

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik Innere Medizin D
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. H.-J. Pavenstädt -

**Untersuchungen zum Einfluss leukozytärer Faktoren terminal
niereninsuffizienter Patienten auf Endothelzellen**

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Frieler, Fabian

aus
Bielefeld
2007

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Volker Arolt

1. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. D. Lang
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. St. Heidenreich

Tag der mündlichen Prüfung: 17.03.2007

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Medizinische Klinik und Poliklinik D
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. H.-J. Pavenstädt
Referent: PD Dr. med. D. Lang
Koreferent: Prof. Dr. med. St. Heidenreich

ZUSAMMENFASSUNG

Untersuchungen zum Einfluss leukozytärer Faktoren terminal
niereninsuffizienter Patienten auf Endothelzellen

Frieler, Fabian

Bei Menschen mit terminaler Niereninsuffizienz treten vielfach häufiger atherosklerotisch bedingte kardiovaskuläre Komplikationen auf als in der nierengesunden Bevölkerung gleichen Alters. In der multifaktoriellen Pathogenese atherosklerotischer Gefäßveränderungen spielen inflammatorische Prozesse im und am Gefäßendothel eine herausragende Rolle. Es wird eine fehlerhafte Wachstumsregulation der Endothelzellen für die erhöhte kardiovaskuläre Morbidität der Dialysepatienten verantwortlich gemacht.

Diese Studie untersuchte in vitro das Wachstumsverhalten immortalierter Endothelzellen (EAhy 926) nach 96-stündiger Inkubation mit Leukozytenüberständen aus 50ml Vollblut nierengesunder und urämischer Probanden, indem durchflusszytometrisch das Apoptose- und Proliferationsverhalten der Endothelzellen gemessen wurde. Dabei zeigten sich folgende signifikante Unterschiede:

Nach Inkubation mit Leukozytenüberständen Nierengesunder konnte in 62% von Apoptose und in lediglich 19% der Proben von Proliferation der Endothelzellen ausgegangen werden, demgegenüber fand sich nach Inkubation mit Überständen von Dialysepatienten in nur 24% Apoptose, allerdings in 55% der Proben deutliche Proliferation.

Außerdem wurde geprüft, in welchem Ausmaß Endothelzellen von diesem Wachstumsverhalten abwichen, nachdem die Leukozyten nierengesunder und dialysepflichtiger Probanden stimulierenden Immunmediatoren (LPS und TGF- β) ausgesetzt waren. Diese Versuche belegten, dass bei Endothelzellen nach Inkubation mit Überständen stimulierter Leukozyten Nierengesunder eine deutliche Proliferationssteigerung nachweisbar war, während diese Effekte in der Gruppe der Dialysepatienten nicht auftraten.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten signifikante Unterschiede im endothelialen Wachstumsverhalten nach Einwirkung leukozytärer Faktoren von Dialysepatienten und Nierengesunden nachgewiesen werden, die auf eine gestörte Wachstumsregulation des Gefäßendothels in der Urämie hinweisen.

Tag der mündlichen Prüfung: 17.03.2007

Inhaltsverzeichnis

	Seite:
I. Einleitung	
Atherosklerose als multifaktorielles Krankheitsgeschehen	6
Plaquentstehung und Plaqueruptur	7
Chronische Niereninsuffizienz und Atherosklerose	7
Bedeutung der Endothelzellen	11
Zielsetzung der Arbeit	12
II. Material und Methoden	
Probanden, Kulturmedium	13
Puffer, Reagenzien, Arbeitsmaterialien, Geräte	13
Leukozytenpräparation und Zellkultur	14
Durchflusszytometrie und Auswertungstechnik	17
Statistik	24
III. Ergebnisse	
Apoptose und Proliferation von Endothelzellen in unterschiedlichem Milieu	25
Wachstumsverhalten der Endothelzellen nach Inkubation mit Leukozytenüberständen <u>nierengesunder</u> Probanden	26
Wachstumsverhalten der Endothelzellen nach Inkubation mit Leukozytenüberständen <u>dialysepflichtiger</u> Probanden	28
<u>Vergleich</u> des Wachstumsverhaltens von Endothelzellen nach Inkubation mit Leukozytenüberständen Nierengesunder und dialysepflichtiger Probanden	29
Ergebnisse der Versuche mit stimulierten Leukozyten	30
Kasuistiken	33

	Seite:
IV. Diskussion	
EAhy 926 als Prototyp einer Endothelzelle	35
Wachstumsverhalten der Endothelzellen nach Inkubation mit leukozytären Überständen Nierengesunder und von Dialysepatienten	36
Stimulationsversuche mit LPS und TGF- β	38
Kasuistiken	40
Ausblick	41
V. Literaturverzeichnis	43
VI. Abkürzungsverzeichnis	54
VII. Lebenslauf	55
VIII. Publikationen	56
IX. Danksagung	57

I. Einleitung

Die stetige Zunahme des durchschnittlichen Lebensalters sowie ein verändertes Ernährungs- und Bewegungsverhalten in den Industrienationen beeinflussen zunehmend die Inzidenz vieler Krankheitsentitäten dieser Gesellschaft. Der menschliche Körper musste im Laufe seiner Evolution Mechanismen entwickeln, um Zeiten des Nahrungsmangels zu überstehen. So befanden sich früher stets die Menschen im Vorteil, die kurze Zeiten des Überflusses effektiv nutzen und wertvolle Nahrungsbestandteile in ihrem Körper speichern konnten. Vor diesem Hintergrund sind Stoffwechselwege zu verstehen, die Mitglieder der Wohlstandsgesellschaft häufig vor Probleme stellen. Insbesondere die Speicherung komplexer Lipidverbindungen in der Wand der Blutgefäße führt über Jahrzehnte zu Atherosklerose und verursacht oft lebensbedrohliche Komplikationen. Diese vor allem in tierischen Fetten enthaltenen Stoffe standen in früheren Zeiten nur sporadisch und in kleiner Menge zur Verfügung, stellen allerdings die Grundlage zur Synthese lebensnotwendiger Hormone (z. B. Steroide) dar. So kann von allen Säugetieren Cholesterol als Grundbaustein auf verschiedene Weise aufgenommen, gebildet und seine Zwischenstufen schnell verfügbar gespeichert werden, interessanterweise existiert jedoch im Stoffwechsel kein bekannter Abbauweg des Steroidgerüsts (25). Seit dem 20. Jahrhundert beschäftigen pathophysiologische Zusammenhänge zwischen Lebensgewohnheiten und veränderten Morbiditäts- und Mortalitätsraten zunehmend die medizinische Forschung in den Industrienationen. Den kardiovaskulären Erkrankungen misst man hier eine besondere Bedeutung zu; stehen sie doch in kausalem Zusammenhang mit vielen Erkrankungen in einer modernen Gesellschaft. Bis vor etwa 15 Jahren beurteilte man Atherosklerose vorwiegend als passiven Prozess im Rahmen des natürlichen Alterns; durch intensive Forschung ist es gelungen, neben den klassischen Risikofaktoren der Framinghamstudie (1) (Adipositas, Nikotinabusus, Dyslipoproteinämie, Familienanamnese, arterieller Hypertonus u.a.) neue, davon unabhängige Faktoren zu benennen. Heute begreift man den Formenkreis der kardiovaskulären Erkrankungen als multifaktorielles Geschehen, in dem verschiedene Faktoren an unterschiedlichen Organen krankhafte Veränderungen bewirken. Letztlich stehen hier zwei pathophysiologisch zusammenhängende, in ihrer Entstehung und Therapierbarkeit jedoch unterschiedliche Prozesse im Vordergrund:

Bei manifester Dyslipoproteinämie in Kombination mit oxidativem Stress in Form freier Radikale entstehen unter anderem oxidierte Lipoproteine („oxLDL“), welche dann durch Makrophagen aufgenommen und unterhalb der Endothelzellschicht in der Intima der Blutgefäße zunächst in Form sogenannter Schaumzellen abgelagert werden. Diese freien Radikale können mit Stickoxidverbindungen das Endothel zur Proliferation anregen sowie die Leukozytenadhärenz und die Thrombozytenaggregation am Endothel fördern (5, 43). Bei Persistenz dieser Bedingungen entstehen so wachsende Plaques innerhalb der Gefäßintima mit langsam fortschreitender Einengung des Gefäßlumens.

Schließlich setzen aktivierte Leukozyten in der Gefäßwand weitere Proteinase frei, die ihrerseits die stabilisierende extrazelluläre Matrix abbauen. Gleichzeitig werden zunehmend proinflammatorische Botenstoffe (Zytokine) produziert, die eine erneute Kollagensynthese unterbinden und zusätzlich zur Destabilisierung der Plaques beitragen. Kommt es dann zur Plaqueruptur, werden von nun freiliegenden Strukturen der Gefäßwand massenhaft Gerinnungsaktivatoren freigesetzt. Innerhalb kurzer Zeit bilden sich Thrombozytenaggregate, die einen akuten Gefäßverschluss und –je nach Organ- die Infarzierung des dahinter liegenden Stromgebietes bewirken (10, 35, 44, 46).

Die chronische Niereninsuffizienz ist definiert als irreversibel fortschreitende Funktionseinschränkung der Niere. Der zunehmende Untergang funktionierenden Nierengewebes äußert sich in der Abnahme des Glomerulumfiltrats, messbar an steigenden Retentionsparametern im Blut wie Harnstoff und Kreatinin.

Die statistisch häufigsten Ursachen chronischer Niereninsuffizienz stellen diabetische Nephropathie, chronische Glomerulonephritis, hypertoniebedingte Nierenschäden, interstitielle Nephritis bzw. chronische Pyelonephritis, polyzystische Nierendegeneration und weitere urologische Erkrankungen dar (71). Nach klinischer Symptomatik hat sich eine Einteilung in vier Stadien etabliert (40), deren Endstadium als „terminale Niereninsuffizienz“ oder „Urämie“ bezeichnet wird. Ohne eine angemessene Organersatztherapie ist ein Überleben nicht möglich (76).

Für Menschen mit terminaler Niereninsuffizienz stehen verschiedene therapeutische Alternativen zur Verfügung: Die erfolgreiche Transplantation einer Spenderniere ist aus unterschiedlichen Gründen einer Minderheit vorbehalten. Die Mehrheit der terminal

niereninsuffizienten Patienten ist dauerhaft auf künstliche Blutreinigungsverfahren wie Hämo- oder Peritonealdialyse, Hämodiafiltration oder Hämofiltration angewiesen.

In Deutschland waren zur Jahrtausendwende durchschnittlich etwa 7 von 10.000 Einwohnern auf eine Nierenersatztherapie angewiesen (22); die Hämodialyse stellte als weltweit ältestes und am häufigsten eingesetztes Verfahren allein in Deutschland für über 55000 Patienten das Verfahren der Wahl dar (39). Auf die Charakteristika der einzelnen Eliminationsverfahren soll hier nicht im Einzelnen eingegangen werden.

Durch ständige Forschung, Weiterentwicklung und Optimierung dieser Techniken stellen sie bereits eine sehr erfolgreiche Organersatztherapie dar, allerdings bleiben mit ihr akute und chronische Komplikationen verbunden (51). Technischer Fortschritt, engmaschige Überwachung und ständig wachsendes Wissen um pathophysiologische Zusammenhänge machen heute akute Zwischenfälle wie Hypersensitivitätsreaktionen oder ultrafiltrationsbedingte Blutdruckabfälle weitgehend beherrschbar (28).

Die Langzeitkomplikationen der chronischen Dialysetherapie sind – bedingt durch vielfältige Komorbidität der Patienten und vielfache technische Einflussgrößen – in ihrer Genese ungleich schwieriger einzuschätzen, stellen allerdings hinsichtlich der Langzeitüberlebenszeit und Lebensqualität bei terminaler Niereninsuffizienz die entscheidenden Faktoren dar.

So liegen die kardiovaskulären Erkrankungen als häufigste Todesursachen in der Urämie noch vor tödlich verlaufenden Infektionen (47, 79). Epidemiologische Studien der 90´er Jahre konnten für Dialysepatienten der westlichen Industrienationen ein um 50% erhöhtes Risiko eines frühzeitigen Todes an kardiovaskulären Erkrankungen nachweisen (21), das mit dem klassischen Risikoprofil allein nicht zu erklären war (11).

Die Forschung widmete sich deshalb dem Studium pathophysiologischer Zusammenhänge gehäuft auftretender Atherosklerose und anderen häufigen medizinischen Problemen dieser Gruppe wie Mangelernährung, Fettstoffwechselstörungen, gesteigertem oxidativem Stress und erhöhter Entzündungsaktivität bei gehäuften Infektionen (29, 55, 72).

Die prominente Rolle der kardiovaskulären Mortalität als Komplikation der Dialysetherapie konnte belegt werden (69, 72, 79); in weitergehenden Studien kristallisierten sich dann zunehmend Zusammenhänge zwischen der Pathogenese der

Gefäßsklerose und systemischer entzündlicher Aktivität heraus; nach Ross wird sie insgesamt vielfach als „mikroinflammatorischer Prozess“ bewertet (62). Man konnte bereits verschiedene Mechanismen chronischer Gefäßdegeneration auf molekularer Ebene beschreiben (78). Eine besondere Bedeutung misst man hier durch Fehlfunktionen verursachten Endotheldefekten und den damit persistierenden chronisch entzündlichen Prozessen an der Gefäßinnenwand und ihren Unterstrukturen bei (17, 18, 19).

Durch Malnutrition, monozytäre Rezeptordefekte (38, 64) und urämische Faktoren ist bei Dialysepatienten die Immunantwort eingeschränkt. Eine signifikante Suppression bestimmter Zellfunktionen (Phagozytose, Degranulation oder Chemotaxis) kann mit Anreicherung inhibitorischer Proteine im Blut erklärt werden (26, 31, 32, 52). Insbesondere Zellen der unspezifischen Immunabwehr (Monozyten, Granulozyten) sowie T-Lymphozyten sind von der Fehlsteuerung zellulärer Immunmechanismen betroffen (58, 80). Zusammenfassend stehen diesen abwehrschwächenden Faktoren allerdings multiple relevante proinflammatorisch wirkende urämische Toxine gegenüber (80).

