

## **2. Methoden**

Um den Effekt von Glukose auf die Gefäßelastizität so genau wie möglich zu untersuchen, wurden verschiedene Messungen in unterschiedliche Richtungen vorgenommen. Dazu zählen klinische Messungen der Pulsrate und des systolischen sowie diastolischen Blutdruckes und der Blutzuckerwert. Experimentell wurde die Expression von CD11a auf Monozyten bestimmt. Weitere Untersuchungen betrafen die Compliance der Gefäße, den Reflective Index und den systemischen Gefäßwiderstand, sowie den totalen Gefäßwiderstand. Diese Resultate wurden durch digitale Photoplethysmographie ermittelt.

### ***2.1. Probanden und Untersuchungsgut***

Im Zentrum der Untersuchung stand der Vergleich der Messwerte von Patienten mit essentieller Hypertonie und normotensiven Probanden. Dazu wurden die Probanden in zwei Gruppen geteilt, zu je 24 Personen.

Um die Ergebnisse vergleichen zu können, wurde innerhalb der Gruppen der Mittelwert berechnet. Anhand dieses Mittelwerts wurden die beiden Gruppen miteinander verglichen. Die Ergebnisse der jeweiligen Messung wurden immer nach dem gleichen Schema ins Verhältnis gesetzt. Es wurde ein Wert zur Stunde 0 erhoben, das heißt zu Beginn des Oralen - Glukose - Toleranz - Test. Der nächste Wert wurde 60 und 120 Minuten nach Einnahme der Glukoselösung ermittelt.

Bei der Untersuchung auf Gleichheit oder Ungleichheit der Messwerte wurden der Stunde-0 – Wert (Nüchternwert) mit Stunde-1 - und Stunde-2 - Wert verglichen. Zusätzlich wurden die Stunde-1 - und Stunde-2 - Werte miteinander verglichen.

Die Untersuchungen wurden bei gesunden Personen und Patienten mit essentieller Hypertonie durchgeführt. Als Kontrollgruppe wurden gesunde Personen ausgewählt, die zum Zeitpunkt der Untersuchung weder Bluthochdruck noch andere Begleiterkrankungen aufwiesen.

In beiden Gruppen befanden sich Probanden im Alter zwischen 22 und 93 Jahren.

## - Methoden -

Bei der Auswahl der Personen wurde auf eine Gleichverteilung der Geschlechter Wert gelegt. Jeder Studienteilnehmer wurde vor Untersuchungsbeginn ausführlich über Inhalt und Durchführung der Studie aufgeklärt; die Zustimmung der Teilnehmer erfolgte sowohl in mündlicher als auch in schriftlicher Form. Personen mit manifestem Diabetes mellitus wurden von der Studie ausgeschlossen.

Einzelne Voruntersuchungen zur Etablierung der digitalen Photoplethysmographie wurden bei gesunden Kontrollpersonen durchgeführt.

Eine essentielle Hypertonie wurde nach mehrfacher Bestimmung des Blutdruckes (systolischer Blutdruck größer als 140 mmHg, diastolischer Blutdruck größer als 90 mmHg) und nach Ausschluss sekundärer Hypertonie - Ursachen (renale Hypertonie, endokrine Hypertonie, Aortenisthmusstenose) diagnostiziert.

**Tabelle 2** zeigt die Charakteristika der beiden Untersuchungsgruppen auf.

**Tabelle 2.** Klinische und biochemische Charakterisierung der gesunden Kontrollgruppe und der Patienten mit essentieller Hypertonie. Kontinuierliche Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben.

Charakteristikum	Normotensive Kontrollgruppe	Hypertensive Patienten
Alter (Jahre)	44,1 $\pm$ 5,33	61,3 $\pm$ 3,48
Mann / Frau	8/16	13/11
Körpergewicht (kg)	66,1 $\pm$ 2,79	83,9 $\pm$ 4,83
Blutzucker (mmol/l)	81,1 $\pm$ 4,88	81,2 $\pm$ 3,77
Systolischer Blutdruck (mmHg)	122,6 $\pm$ 3,05	142,9 $\pm$ 4,4
Diastolischer Blutdruck (mmHg)	66,5 $\pm$ 1,89	79,1 $\pm$ 3,02
Pulsrate (1/min)	69 $\pm$ 2	65 $\pm$ 2
Natrium (mmol/l)	135,4 $\pm$ 0,83	136 $\pm$ 1,46
Kalium (mmol/l)	3,8 $\pm$ 0,08	3,2 $\pm$ 0,11

