

Aus dem Institut für Toxikologie  
der Universität Würzburg  
Vorstand: Professor Dr.rer.nat. W. K. Lutz

Quantifizierung von DNA-Schäden peripherer Lymphozyten  
bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg  
vorgelegt von  
Felix Boullay  
aus Bonn

Würzburg, Mai 2002

Referent: Prof.Dr.rer.nat. Dr.med. H. Stopper

Koreferent: Priv.Doiz. Dr.med. U. Bahner

Dekan: Prof.Dr.med. V. ter Meulen

Tag der mündlichen Prüfung: 27.06.03

Der Promovend ist Arzt

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1. Einleitung</b>	1
1.1 Hintergrund	1
1.2 Fragestellung der vorliegenden Arbeit	2
1.3 Vorstellung des verwendeten Testsystems	3
1.4 Dialyseverfahren	7
1.4.1 Hämodialyse (HD)	7
1.4.2 Hämofiltration (HF)	8
1.4.3 Hämodiafiltration (HDF)	8
<b>2. Material und Methoden</b>	9
2.1. Chemikalien und Arbeitsgeräte	9
2.1.1. Allgemeine Laborchemikalien und Verbrauchsmaterial	9
2.1.2. Verwendete Arbeitsgeräte	9
2.2. Zellkulturmedium	10
2.3. Puffer und Lösungen für den Comet Assay	10
2.4. Isolierung der humanen Lymphozyten	13
2.4.1. Verfahren	13
2.4.2. Durchführung	13
2.5. Comet Assay ( Einzelzell-Gelelektrophorese/SCGE)	14
2.5.1. Eigenschaften	14
2.5.2. Durchführung	14
2.5.3. Auswertung	15
2.6. Ethidiumbromid/Fluoresceindiacetat Methode	16
2.6.1. Testprinzip/Färbelösungen	16
2.6.2. Durchführung	16
2.6.3. Auswertung	17
2.7. Zusammenstellung der Probandenkollektive	18
<b>3. Ergebnisse</b>	21
3.1 Vorversuche	21
3.1.1. Auswahl des DNA-Farbstoffes	21
3.1.2. Vergleich von mehreren Zellpräparaten der selben Person	22
3.1.3. Simulation eines Transportvorganges	24
3.1.4. Vergleich der DNA-Schäden vor und nach der Hämodialyse	25
3.1.5. Untersuchung der Zellüberlebensrate mit der Ethidiumbromid/Fluoresceindiacetat Methode	25
3.2. Untersuchung des DNA-Schadens der peripheren Lymphozyten mittels Comet Assay bei chronisch Nierenkranken mit und ohne Dialysebehandlung	26
3.2.1. Kontrollgruppe	26
3.2.2. Intraindividuelle Schwankungen der ständigen Kontrollperson	27
3.3.1. Chronisch-Nierenkranke ohne Dialysebehandlung	28
3.3.2. Chronisch-Nierenkranke mit Hämodialysebehandlung	29
3.3.3. Doppeltbestimmung des vorherigen Kollektivs	30
3.3.4. Chronisch-Nierenkranke mit Hämodiafiltrationsbehandlung	31
3.4. Vergleichende Darstellung der Ergebnisse aller Probandengruppen	33

<b>4. Diskussion</b>	36
<b>5. Zusammenfassung</b>	41
<b>6. Literatur</b>	43

# **1. Einleitung**

## **1.1. Hintergrund**

In den letzten beiden Dekaden legten mehrere Studien einen Zusammenhang zwischen Niereninsuffizienz bzw. Nierenersatztherapie und einem erhöhten Krebsrisiko dar (Matas et al., 1975; Giacchino et al., 1983). Erst kürzlich zeigte die bisher umfassendste Studie mit mehr als 800.000 Teilnehmern, dass bei dialysepflichtigen Patienten eine teilweise stark erhöhte Malignitätsrate in den Organen der Niere, Blase, Schilddrüse, Zunge, Leber, und des Cervix Uteri zu beobachten ist. Das hämatopoetische System ist in ähnlicher Weise betroffen (Maisonneuve et al., 1999).

Seit Jahren ist die enorme Wichtigkeit eines funktionierenden Immunsystems zur Zerstörung von Tumor-Zellen bekannt (Riede et al., 1995). Jedoch führt die Niereninsuffizienz zu einem Immundefekt, der bei vielen Patienten klinische Konsequenzen nach sich zieht. Hierfür wird der Begriff des 'urämischen' Immundefektes verwendet, da diese Störung unabhängig von der Art der zugrundeliegenden Nierenerkrankung und unabhängig von der Art der Nierenersatztherapie auftritt. Bestimmte Nierenkrankheiten, wie immunologisch aktive Glomerulonephritiden oder Nierenersatzverfahren, wie Hämodialyse und Transplantation, können diesen Immundefekt sogar noch verstärken (Köhler et al., 1993).

Die klinischen Folgen zeigen sich unter anderem in einer verminderten Abstossung von Allotransplantaten, einer reduzierten zellvermittelten Überempfindlichkeit (bspw. negative Tuberkulinreaktion), Nichtansprechen von Impfungen, einer eingeschränkten Immunität gegen Viren, Bakterien, und Pilze, und in der eben erwähnten Verminderung der Tumorkontrolle (Immunosurveillance).

Es existieren jedoch zusätzliche Faktoren, die als potentielle Mechanismen für maligne Transformationen in diesen Patientengruppen gelten. Einer davon ist die Annahme einer gestörten DNA-Reparatur. Verschiedene Forschergruppen wiesen nach, dass die DNA-Reparatur in peripheren Lymphozyten von Patienten mit fortgeschrittenen chronischen Nierenerkrankungen ebenso wie die der Langzeitdialyse-Patienten eingeschränkt ist, im Gegensatz zu Patienten mit einer Dialyse-Behandlungsdauer von wenigen Jahren, deren DNA-Reparatur normal oder sogar erhöht war (Vamvakas et al., 1996; Malachi et al.,

1993). Ebenfalls zeigten diese Patienten eine signifikant erhöhte Mikrokernrate (Stopper et al., 1999). Mikrokerne sind chromatinhaltige Strukturen im Zytoplasma von Zellen, welche getrennt vom Kernmaterial vorliegen. Ein Entstehungsmechanismus ist die indirekte DNA-Schädigung während der Mitose (Schmuck et al., 1998). Das vermehrte Auftreten von Mikrokernen in präkanzerösen Veränderungen (Benner et al., 1993) gilt als möglicher Hinweis auf eine eventuell erfolgende maligne Entartung dieser Zellen.

## **1.2. Fragestellung der vorliegenden Arbeit**

Scheinbar ist die DNA-Reparatur bei Patienten mit präterminaler Niereninsuffizienz beeinträchtigt. Bei Aufnahme ins Dialyseprogramm stellt sich initial eine Erholung, möglicherweise sogar ein ‘overshoot‘ ein, der wahrscheinlich auf der akuten Elimination von urämischen Toxinen beruht. Im Verlauf der Langzeitdialysebehandlung wird die DNA-Reparatur wieder zunehmend beeinträchtigt. Als Grund hierfür wird zum einen die Persistenz von bestimmten Urämietoxinen, zum anderen möglicherweise das Dialyseverfahren (Bioinkompatibilität mit den Dialysematerialien) selbst angesehen (Vamvakas et al., 1998). Es stellt sich die Frage, ob diese starke Beeinträchtigung der DNA-Reparatur bei Langzeitdialyse Entwicklung von Tumoren begünstigt.

Nierentransplantierte Patienten mit Krebserkrankung zeigten eine starke Beeinträchtigung der DNA-Reparatur im Vergleich zu Krebspatienten mit normaler Nierenfunktion (Vamvakas et al., 1996). Dagegen wiesen nierentransplantierte Patienten ohne Krebs quasi einen Normalbefund auf. Unter Berücksichtigung der erniedrigten Reparatur bei langzeitdialysierten Patienten deutet die Besserung des Prozesses nach Nierentransplantation trotz immunsuppressiver Therapie daraufhin, dass sich in der Mehrzahl der Fälle die DNA-Reparatur bei funktionierender Niere wieder erholt.

In Fortführung der bisherigen Untersuchung zur DNA-Schädigung soll der Stellenwert des Comet-Assay zur Erfassung von DNA-Schäden bei Patienten mit chronisch fortgeschrittener Niereninsuffizienz geprüft werden. Das für dieses Patientenkollektiv erstmalig verwendete Comet Assay-Testsystem, einer für die Ermittlung von DNA-Schäden hoch sensiblen Methode, die gentoxische Schädigung in peripheren Lymphozyten untersucht werden.

Durch den Comet Assay kann jede Zelle einzeln betrachtet und ausgewertet werden. Dadurch lässt sich ferner bestimmen, ob alle Zellen gleichmässig oder nur teilweise einer gentoxische Schädigung unterliegen.

Zielgruppen sind sowohl Prädialysepatienten mit unterschiedlicher Einschränkung der glomerulären Filtrationsrate als auch Hämodialysepatienten, die entweder mit der konventionellen Hämodialyse oder mittels Hämodiafiltration behandelt werden. Sowohl bei Prädialyse- als auch bei Hämodialysepatienten soll geprüft werden, ob eine erhöhte DNA-Schädigung gegenüber einem Kontrollkollektiv darstellbar ist, und auch inwieweit eine Korrelation zu der reduzierten DNA-Reparatur und der erhöhten Mikrokernrate besteht.

Patienten mit Hämodiafiltrationsbehandlung wurden bisher noch nicht untersucht. Theoretisch wäre bei diesem Patientenkollektiv eine geringere Schädigung erwartet worden, da diese Dialysemethode zu einer verbesserten Eliminierung von Urämietoxinen gewährleistet. Dies konnte bspw. anhand von AGEs (Advanced Glycation Endproducts) nachgewiesen werden (Gerdemann, et al., 2000). AGEs können sowohl durch proinflammatorische Wirkung als auch durch Modifikation von Proteinen indirekte DNA-Schäden setzen. Andererseits kommen bisher vornehmlich Patienten mit komplizierenden kardio-vaskulären Begleiterkrankungen in den Vorzug der HDF-Behandlung, die allgemein als verträglicher angesehen wird. Dies würde wiederum grössere Schäden erwarten lassen.

Da der Comet Assay in früheren Studien mit Kontrollpersonen eine starke intraindividuelle Variabilität zeigte (Collins et al., 1997; Diem et al., 1999), wurden in der vorliegenden Untersuchung mit dem Blut von Hämodialysepatienten Doppelbestimmungen vorgenommen. Somit konnten Schwankungen in diesem Kollektiv nachgewiesen, quantifiziert, und evaluiert werden.

### **1.3 Vorstellung des verwendeten Testsystems**

Der Comet-Assay stellt ein sensitives Testsystem dar, mit dem auf Einzelzellniveau DNA-Schäden schnell und relativ kostengünstig analysiert werden können (Singh, et al., 1988). Das Spektrum der detektierten Schäden ist breit gefächert (Übersicht bei Tice, 1995). So können neben DNA-Strangbrüchen praktisch alle bekannten DNA-Veränderungen, wie oxidative DNA-Schäden, Alkylierungen und große Addukte eine direkte oder indirekte Induktion der DNA-Wanderung bewirken. Auch bei der Bestimmung von DNA-Reparaturkapazitäten (Plappert et al., 1997) und bei Biomonitoring-Untersuchungen (Kassie et al., Hartmann et al., 1998), zur Erfassung genotoxischer Einflüsse bestimmter Umweltfaktoren, wird der Comet Assay immer häufiger eingesetzt. Hierbei erweist es sich als vorteilhaft, dass selbst Zellen der Nasen- und Wangenschleimhäute, selbst bei geringer Zellzahl, problemlos untersucht werden können (Valverde et al., 1997). Des weiteren ist die Durchführung sowohl mit proliferierenden als auch mit nicht-proliferierenden Zellen möglich.



