenstellend mittels konventioneller Dialyseverfahren entfernt werden können, weisen chronisch-niereninsuffiziente Patienten eine hohe Morbidität und Mortalität auf [4, 5, 35, 43, 72]. Durch die unzureichende dialytische Entfernung vor allem der proteingebundenen Urämie-Toxine und im untergeordnetem Masse der sogenannten Mittelmoleküle wird die hohe Morbidität und Mortalität der chronisch-niereninsuffizienten Patienten bewirkt [16, 18, 69, 93]. Diese Urämie-Toxine weisen zumeist aromatische Strukturen und ionische Gruppen auf und sind, bedingt durch ihre geringe Wasserlöslichkeit, an Plasmaproteine gebunden. Ursächlich für die Toxin-Protein-Bindung sind elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den Proteinen und den hydrophoben Urämie-Toxinen. Aufgrund der Bindung sind diese Urämie-Toxine trotz ihres niedermolekularen Charakters effektiv wie hochmolekulare Urämie-Toxine zu betrachten [24].

1.6 Bindung proteingebundener Urämie-Toxine an Plasmaproteine

Die Bindung niedermolekularer, hydrophober, aromatischer Urämie-Toxine an Plasmaproteine beruht auf elektrostatischen Wechselwirkungen wie ionische Bindungen, Wasserstoffbrücken-Bindungen und hydrophoben Dipol-Dipol-Wechselwirkungen (van der Waals-Kräfte). Da proteingebundene Urämie-Toxine aufgrund ihrer Hydrophobizität und gleichzeitigen Ladung durch ionisierte Gruppen wie Carboxylgruppen oder Sulfatgruppen bivalente Eigenschaften aufweisen, binden sie im Plasma sowohl an hydrophobe als auch an ionisierte oder polarisierte Bereiche auf der ausgeprägten Oberflächenstruktur der Plasmaproteine. Die Assoziation zwischen proteingebundenen Urämie-Toxinen und Plasmaproteinen werden durch ionische Bindungen anionischer Gruppen der Urämie-Toxine, wie Carboxylgruppen oder Sulfatgruppen und kationischer Seitengruppen der Aminosäuren Arginin, Histidin oder Lysin stabilisiert. Des Weiteren wird die Bindung durch Wasserstoffbrücken-Bindungen von Carbonylgruppen oder Hydroxylgruppen der Urämie-Toxine und Hydroxylgruppen oder Aminogruppen hydrophiler Aminosäuren wie Serin, Asparagin oder Glutamin und durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen hydrophober, aromatischer Phenyl- oder Indolringe der Urämie-Toxine mit ebenfalls hydrophoben Seitengruppen von Tryptophan, Phenylalanin und Tyrosin stabilisiert. **Abbildung 8** zeigt die möglichen Interaktionen von Phenylelessigsäure und den Aminosäureresten eines hypothetischen Plasmaproteins. Phenylelessigsäure könnte drei Formen von Interaktionen mit den Seitengruppen der Aminosäuren eines Plasmaproteins eingehen. Das negativ geladene Sauerstoffatom der unter physiologischen Bedingungen dissoziierten Carboxylgruppe der Phenylelessigsäure bildet eine ionische Bindung mit einem positiv geladenen Stickstoffatom der Guanidingruppe eines Arginins. Weiterhin ist die Bildung von Wasserstoffbrücken-Bindungen zwischen dem der Carbonylfunktion der Carboxylgruppe der Phenylelessigsäure und der Hydroxylgruppe eines Serins möglich. Der hydrophobe aromatische Phenylring der Phenylelessigsäure hingegen könnte über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen mit ebenfalls hydrophoben aromatischen Seitengruppen der Aminosäuren Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin interagieren. Durch die Ausbildung dieser drei Interaktionen wird die Bindung eines hydrophoben Urämie-Toxins wie der Phenylelessigsäure an ein Plasmaprotein stabilisiert. Die beschriebenen elektrostatischen Wechselwirkungen sind ursächlich für die Proteinbindung der Urämie-Toxine und können durch verschiedene Methoden abgeschwächt werden.

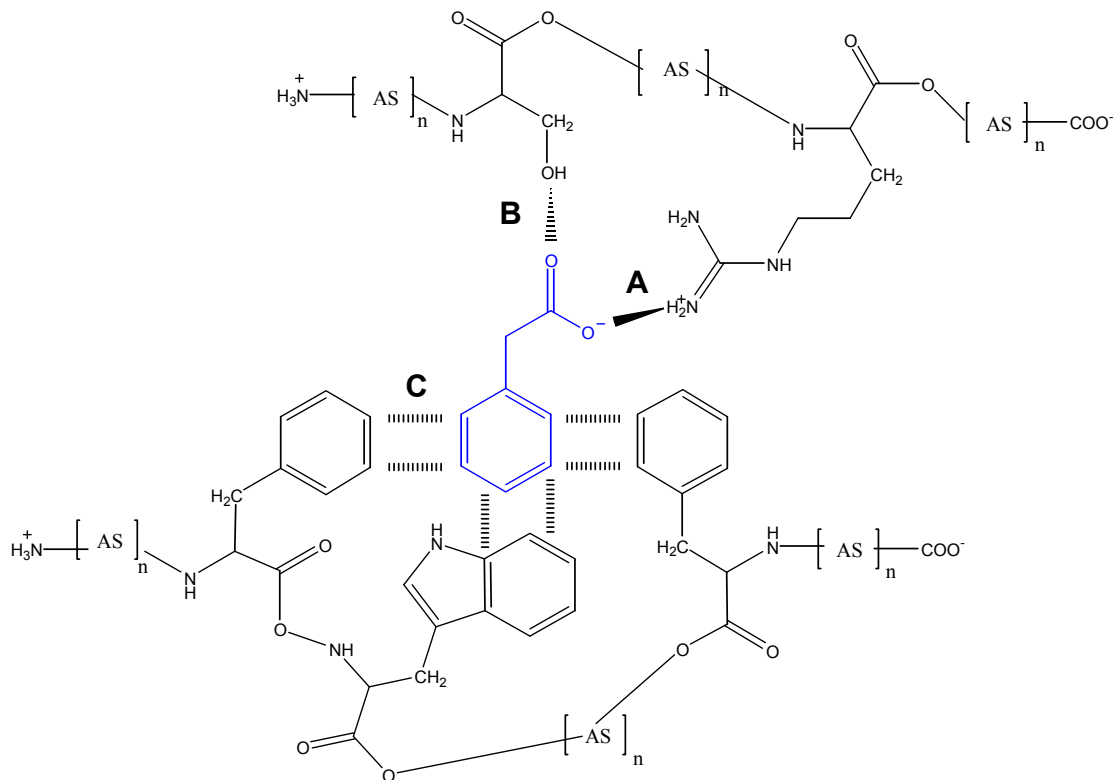


Abbildung 8: Hypothetische Interaktionen zwischen Phenyllessigsäure (blau) und den Aminosäureresten eines Plasmaproteins, **(A)** ionische Bindung zwischen der kationischen Guanidgruppe des Arginins und der anionischen Hydroxylgruppe der Phenyllessigsäure, **(B)** Wasserstoffbrücken-Bindung zwischen der Hydroxylgruppe eines Serins und der Carbonylgruppe der Phenyllessigsäure und **(C)** Dipol-Dipol-Wechselwirkungen (van der Waals-Kräfte) zwischen den aromatischen Ringen von Phenylalanin und Tryptophan mit dem Phenylring des Phenyllessigsäure. Das hypothetische Plasmaprotein ist aus 2 Aminosäureketten aufgebaut, die Aminosäuresequenz ist vereinfacht als $[-AS]_n$ - dargestellt.

1.7 Abschwächung der Bindung proteingebundener Urämie-Toxine an Plasmaproteine

Die Bindung zwischen hydrophoben Urämie-Toxinen und Plasmaproteinen beruht auf elektrostatischen Wechselwirkungen. Diese elektrostatischen Wechselwirkungen können durch geeignete Bedingungen abgeschwächt werden: Die Erhöhung der Ionenstärke der umgebenden Lösung, die Anwesenheit elektromagnetischer Felder und die Anwesenheit geeigneter Adsorber-Medien könnten zu einer Abschwächung der Assoziation zwischen proteingebundenen Urämie-Toxinen und Plasmaproteinen führen.

Da eine große Anzahl proteingebundener Urämie-Toxine durch anionische Ladungen charakterisiert ist, bilden sie mit kationischen Seitengruppen der Aminosäuren der Plasmapro-

teine ionische Bindungen aus. Diese Bindungen können durch Erhöhung der Ionenstärke der umgebenden Lösung abgeschwächt werden. Hierbei kommt es zu einer Konkurrenz zwischen den Ladungsträgern und einer Verdrängung der Urämie-Toxine von den Bindungsstellen der Proteine. Da die dreidimensionale Struktur der Proteine auf der Ausbildung elektrostatischer Wechselwirkungen beruht, führt die Erhöhung der Ionenstärke zu einer partiellen Entfaltung der Struktur, wodurch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Protein und Urämie-Toxin abgeschwächt werden. Beide Effekte verschieben das Gleichgewicht zwischen proteingebundenem und ungebundenem Anteil der hydrophoben Urämie-Toxine zugunsten des ungebundenen Anteils. Vorversuche im Rahmen der Diplomarbeit des Promovierenden zeigten [94], dass Phenyllessigsäure durch Erhöhung der Ionenstärke vermehrt aus der Proteinbindung freigesetzt wird.

Die elektrostatische Anziehung von Proteinen und Urämie-Toxinen könnte durch hochfrequente elektromagnetische Felder abgeschwächt werden. Elektromagnetische HF-Felder vergrößern die Schwingungsfreiheitsgrade der Moleküle, aus denen die Urämie-Toxine und Proteine aufgebaut sind. Die dreidimensionale Struktur der Proteine wird partiell entfaltet und dadurch werden sowohl ionische als auch hydrophobe Wechselwirkungen vermindert und die Bindungen von Proteinen und Urämie-Toxinen abgeschwächt. Das Gleichgewicht zwischen proteingebundener und ungebundener Fraktion wird zugunsten der ungebundenen Fraktion verschoben und das Urämie-Toxin wird vermehrt aus der Proteinbindung freigesetzt.

Elektrostatische Wechselwirkungen sind sowohl die Ursache für die Bindung proteingebundener Urämie-Toxine an Plasmaproteine als auch für ihre Adsorption an die Oberflächenstrukturen von Adsorber-Medien. Physikochemisch geeignete Adsorber können kompetitiv mit Plasmaproteinen um die Bindung der proteingebundenen Urämie-Toxine konkurrieren. Durch die große Oberfläche und die große Anzahl an Bindungsstellen für hydrophobe und ionische Urämie-Toxine können geeignete Adsorber proteingebundene Urämie-Toxine aus der Proteinbindung freisetzen.

1.8 Zielsetzung der Dissertationsarbeit

Die konventionelle Dialysetherapie kann eine ausreichende Abtrennung proteingebundener Urämie-Toxine nicht leisten. Daher sollten im Rahmen dieser Arbeit neuartige Dialyseverfahren entwickelt werden, die eine verbesserte Abtrennung proteingebundener Urämie-Toxine aus dem Blut der Patienten ermöglichen. Eine verbesserte Abtrennung der proteingebundenen Urämie-Toxine korreliert mit ihrer vermehrten Freisetzung aus der Proteinassoziation, sodass ein vermehrter Anteil der hydrophoben, proteingebundenen Urämie-Toxine im unge-

bundenen Zustand vorliegt und aus dem Blut abgetrennt wird. Daher sollten in drei parallelen Methodenentwicklungen untersucht werden, ob die elektrostatische Anziehung zwischen Protein und Urämie-Toxin (A) durch Erhöhung der Ionenstärke der umgebenden Lösung, (B) durch den Einfluss hochfrequenter elektromagnetischer Strahlung und (C) durch die Anwesenheit spezieller Adsorber-Medien für hydrophobe und anionische Urämie-Toxine abgeschwächt wird.

Um ein neuartiges Hämodialyseverfahren mit erhöhter Ionenstärke zu entwickeln, wurden zunächst Bedingungen erhöhter Ionenstärke untersucht, die durch eine vermehrte Freisetzung proteingebundener Urämie-Toxine aus der Proteinbindung charakterisiert waren. Danach wurde untersucht, ob die zuvor bestimmten Bedingungen erhöhter Ionenstärke Einflüsse auf die Aktivität und die native Struktur repräsentativer, plasmatischer Enzyme und Proteine haben. Anschließend wurde in *in vitro*-Versuchsreihen untersucht, ob das neuartige Hämodialyseverfahren durch eine verbesserte Abtrennung proteingebundener Urämie-Toxine charakterisiert ist und ob weitergehende Modifizierungen notwendig sind, um eine Schädigung von Blutzellen durch eine erhöhte Ionenstärke zu minimieren.

In einer weiteren Methode wurde durch Entwicklung eines vereinfachten Modellsystems zunächst untersucht, ob hochfrequente elektromagnetische Felder proteingebundene Urämie-Toxine aus der Proteinbindung freisetzen und diese dialytisch abgetrennt werden. Darauf basierend sollte ein differenziertes Testsystem entwickelt werden, um hochfrequente elektrische, magnetische und elektromagnetische Feldfrequenzen zu identifizieren, die einen Effekt auf die Freisetzung proteingebundener Urämie-Toxine aus der Proteinbindung haben. Darüber hinaus sollte unter Verwendung des zu entwickelnden Testsystems untersucht werden, ob Plasmaproteine hinsichtlich ihrer enzymatischen Aktivität und strukturellen Integrität durch hochfrequente elektromagnetische Felder beeinflusst werden.

In einem weiteren Ansatz wurde untersucht, ob Adsorber-Medien als Bindungspartner proteingebundene Urämie-Toxine aus Proteinbindung freisetzen und binden können. Nachdem die Adsorptionscharakteristika für repräsentative Urämie-Toxine bestimmt wurden, sollte ein extrakorporales, adsorptives Verfahren erstmalig im Rahmen dieser Arbeit in einer klinischen Studie als Behandlungsverfahren für die chronische Niereninsuffizienz eingesetzt werden. Durch den Vergleich zu konventionellen Dialyseverfahren in Bezug auf die Abtrennraten von proteingebundenen Urämie-Toxinen sollte das neuartige Verfahren evaluiert werden. Dadurch wurde bestimmt, ob ein extrakorporales adsorptives Verfahren in der intermittierenden Nierenersatztherapie etabliert werden kann.

2. Methoden

In den folgenden Abschnitten werden die biochemischen und biomedizinischen Methoden beschrieben, die im Rahmen der Dissertationstätigkeit zur Durchführung der Versuchsreihen verwendet wurden.

2.1 Reversed-Phase-Chromatographie

Die Reversed-Phase-Chromatographie oder Umkehrphasen-Chromatographie basiert auf hydrophoben Dipol-Dipolwechselwirkungen von Probenmolekülen und hydrophoben aliphatische Kohlenstoffketten. Die Kohlenstoffketten mit einer Länge von vier Kohlenstoffatomen bis 30 Kohlenstoffatomen, typischer Weise aber 18 Kohlenstoffatomen, sind an eine Silicagelmatrix gebunden [95]. Mit steigender Hydrophobizität der Substanzen werden sie stärker retendiert. Die mobile Phase stellen polare Lösungsmittel wie Acetonitril, Ethanol [96] und Methanol in Kombination mit Wasser und verschiedenen wässrigen Puffern dar. Geladene Substanzen wie Salze werden nicht, oder nur schwach, zurück gehalten. Da Urämie-Toxine sowohl über hydrophobe Eigenschaften als auch über geladene funktionelle Gruppen wie Carboxyl-, Sulfat- und Aminogruppen verfügen können, wird die Hydrophobizität dieser Substanzen durch den Zusatz von Ionenpaarreagenzien, die die Ladung der Urämie-Toxine neutralisieren, zur mobilen Phase erhöht. Die Ionenpaarreagenzien sind organische Salze von tertiären oder quartären Aminen und Carbonsäuren und maskieren durch Ausbildung von ionischen Bindungen die Ladung der Probenmoleküle, sodass sie als neutrale Substanzen an die stationäre Phase binden können. Zusätzlich verfügen diese Ionenpaarreagenzien über verschieden lange aliphatische Kohlenstoffketten, welche die Hydrophobizität der Probenmoleküle erhöhen und dadurch die Retentionszeiten auf der Säule verlängern. Halogenierte Carbonsäuren werden als Ionenpaarreagenzien bei der Auftrennung von amphoteren Substanzen wie Peptiden verwendet. Halogenierte Carbonsäuren liegen vollständig dissoziiert vor und senken den pH-Wert der Probenlösung. Die Protonen der Säuren neutralisieren die negativen Ladungen von Carboxylgruppen der Probenmoleküle, die einen höheren pKs-Wert aufweisen und bei diesen pH-Werten (pH~2) Protonen binden können. Gleichzeitig bilden die Anionen der halogenierten Carbonsäuren ionische Bindungen mit kationischen Aminogruppen der Probenmoleküle aus und maskieren diese positiven Ladungen.

2.2 Größenausschluss-Chromatographie

Die Größenausschluss-Chromatographie, (*size exclusion chromatography* SEC) oder Gel-permeations-Chromatographie (GPC) nutzt die Unterschiede der molekularen Größe von niedermolekularen und hochmolekularen Probenmolekülen zur chromatographischen Auftrennung. Mit Hilfe poröser Polymere in granulierter Form kann eine Auftrennung erreicht werden, da niedermolekulare Substanzen wie Salze durch den Eintritt in die Poren der Matrixpartikel einen längeren Weg durch die Säule haben als hochmolekulare Proteine, die in die Poren nicht eindringen können. Als Matrices finden Polysaccharid- und Kunststoffpolymere Verwendung, da diese Polymere aufgrund einer hohen Anzahl an hydrophilen Gruppen bei Verwendung wässriger mobiler Phasen sehr geringe Adsorptionseigenschaften für Proteine aufweisen. Da die Adsorptionseffekte an die Säulenmatrix fehlen, werden Proteine mit einer wässrigen mobilen Phase von niedermolekularen Substanzen separiert und isokratisch eluiert.

2.3 Elektrospray-Ionisations Massenspektrometrie

Die Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) ist ein Analyseverfahren zur Massenbestimmung von Probenmolekülen wie Urämie-Toxinen [97]. Dabei treten die Probenmoleküle, nachdem sie mit einem Lösungsmittel durch eine Edelstahlkapillare gefördert werden am Ende der Kapillare in ein elektrisches Feld ein. Der anliegenden elektrischen Spannung zwischen dem Ende der Kapillare und einer Gegenelektrode gemäß wandern die ionisierten Tropfen elektrophoretisch auf die Gegenelektrode zu. Mit Hilfe eines Trägergases, in der Regel Stickstoff, werden Tropfen gebildet, deren Größe durch die Verdampfung des Lösungsmittels stetig verringert wird. Die Erhöhung der Ladungsdichte pro Tropfen führt aufgrund der Coulombabstoßung der ionisierten Moleküle zur Bildung noch feinerer Tröpfchen. Es entstehen Pseudo-Ionen der Form $[M+H]^+/[M-H]^-$. Die Ionen werden durch das elektrische Feld in das Massenspektrometer gelenkt, mit Hilfe von elektromagnetischen Feldern in Ionenfallen arretiert und von dort sukzessive zu einem Detektor geleitet und analysiert. Aufgrund der Elektrospray-Ionisation treten bei der ESI-Massenspektrometrie typischerweise mehrfachgeladene Ionen auf. Die Detektion erfolgt entsprechend als Quotient von M/z . Die ESI-Massenspektrometrie ist eine Methode der Ionisierung der Probenmoleküle, bei der primär keine Fragmentierungen auftreten. Die ESI-Massenspektrometrie kann, in Reihe geschaltet, mit HPLC-Methoden kombiniert werden. In der Regel werden Reversed-Phase-chromatographische Methoden dazu verwendet, die Probenbestandteile zu separieren und nachfolgend im Massenspektrometer zu identifizieren.

2.4 Die NMR-Spektroskopie

Die nukleare magnetische Resonanz-Spektroskopie (*nuclear magnetic resonance spectroscopy*, NMR) wurde nach ihrer Entwicklung in den 1940er Jahren [98, 99] zur Analyse niedermolekularer Verbindungen eingesetzt. In der NMR-Spektroskopie werden Atomkerne, die aufgrund ungerader Ordnungs- und/ oder Massenzahl, über ein magnetisches Moment oder Spin zu verfügen, durch ein externes Hauptmagnetfeld ausgerichtet. Dabei treten Energieunterschiede in der Orientierung auf, die als Zeemann-Effekt bezeichnet werden. Wird ein zweites, senkrecht dazu stehendes Magnetfeld mit geeigneter Frequenz eingestrahlt, werden die Atomkerne in der Transversalebene ausgerichtet und oszillieren dann unter Energieabgabe in einer Relaxation zu ihrer Ausgangsorientierung zurück. Bei der Relaxation werden die Atomkerne durch ihre atomare Umgebung beeinflusst. Da Proteine primär aus den Elementen Wasserstoff H, Kohlenstoff C, Sauerstoff O und Stickstoff N zusammengesetzt sind, sind für die Biochemie die Isotope ^1H , ^{13}C und ^{15}N von besonderer Relevanz. Leistungsfähige und sensitive Spektrometern können zur Analyse hochmolekularer und komplexer Verbindungen verwendet werden. Neben der Röntgenkristallographie hat sich die NMR-Spektroskopie zur wichtigsten Methode der Bestimmung atomar auflösender Strukturen von biologischen Makromolekülen wie Proteinen oder Nukleinsäuren entwickelt. Bei der NMR-Spektroskopie wird durch die Analyse die Probe nicht zerstört. Eine Limitation der NMR-Spektroskopie ist, dass die Analytlösungen eine Konzentration $> 10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ aufweisen müssen. Die Analysedauer liegt bei der ^1H -NMR-Spektroskopie im Minutenbereich und es können Substanzgemische gleichzeitig ohne vorherige Auftrennung bestimmt werden. Neben der Strukturaufklärung liegt ein Anwendungsbereich der NMR-Spektroskopie auch in der Untersuchung von toxikologischen Prozessen, Medikamenten-Metabolismus und klinisch-chemischen Untersuchungen [17, 100, 101].

2.5 UV/VIS-Spektroskopie

Die UV/VIS-Spektroskopie ist ein Analyseverfahren, bei der Absorptionseffekte elektromagnetischer Wellen des ultravioletten (UV) und sichtbaren (VIS) Lichtes zur Konzentrationsbestimmung von Analyten in einer Lösung verwendet werden. UV/VIS-Spektrometer sind aus einer Lichtquelle mit einem Monochromator aufgebaut, um selektive Wellenlängen durch die Analytküvetten zu lenken. Aus der Differenz des transmittierten Lichtes zwischen einer Vergleichslösung und der Analytlösung, das den Detektor erreicht, wird die Extinktion bestimmt. Mit Hilfe von 96-Well-Formaten können mehrere Proben und Vergleichslösungen gleichzeitig analysiert werden. Die UV/VIS-Spektroskopie wird zur indirekten Untersuchung der Funktio-

nalität von Proteinen genutzt, indem UV/VIS-aktive Enzymsubstrate eingesetzt werden, die bei der enzymatischen Umsetzung die Extinktions-Effekte in der Probe verändern. Die wellenlängenspezifische Konzentrationsabhängigkeit der absorbierenden Enzymsubstrate zum transmittierten Licht wird dabei über das Lambert-Beersche Gesetz definiert:

$$E_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d$$

E_{λ} = Extinktion bei der Wellenlänge λ [AU]

ε_{λ} = Extinktionskoeffizient der absorbierenden Substanz bei der Wellenlänge [$l \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]

d = Schichtdicke der durchstrahlten Probe [cm]

2.6 Aufbau von Hämodialysegeräten

Moderne Hämodialysegeräte sind computergesteuerte, portable Apparaturen, die aus verschiedenen Pumpensystemen, Wasser- und Elektrolytaufbereitern und Messeinheiten aufgebaut sind. Eine Blutpumpe befördert das Blut vom arterio-venösen Shunt oder Herzkatheter des Patienten durch ein Schlauchsystem zum Dialysator. Ein Antikoagulant wie Heparin oder Natriumzitrat wird über eine weitere Pumpe zugeleitet. Das Blut fließt durch das Lumen der Dialysefasern des Dialysators und wird nach Abtrennung der Urämie-Toxine über das Schlauchsystem dem Patienten wieder zugeführt. Ein Blasenfänger im venösen Schlauchsystem verhindert, dass Luftblasen in die Vene des Patienten gelangen. Innerhalb des Dialysators werden die Dialysefasern mit isotoner, erwärmter Dialysatlösung im Gegenstromprinzip umspült. Auf diese Weise können wasserlösliche, niedermolekulare Urämie-Toxine vom Blut in das Dialysat übertreten. Sofern eine Volumenänderung notwendig ist, entzieht eine zusätzliche Ultrafiltrationspumpe dem Blut Flüssigkeit. Während der Dialysebehandlung werden Parameter wie arterieller und venöser Blutdruck, Luftblasenzähler, Transmembrandruck (TMP), Temperatur, Leitfähigkeit und Elektrolytzusammensetzung der Dialysatlösung, Blutpumpengeschwindigkeit und Ultrafiltrationsvolumen gemessen. Verschiedene Versuchsreihen dieser Arbeit wurden mit konventionellen Hämodialysegeräten durchgeführt. **Abbildung 9** zeigt einen schematischen Dialysekreislauf.

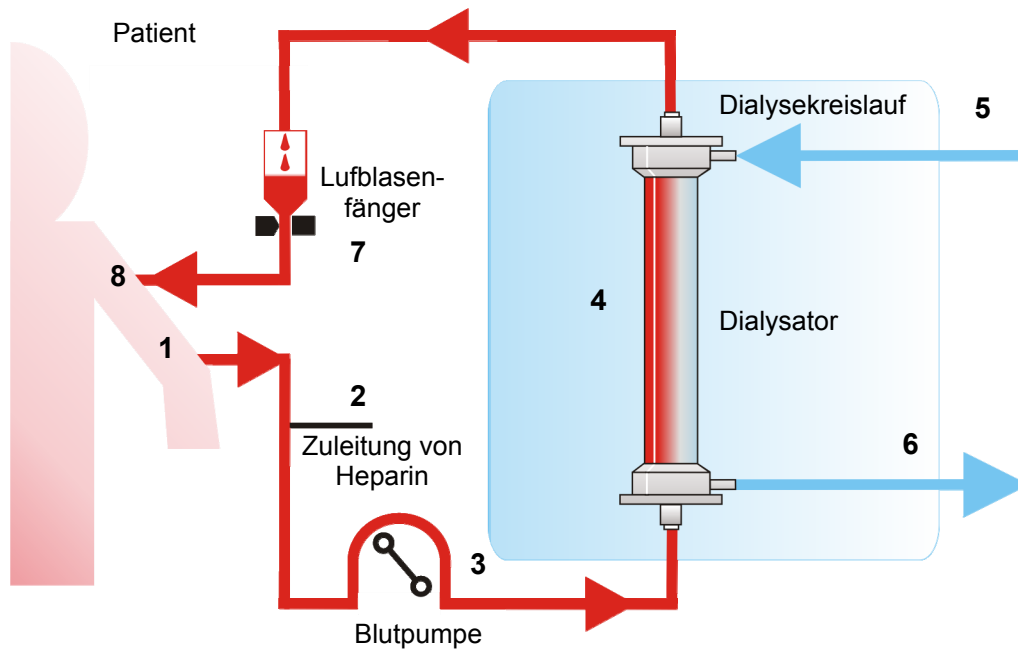


Abbildung 9: Prinzip eines extrakorporalen Kreislaufs der konventionellen Hämodialyse. (1) Das Blut wird am arterio-venösen Shunt dem Patient entnommen in ein Schlauchsystem geleitet. (2) Über eine Zuleitung wird Heparin zur Antikoagulation zugeleitet. Das Blut wird über und (3) eine Blutpumpe durch (4) einen Hämodialysator geleitet. (5 und 6) Das Dialysat wird im Gegenstromprinzip durch den Hämodialysator geleitet. Anschließend wird das Blut durch (7) einen Luftblasenfänger und (8) den arterio-venösen Shunt in den Patienten zurückgeführt.

2.7 Aufbau des FPAD-Systems

Das FPAD-Verfahren (fractionated plasma adsorption device, FPAD) ist ein extrakorporales, adsorptives Leberunterstützungsverfahren, das klinisch bei fulminantem Leberversagen eingesetzt wird. Es setzt sich aus einem konventionellen Dialysekreislauf zusammen, in den ein weiterer FPAD-Kreislauf integriert ist. Zur Antikoagulation wird Natriumzitrat verwendet.

Abbildung 10 zeigt schematisch den extrakorporalen Kreislauf des FPAD-Verfahrens.

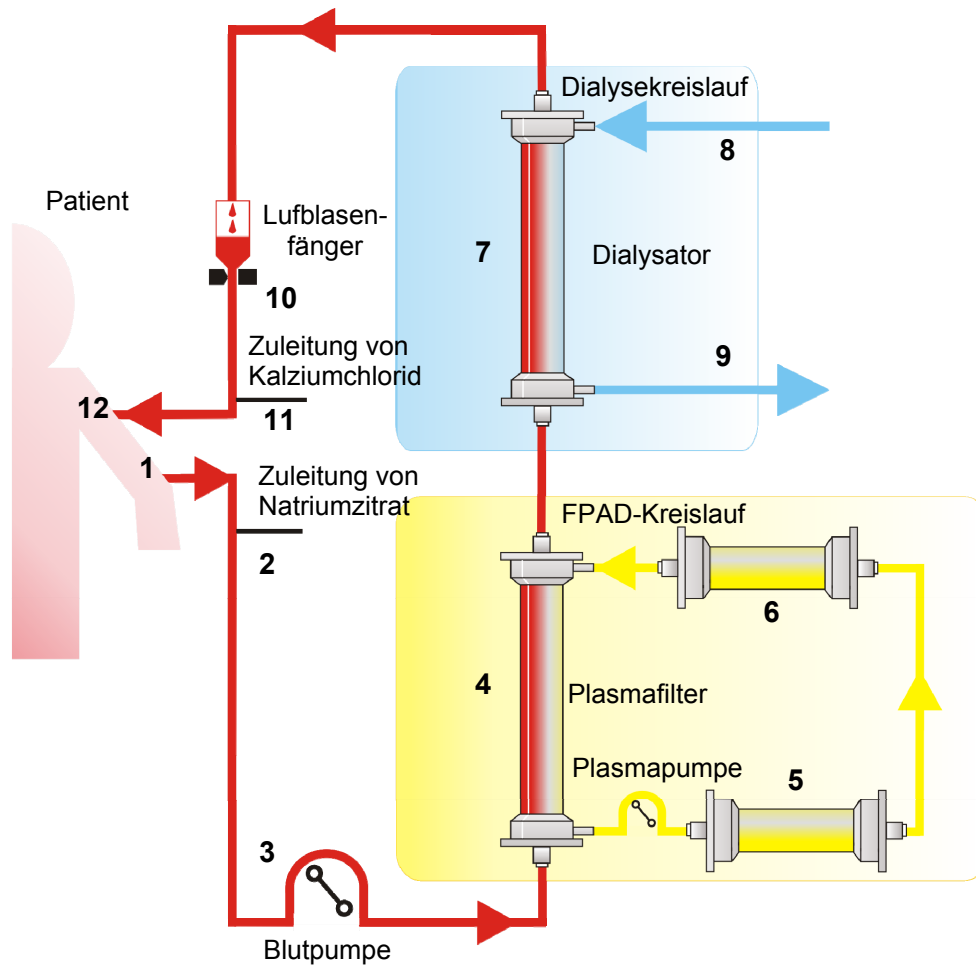


Abbildung 10: Schematische Darstellung des extrakorporalen Kreislaufs des FPAD-Verfahrens. (1) Das Blut wird am arterio-venösen Shunt dem Patient entnommen in ein Schlauchsystem geleitet. (2) Über eine Zuleitung wird Natriumzitrat zur Antikoagulation zugeleitet. Das Blut wird über und (3) eine Blutpumpe durch (4) einen Plasmafilter geleitet. (5 und 6) Das Plasma wird durch die Adsorber geleitet und danach wieder mit den zellulären Bestandteilen des Blutes zusammengeführt. Das Blut wird durch (7) einen Hämodialysator geleitet (8 und 9) Das Dialysat wird im Gegenstromprinzip durch den Hämodialysator geleitet. Anschließend wird das Blut durch (10) einen Luftblasenfänger geleitet und (11) überschüssiges Natriumzitrat durch die Zuleitung von Kalziumchlorid neutralisiert. (12) Anschließend wird das Blut über den arterio-venösen Shunt in den Patienten zurückgeführt.

Das Blut des Patienten wird über einen arterio-venösen Shunt oder Herzkatheter in ein Schlauchsystem gefördert und in einen Plasmafilter geleitet, der eine Ausschlussgrenze von 300 kDa aufweist. Die Plasmaproteine werden vom Blut separiert und im FPAD-Kreislauf durch eine hydrophoben neutralen Adsorber und einen Anionenaustauscher geleitet und dem Blut wieder zugeführt. Anschließend wird das Blut durch einen konventionellen Hämodialysator geleitet und nach Abtrennung wasserlöslicher Leber-Toxine über das Schlauchsystem dem Patienten wieder zugeführt. Ein Blasenfänger im venösen Schlauchsystem verhindert, dass Luftblasen in die Vene des Patienten gelangen. Das zur Antikoagulation verwendete Natriumzitrat wird durch die Infusion einer Kalziumchloridlösung in das Schlauch-

system neutralisiert.

Die im FPAD-Kreislauf verwendeten Adsorber binden proteingebundene Leber-Toxine auf und danach werden die gereinigten Proteine dem Blut wieder zugeführt. Das hydrophobe, neutrale Adsorberharz ist aus einem Copolymer von Polydivinylbenzen und Polystyren in Kugelform aufgebaut und retendiert hydrophobe, ungeladene Substanzen. Das Anionenaustauscherharz ist aus einem Copolymer von Polydivinylbenzen und Polystyren in Kugelform mit kationischen quartären Aminogruppen aufgebaut und retendiert anionische Substanzen. Der chemische Aufbau der Adsorber ist in **Abbildung 11** dargestellt.

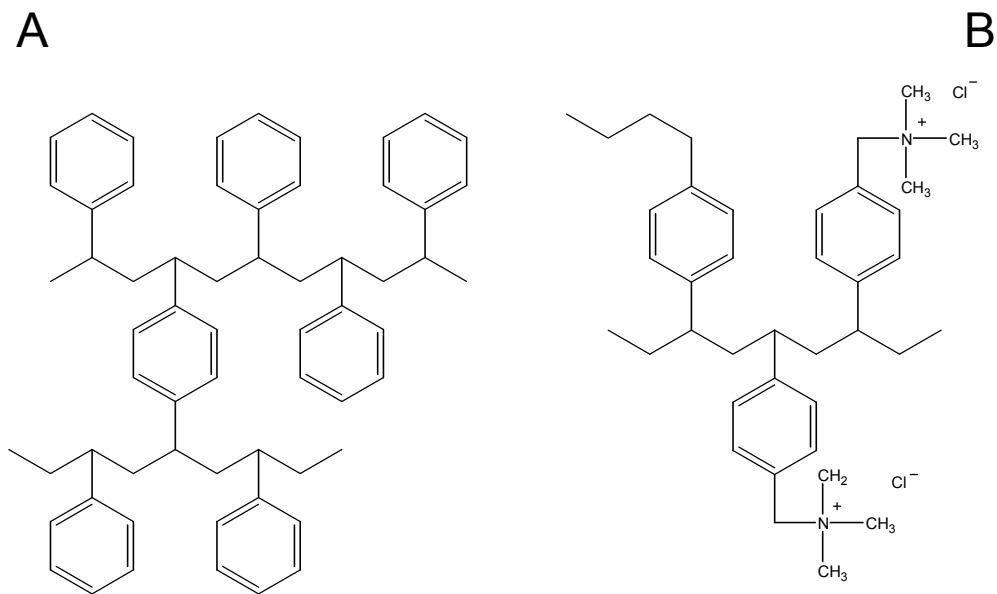


Abbildung 11: Chemischer Aufbau der Adsorber-Resine des FPAD-Verfahrens. (A) der hydrophobe Neutral-Adsorber und (B) der Anionenaustauscher.

3. Experimenteller Teil

Die verwendeten Materialien und Chemikalien wurden, sofern nicht anders vermerkt von Sigma-Aldrich (Traufkirchen, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Biorad (München, Deutschland), Bruker Daltonik (Bremen, Deutschland), Thermo-Fisher-Scientific (Schwerte, Deutschland), Rohde & Schwarz (München, Deutschland), Bonn Elektronik (Holzkirchen, Deutschland), Roche Applied Science (Mannheim, Deutschland), Fresenius Medical Care (Bad Homburg, Deutschland) und Bachem (Bubendorf, Schweiz) bezogen.

3.1 Darstellung von aromatischen Sulfonsäureestern (p-Kresylsulfat)

Die Synthese von p-Kresylsulfat wurde nach der Vorschrift von Feigenbaum und Neuberg [102] durchgeführt: Unter Eiskühlung wurden 15 g Chlorsulfonsäure mit Hilfe einer Bürette tropfenweise unter Rühren zu 10 g p-Kresol in 40 ml Pyridin gegeben. Nach beendeter Reaktion wurde 40 ml von $15 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Kaliumhydroxid-Lösung hinzugefügt. Das Präzipitat wurde in eine Nutsche überführt und mehrfach mit Diethylether gewaschen. Die Extraktion des p-Kresylsulfats aus dem Präzipitat erfolgte durch Zugabe von 70° C warmem 95 % Ethanol / Wasser in einem Wärmeschrank bei 60° C . Das Produkt wurde dreimal mit 4° C kaltem 95 % Ethanol / Wasser gewaschen und schließlich getrocknet. Das Produkt wurde einer Qualitätsanalyse mittels LC-ESI-Massenspektrometrie unterzogen. Es wurde ein Ionen-Fallen-ESI-Massenspektrometer (HCT, Bruker Daltonik) verwendet. In einer Reversed-Phase-chromatographischen Methode wurden 0,1 % Ameisensäure, 0,01 % Trifluoressigsäure in Wasser als Laufpuffer und 100 % Acetonitril und 0,1 % Ameisensäure als Elutionsmittel mit einem Fluss von $10 \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$ verwendet. Es wurde eine Gradientenelution mit 5 % B von 0-1 min, mit 5-50 % B von 1-22 min durchgeführt und das Syntheseprodukt in einem Detektionsbereich von 50 Da bis 500 Da im negativen Ultrascan-Modus identifiziert. Der Fluss des Trockungsgases betrug $5 \text{ l} \cdot \text{min}^{-1}$, der Nebulizerdruck an der Spülkappilare wurde auf 10 psi eingestellt, die Kapilartemperatur betrug 300° C und die maximale Akkumulationszeit betrug 200 ms.

3.2 Elutionsmittelvergleiche in der Ionenpaar-Reversed-Phase-Chromatographie

In den folgenden Abschnitten werden Versuchsreihen beschrieben, die zum Vergleich der Elutionseigenschaften von Acetonitril, Ethanol, Methanol und 1-Propanol durchgeführt wurden.

3.2.1 Ionenpaar-Reversed-Phase-Chromatographie von Dinukleotiden unter Verwendung der Ionenpaar-Reagenz Triethylammoniumacetat

Ein Gemisch aus 6 Diadenosinpolyphosphaten (Ap_nA ; mit $n = 2-6$) (jeweils $1 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) wurde reversed-phase-chromatographisch durch Gradientenelution mit einer Chromolith® Performance RP-18e Säule (100 x 4.6 mm I.D., Merck) separiert. Es wurden das Lösungsmittel A $40 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Triethylammoniumacetat (TEAA) mit einem pH-Wert von 6,5 und die Elutionsmittel B₁₋₄ 80 % Acetonitril-Wasser, 50% Ethanol-Wasser, 100% Methanol und 50 % 1-Propanol-Wasser verwendet. Bei der Verwendung der Elutionsmittel Acetonitril-Wasser, Ethanol-Wasser und 1-Propanol-Wasser wurde ein Lineargradient von 0 % B bis 10 % B in 30 min verwendet. Bei der Verwendung des Elutionsmittels Methanol wurde ein Lineargradient von 0 % B bis 20 % B in 30 min verwendet. 10 μl jeder Probe wurde in 140 μl Lösungsmittel A aufgenommen, das Injektionsvolumen betrug 100 μl . Der Fluss der mobilen Phase betrug $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Die chromatographische Aufreinigung erfolgte bei Raumtemperatur (22° C) an einer HPLC-Anlage (L6200, Merck). Die UV-Absorption wurde mit einem variablen UV-Detektor (759 A, Absorbance Detector, Applied Biosystems) bei 254 nm detektiert. Die Daten wurden mit einem Chromeleon Lab System 6.60 (Dionex, Thermo-Fischer-Scientific) aufgezeichnet und prozessiert.

3.2.2 Ionenpaar-Reversed-Phase-Chromatographie von Dinukleotiden unter Verwendung der Ionenpaarreagenz Tetrabutylammoniumsulfat

Ein Gemisch aus 6 Diadenosinpolyphosphaten (Ap_nA ; mit $n = 2-6$) (jeweils $1 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) wurde reversed-phase-chromatographisch durch Gradientenelution mit einer Chromolith® Performance RP-18e Säule (100 x 4.6 mm I.D., Merck) separiert. Es wurden das Lösungsmittel A $4 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tetrabutylammoniumsulfat (TBA), $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4) mit einem pH-Wert von 6,5 und die Elutionsmittel B₁₋₄ 80 % Acetonitril-Wasser, 100% Ethanol, 100% Methanol und 100 % 1-Propanol verwendet. Bei der Verwendung der Elutionsmittel Acetonitril-Wasser und Ethanol wurde ein Lineargradient von 0 % B bis 40 % B in 30 min verwendet. Bei der Verwendung des Elutionsmittels Methanol wurde ein Lineargradient von 0 % B bis 50 % B in 30 min verwendet. Bei der Verwendung von 1-Propanol wurde ein Lineargradient von 0 % B bis 10 % B in 30 verwendet. Die Proben wurden wie in **Abschnitt 3.2.1**

beschrieben aufgearbeitet und quantifiziert.

3.2.3 Ionenpaar-Reversed-Phase-Chromatographie von Peptiden unter Verwendung der Ionenpaar-Reagenz Trifluoressigsäure

Ein Gemisch aus 3 Peptiden (Angiotensin I, Angiotensin II und Bradykinin, jeweils $2 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) wurde reversed-phase-chromatographisch durch Gradientenelution mit einer Chromolith® Performance RP-18e Säule (100 x 4.6 mm I.D., Merck) separiert. Es wurden das Lösungsmittel A 0,1 % Trifluoressigsäure in Wasser und die Elutionsmittel B₁₋₄ 80 % Acetonitril-Wasser, 100% Ethanol, 100% Methanol und 100 % 1-Propanol verwendet. Bei der Verwendung der Elutionsmittel Acetonitril-Wasser, Ethanol und 1-Propanol wurde ein Lineargradient von 0 % B bis 40 % B in 30 min verwendet. Bei der Verwendung des Elutionsmittels Methanol wurde ein Lineargradient von 0 % B bis 50 % B in 30 min verwendet. 10 μl jeder Probe wurde in 140 μl Lösungsmittel A aufgenommen, das Injektionsvolumen betrug 100 μl . Der Fluss der mobilen Phase betrug $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Die chromatographische Aufreinigung erfolgte bei Raumtemperatur (22° C) an einer HPLC-Anlage (L6200, Merck). Die UV-Absorption wurde mit einem variablen UV-Detektor (759 A, Absorbance Detector, Applied Biosystems) bei 220 nm detektiert. Die Daten wurden mit einem Chromeleon Lab System 6.60 (Dionex, Thermo-Fisher-Scientific) aufgezeichnet und prozessiert.

3.2.4 Ionenpaar-Reversed-Phase-Chromatographie von tryptischen Peptiden unter Verwendung der Ionenpaar-Reagenz Trifluoressigsäure

Humanes Serumalbumin ($1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) wurde mit Trypsin (0.5% w/v) in Ammonium-bikarbonat (50mmol/l, pH 7.5) bei 37° C über Nacht inkubiert. Die tryptischen Peptide wurden durch eine 10 kDa Zentrifugationseinheit (Amicon Ultracel, Merck) filtriert und reversed-phase-chromatographisch durch Gradientenelution mit einer Chromolith® Performance RP-18e Säule (100 x 4.6 mm I.D., Merck) separiert. Es wurden das Lösungsmittel A 0,1 % Trifluoressigsäure in Wasser und die Elutionsmittel B₁₋₄ 80 % Acetonitril-Wasser, 100% Ethanol, 100% Methanol und 50 % 1-Propanol-Wasser verwendet. Bei der Verwendung der Elutionsmittel Acetonitril-Wasser und Ethanol wurde ein Lineargradient von 0 % B bis 50 % B in 90 min verwendet. Bei der Verwendung des Elutionsmittels 1-Propanol wurde ein Lineargradient von 0 % B bis 80 % B in 90 min verwendet. Bei der Verwendung des Elutionsmittels Methanol wurde ein Lineargradient von 0 % B bis 80 % B in 90 min verwendet. Die Proben wurden wie in **Abschnitt 3.2.3** beschrieben aufgearbeitet und analysiert.

3.2.5 Ionenpaar-Reversed-Phase-Chromatographie von Proteinen unter Verwendung der Ionenpaar-Reagenz Trifluoressigsäure

Ein Gemisch aus 3 Proteinen (Trypsininhibitor Typ II S, Cytochrom C und Myoglobin, jeweils $10 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) wurde reversed-phase-chromatographisch durch Gradientenelution mit einer Discovery Bio Wide Pore C5-3 Reversed-Phase Säule (100 x 4.6 mm I.D., Sigma-Aldrich) separiert. Es wurden das Lösungsmittel A 0,1 % Trifluoressigsäure in Wasser und die Elutionsmittel B₁₋₄ 80 % Acetonitril-Wasser, 100% Ethanol, 100% Methanol und 100 % 1-Propanol verwendet. Bei der Verwendung der Elutionsmittel Acetonitril-Wasser, Ethanol, 1-Propanol und Methanol wurde ein Lineargradient von 0 % B bis 80 % B in 90 min verwendet. Die Proben wurden wie in **Abschnitt 3.2.3** beschrieben aufgearbeitet und analysiert.