## **2.2. Reagenzien**

Destilliertes Wasser

Dynabeats, von DYNAL BIOTECH, Oslo, Norwegen

Formaldehydlösung 35%, DAB 10 200-001-8 (EINECS), AUG Hedinger, Stuttgart

Glucosteril® 5%, Glukose-Monohydrat, Reg.-Nr. G 755-1, von Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg

Goat anti rabbit Irdye 800CW, von Rockland

Goat anti rat Irdye 680CW, von Rockland

Histopaque®, von SIGMA Diagnostics, Inc. St-Louis MD 63178, USA

Odyssey Block Puffer, von LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska, USA

PBS – Dulbeco (w/o Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup>, von Biochrom AG®, L 1835)

rabbit anti-human p42p44 MAPK/ERK-Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, USA)

rat anti-human-CD11a (1:1000; Serotec, Düsseldorf)

Staurosporin

Triton X 100 (10%), von LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska, USA

Tween 20 (20%), von LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska, USA

Wortmannin

### **2.3. Puffer- und Eichlösungen**

HBSS (Hank's balanced salt solution):

136 mmol/l	NaCl	7,94g
5,40 mmol/l	KCl	0,40g
0,44 mmol/l	KH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,06g
0,34 mmol/l	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2H <sub>2</sub> O	0,06g
5,60 mmol/l	D-Glukose	1,00g
1,00 mmol/l	CaCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O	0,147g
10 mmol/l	Hepes	43,83g

ad 1000ml Aqua dest.

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

**Tabelle 3.** Verwendete Puffer- und Waschlösungen.

<b>Puffer- /Waschlösungen</b>	<b>Konzentration/Verdünnung</b>	<b>pH- Wert</b>	<b>Notizen</b>
Formaldehyd (35%)	35%		
Triton-X-100 (10%)	1ml Triton-X-100 (100%) + 9ml H <sub>2</sub> O		Volumen = 10ml
Tween-20 (20%)	2ml Tween-20 (100%) + 8ml H <sub>2</sub> O		Volumen = 10ml
HBSS oder PBS +/- Ca <sup>++</sup>		7,4	Volumen = 1l
Fixierlösung	4,5ml PBS + 500µl Formaldehyd (35%)		Volumen = 5ml
Triton Waschlösung	4,95ml PBS + 50µl Triton-X-100 (10%)		Volumen = 5ml
Tween Waschlösung	9,95ml PBS + 50µl Tween-20 (20%)		Volumen = 10ml
Odyssey Blocking Buffer	Company: licor		
Odyssey Blocking Buffer + 0,125% Tween-20	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Verdünnung von Tween-20 = 1:40, entspricht 0,5% (Lsg.A)</li> <li>2. Verdünnung von Lsg.A 1:4, entspricht 0,125%</li> </ol>		Bsp. <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 4,87,5µl buffer + 12,5µl Tween-20 (Lsg.A)</li> <li>2. 500µl Lsg.A + 1,5ml buffer</li> </ol> Volumen = 250µl

## **2.4. Geräte**

CASY®1, Cellcounter und Analysesystem, Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland

Eppendorf Research, Präzisions-Küvetten aus Quarzglas, SUPRASIC®, 101-QS 10mm

Eppendorf-Zentrifuge 5702, Falcon®

Fluoroskan Ascent FL, Labsystems

Guardian 3000 Gefäß-Plethysmograph

Hamilton-Spritzen Micriliter®, Hamilton, Bonaduz, Schweiz

Heraeus-Zentrifuge, Laborfuge GL, Kendro®

Magnetic Particle Concentrator, Dynal MPC®-S, DYNAL Biotech, Hamburg, Deutschland

Odyssey® Infrared Imaging System, LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska, USA

Pumpe 4010, CLINICON GmbH, Mannheim, Deutschland

Vacutainer, BD Vacutainer Systems, Preanalytical Solutions, Heidelberg, Deutschland

Wasserbad, Julabo

## **2.5. Oraler - Glukose - Toleranz - Test**

### **Dextro® O.G- T.**

Wirkstoff: Mono- und Oligosaccharid-Gemisch (Stärkehydrolysat)

#### **Zusammensetzung:**

Eine Flasche Dextro® O.G-T. mit 300 ml Saft enthält:

#### *- arzneilich wirksame Bestandteile*

Mono- und Oligosaccharid-Gemisch (Stärkehydrolysat), das nach enzymatischer Spaltung einer Menge von 75 g wasserfreier Glukose entspricht

#### *- sonstige Bestandteile*

Schwarzer Johannisbeer-Muttersaft, Kaliumsorbat (Konservierungsmittel), gereinigtes Wasser. Dextro® O.G-T. enthält 0,01 - 0,06 Vol.-% Alkohol, da der aus Geschmacksgründen zugesetzte Johannisbeer-Muttersaft Spuren von Alkohol aufweist.

