

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
der Universität Würzburg  
Vorstand: Prof. Dr. W. K. Lutz

**Untersuchung des genetischen Schadens  
in peripheren Lymphozyten von Dialysepatienten  
mittels Mikrokerntest und Comet-Assay**

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg  
vorgelegt von  
Kai Nerlich  
aus Hersbruck

Würzburg, Juni 2004

Referentin: Prof. Dr. rer. nat. H. Stopper

Koreferent: Prof. Dr. med. U. Bahner

Dekan: Prof. Dr. med. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 21.07.2004

Der Promovend ist Arzt.

**Für meine Eltern.**



# **INHALTSVERZEICHNIS**

<b><u>1 Einleitung</u></b>	<b>1</b>
1.1 Hintergrund.....	1
1.2 Fragestellung der Arbeit.....	3
1.3 Mikrokerne.....	5
1.4 Vorstellung der verwendeten Testsysteme.....	8
1.4.1 Cytokinesis-Block-Micronucleus-Assay (CBMNA).....	8
1.4.2 Comet-Assay (Einzelzell-Gelelektrophorese/ SCGE).....	10
1.5 Dialyseverfahren.....	13
1.5.1 Hämodialyse (HD).....	13
1.5.2 Hämofiltration (HF).....	14
1.5.3 Hämodiafiltration (HDF).....	15
1.6 Angiotensin II-Rezeptorantagonisten.....	16
1.6.1 Grundlagen des Renin-Angiotensin-Aldosteron-(RAA)-Systems.....	16
1.6.2 Klinischer Einsatz selektiver Angiotensin II-Antagonisten.....	18
1.6.3 Mögliche Indikation bei Prädialysepatienten.....	18
<b><u>2 Material und Methoden</u></b>	<b>20</b>
2.1 Chemikalien und Arbeitsgeräte.....	20
2.1.1 Allgemeine Laborchemikalien und Verbrauchsmaterial.....	20
2.1.2 Arbeitsgeräte.....	20
2.2 Verwendete Zellarten.....	21

2.2.1	Maus-Lymphom-Zellen (L5178Y tk +/-, MoLy).....	21
2.2.2	Humane Lymphozyten.....	21
2.3	Medien und Puffer für die Zellkulturen.....	<b>22</b>
2.4	Kultur der Zellen.....	<b>26</b>
2.4.1	Auftauen von Zellen.....	26
2.4.2	Einfrieren von Zellen.....	26
2.4.3	Kultur der Maus-Lymphom-Zellen (L5178Y tk +/-, MoLy).....	27
2.5	Puffer und Lösungen für den Comet-Assay.....	<b>28</b>
2.6	Puffer und Lösungen zur Anfertigung der Mikrokernpräparate.....	<b>30</b>
2.7	Durchführung der Experimente.....	<b>31</b>
2.7.1	Isolierung der Lymphozyten.....	31
2.7.2	Anfertigung der Zellpräparate für den Comet-Assay.....	32
2.7.3	Auswertung des Comet-Assay.....	33
2.7.4	Anfertigung der Zellpräparate zur Bestimmung der Mikrokernrate.....	34
2.7.5	Färbung mit Acridin-Orange.....	35
2.7.6	Kriterien der Auswertung der Acridin-Orange-gefärbten Präparate.....	35
2.7.7	Allgemeines zur Auswertung der Experimente .....	36

### **3 Ergebnisse** **37**

3.1	Verlaufsstudie.....	<b>37</b>
3.1.1	Untersuchtes Patienten-Kollektiv.....	38
3.1.2	Vergleichende Darstellung von Mikrokernrate, Anzahl doppelkerniger Lymphozyten und relativer DNA-Schaden im Verlauf.....	39
3.1.2.1	Kontrollpersonen.....	39
3.1.2.2	Gruppe 1.....	44
3.1.2.3	Gruppe 2.....	50

3.1.2.4 Gruppe 3.....	59
3.2 Vergleich Langzeit-HDF-Gruppe mit HD-Gruppe.....	66
3.2.1 Untersuchtes Patienten-Kollektiv.....	66
3.2.2 Gruppenvergleich des relativen DNA-Schaden (in %)......	68
3.2.3 Gruppenvergleich der Mikrokernrate (auf 1000 DK)......	69
3.2.4 Einzel-Paar-Vergleich (Patient/Vergleichspatient).....	70
<b><u>4 Diskussion</u></b>	<b>76</b>
<b><u>5 Zusammenfassung</u></b>	<b>85</b>
<b><u>6 Literatur</u></b>	<b>87</b>
<b><u>7 Anhang</u></b>	<b>92</b>
7.1 Ergebnisse der Verlaufsstudie.....	92
7.2 Patientendaten der Verlaufsstudie.....	105
7.3 Patientendaten der Lz-HDF- und HD-Gruppe.....	111
7.3.1 Lz-HDF-Gruppe.....	111
7.3.2 HD-Gruppe.....	121
7.4 Ergebnisse der statistischen Auswertung (T-Test) der Verlaufsstudie, der Lz-HDF-, sowie der HD-Gruppe.....	131





# **1 Einleitung**

## **1.1 Hintergrund**

Vor allem wegen der demographischen Entwicklung unserer Bevölkerung infolge stetig steigender Lebenserwartung rückt der Krebs zunehmend in den Brennpunkt wissenschaftlichen Interesses.

Dabei zeigt sich in vielen medizinischen Bereichen, dass die Tumorenstehung oftmals eine Folgeerkrankung darstellt, die zumindest teilweise in direktem und/oder indirektem Zusammenhang mit der Grunderkrankung oder der entsprechenden apparativen oder medikamentösen Therapie steht.

Das gilt z.B. für die terminale Niereninsuffizienz, eine schwerwiegende Erkrankung, bei der, erst durch moderne Nierenersatztherapien (Hämodialyse, Hämodiafiltration, Peritonealdialyse und Nierentransplantation) ein jahrzehntelanges Überleben möglich wurde.

Hier beschreiben und belegen zahlreiche Studien den Zusammenhang zwischen Niereninsuffizienz bzw. Nierenersatztherapie und einem (zum Teil stark) erhöhten relativen Risiko für Malignome (Giacchino et al., 1983) bzw. einer erhöhten Krebsinzidenz. Besonders Lymphome sowie Karzinome von Niere, den abführenden Harnwegen, Prostata, Leber und Uterus kommen bei dialysepflichtigen („urämischen“) Patienten um ein vielfaches häufiger vor als in der altersentsprechenden Normalbevölkerung (Maisonneuve et al., 1999; Teschner et al., 2002).

Eine Reihe von möglichen pathogenetischen Mechanismen wurde in den letzten Jahren postuliert und untersucht, darunter die reduzierte Funktion des Immunsystems, die verminderte DNA-Reparatur-Kapazität, erhöhter oxidativer Stress bzw. reduzierte antioxidative Schutzmechanismen, primärer und sekundärer Hyperparathyreoidismus, Medikamente (vor allem Immunsuppressiva bei immunologisch aktiver Glomerulonephritis oder Nierentransplantation) und auch mit der Hämodialyse-Behandlung selbst in Zusammenhang stehende Faktoren (sog. „Bioinkompatibilität“), wie z.B. durch Zytokin induzierende Substanzen aus dem Dialysat (z.B.

Lipopolysaccharide) oder die Freisetzung toxischer Substanzen aus dem Schlauchsystem (z.B. Phtalate; Vamvakas et al., 1998).

Ungeklärt ist in diesem Zusammenhang vor allem, ob und inwieweit die Akkumulation der sogenannten AGEs (advanced glycated end products), die zusammen mit der erhöhten Konzentration verschiedener Zytokine bzw. Wachstumsfaktoren (z.B. IGF-1, IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$  und PDGF) mit der Progression des chronischen Nierenversagens assoziiert sind, eine Rolle bei der Kanzerogenese spielt.

Bekannt ist die Bedeutung eines funktionstüchtigen Immunsystems bei der Prävention maligner Transformation und Tumorentstehung. Das intakte Immunsystem erkennt und eliminiert jeden Tag tausende von „Tumor-Zellen“ (Riede et al., 1995).

Die Niereninsuffizienz führt jedoch zu qualitativer wie quantitativer Beeinträchtigung der humoralen und insbesondere zellulären Immunreaktion (sog. „urämischer Immundefekt“). Als klinische Manifestationen werden reduzierte Reaktion auf Immunisierung („Impfversager“), verzögerte bzw. verminderte Abstoßung von Allotransplantaten, reduzierte (T-)zellvermittelte Überempfindlichkeitsreaktion (Typ IV, z.B. Tuberkulinreaktion) und reduzierte Zahl an zirkulierenden B- und T-Lymphozyten sowie ein erniedrigter T-Helfer/T-Suppressor-Quotient beobachtet, die zusammen zu einer erhöhten Vulnerabilität gegen Bakterien, Viren, Pilzen und zu der bereits erwähnten reduzierten „Tumorkontrolle“ führen.

Die Entstehung von Tumoren ist multifaktoriell, doch das wichtigste Angriffsziel im Prozess der Kanzerogenese ist die DNA. Deshalb ist die Fähigkeit, DNA-Schäden zu erkennen und zu reparieren, ein bedeutender „Verteidigungsmechanismus“ gegen den Krebs. Verschiedene Studien untersuchten bereits die deutlich reduzierte DNA-Reparatur-Kapazität in peripheren Lymphozyten von Patienten im Prädialysestadium bzw. im Endstadium chronischer Nierenerkrankungen sowie die von Dialysepatienten nach unterschiedlicher Behandlungsdauer (Malachi et al., 1993). Die Ergebnisse zeigen außerdem, dass die DNA-Reparatur peripherer Lymphozyten bei Langzeit-Dialysepatienten (>120 Monate) erheblich eingeschränkt ist. In den ersten Monaten der Dialyse kommt es allerdings zu einer Erholung bzw. teilweise sogar zu einem „overshoot“ (<3 Monate bzw. 3-12 Monate). Mit zunehmender Dialysedauer nimmt die DNA-Reparatur-Kapazität jedoch drastisch ab und wird als eine mögliche Komponente

bei der vermehrten Entstehung von Malignomen bei Dialysepatienten angesehen (Vamvakas et al., 1998).

## **1.2 Fragestellung der Arbeit**

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich im Gegensatz zu bisherigen Studien (überwiegend im Rahmen von Querschnittsstudien) v.a. prospektiv mit der Untersuchung der Auswirkung verschiedener Faktoren (1. Prädialysephase, 2. Wechsel von der Hämodialyse zu HDF-Behandlung, 3. Einfluß einer Angiotensin II-Antagonistentherapie sowie (durch einmalige Erhebung) „Langzeit“-HDF-Behandlung) auf den relativen genetischen Schaden, ermittelt durch den Comet-Assay und den Mikrokern-Test in peripheren Lymphozyten bei Dialysepatienten bzw. Prädialysepatienten.

Auf Grund des unterschiedlichen Untersuchungsaufbaus lässt sich die Arbeit in zwei Teile untergliedern. Im Rahmen des ersten wurden, entsprechend der Fragestellung, drei Gruppen (mit jeweils drei Probanden) gebildet und im Rahmen einer Verlaufsstudie über einen Zeitraum von ca. zehn Monaten mit den oben genannten Verfahren überwacht.

Dabei wurde zu Beginn der Studie über mindestens drei Monate hinweg bei einem Messabstand von vier Wochen bei allen Probanden die momentane relative DNA-Schädigung und Mikrokernfrequenz evaluiert und erst im Anschluss die Untersuchungsvariable entsprechend der Gruppenzugehörigkeit verändert. Dadurch stellt jeder Proband auch gleichzeitig seine eigene Kontrollperson dar – die Werte der ersten drei Messungen können mit den späteren (nach Änderung einer Therapie-Variablen) verglichen werden.

Anhand der ersten Gruppe, bestehend aus drei Prädialysepatienten, soll zum einen der zeitliche Verlauf von DNA-Schädigung bzw. Mikrokernrate in der Prädialysephase sowie eventuell auftretenden Veränderungen bei Eintritt in die Dialyse-Behandlung dargestellt werden. Eine Studie von Vamvakas et al. (1998) ergab, dass sich nach Aufnahme ins Dialyseprogramm initial eine, möglicherweise sogar „überschießende“, Erholung der zuvor zunehmend beeinträchtigten DNA-Reparatur einstellt, die

wahrscheinlich auf der „akuten“ Elimination von sog. Urämietoxinen beruht. Dieser Effekt ist im Verlauf der Langzeitdialyse allerdings, bedingt durch die Persistenz bestimmter Urämietoxine und eventuell durch das Dialyseverfahren selbst (Bioinkompatibilität etc.), wieder rückläufig.

Die Dialysepatienten der zweiten Gruppe wurden von Hämodialyse (HD) auf Hämodiafiltrations (HDF)-Behandlung umgestellt, da nachgewiesen wurde, dass HDF-Behandlung die bei Niereninsuffizienz signifikant erhöhten AGE-Spiegel (Advanced Glycation Products) im Vergleich zur Hämodialyse stärker senkt (Gerdemann et al., 2000). Da AGEs, insbesondere Carboxymethyllysine und Pentosidin, die eine wichtige Rolle in der Progression renaler Erkrankungen bzw. deren Folgeerkrankungen (wie z.B. der Atherosklerose) spielen (Heidland et al., 2001; Krivošíková et al., 2001), unter anderem durch ihre proinflammatorische Wirkung und Modifikation von Proteinen und Lipiden, indirekte DNA-Schäden verursachen können, wäre eine Reduktion der DNA-Schäden gegenüber konventionell behandelten Hämodialyse-Patienten anzunehmen.

Bei den Dialysepatienten der dritten Gruppe wurde mit einer Angiotensin II-Antagonistentherapie (mit einem Sartan-Präparat) begonnen. Angiotensin II-Antagonisten gewinnen nämlich neben den ACE (Angiotensin Converting Enzyme)-Inhibitoren bei der „nephroprotektiven“ Therapie zunehmend an Bedeutung. Allerdings zeigten sich nephroprotektive Effekte bisher vorwiegend in experimentellen Studien an Versuchstieren (Krivošíková et al., 2001). Da bisher nur wenige Studien die Wirkung im menschlichen Organismus untersuchten, sollten in dieser Arbeit Daten am Menschen erhoben werden.

Außerdem umfasste die Verlaufsstudie zwei gesunde Probanden, die als ständige Kontrollpersonen dienten. Hier stand weniger der Vergleich mit den (Prä-)Dialysepatienten als die Kontrolle der verwendeten Verfahren (im Hinblick auf sog. methodische Fehler) im Vordergrund.

Zum anderen wurden im Rahmen einer einmaligen Erhebung DNA-Schädigung und Mikrokernfrequenz einer Gruppe, bestehend aus zehn Langzeit-Hämodiafiltrationspatienten, mit den Werten einer Hämodialysegruppe, bestehend aus zehn Patienten, verglichen. Die Auswahl der Probanden für die Kontrollgruppe geschah anhand verschiedener Parameter wie Alter, Geschlecht, Dialysezeit, Grund-/Begleiterkrankung etc., ähnlich einer Fall-Kontroll-Studie.

Voraussetzung für die Aufnahme der Hämodiafiltrationspatienten in die Studie und entscheidendes Kriterium war das Fehlen von gravierenden Begleiterkrankungen, denn bisher kamen vornehmlich gerade solche Patienten in den Vorzug der HDF-Behandlung, weil diese als schonender und somit als „Therapie der Wahl“ für diese Patienten galt.

Dieser Umstand führte zu der Überlegung, dass bei diesem Patientenkollektiv aufgrund des schlechten Allgemeinzustands, der nicht mit der Dialyse-Behandlung in Verbindung steht, ein größerer DNA-Schaden bestehen müsste, weshalb sich die durch HDF-Behandlung erwartete Reduktion des DNA-Schadens möglicherweise nicht ausreichend darstellen lassen würde, weil sich die Effekte ungünstig „überlagern“ oder sogar gegenseitig aufheben könnten.

### **1.3 Mikrokerne**

Mikrokerne sind Chromatin beinhaltende vesikuläre Strukturen im Cytoplasma. Von einer Membran umgeben und ohne Verbindung zum eigentlichen Zellkern entstehen sie durch Separation von ganzen Chromosomen oder Chromosomen-Bruchstücken während der Mitose. Ihr Durchmesser beträgt bis zu  $\frac{1}{3}$  des Hauptkerns (Schiffmann und DeBoni, 1991; siehe Abb.1).

Mit der Transmissionselektronenmikroskopie bewiesen Schiffmann und DeBoni, dass Mikrokerne in ihren ultrastrukturellen Details einem Interphasenkern entsprechen.

Die sie umgebende Doppelmembran, mit einer Differenzierung in Lamina und Nukleoporen, entspricht strukturell der Kernmembran. Ebenso zeigen sie eine Differenzierung in Eu- und Heterochromatin (Schiffmann und DeBoni, 1991).

Die Mechanismen, die zu ihrer Entstehung führen, wurden bisher nur teilweise aufgeklärt. Prinzipiell führen jedoch zwei unterschiedliche Wege zur Entstehung von Mikrokernen, die durch Immunfluoreszenzfärbung der Kinetochore unterschieden werden können. Wenn ganze Chromatiden bzw. Chromosomen (durch Fehlverteilung während der Mitose, z.B. bei indirekter DNA-Schädigung) oder die Zentromerregion eines Chromosoms (nach Chromosomenbrüchen) in Mikrokerne „abgesondert“ werden

und ein hoher Prozentsatz (ca. 70-100%) der untersuchten Mikrokerne Kinetochore enthalten, wird von einem aneugen Entstehungsmechanismus gesprochen.

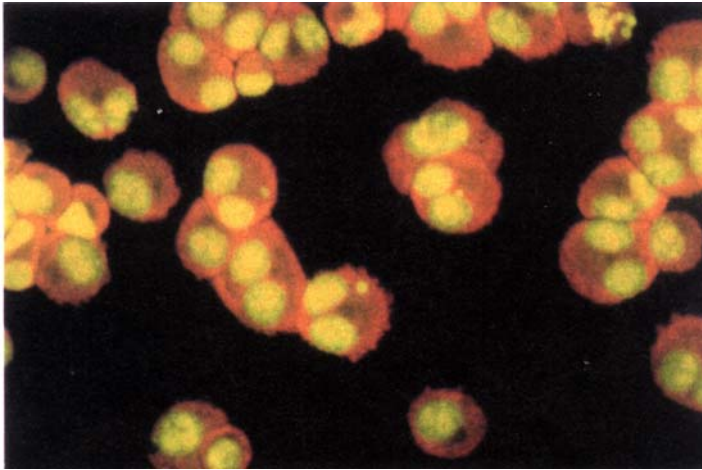


Abb. 1: Mikrokerne in doppelkernigen Lymphozyten nach Vorbehandlung mit Cytochalasin B (Fluoreszenzmikroskop; Färbung : Acridin-Orange; Vergrößerung 1250fach)

Beinhalten die entstandenen Mikrokerne azentrische Chromosomenfragmente (z.B. nach Doppelstrangbrüchen) oder Zentromere bei gleichzeitigem Verlust des Kinetochors, so wäre nur ein niedriger Prozentsatz der untersuchten Mikrokerne kinetochor-positiv (ca. 0-30%) und der zur Entstehung führende Mechanismus wird als clastogen bezeichnet.

Es ist aber auch möglich, dass Mikrokerne ganze Chromatide bzw. Chromosomen enthalten, obwohl an der Zentromerregion kein Kinetochorsignal nachweisbar ist.

Analog zu dieser Einteilung wird Substanzen, welche auf diesen beiden Wegen Mikrokerne in Zellen induzieren, eine aneugenische bzw. clastogenische Eigenschaft/Aktivität zugeschrieben. Außerdem besteht möglicherweise eine Korrelation von genotoxischem Mechanismus und Mikrokernelgröße.

EMS z.B., ein alkylierendes Agens (das sehr kleine Mikrokerne induziert), zeigt einen sehr geringen Prozentsatz an kinetochor-positiven Mikrokerneln und wird daher als clastogen bezeichnet.

Wie schon erwähnt, ist die auf das schädigende Ereignis folgende Mitose absolute Voraussetzung für die Mikrokernentstehung. Bei direkter DNA-Schädigung ist zusätzlich das vorherige Durchlaufen einer weiteren S-Phase notwendig, durch die sich der Schaden manifestiert. In der nun nachfolgenden Mitose führt der entstandene chromosomale Schaden möglicherweise zur Bildung von Mikrokernen. In diesem Fall ist eine erhöhte Mikrokernfrequenz erst nach mindestens 1,5 Zellzyklen zu erwarten, während in der Gegenwart von Substanzen, welche indirekte DNA-Schäden verursachen, bereits wenige Stunden später vermehrt Mikrokerne beobachtet werden können. So lassen sich, nach Einwirkung einer bestimmten Substanz, je nach zeitlichem in Erscheinung treten der Mikrokerne Rückschlüsse auf die, speziell für diese Substanz, sensible Zellzyklusphase treffen (Stopper und Müller, 1997).

Neben dieser augenscheinlich erklärbaren Formation von Mikrokernen hängt deren Erscheinen und Frequenz jedoch noch mit einer Vielzahl von Faktoren zusammen.

So fanden Weirich-Schwaiger et al. (1994) einen Zusammenhang zwischen zellulärem Altern, DNA-Reparaturkapazität und Mikrokernfrequenz.

Erhöhte Mikrokernraten könnten ebenfalls Ausdruck einer allgemeinen genetischen Instabilität bzw. der Versuch sein, durch Ausschluss von chromosomalem Material im Sinne einer Mikrokernformation einen stabileren Karyotyp zu entwickeln (Ottaggio et al., 1993). Nach einer Hypothese von Von-Hoff et al. (1992) könnten Mikrokerne es der Zelle sogar ermöglichen, genetische Schäden zu eliminieren (so auch Eckert, 1996).

Einen wichtigen, die chromosomale Stabilität beeinflussenden Faktor stellt die DNA-Methylierung dar (Hori, 1983). Im Tierversuch mit SHE (Syrian-hamster-embryo-fibroblast)-Zellen unter Applikation von 5-Azacytidin, das Hypomethylierung induziert, bestätigte sich die Vermutung, dass eben diese Hypomethylierung zu genetischer Instabilität führt, was durch eine erhöhte Mikrokernfrequenz zum Ausdruck kommt (Stopper et al., 1995b). Außerdem zeigen die meisten Tumore, bezogen auf Säugetierzellen, eine reduzierte endogene Cytosinmethylierung (Ray et al., 1994).

Die erhöhte Mikrokernrate in Tumorgewebe (Benner et al., 1993; Garewal et al., 1993; Rosin, 1993) legte die Vermutung nahe, dass die Bildung von Mikrokernen eine mögliche Rolle bei der Karzinogenese spielt. So könnte der Verlust eines Tumorsuppressorgens in Folge der Bildung eines Mikrokernes zu neoplastischer Zelltransformation und zu Karzinogenese führen; allerdings nur unter der

Voraussetzung, dass die in Mikrokernen eingeschlossenen genetischen Informationen der Zelle nicht mehr zu Verfügung stehen und unwiderruflich verloren sind. Studien zeigen, dass Mikrokern in der Lage sind, DNA zu synthetisieren (Kramer et al., 1990). Ob das im Mikrokern enthaltene genetische Material der Zelle jedoch gezielt für Transkription und Transformation zur Verfügung steht, ist nicht geklärt. Auch ist noch unklar, ob entstandene Mikrokern im Anschluss an die Mitose enzymatisch abgebaut werden, so von Obe und Beek (1982) vermutet, oder unter bestimmten Voraussetzungen in den Hauptkern reintegriert werden können (Gustavino et al., 1994). Schließlich kann trotz vieler Indizien nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei Mikrokernen nur um ein „unschädliches“ Beiprodukt handelt, das mit der Karzinogenese nichts zu tun hat (Stopper, 1995).

Fest steht, dass die verschiedenen Zellarten und Gewebe starke Unterschiede in Bezug auf die Mikrokernspontanrate zeigen und dass deren Kenntnis, besonders bei Vergleichen von Studienergebnissen an verschiedenen Zelllinien, von großer Bedeutung ist.

Neben Umwelteinflüssen, Ernährungsgewohnheiten und Gesundheitsverhalten (z.B. Rauchen) wird die Mikrokernspontanrate insbesondere von Alter und Geschlecht beeinflusst (Fenech, 1998).

## **1.4 Vorstellung der verwendeten Testsysteme**

### **1.4.1 Cytokinesis-Block-Micronucleus-Assay (CBMNA)**

Der Mikrokernstest spielt eine immer größere Rolle bei der Genotoxizitätsprüfung von natürlichen und synthetischen, potentiell karzinogenen Substanzen, unter anderem bei der immer größer werdenden Gruppe der Xenobiotika. Zu diesem Zweck wurde er für die Anwendung in Säugetierzellsystemen verschiedener Gewebe und Arten entsprechend modifiziert und angepasst.

Für Stoffe, deren Kanzerogenität sich durch ihre direkte Wirkung auf das Genom erklärt und die auf diesem Wege Genmutationen auslösen können, sind Mutationstests (z.B. Ames-Test) Mittel der Wahl. Werden chromosomale Veränderungen durch andere



Mechanismen (z.B. durch indirekte DNA-Veränderung) verursacht, ist eine Detektion auf diesem Wege nicht möglich. Derartige Veränderungen (z.B. Chromosomenbrüche oder der Verlust ganzer Chromosomen) können aber sehr wohl durch den Mikrokerntest nachgewiesen werden, der außerdem weit weniger aufwendig ist. Gleichzeitig stellt er eine sensitive und verlässliche Methode zur Detektion und Quantifizierung chromosomaler Schäden dar.

Mit seiner Hilfe können im Rahmen humaner Biomonitoring-Untersuchungen große Kollektive relativ zeit- und kostengünstig durchleuchtet werden. So wäre es z.B. möglich, akzeptable bzw. „normale“ DNA-Schadens-Werte in humanen Populationen zu bestimmen. Davon ausgehend können die Auswirkungen verschiedener „Lifestyle-Faktoren“ auf eben diese allgemeinen Grundschadenswerte ermittelt werden, um mögliche Präventivmaßnahmen zu ergreifen (Fenech, 1998).

Das Grundprinzip des Mikrokern-Assays ist einfach. Die zu untersuchenden Zellen (z.B. humane periphere Lymphozyten) werden isoliert, kurze Zeit kultiviert und nach Cytospinpräparation (siehe 2.7.4-5) mit einem DNA-Fluoreszenzfarbstoff behandelt.

Die Auswertung erfolgt mit dem Mikroskop, ausgestattet mit einem speziellen Filter für die den Farbstoff anregende Wellenlänge des Lichts.

Wie schon oben erwähnt, ist die Komplettierung mindestens einer Zellteilung nach dem potentiell DNA-schädigenden Ereignis absolute Voraussetzung. Dementsprechend ist die Zellteilung Grundlage der Mikrokernentstehung und deshalb wird die Mikrokernrate maßgeblich von der Geschwindigkeit und insbesondere vom Anteil der sich teilenden Zellen bestimmt. Aus diesem Grund lag bei der ursprünglichen Version des Mikrokern-Assays, bei dem man versuchte, diesem Problem mit Zellsynchronisationstechniken zu begegnen, der Index des bestimmten chromosomalen Schadens unter dem absoluten Wert. Weiterhin wurde festgestellt, dass die Mikrokernfrequenz abnimmt, wenn mehr als eine Zellteilung vollzogen wird (Fenech, 1993).

Aus diesem Grund wurde, und um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen, beschlossen, dass nur Mikrokerne der Zellen gezählt werden, die sich ausschließlich einmal (nach DNA-schädigendem Ereignis) geteilt haben.

Beim Auswerten der Präparate zeigte sich, dass der optimale Zeitpunkt zur Zählung der Mikrokerne das zweikernige Telophasenstadium ist. Durch ihr zweikerniges

Erscheinungsbild sind sie leicht zu erkennen, haben somit zweifelsohne eine Kernteilung vollzogen und sind nun in der Lage, Mikrokerne zu bilden (Fenech, 1993). Um dieses Stadium zu erreichen, werden die kultivierten Zellen vor der ersten Mitosephase mit Cytochalasin-B (Cyt.-B) behandelt und akkumulieren dann als zweikernige Zellen, da Cyt.-B die Zytokinese hemmt, ohne jedoch die Karyokinese zu beeinflussen.

Durch quantitative Erfassung der ein-, zwei- und mehrkernigen Zellen (> 2 Kerne) nach einem definiertem Zeitpunkt kann dann nach einer bestimmten Formel, vorgeschlagen von Eastmond und Tucker (1989), der Nuclear Division Index (NDI) errechnet werden. So kann mit der Cytokinesis-block-Methode auf Ausmaß und Progression der Kernteilung in einer sich teilenden Zellpopulation geschlossen werden. Außerdem können zusätzliche Aussagen über cytostatische oder mitogene Eigenschaften der untersuchten Substanzen innerhalb desselben Untersuchungsansatzes gemacht werden.

#### **1.4.2 Comet-Assay (Einzelzell-Gelelektrophorese/ SCGE)**

Der Comet-Assay stellt ein äußerst sensitives Testsystem dar, welches in der Lage ist, eine Vielzahl von DNA-Schäden auf Einzelzellniveau (und das bereits bei sehr niedrigen Schädigungslevels) direkt zu detektieren und zu quantifizieren.

Die zu untersuchenden Zellen werden nach spezieller Vorbehandlung einer Gelelektrophorese unterworfen. Dabei wandert die negativ geladene DNA (die DNA trägt aufgrund der Phosphatbrücken ihrer Basensequenz eine negative Ladung) bei Anlegen eines elektrischen Feldes zum Pluspol (Anode). Hierbei können kleine DNA-Bruchstücke schneller als große DNA-Fragmente durch das Gel wandern; es erfolgt eine Auftrennung der DNA nach ihrer Größe. Somit kann sich die geschädigte DNA von der eigentlichen Kern-DNA entfernen. Die Menge der migrierten DNA ist dabei proportional zur DNA-Schädigung. Nach spezifischer Färbung der DNA erscheinen geschädigte Zellen daher als „Komet“ unter dem Mikroskop (siehe Abbildung 2 und 3).

Der erste Ansatz, in Agarose eingebettete Zellen einer alkalischen Lyse zu unterziehen, das Verhalten dieser alkalidenaturierten DNA in einem elektrischen Feld zu verfolgen, um eine Aussage über den vorliegenden DNA-Schaden treffen zu können, stammt von

Rydberg und Johanson (1978). Weiter entwickelt wurde diese Mikrogelelektrophorese-technik, um DNA-Schäden auf Einzelzellniveau festzustellen, 1984 von Östling und Johanson, mit dem Unterschied, das Verfahren unter neutralen Bedingungen ablaufen zu lassen. Allerdings erkannte man, dass unter neutralen Lysebedingungen nur die Detektion von Doppel-Strang-Brüchen (DSB) möglich war, da die DNA-Basen-Paarung nicht unterbunden wurde. So wurde die, nun offiziell als Comet-Assay bezeichnete, Methode von Singh et al. (1988) modifiziert und lief nun wieder unter alkalischen Lysebedingungen ab, wodurch auch die Detektion von Einzel-Strang-Brüchen (SSB) und alkali-labiler Bereiche (ALS) möglich war. So verändert gewann der Comet-Assay noch größere Sensitivität im Identifizieren genotoxischer Substanzen, weil nahezu alle diese Stoffe mehr SSB bzw. ALS als DSB induzieren.

Das breit gefächerte Spektrum der zu detektierenden DNA-Schäden (Übersicht bei Tice et al., 1995) umfasst neben den bereits erwähnten DNA-Strangbrüchen und ALS praktisch alle bekannten DNA-Veränderungen, wie etwa oxidative DNA-Schäden, Alkylierungen und die Bildung großer Addukte (DNA/DNA- und DNA/Protein-Crosslinking), da sie alle eine direkte oder indirekte Induktion der DNA-Wanderung bewirken. Gerade diese sozusagen universale Identifikation aller möglicher DNA-Schäden ist Gegenstand ständiger Forschung und Untersuchungen mit dem Ziel, den Comet-Assay dahingehend zu modifizieren, spezifische Klassen von DNA-Schäden festzustellen (z.B. mit spezifischen Exzisionsenzymen). Sonderformen wie der azelluläre Assay (Singh et al 1990) zur Detektion DNA-schädigender Substanzen unabhängig ihrer Zytotoxizität oder der „molecular weight diffusion assay“ zur Erfassung apoptotischer bzw. nekrotischer Zellen (Vasquez und Tice, 1997a) entstanden.

DNA-Schäden immer häufiger mittels Comet-Assay zu erfassen, hat viele Vorteile. Neben seiner hohen Sensitivität können, zum ersten Mal, Zellen aus proliferierenden und nicht-proliferierenden Geweben verwendet werden. Zusätzlich ist die Verarbeitung kultivierter Zellen (in vitro) möglich. Sein bedeutendster Vorteil ist allerdings die rasche, einfache und kostengünstige Durchführbarkeit. Dieser Umstand ermöglicht es, genotoxische (Umwelt-)Einflüsse auf den menschlichen Organismus, z.B. im Rahmen von Biomonitoring-Untersuchungen (Kassie et al., 2000; Hartmann et al., 1998), zu ermitteln und so spezifische Sicherheitsmaßnahmen bei identifizierten mutagenen

und/oder karzinogenen Substanzen zu treffen. Hier erweist es sich als vorteilhaft, dass auch sehr geringe Zellmengen, selbst die Zellen der Nasen- und Rachenschleimhäute, problemlos untersucht werden können (sog. „Zellen des ersten Kontakts“; Valverde et al., 1997). Weiter findet der Comet-Assay Anwendung bei der Bestimmung von DNA-Reparatur-Kapazitäten.

Neben der Auswertung des Comet-Assay mittels Computer und Bildbearbeitungsprogramm, wie sie in dieser Studie erfolgte, existiert noch eine visuelle Schadensklasseneinteilung. Hier geschieht die Einteilung direkt am Mikroskop.

Dabei werden die Kometen in fünf definierte Schadensklassen (Klasse A-E) eingeteilt. Jeder Schadensklasse kann dann ein relativer DNA-Schaden zwischen  $< 10\%$  bis  $>40\%$  zugeschrieben werden.

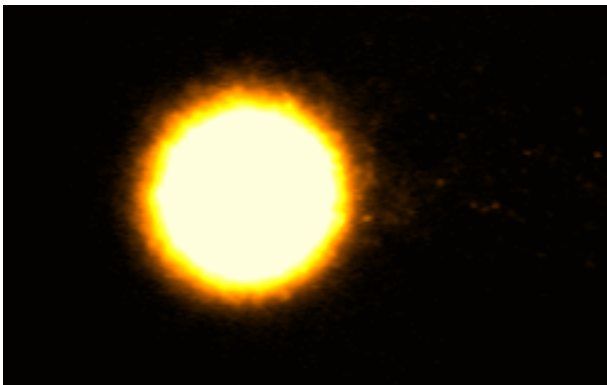


Abb. 2: Beispiel eines Cometen mit einem relativen DNA-Schaden von  $< 10\%$   
(Schadensklasse A; Laufrichtung: von rechts nach links)

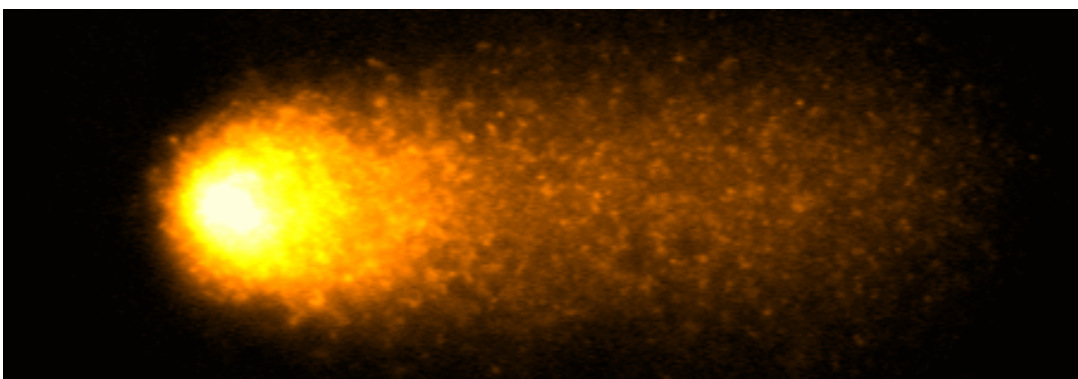


Abb. 3: Beispiel eines Cometen mit einem relativen DNA-Schaden von  $> 40\%$   
(Schadensklasse E; Laufrichtung: von rechts nach links)

## **1.5 Dialyseverfahren**

Die Dialysebehandlung ist eine Nierenersatztherapie, mit deren Hilfe der Ausfall der exkretorischen Nierenfunktion (bei akutem Nierenversagen überbrückend, bei chronischer Niereninsuffizienz intermittierend) so weit wie möglich ausgeglichen werden soll. Ausgehend von der Annahme, dass die meisten Urämiesymptome von der Konzentration harnpflichtiger Substanzen abhängen, die normalerweise von der Niere ausgeschieden werden, ist das Ziel der Dialyse

- die Entfernung von harnpflichtigen Substanzen aus dem Blut (Dialyse) und die Senkung ihrer Konzentration unter die potentiell toxische Grenze
- die Entfernung von akkumulierter Flüssigkeit (Ultrafiltration) und die Kontrolle des Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushalts (sog. Homöostase).

### **1.5.1 Hämodialyse**

Die eigentliche Entgiftung geschieht im so genannten Dialysator. Die dort befindliche Membran ist faserförmig, aus mehreren tausend gebündelten Kapillaren (Kapillardialysator) oder schichtförmig (Plattendialysator) angeordnet und besteht aus Zellulose (Cellophan- oder Cuprophanmaterial) sowie neuerdings synthetischem Material. Diese Membran trennt das Blut von der Dialysierflüssigkeit, einer Elektrolytlösung, die im Gegenstromprinzip durch den Dialysator gepumpt wird. Dialyse bezeichnet also ein physikalisches Verfahren zur Abtrennung gelöster Teilchen aus dem Blut mittels einer semipermeablen Membran.