3.3 Entwicklung eines Dialyseverfahrens zur vermehrten Abtrennung proteingebundener Urämie-Toxine bei erhöhter Ionenstärke

Zur Entwicklung eines Dialyseverfahrens mit vermehrter Abtrennung proteingebundener Urämie-Toxine bei erhöhter Ionenstärke wurden Versuchsreihen durchgeführt, die in den folgenden Abschnitten beschrieben werden.

3.3.1 Bestimmung des proteingebundenen Anteils von Phenylelessigsäure, Indoxylsulfat und p-Kresylsulfat in Abhängigkeit von steigenden Kochsalzkonzentrationen

Es wurde drei unterschiedlichen Spendern 40 ml heparinisertes Vollblut mittels 50-ml-Einwegspritze entnommen und bei 2500 g und 4° C für 20 min zentrifugiert. Das Blutplasma wurde in ein neues Gefäß überführt und bei 4° C gelagert; die zellulären Blutbestandteile wurden verworfen. Pro Spender wurde 10 ml humanes Plasma mit Phenylelessigsäure (PAA), Indoxylsulfat (IDS) und p-Kresylsulfat (CRS) (finale Konzentration: $3 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ PAA, $0,2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ IDS und CRS) versetzt und für 1 h bei Raumtemperatur im Rotator inkubiert. Jeweils 600 μl des Plasmas wurden mit Natriumchlorid versetzt, um Endkonzentrationen von $250 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $300 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $500 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ und $1000 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ zu erreichen. Einer Probe wurde kein Kochsalz zugesetzt. 10 μg Resorcin wurde als interner Standard zugesetzt. Die Proben wurden 30 min bei Raumtemperatur im Rotator inkubiert. 500 μl Probe wurden jeweils in 250 μl Fraktionen in zwei 30 kDa Zentrifugationseinheiten (Amicon Ultracel, Merck) überführt. Die erste Hälfte der Proben wurde für 15 min bei 95° C denaturiert, die zweite Hälfte wurde bei Raumtemperatur aufbewahrt. Gemeinsam wurden alle Proben bei 3000 g und 4 C für 1,5 h zentrifugiert. Das Retentat wurde verworfen, das Volumen des Filtrats wurde bestimmt und das Filtrat bei -20° C gelagert. Die chromatographische Quantifizierung von Phenylelessigsäu-

re, Indoxylsulfat und p-Kresylsulfat aus dem Filtrat erfolgte durch Gradientenelution mit einer Chromolith® Performance RP-18e Säule (100 x 4.6 mm I.D., Merck). Es wurden die Lösungsmittel A $4 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tetrabutylammoniumsulfat (TBA), $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4), pH 6,5 und B 100% Ethanol, pH 6 mit 1%-iger Trifluoressigsäure (TFA) eingestellt [96] verwendet. Das Lösungsmittel B wurde von 2 % auf 60 % innerhalb von 20 min erhöht. $20 \mu\text{l}$ jeder Probe wurde in $130 \mu\text{l}$ Lösungsmittel A aufgenommen, das Injektionsvolumen betrug $100 \mu\text{l}$. Der Fluss der mobilen Phase betrug $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Die chromatographische Aufreinigung erfolgte bei Raumtemperatur (22°C) an einer HPLC-Anlage (L6200, Merck). Die UV-Absorption wurde mit einem variablen UV-Detektor (759 A, Absorbance Detector, Applied Biosystems) bei 220 nm detektiert. Die Daten wurden mit einem Chromeleon Lab System 6.60 (Dionex, Thermo-Fisher-Scientific) aufgezeichnet und prozessiert. Anhand von Standardläufen und Verdünnungsreihen wurden Phenyllessigsäure, Indoxylsulfat, p-Kresylsulfat quantifiziert.

3.3.2 Bestimmung der Enzymaktivität ausgewählter Plasmaproteine bei erhöhter Ionenstärke

In den folgenden Abschnitten werden Versuchsdurchführungen beschrieben, die durchgeführt wurden, um den Effekt einer $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Kochsalzlösung auf die Enzymaktivität der Laktatdehydrogenase (LDH), der Superoxiddismutase (SOD) und der alkalischen Phosphatase (AP) zu untersuchen.

3.3.2.1 Laktatdehydrogenase

$10 \mu\text{l}$ der Laktatdehydrogenase ($5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) wurde mit $490 \mu\text{l}$ physiologischem Puffer beziehungsweise einer $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl-Lösung für 30 min im Rotator bei Raumtemperatur inkubiert. Die $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Kochsalzlösung wurde nach der Inkubation mit Micro-Bio-Spin 30 Entsalzungssäulen (Biorad) gegen physiologischen Puffer ersetzt. Der Tris-Puffer der Micro-Bio-Spin-30-Entsalzungssäulen wurde gegen physiologischen Puffer substituiert, indem die Säulen dreimal mit $500 \mu\text{l}$ physiologischem Puffer zentrifugiert wurden. $450 \mu\text{l}$ wurden auf 6 Biospin-Säulen zu je $75 \mu\text{l}$ LDH-Enzymlösung verteilt. Zwei Eluate wurden jeweils nach der Entsalzung für den Enzymassay gepoolt. Die Säulen wurden für 4 min bei 1000 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Enzymassay wurde von Roche Applied Sciences bezogen und an einem Multiplattenphotometer (Mutiscan, Thermo-Fisher-Scientific) durchgeführt, die UV-Absorption wurde bei 492 nm detektiert. Die lyophilisierte Diaphorase wurde in 1 ml bidestilliertem Wasser aufgenommen und $250 \mu\text{l}$ mit $11,25 \text{ ml}$ Farbstofflösung zu der Reaktionslösung gemischt. Als Negativkontrolle wurden $100 \mu\text{l}$ physiologischer Puffer und $100 \mu\text{l}$ Reakti-

onslösung verwendet. 50 µl LDH-Probe wurden mit 100 µl Reaktionslösung und 50 µl bidestilliertem Wasser gemischt. Zur Messung der LDH-Vergleichsprobe wurde 50 µl LDH-Vergleichslösung ($10 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$) mit 100 µl Reaktionslösung und 50 µl bidestilliertem Wasser gemischt. Die Inkubationszeit betrug 30 min. Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Mittels Verdünnungsreihe eines Standards wurde die relative Enzymaktivität (%) berechnet. Mit Verdünnungsreihen der Proben wurde die relative Aktivität der Laktatdehydrogenase über die folgende Beziehung bestimmt:

$$\text{LDH Aktivität (\%)} = \frac{(E_{\text{Probe}} - E_{\text{Blank 1}})}{(E_{\text{Kont}} - E_{\text{Blank 1}})} \cdot 100$$

E_{Probe} = Extinktion der Probe [AU]

$E_{\text{Blank 1}}$ = Extinktion des Leerwertes (Blank) [AU]

E_{Kont} = Extinktion der LDH-Vergleichsprobe [AU]

3.3.2.2 Superoxiddismutase (SOD)

Die Superoxiddismutase wurde in destilliertem Wasser gelöst ($60.000 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$). Es wurden 10 µl davon mit 490 µl physiologischem Puffer bzw. einer $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Kochsalzlösung für 30 min im Rotator bei Raumtemperatur inkubiert. Die Kochsalzreduktion wurde wie in **Abschnitt 3.3.2.1** beschrieben durchgeführt. Der Enzymassay wurde von Sigma-Aldrich bezogen und an einem Multiplattenphotometer (Mutiscan, Thermo-Fisher-Scientific) durchgeführt, die UV-Absorption wurde bei 450 nm detektiert. 1 ml WST-Lösung wurde mit 19 ml Pufferlösung verdünnt, 2,5 ml Verdünnungspuffer (Dilutionspuffer) wurde mit 15 µl Xanthinoxidase-Lösung versetzt. Zur Messung wurden 20 µl SOD-Probe mit 200 µl WST-Lösung und 20 µl Enzymlösung versetzt. Zur Messung von zwei Leerwertmessungen wurden 20 µl bidestilliertes Wasser mit 200 µl WST-Lösung und 20 µl Enzymlösung, sowie 20 µl bidestilliertes Wasser mit 200 µl WST-Lösung und 20 µl Dilutionspuffer versetzt. Zur Messung der SOD-Vergleichsprobe wurde 20 µl SOD-Vergleichslösung ($10 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$) mit 200 µl WST-Lösung und 20 µl Dilutionspuffer versetzt. Die Inkubationszeit betrug 20 min, es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Mittels Verdünnungsreihe eines Standards wurde die relative Enzymaktivität (%) berechnet. Verdünnungsreihen der Proben wurden erstellt und die relative Aktivität der Superoxiddismutase wurde unter Verwendung der folgenden Beziehung bestimmt:

$$\text{SOD Aktivität (\%)} = \frac{[(E_{\text{Kont}} - E_{\text{Blank1}}) - (E_{\text{Probe}} - E_{\text{Blank2}})]}{(E_{\text{Kont}} - E_{\text{Blank1}})} \cdot 100$$

E_{Probe} = Extinktion der Probe [AU]

$E_{\text{Blank 1,2}}$ = Extinktion der Leerwerte 1 und 2 (Blank 1,2) [AU]

E_{Kont} = Extinktion der LDH-Vergleichsprobe [AU]

3.3.2.3 Alkalische Phosphatase

Die alkalische Phosphatase wurde in Puffer gelöst ($2.940 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$) bezogen und $3,5 \mu\text{l}$ der Enzym-Stammlösung wurden in $31,5 \mu\text{l}$ dest. Wasser verdünnt. $3,5 \mu\text{l}$ der Enzymlösung wurde mit $496,5 \mu\text{l}$ physiologischem Puffer bzw. einer $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Kochsalzlösung versetzt und für 30 min im Rotator bei Raumtemperatur inkubiert. Die Kochsalzreduktion wurde wie in **Abschnitt 3.3.2.1** beschrieben durchgeführt. Der Enzymassay wurde von Sigma-Aldrich bezogen und an einem Multiplattenphotometer (Mutiscan, Thermo-Fisher-Scientific) durchgeführt, die UV-Absorption wurde bei 405 nm detektiert. Es wurde eine Kalibrierfunktion mit Dreifachbestimmung mit der jeweiligen AP-Konzentrationen von $100 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$ bis $1 \text{ mU}\cdot\text{ml}^{-1}$ durchgeführt und die relative Enzymaktivität berechnet. Es wurde eine Verdünnungsreihe der eluierten alkalischen Phosphatase erstellt und $10 \mu\text{l}$ jeder Verdünnung pro Well im 96 Well-Format mit $200 \mu\text{l}$ p-Nitrophenylphosphat-Lösung versetzt und tripliziert photometrisch bei 405 nm gemessen. Verdünnungsreihen der Proben wurden erstellt und die relative Aktivität der Laktatdehydrogenase wurde über die folgende Beziehung bestimmt:

$$\text{AP Aktivität (\%)} = \frac{(E_{\text{Probe}} - E_{\text{Blank 1}})}{(E_{\text{Kont}} - E_{\text{Blank 1}})} \cdot 100$$

E_{Probe} = Extinktion der Probe [AU]

$E_{\text{Blank 1}}$ = Extinktion des Leerwerte 1 (Blank 1) [AU]

E_{Kont} = Extinktion der AP-Kontrollprobe [AU]

3.3.3 Bestimmung des Effekts erhöhter Ionenstärke auf die Struktur von Plasmaproteinen

β -2-Mikroglobulin, α -Chymotrypsinogen und Hämoglobin wurden 30 min mit einer $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Kochsalzlösung bei Raumtemperatur in einem Rotator inkubiert. In einem zweiten Ansatz wurden die Proteine in physiologischer Kochsalzlösung inkubiert. Die Reduktion der Kochsalzkonzentration wurde nach der in **Abschnitt 3.3.2.1** beschriebenen Methode durchge-

führt. Das Volumen der Proben betrug 600 μl . 500 μl der Proben wurden mit 50 μl Deuteriumoxid (D_2O) und 50 μl Deuteriumoxid mit 0,75 % 3-Trimethylsilyl-[2,2,3,3- $^2\text{H}_4$]-Propionat (TSP) versetzt und bei -20°C gelagert. Die ^1H -NMR-Messung wurde mit einem 600 MHz-Spektrometer (DRX 600, Bruker Daltonik) bei einer magnetischen Feldstärke von 600 MHz durchgeführt. Mit Hilfe eines 90° -Impuls von 11,5 μs Länge wurde das Wassersignal unterdrückt, jede Probe wurde mit 1.024 Messwiederholungen bei einer Temperatur von 25°C gemessen. Die Auswertung der ^1H -NMR-Spektren erfolgte mit der Software MestRe-C (Version 3.4.0). Der Freie-Induktions-Abfall der Protonenspins wurde zuerst fourier-transformiert mit anschließender Phasen- und Basislinienkorrektur. Die chemische Verschiebung der Referenzsubstanz TSP wurde zur Kalibrierung verwendet.

3.3.4 Bestimmung der Abtrennrates von Phenylelessigsäure, Indoxylsulfat und p-Kresylsulfat während einer *in vitro*-Hämodialyse einer Proteinlösung unter hypertonen Kochsalzbedingungen

10 l einer Albumin-Lösung (bovines Serumalbumin, (BSA) $60\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, 0,9 % Natriumchlorid) wurde mit Phenylelessigsäure ($1\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), Indoxylsulfat ($0,2\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) und p-Kresylsulfat ($0,2\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) versetzt und über Nacht unter Rühren bei Raumtemperatur inkubiert. 3 l der Protein-Toxin-Lösung wurden mit Kochsalz ($500\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) versetzt und zusammen mit 3 l Protein-Toxin-Lösung für eine Kontrollversuchsreihe ohne Zusatz von Kochsalz für eine Stunde unter Rühren bei Raumtemperatur inkubiert. Unter Verwendung eines vereinfachten *in vitro*-Dialyseaufbaus mit einer externen Schlauchpumpe, einem Schlauchsystem (Biofine[®], Fresenius Medical Care) und einem konventionellen Hämodialysator (FX 5, Fresenius Medical Care) wurden die Protein-Toxin-Lösungen im einfachen Durchgang (single-pass) ohne Rezirkulation dialysiert (**Abbildung 12**).

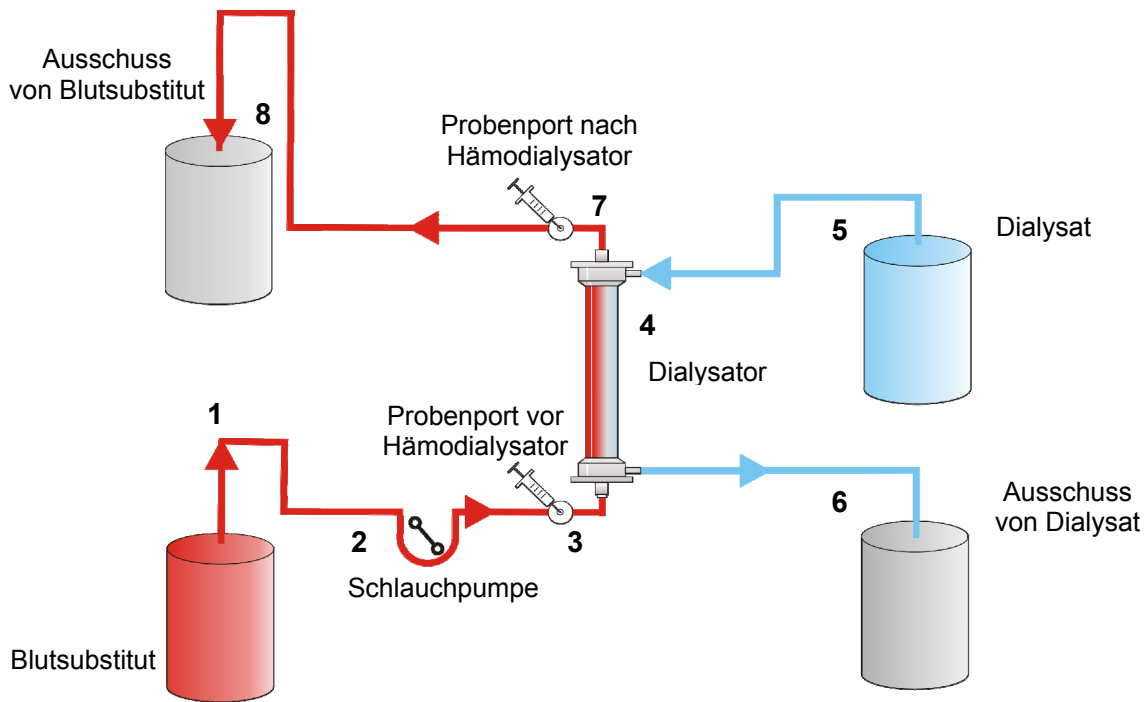


Abbildung 12: Schematische Darstellung der *in vitro*-Dialyse mit einmaligem Durchgang (single-pass) der Testlösung durch den Hämodialysator. (1) Die Lösung wird mit (2) der Schlauchpumpe durch (3) den ersten Probenport in (4) den Hämodialysator geleitet. Der Hämodialysator wird (5 und 6) mit Dialysat durchflossen. Hinter dem Hämodialysator wird die Lösung durch (7) den zweiten Probenport in (8) das Ausschussgefäß geleitet. Die Proben werden mittels Einwegspritze entnommen.

Das Dialysat wurde über eine konventionelle Hämodialyse-Apparatur (Modell 4008 S, Fresenius Medical Care) aufbereitet und gefördert. Die Dialyse-Apparatur wurde mit konventionellen Dialyse-Bikarbonatkonzentraten (BC-F 8,4 %, 84 g NaHCO_3 , Fresenius Medical Care) und konventionellen Elektrolytkonzentraten (SK-F 313/2, 210,68 g Natriumchlorid, 6,34 g Kalziumchlorid Dihydrat, 6,31 g Essigsäure, 7,83 g Kaliumchlorid, 3,56 g Magnesiumchlorid Hexahydrat, 38,5 g Glucose, Fresenius Medical Care) betrieben. Der Dialysatfluss der Dialyse-Apparatur betrug $500 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Mit Hilfe der Bypassapparatur, die im Rahmen der Dissertation entwickelt wurde und in **Abschnitt 3.4.2** beschrieben wird (**Abbildung 19**), wurde der Dialysatfluss in den Versuchsreihen auf $200 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ reduziert. Die Protein-Toxin-Lösung wurde bei einem Fluss von $200 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ für 1,5 min dialysiert und mit 2-ml-Einwegspritzen wurden Proben über eine Entnahmemembran aus dem Blut Schlauch vor und hinter dem Hämodialysator entnommen. Jeder Versuch wurde dreimalig wiederholt ($N = 3$). Jeweils 0,5 ml der Proben wurde mit 50 μl internem Standard (2,6-Dimethylphenol, $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) und mit 34 μl Perchlorsäure (70 %) versetzt, 30 s gemischt und bei 10.000 g für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Proteinpräzipitat wurde verworfen, der Überstand mit 30 μl $15 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Kaliumhydroxid-Lösung auf einen alkalischen pH-Wert über 9,5 titriert und bei -20°C einge-

froren. Nach dem Tauen der Proben konnte das entstandene Kaliumperchlorat (KClO_4) durch Zentrifugation bei 10.000 g für 5 min bei Raumtemperatur präzipitiert werden. Der resultierende Überstand wurde bis zur weiteren Aufreinigung bei -20°C gelagert. Die Urämie-Toxine wurden mittels Ionenpaar-Reversed-Phase-Chromatographie unter Verwendung einer Lineargradientenelution fraktioniert und quantifiziert. 50 μl der Proben wurden mit 100 μl Pufferlösung (92,5 μl 40 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Triethylamoniumacetat, 5 μl 1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Triethylamoniumacetat und 2,5 μl Salzsäure (25 %)) versetzt. Als Laufmittel wurde 40 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Triethylamoniumacetat in Wasser bei einem pH-Wert von 6,5 verwendet, als Elutionsmittel fand 80 % Ethanol / Wasser Verwendung. Ein Lineargradient von 1 % B bis 60 % B in 10 min fand Verwendung. Der Fluss betrug 2 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Das Injektionsvolumen betrug 140 μl . Die chromatographische Aufreinigung erfolgte mit einer HPLC-Anlage (L6200, Merck) bei Raumtemperatur. Die UV-Adsorption wurde bei 260 nm detektiert. Die Daten wurden mit einem Chromeleon Lab System 6.60 (Dionex, Thermo-Fisher-Scientific) aufgezeichnet und prozessiert. Anhand von Standardaufreinigungen und Verdünnungsreihen wurden Phenyllessigsäure, Indoxylsulfat, p-Kresylsulfat sowie der interne Standard 2,6-Dimethylphenol quantifiziert.

3.3.5 Entwicklung eines modifizierten extrakorporalen Hämodialyseverfahrens mit prädilutischer hypertoner Kochsalzinfusion

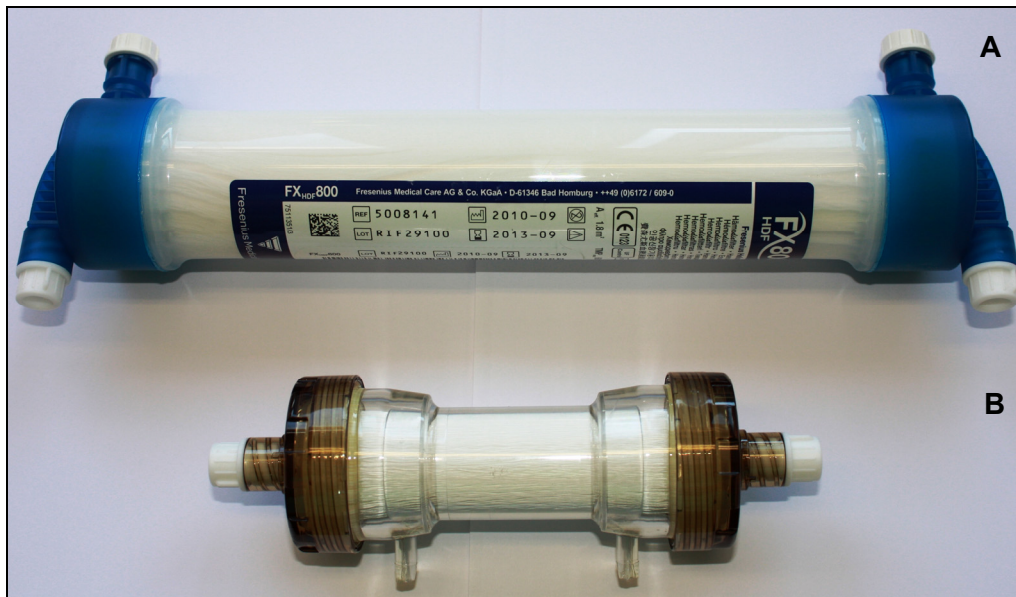


Abbildung 13: Fotografische Darstellung (A) eines konventionellen Hämodialysators und (B) des entwickelten Minidialysators als Kochsalzdispenser

Für die Entwicklung eines modifizierten Hämodialyseverfahrens mit „prädilutischer hypertoner Kochsalzinfusion“ wurden Versuchsreihen unter Verwendung einer konventionellen Hämodialysemaschine (Modell 4008 S, Fresenius Medical Care) durchgeführt. Die Dialysem-

schine wurde mit konventionellen Dialyse-Bikarbonatkonzentraten (BC-F 8,4 %, 84 g NaHCO₃, Fresenius Medical Care) und konventionellen Elektrolytkonzentraten (SK-F 313/2, 210,68 g Natriumchlorid, 6,34 g Kalziumchlorid Dihydrat, 6,31 g Essigsäure, 7,83 g Kaliumchlorid, 3,56 g Magnesiumchlorid Hexahydrat, 38,5 g Glucose, Fresenius Medical Care) betrieben. Verwendung fanden konventionelle Blutschlauchsysteme (LifeLineBeta[®], Fresenius Medical Care) und konventionelle Hämodialysatoren (FX 800, FX 5, Fresenius Medical Care). Ein Minidialysator als Kochsalzdispenser (**Abbildung 13**) wurde direkt vor dem Eintritt in den Hämodialysator in den extrakorporalen Dialysekreislauf integriert. Die

Abbildung 14 zeigt den schematischen Aufbau des modifizierten Hämodialyseverfahrens mit prädilutischer hypertoner Kochsalzinfusion.

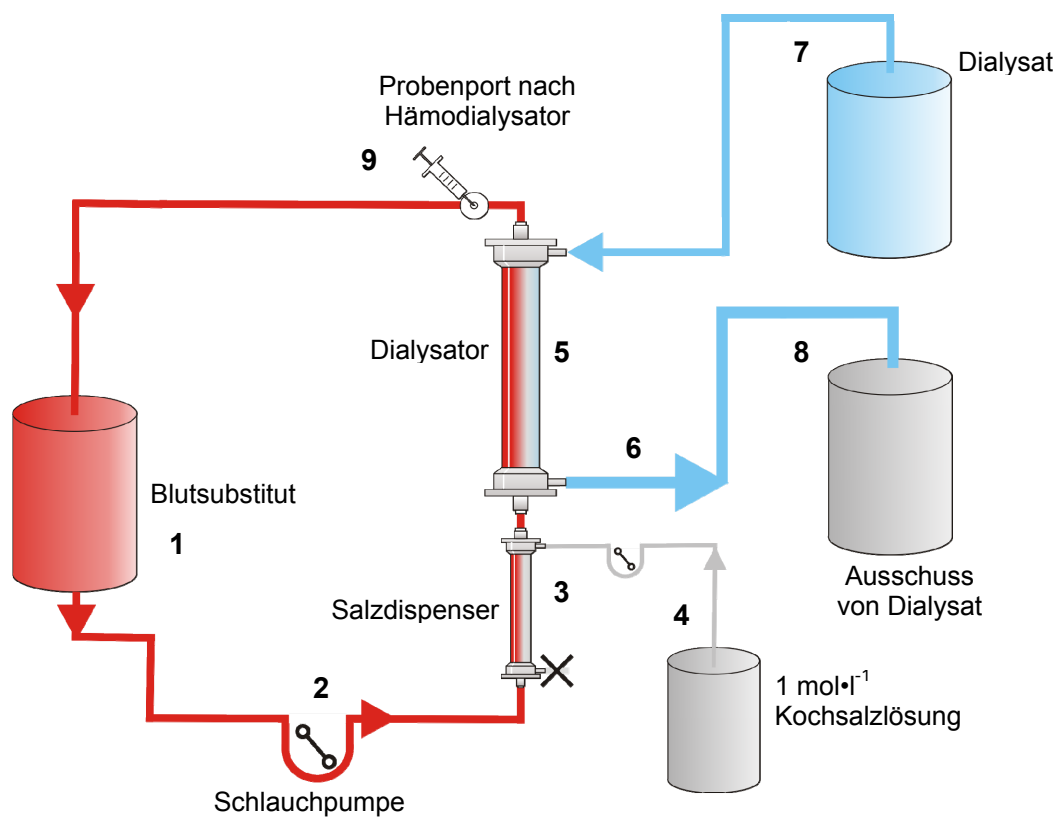


Abbildung 14: Schematische Darstellung eines extrakorporalen Dialysekreislaufs mit hypertoner Kochsalzinfusion. (1) Das Blut wird mit (2) einer Blutpumpe durch (3) den „Salzdispenser“ geleitet und mit (4) einer 1 mol·l⁻¹ Kochsalzlösung versetzt. (5) Im Hämodialysator wird das überschüssige Kochsalz durch (6) die Ultrafiltration abgetrennt. Der Hämodialysator wird (7 und 8) mit Dialysat durchflossen. (9) Am Probenport werden Proben entnommen und das Blut wird in das Blutreservoir zurückgeleitet.

Die *in vitro*-Dialysen wurden mit einem Blutfluss von 250 ml·min⁻¹ und einem Dialysatfluss von 500 ml·min⁻¹ durchgeführt, der Salzpumpenfluss wurde, beginnend bei der physiologischen Konzentration von 140 mmol·l⁻¹, in 20 mmol·l⁻¹ Schritten erhöht. Die Konzentration der

applizierten Kochsalzlösung betrug $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Natriumchlorid. Der Fluss der Salzpumpe wurde mit Hilfe der folgenden Beziehung anhand der effektiv geforderten Kochsalzkonzentration am Eingang des Hämodialysators berechnet:

$$Q_{\text{Salzpumpe}} = \frac{|C_{\text{Blut}} - C_{\text{eff.}}| \cdot Q_{\text{Blutpumpe}}}{|C_{\text{Salz}} - C_{\text{eff.}}|}$$

$Q_{\text{Salzpumpe}}$ = Flussgeschwindigkeit der Salzpumpe [$\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$]

$Q_{\text{Blutpumpe}}$ = Flussgeschwindigkeit der Blutpumpe [$\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$]

C_{Blut} = Kochsalzkonzentration im Blut [$\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$]

$C_{\text{eff.}}$ = effektive Kochsalzkonzentration am Dialysator [$\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$]

C_{Salz} = Konzentration der Kochsalzlösung [$\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$]

3.3.6 Bestimmung einer hämokompatiblen Kochsalzkonzentration bei einer *in vitro*-Hämodialyse mit prädilutischer, hypertoner Kochsalzinfusion

500 ml hepariniertes, humanes Vollblut wurde einem Spender aus der Armvene entnommen und mit Hilfe einer konventionellen Dialysemaschine (S 5008, Fresenius Medical Care) zirkuliert. Ein konventioneller Hämodialyse-Filter (FX 800, Fresenius Medical Care) und Schlauchsysteme (LifeLineBeta[®], Fresenius Medical Care) sowie, vorgeschaltet, der als Kochsalzdispenser fungierende Minidialysator, wie in **Abschnitt 3.3.4** beschrieben (**Abbildung 13** und

Abbildung 14), wurden in das Dialysegerät eingesetzt. Das Blut wurde initial 15 min unter physiologischen Bedingungen ohne Ultrafiltration zirkuliert. Dann wurde die Kochsalzkonzentration im Blut nach jeweils 30 min mittels externer Schlauchpumpe über den Kochsalzdispenser um $20 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaCl erhöht. Das zugeführte Volumen wurde über die Ultrafiltration abgetrennt. An der arteriellen Entnahmestelle des Schlauchsystems wurden zwischen 10 min und 165 min Rezirkulationszeit alle 15 min jeweils 1,2 ml Blutproben zu Bestimmung des freien Hämoglobins und des Blutbildes sowie 2 ml Blutproben zur Bestimmung der Ionenstärke entnommen. Die Proben wurden bei 2.500 g für 10 min und 4° C zentrifugiert und das überstehende Plasma abgenommen. Das Plasma wurde nochmals bei 2.500 g für 10 min und 4° C zentrifugiert und in Photoküvetten überführt. Die freie Hämoglobinkonzentration wurde durch die Methode nach Cripps [103] bestimmt: Photometrisch wurden die Extinktionen bei den Wellenlängen $W_2 = 560 \text{ nm}$, $W_1 = 576,5 \text{ nm}$ und $W_3 = 593 \text{ nm}$ gemessen und die Hämoglobinkonzentration mittels folgender Beziehung bestimmt:

$$\text{freies Hb} = 181,7 \cdot \left(E_{w2} - \frac{(E_{w1} + E_{w3})}{2} \right)$$

E_{w1} = Extinktion der Probe bei 576,5 nm [AU]

E_{w2} = Extinktion der Probe bei 560 nm [AU]

E_{w3} = Extinktion der Probe bei 593 nm [AU]

3.3.7 Bestimmung der Hämolyserate einer *in vitro*-Hämodialyse mit prädilutischer, hypertoner Kochsalzinfusion

500 ml humanes Vollblut wurde mit Hilfe einer konventionellen Dialysemaschine (S 5008, Fresenius Medical Care) dialysiert. Der Aufbau entsprach den Bedingungen in **Abschnitt 3.3.6**. Das Blut wurde 60 min unter physiologischen Bedingungen ohne Ultrafiltration dialysiert. Blutproben wurden an der arteriellen Entnahmestelle zwischen 15 min und 60 min Rezirkulationszeit alle 15 min entnommen: Zur Bestimmung des freien Hämoglobins und des Blutbildes wurden jeweils 1,2 ml Blut und zur Bestimmung der Ionenstärke 2 ml Blut entnommen. Nach 60 min Dialysezeit wurde die effektive Kochsalzkonzentration jeweils um 20 mmol·l⁻¹ NaCl erhöht. Das zugeführte Volumen wurde über die Ultrafiltration abgetrennt. Nach weiteren 60 min Dialysezeit wurde die effektive Kochsalzkonzentration wiederum um 20 mmol·l⁻¹ NaCl erhöht. Die freie Hämoglobinkonzentration, der Hämatokrit-Wert und die Kochsalzkonzentration wurde wie in **Abschnitt 3.3.6** beschrieben bestimmt.

3.3.8 Bestimmung der Hämolyserate einer *in vitro*-Blutrezirkulation mit hypertoner Kochsalzaddition

500 ml hepariniertes humanes Vollblut wurde unter Verwendung eines geeigneten 8 mm-Blutschlauchsystems (Biofine[®], Fresenius Medical Care) und einer externen Blutpumpe rezirkuliert. Ein konventioneller Hämodialysator (FX 800, Fresenius Medical Care) sowie, vorgeschaltet, der in **Abschnitt 3.3.4** beschriebene Minidialysator (**Abbildung 13** und

Abbildung 14) wurden verwendet. Der konventionelle Hämodialysator wurde vor der Rezirkulation des Blutes mit physiologischer Kochsalzlösung befüllt und die Dialysatanschlüsse des Hämodialysators verschlossen. Das Blut wurde 30 min unter physiologischen Bedingungen ohne Dialyse und Ultrafiltration rezirkuliert. Blutproben wurden an der arteriellen Entnahmestelle zwischen 15 min und 30 min Rezirkulationszeit entnommen: Jeweils 1,2 ml Blut wurden zur Bestimmung des freien Hämoglobins und des Blutbildes sowie 2 ml Blut zur Bestimmung der Ionenstärke entnommen. Nach 30 min wurde die Kochsalzkonzentration mittels einer externen Schlauchpumpe über den Minidialysator um 20 mmol·l⁻¹ NaCl erhöht. Nach

weiteren 30 min wurde die Kochsalzkonzentration um weitere $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl erhöht. Die Bestimmung der freien Hämoglobinkonzentration, des Hämatokrit, sowie der Kochsalzkonzentration erfolgte wie in **Abschnitt 3.3.6** beschrieben.

3.4 Entwicklung eines Dialyseverfahren mit vermehrter Abtrennung proteingebundener Urämie-Toxine durch Einsatz elektromagnetischer HF-Felder

Im folgenden Abschnitt werden Versuchsreihen beschrieben, die zur Entwicklung eines Dialyseverfahrens zur vermehrten Abtrennung proteingebundener Urämie-Toxine durch Einsatz hochfrequenter elektromagnetischer Felder durchgeführt wurden.

3.4.1 *In-vitro*-Dialyse einer mit proteingebundenen Urämie-Toxinen versetzten Albuminlösung in Anwesenheit elektromagnetischer HF-Felder

30 ml einer Proteinlösung mit $60 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ bovines Serum-Albumin (BSA) und 0,9% Natriumchlorid in Wasser wurde mit den Urämie-Toxinen Phenyllessigsäure, Indoxylsulfat und p-Hydroxyhippursäure inkubiert, jeweils mit einer Endkonzentration, die der maximal bei CKD-Patienten gemessenen Plasmakonzentrationen (c_{max}) entsprach [1, 17]. Als Hochfrequenz-Signalquelle wurde ein Signal Generator (SMBV100A, Rhode & Schwarz) verwendet. Zur Verstärkung des elektromagnetischen Feldes wurde ein Hochfrequenzverstärker (Modell Amplifier Research) verwendet. Mittels eines Oszillators (Modell 9370, LeCroy) wurde die Wechselspannung als Sinusfunktion visualisiert. Die Albuminlösung wurde während der Versuchsreihe mittels Magnetrührer durchmischt und die Einstrahlelektrode (**Abbildung 15**), sowie das Mini-Dialysem modul (**Abbildung 16**) in Lösung eingebracht und mit Stativmaterial befestigt. Das elektromagnetische Feld wurde von über einen Zeitraum von 10 min über einen Frequenzbereich von 1-20 MHz in 30 s-Intervallen manuell inkrementiert. Über eine Spritzenpumpe wurde während der 10-minütigen Versuchsdauer Flüssigkeit durch die Dialysefasern eingezogen, das Volumen betrug ca. 2 ml. Die Versuchreihe wurde dreimal wiederholt. Eine Kontrollversuchsreihe wurde unter den gleichen Bedingungen in Abwesenheit eines elektromagnetischen Feldes durchgeführt. Die Mini-Dialysemodule wurden nach jedem Versuch mit Hilfe der Spritzenpumpe mit 20 ml physiologischem Puffer in Gegenrichtung gespült. 1 ml der Dialysate wurden mit $25 \mu\text{g}$ 2,6-Dimethylphenol versetzt, mit $67 \mu\text{l}$ 70-%iger Perchlorsäure deproteiniert, 30 s gemischt und bei 10.000 g für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Proteinpräzipitat wurde verworfen, das Überstand mit $60 \mu\text{l}$ $15 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Kaliumhydroxid-Lösung auf einen alkalischen pH-Wert über 9,5 titriert und bei -20°C eingefroren. Nach dem Auftauen der Proben konnte das entstandene Kaliumperchlorat (KClO_4) durch Zentrifugation bei 10.000 g für 5 min bei Raumtemperatur präzipitiert werden. Der re-

sultierende Überstand wurde bei -20°C gelagert und mittels Ionenpaar-Reversed-Phase-Chromatographie unter Verwendung einer Lineargradientenelution aufgereinigt und quantifiziert. Phenyllessigsäure, Indoxylsulfat und p-Hydroxyhippursäure wurden wie in **Abschnitt 3.3.1** beschrieben separiert und quantifiziert.

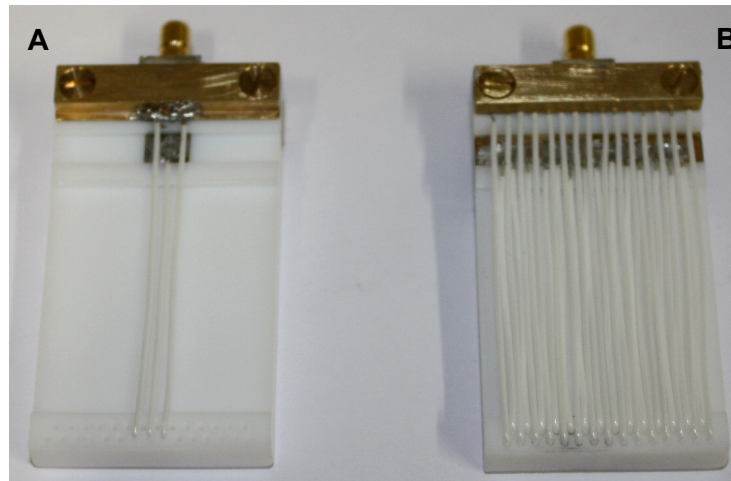


Abbildung 15: Dargestellt sind Prototypen der Einstrahlelektroden, wie sie in den Versuchsreihen verwendet wurden. Die linke Elektrode ist für niedrige Frequenzen bis 1 MHz, die rechte ist für Frequenzen bis 100 MHz geeignet.



Abbildung 16: Foto eines verwendeten Mini-Dialysemoduls: Das Kunststoffgehäuse ist mit einem Spritzenaufsatz versehen, die Dialysefaser sind in einen Silikonstopfen eingegossen.

3.4.2 Entwicklung eines automatisierten Testsystems zur Identifizierung elektromagnetischer Feldfrequenzen, die eine vermehrte Abtrennung von proteingebundenen Urämie-Toxinen während der Dialyse bewirken

Im Rahmen der Dissertationstätigkeit wurde ein Testsystem entwickelt, um den Einfluss hochfrequenter elektrischer und hochfrequenter magnetischer Felder auf die Abtrennung

proteingebundener Urämie-Toxine während der Dialyse zu untersuchen.

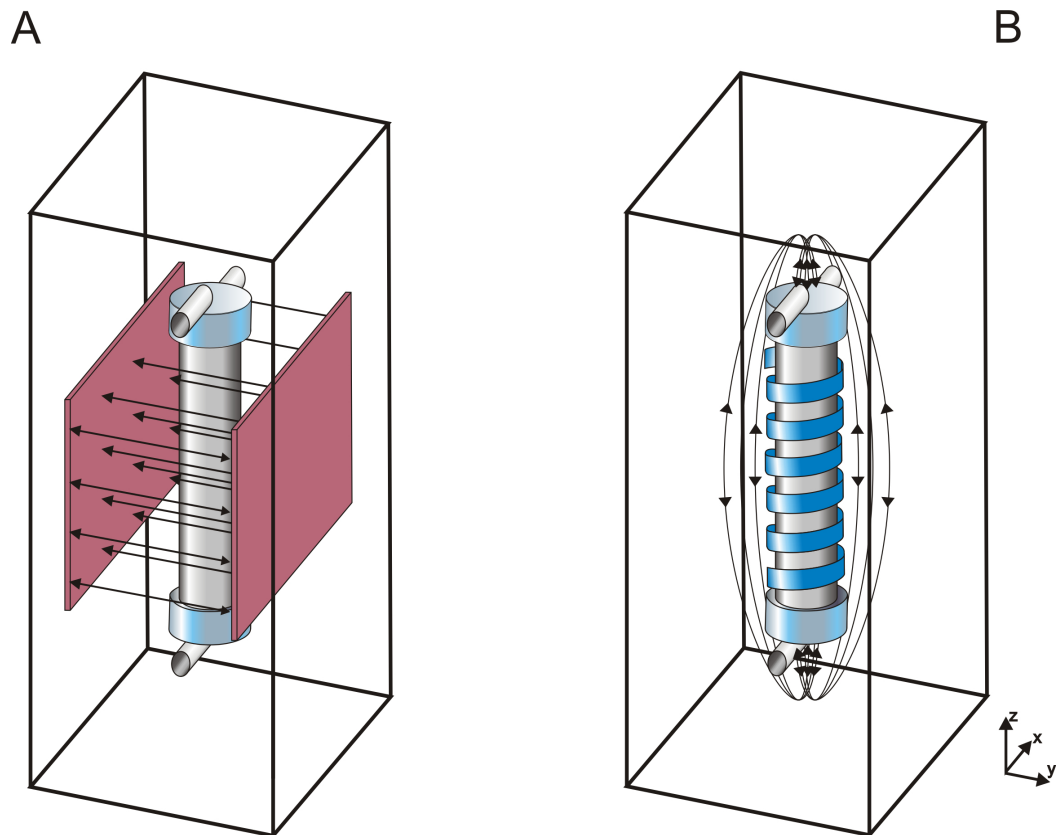


Abbildung 17: Schematische Darstellung eines Hämodialysators (**A**) in einem homogenen elektrischen Wechselfeld zwischen zwei parallelen Kondensatorplatten und (**B**) in einem magnetischen Wechselfeld innerhalb einer stromdurchflossenen Spule. Die elektrischen Feldlinien wechseln periodisch ihr Vorzeichen, die magnetischen Feldlinien ihre Richtung und sind als schwarze Pfeile dargestellt.

Zur Untersuchung elektrischer Felder wurde ein konventioneller Hämodialysator zwischen zwei parallele Kondensatorplatten in ein Aluminiumgehäuse verbaut. Zur Untersuchung magnetischer Felder wurde ein konventioneller Hämodialysator mit einem stromdurchflossenen flachen Kupferband als Spule umwickelt. **Abbildung 17** zeigt eine schematische Darstellung A des zwischen zwei Kondensatorplatten befindlichen Hämodialysators und B des spulenumwickelten Hämodialysators.

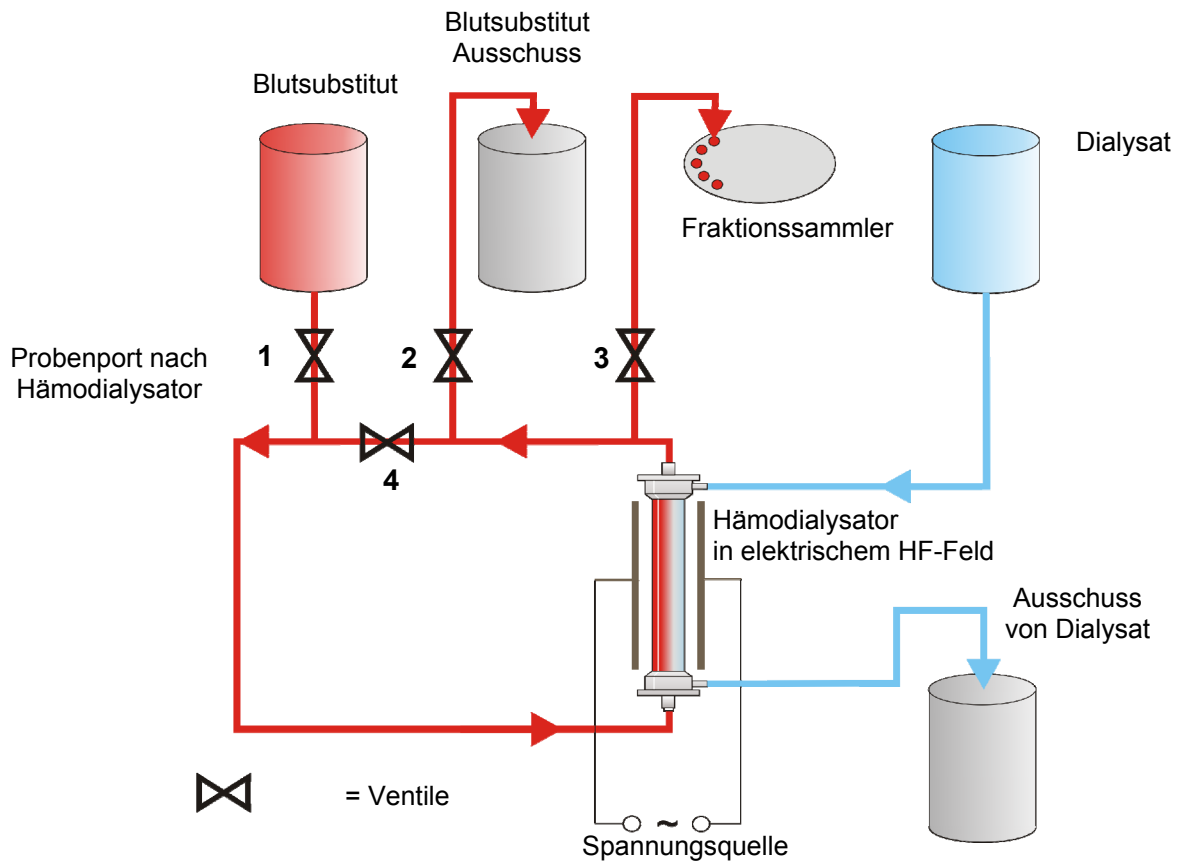


Abbildung 18: Schematischer Aufbau des entwickelten Rezirkulationssystems zur Untersuchung elektrischer HF-Felder. Der Hämodialysator wurde zwischen den Kondensatorplatten eingebaut. Das Dialysat wurde vom Reservoir auf der Dialysatseite des Hämodialysators zum Ausschuss gefördert. Bei Öffnung der Ventile 1 und 2 wurde das Blutsubstitut aus dem Reservoir in den Rezirkulationskreislauf gefördert und das System gespült. Bei Öffnung des Ventils 4 wurde die Lösung rezirkuliert und bei Öffnung des Ventils 3 wurden die Proben gesammelt.