## Comet-Assay Einzelzell-Gelelektrophorese

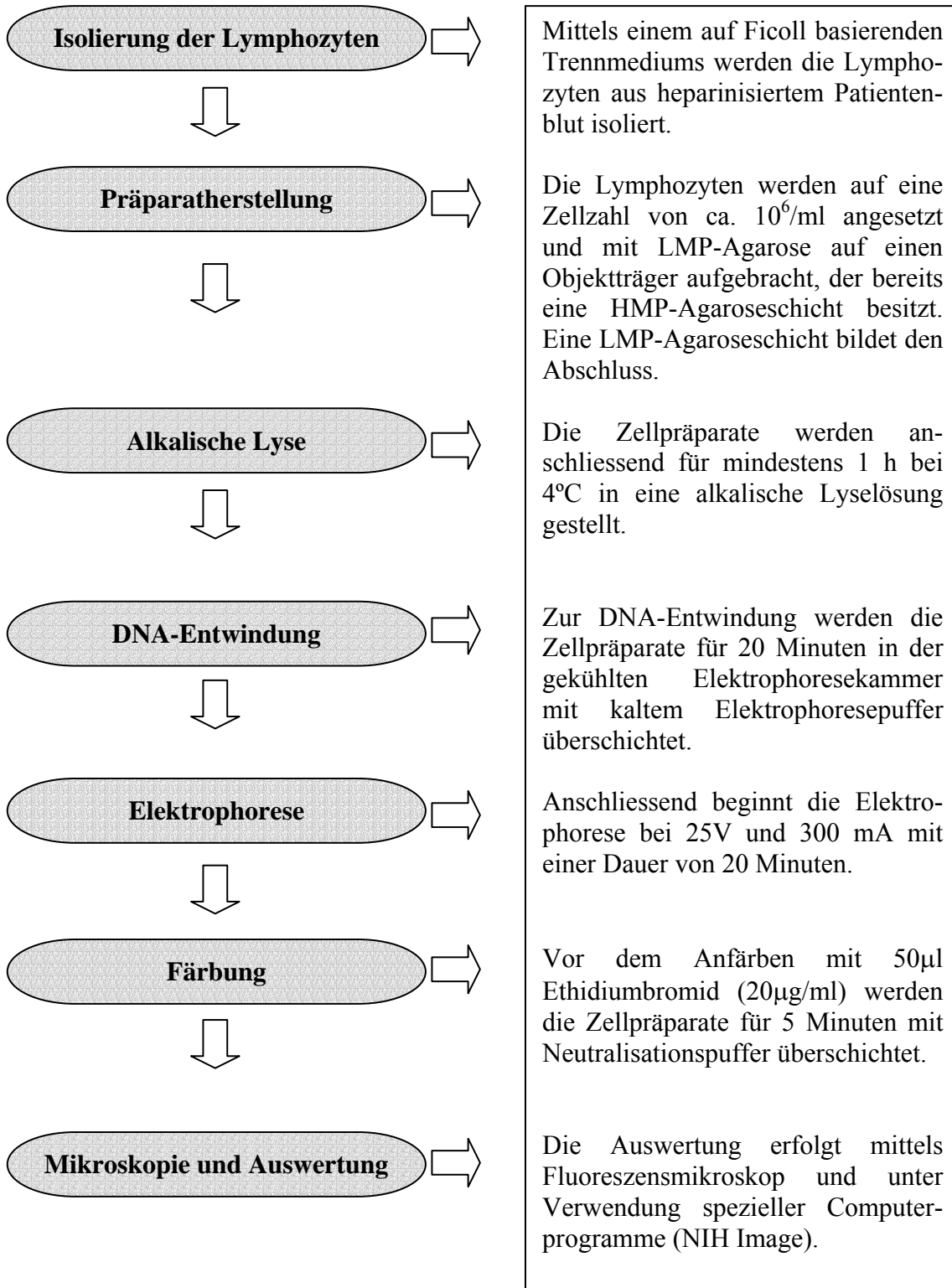


Abbildung 1: Vereinfachtes Schema zur Durchführung des Comet Assays  
Eine genaue Anleitung des Comet Assays ist in Kapitel 2.5.2. nachzulesen.



Abbildung 2: Mikroskopisches Bild eines Lymphozyten nach Durchführung des Comet Assays (Kontrolle).



Abbildung 3: Geschädigter Lymphozyt eines Prädialyse-Patienten, der eine verstärkte DNA-Migration ('Comet') zeigt.

## 1.4. Dialyseverfahren

Die Hauptaufgaben der Dialyse sind:

- Entfernung von im Blut gelösten Schlackenstoffen (Dialyse)
- Entfernung von Flüssigkeit (Ultrafiltration)
- Korrektur von Elektrolytstörungen

### 1.4.1 Hämodialyse

Diese Form der Blutreinigung bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz wurde in den 60er Jahren eingeführt. Die eigentliche Entgiftung erfolgt im sogenannten Dialysator. Die dort befindliche Membran ist entweder faserförmig aus mehreren tausend gebündelten Kapillaren (Kapillardialysator) oder schichtförmig (Plattendialysator) angeordnet und besteht aus Zellulose (Cellophan- oder Cuprophanmaterial), bzw. aus synthetischem Material. Diese Membran trennt das Blut von der Dialysierflüssigkeit. Dialyse bezeichnet also ein physikalisches Verfahren zur Abtrennung gelöster Teilchen aus dem Blut mittels einer semi-permeablen Membran.

Maßgeblich am Stofftransport durch die Membran beteiligt sind folgende Faktoren:

- Diffusion      Stoffentfernung entsprechend dem Konzentrationsgradienten
- Osmose        Wasserentzug durch Konzentrationsausgleich über eine semipermeable Membran
- Ultrafiltration    Wasserentzug durch Druckerhöhung im blutführenden System oder Sog auf der Dialyseseite
- Konvektion      Mitnahme von Stoffen durch den Flüssigkeitsstrom

Die Leistung des Dialysators wird durch die Clearance von Stoffen mit unterschiedlichem Molekulargewicht und durch die Ultrafiltration erfasst. Der Blutfluss wird durch die Menge, welche die Fistel 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

jedoch nicht mit den üblichen Zellulosemembranen beseitigt werden können. Die Technik reagierte mit der Entwicklung von großporigen synthetischen Membranen, welche die Grundlage für die Anwendung der Hämofiltration und Hämodiafiltration darstellen.

#### **1.4.2. Hämofiltration (HF)**

Der Transport von Stoffen erfolgt hier nicht wie bei der Hämodialyse entsprechend eines Konzentrations-, sondern eines Druckgefälles. Die Giftstoffe werden mit der abgepressten Flüssigkeit (Konvektion) aus dem Körper entfernt. Die über das notwendige Maß hinaus abgepresste Flüssigkeitsmenge muss durch eine sterile Substitutionslösung ersetzt werden. Für die Entfernung höhermolekularer Substanzen ist die Hämofiltration besser geeignet als die Hämodialyse.

#### **1.4.3. Hämodiafiltration (HDF)**

Dieses Verfahren kombiniert die Technik der Hämodialyse und der Hämofiltration. Bei der Hämodiafiltration ist die Gesamtmenge der entfernten Schlackenstoffe höher als bei den Einzelverfahren.

Sowohl Hämofiltration als auch Hämodiafiltration haben eine stabilisierende Wirkung auf den Blutdruck. Sie werden deshalb bevorzugt bei Patienten mit cardio-vaskulären Begleiterkrankungen angewandt.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Chemikalien und Arbeitsgeräte**

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

Aldrich-Chemie, Steinheim; Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz; GIBCO, Maryland, USA; Merck, Darmstadt; Roth, Karlsruhe; Serva, Heidelberg; Sigma Chemical Co., Taufkirchen.

Hochreines Wasser wurde aus der hauseigenen Reinstwasser-Anlage entnommen (Millipore System).

Verbrauchsmaterialien wurden bezogen von Hartenstein, Würzburg.

Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur wurden bezogen von Greiner, Nürtingen.

#### **2.1.2 Verwendete Arbeitsgeräte**

Autoklav	Melag Typ 28, Melag, BRD
Brutschrank	Typ B 5060 EK-CO <sub>2</sub> , Heraeus, BRD
Fluoreszenzmikroskop	Labophot 2A/2, Nikon, BRD
Elektrophoresekammer	Instituts-Eigenbau
Lichtmikroskop	Diavert, Leitz, Wetzlar, BRD
Sterile Werkbank	Gelaire BH 26, Flow Laboratories, BRD
Zentrifuge	Universal K2S, Hettich, Tuttlingen, BRD

## 2.2 Zellkulturmedium

Zur Kultivierung und Isolierung von humanen Lymphozyten werden 500 ml des Medium RPMI 1640 unter Zusatz folgender Substanzen verwendet:

- hitzeinaktiviertes ( 30 Minuten, 56° C) Pferdeserum 75 ml  
(Sigma Chemical Co.,Taufkirchen)
- Natrium-Pyruvat (100 mM) 5 ml  
(Sigma Chemical Co.,Taufkirchen)
- L-Glutamin (200 mM) 5 ml  
(Sigma Chemical Co.,Taufkirchen)
- Penicillin-Streptomycin (10.000 I.U./ml Pen.,  
10.000 µg/ml Strept.) ( GIBCO, Maryland, USA) 2 ml
- Tylosin (8mg/ml) 500 µl  
(Sigma Chemical Co.,Taufkirchen)
- MEM (100% Konzentration an ‘non essential amino acids’ 5 ml  
(Sigma Chemical Co.,Taufkirchen)

## 2.3 Puffer und Lösungen für den Comet Assay

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>PO<sub>4</sub> 200 mg
- CaCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O 130 mg
- MgCl<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O 100 mg
- hochgereinigtes Wasser ad 1000 ml
- pH-Wert des Puffers: 7,0
- steril filtrieren

PBS/CMF:

- 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> 200 mg
- hochgereinigtes Wasser ad 1000 ml
- pH-Wert des Puffers: 7,0
- autoklavieren

Lysepuffer-Stammlösung:

- NaCl 2,25 M
- EDTA 100 mM  
(Sigma Chemical Co., Taufkirchen)
- Tris 10 mM  
(Sigma Chemical Co., Taufkirchen)
- Natrium-Saccharinat 0,9 %  
(Sigma Chemical Co., Taufkirchen)
- hochgereinigtes Wasser
- pH-Wert des Puffers: 10,0

Zur Verwendung als Lyselösung muss dieser Puffer bei jedem Versuch frisch angesetzt werden durch Zusatz von:

- Triton X-100 1%  
(Sigma Chemical Co., Taufkirchen)
- DMSO 10%  
(Sigma Chemical Co., Taufkirchen)

Elektrophoresepuffer:

- NaOH 300 mM
- EDTA 1 mM
- pH-Wert des Puffers: 10,0
- autoklavieren
- hochgereinigtes Wasser

Neutralisationspuffer:

- Tris 400 mM
- hochgereinigtes Wasser
- pH-Wert des Puffers: 7,5
- autoklavieren

Agarose 0,75 % (HMP)

(Roth, Karlsruhe)

- Agarose (HMP) 750 mg
- PBS/CMF 100 ml
- aufkochen ( Mikrowelle)

Agarose 0,5% (LMP)

(Sigma Chemical Co., Taufkirchen)

- Agarose (LMP) 50 mg
- PBS/CMF 10 ml
- aufkochen (Mikrowelle)



## **2.4 Isolierung der humanen Lymphozyten**

### **2.4.1. Verfahren**

Die Isolierung der humanen Lymphozyten erfolgt nach der Methode von Böyum (Böyum, 1968) mittels HISTOPAQUE<sup>®</sup>-1077 (Sigma Chemical Co., Taufkirchen), einer Lösung aus Polysaccharose und Natriumdiatrizoat mit einer Dichte von 1,077 +/- 0,001. Dieses Trennmedium ermöglicht die rasche Gewinnung lebender, mononukleärer Zellen aus kleinen Blutvolumina. Histopaque<sup>®</sup>-1077 wird mit Antikoagulans behandeltem venösen Blut überschichtet. Es wurden heparinisierte Monovetten (S-Monovette, Saarstedt, Nürtingen) verwendet. Beim Zentrifugieren werden Erythrozyten und Granulozyten durch Ficoll<sup>®</sup> aggregiert und rasch sedimentiert, während Lymphozyten und andere mononukleäre Zellen in der Plasma-Interphase verbleiben. Die Erythrozyten Kontamination ist vernachlässigbar. Die meisten Verunreinigungen durch Thrombozyten sind durch langsames Zentrifugieren und mehrmaliges Waschen entfernbar.