Die Entwicklung neuer synthetischer Materialien beruht auf den - in den letzten Jahren zunehmenden – Bemühungen, das Membranmaterial des Dialysators möglichst „blutfreundlich“ zu gestalten und führte zu neuen Zellulosemodifikationen. Solche nicht auf Zellulosebasis gefertigte Membrane bestehen beispielsweise aus Polycarbonat oder Polymethylmethanacrylat.

Maßgeblich am Stofftransport durch die Membran beteiligt sind folgende Mechanismen

- Diffusion           Entgiftung durch Konzentrationsausgleich
- Osmose             Wasserentzug durch Konzentrationsausgleich über eine semipermeable Membran
- Ultrafiltration    Flüssigkeitsentzug durch Druckerhöhung auf der Blutseite und/oder Sog auf der Dialyseseite
- Konvektion        Mitnahme von Stoffen durch den Flüssigkeitsstrom.

Die Leistung des Dialysators wird durch seine Clearance und durch die Ultrafiltration erfasst. Der Blutfluss wird durch die Menge, welche die künstlich geschaffene interne arteriovenöse Fistel (als permanenten Gefäßzugang) in der Zeiteinheit zur Verfügung stellen kann, begrenzt und liegt optimal bei 250 bis 300 ml/min. Lange Zeit galt die Entfernung niedermolekularer „Schlackenstoffe“ als Maß der Leistung eines Dialysators, bis erkannt wurde, dass sich auch höhermolekulare Substanzen im Organismus anreichern, die nicht mit den üblichen Zellulosemembranen entfernt werden können. Es wurden durchlässigere synthetische Membranen mit größeren Poren entwickelt, welche die Grundlage für die Anwendung der High-flux-Hämodialyse, Hämofiltration und Hämodiafiltration bilden.

### **1.5.2 Hämofiltration (HF)**

Bei der Hämofiltration wird dem Blut ein Ultrafiltrat entzogen, wobei dieser Filtratstrom hauptsächlich durch konvektiven Transport bedingt ist und so die darin gelösten Giftstoffe entfernt. Im Hämofilter, wird die Ultrafiltration durch Aufbau eines Druckgradienten über die Membran erreicht, wobei Plasmawasser und lösliche Bestandteile bis zu einer bestimmten Größe in das Filterkompartiment gelangen. Im Unterschied zur Hämodialyse erfolgt der Transport von Stoffen also nicht entsprechend eines Konzentrations-, sondern eines Druckgefälles (Ultrafiltration). Die größte Menge des Ultrafiltrats wird durch eine Substitutionslösung bekannter Zusammensetzung ersetzt (abzüglich der gewünschten Dehydratation). Die ausschließliche Verwendung pyrogenfreier Dialyse-Flüssigkeiten (ein Ziel, das Dank neuer Filter inzwischen erreicht

wurde) stellt neben der guten Kreislaufverträglichkeit und der günstigen Beeinflussung der Hypertonie einen besonderen Vorteil dar. Zusätzlich ist die Hämofiltration für die Entfernung höhermolekularer Substanzen besser geeignet als die herkömmliche Hämodialyse. Dementsprechend werden zunehmend sogenannte High-flux-Dialysatoren, aus z.B. Polyacrylnitril, Polysulfon oder Polyamid eingesetzt. Die bessere Clearance höhermolekularer Substanzen, wie beispielsweise  $\beta_2$ -Mikroglobulin, beruht auf der höheren Porengröße von Polysulfon oder Polyamid.

### **1.5.3 Hämodiafiltration (HDF)**

Die Hämodiafiltration ist ein Verfahren, das Hämodialyse und Hämofiltration kombiniert. Grundlage war die Erkenntnis, dass niedermolekulare Substanzen wie Harnstoff und Kreatinin vorwiegend durch diffusiven Transport (durch Hämodialyse) und Mittelmoleküle überwiegend durch konvektiven Stofftransport (durch Hämofiltration) entfernt werden.

Durch Kombination der beiden Verfahren erreichte man eine - im Vergleich mit den Einzelverfahren - erhöhte Gesamteliminationsrate. Allerdings ist diese nicht gleich der Summe der Einzelverfahren, da Konvektion und Diffusion parallel verlaufen.

Für die HDF-Behandlung wurde eine modifizierte Dialyseapparatur mit vergleichsweise großem technischen Aufwand konzipiert, wodurch sich die hohen Kosten erklären. Besondere Bedeutung kommt dabei dem Dialysator zu. Denn übliche Dialysatoren, wie sie in der „normalen“ Dialyse verwendet werden, können für die HDF nicht verwendet werden. Bei den Hämodiafiltern handelt es sich um High-flux-Dialysatoren mit guten Diffusions- und Konvektionseigenschaften.

Ebenso wie die HF hat die HDF eine blutdruckstabilisierende Wirkung und wird deshalb bevorzugt bei Patienten mit kardio-vaskulären Vor- oder Begleiterkrankungen eingesetzt.

## **1.6 Angiotensin II-Rezeptorantagonisten**

### **1.6.1 Grundlagen des Renin-Angiotensin-Aldosteron-(RAA)-Systems**

Hauptaufgaben dieses gemischt enzymatisch-hormonellen Systems sind die Regulation des Flüssigkeitsvolumens, der Elektrolytbalance und des systemischen Blutdrucks.

Angiotensin II, als wichtiger Mediator der RAAS-Kaskade, wird als wesentlicher Faktor bei der Entstehung der Hypertonie und verschiedenen Formen kardio-vaskulärer und renaler Komplikationen angesehen, wodurch es in den Brennpunkt pharmakologischer Studien rückte.

Renin, ursprünglich als Prezymogen (Preprorenin) synthetisiert und durch proteolytische Spaltungen und Glykosilierungen verändert, wird im juxtaglomerulären Apparat (JAG) der afferenten glomerulären Arteriolen der Niere produziert und in das Blut sezerniert. Bei den juxtaglomerulären Zellen handelt es sich um modifizierte glattmuskuläre Zellen mit endokriner Funktion. Ausgelöst wird die Reninfreisetzung durch Minderdurchblutung der Niere bzw. des JAG, durch Verkleinerung des Natrium-Kalium-Quotienten, durch  $\beta$ -Rezeptorstimulation, Parathormon, Glukagon und vasoaktive intestinale Peptide (VIP). Durch die nun folgende enzymatische Kaskade (siehe Übersicht) wird das (in der Leber produzierte) Angiotensinogen zu Angiotensin II umgewandelt. Angiotensin II wirkt nun über verschiedene Signalwege (systemisch) an unterschiedlichen Zielorganen, wobei die Wirkung häufig direkt oder indirekt mit der Blutdruckregulation zusammenhängt. An dieser Stelle sollen nur einige der vielen bisher entdeckten Wirkungen genannt werden (siehe auch Abbildung 4 und 5).

Angiotensin II entfaltet an den glattmuskulären Gefäßzellen direkt seine vasokonstriktorische Wirkung und gilt als stärkste blutdrucksteigernde Substanz im Organismus. In der Nebenniere stimuliert Angiotensin II u.a. die Aldosteronproduktion in der Zona glomerulosa; über Natrium- und Wasserretention im proximalen Tubulus kommt es zu einer Erhöhung des intravasalen Volumens und kann hierdurch wiederum blutdrucksteigernd wirken. Beide Effekte führen im Anschluss wieder zur down-regulation des RAAS. Darüber hinaus fungiert Angiotensin II als Wachstumsmodulator oder -faktor.



Ausgeübt werden diese Effekte über die Bindung von Angiotensin II an spezifische Rezeptoren, wobei die unterschiedliche Wirkung in verschiedenen Geweben und Organen auf unterschiedliche Rezeptoren schließen ließ. Inzwischen sind zwei differente Angiotensin II-Rezeptoren isoliert worden. Der Angiotensinrezeptor (AT I) mit den Isoformen I a und I b und der AT II-Rezeptor, ebenfalls mit zwei Isoformen, II a und II b.

Weiterhin muss die Vernetzung des RAAS mit dem Abbauweg des Kinin-Systems erwähnt werden, da diese als mögliche „Schwachstelle“ der sehr häufig bei der Hypertoniebehandlung eingesetzten ACE (angiotensin-converting-enzyme)-Hemmer eine Rolle spielt. Das ACE (ebenfalls als Kinase II bekannt) ist neben seiner Wirkung in der Aktivierungskaskade des RAAS ein abbauendes Enzym von Bradykinin, Substanz P und anderen biologisch aktiven Peptiden im Kallikrein-Kinin-Prostaglandinsystem. So besitzen ACE-Hemmer eine bradykininpotensierende Wirkung durch Reduktion bradykininabbauender Kinasen. Dies gilt als Hauptursache einiger typischer Nebenwirkungen, des relativ häufig beobachteten trockenen Reizhustens und verschiedener allergischer Hautreaktionen.

Unter Therapie mit Angiotensin II-Rezeptorantagonisten bleibt hingegen die Aktivität des ACE (Kinase II), die (renale) Prostaglandinsynthese und die systemische Prostazyklinsynthese unbeeinflusst (Maarten et al., 2000).

### **1.6.2 Klinischer Einsatz selektiver Angiotensin II-Antagonisten**

Hauptindikation dieser relativ „neuen“ Substanzgruppe ist die arterielle Hypertonie. Bekanntester Vertreter dieser sogenannten Sartane ist der Wirkstoff Losartan, ein seit Oktober 1995 in Deutschland zugelassener Imidazolabkömmling, der in der Lage ist, den AT I-(Angiotensin II) Rezeptor selektiv zu hemmen, ohne den AT II-Rezeptor direkt zu beeinflussen. Die Angiotensin II vermittelte Wirkung auf Blutdruck, Aldosteron-, Vasopressin- und Katecholaminfreisetzung und Durstentstehung wird selektiv antagonisiert. Ebenso wurde die Ausbildung einer kardialen Hypertrophie und die unter RAAS-Aktivierung entstandene Herzinsuffizienz günstig beeinflusst oder sogar verhindert (Taal et al., 2000; siehe auch Abbildung 4 und 5).

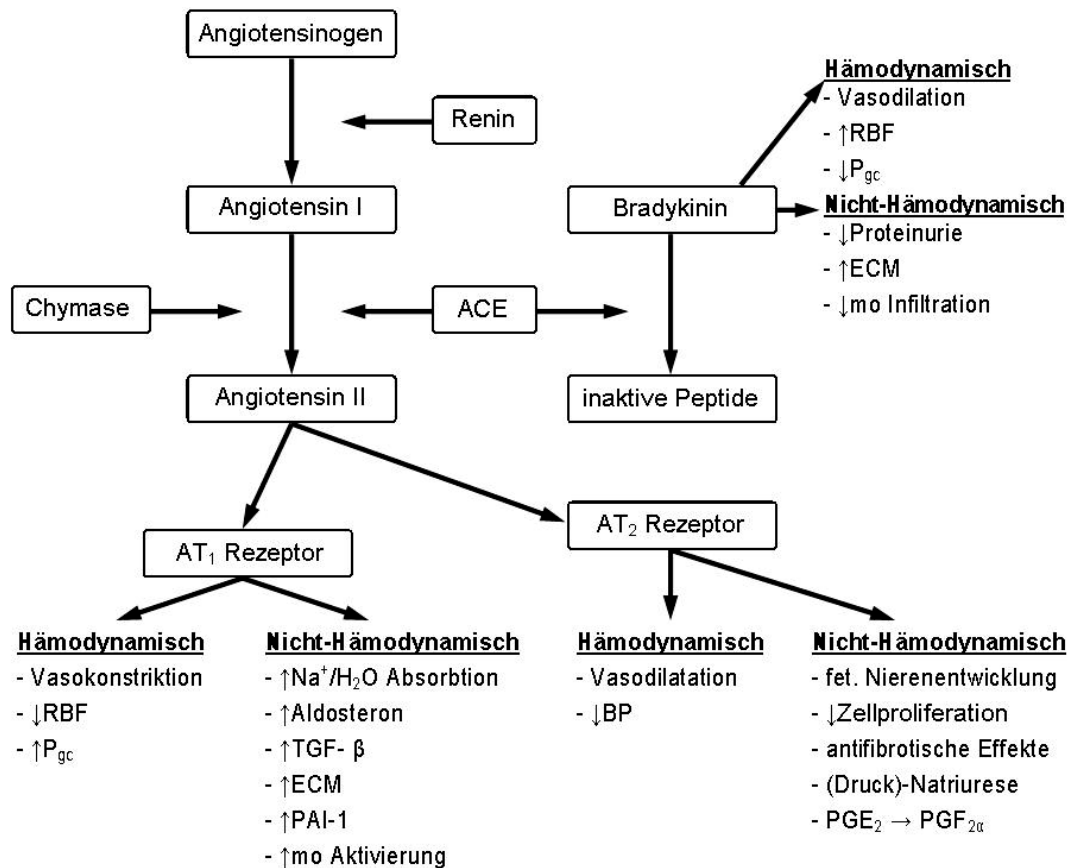


Abb.4: Interaktion des Renin-Angiotensin-System mit dem Kinin-System (modifiziert nach Taal et al., 2000). Inhibition des angiotensin-converting-enzyme (ACE) durch ACEI erhöht kinin-abhängige Effekte, während die AT<sub>1</sub>Rezeptor-Blockade mit AT<sub>1</sub>RA AT<sub>1</sub>Rezeptor abhängige Effekte inhibiert und eventuell durch erhöhte Ang II-Spiegel AT<sub>2</sub>Rezeptor-abhängige Effekte stimuliert. Chymase und andere Serin-Proteasen können Ang I in Ang II umwandeln, wenn das ACE durch ACEI blockiert wird. **Abkürzungen:** ECM = extrazelluläre Matrix (Proteine), mo = Makrophagen, PAI-1 = Plasminogen Aktivator Inhibitor-1, P<sub>gc</sub> = glomerulärer Kapillardruck, TGF-β = transforming growth factor-β, Pg = Prostaglandin, RBF = renaler Blutfluß.

### 1.6.3 Mögliche Indikation bei Prädialysepatienten

An der Niere zeigt Losartan eine natriuretische und vasodilatatorische Wirkung, wirkt somit blutdruck- senkend und steigert, zumindest vorübergehend, die Harnsäureausscheidung. Weiter bestätigten mehrere Studien eine günstige

Beeinflussung einer bestehenden Proteinurie. So zeigte Losartan im Tierversuchen eine renoprotektive Wirkung, hemmte die Neointimaproliferation sowie die Entstehung der diabetischen Glomerulopathie (Krivošiková et al., 2001; Taal et al., 2000; siehe auch Abbildung 4 und 5).

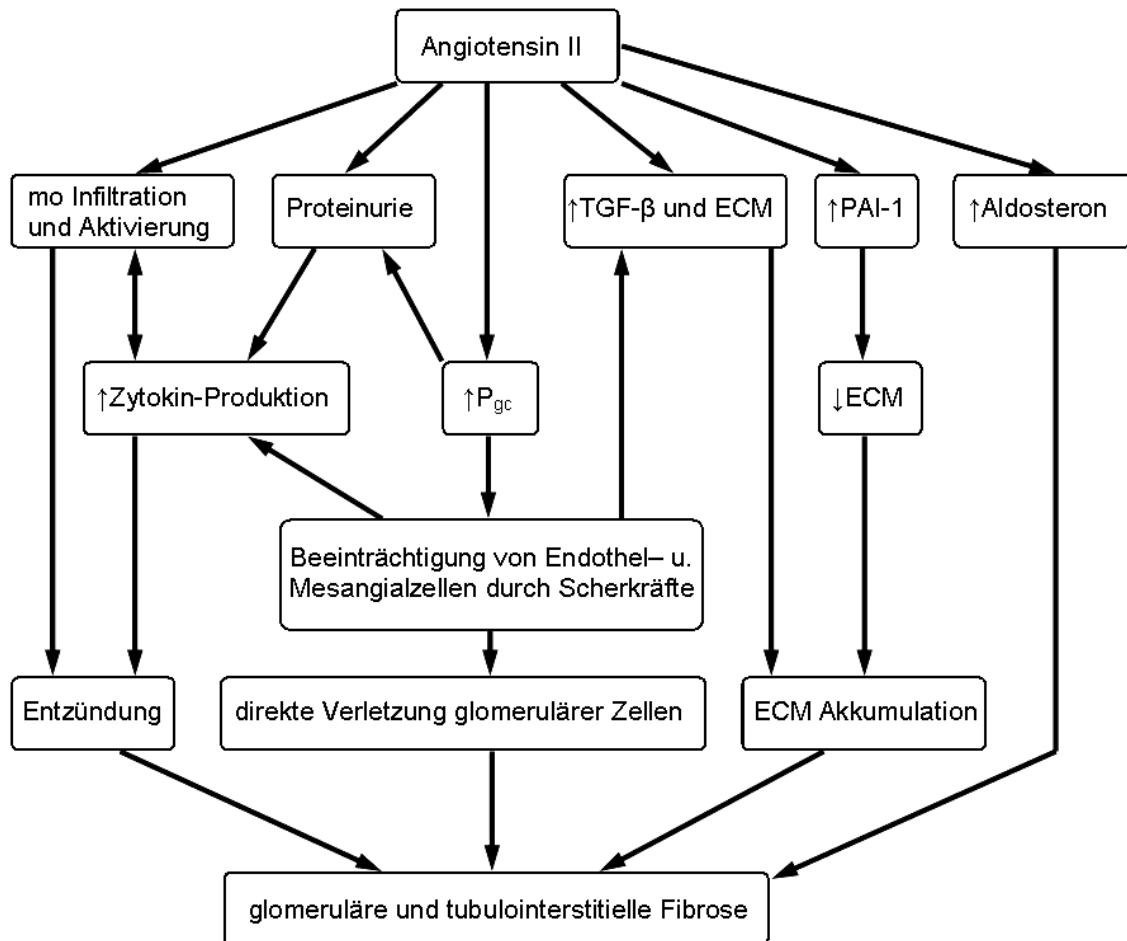


Abb.5: Hämodynamischen und nicht-hämodynamischen Effekte von Angiotensin II in der Pathogenese der progressiven Nierenerkrankung und der Nierenfibrose nach Nephronenverlust (modifiziert nach Taal et al., 2000).

**Abkürzungen:** ECM = extrazelluläre Matrix (Proteine), mo = Makrophagen, PAI-1 = Plasminogen Aktivator Inhibitor-1,  $P_{gc}$  = glomerulärer Kapillardruck, TGF- $\beta$  = transforming growth factor- $\beta$ .

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Chemikalien und Arbeitsgeräte**

#### **2.1.1 Allgemeine Laborchemikalien und Verbrauchsmaterial**

Bezugsquellen waren: Aldrich-Chemie, Steinheim; Fluka-Chemie AG, Buchs/Schweiz; GIBCO, Maryland/USA; Merck, Darmstadt; Roth, Karlsruhe; Serva, Heidelberg; Sigma Chemical Co., Taufkirchen; Hartenstein, Würzburg (Verbrauchsmaterial); Greiner, Nürtingen (Verbrauchsmaterial für Zellkulturen); Eppendorf, Hamburg (Verbrauchsmaterial für Zellkulturen); Quagen, Hilden (Verbrauchsmaterial für Zellkulturen);

Verwendet wurde hochreines Wasser aus der hauseigenen Reinstwasser-Anlage (Millipore-System, 0,2µm).

Die verwendeten Puffer, Lösungen und Verbrauchsmaterialien wurden nach Fertigstellung bzw. vor Gebrauch autoklaviert.

#### **2.1.2 Arbeitsgeräte**

Autoklav	Melag Typ 28, Melag, Berlin;
Brutschrank	Typ B 5060 EK-CO <sub>2</sub> , Heraeus, Düsseldorf;
Fluoreszenzmikroskop	Labophot 2A/2, Nikon GmbH, Düsseldorf;
Kamera für Fluoreszenzmikroskop	CF 15/2R GB, Kappa Messtechnik GmbH, Gleichen;
Inversionsmikroskop	Diavert, Leitz, Wetzlar;
Hämatocytometer	„Neubauerkammer“, Hartenstein, Würzb.;
Bildverarbeitungssystem	NIH Image, Vers.1.54, by Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA;

Sterile Werkbank	Gelair BH26, Flow Laboratories GmbH, Meckenheim;
Elektrophorese-Kammer	Instituts-Eigenbau;
Zentrifuge	Hettich Universal/K2S, Hettich, Tuttlingen;
Zytozentrifuge	Cytospin 3, Shandon, Astmore/GB;
Pipetten/E-Pipetten	

## **2.2 Verwendete Zellarten**

### **2.2.1 Maus-Lymphom-Zellen (L5178Y tk +/-, MoLy)**

Diese Zelllinie (Klon 7.3.2.c) wurde von Dr. W.J. Caspary, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, North Carolina/USA, zur Verfügung gestellt.

### **2.2.2 Humane Lymphozyten**

Die für die Experimente benötigten humanen Lymphozyten stammen von männlichen und weiblichen Dialysepatienten des Dialysezentrums Würzburg.

Da eine frühere Studie des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie Würzburg gezeigt hat, dass im Anschluss an den Dialysevorgang entnommenes Blut einen leicht geringeren DNA-Schaden aufweist, wurden die anschließenden Versuche immer mit Blutproben, die vor dem Vorgang der Dialyse entnommen wurden, durchgeführt.

Außerdem wurden humane Lymphozyten zweier ständiger, gesunder Kontrollpersonen (männlich, Nichtraucher) verwendet.

Die Abnahme erfolgte in Ammonium-Heparin-Monovetten (9 ml S-Monovetten, Saarstedt, Nürtingen), um die Blutgerinnung zu verhindern. Die Verarbeitung geschah unmittelbar danach, maximal innerhalb einer Stunde. Die Zeit ist bei der Arbeit mit humanen Lymphozyten ein maßgeblicher Faktor, da diese nur einige Tage kultiviert werden können, bevor sie absterben.

## **2.3 Medien und Puffer für die Zellkulturen**

### Zellkulturmedium für humane Lymphozyten :

Zur Kultivierung von humanen Lymphozyten werden 500 ml RPMI 1640 mit Phenolrot (Sigma Chemie, Taufkirchen) mit folgenden Zusätzen ergänzt:

- hitzeinaktiviertes (30 min bei 56°C) fetales Kälberserum, 75 ml  
Sigma Chemical, Taufkirchen;
- Natrium-Pyruvat (100mM), 5 ml  
Sigma Chemical, Taufkirchen;
- L-Glutamin (200mM), 5 ml  
Sigma Chemical, Taufkirchen;
- MEM (Gemisch aus nicht-essentiellen Aminosäuren), 5 ml  
GIBCO, Maryland/USA;
- Penicillin-Streptomycin (10.000 I.U./ml Pen., 10.000 µg/ml Strep.), 2 ml  
GIBCO, Maryland/USA;

### Zellkulturmedium für Maus-Lymphom-Zellen (L5178Y tk+/-, MoLy):

Zur Kultivierung und Isolierung von Maus-Lymphom-Zellen(L5178Y tk +/-, MoLy) werden 500 ml RPMI 1640 mit Phenolrot (Sigma Chemie, Taufkirchen) mit folgenden Zusätzen ergänzt:

- hitzeinaktiviertes (30 min bei 56°C) Pferdeserum, 50 ml  
Sigma Chemical, Taufkirchen;
- Natrium-Pyruvat (100mM), 5 ml  
Sigma Chemical, Taufkirchen;
- L-Glutamin (200mM), 5 ml  
Sigma Chemical, Taufkirchen;
- Penicillin-Streptomycin (10.000 I.U./ml Pen., 10.000 µg/ml Strep.), 2 ml  
GIBCO, Maryland/USA;

PBS:

• NaCl p.A.	8000 mg
• KCl p.A.	200 mg
• Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	1150 mg
• KH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	200 mg
• CaCl · 2H <sub>2</sub> O	130 mg
• MgCl · 2H <sub>2</sub> O	100 mg

Der Puffer wird mit hochgereinigtem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt.

Der pH-Wert beträgt 7,0. Im Anschluss wird autoklaviert.

Dieser Puffer dient zur Verdünnung von Lösungen und zum Reinigen von Zellen.

PBS/CMF-Puffer (Ca<sup>2+</sup>- und Mg<sup>2+</sup>-frei):

• NaCl p.A.	8000 mg
• KCl p.A.	200 mg
• Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	572 mg
• KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	200 mg

Der Puffer wird mit hochgereinigtem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt.

Der pH-Wert beträgt 7,0. Im Anschluss wird autoklaviert.

Dieser Puffer dient ebenfalls zur Verdünnung von Lösungen und zum Reinigen von Zellen.

NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (7,5%):

• NaHCO <sub>3</sub>	7500 mg
• Hochgereinigtes Wasser	92,5 ml

Diese Lösung dient dem Anheben des pH-Wertes eines sauren Mediums und wird im Bedarfsfall zur pH-Wert-Einstellung verwendet.

### Histopaque<sup>®</sup> – 1077:

Histopaque<sup>®</sup> – 1077, eine Lösung aus Polysaccharose und Natriumdiatrizoat mit einer Dichte von 1.077 +/- 0,001, ist ein Trennmedium und ermöglicht die rasche Gewinnung lebender, mononukleärer Zellen aus relativ kleinen Blutvolumina. Das Blut kann so durch Zentrifugieren nach seinem Dichtegradienten aufgetrennt werden.

In der obersten Schicht befindet sich das gelbliche Plasma, darunter die Interphase, gefolgt von der Histopaque<sup>®</sup>-Lösung und zuletzt, am Boden des Röhrchens, das Pellet aus Erythrozyten bzw. anderem Zellmaterial. Die Kontamination ist bei diesem Verfahren vernachlässigbar, die meisten Verunreinigungen durch Thrombozyten sind durch langsames Zentrifugieren und mehrmaliges Waschen entfernbare.

### PHA-Lösung:

Phytohämagglutinin (PHA), Stammlösung 1mg/ml in PBS,  
Sigma Chemical, Taufkirchen;

PHA sind aus bestimmten Pflanzen(samen) gewonnene Extrakte, die sich durch ihren hohen Gehalt an Lektinen auszeichnen. Lektine, hier wurden Lektine aus der Kidney Bohne verwendet, sind (Glyco-)Proteine, die spezifisch mit bestimmten Kohlenhydratstrukturen (Glycoproteine oder Polysaccharidreste) reagieren, das heißt sie können verschiedene Zellen binden und quervernetzen (z.B. Erythrozyten, Tumorzellen etc.) und diese mit zum Teil großer Spezifität agglutinieren bzw. präzipitieren. Einige Lektine, wie etwa das der Kidney Bohne, wirken als Mitogene bzw. fördern Wachstum und Differenzierung bestimmter Zellen.

Sie wurden in dieser Studie zur Stimulation der Lymphozyten zum Durchlaufen des Zellzyklus verwendet. Sie bewirken damit die Umwandlung kleiner, ruhender Lymphozyten zu großen, aktivierten Lymphoblasten (mit vermehrter Nucleinsäuresynthese und Mitoserate).



### Cytochalasin-B-Lösung :

Cytochalasin-B, Stammlösung 500 µg/ml in DMSO,  
Sigma Chemical, Taufkirchen;

Cytochalasin-B ist ein Mykotoxin, das die Fähigkeit besitzt, Aktinfilamente aufzulösen. Seine Wirkung entfaltet es durch Bindung des Plus-Endes des Filaments und verhindert so die weitere Polymerisation, während das Filament vom Minus-Ende depolymerisiert. Die Zellen verbleiben somit im Zweikern-Stadium. Dies ist für die Untersuchung auf Mikrokerne von äußerster Relevanz, da nur durch eine Mitose Mikrokerne entstehen können.

### Heparin :

Heparin stellt eine Mischung von Polyschwefelsäureestern mit einem Glucosaminoglycans dar. Die Hauptwirkung des Heparins bei der Antikoagulation besteht in einer Steigerung der Reaktionsfähigkeit und der Reaktionsgeschwindigkeit von Antithrombin III (AT III). Es erfolgt eine dosisabhängige Blockierung der exogenen und endogenen Blutgerinnung. Antithrombin III ist das wichtigste Thromboseschutzprotein des Blutplasmas; es hemmt die Entstehung von Thrombin. Ohne eine ausreichende Menge von AT III ist Heparin wirkungslos, so dass bei angeborenem oder erworbenem AT III-Mangel dieses Protein zur Entfaltung der Heparinwirkung erst substituiert werden muss. Neben der Hemmung der Thrombinsynthese wirkt Heparin als Fibrinolyseaktivator und fördert somit die Auflösung von Blutgerinnseln.

## **2.4 Kultur der Zellen**

### **2.4.1 Auftauen von Zellen**

Da der Auftauvorgang (im Gegensatz zum Einfrieren) möglichst rasch ablaufen sollte, wird bereits zu Beginn ein Zentrifugenröhrchen (Greiner, Nürtingen) mit 5 ml Kulturmedium (bei Raumtemperatur) bereitgestellt.

Die eingefrorenen Zellen werden dem Gefrierschrank (-70°C) entnommen und bei 37°C im Wasserbad aufgetaut. Vor dem Öffnen wird die Ampulle mit 70% Alkohol desinfiziert und anschließend der Inhalt unter der Sterilbank in das vorbereitete Medium überführt. Um die Zellen von dem toxischen, im Einfriermedium enthaltenen Dimethylsulfoxid (DMSO) zu trennen, zentrifugiert man nun bei 1.000 rpm über 5 Minuten lang. Nachdem der Überstand dekantiert wurde, wird das am Boden haftende Zellpellet in 5 ml frischem Medium gelöst und die durch mehrfaches Resuspendieren vereinzelt Zellen in eine Zellkulturflasche (25 cm<sup>2</sup>, Greiner, Nürtingen) überführt. Sofern die Zellen nicht sofort weiterverarbeitet bzw. verwendet werden, sollte am nächsten Tag ein Mediumwechsel durchgeführt werden, um die durch Lagerung und Auftauen entstandenen Zellfragmente zu entfernen.

### **2.4.2 Einfrieren von Zellen**

Um bei eventuellen Misserfolgen in der Kultivierung der Zellen (z.B. in Folge bakterieller Verunreinigung etc.) auf ausreichenden Ersatz zurückgreifen zu können, werden von den zugesandten Zelllinien unter sterilen Bedingungen mehrere kleine Ampullen eingefroren.

Zum Einfrieren von Zellen wird ein spezielles Einfriermedium benötigt, das aus dem Kulturmedium der Zellen bei Zugabe von 10 % DMSO hergestellt wird.

Bei Suspensionszellen (Maus-Lymphom-Zellen (L5178Y tk +/-, MoLy)) werden die Zellen mehrfach resuspendiert, mit einer 5 ml Pipette in ein Zentrifugenröhrchen (Greiner, Nürtingen) überführt und anschließend 5 Minuten lang mit 1.000 rpm bei

Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in das auf Eis gekühlte Einfriermedium (ca. 10 ml) überführt. Nun kann die Zellsuspension auf ebenfalls in Eis gelagerte Einfrierampullen (1,8 ml, Greiner, Nürtingen) verteilt werden.

Um den Einfriervorgang möglichst schonend zu gestalten, werden die Ampullen zunächst für ca. 2-3 Stunden im Gefrierschrank (-20°C) deponiert. Danach werden die Zellen für weitere 15 Stunden bei -70°C gelagert und können dann in flüssigem Stickstoff bei -196°C aufbewahrt werden.

### **2.4.3 Kultur der Maus-Lymphom-Zellen (L5178Y tk +/-, MoLy)**

Die Maus-Lymphom-Zellen liegen in einer Suspensionskultur vor. Die Beurteilung der Zelldichte erfolgt im Inversionsmikroskop, nachdem die Zellen durch mehrfaches resuspendieren vereinzelt wurden. Anschließend wird die Zellsuspension unter sterilen Bedingungen an der Sterilbank mit einer Pipette aufgenommen, nochmals resuspendiert und in ein Zentrifugenröhrchen (Greiner, Nürtingen) überführt. Nach der Zentrifugation bei Raumtemperatur wird der Überstand dekantiert und das Zellpellet wieder in frisches Medium aufgenommen. Die Zellen werden nun in eine oder mehrere neue Zellkulturflaschen (25 cm<sup>3</sup>, Greiner, Nürtingen) mit gewünschter Verdünnung (unter Zugabe von Medium) verteilt und weiter kultiviert. Die Kultivierung erfolgt bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt im Brutschrank.

Um einen ausreichenden Gasaustausch und damit die nötige CO<sub>2</sub>-Zufuhr zu gewährleisten, ist darauf zu achten, dass vor dem Einlagern der Zellkulturen in den Brutschrank der Deckel der Flasche nur locker verschraubt ist. (Dies ist dann nicht nötig, wenn eine Zellkulturflasche mit Filter im Deckel verwendet wird.) Somit ist es möglich, den pH-Wert des Kulturmediums im physiologischen Bereich von 7,0-7,4 zu halten. Die Verdopplungszeit beträgt ca. 10 Stunden.

## 2.5 Puffer und Lösungen für den Comet-Assay

### Agarose-Lösung (HMP):

- Agarose 0,75 % (HMP), 750 mg  
Roth, Karlsruhe;
- PBS/CMF-Puffer 100 ml

Vor Verwendung in der Mikrowelle mehrmals aufkochen und während der Verarbeitung auf einer Wärmeplatte bei ca. 37°C flüssig halten.

### Agarose-Lösung (LMP):

- Agarose 0,5 % (LMP, niedrigschmelzend), 50 mg  
Sigma Chemical, Taufkirchen;
- PBS/CMF-Puffer 10 ml

Anschließend in der Mikrowelle kurz aufkochen.

### Lysepuffer-Stammlösung:

- NaCl 2,5 M
- EDTA, 100 mM  
Sigma Chemical, Taufkirchen;
- Tris, 10 mM  
Sigma Chemical, Taufkirchen;
- Natrium-Saccharinat, 1 %  
Sigma Chemical, Taufkirchen;

Der pH-Wert des Puffers beträgt 10,0.

Lyselösung :

- Lysepuffer (89 %) 66,75 ml
- DMSO (10 %),  
Sigma Chemical, Taufkirchen; 7,5 ml
- Triton X-100 (1 %),  
Sigma Chemical, Taufkirchen; 0,75 ml

Die Lyselösung muss vor jedem Versuch frisch angesetzt und auf 4°C gekühlt werden.

Elektrophoresepuffer :

- NaOH (5 M) 120 ml
- EDTA (0,2 M) 10 ml
- hochgereinigtes Wasser ad 2 l

Der pH-Wert des Puffers beträgt 10,0.

Der Elektrophoresepuffer muss ebenfalls vor jedem Versuch frisch angesetzt und auf 4°C gekühlt werden.

Neutralisationspuffer:

- Tris (0,4 M) 48,452 g
- hochgereinigtes Wasser ad 1 l

Der pH-Wert des Puffers beträgt 7,5. Im Anschluss wird autoklaviert.

Ethidiumbromid-Färbelösung:

- Ethidiumbromid, Stammlösung (1 mg/ml), in sterilfiltriertem Wasser,  
Sigma Chemical, Taufkirchen;

Ethidiumbromid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, mit dem die im Agarosegel eingebettete DNA spezifisch angefärbt wird. Im Umgang mit Ethidiumbromid ist erhöhte Vorsicht geboten, da dieser Farbstoff kanzerogen ist.

Ethylmethansulfonat (EMS)

(Sigma Chemical, Taufkirchen);

EMS ist eine monofunktionelle alkylierende Verbindung mit bekannter mutagener Wirkung. Substanzen dieses Typs zeigen ihre direkt DNA-schädigende Wirkung in der S-Phase des Zellzyklus. Deshalb wird EMS in dieser Studie zur Herstellung einer Positiv-Kontrolle für den Comet-Assay verwendet.

## **2.6 Puffer und Lösungen zur Anfertigung der Mikrokernpräparate**

Sörensen-Puffer:

- 15 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 584 mg
- hochgereinigtes Wasser ad 1 l
- 15mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O 461 mg
- hochgereinigtes Wasser ad 1 l

Die beiden Lösungen werden vermischt und im Anschluss wird autoklaviert.

Der pH-Wert des Puffers beträgt 6,8.

Acridin-Orange-Färbelösung:

- Acridin-Orange, Stammlösung 0,1 %, 4,5 ml  
Serva, Heidelberg;
- Sörensen-Puffer 67,5 ml

Acridin Orange ist ebenfalls ein Fluoreszenzfarbstoff.

### Etoposid:

Etoposid-Stammlösung (2mM), mit RMPI verdünnt auf 20 nM,  
Sigma Chemical, Taufkirchen;

Etoposid, ein Topoisomerase II-Inhibitor, wurde in dieser Studie zur Herstellung einer Positiv-Kontrolle für die Mikrokern-Analyse verwendet.

## **2.7 Durchführung der Experimente**

### **2.7.1 Isolierung der Lymphozyten**

Zuerst werden 6 ml Histopaque<sup>®</sup> – 1077 (Sigma Chemical, Taufkirchen) - in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen mit konischem Boden (Greiner, Nürtingen) vorgelegt und auf Raumtemperatur erwärmt. Das Trennmedium wird nun langsam und vorsichtig mit 6ml Vollblut überschichtet, um ein Vermischen zu vermeiden. Anschließend wird die Probe 30 Minuten lang bei 400\*g / 1.600 rpm zentrifugiert, wodurch die Erythrozyten und Granulozyten durch Ficoll<sup>®</sup> aggregiert werden und dadurch rasch sedimentieren, während Lymphozyten und andere mononukleäre Zellen in der Plasma-Interphase verbleiben. Jetzt wird die oberste Schicht (Plasma) bis einschließlich 0,5 cm der undurchsichtigen Interphase mit einer Pasteurpipette abpipettiert und eingefroren (zum Zwecke der Konservierung und Haltbarmachung für eine andere Studie). Die Interphase (ca. 2-2,5 ml) wird mit 10 ml Lymphozytenmedium in ein neues Zentrifugenröhrchen mit konischem Boden gegeben und durch vorsichtiges Aspirieren vermischt, verbleibendes Histopaque<sup>®</sup> und Erythrozyten werden autoklaviert und entsorgt. Es folgt eine weitere Zentrifugation für 10 Minuten bei 250\*g / 1.300 rpm. Der Überstand wird dekantiert und das am Boden haftende Zellpellet in 10 ml Lymphozytenmedium resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (10 Minuten bei 1.300 rpm) und Wiederholung des letzten Arbeitsschrittes wird das Zellpellet mit 3 ml Lymphozytenmedium resuspendiert und kann nach Auszählung mit der Neubauer-

Kammer auf die gewünschte Zellzahl von ca.  $0,8 \cdot 10^5$ - $1,2 \cdot 10^6$  Zellen pro ml (max. 200 Zellen) durch Zugabe von Medium eingestellt werden.