Im Rahmen der Dissertationstätigkeit wurde ein computerbasiertes, elektrisch gesteuertes Mehrwege-Ventilsystem entwickelt, mit dem (A) die Flüssigkeit zum Spülen des Systems aus dem Probenreservoir durch die Rezirkulations-Apparatur in den Abfallbehälter gefördert wird, (B) die Flüssigkeit rezirkuliert wird und (C) Proben der rezirkulierten Flüssigkeit zu definierten Messpunkten mit Hilfe eines Fraktionssammlers gesammelt werden. **Abbildung 18** zeigt den schematischen Aufbau des Testsystems am Beispiel des elektrischen Feldaufbaus. Im elektrischen Feldaufbau wurden die Kondensatorplatten über eine Hochfrequenzspannungsquelle (Signal Generator SMBV100A, Rhode & Schwarz) und einen Hochfrequenzverstärker (Power Amplifier, Modell BSA 0125-25, Bonn Elektronik) mit elektrischer Spannung versorgt. Im magnetischen Feldaufbau wurden die Spulen mit hochfrequenten Wechselströmen durchflossen.

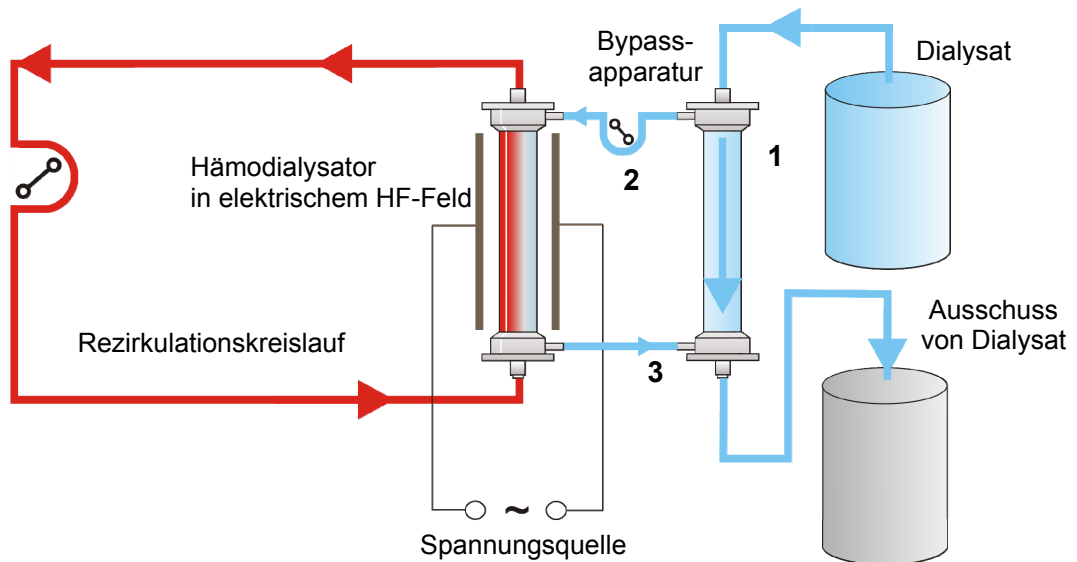


Abbildung 19: Schematischer Aufbau der entwickelten Bypassapparatur, um den Dialysatfluss reduzieren zu können. Das Dialysat der Dialysemaschine wurde mit $500 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ longitudinal durch (1) ein leeres Dialysatorgehäuse gefördert. (2) Mit der Blutpumpe der Dialysemaschine wurde der Hämodialysator des Testsystems über einen Bypass mit Dialysat des geforderten Dialysatflusses durchspült. (3) Das mit Urämie-Toxinen angereicherte Dialysat wurde am Ausgang des Bypassgehäuses in das Dialysat zurückgeführt, die Volumenbilanz blieb erhalten.



Abbildung 20: Fotografische Darstellung des leeren Dialysatorgehäuses, das als Bypassapparatur verwendet wurde.

Es wurde eine Bypassapparatur entwickelt (**Abbildung 19** und **Abbildung 20**), um den Hämodialysator mit einem niedrigeren Dialysatfluss zu spülen, als die Dialysemaschine technisch bedingt liefern kann. Dazu wurde ein leeres Dialysatorgehäuse verwendet, das longitudinal mit Dialysat der Dialysemaschine mit einem Fluss von $500 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ gespült wurde.

Über ein Bypass-Schlauchsystem wurde mit der Blutpumpe der Dialysemaschine am Eingang zum Dialysatorgehäuse Dialysat abgeführt und der Hämodialysator des Testsystems gespült. Das mit Urämie-Toxinen angereicherte Dialysat wurde am Ausgang des Bypassgehäuses wieder dem Dialysat zugeführt, um die Volumenbilanz zu erhalten. Durch Regulation der Blutflusspumpe wurde der geforderte Dialysatfluss von $25 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ bis $250 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ variiert. **Abbildung 21** zeigt eine fotografische Darstellung der Dialyseeinheit mit Bypassapparat. Die Flussrichtung des Dialysats ist mit Pfeilen dargestellt.

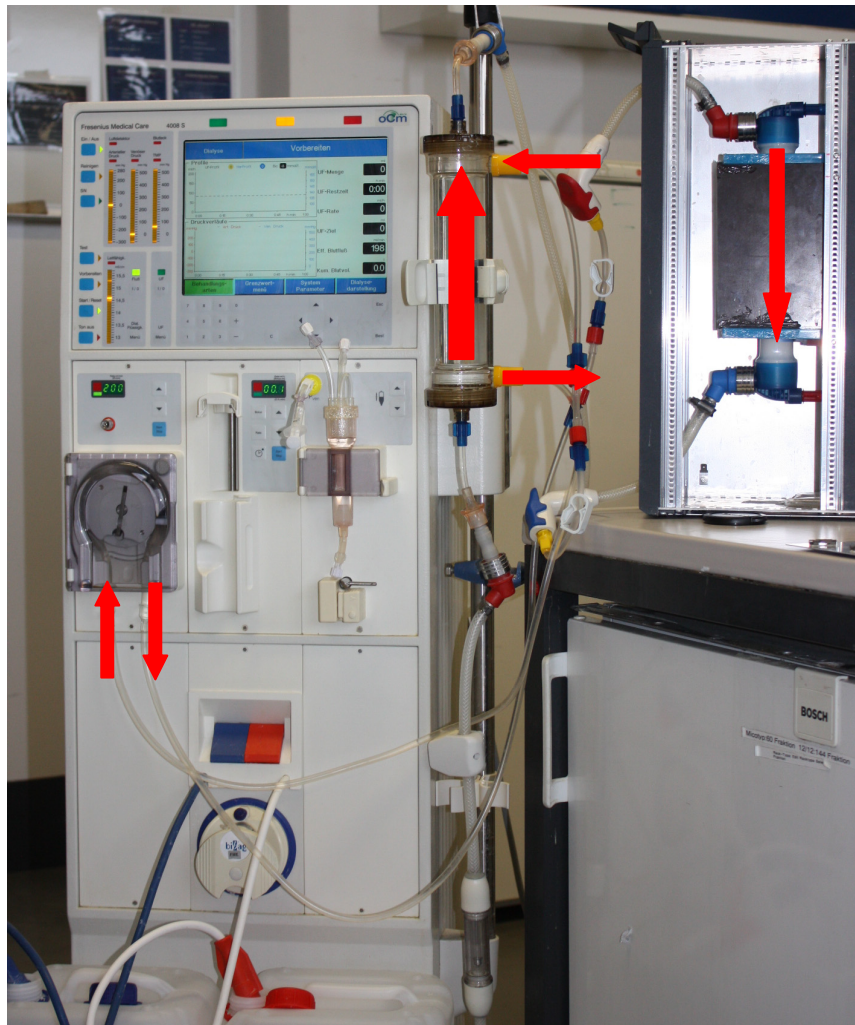


Abbildung 21: Fotografische Darstellung der Dialyseeinheit mit Reduzierung des Dialysatflusses durch die Verwendung einer Bypassapparatur. Die roten Pfeile stellen die Flussrichtung des Dialysats dar. Das Dialysat wurde durch die Dialyseeinheit aus einem Konzentrat und destilliertem Wasser gemischt und mit Hilfe der Dialysatschläuche durch die Bypassapparatur gefördert.

3.4.3 Durchführung eines Rezirkulationsexperiments unter Verwendung des Testsystems

Es wurden konventionelle Hämodialysatoren verschiedener Größe (FX 5, FX 8, FX 800 und FX pead, Fresenius Medical Care) verwendet. Der Dialysator wurde über 8 mm-Schlauchsysteme (Biofine®, Fresenius Medical Care) mit einer externen Schlauchpumpe (Fresenius Medical Care) verbunden. Der Dialysator wurde über Dialysatorkupplungen einer konventionellen Dialysemaschine (4008, Fresenius Medical Care) verbunden und mit Dialysat durchspült. Die Frequenz des elektrischen Feldes wurde während der Versuchsdurchführung von 1-170 MHz inkrementiert. Die Frequenz des magnetischen Feldes wurde von 1-25 MHz inkrementiert. Die Spülzeit des Systems wurde von 30 s bis 75 s, die Rezirkulationszeit von 60 bis 120 s variiert. Der Dialysatfluss wurde unter Verwendung der Bypassapparatur von 25 bis 300 ml·min⁻¹ variiert und der Blutfluss auf 200 ml·min⁻¹ definiert. Die Ausgangsleistung des Verstärkers wurde von -12 dBm bis -10 dBm variiert. 10 l einer Albuminlösung von 60 g·l⁻¹, bovines Serum-Albumin in physiologischer Kochsalzlösung wurde mit Phenylsigsäure (finale Konzentration 1 mmol·l⁻¹), Indoxylsulfat (0,2 mmol·l⁻¹) und p-Kresylsulfat (0,2 mmol·l⁻¹) über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Eine Probe der Ausgangslösung von 2 ml wurde aus dem Probenreservoir genommen und bei -20° C gelagert. Das Rezirkulationssystem wurde mit einer physiologischen Kochsalzlösung gefüllt und mit der Albuminlösung gespült, die Lösung entsprechend der Rezirkulationszeit unter Einwirkung eines elektrischen oder magnetischen Feldes dialysiert und jeweils eine 2 ml Probe am Ende der Rezirkulationszeit gesammelt und bei -20° C gelagert. Jede Versuchsreihe wurde dreimal wiederholt (N = 3). Eine Kontrollversuchsreihe wurde unter den gleichen Bedingungen in Abwesenheit des elektrischen oder magnetischen Feldes durchgeführt und dreimal wiederholt (N = 3). Die Proben wurden wie in **Abschnitt 3.3.4** beschrieben aufgereinigt und quantifiziert.

3.4.4 Durchführung eines Rezirkulationsexperimentes mit humanem Plasma unter Verwendung des elektrischen Feldaufbaus

Sechs humane Plasmakonserven wurden von der Blutbank des Deutschen Roten Kreuz bezogen. Die Konserven wurden vereinigt und mit 5 ml Heparinlösung (5000 U·ml⁻¹) versetzt. Das Plasma wurde mit Phenylsigsäure (1 mmol·l⁻¹) und Indoxylsulfat (0,2 mmol·l⁻¹) versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Wie in **Abschnitt 3.4.3** beschrieben, wurde die Plasma-Toxin-Lösung in das Testsystem unter Verwendung des elektrischen Feldaufbaus in das Testsystem gefördert und für 60 s unter Einwirkung eines elektrischen Feldes von 1-170 MHz rezirkuliert. Am Ende der Rezirkulationszeit wurde jeweils eine Probe von 2 ml aufbewahrt und bei -20 °C gelagert. Jede Versuchsreihe wurde dreimal wiederholt

(N = 3). Eine Kontrollversuchsreihe wurde unter den gleichen Bedingungen ohne Einschalten des elektrischen Feldes durchgeführt (N = 3). Die Proben wurden wie in **Abschnitt 3.4.3** beschrieben deproteiniert und mittels Ionenpaar-Reversed-Phase-Chromatographie quantifiziert.

3.4.5 Bestimmung des Einflusses eines hochfrequenten elektrischen Feldes auf die Enzymaktivität von Plasmaproteinen

Die Enzymansätze der Laktatdehydrogenase (LDH), der Superoxiddismutase (SOD) und der alkalischen Phosphatase (AP) wurden in Reaktionsgefäßen (1,5 ml) durchgeführt. Zur Ableitung der entstehenden die Wärme der elektrischen Widerstände des Testsystems wurden die Reaktionsgefäße in ein 50-ml-Reaktionsgefäß eingebracht, welches an ein Schlauchsystem angeschlossen wurde und mit destilliertem Wasser bei Raumtemperatur durchspült wurde (**Abbildung 22**). Das so präparierte 50-ml-Reaktionsgefäß wurde zwischen den Kondensatorplatten befestigt und ein hochfrequentes elektrisches Feld von 1-170 MHz angelegt.

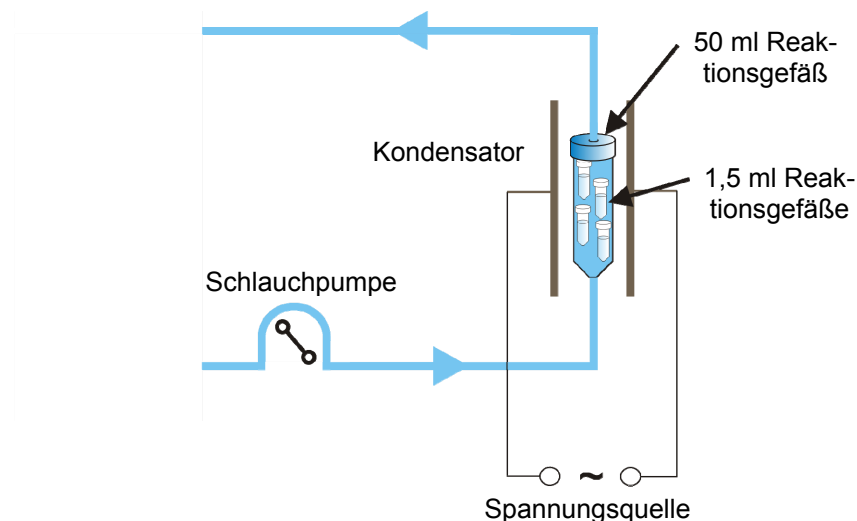


Abbildung 22: Schematischer Aufbau des entwickelten Testsystems zur Untersuchung des Einflusses eines hochfrequenten elektrischen Feldes auf die Enzymaktivität mit integrierter Systemkühlung. Die Enzymproben waren in 1,5-ml-Reaktionsgefäßen, die sich in einem 50-ml-Reaktionsgefäß befanden. Das 50-ml-Reaktionsgefäß war über ein Schlauchsystem mit einer Pumpe verbunden und wurde mit destilliertem Wasser bei Raumtemperatur durchspült. Das 50-ml-Reaktionsgefäß befand sich zwischen den Kondensatorplatten in einem homogenen elektrischen Feld.

3.4.5.1 Laktatdehydrogenase

Die Laktatdehydrogenase wurde in physiologischem Puffer aufgenommen (Endkonzentration $5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, $133 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$). $75 \text{ } \mu\text{l}$ (50 U) des Enzyms wurden in $425 \text{ } \mu\text{l}$ physiologischem Puffer

aufgenommen. Die Proben wurden in das in **Abschnitt 3.4.5** beschriebene 50-ml-Reaktionsgefäß eingebracht und das Reaktionsgefäß wurde mit destilliertem Wasser bei Raumtemperatur durchspült. Die Enzymproben wurden in parallelen Ansätzen für 30 s und für 5 min einem elektrischen HF-Feld von 1-170 MHz ausgesetzt. Der Enzymaktivitäts-Assay wurde wie in **Abschnitt 3.3.2.1** beschrieben mit einem Multiplattenphotometer (Mutiscan, Thermo-Fisher-Scientific) in Dreifachbestimmungen durchgeführt.

3.4.5.2 Superoxiddismutase (SOD)

Die Superoxiddismutase wurde in 1 ml destilliertem Wasser gelöst ($25.470 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$). $1,96 \mu\text{l}$ (50 U) wurden mit $498,04 \mu\text{l}$ physiologischem Puffer verdünnt. Die Proben wurden in das in **Abschnitt 3.4.5** beschriebene 50-ml-Reaktionsgefäß eingebracht und das Reaktionsgefäß wurde mit destilliertem Wasser bei Raumtemperatur durchspült. Die Enzymproben wurden in parallelen Ansätzen für 30 s und für 5 min einem elektrischen HF-Feld von 1-170 MHz ausgesetzt. Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Der Enzymaktivitäts-Assay wurde wie in **Abschnitt 3.3.2.2** beschrieben mit einem Multiplattenphotometer (Mutiscan, Thermo-Fisher-Scientific) in Dreifachbestimmungen durchgeführt.

3.4.5.3 Alkalische Phosphatase

Die alkalische Phosphatase wurde in Puffer gelöst ($2.940 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$) bezogen. $1,73 \mu\text{l}$ (50 U) der Enzymlösung wurden mit $498,26 \mu\text{l}$ physiologischem Puffer verdünnt. Die Proben wurden in das in **Abschnitt 3.4.5** beschriebene 50-ml-Reaktionsgefäß eingebracht und das Reaktionsgefäß wurde mit destilliertem Wasser bei Raumtemperatur durchspült. Die Enzymproben wurden in parallelen Ansätzen für 30 s und für 5 min einem elektrischen HF-Feld von 1-170 MHz ausgesetzt. Der Enzymaktivitäts-Assay wurde wie in **Abschnitt 3.3.2.3** beschrieben mit einem Multiplattenphotometer (Mutiscan, Thermo-Fisher-Scientific) in Dreifachbestimmungen durchgeführt.

3.4.6 Bestimmung des Einflusses eines hochfrequenten elektrischen Feldes auf die dreidimensionale Struktur von Plasmaproteinen

Eine Albuminlösung von $60 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, bovines Serum Albumin in physiologischer Kochsalzlösung wurde im Testsystem (**Abschnitt 3.4.2**) für 15 min rezirkuliert. Dabei wurde ein hochfrequentes elektrisches Feld von 1-170 MHz angelegt. In einem Kontrollversuch wurde eine Albuminlösung ohne den Einfluss eines elektrischen Feldes rezirkuliert. Es wurden Proben von 1,5 ml Volumen entnommen. $500 \mu\text{l}$ der Proben wurden mit $50 \mu\text{l}$ Deuteriumoxid (D_2O) und $50 \mu\text{l}$ Deuteriumoxid mit 0,75 % 3-Trimethylsilyl-[2,2,3,3,-2 H₄]-Propionat (TSP) versetzt und

bei -20°C gelagert. Das $^1\text{H-NMR}$ -Messungen wurden mit einem 600 MHz-Spektrometer (DRX 600, Bruker Daltonik) durchgeführt. Mit Hilfe eines 90° -Impuls von $11,5\ \mu\text{s}$ Länge (p1) wurde das Wassersignal unterdrückt, jede Probe wurde mit 1.024 Messwiederholungen (NS) bei einer Temperatur von 25°C gemessen. Die Auswertung der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren erfolgte mit der Software MestRe-C (Version 3.4.0). Der Freie-Induktions-Abfall (FID) der Protonenspins wurde zuerst fourier-transformiert und anschließend eine Phasen- und Basislinienkorrektur durchgeführt. Die chemische Verschiebung der Referenzsubstanz TSP wurde zur Kalibrierung verwendet.

3.5 Entwicklung, Validierung und Etablierung eines adsorptiven Verfahrens in der extrakorporalen Nierenersatztherapie zur vermehrten Abtrennung proteingebundener Urämie-Toxine

Im folgenden Abschnitt werden Versuchsreihen beschrieben, die zur Entwicklung eines adsorptiven Verfahrens in der extrakorporalen Nierenersatztherapie durchgeführt wurden.

3.5.1 Bestimmung von Adsorptionscharakteristika eines neutralen Adsorbers und eines kationischen Adsorbers

50 g der Adsorber-Medien (**Abschnitt 2.7**) wurden mit destilliertem Wasser gereinigt und mittels Lyophilisation vollständig vom Lösungsmittel befreit. Jeweils 200 mg der trockenen Adsorber wurden in Glasgefäße gefüllt und mit 1 ml 50 % Ethanol in Wasser versetzt und mittels Rotator bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Die Adsorberpartikel wurden durch Zentrifugation bei 500 g für 3 min präzipitiert und der Überstand entfernt. Die Adsorberpartikel wurden nach dem zuvor beschriebenen Schema zweimalig mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Phenyllessigsäure, Indoxylsulfat und p-Kresylsulfat wurden einzeln oder im Gemisch mit finalen Konzentrationen von $1\ \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (PAA) und $0,2\ \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (IDS, CRS) in 10 ml physiologischer Kochsalzlösung ($154\ \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Natriumchlorid, $10\ \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Di-Kaliumhydrogenphosphat, pH 7,4) gelöst. Im Anschluss wurden Phenyllessigsäure, Indoxylsulfat und p-Kresylsulfat einzeln oder im Gemisch mit finalen Konzentrationen von $1\ \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (PAA) und $0,2\ \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (IDS, CRS) in 10 ml Albumin-Lösungen (bovines Serumalbumin, $60\ \text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, $154\ \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Natriumchlorid, $10\ \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Di-Kaliumhydrogenphosphat, pH 7,4) gelöst. Sämtliche Versuchsansätze wurden für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. 1 ml der jeweiligen Toxinlösungen oder der Albuminlösungen wurden mit den Adsorbentien für 1 h im Rotator bei 37°C in einem Wärmeschrank inkubiert. Die Partikel wurden mittels Zentrifugation bei 500 g für 3 min präzipitiert, der Überstand in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C gelagert. Kontrollversuche wurden mit physiologischer Kochsalzlösung bezie-

ungsweise toxfreier Albuminlösung durchgeführt und dreimal wiederholt. 50 µl der Proben des albuminfreien Ansatzes wurden mit 498 µl 40 mmol·l⁻¹ Triethylamoniumacetat (pH-Wert: 6,5) und 2 µl 2,6-Dimethylphenol (1 mg·ml⁻¹ in destilliertem Wasser) als interner Standard versetzt und mittels Ionenpaar-Reversed-Phase-Chromatographie unter Verwendung einer Lineargradientenelution fraktioniert und quantifiziert. 0,5 ml der Proben des zweiten Ansatzes wurden mit 25 µl 2,6-Dimethylphenol (1 mg·ml⁻¹ in destilliertem Wasser) als interner Standard versetzt und wie in **Abschnitt 3.4.3** beschrieben deproteiniert und aufgereinigt. 50 µl der deproteinierten Albuminproben wurden mit 100 µl Pufferlösung (92,5 µl 40 mmol·l⁻¹ Triethylamoniumacetat, 5 µl 1 mol·l⁻¹ Triethylamoniumacetat und 2,5 µl Salzsäure (25 %)) versetzt und mittels Ionenpaar-Reversed-Phase-Chromatographie unter Verwendung einer Lineargradientenelution aufgereinigt und quantifiziert. Als Laufmittel wurde 40 mmol·l⁻¹ Triethylamoniumacetat in Wasser und einem pH-Wert von 6,5 verwendet; als Elutionsmittel wurde 80 % Ethanol / Wasser verwendet. Ein Lineargradient wurde von 1 % B bis 60 % B in 10 min verwendet. Der Fluss betrug 2 ml·min⁻¹. Das Injektionsvolumen betrug 140 µl. Die chromatographische Aufreinigung erfolgte mit einer HPLC-Anlage (Merck) bei Raumtemperatur (22° C). Die UV-Adsorption wurde bei 260 nm detektiert. Die Daten wurden mit einem Chromeleon Lab System 6.60 (Dionex, Thermo-Fisher-Scientific) aufgezeichnet und prozessiert. Anhand von Kalibrierfunktionen wurden Phenyllessigsäure, Indoxylsulfat, p-Kresylsulfat sowie der interne Standard 2,6-Dimethylphenol quantifiziert.

3.5.2 Das FPAD-Verfahren in der extrakorporalen Nierenersatztherapie im Rahmen einer klinischen Studie

Durch die Ethik-Kommission der Charité wurde ein Ethikvotum (EA4/057/10) zur Durchführung einer klinischen Studie erteilt. Aus dem Patientenkollektiv der Medizinischen Klinik IV der Charité wurden fünf Patienten ausgewählt, die eine terminale, chronische Niereninsuffizienz aufwiesen und dreimal die Woche ambulant auf der Dialysestation mittels extrakorporaler Nierenersatzverfahren behandelt wurden. Fünf weitere Patienten, die dieselben Kriterien erfüllten, wurden in einer Hämodialyse-Gruppe konservativ behandelt. Fünf Patienten wurden einmalig mit dem FPAD-Verfahren behandelt und über einen Zeitraum von 14 Tagen während der folgenden konventionellen Dialysen untersucht. Die Patienten der Hämodialyse-Gruppe wurden über den gleichen Zeitraum konservativ behandelt. Während der einmaligen FPAD-Behandlung wurden Blut- und Plasmaproben aus dem extrakorporalen System an verschiedenen Abnahmestellen und Zeiten entnommen und zur Analyse verschiedener urämischer Mediatoren und klinischer Parameter verwendet. Die genauen Sammelpunkte und Zeiten sind der **Abbildung 23** und der **Tabelle 2** zu entnehmen.

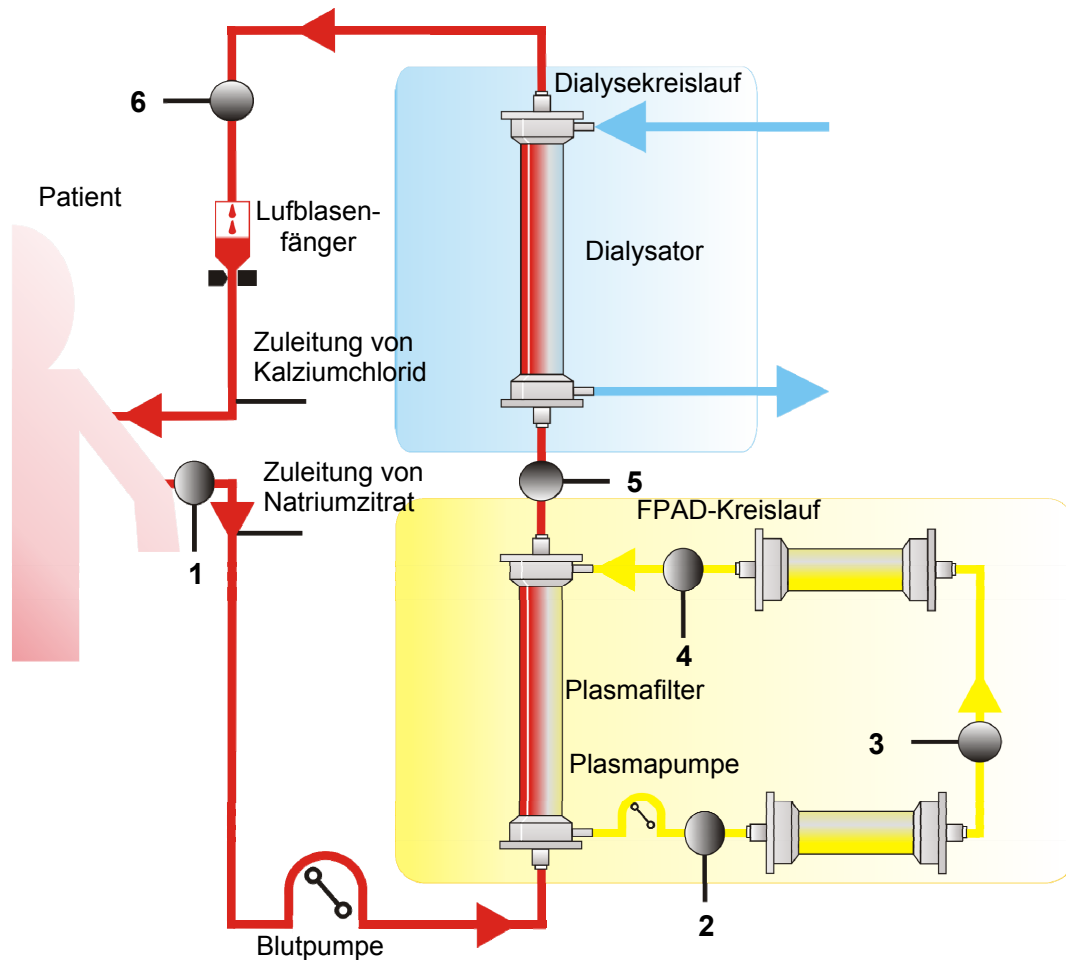


Abbildung 23: Schematische Darstellung des extrakorporalen Kreislaufs des FPAD-Verfahrens mit Sammelpunkten für die Proben. (1) arterieller Sammelpunkt, (2) Sammelpunkt vor den Adsorbern, (3) Sammelpunkt zwischen den Adsorbern, (4) Sammelpunkt nach den Adsorbern, (5) Sammelpunkt nach dem FPAD-Kreislauf und (6) venöser Sammelpunkt.

3.5.3 Durchführung der FPAD-Behandlung und Dialysebehandlung

Nach dem Einsetzen in die FPAD-Einheit wurden das Schlauchsystem und die Adsorber-Kartuschen mit 2 l physiologischer Kochsalzlösung befüllt und mit $5.000 \text{ IU} \cdot \text{l}^{-1}$ Heparin zur Antikoagulation versetzt. Die Behandlungszeit war 5 h. Es wurde mit einem kalziumfreien sauren Elektrolytkonzentrat gearbeitet, zusätzlich wurde eine Zitrat/Kalzium-Antikoagulation durchgeführt. Der Blutpumpenfluss betrug $250 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Die Proben wurden mit Einwegspritzen an den jeweiligen Entnahmestellen entnommen, das Volumen entsprach 5 ml pro Entnahmestelle. In Aliquots dieser Proben wurden durch Routineuntersuchungen der klinischen Chemie der Charité die Kortisol-, Trijodthyronin-, Thyroxinkonzentrationen und die Parameter des kleinen Blutbilds bestimmt. Im Gegensatz zur FPAD-Gruppe wurden in der Hämodialyse-Gruppe nur arterielle und venöse Proben und die oben genannten klinischen Parameter

während der Dialysebehandlung erhoben (**Tabelle 2**). Die Blut- und Plasmaproben wurden analog zu den in **Abschnitt 3.3.1** beschriebenen Bedingungen aufgearbeitet und deproteiniert. 100 µg 2,6-Dimethylphenol wurde als interner Standard jeder Probe zugesetzt. 10 µl jeder Probe wurde wie in **Abschnitt 3.3.1** beschrieben mittels Ionenpaar-Reversed-Phase-Chromatographie quantifiziert. Die Signifikanz wurde mit dem unpaarigen Mann-Whitney-Test bestimmt.

Tabelle 2: Auflistung der Probenentnahmezeitpunkte und Abnahmestellen der FPAD-Gruppe und der Hämodialyse-Gruppe (HD) während der Behandlung und der 2-wöchigen Folgezeit, Routine = klinische Parameter (siehe oben), U.-Toxine = Phenylelessigsäure, Indoxylsulfat, p-Kresylsulfat, SP = Sammelpunkt der Proben, (**Abbildung 23**)

Studien-Gruppe	Zeitpunkt	Sammelpunkt (SP)	Parameter
FPAD, HD	vor Dialyse	Arteriell	Routine, U.-Toxine
FPAD, HD	120 min	SP 1	Routine, U.-Toxine
FPAD		SP 2	U.-Toxine
FPAD		SP 3	U.-Toxine
FPAD		SP 4	U.-Toxine
FPAD		SP 5	U.-Toxine
FPAD, HD		SP 6	U.-Toxine
FPAD, HD	240 min	SP 1	Routine, U.-Toxine
FPAD		SP 2	U.-Toxine
FPAD		SP 3	U.-Toxine
FPAD		SP 4	U.-Toxine
FPAD		SP 5	U.-Toxine
FPAD, HD		SP 6	U.-Toxine
FPAD, HD	2 h post	periphere Vene	Routine, U.-Toxine
FPAD, HD	4 h post	periphere Vene	Routine, U.-Toxine
FPAD, HD	3 d post	arteriell	Routine, U.-Toxine
FPAD, HD	5 d post	arteriell	Routine, U.-Toxine
FPAD, HD	7 d post	arteriell	Routine, U.-Toxine
FPAD, HD	14 d post	arteriell	Routine, U.-Toxine

4. Ergebnisse

Die Ergebnisse der Versuchsreihen, die im Rahmen der Dissertationstätigkeit durchgeführt wurden, werden in den folgenden Abschnitten dargestellt.

4.1 Darstellung aromatischer Sulfonsäureester (p-Kresylsulfat)

p-Kresylsulfat wurde aus p-Kresol und Chlorsulfonsäure synthetisiert. **Abbildung 24** zeigt die Reaktionsformeln der Synthese von p-Kresylsulfat aus p-Kresol. Die Synthese folgt der Einhornvariante der Schotten-Baumannmethode [104-106]. Nach der Synthese wurden 2 g p-Kresylsulfat erhalten und bei -20°C gelagert.

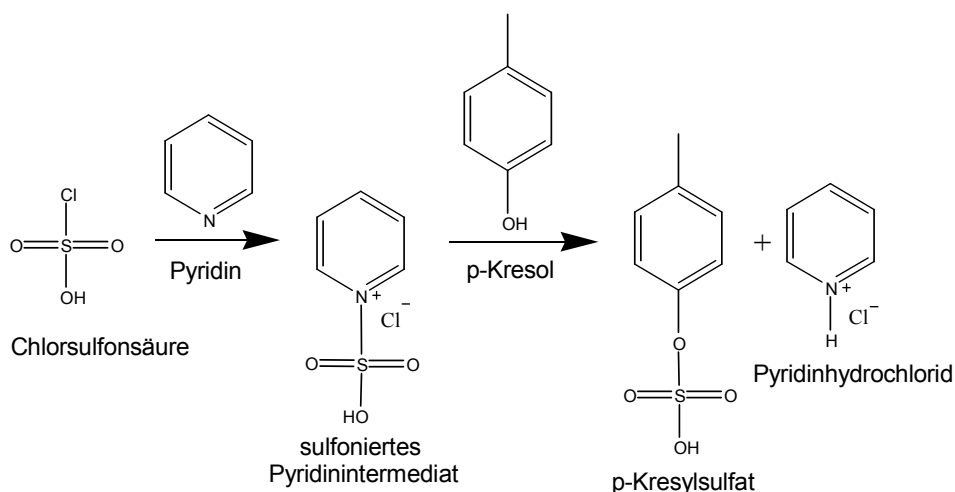


Abbildung 24: Chemische Reaktionen der Synthese von p-Kresylsulfat aus p-Kresol und Chlorsulfonsäure

Zunächst reagierte Chlorsulfonsäure mit der Base Pyridin unter Bildung sulfonierter Aroylpyridiniumionen. Das freie Elektronenpaar des Pyridin-Stickstoffatoms reagierte in einer nukleophilen Reaktion mit dem positiv polarisierten Schwefelatom der Chlorsulfonsäure unter Abspaltung des Chlorids. Die Hydroxylgruppe des p-Kresols reagierte anschließend nukleophil mit dem reaktiven Aroylpyridiniumion unter Bildung des p-Kresylsulfats und des Pyridiniumhydrochlorids. Das Syntheseprodukt wurde mit Hilfe der ESI-Massenspektrometrie analysiert und konnte anhand des Massensignals $M/z = 187,01$ als p-Kresylsulfat identifiziert werden (**Abbildung 25**). Das ESI-MS-Spektrum zeigte eine hohe Reinheit des Syntheseproduktes an. Das synthetisierte p-Kresylsulfat wurde für sämtliche Versuchsreihen dieser Arbeit genutzt, in denen es verwendet wurde.

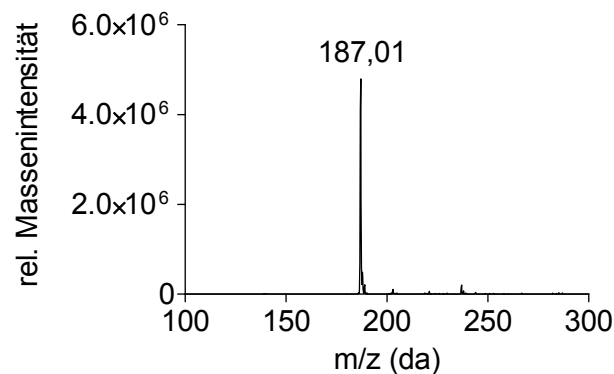


Abbildung 25: LC-ESI-Massenspektrum des synthetisierten p-Kresylsulfats.

4.2 Elutionsmittelvergleiche in der Ionenpaar-Reversed-Phase-Chromatographie

Zu Beginn der Dissertationstätigkeit bestand eine unzureichende kommerzielle Verfügbarkeit des organischen Lösungsmittel Acetonitril, das in der Reversed-Phase-Chromatographie üblicherweise als Elutionsmittel verwendet wird. Daher wurden Versuchsreihen durchgeführt, um die Lösungsmittel Acetonitril, Ethanol, 1-Propanol und Methanol hinsichtlich ihrer Elutionseigenschaften in der Ionenpaar-Reversed-Phase-Chromatographie von Biomolekülen wie Proteinen, Peptiden, Dinukleotiden zu untersuchen. Ein Gemisch der Diadenosinpolyphosphate Ap_2A - Ap_6A wurden in Anwesenheit der Ionenpaar-Reagenz Triethylammoniumacetat (TEAA) und unter Verwendung der Elutionsmittel 80 % Acetonitril-Wasser, 50 % Ethanol-Wasser, 50 % 1-Propanol-Wasser und 100 % Methanol chromatographisch aufgereinigt. Bei Verwendung von 80 % Acetonitril-Wasser und 50 % Ethanol-Wasser als Elutionsmittel und denselben Gradienten konnten die Diadenosinpolyphosphate basisliniengetreunt von einander separiert werden (**Abbildung 26 A und B**). Die Auftrennung mit 50 % 1-Propanol-Wasser und 100 % Methanol war hingegen unzureichend, da Ap_2A und Ap_3A sowie Ap_5A und Ap_6A nicht basisliniengetreunt separiert werden konnten (**Abbildung 26 C und D**). Darüber hinaus traten bei der Auftrennung mit 1-Propanol erhöhte Gegendrucke auf.

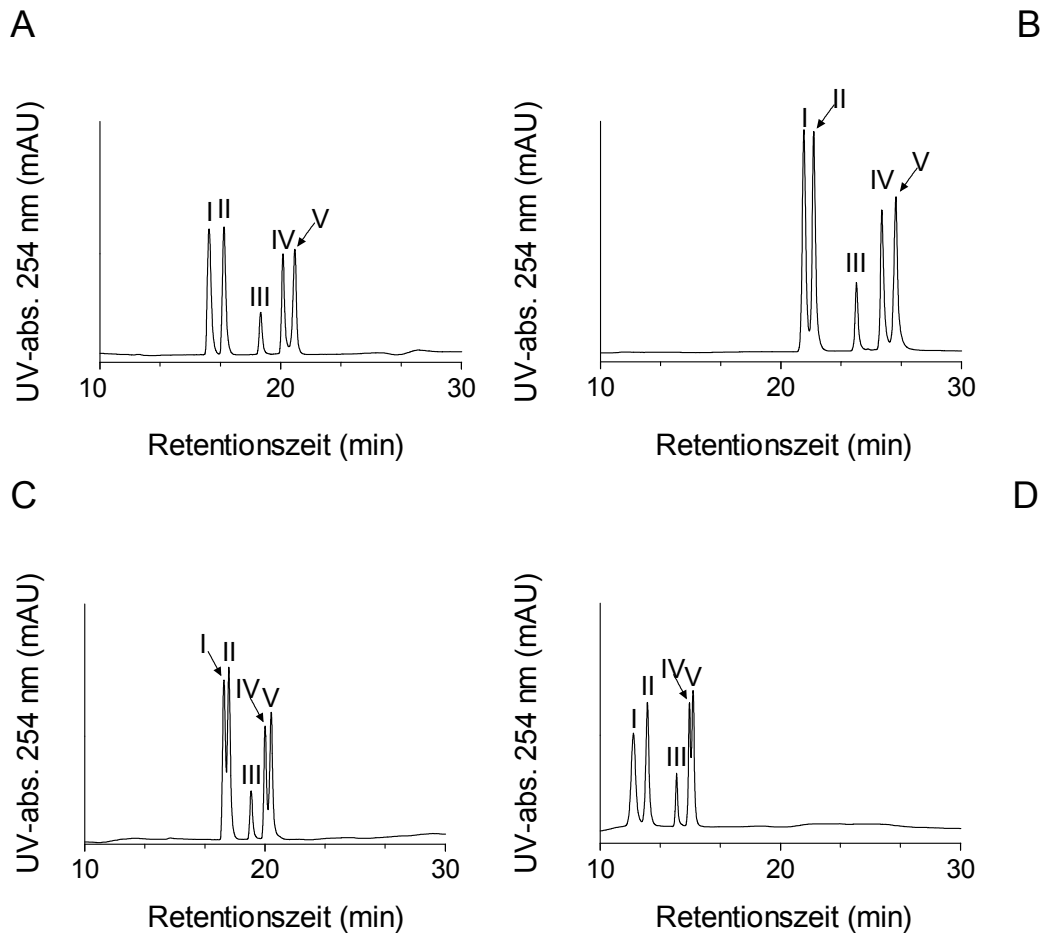


Abbildung 26: Reversed-Phase-chromatographische Auftrennung von Diadenosinpolyphosphaten Ap_2A – Ap_6A in Anwesenheit der Ionenpaar-Reagenz Triethylammoniumacetat. **(A)** Die Auftrennung mit 80 % Acetonitril-Wasser, **(B)** die Auftrennung mit 50 % Ethanol-Wasser **(C)** die Auftrennung mit 50 % 1-Propanol-Wasser und **(D)** die Auftrennung mit 100 % Methanol. I = Ap_2A , II = Ap_3A , III = Ap_4A , IV = Ap_5A und V = Ap_6A .

Weiterhin wurde ein Gemisch der Diadenosinpolyphosphate Ap_2A - Ap_6A in Anwesenheit der Ionenpaar-Reagenz Tetrabutylammoniumsulfat (TBA) und unter Verwendung der Elutionsmittel 80 % Acetonitril-Wasser, 100 % Ethanol, 100 % 1-Propanol und 100 % Methanol chromatographisch aufgereinigt. Bei Verwendung von 80 % Acetonitril-Wasser und 100 % Ethanol als Elutionsmittel und denselben Gradienten konnten die Diadenosinpolyphosphate basisliniengetrennt von einander separiert werden, die Basislinientrennung mit 100 % Ethanol war verbessert. **(Abbildung 27 A und B)**. Die Auftrennung mit 100 % 1-Propanol und 100 % Methanol war hingegen unzureichend, Ap_5A und Ap_6A konnten nicht von einander getrennt werden **(Abbildung 27 C und D)**. Wiederum traten bei der Auftrennung mit 1-Propanol erhöhte Gegendrucke auf.

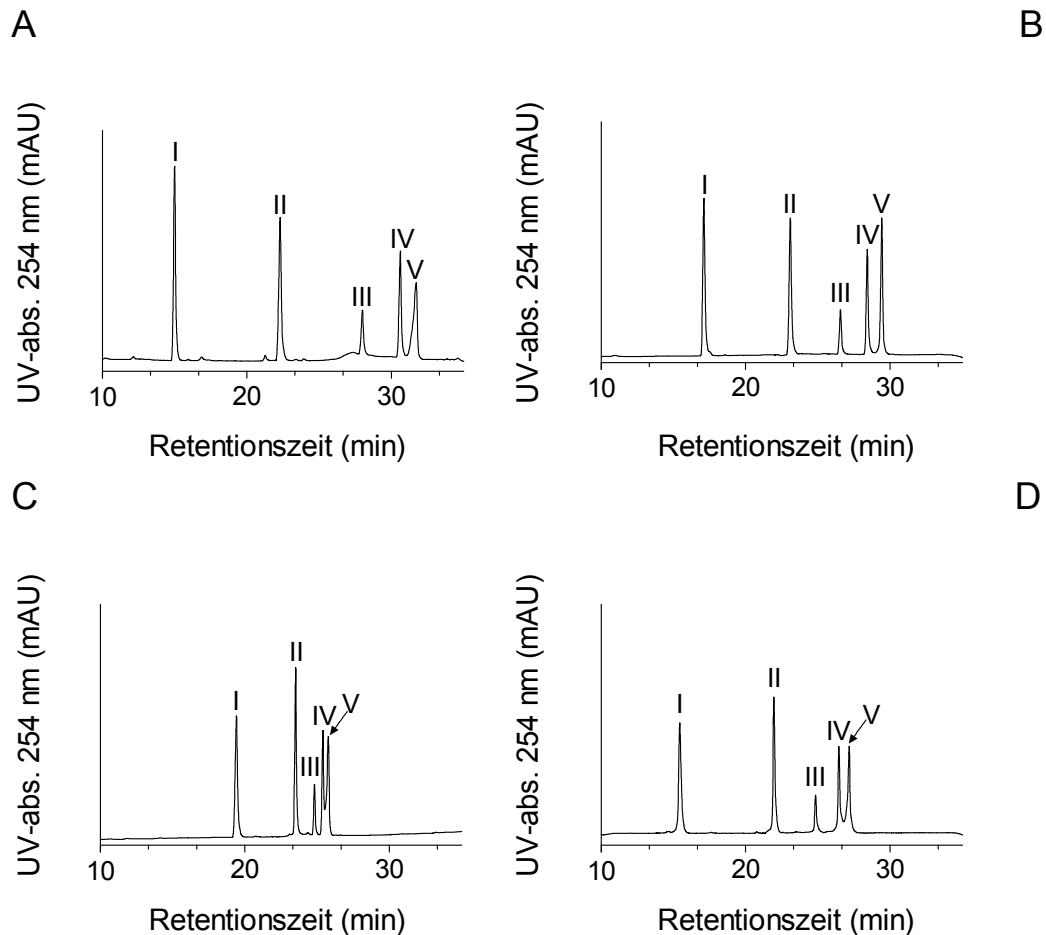


Abbildung 27: Reversed-Phase-chromatographische Auftrennung von Diadenosinpolyphosphaten Ap₂A – Ap₆A in Anwesenheit der Ionenpaar-Reagenz Tetrabutylammoniumsulfat. **(A)** Die Auftrennung mit 80 % Acetonitril-Wasser, **(B)** die Auftrennung mit 100 % Ethanol **(C)** die Auftrennung mit 100 % 1-Propanol und **(D)** die Auftrennung mit 100 % Methanol. I = Ap₂A, II = Ap₃A, III = Ap₄A, IV = Ap₅A und V = Ap₆A.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde ein Gemisch der Peptide Angiotensin I und II sowie Bradykinin in Anwesenheit der Ionenpaar-Reagenz Trifluoressigsäure (TFA) und unter Verwendung der Elutionsmittel 80 % Acetonitril-Wasser, 100 % Ethanol, 100 % 1-Propanol und 100 % Methanol chromatographisch aufgereinigt. Die Peptide konnten mit sämtlichen untersuchten Elutionsmitteln basisliniengetrennt von einander separiert werden. Die Auftrennung mit 100 % Ethanol zeigte die beste Übereinstimmung der Retentionszeiten der Peptide bei den gleichen Gradientenbedingungen von 0 % B bis 40 % B in 30 min zur Auftrennung mit 80 % Acetonitril-Wasser (**Abbildung 28 A** und **B**). Während der Auftrennung mit 100 % 1-Propanol waren die Retentionszeiten der Peptide um die Hälfte verkürzt war bei der Auftrennung mit 100 % Methanol die Retentionszeiten der Peptide verlängert (**Abbildung 28 C** und **D**). Wiederum traten bei der Auftrennung mit 1-Propanol erhöhte Gegendrucke auf.