#### **Darreichungsform und Inhalt:**

Dextro® O.G-T. ist als Flasche mit 300 ml Saft erhältlich.

#### **Anwendungsgebiet:**

Dextro® O.G-T. ist ein Belastungstrunk für den oralen Glukose-Toleranztest (Zuckerbelastungstest zum Ausschluss bzw. zur Diagnose eines Diabetes mellitus). Der orale Glukose-Toleranztest wurde bei 15 gesunden Personen und 30 Probanden mit essentieller Hypertonie als „vasogener Belastungstest“ durchgeführt. Nüchtern, 60 und 120 Minuten nach der Einnahme wurden Blutzucker, Gefäßelastizität, Blutdruck und Puls gemessen und miteinander verglichen.

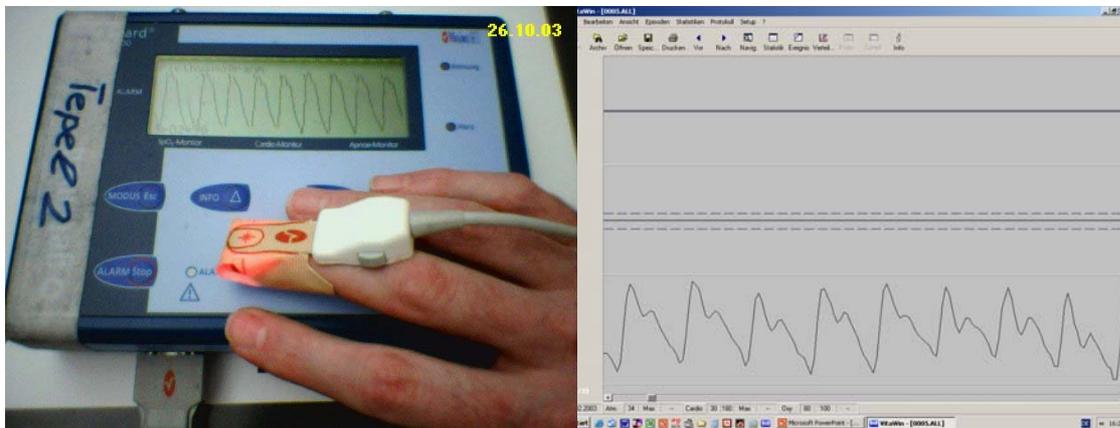
Pharmazeutischer Unternehmer  
Hoffmann-La Roche AG  
Emil-Barell-Straße 1  
79639 Grenzach-Wyhle