### **2.7.2 Anfertigung der Zellpräparate für den Comet-Assay**

Hierzu werden mit Agarose beschichtete Objektträger benötigt. Die aufgerauhten Objektträger (Labcraft, Dakin Fully Frosted, Curtin Matheson Scientific Inc., Houston/Texas) werden mit 300-400  $\mu$ l 0,75 % HMP-Agarose beschichtet (nachdem sie vorher zweimal aufgekocht wurde), mit Deckgläsern versehen und anschließend für zehn Minuten im Kühlschrank zur Aushärtung verwahrt.

Nun werden die Deckgläser vorsichtig abgezogen. Mit dieser Methode wurde in regelmäßigen Abständen eine größere Anzahl von Objektträgern vorbereitet und bis zur Verwendung geschützt aufbewahrt.

Die gut resuspendierten Lymphozyten mit einer Zelldichte von ca.  $1 \cdot 10^6$  Zellen pro ml (siehe 2.7.1) werden im Verhältnis von 20  $\mu$ l Zellsuspension zu 180  $\mu$ l 0,5 % LMP-Agarose (1:10) in die 37°C warme Agaroselösung aufgenommen, vorsichtig gemischt und 45  $\mu$ l des Gemisches als zweite Schicht auf den Objektträger gegeben. Mit einem Deckglas versehen lässt man die neu aufgetragene Agaroseschicht für ca. fünf Minuten im Kühlschrank bei 4°C aushärten. So lassen sich Risse in der Agarose beim anschließenden Ablösen des Deckglases vermeiden.

Die Präparate werden dann für mindestens eine Stunde bei 4°C lichtgeschützt in die Lyselösung gestellt. Der Ausschluss von Licht dient der Vermeidung von zusätzlichen, lichtinduzierten Strangbrüchen und ist auch für alle folgenden Arbeitsschritte einzuhalten.

Nach der Lyse werden die Objektträger in die Elektrophoresekammer eingebracht (vorher sorgfältig abtropfen lassen) und mit Elektrophoresepuffer auf 4°C gekühlt überschichtet.

Die Präparate werden nun für 20 Minuten (ebenfalls gekühlt) im Elektrophoresepuffer belassen. Diese Alkalibehandlung (pH 13), das sogenannte „Unwinding“, dient der Steigerung der Sensitivität. Danach wird die Elektrophorese mit 25 V und 300 mA



gestartet. Die Laufzeit beträgt genau 20 Minuten. Die Stromstärke wird vor Beginn über das Puffervolumen reguliert.

Anschließend werden die Zellpräparate nach sorgfältigem Abtropfen für fünf Minuten mit Neutralisationspuffer überschichtet; nach erneutem Abtropfen wird die Gesamt-DNA mit 20 µl Ethidiumbromidlösung gefärbt und mit einem Deckglas versehen.

Die Aufbewahrung bis zur Auswertung erfolgt lichtgeschützt bei 4°C in einer feuchten Kammer.

### **2.7.3 Auswertung des Comet-Assay**

Die quantitative Bestimmung des Schadens erfolgt mit einer 500-fachen Vergrößerung mittels Fluoreszenzmikroskop (515-560 nm) und computergestützter Bildverarbeitung.

Dabei wird die Intensität des (in die DNA) interkalierten Ethidiumbromids gemessen.

Pro Ansatz wurden mindestens 50 Zellen (je 25 zufällig ausgewählt aus zwei Objektträgern pro Ansatz; die Zellen sollten möglichst aus der Mitte des Objektträgers stammen) und mit Hilfe des Bildanalyseprogramms NIH-Image ausgewertet. Dabei wird der Bereich der Gesamt-DNA (Kern- und Schweif-DNA) und die Fläche des Kometenschweifs bestimmt. Das Programm kann so die integrierte Dichte der ausgewählten Fläche (Summe der Grauwerte jedes Pixels entspricht dem Fluoreszenzsignal der jeweiligen Fläche) berechnen. Zur Quantifizierung wird der Quotient aus der Dichte des Kometenschweifs (geschädigte DNA) und der Gesamt-DNA (Kern- und Schweif-DNA) gebildet. Als Maß für die Schädigung der DNA gilt der bestimmte Anteil an DNA im Schweif, angegeben in Prozent.

Berechnet wurden jeweils Mittelwert, Median, Standardabweichung und die 1./3. Quartile.

## **2.7.4 Anfertigung der Zellpräparate zur Bestimmung der Mikrokernrate**

Im Anschluss an die Lymphozyten-Isolierung werden 3 – 5 ml des Lymphozyten-Medium-Gemisches in Zellkulturflaschen (25 cm<sup>3</sup>) überführt. Jetzt wird das mitogen wirkende PHA (siehe 2.6) zugegeben, 10 µg pro ml, um die Lymphozyten zu Wachstum und somit zur Zellteilung anzuregen, was notwendig für die Entstehung von Mikrokernen ist (siehe 1.3). Da das PHA in eingefrorener Form vorliegt, muss die Zellsuspension nach Zugabe rasch durch vorsichtiges Schwenken gemischt werden, um das in der PHA-Lösung vorhandene, toxische DMSO zu verdünnen, da sonst die Lymphozyten geschädigt werden könnten.

Nach 40-44 Stunden ist der erste Zellzyklus abgeschlossen. Er wird vom größten Teil der Population synchron durchlaufen. Die Kultivierung erfolgt in dieser Zeit bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt im Brutschrank. Um einen ausreichenden Gasaustausch und damit die nötige CO<sub>2</sub>-Zufuhr zu gewährleisten, ist darauf zu achten, dass vor dem Einlagern der Zellkulturen in den Brutschrank der Deckel der Flasche nur locker verschraubt ist. (Dies ist nicht nötig, wenn eine Zellkulturflasche mit Filter im Deckel verwendet wird.) Somit ist es möglich, den pH-Wert des Kulturmediums im physiologischen Bereich von 7,0-7,4 zu halten.

Nach Ablauf dieser Zeit erfolgt die Zugabe von Cytochalasin-B (siehe 2.6.) und zwar 5 µg pro ml. Durch die durch Cytochalasin-B verursachte Hemmung der Zellteilung verbleiben die Lymphozyten im Zwei-Kern-Stadium. Nach Zugabe verbleiben die Zellkulturen weitere 22-26 Stunden im Brutschrank.

Nun werden mit der Cytospin-Zentrifuge die endgültigen Präparate hergestellt.

Da für die Herstellung einwandfrei auszuwertender Präparate saubere Objektträger unverzichtbar sind, müssen diese einer zusätzlichen Reinigung unterzogen werden.

Nur so ist ein sicheres Haften der aufzentrifugierten Zellen und ein möglichst einfaches und genaues (da „artefaktfrei“) Zählen gewährleistet. Dazu werden die hierzu verwendeten Objektträger vor Beginn mit Methanol (70%) gereinigt, anschließend luftgetrocknet und beschriftet. Für jeden Patienten wurden fünf Präparate angefertigt. Pro Objektträger werden 50-60 µl der Zellsuspension (vorher mehrfaches Resuspendieren, um die Zellen zu vereinzeln) in einen passenden Tropftrichter

pipettiert, der unter Zwischenlegen eines geeigneten Lochfilters (Shandon Filter Cards, Pittsburgh/USA) auf einem Objektträger fixiert wird (dafür vorgesehene Einsätze, Shandon Cytoclip, Pittsburgh/USA). Nun wird für fünf Minuten in der Cytospin-Zentrifuge bei 1.000 rpm zentrifugiert (Programm 8). Durch diesen Vorgang kann eine relativ hohe Zelldichte auf sehr engem Raum erzielt werden. Überschüssige flüssige Bestandteile werden durch das Filterpapier aufgesaugt. Es muss darauf geachtet werden, dass die Präparate nach Entnahme aus der Zentrifuge nicht austrocknen, aber auch nicht zu feucht sind, da sich die Zellen sonst vom Objektträger lösen. Die Zellpräparate werden nun in einer Küvette mit Methanol bei -20°C mindestens eine Stunde lang fixiert. In diesem Zustand können sie auch über mehrere Wochen bei -20°C gelagert werden.

### **2.7.5 Färbung mit Acridin-Orange**

Vor der Auswertung der Zellpräparate werden diese für zwei Minuten in eine Küvette mit Acridin-Orange-Färbelösung gestellt, anschließend zweimal für jeweils fünf Minuten in Sörensen-Puffer entfärbt. Ziel ist eine möglichst gleichmäßige Färbung der Zellen (Kerne werden grün, das Cytoplasma orange dargestellt) bei minimaler Hintergrundfärbung. Zuletzt werden noch die Deckgläser platziert. Da kein Eindeckmittel verwendet wird, müssen die Präparate wegen der Gefahr der Austrocknung und wegen des raschen Nachlassens der Intensität des hochgradig lichtempfindlichen Farbstoffes sofort (innerhalb von ein bis zwei Stunden) ausgewertet werden.

### **2.7.6 Kriterien der Auswertung der Acridin-Orange-gefärbten**

#### **Präparate**

Die Auswertung der gefärbten Präparate erfolgt mittels 1250facher Vergrößerung am Fluoreszenzmikroskop (mit Anregungsfilter 356 nm).

Als signalpositiv werden alle Kerne bzw. Mikrokerne gezählt, die sich durch ihre grüne Fluoreszenz deutlich von dem sonst nur schwach gefärbten Hintergrund abheben.

Berücksichtigt werden bei dieser Studie nur Mikrokern in doppelkernigen Lymphozyten (somit nur die, die in der letzten Zellteilung entstanden sind; siehe 1.3), die ansonsten den Anforderungen an Größe und Struktur entsprechen müssen.

Zur Quantifizierung der Mikrokern wurden von je drei Objektträgern 1000 Zellen ausgezählt. Angegeben ist jeweils der Mittelwert der Gesamtzahl.

Es wurde der Prozentanteil der mikrokernhaltigen doppelkernigen Lymphozyten sowie das Verhältnis der einkernigen zu den doppelkernigen Zellen ermittelt.

### **2.7.7 Allgemeines zur Auswertung der Experimente**

Es ist unbedingt erforderlich, dass die Auswertung sämtlicher Experimente innerhalb einer Studie von derselben Person vorgenommen wird, um subjektive Auswertungsunterschiede zu vermeiden.

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Verlaufsstudien**

Im Rahmen der Verlaufsstudie wurden drei Gruppen gebildet, jede bestehend aus drei Dialysepatienten bzw. Prädialysepatienten (in Gruppe 3). Bei allen drei Gruppen wurde nach demselben Schema verfahren. Die Blutentnahmen erfolgten im Abstand von ca. vier Wochen, jeweils vor der Dialyse, über einen Zeitraum der mindestens sechs Messungen ermöglichte. Nach den ersten drei Messungen wurde entsprechend der Gruppenzugehörigkeit die Untersuchungsvariable verändert.

Für Gruppe 1 wurden Prädialysepatienten ausgewählt, von denen angenommen wurde, dass sie in den nächsten Monaten mit einer Dialysetherapie (entsprechend ihrem Gesundheitszustand) beginnen würden. Die Patienten der Gruppe 2 wurden nach ca. drei Monaten (drei Messungen) von Hämodialyse- auf Hämodiafiltrationsbehandlung umgestellt. Bei Probanden der Gruppe 3 wurde mit einer Angiotensin II-Antagonisten-Therapie begonnen. Eine Übersicht der verschiedenen Gruppen zeigt Abbildung 6.

#### **Gruppenübersicht :**

*Gruppe 1:* Prädialyse-Gruppe;

*Gruppe 2:* HD→HDF-Gruppe;

*Gruppe 3:* AT II-Gruppe;

Abb.6: Übersicht der in der Verlaufsstudie untersuchten Gruppen;

Ermittelt wurden jeweils die Mikrokernrate (als MK/1000 DK; MK= Mikrokerne, DK= doppelkernige Lymphozyten), der Anteil an doppelkernigen Lymphozyten (von allen gezählten Zellen; in %) und der relative DNA-Schaden (in %).

Der Anteil der doppelkernigen Lymphozyten wurde, neben MK-Rate und DNA-Schaden, als weiteres Kriterium für den „Funktionszustand“ der Lymphozyten erhoben. Von der „Funktion“ der Zelle, in diesem Fall die Zellteilung, kann in begrenztem Umfang auf den Zustand des Genoms geschlossen werden, das die für die Zellteilung

benötigten Informationen in sich trägt. Ein hoher Anteil an doppelkernigen Lymphozyten ließe somit auf ein geringes Maß an genomischen Schäden schließen.

Im Versuch lassen sich außerdem eventuelle Missstände bei der Kultivierung der Lymphozyten erkennen (Temperatur, CO<sub>2</sub>-Gehalt etc.).

Um den eventuell auftretenden Effekt nach Änderung der Untersuchungsvariablen in den Gruppen 1 – 3 besser darstellen zu können, wurde von den Messreihen bezüglich Mikrokernrate und relativen DNA-Schaden jeweils der Mittelwert der ersten drei Messpunkte (vor Änderung der Untersuchungsvariablen) und der Mittelwert der letzten drei Messpunkte (nach Änderung der Untersuchungsvariablen) gebildet und diese einander gegenüber gestellt.

Weiter wurden die so gewonnenen Daten (Mittelwerte) einer statistischen Analyse, dem T-Test unterzogen. Mit ihm kann berechnet werden, ob eine kontinuierliche Variable (Mikrokernrate bzw. relativer DNA-Schaden) im Mittel für zwei Gruppen von Fällen (vor und nach Änderung der Untersuchungsvariablen) einen signifikanten Unterschied aufweist (siehe auch Tab. 21-23 des Anhangs).

### **3.1.1 Untersuchtes Patienten-Kollektiv** (siehe auch 7)

Das Patientenkollektiv der Verlaufsstudie umfasste insgesamt acht Patienten, da ein Proband der Gruppe 3 nach ca. vier Monaten aus gesundheitlichen Gründen nicht mehr an der Studie teilnehmen konnte und kein geeigneter Ersatz mehr gefunden wurde.

An der Studie nahmen drei Frauen und fünf Männer teil. Das Durchschnittsalter betrug 63 Jahre. Bei vier Patienten wurde als nephrologische Grunderkrankung eine polyzystische Nierendegeneration diagnostiziert. Weiterhin nahm jeweils ein Patient mit membranöser Glomerulonephritis (mit nephrotischem Syndrom), mit mesangialproliferierender Glomerulonephritis und mit chronischer Pyelonephritis (nicht näher differenziert) an der Studie teil (siehe Tab.1).

Patient	Geschlecht	nephrologische Grunderkrankung	Gruppe
1	M	chronische Pyelonephritis	3
2	W	polyzystische Nierendegeneration	2
3	W	polyzystische Nierendegeneration	1
4	W	polyzystische Nierendegeneration	1
5	M	membranöser GN mit neph. Syndrom	2
6	M	polyzystische Nierendegeneration	3
7	M	mesangial-proliferativer GN	2
8	M	chronische Pyelonephritis	1

Tab.1: Patienten-Kollektiv (Verlaufsstudie; GN= Glomerulonephritis);

### **3.1.2 Vergleichende Darstellung von Mikrokernrate, Anzahl doppelkerniger Lymphozyten und rel. DNA-Schaden im Verlauf**

#### **3.1.2.1 Kontrollpersonen**

Während des gesamten Untersuchungszeitraums wurde (zusammen mit den Blutproben der Patienten) ebenfalls das Blut zweier ständiger Kontrollpersonen (KP 1+2) mittels Comet-Assay und Mikrokern-Test untersucht. Dies geschah, um eventuell auftretende umgebungs- und verarbeitungsbedingte Unregelmäßigkeiten zu erkennen und um den Test (für alle Patienten und die Kontrollpersonen) in diesem Fall zu wiederholen.

Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 7-12 dargestellt.

Die Mikrokernrate in den Zellen von Kontrollperson 1 lag, mit geringen Schwankungen, im Mittel bei 8,62 +/- 1,99. Einzig auffällig ist der dritte Messpunkt (↑), der einen Anstieg von ca. 5, vom Mittelwert, auf 13,63 zeigt. Die Kontrollperson 1 war in diesem Zeitraum allerdings an einem starken Infekt der oberen Luftwege erkrankt, was den deutlichen Anstieg bezüglich der Mikrokernrate und zugleich des relativen DNA-Schadens bzw. Abfall des Anteils der doppelkernigen Lymphozyten (siehe unten) erklären könnte.

Der Anteil der doppelkernigen Lymphozyten lag mit einer, im Vergleich zur Mikrokernrate, deutlich größeren intraindividuellen Schwankungsbreite (ca. 27 %) im Mittel bei 57,3 % +/- 9,89 %. Es zeigt sich der oben im Text bereits erwähnte Abfall v.a. des dritten Messwerts ( ↑ ) zum Zeitpunkt des evaluierten akuten Infekts der Kontrollperson.

Der relative DNA-Schaden lag, mit ebenfalls größeren Schwankungen, im Untersuchungszeitraum im Mittel bei 11,23 % +/- 2,33 %. Auch hier fällt der deutliche Anstieg von ca. 3-5 %, vom Mittelwert, im Bereich des dritten (und vierten, ↑ ) Messpunktes auf. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 7-9 dargestellt.

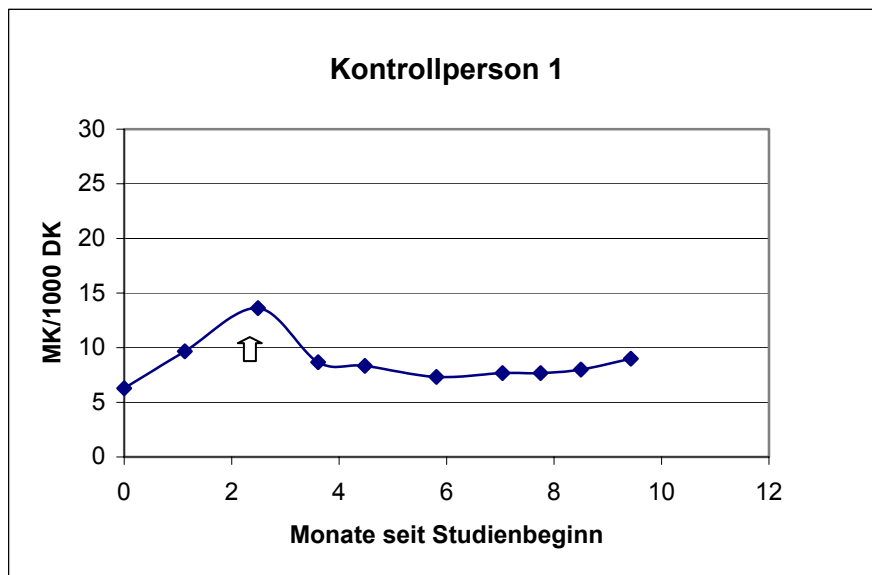


Abb.7 Kontrollperson 1: Mikrokernrate im zeitlichen Verlauf



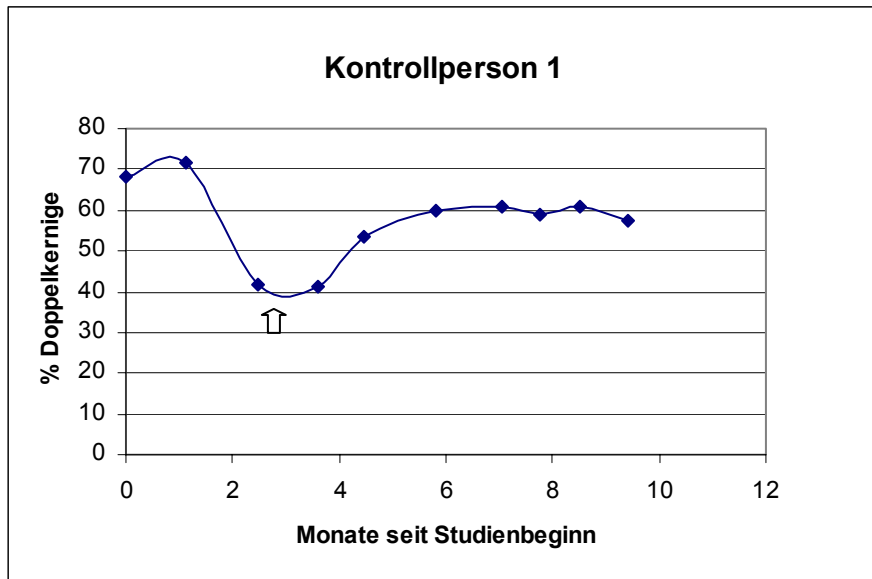


Abb.8 Kontrollperson 1: Anzahl der doppelkernigen Lymphozyten (in %) im zeitlichen Verlauf

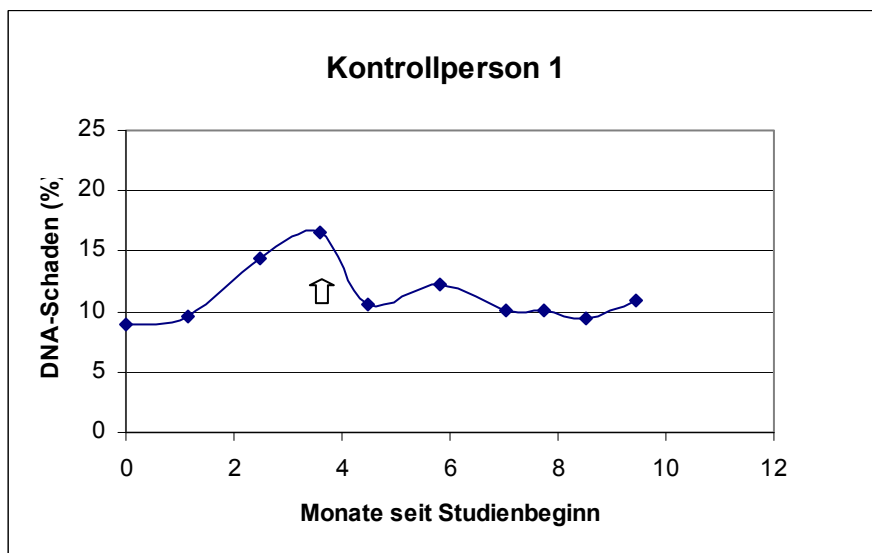


Abb.9 Kontrollperson 1: rel. DNA-Schaden (in %) im zeitlichen Verlauf

Die Mikrokernrate in den Zellen von Kontrollperson 2 lag, mit geringen Schwankungen, im Mittel bei 10,84 +/- 3,52. Einzig auffällig ist hier gleichfalls der dritte Messpunkt ( ↑ ), der einen Anstieg von ca. 10, vom Mittelwert, auf 20,10 zeigt.

Es konnte zudem ermittelt werden, dass Kontrollperson 2 in diesem Zeitraum ebenfalls an einem starken Infekt der oberen Luftwege erkrankt war, was wiederum den deutlichen Anstieg bezüglich der Mikrokernrate und zugleich Abfall des Anteils der doppelkernigen Lymphozyten (siehe unten) erklären könnte. Der Anstieg des relativen DNA-Schadens war in diesem Fall jedoch deutlich geringer.

Der Anteil der doppelkernigen Lymphozyten lag, mit einer im Vergleich zur Mikrokernrate, deutlich größeren intraindividuellen Schwankungsbreite (ca. 15 %) im Mittel bei 61,27 % +/- 5,37 %. Es zeigt sich der oben im Text bereits erwähnte Abfall v.a. des dritten Messwerts ( ↑ ) zum Zeitpunkt des evaluierten akuten Infekts der Kontrollperson.

Der relative DNA-Schaden lag, mit ebenfalls größeren Schwankungen, im Untersuchungszeitraum im Mittel bei 10,88 % +/- 1,85 %.

Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 10-12 dargestellt.

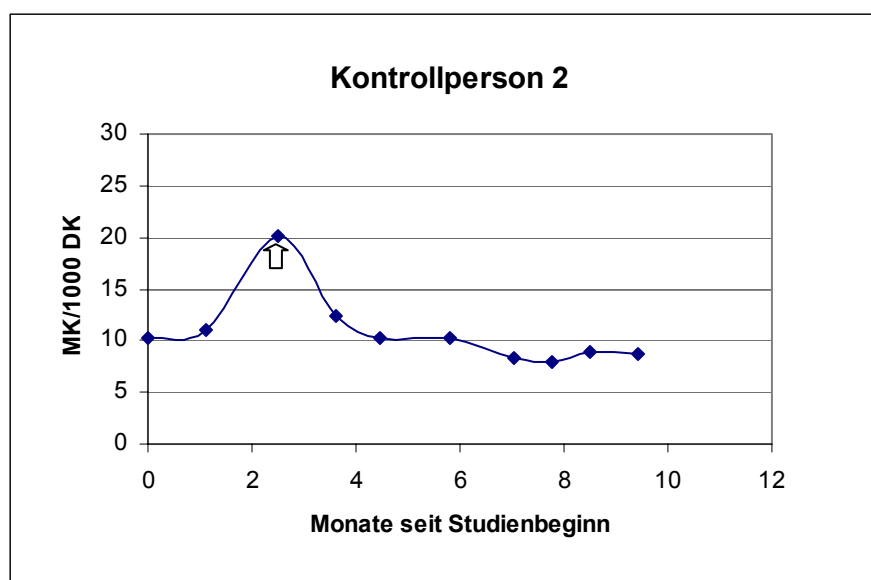


Abb.10 Kontrollperson 2: Mikrokernrate im zeitlichen Verlauf

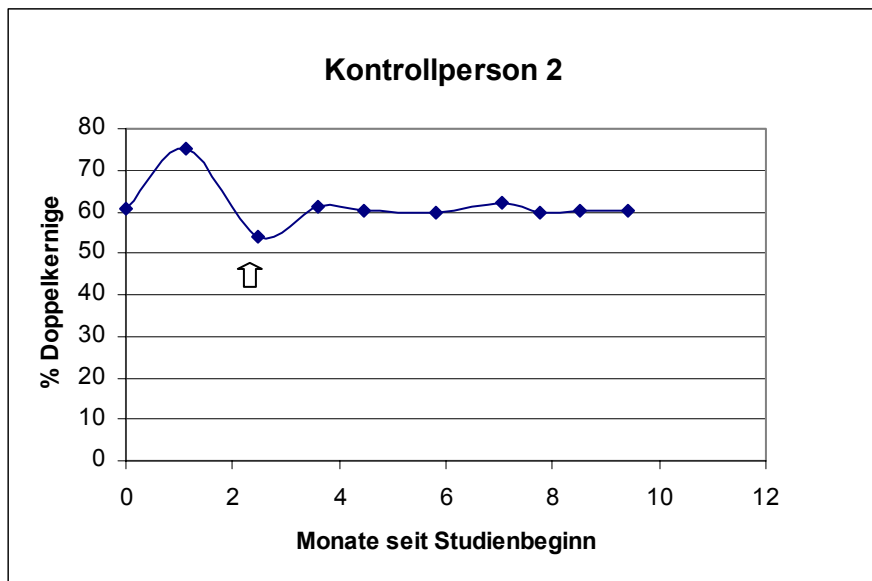


Abb.11 Kontrollperson 2: Anzahl der doppelkernigen Lymphozyten (in %) im zeitlichen Verlauf

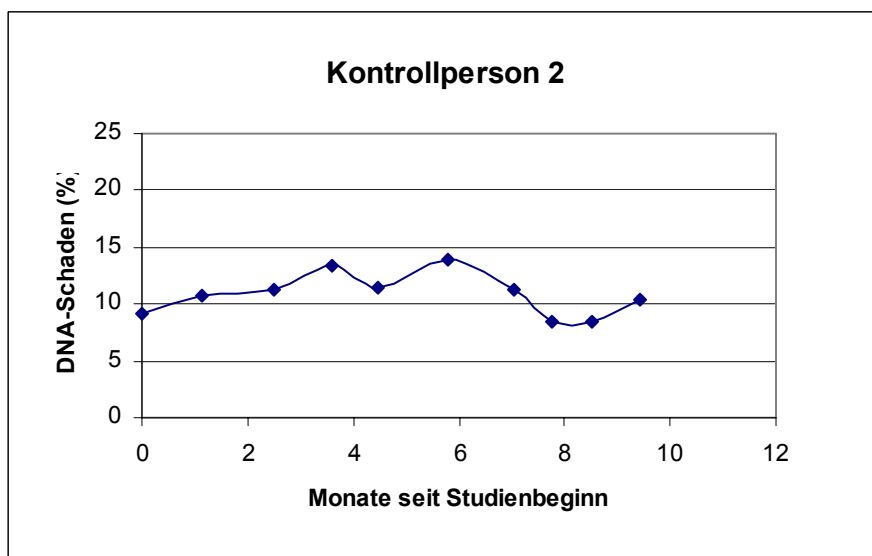


Abb.12 Kontrollperson 2: rel. DNA-Schaden (in %) im zeitlichen Verlauf

### 3.1.2.2 Gruppe 1 (Prädialyse-Gruppe)

Bei den Prädialysepatienten der Gruppe 1, die sich im Endzustand einer chronischen Nierenerkrankung (end stage renal disease = ESRD) befanden, war bis zum Ende der Studie (ca. 8 Monate), nach den aktuell gültigen Richtlinien, keine klinische Indikation für den Beginn einer Dialyse-Behandlung gegeben.

Die Mikrokernrate lag bei Patient 1 zu Beginn der Studie im Mittel bei 21,47 +/- 1,07 (berechnet aus den ersten drei Messpunkten), zum Ende bei 23,11 +/- 1,02 (berechnet aus den letzten drei Messpunkten). Der Kurvenverlauf stellte sich relativ homogen und ohne größere Schwankungen dar. Insgesamt zeigen die erhobenen Daten ein nicht eindeutiges Bild mit allenfalls geringer Tendenz nach oben.

Der Anteil der doppelkernigen Lymphozyten zeigte einen insgesamt, v.a. zu Beginn (Messpunkte 1-2), schwankenden Verlauf. Es ergaben sich Schwankungen von ca. 10 % um einen Mittelwert von ca. 47 %.

Der relative DNA-Schaden lag bei Patient 1 zu Beginn der Studie im Mittel bei 15,48 % +/- 3,35 % (berechnet aus den ersten drei Messpunkten). Die relativ hohe Standardabweichung erklärt sich durch den zu Beginn der Studie auffällig hohen ersten Messpunkt. Diesbezüglich konnte kein bibliographisches Ereignis evaluiert werden.

Der weitere Kurvenverlauf stellt sich, nach kontinuierlichem Abfall des relativen DNA-Schadens (zum zweiten Messpunkt), insgesamt äußerst inhomogen, mit deutlichen Schwankungen (nach oben und unten) von ca. 5 % dar. Der relative DNA-Schaden lag zum Ende der Studie bei einem Mittelwert von 13,09 % +/- 0,55 % (berechnet aus den letzten drei Messpunkten). Insgesamt zeigen die erhobenen Daten ein eher uneinheitliches Bild mit rechnerisch geringer Tendenz nach unten.

Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 13-15 bzw. 19 und Tabelle 2 dargestellt.

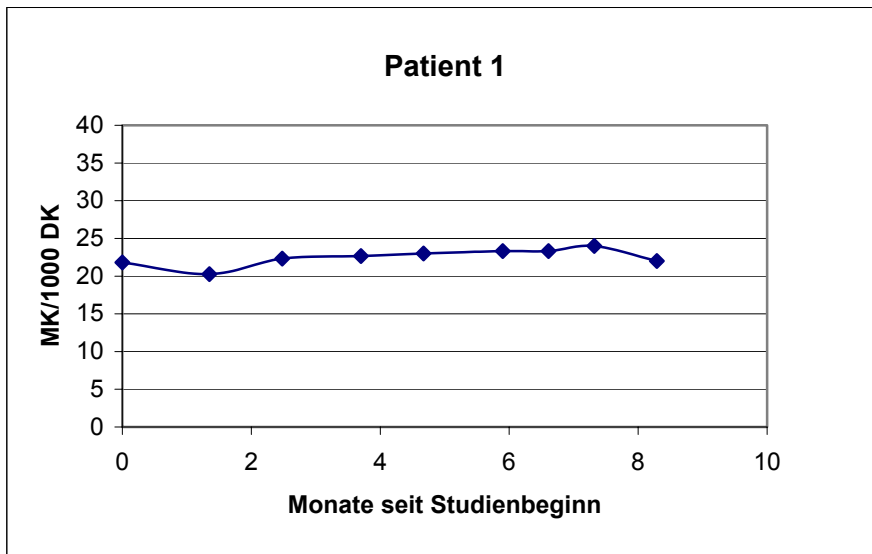


Abb.13 Patient 1: rel. DNA-Schaden (in %) im zeitlichen Verlauf

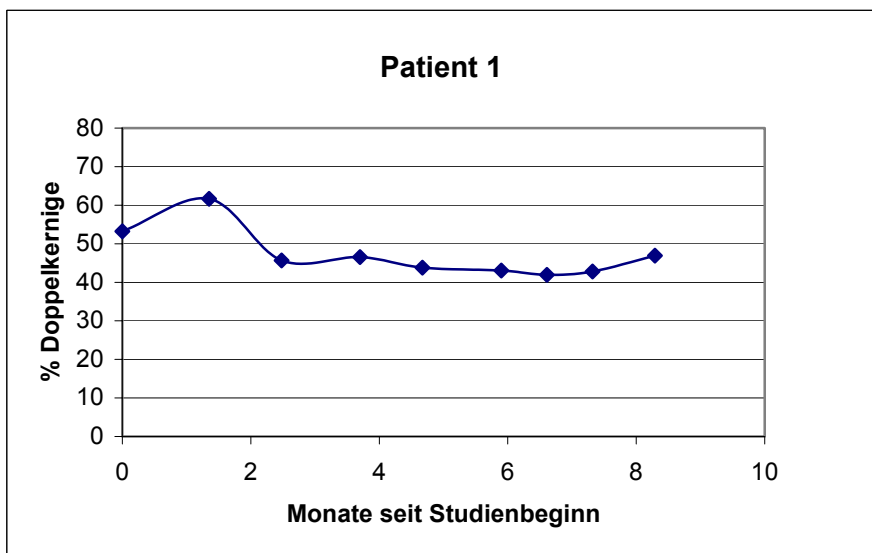


Abb.14 Patient 1: Anzahl der doppelkernigen Lymphozyten (in %) im zeitlichen Verlauf

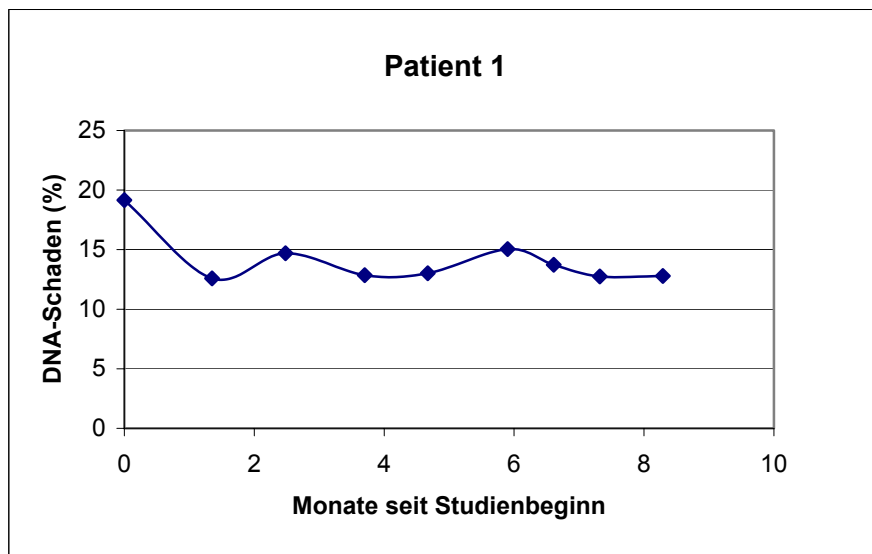


Abb.15 Patient 1: Mikrokernrate im zeitlichen Verlauf

Die Mikrokernrate lag bei Patient 6 zu Beginn der Studie im Mittel bei 23,31 +/- 6,8 (berechnet aus den ersten drei Messpunkten), zum Ende bei 21,89 +/- 0,19 (berechnet aus den letzten drei Messpunkten). Die relativ hohe Standardabweichung zu Beginn der Studie erklärt sich durch den auffällig hohen ersten Messpunkt. Diesbezüglich konnte kein bibliographisches Ereignis evaluiert werden. Der weitere Kurvenverlauf stellt sich, nach kontinuierlichem Abfall der MR, insgesamt relativ inhomogen dar. Insgesamt zeigen die erhobenen Daten ein sehr uneinheitliches Bild mit allenfalls geringer Tendenz nach unten.

Der Anteil der doppelkernigen Lymphozyten zeigt einen insgesamt, v.a. zu Beginn (Messpunkte 1-2), schwankenden Verlauf. Der Kurvenverlauf stellt sich weitgehend homogen dar, einzig auffällig ist der erhöhte zweite Messpunkt. Es ergaben sich somit Schwankungen von ca. 5 % um einen Mittelwert von ca. 51 %.