Als klinisch besonders bedeutsam erscheint hier das C-reaktive Protein (CRP).

Man ordnet dieses aus fünf identischen Untereinheiten zusammengesetzte, nicht glykolysierte polymere Protein den „Akute Phase Proteinen“ zu und findet es bei den meisten Säugetieren (8). Im klinischen Alltag konnte sich CRP als gängiger Marker für Entzündungen und Infektionen durchsetzen (53). Die Bindung von CRP an die Zellwand aktiviert das Komplementsystem und stimuliert Makrophagen und andere Zellen zur Phagozytose. Die Ausschüttung von CRP selbst wird über Zytokine wie IL-6 vermittelt, welches Hepatozyten zur Bildung weiterer Akute Phase Proteine veranlasst (42). Insbesondere bei Dialysepatienten misst man dem CRP hinsichtlich der kardiovaskulären Morbidität eine besondere Bedeutung zu (4), ferner ließen sich bereits signifikante Korrelationen zwischen sonografisch ermittelten arteriellen Plaquedurchmessern - als Marker kardiovaskulärer Morbidität, subakuter CRP-Erhöhung und Malnutrition nachweisen (79); ferner bestehen Zusammenhänge mit der Dialysemembran und dem CRP-Spiegel (66). Weiterhin konnte bereits eine Kolokalisation von CRP und Komplementaktivierungskomplexen in sklerosierten Koronararterien nachgewiesen werden (75).

Eine entscheidende Rolle in der Aktivierung entzündlicher Abläufe spielen die extrakorporalen Komponenten bei der Dialyse. Durch sie können verschiedene proinflammatorische Signale hinsichtlich der Zytokinaktivierung synergistisch zusammenwirken (z. B. Endotoxine aus dem Dialysat, Komplementaktivierung, Thrombinbildung durch Aktivierung des Gerinnungssystems an der Membran, Granulozyten-inhibierende Proteine (GIP I und GIP II)) (24, 31, 34). Während der Dialyse erfolgen durch den Blut-Membrankontakt hohe Komplementumsätze, die verschiedene Leukozytengruppen wie Granulozyten, NK-Zellen und Monozyten direkt stimulieren können (9, 16). Das Komplementsystem hat – vereinfacht dargestellt – die Aufgabe, körpereigene von körperfremden Oberflächenmolekülen zu unterscheiden und andere Komponenten des Immunsystems bei Antreffen körperfremder Strukturen im Blutkreislauf zu alarmieren. Zum Teil besteht eine messbare Korrelation zwischen verwendeter Dialysemembran und der Freisetzung bestimmter Komplementfreisetzungsprodukte, Zytokine wie Interleukin-1 β und Tumor-Nekrose-Faktor TNF (66, 67). Das Ausmaß granulozytärer und monozytärer Aktivierung durch Dialysemembran-induzierte Komplementaktivierung wurde an Hand der freigesetzten Proteasen und ansteigendem intrazellulärem Calcium ebenfalls quantifiziert und in einen klaren Zusammenhang gebracht (26). Patienten mit Nierenversagen reagieren allerdings deutlich empfindlicher auf zusätzliche proinflammatorische Einflüsse als Nierengesunde, da Akute-Phase-Proteine wie CRP, Fibrinogen, Serum-Amyloid A und Komplementfaktor D ohnehin schon signifikant erhöht sind (z. B. Faktor D etwa 10-fach höher als bei Gesunden) (80). Die Ergebnisse dieser Studien konnten bereits zu einer deutlichen Optimierung der Dialysemembranbeschaffenheit in Form minimaler Komplementaktivierung genutzt werden. So lässt sich unter Einsatz moderner Polyflux-Membranen eine Komplementfaktor D-Reduktion von im Mittel 37% erreichen (36). Dies reicht bei 3 Dialysesitzungen pro Woche nicht aus, um zu normalen Blutspiegeln zu gelangen; für andere Substanzen hingegen konnten bereits nach 24 Stunden wieder prädialytische Konzentrationen erreicht werden (Pentosidin) (50). Sehr wichtig erscheint der Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von Endotoxinen / LPS (als Bestandteil der Bakterienmembran) nach Komplementinduktion für die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (68), der in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde.

In der zusammenfassenden Einschätzung der Atherosklerose wird deutlich, dass den Endothelzellen in den Blutgefäßen eine zentrale Bedeutung zukommt: Diese Zellschicht ist der primäre Angriffspunkt aller im Blut enthaltenen Stoffe – die Entstehung atherosklerotischer Gefäßveränderungen steht daher mit diesen Zellen in engem Zusammenhang. Eine fehlerhafte endotheliale Wachstumsregulation mit gesteigerter Apoptose führt zu Gefäßdefekten, die dann bereits beschriebene Kaskaden pathologischer Prozesse wie atheromatöse Plaquebildung, Freisetzung inflammatorischer Mediatoren und letztlich die intravasale Thrombenbildung mit Gefäßverschluss in Gang setzen (12, 17, 18, 19, 63). Bei dialysepflichtigen Menschen stehen die (Fehl-) Funktionen des Gefäßendothels in besonderem wissenschaftlichen Interesse, da man hier die Ursachen für die signifikant erhöhte kardiovaskuläre Morbidität vermutet (2, 72; 79, 69).

Es gibt keine ausreichenden Untersuchungen zur Veränderung des Wachstumsverhaltens von Endothelzellen nach Einwirkung leukozytärer Faktoren Nierengesunder und urämischer Probanden. Daher sollten an geeigneten Endothelzellen entsprechende Untersuchungen erfolgen. Unter Berücksichtigung mehrerer Charakteristika fiel die Wahl auf die Hybridzelllinie EAhy 926. Diese Zelle entstand aus Fusion menschlichen Nabelschnurvenenendothels („HUVEC“) und einer immortalisierten Bronchialkarzinomzelle („A549“). Insbesondere die verhältnismäßig einfache labortechnische Handhabung sowie die relativ hohe Toleranz dieser Zelle hinsichtlich des Entzugs von Wachstumsfaktoren waren wesentliche Argumente für diese Zelllinie. Im Rahmen ähnlicher Fragestellungen konnten verschiedene Arbeiten bereits eine gewisse Überlegenheit der EAhy gegenüber HUVECs durch stabilere Zellkulturergebnisse mit dennoch vergleichbaren Ergebnissen hinsichtlich der untersuchten Einflüsse belegen (6, 74). Die dort verwendeten HUVECs reagierten in ihrem Wachstumsverhalten ungleich sensibler auf den Entzug exogener Wachstumsfaktoren, die zuvor zur Kultivierung zugegeben werden mussten. Mit der Verwendung einer in unserer Arbeitsgruppe bereits etablierten Zelllinie konnte ich so auf erprobte Kulturprotokolle und weitreichende Erfahrungen mit der Kultivierung der EAhy 926 zurückgreifen.

Die hier durchgeführten Versuche bestanden aus je zwei Phasen: Zunächst inkubierte man die aus 50ml Vollblut nierengesunder und urämischer Probanden isolierten leukozytären Zellen für 48 h in Standardmedium zunächst ohne Zusatz von Wachstumsfaktoren. In einer späteren Versuchsreihe („Stimulationsversuche“) setzte man diesem Medium LPS oder TNF- β zu. Nachdem dann diese Serumüberstände sorgfältig von zellulären Bestandteilen gereinigt waren, dienten sie für 96 h als Testmedium für die Endothelzellen „EAhy 926“. Unmittelbar im Anschluss an diese Inkubation erfolgte die Präparation, Färbung und durchflusszytometrische Messung des Wachstumsverhaltens der Endothelzellen. Dieser Versuchsaufbau sollte in-vitro das Wachstumsverhalten endothelialer Zellen unter dem Einfluss leukozytenvermittelter Mediatoren Nierengesunder und urämischer Patienten vor Dialysebeginn untersuchen.

II. Material und Methoden

1.1) Auswahl der Probanden

ausgewählt wurden Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz, die sich seit mindestens 6 Monaten in Hämodialysetherapie befanden sowie klinisch Nierengesunde. Für beide Gruppen durften keine klinisch relevanten Infekte vorliegen.

1.2) Das Kulturmedium für Leukozyten und Endothelzellen

RPMI 1640 Medium, 2mM L-Glutamin, 50 IE/ml Penicillin / 50 µg/ml Streptomycin, 10 µM Mercaptoethanol, 5 mM Hepes-Buffer, Fetales Kälberserum (FCS) 5% (Endothelzellen) bzw. 0% (Leukozyten)

2.) Puffer

PBS – Puffer: PBS w Ca^{2+} / Mg^{2+} ; PBS w/o Ca^{2+} / Mg^{2+} / beide Firma Seromed
Natriumazid 0,1% (FACS-Analyse): 0,1 µg/ml NaN_3 , 500 µl FCS ad 500 ml PBS w Ca^{2+} / Mg^{2+} , pH = 7,4

Paraformaldehyd – Lösung (FACS-Analyse): 4% Paraformaldehyd in 100 ml PBS w Ca^{2+} / Mg^{2+} , pH = 7,4

Saponin Puffer: PBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} ; 2% Hepes, 1% Rinderalbumin (BSA) (Merck); 0,1% Saponin (Sigma) in Aqua bidestillata ;pH:7,4

FACS-Pufferlösung: 500 ml PBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} ; 0,05% Natriumazid NaN_3 (Merck), 0,05% FCS, pH: 7,4

3.) Reagenzien

BD Pharmingen: Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)-Antikörper, Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) – markiert, Klon: PC 10 ; Isotypenkontrolle: FITC-markiertes IgG-2a (Maus), Klon: MOPC – 173

Seromed / PAA Laboratories, Linz, A. : Antibiotikum (Penicillin / Streptomycin); Ficoll; Hepes; PBS w Ca^{2+} / Mg^{2+} und PBS w/o Ca^{2+} / Mg^{2+} ; serumfreier RPMI 1640 Kulturmedium(PAA Laboratories)

Sigma: Beta-Mercaptoethanol; Natriumazid (NaN_3); LPS (strain 0127:B8);

BD PharMingen, San Diego, USA: PCNA (Anti Human Clone PC10, IgG_{2a, k}); Maus, monoklonal, FITC-markiert, Verdünnung 1:20 ; / PCNA (Isotypenkontrolle, Clone MOPC-173, IgG_{2a,k}); Maus, monoklonal, FITC-markiert, 1:20 Annexin V-FITC, rekombinant, Verdünnung 1:40

4.) Arbeitsmaterialien:

Sarstedt, Nümbrecht, D.: Zentrifugenröhrchen; Eppendorf-Pipetten 1,5 ml

PAA Laboratories, Linz, A.: Zentrifugenröhrchen (mit / ohne Polyestermembran)

Falcon: 24-Well-Platten, Zentrifugenröhrchen

Greiner Labortechnik: Zentrifugenröhrchen Cellstar, 24well-Platte mit Flachboden

Becton Dickinson, USA: FACS-Zentrifugenröhrchen (5ml Polystyrene Falcon)

5.) Geräte:

Beckman: TJ-6 Zentrifuge

Becton Dickinson: FACScan flow cytometer; Software Lysis II

Janke & Kunkel, D.: IKA-Vibrax-VXR (Rüttler)

Zeiss, Jena, D.: Mikroskop Televal 31

Greiner: Pipettenspitzen

Heraeus Düsseldorf: Sterile Werkbank „Laminair“; Kühlzentrifuge (Biofuge 28 RS);

Melay: Brutschrank Typ 605, Atmosphäre: 5% CO₂ / 95 % Luft

Biometra, : Volt-Amperé-Meter, pH-Meter und TB1-Thermoblock

6.) Leukozytenpräparation und Zellkultur

6.1 Zellkultur der Endothelzelle EAhy 926

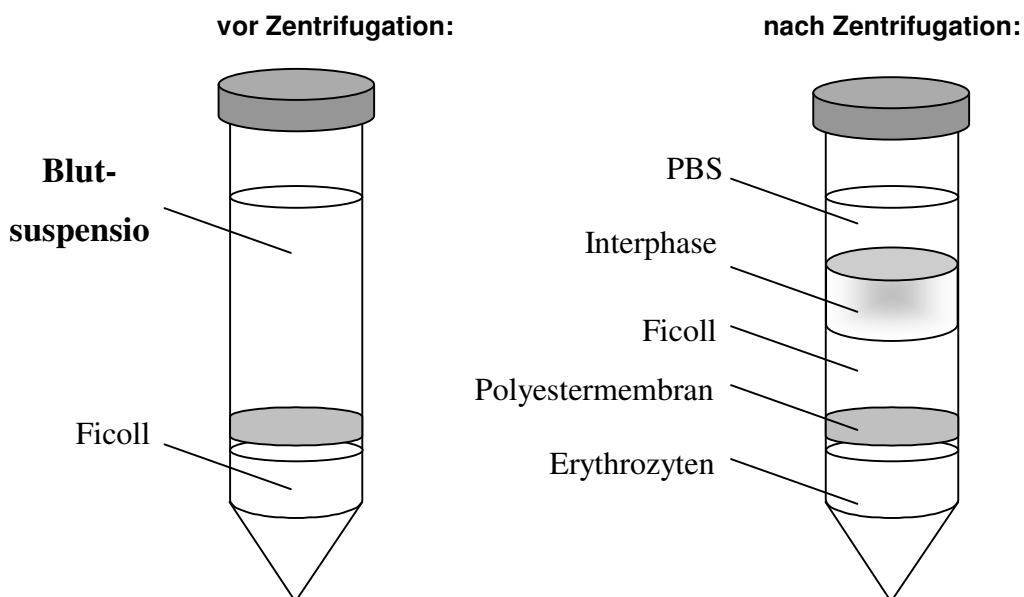
Die zur FACS-Analyse verwendeten Endothelzellen werden in RPMI 1640 – Medium mit Zusatz von 5 % FCS kultiviert. Es zeigte sich, dass ein optimales Wachstum der Zellen dann erfolgte, wenn sie alle 3 bis 4 Tage passagiert wurden, d. h. das Medium erneuert wurde. Bei dichter Zellvegetation wurden die Zellen 5 Minuten mit Trypsin-EDTA und PBS w/o Ca²⁺ / Mg²⁺ bei 37° C

inkubiert und anschließend in 5% FCS haltigem Medium gewaschen. Im Anschluss erfolgte das erneute Einbringen in Kulturflaschen bzw. 24-Well-Platten in entsprechender Vegetationsdichte. Nach 12 solcher Passagen verwarf ich die Kulturen, um einer Ergebnisbeeinflussung durch mögliche Kontamination oder Entdifferenzierung vorzubeugen und ein möglichst konstantes Wachstumsverhalten der Endothelzellen zu erhalten.