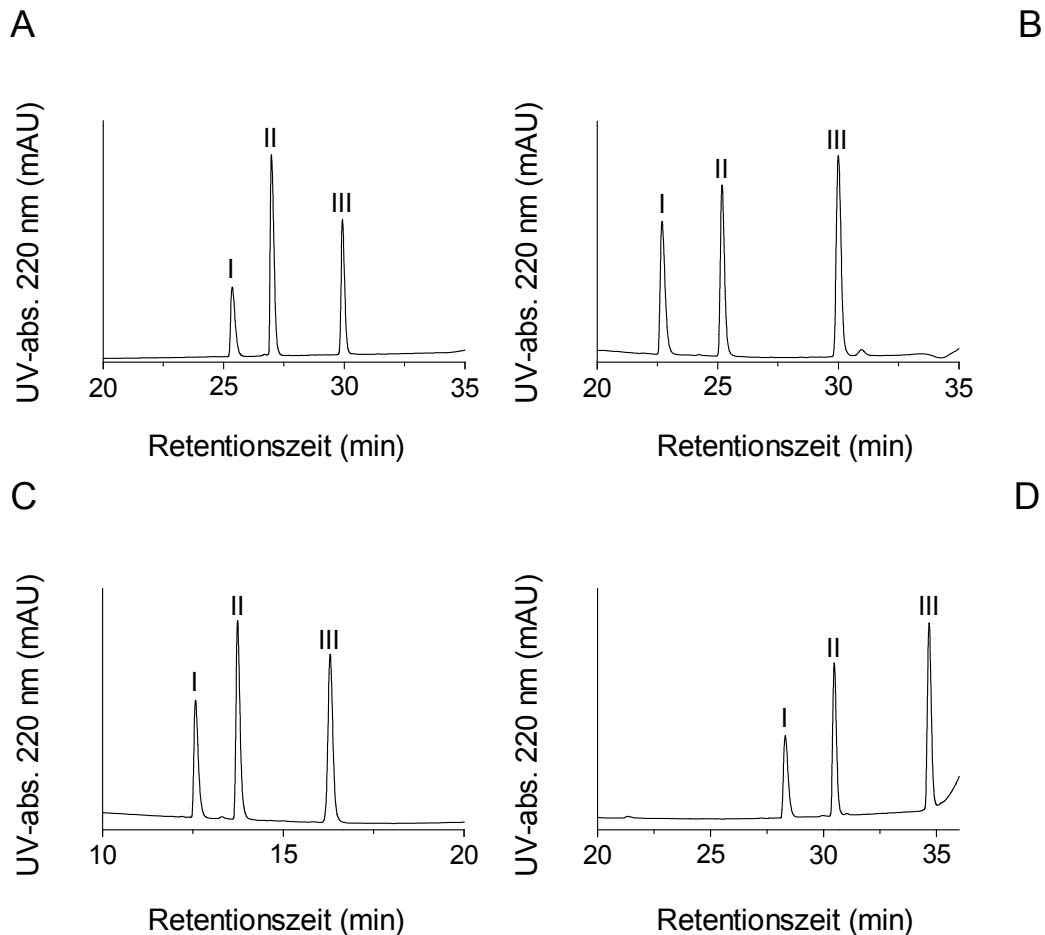


Abbildung 28: Reversed-Phase-chromatographische Auftrennung von Peptiden Angiotensin I & II und Bradykinin Anwesenheit der Ionenpaar-Reagenz Trifluoressigsäure. **(A)** Die Auftrennung mit 80 % Acetonitril-Wasser, **(B)** die Auftrennung mit 100 % Ethanol **(C)** die Auftrennung mit 100 % 1-Propanol und **(D)** die Auftrennung mit 100 % Methanol. I = Bradykinin II = Angiotensin II und III = Angiotensin I.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden tryptische Peptide von humanem Serumalbumin in Anwesenheit der Ionenpaar-Reagenz Trifluoressigsäure (TFA) und unter Verwendung der Elutionsmittel 80 % Acetonitril-Wasser, 100 % Ethanol, 100 % 1-Propanol und 100 % Methanol chromatographisch aufgereinigt. Die komplexe Probe aus tryptischen Peptiden konnte mit 80 % Acetonitril-Wasser und 100 % Ethanol im gleichen Gradienten von 0 % bis 50 % B in 90 min übereinstimmend aufgetrennt werden (**Abbildung 29 A** und **B**). Bei der Auftrennung mit 100 % 1-Propanol hingegen war die chromatographische Auflösung der Peptide unzureichend und es traten erhöhte Gegendrucke auf (**Abbildung 29 C**). Bei der Auftrennung mit 100 % Methanol musste ein Gradient von 0 % B bis 80 % B in 90 min verändert werden, um eine ausreichende chromatographische Auflösung der Peptide zu haben (**Abbildung 29 D**).

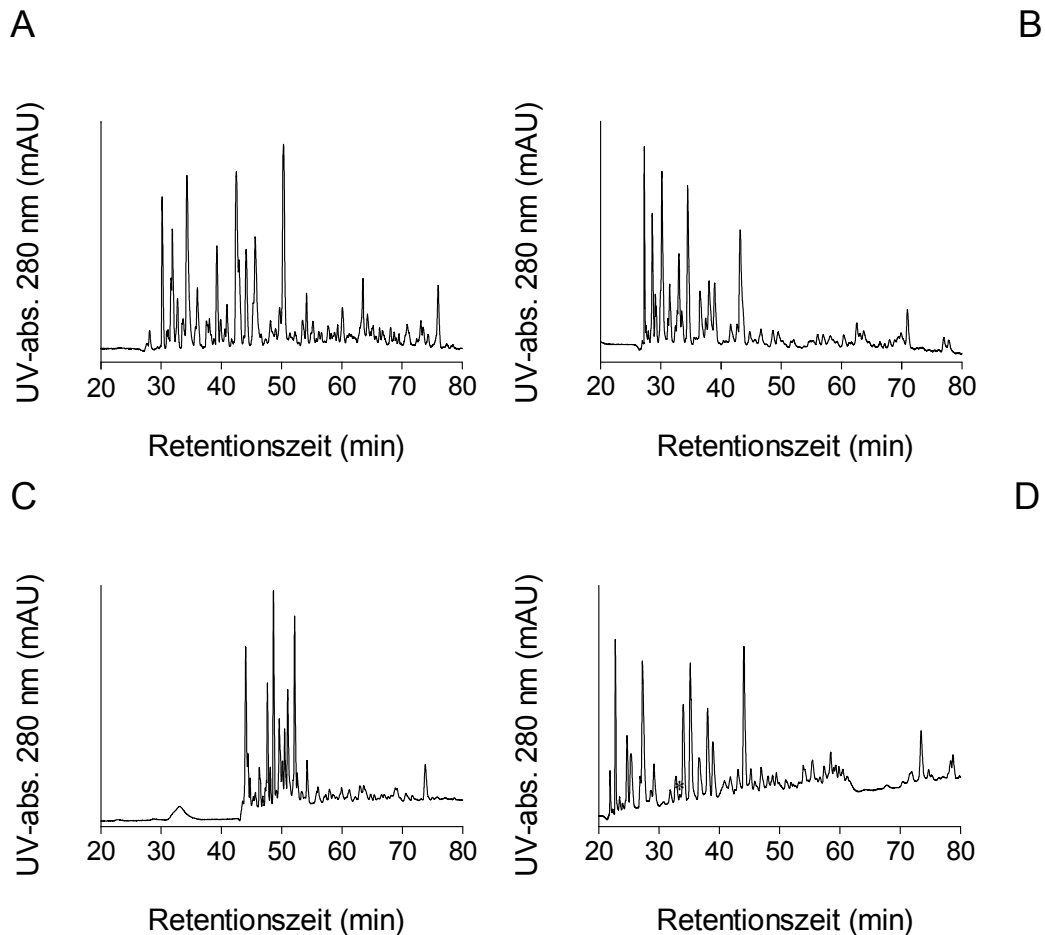


Abbildung 29: Reversed-Phase-chromatographische Auftrennung von tryptischen Peptiden des humanen Serumalbumins Anwesenheit der Ionenpaar-Reagenz Trifluoressigsäure. **(A)** Die Auftrennung mit 80 % Acetonitril-Wasser, **(B)** die Auftrennung mit 100 % Ethanol **(C)** die Auftrennung mit 100 % 1-Propanol und **(D)** die Auftrennung mit 100 % Methanol.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde ein Gemisch der Proteine Myoglobin, Trypsininhibitor Typ II S und Cytochrom C in Anwesenheit der Ionenpaar-Reagenz Trifluoressigsäure (TFA) und unter Verwendung der Elutionsmittel 80 % Acetonitril-Wasser, 100 % Ethanol, 100 % 1-Propanol und 100 % Methanol chromatographisch aufgereinigt. Mit 80 % Acetonitril-Wasser und 100 % Ethanol im gleichen Gradienten von 0 % bis 80 % B in 90 min konnten die Proteine basisliniengetrennt separiert werden (**Abbildung 30 A und B**). Bei der Auftrennung mit 100 % 1-Propanol waren die Retentionszeiten verkürzt und die chromatographische Auflösung von Cytochrom C und Trypsininhibitor Typ II S war unzureichend (**Abbildung 30 C**). Bei der Auftrennung mit 100 % Methanol verlängerten sich die Retentionszeiten der Proteine wiederum, wodurch die UV-Signale der Proteine in den ungünstigen Bereichen der Auftrennung mit hoher Basislinienverschiebung detektiert wurden (**Abbildung 30 D**).

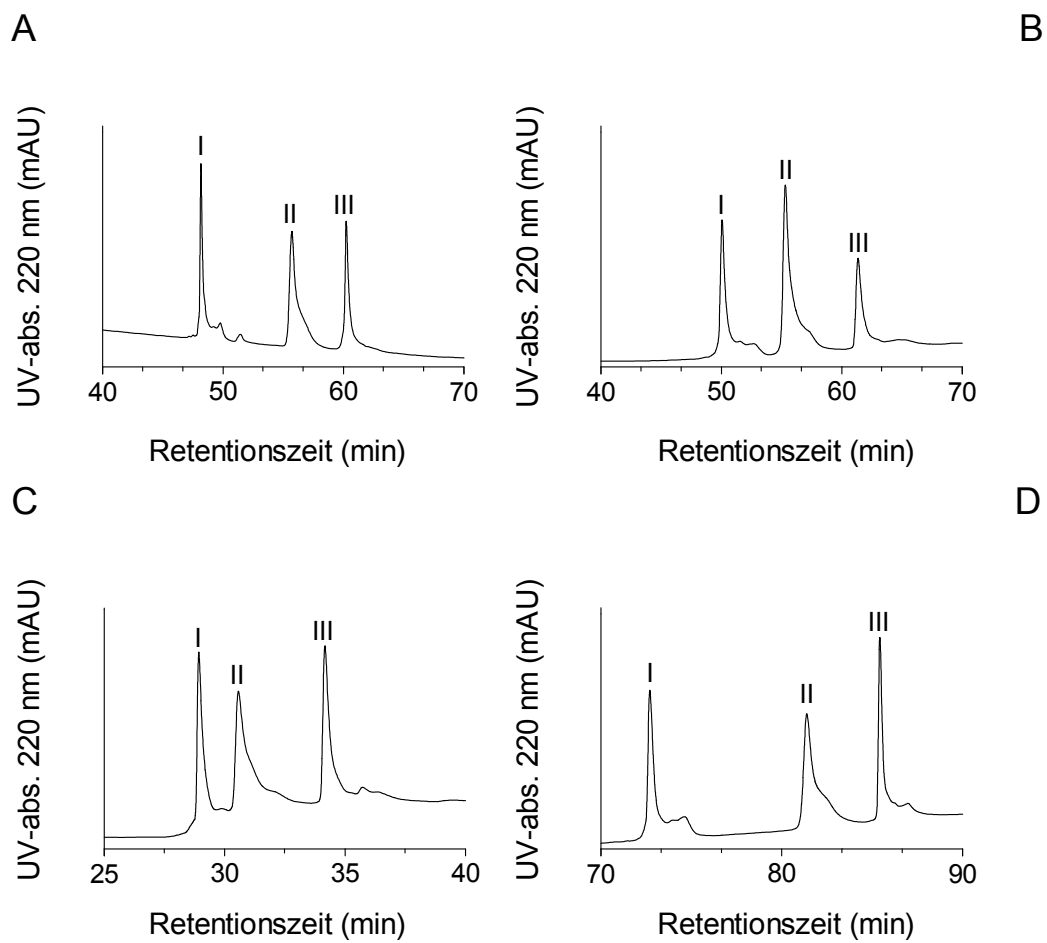


Abbildung 30: Reversed-Phase-chromatographische Auftrennung der Proteine Myoglobin, Cytochrom C und Trypsininhibitor Typ II S in Anwesenheit der Ionenpaar-Reagenz Trifluoressigsäure. **(A)** Die Auftrennung mit 80 % Acetonitril-Wasser, **(B)** die Auftrennung mit 100 % Ethanol **(C)** die Auftrennung mit 100 % 1-Propanol und **(D)** die Auftrennung mit 100 % Methanol. I = Cytochrom C II = Trypsininhibitor Typ II S und III = Myoglobin.

4.3 Entwicklung eines Dialyseverfahrens mit vermehrter Abtrennung proteingebundener Urämie-Toxine bei erhöhter Ionenstärke

Die Ergebnisse der Versuchsreihen, die zur Entwicklung eines Dialyseverfahrens mit vermehrter Abtrennung proteingebundener Urämie-Toxine unter Einfluss erhöhter Ionenstärke durchgeführt wurden, werden in den folgenden Abschnitten dargestellt.

4.3.1 Proteinbindung von Phenylelessigsäure, Indoxylsulfat und p-Kresylsulfat bei erhöhter Ionenstärke

Im Rahmen der Arbeit wurde zunächst untersucht, ob eine erhöhte Ionenstärke proteingebundene Urämie-Toxine vermehrt aus der Proteinbindung freisetzt. Die Proteinbindung proteingebundener Urämie-Toxine bei erhöhter Ionenstärke wurde untersucht, indem die Konzentrationen von Phenylelessigsäure, Indoxylsulfat und p-Kresylsulfat im Filtrat von Plasma, das zuvor in Anwesenheit steigender Kochsalzkonzentrationen mittels 30 kDa-Filters zentrifugiert wurde (**Abschnitt 3.3.1**), bestimmt wurde. Unter Verwendung von Ionenpaar-Reversed-Phase-Chromatographie wurden die Urämie-Toxine separiert, die Retentionszeiten der drei Substanzen bestimmt und die Menge von Phenylelessigsäure, Indoxylsulfat und p-Kresylsulfat der Filtrate quantifiziert. Die verwendeten Lineargradienten der Ionenpaar-Reversed-Phase-Chromatographie konnten Phenylelessigsäure, Indoxylsulfat und p-Kresylsulfat basisliniengetrennt separieren. In **Abbildung 31** sind die chromatographischen Aufreinigungen der Substanzen im Filtrat einer Probe von humanem Plasma ohne Hitzedenaturierung und nach Hitzedenaturierung, sowohl bei physiologischer Kochsalzkonzentration als auch bei $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Natriumchlorid dargestellt. Die Peakflächen von Phenylelessigsäure (PAA), Indoxylsulfat (IDS) und p-Kresylsulfat (CRS) im Filtrat ohne Hitzedenaturierung entsprachen der ungebundenen Fraktion der proteingebundenen Urämie-Toxine, die Peakflächen im Filtrat nach Hitzedenaturierung entsprachen der Gesamtmenge der Urämie-Toxine. Ein Vergleich zwischen **Abbildung 31 A** und **C** zeigte größere Peakflächen der drei Urämie-Toxine bei einer Kochsalzkonzentration von $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Natriumchlorid. Die korrespondierende Menge an Urämie-Toxinen in der ungebundenen Fraktion war somit größer bei höherer Kochsalzkonzentration.

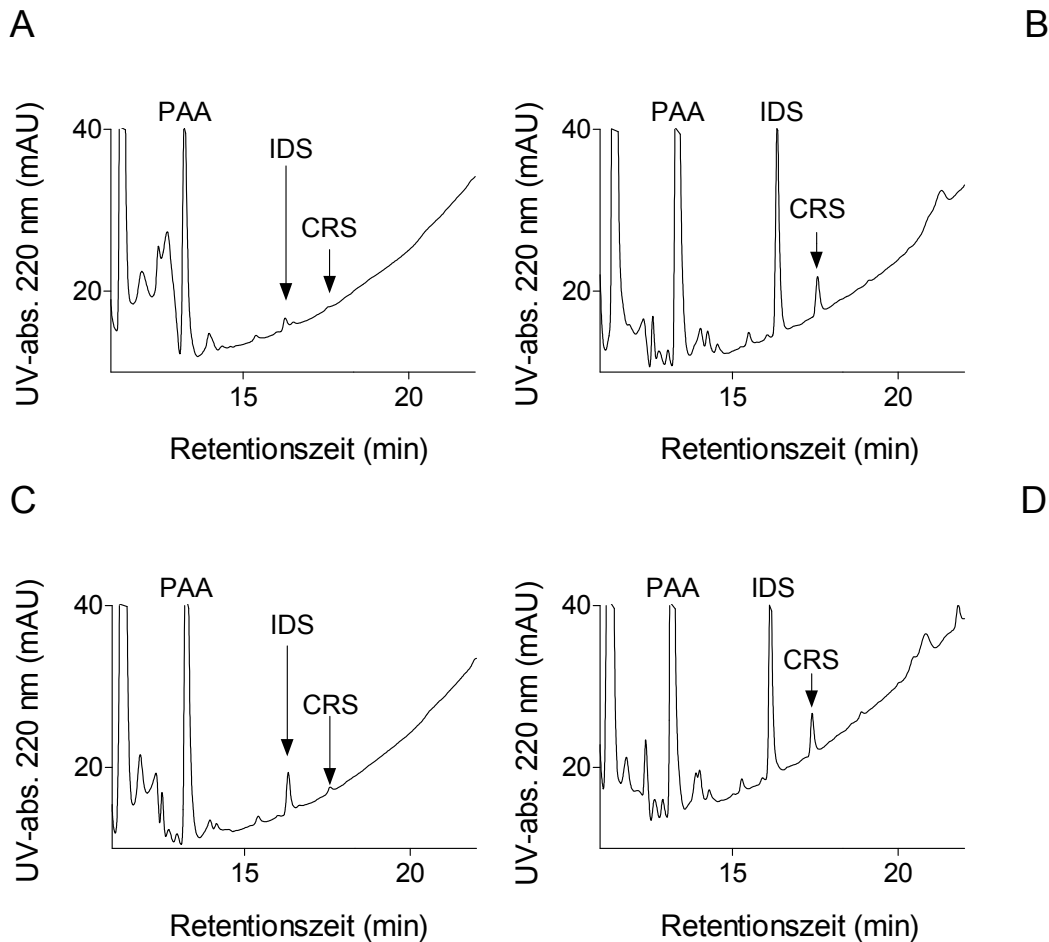


Abbildung 31: Ionenpaar-Reversed-Phase-Chromatographie humanem Plasmafiltrat mit Phenyllessigsäure (PAA), Indoxylsulfat (IDS) und p-Kresylsulfat (CRS). **(A)** Ein Chromatogramm des Filtrats bei physiologischer Kochsalzkonzentration, **(B)** ein Chromatogramm des Filtrats bei physiologischer Kochsalzkonzentration nach Hitzedenaturierung, **(C)** ein Chromatogramm des Filtrats bei einer $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Kochsalz-Konzentration und **(D)** ein Chromatogramm des Filtrats bei einer $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Kochsalz-Konzentration nach Hitzedenaturierung.

Abbildung 32 zeigt den Effekt erhöhter Ionenstärke auf die Proteinbindung gesondert für Phenyllessigsäure (**Abbildung 32 A und B**) und Indoxylsulfat und p-Kresylsulfat (**Abbildung 32 C und D**). Im Bereich der Retentionszeiten von Phenyllessigsäure, Indoxylsulfat und p-Kresylsulfat waren bei physiologischen Kochsalzkonzentrationen kleinere Peakflächen als in Anwesenheit von $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Kochsalz festzustellen. Anhand der Peakflächen von Phenyllessigsäure, Indoxylsulfat und p-Kresylsulfat wurden mittels Verdünnungsreihen die Toxin-Mengen der Probe bestimmt. Über die Wiederfindungsrate (%) des internen Standards Resorcin wurde der Verlust der Substanzen während der Aufreinigung bestimmt. Mit Hilfe des Volumens des Filtrats wurde die Konzentration der Urämie-Toxine in $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ berechnet.

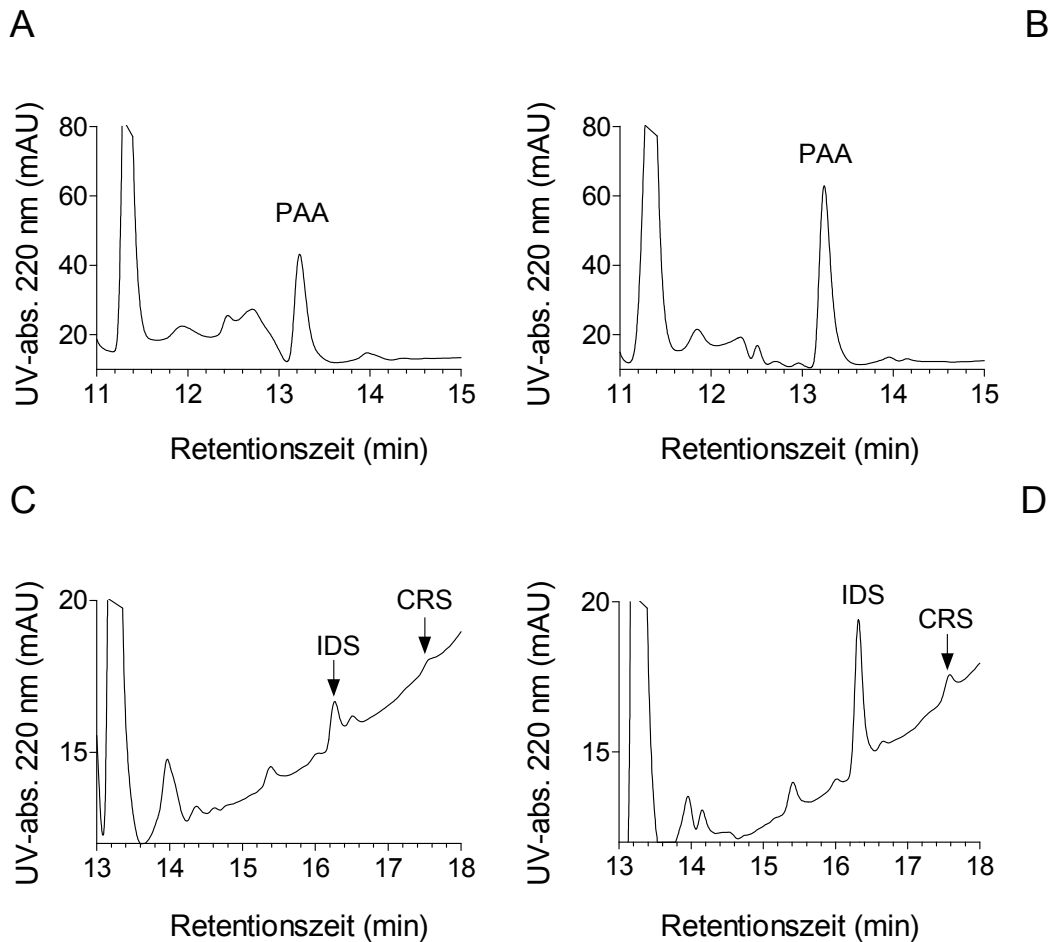


Abbildung 32: Ionenpaar-Reversed-Phase-Chromatographie von Plasmafiltrat mit Phenyllessigsäure (PAA), Indoxylsulfat (IDS) und p-Kresylsulfat (CRS). **(A)** Ein Chromatogramm im Bereich der Retentionszeit von Phenyllessigsäure im Filtrats der ungebundenen Fraktion bei physiologischer Kochsalzkonzentration, **(B)** das Chromatogramm des Filtrats im Bereich der Retentionszeit von Phenyllessigsäure der ungebundenen Fraktion bei einer $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Kochsalzkonzentration **(C)** das Chromatogramm im Bereich von Indoxylsulfat und p-Kresylsulfat in der ungebundenen Fraktion bei physiologischer Kochsalzkonzentration, **(D)** das Chromatogramm im Bereich von Indoxylsulfat und p-Kresylsulfat in der ungebundenen Fraktion bei einer $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Kochsalzkonzentration.

Aus der Differenz zwischen der Gesamtkonzentration der Urämie-Toxine nach Hitzedenaturierung und der Konzentration der ungebundenen Fraktion ohne Hitzedenaturierung der Urämie-Toxine wurde die Konzentration der proteingebundenen Fraktion bestimmt. Die proteingebundenen Fraktionen von Phenyllessigsäure, Indoxylsulfat und p-Kresylsulfat sind in **Abbildung 33** in Abhängigkeit steigender Kochsalzkonzentration in den Plasmaproben dargestellt. Phenyllessigsäure war im Plasma bei physiologischen Kochsalzkonzentrationen zu $59,4 \pm 3,4 \%$ proteingebunden, Indoxylsulfat zu $95,7 \pm 0,6 \%$ und p-Kresylsulfat zu $96,9 \pm 1,5 \%$. Nach Inkubation mit einer $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Kochsalzlösung waren Phenyllessigsäure zu $17,3 \pm 6,2 \%$, Indoxylsulfat zu $78,3 \pm 1,2 \%$ und p-Kresylsulfat zu $86,2 \pm 0,6 \%$ proteingebunden. Die

proteingebundenen Fraktionen von Phenyllessigsäure, Indoxylsulfat und p-Kresylsulfat wurden bei steigenden Kochsalzbedingungen von physiologischer Kochsalzkonzentration bis $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Natriumchlorid verkleinert. Die Freisetzung aus der Proteinbindung betrug in Anwesenheit einer $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Kochsalzlösung bei Phenyllessigsäure $42,1 \pm 7,1 \%$, bei Indoxylsulfat $17,4 \pm 1,4 \%$ und bei p-Kresylsulfat $10,7 \pm 1,6 \%$. In **Tabelle 3** sind die Anteile der proteingebundenen Fraktionen in Anwesenheit steigender Kochsalzkonzentrationen dargestellt.

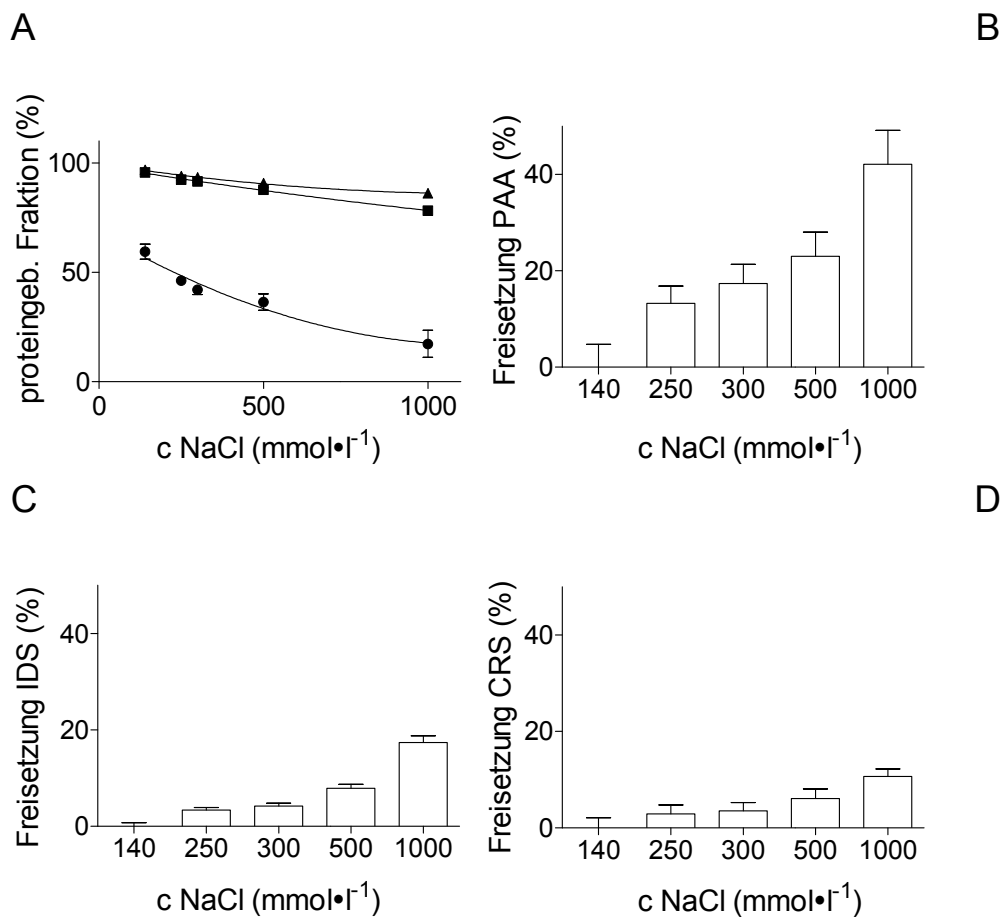


Abbildung 33: (A) Proteingebundene Fraktion von Phenyllessigsäure (●), Indoxylsulfat (■) und p-Kresylsulfat (▲) im Plasma in Abhängigkeit von steigenden Kochsalzkonzentrationen. Freisetzung von (B) Phenyllessigsäure (PAA), (C) Indoxylsulfat (IDS) und (D) p-Kresylsulfat (CRS) aus der Proteinbindung bei steigenden Kochsalzkonzentrationen als Differenz Δ des proteingebundenen Anteils von physiologischen Bedingungen und den proteingebundenen Anteilen bei steigenden Kochsalzkonzentrationen (**Tabelle 3**), dargestellt als Mittelwerte \pm Standardfehler in Prozent (standard error of mean, SEM), ($N = 3$).

Tabelle 3: Anteil der proteingebundenen Fraktion von Phenylelessigsäure (PAA), Indoxylsulfat (IDS) und p-Kresylsulfat (CRS) in Anwesenheit steigender Kochsalzkonzentrationen, sowie der Differenz Δ zu den proteingebundenen Anteilen unter physiologischen Bedingungen. Darstellung in Prozent der Mittelwerte \pm Standardfehler SEM, (N = 3).

Kochsalz- konz. [mmol·l ⁻¹]	proteingeb. Fraktion PAA (%)	proteingeb. Fraktion IDS (%)	proteingeb. Fraktion CRS (%)	Differenz Δ PAA (%)	Differenz Δ IDS (%)	Differenz Δ CRS (%)
140	59,4 \pm 3,4	95,7 \pm 0,6	96,9 \pm 1,5	0 \pm 4,8	0 \pm 0,8	0 \pm 2,1
250	46,2 \pm 1,3	92,3 \pm 0,2	94,0 \pm 1,1	13,3 \pm 3,6	3,4 \pm 0,6	2,9 \pm 1,8
300	42 \pm 2,1	91,5 \pm 0,3	93,3 \pm 0,9	17,4 \pm 4,0	4,2 \pm 0,6	3,6 \pm 1,7
500	36,4 \pm 3,7	87,8 \pm 0,6	90,8 \pm 1,3	23,0 \pm 5,0	7,9 \pm 0,8	6,1 \pm 1,9
1000	17,3 \pm 6,2	78,3 \pm 1,2	86,2 \pm 0,6	42,1 \pm 7,1	17,4 \pm 1,4	10,7 \pm 1,6

4.3.2 Enzymaktivitäten ausgewählter Plasmaproteine nach Inkubation bei erhöhter Ionenstärke

Um den Einfluss erhöhter Ionenstärke auf die Funktionalität ausgewählter Plasmaproteine zu untersuchen, wurden die Enzyme Laktatdehydrogenase (LDH), Superoxiddismutase (SOD) und alkalische Phosphatase (AP) für 30 min in einer 0,5 mol·l⁻¹ Kochsalzlösung inkubiert und die Enzymaktivität durch colorimetrische Enzym-Assays bestimmt. In **Abbildung 34** ist der Einfluss einer 0,5 mol·l⁻¹ Kochsalzlösung auf die Enzymaktivität (**A**) der Laktatdehydrogenase (LDH), (**B**) der Superoxiddismutase (SOD) und (**C**) der alkalischen Phosphatase (AP) dargestellt.

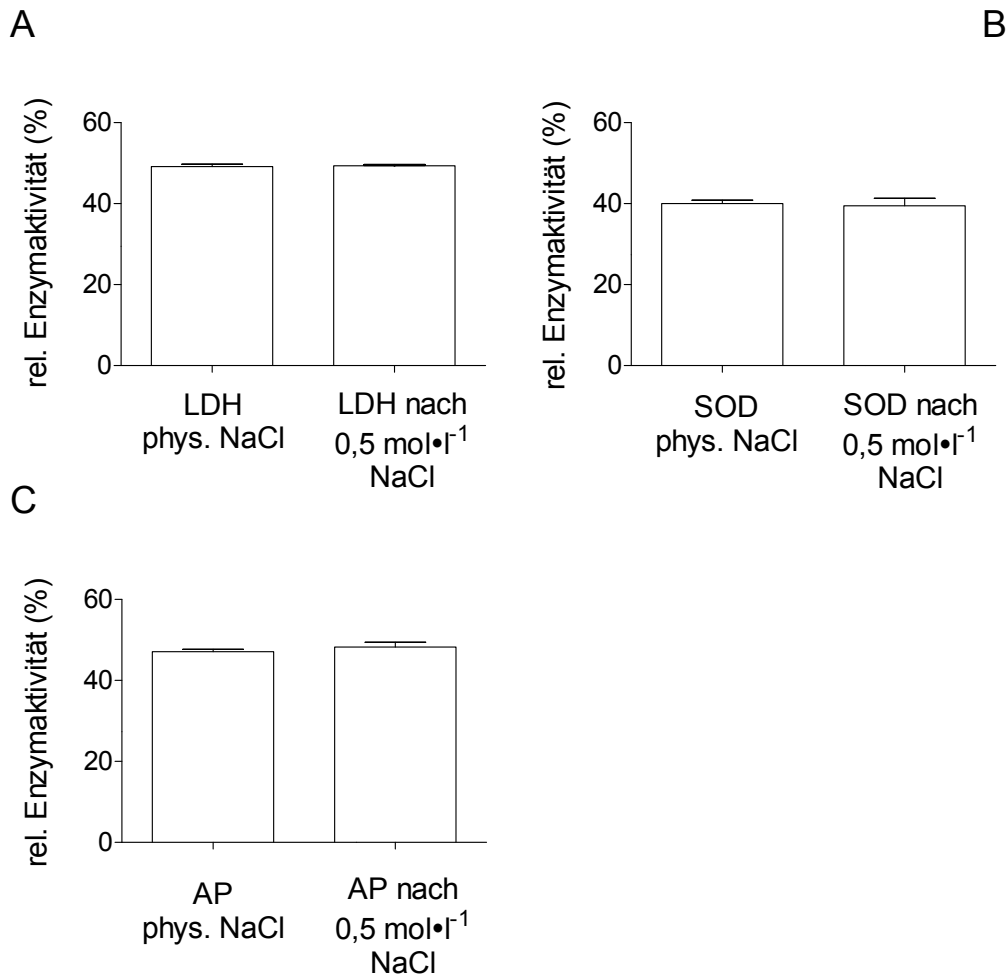


Abbildung 34: Enzymaktivität **(A)** der Laktatdehydrogenase (LDH), **(B)** der Superoxiddismutase (SOD) und **(C)** der alkalischen Phosphatase (AP), jeweils nach Inkubation in physiologischer Kochsalzlösung und in $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Kochsalzlösung, Darstellung der Mittelwerte \pm Standardfehler SEM in Prozent, (N = 3).

Die relativen Enzymaktivitäten der Laktatdehydrogenase, der Superoxiddismutase und der alkalischen Phosphatase wurden durch prozentualen Vergleich mit Enzymproben bekannter Aktivität von $10 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$ bestimmt. Die relativen Enzymaktivitäten der Laktatdehydrogenase, der Superoxiddismutase und der alkalischen Phosphatase zeigten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der Proteinproben, die in physiologischer Kochsalzlösung inkubiert wurden und der Proben, die in $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Kochsalzlösung inkubiert wurden: Die Laktatdehydrogenase hatte in der Probe mit physiologischer Kochsalzkonzentration eine relative Aktivität von $49,1 \% \pm 0,6 \%$ und in den Proben nach Inkubation unter erhöhter Ionenstärke eine relative Enzymaktivität von $49,3 \% \pm 0,2 \%$, ($P > 0,05$). Die Superoxiddismutase hatte eine relative Enzymaktivität von $40,0 \% \pm 0,8 \%$ in den physiologischen Proben und $39,4 \% \pm 1,7 \%$ ($P > 0,05$) in den Proben nach Inkubation in einer $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Kochsalzlösung. Die alka-

lische Phosphatase hatte eine relative Enzymaktivität von $47,1 \% \pm 0,6 \%$ in den physiologischen Proben und $48,2 \% \pm 1,2 \%$ ($P > 0,05$) in den Proben. Da die Enzymaktivitäten der physiologischen Kontrollproben und den Proteinproben nach Inkubation unter erhöhter Ionenstärke vergleichbar waren, wurden die Proteine während einer 30-minütigen Inkubation in einer $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Kochsalzlösung nicht irreversibel denaturiert. Nach der Reduktion der Kochsalzkonzentration auf physiologische Bedingungen hatten die Enzyme die gleichen enzymatischen Eigenschaften wie in den Kontrollversuchen. Die Inkubation in einer hypertonen Kochsalzlösung führte zu keiner verminderten Aktivität der untersuchten repräsentativen Enzyme.

4.3.3 Strukturanalyse ausgewählter Plasmaproteine nach Inkubation bei erhöhter Ionenstärke

Weiterhin wurde die Strukturintegrität ausgewählter Plasmaproteine nach Inkubation unter erhöhter Ionenstärke mit Hilfe der ^1H -NMR-Spektroskopie untersucht. Dazu wurden ^1H -NMR-Experimente von β -2-Mikroglobulin, α -Chymotrypsinogen und Hämoglobin nach einer Inkubation in einer $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Kochsalzlösung, sowie nach einer Inkubation in physiologischer Kochsalzlösung durchgeführt. Zusätzlich wurden ^1H -NMR-Messungen der Proteine mit Zusatz von 10 % Acetonitril durchgeführt. In **Abbildung 35** sind die Spektren des β -2-Mikroglobulins abgebildet: **(A)** nach einer Inkubation in einer $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Kochsalzlösung, **(B)** in physiologischer Kochsalzlösung und **(C)** in physiologischer Kochsalzlösung mit Zusatz von 10 % Acetonitril. Die Spektren des β -2-Mikroglobulins nach Inkubation in erhöhter Ionenstärke und in physiologischer Kochsalzlösung zeigten keine signifikanten Unterschiede, da die chemische Verschiebung, die die chemische Umgebung der Protonen darstellt, nicht unterschiedlich war. Hingegen bestanden deutliche Unterschiede zur Probe mit Zusatz von 10 % Acetonitril. Acetonitril denaturierte die dreidimensionale Struktur des β -2-Mikroglobulins, wodurch die chemische Verschiebung der Protonen verändert wurde.

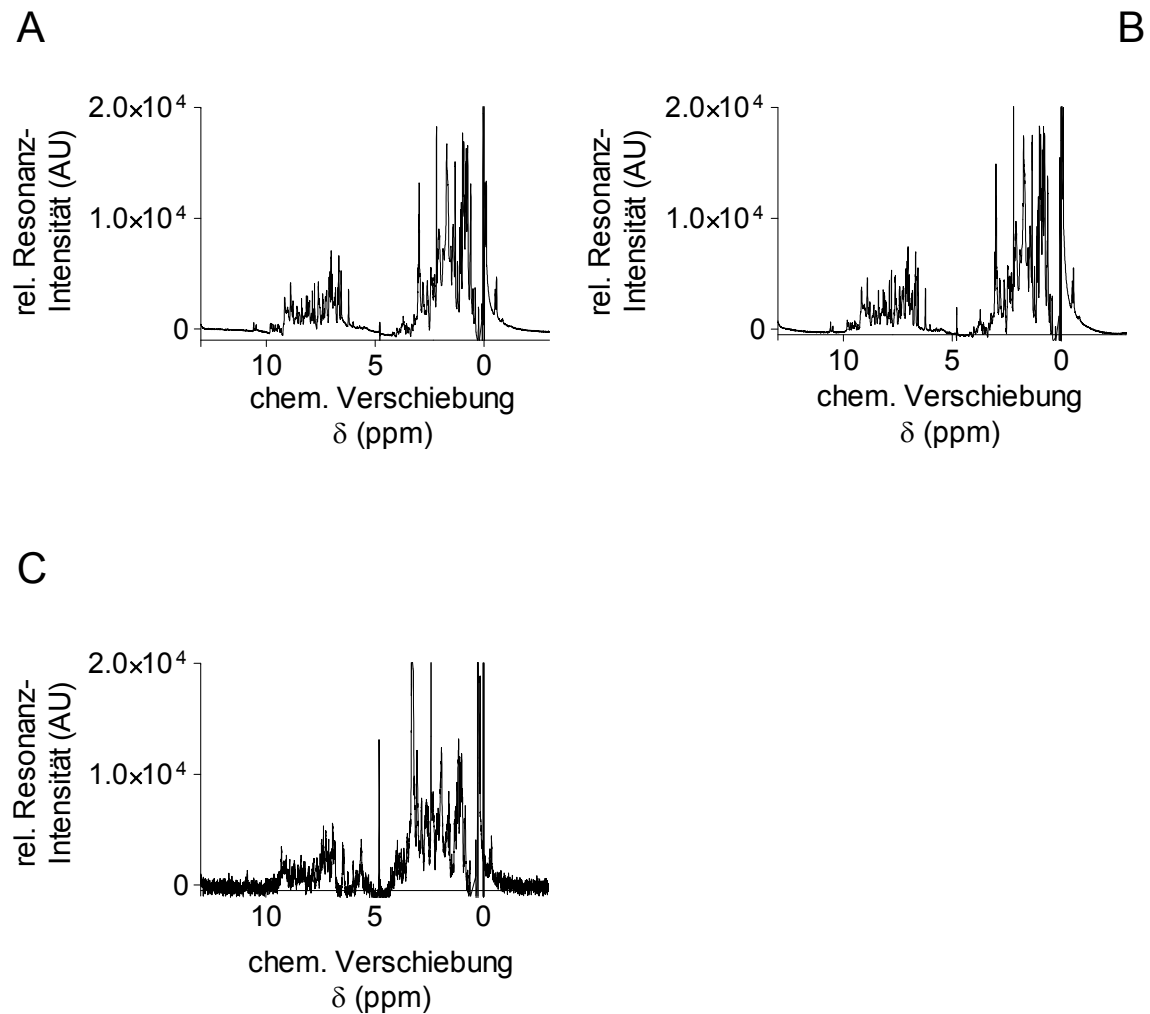


Abbildung 35: $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von β -2-Mikroglobulin. (A) ein $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum nach einer Inkubation mit einer $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Kochsalzlösung, (B) nach einer Inkubation in physiologischer Kochsalzlösung und (C) nach einer Inkubation in physiologischer Kochsalzlösung mit 10 % Acetonitril.

In **Abbildung 36** und **Abbildung 37** sind die ^1H -Spektren des α -Chymotrypsinogens und des Hämoglobins in analoger Reihenfolge dargestellt. Es bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Spektren der Proteinproben, die bei erhöhter Ionenstärke inkubiert wurden und den Spektren der Proteinproben mit physiologischer Ionenstärke. Dagegen waren deutliche Unterschiede zu den Spektren der Proteinproben mit Zusatz von 10 % Acetonitril vorhanden.