Der relative DNA-Schaden lag bei Patient 6 zu Beginn der Studie im Mittel bei 13,49 % +/- 2,58 % (berechnet aus den ersten drei Messpunkten). Der relative DNA-Schaden lag zum Ende der Studie bei einem Mittelwert von 12,06 % +/- 1,4 % (berechnet aus den letzten drei Messpunkten). Die relativ hohe Standardabweichung erklärt sich durch den ebenfalls äußerst inhomogenen Kurvenverlauf, mit deutlichen Schwankungen (nach oben und unten) von ca. 5 %. Der relative DNA-Schaden lag zum Ende der Studie bei einem Mittelwert von 13,09 % +/- 0,55 % (berechnet aus den

letzten drei Messpunkten). Insgesamt zeigen die erhobenen Daten ein uneinheitliches Bild mit rechnerisch minimaler Tendenz nach unten.

Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 16-18 bzw. 19 und Tabelle 2 dargestellt.

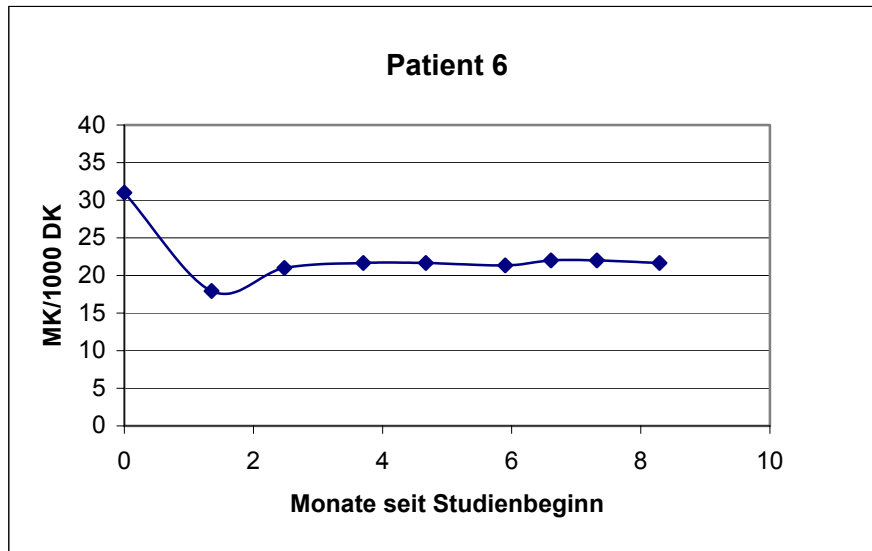


Abb.16 Patient 6: Mikrokernrate im zeitlichen Verlauf

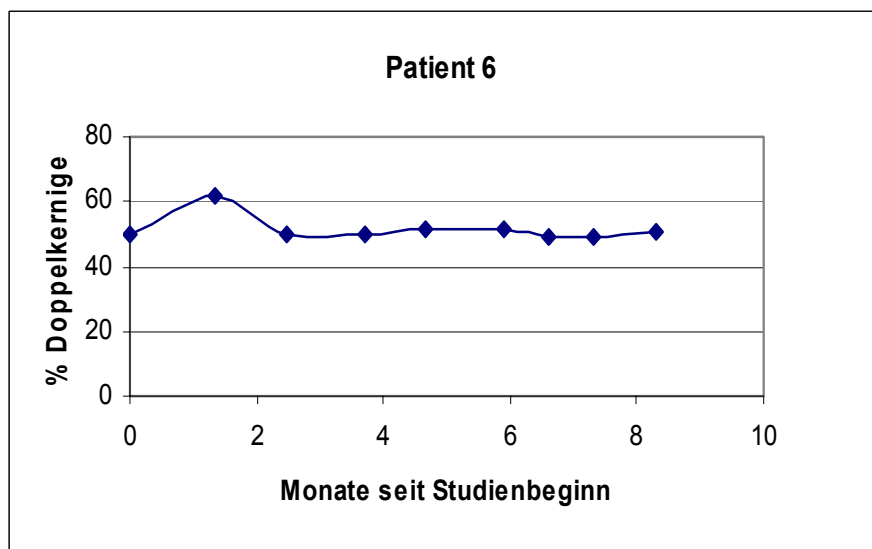


Abb.17 Patient 6: Anzahl der doppelkernigen Lymphozyten (in %) im zeitlichen Verlauf

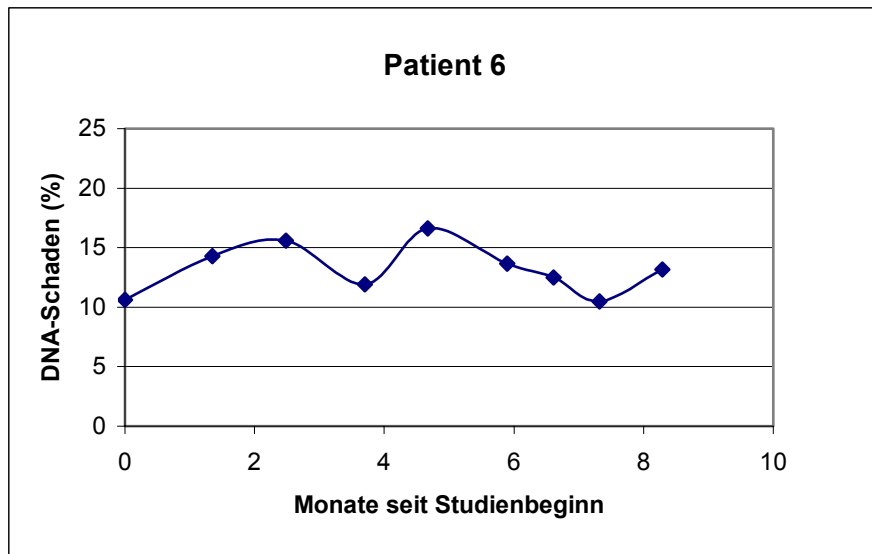


Abb.18 Patient 6: rel. DNA-Schaden (in %) im zeitlichen Verlauf

	Patient	Therapie	N	Mittelwert	SD	SF des Mittelwertes
Mikrokernrate	1	Ø	3	21,47	1,07	0,62
Mikrokernrate	1	Ø	3	23,11	1,01	0,59
Mikrokernrate	6	Ø	3	23,31	6,83	3,94
Mikrokernrate	6	Ø	3	21,89	0,19	0,11
DNA-Schaden	1	Ø	3	15,48	3,35	1,93
DNA-Schaden	1	Ø	3	13,09	0,55	0,32
DNA-Schaden	6	Ø	3	13,49	2,58	1,49
DNA-Schaden	6	Ø	3	12,06	1,39	0,80

Tab.2: Gruppenstatistik bei Vergleich der Mikrokernrate und des relativen DNA-Schadens der Gruppe 1



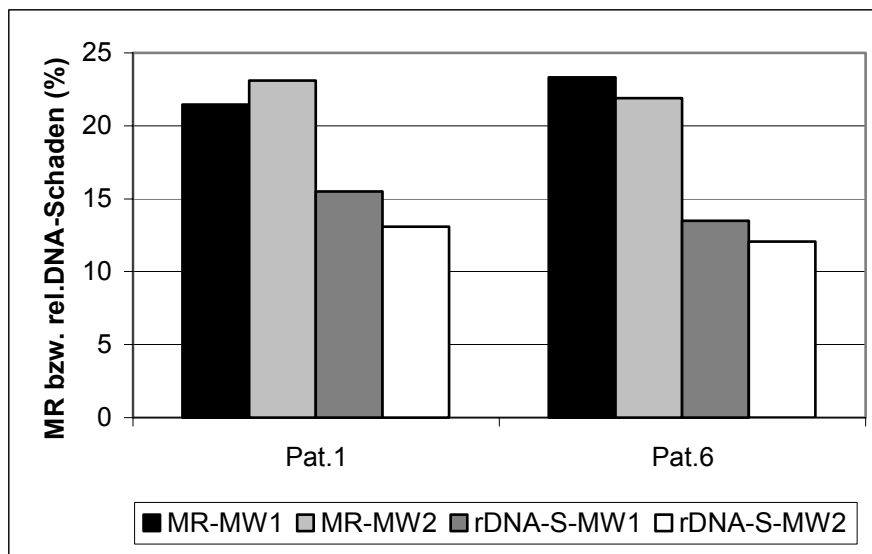


Abb. 19: Gruppenstatistik bei Vergleich der Mikrokernrate und des relativen DNA-Schadens der Gruppe 1

Die statistische Analyse der gewonnenen Daten der Gruppe 1, mittels T-Test bei unabhängigen Stichproben, ergab bezüglich der Mikrokernrate für Patient 1 eine Signifikanz von  $p = 0,127$  bei einem 95 % Konfidenzintervall von  $-4,01 - 0,73$  (mit 0) und für Patient 6 eine Signifikanz von  $p = 0,737$  bei einem Konfidenzintervall von  $-9,54 - 12,38$  (mit 0).

Für den relativen DNA-Schaden der Gruppe 1 ergab sich für Patient 1 eine Signifikanz von  $p = 0,290$  bei einem 95 % Konfidenzintervall von  $-3,06 - 7,83$  (mit 0) und für Patient 6 eine Signifikanz von  $p = 0,446$  bei einem Konfidenzintervall von  $-3,27 - 6,14$  (mit 0; siehe auch Tab. 23 des Anhangs).

### 3.1.2.3 Gruppe 2 (HD→HDF-Gruppe)

Die Mikrokernrate lag bei Patient 3 zu Beginn der Studie, und unter HD-Behandlung, im Mittel bei  $20,78 \pm 0,69$  (berechnet aus den ersten drei Messpunkten). Nach Umstellung auf HDF-Behandlung (nach der dritten Messung, ↓) zeigte sich im Verlauf eine Tendenz nach unten (ohne auffällige Schwankungen) und die Mikrokernrate sank auf einen Mittelwert von  $19,33 \pm 1,34$  (berechnet aus den letzten drei Messpunkten).

Der Anteil der doppelkernigen Lymphozyten zeigte einen insgesamt homogenen Verlauf, bei Schwankungen von ca. 3 % um einen Mittelwert von ca. 57 %, ohne eindeutig erkennbare Tendenzen nach oben oder unten.

Der relative DNA-Schaden lag bei Patient 3 zu Beginn der Studie, und unter HD-Behandlung, im Mittel bei  $13,34 \% \pm 0,76 \%$  (berechnet aus den ersten drei Messpunkten). Schon in diesem Zeitraum zeigte sich allerdings eine leicht fallende Tendenz. Nach Umstellung auf HDF-Behandlung (nach der dritten Messung, ↓) zeigte sich im Verlauf eine nun deutlichere Tendenz nach unten, bei leichtem Anstieg des letzten Messpunktes, aber ohne weitere auffällige Schwankungen, und der relative DNA-Schaden sank auf einen Mittelwert von  $10,42 \% \pm 0,76 \%$  (berechnet aus den letzten drei Messpunkten).

Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 20-22 bzw. 29 und Tabelle 3 dargestellt.

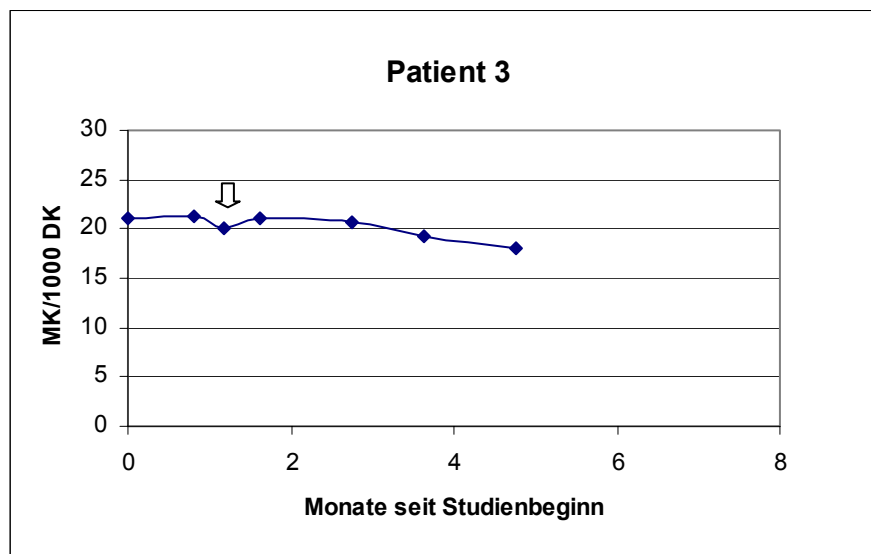


Abb.20 Patient 3: Mikrokernrate im zeitlichen Verlauf

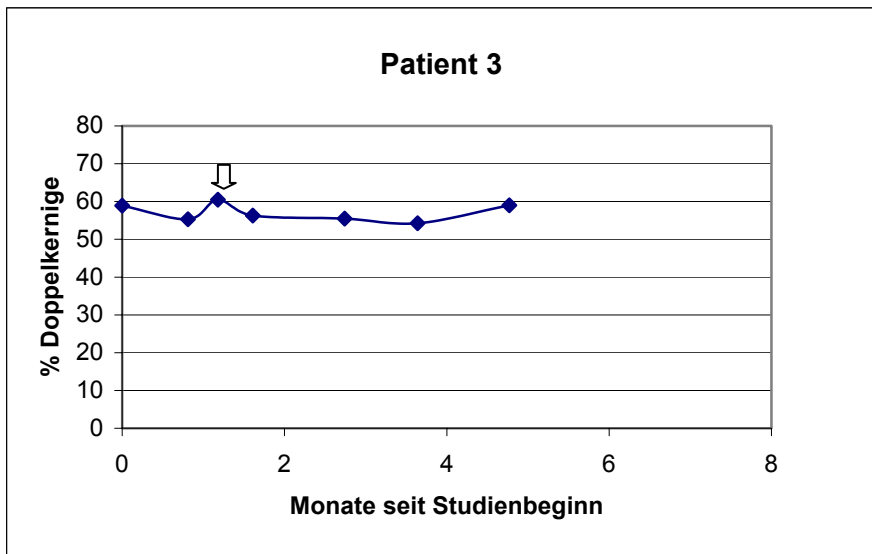


Abb.21 Patient 3: Anzahl der doppelkernigen Lymphozyten (in %) im zeitlichen Verlauf

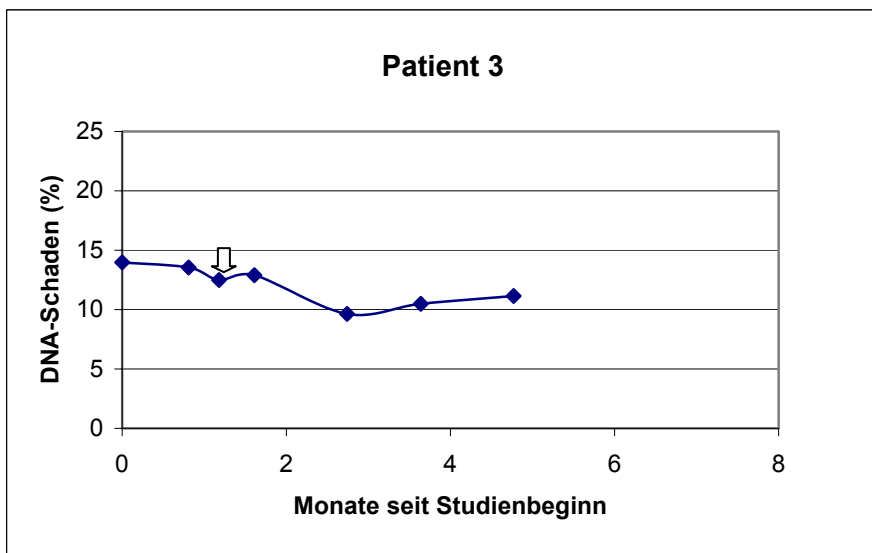


Abb.22 Patient 3: rel. DNA-Schaden (in %) im zeitlichen Verlauf

Die Mikrokernrate lag bei Patient 4 zu Beginn der Studie, und unter HD-Behandlung, im Mittel bei 21,45 +/- 0,69 (berechnet aus den ersten drei Messpunkten). Nach Umstellung auf HDF-Behandlung (nach der dritten Messung, ↓) zeigte sich im Verlauf eine Tendenz nach unten (ohne auffällige Schwankungen) und die Mikrokernrate sank auf einen Mittelwert von 19,00 +/- 1,33 (berechnet aus den letzten drei Messpunkten). Der Anteil der doppelkernigen Lymphozyten zeigte einen insgesamt homogenen Verlauf, bei Schwankungen von ca. 3 % um einen Mittelwert von ca. 58 %, ohne eindeutig erkennbare Tendenzen nach oben oder unten.

Der relative DNA-Schaden lag bei Patient 4 zu Beginn der Studie, und unter HD-Behandlung, im Mittel bei 14,35 % +/- 1,31 % (berechnet aus den ersten drei Messpunkten). Schon in diesem Zeitraum zeigte sich allerdings eine leicht fallende Tendenz. Nach Umstellung auf HDF-Behandlung (nach der dritten Messung, ↓) zeigte sich im Verlauf eine nun deutlichere Tendenz nach unten (ohne weitere auffällige Schwankungen) und der relative DNA-Schaden sank auf einen Mittelwert von 12,23 % +/- 0,74 % (berechnet aus den letzten drei Messpunkten).

Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 23-25 bzw. 29 und Tabelle 3 dargestellt.

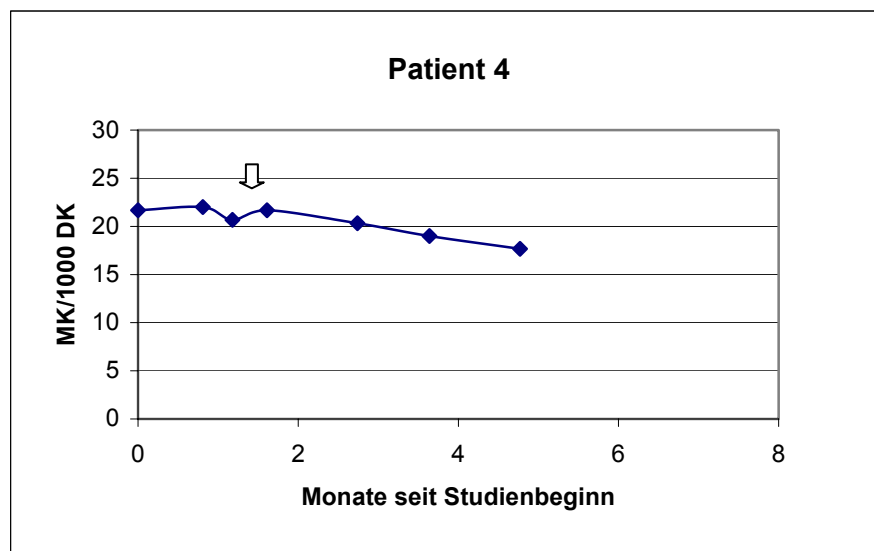


Abb.23 Patient 4: Mikrokernrate im zeitlichen Verlauf

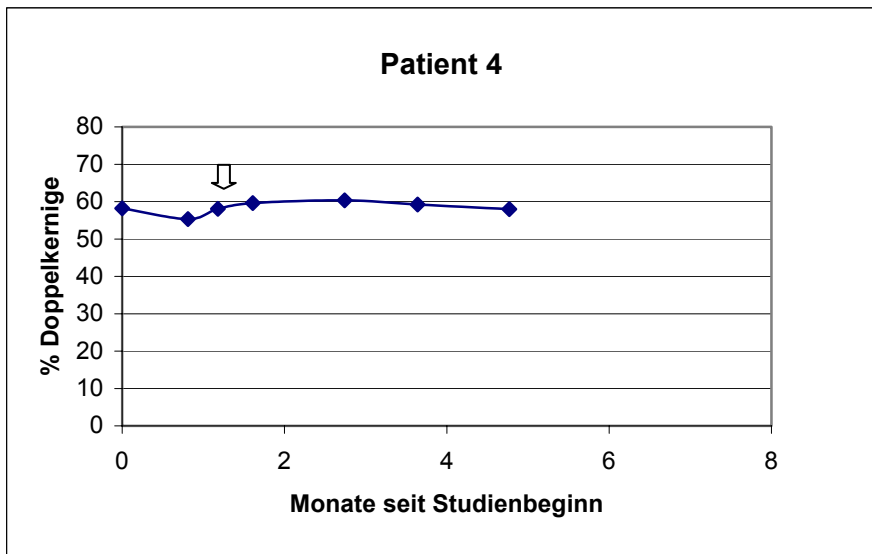


Abb.24 Patient 4: Anzahl der doppelkernigen Lymphozyten (in %) im zeitlichen Verlauf

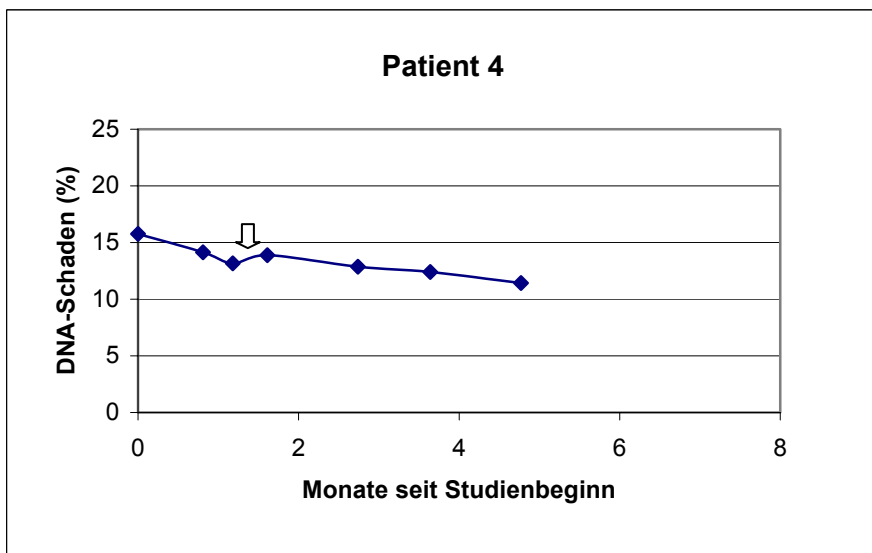


Abb.25 Patient 4: rel. DNA-Schaden (in %) im zeitlichen Verlauf

Die Mikrokernrate lag bei Patient 8 zu Beginn der Studie, und unter HD-Behandlung, im Mittel bei 30,66 +/- 3,28 (berechnet aus den ersten drei Messpunkten). Nach Umstellung auf HDF-Behandlung (nach der dritten Messung, ↓) zeigte sich im Verlauf insgesamt eine dennoch deutliche Tendenz nach unten, allerdings mit starken Schwankungen im ersten und mittleren Abschnitt, was in der relativ hohen Standardabweichung zum Ausdruck kommt. Die Mikrokernrate sank zum Ende der Studie auf einen Mittelwert von 23,78 +/- 0,69 (berechnet aus den letzten drei Messpunkten).

Der Anteil der doppelkernigen Lymphozyten zeigte einen teilweise stark schwankenden Verlauf mit fallender Tendenz im ersten (Messpunkte 1-4), ansteigender Tendenz im mittleren (Messpunkte 4-6) und relativ homogenen Verlauf im letzten Abschnitt (Messpunkte 6-8). Es ergaben sich somit Schwankungen von ca. 5-10 % um einen Mittelwert von ca. 50 %. Nach deutlichem Abfall, noch unter HD-Behandlung, und Anstieg unter HDF-Behandlung, ergaben sich zum Ende nahezu Ausgangswerte.

Der relative DNA-Schaden lag bei Patient 8 zu Beginn der Studie, und unter HD-Behandlung, im Mittel bei 15,42 % +/- 3,78 % (berechnet aus den ersten drei Messpunkten). Der auffällig erniedrigte zweite Messpunkt erklärt die relativ hohe Standardabweichung. Nach Umstellung auf HDF-Behandlung (nach der dritten Messung, ↓) zeigte sich im weiterhin schwankenden Verlauf insgesamt eine Tendenz nach unten und der relative DNA-Schaden sank auf einen Mittelwert von 13,3 % +/- 0,49 % (berechnet aus den letzten drei Messpunkten).

Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 26-28 bzw. 29 und Tabelle 3 dargestellt.

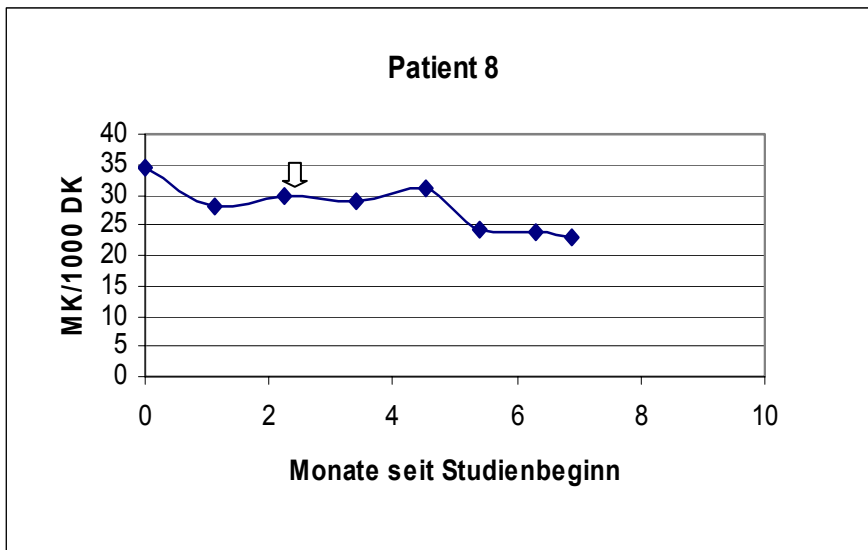


Abb.26 Patient 8: Mikrokernrate im zeitlichen Verlauf

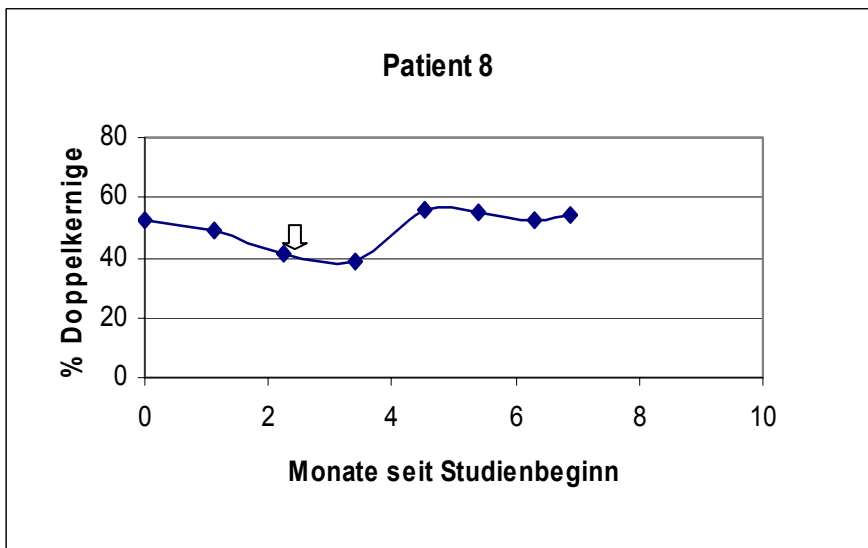


Abb.27 Patient 8: Anzahl der doppelkernigen Lymphozyten (in %) im zeitlichen Verlauf

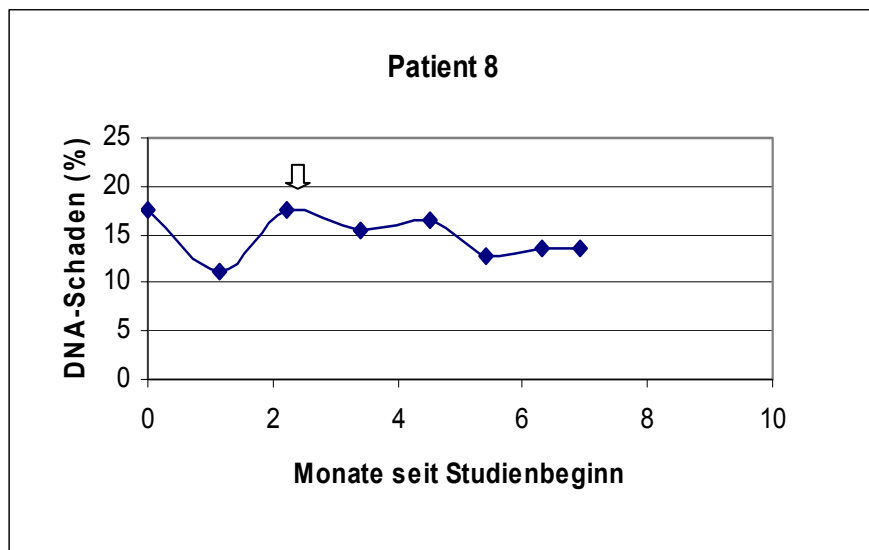


Abb.28 Patient 8: rel. DNA-Schaden (in %) im zeitlichen Verlauf

	Patient	Therapie	N	Mittelwert	SD	SF des Mittelwertes
Mikrokernrate	3	HD	3	20,78	0,69	0,39
Mikrokernrate	3	HDF	3	19,33	1,33	0,77
Mikrokernrate	4	HD	3	21,45	0,69	0,39
Mikrokernrate	4	HDF	3	19,00	1,33	0,77
Mikrokernrate	8	HD	3	30,66	3,27	1,89
Mikrokernrate	8	HDF	3	23,78	0,69	0,39
DNA-Schaden	3	HD	3	13,34	0,76	0,44
DNA-Schaden	3	HDF	3	10,42	0,76	0,44
DNA-Schaden	4	HD	3	14,35	1,31	0,76
DNA-Schaden	4	HDF	3	12,23	0,74	0,43
DNA-Schaden	8	HD	3	15,42	3,78	2,18
DNA-Schaden	8	HDF	3	13,29	0,49	0,28

Tab.3: Gruppenstatistik bei Vergleich der Mikrokernrate und des relativen DNA-Schadens der Gruppe 2



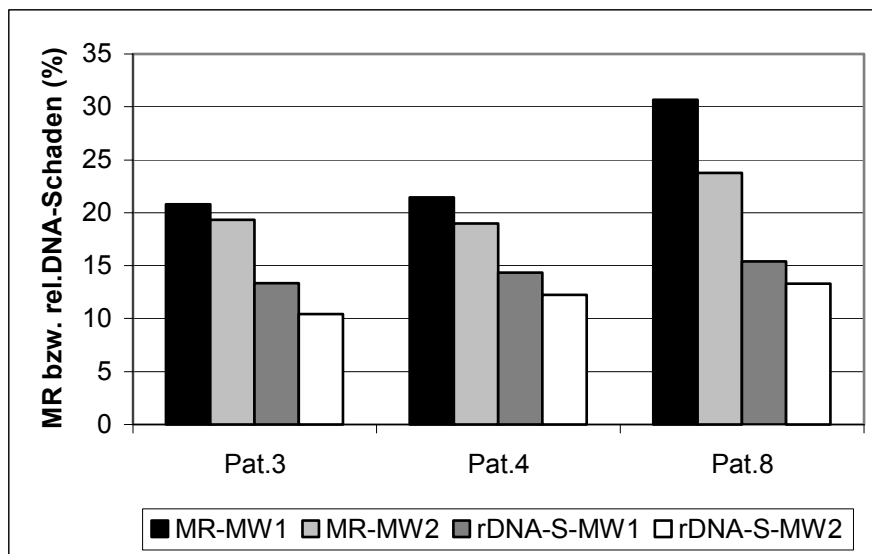


Abb.29: Gruppenstatistik bei Vergleich der Mikrokernrate und des relativen DNA-Schadens der Gruppe 2

Die statistische Analyse der gewonnenen Daten der Gruppe 2, mittels T-Test bei unabhängigen Stichproben, ergab bezüglich der Mikrokernrate für Patient 3 eine Signifikanz von  $p = 0,172$  bei einem 95 % Konfidenzintervall von  $-0,97 - 3,85$  (mit 0), für Patient 4 eine Signifikanz von  $p = 0,048$  bei einem Konfidenzintervall von  $4,29 - 4,85$  (ohne 0) und für Patient 8 eine Signifikanz von  $p = 0,024$  bei einem Konfidenzintervall von  $1,52 - 12,25$  (ohne 0).

Für den relativen DNA-Schaden der Gruppe 2 ergab sich für Patient 3 eine Signifikanz von  $p = 0,009$  bei einem 95 % Konfidenzintervall von  $1,19 - 4,63$  (ohne 0), für Patient 4 eine Signifikanz von  $p = 0,071$  bei einem Konfidenzintervall von  $-0,29 - 4,54$  (mit 0) und für Patient 8 eine Signifikanz von  $p = 0,388$  bei einem Konfidenzintervall von  $-3,98 - 8,23$  (mit 0; siehe auch Tab. 21 des Anhangs). (AT II-Gruppe)

### 3.1.2.4 Gruppe 3

Die Mikrokernrate lag bei Patient 2 zu Beginn der Studie, und vor AT II-Antagonisten-therapie, im Mittel bei 31,03 +/- 0,76 (berechnet aus den ersten drei Messpunkten).

Nach Beginn der AT II-Antagonistentherapie (nach der dritten Messung, ↓) zeigte sich im Verlauf insgesamt eine dennoch deutliche Tendenz nach unten, allerdings mit starken Schwankungen im gesamten Verlauf. Die Mikrokernrate sank zum Ende der Studie auf einen Mittelwert von 21,11 +/- 1,26 (berechnet aus den letzten drei Messp.).

Der Anteil der doppelkernigen Lymphozyten zeigte einen relativ homogenen Verlauf mit tendenziellem Abfall bis zum dritten und Anstieg ab dem vierten Messpunkt. Es ergaben sich somit Schwankungen von ca. 5-10 % um einen Mittelwert von ca. 59 %.

Der relative DNA-Schaden lag bei Patient 2 zu Beginn der Studie, und vor AT II-Antagonistentherapie, im Mittel bei 18,44 % +/- 1,43 % (berechnet aus den ersten drei Messpunkten). Nach Beginn der AT II-Antagonistentherapie (nach der dritten Messung, ↓) zeigte sich im Verlauf insgesamt eine dennoch deutliche Tendenz nach unten, allerdings mit starken Schwankungen im gesamten Verlauf. Der relative DNA-Schaden sank zum Ende der Studie auf einen Mittelwert von 12,4 % +/- 0,82 % (berechnet aus den letzten drei Messpunkten). Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 30-32 bzw. 39 und Tabelle 4 dargestellt.

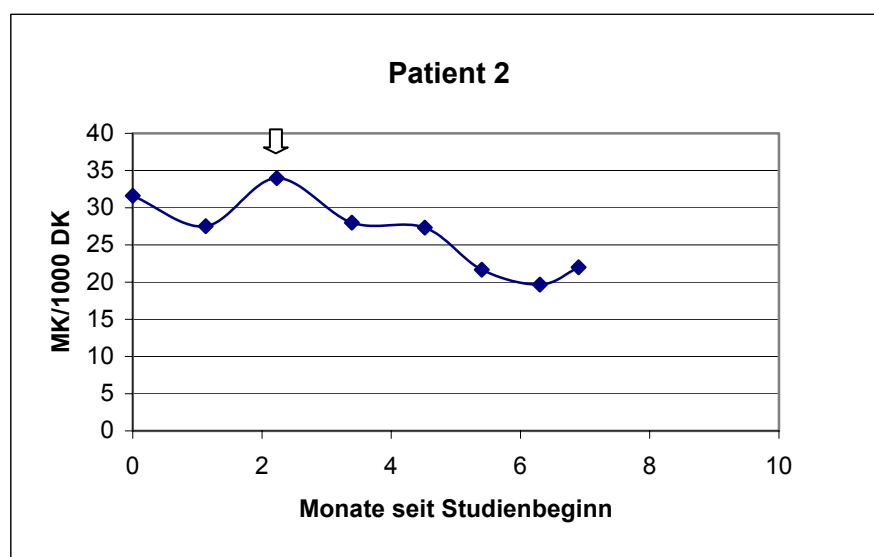


Abb.30 Patient 2: rel. DNA-Schaden (in %) im zeitlichen Verlauf

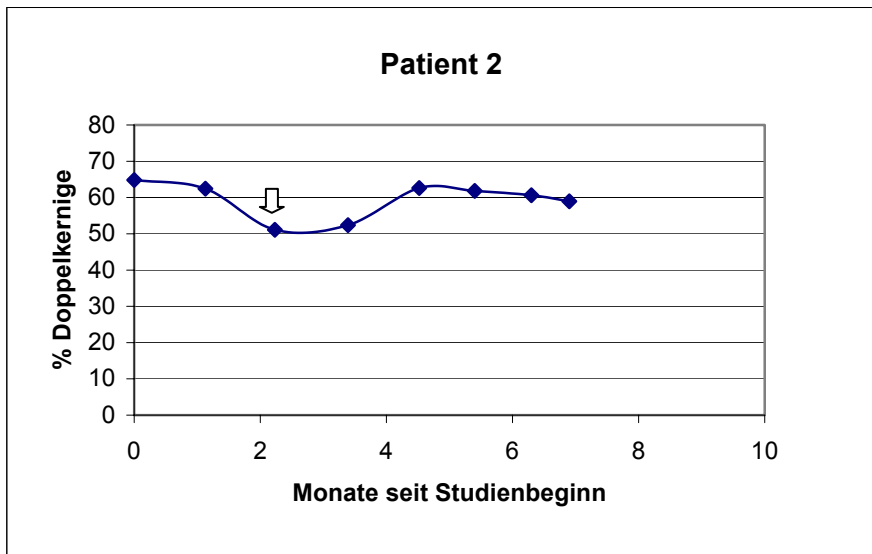


Abb.31 Patient 2: Anzahl der doppelkernigen Lymphozyten (in %) im zeitlichen Verlauf

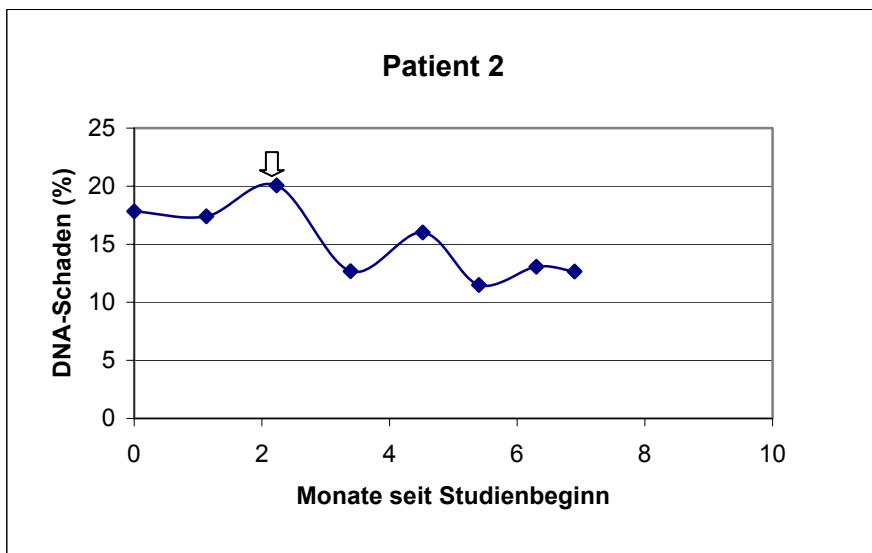


Abb.32 Patient 2: Mikrokernrate im zeitlichen Verlauf

Die Mikrokernrate lag bei Patient 5 zu Beginn der Studie, und vor AT II-Antagonisten-therapie, im Mittel bei 23,11 +/- 1,02 (berechnet aus den ersten drei Messpunkten).