6.2 Leukozytenpräparation

Für die Versuche verwendete ich humane Leukozyten aus einer max. 2 Stunden alten peripheren Venenblutspende von 50 ml. Die Blutentnahme erfolgte steril in einer heparinisierten 50 ml- Perfusorspritze. Zur Präparation wurden die 50 ml Blut auf zwei sterile 50 ml – Zentrifugenröhrchen verteilt, mit PBS w/o Ca^{2+} / Mg^{2+} aufgefüllt und 15 Minuten bei 400 x g zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des überstehenden Plasmas resuspendierte ich das Sediment erneut mit PBS w/o Ca^{2+} / Mg^{2+} und zentrifugierte zwei weitere Male 10 Minuten bei 400 x g. Anschließend wurden die nun gewaschenen zellulären Anteile mit PBS w Ca^{2+} / Mg^{2+} auf 40 ml aufgefüllt und bei 4° C gekühlt. Ein spezielles Zentrifugenröhrchen, das bei 15 ml eine Polyester membran enthält, wurde nun mit 15 ml 4° C kaltem Ficoll gefüllt und 2 Minuten bei 400 x g zentrifugiert.

Abb. Nr.1: Dichtegradientenzentrifugation



Dadurch gelangte das Ficoll unter die Membran und füllte den darunterliegenden Raum vollständig aus, so dass jetzt 20 ml der zuvor gewaschenen Erythrozyten-Leukozyten-PBS-Suspension vorsichtig überschichtet werden konnten. Die Polyester membran diente hier dazu, Vermischungen beim Überschichten zu vermeiden. In den nun folgenden 20 Minuten Zentrifugation bei 600 x g galt es zu beachten, dass die Zentrifugenbremse deaktiviert war, da es andernfalls zu Verwirbelungen und daher Vermischungen der Interphase mit dem übrigen Überstand kommen konnte. (s. Abb. Nr. 1)

Die hier beschriebene Dichtegradientenzentrifugation trennt nukleäre Zellen von Erythrozyten. Lympho- und Monozyten stellen sich wegen ihrer geringeren Dichte gegenüber dem Ficoll als scharf abgrenzbare Interphase dar, die ich vorsichtig mit einer 1 ml Pipette entnahm. Diese Interphasezellen wurden nun zweimal mit PBS w Ca^{2+} / Mg^{2+} aufgefüllt und bei jeweils 400 x g zentrifugiert, um sie weitgehend von Ficollresten zu reinigen. Zur Ermittlung der Gesamtzellzahl wurden vor der letzten Zentrifugation 10 μl Suspension entnommen und in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Nach dem letzten Waschen erfolgte die Einstellung der Zellen in einer Konzentration von 5×10^5 Zellen /ml in Kulturmedium ohne Zusatz von fetalem Kälberserum (FCS).

Bei den **Stimulationsversuchen** im späteren Verlauf der Arbeit wurde dieser Abschnitt im Versuchsaufbau modifiziert: Nach dem Ausbringen der lymphozytären Zellen auf der Kulturplatte (Konzentration ebenfalls 5×10^5 Zellen /ml) erfolgte der Zusatz von drei verschiedenen Kulturmedien.

Entweder:

- a) RPMI- Kulturmedium ohne Zusatz von fetalem Kälberserum (0% FCS) als Vergleichsgruppe, oder
- b) mit Zusatz von LPS (1 μg / ml), oder
- c) mit Zusatz von TGF- β (10 μg / ml) als Stimulantien der Leukozyten

Nach dem Ausbringen in einer 24-Well-Platte (1 Well = 1 ml) erfolgte die Inkubation bei 37° C unter 5%iger CO₂ Atmosphäre für 48 Stunden.

6.3 Inkubation der Endothelzellen mit Leukozytenüberständen

Das wesentliche Experiment stellt nun die Inkubation der Endothelzelle EAhy 926 mit den oben genannten Leukozytenüberständen dar. Hierzu werden 3 Tage im Voraus die Endothelzellen der Kultur entnommen und in eine 24-Well – Platte überführt. Nach 24 Stunden in 5 % FCS haltigem Medium waren die Zellen bodendeckend adhärent, so dass nun die FCS – Konzentration im Medium schrittweise auf 0 % gesenkt wurde (1. Tag: 5%; 2. Tag: 2%, 3. Tag: 0%), um das FCS als Wachstumsfaktor zu minimieren.

Am vierten Tag ersetzte ich das Standardmedium zweimal vorsichtig mit der Pipette durch PBS w/o Ca²⁺ / Mg²⁺, um die Wells vom Medium zu befreien. Anschließend wurden nun die von Zellen gereinigten Leukozytenüberstände anstelle des Standardmediums in die 24-Well-Platte eingebracht und anschließend für 120 Stunden bei 37° C unter 5 % CO₂ inkubiert.

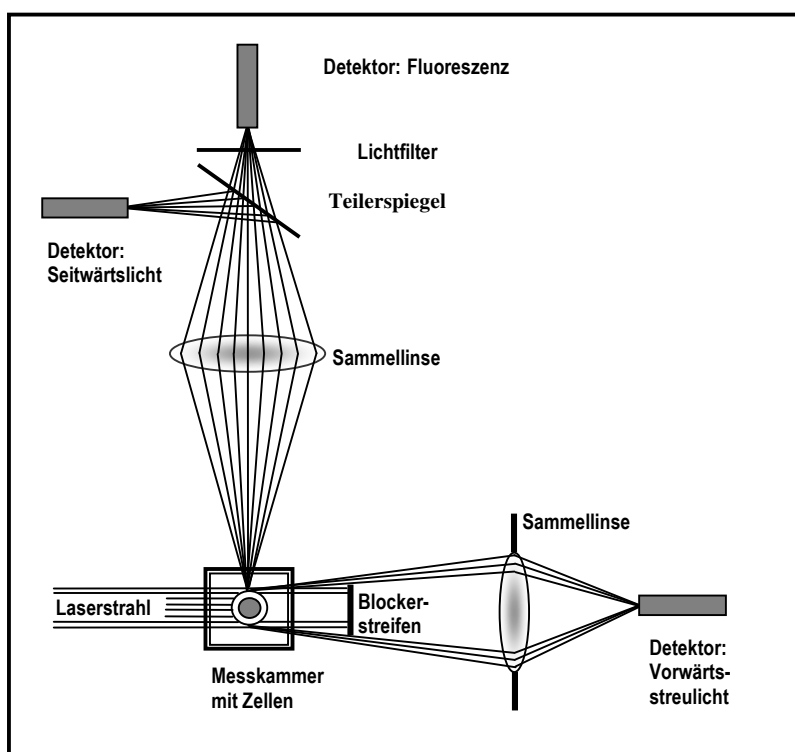
7.) Durchflusszytometrie (FACScan Analyse)

7.1 Prinzip der Durchflusszytometrie:

Die Durchflusszytometrie macht sich die Eigenschaft zu Nutze, dass Zellen mittels unterschiedlicher Lichtqualitäten (gestreut oder emittiert) detektiert werden. Sie werden dazu durch eine Glaskapillare gepresst und einzeln – etwa wie die Perlen einer Perlenkette - an einem fokussierten Laserstrahl (Argonlaser, 488 nm) vorbeigeführt. Durch die dabei entstehende Lichtstreuung kommt es zur Entstehung von Streusignalen in Vorwärts- oder Seitwärtsrichtung. Die Vorwärtsstreuung entspricht dabei der Größe der einzelnen Zelle, die Seitwärtsstreuung der Granularität. Photoröhren und Photodioden konvertieren die optischen Signale in elektrische Impulse, die mit der Intensität des Lichtsignals korrelieren. Mit Hilfe eines Schwellenwertes werden Rausch- und Störsignale eliminiert (57). Ferner lassen sich spezifische Substanzen mit Hilfe

von Antikörpern identifizieren, die mit einem Fluorochrom (z. B. FITC) markiert wurden, welches nach Anregung durch den Laser fluoresziert. Das hier verwendete FITC emittiert bei einer Wellenlänge von 539 nm. Die Bestimmung der Fluoreszenzemission mittels Durchflusszytometrie ermöglicht Aussagen über die Konzentration der jeweiligen Substanz in der Zelle. Abb. Nr.2 ermöglicht einen Überblick über das optische System eines Durchflusszytometers:

Abb. Nr. 2 : Darstellung des optischen Systems eines Durchflußzytometers



7.2.1 Praktische Durchführung der Markierung der Zielantigene mit Antikörpern

Nach Ablauf der Inkubationszeit von 120h (s. 6.3) entfernt man aus den 24-Well – Platten die Leukozytenüberstände, füllt die Wells mit PBS w/o Ca^{2+} / Mg^{2+} auf und stellt sie auf Eis. Um ausreichend Zellen für die Messung zu gewinnen, werden je 2 Wells für eine Messung verwendet. Nach 20 Minuten lassen sich die zuvor adhärennten Zellen unter mehrfachem Spülen mit einer 100 μl –Pipette ablösen und in ein FACS – Rörchen überführen, in dem sie zunächst 2 Minuten

bei 400 x g zentrifugiert werden. Im Anschluss entfernt man Mediumrückstände durch zweimaliges Waschen mit PBS w Ca^{2+} / Mg^{2+} .

Sämtliche noch folgenden Waschschritte werden in ähnlicher Weise durchgeführt. Dann wird das Pellet in 1 ml Natriumazidlösung (NaN_3 ; 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) resuspendiert und die Lösung abzentrifugiert. Die mit PCNA zu markierenden Proben erhalten nun eine 10 minütige Permeabilisierung und Fixierung in 100 μl Paraformaldehyd (4 %) bei 4° C. Nach Zugabe von 1000 μl NaN_3 und Zentrifugation bei 300 x g für 2 Minuten kann das Pellet in der entsprechenden Antikörper enthaltenden Färbelösung resuspendiert und dann für 30 Minuten bei 4° C gelagert werden (41, 49). Nach 30 Minuten wird erneut mit 1000 μl NaN_3 gewaschen und abschließend mit 500 μl NaN_3 resuspendiert. Nun wird die Messung mit dem „Becton Dickinson FACScan flow cytometer“ durchgeführt.

Diese Färbelösungen enthalten im Einzelnen:

Annexin V: 3 μl AnnexinV + 100 μl NaN_3

PCNA: 5 μl PCNA- AK + 100 μl Saponinpuffer

7.2.2 Färbung mit FITC - markiertem Annexin V:

Im Verlauf der Apoptose kommt es zu Veränderungen in der Plasmamembran:

Die Lipiddoppelmembran vitaler Zellen zeichnet sich durch eine asymmetrische Verteilung von bestimmten Phospholipiden aus. Phosphatidylserine sind hier nur auf der inneren, der dem Zytoplasma zugewandten Lipidschicht zu finden.

Während der frühen „Exekutionsphase“ der Apoptose geht diese Asymmetrie verloren, so dass diese Phosphatidylserine nun auch in der äußeren Membran zu finden sind (20). Diese Eigenschaft apoptotischer Zellen dient in vivo den Makrophagen zur spezifischen Identifikation und führt letztlich zur Phagozytose der Zelle. Auf Grund der hohen Affinität von Annexin V zu diesen exponierten Phosphatidylserinen auf der äußeren Membran der Lipiddoppelschicht kommt es in Gegenwart von Calcium (Ca^{2+}) zu einer Bindung zwischen Annexin V und den Phosphatidylserinen. Durch Fluoreszenzmarkierung des Annexins (FITC) wird es so möglich, apoptotische Zellen mittels Durchflusszytometrie zu

erfassen und quantitativ von vitalen Zellen abzugrenzen. Demnach können Zellen mit einer hohen Lichtemission bei Annexinmarkierung (= „Annexin – positiv“) als apoptotisch eingestuft werden. Als Negativkontrolle wurde hier ein Ansatz ohne Annexinzusatz verwendet.