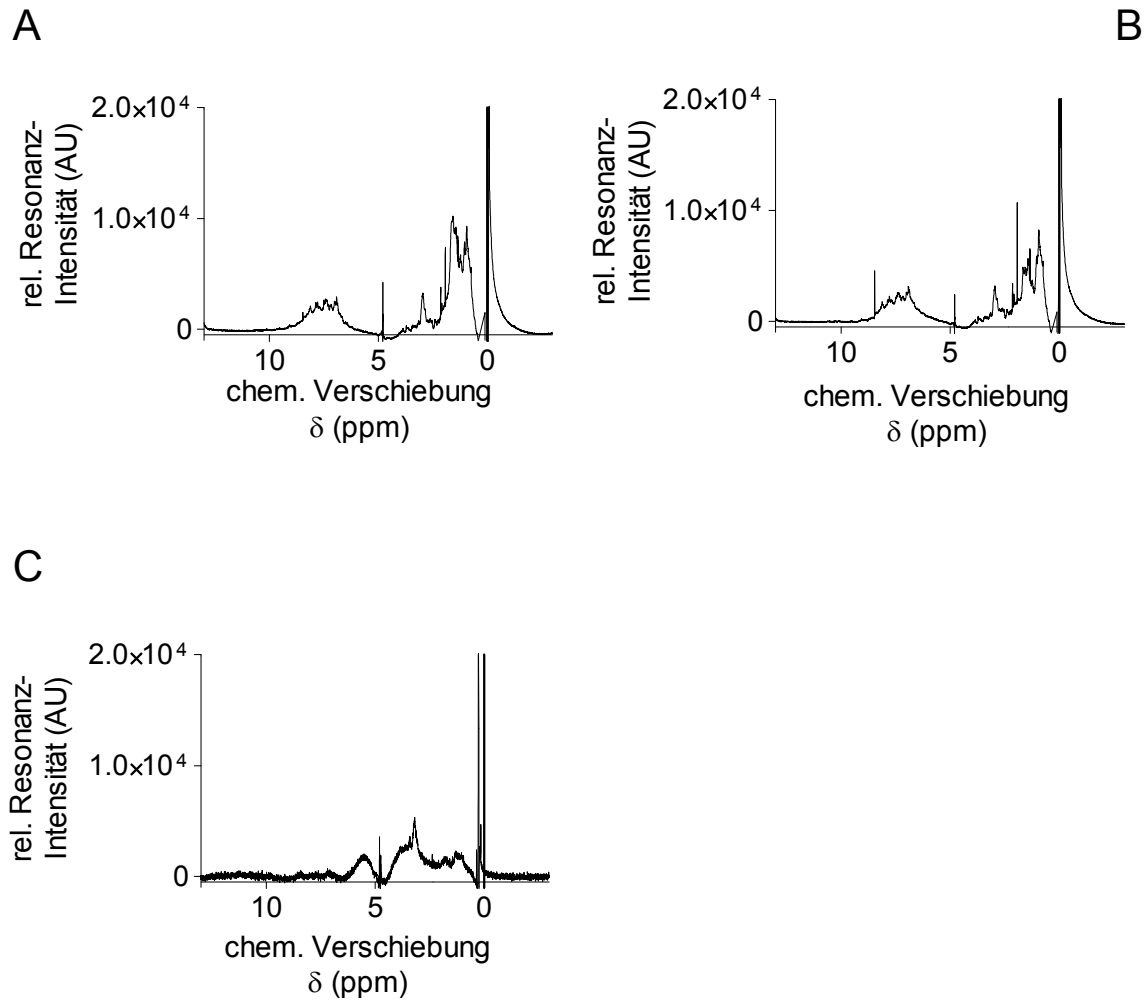


Abbildung 36: $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von α -Chymotrypsinogen. (A) das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum nach einer Inkubation mit einer $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Kochsalzlösung, (B) nach einer Inkubation in physiologischer Kochsalzlösung und (C) nach einer Inkubation in physiologischer Kochsalzlösung mit 10 % Acetonitril.

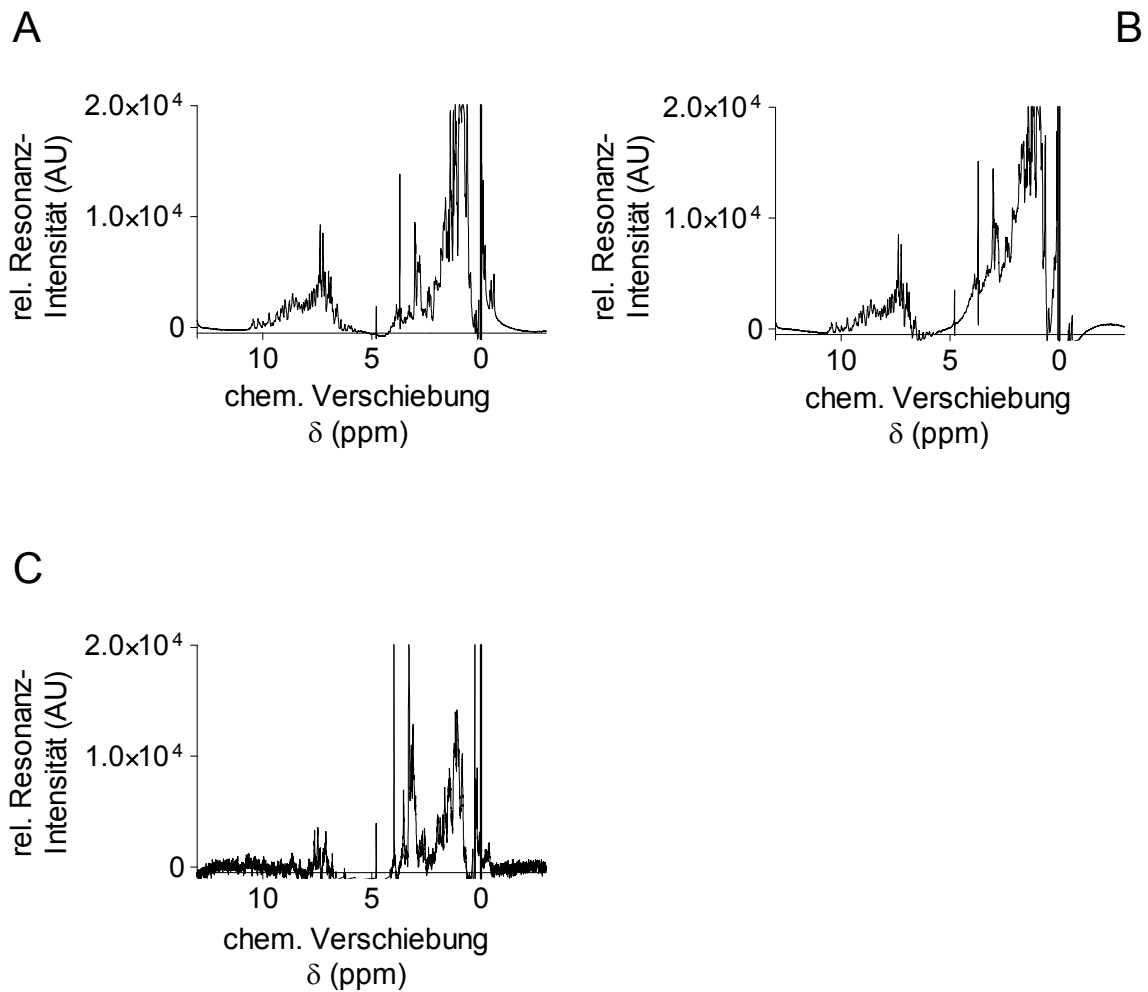


Abbildung 37: $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von Hämoglobin. (A) ein $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum nach einer Inkubation mit einer $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Kochsalzlösung, (B) nach einer Inkubation in physiologischer Kochsalzlösung und (C) nach einer Inkubation in physiologischer Kochsalzlösung mit 10 % Acetonitril.

Die $^1\text{H-NMR}$ -Versuchsreihen zeigten, dass die Inkubation von Proteinen in einer $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Kochsalzlösung und nachfolgender Reduktion der Kochsalzkonzentration mittels Größenausschlusschromatographie auf physiologische Werte keinen nachweisbaren Einfluss auf die Strukturintegrität dieser Plasmaproteine hatte. Die Ergebnisse der $^1\text{H-NMR}$ -Versuchsreihen waren damit mit den Untersuchungen der Enzymaktivitäten bei erhöhter Ionenstärke konform. Folglich konnte in Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine Dialysebehandlung mit erhöhter Ionenstärke keinen Einfluss auf die Funktionalität und Strukturintegrität von Plasmaproteinen hat.

4.3.4 Abtrennrage proteingebundener Urämie-Toxine bei einer *in vitro*-Dialyse bei erhöhten Kochsalzbedingungen

Um die zuvor darstellten Ergebnisse auf die Bedingungen einer konventionellen Dialysebehandlung zu adaptieren, wurde in *in vitro*-Dialysen mit erhöhter Ionenstärke untersucht, ob sich proteingebundene Urämie-Toxine in erhöhter Ionenstärke verbessert abtrennen lassen. Die Abtrennung proteingebundener Urämie-Toxine wurde während der *in vitro*-Dialyse mit erhöhter Ionenstärke einer Albumin-Urämie-Toxin-Lösung bei einem einmaligen Durchgang durch einen konventionellen Hämodialysator bestimmt (**Abbildung 12**). Die Proben wurden vor und hinter dem Hämodialysator entnommen und die Konzentrationen der proteingebundenen Urämie-Toxine Phenyllessigsäure, Indoxylsulfat und p-Kresylsulfat bestimmt. Die Konzentrationen sind als Mittelwerte \pm Standardfehler SEM in $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ in **Tabelle 4** dargestellt.

Tabelle 4: Konzentrationen von Phenyllessigsäure, Indoxylsulfat und p-Kresylsulfat in den Proben einer Albuminlösung mit physiologischen Kochsalzkonzentration und $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl vor und hinter dem Hämodialysator entnommen. Die Konzentrationen sind als Mittelwerte \pm Standardfehler SEM in $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ dargestellt.

	Toxin-Konz. bei phys. NaCl in [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]		Toxin-Konz. bei $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl in [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]	
	vor HD	nach HD	vor HD	nach HD
	Phenyllessigsäure	1519 ± 35	1018 ± 73	1616 ± 35
Indoxylsulfat	254 ± 2	218 ± 3	262 ± 7	208 ± 3
p-Kresylsulfat	319 ± 4	281 ± 3	346 ± 6	293 ± 7

Bei physiologischen Kochsalzbedingungen wurden die Konzentrationen von Phenyllessigsäure, Indoxylsulfat und p-Kresylsulfat um $49,2 \pm 3,5 \%$, $16,5 \pm 1,7 \%$ und $13,3 \pm 1,8 \%$ reduziert. Dagegen wurden die Konzentrationen von Phenyllessigsäure, Indoxylsulfat und p-Kresylsulfat bei einer erhöhten Ionenstärke von $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl um $60,9 \pm 3,7 \%$, $26,0 \pm 3,6 \%$ und $18,2 \pm 3,1 \%$ reduziert. Somit wurden Phenyllessigsäure, Indoxylsulfat und p-Kresylsulfat bei einer erhöhten Ionenstärke zu $11,7 \pm 5,0 \%$, $9,5 \pm 4,0 \%$ und $4,9 \pm 3,6 \%$ verbessert abgetrennt.

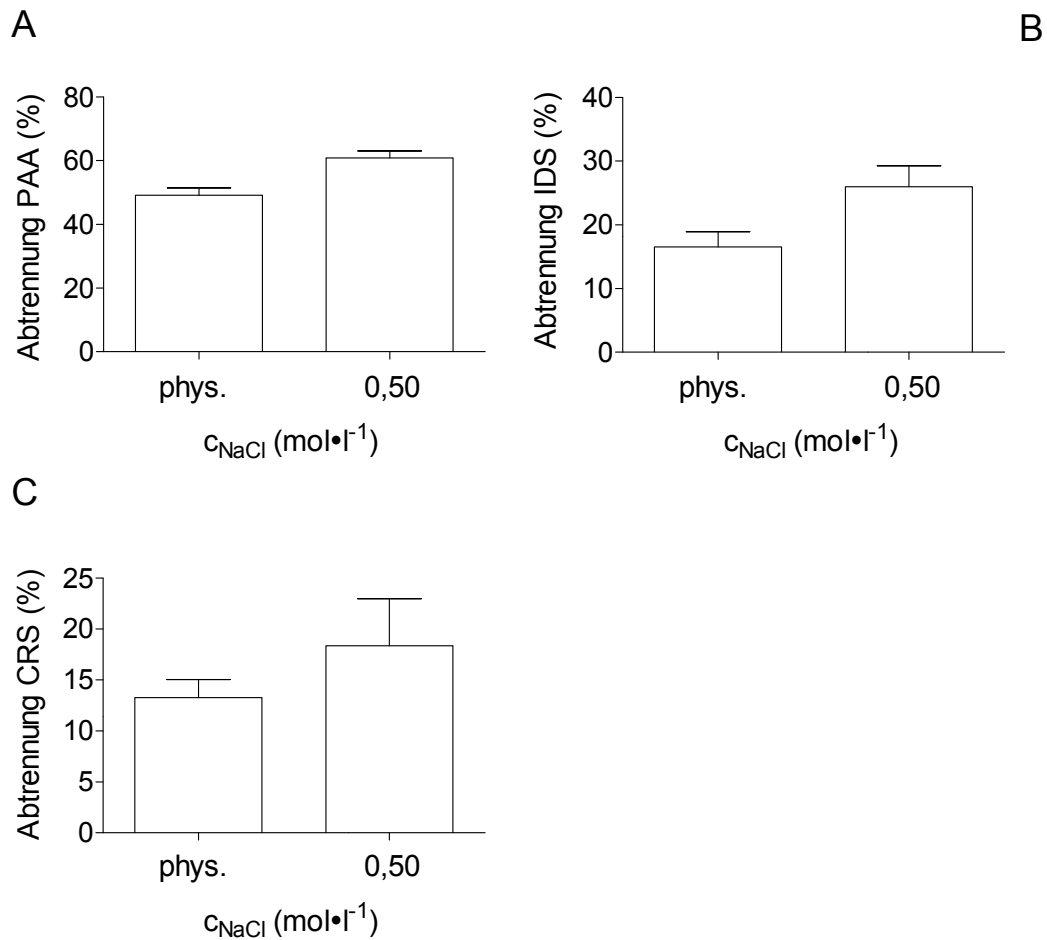


Abbildung 38: Dialytische Abtrennung proteingebundener Urämie-Toxine in *in vitro*-Dialysen bei erhöhter Ionenstärke, **(A)** Phenyllessigsäure (PAA), **(B)** Indoxylsulfat (IDS) und **(C)** p-Kresylsulfat (CRS), jeweils bei physiologischer Kochsalzkonzentration und bei einer erhöhten Ionenstärke von $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl, Darstellung als Mittelwerte \pm Standardfehler SEM in %, ($N = 3$).

Um die Leistung der *in vitro*-Dialyse mit erhöhter Ionenstärke eingehender darzustellen, wurde die dialytische Reinigung, die als *Clearance* bezeichnet wird, über folgende Beziehung bestimmt:

$$C = Q_{\text{Blut}} \cdot \left(1 - \frac{C_{\text{nach}}}{C_{\text{vor}}} \right)$$

C = Clearance [$\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$]

Q_{Blut} = Fluss der Blutpumpe [$\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$]

C_{vor} = Konzentration vor dem Hämodialysator [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]

C_{nach} = Konzentration nach dem Hämodialysator [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]

In **Abbildung 39** ist die *Clearance* der *in vitro*-Dialyse mit erhöhter Ionenstärke dargestellt.

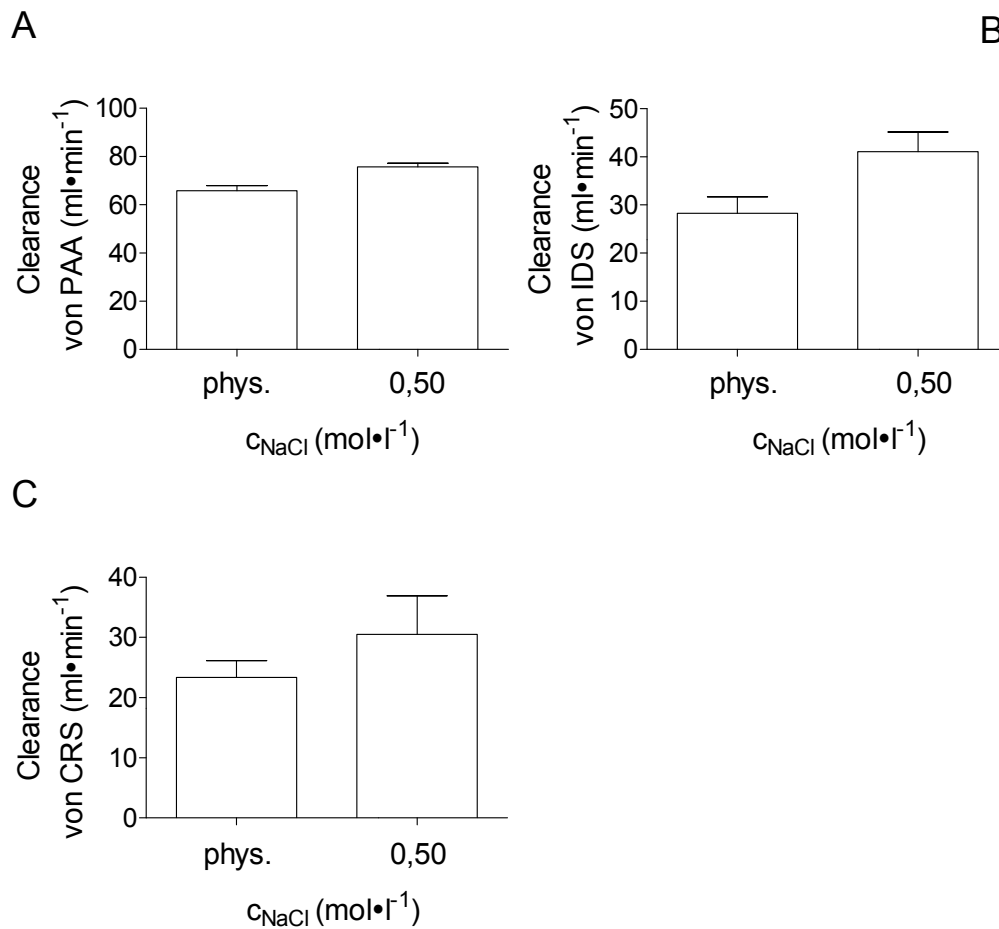


Abbildung 39: Dialytische Abtrennung (*Clearance*) (**A**) von Phenylelessigsäure (PAA), (**B**) Indoxylsulfat und (**C**) p-Kresylsulfat bei physiologischen Kochsalzkonzentrationen und bei erhöhter Ionenstärke von $0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaCl. Darstellung als Mittelwerte \pm Standardfehler SEM in $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$, ($N = 3$).

Während bei physiologischer Ionenstärke die Albuminlösung zu $65,8 \pm 2,1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, $28,3 \pm 3,4 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ und $23,4 \pm 2,8 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ von Phenylelessigsäure, Indoxylsulfat und p-Kresylsulfat bei einem Fluss von $200 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ gereinigt wurde, war die *Clearance* bei einer erhöhten Ionenstärke von $0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaCl zu $75,7 \pm 1,7 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, $41,0 \pm 4,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ und $30,5 \pm 6,4 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ von Phenylelessigsäure, Indoxylsulfat und p-Kresylsulfat. Die vermehrte dialytische Reinigung der Albuminlösung unter hypertonen Kochsalzbedingungen ($500 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaCl) von Phenylelessigsäure um $9,8 \pm 2,7 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, von Indoxylsulfat um $12,8 \pm 5,3 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ und p-Kresylsulfat $7,2 \pm 7,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ wurde durch die erhöhte Freisetzung der Urämie-Toxine aus der Proteinbindung erreicht.

4.3.5 Hämolyserate von humanem Vollblut bei einer *in-vitro*-Hämodialyse bei erhöhter Ionenstärke

Um den Einfluss erhöhter Ionenstärke von $160 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl bis $240 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl auf Vollblut zu untersuchen, wurden *in vitro*-Hämodialysen mit humanem Vollblut durchgeführt und bei der Rezirkulation des Blutes eine hypertone Kochsalzlösung vor dem Hämodialysator zugeleitet.

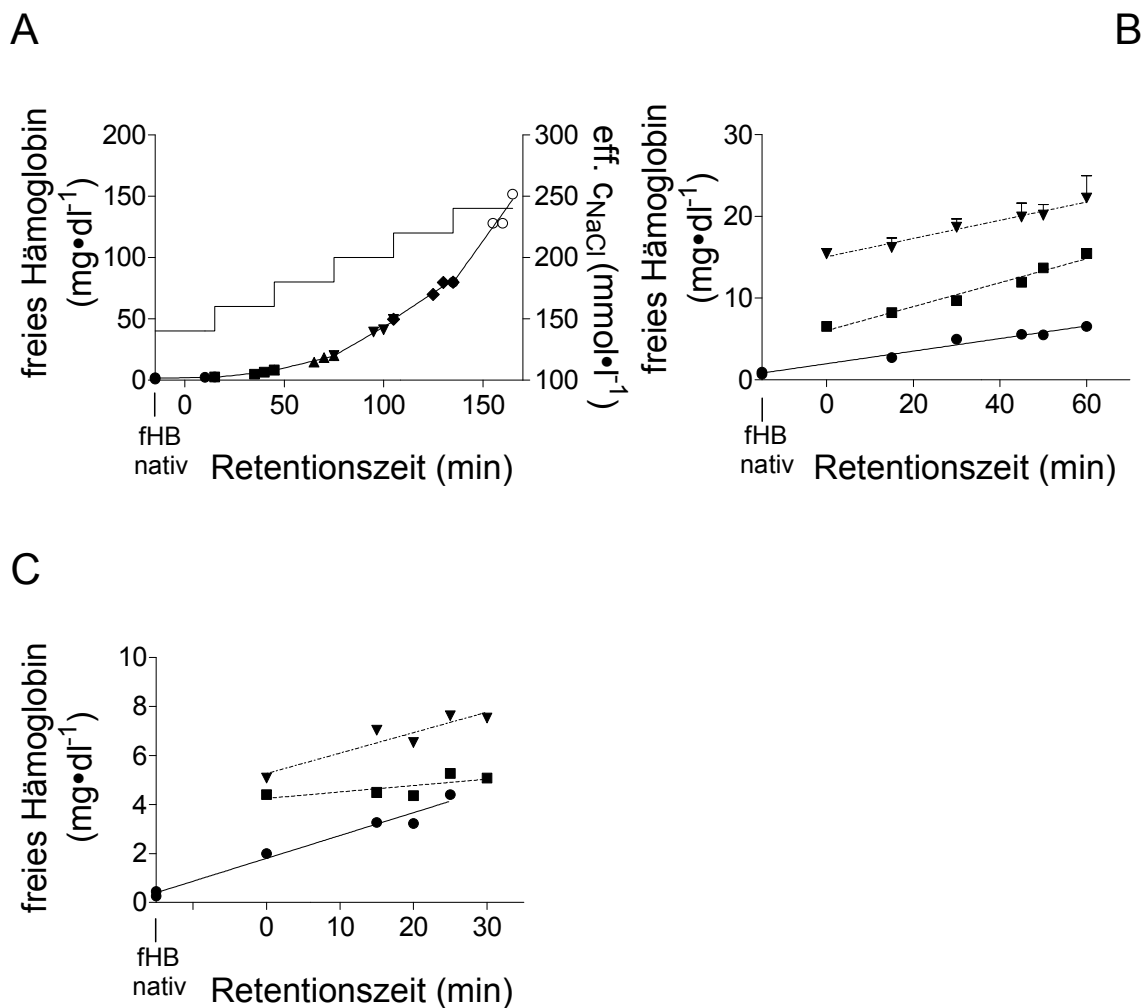


Abbildung 40: Freie Hämoglobinkonzentration in humanem Vollblut bei einer *in vitro*-Hämodialyse (**A**) in Abhängigkeit der Rezirkulationszeit und der steigenden effektiven Kochsalzkonzentrationen von (\bullet) $c_{\text{eff.}} = 140 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, (\blacksquare) $c_{\text{eff.}} = 160 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, (\blacktriangle) $c_{\text{eff.}} = 180 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, (\blacktriangledown) $c_{\text{eff.}} = 200 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, (\blacklozenge) $c_{\text{eff.}} = 220 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ und (\circ) $c_{\text{eff.}} = 240 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl. (**B**) Freie Hämoglobinkonzentration in Abhängigkeit einer 60-minütigen Rezirkulationszeit und den effektiven Kochsalzkonzentrationen von (\bullet) $c_{\text{eff.}} = 140 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, (\blacksquare) $c_{\text{eff.}} = 160 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ und (\blacktriangledown) $c_{\text{eff.}} = 180 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl. (**C**) Freie Hämoglobinkonzentration eines Rezirkulationsexperiments ohne Dialyse/Ultrafiltration und 30 min Rezirkulationszeit und (\bullet) $c_{\text{eff.}} = 140 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, (\blacksquare) $c_{\text{eff.}} = 160 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ und (\blacktriangledown) $c_{\text{eff.}} = 180 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl.

Das in **Abschnitt 3.3.4** beschriebene modifizierte Hämodialyseverfahren mit prädilutischer Infusion einer hypertonen Kochsalzlösung wurde durch Verwendung von humanem Vollblut auf seine Hämokompatibilität untersucht. In einer ersten Versuchsreihe wurde die maximal tolerierte effektive Kochsalzkonzentration in rezirkuliertem Vollblut bestimmt und darauf basierend weitere Versuchsreihen unter Verwendung der zuvor bestimmten tolerablen Kochsalzkonzentrationen mit und ohne Dialyse und Ultrafiltration durchgeführt (**Abbildung 40**). Im ersten Rezirkulationsexperiment wurde die freie Hämoglobinkonzentration in Abhängigkeit einer in $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Schritten ansteigenden effektiven Konzentration bestimmt. **Abbildung 40 A** zeigt die Abhängigkeit der freien Hämoglobinkonzentration gegen die Rezirkulationszeit und die effektive Kochsalzkonzentration. Anhand der Steigung einer linearen Regression durch die Messpunkte und des zuvor bestimmten Hämatokrits wurde der normierte Index der Hämolyse (NIH) nach folgender Beziehung bestimmt.

$$\text{NIH} = \frac{m_{\text{fHB}(t)} \cdot V \cdot \left(1 - \frac{\text{HCT}_{\text{mean}}}{100}\right)}{Q} \cdot 100$$

NIH = Normierter Index der Hämolyse [$\text{mg}\cdot\text{dl}^{-1}$]

$M_{\text{fHB}(t)}$ = Steigung von $\text{fHB}(t)$ [$\text{mg}\cdot(\text{dl}^{-1}\cdot\text{min})$]

V = Gesamtblutvolumen [ml]

HCT_{mean} = Durchschnitt des Hämatokrit der Messpunkte [%]

Q = Blutfluss [$\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$]

Tabelle 5 zeigt den normierten Index der Hämolyse (NIH) im rezirkulierten Vollblut für die effektiven Kochsalzkonzentrationen von $140 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ bis $240 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl bei drei *in vitro*-Hämodialyse-Versuchsreihen. Die Ergebnisse des ersten Rezirkulationsexperiment zeigten, dass der normierte Index der Hämolyse (NIH) proportional zur effektiven Kochsalzkonzentration anstieg und bei einer effektiven Kochsalzkonzentration von $160 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ im Toleranzbereich einer Hämodialysebehandlung von $6\text{-}13 \text{ mg}\cdot\text{dl}^{-1}$ lag. Bei *in vitro*-Hämodialysen mit einer verlängerten Rezirkulationszeit von 60 min pro Kochsalzkonzentration (**Abbildung 40 B**) wurden dagegen für die physiologische Rezirkulation ein NIH-Wert von $6,2 \text{ mg}\cdot\text{dl}^{-1}$ und bei effektiven Kochsalzkonzentrationen von $160 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl und $180 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl ein NIH-Wert von $11,3 \text{ mg}\cdot\text{dl}^{-1}$ und $8,6 \text{ mg}\cdot\text{dl}^{-1}$ berechnet (**Tabelle 5**).

Tabelle 5: Der normierte Index der Hämolyse (NIH) bei *in vitro*-Hämodialyse von humanem Vollblut: Hämodialyse mit stufenweise ansteigender Kochsalzkonzentration. Hämodialyse mit $c_{\text{eff.}}$ von $140 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $160 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ und $180 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl und einer Rezirkulation ohne Dialyse/Ultrafiltration mit $c_{\text{eff.}}$ von $160 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ und $180 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Effektive Kochsalz- konz [mmol·l ⁻¹]	NIH [mg·dl ⁻¹]	NIH [mg·dl ⁻¹]	NIH [mg·dl ⁻¹]
	140-240 mmol·l ⁻¹ NaCl	140-180 mmol·l ⁻¹ NaCl	140-180 mmol·l ⁻¹ NaCl, nur Rezirkulation
140	2,6	6,2	7,1
160	14,2	11,3	2,6
180	30,9	8,6	6,9
200	75,3	nicht bestimmt	nicht bestimmt
220	85,3	nicht bestimmt	nicht bestimmt
240	183,5	nicht bestimmt	nicht bestimmt

Die NIH-Werte dieser Versuchsreihe lagen damit im Normbereich für eine Dialysebehandlung von $6\text{-}13 \text{ mg}\cdot\text{dl}^{-1}$. Um den Einfluss der Dialyseleistung auf die Hämolyse zu untersuchen, wurde in einem weitergehenden Versuch Vollblut jeweils 30 min bei effektiven Kochsalzkonzentrationen von $160 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ und $180 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl ohne Dialyse und Ultrafiltration rezirkuliert, sodass das zugeführte Kochsalz nicht abgetrennt wurde. **Abbildung 40 C** zeigt die Abhängigkeit zwischen der freien Hämoglobinkonzentration und der steigenden Kochsalzkonzentration bei einer Kochsalzaddition von $160 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ und $180 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl ohne Dialyse und Ultrafiltration. Bei den Versuchen wurden NIH-Werte von $7,1 \text{ mg}\cdot\text{dl}^{-1}$, $2,6 \text{ mg}\cdot\text{dl}^{-1}$ und $6,9 \text{ mg}\cdot\text{dl}^{-1}$ berechnet. Die NIH-Werte für die Rezirkulation bei physiologischer Kochsalzkonzentration und nach $40 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl-Zufuhr lagen im Normbereich, der NIH-Wert nach $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl-Zufuhr war unterhalb des Normbereiches von $6\text{-}13 \text{ mg}\cdot\text{dl}^{-1}$.

Die normierten Indices der Hämolyse mit Dialyse und Ultrafiltration (**Abbildung 40 B**) und ohne Dialyse und ohne Ultrafiltration (**Abbildung 40 C**) zeigten bei erhöhter Ionenstärke deutliche Unterschiede in der Hämolyserate: Bei physiologischen Kochsalzbedingungen wurden NIH-Werte von $6,2 \text{ mg}\cdot\text{dl}^{-1}$ mit Dialyse- und Ultrafiltrationsleistung und $7,1 \text{ mg}\cdot\text{dl}^{-1}$ ohne Dialyse- und Ultrafiltrationsleistung bestimmt, die Unterschiede waren nicht signifikant. Dagegen wurden bei einer effektiven Kochsalzkonzentration von $160 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl und vorhandener Dialyse- und Ultrafiltrationsleistung ein NIH-Wert von $11,3$ berechnet, während der NIH-Wert bei der Rezirkulation ohne Dialyse- und Ultrafiltrationsleistung bei $2,6 \text{ mg}\cdot\text{dl}^{-1}$ lag. Bei einer effektiven Kochsalzkonzentration von $180 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl war der Unterschied mit

8,6 mg·dl⁻¹ mit Dialyse- und Ultrafiltration zu 6,9 mg·dl⁻¹ ohne Dialyse- und Ultrafiltration weniger deutlich. Die Dialyse- und/ oder Ultrafiltrationsleistung hatte somit einen zusätzlichen Einfluss zur erhöhten Hämolyserate bei der Kochsalzinfusion mit Dialyse und Ultrafiltration.

4.4 Entwicklung eines Dialyseverfahrens mit vermehrter Abtrennung proteingebundener Urämie-Toxine durch Einsatz hochfrequenter elektromagnetischer Felder

In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse der Versuchsreihen beschrieben, die zur Entwicklung eines Dialyseverfahrens mit vermehrter Abtrennung proteingebundener Urämie-Toxine durch Einsatz elektromagnetischer HF-Felder durchgeführt wurden.

4.4.1 Einfluss hochfrequenter elektromagnetischer Felder auf die Freisetzungsraten proteingebundener Urämie-Toxine aus der Proteinbindung

Es wurde der Einfluss hochfrequenter elektromagnetischer Felder auf die Assoziation von Plasmaproteinen und proteingebundenen Urämie-Toxinen untersucht. Dazu wurden Mini-Dialysemodule (**Abbildung 16**) entwickelt, mit deren Hilfe die Urämie-Toxine während des Einflusses eines elektromagnetischen Feldes abgetrennt werden konnten. In Anwesenheit eines elektromagnetischen Feldes wurde mit Hilfe einer Spritze eine Albuminlösung, die mit Phenyllessigsäure, Indoxylsulfat und p-Kresylsulfat versetzt wurde, dialysiert. Urämie-Toxine der ungebundenen Fraktion wurden dabei durch die Dialysefasern des Mini-Dialysemoduls hindurch in das Dialysat befördert. Die Dialysatkonzentration von p-Hydroxyhippursäure, Phenyllessigsäure und Indoxylsulfat wurde mittels Ionenpaar-Reversed-Phase-Chromatographie (**Abschnitt 3.3.1**) anhand der Peakflächen und der Wiederfindungsrate des internen Standards 2,6-Dimethylphenol bestimmt. **Abbildung 41** zeigt die Urämie-Toxin-Konzentrationen im Dialysat in den Proben in Abwesenheit eines hochfrequenten Feldes und in Anwesenheit eines hochfrequenten Feldes von 1 bis 20 MHz.

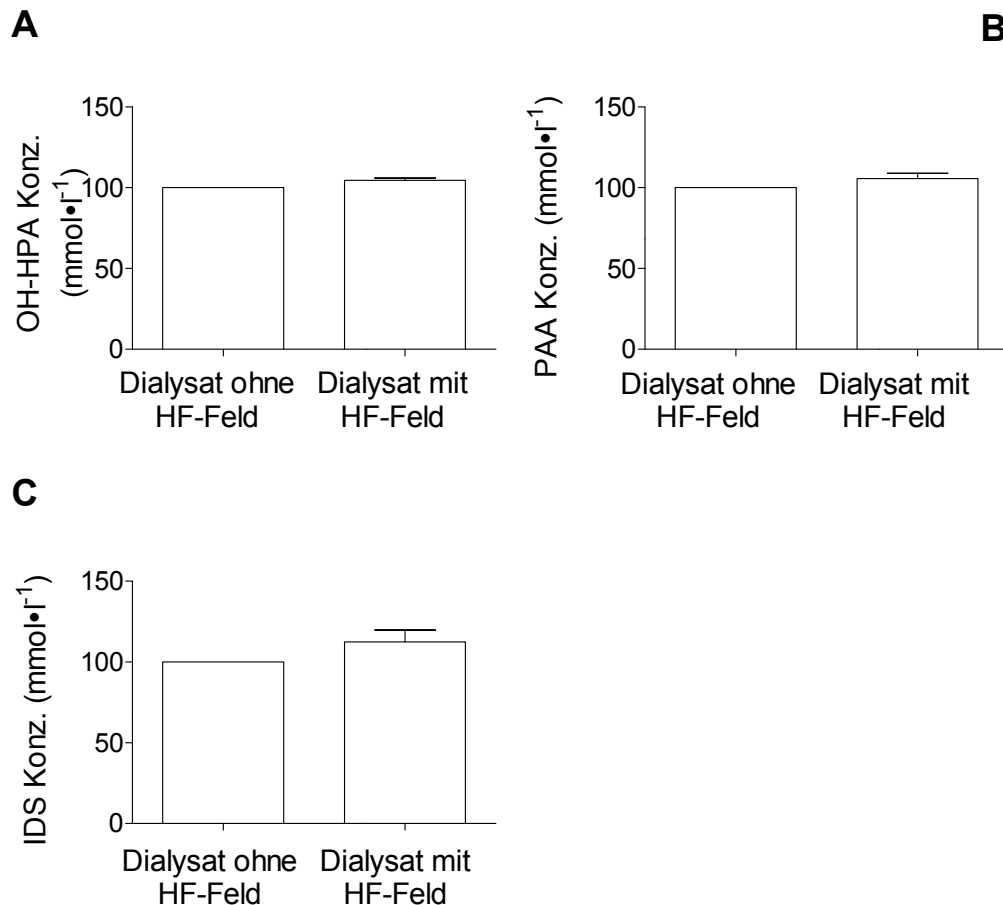


Abbildung 41: Vergleich der Konzentrationen im Dialysat in Ab- und Anwesenheit eines hochfrequenten elektromagnetischen Feldes: **(A)** p-Hydroxyhippursäure (OH-HPA), **(B)** Phenyllessigsäure (PAA) und **(C)** Indoxylsulfat (IDS), (N = 6, unterschiedliche Dialysemodule). Das elektromagnetische HF-Feld wurde von 1 bis 20 MHz innerhalb von 10 min inkrementiert.

In Anwesenheit eines elektromagnetischen HF-Feldes waren die Dialysatkonzentrationen von p-Hydroxyhippursäure, Phenyllessigsäure und Indoxylsulfat größer als in Abwesenheit des HF-Feldes.

4.4.2 Entwicklung eines Testsystems zur Identifizierung elektromagnetischer HF-Feldfrequenzen auf die Abtrennrage proteingebundener Urämie-Toxine

Es wurde ein Testsystem entwickelt, um den Einfluss elektromagnetischer HF-Feldfrequenzen auf die dialytische Abtrennung proteingebundener Urämie-Toxine eingehender zu untersuchen und so das Verfahren für die Therapie chronisch-niereninsuffizienter Patienten zugänglich zu machen. Mit Hilfe des Testsystems konnten automatisiert Versuchsrei-

hen durchgeführt werden und Parameter variiert werden, um Bedingungen zu bestimmen, die durch eine verbesserte Abtrennung proteingebundener Urämie-Toxine in Anwesenheit elektromagnetischer HF-Felder charakterisiert waren. **Abbildung 42** zeigt die Benutzeroberfläche des Steuerungsprogramms zur Durchführung von Versuchsreihen unter Verwendung des Testsystems.

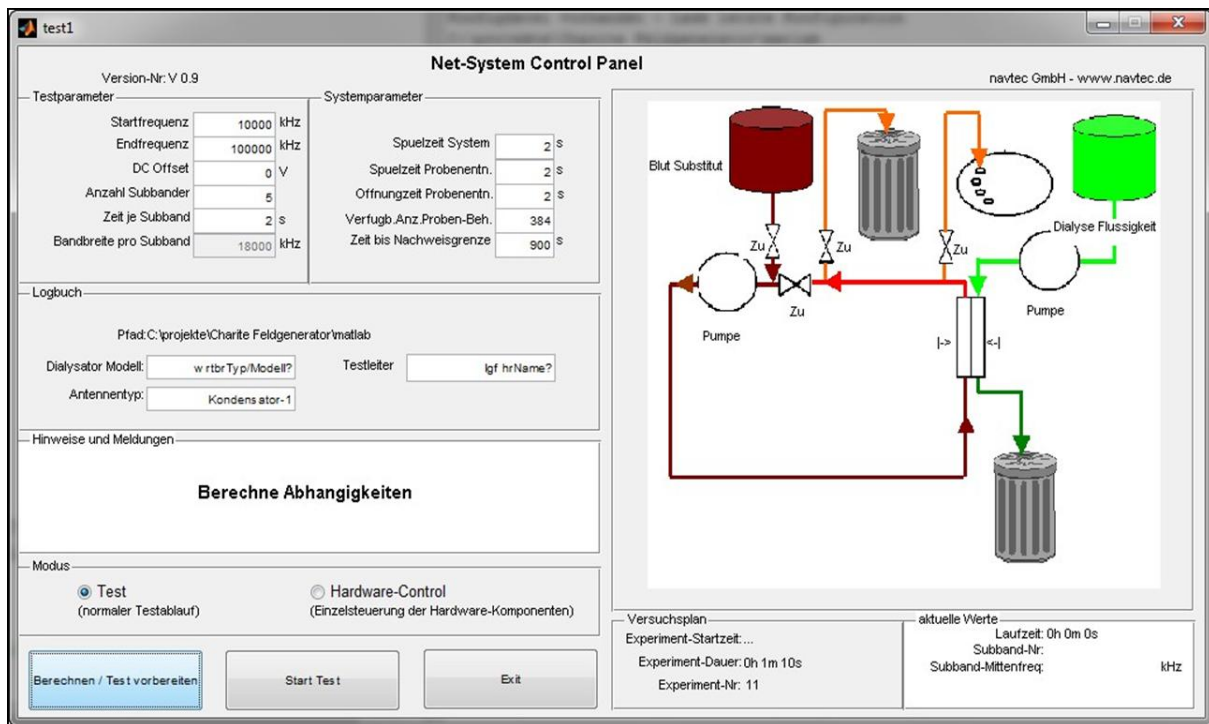


Abbildung 42: Darstellung der Benutzeroberfläche des Steuerungsprogramms zur computergestützten Durchführung von Versuchsreihen, die zur Identifizierung von elektromagnetischen Feldern dienen.

Abbildung 43 zeigt den Aufbau des Testsystems zur automatisierten Identifizierung elektromagnetischer Feldfrequenzen, die einen Effekt auf die Abtrennung proteingebundener Urämie-Toxine haben.



Abbildung 43: Fotografische Darstellung des entwickelten Testsystems. (1) Eine Albuminlösung wird durch (2) eine Schlauchpumpe und (3) ein Ventilsystem über ein Schlauchsystem in (4) das Abschirmgehäuse mit darin befindlichem Hämodialysator gefördert. (5) Ein HF-Signalgenerator erzeugt die elektrischen oder magnetischen HF-Felder. Die Albuminproben werden mittels (6) Fraktionssammler aufbewahrt. (7) Ein Computer dient zur Steuerung des Systems

Da elektromagnetische Felder in elektrische und magnetische Feldkomponenten unterteilt sind, wurden für die Entwicklung des Testsystems zwei technische Aufbauten realisiert: Konventionelle Hämodialysatoren konnten zwischen zwei parallele Kondensatorplatten in ein homogenes elektrisches HF-Feld gebracht werden, um den Effekt elektrischer HF-Felder auf die Proteinbindung proteingebundener Urämie-Toxine zu untersuchen. Andererseits konnten spulenumwickelte konventionelle Hämodialysatoren verwendet werden, durch deren Longitudinal-Ebene ein homogenes magnetisches HF-Feld vorlag, um den Einfluss magnetischer HF-Felder auf die Proteinbindung proteingebundener Urämie-Toxine zu untersuchen. **Abbildung 44** zeigt einen konventionellen Hämodialysator zwischen den Kondensatorplatten in der Versuchsanordnung zur Untersuchung elektrischer HF-Felder und einen spulenumwickelten Hämodialysator zur Untersuchung magnetischer HF-Felder.

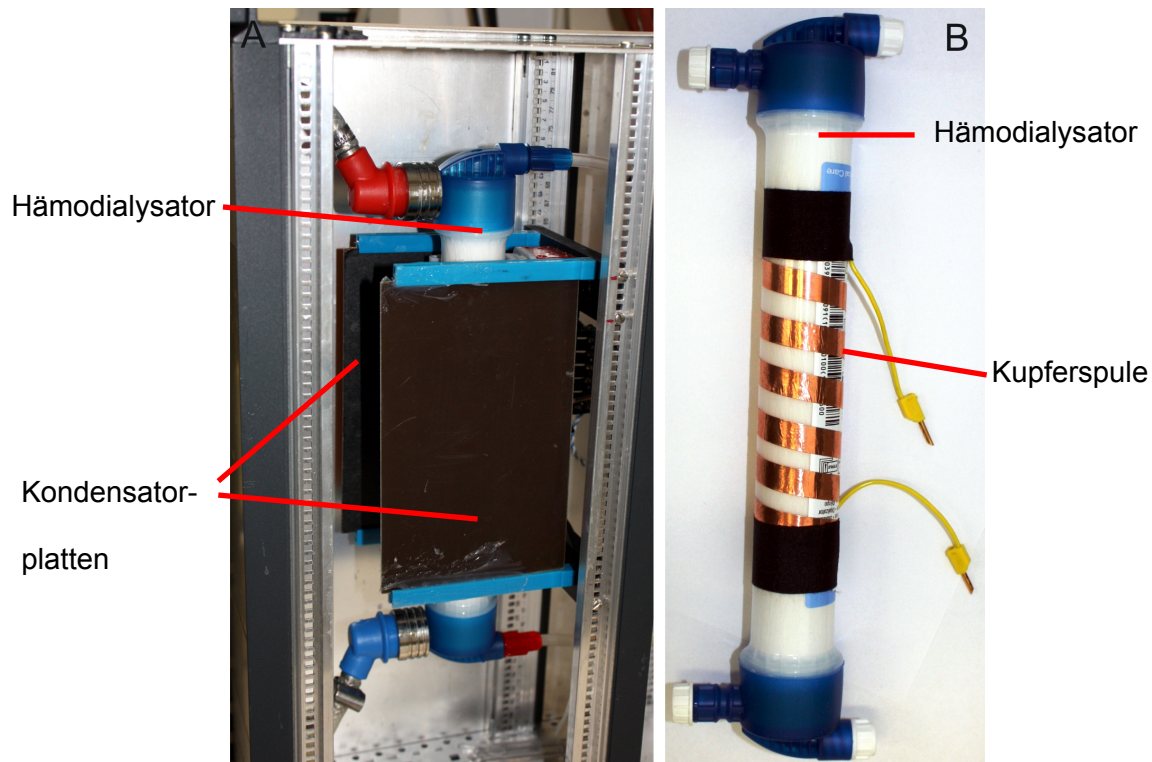


Abbildung 44: Fotografische Darstellung eines konventionellen Hämodialysators, (A) zwischen zwei Kondensatorplatten zur Untersuchung elektrischer HF-Felder und (B) mit Kupferdraht als einer Spule umwickelt zur Untersuchung magnetischer HF-Felder.

4.4.3 Abtrennung proteingebundener Urämie-Toxine aus humanem Plasma in Anwesenheit elektrischer HF-Felder

Es wurden *in vitro*-Dialyse-Versuchsreihen durchgeführt, um die Abtrennung proteingebundener Urämie-Toxine in Ab- und Anwesenheit elektrischer HF-Felder während der Dialyse von humanem Plasma zu untersuchen. Humanes Plasma wurde in einer Versuchsreihe mit einem Rezirkulationsfluss von $200 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, einem Dialysatfluss von $300 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ und einer Spülzeit von 60 s und einer Rezirkulationszeit von 60 s dialysiert. Die Plasmaproben wurden wie in **Abschnitt 3.4.3** beschrieben aufgearbeitet, wobei die Konzentrationen von Phenyllessigsäure und Indoxylsulfat chromatographisch bestimmt wurden. **Abbildung 45** zeigt die Plasmakonzentrationen von Phenyllessigsäure und Indoxylsulfat nach dem Spülvorgang des Testsystems und einer *in vitro*-Dialyse mit 60 s Rezirkulationszeit in Ab- und Anwesenheit eines elektrischen HF-Feldes. Während des Spülvorgangs des Systems ohne Rezirkulation der Proteinlösung wurde die Plasmakonzentration von Phenyllessigsäure und Indoxylsulfat um $66,4 \% \pm 1,4 \%$ und $24,8 \% \pm 5,3 \%$ reduziert. In Abwesenheit eines HF-Feldes betrug die Abtrennung von Phenyllessigsäure und Indoxylsulfat $79,4 \% \pm 0,1 \%$ und $35,2,8 \% \pm 2,7 \%$. Dagegen war die Abtrennung von Phenyllessigsäure und Indoxylsulfat in Anwesenheit

eines elektrischen HF-Feldes $80,4 \% \pm 1,0 \%$ und $38,1 \% \pm 4,0 \%$. Aufgrund der starken Abtrennung während des Spülvorgangs wurde für weitere Versuchsreihen die Bypassapparatur verwendet.