### **2.4.2. Durchführung**

In ein 15-ml-Zentrifugenröhrchen mit konischem Boden werden 3,0 ml Trennmedium gegeben und auf Raumtemperatur erwärmt. Daraufhin erfolgt eine vorsichtige Überschichtung mit 3,0 ml Vollblut. Anschließend wird die Probe 30 Minuten lang bei Raumtemperatur mit 400\*g zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation wird die obere Schicht bis einschließlich 0,5 cm der undurchsichtigen Interphase (mononukleäre Zellen) mit einer Pasteurpipette abpipettiert und verworfen. Die Interphase wird mit 10 ml Lymphozytenmedium in ein neues Zentrifugenröhrchen gegeben und durch vorsichtiges Aspirieren vermischt. Es erfolgt eine erneute Zentrifugation für 10 Minuten mit 250\*g. Der Überstand wird dekantiert und verworfen, der Bodensatz mit 5,0 ml Lymphozytenmedium resuspendiert. Nach Zentrifugation (10 Minuten / 250\*g ) und Wiederholung des letzten Arbeitsschrittes wird der Bodensatz mittels Lymphozytenmedium resuspendiert und kann nach Auszählung mit der Neubauer-Kammer auf die gewünschte Zellzahl eingestellt werden.

Für den Comet-Assay wurde eine Zelldichte zwischen  $0,8 \cdot 10^5$  und  $1,2 \cdot 10^6$  ml gewählt.

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

### **2.5.1. Eigenschaften**

Der Comet-Assay stellt ein sensitives Testsystem dar, mit dem auf Einzelzellniveau schnell und relativ kostengünstig DNA-Schäden analysiert werden können (Singh et al, 1988). Für weitere Eigenschaften des Comet Assay siehe auch Kapitel 1.3.

### **2.5.2 Durchführung**

Ein aufgerauhter Objektträger (Labcraft, Dakin Fully Frosted, Curtin Matheson Scientific Inc., Houston, Texas) wird mit 300-400  $\mu$ l 0,75% HMP-Agarose beschichtet. Die gut resuspendierten Lymphozyten mit einer Zelldichte zwischen  $0,8 \cdot 10^5$  und  $1,2 \cdot 10^6$  werden im Verhältnis von 10  $\mu$ l Zellsuspension zu 90  $\mu$ l 0,5 % LMP-Agarose gut vermischt und als zweite Schicht aufgetragen. Als Deckschicht werden nochmal 100  $\mu$ l LMP Agarose aufgebracht. Jede Agaroseschicht bedarf je nach Raumtemperatur zwischen 5 bis 10 Minuten der Erhärtung, bevor die nächste Schicht aufgetragen werden sollte. So lassen sich Risse in der Agarose beim Ablösen der Deckgläser vermeiden. Die Aufbewahrung der Präparate während der Härtung erfolgt bei 4° Celsius.

Die Zellpräparate werden dann für mindestens 1 h bei 4° Celsius unter Vermeidung von Lichteinwirkung über die gesamte Versuchsdauer in die Lyselösung gestellt.

Danach werden die Zellpräparate nach sorgfältigem Abtropfen der Lyselösung in die eisgekühlte Elektrophoresekammer eingebracht und mit 4° Celsius kaltem Elektrophoresepuffer überschichtet. Die Objektträger werden für genau 20 Minuten im Elektrophoresepuffer belassen (sogenantes 'unwinding'). Daraufhin wird die Elektrophorese mit 25 V und 300 mA gestartet. Dabei kann die Stromstärke über das Puffervolumen reguliert werden. Die Laufzeit der Elektrophorese beträgt genau 20 Minuten.

Anschließend werden die Zellpräparate nach sorgfältigem Abtropfen des Elektrophorese-Puffers für 5 Minuten mit Neutralisationspuffer überschichtet und nach sorgfältigem Abtropfen mit 50 µl Ethidiumbromid (20 µg/ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>) gefärbt.

### **2.5.3. Auswertung**

Das optimale Zeitfenster für die Auswertung der Objektträger liegt zwischen 12 und 24 Stunden nach der Anfärbung. Vorher bietet der Hintergrund zu wenig Kontrast, danach setzt zu starkes Verblässen der Kometenschweife ein.

Die Auswertung erfolgte mit 500-facher Vergrößerung mittels Fluoreszenzmikroskop und computergestützter Bildverarbeitung. Gemessen wird die Intensität der Fluoreszenz des DNA-gebundenen Ethidiumbromids. Pro Ansatz werden mindestens 50 Zellen (je 25 von zwei Objektträgern pro Ansatz) mit Hilfe des Programms NIH Image 1.54 (NIH, USA) ausgewertet. Es wird die Fläche der Gesamt-DNA (Kern-DNA und Schweif) und die Fläche des Comet-Schweifes ausgewählt. Dadurch kann das Programm die integrierte Dichte der ausgewählten Fläche berechnen (Summe der Grauwerte jedes Pixel = Fluoreszenzsignal der jeweiligen Fläche). Zur Quantifizierung wurde das Verhältnis zwischen Comet-Schweif (geschädigte DNA) und Gesamt-Comet (Gesamt-DNA) gebildet. Als Mass für den DNA-Schaden wurde der Anteil an DNA im Schweif angegeben. Berechnet wurde jeweils Mittelwert, Median, Standardabweichung, und die 1./3. Quartile.

Es ist erforderlich, dass die Auswertung sämtlicher Experimente innerhalb einer Studie von der selben Person vorgenommen werden, um subjektive Auswertungsunterschiede zu vermeiden.

## **2.6. Ethidiumbromid / Fluoresceindiacetat (FDA) Methode**

### **2.6.1 Testprinzip/ Färbelösungen**

Zur Bestimmung der Überlebensfähigkeit von Lymphozyten nach der Isolierung wurde zu Beginn der Studie die Methode nach Strauss mit leichten Modifikationen angewendet (Strauss, 1991). Das farblose FDA wird in die Zelle aufgenommen und nach kurzer Inkubation dort durch aktive Esterasen zu dem im Fluoreszenzmikroskop gut sichtbaren Fluorescein gespalten. Gleichzeitig wird die Membranintegrität durch fehlende Anfärbung der DNA mit Ethidiumbromid überprüft, da dieser Farbstoff nur bei defekter Zellmembran in die Zelle gelangen kann. Somit können also nur abgestorbene oder stark beschädigte Zellen durch Ethidiumbromid angefärbt werden.

Reagenzien (Färbemix-Stammlösungen):

- Ethidiumbromid (1mg/ml H<sub>2</sub>O)
- FDA (5mg/ml Aceton)
- PBS

Färbelösung (frisch anzusetzen) :

- 2,5 ml PBS + 15 µl FDA + 40 µl Ethidiumbromid

### **2.6.2 Durchführung**

Nach der Isolierung werden die Lymphozyten (Zellzahl ca 10<sup>6</sup>/ml) im Verhältnis 35 µl Zellsuspension zu 15 µl Färbelösung in ein Eppendorf-Cap gegeben und durch vorsichtiges Aspirieren vermischt. Anschließend erfolgt eine Inkubation von 3-5 Minuten bei Raumtemperatur. Es werden 35 µl dieser Suspension auf einen Objektträger aufgebracht.

### **2.6.3 Auswertung**

Die Auswertung des Objektträgers erfolgt unter dem Fluoreszenzmikroskop. Dabei werden 200 intakte Zellen (grüne Fluoreszenz des Fluoresceins) ausgezählt und der Anteil Ethidiumbromid positiver Zellen (rote Fluoreszenz des DNA gebundenen Ethidiumbromids) bestimmt. Die Überlebensrate entspricht dem Anteil lebender Zellen an der Gesamtzellzahl und wird in Prozent angegeben.

## 2.7. Zusammenstellung der Probandenkollektive

Geschlecht	Alter	Primäre Nierenerkrankung	Dialyseart	Dialyse(Jahre)
m ***	64	Polyzyst. Nierendegeneration	HD	6
m***	69	Chron. interstitielle Nephritis	HD	4
m***	74	Glomerulosklerose	HD	1
w***	76	Schrumpfniere bds.	HD	5
m	54	Schrumpfniere bds.	HD	9
m***	74	Schrumpfniere bds	HD	8
m***	68	Polyzyst. Nierendegeneration	HD	6
m	56	Endangitis obliterans	HD	11
w***	78	Diabet. Nephropathie	HD	6
w***	68	Polyzyst. Nierendegeneration	HD	10
m***	39	Glomerulonephritis(IgA-Typ)	HD	2
w***	69	Nephrolithiasis	HD	2
m	73	Chron. Glomerulonephritis	HD	18
m	59	Chron. Glomerulonephritis	HD	27
m	63	Chron. Glomerulonephritis	HD	24
m	48	Segmental/skleros. Glomerulonephritis	HD	19
w	78	Chron. Glomerulonephritis	HD	18
m	40	Chron. Glomerulonephritis	HD	0,5
m	76	Unbekannt	HD	2
w	53	Chron. Glomerulonephritis	HD	6
w***	72	Chron.Glomerulonephritis	HD	2
m***	70	Unbekannt	HD	2
w	75	Hypertensive Nephrosklerose	HD	1
w***	63	Interstit. Nephritis (Analg.)	HD	8
w	80	Polycyst. Nierendegeneration	HD	15
m***	33	Sek. Amyloidose	HD	1

Tabelle 15: Aufstellung des untersuchten Hämodialysekollektivs (n=26)

\*\*\* = Patienten, welche doppelt untersucht wurden.

Ein Patient mit Tumorerkrankung (Prostata)

<b>Geschlecht</b>	<b>Alter</b>	<b>Primäre Nierenerkrankung</b>	<b>Dialyseart</b>	<b>Dialyse(Jahre)</b>
w	72	Analgetikanephropathie	HDF	4
w	55	Polyzyst. Nierendegeneration	HDF	2
w	69	Chron. Glomerulonephritis	HDF	8
w	56	Polyzyst. Nierendegeneration	HDF	10
w	56	Skleros. Glomerulonephritis	HDF	5
m	75	Cron. Pyelonephritis	HDF	8
w	68	Hypertensive Nephropathie	HDF	2
m	66	Schrumpfniere bds.	HDF	4
w	50	Rez. Pyelonephritis	HDF	4
w	70	Chron. mesangio-prolif. GN	HDF	3
m	61	Nephrosklerose	HDF	2
w	64	Polyzystische Nierendegen.	HDF	10
m	77	Benigne Nephrosklerose	HDF	4
w	63	Pyelonephr./ Nephroskl.	HDF	3
m	71	Mesang. sklero. GN	HDF	9

Tabelle 16: Aufstellung des untersuchten Hämodiafiltrationskollektivs (n=15)  
Ein Patient mit Tumorerkrankung (Mamma)

Geschlecht	Alter	Nierenerkrankung	Kreatinin (mg/dl)
w	73	Diabetische Nephropathie	5,28
m	64	Hypertensive Nephropathie(?)	9,07
w	73	Ischämische Nephropathie	4,1
m	64	Skleros. Glomerulonephritis	3,9
m	79	Analgetika-Nephropathie	3,6
m	62	IgA-Nephritis	7,6
m	74	Interstitielle Nephritis	9,8
w	72	Diabetische Nephropathie	8
m	42	Diabetische Nephropathie	6,5
w	59	Ren. Anämie, Schrumpfn. re, Art. HT	6,3
w	75	Zystenniere	5,1
m	44	Schrumpfnieren	5,6
w	71	Diabetische Nephropathie	4,4
w	78	Schrumpfnieren bds, Art. HT, Sjögren	4,8
w	72	Diabetische Nephropathie	4,02
m	75	Progrediente Glomerulonephr.	3,38
m	69	Chron. Pyelonephritis	5,84
w	59	Nephrosklerose	6,2
m	63	Maligne Hypertonie	7,4
w	61	Diabetische Nephropathie	8,6
w	37	Chron. Glomerulonephritis	6,7
m	59	Zystenniere (bds.)	7,6
m	68	Nephrosklerose	8,72

Tabelle 17: Aufstellung des untersuchten Prädialyse-Kollektivs (n=23)



### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Vorversuche

##### 3.1.1 Auswahl des DNA-Farbstoffes

Vor Beginn der Versuche mit Patienten-Lymphozyten sollte anhand eines Vergleiches herausgefunden werden, welcher DNA-Farbstoff sich für unsere Zwecke am besten eignet. Neben dem am Institut bereits für den Comet-Assay etablierten Ethidiumbromid (Sigma Chemical Co., Taufkirchen) wurden außerdem die Farbstoffe Sybr-Green (Mo Bi Tec, Göttingen) teilweise mit farbkonservierenden Zusätzen, und mit Bisbenzimid (Sigma Chemical Co., Taufkirchen) getestet.