Nach Beginn der AT II-Antagonistentherapie (nach der dritten Messung, ↓) zeigte sich im Verlauf insgesamt eine deutliche Tendenz nach unten. Die Mikrokernrate sank zum Ende der Studie auf einen Mittelwert von 16,78 +/- 0,77 (berechnet aus den letzten drei Messpunkten).

Der Anteil der doppelkernigen Lymphozyten zeigte einen relativ homogenen Verlauf mit allenfalls geringer Tendenz nach unten. Es ergaben sich geringe Schwankungen von ca. 2 % um einen Mittelwert von ca. 41 %.

Der relative DNA-Schaden lag bei Patient 5 zu Beginn der Studie, und vor AT II-Antagonistentherapie, im Mittel bei 16,78 % +/- 1,29 % (berechnet aus den ersten drei Messpunkten). Nach Beginn der AT II-Antagonistentherapie (nach der dritten Messung, ↓) zeigte sich im Verlauf, mit relativ geringen Schwankungen, insgesamt eine dennoch merkliche Tendenz nach unten. Der relative DNA-Schaden sank zum Ende der Studie auf einen Mittelwert von 13,17 % +/- 0,54 % (berechnet aus den letzten drei Messpunkten). Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 33-35 bzw. 39 und Tabelle 4 dargestellt.

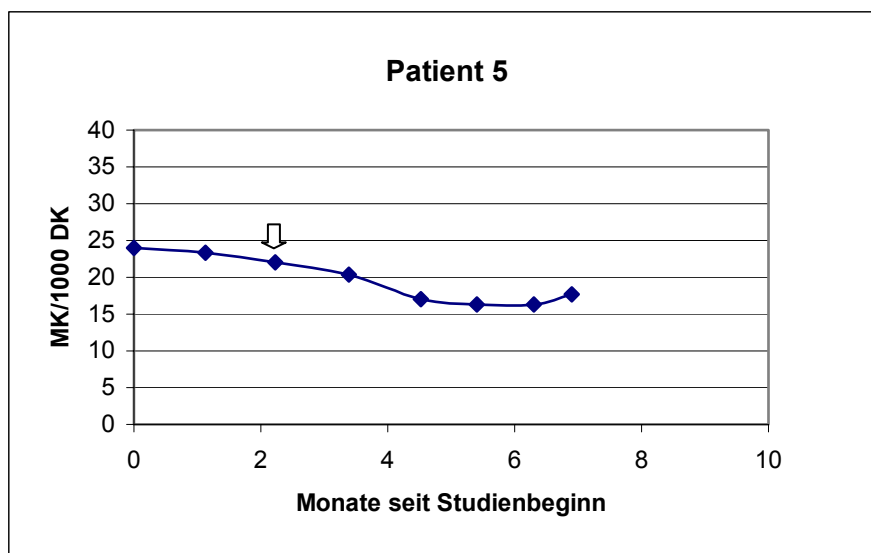


Abb.33 Patient 5: Mikrokernrate im zeitlichen Verlauf

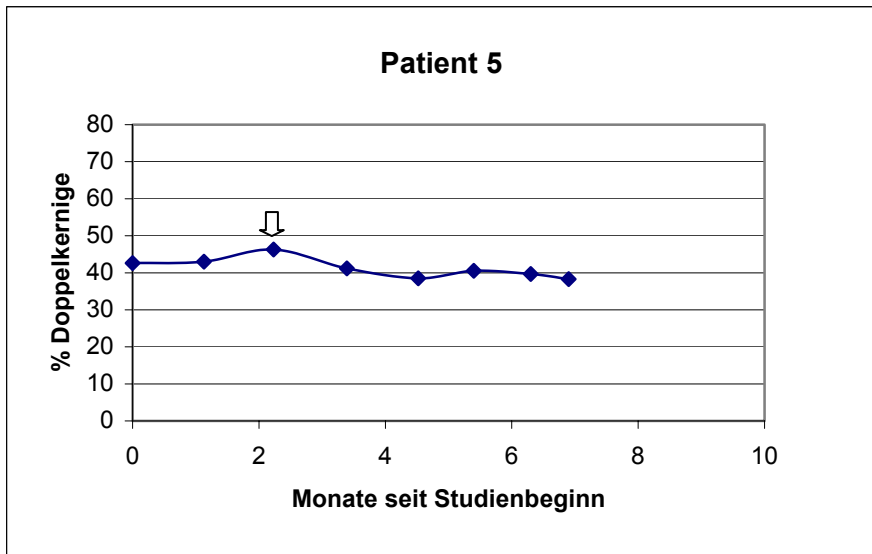


Abb.34 Patient 5: Anzahl der doppelkernigen Lymphozyten (in %) im zeitlichen Verlauf

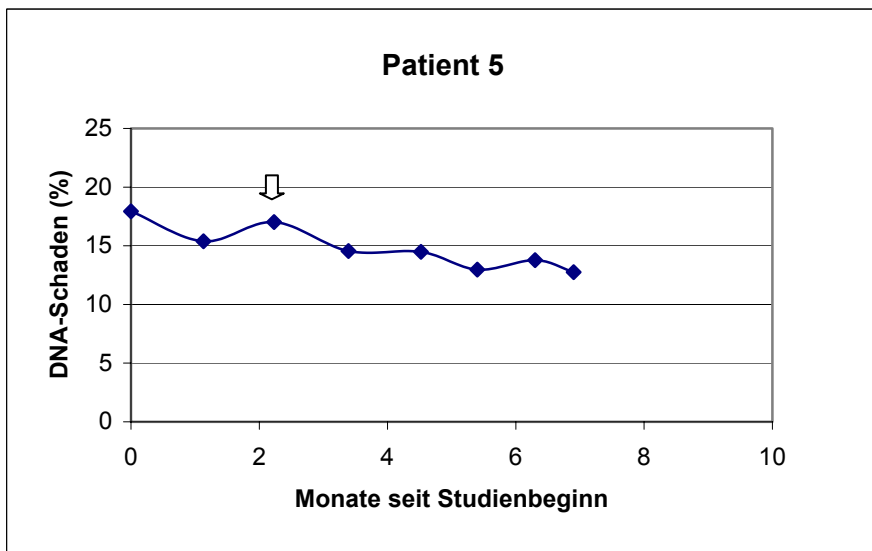


Abb.35 Patient 5: rel. DNA-Schaden (in %) im zeitlichen Verlauf

Die Mikrokernrate lag bei Patient 7 zu Beginn der Studie, und vor AT II-Antagonisten-therapie, im Mittel bei 18,74 +/- 3,1 (berechnet aus den ersten drei Messpunkten).

Nach Beginn der AT II-Antagonistentherapie (nach der dritten Messung, ↓) sank die Mikrokernrate auf einen Mittelwert von 15,22 +/- 0,51 (berechnet aus den letzten drei Messpunkten). Die relativ hohe Standardabweichung zu Beginn der Studie (Messpunkte 1-3) erklärt sich durch den starken Anstieg in diesem Abschnitt. Diesbezüglich konnte kein bibliographisches Ereignis evaluiert werden. Der weitere Kurvenverlauf zeigte keine größeren Schwankungen.

Der Anteil der doppelkernigen Lymphozyten zeigt einen insgesamt stark schwankenden Verlauf. Es ergaben sich Schwankungen von ca. 10 % um einen Mittelwert von ca. 45 %. Insgesamt zeigen die erhobenen Daten ein sehr uneinheitliches Bild mit allenfalls geringer Tendenz nach unten.

Der relative DNA-Schaden lag bei Patient 7 zu Beginn der Studie, und vor AT II-Antagonistentherapie, im Mittel bei 17,63 % +/- 2,6 % (berechnet aus den ersten drei Messpunkten). Die relativ hohe Standardabweichung zu Beginn der Studie (Messpunkte 1-3) erklärt sich durch den starken Anstieg (in Korrelation zur Mikrokernrate) in diesem Abschnitt. Diesbezüglich konnte, wie bereits oben erwähnt, kein klinisches Ereignis evaluiert werden. Nach Beginn der AT II-Antagonistentherapie (nach der dritten Messung, ↓) zeigte sich im Verlauf insgesamt eine merkliche Tendenz nach unten (ohne größere Schwankungen). Der relative DNA-Schaden sank zum Ende der Studie, bei fehlender Korrelation zur MR (micronucleus ratio), auf einen Mittelwert von 13,62 % +/- 0,55 % (berechnet aus den letzten drei Messpunkten).

Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 36-38 bzw. 39 und Tabelle 4 dargestellt.

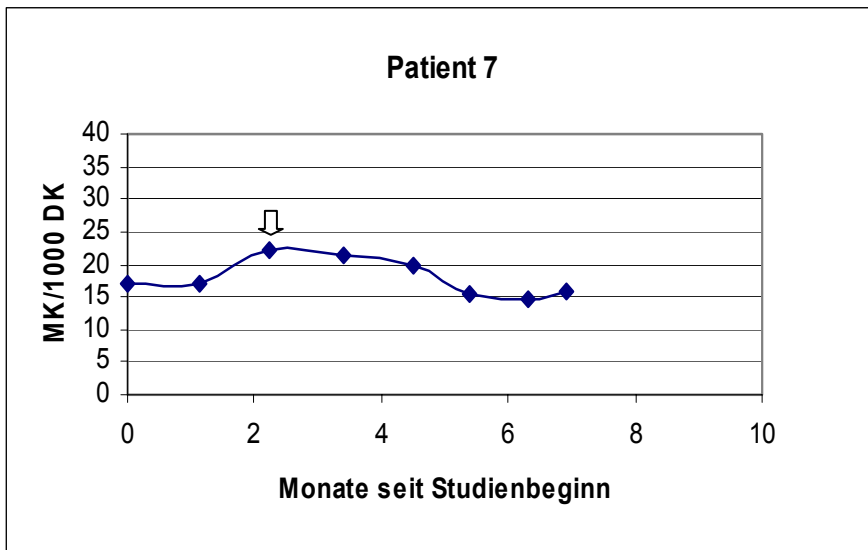


Abb.36 Patient 7: Mikrokernrate im zeitlichen Verlauf

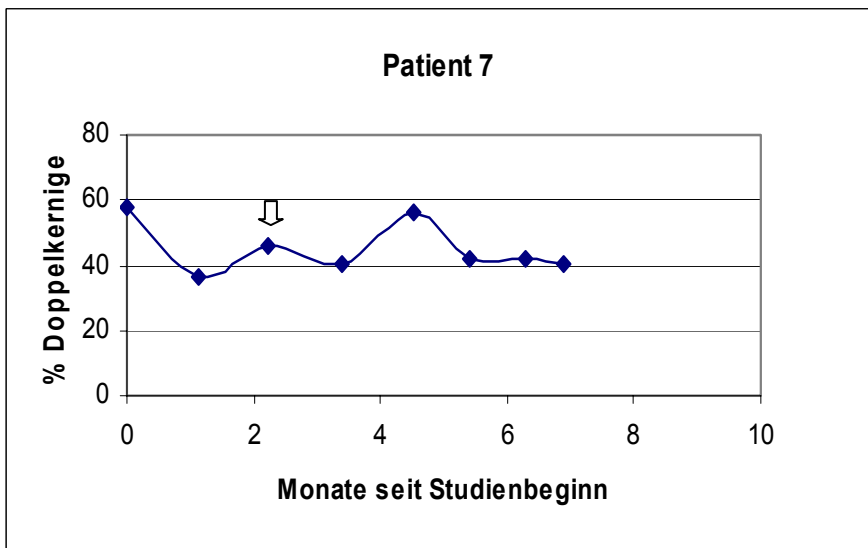


Abb.37 Patient 7: Anzahl der doppelkernigen Lymphozyten (in %) im zeitlichen Verlauf

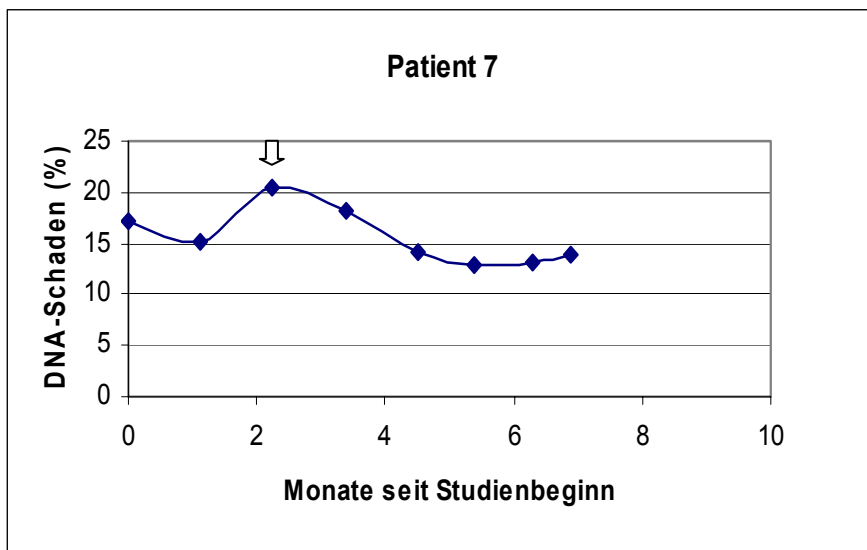


Abb.38 Patient 7: rel. DNA-Schaden (in %) im zeitlichen Verlauf

	Patient	Therapie	N	Mittelwert	SD	SF des Mittelwertes
Mikrokernrate	2	Ø	3	31,03	3,27	1,89
Mikrokernrate	2	AT II-B	3	21,11	1,26	0,73
Mikrokernrate	5	Ø	3	23,11	1,02	0,59
Mikrokernrate	5	AT II-B	3	16,78	0,77	0,44
Mikrokernrate	7	Ø	3	18,74	3,11	1,79
Mikrokernrate	7	AT II-B	3	15,22	0,51	0,29
DNA-Schaden	2	Ø	3	18,44	1,43	0,82
DNA-Schaden	2	AT II-B	3	12,40	0,82	0,47
DNA-Schaden	5	Ø	3	16,78	1,29	0,74
DNA-Schaden	5	AT II-B	3	13,17	0,54	0,31
DNA-Schaden	7	Ø	3	17,63	2,60	1,50
DNA-Schaden	7	AT II-B	3	13,32	0,55	0,32

Tab.4: Gruppenstatistik bei Vergleich der Mikrokernrate und des relativen DNA-Schadens der Gruppe 3



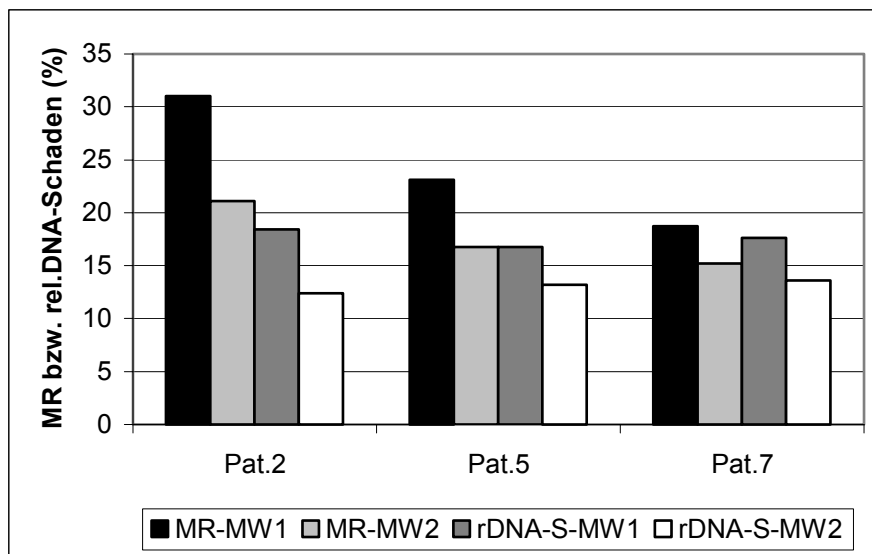


Abb. 39: Gruppenstatistik bei Vergleich der Mikrokernrate und des relativen DNA-Schadens der Gruppe 3

Die statistische Analyse der gewonnenen Daten der Gruppe 3, mittels T-Test bei unabhängigen Stichproben, ergab bezüglich der Mikrokernrate für Patient 2 eine Signifikanz von  $p = 0,08$  bei einem 95 % Konfidenzintervall von 4,31 – 15,53 (ohne 0), für Patient 5 eine Signifikanz von  $p = 0,01$  bei einem Konfidenzintervall von 4,28 – 8,38 (ohne 0) und für Patient 7 eine Signifikanz von  $p = 0,125$  bei einem Konfidenzintervall von -1,53 – 8,57 (mit 0).

Für den relativen DNA-Schaden der Gruppe 3 ergab sich für Patient 2 eine Signifikanz von  $p = 0,003$  bei einem 95 % Konfidenzintervall von 3,39 – 8,67 (ohne 0), für Patient 5 eine Signifikanz von  $p = 0,011$  bei einem Konfidenzintervall von 1,37 – 5,86 (ohne 0) und für Patient 7 eine Signifikanz von  $p = 0,048$  bei einem Konfidenzintervall von 4,79 – 8,57 (ohne 0; siehe auch Tab. 22 des Anhangs).

## 3.2 Vergleich Langzeit-HDF-Gruppe mit HD-Gruppe

### 3.2.1 Untersuchtes Patienten-Kollektiv

Das Patienten-Kollektiv der beiden Gruppen (HDF- und HD-Gruppe) umfasste insgesamt 20 Patienten (jeweils zehn pro Gruppe). An der Studie nahmen zehn Frauen und zehn Männer teil. Das Durchschnittsalter betrug 55,1 Jahre. Bei zehn Patienten wurde als nephrologische Grunderkrankung eine chronische Glomerulonephritis (nicht näher differenziert) diagnostiziert. Weiter nahmen drei Patienten mit mesangial-proliferierender Glomerulonephritis, zwei Patienten mit diabetischer Nephropathie, zwei Patienten mit Analgetika-Nephropathie und jeweils ein Patient mit Glomerulosklerose, mit Nephrolithiasis (bds.) und mit ADPKD an der Studie teil (siehe Tab.5).

Paar	Geschlecht	Alter (Jahre)	Dialysezeit (Monate)	Nephrologische Grunddiagnose	D.m.
<b>1</b>					
HDF	m	64	53	chronische GN	(-)
HD (K)	m	62	50	mesangial-prol. GN	(-)
<b>2</b>					
HDF	m	72	59	diabetische Nephropathie	(+)
HD (K)	m	66	50	diabetische Nephropathie	(+)
<b>3</b>					
HDF	w	68	28	Analgetika- Nephropathie	(-)
HD (K)	w	66	36	V.a. Analgetika- Nephrop.	(-)
<b>4</b>					
HDF	m	65	88	chronische GN	(-)
HD (K)	m	62	102	chronische GN	(-)
<b>5</b>					
HDF	w	43	78	chronische GN	(-)
HD (K)	w	45	69	mesangial-prol. GN	(-)

Tab.5: Patienten-Kollektiv (HDF/HD), (GN = Glomerulonephritis)

<b>6</b>					
HDF	m	41	15	chronische GN	(-)
HD (K)	m	37	28	mesangial-prol. GN	(-)
<b>7</b>					
HDF	m	48	155	ADPKD	(-)
HD (K)	m	51	158	chronische GN	(-)
<b>8</b>					
HDF	w	37	108	chronische GN	(-)
HD (K)	w	33	96	chronische GN	(-)
<b>9</b>					
HDF	w	59	167	chronische GN	(-)
HD (K)	w	60	162	chronische GN	(-)
<b>10</b>					
HDF	w	62	36	Nephrolithiasis (beidseits)	(-)
HD (K)	w	61	36	Glomerulosklerose	(-)

Tab.5 (Fortsetzung): Patienten-Kollektiv (HDF/HD), (GN = Glomerulonephritis)

Ermittelt wurden jeweils die Mikrokernrate (als MK/1000 DK; MK= Mikrokerne, DK= doppelkernige Lymphozyten), der Anteil an doppelkernigen Lymphozyten (von allen gezählten Zellen in %) und der relative DNA-Schaden (in %).

Weiter wurden die gewonnenen Daten einer statistischen Analyse, dem sogenannten T-Test unterzogen. Mit ihm kann berechnet werden, ob eine kontinuierliche Variable (Mikrokernrate bzw. relativer DNA-Schaden) im Mittel für zwei Gruppen von Fällen (vor und nach Änderung der Untersuchungsvariablen) einen signifikanten Unterschied aufweist.

### 3.2.2 Gruppenvergleich der Mikrokernrate (auf 1000 DK)

Bei allen zehn Probandenpaaren lag die Mikrokernrate der HD-Patienten über der Mikrokernrate der HDF-Patienten. Die Mikrokernrate der HD-Gruppe betrug im Mittel 19,93 +/- 1,87 und lag so deutlich über dem Mittelwert der HDF-Gruppe von 16,93 +/- 1,29. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 6 und 7 sowie der Abbildung 40 dargestellt.

Paar	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
HDF	17,67	19,33	15,00	17,67	16,00	18,33	16,00	16,33	16,67	16,33
HD	21,33	24,00	18,67	19,00	21,00	20,67	18,33	20,00	18,00	18,33

Tab. 6: Gruppenvergleich der Mikrokernrate (auf 1000 DK) von 10 Probandenpaaren

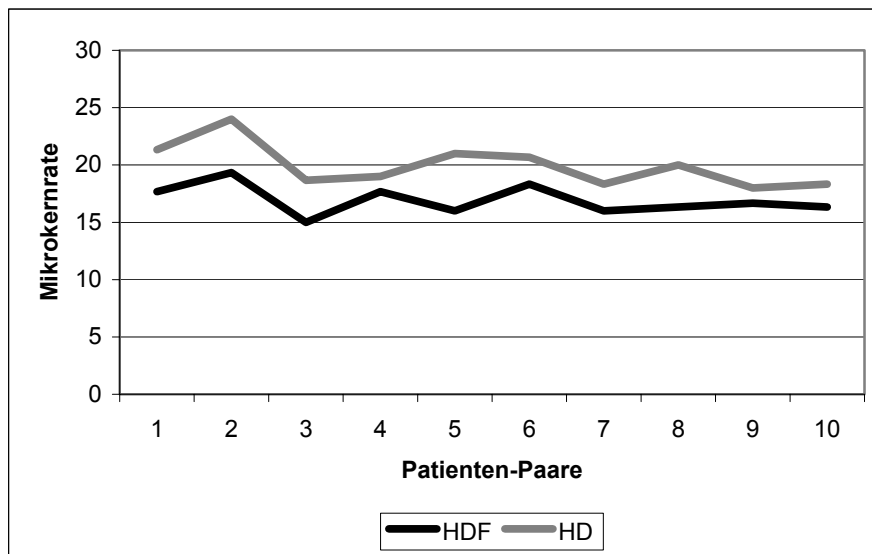


Abb. 40: Vergleich der Mikrokernrate (auf 1000 DK): HDF/HD

Dialyseart	N	Mittelwert	Standardabweichung	SF des Mittelwertes
HDF	10	16,93	1,29	0,41
HD	10	19,93	1,87	0,59

Tab.7: Gruppenstatistik bei Vergleich der Mikrokernrate (HDF-/HD-Gruppe)

Die statistische Analyse der gewonnenen Daten des HDF-/HD-Gruppenvergleichs, mittels T-Test bei unabhängigen Stichproben, ergab bezüglich der Mikrokernrate eine Signifikanz von  $p = 0,001$  bei einem 95 % Konfidenzintervall von  $-4,51 - -1,49$  (ohne 0; siehe auch Tab. 52 des Anhangs).

### 3.2.3 Gruppenvergleich des relativen DNA-Schadens (in %)

Bei allen zehn Probandenpaaren lag der relative DNA-Schaden (in %) der HD-Patienten über dem relativen DNA-Schaden der HDF-Patienten. Der relative DNA-Schaden der HD-Gruppe betrug im Mittel  $17,05 \pm 1,31$  und lag so über dem relativen DNA-Schaden der HDF-Gruppe von  $14,33 \pm 1,93$ . Die Ergebnisse sind in den Tabellen 8 und 9 sowie der Abbildung 41 dargestellt.

Paar	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
HDF	12,92	14,38	16,08	16,06	13,33	15,43	13,34	15,37	12,61	13,78
HD	15,6	19,5	17,72	18,76	17,29	18,48	15,86	18,77	14,36	14,16

Tab. 8: Gruppenvergleich des relativen DNA-Schadens (in %) bei 10 Probandenpaaren

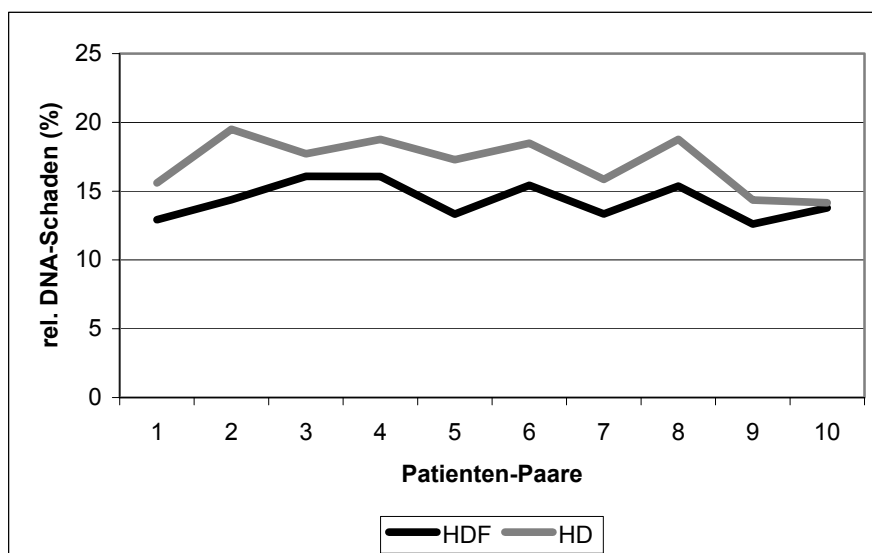


Abb. 41: Vergleich des relativen DNA-Schadens (in %): HDF/HD

Dialyseart	N	Mittelwert	Standardabweichung	SF des Mittelwertes
HDF	10	14,33 %	1,31	0,42
HD	10	17,05 %	1,93	0,61

Tab.9: Gruppenstatistik bei Vergleich des relativen DNA-Schadens (HDF-/HD-Gruppe)

Für den relativen DNA-Schaden des HDF-/HD-Gruppenvergleichs ergab sich eine Signifikanz von  $p = 0,002$  bei einem 95 % Konfidenzintervall von  $-4,29 - -1,15$  (ohne 0; siehe auch Tab. 52 des Anhangs).

### 3.2.4 Einzel-Paar-Vergleich (Patient/Vergleichspatient)

Paar 1	MIC-Rate	rel. DNA-Schaden	Paar 6	MIC-Rate	rel. DNA-Schaden
HDF	17,67	12,92	HDF	18,33	15,43
HD	21,33	15,6	HD	20,67	18,48
Paar 2	MIC-Rate	rel. DNA-Schaden	Paar 7	MIC-Rate	rel. DNA-Schaden
HDF	19,33	14,38	HDF	16	13,34
HD	24	19,5	HD	18,33	15,86
Paar 3	MIC-Rate	rel. DNA-Schaden	Paar 8	MIC-Rate	rel. DNA-Schaden
HDF	15	16,08	HDF	16,33	15,37
HD	18,67	17,72	HD	20	18,77
Paar 4	MIC-Rate	rel. DNA-Schaden	Paar 9	MIC-Rate	rel. DNA-Schaden
HDF	17,67	16,06	HDF	16,67	12,61
HD	19	18,76	HD	18	14,36
Paar 5	MIC-Rate	rel. DNA-Schaden	Paar 10	MIC-Rate	rel. DNA-Schaden
HDF	16	13,33	HDF	16,33	13,78
HD	21	17,29	HD	18,33	14,16

Tab. 10: Einzel-Paar-Vergleich (Patient/Vergleichspatient)

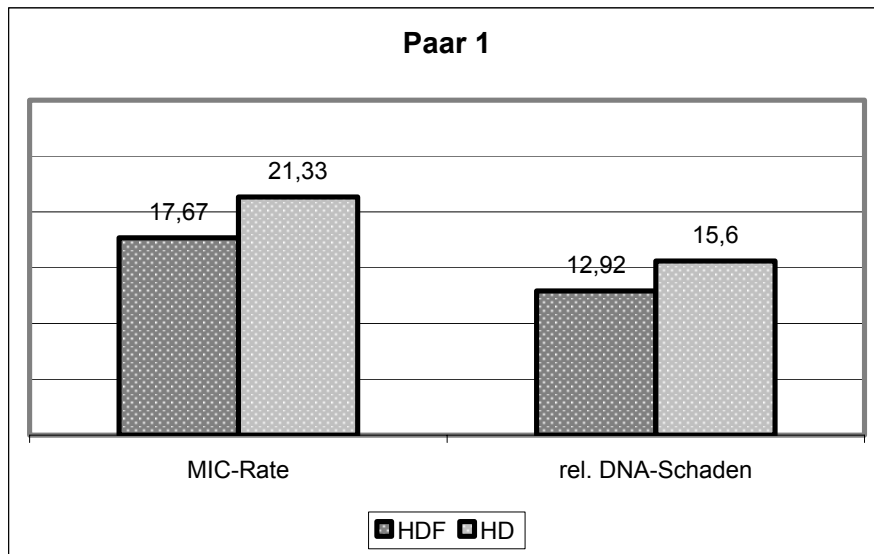


Abb. 42: Paar 1: Dargestellt sind der Vergleich der Mikrokernrate und der Vergleich des relativen DNA-Schadens (in %)

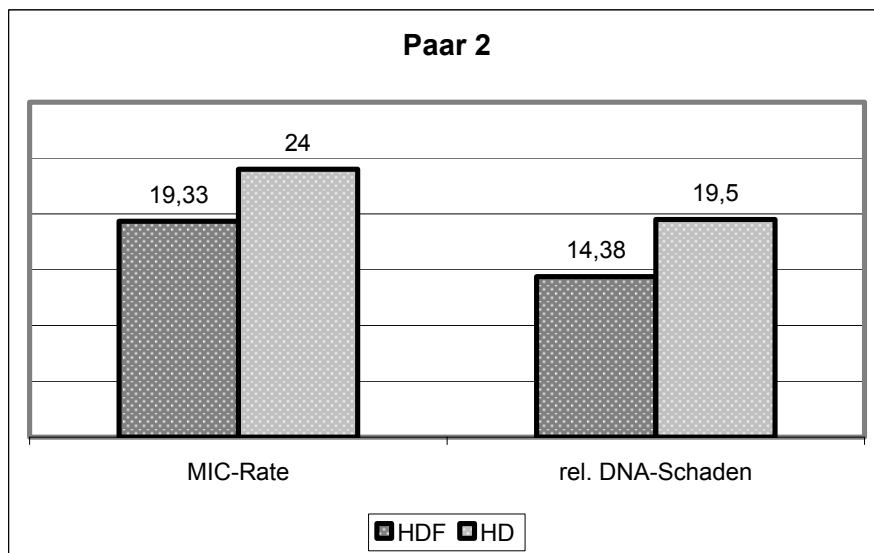


Abb. 43: Paar 2: Dargestellt sind der Vergleich der Mikrokernrate und der Vergleich des relativen DNA-Schadens (in %)

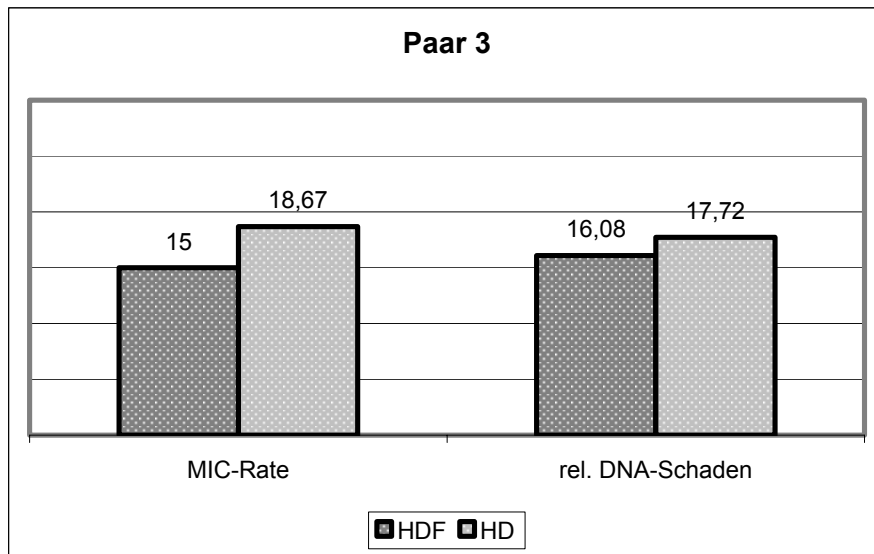


Abb. 44: Paar 3: Dargestellt sind der Vergleich der Mikrokernrate und der Vergleich des relativen DNA-Schadens (in %)

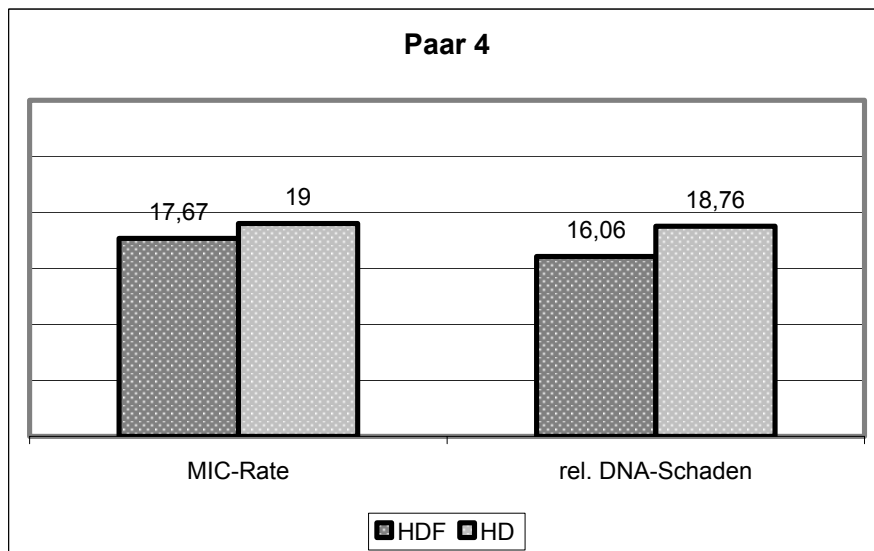


Abb. 45: Paar 4: Dargestellt sind der Vergleich der Mikrokernrate und der Vergleich des relativen DNA-Schadens (in %)



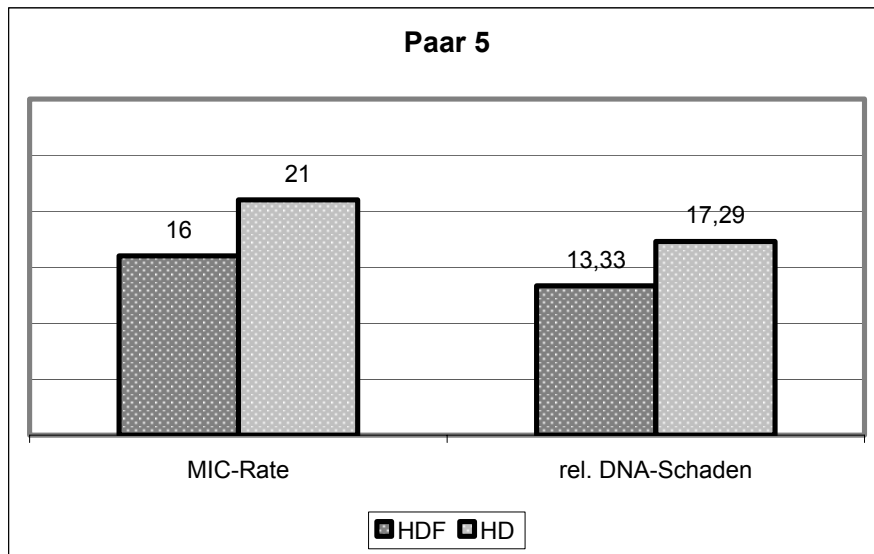


Abb. 46: Paar 5: Dargestellt sind der Vergleich der Mikrokernrate und der Vergleich des relativen DNA-Schadens (in %)