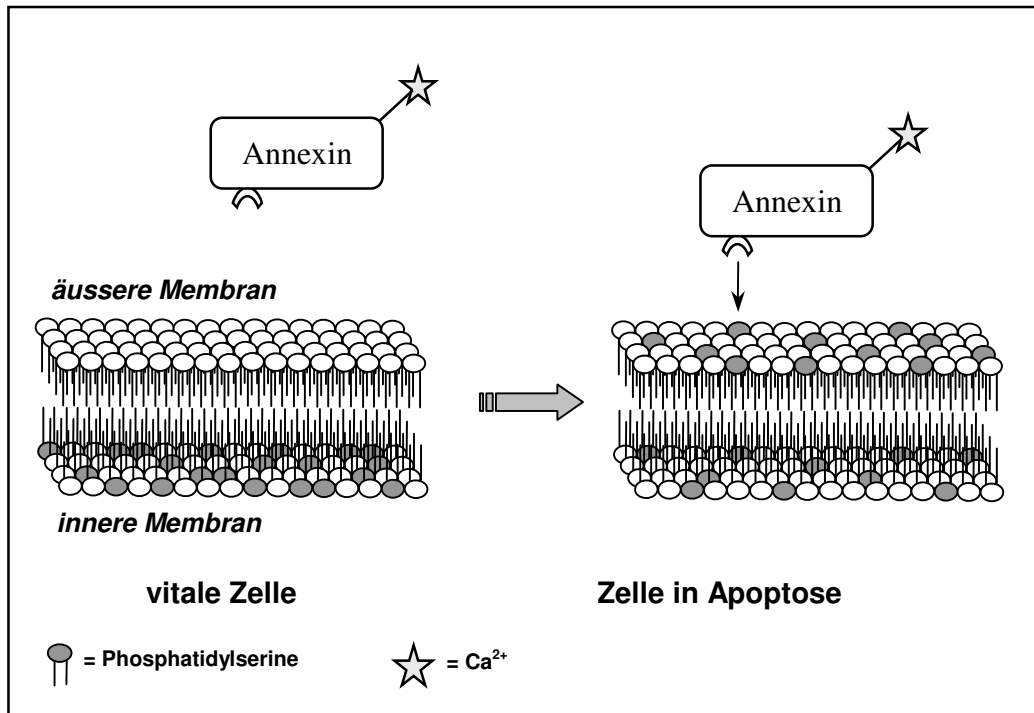
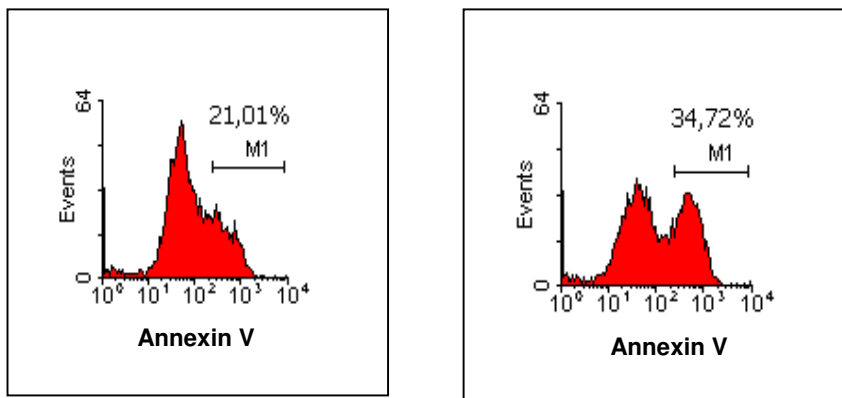


Abb. Nr. 3: Schematische Darstellung der äußeren und inneren Membran von vitalen und apoptotischen Zellen und dem Verlust der Asymmetrie der Lipiddoppelschicht während der Apoptose und der Exposition von Phosphatidylserinen (PS, graue Kreise) auf der äußeren Membran (20).

Abb. Nr.4: Durchflusszytometrischer Apoptosenachweis mittels Annexin V: links 21%, rechts 35% apoptotische Zellen. Jeweils links von der Markierung sind die vitalen, Annexin - negativen Zellen zu finden.



7.2.3 Färbung mit FITC – markierten PCNA – Antikörpern

Das „Proliferating cell nuclear antigen“ (PCNA) spielt bei der Verdopplung des genetischen Materials der Zelle (DNA – Replikation) während der Zellteilung eine entscheidende Rolle: Das PCNA – Protein bildet einen Ring, der die DNA umschließt. Während des Replikationsprozesses fährt es quasi im Geleit mit dem für die Verdopplung zuständigen Enzym, der Polymerase, den DNA-Strang ab. Trifft das Duo auf eine Stelle, an der die DNA beschädigt ist, hält es an, um eine Reparatur des Schadens zu ermöglichen. Durch Verknüpfung mit verschiedenen Proteinen (z.B. Ubiquitin) fungiert PCNA quasi als zellulärer Schutzschalter der DNA – Replikation und –Reparatur (30).

PCNA- Signale steigen somit während der G1- Phase im Zellzyklus an, erreichen ein Maximum in der S- Phase und fallen dann in der G2-/M- Phase wieder ab. Auf Grund dieser Eigenschaft stellt sich PCNA als bewährtes Markerprotein für Zellproliferation dar (41, 54; 70).

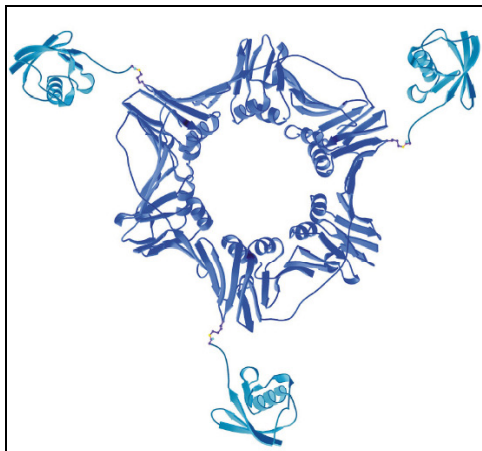


Abb. Nr.5: Darstellung des ringförmigen PCNA-Moleküls (dunkelblau), an das 3 Ubiquitin-Proteine (hellblau) zur Aktivierung der DNA-Reparatur geknüpft sind. (nach: Groll M, Max Planck Institut für Biochemie, Martinsried)

Der zur Messung verwendete menschliche PCNA-Antikörper gelangt in die zuvor mit Paraformaldehyd permeabilisierten Zellkerne und bindet dort an vorhandene PCNA- Moleküle. Proliferierende Zellen in der G1- / S- Phase des Zellzyklus stellen sich so in der FACS- Messung PCNA- positiv dar:

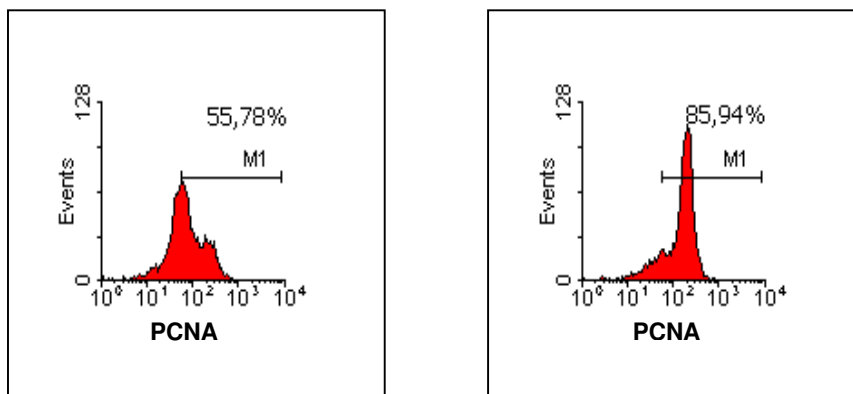


Abb. Nr.6: Proliferationsnachweis mittels PCNA: links 56%, rechts 86% Zellen in der Proliferationsphase

Als Negativkontrolle diente hier ein Ansatz mit einer Isotypenkontrolle bestehend aus FITC-markierten IgG2a-Antikörpern der Maus, der bei jeder Färbereihe mitgemessen wurde. Nach erfolgreicher Durchführung der Färbung sollte der „Peak“ in der Isotypenkontrolle definitionsgemäss deutlich im PCNA-negativen Bereich liegen.

7.3.1 Auswertung

Zu Beginn der Auswertung erfolgt die Darstellung von Forward- (FSC) und Side- Light- Scatter (SSC) Messungen. Hier lassen sich einzelne Populationen der Endothelzellen abgrenzen:

In der frühen Apoptose befindliche Zellen stellen sich im Vorwärtslicht (FSC) mit verminderter Streuung dar, während sich die Intensität des Seitwärtslichtes (Granularität) bei ihnen erhöht bzw. gleich bleibt. Zellen in der späten Apoptosephase zeigen eine Herabsetzung des Streulichts in beide Richtungen (14). Vitale Zellen sind an einer hohen Streuung in beide Richtungen (FSC und SSC) zu erkennen. Diese Eigenschaften sind bedingt durch eine Abnahme der Zellgröße im Verlauf der Apoptose. Im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht lassen sich auch nekrotische Zellen und deren Zelltrümmer zuverlässig abgrenzen und durch Markieren einer solchen Signalgruppe aus der weiteren Auswertung ausschließen. Die quantitative Auswertung der Apoptose und der Proliferation erfolgte folgendermaßen: In jeder Versuchsreihe wurde eine Probe von

Endothelzellen nicht mit Leukozytenüberständen versetzt, sondern mit dem Standardmedium ohne Zugabe von Wachstumsfaktoren (= 0% FCS) inkubiert. Das Histogramm dieses Ansatzes diente als Basis für die Abgrenzung des Apoptose- bzw. Proliferationsanteils der mit echten Überständen versehenen Proben: Die Abgrenzungen der Annexin- bzw. PCNA- positiven Peaks in diesem 0% FCS- Medium dienten als Referenzmarkierung für alle anderen Probenhistogramme in diesem Ansatz.

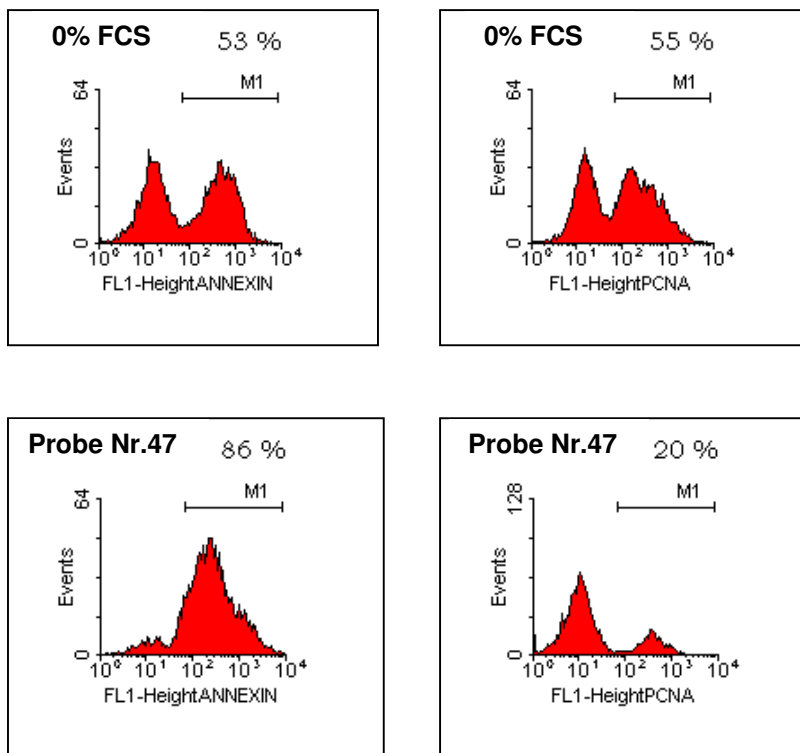


Abb. Nr. 7: Histogrammische Darstellung der FACS- Analyse von Endothelzellen nach 120 - stündiger Inkubation bei 37° C

So ließen sich quantitative Verhältnisse ermitteln, ob in einer mit Leukozytenüberstand inkubierten Probe mehr oder weniger apoptotische bzw. proliferierende Endothelzellen enthalten waren.

Abb. Nr. 7 verdeutlicht dieses Vorgehen an einem Beispiel: Im Standardmedium ohne FCS- Zusatz zeigten 53% ein Annexin- positives und 55% ein PCNA- positives Signal. Diese Werte dienten in diesem Versuch als Basis der Interpretation aller weiteren Ansätze; in Probe Nr. 47 findet sich bei 86% der

Zellen ein positives Signal in der Annexinfärbung und bei lediglich 20% ein positives PCNA-Antikörpersignal. Die Differenz in Probe Nr. 47 zur Referenzpopulation beträgt also 33% mehr apoptotische und 25% weniger proliferierende Zellen. Nimmt man nun eine systemimmanente Ungenauigkeit von 5% an, so lassen sich die einzelnen Proben in verschiedene Kategorien einteilen:

<i>Kategorie</i>	<i>Differenz</i> zur Referenzpopulation
APOPTOSE	Apoptoserate > 5%
INDIFFERENZ kein signifikanter Unterschied	Apoptoserate / Proliferationstendenz von + 5% bis - 5%
PROLIFERATION	Proliferationsrate > 5%

Abb. Nr.8: Bewertungsschema zur Kategorisierung des Wachstumsverhaltens von Endothelzellen

Gemäss dieser Klassifikation wurden die Ergebnisse der einzelnen Proben kategorisiert und waren so einer vereinfachten statistischen Auswertung besser zugänglich.

8.) Statistik

Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. Zur statistischen Analyse fand für die unabhängigen Daten der T-Test nach Student Anwendung. Unterschiede auf dem Niveau von $p < 0,05$ erachtete man als signifikant.

IV. Ergebnisse

1. Apoptose und Proliferation von Endothelzellen in unterschiedlichem Milieu

Vor Beginn der Untersuchungen mit humanen Leukozyten wurden Apoptose und Proliferationsverhalten der Endothelzellen in RPMI- Medium mit unterschiedlichen Eigenschaften untersucht. Diese Versuche dienten als Basis für die Interpretation späterer Ergebnisse mit echten Leukozytenüberständen. Ferner flossen die hier gewonnenen Erkenntnisse in die Gestaltung des Versuchsaufbaus mit Leukozytenüberständen ein.

So wurde unter anderem gezeigt, dass eine schrittweise Reduktion der FCS-Konzentration im Endothelzellmedium binnen 72 h auf letztlich 0% FCS ausreichte, um das FCS als unerwünschten Wachstumsfaktor im Ansatz soweit zu minimieren, dass hierdurch eine stabile Apoptoserate erreicht wurde.