- Ethidiumbromid: 20 µl /ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>, davon 50 µl pro Objektträger
- Sybr-Green: 1/10.000 in DMSO, 1/10.000 verdünnen mit TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8), davon 50 µl pro Objektträger
- Anti-Fade: zusätzlich 50 µl pro Objektträger
- Mounting-Medium: zusätzlich 50 µl pro Objektträger
- Bisbenzimid: 3980 µl PBS/CMF + 20 µl Bibenzimid, davon 50 µl pro Objektträger

Vor-und Nachteile anderer DNA-Farbstoffe gegenüber Ethidiumbromid	Sybr-Green	Sybr-Green mit Anti-Fade	Sybr-Green mit Anti-Fade und Mounting-Medium	Bisbenzimid
<b>Vorteile</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ausgezeichneter Kontrast</li> <li>• keine Hintergrund-Anfärbung</li> <li>• selbst kleinste DNA-Fragmente noch gut erkennbar</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Keine nachweisbare Veränderung gegenüber den positiven Eigenschaften von Sybr-Green</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Keine nachweisbare Veränderung gegenüber den positiven Eigenschaften von Sybr-Green</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• gute Anfärbung der DNA</li> </ul>
<b>Nachteile</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• extrem schnelles Verblässen der DNA-Partikel</li> <li>• korrekte Auswertung dadurch nicht möglich</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Verblässen setzt langsamer ein als bei Sybr-Green alleine, aber immer noch zu schnell</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Keine Änderung gegenüber der Kombination aus Sybr-Green mit Anti-Fade</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• schlechterer Kontrast</li> <li>• Hintergrund stark angefärbt</li> </ul>

Tabelle 1: Vor-und Nachteile anderer DNA-Farbstoffe gegenüber Ethidiumbromid

Für die Beibehaltung des Ethidiumbromids als DNA-Farbstoff sprechen neben dem guten Kontrast und der Anfärbbarkeit, die Stabilität der Färbung unter der Einwirkung des Fluoreszenzlichtes. Diese Eigenschaft ist bei einer computergestützten Auswertung von größter Wichtigkeit. Bei der Verwendung von Sybr-Green beispielsweise setzt das Verblässen kleiner DNA-Partikel so schnell ein, dass eine unscharfe Aufnahme nicht wiederholt werden könnte.

### 3.1.2 Vergleich von mehreren Zellpräparaten der gleichen Person

Die Untersuchung der Lymphozyten mittels Comet Assay wurde bei jeweils 3 Personen, die an einer chronischen Nierenerkrankung litten, und bei 3 gesunden Kontrollpersonen durchgeführt. Von jeder Person wurden 5 Objektträger mit jeweils 50 Lymphozyten ausgewertet. Ziel des Experimentes war die genaue Analyse über Schwankungen des DNA-Schadens bei ein und derselben Person nach Auswertung unterschiedlicher Objektträger, welche alle genau den gleichen Testbedingungen unterworfen waren.

<b>Patient 1</b>	Präparat 1	Präparat 2	Präparat 3	Präparat 4	Präparat 5
Mittelwert	12,58	12,21	13,02	12,44	12,97
<b>Patient 2</b>	Präparat 1	Präparat 2	Präparat 3	Präparat 4	Präparat 5
Mittelwert	13,14	12,66	12,64	11,93	12,07
<b>Patient 3</b>	Präparat 1	Präparat 2	Präparat 3	Präparat 4	Präparat 5
Mittelwert	10,73	10,7	10,83	11,81	11,39

Tabelle 2: Vergleich von 5 Zellpräparaten von 3 Patienten mit chronischer Nierenerkrankung unter exakt gleichen Testbedingungen

<b>Patient 1</b>	<b>Werte</b>
Durchschnitt-Mittelwert	12,64
Durchschnitt-Standardabw.	0,35
Kreatinin (mg/dl)	4,02

<b>Patient 2</b>	<b>Werte</b>
Durchschnitt-Mittelwert	12,48
Durchschnitt-Standardabw.	0,49
Kreatinin (mg/dl)	3,38

Patient 3	Werte
Durchschnitt-Mittelwert	11,09
Durchschnitt-Standardabw.	0,44
Kreatinin (mg/dl)	5,84

Tabelle 3: Durchschnitt der gemessenen Schädigung und der sich daraus ergebenden Standardabweichung aus dem Vergleich der 5 Zellpräparate

Proband 1	Präparat 1	Präparat 2	Präparat 3	Präparat 4	Präparat 5
Mittelwert	10,16	10,74	10	10,73	10,67
Proband 2	Präparat 1	Präparat 2	Präparat 3	Präparat 4	Präparat 5
Mittelwert	11,58	11,4	11,62	10,56	11,27
Proband 3	Präparat 1	Präparat 2	Präparat 3	Präparat 4	Präparat 5
Mittelwert	11,16	11,09	11,51	11,1	11,78

Tabelle 4: Vergleich von 5 Zellpräparaten von 3 gesunden Probanden unter exakt gleichen Testbedingungen

Proband 1	Werte
Durchschnitt-Mittelwert	10,46
Durchschnitt-Standardabw.	0,35

Proband 2	Werte
Durchschnitt-Mittelwert	11,29
Durchschnitt-Standardabw.	0,43

Proband 3	Werte
Durchschnitt-Mittelwert	11,33
Durchschnitt-Standardabw.	0,31

Tabelle 5: Durchschnitt der gemessenen Schädigung und der sich daraus ergebenden Standardabweichung aus dem Vergleich der 5 Zellpräparate

Die gemessenen Abweichungen zwischen den Objektträgern mit Präparaten der selben Person sind so gering, dass sie die Ergebnisse der Studie nicht beeinträchtigen.

### 3.1.3 Simulation eines Transportvorganges

Da eine ausreichende Zahl geeigneter Patienten in Würzburg nicht zur Verfügung stand, musste auch auf auswärtige Dialysezentren ausgewichen werden. Dadurch verlängerte sich die Zeitspanne von der Abnahme des Blutes bis zum Beginn der Verarbeitung um bis zu 3 h, während das Blut der Würzburger Patienten meist schon innerhalb der ersten 30 Minuten nach Abnahme verarbeitet wurde. Zusätzlich muss während dieser Zeit von einer Lagerung bei Raumtemperatur und eventueller ständiger Bewegung der Entnahmeröhrchen ausgegangen werden (Motorradkurier).

Um auszuschließen, dass der spätere Verarbeitungsbeginn einen Effekt auf die Höhe des DNA-Schadens hat, wurde mit folgenden Voraussetzungen ein Transportvorgang simuliert:

- Einer gesunden Kontrollperson wurden direkt nacheinander 3 Monovetten Blut entnommen
- Verarbeitungsbeginn der Blutproben: Direkt / nach 2 h / nach 4h
- Lagerung bei Raumtemperatur
- Bewegung der Blutentnahmeröhrchen mittels Schüttler

Verarbeitung	Direkt	Nach 2h	Nach 4h
Mittelwert	11,17	11,52	11,51

Tabelle 6: Vergleich der DNA-Schädigung bei einer gesunden Kontrollperson nach unterschiedlichem Verarbeitungsbeginn

Der DNA-Schaden steigt bei späterem Arbeitsbeginn kaum messbar an. Somit bestanden keine Bedenken für eine Bearbeitung der Proben innerhalb eines Zeitfensters von 4 h.

### 3.1.4 Vergleich der DNA-Schäden vor und nach der Dialyse

Anhand dieses Experimentes sollte herausgefunden werden, ob der Vorgang der Hämodialyse direkte Effekte auf den von uns messbaren Schaden der DNA hat. Es wurden 3 Dialysepatienten jeweils vor und nach der Dialyse Blut entnommen.

Vor Dialyse	Patient 1	Patient 2	Patient 3
Mittelwert	11,9	11,5	11,63

Tabelle 7: DNA-Schaden von 3 Patienten vor der Dialyse

Nach Dialyse	Patient 1	Patient 2	Patient 3
Mittelwert	10,37	11,48	11,31

Tabelle 8: DNA-Schaden von 3 Patienten nach der Dialyse

Ergebnisse Vor / Nach Dialyse	Patient 1	Patient 2	Patient 3
Durchschnitt-Mittelwert	10,78	11,49	11,63
Durchschnitt-Standardabw.	0,58	0,01	0,22

Tabelle 9: Ergebnisse des Vergleichs vor / nach Dialysevorgang bei 3 Patienten

Nach dem Dialysevorgang konnte bei allen Patienten eine leichte Erniedrigung des DNA-Schadens festgestellt werden. Man beachte jedoch die fehlende Signifikanz und das kleine Kollektiv. Trotzdem wurden die anschließenden Versuche mit den Blutproben von Dialysepatienten immer vor dem Vorgang der Dialyse durchgeführt.

### 3.1.5 Untersuchung der Zellüberlebensrate mit der Ethidiumbromid / Fluoresceindiacetat Methode

Zu Beginn der Studie wurde mittels dieser Methode bei 6 Dialysepatienten die Zellüberlebensrate der Lymphozyten nach der Isolierung mittels Histo-Paque untersucht. Da die Auszählung beständig > 95 % überlebende Zellen ergab, wurde auf eine kontinuierliche Mituntersuchung verzichtet.

### 3.2 Untersuchung des DNA-Schadens der peripheren Lymphozyten mittels Comet Assay bei chronisch Nierenkranken mit und ohne Dialysebehandlung

#### 3.2.1 Kontrollgruppe

Es wurden die Lymphozyten von 21 gesunden Probanden im Alter zwischen 21 und 91 Jahren mittels Comet Assay untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 8 dargestellt.

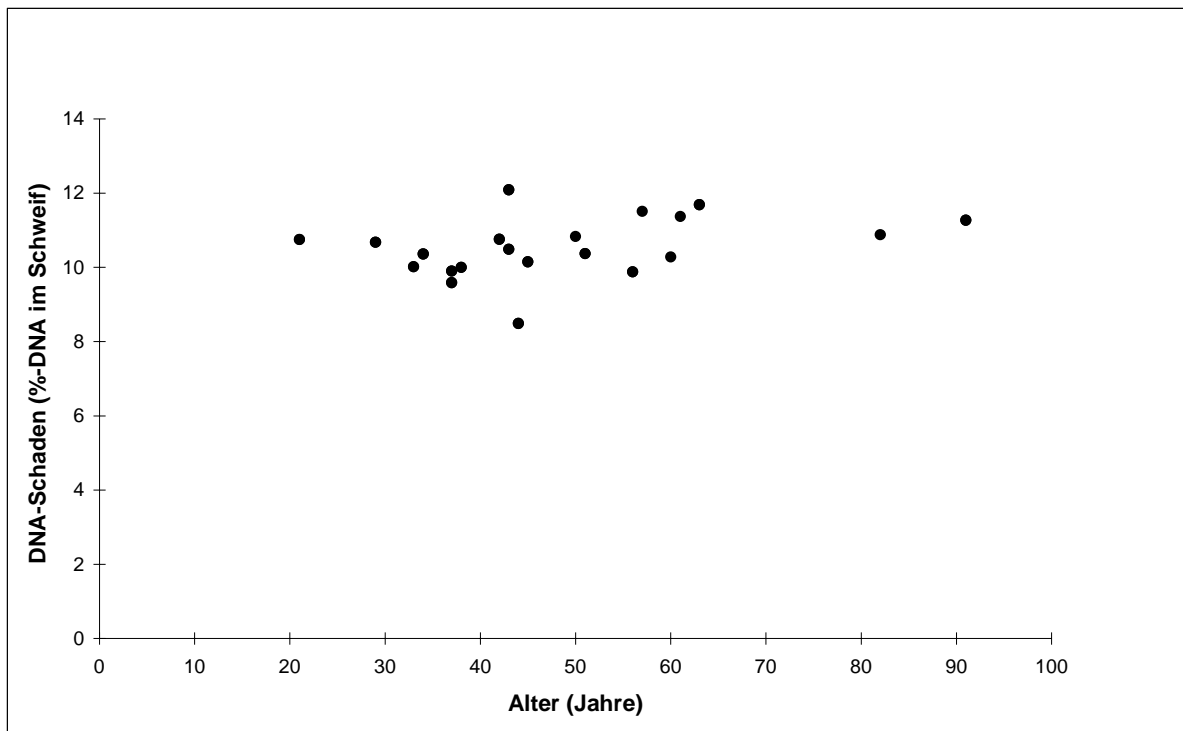


Abbildung 8: Beziehung zwischen DNA-Schaden und dem Alter bei 21 Probanden

Es konnte keine Beziehung zwischen der Höhe des DNA-Schadens und der Höhe des Alters festgestellt werden. Nicht in Abbildung 8 vermerkt ist die ständige Mituntersuchung einer Kontrollperson mit einem Mittelwert von 10,97%, um eventuelle Unregelmäßigkeiten während der Versuchsdurchführung feststellen zu können.