**Stand der Information: November 2001**

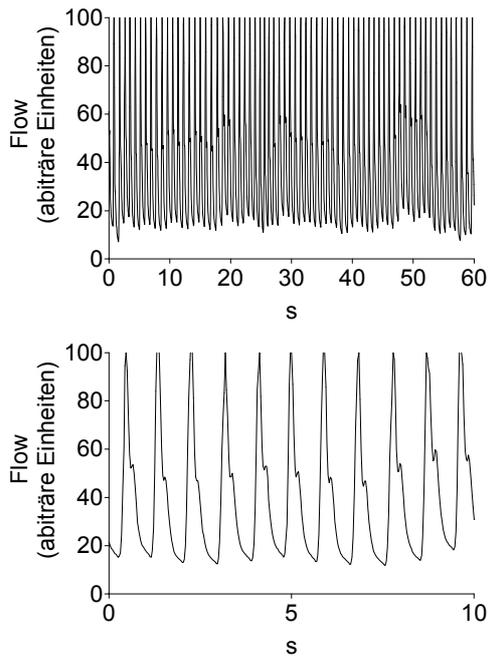
## 2.6. Digitale Photoplethysmographie

### Digitale Photoplethysmographie vor und nach oralem Glukose-Toleranztest

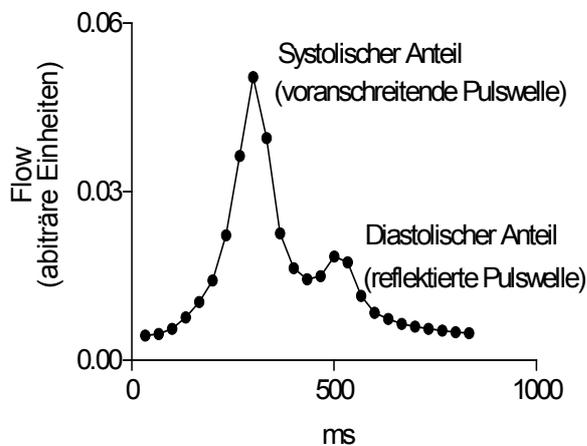
Die digitale Photoplethysmographie wurde mit einem Pulsoximeter (Vitanguard VG3000; getemed, Teltow) durchgeführt, einem Sensor (LNOP-Adult SpO2 sensor; Masimo Corp. CA), der auf die Fingerkuppe des Mittelfingers aufgeklebt wird. **Abbildung 1** zeigt die Mess-Apparatur in situ. Mit der digitalen Photoplethysmographie wird der digitale Volumenpuls gemessen. Mittels digitaler Photoplethysmographie mit einem Pulsoximeter kann die Pulswelle bei jedem Herzschlag kontinuierlich aufgezeichnet werden, ohne dass der Patient oder die Behandlung beeinträchtigt werden (**Abbildung 2**). Wie in der Literatur beschrieben (Millasseau et al., 2003) besteht die digitale Volumenpulswelle aus zwei Anteilen (**Abbildung 3**). Der initiale, systolische Anteil der digitalen Volumenpulswelle wird durch die voranschreitende Pulswelle bestimmt. Der spätere, diastolische Anteil der digitalen Volumenpulswelle kommt durch die Reflexion der Pulswelle in der Peripherie, wahrscheinlich vorwiegend an kleinen Arterien insbesondere der unteren Körperabschnitte, zustande.



**Abbildung 1.** Digitale Photoplethysmographie zur Analyse der Pulswelle. (Abbildung aus Abraha, 2005)



**Abbildung 2.** Typisches Beispiel für kontinuierliches Monitoring der Pulswelle durch digitale Photoplethysmographie. Dargestellt sind die Pulswellen, die über einen Zeitraum von 60 Sekunden (**obere Abbildung**) bzw. 10 Sekunden (**untere Abbildung**) aufgezeichnet wurden.

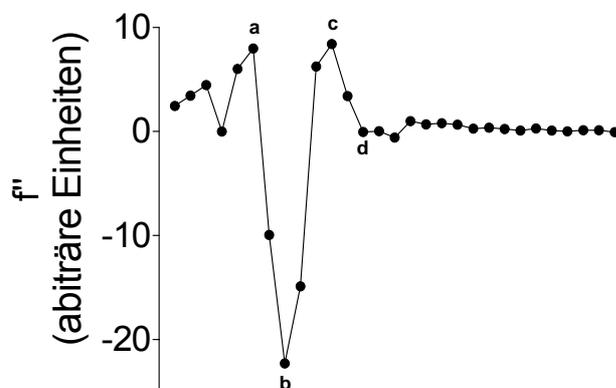


**Abbildung 3.** Schematische Darstellung der verschiedenen Komponenten der Pulswelle bestimmt durch digitale Photoplethysmographie.

Die Photoplethysmographie-Daten wurden mit 32 pro Sekunde gewonnen, aufgezeichnet und auf einen PC übertragen. Die Rohdaten wurden mit einem speziellen, selbst - entwickelten Auswertungsprogramm analysiert. Die Messdaten wurden in Episoden von 150 Sekunden zusammengefasst. Die Pulswellen wurden durch den so genannten Reflective Index charakterisiert; dieser zeigte den diastolischen

Anteil der Pulswelle, also die Reflexion der Pulswelle in der Peripherie. Der Reflective Index wurde immer als Mittelwert aus allen Pulswellen, die innerhalb einer Episode von 150 Sekunden aufgezeichnet wurden, angegeben.

Zur Berechnung des Reflective Index zur Charakterisierung des diastolischen Anteils der Pulskurve wurde für jede Pulswelle die erste und zweite Ableitung berechnet (GraphPad Prism 3.0, GraphPad Software, San Diego, CA). Das lokale Minimum dieser Funktion wurde automatisch berechnet. Das lokale Minimum der ersten Ableitung entspricht dem Wendepunkt der Pulswelle. Die Mittelwerte der Daten des dritten bis siebten Punktes, die dem Wendepunkt der Pulswelle folgen, wurden analysiert. Der Mittelwert in Prozent der maximalen Amplitude der Pulswelle wurde dann als Reflective Index bezeichnet. Die **Abbildung 4** zeigt eine beispielhafte Auswertung der Pulswelle. Die oben genannten Punkte liegen in einem Intervall zwischen 93 Millisekunden bis 218 Millisekunden nach dem Wendepunkt der Pulswelle und beschreiben die charakteristische "Schulterregion" im diastolischen Verlauf der Pulswelle, welche überwiegend durch die Reflexion der Pulswelle in der Peripherie bedingt ist. Durch den neuen Auswerte-Algorithmus kann der Reflective Index als Charakteristikum des diastolischen Anteils der Pulswelle kontinuierlich vor und nach oralem Glukose-Toleranztest gemessen werden.