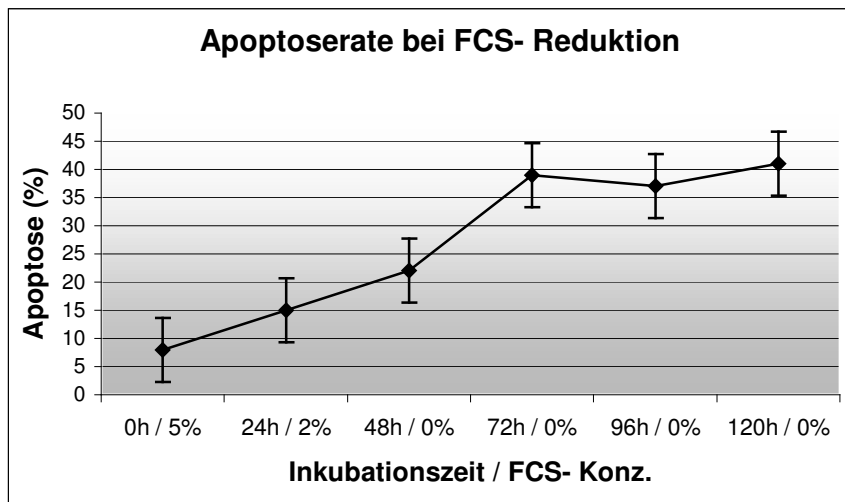


Abb. Nr. 9a: Wachstumsverhalten von EAhy 926 bei schrittweiser Reduktion des FCS-Gehaltes

Wie in Abbildung Nr. 9a verdeutlicht, weist die Annexinfärbung einen deutlich zunehmenden Anteil an Annexin – positiven Endothelzellen (= Zellen in Apoptose) nach, wenn man die Konzentration an Wachstumsfaktor (FCS) reduziert.

Zunächst stieg die Apoptoserate der Kulturzellen linear an, nach etwa 72 Stunden lag sie in etwa konstant bei 40%.

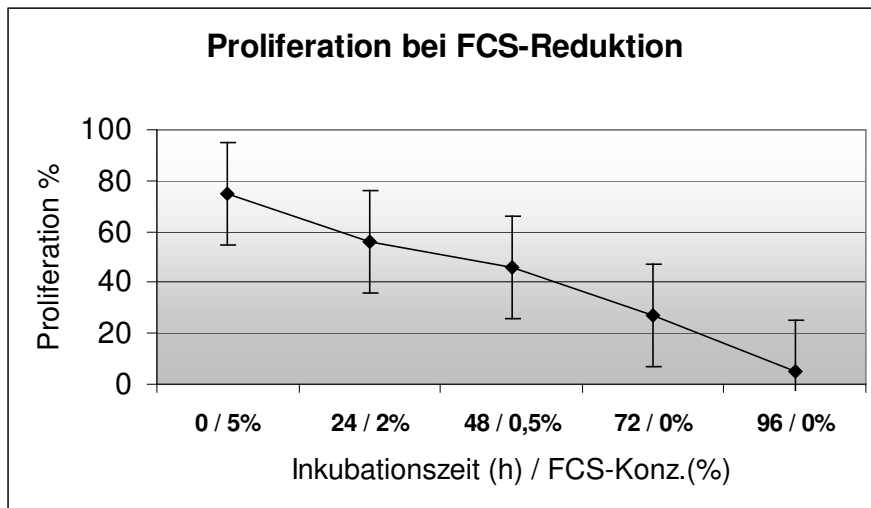


Abb. Nr. 9b : Wachstumsverhalten von EAhy 926 bei schrittweiser Reduktion des FCS-Gehaltes

Um diese mit dem Apoptosemarker „AnnexinV“ gemachte Beobachtung zu validieren, wurde unter gleichem Versuchsaufbau die Proliferation in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bei Reduktion der FCS- Konzentration als Wachstumsfaktor gemessen. Hierzu dienten FITC – gefärbte Antikörper, die spezifisch an PCNA (= „proliferating cell nuclear antigen“) einer sich teilenden Zelle binden und sie so in der FACS- Analyse quantitativ nachweisbar machen. Die Färbungen mit PCNA – Antikörpern (Abb. Nr. 9b) zeigten, dass sich die Proliferationsrate der Endothelzellen annähernd proportional zum Gehalt an Wachstumsfaktor FCS verhält.

2. Wachstumsverhalten der Endothelzellen nach Inkubation mit Leukozytenüberständen nierengesunder Probanden

Nachdem die Leukozyten aus 50 ml Vollblut nierengesunder Probanden isoliert, über 48 Std. in Medium inkubiert und aus der Lösung entfernt wurden, dienten die Überstände als Versuchsmedien für die Endothelzellen EAhy 926. Nach 120-stündiger Inkubation wurde das Verhalten der Endothelzellen untersucht. Nach Inkubation mit Leukozytenüberständen gesunder Kontrollpersonen konnten folgende Ergebnisse gefunden werden:

Im *Mittelwert* proliferierten Endothelzellen nach Inkubation mit leukozytären Mediumüberständen Nierengesunder um **10,6%** weniger als im RPMI-Standardmedium,

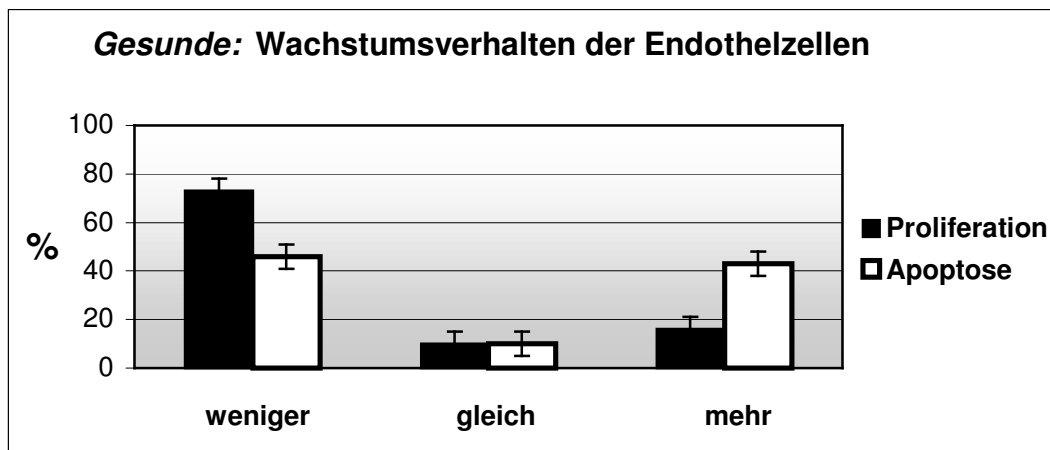
wohingegen die Apoptoserate **4,6 %** dieser Endothelzellen über der Referenzpopulation in RPMI- Standardmedium lag.

Abb. Nr. 10 a: Prozentuale Darstellung des Wachstumsverhaltens der Endothelzellen nach Inkubation mit Leukozytenüberständen nierengesunder Probanden

Referenzansatz: Standardmedium mit 0% FCS

Gesunde	weniger	gleich	mehr
Proliferation	73%	10%	16%
Apoptose	46%	10%	43%

Abb. Nr. 10 b: Zusammenfassende graphische Darstellung nach Einteilung in drei Kategorien



3. Wachstumsverhalten der Endothelzellen nach Inkubation mit Leukozytenüberständen dialysepflichtiger Probanden

Die Blutproben der Probanden mit dialysepflichtiger chronischer Niereninsuffizienz wurden direkt vor Dialysebeginn unter sterilen Bedingungen entnommen und danach in analoger Vorgehensweise wie die Proben der Nierengesunden untersucht. Die Auswertung der FACS – Ergebnisse dieser Probengruppe zeigte folgende Ergebnisse:

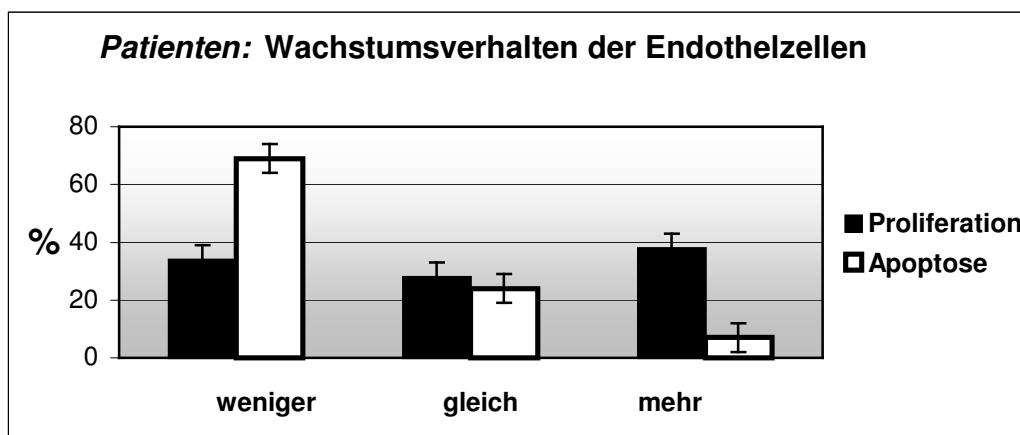
Im Vergleich zu den mit Standardmedium ohne Wachstumsfaktorzusatz inkubierten Endothelzellen lag die Proliferationsrate im Mittel um **0,71 %** höher, die Apoptoserate allerdings um **5,6%** niedriger. (Abb. 11)

Abb. Nr. 11a: Prozentuale Darstellung des Wachstumsverhaltens der Endothelzellen nach Inkubation mit Leukozytenüberständen dialysepflichtiger Probanden

Referenzansatz: Standardmedium mit 0% FCS

Patienten	weniger	gleich	mehr
Proliferation	34%	28%	38%
Apoptose	69%	24%	7%

Abb. Nr. 11b: Zusammenfassende graphische Darstellung nach Einteilung in drei Kategorien



4. Vergleich des Wachstumsverhaltens von Endothelzellen nach Inkubation mit Leukozytenüberständen Nierengesunder und dialysepflichtiger Probanden

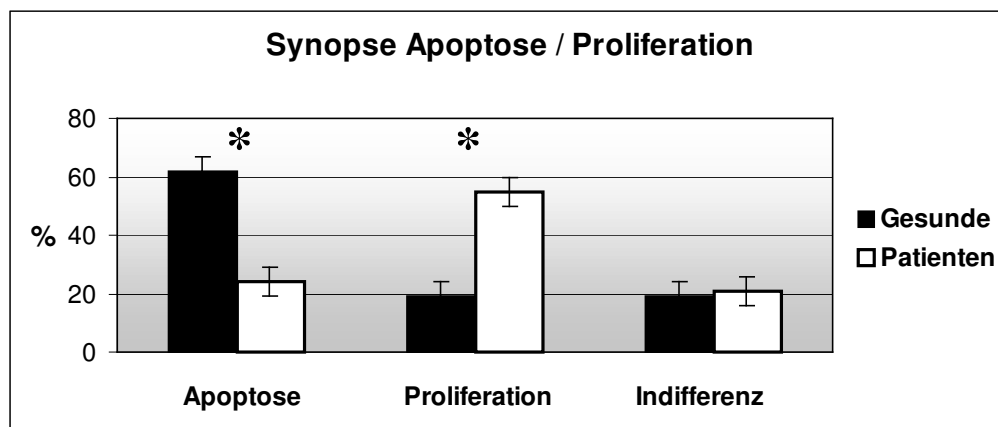
Die hinsichtlich der Zielsetzung der Arbeit wesentliche Frage war nun, ob Endothelzellen nach Inkubation mit leukozytären Überständen urämischer Probanden ein signifikant anderes Wachstumsverhalten aufweisen als nach Inkubation mit Überständen nierengesunder Probanden. Beim Vergleich dieser zwei Gruppen zeigten sich folgende Ergebnisse:

Abb. Nr. 12a: Wachstumsverhaltens der Endothelzellen im Vergleich der Leukozytenüberstände Nierengesunder und von Dialysepatienten (Tabelle)

relativ(%)	Apoptose	Proliferation	Indifferenz
Gesunde	62	19	19
Patienten	24	55	21

Abb. Nr. 12b: Wachstumsverhalten der Endothelzellen im Vergleich der Leukozytenüberstände Nierengesunder und von Dialysepatienten (Säulendiagramm)

* $p < 0,05$ (T-Test)



Bei 62% der Proben Nierengesunder konnte insgesamt von einer Apoptose der Endothelzellen ausgegangen werden, in der Gruppe der Dialysepatienten bei lediglich 24%. Demgegenüber fand sich bei lediglich 19% der mit nierengesunden Leukozytenüberständen bebrüteten Endothelzellproben eine Proliferation, die Gruppe der Dialysepatienten lag hier bei 55%. Für beide Wachstumsmarker lag die

Gruppe der nicht klar einzustufenden Proben (= „Indifferenz“) bei 19% bzw. 21%. Die im T-Test nach Student ermittelten Werte als Maß für die Signifikanz der Ergebnisse liegen im Einzelnen bei:

Vergleich der Proliferationsrate der Endothelzellproben nach Inkubation mit Überständen Nierengesunder und von Dialysepatienten:

Unterschied im T-Test = 0,0011

Vergleich der Apoptoserate der Endothelzellproben nach Inkubation mit Überständen Nierengesunder und von Dialysepatienten:

Unterschied im T-Test = 0,0039

5. Ergebnisse der Versuche mit stimulierten Leukozyten

Nachdem nun gezeigt werden konnte, dass Serumüberstände der Leukozyten chronisch dialysepflichtiger Menschen eine signifikant höhere Proliferation und niedrigere Apoptose bei Endothelzellen in vitro bewirken, stellte sich die Frage, inwieweit diese Leukozyten noch auf Stoffe reagieren, die bekanntermaßen eine Stimulation der Zellen der körpereigenen Abwehr verursachen.