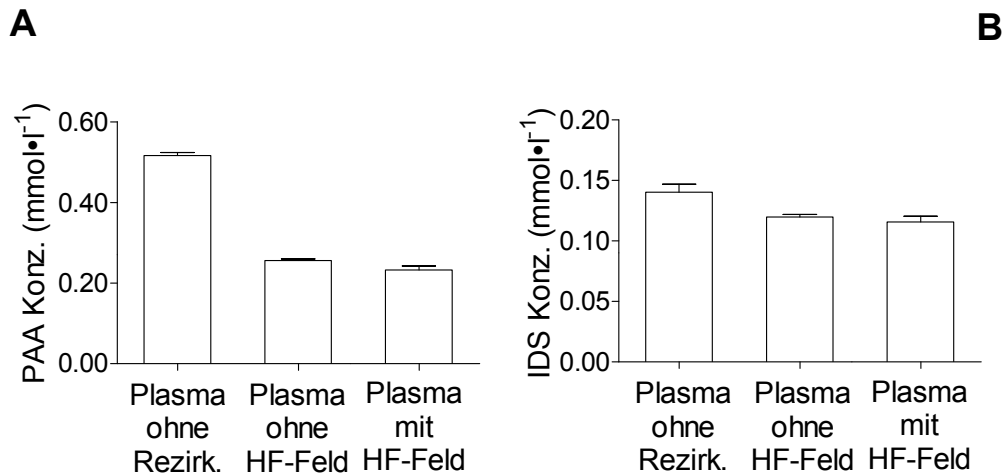


Abbildung 45: Darstellung der Urämie-Toxin-Konzentrationen von humanem Plasma nach *in vitro*-Dialysen in Ab- und Anwesenheit eines elektrischen HF-Feldes von 1-170 MHz. **(A)** Phenyllessigsäure, **(B)** Indoxylsulfat. Die Konzentrationen sind als Mittelwert \pm Standardfehler SEM in $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ dargestellt, N = 3.

4.4.4 Abtrennung proteingebundener Urämie-Toxine aus einer Albuminlösung in Anwesenheit elektrischer und magnetischer HF-Felder

Um den Einfluss hochfrequenter magnetischer Felder auf die Abtrennung proteingebundener Urämie-Toxine während der Dialyse zu untersuchen, wurden *in vitro*-Dialyse-Versuchsreihen durchgeführt. Eingehend wurde der Einfluss des elektromagnetischen HF-Feldes auf die Abtrennung der proteingebundenen Urämie-Toxine Phenyllessigsäure, Indoxylsulfat und p-Kresylsulfat untersucht, indem die Albuminlösung in Anwesenheit eines hochfrequenten magnetischen Feldes von 1-25 MHz dialysiert wurde. Die Proben wurden wie in **Abschnitt 3.4.3** beschrieben aufgearbeitet und die Konzentrationen von Phenyllessigsäure, Indoxylsulfat und p-Kresylsulfat chromatographisch bestimmt. In **Abbildung 46** sind die Konzentrationen der drei Urämie-Toxine einer Versuchsreihe mit einem Zirkulationsfluss von $200 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, einem Dialysatfluss von $50 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ und einer Spülzeit von 60 s und einer Rezirkulationszeit von 120 s dargestellt.

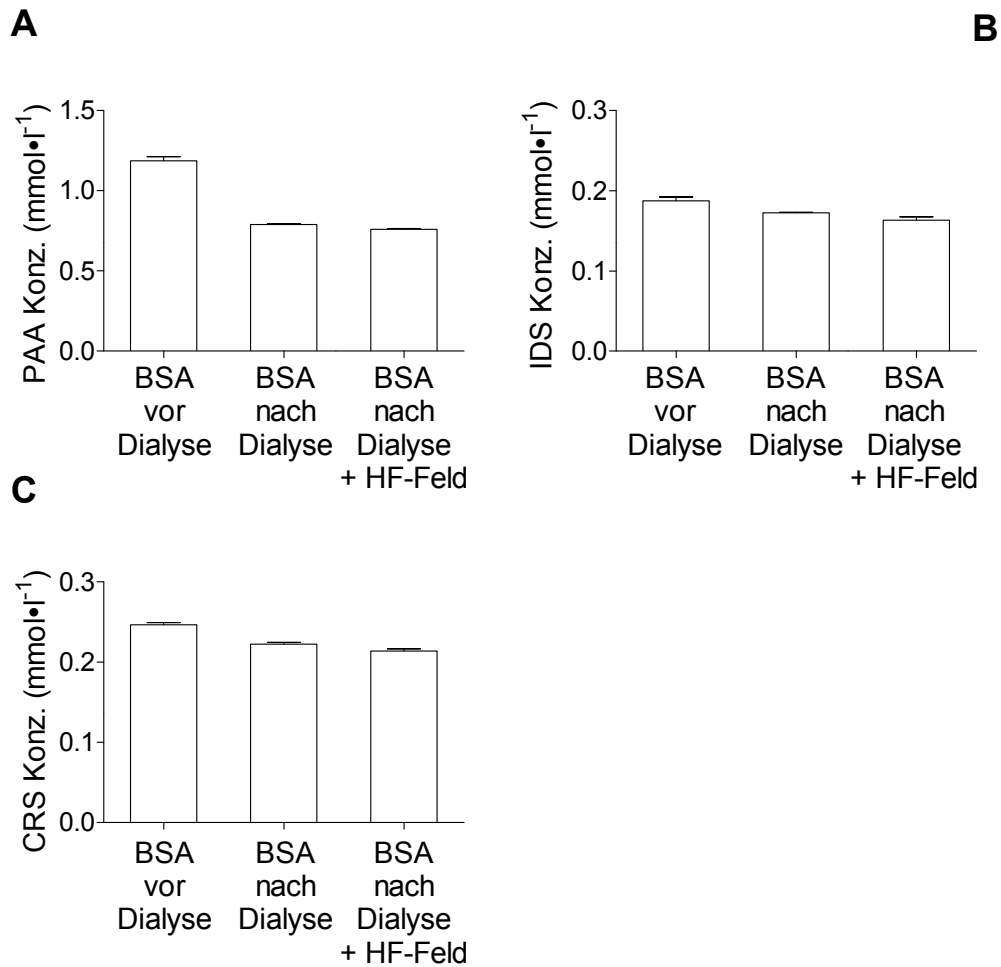


Abbildung 46: Darstellung der Urämie-Toxin-Konzentrationen einer Albuminlösung (BSA) vor und nach *in vitro*-Dialysen in Ab- und Anwesenheit eines magnetischen HF-Feldes von 1-25 MHz. **(A)** Phenyllessigsäure (PAA), **(B)** Indoxylsulfat (IDS) und **(C)** p-Kresylsulfat (CRS). Die Konzentrationen sind als Mittelwert \pm Standardfehler SEM in $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ dargestellt, $N = 3$.

Die Konzentrationen von Phenyllessigsäure, Indoxylsulfat und p-Kresylsulfat nach der Dialyse waren in Abwesenheit eines magnetischen HF-Feldes höher als in Anwesenheit eines magnetischen HF-Feldes. In Abwesenheit eines magnetischen HF-Feldes wurde Phenyllessigsäure, Indoxylsulfat und p-Kresylsulfat zu $33,4 \% \pm 2,2 \%$, $7,9 \% \pm 2,5 \%$ und $9,8 \% \pm 1,4 \%$ abgetrennt, in Anwesenheit eines magnetischen HF-Feldes hingegen zu $36,0 \% \pm 2,3 \%$, $12,9 \% \pm 3,4 \%$ und $13,3 \% \pm 1,6 \%$.

4.4.5 Einfluss hochfrequenter elektrischer Feldfrequenzen auf die Enzymaktivität ausgewählter Plasmaproteine

Der Einfluss eines hochfrequenten elektrischen Feldes auf die enzymatische Aktivität wurde untersucht, indem Versuchsreihen mit den Enzymen Laktatdehydrogenase, Superoxiddismutase und alkalische Phosphatase durchgeführt wurden. Die Enzyme wurden für 30 s und für 5 min einem elektrischen HF-Feld von 1-170 MHz ausgesetzt und die relativen Enzymaktivitäten mittels colorimetrischer Analyse bestimmt. Als Referenz wurde die Aktivität einer Enzymlösung mit $10 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$ verwendet. **Abbildung 47** zeigt die relativen Enzymaktivitäten (**A**) der Laktatdehydrogenase, (**B**) der Superoxiddismutase und (**C**) der alkalischen Phosphatase dieser Versuchsreihe. Zwischen den Proteinproben, die in Ab- und Anwesenheit des elektrischen HF-Feldes inkubiert wurden, traten keine signifikanten Unterschiede auf. Diese Ergebnisse zeigten, dass das verwendete hochfrequente elektrische Feld keinen Effekt auf die Funktion der enzymatischen Aktivität von Plasmaproteinen ausübte.

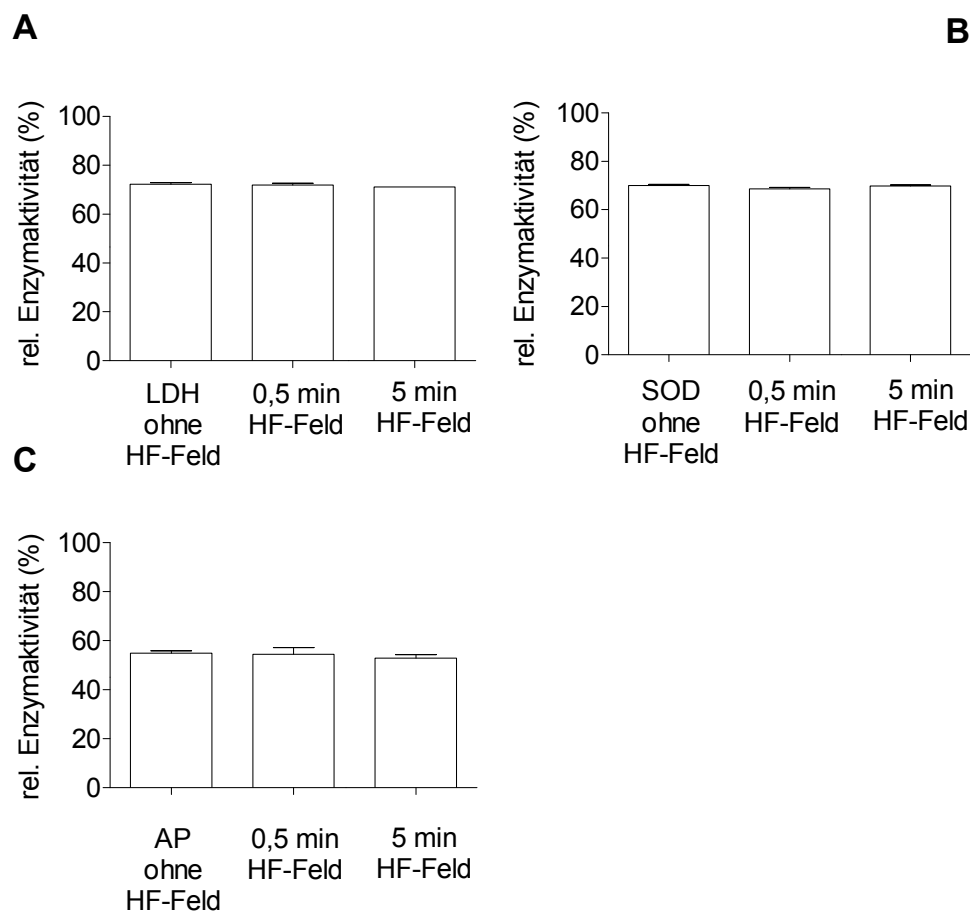


Abbildung 47: Vergleich der Enzymaktivitäten (**A**) der Laktatdehydrogenase, (**B**) der Superoxiddismutase und (**C**) der alkalischen Phosphatase in Abwesenheit und einer 0,5-minütigen und 5-minütigen Anwesenheit eines elektrischen HF-Feldes. Die relativen Enzymaktivitäten sind als Durchschnittswert \pm Standardfehler SEM dargestellt, ($N = 3$).

4.4.6 Einfluss hochfrequenter elektrischer Feldfrequenzen auf die dreidimensionale Struktur von rezirkuliertem Albumin

Um die Ergebnisse der vorangegangenen Versuchsreihen dieses Teilprojektes zu bestätigen wurde der Einfluss elektromagnetischer HF-Felder auf die Strukturintegrität von Proteinen untersucht.

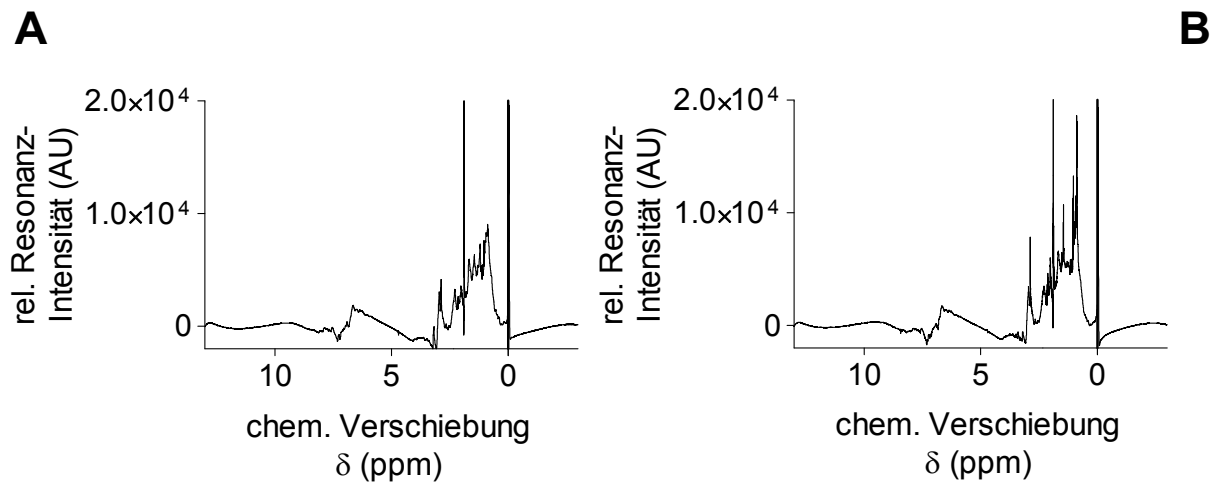


Abbildung 48: ¹H-NMR-Spektren von Albumin (BSA). (A) ein ¹H-NMR-Spektrum nach einer 15 min Rezirkulation in Abwesenheit eines elektrischen HF-Feldes, (B) nach einer Rezirkulation in Anwesenheit eines elektrischen HF-Feldes von 1-170 MHz.

Zwischen den ¹H-NMR-Spektren der Albuminlösung, die in Ab- und Anwesenheit eines elektrischen HF-Feldes rezirkuliert wurden, waren keine messbaren Unterschiede vorhanden (

Abbildung 48). Die Albuminlösung wurde nicht durch die verwendeten elektrischen HF-Felder verändert.

4.5 Entwicklung, Validierung und Etablierung eines adsorptiven Verfahren in der extrakorporalen Nierenersatztherapie

Die Ergebnisse der Versuchsreihen, die zur Entwicklung, Validierung und Etablierung eines adsorptiven Verfahrens in der extrakorporalen Nierenersatztherapie durchgeführt wurden, sind in den folgenden Abschnitten dargestellt.

4.5.1 Adsorptionseigenschaften der Adsorber-Resine des FPAD-Verfahrens

Um die Eignung der Adsorber des FPAD-Verfahren in der Nierenersatztherapie zu charakterisieren, wurden in initialen Versuchsreihen die Adsorptionseigenschaften des hydrophoben Neutral-Adsorbers und des Anionenaustauschers des FPAD-Verfahrens für die proteingebundenen Urämie-Toxine Phenyllessigsäure, Indoxylsulfat und p-Kresylsulfat bestimmt. Die Urämie-Toxine wurden einzeln und in Gemischen, sowohl in physiologischer Kochsalzlösung als auch in einer Albuminlösung gelöst, mit den Adsorber-Resinen eine Stunde bei 37° C inkubiert. Die desorbierte Urämie-Toxinmenge wurde mittels Ionenpaar-Reversed-Phase-Chromatographie bestimmt. Repräsentative Chromatogramme der Quantifizierung mittels Ionenpaar-Reversed-Phase-Chromatographie der desorbierten Urämie-Toxine Phenyllessigsäure, Indoxylsulfat und p-Kresylsulfat in Mischung in physiologischer Kochsalzlösung sind in **Abbildung 49** gezeigt. **(A)** zeigt die chromatographische Aufreinigung von Phenyllessigsäure, Indoxylsulfat und p-Kresylsulfat vor Inkubation mit den Adsorbern. **(B)** zeigt die chromatographische Aufreinigung von Phenyllessigsäure, Indoxylsulfat und p-Kresylsulfat nach Inkubation mit dem hydrophoben Neutral-Adsorber und **(C)** zeigt die chromatographische Aufreinigung von Phenyllessigsäure, Indoxylsulfat und p-Kresylsulfat nach Inkubation mit dem Anionenaustauscher.

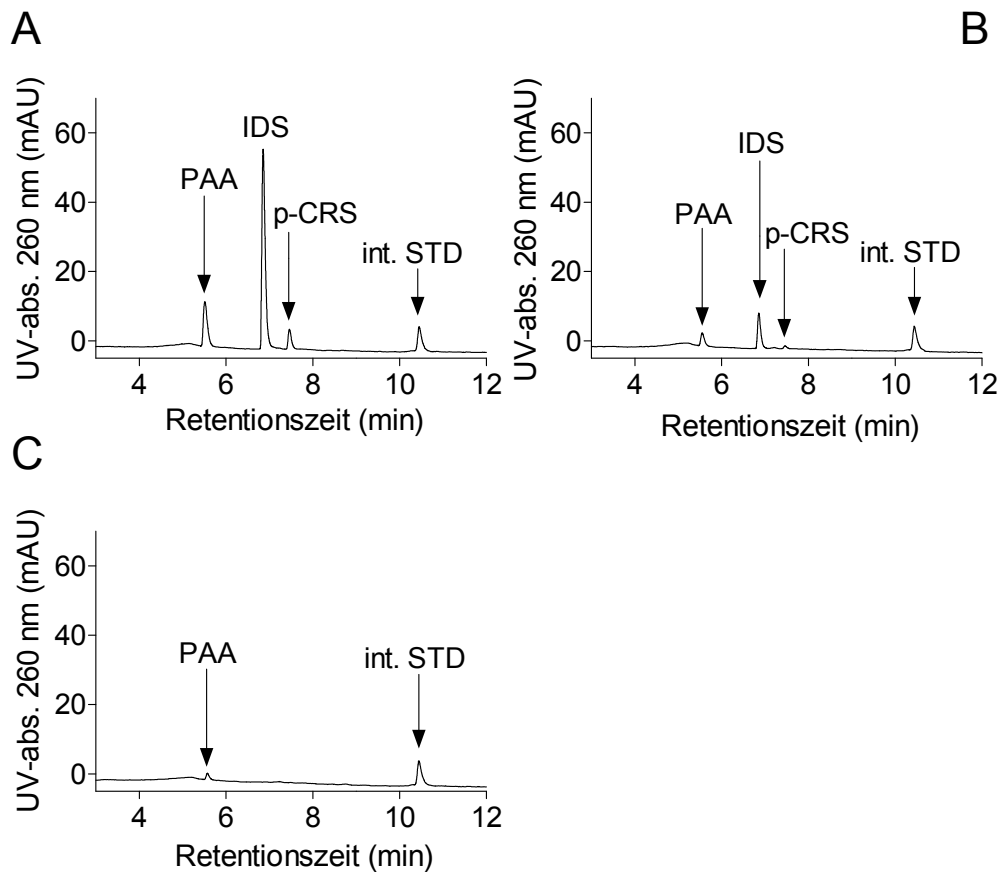


Abbildung 49: Reversed-Phase-chromatographische Darstellung der desorbierten Urämie-Toxinmenge von Phenylelessigsäure, Indoxylsulfat und p-Kresylsulfat der Versuchsreihe mit drei Urämie-Toxinen im Gemisch in physiologischer Kochsalzlösung. **(A)** vor der Inkubation mit den Adsorbentien, **(B)** nach Inkubation mit dem hydrophoben Neutral-Adsorber-Resin und **(C)** mit dem Anionenaustauscher-Resin.

Nach Inkubation der Urämie-Toxine in physiologischer Kochsalzlösung mit den Adsorber-Resinen wurden die Urämie-Toxin-Konzentrationen in den Proben deutlich reduziert. In **Abbildung 50** sind die Urämie-Toxin-Konzentrationen in der physiologischen Kochsalzlösung (PBS) vor und nach der Inkubation mit dem hydrophoben Neutral-Adsorber und dem Anionenaustauscher dargestellt: In **Abbildung 50 A** und **B** sind die Konzentrationen von Phenylelessigsäure im einzelnen Ansatz und im gemischten Ansatz dargestellt. Analog sind in **Abbildung 50 C** und **D** die Konzentrationen von Indoxylsulfat und in **Abbildung 50 E** und **F** die Konzentrationen von p-Kresylsulfat dargestellt.

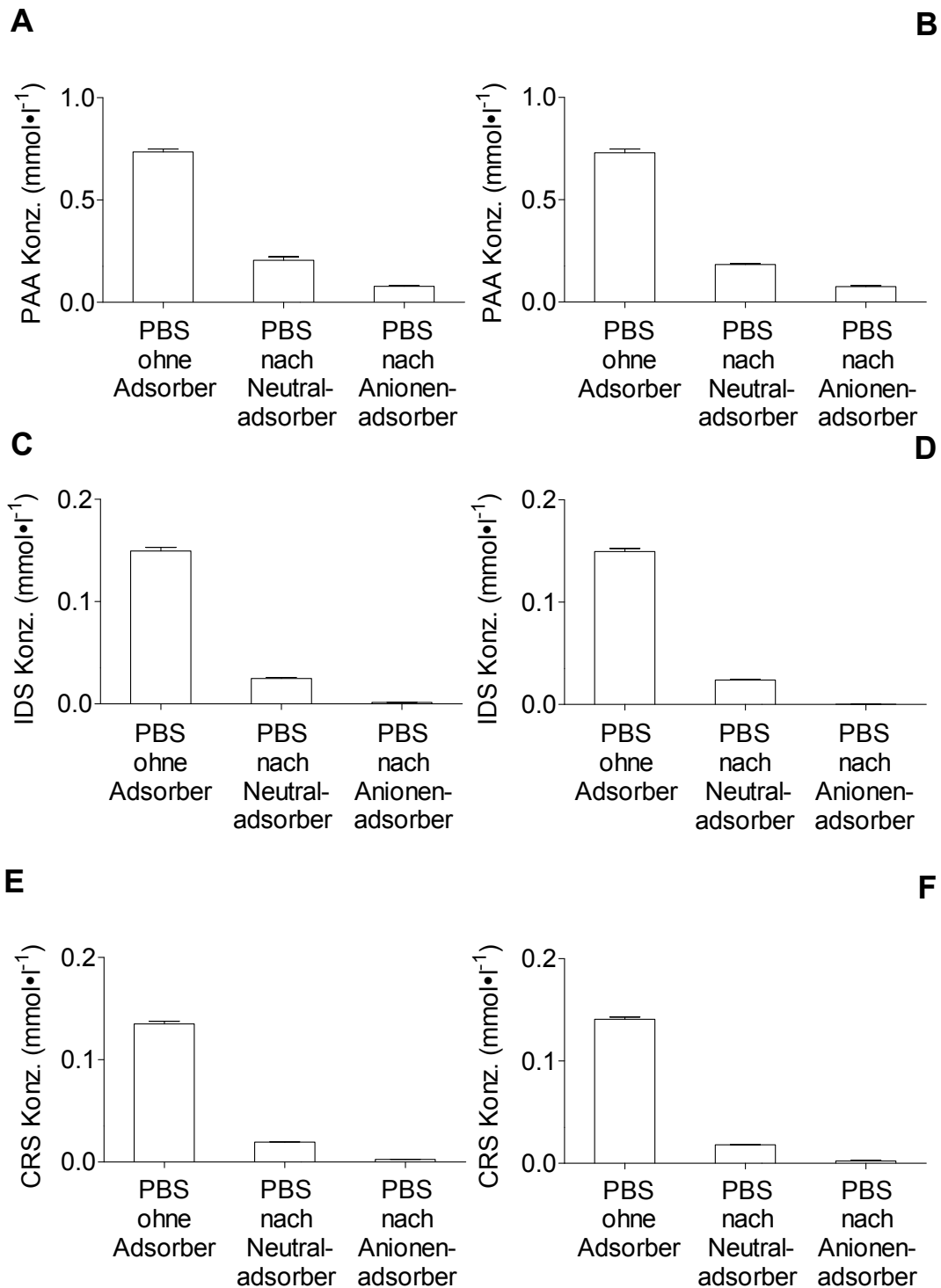


Abbildung 50: Konzentrationen von Phenyllessigsäure (PAA), Indoxylsulfat (IDS) und p-Kresylsulfat (CRS) in physiologischer Kochsalzlösung (PBS) vor und nach Inkubation mit dem hydrophoben Neutral-Adsorber-Resin und dem Anionenadsorber-Resin. Dargestellt sind (A) und (B) die Konzentrationen von Phenyllessigsäure einzeln und im gemischten Ansatz, (C) und (D) die Konzentrationen von Indoxylsulfat einzeln und im gemischten Ansatz und (E) und (F) die Konzentrationen von p-Kresylsulfat einzeln und im gemischten Ansatz. Darstellung als Mittelwerte \pm Standardfehler SEM, N = 3.

Der Anionenaustauscher hatte stärkere Adsorptionseigenschaften für die analysierten Urämie-Toxine als der hydrophobe Neutral-Adsorber. Unter Verwendung des hydrophoben Neutral-Adsorbers wurde Phenyllessigsäure zu $72,0 \pm 3,3$ % und zu $74,8 \pm 3,0$ % im Gemisch mit den anderen beiden Urämie-Toxinen adsorbiert. Die Adsorption unter Verwendung des Anionenaustauschers wurde mit $89,3 \pm 2,7$ % und $89,6 \pm 3,3$ % bestimmt. Indoxylsulfat wurde unter Verwendung des Neutral-Adsorbers zu $83,4 \pm 3,3$ % und zu $84,0 \pm 2,7$ % im Gemisch und unter Verwendung des Anionenaustauschers zu $99,1 \pm 3,5$ % und zu $99,9 \pm 2,9$ % adsorbiert. p-Kresylsulfat wurde unter Verwendung des hydrophoben Neutral-Adsorbers zu $85,9 \pm 2,6$ % und zu $87,1 \pm 2,2$ % im Gemisch und unter Verwendung des Anionenaustauschers um $98,1 \pm 2,7$ % und um $98,3 \pm 2,4$ % adsorbiert. Beide Adsorber wiesen starke Adsorptionseigenschaften für die untersuchten Urämie-Toxine auf, wobei sich der Anionenaustauscher durch 10 % bis 15 % bessere Adsorptionseigenschaften als der hydrophobe Neutral-Adsorber charakterisieren ließ. In weiteren Versuchsreihen wurden die Adsorptionseigenschaften der Adsorber in Anwesenheit von Proteinen untersucht, da diese als Bindungspartner der Urämie-Toxine mit den Adsorbern um die Bindung der Urämie-Toxine konkurrieren. **Abbildung 51** zeigt die Konzentrationen (**A**) von Phenyllessigsäure einzeln in einer Albuminlösung und (**B**) im Gemisch mit den beiden anderen Urämie-Toxinen, sowie analog dazu die Konzentrationen in (**C** und **D**) von Indoxylsulfat und in (**E** und **F**) p-Kresylsulfat vor und nach der Inkubation mit dem beiden Adsorbern.

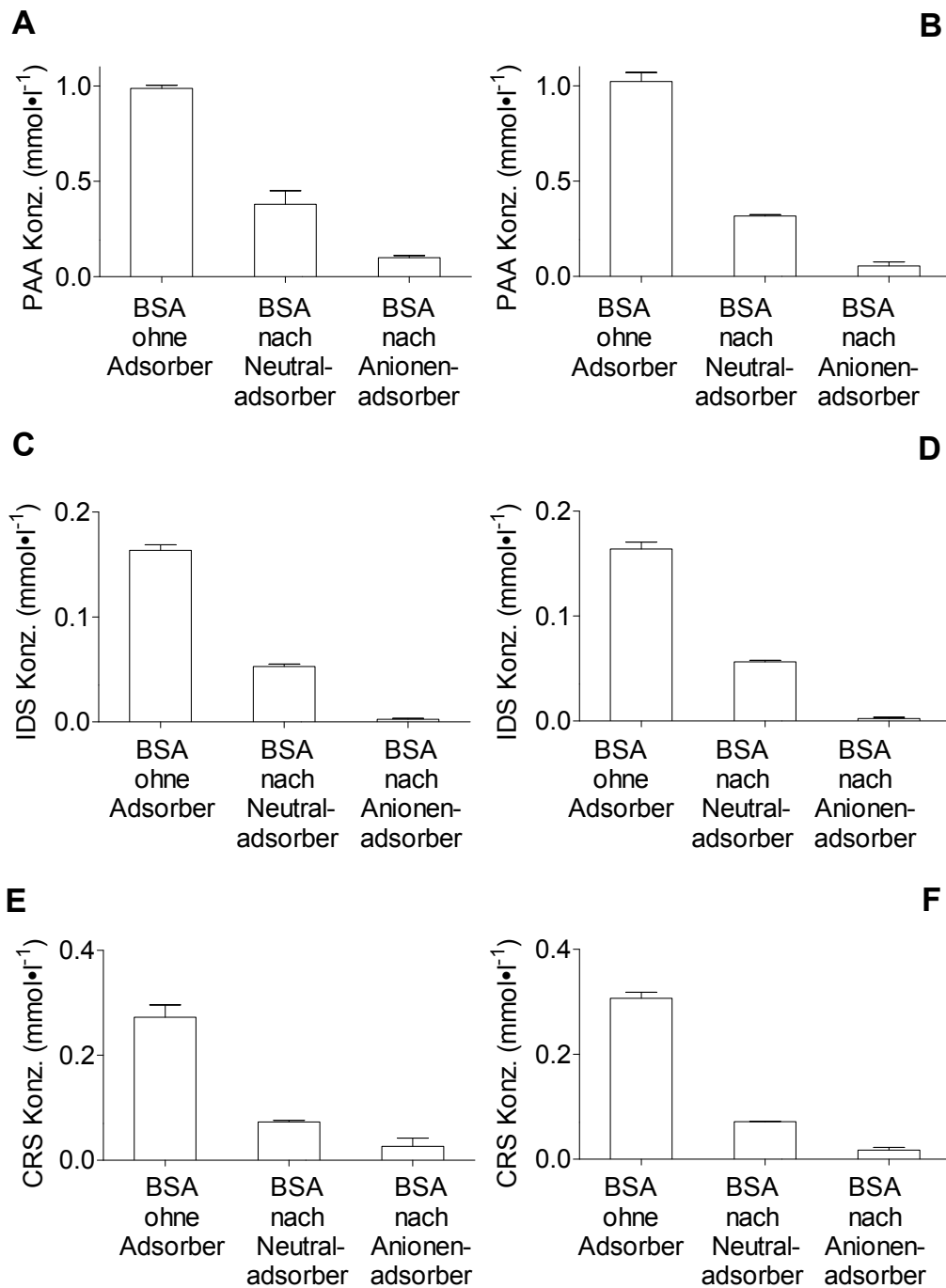


Abbildung 51: Konzentrationen von Phenyllessigsäure (PAA), Indoxylsulfat (IDS) und p-Kresylsulfat (CRS) in einer Albuminlösung (BSA) vor Inkubation und nach Inkubation mit dem hydrophoben Neutral-Adsorber-Resin (Ads. 1) und dem Anionenaustauscher-Resin (Ads. 2). (A und B) sind die Konzentrationen von Phenyllessigsäure einzeln und im gemischten Ansatz, in (C und D) von Indoxylsulfat einzeln und im gemischten Ansatz dargestellt und in E und F von p-Kresylsulfat einzeln und im gemischten Ansatz dargestellt. Darstellung als Mittelwerte \pm Standardfehler SEM, (N = 3).

Auch in Anwesenheit von Albumin hatte der Anionenaustauscher stärkere Adsorptionseigenschaften für die ausgewählten Urämie-Toxine als der hydrophobe Neutral-Adsorber. In Anwesenheit von $60 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ Albumin wurde Phenyllessigsäure durch den hydrophoben Neutral-Adsorber zu $61,6 \pm 7,5 \%$ und im Gemisch mit den anderen beiden Urämie-Toxinen zu $69,0 \pm 5,7 \%$ adsorbiert. Der Anionenaustauscher adsorbierte Phenyllessigsäure zu $89,9 \pm 2,6 \%$ und zu $94,6 \pm 6,8 \%$ im Gemisch. Indoxylsulfat wurde unter Verwendung des Neutral-Adsorbers zu $67,6 \pm 4,3 \%$ und zu $65,6 \pm 5,0 \%$ im Gemisch adsorbiert. Der Anionenaustauscher adsorbierte Indoxylsulfat zu $98,4 \pm 4,7 \%$ und zu $98,6 \pm 5,9 \%$ im Gemisch. p-Kresylsulfat wurde unter Verwendung des hydrophoben Neutral-Adsorber zu $73,3 \pm 10,8 \%$ und zu $76,6 \pm 4,8 \%$ im Gemisch und unter Verwendung des Anionenaustauschers zu $90,3 \pm 13,0 \%$ und im Gemisch zu $94,3 \pm 5,4 \%$ adsorbiert. Der hydrophobe Neutral-Adsorber und der Anionenaustauscher wiesen in Anwesenheit der Albuminlösung ebenfalls starke Adsorptionseigenschaften auf, wobei der Anionenaustauscher 15 % bis 30 % stärkere Adsorptionseigenschaften als der hydrophobe Neutral-Adsorber hatte.

4.5.2 Etablierung eines adsorptiven Verfahren zur extrakorporalen Nierenersatztherapie im Rahmen einer klinischen Studie

Im Rahmen einer klinischen Studie (**Abschnitt 3.5.3**) wurden klinische und biochemische Parameter im Plasma chronisch-niereninsuffizienter Patienten bestimmt. **Tabelle 6** zeigt die klinischen und biochemischen Eigenschaften der CKD-Patienten der Studie, die initial vor der ersten Behandlung bestimmt wurden. Es bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Patientengruppen ($p > 0,05$). 3 von 5 Patienten der FPAD-Gruppe berichteten über Nausea und Unwohlsein, die 2 h nach Beginn der Behandlung auftraten. Klinisch relevante Parameter wie Blutdruck, Puls, Elektrolytkonzentration und der pH-Wert des Blutes waren über den gesamten Behandlungszeitraum unauffällig. Bei den Patienten der Hämodialyse-Gruppe, die konventionell mittels Hämodialyse behandelt wurden, gab es kein Auftreten von Unwohlsein und Nausea.

Tabelle 6: Klinische und biochemische Charakteristika der Studienteilnehmer, Initialwerte, dargestellt als Durchschnittswerte \pm Standardfehler SEM, N = 5.

Parameter	FPAD Gruppe	Dialyse Gruppe	Signifikanz
Alter [a]	68 \pm 3	63 \pm 7	n.s.
Geschlecht [m / w]	2 / 3	4 / 1	n.s.
Body-mass-index [kg \cdot m ⁻²]	28 \pm 5	25 \pm 1	n.s.
Dialysejahre [a]	2,4 \pm 0,7	1,8 \pm 0,4	n.s.
Blutdruck [mm Hg] systolisch/ diastolisch	134 \pm 7/ 60 \pm 3	122 \pm 15/ 68 \pm 6	n.s.
Kreatinin [mg \cdot dl ⁻¹]	6,5 \pm 0,7	8,5 \pm 0,9	n.s.
Harnstoff [mg \cdot dl ⁻¹]	125 \pm 29	154 \pm 17	n.s.
Phosphat [mmol \cdot l ⁻¹]	1,6 \pm 0,2	1,8 \pm 0,2	n.s.
Hämoglobin [g \cdot dl ⁻¹]	11,4 \pm 0,6	11,2 \pm 0,5	n.s.
Hämatokrit [l \cdot l ⁻¹]	0,37 \pm 0,02	0,34 \pm 0,02	n.s.
Gesamtprotein [g \cdot dl ⁻¹]	6,5 \pm 0,4	7,0 \pm 0,3	n.s.
Trijodthyronin [μ g \cdot l ⁻¹]	0,8 \pm 0,05	0,7 \pm 0,1	n.s.
Thyroxin [μ g \cdot dl ⁻¹]	5,6 \pm 0,5	6,5 \pm 0,5	n.s.
Kortisol [nmol \cdot l ⁻¹]	398 \pm 50	398 \pm 73	n.s.

Entsprechend des Studiendesigns (**Abschnitt 3.5.3**) wurden während der FPAD-Behandlungen und der Hämodialysen Blut- und Plasmaproben aus dem extrakorporalen Kreislauf entnommen und aufgereinigt. Die Plasmakonzentrationen von Phenyllessigsäure, Indoxylsulfat und p-Kresylsulfat der deproteinierten Proben wurden mittels Ionenpaar-Reversed-Phase-Chromatographie bestimmt. Nach Bestimmung der Retentionszeiten von Phenyllessigsäure, Indoxylsulfat und p-Kresylsulfat in physiologischer Kochsalzlösung wurden die Urämie-Toxine in den Proben durch Vergleich der Retentionszeiten identifiziert. Zusätzlich wurde zu den Proben in separaten Fraktionierungen die drei Analyten mit jeweils 0,2 μ g pro Substanz hinzugefügt und die Identität von Phenyllessigsäure, Indoxylsulfat und p-Kresylsulfat in deproteinierten Plasma chronisch-niereninsuffizienter Patienten bestätigt und die Konzentration bestimmt. In **Abbildung 52** sind vier repräsentative Chromatogramme dargestellt, jeweils zwei von deproteinierten Plasma eines Patienten aus der FPAD-Gruppe (**A** und **B**) und zwei von Plasma eines Patienten aus der Hämodialyse-Gruppe (**C** und **D**). In den Chromatogrammen in (**A** und **C**) wurden deproteinierte Proben zu Beginn und in (**B** und

D) nach einer 4-stündigen extrakorporalen Behandlung fraktioniert. Die Peakflächen der Urämie-Toxine initial vor der Behandlung waren nach Normierung mit dem internen Standard vergleichbar (**Abbildung 52**). Nach einer 4-stündigen Behandlung wurden die Peakflächen signifikant reduziert, die Reduktion der Peakflächen in den Proben der FPAD-Gruppe war stärker als in den Proben der Hämodialyse-Gruppe (**B** und **D**). Mit Hilfe der Wiederfindungsrate des internen Standards 2,6-Dimethylphenol von $32 \pm 1 \%$ konnte der Verlust der Urämie-Toxine während der chromatographischen Aufreinigung bestimmt werden.

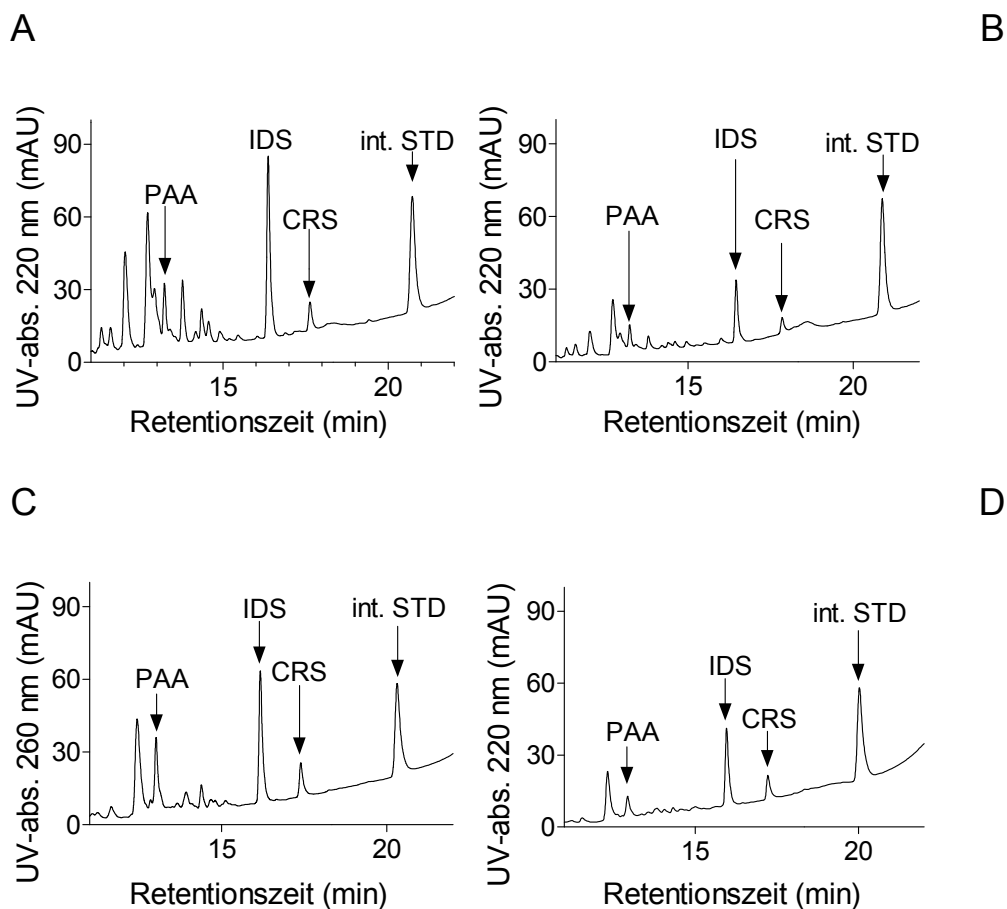


Abbildung 52: Chromatographische Darstellung von Phenylelessigsäure, Indoxylsulfat und p-Kresylsulfat in deproteinisiertem Plasma chronisch-niereninsuffizienter Patienten (**A** und **B**) der FPAD-Gruppe und (**C** und **D**) der Hämodialyse-Gruppe. vor und nach 4 h Behandlung, Phenylelessigsäure (PAA), Indoxylsulfat (IDS), p-Kresol (CRS) und des internen Standards (int. STD) wurden markiert.

Die Konzentrationen der Urämie-Toxine sind als Mittelwerte \pm Standardfehler SEM in $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ in **Tabelle 7** (FPAD-Gruppe) und **Tabelle 8** (Hämodialyse-Gruppe) aufgeführt.

Tabelle 7: Plasmakonzentrationen von Phenylelessigsäure, Indoxylsulfat und p-Kresylsulfat in deproteinisiertem Plasma der Patienten der FPAD-Gruppe als Mittelwerte \pm Standardfehler SEM in $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ an den Entnahmestellen SP1-SP6 (**Abbildung 23**) und zu den Zeitpunkten $t = 0$ min, $t = 120$ min und $t = 240$ min. $N = 5$

Entnahmestelle (SP)	Zeitpunkt t [min]	Phenylelessigsäure Konzentration [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]	Indoxylsulfat Konzentration [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]	p-Kresylsulfat Konzentration [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]
	0	1377 \pm 227	275 \pm 73	341 \pm 70
SP1	120	632 \pm 188	151 \pm 52	170 \pm 58
	240	429 \pm 130	98 \pm 40	118 \pm 49
SP2	120	597 \pm 176	53 \pm 16	110 \pm 35
	240	372 \pm 89	51 \pm 20	127 \pm 44
SP3	120	597 \pm 210	60 \pm 20	150 \pm 53
	240	332 \pm 104	49 \pm 19	118 \pm 43
SP4	120	500 \pm 159	42 \pm 18	142 \pm 45
	240	318 \pm 97	33 \pm 15	101 \pm 37
SP5	120	461 \pm 136	99 \pm 34	142 \pm 38
	240	351 \pm 120	82 \pm 33	114 \pm 48
SP6	120	311 \pm 120	92 \pm 36	115 \pm 46
	240	223 \pm 75	60 \pm 24	99 \pm 32

Tabelle 8: Plasmakonzentrationen von Phenylelessigsäure, Indoxylsulfat und p-Kresylsulfat in deproteinisiertem Plasma der Patienten der Hämodialyse-Gruppe als Mittelwerte \pm Standardfehler SEM in $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ zu den Zeitpunkten $t = 0$ min, $t = 120$ min und $t = 240$ min, $N = 5$

Entnahmestelle	Zeitpunkt t [min]	Phenylelessigsäure Konzentration [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]	Indoxylsulfat Konzentration [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]	p-Kresylsulfat Konzentration [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]
arteriell	0	1201 \pm 506	216 \pm 80	692 \pm 283
	120	668 \pm 212	159 \pm 64	558 \pm 207
venös	240	443 \pm 122	132 \pm 54	467 \pm 174

Die Reduktion der Plasmakonzentrationen von Phenylelessigsäure, Indoxylsulfat und p-Kresylsulfat während einer 4-stündigen Behandlung sind als Δc ($\Delta c = c_{0h} - c_{4h}$) in **Tabelle 9**

dargestellt.

Tabelle 9: Reduktion der Plasmakonzentration (Δc) von Phenyllessigsäure, Indoxylsulfat und p-Kresylsulfat während einer 4-stündigen Behandlung, Vergleich zwischen konventioneller Dialyse und FPAD-Verfahren.