**Abbildung 4.** Analyse des diastolischen Anteils der Pulswelle, die mittels digitaler Photoplethysmographie gewonnen wurde. Die Pulswelle (Flow, **obere Abbildung**) wurde durch digitale Photoplethysmographie mit einem Pulsoximeter gemessen mit einem Sensor, der auf die Fingerkuppe aufgeklebt wurde. Die Plethysmographie - Daten wurden mit 32 pro Sekunde gewonnen. Für jede Pulswelle wurde die erste Ableitung berechnet ( $f'$ , **mittlere Abbildung**) und das lokale Minimum dieser Funktion wurde automatisch analysiert. Das lokale Minimum der ersten Ableitung entspricht dem Wendepunkt der Pulswelle. Die Mittelwerte der Daten des dritten bis siebten Punktes, die dem

Wendepunkt der Pulswelle folgen, wurden bestimmt und als Reflective Index bezeichnet. In diesem Beispiel beträgt der Reflective Index 0,016.

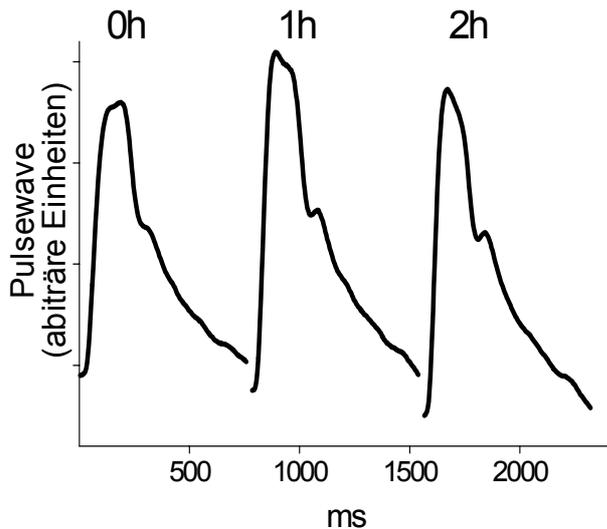
Anhand der zweiten Ableitung ( $f''$ , **untere Abbildung**) lässt sich die Pulscurve durch die Parameter **a**, **b**, **c** und **d** charakterisieren: **a** und **c** stellen erstes und zweites Maximum, **b** und **d** erstes und zweites Minimum der Pulscurve dar. (Abbildung aus Abraha, 2005)

Außerdem wurde bei jedem Probanden die Reaktive Hyperämie gemessen. Darunter versteht man die reaktive Weitstellung der Gefäße nach längerer Kompression. Die Stauung der Gefäße wurde durch eine am Oberarm befestigte und auf ca. 200 mmHg aufgepumpte Blutdruckmanschette erreicht, sie dauerte fünf Minuten. Die Messung der Reaktiven Hyperämie erfolgte pro Proband dreimal: nüchtern, d.h. vor Einnahme der Glukoselösung und jeweils 60 und 120 Minuten nach oralem Glukose-Toleranztest.

## **2.7. Vascular Profiling**

Mithilfe eines auf der A. radialis befestigten Sensors des HDI/PulseWave™ CR-2000® wurde die Compliance der kleinen und großen arteriellen Gefäße vor und nach oralem Glukose-Toleranztest registriert. Die Pulscurve wurde 30 Sekunden lang aufgezeichnet. Aufgrund des Kurvenverlaufes wurden C1 und C2 gemessen, wobei C1 den Elastizitätsindex der großen Gefäße (large artery elasticity index, ml/mmHg) und C2 den Elastizitätsindex der kleinen Gefäße (small artery elasticity index, ml/mmHg) widerspiegelte. Durch das Anlegen einer Blutdruckmanschette konnten zeitgleich Blutdruck, Pulsdruck, und Pulsrate gemessen werden. Die Pulscurve wurde in das Gerät eingelesen und auf die Blutdruckkurve aufgesetzt. Dabei entsprachen Minima der Pulscurve den diastolischen Blutdruckwerten, Maxima entsprechend den systolischen Werten (**Abbildung 5**) Die Rohdaten wurden in einen Computer übertragen und mittels Auswertungsprogramm (GraphPad Prism) analysiert.