### 3.2.2 Intraindividuelle Schwankungen der ständigen Kontrollperson

An 23 Versuchstagen wurde das Blut einer ständigen Kontrollperson jeweils mit dem Blut der Patienten zusammen ausgewertet. Dies geschah, um eventuelle Unregelmäßigkeiten des Versuchablaufs zu erkennen und den Test gegebenenfalls zu wiederholen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 9 dargestellt.

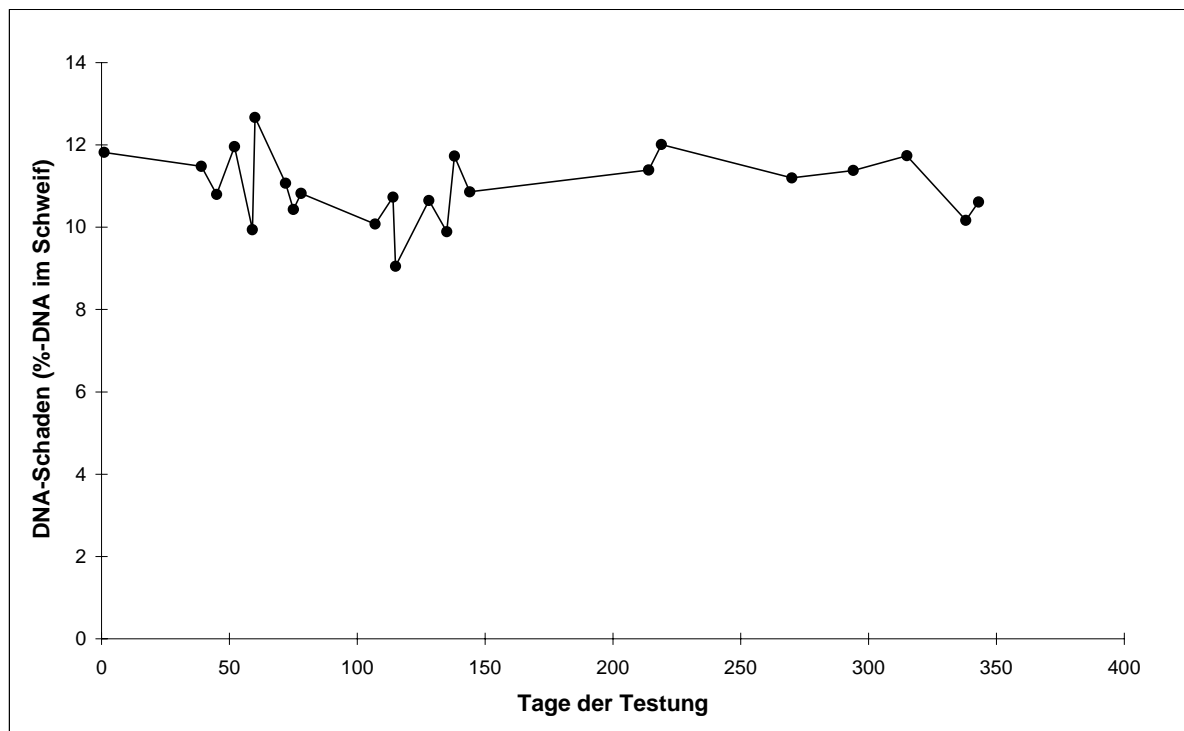


Abbildung 9: Intraindividuelle Schwankungen des DNA-Schadens bei der ständigen Kontrollperson an 23 Versuchstagen

Es ergaben sich Schwankungen von ca. 9% um den Mittelwert von 10,97% aller Messungen.

### 3.3.1 Chronisch Nierenkranke ohne Dialysebehandlung

Es wurden Lymphozyten von 23 Patienten mit chronischer Nierenerkrankung mittels Comet Assay untersucht. Die Einteilung des Schweregrades der jeweiligen Erkrankung erfolgte über den Spiegel des Serum-Kreatinins (mg/dl). Das Ergebnis ist in Abbildung 4 dargestellt.

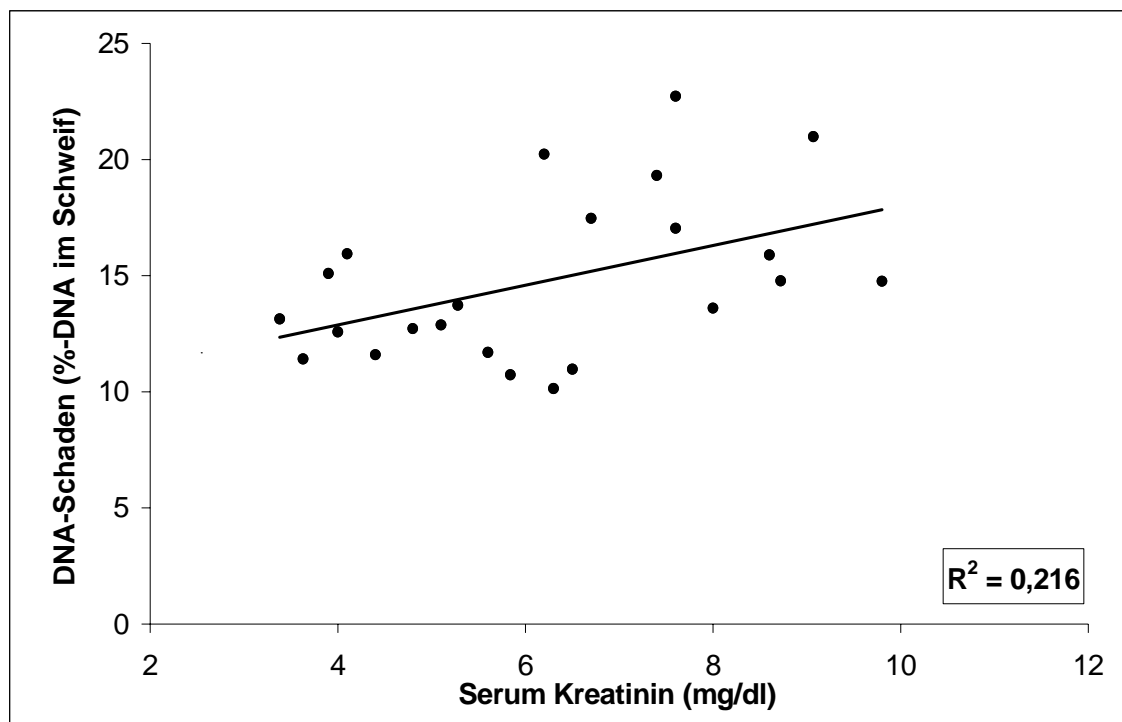


Abbildung 4: Beziehung zwischen DNA-Schaden und der Höhe des Serum-Kreatinins bei 23 Präodialyse-Patienten

Der DNA-Schaden steigt mit der Konzentration des Serum-Kreatinins. Während bis zu einem Kreatininspiegel von 6 mg/dl die gemessenen Schäden teilweise nur geringfügig gegenüber dem Kontrollmittelwert von 10,5% erhöht waren, waren die Zellen der Patientengruppe mit darüber hinausgehenden Werten mit einem signifikant erhöhten Schaden gegenüber der Kontrollgruppe behaftet (siehe auch Abbildung 10). Nicht in Abbildung 4 vermerkt ist die beständige Mituntersuchung einer Kontrollperson mit einem Mittelwert von 10,97%, um eventuelle Unregelmäßigkeiten während der Versuchsdurchführung feststellen zu können.



### 3.3.2 Chronisch Nierenkranke mit Hämodialysebehandlung

Es wurde das Blut von 26 chronisch hämodialysierten Patienten mittels Comet-Assay untersucht (Behandlungsdauer zwischen 8 und 320 Monaten). Die Ergebnisse werden in Abbildung 5 dargestellt.

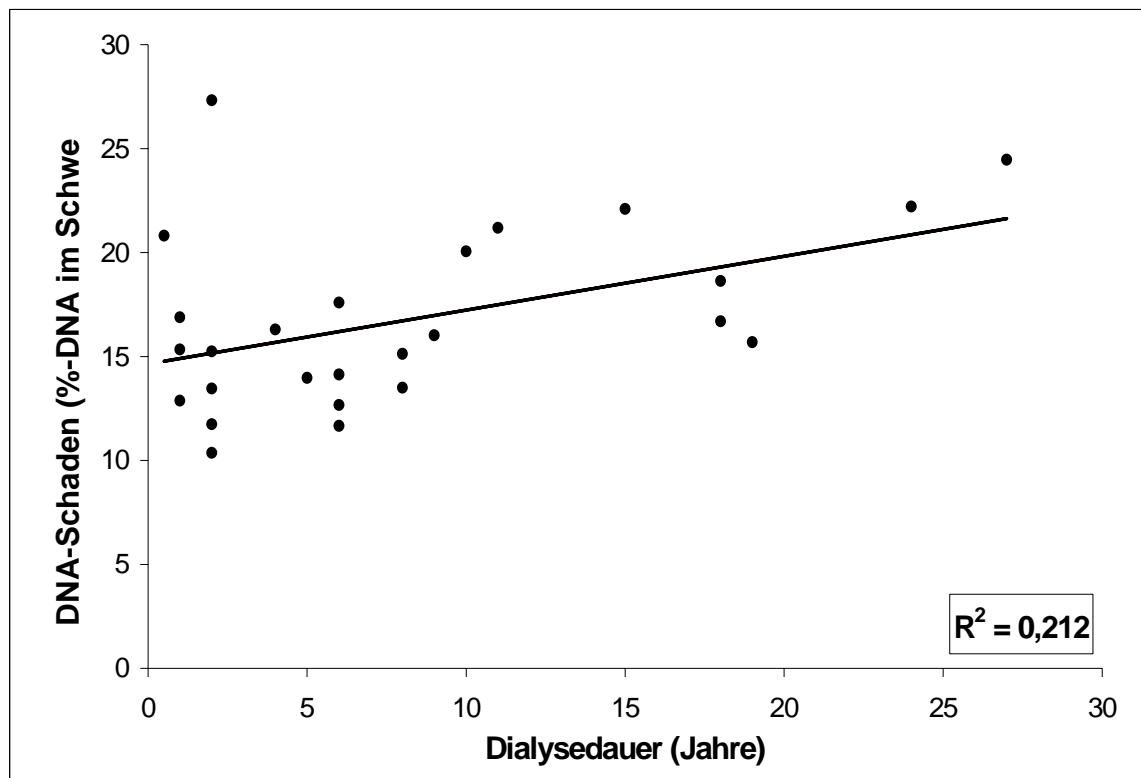


Abbildung 5: Beziehung zwischen dem DNA-Schaden und der Dauer der Hämodialyse bei 26 Patienten

Der zelluläre DNA-Schaden nimmt mit der Länge der Behandlung zu. In den ersten Jahren nach Beginn der Dialyse wurden vereinzelt stark erhöhte Werte bestimmt. Die Lymphozyten des gesamten Kollektivs wiesen eine signifikant erhöhte DNA-Schäden gegenüber der Kontrollgruppe auf (siehe auch Abbildung 10). In der Untergruppe der Patienten, welche länger als 10 Jahre behandelt wurden, war der gemessene Schaden nahezu doppelt so hoch wie der Kontrollwert von 10,5%. Nicht in Abbildung 5 vermerkt ist die beständige Mituntersuchung einer Kontrollperson mit einem Mittelwert von 10,97%, um eventuelle Unregelmäßigkeiten während der Versuchsdurchführung feststellen zu können.