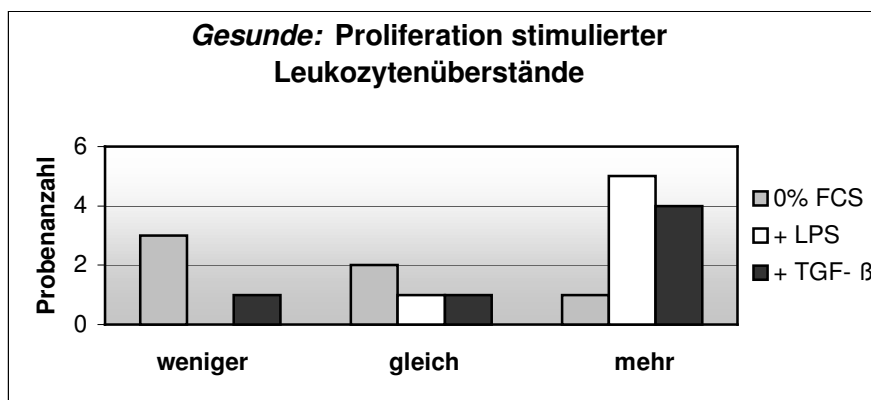
So wurden Lipopolysaccharide (=„LPS“) als Bestandteile von Bakterienmembranen zugesetzt, die durch ihre Oberflächenstruktur eine Aktivierung des menschlichen Immunsystems bewirken. Auch die zweite hier verwendete Substanz, der „tumorgrowth-factor- β “, (= TGF- β), repräsentiert einen bekannten Mediator unseres Abwehrsystems. Um die Stimulationswirkung dieser beiden Substanzen zu testen, erfolgte eine Modifikation des zuvor verwendeten Versuchsaufbaus (s. Teil II, Kap. 6.2). Zunächst wurde geprüft, ob bei diesem Versuchsaufbau überhaupt Unterschiede hinsichtlich einer Stimulation der Leukozyten nachweisbar sind. Hierzu wurden zunächst Leukozyten von nierengesunden Probanden verwendet.

Die Auswertung der FACS-Analysen zeigte folgende Ergebnisse:

- 1.) Die Überstände der Leukozyten, die sich in reinem Kulturmedium befanden, vermittelten offensichtlich keine proliferationsfördernde Wirkung auf Endothelzellen. (s. Abb. Nr.13: „0% FCS“)

- 2.) In keiner Endothelzellprobe nach Inkubation mit Überständen Nierengesunder konnte nach Stimulation eine erhöhte Apoptoserate ($= > 5\%$) nachgewiesen werden.
- 3.) Die Auswertungen zeigen eine deutlich gesteigerte Proliferationsrate, wenn die Leukozyteninkubation mit Zusatz von LPS oder TGF- β erfolgte (Abb. Nr.13). So konnte bei **83%** ($= +$ LPS) bzw. **67%** ($= +$ TGF- β) Proben eine Proliferationsrate $> 5\%$ im Vergleich zum 0%-FCS-Medium nachgewiesen werden. Die Grundlage dieser Berechnungen bildeten 5 von 6 (+ LPS) und 4 von 6 (+ TGF- β) deutlich PCNA- positive Ansätze.

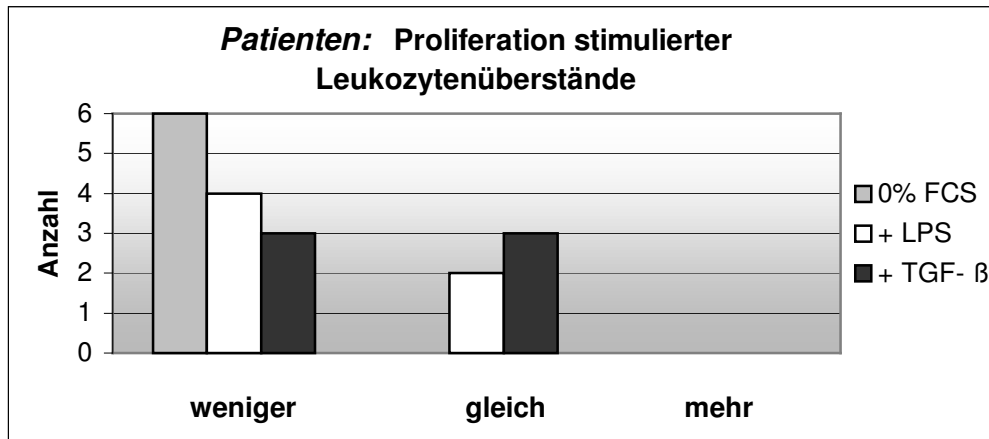
Abb. Nr. 13: Endothelproliferationsraten nach Inkubation mit Überständen stimulierter Leukozyten nierengesunder Probanden



Die Untersuchungen von Endothelzellen nach Bebrütung mit Überständen stimulierter Leukozyten dialysepflichtiger Menschen ergaben:

- 1.) Die Apoptoserate im „Referenzmedium“ ohne Zusätze war bei keiner Probe gesteigert. Unter Zusatz von LPS konnte bei **33%** (2 von 6 Proben), bei Zugabe von TGF- β bei **16%** (1 von 6 Proben) eine Apoptoserate über 5% nachgewiesen werden.
- 2.) Im Gegensatz zu den Versuchen mit Überständen nierengesunder Leukozyten ließen sich jetzt keine Proliferationssteigerungen der Endothelzellproben mehr nachweisen. Vielmehr zeigten alle mit dem Referenzmedium inkubierten Proben eine Proliferationsrate von $< 5\%$, etwa ein Drittel der Endothelzellproben, die zuvor mit Stimulantien behandelt waren, musste dem Indifferenzbereich von -5 bis $+5\%$ zugeordnet werden.

Abb. Nr. 14: Endothelproliferationsrate nach Inkubation mit Überständen stimulierter Leukozyten dialysepflichtiger Probanden



Im statistischen Vergleich der Versuchsergebnisse aus der Gruppe der Nierengesunden und der Dialysepatienten ergaben sich folgende Werte (Abb. Nr. 15)

Vergleich Endothelzell**proliferationsrate** nach Inkubation mit Überständen **LPS**-stimulierter Leukozyten Gesunder vs. Patienten: T-Test $p = 0,000525$

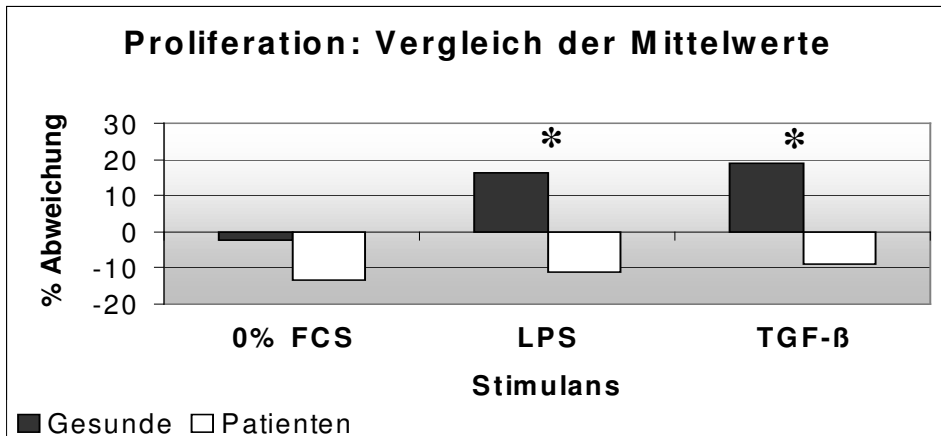
Vergleich Endothelzell**proliferationsrate** nach Inkubation mit Überständen **TGF-β**-stimulierter Leukozyten Gesunder vs. Patienten: T-Test $p = 0,00488$

Bei einer zuvor festgelegten Signifikanzschwelle von $p < 0,005$ im T-Test nach Student sind diese beiden Ergebnisse somit als signifikant zu betrachten.

Der statistische Vergleich der mit Referenzmedium (0%-FCS) inkubierten Endothelzellen ergab ein – nicht als signifikant zu bewertendes- $p = 0,0615$.

Der Vergleich der Apoptoseraten Gesunder / Dialysepflichtiger erbrachte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied.

Abb. Nr. 15: Vergleich der mittleren Endothelproliferationsraten nach Inkubation mit Überständen stimulierter Leukozyten Nierengesunder und dialysepflichtiger Probanden; * $p < 0,05$ (T-Test)



Zusammenfassend zeigen die Stimulationsversuche daher Folgendes:

Leukozyten nierengesunder Menschen produzieren offensichtlich proliferationsfördernde Substanzen für Endothelzellen, die Leukozyten terminal niereninsuffizienter Patienten nicht mehr freisetzen können.

Ein signifikant verändertes Apoptoseverhalten von Endothelzellen nach Bebrütung mit Überständen LPS- bzw. TGF-β- stimulierter Leukozyten Nierengesunder und urämischer Probanden konnte nicht nachgewiesen werden.

4. Kasuistiken

Zunächst hatte diese Arbeit zum Ziel, einen möglichen Unterschied in der durch Leukozyten des peripheren Blutes vermittelten Proliferationstendenz von Endothelzellen zwischen Dialysepatienten und nierengesunden Probanden nachzuweisen. Nachdem hier in-vitro signifikante Unterschiede nachgewiesen werden konnten, stellte sich die Frage, ob sich bei diesen Dialysepatienten bereits in der Krankengeschichte eine Häufung kardiovaskulärer Ereignisse fand, die auf eine atherosklerotische Genese mit erhöhter Proliferation des Gefäßendothels zurückzuführen sind. Um einen solchen Zusammenhang nachzuweisen, wurden einige Krankengeschichten (Patienten: n=14, Gesunde: n=26) der einzelnen

Probanden sorgfältig analysiert. Kriterien, die eine Klassifikation als „kardiovaskuläres Ereignis“ erlauben sollten, waren:

- Dauer der Hämodialysetherapie bis zum Versuchszeitpunkt
- CRP– Wert als Marker für eine entzündliche Aktivität im peripheren Blut
- bereits stattgefundenene kardiovaskuläre Ereignisse, die auf eine atherosklerotische Genese schliessen lassen wie z. B.: periphere arterielle Verschlusskrankheit (Stadium > IIa nach Fontaine), Myokardinfarkt, cerebraler Insult, Mesenterialinfarkt, Hörsturz und Ähnliches

Die bei fast allen dialysepflichtigen Probanden vorhandene arterielle Hypertonie wird hier von vornherein als Kriterium ausgeschlossen, da sie bei diesen Patienten pathogenetisch nicht als „kardiovaskuläres Ereignis“ interpretiert werden kann.

Die Auswertung dieser Recherchen zeigte mit rund 30% eine wesentlich höhere Inzidenz an kardiovaskulären Ereignissen bei Dialysepatienten (4 von 14 Patienten) im Vergleich zu 0% bei Nierengesunden (0 von 26 Probanden).

IV. Diskussion

Die Bewertung der Pathomechanismen der Atherosklerose hat in den letzten Jahren eine deutliche Wandlung erfahren. So werden die klassischen Risikofaktoren der Framinghamstudie mit wachsendem Wissen um das Ineinandergreifenden verschiedener Regelkreise unseres Stoffwechsels ständig erweitert.

Einen Fokus der medizinischen Forschung stellt die Hypothese dar, dass entzündliche, vorwiegend leukozytenvermittelte Reaktionen in engem Zusammenhang mit der Entwicklung atherosklerotischer Veränderungen stehen (44, 59, 62). Als gemeinsame Endstrecke vieler Risikofaktoren gelten hierbei zunächst Endotheldysfunktionen, die dann zur Bildung des atheromatösen Plaque führen. Der akute Gefäßverschluss ist dann letztlich meist Konsequenz eines instabilen, rupturierten Plaques mit Entstehung eines okkludierenden Thrombus (46).

Insbesondere für Menschen mit terminaler Niereninsuffizienz, die über längere Zeit an eine Dialysetherapie gebunden sind, bedeuten kardiovaskuläre Komplikationen ein wesentliches, lebensbedrohliches Problem (72, 79). So werden mit Atherosklerose assoziierte Ereignisse in Europa und Nordamerika für ca. 50% der vorzeitigen Todesfälle dieses Kollektivs verantwortlich gemacht (11, 21).

In diesem Kontext steht der Ausgangspunkt dieser Arbeit, an Hand eines in-vitro-Modells das Wachstumsverhalten von Endothelzellen unter dem Einfluss leukozytärer Faktoren verschiedener Kollektive zu untersuchen.

1.) EAhy 926 als Prototyp einer Endothelzelle

Der erste Abschnitt dieser Arbeit hatte zum Ziel, ein standardisiertes Zellkulturprotokoll zu entwickeln, das für die späteren Inkubationsversuche mit leukozytären Überständen eine konstante Anwendung finden sollte.

Die aus einer Fusion von Endothelzellen menschlicher Nabelschnurvenen (HUVEC) mit der Bronchialcarzinomzelle A549 entwickelte Hybrid-zelllinie „EAhy 926“ ist bereits mehrfach erfolgreich für in-vitro Studien mit immunologischen Fragestellungen verwendet worden (45, 48). Ersetzte man das Kulturmedium alle 72h, ließ sich ein

optimales Zellwachstum der EAhy beobachten. Um das Risiko einer Kontamination und Entdifferenzierung zu reduzieren, wurden maximal 12 Passagen eingesetzt.

Im Hinblick auf die Fragestellung der Arbeit erwies sich der Zusatz von Wachstumsfaktoren aus fetalem Kälberserum (5% FCS) als problematisch: Einerseits ist es zur Kultivierung der Endothelzellen notwendig, da es den Zellen Hormone, Bindungsproteine, Anheftungsfaktoren, für die Proteinsynthese notwendige Aminosäuren, Salze und Albumin enthält. Andererseits stellt es prinzipiell einen systemischen Störfaktor dar, wenn die Wirkung von Faktoren menschlicher Leukozyten untersucht werden soll. Die Lösung dieses Problems bestand in der schrittweisen Reduktion der FCS-Konzentration über insgesamt 72 h bis auf 0% (Kap.II, 6.1). In wiederholt durchgeführten FACS-Messungen ließ sich belegen, dass die Apoptoserate nach ca. 72 h ein Plateau erreichte, während der Anteil proliferierender Endothelzellen in etwa linear abnahm (s.a. Kap. III.1).