Wie in der Literatur beschrieben hat die Gefäß-Elastizität einen direkten Einfluss auf den Pulsdruck (pulse pressure) (Marchais et al., 1993). Der Pulsdruck wird aus der Differenz von systolischem und diastolischem Blutdruck berechnet.



**Abbildung 5.** Beispielhafter Verlauf der Pulskurve, nachdem ein Sensor des HDI/PulseWave™ CR-2000® auf der Arteria radialis befestigt wurde.

## **2.8. Isolation und Untersuchung von Monozyten aus Vollblut**

Untersucht wurde der Einfluss von Glukose auf die Expression von CD11a auf Monozyten.

Das Blut wurde den Probanden aus der Vena brachialis vor der Einnahme von 75 g Glukose, 60 min und 120 min danach entnommen und heparinisiert.

Zur Isolierung der Monozyten wurde zunächst auf die Dichtegradzentrifugation zurückgegriffen. Dazu wurden je 5 ml Vollblut auf 3 ml Histopaque® (SIGMA Diagnostics, Inc. St-Louis MD 63178, USA) vorsichtig aufgeschichtet und anschließend bei 2100 rounds per minute (rpm) für 30 min zentrifugiert. Der dabei entstandene Lymphozytenring wurde vorsichtig aspiriert.

Der Lymphozytenring wurde anschließend noch mal 5-minütig bei 3300 rpm in der Eppendorf Zentrifuge zentrifugiert. Um mögliche Verunreinigungen durch beispielsweise Erythrozyten zu vermeiden, wurde der Überstand jeweils dekantiert und das entstehende Zentrifugat mit HBSS-Puffer resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt bis makroskopisch keine Verunreinigung durch Erythrozyten mehr erkennbar war.

Den isolierten Zellproben, zur Stunde 0 (0 = Blutprobe beim nüchternen Patienten entnommen), zur Stunde 1 (1 = Blutprobe 1 Stunde nach Glukosegabe, 300ml

## - Methoden -

Glukoselösung enthält 75 g wasserfreie Glukose) und zur Stunde 2 (2 = Blutprobe, 2 Stunden nach Glukosegabe ohne andere Nahrungsaufnahme) wurden jeweils 25 µl der Antikörper (Dynabeads CD14, von DYNAL BIOTECH, Oslo, Norwegen) zugegeben. Diese Antikörper sind gegen das Oberflächenmolekül CD11a gerichtet und binden supraparamagnetische Polystyren-Kügelchen. Da CD11a vorwiegend auf Monozyten vorkommt, konnten mit diesen Beads Monozyten markiert werden. Dafür wurde die Suspension für eine Stunde bei 4 °C inkubiert und ca. alle 5 Minuten geschüttelt, um einen größtmöglichen Kontakt zwischen den Beads und den Monozyten herzustellen. Hiernach konnte durch Anwendung des Magnetic Particle Concentrator (Dynal MPC®-S, DYNAL Biotech, Hamburg, Deutschland) die markierten Monozyten vom Rest der Suspension getrennt und isoliert werden. Dabei wurden die durch Beads gebundenen Monozyten magnetisch im Reagenzglas gehalten, während der Überstand dekantiert wurde.

Diese Zellsuspension wurde nun mit je 1 ml Fixing Solution bei Raumtemperatur für 20 min inkubiert, anschließend wurde die Fixierungslösung wieder entfernt.

Anschließend wurden die Zellansätze mit je 500µl Triton Washing Solution gewaschen. Dieser Vorgang wurde bei jeder Probe über 5 Minuten 4mal durchgeführt.

Dem Waschvorgang folgte die Inkubation der Proben in je 1800 µl einer Pufferlösung aus Odyssey Blocking Buffer und PBS (Mischverhältnis 1:1). Die Inkubation wurde bei Raumtemperatur für 60 Minuten durchgeführt.

Die Zellsuspension der Blutproben 0 Stunden, 1 Stunde und 2 Stunden wurden danach auf jeweils 7 Reagenzgläser (01 - 07 bezeichnet die Proben von Stunde 0; 11 - 17 bezeichnet die Proben von Stunde 1 und 21 - 27 bezeichnet die Proben von Stunde 2) verteilt. Auf je 250 µl der Zellsuspension wurden 10 µl einer mit Odyssey Blocking Buffer 1:40 verdünnten Lösung primärer Antikörper nach folgendem Schema dazugegeben:

- Zugabe des Antikörper rabbit anti-human p42p44 MAPK/ERK-Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, USA) in den Proben 04 - 07; 14 - 17 und 24 - 27
- Zugabe des Antikörper rat anti-human-CD11a (1:1000; Serotec, Düsseldorf) in den Proben 04 - 07; 14 - 17 und 24 - 27
- den Proben 01 - 03; 11 - 13 und 21 - 23 wurden keine Antikörper zugefügt

## - Methoden -

Nach Zugabe der primären Antikörper wurde die Zellsuspension bei 4 °C über Nacht inkubiert.