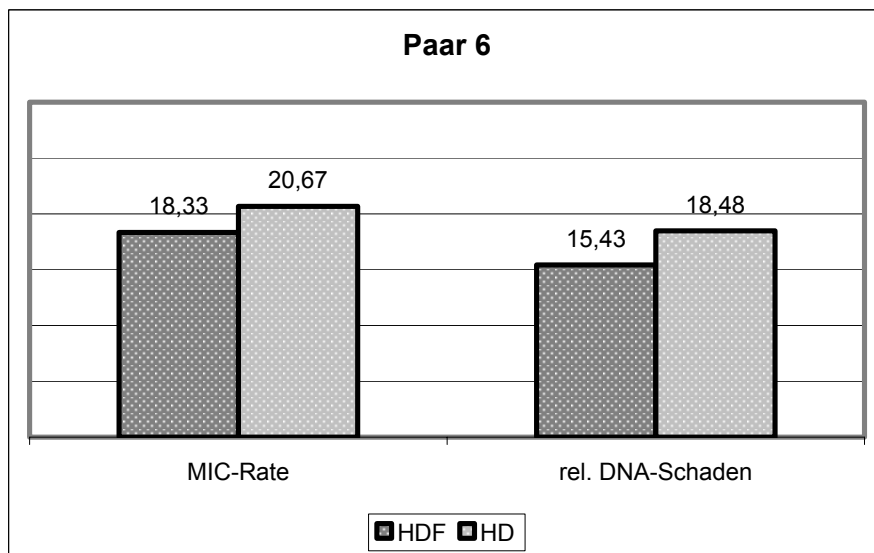


Abb. 47: Paar 6: Dargestellt sind der Vergleich der Mikrokernrate und der Vergleich des relativen DNA-Schadens (in %)

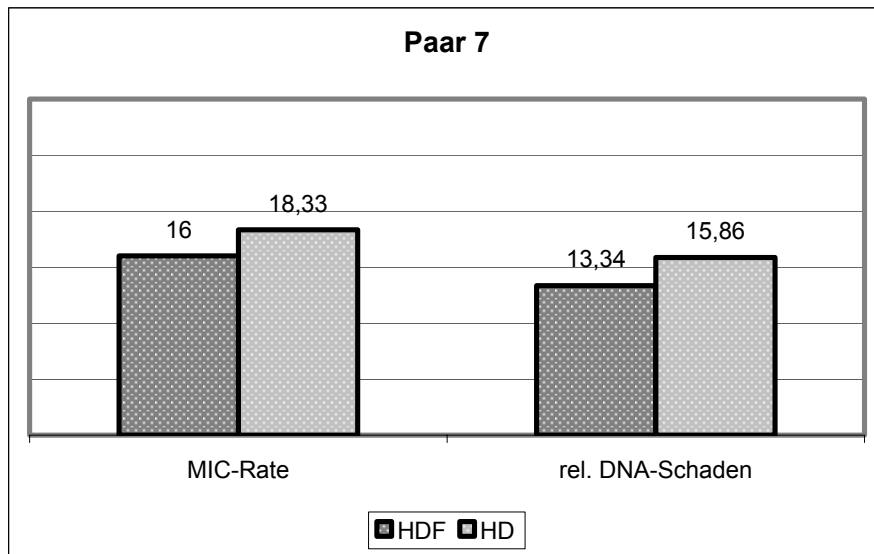


Abb. 48: Paar 7: Dargestellt sind der Vergleich der Mikrokernrate und der Vergleich des relativen DNA-Schadens (in %)

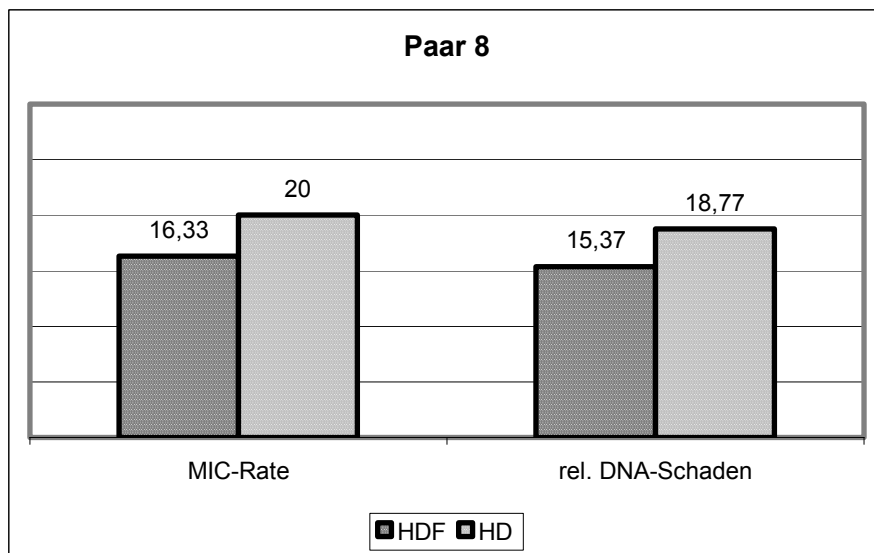


Abb. 49: Paar 8: Dargestellt sind der Vergleich der Mikrokernrate und der Vergleich des relativen DNA-Schadens (in %)

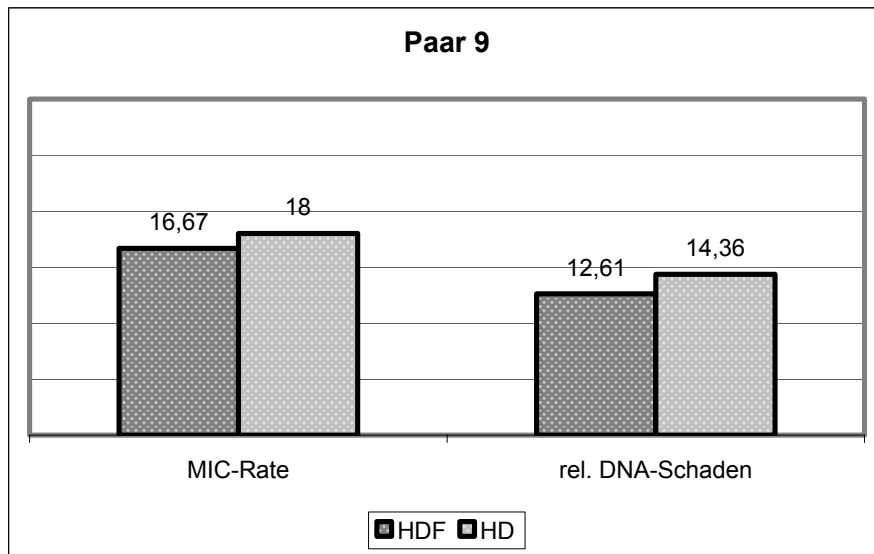


Abb. 50: Paar 9: Dargestellt sind der Vergleich der Mikrokernrate und der Vergleich des relativen DNA-Schadens (in %)

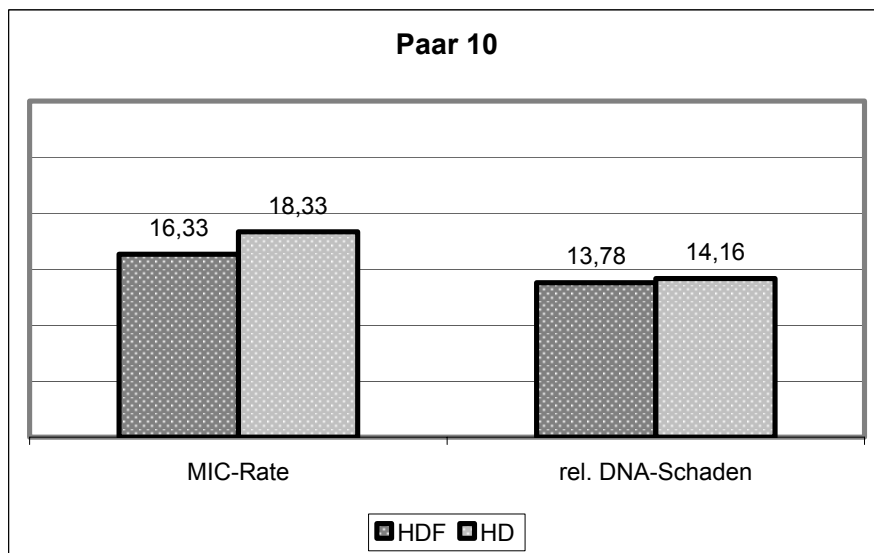


Abb. 51: Paar 10: Dargestellt sind der Vergleich der Mikrokernrate und der Vergleich des relativen DNA-Schadens (in %)

## **4 Diskussion**

Zahlreiche Studien beschreiben und belegen den Zusammenhang zwischen fortgeschrittener Niereninsuffizienz (ESRD = end stage renal disease) bzw. Nierenersatztherapie und einem signifikant erhöhten relativen Risiko für Malignome (Giacchino et al., 1983) bzw. einer erhöhten Krebsinzidenz. Zu den möglichen pathogenethischen Mechanismen (im Zusammenhang mit der malignen Entartung) zählen unter anderem die urämie-bedingte Beeinträchtigung der Funktion des Immunsystems und die reduzierte DNA-Reparatur-Kapazität (Vamvakas et al., 1998). Als weitere systemische Faktoren, die im Rahmen der Niereninsuffizienz die Krebsentstehung fördern können, gelten v.a. der erhöhte Anfall von freien Sauerstoffradikalen bei gleichzeitig reduzierter antioxidativer Kapazität, die Akkumulation kanzerogener heterozyklischer Amine, die mögliche Hypomethylierung der DNA bei erhöhtem Homocysteinspiegel sowie das Rauchen.

Seit einiger Zeit müssen auch die sog. „advanced glycated end products“ (AGEs) als Schädigungsfaktoren der DNA betrachtet werden. Diese sind im Rahmen der Niereninsuffizienz im Blut und Gewebe beträchtlich erhöht und steigern, neben anderen Effekten, wiederum die Sauerstoffradikalbildung (Teschner et al., 2002).

Hinreichend bekannt ist die enorme Bedeutung eines funktionstüchtigen Immunsystems bei der Prävention maligner Transformation und Tumorentstehung. Das intakte Immunsystem erkennt und eliminiert jeden Tag tausende von „Tumor-Zellen“ (Riede et al., 1995). Dabei ist die Fähigkeit, DNA-Schäden zu erkennen und zu reparieren, ein bedeutender „Verteidigungsmechanismus“ gegen den Krebs, denn trotz der multifaktoriellen Entstehung von Tumoren stellt die DNA oftmals das wichtigste Angriffsziel im Prozess der Kanzerogenese dar.

Die Niereninsuffizienz führt jedoch zu qualitativer wie quantitativer Beeinträchtigung der humoralen und (insbesondere) zellulären Immunreaktion (sog. „urämischer Immundefekt“) und somit zu einer reduzierten „Tumorkontrolle“. Außerdem wurde nachgewiesen, dass die DNA-Reparatur-Kapazität peripherer Lymphozyten bei Langzeit-Dialysepatienten (>120 Monate) erheblich eingeschränkt ist (Vamvakas et al., 1998; Malachi et al., 1993) und mit zunehmender Dialysedauer weiter sinkt, während es zu einer deutlichen Zunahme der Mikrokernrate kommt (Stopper et al., 1999). Eine

erhöhte Mikrokernrate wurde auch in Untersuchungen von verschiedenen Tumorgeweben nachgewiesen (Benner et al., 1993; Garewal et al., 1993; Rosin, 1993), was die Vermutung nahe legt, dass die Bildung von Mikrokernen eine mögliche Rolle bei der Karzinogenese spielt. Diese Befunde lassen auf erhöhte gentoxische Einflüsse im Blut dieser Patienten schließen, die zu einem Urämie-induzierten genetischen Schaden führen und somit für die vermehrte Entstehung von Malignomen bei Dialysepatienten angesehen werden könnte.

Der in dieser Arbeit verwendete Mikrokerntest spielt in den letzten Jahren eine immer größere Rolle bei der Gentoxizitätsprüfung von natürlichen und synthetischen, potentiell karzinogenen Substanzen, unter anderem bei der immer größer werdenden Gruppe der Xenobiotika. Zu diesem Zweck wurde er für die Anwendung in Säugetierzellsystemen verschiedener Gewebe und Arten entsprechend modifiziert und angepasst. Werden chromosomale Schäden durch indirekte DNA-Veränderung verursacht, ist eine Detektion mit den klassischen Mutations-Testsystemen (z.B. Ames-Test) nicht möglich. Derartige Veränderungen (z.B. Chromosomenbrüche oder der Verlust ganzer Chromosomen) können aber sehr wohl durch den Mikrokerntest nachgewiesen werden, der außerdem weit weniger aufwendig ist. Gleichzeitig stellt er eine sensitive und verlässliche Methode zur Detektion und Quantifizierung chromosomaler Schäden dar.

Weiter wurde der so genannte Comet-Assay angewandt, der ein äußerst sensitives Testsystem darstellt, welches in der Lage ist, eine Vielzahl von DNA-Schäden auf Einzelzellniveau (und das bereits bei sehr niedrigen Schädigungslevels) direkt zu detektieren und zu quantifizieren. Das breit gefächerte Spektrum der zu detektierenden DNA-Schäden (Übersicht bei Tice et al., 1995) umfasst neben DNA-Strangbrüchen und ALS (alkali-labiler Bereiche) praktisch alle bekannten DNA-Veränderungen, wie etwa oxidative DNA-Schäden, Alkylierungen und die Bildung großer Addukte (DNA/DNA- und DNA/Protein-Crosslinking), da sie alle eine direkte oder indirekte Induktion der DNA-Wanderung bewirken. Ein bereits bekanntes Phänomen, welches auch im Rahmen dieser Studie zum Ausdruck kam, war die teilweise hohe Standardabweichung von bis zu ca. 6%, welche durch eine relativ große intraindividuelle Schwankungsbreite der Einzelwerte bedingt ist, was v.a. bei den ständigen Kontrollpersonen deutlich wird. Die starke Variabilität bei Comet-Assay-Untersuchungen bei Zellproben der gleichen

Person zu verschiedenen Zeitpunkten wird insgesamt als problematisch gesehen (Collins et al., 1997), denn auch bei genauester Versuchsdurchführung lassen sich methodische und patientenspezifische Schwankungen nicht verhindern. Demzufolge muss die Interpretation der durch den Comet-Assay gewonnenen Ergebnisse mit Zurückhaltung interpretiert bzw. mit anderen Testverfahren und anamnestisch gewonnen Daten abgesichert werden, da beispielsweise eine akute Infektion, Mangelernährung (Betancourt et al., 1995) oder Nüchternblutabnahme (Green et al., 1994) allein ausreicht, um eine erhöhte DNA-Schädigung zu erzielen. Ein weiterer, bisher nur für den Comet-Assay beschriebener Störfaktor ist die Induzierung von erhöhter DNA-Migration nach starker körperlicher Belastung (Hartmann et al., 1994). Außerdem auffallend in dieser Arbeit war eine unterschiedlich ausgeprägte Inhomogenität in der Anzahl und dem Grad der geschädigten Lymphozyten von nahezu nicht- bis maximal geschädigt, welche sich sowohl in den Patientengruppen wie auch bei den gesunden Kontrollpersonen über den gesamten Verlauf der Studie darstellte. Da auch dieses Phänomen bereits in anderen Studien beschrieben, aber bisher nicht erklärt werden konnte, bedarf es weiterer Forschung, um zu klären, in welchem Maße diese Variabilitäten Kontrollmöglichkeiten unterliegen bzw. in die Interpretation der Ergebnisse mit einfließen müssten. Und so sollte diese Standardisierungsproblematik auch weiterhin mit Interesse verfolgt werden (Speit et al., 1999; De Boeck et al., 2000).

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich nun mit der Untersuchung des Einflusses verschiedener Faktoren (Prädialysephase/ Beginn einer Dialysebehandlung, Wechsel von konventioneller HD- zu HDF-Behandlung, Angiotensin II-Antagonistentherapie und Langzeit-HDF-Behandlung) auf die Zellkern-DNA bzw. auf den davon abgeleiteten relativen genetischen Schaden, ermittelt durch die beiden oben beschriebenen Testverfahren (Comet-Assay und Mikrokern-Assay) und zwar in frisch aus dem Blut von Dialysepatienten (bzw. Prädialysepatienten) isolierten peripheren Lymphozyten. Zu diesem Zweck wurden drei Gruppen (mit jeweils drei Probanden) gebildet und im Rahmen einer Verlaufsstudie über einen Zeitraum von ca. zehn Monaten mit den oben genannten Verfahren überwacht. Zu Beginn wurde über mindestens drei Monate hinweg bei einem Messabstand von vier Wochen bei allen Probanden die momentane relative DNA-Schädigung und Mikrokernfrequenz evaluiert und erst im Anschluss die

Untersuchungsvariable entsprechend der Gruppenzugehörigkeit verändert. Dadurch stellte jeder Proband auch gleichzeitig seine eigene Kontrollperson dar.

Außerdem umfasste die Verlaufsstudie zwei gesunde Probanden, die als ständige Kontrollpersonen dienten. Hier stand weniger der Vergleich mit den (Prä-) Dialysepatienten als die Kontrolle der verwendeten Verfahren (im Hinblick auf sog. methodische Fehler) im Vordergrund. Eventuell auftretende umgebungs- und verarbeitungsbedingte Unregelmäßigkeiten können so erkannt werden und der Test (für alle Patienten und die Kontrollpersonen) in diesem Fall wiederholt werden.

Die ermittelte Mikrokernrate der beiden ständigen Kontrollpersonen, die mit ca. 9 Mikrokernen (auf 1000 doppelkernige Lymphozyten) deutlich unter den Werten der Dialysepatienten lag, zeigt einen insgesamt homogenen bzw. stabilen Verlauf. Ähnliches gilt für den festgestellten relativen DNA-Schaden von ca. 11 %, wobei der Kurvenverlauf deutliche Schwankungen um den entsprechenden Mittelwerte zeigt. Einzig davon ausgenommen zeigen die Werte zum Zeitpunkt des dritten Messpunktes bei beiden Kontrollpersonen einen deutlichen Anstieg der Mikrokernrate und des relativen DNA-Schadens. Es konnte jedoch evaluiert werden, dass beide Kontrollpersonen in diesem Zeitraum an einem grippalen Infekt erkrankt waren, wodurch nach Betancourt (siehe oben) sich der, sozusagen Infektbedingte, Anstieg der Werte erklären ließe. Somit ist davon auszugehen, dass zu jedem Messpunkt annähernd gleiche Untersuchungsbedingungen bestanden und beide Verfahren korrekt angewandt wurden.

Bei drei Dialysepatienten wurde mit einer Angiotensin II-Antagonistentherapie (einem Sartan-Präparat) begonnen. Angiotensin II-Antagonisten gewinnen nämlich neben den ACE (Angiotensin Converting Enzyme)-Inhibitoren bei der „kardio- und nephroprotektiven“ Therapie sowie der Behandlung der Herzinsuffizienz zunehmend an Bedeutung. Diese nephroprotektiven Effekte wurden allerdings bisher vorwiegend in experimentellen Studien u.a. an Versuchstieren (Krivošiková et al., 2001) und neuerdings auch an Patienten mit Diabetes mellitus gezeigt.

Im Zentrum dieses Therapieansatzes steht das RAAS, ein gemischt enzymatisch-hormonelles System, dessen Hauptaufgabe die Regulation des Flüssigkeitsvolumens, der Elektrolytbalance und des systemischen Blutdrucks ist. Weiterhin kann Angiotensin

II, als wichtigster Mediator der RAAS-Kaskade, als Wachstumsmodulator oder -faktor fungieren. Es wird als wesentlicher Faktor bei der Entstehung der Hypertonie und verschiedenen Formen kardio-vaskulärer und renaler Erkrankungen angesehen, wodurch es in den Brennpunkt pharmakologischer Studien rückte. Ausgeübt werden diese Effekte über die Bindung von Angiotensin II an spezifische Rezeptoren, den AT I- und den AT II-Rezeptor (Physiologie des Menschen, 27. Aufl.; Pharmakologie und Toxikologie, 14. Aufl.; Maarten et al., 2000).

Unter Therapie mit Angiotensin II-Rezeptorantagonisten (sog. Sartan-Präparate), welche bisher hauptsächlich bei der essentiellen arteriellen Hypertonie eingesetzt werden, wird die Angiotensin II vermittelte Wirkung auf Blutdruck, Aldosteron-, Vasopressin- und Katecholaminfreisetzung sowie Durstentstehung selektiv und vollständig antagonisiert. Ebenso wurde beobachtet, dass die Ausbildung der kardialen Hypertrophie und die mit der RAAS-Aktivierung assoziierte Herzinsuffizienz günstig beeinflusst oder sogar verhindert werden konnten (Taal et al., 2000).

Alle drei Patienten zeigten unter Therapie mit Angiotensin II-Antagonisten eine teilweise sogar deutlich (Patient 2) niedrigere Mikrokernrate und auch einen geringeren relativen DNA-Schaden als vor der Therapie. Die statistische Analyse der gewonnenen Daten mittels T-Test ergab bezüglich der Mikrokernrate in zwei von drei Fällen, im Hinblick auf den relativen DNA-Schaden sogar in allen drei Fällen, eine signifikante Reduktion der Werte.

In Zusammenschau der bisherigen Datenlage und auch dieser Ergebnisse ergäbe sich ein deutliches Benefit für das entsprechende Patienten-Kollektiv mit einer wahrscheinlichen Verringerung der Progression zu ESRD, eine Verminderung der Dialyse- und Transplantationshäufigkeit bzw. einer Verlängerung des Zeitraums bis zum Beginn einer Nierenersatztherapie, die Reduktion von Folge- bzw. Begleiterkrankungen im Rahmen einer Nierenersatztherapie (u.a. arterielle Hypertonie, renale Anämie, sekundärer Hyperparathyreoidismus, renale Osteopathie, etc.), eine Reduktion kardio-vaskulärer Ereignisse, eine Verringerung der Hospitalisierung. Neben den augenscheinlichen Vorteilen für die Patienten könnte durch Therapie mit Angiotensin II-Antagonisten zudem eine erhebliche Kostenersparnis erzielt werden und zwar ohne notwendige medizinische Leistungen zu kürzen. Eine Kostenanalyse der Renaal-Studie (Mai 2001) über 3,5 Jahre bei Behandlung von Patienten mit Typ II-



Diabetes und Nephropathie mit Losartan und einem konventionellem Antihypertonikum ergab eine Nettoeinsparung von 3000\$ pro behandeltem Patient (Brenner et al., 2000).

Anhand der nächsten Gruppe, bestehend aus drei Prädialysepatienten, sollte festgestellt werden, ob und in wieweit sich die DNA-Schädigung bzw. Mikrokernrate bei Eintritt in die Dialyse-Behandlung verändert. Eine Studie von Vamvakas et al. (1998) ergab, dass sich nach Aufnahme ins Dialyseprogramm initial eine, möglicherweise sogar „überschießende“, Erholung der zuvor zunehmend beeinträchtigten DNA-Reparatur einstellt, die wahrscheinlich auf der „akuten“ Elimination von sog. Urämietoxinen beruht. Dieser Effekt ist im Verlauf der Langzeitdialyse allerdings, bedingt durch die Persistenz bestimmter Urämietoxine und eventuell durch das Dialyseverfahren selbst (Bioinkompatibilität etc.), wieder rückläufig.

Bei den für die Studie ausgewählten Prädialysepatienten, die sich im Endzustand einer chronischen Nierenerkrankung (end stage renal disease = ESRD) befanden, war bis zum Ende der Studie (ca. 8 Monate), nach den aktuell gültigen Richtlinien, keine klinische Indikation für den Beginn einer Dialyse-Behandlung gegeben. Weiterhin konnte einer der Probanden nach ca. vier Monaten aus gesundheitlichen Gründen nicht mehr an der Studie teilnehmen und es konnte kein geeigneter Ersatz mehr gefunden werden.

Im Verlauf der Studie zeigte sich bezüglich der Mikrokernrate eine allenfalls geringe tendenzielle Zunahme ohne Signifikanz. Bei Betrachtung des relativen DNA-Schadens lässt sich auf Grund des stark schwankenden Kurvenverlaufs keine eindeutige Aussage bezüglich einer Zu- oder Abnahme der Werte treffen. Rein rechnerisch ergab sich eine minimale Tendenz nach unten (ohne Signifikanz). Die Interpretation der Ergebnisse wäre ein (in diesem Zeitraum) auf niedrigem Niveau stabiler Verlauf der Erkrankung, also ohne wesentliche Progression. In Korrelation dazu zeigt sich die klinische Beurteilung der Patienten im Stadium der kompensierten Retention, ohne Indikation für den Beginn der Dialyse, kongruent.

Da nun verschiedene Studien zu dem Ergebnis kamen, dass die HDF-Behandlung die bei Dialysepatienten signifikant erhöhten AGE-Spiegel (Advanced Glycation Products) im Vergleich zur Hämodialyse effektiver senkt (Gerdemann et al., 2000), wurden drei Dialysepatienten von Hämodialyse (HD) auf Hämodiafiltrations (HDF)-Behandlung

umgestellt. AGEs, insbesondere Carboxymethyllysin und Pentosidin, die eine wichtige Rolle in der Progression renaler Erkrankungen spielen (Heidland et al., 2001; Krivošiková et al., 2001), können unter anderem durch ihre proinflammatorische Wirkung und Modifikation von Proteinen und Lipiden indirekte DNA-Schäden verursachen. Somit wäre eine Reduktion der DNA-Schäden gegenüber Hämodialyse-Patienten anzunehmen, was sich in dieser Studie (wenn auch nicht signifikant) zumindest im Sinne eines Trends bestätigte. Alle drei Patienten zeigten unter Hämodialyse eine teilweise sogar deutlich (Patient 8) höhere Mikrokernrate und auch einen größeren relativen DNA-Schaden als unter Hämodiafiltration. Die statistische Analyse der gewonnenen Daten mittels T-Test ergab bezüglich der Mikrokernrate in zwei von drei Fällen im Hinblick auf den relativen DNA-Schaden nur in einem von drei Fällen eine signifikante Reduktion der Werte. Die zum Teil fehlende Signifikanz dieser Beobachtung könnte man eventuell auch auf die zu geringen Gruppengrößen ( $N = 3$ ) zurückführen. Selbst bei einer in allen Fällen nachgewiesenen Signifikanz wäre das Ergebnis nur eingeschränkt aussagekräftig, denn es ist im Grunde nicht möglich, für diese Gruppengröße ein signifikantes Ergebnis zu erzielen. Um diesem Trend eine uneingeschränkt gültige Signifikanz nachzuweisen, müsste diese Untersuchung an einer wesentlich größeren Gruppe von Dialysepatienten wiederholt werden.

Aus diesem Grund wurde im Rahmen einer einmaligen Erhebung DNA-Schädigung und Mikrokernfrequenz einer Gruppe, bestehend aus zehn Langzeit-Hämodiafiltrationspatienten, mit den Werten einer Vergleichsgruppe, bestehend aus zehn Hämodialysepatienten, verglichen. Die Auswahl der Probanden für die Kontrollgruppe geschah anhand verschiedener Parameter wie Alter, Geschlecht, Dialysezeit, Grund-/Begleiterkrankung im Sinne einer „matched-pair“ Technik, ähnlich einer Fall-Kontroll-Studie. Voraussetzung für die Aufnahme der Hämodiafiltrationspatienten in die Studie und entscheidendes Kriterium war das Fehlen von gravierenden Vorerkrankungen, denn bisher kamen vornehmlich gerade solche Patienten in den Vorzug der HDF-Behandlung, weil diese als schonender und somit als „Therapie der Wahl“ für diese Patienten galt.

Im Folgenden soll nun noch einmal kurz auf die bereits erwähnten AGEs eingegangen werden, da die Kenntnis ihrer Herkunft, Bildung und Interaktion sehr zum Verständnis

ihrer Rolle bei der chronischen Niereninsuffizienz beiträgt. Zu einer Akkumulation der AGEs kommt es bekanntermaßen z.B. im Rahmen des normalen Alterungsprozesses, bei degenerativen Prozessen wie z.B. der Alzheimer Erkrankung, bei Diabetes mellitus und Nierenversagen. „Maillard products“ oder „advanced glycation end products“ (AGEs) entstehen im Verlauf der sog. Maillard-Reaktion, einer nicht-enzymatischen Reaktion einer (Zucker-) Keton- oder Aldehydgruppe mit einer freien Aminogruppe von Proteinen, Lipiden oder Aminosäuren. Nachdem im ersten Schritt eine labile Schiffbase gebildet wird, erfolgt im Anschluss die Umwandlung in sog. „Amadori Produkte“. AGEs entstehen nun im Verlauf einer komplexen Kaskade aus Dehydratation, Kondensation, Fragmentation, Oxidation und Ringbildungs-Reaktionen. Diese in Struktur, Funktion und Molekülmasse äußerst heterogene Gruppe umfasst neben den bekannten N-carboxymethyllysinen (CML), Pentosidinen (PENT), Pyrralinen und Imidazolen eine Vielzahl von noch nicht näher klassifizierten Produkten, welche bisher nur eingeschränkt in ihrer pathogenethischen Rolle (Funktion/Interaktion) und damit auch teilweise in ihrer Quantität erfasst werden können (Heidland et al., 2001).

So erklären sich auch die unterschiedlichen Studienergebnisse bei der Bewertung der verschiedenen Eliminationsmethoden im Rahmen der Nierenersatztherapie. Es kann allerdings vermutet werden, dass beim Vergleich der Hämodialyse mit der Hämodiafiltration in Bezug auf Elimination der AGEs die HDF, welche eine maximale Clearance über das gesamte Molekülmassenspektrum erreicht, in Anbetracht der Heterogenität der Gruppe der AGEs die besseren Grundvoraussetzungen bietet.

Im Falle dieser Studie lag die Mikrokernrate der HD-Patienten bei allen zehn Probandenpaaren (im Mittel 19,93 +/- 1,87) signifikant ( $p = 0,001$ ; 95 % Konfidenzintervall von -4,51 – -1,49) über der Mikrokernrate der HDF-Patienten (im Mittel 16,93 +/- 1,29). Weiter lag der relative DNA-Schaden bei allen zehn Probandenpaaren der HD-Patienten (im Mittel 17,05 +/- 1,31) signifikant ( $p = 0,002$ ; 95 % Konfidenzintervall von -4,29 – -1,15) über dem relativen DNA-Schaden der HDF-Patienten (im Mittel 14,33 +/- 1,93).

Es kann somit festgestellt werden, dass - auch wenn in dieser Studie nicht erfasst wurde, in wie weit die beiden untersuchten Verfahren AGEs und ihre Folge- bzw. Beiprodukte aus dem Blut eliminieren können - die HDF-Behandlung aufgrund des niedrigeren

detektierten DNA-Schadens vom medizinischen Standpunkt aus als die langfristig „bessere“ Methode erscheint.

Weiter muss in Betracht gezogen werden, in wie weit die festgestellte (und den AGEs zugeschriebene) Genotoxizität womöglich zusätzlich zur direkten Wirkung auf sozusagen indirektem Weg vermittelt wird. So ergaben Beobachtungen, dass AGEs vielfältige biologische Wirkungen durch Bindung an ihren Rezeptor (RAGE) erzielen, wodurch weitere Stoffwechselprozesse und Regelkreisläufe auch im Hinblick auf mögliche Therapieansätze (z.B. medikamentöse Interferenz mit dem RAGE-Rezeptor), mit einbezogen werden müssen (Heidland et al., 2001).

Abschließend bleibt anzumerken, dass bis heute noch nicht hinreichend geklärt, ob die Zellen, die von uns als beschädigt identifiziert wurden, für die Tumorgenese selbst überhaupt eine Bedeutung haben, oder ob sie lediglich als Indikator für erfolgte Genotoxizität angesehen werden müssen. In jedem Fall stellt sich die Frage, inwiefern zirkulierende Lymphozyten möglicherweise nur für das hämatopoetische System einen Indikator für Zellentartungstendenzen darstellen, oder ob sich daraus zusätzlich Prognosen für andere Organe ergeben. Fest steht, dass die verschiedenen Zellarten und Gewebe starke Unterschiede in Bezug auf die Mikrokernspontanrate zeigen und dass deren Kenntnis, besonders bei Vergleichen von Studienergebnissen an verschiedenen Zelllinien, von großer Bedeutung ist. Neben Umwelteinflüssen, Ernährungsgewohnheiten und Gesundheitsverhalten (z.B. Rauchen) wird die Mikrokernspontanrate insbesondere von Alter und Geschlecht beeinflusst (Fenech, 1998). Und letztendlich kann trotz vieler Indizien auf ihre Beteiligung nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei Mikrokernen nur um ein „unschädliches“ Beiprodukt handelt, das mit der Karzinogenese nichts zu tun hat (Stopper, 1995).

## **5 Zusammenfassung**

Zahlreiche Studien beschreiben und belegen den Zusammenhang zwischen fortgeschrittener Niereninsuffizienz (ESRD = end stage renal disease) bzw. Nierenersatztherapie und einem signifikant erhöhten relativen Risiko für Malignome bzw. einer erhöhten Krebsinzidenz. Zu den möglichen pathogenethischen Mechanismen (im Zusammenhang mit der malignen Entartung) zählen unter anderem die urämiebedingte Beeinträchtigung der Funktion des Immunsystems und die reduzierte DNA-Reparatur-Kapazität. Weiter wurde nachgewiesen, dass die DNA-Reparatur-Kapazität peripherer Lymphozyten bei Langzeit-Dialysepatienten (>120 Monate) erheblich eingeschränkt ist und mit zunehmender Dialysedauer weiter sinkt, während es gleichzeitig zu einer deutlichen Zunahme der Mikrokernrate kommt.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Untersuchung des Einflusses verschiedener Faktoren auf die Zellkern-DNA peripherer Lymphozyten bzw. auf den davon abgeleiteten relativen genetischen Schaden, ermittelt durch den Comet-Assay und den Mikrokern-Assay.

Dialysepatienten, die - im Rahmen der Studie - mit einer Angiotensin II-Antagonistentherapie begannen, zeigten unter dieser Therapie eine teilweise sogar deutlich niedrigere Mikrokernrate und auch einen geringeren relativen DNA-Schaden als zuvor. Die statistische Analyse ergab bezüglich der Mikrokernrate in zwei von drei Fällen, hinsichtlich des relativen DNA-Schaden sogar in allen drei Fällen, eine signifikante Reduktion der Werte. Es ergab sich somit ein deutliches Benefit für das entsprechende Patienten-Kollektiv mit einer wahrscheinlichen Verringerung der Progression zu ESRD sowie eine wahrscheinlich Reduktion von Folge- bzw. Begleiterkrankungen im Rahmen einer Nierenersatztherapie. Neben den augenscheinlichen Vorteilen für die Patienten könnte durch Therapie mit Angiotensin II-Antagonisten zudem eine erhebliche Kostenersparnis erzielt werden und zwar ohne Kürzung notwendiger medizinischer Leistungen. Die Ergebnisse der Gruppe der Prädialysepatienten zeigten einen (im Beobachtungs-Zeitraum) auf niedrigem Niveau stabilen Verlauf der Erkrankung, also ohne wesentliche Progression. In Korrelation dazu zeigt sich die klinische Beurteilung der Patienten im Stadium der kompensierten Retention kongruent, ohne Indikation für den Beginn einer Nierenersatztherapie.

Verschiedene Studien zeigen, dass die HDF-Behandlung die bei Dialysepatienten signifikant erhöhten AGE-Spiegel (Advanced Glycation Products) im Vergleich zur Hämodialyse effektiver senkt. Da AGEs, insbesondere Carboxymethyllysin und Pentosidin, eine wichtige Rolle in der Progression renaler Erkrankungen spielen wäre eine Reduktion der DNA-Schäden gegenüber Hämodialyse-Patienten anzunehmen. Dies bestätigte sich in dieser Studie wenn auch nicht signifikant, zumindest aber im Sinne eines Trends. Alle Patienten zeigten unter Hämodialyse eine teilweise sogar deutlich höhere Mikrokernrate und auch einen größeren relativen DNA-Schaden als unter Hämodiafiltration. Um über diesen Trend hinaus eine Signifikanz nachzuweisen, müsste diese Untersuchung an einer wesentlich größeren Gruppe von Dialysepatienten wiederholt werden. In dieser Studie wurde zumindest im Rahmen einer einmaligen Erhebung DNA-Schädigung und Mikrokernfrequenz einer größeren Gruppe von Langzeit-Hämodiafiltrationspatienten mit den Werten einer Vergleichsgruppe, bestehend aus Hämodialysepatienten verglichen. Voraussetzung für die Aufnahme der Hämodiafiltrationspatienten in die Studie war das Fehlen von gravierenden Vorerkrankungen; denn bisher kamen vor allem gerade Patienten mit solchen Vorerkrankungen in den Vorzug der HDF-Behandlung, weil diese als schonender und somit als „Therapie der Wahl“ für diese Patienten galt. Im Falle dieser Studie lag die Mikrokernrate der HD-Patienten bei allen zehn Probandenpaaren signifikant über der der HDF-Patienten. Weiter lag der relative DNA-Schaden bei allen zehn Probandenpaaren der HD-Patienten signifikant über dem der HDF-Patienten. Es kann somit festgestellt werden, dass - auch wenn in dieser Studie nicht erfasst wurde, in wie weit die beiden untersuchten Verfahren AGEs und ihre Folge- bzw. Beiprodukte aus dem Blut eliminieren können - die HDF-Behandlung aufgrund des niedrigeren detektierten DNA-Schadens vom medizinischen Standpunkt aus als die langfristig „bessere“ Methode anzusehen ist.