Urämie-Toxin	Hämodialyse HD	FPAD-Verfahren
PAA [$\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$]	$0,76 \pm 0,40$	$1,15 \pm 0,17$
IDS [$\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$]	$0,09 \pm 0,03$	$0,22 \pm 0,05$
CRS [$\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$]	$0,23 \pm 0,11$	$0,24 \pm 0,06$

Nach einer 4-stündigen FPAD-Behandlung wurden die Plasmakonzentrationen von Phenyllessigsäure, Indoxylsulfat und p-Kresylsulfat um die Faktoren 6,2, 4,6 und 3,4 reduziert, nach einer 4-stündigen konventionellen Hämodialyse wurden die Plasmakonzentrationen von Phenyllessigsäure, Indoxylsulfat und p-Kresylsulfat um die Faktoren 2,7, 1,6, und 1,5 reduziert. Eine 4-stündige FPAD-Behandlung entfernte Phenyllessigsäure zu 130 %, Indoxylsulfat zu 180 % und p-Kresylsulfat zu 127 % effektiver als die konventionelle Hämodialyse, ($\text{Faktor}_{\text{FPAD}} \cdot 100 \% / \text{Faktor}_{\text{HD}}$). Die Effektivität beider Behandlungsverfahren wurde bestimmt, indem die Abtrennrates (AR) nach folgender Beziehung berechnet wurde:

$$\text{AR \%} = 100 \% - \frac{t_x \cdot 100}{t_0}$$

AR: Abtrennrates [%];

t_0 : initiale Plasmakonzentration [$\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$]

$t_x = t_{2\text{ h, } 4\text{ h}}$,

Der Vergleich der Abtrennrates beider Behandlungsverfahren ist in **Abbildung 53** aufgeführt. Eine 4-stündige FPAD-Behandlung, dargestellt als durchgezogene Linie entfernte Phenyllessigsäure zu $84,3 \% \pm 4,2 \% (\bullet)$, Indoxylsulfat zu $80,1 \% \pm 5,4 \% (\bullet)$ und p-Kresylsulfat zu $68,7 \% \pm 6,5 \% (\bullet)$. Eine konventionelle Hämodialyse hingegen, dargestellt als unterbrochene Linie entfernte Phenyllessigsäure zu $51,9 \% \pm 13,5 \% (\circ)$, Indoxylsulfat zu $41,7 \% \pm 3,3 \% (\circ)$ und p-Kresylsulfat zu $29,2 \% \pm 3,0 \% (\circ)$. Der Adsorberkreislauf, dargestellt als durchgezogene Linie hatte den größeren Einfluss auf die Abtrennrates der protein gebundenen Urämie-Toxine, mit ihm wurden Phenyllessigsäure zu $72,0 \% \pm 8,5 \% (\blacksquare)$, Indo-

xylsulfat zu $76,0 \% \pm 5,7 \%$ (■) und p-Kresylsulfat zu $65,5 \% \pm 9,1 \%$ (■) abgetrennt.

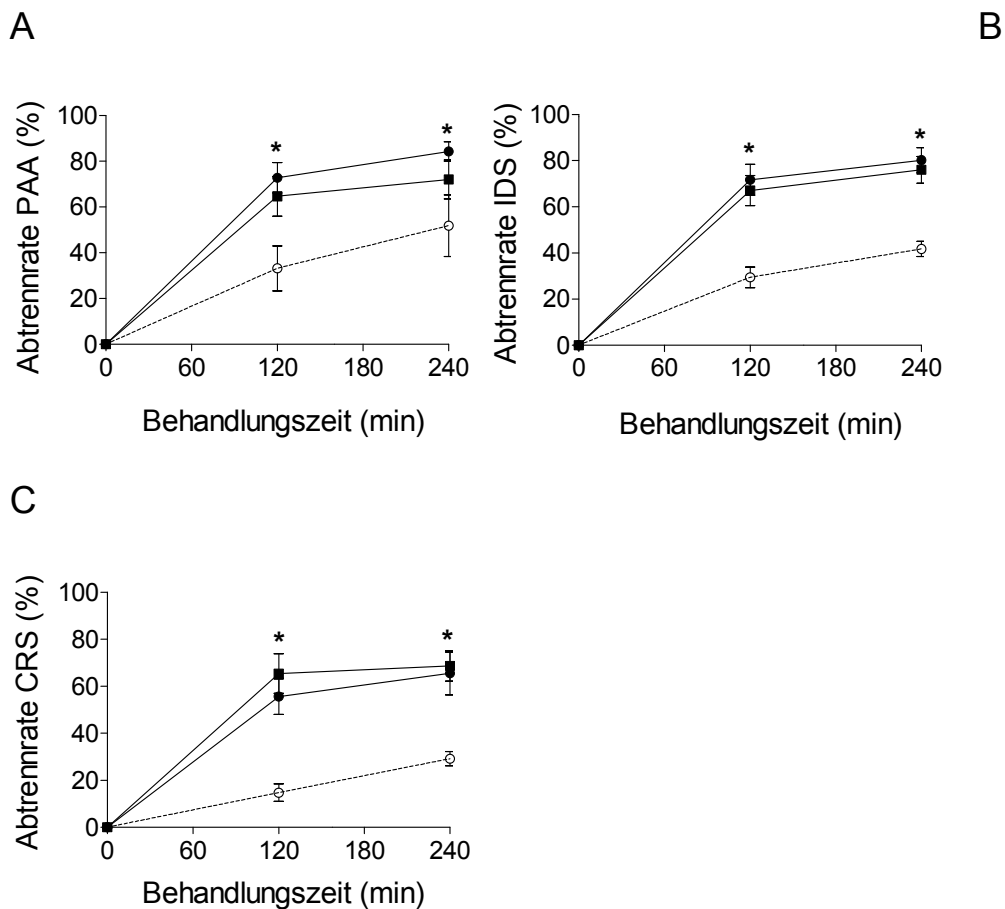


Abbildung 53: Die Abtrennrates (A) von Phenylelessigsäure, (B) Indoxylsulfat und (C) p-Kresylsulfat aus dem Blut chronisch-niereninsuffizienter Patienten während eines 4-stündigen extrakorporalen Behandlungsverfahren. Die Abtrennrates des FPAD-Verfahrens ist als durchgezogene Linien dargestellt, mit den Zeitpunkten 2 h, 4 h und den Entnahmepunkten post Adsorberkreislauf (SP5) (■), Entnahmepunkt post Hämodialysator (SP6) (●). Die konventionelle Hämodialyse ist als unterbrochene Linie dargestellt, mit den Zeitpunkten 2 h und 4 h (○).

Die Hämodialyseeinheit des FPAD-Verfahrens hatte demnach einen geringen Einfluss auf die Abtrennrates des Verfahrens. Die Abtrennrates sind während der ersten 2 h der FPAD-Behandlung größer, in den folgenden 2 h war die Abtrennung geringer. Die Abtrennrates des FPAD-Verfahrens für die drei Urämie-Toxine sind sowohl bei 2 h und 4 h signifikant ($p < 0,05$) unterschiedlich zu den Abtrennrates des konventionellen Dialyseverfahrens. Um die Konzentrationen der Urämie-Toxine nach der Beendigung der jeweiligen Behandlung zu untersuchen, wurden den Patienten beider Studiengruppen 2 h und 4 h nach Beendigung der Behandlung Blutproben entnommen. Darüber hinaus wurden Blutproben für die folgenden 14 Tage initial vor den sechs konventionellen Dialysebehandlungen gesammelt, um Konzentrationsverläufe der Urämie-Toxine nach der einmaligen Behandlung über 14 Tage zu bestimm-

men. Die Konzentrationen der Urämie-Toxine beider Studiengruppen sind als Mittelwerte \pm Standardfehler SEM in $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ in **Tabelle 10** (FPAD-Gruppe) und **Tabelle 11** (Hämodialyse-Gruppe) aufgeführt.

Tabelle 10: Plasmakonzentrationen von Phenyllessigsäure, Indoxylsulfat und p-Kresylsulfat der Patienten der FPAD-Gruppe 2 h und 4 h nach Beendigung der FPAD-Behandlung und vor den nachfolgenden konventionellen Dialysebehandlungen in 3-tägigem Zyklus. Darstellung als Mittelwerte \pm Standardfehler SEM in $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, (N = 5).

Zeitpunkt nach FPAD-Behandlung	Phenyllessigsäure-Konzentration ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	Indoxylsulfat Konzentration ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	p-Kresylsulfat Konzentration ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)
120 min	614 \pm 87	160 \pm 79	159 \pm 61
240 min	668 \pm 84	133 \pm 45	165 \pm 62
3 d	1081 \pm 329	206 \pm 54	298 \pm 65
5 d	1102 \pm 267	230 \pm 86	341 \pm 96
7 d	840 \pm 222	255 \pm 87	338 \pm 103
14 d	866 \pm 243	264 \pm 96	489 \pm 165

Tabelle 11: Plasmakonzentrationen von Phenyllessigsäure, Indoxylsulfat und p-Kresylsulfat der Patienten der Hämodialyse-Gruppe 2 h und 4 h nach Beendigung der FPAD-Behandlung und vor den nachfolgenden konventionellen Dialysebehandlungen in 3-tägigem Zyklus. Darstellung als Mittelwerte \pm Standardfehler SEM in $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, (N = 5).

Zeitpunkt nach HD-Behandlung	Phenyllessigsäure-Konzentration ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	Indoxylsulfat Konzentration ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	p-Kresylsulfat Konzentration ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)
120 min	463 \pm 127	134 \pm 51	469 \pm 173
240 min	523 \pm 133	146 \pm 52	537 \pm 168
3 d	1254 \pm 660	199 \pm 82	692 \pm 225
5 d	872 \pm 401	183 \pm 74	642 \pm 224
7 d	866 \pm 376	186 \pm 75	716 \pm 213
14 d	1046 \pm 385	208 \pm 73	581 \pm 198

Abbildung 54 gibt die Konzentrationsverläufe vor beziehungsweise nach der Behandlung wieder. Die Plasmakonzentrationen von Phenyllessigsäure, Indoxylsulfat und p-Kresylsulfat wurden während FPAD-Behandlung und konventioneller Dialysebehandlung reduziert, der Rückstrom der Urämie-Toxine führte nach Beendigung der Behandlung zu einem Anstieg der Plasmakonzentrationen. In der Hämodialyse-Gruppe wurden die Ausgangskonzentrationen früher erreicht. Nach drei Tagen lagen die Plasmakonzentrationen der Urämie-Toxine in beiden Studiengruppen wieder auf Ausgangsniveau.

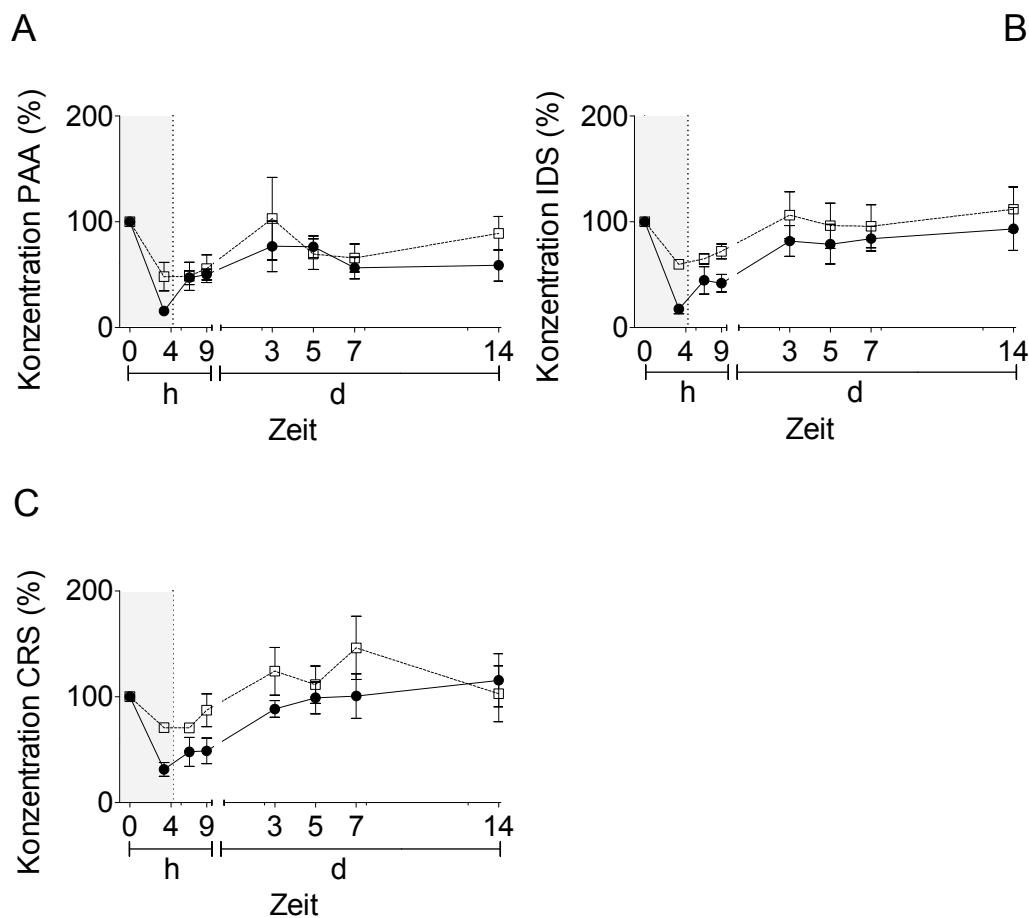


Abbildung 54: Konzentrationsverläufe (A) von Phenyllessigsäure, (B) von Indoxylsulfat und (C) von p-Kresylsulfat von 2 h bis zu 14 Tage nach der initialen Behandlung in Rahmen der Studie. Die Werte sind in Prozent der Ausgangskonzentration als Mittelwert \pm Standardfehler SEM angegeben. Grau unterlegt sind die 5-stündigen Behandlungszeiten in Stunden h der initialen Behandlung, die der 14-tägige Zeitraum ist in Tagen d dargestellt. Die Konzentrationsverläufe in der FPAD-Gruppe sind als kontinuierliche Linie (●) dargestellt. Die Konzentrationsverläufe in der Hämodialyse-Gruppe sind als unterbrochene Linie (□) dargestellt, (N = 5).

Es wurden weiterhin routinemäßig die klinischen Parameter Kortisol, Trijodthyronin und die Gesamtproteinkonzentration des Plasmas der Studienpatienten beider Studiengruppen bestimmt (**Abbildung 55**). Sowohl während der Behandlung als auch in dem 14-tägigen Zeitraum nach der initialen Behandlung im Rahmen der Studie waren keine signifikanten Unterschiede zwischen der FPAD-Gruppe und der Hämodialyse-Gruppe vorhanden.

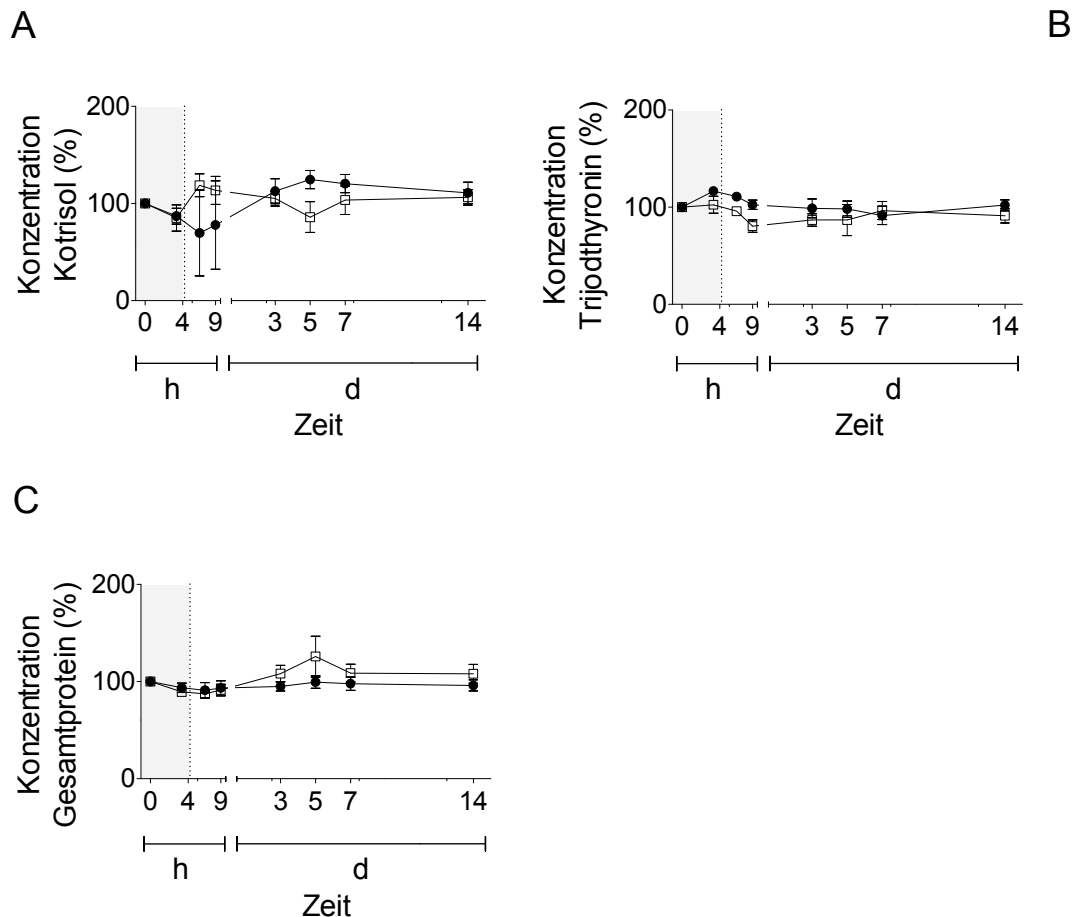


Abbildung 55: Konzentrationsverläufe von (A) Kortisol, (B) Trijodthyronin und (C) der Gesamtproteinkonzentration während der Behandlung und von 2 h nach deren Beendigung und über einen 14-tägigen Zeitraum mit 6 konventionellen Routine-Dialysen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler SEM in Prozent der Ausgangskonzentration. Grau unterlegt sind die 5-stündigen Behandlungszeiten in Stunden h, der 14-tägige Zeitraum ist in Tagen d dargestellt. Die Konzentrationsverläufe der FPAD-Gruppe sind als durchgehende Linie (●) dargestellt, die Konzentrationsverläufe der Hämodialyse-Gruppe sind als unterbrochene (□) dargestellt, N = 5.

5. Diskussion

Da proteingebundene Urämie-Toxine nur unzureichend durch konventionelle Dialyseverfahren abzutrennen sind, aber die betreffenden Substanzen einen großen Einfluss auf die Morbidität und Mortalität chronisch-niereninsuffizienter Patienten haben [16], ist die Entwicklung neuartiger Therapieverfahren, die diese Substanzen vermehrt abtrennen können, von großer Bedeutung. Die Trennleistung konventioneller Dialyseverfahren wird allein aufgrund konvektiven und diffusiven Transports durch die Dialysemembran definiert. Verbesserungen sind in diesem Rahmen nur durch Erhöhungen der Ausschlussgrenzen der Membranen und vergrößerte Konzentrationsdifferenzen zwischen Blut und Dialysat möglich. Allerdings lassen sich auf diese Weise nur Urämie-Toxine abtrennen, die im Plasma wasserlöslich und frei vorliegen und die darüber hinaus die Poren der Dialysemembran aufgrund ihrer molekularen Masse passieren können. Da ein Großteil der proteingebundenen Urämie-Toxine eine niedermolekulare Masse hat [1, 40, 41, 107], aber durch die Assoziation an Plasmaproteine wie hochmolekulare Moleküle einer Masse charakterisiert ist, sind proteingebundene Urämie-Toxine nur durch eine deutliche Erhöhung der Ausschlussgrenzen von mehr als 50 kDa im ausreichenden Maße abtrennbar. Membranporen dieser Dimension würden zwangsläufig die Dialysemembran für einen großen Teil der Plasmaproteine passierbar machen, aber zu unkontrollierten Proteinverlusten führen und damit nicht einsetzbar. Im Rahmen der Arbeit wurden neuartige extrakorporale Therapieverfahren entwickelt, die sich durch eine verbesserte Abtrennung proteingebundener Urämie-Toxine charakterisieren lassen. Proteingebundene Urämie-Toxine lassen sich durch Erhöhung der Ionenstärke oder die Anwesenheit elektromagnetischer Felder innerhalb des Dialysators vermehrt aus der Proteinbindung freisetzen, indem das Bindungsgleichgewicht der proteingebundenen Urämie-Toxine zu Gunsten der ungebundenen Fraktion verschoben wird. Der ungebundene Anteil der proteingebundenen Urämie-Toxine ist dialysierbar. Dadurch werden verbesserte Abtrennraten proteingebundener Urämie-Toxine erreicht. Neben den auf einer vermehrten Freisetzung basierenden Verfahren, wurde ein adsorptives Verfahren entwickelt, das durch den Einsatz eines hydrophoben Neutral-Adsorber und eines Anionenaustauschers charakterisiert ist und verbesserte Abtrennraten der proteingebundenen Urämie-Toxine durch Adsorption an diese Adsorber ermöglicht. Im Rahmen einer klinischen Studie wurde das adsorptive Verfahren bereits erstmalig in der extrakorporalen Nierenersatztherapie eingesetzt. Seine Effizienz wurde an den chronisch-niereninsuffizienten Patienten untersucht und validiert. Diese Studie ist ein weiterer Schritt zur Etablierung adsorptiver Verfahren in der klinischen Routinebehandlung chronisch-niereninsuffizienter Patienten.

Die Ionenpaar-Reversed-Phase-Chromatographie wurde im Rahmen der vorliegenden Dissertation für die Fraktionierungen und Quantifizierungen von Urämie-Toxinen in endogenem Patientenplasma und künstlich erzeugten Proben verwendet. In der Reversed-Phase-Chromatographie wird üblicherweise das Elutionsmittel Acetonitril verwendet [95, 108]. Aufgrund von Lieferengpässen des Lösungsmittels Acetonitril, die durch die Finanzkrise bedingt waren, bestand die Notwendigkeit nach alternativen organischen Lösungsmitteln für die Ionenpaar-Reversed-Phase-Chromatographie. Daher wurden Versuchsreihen durchgeführt und die alternativen Lösungsmittel Methanol, Ethanol und 1-Propanol auf ihre Eignung als Elutionsmittel in der Ionenpaar-Reversed-Phase-Chromatographie von Biomolekülen wie Dinukleotiden (**Abbildung 26** und **Abbildung 27**), Peptiden (**Abbildung 28** und **Abbildung 29**) und Proteinen (**Abbildung 30**) im Vergleich zu Acetonitril untersucht. Da 1-Propanol die stärksten Elutionseigenschaften der Lösungsmittel aufwies, besteht bei seiner Verwendung die Notwendigkeit die bestehenden Elutionsgradienten und Lösungsmittelzusammensetzungen zu verändern. Darüber hinaus ist 1-Propanol durch die erhöhte Viskosität nur eingeschränkt für die Reversed-Phase-Chromatographie geeignet. Methanol wies dagegen schwächere Elutionseigenschaften als Acetonitril-Wasser auf, was wiederum zu Änderungen der Chromatographiebedingungen führte. Ethanol hingegen stellt ein alternatives Elutionsmittel zu Acetonitril dar, da es eine stärkere Elutionskraft als Methanol und eine vergleichbare Elutionskraft wie Acetonitril für Biomoleküle wie Proteine, Peptide und Dinukleotide aufweist [96]. Darüber hinaus hat Ethanol im Gegensatz zu Methanol und Acetonitril keine toxischen Eigenschaften. Mit Hilfe der Verwendung des Elutionsmittels Ethanol in der Reversed-Phase-Chromatographie konnten darüber hinaus die Urämie-Toxine p-Hydroxyhippursäure, Phenyllessigsäure, Indoxylsulfat und p-Kresylsulfat basisliniengetrennt von einander aus komplexen Proben wie humanem Plasma separiert und quantifiziert werden. Da Ethanol eine vergleichbare Viskosität wie wässrige Laufmittel zeigt, die in der Ionenpaar-Reversed-Phase-Chromatographie mit Gradientenelution verwendet werden, wird eine Vaporisierung der Lösung durch Druckschwankungen bei steigenden Elutionsmittelkonzentrationen durch die Verwendung von Ethanol minimiert [96].

5.1 Entwicklung eines Dialyseverfahrens mit vermehrter Abtrennung proteingebundener Urämie-Toxine bei erhöhter Ionenstärke

Um ein Dialyseverfahren zu entwickeln, das durch eine verbesserte Abtrennung proteingebundener Urämie-Toxine charakterisiert ist, wurde in *in vitro*-Versuchsreihen untersucht, inwieweit die Erhöhung der Ionenstärke proteingebundene Urämie-Toxine wie Phenyllessigsäure, Indoxylsulfat und p-Kresylsulfat aus der Proteinbindung freigesetzt. Da bei erhöhter Ionenstärke ein größerer Anteil der proteingebundenen Urämie-Toxine in ungebundener

Fraktion vorliegt (**Abbildung 33**), wurde anschließend untersucht, ob eine Erhöhung der Ionenstärke einen Einfluss auf die strukturelle und funktionelle Integrität von Plasmaproteinen hat. Dazu wurden in *in vitro*-Studien Plasmaproteine nach einer 30-minütigen Inkubation bei erhöhter Ionenstärke hinsichtlich ihrer enzymatischen Aktivität analysiert. Die Funktionalität der Proteine, die bei erhöhter Ionenstärke inkubiert worden waren, wurde durch Vergleich mit nativen Enzymproben bestätigt. Die repräsentativen Proteine Laktatdehydrogenase, Superoxiddismutase und alkalische Phosphatase sind ubiquitär vorkommende Proteine und katalysieren lebenswichtige Reaktionen im Körper. Nach der Inkubation mit einer $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Kochsalzlösung waren die Aktivitätsunterschiede der Enzyme nicht signifikant unterschiedlich zu Enzymen, die in physiologischer Kochsalzlösung inkubiert worden waren (**Abbildung 34**). Zur Verifizierung der Ergebnisse wurde mit der ^1H -NMR-Spektroskopie ein weiteres Verfahren zur Untersuchung der Strukturintegrität der Plasmaproteine verwendet. Die ^1H -Spektren von β -2-Mikroglobulin (**Abbildung 35**), α -Chymotrypsinogen (**Abbildung 36**), und Hämoglobin (**Abbildung 37**) nach einer 30-minütigen Inkubation in einer $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Kochsalzlösung waren nicht signifikant unterschiedlich zu den Spektren der Plasmaproteine, die in physiologischer Kochsalzlösung inkubiert worden waren. Somit bestätigen die Ergebnisse der ^1H -NMR-spektroskopischen Untersuchungen die Ergebnisse der Enzymaktivitätsuntersuchungen: Eine Inkubation von Proteinen in einer $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Kochsalzlösung hat keine signifikanten strukturellen Änderungen der Proteine im Plasma zur Folge. Die betreffenden Ergebnisse wurden auf den Maßstab einer Dialysebehandlung adaptiert, indem eine *in vitro*-Hämodialyse einer Albumin-Urämie-Toxin-Lösung unter hypertonen Kochsalzbedingungen durchgeführt wurde. Die Albuminlösung wurde für eine *in-vitro*-Dialyse verwendet, da Albumin mit bis zu 75 % der Proteinmenge des Blutplasmas das häufigste Protein ist [109]. Albumin ist ein Transportprotein für eine Vielzahl von Substanzen wie Billirubin, Fettsäuren, Metallionen und Medikamenten im Blut [110-116]. Darüber hinaus hat Albumin verschiedene Bindungsstellen für hydrophobe Substanzen, die als Sudlowsites I + II [117] bezeichnet werden. Albumin bindet Indoxylsulfat und p-Kresylsulfat an der Sudlowsite II [118, 119]. Daher ist eine Albumin-Lösung ein adäquater Ersatz für Blutplasma in den *in vitro*-Versuchsreihen. Die dialytische Reinigung, die als *Clearance* bezeichnet wird, wurde bei einer *in vitro*-Hämodialyse bei hypertonen Kochsalzbedingungen durch die Konzentrationsbestimmung von Phenyllessigsäure, Indoxylsulfat und p-Kresylsulfat in der Albumin-Lösung vor und hinter dem Hämodialysator, evaluiert. Die *Clearance* von Phenyllessigsäure, Indoxylsulfat und p-Kresylsulfat ist in Anwesenheit einer $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Kochsalzkonzentration im Vergleich zur *Clearance* bei physiologischer Kochsalzkonzentration erhöht (**Abbildung 39**). Da bei erhöhter Ionenstärke das Bindungsgleichgewicht der proteingebundenen Urämie-Toxine zu Gunsten der ungebundenen Fraktion verschoben wird, ist ein größerer Anteil der Urämie-Toxine nicht an Proteine gebunden und wird dialytisch abgetrennt. Mit Hilfe erhöhter Ionenstärke lassen

sich proteingebundene Urämie-Toxine in einem Dialyseverfahren vermehrt abtrennen.

Um die Ionenstärke des im extrakorporalen Kreislauf befindlichen Blutes zu erhöhen, wurde daher ein Hämodialyseverfahren entwickelt, bei dem eine hypertone Kochsalzlösung mit einer externen Pumpe über einen Zugang vor dem Hämodialysator zugeführt wird (

Abbildung 14). Zur homogenen Verteilung der Kochsalzlösung wurde ein Minidialysator als Kochsalzdispenser entwickelt (**Abbildung 13**), mit dem die hypertone Kochsalzlösung durch die Dialysefasern des Minidialysators hindurch infundiert wird und sich homogen mit dem Blut mischt. Die Infusion einer hypertonen Kochsalzlösung über einen seitlichen Zugang zum blutführenden Schlauchsystem würde hohe lokale Konzentrationsunterschiede bewirken, die zu einer Schädigung der Blutzellen und Plasmaproteine führen könnten. Um die Volumenbilanz zu erhalten wird die zugeführte Lösung durch die Ultrafiltrationsleistung der Dialyseapparatur abgetrennt. Um das neuartige Verfahren weiter zu verifizieren, wurde humanes Vollblut in *in vitro*-Studien mit Infusion einer hypertonen Kochsalzlösung dialysiert, um die Häkompatibilität des Verfahrens zu prüfen. Die Erythrozyten wurden als Indikatoren für die Zellschädigung der Blutzellen ausgewählt und die Hämolyserate der Erythrozyten durch die Bestimmung der freien Hämoglobinkonzentration in humanem Plasma bestimmt. Um die Hämolyserate des neuartigen Verfahrens abschätzen und vergleichen zu können, wurde nach der Methode von Cribbs [103] die freie Hämoglobinkonzentration photometrisch bestimmt und daraus der normierte Index der Hämolyserate (NIH) bestimmt und mit dem NIH des konventionellen Hämodialyseverfahren verglichen. Da eine hohe Kochsalzkonzentration innerhalb des Hämodialysators eine hohe Freisetzungsrates der proteingebundenen Urämie-Toxine bewirkt und zu einer verbesserten Abtrennung dieser Substanzen führt, wurde zunächst in *in-vitro*-Studien die freien Hämoglobinkonzentrationen bei sukzessive in $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Schritten gesteigerten effektiven Kochsalzkonzentrationen bestimmt (**Abbildung 40**). Während die freie Hämoglobinkonzentrationen im Vollblut $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ beträgt [22], weisen freie Hämoglobinkonzentrationen von mehr als $20 \text{ ml}\cdot\text{dl}^{-1}$ auf die Hämolyse des Blutes hin [120]. Eine freie Hämoglobinkonzentration von $20 \text{ ml}\cdot\text{dl}^{-1}$ wurde in der ersten Versuchsreihe bei einer effektiven Kochsalzkonzentration von $180 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ überschritten, daher wurde eine effektive Kochsalzkonzentration von $180 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ als oberer Grenzwert definiert und bei den folgenden *in vitro*-Dialysen wurde diese Konzentration verwendet. Nach Erhöhung der Rezirkulationszeit in den folgenden Versuchsreihen von 30 min auf 60 min wurden bei effektiven Kochsalzkonzentrationen von $160 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ und $180 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NIH-Werte von $11,3 \text{ mg}\cdot\text{dl}^{-1}$ und $8,6 \text{ mg}\cdot\text{dl}^{-1}$ bestimmt, die deutlich niedriger waren als in der ersten Versuchsreihe und im Normbereich einer Hämodialysebehandlung zwischen $6 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ und $13 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ freies Hämoglobin lagen. Der NIH-Wert wird über die Steigung einer Geradengleichung der graphischen Auftragung von freier Hämoglobinkonzentration über der Rezirkulationszeit berechnet [121].

Durch Verlängerung der Rezirkulationszeit wurden somit niedrigere NIH-Werte bestimmt. Zur weiteren Untersuchung des Einflusses einer erhöhten Kochsalzkonzentration im Vollblut wurden in einer *in vitro*-Versuchsreihe ohne Dialyse und Ultrafiltration die freien Hämoglobinkonzentrationen und die NIH-Werte bestimmt. Dazu wurde Vollblut rezirkuliert, dessen effektive Kochsalzkonzentration durch einmalige Infusion einer $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Kochsalzlösung auf effektive Kochsalzkonzentrationen von $160 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ und $180 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ erhöht wurde. Die freien Hämoglobinkonzentration und die NIH-Werte lagen niedriger als den vorangegangenen Versuchsreihen (**Tabelle 5**). Die Hämolyserate des rezirkulierten Blutes wird demnach vorwiegend nicht durch die Erhöhung der Kochsalzkonzentration beeinflusst, sondern maßgeblich durch die Equilibrierung der Kochsalzkonzentration auf physiologische Bedingungen in Folge der Dialyseleistung und der Ultrafiltration. Der Flüssigkeitsstrom aus den Zellen unter hypertonen Bedingungen, der zur Bildung des Echinozyten führt, beeinflusst die Hämolyserate weniger stark als der Rückstrom der Flüssigkeit in die Zellen in Folge der hohen Dialyseleistung und Ultrafiltration. Eine Reduktion des Dialysatflusses mit gleichzeitiger Verringerung der Ausgangskonzentration des Kochsalzes könnte dementsprechend zu einer verringerten Hämolyserate führen und eine Erhöhung der effektiven Kochsalzkonzentration ermöglichen, die eine verbesserte Abtrennung proteingebundener Urämie-Toxine zur Folge hat. Die Reduzierung der Ausgangskonzentration der Kochsalzlösung bedingt die Infusion eines größeren Volumens der Kochsalzlösung, um die benötigten effektiven Kochsalzkonzentrationen zu erreichen. Da die technisch mögliche Grenze des Ultrafiltrationsvolumens einer konventionellen Hämodialyseeinheit gegenwärtig $2 \text{ l} \cdot \text{h}^{-1}$ beträgt und bei der Verwendung einer $0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Kochsalzlösung überschritten wird, wenn effektive Kochsalzkonzentrationen von $200 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ und mehr erreicht werden sollen, wäre zur Durchführung entsprechender Versuchsreihen eine umfangreiche technische Modifizierung der Dialyseeinheiten notwendig. Das Ultrafiltrationsvolumen ließe sich durch eine gleichzeitige Reduzierung des Blutflusses unterhalb von $200 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ reduzieren. Dieser Ansatz wäre aber wenig zielführend, weil konventionelle Dialysebehandlungen mit Blutflüssen von $200 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ bis $400 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ durchgeführt werden [3], um eine effektive Entfernung der niedermolekularen, wasserlöslichen Urämie-Toxine während der Behandlungszeit sicher zu stellen. Eine Optimierung der technischen Bedingungen eines Dialyseverfahrens mit prädilutischer Infusion einer hypertonen Kochsalzlösung ist daher konsequenterweise notwendig, um die effektive Kochsalzkonzentration innerhalb des Hämodialysators zu erhöhen und damit verbesserte Abtrennraten der proteingebundenen Urämie-Toxine zu erreichen.

Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Erkenntnisse stellen die Grundlage zur Entwicklung eines neuartigen Hämodialyseverfahrens dar: Die Infusion einer hypertonen Kochsalzlösung vor den Hämodialysator bewirkt eine erhöhte Ionenstärke im Blut. Dadurch werden protein-

gebundene Urämie-Toxine vermehrt aus der Proteinbindung freisetzt und können im Hämodialysator abgetrennt werden. Die Abtrennung des infundierten Flüssigkeitsvolumens über die Ultrafiltration bewirkt zusätzlich einen erhöhten konvektiven Transport von Urämie-Toxinen. Dadurch werden im Vergleich zur konventionellen Hämodialyse verbesserte Abtrennraten der niedermolekularen, wasserlöslichen Urämie-Toxine und der mittelmolekularen Urämie-Toxine erreicht [49, 122, 123]. Das neuartige Verfahren ist somit den übrigen konventionellen Dialyseverfahren überlegen, da es über verbesserte Abtrennraten (A) proteingebundener Urämie-Toxine, (B) niedermolekularer, wasserlöslicher Urämie-Toxine und (C) mittelmolekularer Urämie-Toxine charakterisiert ist und daher alle drei bei Vanholder [1] genannten Gruppen von Urämie-Toxinen einschließt. Um die Entwicklung des neuartigen Verfahrens voranzutreiben, werden zukünftig weitere Versuchsreihen durchgeführt, um technische Details wie die Ultrafiltrationsraten und das infundierte Volumen der hypertonen Kochsalzlösung zu spezifizieren. Dazu ist eine technische Modifizierung der Dialyseapparaturen notwendig. Zukünftig werden Versuchsreihen angestrebt, um das neuartige Verfahren in einem Tiermodell zu verifizieren und eine therapeutische klinische Anwendung möglich zu machen. Im Rahmen einer Erfindungsmeldung wurden diese Ergebnisse zu einer PCT-Patentanmeldung mit dem Titel „Dialyseverfahren zur Entfernung proteingebundener Toxine aus dem Blut von akut oder chronisch-niereninsuffizienten Patienten“ (PCT/EP2012/062658) verwendet.

5.2 Entwicklung eines Hämodialyseverfahrens mit vermehrter Abtrennung proteingebundener Urämie-Toxine durch elektromagnetische HF-Felder

Da die Bindungen von hydrophoben Urämie-Toxinen mit Proteinen auf elektrostatischen Wechselwirkungen beruhen, wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob diese elektrostatischen Wechselwirkungen neben erhöhter Ionenstärke auch durch elektromagnetische HF-Felder vermindert oder gänzlich aufgehoben werden können. Dieser Versuch wurde im Labormaßstab entwickelt und durchgeführt, um in einer vereinfachten Versuchsanordnung den Einfluss hochfrequenter elektromagnetischer Felder auf die Proteinbindung proteingebundener Urämie-Toxine zu untersuchen. Mit Hilfe speziell entwickelter Elektroden (**Abbildung 15**) und Mini-Dialysemodule (**Abbildung 16**) wurden daher drei repräsentative, proteingebundene Urämie-Toxine unter Einfluss hochfrequenter elektromagnetischer Felder aus einer Albuminlösung dialysiert und die Konzentration der Urämie-Toxine im Dialysat bestimmt. In Anwesenheit eines elektromagnetischen HF-Feldes wurden die Urämie-Toxine p-Hydroxyhippursäure, Phenyllessigsäure und Indoxylsulfat als repräsentativer Vertreter der proteingebundenen Urämie-Toxine vermehrt abgetrennt als Abwesenheit eines elektromagnetischen HF-Feldes (**Abbildung 41**). Die verbesserte Abtrennung der proteingebundenen

Urämie-Toxine in der Versuchsreihe ist auf einen erhöhten Transport von p-Hydroxyhippursäure, Phenylelessigsäure und Indoxylsulfat ins Dialysat zurückzuführen. Der erhöhte Transport basiert auf der vermehrten Freisetzung der Urämie-Toxine aus der Proteinbindung, die durch die Abschwächung der elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Urämie-Toxinen und den Proteinen durch die Anwesenheit des elektromagnetischen Feldes verursacht wird.

Im Anschluss wurde ein Testsystem entwickelt, das auf einer Dialyse in Anwesenheit homogener elektromagnetischer Felder basiert. Dabei wurden durch die Verwendung konventioneller, standardisierter Hämodialysematerialien äquivalente Bedingungen zu einer konventionellen Hämodialysebehandlung erreicht (**Abbildung 18**) und (**Abbildung 43**). Für den technischen Aufbau des Systems wurden Hämodialysatoren und Schlauchsysteme verwendet und die Geometrie der elektromagnetischen Felder wurde der Geometrie der Hämodialysatoren angepasst. So wurde eine größtmögliche Verweildauer der Testlösung im elektromagnetischen Feld realisiert, um Urämie-Toxine, die in Anwesenheit der HF-Felder vermehrt aus der Proteinbindung freigesetzt werden, dialytisch abzutrennen. Durch Automatisierung der Pumpen- und Ventilschaltvorgänge mit Hilfe einer entwickelten computergestützten Steuerung wurden Versuchsparameter und Versuchsdurchführung standardisiert. Auf diese Weise wurden eine geringe Varianz während der Versuchsdurchführung und eine hohe Reproduzierbarkeit der Versuchsdaten innerhalb einer Versuchsreihe erreicht. Die Hochfrequenz-Feldquelle des Systems wurde variabel gewählt, um sowohl die Anwesenheit hochfrequenter elektrischer Felder, als auch hochfrequenter magnetischer Felder auf die vermehrte Freisetzung proteingebundener Urämie-Toxine über einen Frequenzbereich von drei Zehnerpotenzen separat untersuchen zu können. Elektrische HF-Feld-Einflüsse wurden unter Verwendung von Kondensatorplatten untersucht, sodass sich der dazwischen befindliche konventionelle Hämodialysator in einem homogenen Hf-Feld befand (**Abbildung 17**). Zur Untersuchung magnetischer HF-Feld-Effekte fand ein spulenumwickelter Hämodialysator Verwendung, in Längsrichtung der Dialysemembranfasern wurde bei Stromfluss durch die Spule ein hochfrequentes magnetisches Feld erzeugt (**Abbildung 17**). Bauartbedingt wurden elektrische Feldfrequenzen von 1-170 MHz und magnetische Feldfrequenzen von 1-25 MHz in die Untersuchung einbezogen. Erste Versuchsreihen zur Untersuchung der Abtrennraten von proteingebundenen Urämie-Toxinen in humanem Plasma in Anwesenheit elektrischer HF-Felder resultierten in hohen Abtrennraten von Phenylelessigsäure und Indoxylsulfat aus rezirkuliertem humanem Plasma (**Abbildung 45**). Der Effekt des hochfrequenten elektrischen Feldes auf die Abtrennung proteingebundener Urämie-Toxine wurde durch die hohe Dialyseleistung überlagert. Da das Testsystem ein rezirkuliertes Volumen der Testlösung von 75 ml aufwies, gleichzeitig der Rezirkulationsfluss auf $200 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ definiert wurde und der

technisch niedrigste Dialysatfluss der angeschlossenen Dialyseeinheit $300 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ betrug, ist die hohe Abtrennleistung auf das Verhältnis von Rezirkulationsvolumen zu Rezirkulations- und Dialysatfluss zurückzuführen. Die Testlösung wurde mit Einbeziehung des einmaligen Durchgangs der Lösung beim Befüllen und Spülen des Testsystems während einer 1-minütigen Rezirkulation 3,6-mal dialysiert. Durch die Entwicklung einer Bypassapparatur konnte der Dialysatfluss reduziert werden, um den Effekt elektromagnetischer Felder auf die Abtrennung proteingebundener Urämie-Toxine eingehender zu untersuchen. In Anwesenheit eines magnetischen HF-Feldes von 1-25 MHz wurden Phenyllessigsäure, Indoxylsulfat und p-Kresylsulfat vermehrt dialytisch abgetrennt im Vergleich zu Versuchsreihen in Abwesenheit eines HF-Feldes (**Abbildung 46**).

Da initial nicht auszuschließen war, dass elektromagnetische HF-Felder einen Einfluss auf die strukturelle und funktionelle Integrität von Plasmaproteinen ausüben, wurden in *in vitro*-Versuchsreihen repräsentative Plasmaproteine nach einer Inkubation in Anwesenheit eines hochfrequenten elektrischen Feldes hinsichtlich ihrer enzymatischen Aktivität untersucht. Die enzymatische Aktivität der Proteine wurde anhand eines Vergleiches mit nativen Proteinen bestätigt. Die Enzymaktivitäten der repräsentativen Proteine Laktatdehydrogenase, Superoxiddismutase und alkalischen Phosphatase wiesen nach einer Inkubation in Anwesenheit eines hochfrequenten elektrischen Feldes von 1-170 MHz keine signifikanten Aktivitätsunterschiede zu den Kontrollproben auf (**Abbildung 34**). Diese Ergebnisse wurden verifiziert, indem die dreidimensionale Struktur von rezirkuliertem Albumin mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie untersucht wurde. Albumin, das in Anwesenheit eines hochfrequenten elektrischen Feldes für 15 min rezirkuliert wurde. Es konnten keine Unterschiede im Vergleich zu nativem Albumin bestimmt werden (**Abbildung 48**). Die Ergebnisse der Enzymaktivitätsbestimmung und der Strukturanalyse indizieren, dass die in Anwesenheit eines hochfrequenten elektrischen Feldes inkubierten Proteine keine strukturellen Änderungen aufweisen und damit ihre native Funktionalität erhalten bleibt. Die Ergebnisse der Enzymaktivitätsbestimmung und der Strukturanalyse zeigen darüber hinaus, dass keine prinzipiellen Komplikationen für die Entwicklung eines Dialyseverfahrens mit verbesserter Abtrennung von proteingebundenen Urämie-Toxinen durch die Anwesenheit von hochfrequenten elektromagnetischen Feldern zu erwarten sind. Die Ergebnisse wurden im Rahmen einer internationalen Patentanmeldung mit dem Titel „Dialyseverfahren zur Entfernung proteingebundener Toxine aus dem Blut von Patienten unter Einsatz hochfrequenter, elektromagnetischer Felder“ (PCT-Anmeldung PCT/EP2012/062657) verwendet.

5.3 Entwicklung, Validierung und Etablierung eines adsorptiven Verfahren in der klinischen Nierenersatztherapie mit verbesserter Abtrennung proteingebundener Urämie-Toxine

Da proteingebundene Urämie-Toxine zumeist durch hydrophobe, aromatische Strukturen und anionische funktionelle Gruppen charakterisiert sind, wurden in früheren Arbeiten der AG Jankowski die Adsorptionseigenschaften verschiedener in der Chromatographie verwendeter Resine für proteingebundene Urämie-Toxine untersucht. Sowohl Reversed-Phase-, als auch Anionenaustauscher-Resine wiesen starke Adsorptionseigenschaften für proteingebundene Urämie-Toxine wie Phenylelessigsäure, Indoxylsulfat und p-Kresylsulfat auf.