Dann wurden die angesetzten Lösungen vom Blocking Buffer befreit und erneut gewaschen. Dazu wurde je 250 µl Tween Wasch Lösung für 5 Minuten dazugegeben, die Lösung geschüttelt und anschließend die Waschlösung wieder entfernt. Dieser Vorgang wurde 4mal wiederholt.

Nach Herstellung von 6 ml Block-Puffer (BP) + 0,125% Tween20 (3 ml HBSS-Puffer + 2,9625 ml BP + 37,5 µl Tween 20 (20 %)), wurden jeweils 250 µl dieser Pufferlösung auf jede der angesetzten Proben gegeben.

Dieser Suspension wurden nun die fluoreszierenden sekundären Antikörper zugeführt. Die Zugabe erfolgte nach folgendem Schema:

- Zugabe des AK gegen rabbit IRDye 800 (= 2,5 µl der 1:10 Verdünnung Goat anti-rabbit IrDye 800CW) zu denen Reagenzgläsern: 02 - 07, 12 - 17 und 22 - 27
- Zugabe des AK gegen rat Alexa700 (= 2,5 µl der 1:10 Verdünnung Goat anti-rat Alexa 680) zu den Reagenzgläsern: 02 - 07, 12 - 17 und 22 - 27

Nach Zugabe der primären und sekundären Antikörper entstand folgendes Schema:

**Tabelle 4.** Schema der Zugabe der primären und sekundären Antikörper zu den einzelnen Proben.

<b>Probe</b>	<b>prim. AK</b>	<b>sek.AK</b>
<b>01, 11, 21</b>	---	---
<b>02, 12, 22</b>	---	anti-rabbit (800), anti-rat (680)
<b>03, 13, 23</b>	---	anti-rabbit (800), anti-rat (680)
<b>04, 14, 24</b>	rabbit anti-P-ERK, rat anti-human-CD11a	anti-rabbit (800), anti-rat (680)
<b>05, 15, 25</b>	rabbit anti-P-ERK, rat anti-human-CD11a	anti-rabbit (800), anti-rat (680)
<b>06, 16, 26</b>	rabbit anti-ERK, rat anti-human-CD11a	anti-rabbit (800), anti-rat (680)
<b>07, 17, 27</b>	rabbit anti-ERK, rat anti-human-CD11a	anti-rabbit (800), anti-rat (680)

Die sekundären Antikörper wurden für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Einwirken der sekundären Antikörper wurde der Überstand wieder entfernt.

Im Anschluss wurden die Zelllösungen mit je 250 µl Tween Wasch Lösung über je 5 Minuten 4mal gewaschen. Dabei musste darauf geachtet werden, die Platte vor Lichteinfall zu schützen.

Die Monozyten - Antikörper - Suspension wurde hinterher in jeweils 210 µl HBSS - Lösung resuspendiert.

Nach erfolgter Resuspension wurden von diesen 210 µl Lösung jeweils 100 µl pro well pipettiert, d.h. von jeder Probe wurde eine Doppelbestimmung gemacht.

Dabei entstand folgende Anordnung auf der Palette:

**Tabelle 5.** Anordnung der Proben auf der Messpalette.

\*Kontrolle ohne primärer und sekundärer Antikörper, \*<sup>1</sup>Kontrolle ohne primärer Antikörper

A1 01*	A2 02* <sup>1</sup>	A3 03* <sup>1</sup>	A4 04	A5 05	A6 06	A7 07
B1 01*	B2 02* <sup>1</sup>	B3 03* <sup>1</sup>	B4 04	B5 05	B6 06	B7 07
C1 11*	C2 12* <sup>1</sup>	C3 13* <sup>1</sup>	C4 14	C5 15	C6 16	C7 17
D1 11*	D2 12* <sup>1</sup>	D3 13* <sup>1</sup>	D4 14	D5 15	D6 16	D7 17
E1 21*	E2 22* <sup>1</sup>	E3 23* <sup>1</sup>	E4 24	E5 25	E6 26	E7 27
F1 21*	F2 22* <sup>1</sup>	F3 23* <sup>1</sup>	F4 24	F5 25	F6 26	F7 27

Diese Palette wurde nun in das Odyssey® Infrared Imaging System Gerät eingelesen und die Fluoreszenz-Messungen der einzelnen Proben durchgeführt. Dabei wurde die Untersuchung laut Angabehinweisen des Herstellers durchgeführt.