### 3.3.3. Doppelt-Bestimmung des vorherigen Kollektivs

Insgesamt 14 Patienten aus der obigen Gruppe (3.2.2) wurden zu einem anderen Zeitpunkt nochmals untersucht, um intraindividuelle Schwankungen des DNA-Schadens zu quantifizieren. Die Behandlungsdauer dieser Patienten lag zwischen 24 und 120 Monaten. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6 dargestellt.

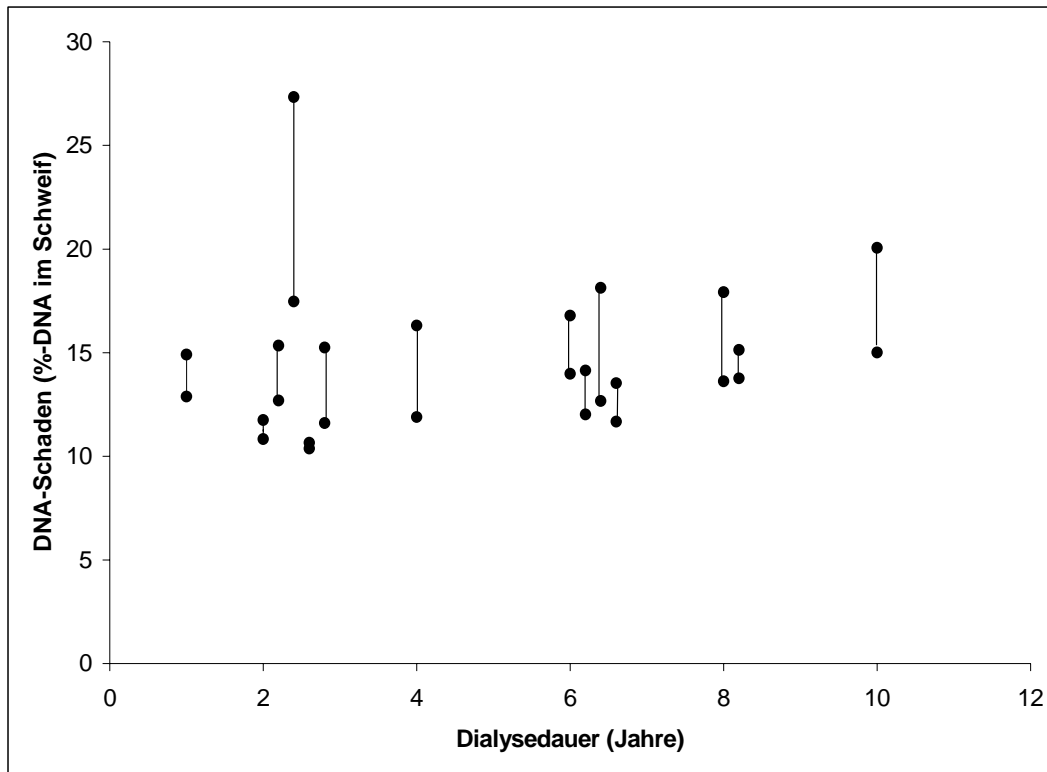


Abbildung 6: Beziehung zwischen dem zellulären DNA-Schaden und der Dauer der Hämodialysebehandlung bei 14 Patienten, deren Blut jeweils doppelt untersucht wurde

Niedrigste Standardabweichung	Höchste Standardabweichung	Durchschnitt der Standardabweichungen	Standardabweichung vom Durchschnitt
0,2	6,97	2,36	1,72

Tabelle 10: Jeweilige Standardabweichungen der doppelt untersuchten Patienten

Die Höhe der Standardabweichung ist individuell sehr verschieden. Nicht in Abbildung 6 vermerkt ist die beständige Mituntersuchung einer Kontrollperson mit einem Mittelwert von 10,97%, um eventuelle Unregelmäßigkeiten während der Versuchsdurchführung feststellen zu können.

### 3.3.4. Chronisch Nierenkranke mit Hämodiafiltrationsbehandlung

Es wurden die Lymphozyten von 15 Patienten untersucht, die mit dem Verfahren der Hämodiafiltration behandelt wurden und eine Behandlungsdauer zwischen 24 und 120 Monaten aufwiesen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7 dargestellt.

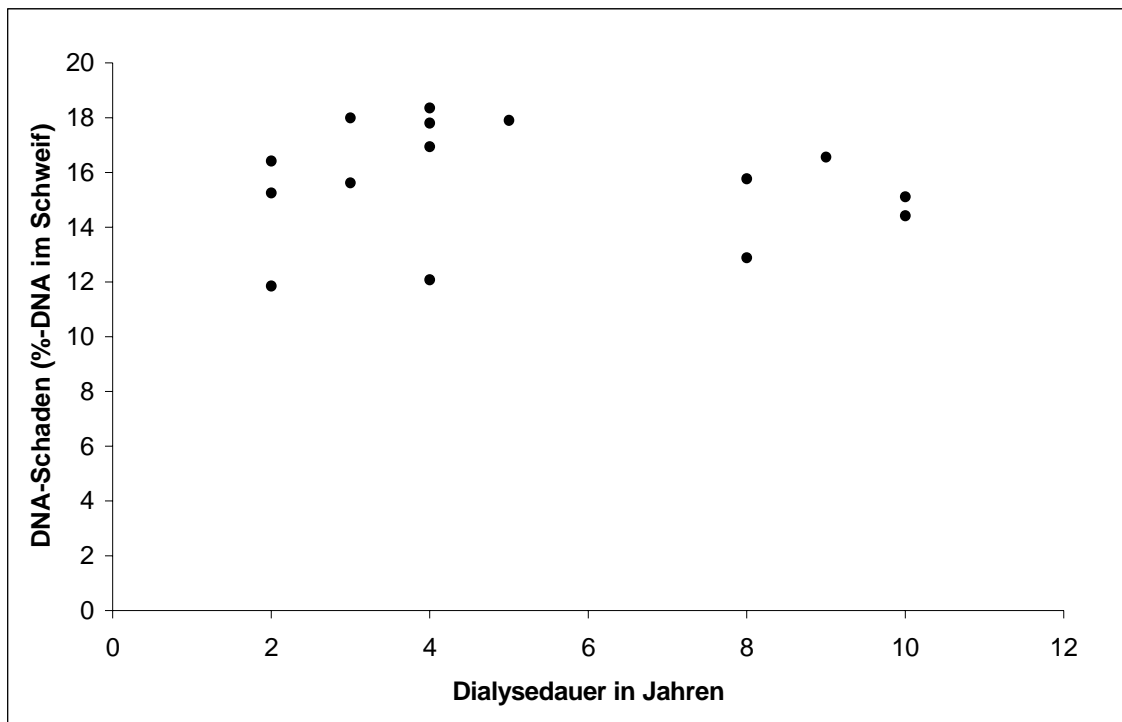


Abbildung 7: Beziehung zwischen DNA-Schaden und Dauer der Hämodiafiltrationsbehandlung bei 15 Patienten

Bezeichnung der einzelnen Gruppen	Hämodialyse bis 10 Jahre Behandlungsdauer	Hämodiafiltration bis 10 Jahre Behandlungsdauer
Mittelwert	15,53	15,66
Standardabw	3,93	2,11

Tabelle 11: Vergleich von Hämodialyse- und Hämodiafiltrationspatienten des gleichen Behandlungszeitraumes

Bei dieser Form der Dialyse konnte kein Zusammenhang zwischen Behandlungsdauer und Höhe des DNA-Schadens festgestellt werden. Insgesamt waren die Schäden, die innerhalb dieses Kollektivs gemessen wurden jedoch vergleichbar mit denen der Hämodialyse-Patienten im gleichen Behandlungszeitraum. Nicht in Abbildung 7

vermerkt ist die beständige Mituntersuchung einer Kontrollperson mit einem Mittelwert von 10,97%, um eventuelle Unregelmäßigkeiten während der Versuchsdurchführung feststellen zu können.

### 3.4 Vergleichende Darstellung der Ergebnisse aller Probandengruppen

Bezeichnung der einzelnen Gruppen	Hämodialyse	Hämodialyse (Untergruppe von Hämodialyse)	Hämodialyse (Untergruppe von Hämodialyse)	Hämodiafiltration
	Einfach-vermessen	>10 Jahre Behandlung	Doppelt-vermessen	Einfach-vermessen
Anzahl	26	8	14	15
Alter (Jahre)	64 +/- 13	65 +/- 11	65 +/- 13	64 +/- 8
Geschlecht (M/F)	16:10	5:3	8:6	5:10
Behandlungsdauer (Jahren)	8,2 +/- 7,5	17,7 +/- 5,8	4,6 +/- 2,8	5,2 +/- 2,9
<b>DNA-Schaden</b>	<b>16,7 +/- 4,2</b>	<b>20,1 +/- 2,9</b>	<b>14,5 +/- 3,5</b>	<b>15,6 +/- 2,1</b>

Tabelle 12: Allgemeine und spezielle Daten der verschiedenen Dialysegruppen

Bezeichnung der einzelnen Gruppen	Prädialyse- Patienten mit Serum-Kreatinin von 3,3-9,8 mg/dl	Prädialyse-Patienten mit Serum-Kreatinin >6mg/dl (Untergruppe von Prädialyse-Patienten)
	Anzahl	23
Alter	65 +/- 11	59 +/- 11
Geschlecht (M/F)	12:11	7:4
Kreatinin (mg/dl)	6,2 +/- 1,8	7,8 +/- 1,1
<b>DNA-Schaden</b>	<b>14,7 +/- 3,4</b>	<b>17,1 +/- 3,5</b>

Tabelle 13 : Allgemeine und spezielle Daten der verschiedenen Prädialysegruppen

Bezeichnung der einzelnen Gruppen	Kontrollen	Kontrollen > 50 Jahre (Untergruppe von Kontrollen)	Ständige Kontrollperson
Anzahl	21	9	23 Messungen
Alter	48 +/- 17	63 +/- 14	25
Geschlecht (M/F)	9:12	4:5	M
<b>DNA-Schaden</b>	<b>10,5 +/- 0,8</b>	<b>10,9 +/- 0,6</b>	<b>10,9 +/- 0,8</b>

Tabelle 14: Allgemeine und spezielle Daten der verschiedenen Kontrollgruppen

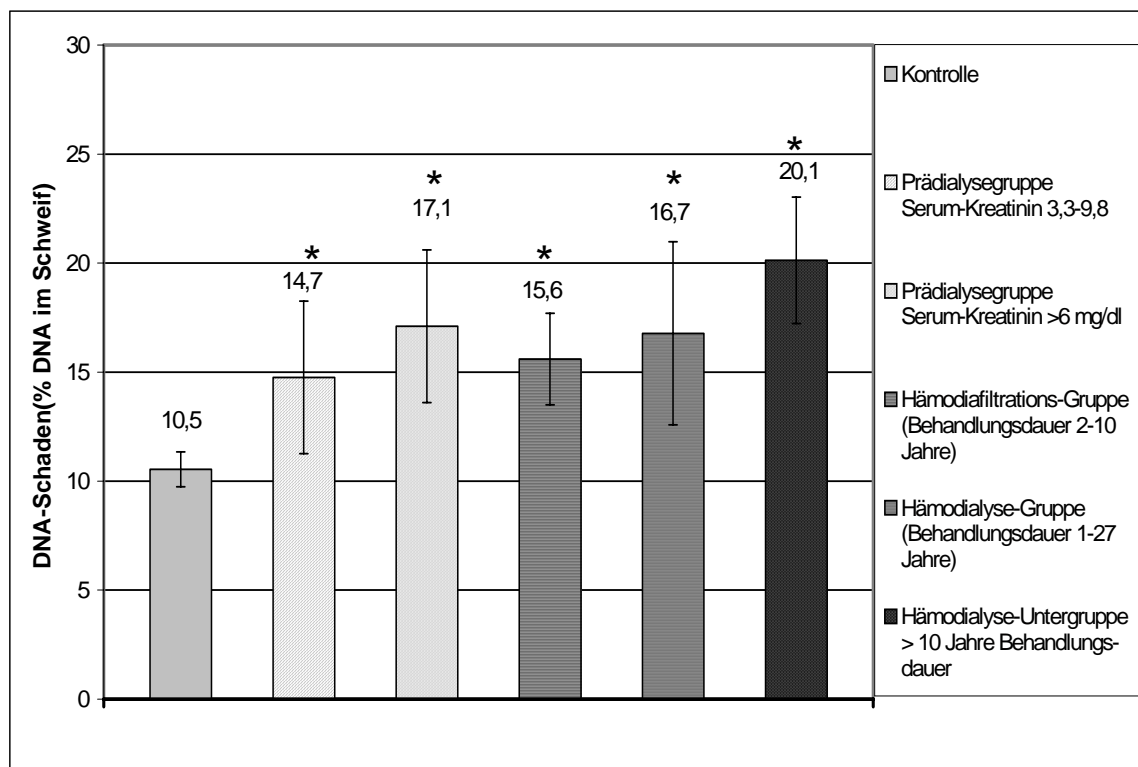


Abbildung 10: Darstellung der wichtigsten untersuchten (Unter-)Gruppen in einer Zusammenfassung. \*= p < 0,01 (Student T-Test, Man-Whitney U-Test)

Abbildung 10 veranschaulicht in einer Zusammenfassung nochmals die wichtigsten Ergebnisse, welche innerhalb der Studie erzielt wurden. Alle Gruppen zeigten eine durch den Student T-Test und den Man-Whitney U-Test nachgewiesene signifikante Erhöhung gegenüber der Kontrollgruppe. Es fällt auf, dass die Prädialyse-Untergruppe mit Kreatininspiegeln über 6 mg/dl eine um etwa 16% höhere Schädigung als der Durchschnitt des Prädialyse Kollektivs aufwiesen.