Da diese Chromatographie-Resine hinsichtlich ihrer Hämokompatibilitäts-Eigenschaften nur unzureichend charakterisiert sind, wurden für die Entwicklung eines adsorptiven Verfahrens in der Nierenersatztherapie im Rahmen der vorliegenden Arbeit zwei physikochemisch geeignete Adsorber-Resine genutzt, deren Hämokompatibilitäts-Charakteristika durch die klinische Anwendung in einem adsorptiven Leberunterstützungsverfahren zur effektiven Entfernung proteingebundener Leber-Toxine beschrieben sind [124, 125]. Die Adsorptionseigenschaften des hydrophoben Neutraladsorbers und des kationischen Anionenaustauschers des Leberunterstützungsverfahrens FPAD wurden für die Urämie-Toxine Phenylelessigsäure, Indoxylsulfat und p-Kresylsulfat in *in vitro*-Versuchsreihen untersucht. In diesen *in vitro*-Versuchsreihen konnte gezeigt werden, dass Phenylelessigsäure, Indoxylsulfat und p-Kresylsulfat sowohl durch den neutralen Adsorber als auch durch den kationischen Anionen-Adsorber retendiert wurden. Sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit von Plasmaproteinen wurden die Urämie-Toxine an die Adsorber-Resine gebunden (**Abbildung 50** und **Abbildung 51**). Der Anionenaustauscher hatte stärkere Adsorptionseigenschaften für Phenylelessigsäure, Indoxylsulfat und p-Kresylsulfat als der hydrophobe Neutral-Adsorber. Aufgrund der chemischen Struktur des Anionenaustauschers, der aus einem Copolymer von Polydivinylbenzen und Polystyren mit quartären Aminogruppen aufgebaut ist, wurden die Urämie-Toxine sowohl über ionische Bindungen als auch über hydrophobe Dipol-Dipol-Wechselwirkungen retendiert. Die Kombination aus ionischen Wechselwirkungen zwischen den kationischen Aminogruppen und den anionischen Carboxyl- oder Sulfatgruppen der Urämie-Toxine und den hydrophoben Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zwischen dem hydrophoben aromatischen Gerüst des Adsorbers und der hydrophoben aromatischen Strukturen der Urämie-Toxine ist ursächlich für die starken Adsorptionseigenschaften des Anionenaustauschers für die Urämie-Toxine.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Adsorber hervorragende Adsorptionseigenschaften aufwiesen, um hydrophobe proteingebundene Urämie-Toxine aus humanem Plasma zu retendieren

und zu entfernen. Im Rahmen einer klinischen Studie wurde daher dieses adsorber-basierte Verfahren hinsichtlich der Abtrennraten der drei repräsentativen proteingebundenen Urämie-Toxine Phenyllessigsäure, Indoxylsulfat und p-Kresylsulfat im Vergleich zu konventioneller Hämodialyse untersucht [126]. Die klinische Studie wurde mit einer doppelten Antikoagulation aus Kalziumkomplexierung mit Zitrat und Heparininfusion durchgeführt, da vorangegangene Arbeiten von Meijer et al. [127] zu Blutgerinnung bei der Behandlung von Patienten mit dem FPAD-Verfahren führten. Die Ergebnisse der klinischen Studie zeigten, eine höhere Abtrennraten der proteingebundenen Urämie-Toxine in der FPAD-Gruppe als in der Hämodialyse-Gruppe. Die Behandlung chronisch-niereninsuffizienter Patienten mit dem FPAD-Verfahren ist daher im Bezug auf die Eliminierung proteingebundener Urämie-Toxine der klassischen Hämodialyse deutlich überlegen. Der Adsorberkreislauf hat dabei einen übergeordneten Einfluss auf die Gesamtreaktion von Phenyllessigsäure, Indoxylsulfat und p-Kresylsulfat, der nachgeschaltete Hämodialysekreislauf hat einen untergeordneten Einfluss auf die Entfernung der proteingebundenen Urämie-Toxine (**Abbildung 53**). Würde die Hämodialyseeinheit vor den Adsorberkreislauf platziert werden, also die Geometrie der existierenden FPAD-Einheit umgekehrt werden, ließe sich die Abtrennung möglicherweise weiter verbessern, da die Kapazität der Adsorber über einen längeren Behandlungszeitraum zu Verfügung stehen würde. Aufgrund der chemischen Heterogenität der proteingebundenen Urämie-Toxine, der patientenspezifischen Initial-Konzentrationsverteilung waren die Bewertungen über eine größere Effektivität des neutralen oder des kationischen Adsorbers uneinheitlich. Die Erkenntnisse der *in vitro* Versuchsreihen können für die Bewertung nur eingeschränkt verwendet werden, da die Adsorber einzeln hinsichtlich der Retentionsvermögen untersucht wurden und drei parallel verwendete proteingebundene Urämie-Toxine die native Situation mit ca. 100 bekannten [1, 40, 41] und möglicherweise ebenso vielen unbekanntem Urämie-Toxinen nicht widerspiegelt. In der komplexen, nativen Situation sind weitere Einflüsse wie Verdrängungseffekte durch Besetzung der Bindungsstellen der Adsorber sowie Konzentrationsverteilungen von Relevanz. Arbeiten von Meijers et al. zeigten, dass zumindest p-Kresylsulfat zu 70 % durch den kationischen Anionenaustauscher retendiert wurde [127]. Die *in vitro*-Versuchsreihen zur Adsorptionscharakterisierung sind somit konform mit diesen Arbeiten. Die Behandlung der Patienten mit dem FPAD-Verfahren resultierte in der vermehrten Abtrennung von Phenyllessigsäure, Indoxylsulfat und p-Kresylsulfat. Aufgrund hoher Gewebekonzentration der proteingebundenen Urämie-Toxine wurde ein starker Rückstrom der Urämie-Toxine in das Blut durch Equilibrierungseffekte beobachtet. Drei Tage nach der einmaligen FPAD-Behandlung waren daher Konzentrationen der Urämie-Toxine erreicht, die denen vor der Behandlung entsprachen (**Abbildung 54**). Darüber hinaus könnten die raschen Equilibrierungseffekte der Urämie-Toxine nach der FPAD-Behandlung durch eine Auslastung der Adsorberkapazität begründet sein. Die Gesamtmenge der beschriebenen Urä-

mie-Toxine, die im Körper eines chronisch-niereninsuffizienten Patienten zirkulieren, macht eine Urämie-Toxin-Menge im Grammbereich aus [1, 40, 41]. Daher ist ein Erreichen der Kapazitätsgrenzen der Adsorber im Rahmen einer vierstündigen Behandlung ein möglicher Grund. Regelmäßige Behandlungen mit dem FPAD-Verfahren könnten somit dazu beitragen, die Gesamtmenge an Urämie-Toxinen im Patienten zu reduzieren.

Die FPAD-Behandlung und die konventionelle Hämodialyse zeigten einen vergleichbaren Einfluss auf die untersuchten biochemischen Parameter Kortisol, Trijodthyronin oder Gesamtplasmaproteine, sodass nicht von einer zusätzlichen Belastung für die Patienten auszugehen ist. Nichtsdestotrotz klagten drei von fünf Patienten der FPAD-Gruppe nach der Hälfte der Behandlungszeit über Nausea. Vermutlich führte die rasche Senkung der Konzentration der proteingebundenen Urämie-Toxine aus dem Blut zu Equilibrierungsvorgängen im Körper des Patienten, wodurch das klinische Syndrom der Nausea verursacht worden ist. Eine regelmäßige FPAD-Behandlung wird die Gesamtkonzentration der proteingebundenen Urämie-Toxine langfristig senken, sodass die Equilibrierungsvorgänge gesenkt werden und Seiteneffekte der Behandlung wie Nausea reduziert werden. Da der Großteil der proteingebundenen Urämie-Toxine in den ersten 2 h der Behandlung aus dem Blut der Patienten entfernt wurde, könnte in folgenden Studien eine verkürzte Behandlungszeit verwendet werden, um auf diese Weise große Equilibrierungsvorgänge vermeiden zu können.

Die hier dargestellten Ergebnisse sind Grundlage für eine längerfristige klinische Studie, die im Rahmen einer einmal pro Woche durchgeführten FPAD-Behandlung über einen sechswöchigen Behandlungszeitraum mit einem erweiterten Patientenkollektiv an der medizinischen Klinik IV der Charité durchgeführt wird.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der Einsatz von adsorber-basierten Verfahren in der extrakorporalen Nierenersatztherapie aufgrund der verbesserten Abtrennraten proteingebundener Urämie-Toxine längerfristig das Leben und Überleben von chronisch-niereninsuffizienten Patienten verbessern könnte.

6. Zusammenfassung

Die extrakorporale Nierenersatztherapie ist gegenwärtig das Verfahren der Wahl zur Behandlung von chronischen Nierenversagen, sofern kein Spenderorgan zu Verfügung steht und somit eine Nierentransplantation nicht möglich ist. Rezente Nierenersatztherapie-Verfahren nutzen diffusive und konvektive Filtrationsprozesse zur Reinigung des Blutes. Allen Verfahren gemein ist, dass sie auf die Abtrennung von wasserlöslichen und niedermolekularen Substanzen optimiert sind und durch die Limitierung der Porengrößen der Dialysmembranen und die Verwendung wässriger Dialysate hydrophobe, proteingebundene Urämie-Toxine nur unzureichend entfernen können. Chronisch-niereninsuffiziente Patientengruppen weisen aufgrund der unzureichenden Abtrennung von proteingebundenen Urämie-Toxinen eine vermehrte kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität auf. Proteingebundene Urämie-Toxine wie Phenyllessigsäure, Indoxylsulfat und p-Kresylsulfat führen zum Beispiel zu Veränderungen der Gefäßtonus-Regulation, Arteriosklerose und zu endothelialer Dysfunktion. Um das Leben und Überleben dieser Patientengruppe zu verbessern, ist die Entwicklung von neuartigen und ergänzenden Verfahren zur verbesserten Abtrennung dieser proteingebundenen Urämie-Toxine von besonderer Relevanz. Für die Entwicklung von Therapieverfahren, die verbesserte Abtrennraten proteingebundener Urämie-Toxine im Vergleich zu konventionellen Verfahren aufweisen, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit physikochemische Methoden entwickelt, die die Assoziation zwischen Protein und Urämie-Toxin vermindern und dadurch den dialysierbaren ungebundenen Anteil dieser Substanzen vergrößern. In einem neu entwickelten Dialyseverfahren wurde die Wechselwirkung proteingebundener Urämie-Toxine mit Plasmaproteinen durch eine erhöhte Ionenstärke vermindert, wodurch der ungebundene Anteil der Urämie-Toxine vergrößert wurde. Die ungebundenen Urämie-Toxine wurden dialytisch entfernt, sodass verbesserte Abtrennraten proteingebundener Urämie-Toxine ermöglicht wurden. Da die Ionenstärke in einem Maße erhöht wurde, ohne Plasmaproteine und Blutzellen zu schädigen, wurden die Grundlagen für ein sicheres und den konventionellen Verfahren überlegenes Hämodialyseverfahren etabliert. In Adaptierung wurde aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ein Behandlungsverfahren entwickelt, bei dem durch die Infusion einer hypertonen Kochsalzlösung die Ionenstärke innerhalb des Hämodialysators erhöht wird und proteingebundene Urämie-Toxine im Vergleich zu konventionellen Dialyseverfahren verbessert abgetrennt werden. Das neu entwickelte Verfahren wird gegenwärtig im Tiermodell validiert und stellt somit ein alternatives Hämodialyseverfahren mit vermehrter Abtrennung proteingebundener Urämie-Toxine dar.

Weiterhin wurde mit Hilfe hochfrequenter elektromagnetischer Felder die Wechselwirkung

zwischen Urämie-Toxinen und Plasmaproteinen vermindert, wodurch ein größerer Anteil der proteingebundenen Urämie-Toxine im ungebundenen Zustand vorlag und dialytisch abtrennbar war. Um elektromagnetische Feldfrequenzen zu identifizieren, in deren Anwesenheit proteingebundene Urämie-Toxine vermehrt aus der Proteinassoziation freigesetzt werden, wurde ein Testsystem entwickelt, bei dem konventionelle Dialysatoren und Schlauchsysteme verwendet werden, um das Verfahren der klinischen Verwendung zugänglich zu machen. Durch die entwickelte Automatisierung Versuchsdurchführungen konnten die Versuchsparameter optimiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass in Anwesenheit hochfrequenter elektromagnetischer Felder proteingebundene Urämie-Toxine innerhalb eines konventionellen Hämodialysators aus der Proteinbindung freigesetzt und dialytisch abgetrennt werden. Dies führte zu einer erhöhten Abtrennrates der proteingebundenen Urämie-Toxine. Darüber hinaus konnte die verwendeten HF-Felder dieses Verfahrens als biologisch unbedenklich verifiziert werden, da keine Beeinflussung der Funktionalität und Strukturintegrität der Plasmaproteine auftrat. Das neu etablierte Dialyseverfahren in Anwesenheit elektromagnetischer HF-Felder wird gegenwärtig in einem weiteren Entwicklungsschritt im Tiermodell validiert und verifiziert.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein drittes Verfahren entwickelt, das ein extrakorporales, adsorber-basiertes Verfahren darstellt. Es konnte gezeigt werden, dass die Verwendung hydrophober Neutral-Adsorber und kationischer Anionenaustauscher aromatische und anionische proteingebundene Urämie-Toxine effektiv aus einer Proteinlösung entfernt. Daher wurde der Einsatz eines adsorber-basierten Verfahrens im Rahmen einer klinischen Studie in der extrakorporalen Nierenersatztherapie validiert. Das FPAD-Verfahren, das aus einer Kombination eines Adsorberkreislaufs und einer konventionellen Hämodialyse aufgebaut ist, konnte die proteingebundenen Urämie-Toxine Phenyllessigsäure, Indoxylsulfat und p-Kresylsulfat signifikant verbessert abtrennen als eine konventionelle Hämodialyse. Der Adsorberkreislauf des FPAD-Verfahrens, der aus einem hydrophoben Neutral-Adsorber und einem kationischen Anionenaustauscher aufgebaut ist, war dabei maßgeblich für die gesteigerte Abtrennung von Phenyllessigsäure, Indoxylsulfat und p-Kresylsulfat im Vergleich zur konventionellen Hämodialysetherapie. Die folgende konventionelle Hämodialyse des FPAD-Verfahrens hatte einen untergeordneten Einfluss auf die Abtrennung der proteingebundenen Urämie-Toxine. Zur weiteren Validierung wird aktuell eine weitere klinische Studie an der Charité durchgeführt, bei der bisher zwei von 10 chronisch-niereninsuffizienten Patienten über einen sechswöchigen Behandlungszeitraum einmal wöchentlich mit dem FPAD-Verfahren behandelt wurden, um die Trennleistung des FPAD-Verfahrens in einem größeren Patientenkollektiv zu bestimmen und langfristige Effekte der verbesserten Abtrennung proteingebundener Urämie-Toxine auf das klinische Langzeitergebnis der Patienten zu untersuchen.

chen.

Da die proteingebundenen Urämie-Toxine einen großen Einfluss auf die Morbidität und Mortalität von chronisch-niereninsuffizienten Patienten ausüben, ist die Entwicklung von extrakorporalen Verfahren voranzutreiben, um proteingebundene Urämie-Toxine verbessert abtrennen zu können. Im Rahmen dieser Arbeit konnten drei Verfahren, die im Vergleich zu den konventionellen Verfahren über überlegende Abtrennraten von proteingebundenen Urämie-Toxinen verfügen, entwickelt und zur klinischen Anwendung gebracht werden.

7. Summary

Conventional extracorporeal renal replacement therapies are currently the major treatment forms of chronic kidney disease (CKD), if either kidney transplantations are not possible or to bridge the time gap until a donor organ is available. Extracorporeal blood-cleaning is based on diffusive and convective processes through the dialysis membrane. Conventional methods have in common that they are optimized on removal of water-soluble and low molecular-weight substances. Whereas water-soluble and low molecular-weight uremic toxins are cleared sufficiently by conventional dialysis, the removal of middle-molecular uremic toxins and hydrophobic protein-bound uremic toxins is insufficient. While the clearance of middle-molecular uremic toxins has been improved during the recent years by increasing the pore sizes of the dialysis membranes, the removal of hydrophobic protein-bound uremic toxins, which show macromolecules characteristics, is still deficient. Protein-bound uremic toxins accumulate in patients with chronic kidney diseases and seem to have a major impact on the progression of chronic kidney disease and cardiovascular disease (CVD). Renal failure patients have an increased cardiovascular morbidity and mortality due the inadequate clearance of protein-bound uremic toxins. Protein-bound uremic toxins induce changes in the vascular tone regulation, atherosclerosis and promote endothelial dysfunction. In order to improve live and survival of these patients the development of novel dialysis treatments for an enhanced removal of hydrophobic protein-bound uremic toxins is of high relevance. The novel dialysis treatments that have been developed in the present thesis are based on physicochemical methods, focusing on the reduction of the binding between proteins and uremic toxins. In a novel dialysis procedure the association of protein-bound uremic toxins to plasma proteins was reduced by an increased ionic strength, in order to increase the unbound fraction of uremic toxins. The unbound uremic toxins were removed by dialysis, so improved removal rates of protein-bound uremic toxins were realized. While the ionic strength was increased to an extent without inducing damages to plasma proteins and blood cells, the foundations for a secure method were developed with superior characteristics compared to conventional hemodialysis. In adaptation of the results of the present study, a treatment method was developed, in which a hypertonic saline infusion is used to increase the ionic strength within the hemodialyzer in order to remove protein-bound uremic toxins superior to conventional dialysis. The novel treatment method is evaluated next in an animal model, before a clinical application is realized. Therefore this novel dialysis procedure with improved removal of protein-bound uremic toxins represents an alternative to conventional treatment forms.

In addition, high-frequency electromagnetic fields were used to reduce the association between proteins and uremic toxins. Thereby the unbound state of protein-bound uremic toxins was increased and was separated by dialysis. A test system was developed and established to identify high-frequency electromagnetic field-frequencies, that release protein-bound uremic toxins from protein-binding. This test system is based on conventional dialyzers and tubing, to make the novel method accessible to clinical treatment of chronic kidney diseases patients. These studies were automated to identify high-frequency electromagnetic fields and optimize the experimental parameters. To validate the separation efficiency of this novel method in a clinical scale, conventional hemodialyzer are inserted into the high frequency electromagnetic fields. In presence of high-frequency electromagnetic fields within a conventional hemodialyzer protein-bound uremic toxins were released from their protein bindings and were increasingly removed by dialysis. This in turn led to improved separation rate of protein-bound uremic toxins. Moreover, it was shown that high frequency electromagnetic fields are biologically safe, since they had no effect on the function and structure integrity of the plasma proteins. This novel dialysis method with improved removal of protein-bound uremic toxins in presence of high frequency electromagnetic fields will be validated and verified in an animal model as a further development step.

A third method was developed, representing an extracorporeal adsorber-based therapy. It has been shown that the use of a hydrophobic neutral adsorbent and a cationic anion exchanger effectively removes anionic, aromatic and protein-bound uremic toxins from a protein solution. Hence an adsorber-based method was validated in renal replacement within a clinical study. It has been shown that the FPAD-therapy, which is a combination of a adsorber-circuit and a conventional hemodialysis, removes protein-bound uremic toxins like phenylacetic acid, indoxyl sulfate and p-cresyl sulfate significantly better than conventional renal replacement. The adsorber circuit of the FPAD, consisting of a hydrophobic neutral adsorber and a cationic anion exchanger, had the major impact on the improved removal of protein-bound uremic toxins in comparison to conventional dialysis therapy. The hemodialysis unit of the FPAD had a minor impact on the removal of protein-bound uremic toxins. For further validation, a clinical study is performed within the Charité: Two of ten patients with chronic renal failure have been treated so far once the week with FPAD-therapy during a six-week time period in order to evaluate the removal rates of protein-bound uremic toxins in a larger patient collective. Thus long-term effects of improved removal of uremic toxins are investigated on the clinical outcome of these patients. Since protein-bound uremic toxins exert major impacts on the morbidity and mortality of chronic renal failure patients, the development of improved extracorporeal methods with enhanced removal of protein-bound uremic toxins has to be promoted. In the present thesis, three methods were described from

the development to clinical applications that have superior removal rates of protein-bound uremic toxins, in comparison to the conventional dialysis.

8. Wissenschaftliche Veröffentlichungen

8.1 Wissenschaftliche Artikel

Brettschneider, F., et al., *Replacement of acetonitrile by ethanol as solvent in reversed phase chromatography of biomolecules*. J. Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2010. 878 (9-10): p. 763-68.

Brettschneider, F., et al., Removal of Protein-Bound, Hydrophobic Uremic Toxins by a Combined Fractionated Plasma Separation and Adsorption Technique. Artif. Organs, 2013.

37 (4): p. 409-16

Manuskript: Brettschneider, F., et al. Hypertonic sodium chloride infusion increases the removal of protein-bound uremic toxins in in vitro extracorporeal Dialysis therapy. In Vorbereitung

8.2 Präsentationen

Brettschneider, F., et al., An Increased Permeability of the Dialyser Membrane Has a Positive Effect on the Removal Rate of the Protein-Bound Uremic Toxins Phenylacetic Acid and p-Cresylsulfate. Kidney Week 2012 American Society of Nephrology in San Diego, CA, USA:

8.3 Patente

PCT-Patent: Dialyseverfahren zur Entfernung proteingebundener Toxine aus dem Blut von akut oder chronisch-niereninsuffizienten Patienten (PCT/EP2012/062658)

PCT-Patent: Dialyseverfahren zur Entfernung proteingebundener Toxine aus dem Blut von Patienten unter Einsatz hochfrequenter, elektromagnetischer Felder (PCT/EP2012/062657)

9. Literaturverzeichnis

1. Vanholder, R., et al., Review on uremic toxins: classification, concentration, and interindividual variability. *Kidney Int*, 2003. **63**(5): p. 1934-43.
2. Boure, T. and R. Vanholder, *Biochemical and clinical evidence for uremic toxicity*. *Artif Organs*, 2004. **28**(3): p. 248-53.
3. Walb, D., F.C. Luft, and U. Kuhlmann, *Nephrologie: Pathophysiologie - Klinik - Nierenersatzverfahren*. Vol. 5. 2008, Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag KG. 720.
4. Depner, T.A., *Uremic toxicity: urea and beyond*. *Semin Dial*, 2001. **14**(4): p. 246-51.
5. Meyer, T.W. and T.H. Hostetter, *Uremia*. *N Engl J Med*, 2007. **357**(13): p. 1316-25.
6. Dirks, J.H., et al., Prevention of chronic kidney and vascular disease: toward global health equity--the Bellagio 2004 Declaration. *Kidney Int Suppl*, 2005. **68**(98): p. 1-6.
7. Schieppati, A. and G. Remuzzi, Chronic renal diseases as a public health problem: epidemiology, social, and economic implications. *Kidney Int Suppl*, 2005. **68**(98): p. S7-S10.
8. Stel, V.S., et al., *The 2008 ERA-EDTA Registry Annual Report-a precis*. *NDT Plus*, 2011. **4**(1): p. 1-13.
9. Tesouro, M., et al., Metabolic syndrome, chronic kidney, and cardiovascular diseases: role of adipokines. *Cardiol Res Pract*, 2011. **2011**: p. 1-11.
10. Tesouro, M. and C. Cardillo, *Obesity, blood vessels and metabolic syndrome*. *Acta Physiol (Oxf)*, 2011. **203**(1): p. 279-86.
11. Udani, S., I. Lazich, and G.L. Bakris, *Epidemiology of hypertensive kidney disease*. *Nat Rev Nephrol*, 2011. **7**(1): p. 11-21.
12. Foley, R.N., *Cardiovascular disease and survival in ESRD*. *Saudi J Kidney Dis Transpl*, 1999. **10**(4): p. 455-63.
13. Kundhal, K. and C.E. Lok, *Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic kidney disease*. *Nephron Clin Pract*, 2005. **101**(2): p. 47-52.
14. Burrows, N.R., et al., Incidence of end-stage renal disease attributed to diabetes among persons with diagnosed diabetes --- United States and Puerto Rico, 1996-2007. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2010. **59**(42): p. 1361-6.
15. Parfrey, P.S. and R.N. Foley, *The clinical epidemiology of cardiac disease in chronic renal failure*. *J Am Soc Nephrol*, 1999. **10**(7): p. 1606-15.

16. Bammens, B., et al., Free serum concentrations of the protein-bound retention solute p-cresol predict mortality in hemodialysis patients. *Kidney Int*, 2006. **69**(6): p. 1081-7.
17. Jankowski, J., et al., Increased plasma phenylacetic acid in patients with end-stage renal failure inhibits iNOS expression. *J Clin Invest*, 2003. **112**(2): p. 256-64.
18. Meijers, B.K., et al., Free p-cresol is associated with cardiovascular disease in hemodialysis patients. *Kidney Int*, 2008. **73**(10): p. 1174-80.
19. Seliger, S.L., et al., Elevated risk of stroke among patients with end-stage renal disease. *Kidney Int*, 2003. **64**(2): p. 603-9.
20. Zoccali, C., Traditional and emerging cardiovascular and renal risk factors: an epidemiologic perspective. *Kidney Int*, 2006. **70**(1): p. 26-33.
21. Dhondt, A., et al., *The removal of uremic toxins*. *Kidney Int Suppl*, 2000. **76**(-): p. S47-59.
22. Lesaffer, G., et al., Intradialytic removal of protein-bound uraemic toxins: role of solute characteristics and of dialyser membrane. *Nephrol Dial Transplant*, 2000. **15**(1): p. 50-7.
23. Martinez, A.W., et al., *Removal of P-cresol sulfate by hemodialysis*. *J Am Soc Nephrol*, 2005. **16**(11): p. 3430-6.
24. Jourde-Chiche, N., et al., *Protein-bound toxins--update 2009*. *Semin Dial*, 2009. **22**(4): p. 334-9.
25. Niwa, T., et al., Accumulation of indoxyl sulfate, an inhibitor of drug-binding, in uremic serum as demonstrated by internal-surface reversed-phase liquid chromatography. *Clin Chem*, 1988. **34**(11): p. 2264-7.
26. Stanfel, L.A., P.F. Gulyassy, and E.A. Jarrard, Determination of indoxyl sulfate in plasma of patients with renal failure by use of ion-pairing liquid chromatography. *Clin Chem*, 1986. **32**(6): p. 938-42.
27. De Smet, R., et al., Toxicity of free p-cresol: a prospective and cross-sectional analysis. *Clin Chem*, 2003. **49**(3): p. 470-8.
28. Bammens, B., et al., Removal of middle molecules and protein-bound solutes by peritoneal dialysis and relation with uremic symptoms. *Kidney Int*, 2003. **64**(6): p. 2238-43.
29. Canaud, B., et al., Overview of clinical studies in hemodiafiltration: what do we need now ? *Hemodial Int*, 2006. **10 Suppl 1**: p. 5-12.
30. Leber, H.W., et al., Hemodiafiltration: a new alternative to hemofiltration and conventional hemodialysis. *Artif Organs*, 1978. **2**(2): p. 150-3.

31. Ledebø, I., Development of hemodiafiltration therapy--a historical perspective. *Blood Purif*, 2013. **35 Suppl 1**: p. 6-10.
32. Ward, R.A., et al., A comparison of on-line hemodiafiltration and high-flux hemodialysis: a prospective clinical study. *J Am Soc Nephrol*, 2000. **11**(12): p. 2344-50.
33. Higuchi, A., et al., Chemically modified polysulfone hollow fibers with vinylpyrrolidone having improved blood compatibility. *Biomaterials*, 2002. **23**(13): p. 2659-66.
34. Hayama, M., et al., How polysulfone dialysis membranes containing polyvinylpyrrolidone achieve excellent biocompatibility? *Journal of membrane science*, 2004. **234**(1-2): p. 41-49.
35. Cheung, A.K., et al., Effects of high-flux hemodialysis on clinical outcomes: results of the HEMO study. *J Am Soc Nephrol*, 2003. **14**(12): p. 3251-63.
36. Chan, C.T., et al., Regression of left ventricular hypertrophy after conversion to nocturnal hemodialysis. *Kidney Int*, 2002. **61**(6): p. 2235-9.
37. Culeton, B.F., et al., Effect of frequent nocturnal hemodialysis vs conventional hemodialysis on left ventricular mass and quality of life: a randomized controlled trial. *JAMA*, 2007. **298**(11): p. 1291-9.
38. Pierratos, A., et al., *Nocturnal hemodialysis: three-year experience*. *J Am Soc Nephrol*, 1998. **9**(5): p. 859-68.
39. Neiryck, N., et al., *An update on uremic toxins*. *Int Urol Nephrol*, 2013. **45**(1): p. 139-50.
40. Vanholder, R., S. Van Laecke, and G. Glorieux, *What is new in uremic toxicity?* *Pediatr Nephrol*, 2008. **23**(8): p. 1211-21.
41. Durantou, F., et al., *Normal and pathologic concentrations of uremic toxins*. *J Am Soc Nephrol*, 2012. **23**(7): p. 1258-70.
42. Vanholder, R., R. De Smet, and N. Lameire, *Protein-bound uremic solutes: the forgotten toxins*. *Kidney Int Suppl*, 2001. **78**: p. 266-70.
43. Eknoyan, G., et al., Effect of dialysis dose and membrane flux in maintenance hemodialysis. *N Engl J Med*, 2002. **347**(25): p. 2010-9.
44. Depner, T.A., et al., Is Kt/V urea a satisfactory measure for dosing the newer dialysis regimens? *Semin Dial*, 2001. **14**(1): p. 8-21.
45. Locatelli, F., S. Di Filippo, and C. Manzoni, *Clinical aspects of haemodiafiltration*. *Contrib Nephrol*, 2007. **158**(-): p. 185-93.

46. Liabeuf, S., T.B. Drueke, and Z.A. Massy, *Protein-bound uremic toxins: new insight from clinical studies*. Toxins (Basel), 2011. **3**(7): p. 911-9.
47. Vanholder, R., et al., *Survival of hemodialysis patients and uremic toxin removal*. Artif Organs, 2003. **27**(3): p. 218-23.
48. James, M.O., et al., The conjugation of phenylacetic acid in man, sub-human primates and some non-primate species. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1972. **182**(66): p. 25-35.
49. Karoum, F., et al., Phenylacetic acid excretion in schizophrenia and depression: the origins of PAA in man. Biol Psychiatry, 1984. **19**(2): p. 165-78.
50. O'Neil, M.J., *The Merck Index*. Vol. 13. 2001: Merck Publishing Group. 2564.
51. O'Reilly, R.L. and B.A. Davis, *Phenylethylamine and schizophrenia*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 1994. **18**(1): p. 63-75.
52. Szabo, A., E. Billett, and J. Turner, *Phenylethylamine, a possible link to the antidepressant effects of exercise?* Br J Sports Med, 2001. **35**(5): p. 342-3.
53. Furchgott, R.F., *Introduction to EDRF research*. J Cardiovasc Pharmacol, 1993. **22 Suppl 7**(7): p. 1-2.
54. Furchgott, R.F. and J.V. Zawadzki, The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature, 1980. **288**(5789): p. 373-6.
55. Hutchinson, P.J., R.M. Palmer, and S. Moncada, *Comparative pharmacology of EDRF and nitric oxide on vascular strips*. Eur J Pharmacol, 1987. **141**(3): p. 445-51.
56. Ignarro, L.J., et al., Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(24): p. 9265-9.
57. Palmer, R.M., A.G. Ferrige, and S. Moncada, Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. Nature, 1987. **327**(6122): p. 524-6.
58. Jankowski, J., et al., Characterization of dimethylguanosine, phenylethylamine, and phenylacetic acid as inhibitors of Ca²⁺ ATPase in end-stage renal failure. J Am Soc Nephrol, 1998. **9**(7): p. 1249-57.
59. Arieff, A.I. and S.G. Massry, Calcium metabolism of brain in acute renal failure. Effects of uremia, hemodialysis, and parathyroid hormone. J Clin Invest, 1974. **53**(2): p. 387-92.
60. Cooper, J.D., V.C. Lazarowitz, and A.I. Arieff, *Neurodiagnostic abnormalities in patients with acute renal failure*. J Clin Invest, 1978. **61**(6): p. 1448-55.

61. Schmidt, S., et al., *The uraemic toxin phenylacetic acid impairs macrophage function*. Nephrol Dial Transplant, 2008. **23**(11): p. 3485-93.
62. Scholze, A., et al., Phenylacetic acid and arterial vascular properties in patients with chronic kidney disease stage 5 on hemodialysis therapy. Nephron Clin Pract, 2007. **107**(1): p. 1-6.
63. Morita, M., et al., Phenylacetic acid stimulates reactive oxygen species generation and tumor necrosis factor-alpha secretion in vascular endothelial cells. Ther Apher Dial, 2011. **15**(2): p. 147-50.
64. Curtius, H.C., M. Mettler, and L. Ettliger, Study of the intestinal tyrosine metabolism using stable isotopes and gas chromatography-mass spectrometry. J Chromatogr, 1976. **126**(-): p. 569-80.
65. de Loor, H., et al., Gas chromatographic-mass spectrometric analysis for measurement of p-cresol and its conjugated metabolites in uremic and normal serum. Clin Chem, 2005. **51**(8): p. 1535-8.
66. Meijers, B.K., et al., *p-Cresyl sulfate and indoxyl sulfate in hemodialysis patients*. Clin J Am Soc Nephrol, 2009. **4**(12): p. 1932-8.
67. Vanholder, R., et al., *Warning: the unfortunate end of p-cresol as a uraemic toxin*. Nephrol Dial Transplant, 2011. **26**(5): p. 1464-7.
68. Miyamoto, Y., et al., Organic anion transporters play an important role in the uptake of p-cresyl sulfate, a uremic toxin, in the kidney. Nephrol Dial Transplant, 2011. **26**(8): p. 2498-502.
69. Wu, I.W., et al., p-Cresyl sulphate and indoxyl sulphate predict progression of chronic kidney disease. Nephrol Dial Transplant, 2011. **26**(3): p. 938-47.
70. Schepers, E., et al., P-cresylsulphate, the main in vivo metabolite of p-cresol, activates leucocyte free radical production. Nephrol Dial Transplant, 2007. **22**(2): p. 592-6.
71. Meijers, B.K., et al., The uremic retention solute p-cresyl sulfate and markers of endothelial damage. Am J Kidney Dis, 2009. **54**(5): p. 891-901.
72. Vanholder, R., et al., *Uremic toxicity: present state of the art*. Int J Artif Organs, 2001. **24**(10): p. 695-725.
73. Vanholder, R., et al., *Chronic kidney disease as cause of cardiovascular morbidity and mortality*. Nephrol Dial Transplant, 2005. **20**(6): p. 1048-56.
74. Wikoff, W.R., et al., Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on

- mammalian blood metabolites. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(10): p. 3698-703.
75. Niwa, T. and M. Ise, Indoxyl sulfate, a circulating uremic toxin, stimulates the progression of glomerular sclerosis. J Lab Clin Med, 1994. **124**(1): p. 96-104.
76. Niwa, T., M. Ise, and T. Miyazaki, Progression of glomerular sclerosis in experimental uremic rats by administration of indole, a precursor of indoxyl sulfate. Am J Nephrol, 1994. **14**(3): p. 207-12.
77. Kawakami, T., et al., Indoxyl sulfate inhibits proliferation of human proximal tubular cells via endoplasmic reticulum stress. Am J Physiol Renal Physiol, 2010. **299**(3): p. 568-76.
78. Yu, M., Y.J. Kim, and D.H. Kang, Indoxyl sulfate-induced endothelial dysfunction in patients with chronic kidney disease via an induction of oxidative stress. Clin J Am Soc Nephrol, 2011. **6**(1): p. 30-9.
79. Taki, K., Y. Tsuruta, and T. Niwa, *Indoxyl sulfate and atherosclerotic risk factors in hemodialysis patients*. Am J Nephrol, 2007. **27**(1): p. 30-5.
80. Chen, N.X. and S.M. Moe, *Vascular calcification in chronic kidney disease*. Semin Nephrol, 2004. **24**(1): p. 61-8.
81. Chen, N.X., et al., Phosphorus and uremic serum up-regulate osteopontin expression in vascular smooth muscle cells. Kidney Int, 2002. **62**(5): p. 1724-31.
82. Lindberg, J.S., et al., The calcimimetic AMG 073 reduces parathyroid hormone and calcium x phosphorus in secondary hyperparathyroidism. Kidney Int, 2003. **63**(1): p. 248-54.
83. Moe, S.M. and N.X. Chen, *[Vascular calcification in end stage renal disease]*. Clin Calcium, 2002. **12**(10): p. 1417-22.
84. Moe, S.M., et al., Uremia induces the osteoblast differentiation factor Cbfa1 in human blood vessels. Kidney Int, 2003. **63**(3): p. 1003-11.
85. Moe, S.M., et al., Medial artery calcification in ESRD patients is associated with deposition of bone matrix proteins. Kidney Int, 2002. **61**(2): p. 638-47.
86. Motojima, M., et al., Uremic toxins of organic anions up-regulate PAI-1 expression by induction of NF-kappaB and free radical in proximal tubular cells. Kidney Int, 2003. **63**(5): p. 1671-80.
87. Dou, L., et al., The uremic solute indoxyl sulfate induces oxidative stress in endothelial cells. J Thromb Haemost, 2007. **5**(6): p. 1302-8.
88. Motojima, M., et al., Uraemic toxins induce proximal tubular injury via organic anion transporter 1-mediated uptake. Br J Pharmacol, 2002. **135**(2): p. 555-63.

89. Jankowski, J., et al., Characterization of p-hydroxy-hippuric acid as an inhibitor of Ca²⁺-ATPase in end-stage renal failure. *Kidney Int Suppl*, 2001. **78**(-): p. 84-8.
90. Cohen, G., et al., The uraemic retention solute para-hydroxy-hippuric acid attenuates apoptosis of polymorphonuclear leukocytes from healthy subjects but not from haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*, 2008. **23**(8): p. 2512-9.
91. Eloit, S., et al., Impact of hemodialysis duration on the removal of uremic retention solutes. *Kidney Int*, 2008. **73**(6): p. 765-70.
92. Vanholder, R.C. and S.M. Ringoir, *Adequacy of dialysis: a critical analysis*. *Kidney Int*, 1992. **42**(3): p. 540-58.
93. Winchester, J.F., T.H. Hostetter, and T.W. Meyer, *p-Cresol sulfate: further understanding of its cardiovascular disease potential in CKD*. *Am J Kidney Dis*, 2009. **54**(5): p. 792-4.
94. Brettschneider, F., Untersuchungen zur Proteinbindung des Urämietoxins Phenyllessigsäure in humanen Plasma (Diplomarbeit), in Fachbereich Chemie, Biochemie. 2007, Freie Univesität Berlin. p. 78.
95. Horvath, C. and W. Melander, Liquid-Chromatography with Hydrocarbonaceous Bonded Phases - Theory and Practice of Reversed Phase Chromatography. *Journal of Chromatographic Science*, 1977. **15**(9): p. 393-404.
96. Brettschneider, F., et al., *Replacement of acetonitrile by ethanol as solvent in reversed phase chromatography of biomolecules*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2010. **878**(9-10): p. 763-8.
97. Pitt, J.J., Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *Clin Biochem Rev*, 2009. **30**(1): p. 19-34.
98. Purcell, E.M., H.C. Torrey, and R.V. Pound, *Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Solid*. *Physical Review*, 1946. **69**(1-2): p. 37-38.
99. Bloch, F. and W.W. Hansen, *Nuclear Induction*. *Phys Rev.*, 1946. **69**: p. 127.
100. Nicholson, J.K., M.J. Buckingham, and P.J. Sadler, *High resolution 1H n.m.r. studies of vertebrate blood and plasma*. *Biochem J*, 1983. **211**(3): p. 605-15.
101. Holmes, E., et al., 750 MHz 1H NMR spectroscopy characterisation of the complex metabolic pattern of urine from patients with inborn errors of metabolism: 2-hydroxyglutaric aciduria and maple syrup urine disease. *J Pharm Biomed Anal*, 1997. **15**(11): p. 1647-59.
102. Feigenbaum, J. and C.A. Neuberger, *Simplified method for the preparation of aromatic*

- sulfuric acid esters*. Journal of the American Chemical Society, 1941. **63**(12): p. 3529-30.
103. Cripps, C.M., Rapid method for the estimation of plasma haemoglobin levels. J Clin Pathol, 1968. **21**(1): p. 110-2.
104. Baumann, E., *Ueber eine einfache Methode der Darstellung von Benzoësäureäthern*. Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, 1886. **19**(2): p. 3218-22.
105. Becker, H.G.O., et al., *Organikum 21*. . Vol. 21. 2001, Weinheim: Wiley-VCH. 852.
106. Schotten, C., *Ueber die Oxydation des Piperidins*. Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, 1884. **17**(2): p. 2544-7.
107. Adijang, A., et al., Indoxyl sulphate promotes aortic calcification with expression of osteoblast-specific proteins in hypertensive rats. Nephrol Dial Transplant, 2008. **23**(6): p. 1892-901.
108. Dorsey, J.G., et al., *Liquid chromatography: theory and methodology*. Anal Chem, 1994. **66**(12): p. 500-46.
109. Margaron, M.P. and N. Soni, *Serum albumin: touchstone or totem?* Anaesthesia, 1998. **53**(8): p. 789-803.
110. Bar-Or, D., et al., *The cobalt-albumin binding assay: insights into its mode of action*. Clin Chim Acta, 2008. **387**(1-2): p. 120-7.
111. Curry, S., P. Brick, and N.P. Franks, *Fatty acid binding to human serum albumin: new insights from crystallographic studies*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1441**(2-3): p. 131-40.
112. Docter, R., et al., Specific thyroxine binding albumin is a constituent of normal human serum. Lancet, 1984. **1**(8367): p. 50.
113. Jacobsen, J. and R. Brodersen, *Albumin-bilirubin binding mechanism*. J Biol Chem, 1983. **258**(10): p. 6319-26.
114. Kragh-Hansen, U., Structure and ligand binding properties of human serum albumin. Dan Med Bull, 1990. **37**(1): p. 57-84.
115. Kragh-Hansen, U., et al., *Hormone binding to natural mutants of human serum albumin*. Eur J Biochem, 1990. **193**(1): p. 169-74.
116. Fasano, M., et al., The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin. IUBMB Life, 2005. **57**(12): p. 787-96.
117. Sudlow, G., D.J. Birkett, and D.N. Wade, *The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin*. Mol Pharmacol, 1975. **11**(6): p. 824-32.
118. Meijers, B.K., et al., *A review of albumin binding in CKD*. Am J Kidney Dis, 2008.

51(5): p. 839-50.

119. Viaene, L., et al., Albumin is the main plasma binding protein for indoxyl sulfate and p-cresyl sulfate. *Biopharm Drug Dispos*, 2013. **34(3)**: p. 165-75.

120. Pang, K.S., et al., *Transport, binding, and metabolism of sulfate conjugates in the liver*. *Chem Biol Interact*, 1994. **92(1-3)**: p. 179-207.

121. Naito, K., K. Mizuguchi, and Y. Nose, *The need for standardizing the index of hemolysis*. *Artif Organs*, 1994. **18(1)**: p. 7-10.

122. Vanholder, R., et al., *Warning: the unfortunate end of p-cresol as a uraemic toxin*. *Nephrol Dial Transplant*. **26(5)**: p. 1464-7.

123. Pedrini, L.A., et al., Mixed predilution and postdilution online hemodiafiltration compared with the traditional infusion modes. *Kidney Int*, 2000. **58(5)**: p. 2155-65.

124. Falkenhagen, D., et al., Fractionated plasma separation and adsorption system: a novel system for blood purification to remove albumin bound substances. *Artif Organs*, 1999. **23(1)**: p. 81-6.

125. Vienken, J. and H. Christmann, How can liver toxins be removed? Filtration and adsorption with the Prometheus system. *Ther Apher Dial*, 2006. **10(2)**: p. 125-31.

126. Brettschneider, F., et al., Removal of protein-bound, hydrophobic uremic toxins by a combined fractionated plasma separation and adsorption technique. *Artif Organs*, 2013. **37(4)**: p. 409-16.

127. Meijers, B.K., et al., Removal of the uremic retention solute p-cresol using fractionated plasma separation and adsorption. *Artif Organs*, 2008. **32(3)**: p. 214-9.

10. Anhang

10.1 Danksagung

Aus Gründen des Datenschutzes ist die Danksagung in der Onlineversion nicht verfügbar.

10.2 Abkürzungsverzeichnis:

CKD: *Chronic Kidney Disease*; chronische Nierenerkrankungen

CVD: *Cardiovascular disease*; kardiovaskuläre Erkrankungen

PAA: Phenyllessigsäure

IDS: Indoxylsulfat

CRS: p-Kresylsulfat

OH-HPA: p-Hydroxyhippursäure

TBA: Tetrabutylammoniumsulfat

TEAA: Triethylammoniumacetat

TFA: Trifluoressigsäure

DMP: 2,6-Dimethylphenol

FPAD: Fractionated plasma separation and adsorption device; fraktionierte Plasma-separation und Adsorptionseinheit

SOD: Superoxiddismutase

LDH: Laktatdehydrogenase

AP: alkalische Phosphatase

ESI: *Electrospray ionisation*; Elektrospray Ionisation

NaCl: Natriumchlorid

K₂HPO₄: Di-Kaliumhydrogenphosphat

HCl: Salzsäure

SEM: standard error of mean; Standardfehler des Mittelwerts

10.3 Pufferzusammensetzungen

Laufpuffer Ionenpaar-Reversed Phase Chromatographie:

4 mmol·l⁻¹ Tetrabutylammoniumsulfat TBA, 10 mmol·l⁻¹ Di-Kaliumhydrogenphosphat K₂HPO₄, pH-Wert 6,5 mit Phosphorsäure H₃PO₄ eingestellt

40 mmol·l⁻¹ Triethylammoniumacetat TEAA, pH-Wert 6,5

Elutionspuffer Ionenpaar-Reversed Phase Chromatographie:

100 % Ethanol, pH < 7 eingestellt mit 40 µl 0,1 % Trifluoressigsäure TFA in bidest. Wasser

80 % Ethanol, pH < 7 eingestellt mit 40 µl 0,1 % Trifluoressigsäure TFA in bidest. Wasser

Physiologischer Puffer:

140 mmol·l⁻¹ Natriumchlorid NaCl, 10 mmol·l⁻¹ Di-Kaliumhydrogenphosphat K₂HPO₄, pH-Wert 7,4 mit Phosphorsäure H₃PO₄ eingestellt

154 mmol·l⁻¹ Natriumchlorid NaCl, 10 mmol·l⁻¹ Di-Kaliumhydrogenphosphat K₂HPO₄, pH-Wert 7,4 mit Phosphorsäure H₃PO₄ eingestellt