Es wurde dabei die Fluoreszenz der CD11a-gebundenen Antikörper mit jener von ERK-gebundenen Antikörpern verglichen. Die extracellulär signal-regulierte Kinase (ERK) ist eine ubiquitär vorkommende Kinase, die sich als Referenz eignet.

## **2.9. Statistische Auswertung**

Bei der Prüfung der Testergebnisse wurden theoretische Erwartungen mit Beobachtungen verglichen. Da die Stichprobe nur einen kleinen Teil der Grundgesamtheit umfasst, besteht bei der Auswertung die Gefahr des Irrtums. Um diesen so wahrscheinlich wie möglich unter Kontrolle zu halten, wurde darauf geachtet formale Richtlinien einzuhalten.

Diese angestrebten Aussagen werden Hypothesen genannt, da man nicht sicher sagen kann, ob sie falsch oder richtig sind. Dabei werden die Annahmen so formuliert, dass sie widerlegt werden können. Man unterscheidet eine Nullhypothese von der Alternativhypothese.

Die Nullhypothese  $H_0$  geht von der Annahme aus, dass es keinen Unterschied zwischen den Stichproben gibt:

$$H_0 : x_1 = x_2$$

Dagegen geht die Alternativhypothese von einem Unterschied in den Aussagen aus:

$$H_0 : x_1 \neq x_2$$

Als Grenzwert wurde  $\alpha < 0,05$  für den Ablehnungsbereichs festgelegt. Wird dieser unterschritten, wird die Nullhypothese abgelehnt und die Ergebnisse als signifikant unterschiedlich zur Hypothese bezeichnet. Da die Verteilungskurve des geprüften Merkmals nicht bekannt ist, wurde für den Vergleich der Werte der Stichproben ein nicht- parametrisches Prüfverfahren für unverbundene Stichproben angewandt. Dabei handelte es sich um den U – Rangtest nach Wilcoxon- Mann- Whitney.

Mit Hilfe des U-Tests von Wilcoxon- Mann- Whitney wird geprüft, ob sich die Mittelwerte von zwei unabhängigen Stichproben signifikant oder nur zufällig voneinander unterscheiden.

Die Nullhypothese  $H_0$  lautet:

$$H_0: x_1 = x_2 = x$$

Dieser Test für unabhängige Stichproben ist verteilungsunabhängig. Der Umfang der einen Stichprobe sei  $n_1$  und der anderen Stichprobe sei  $n_2$ . Man bringt die Stichprobenwerte ( $n_1+n_2$ ) in eine gemeinsame aufsteigende Rangfolge, d.h. die Daten der beiden Stichproben werden zusammengefasst ( $\Sigma = n_1 + n_2$ ) und der Größe nach geordnet. So erhält man eine gemeinsame aufsteigende Rangordnung. Jedem Wert der Rangordnung wird anschließend eine Rangzahl zugeordnet.

Die Summe der Rangzahlen von Stichprobe 1 sei  $R_1$ , die von Stichprobe 2 sei  $R_2$ . Als Prüfgrößen wurden folgende beiden Größen verwendet:

$$U_1 = n_1 * n_2 + \frac{1}{2} * n_1 * (n_1 + 1) - R_1$$

$$U_2 = n_1 * n_2 + \frac{1}{2} * n_2 * (n_2 + 1) - R_2$$

Der kleinere Wert der beiden Prüfgrößen wird als kritischer Wert U betrachtet. Die Kontrolle der Rechnungen erfolgte mit folgender Prüfgleichung:

$$U_1 + U_2 = n_1 * n_2$$

Die Nullhypothese wurde mit der Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha$  verworfen, wenn U als der niedrigere Wert von  $U_1$  und  $U_2$  kleiner oder gleich dem tabellierten kritischen Wert  $U_0(n_1, n_2, \alpha)$  war.

Als Irrtumswahrscheinlichkeit für den Fehler 1. Art wurde  $\alpha \leq 0,05$  festgelegt.

Zum Vergleich der drei verschiedenen Messzeitpunkte wurde auf einen nichtparametrischen ANOVA-Test zurückgegriffen, den Friedman-Test. Dieser Test ist für den verteilungsunabhängigen Vergleich von mehreren verbundenen Stichproben von Messwerten geeignet. Auch hier zeigen sich signifikante Unterschiede in den einzelnen Untersuchungszeiträumen auf, wenn  $p < 0,05$  ist.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels GraphPad Prism 3.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) oder SPSS für Windows (version 11.5; SPSS, Chicago, IL).