In der Gruppe der Hämodialyse-Patienten ergibt sich für Patienten mit einer Behandlungsdauer von 10 Jahren und länger nahezu eine Verdoppelung der Schäden verglichen mit der Kontrolle und eine etwa 20%-ige Erhöhung bezogen auf den Gesamtdurchschnitt der Hämodialyse-Patienten. Gegenüber den Patienten mit einer Behandlungsdauer bis einschliesslich 10 Jahre (siehe Tabelle 11, Kapitel 3.2.4.) war ein noch deutlicherer Anstieg um ca 30% zu verzeichnen.

Bei Patienten mit Hämodiafiltrationsbehandlung muss berücksichtigt werden, dass bei ihnen die Behandlungsdauer maximal 10 Jahre betrug, und es hier somit nur bedingt möglich war, einen Vergleich mit der Hämodialysegruppe zu ziehen. Wurden allerdings Hämodialyse und Hämodiafiltrationspatienten in einem ähnlichen Behandlungszeitraum miteinander verglichen (siehe Tabelle 11, Kapitel 3.2.4.), so zeigten sich sehr ähnliche Ergebnisse.

## 4. Diskussion

Patienten mit fortgeschrittener Niereninsuffizienz sind oftmals von einem klinisch manifesten Immundefekt betroffen, welcher neben anderen Folgen auch zu einer verminderten Tumorkontrolle, der sogenannten Immunosurveillance (Köhler et al., 1993) führen kann. Da eine auffällig hohe Krebsrate in diesem Patienten-Kollektiv besteht (Maisonneuve et al., 1999) und bei Dialysepatienten verstärkt gentoxische Einflüsse anhand einer reduzierten DNA-Reparaturfähigkeit (Vamvakas et al., 1996) und einer erhöhter Mikrokern-Rate (Stopper et al., 1999) nachgewiesen werden konnte, lässt sich hier ein Zusammenhang vermuten. In der hier vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen einer moderaten und schweren Niereninsuffizienz sowie der Effekt einer Nierenersatz-Therapie durch Hämodialyse oder Hämodiafiltration auf die Zellkern-DNA von frisch isolierten, peripheren Lymphozyten untersucht.

Das hierfür verwendete Testsystem, der Comet Assay, ist ein sensitives Verfahren mit dem schnell und relativ kostengünstig DNA-Schäden auf Einzelzellniveau (Singh et al., 1988) analysiert und quantifiziert werden können. Da bis zu diesem Zeitpunkt noch keine veröffentlichte Untersuchung ähnlicher Kollektive mittels Comet-Assay vorliegt, wurden Vorversuche zur Gewährleistung eines optimalen Versuchsablaufes durchgeführt. In einem Vergleich verschiedener DNA-Farbstoffe wurde gezeigt, dass Ethidiumbromid für die Auswertung mittels Fluoreszenzmikroskop und Bildverarbeitungs-Software aufgrund seiner Farbbeständigkeit und Anfärbbarkeit das für unsere Zwecke am besten geeignete Präparat war. Eine andere Studie bestätigte dies jetzt nachträglich (Bauch et al, 1999).

Von jeder Testperson wurden pro Versuchsansatz jeweils 2 Zellpräparate angefertigt und ausgewertet. Dabei stellte sich die Frage, ob zwischen den Objektträgern Abweichungen in ihren Einzel-Ergebnissen bestand. In einem Versuch mit Blut von drei chronisch nierenkranken Patienten sowie drei gesunden Kontrollpersonen konnte jedoch anhand der Auswertung von jeweils 5 Zellpräparaten pro Person demonstriert werden, dass die festgestellten Abweichungen zwischen Objektträgern mit Präparaten derselben Person gering sind und die Ergebnisse insgesamt nicht beeinträchtigen.



Die ausreichende Rekrutierung geeigneter Testpersonen im Raum Würzburg war nicht möglich. Ein Ausweichen auf andere Dialysezentren bringt jedoch einen späteren Verarbeitungsbeginn mit sich, welcher zusätzlich mit Lagerung bei Raumtemperatur und ständiger Bewegung der Blutentnahmeröhrchen (Motorrad-Kurier) einhergehen kann. Da zu dieser Thematik bisher keine Publikationen vorliegen, konnte in einem simulierten Transportversuch, der unseren Gegebenheiten entsprach, gezeigt werden, dass praktisch keine Beeinträchtigung der Ergebnisse durch einen Transport erfolgt.

Ein Vergleich der DNA-Schäden vor und nach der Dialyse sollte veranschaulichen, ob der Vorgang der Dialyse direkten Einfluss auf den gemessenen Schaden der Lymphozyten hat. Bei allen 3 untersuchten Patienten war nach der Dialyse ein unwesentlich geringerer Schaden als vor Dialyse detektiert worden. Eine Erklärung hierfür wäre die Eliminierung von Urämie-Toxinen und eine dadurch bereits während der Dialyse einsetzende, verbesserte DNA-Reparatur. Möglich wäre auch eine Ausschleusung stark geschädigter Lymphozyten aus dem Blutkreislauf der Patienten. Für eine konkrete Aussage über den direkten Einfluss der Dialyse war die Anzahl der untersuchten Patienten jedoch zu gering. In der vorliegenden Studie erfolgten die Blutabnahme vor Dialysebeginn und erlaubten somit die Messung größtmöglicher DNA-Schäden.

Bei der Untersuchung der Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz konnte eine Zunahme des DNA-Schadens mit Anstieg des Serum-Kreatinins festgestellt werden. Während Patienten mit einem Kreatininspiegel unter 6 mg/dl teilweise noch Werte verzeichneten, die sich nur unwesentlich von der Kontrolle unterschieden, bestanden bei Patienten mit höherem Serumkreatinin eine signifikante Erhöhung des Schadens gegenüber der Kontrolle. Die gemessenen Werte liegen mit wenigen Ausnahmen deutlich über denen der Patienten, die sich erst seit wenigen Jahren im Hämodialyse-Programm befinden.

Hieraus könnte sich die Indikation ergeben bei niedrigerem Serum-Kreatinin als bisher mit der Dialyse zu beginnen. Dies hätte jedoch eine längere Dialysedauer zur Folge und die Patienten, die mehr als 10 Jahre behandelt wurden, wiesen insgesamt eine noch höhere Schädigung auf. Ein weiterer Aspekt, der für eine frühere Hämodialyse-

Behandlung spräche, wäre die relativ hohe Inzidenz von Tumoren innerhalb der ersten Jahre der Dialyse (Maisonneuve et al., 1999). Die meisten Krebsarten haben Latenzzeiten von mehreren Jahren, so dass in diesen Fällen von einer Entstehung der Tumoren bereits vor Beginn der Dialyse-Behandlung ausgegangen werden kann (Heidland et al., 2000). Inwieweit ein früherer Behandlungsbeginn Einfluss auf die Entstehung von Tumoren hat, ließe sich daher nur durch eine umfassende Verlaufsstudie zeigen.

Bis heute ist noch ungeklärt, ob die Zellen, welche 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. Daher wäre es wichtig zu untersuchen, ob DNA-Schäden in nichtzirkulierenden Zellen außerhalb des Blutkreislaufes ebenfalls festgestellt werden können.

Die Gruppe der Hämodialyse-Patienten weist ebenfalls eine signifikante Erhöhung der DNA-Schäden gegenüber der Kontrollgruppe auf. Besonders deutlich wird dies nach einer mehr als zehnjährigen Behandlung. In diesem Kollektiv ist nahezu eine Verdoppelung der gemessenen Schäden feststellbar. Es erfolgt also eine mit der Behandlungsdauer zunehmende Schädigung. Auffällig sind vereinzelte hohe Werte in den ersten beiden Jahren der Behandlung. Inwieweit sich daraus ein Zusammenhang mit der oben erwähnten erhöhten Krebsinzidenz innerhalb der ersten Jahre nach Beginn der Dialyse-Behandlung ergibt, ist noch unklar. Eine genauere Beobachtung dieser Patienten kann hierüber weiteren Aufschluss geben.

Patienten aus dieser Gruppe, die doppelt vermessen wurden, zeigten teilweise eine hohe Standardabweichung zwischen den beiden Messungen. Noch deutlicher wurde dieses Phänomen bei den zahlreichen Messungen der ständigen Kontrollperson während der gesamten Versuchsreihe, die eine Standardabweichung von etwa 7% vom Gesamt-Mittelwert ergab. Andere Studien mit vergleichbaren Versuchsanordnungen zeigen sogar Standardabweichungen von bis zu 15% (Diem et al., 1999). Eine starke Variabilität bei Comet Assay Untersuchungen bei Zellproben der gleichen Person zu

verschiedenen Zeitpunkten wird insgesamt als problematisch angesehen (Collins et al., 1997). Da der Comet Assay jedoch selbst bei genauester Versuchsdurchführung methodische und patientenspezifische Schwankungen aufweist, muss eine Interpretation immer mit Zurückhaltung erfolgen. Der Zustand einer akuten Infektion, Mangel-Ernährung (Betancourt et al., 1995), oder Nüchternblut-Abnahme (Green et al., 1994) alleine reicht aus, 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). Aus diesem Grund sollte darauf geachtet werden, dass die Teilnehmer einer Studie während der letzten Woche vor der Blutentnahme sich nicht übermäßig körperlich belastet haben.

Allen Gruppen war eine Inhomogenität in der Anzahl der geschädigten Lymphozyten gemeinsam. Manche Patienten wiesen lediglich vereinzelte, schwach bis sehr stark beschädigte Lymphozyten auf, während die übrigen Lymphozyten von denen der Kontroll-Personen oft nicht zu unterscheiden waren. Andere Patienten zeigten eher ein kontinuierliches Schadensspektrum sämtlicher Zellen auf. Jedoch fanden sich auch innerhalb der Kontrollen einzelne, schwach bis stark geschädigte Lymphozyten. Es bedarf daher weiterer Untersuchungen um festzustellen, inwieweit diese Variabilitäten methodisch bedingt und vermeidbar sind. Diese Standardisierungsproblematik erfährt auch international derzeit große Beachtung (Speit et al., 1999; De Boeck et al., 2000).