Abschließend ist anzumerken, dass noch nicht hinreichend geklärt ist, ob bzw. in wie weit die Zellen, die als beschädigt identifiziert wurden, eine Rolle in der Tumorgenese spielen oder lediglich als Indikator für erfolgte Genotoxizität angesehen werden müssen. Endgültige Empfehlungen für eine Überarbeitung der Therapierichtlinien erfordern somit weitere ausführliche Studien an diesem Patientenkollektiv.

## **6 Literatur**

Riede U. N., Wiestler O. D., Müller H. J. Allgemeine und spezielle Pathologie, 4. Auflage; Thieme-Verl. (1995);

Benner E. S., Wargovich M. J., Lippman S. M., Hong W. K. (1993) Micronuclei: a potential intermediate marker for chemoprevention of aerodigestive tract cancer. *Jou. Cell. Biochemi. Suppl.* 17F, 250-254.

Brenner B. M., Cooper M. E., Zeeuw Dd. D., Grunfeld J.P., Keane W. F., Kurokawa K., McGill J. B., Mitch W. E., Parving H. H., Remuzzi G., Ribi A. B., Schluchter M. D., Snavely D., Zhang Z., Simps R., Shahinar S., RENAAL-Study Investigators (2000) The Losartan renal protection study – rationale, study design and baseline characteristics of RENAAL (Reduction of Endpoints in NIDDM with the Angiotensin II Antagonist Losartan). *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 1(4), 328-335.

Eastmond D. A. and Tucker J. D. (1989) Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Env. Mol. Mutagenesis* 13, 34-43.

Eckert I. (1996) Mikrokerne: Entstehungsmechanismen und Bedeutung als Endpunkt für Genotoxizität. Dissertationsschrift zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg.

Fenech M. (1993) The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mut. Res.* 285, 35-44.

Fenech M. (1998) Important variables that influence base-line micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes – a biomarker for DNA damage in human populations. *Mut. Res.* 404, 155-165.

Garewal H. S., Ramsey L., Kaugars G., Boyle J. (1993) Clinical experience with the micronucleus assay. *Journal of Cellular Biochemistry Suppl.* 17F, 206-212.

Gerdemann A., Lemke H. D., Nothdurft A., Heidland A., Münch G., Bahner U., Schinzel R. (2000) Low-molecular but not high-molecular advanced glycation endproducts (AGEs) are removed by high-flux dialysis. *Clin. Nephro.* 54, 276-283.

Giacchino F., Formica M., Quadrello F., Bonello F., Picolli G. (1983) High incidence of cancer in uremic patients. *Clin. Nephro.* 22, 256-266.

Gustavino B., Degrassi F., Filipponi R., Modesti D., Tanzarella C., Rizzoni M. (1994) Mitotic indirect non-disjunction in phytohemagglutinine-stimulated human lymphocytes. *Mutagenesis* 9, 17-21.

Hartmann A., Fender H., Speit G. (1998) Comparative biomonitoring study of workers at a waste disposal site using cytogenetic tests and the comet (single gel) assay. *Env. Mol. Mutagenesis* 32, 17-24.

Heidland A., Šebeková K., Schinzel R. (2001) Advanced glycation endproducts and the progressive course of renal disease. *Am. J. Kid. Dis.* 38, 100-106.

Hori T.A. (1983) Induction of chromosome decondensation, sister-chromatid-exchange and endoreduplications by 5-azacytidine, an inhibitor of DNA-methylation. *Mut. Res.* 121, 47-52.

Kassie F., Parzefall W., Knasmüller S. (2000) Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. *Mut. Res.* 463, 13-31.

Kramer J., Schaich-Walch G., Nüsse M. (1990) DNA synthesis in radiation-induced micronuclei studied by bromodeoxyuridine (BrdUrd) labelling and anti-BrdUrd antibodies. *Mutagenesis* 5, 491-495.



Krivošíková Z., Dušínská M., Spustová V., Šebeková K., Blažíček P., Heidland A., Dzūrik R. (2001) DNA damage of lymphocytes in experimental chronic renal failure: Beneficial effects of losartan. *Kid. Int.* 59 (S78), 212-215.

Lüllmann H., Mohr K., *Pharmakologie und Toxikologie*, 14. Aufl.; Thieme-Verlag (1999), 105-107.

Maisonneuve P., Agoda L., Gellert R., Stewart J. H., Buccianti G., Lowenfels A.B., Boyle P. (1999) Cancer in patients on dialysis for end-stage renal disease: an international collaborative study. *Lancet* 354, 93-98.

Malachi T., Zevin D., Gafter U., Changnac A., Slor H. Levi J. (1993) DNA repair and recovery of RNA synthesis in uremic patients. *Kid. Int.* 44, 385-389.

Obe G., Beek B. (1982) *Premature chromosome condensation in micronuclei.* Academic Press, New York.

Östling O., Johanson K. J. (1984) Microelektrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 123, 291-298.

Ottaggio L., Bonatti S., Cavalieri Z., Abbondandolo A. (1993) Chromosome bearing amplified genes are a preferential target of chemicals inducing chromosome breakage and aneuploidy. *Mut. Res.* 301, 149-155.

Ray J. S., Harbison M.L., McClain R. M., Goodman J. I. (1994) Alterations in the methylation status and expression of the rat oncogene in phenobarbital-induced and spontaneous B6C3F1 mouse liver tumors. *Molec. Carcin.* 9, 155-166.

Rosin M. P. (1993) Genetic alterations in carcinogenesis and chemoprevention. *Envi. Health Perspectives* 101, 253-256.

Rydberg B., Johanson K. J. (1978) Estimation of single strand breaks in single mammalian cells. In: Hanawalt P. C., Friedberg E. C. und Fox C. F. (Eds.) (1993) DNA repair mechanisms. Academic Press, New York 1978, 465-468.

Schiffmann D., DeBoni U. (1991) Dislocation of chromatin elements in prophase induced by diethylstilbestrol: a novel mechanism by which micronuclei can arise. *Mut. Res.* 246, 113-122.

Schmidt R. F., Thews G., *Physiologie des Menschen*, 27. Aufl.; Springer-Verlag (1997), 540-542, 769-772.

Singh N. P., McCoy M. T., Tice R. R., Schneider E. L. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell. Research* 175, 184-191.

Singh N. P., Danner D. B., Tice R. R., Pearson J. B., Brant L. J., Schneider E. L. (1990) DNA damage and repair with age in individual human lymphocytes. *Mut. Res.* 273, 123-130.

Stopper H. (1995) Mikrokerne: Zellbiologischer Endpunkt für Gentoxizität. Habilitationsschrift, Medizinische Fakultät für das Fach Toxikologie und Pharmakologie, Universität Würzburg.

Stopper H., Koerber C., Gibis P., Spencer D. L., Caspary W. J. (1995b) Micronuclei induced by modulators of methylation: analogs of 5-azacytidine. *Carcinogenesis* 16, 1647-1650.

Stopper H., Müller S. O. (1997) Micronuclei as biological endpoint for genotoxicity: a minireview. *Toxicol. in Vitro* 11, 661-667.

Taal M. W., Brenner B. M. (2000) Renoprotective benefits of RAS inhibition: From ACEI to angiotensin II antagonists. *Kid. Int.* 57, 1803-1817.

Teschner M., Garte C., Rückle-Lanz H., Stopper H., Klassen A., Heidland A. (2002) Inzidenz und Spektrum maligner Erkrankungen bei Dialysepatienten in Nordbayern. Deutsche Medi. Wochen. 127, 2497-2502.

Tice R. R. (1995) The single cell gel / comet assay: a microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. In: Phillips D. H. and Venitt S. (Eds.) *Env. Mutagenesis* 315-339, Bios. Scientific Publishers Ltd. Oxford.

Vamvakas S., Bahner U., Heidland A. (1998) Cancer in end-stage renal disease: potential factors involved. *Am. J. Kid. Dis.* 18, 89-95.

Valverde M., Lopez M. C., Lopez I., Sanchez I., Fortoul T. I., Ostrosky-Wegman P., Rojas E. (1997) DNA damage in leukocytes and buccal and nasal epithelial cells of individuals exposed to air pollution in Mexico City. *Env. Mol. Mutagenesis* 30, 147-152.

Vasquez M., Tice R. R. (1997a) Comparative analysis of apoptosis versus necrosis using the single cell gel (SCG) assay. *Env. Mol. Mutagenesis* 29 (S28), 53.

Von-Hoff D. D., McGill J. R., Forseth B. J., Davidson K. K., Bradley T. P. R. V.-D. D., Wahl G. M. (1992) Elimination of extrachromosomally amplified Myc genes from human tumor cells reduces their tumorigenicity. *Proc. Nat. Acad. Scien. of the U.S.A.* 89, 8165-8169.

Weirich-Schwaiger H., Weirich H. G., Gruber B., Schweiger M., Hirsch-Kaufmann M. (1994) Correlation between senescence and DNA repair in cells from young and old individuals and in premature aging syndromes. *Mut. Res.* 316, 37-48.

## 7 Anhang

### 7.1 Ergebnisse der Verlaufsstudie (zum Abschnitt 3.1.2)

<b>Kontrollperson 1</b>								
Datum	MK/1000	MK MW	MK STA	DK/1000	DK MW[%]	DK STA	CO MW[%]	CO STA
4. Mrz.	6,88	6,29	1,13	631,00	68,03	43,66	8,94	3,19
	4,98			696,00				
	7,00			714,00				
8. Apr.	10,00	9,67	0,58	732,00	71,90	14,73	9,55	2,27
	9,00			703,00				
	10,00			722,00				
21. Mai.	11,98	13,63	1,50	395,00	41,90	28,16	14,48	1,90
	14,93			412,00				
	13,97			450,00				
24. Jun.	10,00	8,67	1,15	420,00	41,00	10,00	16,00	2,77
	8,00			400,00				
	8,00			410,00				
31. Jul.	7,00	8,33	1,15	568,00	53,60	31,51	10,63	3,08
	9,00			535,00				
	9,00			505,00				
30. Aug.	8,00	7,33	0,58	603,00	59,93	4,73	12,23	2,45
	7,00			594,00				
	7,00			601,00				
7. Okt.	7,00	7,67	2,08	625,00	60,90	14,00	10,09	2,24
	6,00			603,00				
	10,00			599,00				
28. Okt.	8,00	7,67	1,53	585,00	58,90	14,42	10,10	2,73
	9,00			577,00				
	6,00			605,00				
18. Nov.	8,00	8,00	1,00	623,00	60,87	12,42	9,44	2,39
	7,00			602,00				
	9,00			601,00				
16. Dez.	8,00	9,00	1,00	576,00	57,30	9,85	10,86	2,16
	10,00			562,00				
	9,00			581,00				

Tab.11: Kontrollperson 1: Dargestellt sind Untersuchungstag, Mikrokernrate in drei Präparaten (pro Untersuchungstag), Mikrokernrate-Mittelwert, Mikrokernrate-Standardabweichung, Anteil der doppelkernigen Lymphozyten (DK), DK-Mittelwert, DK-Standardabweichung, relativer DNA-Schaden-Mittelwert (CO MW) und CO-Standardabweichung;

<b>Kontrollperson 2</b>								
Datum	MK/1000	MK MW	MK STA	DK/1000	DK MW[%]	DK STA	CO MW[%]	CO STA
4. Mrz.	13,86	10,27	3,14	605,00	60,53	25,50	9,20	4,66
	8,96			631,00				
	8,00			580,00				
8. Apr.	13,00	11,00	2,00	720,00	75,20	68,83	10,75	2,25
	9,00			831,00				
	11,00			705,00				
21. Mai.	23,88	20,10	3,32	620,00	53,77	71,81	11,27	2,56
	17,63			488,00				
	18,79			505,00				
24. Jun.	13,00	12,33	3,06	600,00	61,10	11,53	13,36	2,95
	15,00			623,00				
	9,00			610,00				
31. Jul.	12,00	10,33	2,08	595,00	60,10	6,00	11,50	1,87
	8,00			607,00				
	11,00			601,00				
30. Aug.	10,00	10,33	1,53	597,00	59,63	14,01	13,97	2,78
	12,00			582,00				
	9,00			610,00				
7. Okt.	8,00	8,33	0,58	605,00	61,97	14,05	11,35	2,53
	8,00			621,00				
	9,00			633,00				
28. Okt.	10,00	8,00	2,00	599,00	59,93	10,50	8,51	3,00
	8,00			610,00				
	6,00			589,00				
18. Nov.	8,00	9,00	1,00	591,00	60,43	14,05	8,47	2,55
	10,00			603,00				
	9,00			619,00				
16. Dez.	7,00	8,67	1,53	617,00	60,07	14,57	10,40	2,15
	9,00			589,00				
	10,00			596,00				

Tab.12: Kontrollperson 2: Dargestellt sind Untersuchungstag, Mikrokernrate in drei Präparaten (pro Untersuchungstag), Mikrokernrate-Mittelwert, Mikrokernrate-Standardabweichung, Anteil der doppelkernigen Lymphozyten (DK), DK-Mittelwert, DK-Standardabweichung, relativer DNA-Schaden-Mittelwert (CO MW) und CO-Standardabweichung;

Proband 1								
Datum	MK/1000	MK MW	MK STA	DK/1000	DK MW[%]	DK STA	CO MW[%]	CO STA
8. Apr.	19,80	21,81	2,74	531,00	53,23	67,01	19,15	3,90
	24,93			466,00				
	20,71			600,00				
21. Mai.	19,80	20,27	1,55	606,00	61,63	12,34	12,59	2,49
	22,00			613,00				
	19,00			630,00				
24. Jun.	22,00	22,33	2,52	530,00	45,67	66,58	14,69	3,20
	20,00			400,00				
	25,00			440,00				
31. Jul.	23,00	22,67	1,53	465,00	46,53	14,50	12,85	2,36
	21,00			480,00				
	24,00			451,00				
30. Aug.	25,00	23,00	2,00	445,00	43,80	6,56	13,02	2,75
	21,00			432,00				
	23,00			437,00				
7. Okt.	25,00	23,33	1,53	455,00	43,07	25,03	15,04	3,09
	23,00			432,00				
	22,00			405,00				
28. Okt.	21,00	23,33	2,52	423,00	41,93	16,80	13,73	2,75
	23,00			401,00				
	26,00			434,00				
18. Nov.	22,00	24,00	2,00	433,00	42,80	16,09	12,75	2,98
	24,00			441,00				
	26,00			410,00				
16. Dez.	21,00	22,00	2,65	457,00	46,93	16,44	12,79	2,82
	20,00			488,00				
	25,00			463,00				

Tab.13: Proband 1: Dargestellt sind Untersuchungstag, Mikrokernrate in drei Präparaten (pro Untersuchungstag), Mikrokernrate-Mittelwert, Mikrokernrate-Standardabweichung, Anteil der doppelkernigen Lymphozyten (DK), DK-Mittelwert, DK-Standardabweichung, relativer DNA-Schaden-Mittelwert (CO MW) und CO-Standardabweichung;

Proband 2								
Datum	MK/1000	MK MW	MK STA	DK/1000	DK MW[%]	DK STA	CO MW[%]	CO STA
25. Feb.	34,83	31,60	4,09	605,00	64,80	38,43	17,83	4,28
	32,97			679,00				
	27,00			660,00				
1. Apr.	28,56	27,52	2,19	600,00	62,43	25,03	17,41	3,79
	25,00			623,00				
	29,00			650,00				
5. Mai.	30,94	33,98	3,03	456,00	51,10	49,51	20,07	3,46
	37,00			552,00				
	34,00			525,00				
10. Jun.	28,00	28,00	2,00	560,00	52,37	34,65	12,68	3,12
	26,00			491,00				
	30,00			520,00				
15. Jul.	27,00	27,33	2,52	642,00	62,60	16,00	16,02	3,13
	30,00			626,00				
	25,00			610,00				
5. Aug.	18,00	21,67	3,21	627,00	61,80	10,15	11,49	3,06
	24,00			620,00				
	23,00			607,00				
2. Sep.	21,00	19,67	1,53	605,00	60,63	4,16	13,07	2,18
	20,00			611,00				
	18,00			603,00				
23. Sep.	20,00	22,00	2,00	590,00	58,93	8,02	12,65	2,61
	24,00			597,00				
	22,00			581,00				

Tab.14: Proband 2: Dargestellt sind Untersuchungstag, Mikrokernrate in drei Präparaten (pro Untersuchungstag), Mikrokernrate-Mittelwert, Mikrokernrate-Standardabweichung, Anteil der doppelkernigen Lymphozyten (DK), DK-Mittelwert, DK-Standardabweichung, relativer DNA-Schaden-Mittelwert (CO MW) und CO-Standardabweichung;

Proband 3								
Datum	MK/1000	MK MW	MK STA	DK/1000	DK MW[%]	DK STA	CO MW[%]	CO STA
5. Aug.	21,00	21,00	2,00	566,00	58,90	22,07	13,97	2,22
	19,00			591,00				
	23,00			610,00				
30. Aug.	20,00	21,33	1,53	533,00	55,30	24,98	13,55	2,69
	23,00			545,00				
	21,00			581,00				
10. Sep.	18,00	20,00	2,00	603,00	60,47	4,73	12,49	2,40
	22,00			601,00				
	20,00			610,00				
23. Sep.	20,00	21,00	2,65	575,00	56,30	10,82	12,90	2,28
	24,00			560,00				
	19,00			554,00				
28. Okt.	23,00	20,67	2,52	555,00	55,47	12,50	9,64	1,78
	18,00			542,00				
	21,00			567,00				
18. Nov.	19,00	19,33	0,58	541,00	54,23	18,04	10,48	1,97
	19,00			525,00				
	20,00			561,00				
16. Dez.	18,00	18,00	2,00	577,00	59,00	14,73	11,15	2,12
	16,00			587,00				
	20,00			606,00				

Tab.15: Proband 3: Dargestellt sind Untersuchungstag, Mikrokernrate in drei Präparaten (pro Untersuchungstag), Mikrokernrate-Mittelwert, Mikrokernrate-Standardabweichung, Anteil der doppelkernigen Lymphozyten (DK), DK-Mittelwert, DK-Standardabweichung, relativer DNA-Schaden-Mittelwert (CO MW) und CO-Standardabweichung;



Proband 4								
Datum	MK/1000	MK MW	MK STA	DK/1000	DK MW[%]	DK STA	CO MW[%]	CO STA
5. Aug.	22,00	21,67	2,52	585,00	58,20	9,85	15,76	3,15
	24,00			571,00				
	19,00			590,00				
30. Aug.	24,00	22,00	2,00	555,00	55,33	10,60	14,14	2,54
	20,00			542,00				
	22,00			563,00				
10. Sep.	23,00	20,67	2,52	590,00	58,07	13,65	13,16	2,39
	21,00			565,00				
	18,00			587,00				
23. Sep.	22,00	21,67	0,58	585,00	59,60	9,54	13,88	2,77
	21,00			601,00				
	22,00			602,00				
28. Okt.	22,00	20,33	1,53	595,00	60,53	11,68	12,87	2,75
	19,00			603,00				
	20,00			618,00				
18. Nov.	21,00	19,00	2,65	582,00	59,23	10,02	12,40	2,75
	16,00			593,00				
	20,00			602,00				
16. Dez.	18,00	17,67	0,58	572,00	57,97	16,86	11,42	2,58
	17,00			568,00				
	18,00			599,00				

Tab.16: Proband 4: Dargestellt sind Untersuchungstag, Mikrokernrate in drei Präparaten (pro Untersuchungstag), Mikrokernrate-Mittelwert, Mikrokernrate-Standardabweichung, Anteil der doppelkernigen Lymphozyten (DK), DK-Mittelwert, DK-Standardabweichung, relativer DNA-Schaden-Mittelwert (CO MW) und CO-Standardabweichung;

Proband 5								
Datum	MK/1000	MK MW	MK STA	DK/1000	DK MW[%]	DK STA	CO MW[%]	CO STA
25. Feb.	22,00	24,00	3,46	493,00	42,63	62,15	17,94	4,31
	28,00			416,00				
	22,00			370,00				
1. Apr.	22,00	23,33	1,53	405,00	43,00	22,91	15,39	3,97
	25,00			435,00				
	23,00			450,00				
5. Mai.	26,00	22,00	4,00	423,00	46,27	47,29	17,02	3,52
	18,00			450,00				
	22,00			515,00				
10. Jun.	18,00	20,33	2,08	400,00	41,20	16,64	14,55	3,17
	22,00			431,00				
	21,00			405,00				
15. Jul.	17,00	17,00	2,00	380,00	38,53	17,62	14,48	2,92
	15,00			405,00				
	19,00			371,00				
5. Aug.	18,00	16,33	1,53	395,00	40,53	10,50	12,97	2,68
	15,00			405,00				
	16,00			416,00				
2. Sep.	17,00	16,33	1,15	403,00	39,67	14,57	13,78	2,40
	15,00			407,00				
	17,00			380,00				
23. Sep.	18,00	17,67	2,52	395,00	38,30	12,53	12,75	2,59
	20,00			370,00				
	15,00			384,00				

Tab.17: Proband 5: Dargestellt sind Untersuchungstag, Mikrokernrate in drei Präparaten (pro Untersuchungstag), Mikrokernrate-Mittelwert, Mikrokernrate-Standardabweichung, Anteil der doppelkernigen Lymphozyten (DK), DK-Mittelwert, DK-Standardabweichung, relativer DNA-Schaden-Mittelwert (CO MW) und CO-Standardabweichung;

Proband 6								
Datum	MK/1000	MK MW	MK STA	DK/1000	DK MW[%]	DK STA	CO MW[%]	CO STA
8. Apr.	31,00	31,00	2,00	443,00	49,90	52,85	10,61	2,54
	33,00			548,00				
	29,00			506,00				
21. Mai.	22,82	17,93	4,27	606,00	61,63	12,34	14,27	2,62
	16,00			613,00				
	14,97			630,00				
24. Jun.	23,00	21,00	2,00	515,00	50,27	12,50	15,60	3,65
	19,00			490,00				
	21,00			503,00				
31. Jul.	18,00	21,67	3,51	500,00	50,23	13,65	11,91	2,30
	22,00			490,00				
	25,00			517,00				
30. Aug.	24,00	21,67	2,08	510,00	51,30	7,00	13,12	3,01
	21,00			508,00				
	20,00			521,00				
7. Okt.	22,00	21,33	1,15	525,00	51,17	14,05	13,65	2,11
	20,00			513,00				
	22,00			497,00				
28. Okt.	20,00	22,00	2,00	513,00	49,47	16,50	12,49	2,78
	22,00			490,00				
	24,00			481,00				
18. Nov.	19,00	22,00	2,65	497,00	49,37	10,41	10,50	2,81
	24,00			482,00				
	23,00			502,00				
16. Dez.	22,00	21,67	0,58	479,00	50,40	22,34	13,19	2,19
	21,00			522,00				
	22,00			511,00				

Tab.18: Proband 6: Dargestellt sind Untersuchungstag, Mikrokernrate in drei Präparaten (pro Untersuchungstag), Mikrokernrate-Mittelwert, Mikrokernrate-Standardabweichung, Anteil der doppelkernigen Lymphozyten (DK), DK-Mittelwert, DK-Standardabweichung, relativer DNA-Schaden-Mittelwert (CO MW) und CO-Standardabweichung;

Proband 7								
Datum	MK/1000	MK MW	MK STA	DK/1000	DK MW[%]	DK STA	CO MW[%]	CO STA
25. Feb.	16,95	16,89	2,15	561,00	57,47	58,71	17,29	3,66
	14,71			639,00				
	19,00			524,00				
1. Apr.	14,00	17,00	2,65	290,00	36,50	65,18	15,21	4,80
	19,00			397,00				
	18,00			408,00				
5. Mai.	26,00	22,33	3,21	454,00	45,80	30,20	20,38	3,29
	20,00			490,00				
	21,00			430,00				
10. Jun.	21,00	21,33	2,52	405,00	40,20	20,66	18,24	3,36
	24,00			380,00				
	19,00			421,00				
15. Jul.	22,00	20,00	2,65	544,00	56,57	22,01	14,11	2,47
	21,00			588,00				
	17,00			565,00				
5. Aug.	14,00	15,33	2,31	415,00	41,67	9,61	12,90	2,53
	14,00			427,00				
	18,00			408,00				
2. Sep.	16,00	14,67	1,53	430,00	41,90	9,64	13,11	2,13
	15,00			412,00				
	13,00			415,00				
23. Sep.	17,00	15,67	1,15	403,00	40,60	12,77	13,94	2,77
	15,00			395,00				
	15,00			420,00				

Tab.19: Proband 7: Dargestellt sind Untersuchungstag, Mikrokernrate in drei Präparaten (pro Untersuchungstag), Mikrokernrate-Mittelwert, Mikrokernrate-Standardabweichung, Anteil der doppelkernigen Lymphozyten (DK), DK-Mittelwert, DK-Standardabweichung, relativer DNA-Schaden-Mittelwert (CO MW) und CO-Standardabweichung;

Proband 8								
Datum	MK/1000	MK MW	MK STA	DK/1000	DK MW[%]	DK STA	CO MW[%]	CO STA
25. Feb.	36,95	34,32	3,03	490,00	52,60	39,96	17,64	3,96
	35,00			519,00				
	31,00			569,00				
1. Apr.	32,00	28,00	3,46	486,00	49,30	25,24	11,06	4,06
	26,00			521,00				
	26,00			472,00				
5. Mai.	29,00	29,67	2,08	408,00	41,60	30,79	17,57	3,21
	28,00			390,00				
	32,00			450,00				
10. Jun.	33,00	29,00	3,61	410,00	38,50	27,84	15,52	3,43
	26,00			355,00				
	28,00			390,00				
15. Jul.	29,00	31,00	2,00	553,00	55,70	8,72	16,59	3,17
	33,00			551,00				
	31,00			567,00				
5. Aug.	21,00	24,33	3,06	560,00	54,73	12,50	12,73	2,49
	25,00			535,00				
	27,00			547,00				
2. Sep.	22,00	24,00	2,00	520,00	52,87	14,15	13,60	2,23
	26,00			545,00				
	24,00			521,00				
23. Sep.	21,00	23,00	2,00	545,00	53,90	14,93	13,56	2,19
	25,00			522,00				
	23,00			550,00				

Tab.20: Proband 8: Dargestellt sind Untersuchungstag, Mikrokernrate in drei Präparaten (pro Untersuchungstag), Mikrokernrate-Mittelwert, Mikrokernrate-Standardabweichung, Anteil der doppelkernigen Lymphozyten (DK), DK-Mittelwert, DK-Standardabweichung, relativer DNA-Schaden-Mittelwert (CO MW) und CO-Standardabweichung;

**T-Test der Gruppe 1 (Test bei unabhängigen Stichproben)**

	Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit						
	F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)	Mit-Differenz	Standardfehler der Differenz	95% Konfidenzintervall der Differenz	
								Untere	Oberer
MR-Patient Varianzen sind gleich Varianzen sind nicht gleich	,625	,473	1,662	4	,172	1,4433	,8683	-,9675	3,8541
MR-Patient Varianzen sind gleich Varianzen sind nicht gleich	,612	,478	2,826	4	,048	2,4467	,8657	-1,3180	4,2047
MR-Patient Varianzen sind gleich Varianzen sind nicht gleich	5,855	,073	2,826	3,010	,066	2,4467	,8657	-,3032	5,1965
			3,563	4	,024	6,8867	1,9326	1,5208	12,2525
			3,563	2,179	,062	6,8867	1,9326	-,8088	14,5821

	Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit						
	F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)	Mit-Differenz	Standardfehler der Differenz	95% Konfidenzintervall der Differenz	
								Untere	Oberer
rDNA-S-Patient Varianzen sind gleich Varianzen sind nicht gleich	,020	,894	4,697	4	,009	2,9133	,6203	1,1912	4,6355
rDNA-S-Patient Varianzen sind gleich Varianzen sind nicht gleich	,922	,391	4,697	4,000	,009	2,9133	,6203	1,1912	4,6355
rDNA-S-Patient Varianzen sind gleich Varianzen sind nicht gleich	11,901	,026	2,440	4	,071	2,1233	,8701	-,2926	4,5392
			2,440	3,154	,088	2,1233	,8701	-,5711	4,8178
			,967	4	,388	2,1267	2,2001	-3,9818	8,2352
			,967	2,068	,433	2,1267	2,2001	-7,0494	11,3027

Tab. 21 : T-Test (MK und rDNA-S) der Gruppe 1 (MR =Mikroemrate; rDNA-S = relativer DNA-Schaden);

**T-Test der Gruppe 2 (Test bei unabhängigen Stichproben)**

	Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit						
	F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)	Mit-Differenz	Standardfehler der Differenz	95% Konfidenzintervall der Differenz	
								Untere	Oberer
MR-Patient	2,160	,216	4,906	4	,008	9,9200	2,0218	4,3065	15,5335
Varianzen sind gleich Varianzen sind nicht gleich			4,906	2,583	,023	9,9200	2,0218	2,8557	16,9843
MR-Patient	,222	,662	8,579	4	,001	6,3333	,7382	4,2838	8,3829
Varianzen sind gleich Varianzen sind nicht gleich			8,579	3,732	,001	6,3333	,7382	4,2245	8,4422
MR-Patient	10,867	,030	1,933	4	,125	3,5167	1,8191	-1,5340	8,5674
Varianzen sind gleich Varianzen sind nicht gleich			1,933	2,107	,186	3,5167	1,8191	-3,9420	10,9753

	Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit						
	F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)	Mit-Differenz	Standardfehler der Differenz	95% Konfidenzintervall der Differenz	
								Untere	Oberer
rDNA-S-Patient 2	1,819	,249	6,342	4	,003	6,0333	,9513	3,3922	8,6744
Varianzen sind nicht gleich Varianzen sind nicht gleich			6,342	3,183	,007	6,0333	,9513	3,1022	8,9645
rDNA-S-Patient 5	1,946	,235	4,472	4	,011	3,6167	,8087	1,3714	5,8619
Varianzen sind gleich Varianzen sind nicht gleich			4,472	2,684	,026	3,6167	,8087	,8632	6,3701
rDNA-S-Patient 7	3,443	,137	2,808	4	,048	4,3100	1,5351		8,5721
Varianzen sind nicht gleich Varianzen sind nicht gleich			2,808	2,178	,097	4,3100	1,5351	-1,8028	10,4228

Tab. 22 : T-Test (MK und rDNA-S) der Gruppe 2 (MR =Mikroemrate; rDNA-S = relativer DNA-Schaden);

**T-Test der Gruppe 3 (Test bei unabhängigen Stichproben)**

	Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit						
	F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)	Mit-Differenz	Standardfehler der Differenz	95% Konfidenzintervall der Differenz	
								Unten	Obere
MR-Patient Varianzen sind gleich Varianzen sind nicht gleich	,027	,878	-1,922 -1,922	4 3,990	,127 ,127	-1,6400 -1,6400	,8532 ,8532	-4,0089 -4,0113	,7289 ,7313
MR-Patient Varianzen sind gleich Varianzen sind nicht gleich	10,208	,033	,360 ,360	4 2,003	,737 ,753	1,4200 1,4200	3,9473 3,9473	-9,5396 -15,5388	12,3796 18,3788

	Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit						
	F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)	Mit-Differenz	Standardfehler der Differenz	95% Konfidenzintervall der Differenz	
								Unten	Obere
rDNA-S-Patient Varianzen sind gleich Varianzen sind nicht gleich	5,425	,080	1,217 1,217	4 2,110	,290 ,342	2,3867 2,3867	1,9605 1,9605	-3,0564 -5,6423	7,8298 10,4156
rDNA-S-Patient Varianzen sind gleich Varianzen sind nicht gleich	1,599	,275	,845 ,845	4 3,075	,446 ,459	1,4333 1,4333	1,6956 1,6956	-3,2744 -3,8889	6,1411 6,7555

Tab. 23 : T-Test (MK und rDNA-S) der Gruppe 3 (MR =Mikrokernrate; rDNA-S = relativer DNA-Schaden);



## 7.2 Patientendaten – Verlaufsstudie

<b>Patient :</b> 1	<b>Geschl.:</b> M	<b>Geb.:</b> Mär 1947	<b>Status :</b> Prädialyse
<b>Nephrologische Grunddiagnose :</b> präterm. Niereninsuffizienz bei polyzystischer Nierendegeneration			
<b>Sekundärkomplikationen :</b> arterielle Hypertonie, renale Anämie, Hyperlipidämie;			
<b>Weitere Diagnosen :</b>			
<b>Medikation :</b>			

Tab. 24: Patientendaten – Verlaufsstudie : Proband 1;

<b>Patient :</b> 2	<b>Geschl.:</b> W	<b>Geb.:</b> Okt 1951	<b>Dialyse seit :</b> Feb 01
<b>Dialyseart :</b> Hämodialyse-Bicarbonat			
<b>Filter :</b> Kap Hemoflow-F-6-HPS (ED-Spezial)			
<b>Hersteller :</b> Fresenius	<b>Oberfläche :</b>	1,3	
<b>Membran :</b> Polysulfon	<b>UF-Rate :</b>	8,5	
<b>Nephrologische Grunddiagnose :</b> Dialysepflichtige Niereninsuffizienz bei polyzystischer Nierendegeneration;			
<b>Medikation :</b> Unat 200, Bocatriol 0,25 mcg, Vitarenal, Calciumacetat Nefro 500 mg, <u>Lorzaar 12,5 mg Start (seit Juni 02):</u>			
<b>Medikation während der Dialyse :</b> Erypo FS 2000, Ferrlecit 3,2 ml;			

Tab. 25: Patientendaten – Verlaufsstudie : Proband 2;

<b>Patient :</b>	3	<b>Geschl.:</b>	W	<b>Geb.:</b>	Sep 1945	<b>Dialyse seit :</b>	Mai 96
<b>Dialyseart :</b>	Hämodiafiltration - Bicarbonat (seit September 02, davor HD-B)						
<b>Filter :</b>	Kap FX-60						
<b>Hersteller :</b>	Fresenius	<b>Oberfläche :</b>	1,4				
<b>Membran :</b>	Polysulfon	<b>UF-Rate :</b>	46,00				
<b>Nephrologische Grunddiagnose :</b>	Dialysepflichtige Niereninsuffizienz bei polyzystischer Nierendegeneration mit Leberzysten;						
<b>Sekundärkomplikationen :</b>	arterielle Hypertonie, renale Anämie, Z.n. totaler Parathyreoidektomie und Autotransplantation (re UA) wegen sek. Hyperparathyreoidismus, Polyneuropathie, Hyperlipidämie;						
<b>Weitere Diagnosen :</b>	Z.n. HP-pos. Gastritis 3/98 (Eradikationstherapie), axiale Magengleithernie u. Refluxösophagitis, Z.n. tu Blasen-TU-Resektion 6/96 bei Plattenepithel-metaplasie, Strumaresektion 83 wegen hyperthyreoter Struma, Z.n. Colonteilresektion 11/00 bei Adeno-CA (T1N0M0), Polypektomie 11/01;						
<b>Medikation :</b>	Aspirin prot. 100, Aquaphor 10, Omeprazol 20, Calciumacetat Nefro 500 mg, L Thyroxin 75, Sortis 20 mg, Norvasc 5 mg, Carenal;						
<b>Medikation während der Dialyse :</b>	Erypo FS 4000, Ferrlecit 3,2 ml;						

Tab. 26: Patientendaten – Verlaufsstudie : Proband 3;

<b>Patient :</b>	4	<b>Geschl.:</b>	W	<b>Geb.:</b>	Jun 1932	<b>Dialyse seit :</b>	Okt 89
<b>Dialyseart :</b>	Hämodiafiltration - Bicarbonat (seit September 02, davor HD-B)						
<b>Filter :</b>	Kap FX-60						
<b>Hersteller :</b>	Fresenius	<b>Oberfläche :</b>	1,4				
<b>Membran :</b>	Polysulfon	<b>UF-Rate :</b>	46,00				
<b>Nephrologische Grunddiagnose :</b>	Dialysepflichtige Niereninsuffizienz bei polyzystischer Nierendegeneration						
<b>Sekundärkomplikationen :</b>	sek. Hyperparathyreoidismus, per. Polyneuropathie, Hypothyreose;						
<b>Weitere Diagnosen :</b>	Strumaresektion 54, Z.n. Lungen-Tb 77, Periarthropathia humeroscapularis bds, Spontanfraktur Os metatarsale II re 5/96, Radiusköpfchenfraktur re 3/00;						
<b>Medikation :</b>	Calciumcarbonat 0,5 g, Bondiol 1 mcg, Restex, Natriumhydrogencarbonat 1 g, L Thyroxin 50, Vitarenal, Ticlopidin, Beloc zok mite;						
<b>Medikation während der Dialyse :</b>	Ferrelecit 3,2 ml;						

Tab. 27: Patientendaten – Verlaufsstudie : Proband 4;

<b>Patient :</b>	5	<b>Geschl.:</b>	M	<b>Geb.:</b>	Nov 1926	<b>Dialyse seit :</b>	Jul 01
<b>Dialyseart :</b>	Hämodialyse-Bicarbonat						
<b>Filter :</b>	Kap Polyflux-14-L (ED-Spezial)						
<b>Hersteller :</b>	Gambro	<b>Oberfläche :</b>	1,3				
<b>Membran :</b>	Polyamid	<b>UF-Rate :</b>	9,50				
<b>Nephrologische Grunddiagnose :</b>	Dialysepflichtige Niereninsuffizienz bei membranöser GN mit nephrotischem Syndrom;						
<b>Sekundärkomplikationen :</b>	arterielle Hypertonie, renale Anämie, sek. Hyperparathyreoidismus, Hyperlipidämie; Z.n. Steroidtherapie 10/97, Z.n. Cyclophosphamid-Dauerth. 9-10/98, Z.n. CsA-Therapie 12/98-12/99;						
<b>Weitere Diagnosen :</b>	passagerer steroid-induzierter D.m. Typ II, kompl. Rechtsschenkelblock, Z.n. Carpaltunneldekompression li. 3/02;						
<b>Medikation :</b>	Norvasc 5 mg, Omeprazol 20, Vitarenal, Calciumacetat Nefro 500 mg, Cynt 0,4, Natriumhydrogencarbonat 1 g, <u>Atacand 8 mg (seit Juni 02)</u> ;						
<b>Medikation während der Dialyse:</b>	Erypo FS 2000, Ferrlecit 3,2 ml, Dekristol 2000 I.E.;						