2.) Wachstumsverhalten der Endothelzellen nach Inkubation mit leukozytären Überständen Nierengesunder und von Dialysepatienten

Aus 26 Proben nierengesunder Probanden erhielt man folgendes Ergebnis: Im Mittelwert lag die Proliferationsrate des Endothels 11% unterhalb, die Apoptoserate 5% oberhalb der Standardmedium-Gruppe. Die Gruppe der Dialysepatienten (n=29) zeigte eine im Mittel um 0,7% erhöhte Proliferation bei 6% niedrigerer Apoptoserate. Aus diesen Werten ist zunächst noch kein signifikantes Ergebnis zu erkennen, allerdings handelt es sich um Mittelwerte mit einer erhöhten statistischen Störanfälligkeit gegenüber einzelnen Proben mit extremen Ergebnissen („Ausreisser“). Bei genauer Analyse der Histogramme der FACS-Messungen fielen einige Proben auf, die sowohl eine apoptotische als auch eine proliferierende Zellgruppe enthielten. Im Kontext der Fragestellung nach einem Unterschied im Wachstumsverhalten der Endothelzellen nach Inkubation mit leukozytären Überständen gesunder und dialysepflichtiger Probanden lassen sich solche Proben jedoch nicht zweifelsfrei verwerten. Um zu verwertbaren Ergebnissen zu gelangen, wurde jede Messung in drei klar abgrenzbare Gruppen kategorisiert: a) mehr, b) gleich, c) weniger Apoptose / Proliferation als die Vergleichsmessung mit Standardmedium ohne FCS-Zusatz. Proben

mit unklarem Ergebnis (etwa die oben beschriebene „Doppel- Peak- Gruppe“) wurde als „Indifferenzgruppe“ benannt. Zusätzlich sind von allen Proben mehrere Messungen an unterschiedlichen Tagen durchgeführt worden – falls die Zuordnung zu den oben genannten Kategorien dadurch zweifelhaft wurde, flossen diese Proben nicht in die statistische Auswertung ein.

Mit Hilfe dieses klaren „cut-offs“ ließen sich signifikante Ergebnisse ermitteln: Die mit Leukozytenüberständen Nierengesunder inkubierten Endothelzellen ließen weniger Proliferation und mehr Apoptose erkennen als die Zellen aus dem Standardmedium. Dieses Ergebnis entsprach den Erwartungen vor Versuchsbeginn; es zeigt, dass ohne endotheliale Wachstumsfaktoren diese Zellen zunehmend starben.

Die mit Leukozytenüberständen dialysepflichtiger Probanden inkubierten Endothelzellen entwickelten ein davon deutlich abweichendes Wachstumsverhalten: Über 2/3 dieser Proben (69%) wiesen einen signifikant kleineren Anteil apoptotischer Zellen auf, bei immerhin 38% fand sich eine Mehrheit proliferierenden Endothels als in den Referenzproben mit Standardmedium. Etwa ¼ der Proben waren der Indifferenzgruppe zuzuordnen (28% und 24%).

Der Vergleich der Probandenkollektive Nierengesunde / Dialysepatienten – gegliedert nach den Gruppen „Proliferation“, „Apoptose“ und „Indifferenz“ ließ statistisch signifikante Unterschiede nachweisen: 62% der mit Überständen nierengesunder Leukozyten inkubierten Proben gingen in Apoptose (24% der Dialysegruppe; T-Test = 0,004), demgegenüber standen 55% proliferierende Proben der Dialysepatienten (19% der Nierengesunden; T-Test = 0,001).

Dieses Ergebnis einer gesteigerten Endothelproliferation bei urämischen Patienten (Blutentnahme unmittelbar vor Dialysebeginn) fügt sich übereinstimmend in den derzeitigen Literaturkontext hinsichtlich der Bedeutung des vaskulären Endothels und der Pathogenese der Atherosklerose ein. Libby beschrieb 2002 die enge Verknüpfung zwischen Fettstoffwechselstörungen (Oxidation des LDL und Ablagerung in der Gefäßintima) und entzündlichen Prozessen, Ross ging bereits 1990 davon aus, dass mehrere „nicht-klassische“ Risikofaktoren wie Entzündungsaktivität, Fehlernährung und oxidativer Stress als gemeinsame pathophysiologische Endstrecke die Endotheldysfunktion und damit Entstehung der atherosklerotischen Plaque begünstigen (44, 61). Diese Risikofaktoren sind bei terminaler Niereninsuffizienz gehäuft zu finden

(29, 72). In einer neueren Arbeit beschreibt Ross die sklerotischen Gefäßveränderungen als mikroinflammatorischen Prozess (61), Zimmermann et al. konnte 1999 in einer prospektiven Studie ein Ansteigen der Gesamt- und der kardiovaskulären Mortalität mit steigendem Spiegel des C-reaktiven Proteins (CRP) als Marker der Mikroinflammation belegen (79). Derzeit sieht man die Ursachen einer Plaqueruptur und Gefäßokklusion vor allem im Bereich inflammatorischer Effekte auf das Wachstums- und Apoptoseverhalten der Gefäßendothelzellen (3).

3.) Stimulationsversuche mit LPS und TGF- β

Vor diesem Hintergrund stehen die Messungen des endothelialen Wachstumsverhaltens nach Stimulation mit inflammatorischen Mediatoren (LPS und TGF- β). Hierzu erfolgte die 48-stündige Leukozyteninkubation unter Zusatz dieser Substanzen. In Analogie zur Hauptversuchsreihe ohne Stimulation prüfte ich zunächst das Wachstum der Endothelzellen unter Einfluss nierengesunder Leukozytenüberstände im Vergleich zum Standardmedium, anschließend erfolgte der Vergleich mit Überständen dialysepflichtiger Patienten. Die Ergebnisse aus den Messungen der Gruppe der Nierengesunden entsprachen den Erwartungen: Unter LPS- und TGF- β -Zusatz war eine deutliche Steigerung der Proliferation nachzuweisen, bei keiner Probe fand sich eine erhöhte Apoptosefraktion. Dieses Ergebnis werteten wir als Beleg der leukozytenvermittelten inflammatorischen Aktivität auf das Stoffwechselverhalten der Endothelzellen. Der Vergleich mit Überständen dialysepflichtiger Probanden erbrachte ein interessantes Ergebnis: Die endotheliale Proliferationsrate konnte durch den Zusatz inflammatorischer Stimulanzien nicht weiter gesteigert werden. Während der Vergleich der Apoptoserate des Endothels mit Überständen Nierengesunder keine signifikanten Unterschiede zeigte, wiesen die Proben mit Überständen dialysepflichtiger Patienten statistisch signifikant eine geringere Proliferation auf. Der Student'sche T-Test ermittelte bei LPS ein $p=0,0005$, bei TGF- β ein $p=0,0048$. Im statistischen Vergleich mit dem Standardmedium (ohne Leukozytenkontakt) fand sich erwartungsgemäß kein signifikanter Unterschied der Proliferationsrate.

Nach Stimulation der Leukozyten mit LPS / TGF- β sind im Überstand nierengesunder Zellen offenbar Faktoren enthalten, die bei Endothelzellen Apoptose vermindern und

die Proliferationsrate erhöhen. Im Unterschied dazu konnte diese Endothelzellaktivierung durch Leukozyten urämischer Patienten hier nicht nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung dieses Sachverhaltes könnte in Richtung gestörter Reparaturvorgänge bei reduzierter Proliferationspotenz gehen; allerdings kann diese Erklärung nicht an Hand hier gemachter Beobachtungen bewiesen werden. Die derzeitige internationale Forschung zur Funktion des Immunsystems bei terminaler Niereninsuffizienz unter Dialysetherapie stellt einen Forschungsschwerpunkt dar. Einerseits muss von einer Einschränkung der Immunkompetenz durch Defekte der unspezifischen Immunabwehr auf zellulärer Ebene (insbesondere bei Granulozyten, Monozyten (38, 64) und T-Lymphozyten) durch Akkumulation inhibitorischer Substanzen (z.B. Granulozyten-inhibierendes-Protein GIP I + II (25)) durch urämische Toxine ausgegangen werden (58, 79). Verschiedene Autoren konnten bereits Einschränkungen wichtiger immunologischer Zellfunktionen (Phagozytose, Degranulation, Chemotaxis und IgM-Synthese) beschreiben (26, 31, 52).

Andererseits finden sich bei terminaler Niereninsuffizienz eine Vielzahl proinflammatorischer Faktoren wie gewebezell-aktivierende Substanzen (nachgewiesen bei Hepatozyten, Myozyten und Endothelzellen (33, 60)), LPS, Endotoxine, Komplementfaktor D und andere. Eine besondere Bedeutung kommt hier der extrakorporalen Komponente unter Dialysebedingungen zu: Mehrere Studien untersuchten die Zusammenhänge zwischen Dialysemembranbeschaffenheit und Dialysetechnik im Hinblick auf die Elimination proatherogener Faktoren (36, 50). Ziel dieser Bemühungen ist, die renale Restfunktion möglichst lange zu erhalten sowie Komplikationen durch Komorbidität und die Mortalität zu senken. Durch den Einsatz biokompatibler Membranen ist man diesem Ziel deutlich näher gekommen, allerdings sind die pathophysiologischen Zusammenhänge noch nicht hinreichend geklärt, um konkrete therapeutische Bedingungen für eine günstige Prognose zu formulieren (27, 28, 37).

Zusammenfassend lässt sich nun feststellen, dass trotz technischer Verbesserungen unter Hämodialysebedingungen von einer chronischen Mikroinflammation mit gesteigertem Komplementumsatz und erhöhten Akute-Phase-Proteinen auszugehen ist, die auf das Gefäßendothel einwirken und dort Fehlfunktionen begünstigen.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Stimulationsversuche legen nahe, dass Leukozyten dialysepflichtiger Probanden unmittelbar vor Dialysebeginn offenbar kaum weiter durch LPS und TGF- β als inflammatorische Mediatoren stimuliert werden konnten, während dies bei Nierengesunden eindeutig der Fall war. Eine zweifelsfreie Interpretation dieser Tatsache gestaltet sich in Anbetracht der geringen Fallzahlen ($n = 6$ aus jedem Kollektiv) als schwierig, da mögliche Ausreißer hier eine hohe Gewichtung erhielten. Allerdings wurden diese Versuche zweifach durchgeführt, und der Vergleich mit dem Standardmedium blieb ohne signifikante Unterschiede. Außerdem muss berücksichtigt werden, dass menschliches Gefäßendothel in vivo sicher noch andere Eigenschaften besitzt als die hybridisierte Endothelzelle EAhy 926 (s.o.). Möglicherweise ließe sich eine gesteigerte leukozytäre Aktivität auch erst nach Aktivierung des Komplementsystems durch körperfremde Oberflächen (\Rightarrow Dialysemembran) erreichen. Ein ähnlicher Zusammenhang –die Notwendigkeit einer LPS- / Endotoxinexposition zur Zytokinfreisetzung nach Komplementaktivierung- ist bereits von Schindler 1993 beschrieben worden (67).

4. Kasuistiken

Im Anschluss an das leukozytenvermittelte, signifikant unterschiedliche Wachstumsverhalten endothelialer Zellen in vitro stellte ich mir die Frage, ob sich an Hand der Anamnesen meiner Probanden ebenfalls signifikante Unterschiede finden ließen. Im Sinne des Themas der Arbeit wurde geprüft, ob bei den Dialysepatienten, deren Leukozyten ich für meine Versuche verwendet habe, bereits kardiovaskuläre Komplikationen eingetreten waren. Um dies zu untersuchen, wurden einige zur Verfügung stehende Krankengeschichten durchgearbeitet. Die genauen Klassifikationskriterien hierzu finden sich im Kap. III.4.

Im Ergebnis fanden sich bei etwa 30% der Dialysepatienten derartige Ereignisse, bei den nierengesunden Probanden bei 0%. Dieses Ergebnis könnte –rein mathematisch betrachtet- als signifikant angesehen werden, allerdings muss zum Einen die absolute Größe und zum Anderen die Altersstruktur der beiden Probandenkollektive mitbedacht werden: Die für eine allgemeingültige Aussage hinsichtlich des möglicherweise erhöhten kardiovaskulären Risikos nötige Fallzahl konnte im Rahmen dieser Arbeit

nicht erreicht werden (n = 14 Dialysepatienten // n = 26 nierengesunde Probanden), zusätzlich waren weitergehende Untersuchungen (z. B. CRP- Bestimmung) organisatorisch nicht möglich. Ferner bestand das Probandenkollektiv der Nierengesunden zu einem großen Teil aus wesentlich jüngeren Personen als die Dialysepatienten, was eine valide Aussage über das kardiovaskuläre Risiko im Vergleich stark in Frage gestellt hätte.

5. Ausblick

Insgesamt betrachtet fügen sich die Ergebnisse aus den im Rahmen dieser Arbeit in-vitro gemachten Untersuchungen in den derzeitigen Literaturkontext ein; hier konnte eine signifikant erhöhte Proliferation an Endothelzellen unter dem Einfluss leukozytärer Faktoren als Zeichen gesteigerter entzündlicher Aktivität nachgewiesen werden.

Ein grundlegendes Problem liegt in der Vergleichbarkeit dieser in-vitro gemachten Untersuchungen mit der Hybridzelllinie EAhy 926 und dem menschlichen Gefäßendothel. Die internationale immunologische Forschung befindet sich ständig auf der Suche nach validen Zelltypen, die eine Übertragung von in-vitro gemachten Beobachtungen auf den lebenden Menschen erlauben. EAhy 926 bietet wegen ihrer monoklonalen Herkunft und ihrer verhältnismäßig guten Kultivierbarkeit weitgehend konstante Versuchsbedingungen. Im Vergleich zu anderen Endothelzellen konnte die Vergleichbarkeit bei Reaktionen unter immunologischen Fragestellungen bereits belegt werden (6, 74). Ein weiterer Vorteil gegenüber vitalen Zelltypen wie z.B. die menschlichen Nabelschnurvenenzellen („HUVEC“) ist die Tatsache, dass man keine Ergebnisbeeinflussung durch interindividuelle Unterschiede der Spenderorganismen befürchten muss.