Im Gegensatz dazu scheint bei den mittels Hämodiafiltration behandelten Patienten die Behandlungsdauer keinen nachteiligen Einfluss auf die DNA-Schädigung zu besitzen. Insgesamt lag hier eine ähnlich hohe Schädigung wie bei Patienten der Hämodialyse in einem vergleichbaren Behandlungszeitraum vor. Da bisher vornehmlich Patienten mit schlechterem Allgemeinzustand, (bedingt durch Störungen des cardio-vaskulären Systems, Malnutrition, etc.) mit der für die Patienten zugleich besser verträglichen Methode behandelt wurden, war hier von einer größeren Schädigung ausgegangen worden. Es ist vorstellbar, dass die Hämodiafiltrations-Behandlung eine günstige Wirkung auf das Auftreten von DNA-Schäden hat. Dies stünde in Einklang mit Befunden, nach denen Hämodiafiltrationspatienten einen niedrigeren AGE-Spiegel (Advanced Glycation Endproducts) gegenüber Hämodialysepatienten aufwiesen. AGEs

können sowohl durch ihre proinflammatorische Wirkung, als auch durch Modifikation von Proteinen indirekt DNA-Schäden verursachen (Gerdemann et al., 2000). Einen genaueren Aufschluss, ob Hämodiafiltration zu einer reduzierten Schädigung der DNA führt, kann daher nur durch eine Verlaufsstudie an Einzelpersonen nach einer Umstellung von Hämodialyse auf Hämodiafiltration erfolgen.

Bei der mituntersuchten Kontrollgruppe konnte kein Zusammenhang zwischen Alter und DNA-Schaden festgestellt werden. Dieses Ergebnis wird durch eine andere Studie bestätigt (Singh et al, 1991).

Insgesamt zeigt sich, dass alle Patientengruppen eine signifikante Erhöhung der DNA-Schäden im Zellkern von Lymphozyten aufweisen, die im Zusammenhang mit der erhöhten Malignitätsrate in den untersuchten Patientenkollektiven stehen könnten. Inwieweit sich daraus therapeutische Konsequenzen ergeben, wird Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

## 5. Zusammenfassung

Schon vor mehr als zwei Jahrzehnten wurde eine erhöhte Tumorentstehungsrate bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung unter Dialysebehandlung festgestellt. Eine der wahrscheinlichsten Erklärungen für dieses Phänomen ist die klinische Manifestation eines Immundefektes innerhalb dieses Patientenkollektives. Lymphozyten von Patienten mit chronischen Nierenerkrankungen ohne Dialyse und Dialysepatienten mit einer Behandlungsdauer von mehr als 120 Monaten verfügen nachweislich über eine reduzierte DNA-Reparaturfähigkeit. Zusätzlich weisen sie eine erhöhte Rate von Mikrokernen auf, was für verstärkte genotoxische Einflüsse im Patientenblut spricht.

In dieser Arbeit wurde mittels Comet Assay, einem sensiblen Testverfahren zur Quantifizierung von DNA-Schäden auf Einzellzellniveau, aus verschiedenen Gruppen von chronisch Nierenkranken die Zellkern-DNA von peripheren Lymphozyten auf Schäden untersucht. Neben Patienten mit leicht bis stark erhöhten Kreatininspiegeln wurden auch Kollektive mit Hämodialyse und Hämodiafiltrationsbehandlung auf DNA-Schäden untersucht und miteinander verglichen.

In den Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass in der Gruppe der chronisch Nierenkranken ohne Dialysebehandlung offensichtlich ein Zusammenhang zwischen Höhe des Kreatininspiegels und einer durch den Comet Assay feststellbaren DNA-Schädigung besteht: im Kollektiv der Hämodialysepatienten ist mit der Dauer der Behandlung ein Anstieg des Schadens zu verzeichnen. Bei Patienten mit Hämodiafiltrationsbehandlung hingegen war kein Anstieg der DNA-Schäden mit der Länge der Behandlung feststellbar. Bei gleicher Behandlungsdauer bestehen zwischen Hämodialyse- und Hämodiafiltrationsgruppe nur unwesentliche Schadensdifferenzen. Dies war nicht vorhersehbar, da besonders Patienten mit stärkeren gesundheitlichen Einschränkungen in den Vorzug der Hämodiafiltration gelangen. Insgesamt zeigten jedoch alle untersuchten Gruppen einen signifikanten Anstieg der DNA-Schädigung gegenüber den Kontrollen.

Da der Comet Assay derzeit noch mit methodischen und patientenbedingten Ergebnisschwankungen behaftet ist, muss jede Interpretation mit Zurückhaltung erfolgen.

Insbesondere muss anhand eines Zusammenhanges hinsichtlich Genotoxizität und vorliegender Erkrankung untersucht und kritisch hinterfragt werden, ob ein früherer Beginn der Dialyse-Behandlung für den Patienten von Vorteil sein könnte. Inwieweit eine Umstellung von Hämodialyse auf Hämodiafiltration die Schäden der lymphozytären Zellkern DNA und somit eventuell auch die Tumorentstehungsraten beeinflusst, ist durch weitere Forschungen auf diesem Gebiet zu klären.

## 6. Literatur

Bauch T, Böcker W, Mallek U, Müller W-U, Streffer C: Optimization and standardization of the Comet Assay for analyzing the repair of DNA damage in cells. *Strahlenther und Onk* 1999; 175; 333-40

Benner SE, Wargovich MJ, Lippman SM, Hong WK: Micronuclei : a potential intermediate marker for chemoprevention of aerodigestive tract cancer. *J. Cell Biochem Suppl* 1993; 17F, 250-254

Betancourt M, Ortiz R, Gonzalez C, Perez P: Assessment of DNA-Damage in leukocytes from infected and malnourished children by single cell gel electrophoresis/comet assay. *Mut Res* 1995; 331, 65-77

Böyum A : Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scandi J of Clin Lab Invest* 1968; 21 Suppl. 97

Collins AR, Dusinska M, Franklin M, Somorovska M, Petrovska H, Duthie S, Filion L, Panayiotidis M, Roslova K, Vaughan N : Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation and applications. *Environ Mol Mutagen* 1997; 30, 139-146

De Boeck M, Touil N, De Visscher G, Kirsch-Volders M : Validation and implementation of an internal standard in comet assay analysis. *Mut Res* 2000; 469, 181-197

Diem E, Rüdiger HW : Mikrokerntest und Comet Assay: Ein Ergebnisvergleich bei Normalprobanden. *Arbeitsmed Sozialmedizin Umweltmed* 1999; 34, 11, 437-441

Full M : Untersuchungen zum möglichen Zusammenhang zwischen DNA-Reparatur und Mikrokern-Induktion in Säugerzellen. *Dissertationsschrift* 1997; Universität Würzburg

Gerdemann A, Lemke HD, Nothdurft A, Heidland A, Münch G, Bahner U, Schinzel R: Low-molecular but not high-molecular advanced glycation end products (AGEs) are removed by high-flux dialysis. Clin Nephro 2000; Vol. 54, No.4, 276-283

Green MHL, Lowe JE, Waugh APW, Aldridge KE, Cole J, Arlett CF: Effect of diet and vitamin C on DNA strand breakage in freshly-isolated human white blood cells. Mut Res 1994; 316, 91-102

Giacchino F, Formica M, Quarello F, Bonello F, Piccoli G: High incidence of cancer in uremic patients. Clin Nephrol 1983; 22: 256-266

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

Heidland A, Bahner U, Vamvakas S: Incidence and spectrum of dialysis-associated cancer in three continents. Am J Kid Dis 2000; vol 35, 347-353

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

Köhler H, Girndt H, Dumann H, Klingel R : Immundefekt bei Niereninsuffizienz, Dtsch med Wschr 1993; 118, 757-61

Kühnel A: Einfluss metabolischer Inhibierung auf dem Wirkungseffekt von 5-Fluoruracil in vitro. Dissertationsschrift 1997; Universität Würzburg

Maisonneuve P, Agoda L, Gellert R, Stewart JH, Buccianti G, Lowenfels AB, Boyle P : Cancer in patients on dialysis for end-stage renal disease: an international collaborative study. Lancet 1999; Vol 354, 93-98



Malachi T, Zevin D, Gafter U, Chagnac A, Slor H, Levi J, : DNA repair and recovery of RNA synthesis in uremic patients. *Kid Int* 1999; Vol 44, 385-389

Matas AJ, Simmons RL, Kjellstrand CM, Buselmeier TJ, Najarian JS : Increased incidence of malignancy during chronic renal failure *Lancet* 1975; i: 883-886

Müller, SO : Anthranoide-Vorkommen in pflanzlichen Lebensmitteln, deren Gentoxizität und zugrundeliegende Mechanismen, Dissertationsschrift 1997; Universität Würzburg

Plappert U, Stocker B, Fender H, Fliedner TM : Changes in the repair capacity of blood cells as a biomarker for chronic low-dose exposure to ionizing radiation. *Environ Mol Mutagen* 1997; 30 (2), 153-160

Riede UN, Wiestler OD, Müller HJ: Autonomes Zellwachstum (Tumorpathologie). In: *Allgemeine und spezielle Pathologie* 1995, 4. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York

Schmuck G, Lieb D, Wild D, Schiffmann D, Henschler D : Characterization of an in vitro micronucleus assay with Syrian hamster embryo fibroblasts. *Mut Res* 1988; 246, 113-122

Singh NP, Mc Coy MT, Tice RR, Schneider EL : A simple technique for quantitation of low levels of DNA-damage in individual cells. *Exp Cell Research* 1988; 175, 184-191

Singh NP, Danner DB, Tice RR, Pearson JD, Brant LJ, Morrel CH, Schneider EL : Basal DNA damage in individual human lymphocytes with age. *Mut Res* 1991; 256, 1-6

Speit G, Trenz G, Schütz P, Rothfuß A, Merk O : The influence of temperature during alkaline treatment and electrophoresis on results obtained with the comet assay. *Tox Let* 1999; 110, 73-78

Sperschneider H; (1995). Dialyse, Ein Ratgeber für Patienten und Angehörige, J. A. Barth Verlag, Hüthig GmbH, Heidelberg, Leipzig

Stopper H, Meysen T, Böckenförde A, Bahner U, Heidland A, Vamvakas S : Increased genomic damage in lymphocytes of patients before and after long-term hemodialysis therapy. Am Jour of Kid Dis 1999; Vol 34, No 3, 433-437

Strauss GHS : Non random cell killing in cryopreservations: implication for performance of the battery of leukocyte tests (BLT), I. Toxic and immunotoxic effects. Mutat Res 1991; 283, 21-28

Tice RR : The single cell gel / comet assay: a microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells, Envir Mutagen 1995 (Phillips, DH and Venitt, S, eds); p 315-339, Bios Scient Publ, Ltd. Oxford

Vamvakas S, Bahner U, Becker P, Steinle A, Götz R, Heidland A : Impairment of DNA damage in the course of long-term hemodialysis and under cyclosporine immunosuppression after renal transplantation. Transpl Proc 1996; Vol 28, 3468-3473

Vamvakas S, Bahner U, Heidland A : Cancer in end-stage renal disease: potential factors involved. Am J Nephrol 1998; 18:89-95

Valverde M, Lopez CM, Lopez I, Sanchez I, Fortoul T, Ostrosky-Wegman P, Rojas E, , DNA damage in leukocytes and buccal and nasal epithelial cells of individuals exposed to air pollution in Mexico City. Environ Mol Mutagen 1997; 30, 147-152

## Lebenslauf

Felix Boullay

geboren am 24.5.1974 in London (GB)

- Ausbildung:
- 1980-1984 Grundschule Sonnenfeld in Homburg
  - 1984-1993 Staatliches Saarpfalz-Gymnasium in Homburg/Saar mit Abschluss Abitur
  - 1994-1995 Studium der Chemie in Bonn und Aachen
  - 1995-1997 Studium der Humanmedizin an der Universität Bonn ( Vorklinik)
  - 1997-2001 Studium der Humanmedizin an der Universität Würzburg (Klinischer Abschnitt)
  - 2001-2002 Studium der Humanmedizin an den Universitäten des Saarlandes (Praktisches Jahr)
- Famulaturen:
- 1997 Hämatologie/Onkologie in der Praxis Dr. Girmann in Homburg/Saar
  - 1998 Arbeitsmedizin bei der Firma Kässbohrer bei Herrn Prof. Dr. Berz in Ulm
  - 2000 Anästhesie im Johanniter-KH bei Herrn Dr. Grabs in Bonn
  - 2000 Nephrologie im Kuratorium für Hämodialyse bei Herrn Prof. Dr. Hennemann in Coburg
- Praktisches Jahr:
1. Tertial: Urologie
  2. Tertial: Unfall-/ Allgemein Chirurgie
  3. Tertial: Innere Medizin ( Nephrologie )

Abgeleistet an den Universitätskliniken des Saarlandes Homburg/Saar