Tab. 28: Patientendaten – Verlaufsstudie : Proband 5;

<b>Patient :</b>	6	<b>Geschl.:</b>	M	<b>Geb.:</b>	Aug 1964	<b>Status :</b>	Prädialyse
<b>Nephrologische Grunddiagnose :</b>	präterm. Niereninsuffizienz bei polyzystischer Nierendegeneration						
<b>Sekundärkomplikationen :</b>	renale Anämie, sek. Hyperparathyreoidismus;						
<b>Weitere Diagnosen :</b>	Fak. V-Leiden, Z.n. linkscerebralem Insult 98;						
<b>Medikation :</b>							

Tab. 29: Patientendaten – Verlaufsstudie : Proband 6;

<b>Patient :</b>	7	<b>Geschl.:</b>	M	<b>Geb.:</b>	Jan 1940	<b>Dialyse seit :</b>	Jun 98
<b>Dialyseart :</b>	Hämodialyse-Bicarbonat						
<b>Filter :</b>	Kap Polyflux-17-L (High-Flux)						
<b>Hersteller :</b>	Gambro	<b>Oberfläche :</b>	1,7				
<b>Membran :</b>	Polyamid	<b>UF-Rate :</b>	12,50				
<b>Nephrologische Grunddiagnose :</b>	Dialysepflichtige Niereninsuffizienz bei mesangial-proliferativer GN;						
<b>Sekundärkomplikationen :</b>	arterielle Hypertonie, renale Anämie, Hyperlipidämie;						
<b>Weitere Diagnosen :</b>	subakuter Lateralinfarkt 2/97, PTCA einer prox. RIVA-Stenose 3/97, Z.n. Milzexstirpation u. Amputation Dig. II bis V re. Fuß nach Verkehrsunfall,						
<b>Medikation :</b>	Unat 200, Vitarenal, Calciumacetat Nefro 500 mg, Beloc Zok, Ferrlecit 3,2 ml, <u>Lorzaar 50 mg (seit Juni 02)</u> , Dekristol 2t I.E., Sortis 20 mg, Rani 150, ASS;						
<b>Medikation während der Dialyse:</b>	Erypo FS 2000, Ferrlecit 3,2 ml;						

Tab. 30: Patientendaten – Verlaufsstudie : Proband 7;

<b>Patient :</b>	8	<b>Geschl.:</b>	M	<b>Geb.:</b>	Feb 1920	<b>Dialyse seit :</b>	Nov 84
<b>Dialyseart :</b>	Hämodiafiltration - Bicarbonat (seit September 02, davor HD-B)						
<b>Filter :</b>	Kap Hemoflow-F-60-S (High-Flux)						
<b>Hersteller :</b>	Fresenius	<b>Oberfläche :</b>	1,3				
<b>Membran :</b>	Polysulfon	<b>UF-Rate :</b>	40,00				
<b>Nephrologische Grunddiagnose :</b>	Dialysepflichtige Niereninsuffizienz bei chron. Pyelonephritis bei vesikourethralem Reflux li.;						
<b>Sekundärkomplikationen :</b>	arterielle Hypertonie, renale Anämie, Hyperlipidämie, sek. Hyperparathyreoidismus;						
<b>Weitere Diagnosen :</b>	Orchiektomie bds. Bei Prostata-Ca re. Seitenlappen 1/87, TUR eines hochdiff. Urothel-Ca der Harnblase 10/91, Mitralklappenprolaps, HWS-Syndr., Medianusdekompres. li. bei CTS 6/96, dist. Radiusfraktur bds. nach Sturz 6/97, Radiusfraktur li. u. Fraktur des 5. Fingers re. nach Sturz bei Vertigo 9/97;						
<b>Medikation :</b>	Bondiol 0,25 mcg, Vitarenal, Calciumacetat Nefro 500 mg, Aspirin prot. 100, Sklerofibrat, Bromaz 6, Lefaxin, Diclo 50, Zostex;						
<b>Medikation während der Dialyse:</b>	Aranesp 10 µg, Ferrlecit 3,2 ml;						

Tab. 31: Patientendaten – Verlaufsstudie : Proband 8;

## 7.3 Patientendaten - Lz-HDF- und HD- Gruppe

### 7.3.1 Lz-HDF-Gruppe

<b>Patient :</b>	1	<b>Geschl.:</b>	M	<b>Geb.:</b>	Aug 1938	<b>Dialyse seit :</b>	Mär 98
<b>Dialyseart :</b>	Hämodiafiltration – Bicarbonat						
<b>Filter :</b>	Kap Polyflux-14-S (High-Flux)						
<b>Hersteller :</b>	Gambro	<b>Oberfläche :</b>	1,4				
<b>Membran :</b>	Polyamid	<b>UF-Rate :</b>	62,00				
<b>Nephrologische Grunddiagnose :</b>	Dialysepflichtige Niereninsuffizienz bei chron. Glomerulonephritis;						
<b>Sekundärkomplikationen :</b>	arterielle Hypertonie, renale Anämie, sek. Hyperparathyreoidismus, renale Osteopathie;						
<b>Weitere Diagnosen :</b>	KHK mit HI 97 u. 98 mit RCA-Stent u. PTCA/2 x Stent, eingeschr. LV-Fkt., Sick-Sinus-Syndr. mit Schrittmacher-Impl. 3/98, supravent. Tachykardie, pAVK mit Stent A. fem. bds., Carotis TEA 90, Hypercholesterinämie, Sruma diffusa (Grad II);						
<b>Medikation :</b>	Dreisavit N, ASS 100, Molsidomin 8, LT 50, Metoprolol 50, Isoket 40, Zocor 5mg, Calc.carb. 0,5mg, Einsalpha 0,25mg;						
<b>Medikation während der Dialyse:</b>	Aranesp 20 µg, Cytobion 1000;						

Tab. 32: Patientendaten - Lz-HDF-Gruppe: Patient 1;

<b>Patient :</b>	2	<b>Geschl.:</b>	M	<b>Geb.:</b>	Jul 1930	<b>Dialyse seit :</b>	Nov 97
<b>Dialyseart :</b>	Hämodiafiltration – Bicarbonat						
<b>Filter :</b>	Kap FX-60 (High-Flux)						
<b>Hersteller :</b>	Fresenius	<b>Oberfläche :</b>	1,4				
<b>Membran :</b>	Polysulfon	<b>UF-Rate :</b>	46,00				
<b>Nephrologische Grunddiagnose :</b>	Dialysepflichtige Niereninsuffizienz bei Nephrosklerose bzw. diabet. Nephropathie;						
<b>Sekundärkomplikationen :</b>	arterielle Hypertonie, renale Anämie, sek. Hyperparathyreoidismus;						
<b>Weitere Diagnosen :</b>	Diabetes m. IIb, KHK Typ R/D 3, AAR bei VHF, Hyperuricämie, Hyperlipidämie, Sensomoto. Ployneuropathie, Restless-legs-Syndr.;						
<b>Medikation :</b>	ISDN 40, Vitarenal, Marcumar, Restex, Bondiol 0,25 mg, Calc.acetat 500, Renagel 800 mg;						
<b>Medikation während der Dialyse:</b>	Aranesp 30 µg, Cytobion 1000, Polybion N, Ferrlecit 3,2 ml;						

Tab. 33: Patientendaten - Lz-HDF-Gruppe: Patient 2;



<b>Patient :</b>	3	<b>Geschl.:</b>	W	<b>Geb.:</b>	Sep 1934	<b>Dialyse seit :</b>	Apr 00
<b>Dialyseart :</b>	Hämodiafiltration – Bicarbonat						
<b>Filter :</b>	Kap Polyflux-14-S (High-Flux)						
<b>Hersteller :</b>	Gambro	<b>Oberfläche :</b>	1,4				
<b>Membran :</b>	Polyamid	<b>UF-Rate :</b>	62,00				
<b>Nephrologische Grunddiagnose :</b>	Dialysepflichtige Niereninsuffizienz bei V.a. Analgetika-Nephropathie;						
<b>Sekundärkomplikationen :</b>	arterielle Hypertonie, renale Anämie, sek. Hyperparathyreoidismus, renale Osteopathie;						
<b>Weitere Diagnosen :</b>	Struma nodosa mit Resektion 94 bei Hyperthyreose, Hypercholesterinämie, Coxarthrose bds., Hysterektomie 76, US-Varikosis re.;						
<b>Medikation :</b>	Sortis 10, Vitarenal, Estraderm TTS 25, Mg 500, Calc.acet., Metoprolol 50, LT4 50, EinsAlpha 0,5 mg, Ginkobil N;						
<b>Medikation während der Dialyse:</b>	Aranesp 10 µg, Cytobion 1000, Ferrlecit 3,2 ml;						

Tab.34: Patientendaten - LZ-HDF-Gruppe: Patient 3;

<b>Patient :</b>	4	<b>Geschl.:</b>	M	<b>Geb.:</b>	Nov 1937	<b>Dialyse seit :</b>	Apr 95
<b>Dialyseart :</b>	Hämodiafiltration – Bicarbonat						
<b>Filter :</b>	Kap Polyflux-14-S (High-Flux)						
<b>Hersteller :</b>	Gambro	<b>Oberfläche :</b>	1,4				
<b>Membran :</b>	Polyamid	<b>UF-Rate :</b>	62,00				
<b>Nephrologische Grunddiagnose :</b>	Dialysepflichtige Niereninsuffizienz bei V.a. chron. GN;						
<b>Sekundärkomplikationen :</b>	arterielle Hypertonie, renale Anämie, sek. Hyperparathyreoidismus, renale Osteopathie;						
<b>Weitere Diagnosen :</b>	urämische PNP mit Restless-legs-Syndr., NTX 92 – Expl. 95 bei membr. GN, pAVK IIa, TEP li. 93, COLD, Angiodysplasie d. Colon;						
<b>Medikation :</b>	Plavix, Vitarenal, Zocor 20, Metoprolol 50, Nacom 100, Calci Gry, Anti Phosphat;						
<b>Medikation während der Dialyse:</b>	Aranesp 60 µg, Cytobion 1000, Liponsre. 600;						

Tab. 35: Patientendaten - Lz-HDF-Gruppe: Patient 4;

<b>Patient :</b>	5	<b>Geschl.:</b>	W	<b>Geb.:</b>	Dez 1959	<b>Dialyse seit :</b>	Okt 88
<b>Dialyseart :</b>	Hämodiafiltration – Bicarbonat						
<b>Filter :</b>	Kap FX-60 (High-Flux)						
<b>Hersteller :</b>	Fresenius	<b>Oberfläche :</b>	1,4				
<b>Membran :</b>	Polysulfon	<b>UF-Rate :</b>	46,00				
<b>Nephrologische Grunddiagnose :</b>	Dialysepflichtige Niereninsuffizienz bei V.a. chron. GN;						
<b>Sekundärkomplikationen :</b>	arterielle Hypertonie, renale Anämie, sek. Hyperparathyreoidismus;						
<b>Weitere Diagnosen :</b>	NTX 92 – Expl. 96;						
<b>Medikation :</b>	Calc.carb., Decostriol 0,25, Vitarenal, Ena Puren 10, Metohaxal 50, Norvasc 10 mg, Renagel 800 mg;						
<b>Medikation während der Dialyse:</b>	Aranesp 10 µg, Cytobion 1000, Polybion N, Ferrlecit 3,2 ml;						

Tab. 36: Patientendaten - Lz-HDF-Gruppe: Patient 5;

<b>Patient :</b>	6	<b>Geschl.:</b>	M	<b>Geb.:</b>	Dez 1961	<b>Dialyse seit :</b>	Mai 01
<b>Dialyseart :</b>	Hämodiafiltration – Bicarbonat						
<b>Filter :</b>	Kap Polyflux-14-S (High-Flux)						
<b>Hersteller :</b>	Gambro	<b>Oberfläche :</b>	1,4				
<b>Membran :</b>	Polyamid	<b>UF-Rate :</b>	62,00				
<b>Nephrologische Grunddiagnose :</b>	Dialysepflichtige Niereninsuffizienz bei V.a. chron. GN;						
<b>Sekundärkomplikationen :</b>	arterielle Hypertonie, renale Anämie, tert. Hyperparathyreoidismus mit Parathyreoidektomie;						
<b>Weitere Diagnosen :</b>	NTX 91 – Expl. 01, Hypakusis bds., ob. GI-Blutung bei Ulcus ventr., Psoriasis vulg. mit multipl Furunkeln, Hyperlipidämie, multipl. aktinische Keratosen mit Basaliom d. Kopfhaut 04/01, Strumektomie 12/01;						
<b>Medikation :</b>	Urbason 4, Sortis 10, Lasix 40, Tavegil, Thyronajod 50, Calc.acet. 500 mg, EinsAlpha 0,5 mg;						
<b>Medikation während der Dialyse:</b>	Aranesp 30 µg, Cytobion 1000, Ferrlecit 3,2 ml;						

Tab. 37: Patientendaten - Lz-HDF-Gruppe: Patient 6;

<b>Patient :</b>	7	<b>Geschl.:</b>	M	<b>Geb.:</b>	Mai 1954	<b>Dialyse seit :</b>	Sep 89
<b>Dialyseart :</b>	Hämodiafiltration – Bicarbonat						
<b>Filter :</b>	Kap Polyflux-14-S (High-Flux)						
<b>Hersteller :</b>	Gambro	<b>Oberfläche :</b>	1,4				
<b>Membran :</b>	Polyamid	<b>UF-Rate :</b>	62,00				
<b>Nephrologische Grunddiagnose :</b>	Dialysepflichtige Niereninsuffizienz bei ADPKD;						
<b>Sekundärkomplikationen :</b>	arterielle Hypertonie, renale Anämie, sek. Hyperparathyreoidismus;						
<b>Weitere Diagnosen :</b>	Nephrektomie re. 10/01, V.a. Restless-legs-Syndr. 2/02, rez. HWI, V.a. gastroösoph. Reflux, Splenomegalie, TE 1/01, Herniotomie 7/01;						
<b>Medikation :</b>	Dreisavit N, Fosinorm 10, Furosemid 500, Nephrotrans, Bondiol 0,25, Restex, Norvasc 5 mg, Renagel 800 mg, Omeprazol, Tilidin plus;						
<b>Medikation während der Dialyse:</b>	NeoRecormon 1t u. 2t, EinsAlpha 1 ml, Cytobion 1000, Ferrlecit 3,2 ml;						

Tab. 38: Patientendaten - Lz-HDF-Gruppe: Patient 7;

<b>Patient :</b>	8	<b>Geschl.:</b>	W	<b>Geb.:</b>	Sep 1965	<b>Dialyse seit :</b>	Apr 93
<b>Dialyseart :</b>	Hämodiafiltration – Bicarbonat						
<b>Filter :</b>	Kap FX-60 (High-Flux)						
<b>Hersteller :</b>	Fresenius	<b>Oberfläche :</b>	1,4				
<b>Membran :</b>	Polysulfon	<b>UF-Rate :</b>	46,00				
<b>Nephrologische Grunddiagnose :</b>	Dialysepflichtige Niereninsuffizienz bei V.a. chron. GN; 2x NTX 83/85 – Expl. 93;						
<b>Sekundärkomplikationen :</b>	arterielle Hypertonie, renale Anämie, sek. Hyperparathyreoidismus;						
<b>Weitere Diagnosen :</b>	Aorteninsuffizienz (G II), Gingivahyperplasie, Ovarialzyste li., Allergie auf Ferrlecit, Trigonitis d. Blase 10/01;						
<b>Medikation :</b>	Calc.acet. Gry, Unizink 50, Renavital, EinsAlpha 0,25 mg;						
<b>Medikation während der Dialyse:</b>	NeoRecormon 1t u. 2t, Cytobion 1000, L-Carnitin 1g;						

Tab. 39: Patientendaten - Lz-HDF-Gruppe: Patient 8;

<b>Patient :</b>	9	<b>Geschl.:</b>	W	<b>Geb.:</b>	Dez 1943	<b>Dialyse seit :</b>	Sep 88
<b>Dialyseart :</b>	Hämodiafiltration – Bicarbonat						
<b>Filter :</b>	Kap Polyflux-14-S (High-Flux)						
<b>Hersteller :</b>	Gambro	<b>Oberfläche :</b>	1,4				
<b>Membran :</b>	Polyamid	<b>UF-Rate :</b>	62,00				
<b>Nephrologische Grunddiagnose :</b>	Dialysepflichtige Niereninsuffizienz bei Schrumpfnieren bds. bei V.a. chronische Glomerulonephritis;						
<b>Sekundärkomplikationen :</b>	renale Osteopathie, renale Anämie, sek. Hyperparathyreoidismus;						
<b>Weitere Diagnosen :</b>	arterielle Hypotonie, Allergie auf Kontrastmittel u. Bactrin , Arthrose re. Sprunggelenk, HLA-B27 pos. ISG Arthritis ;						
<b>Medikation :</b>	ASS 100, Cranoc 20, Vitarenal, Unizink 50, Tramagetic, Decostriol 0,25 mg, Vioxx 12,5 mg;						
<b>Medikation während der Dialyse:</b>	Aranesp 20 µg, Liponsre. 600 l, Cytobion 1000, Ferrlecit 3,2 ml;						

Tab. 40: Patientendaten - Lz-HDF-Gruppe: Patient 9;

<b>Patient :</b>	10	<b>Geschl.:</b>	W	<b>Geb.:</b>	Mai 1940	<b>Dialyse seit :</b>	Dez 99
<b>Dialyseart :</b>	Hämodiafiltration – Bicarbonat						
<b>Filter :</b>	Kap FX-60 (High-Flux)						
<b>Hersteller :</b>	Fresenius	<b>Oberfläche :</b>	1,4				
<b>Membran :</b>	Polysulfon	<b>UF-Rate :</b>	46,00				
<b>Nephrologische Grunddiagnose :</b>	Dialysepflichtige Niereninsuffizienz bei V.a. chron. GN; Nephrolithiasis bds. mit Nephrektomie re. 1/94;						
<b>Sekundärkomplikationen :</b>	arterielle Hypertonie, renale Anämie, sek. Hyperparathyreoidismus;						
<b>Weitere Diagnosen :</b>	COPD mit Pleuraschwarte re., Refluxösophagitis (G I), Z.n Netzhautblutung u. Venenthrombose re., Allergie auf Sulfonamide, Ciprofloxacin u. Theophyllin;						
<b>Medikation :</b>	Torem 200, Vit.r., Decostr. 0,25, Uniz. 50, Calci Gry, ASS 100, Activelle, AntiPhosp., Berodual, Nephrotr., BelocZok, Bayotensin, Xanef, Clonidin;						
<b>Medikation während der Dialyse:</b>	Ferrlecit 3,2 ml, Cytobion 1000, Paracetamol 500, Erypo FS 2000;						

Tab. 41: Patientendaten - Lz-HDF-Gruppe: Patient 10;



### 7.3.2 HD-Gruppe

<b>Patient :</b>	7	<b>Geschl.:</b>	M	<b>Geb.:</b>	Jan 1940	<b>Dialyse seit :</b>	Jun 98
<b>Dialyseart :</b>	Hämodialyse-Bicarbonat						
<b>Filter :</b>	Kap Polyflux-17-L (High-Flux)						
<b>Hersteller :</b>	Gambro	<b>Oberfläche :</b>	1,7				
<b>Membran :</b>	Polyamid	<b>UF-Rate :</b>	12,50				
<b>Nephrologische Grunddiagnose :</b>	Dialysepflichtige Niereninsuffizienz bei mesangial-proliferativer GN;						
<b>Sekundärkomplikationen :</b>	arterielle Hypertonie, renale Anämie, Hyperlipidämie;						
<b>Weitere Diagnosen :</b>	subakuter Lateralinfarkt 2/97, PTCA einer prox. RIVA-Stenose 3/97, Z.n. Milzexstirpation u. Amputation Dig. II bis V re. Fuß nach Verkehrsunfall,						
<b>Medikation :</b>	Unat 200, Vitarenal, Calciumacetat Nefro 500 mg, Beloc Zok, Ferrlecit 3,2 ml, Lorzaar 50 mg (seit Juni 02), Dekristol 2t I.E., Sortis 20 mg, Rani 150, ASS;						
<b>Medikation während der Dialyse:</b>	Erypo FS 2000, Ferrlecit 3,2 ml;						

Tab. 42: Patientendaten - HD-Gruppe: Patient 1;

<b>Patient :</b>	2	<b>Geschl.:</b>	M	<b>Geb.:</b>	Nov 1936	<b>Dialyse seit :</b>	Jun 98
<b>Dialyseart :</b>	Hämodialyse – Bicarbonat						
<b>Filter :</b>	Kap Hemoflow-F-6-HPS (ED-Spez.)						
<b>Hersteller :</b>	Fresenius	<b>Oberfläche :</b>	1,3				
<b>Membran :</b>	Polysulfon	<b>UF-Rate :</b>	8,50				
<b>Nephrologische Grunddiagnose :</b>	Dialysepflichtige Niereninsuffizienz bei diab. Nephropathie;						
<b>Sekundärkomplikationen :</b>	arterielle Hypertonie, renale Anämie, sek. Hyperparathyreoidismus;						
<b>Weitere Diagnosen :</b>	Diabetes mellitus seit 80 (Insulin seit 82), kompl. diabet. Spätsyndr., Z.n. panretinaler Laserkoagulation re., Glaskörpereinblutung, Mediateilinfarkt re. mit Hemiparese li. 12/96, Cholezystolithiasis;						
<b>Medikation :</b>	Fosinorm 10, Unat 200, Vigantolekten 1000, Glucobay 50, Vitarenal, Cynt 0,3, Baymycard RR 10, Iscover 75 mg, Calc.ac. 500 mg;						
<b>Medikation während der Dialyse:</b>	Ferrelecit 3,2 ml, Erypo FS 1000;						

Tab. 43: Patientendaten - HD-Gruppe: Patient 2;

<b>Patient :</b>	3	<b>Geschl.:</b>	M	<b>Geb.:</b>	Jun 1936	<b>Dialyse seit :</b>	Mai 99
<b>Dialyseart :</b>	Hämodialyse – Bicarbonat						
<b>Filter :</b>	Kap Hemoflow-F-6-HPS (ED-Spez.)						
<b>Hersteller :</b>	Fresenius	<b>Oberfläche :</b>	1,3				
<b>Membran :</b>	Polysulfon	<b>UF-Rate :</b>	8,50				
<b>Nephrologische Grunddiagnose :</b>	Dialysepflichtige Niereninsuffizienz bei FSGS;						
<b>Sekundärkomplikationen :</b>	arterielle Hypertonie, renale Anämie, sek. Hyperparathyreoidismus, Hyperlipidämie;						
<b>Weitere Diagnosen :</b>	Nebennieren-Inzidentalom li 10/00, Z.n. GI-Blutung bei Ulcera ventriculi 5/00, Kontrastmittelallergie;						
<b>Medikation :</b>	Unat 200, Decrist. 2t I:E., Ranitidin 150, Vitarenal, ASS 100, Sab simplex, Calc.ac. 500 mg, Celebrex 10 mg;						
<b>Medikation während der Dialyse:</b>	Ferrelecit 3,2 ml, Erypo FS 4000;						

Tab. 44: Patientendaten - HD-Gruppe: Patient 3;

<b>Patient :</b>	4	<b>Geschl.:</b>	M	<b>Geb.:</b>	Okt 1940	<b>Dialyse seit :</b>	Feb 94
<b>Dialyseart :</b>	Hämodialyse – Bicarbonat						
<b>Filter :</b>	Kap Hemoflow-F-6-HPS (ED-Spez.)						
<b>Hersteller :</b>	Fresenius	<b>Oberfläche :</b>	1,3				
<b>Membran :</b>	Polysulfon	<b>UF-Rate :</b>	8,50				
<b>Nephrologische Grunddiagnose :</b>	Dialysepflichtige Niereninsuffizienz bei FSGS;						
<b>Sekundärkomplikationen :</b>	arterielle Hypertonie, renale Anämie, sek. Hyperparathyreoidismus, Z.n. Parathyreoidektomie 12/99;						
<b>Weitere Diagnosen :</b>	dil. Cardiomyopathie mit LV-Insuff., Z.n. Rektumamputation mit Anus praeter-Anlage 3/80 bei Adeno-Ca, Z.n. Urethronocystostomie bei intraop. prävesic. Uretherverletzung li. 3/80, Z.n. percut Nephrostomie bds. 2/91, Z.n. TUR-Prostataresektion bei Adenom 2/91, Hyperlipidämie;						
<b>Medikation :</b>	Zocor 10, Vitarenal, Digimerck 0,1, Na-hydrogencarb. 1g, Dilatrend 25 mg, Calc.ac. 500 mg, Folsre. 5 mg, Rocaltrol 0,25 mg;						
<b>Medikation während der Dialyse:</b>	Ferrelecit 3,2 ml, Erypo FS 4000;						

Tab. 45: Patientendaten - HD-Gruppe: Patient 4;

<b>Patient :</b>	5	<b>Geschl.:</b>	W	<b>Geb.:</b>	Mai 1957	<b>Dialyse seit :</b>	Nov 96
<b>Dialyseart :</b>	Hämodialyse – Bicarbonat						
<b>Filter :</b>	Kap Polyflux-17-L (High-Flux)						
<b>Hersteller :</b>	Gambro	<b>Oberfläche :</b>	1,70				
<b>Membran :</b>	Polyamid	<b>UF-Rate :</b>	12,50				
<b>Nephrologische Grunddiagnose :</b>	Dialysepflichtige Niereninsuffizienz bei mesangial-proliferativer GN;						
<b>Sekundärkomplikationen :</b>	arterielle Hypertonie, renale Anämie, sek. Hyperparathyreoidismus, Hyperlipidämie;						
<b>Weitere Diagnosen :</b>	Z.n. Strumektomie 87, Unvertr. von Ferrlecit u. Heparin, Z.n. ischämisches Kolonasc.-Ulcus;						
<b>Medikation :</b>	Vitarenal, LT 50, Dekristol 2t I.E., Bondiol 0,25 mg, Laxoberal, Mg 300, Phosphosorb Mg 2+, Folsan 5 mg;						
<b>Medikation während der Dialyse:</b>	Venofer, Nefrocarnit, Erypo FS 4000;						

Tab. 46: Patientendaten - HD-Gruppe: Patient 5;

<b>Patient :</b>	6	<b>Geschl.:</b>	M	<b>Geb.:</b>	Aug 1965	<b>Dialyse seit :</b>	Apr 00
<b>Dialyseart :</b>	Hämodialyse – Bicarbonat						
<b>Filter :</b>	Kap FX-60 (High-Flux)						
<b>Hersteller :</b>	Fresenius	<b>Oberfläche :</b>	1,40				
<b>Membran :</b>	Polysulfon	<b>UF-Rate :</b>	46,00				
<b>Nephrologische Grunddiagnose :</b>	Dialysepflichtige Niereninsuffizienz bei mesangial-proliferativer GN;						
<b>Sekundärkomplikationen :</b>	arterielle Hypertonie, renale Anämie, sek. Hyperparathyreoidismus;						
<b>Weitere Diagnosen :</b>	Adipositas permagna, Psoriasis vulgaris, path. Luc-Toleranztest;						
<b>Medikation :</b>	Vitarenal, ASS 100, Calc.ac. 500 mg, Nephrotrans, Torem 200;						
	Phosphosorb Mg 2+, Folsan 5 mg;						
<b>Medikation während der Dialyse:</b>	Ferrlecit 3,2 ml, Aranesp 10µg;						

Tab. 47: Patientendaten - HD-Gruppe: Patient 6;

<b>Patient :</b>	7	<b>Geschl.:</b>	M	<b>Geb.:</b>	Jun 1951	<b>Dialyse seit :</b>	Jun 89
<b>Dialyseart :</b>	Hämodialyse – Bicarbonat						
<b>Filter :</b>	Kap Polyflux-14-S (High-Flux)						
<b>Hersteller :</b>	Gambro	<b>Oberfläche :</b>	1,40				
<b>Membran :</b>	Polyamid	<b>UF-Rate :</b>	62,00				
<b>Nephrologische Grunddiagnose :</b>	Dialysepflichtige Niereninsuffizienz bei chron. Pyelo-/ GN bei Blasenextrophie;						
<b>Sekundärkomplikationen :</b>	arterielle Hypertonie, renale Anämie, sek. Hyperparathyreoidismus mit Parathyreoidektomie u. Autotranspl. in re. UA 9/99;						
<b>Weitere Diagnosen :</b>	Hepatitis C, Z.n. Ureterosigmoidostomie mit Abtragung der Blasenanlage 53, Epispadiekorrektur 53, Anlage eines Iliumconduits 79, Op re. Niere nach Fistelbildung 80, Appendektomie 69;						
<b>Medikation :</b>	Vitarenal, Beloc Zok, Calciumacetat 500 mg;						
<b>Medikation während der Dialyse:</b>	Ferrlecit 3,2 ml, Erypo FS 1000;						

Tab. 48: Patientendaten - HD-Gruppe: Patient 7;

<b>Patient :</b>	8	<b>Geschl.:</b>	W	<b>Geb.:</b>	Sep 1969	<b>Dialyse seit :</b>	Dez 99
<b>Dialyseart :</b>	Hämodialyse – Bicarbonat						
<b>Filter :</b>	Kap FX-60 (High-Flux)						
<b>Hersteller :</b>	Fresenius	<b>Oberfläche :</b>	1,40				
<b>Membran :</b>	Polysulfon	<b>UF-Rate :</b>	46,00				
<b>Nephrologische Grunddiagnose :</b>	Dialysepflichtige Niereninsuffizienz bei chron. Pyelo-/GN bei Refluxnephropathie;						
<b>Sekundärkomplikationen :</b>	Hyperlipidämie, renale Anämie, sek. Hyperparathyreoidismus;						
<b>Weitere Diagnosen :</b>	Z.n. Antirefluxplastik re. 74 u. li. 75 mit Revision 80 u. 81, subtot. Strumektomie bei hyperthyreoter Struma nodosa u. papillärem Schilddrüsen-Ca (pT2N0M0) mit Autoimpl. d. NSD in re. UA 9/94, Interuptio 87, 3 x Abort 92/94/95;						
<b>Medikation :</b>	Unat 200, BelocZok , Carenal, Na-hydrogencarb. 1g, LT 200, Phosphonorm, Calciumacetat 500 mg, Folsre 5 mg, Zinkorotat 20;						
<b>Medikation während der Dialyse:</b>	Ferrelecit 3,2 ml, Erypo FS 4000;						

Tab. 49: Patientendaten - HD-Gruppe: Patient 8;



<b>Patient :</b>	9	<b>Geschl.:</b>	W	<b>Geb.:</b>	Feb 1942	<b>Dialyse seit :</b>	Mär 89
<b>Dialyseart :</b>	Hämodialyse – Bicarbonat						
<b>Filter :</b>	Kap Polyflux-14-S (High-Flux)						
<b>Hersteller :</b>	Gambro	<b>Oberfläche :</b>	1,40				
<b>Membran :</b>	Polyamid	<b>UF-Rate :</b>	62,00				
<b>Nephrologische Grunddiagnose :</b>	Dialysepflichtige Niereninsuffizienz bei chron. Pyelo-/ GN bei Refluxnephropathie; CAPD bis 9/94 dann HD;						
<b>Sekundärkomplikationen :</b>	arterielle Hypertonie, renale Anämie, sek. Hyperparathyreoidismus mit Parathyreoidektomie u. Autotranspl. in re. UA 9/99;						
<b>Weitere Diagnosen :</b>	Z.n. Fundoplikatio 10/99 bei Refluxösophagitis (G I) u. axialer Gleithernie, Spondylolisthesis L5/S1, sens. PNP, Rizarthrose li., Nephrektomie re. 80, COPD mit bronch. Hyperaktivität, Katarakt-Op re. 10/01 u. li. 2/02, Unverträglichkeit von Ciprobay u. Tavegil;						
<b>Medikation :</b>	Vitarenal, Dekristol 2t I.E., ASS 100, LT 125 mg, Calciumacetat 500 mg, Bondiol 0,25 mg, Tramal, Vioxx 12,5 mg, Folsan 5 mg;						
<b>Medikation während der Dialyse:</b>	Ferrlecit 3,2 ml, Nefrocarnit;						

Tab. 50: Patientendaten - HD-Gruppe: Patient 9;

<b>Patient :</b>	10	<b>Geschl.:</b> W	<b>Geb.:</b>	Aug 1941	<b>Dialyse seit :</b>	Nov 99
<b>Dialyseart :</b>	Hämodialyse – Bicarbonat					
<b>Filter :</b>	Kap Polyflux-17-L (High-Flux)					
<b>Hersteller :</b>	Gambro	<b>Oberfläche :</b>	1,70			
<b>Membran :</b>	Polyamid	<b>UF-Rate :</b>	12,50			
<b>Nephrologische Grunddiagnose :</b>	Dialysepflichtige Niereninsuffizienz bei chron. GN bzw. Glomerulosklerose u. Schrumpfniere re.;					
<b>Sekundärkomplikationen :</b>	arterielle Hypertonie, renale Anämie, sek. Hyperparathyreoidismus mit Parathyreoidektomie u. Autotranspl. in re. UA 9/99;					
<b>Weitere Diagnosen :</b>	Gonarthrose bds., Z.n. Hyperthyreose bei Autoimmunthyreopathie vom Typ M. Basedow 5/00, seit 7/02 euthyreote Stoffwechsellage, vaginale Hysterektomie u. Salpingektomie 95;					
<b>Medikation :</b>	Carenal, Zocor 5, Oestrofeminal 0,6, Mg, Ranitic 150, Na-hydrogencarb. 1 g, Phosphonorm, Diclo 50 mg, Folsan 5 mg;					
<b>Medikation während der Dialyse:</b>	Venofer, Aranesp 30 µm;					

Tab. 51: Patientendaten - HD-Gruppe: Patient 10;

## 7.4 Ergebnisse der statistischen Auswertung der Verlaufsstudie, der Lz-HDF-, sowie der HD-Gruppe

**T-Test der HDF/HD-Vergleichsstudie (Test bei unabhängigen Stichproben)**

	Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit						
	F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)	Mit-Differenz	Standardfehler der Differenz	95% Konfidenzintervall der Differenz	
								Untere	Oberer
MIR-MW-HDF/ Varianzen sind gleich Varianzen sind nicht gleich	1,102	,308	-4,170 -4,170	18 16,001	,001 ,001	-3,0000 -3,0000	,7194 ,7194	-4,5114 -4,5250	-1,4886 -1,4750

	Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit						
	F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)	Mit-Differenz	Standardfehler der Differenz	95% Konfidenzintervall der Differenz	
								Untere	Oberer
rDNA-S-MW-HDF/ Varianzen sind gleich Varianzen sind nicht gleich	2,535	,129	-3,682 -3,682	18 15,877	,002 ,002	-2,7200 -2,7200	,7388 ,7388	-4,2721 -4,2871	-1,1679 -1,1529

Tab. 52 : T-Test (MK und rDNA-S) der HDF/HD-Vergleichsstudie (MR =Mikrokernrate; rDNA-S = relativer DNA-Schaden);



## Danksagung

Ganz besonders danken möchte ich zu allererst Frau Prof. Dr. H. Stopper für die Bereitstellung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung und ihre stete Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. A. Heidland danke ich für sein außergewöhnliches Engagement und seine Unterstützung, nicht nur bei Belangen des Kuratoriums für Dialyse in Würzburg. Gleichmaßen danke ich Herrn Prof. Dr. U. Bahner, nicht zuletzt für die Übernahme des Koreferates.

Im Weiteren danke ich „meinen Lehrern für experimentelles Arbeiten“ - dem gesamten Team der Arbeitsgruppe Stopper des toxikologischen Institutes der Universität Würzburg - für die Hilfsbereitschaft, Unterstützung und die gute Zusammenarbeit.

Ich danke außerdem den vielen Mitarbeitern des Kuratoriums für Dialyse in Würzburg und Nürnberg für die tatkräftige Unterstützung bei der Bereitstellung der Proben.

Ohne die Hilfe und Unterstützung meiner Eltern wäre der Weg zu dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Ihnen gilt mein ganz besonderer Dank.



Kai Nerlich  
Johann-Salomon-Straße 4  
97080 Würzburg  
Telefon 0931-3594761

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Vor- u. Familienname: Kai Nerlich  
Geburtsdatum: 22.07.1977  
Geburtsort: Nürnberg  
Familienstand: ledig

### **Schulbildung**

1983 – 1987 Besuch der Grundschule Altensittenbach  
1987 – 1996 Besuch des Paul-Pfinzing-Gymnasiums  
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Zweig)  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### **Wehrdienst**

Juli 1996 – Grundwehrdienst im Sanitätsdienst der Luftwaffe  
April 1997 der deutschen Bundeswehr,  
Bundeswehrkrankenhaus Amberg i.d.Opf.;

## Hochschulbildung

April 1997                    Beginn des Medizinstudiums an der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

September 1999            Ärztliche Vorprüfung mit der Note „gut“

September 2000            Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung mit der Note „gut“

März 2003                    Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung mit der Note „gut“

Praktisches Jahr:  
28.04.03 – 17.08.03:  
Prof. Dr. med. Chr. Reiners,  
Klinik für Nuklearmedizin der Universitätsklinik Würzburg

18.08.03 – 07.12.03:  
Prof. Dr. med. B. Jany,  
Missionsärztliche Klinik, Abteilung Innere Medizin

08.12.03 – 28.03.04:  
Prof. Dr. med. A. Thiede,  
Chirurgische Universitätsklinik Würzburg

Juni 2004                    Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung mit der Note „sehr  
gut“ und damit Abschluss des Medizinstudiums mit der  
Gesamtnote „gut“ (1,66).



Würzburg, Juni 2004