Allerdings bildet EAhy nicht alle Facetten unseres Immunsystems naturgetreu ab; so ließen sich im Vergleich verschiedener immortalierter Endothelzelllinien deutliche Unterschiede in der Antwortmöglichkeit auf Zytokine, der Expression immunologisch relevanter Oberflächenmoleküle (MHC I+II, V-CAM-1, E-Selektin) und der transendothelialen Migrationsfähigkeit monozytärer Zellen nachweisen (45). Salmi et al. kamen bereits 1995 zu einem ähnlichen Ergebnis betreffend das „vascular adhesion protein-1“ (VAP-1) (65).

Das unterschiedliche Wachstumsverhalten der Eahy 926 nach Inkubation mit Leukozytenüberständen verschiedener Probandengruppen ist als multifaktorieller Prozess zu verstehen – welche Stoffe hierzu eine prominente Rolle spielen, ließ sich anhand der hier gewählten Versuchsanordnung zunächst nicht zeigen. Man könnte analoge Versuche an anderen Endothelzellen (beispielsweise HUVECs) durchführen, um die Ergebnisse zu vergleichen. Sollten sich dann Unterschiede im Ansprechen des verwendeten Endothels auf leukozytäre Faktoren nachweisen lassen, wären Rückschlüsse hinsichtlich der Genese dieser Wachstumsmodulatoren und den Charakteristika der verwendeten Endothelzelle denkbar.

Weiterhin böten genaue Proteinanalysen der hier verwendeten Proben mit anderen Testverfahren (z. B. PCR, elektrophoretische Analysen etc.) die Möglichkeit, diese Ergebnisse mit dem jeweiligen Wachstumsverhalten einzelner Probanden zu vergleichen.

Eine Verknüpfung des Wachstumsverhaltens und den Krankengeschichten der Probanden hinsichtlich kardiovaskulärer Ereignisse wurde hier nach Abschluss der in-vitro-Analysen versucht (s.o.). Die Daten können in Anbetracht der geringen Fallzahlen und der unterschiedlichen Altersverteilung der Probanden noch kein eindeutiges Bild liefern. Um hierzu verlässliche Schlüsse zu ziehen, müsste ein prospektives Studiendesign gewählt werden, bei dem parallel weitere Labordiagnostik (z. B. CRP-Wert, Gesamteiweiß, Retentionsparameter etc.) sowie einheitliche Analysen der bisherigen Krankengeschichte durchgeführt werden müssten. Letztlich bliebe somit zu klären, durch welche Faktoren im Einzelnen hier die Weiche „Proliferation“ oder „Apoptose“ der Endothelzellen gestellt wird. Die Entwicklung eines in-vitro-Modells böte die Möglichkeit, weitere Marker zu isolieren, die eine Quantifizierung des immunologischen Aktivierungszustands urämischer Patienten vor Dialyse erlauben und zur Evaluierung aktueller Dialysetechniken beitragen.

V. Literaturverzeichnis

- 1.) Abbott RD, Levy D, Kannel WB, Castelli WP, Wilson WP, Garrison RJ, Stokes J.
Cardiovascular risk factors and graded treadmill exercise endurance in healthy adults: The Framingham Offspring Study. *Am J Cardiol* 1989 Feb 1; 63(5): 342-6
- 2.) Amann K, Tyralla K, Gross ML, Eifert T, Adamczak M, Ritz E.
Special characteristics of atherosclerosis in chronic renal failure. *Clin Nephrol* 2003; 60 Suppl 1: 13-21
- 3.) Amit K. Mitra, Ashwini S. Dhume, and Devendra K. Agrawal.
"Vulnerable plaques" — ticking of the time bomb. *Can J Physiol Pharmacol/Rev can physiol pharmacol* 82(10): 860-871 (2004)
- 4.) Arici M, Walls J.
End-stage renal disease, atherosclerosis and vascular mortality: is C-reactive protein the missing link? *Kidney Int* 2001; 59(2): 407-414
- 5.) Azumi H, Inoue N, Ohashi Y, Terashima M, Mori T, Jujita H, Awano K, Kobayashi K, Maeda K, Hata K, Dhinke T, Kobayashi S, Hirata K, Kawashima S, Itabe H, Hayashi Y, Imajoh-Ohmi S, Itoh H, Yokoyama M:
Superoxide generation in directional coronary atherectomy speximens of patients with angina pectoris: Important role of NADPH oxidase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: 1838-1844, 2002
- 6.) Baffert F, Usson Y, Tranqui L.
Effects of prolonged exposure to hypoxia on morphological changes of endothelial cells plated on fibrin gel. *Eur J Cell Biol* 80; 78-86; 2001
- 7.) Ballou SP, Kushner I.
C-reactive protein and the acute-phase-response. *Adv Intern Med* 1992; 37: 313-336

- 8.) Bartels, A.M.:
Durchflusszytometrische Untersuchungen zur zellulären Pharmakokinetik von freiem und liposomal verkapseltem Daunorubicin, Medizinischen Fakultät Charité der Humboldt-Univ. zu Berlin, Dissertation, 2002
- 9.) Beck W, Speidel R, Stier E, Zeier M, Deppisch R.
Zytokine und ihre Bedeutung bei der Wechselwirkung von Blut mit künstlichen Oberflächen. Dialyse-Journal 1998; 61: 71-81
- 10.) Buffon A, Diasucci LM, Liuzzo G, Dónofrie G, Crea F, Maseri A:
Widespread coronary inflammation in unstable angina. N Engl J Med 347: 5-12, 2002
- 11.) Cheung AK, Sarnak MJ, Yan G, Dwyer JT, Heyka RJ, Rocco MV, Teehan BP, Levey AS.
Atherosclerotic cardiovascular disease risks in chronic hemodialysis patients. Kidney Int 58: 353-362, 2000
- 12.) Choy JC, Granville DJ, Hunt DW, McManus BM.
Endothelial cell apoptosis: biochemical characteristics and potential implications for atherosclerosis. J Mol Cell Cardiol 2001; 33 (9): 1673-1690
- 13.) Cohen JJ, : Apoptosis. Immunol. Tod 14: 126-130, 1993
- 14.) Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, Gorczyca W, Hotz MA, Lassota P, Traganos F.
Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. Cytometry 1992; 13(8): 795-808
- 15.) Darzynkiewicz Z, Juan G, Li X:
Cytometry in Cell Necrobiology: Analysis of Apoptosis and Accidental Cell Death (Necrosis). Cytometry 1997; 27: 1-20

- 16.) Deppisch R, Ritz E, Hänsch GM, Schöls M, Rauterberg EW.
Bioincompatibility- Perspectives in 1993. *Kidney Int* 1994; 45: 77-84
- 17.) Dimmeler S, Haendeler J, Zeiher AM.
Regulation of endothelial cell apoptosis in atherothrombosis. *Curr Opin Lipidol*
22002; 13(5): 531-536
- 18.) Dimmeler S, Hermann C, Zeiher AM.
Apoptosis of endothelial cells. Contribution to the pathophysiology of
atherosclerosis? *Eur Cytokine Netw* 1998; 9(4): 697-698
- 19.) Dimmeler S, Zeiher AM.
Endothelial cell apoptosis in angiogenesis and vessel regression *Circ Res* 2000;
87(6): 434-439
- 20.) Engeland M., Nieland L. J. W., Ramakers F. C. S.:
Annexin V-Affinity : Assay: A Review on an Apoptosis Detection System Based
on Phosphatidylserine Exposure. *Cytometry* 1998; 31: 1-9
- 21.) Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ:
Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal failure. *Am J
Kidney Dis* 32: 112-119, 1998
- 22.) Frei U, Schober-Halstenberg HJ
Annual report of the German Renal Registry 1998. Qua-Si Niere: Task Group for
qualityy accurance in renal replacement therapy; *Nephrol Dial Transplant* 1999;
14(5): 1085-1090
- 23.) Garland J M, Halestrap A:
Energy Metabolism during Apoptosis *J Biol Chem*, Vol. 272, No. 8, Issue of Feb.
21, pp. 4680–4688, 1997

- 24.) Griffin J
Bloodcoagulation. The thrombin paradox. *Nature* 1995; 378: 337-338
- 25.) Guevara NV, Chen KH, Chan L.
Apoptosis in atherosclerosis: pathological and pharmacological implications.
Pharmacol Res 2001; 44(2): 59-71
- 26.) Haag-Weber M, Mai B, Hörl WH.
Isolation of a granulocyte inhibitory protein from uraemic patients with homology
of β 2-microglobulin. *Nephrol Dial Transplant* 1994; 9:382-388
- 27.) Hakim RM.
Recent advances in the biocompatibility of haemodialysis membranes. *Nephrol
Dial Transplant* 1995;10:7-11
- 28.) Hartmann J, Fricke H, Schiffel H.
Biocompatible membranes preserve residual renal function in patients undergoing
regular hemodialysis. *Am J Kidney Dis* 1997; 30:366-373
- 29.) Himmelfarb J, Stenvinkel P, Ikizler TA, Hakim RM:
The elephant of uremia: Oxidative stress as a unifying concept of cardiovascular
disease in uremia. *Kidney Int.* 62:1524-1538, 2002
- 30.) Hoegge J, Pfander K, Moldovan A, Pyrowolakis J, Jentsch P:
RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and
SUMO. *Nature* 419: 135-141.
- 31.) Hörl WH:
Infektionsgefährdung des urämischen Patienten Nieren und
Hochdruckkrankheiten 1995; 24: 275-278

- 32.) Hörl WH.
Genesis of the uraemic syndrome: role of uraemic toxins. Wiener Klin Wochenschr 1998; 110:511-520
- 33.) Hoffmann JN, Hartl WH, Deppisch R, Faist E, Jochum M, Inthorn D.
Hemofiltration in human sepsis: evidence for elimination of immunomodulatory substances. Kidney Int 1995; 48:1563-1570
- 34.) Hoffmann M, Cooper ST.
Thrombin enhances monocyte secretion of tumor necrosis factor and interleukin-1 β by two distinct mechanisms. Blood Cells 1995; 21: 156-167
- 35.) Huang H, Virmani R, Younis H, Burke AP, Kamm RD, Lee RT
The impact of calcification on the biochemical stability of atherosclerotic plaques. Circulation 103: 1051-1056, 2001
- 36.) Kaiser JP, Oppermann M, Götze O, Deppisch R, Göhl H, Asmus G, Röhrich B, von Herrath D, Schaefer K.
Significant reduction of factor D an immunosuppressive complement fragment Ba by hemofiltration. Blood Purif 1995; 13:314-321
- 37.) Koda Y, Nishi S, Miyazaki S, Haginoshita S, Sakurabayashi T, Suzuki M, Sakai S, Yuasa Y, Hirasawa Y, Nishi T.
Switch from conventional to high-flux membrane reduces the risk of carpal tunnel syndrome and mortality of hemodialysis patients. Kidney Int 1997; 52:1096-1101
- 38.) Köhler H, Girndt M, Dumann H, Klingel R.
Immundefekt bei Niereninsuffizienz. Teil II: Mechanismen des urämischen Immundefekts. Dtsch med Wschr. 1993; 118: 790-795

- 39.) Kribben A, Philipp Th.
Editorial: Themenschwerpunkt Nephrologie Deutsche Medizinische
Wochenschrift 2000; 125(34-35): 995
- 40.) Kuhlmann M, Grindt M, Riegel W.
Chronische Niereninsuffizienz; in: Alexander K, Daniel WG, Diener H-C,
Freund M, Köhler H, Matern S, Maurer HH, Michel BA, Nowak D, Risler T,
Schaffner A, Scherbaum WA, Sybrecht GW, Wolfram G, Zeitz M (Hrsg.): TIM-
Thiemes Innere Medizin, Thieme 1999: 1400-1416
- 41.) Kurki C, Ogata M, Tan Y:
Monoclonal antibodies to PCNA/ cyclin as probes for proliferating cells by flow
cytometry. J Immunol Methods 1988, 109: 49-59
- 42.) Kushner I.
C-reactive protein and the acute phase response. Hosp Pract 1990; 25 (3A): 13-28
- 43.) Li AC, Glass CK:
The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention. Nature Med 8:
1235-1242, 2002
- 44.) Libby P: Inflammation in atherosclerosis. Nature:420: 868-874, 2002
- 45.) Lidington EA, Moyes DL, McCormack AM, Rose ML
A comparison of primary endothelial cells and endothelial cell lines for studies of
immune interactions , Hum Antibodies, 06-2001
- 46.) London GM, Drueke TB
Atherosclerosis and arteriosclerosis in chronic renal failure. Kidney Int 51: 1678-
1695, 1997

- 47.) Mailloux LU, Bellucci AG, Wilkes BM.
Mortality in dialysis patients: analysis of the courses of death Am J Kidney Dis
1991; 3:326-335
- 48.) Meyer O, Kaiser P, Haim T, Edgell CJ, Pasquier C, de Bandt M, Bridey F, Sellak
H, Lansaman J, Kahn MF.
Anti-vascular endothelial cell antibodies (AECA): comparison of two assay
methods and clinical applications. Rev Rhum Engl Ed. 1995 Dec;62(11):737-47.
- 49.) Mikulka C, Bolton K
Methodologies for the preservation of proliferation associated antigens PCNA,
p120 and p105 in tumor cell lines for use in flow cytometry. Cytometry 1994, 17:
246-57
- 50.) Miyata T, Ueda Y, Yoshida A, Sugiyama S, Ida Y, Jadoul M, Maeda K, Kurokawa
K, van Ypersele de Strihou C.
Clearance of pentosidine, an advanced glycation end product, by different
modalities of renal replacement therapy. Kidney Int 1997; 51: 880-887
- 51.) Nascimento MM, Pecoits_Filho R, Lindholm B, Riella MC, Stenvinkel P.
Inflammation, malnutrition and atherosclerosis in end-stage renal disease: a global
perspective. Blood Purif 2002; 20 (5): 454-458
- 52.) Oppermann M, Kurts C, Zierz R, Quentin E, Weber MH, Götze O.
Elevated plasma levels of the immunosuppressive complement fragment Ba in
renal failure. Kidney Int 1991; 40:939-947
- 53.) Pepys A. CRP - fifty years on. Lancet 1981; 1(8221): 653-657
- 54.) Prelich G, Tan CK, Kostura M, Mathews MB, So AG, Downey KM, Stillman B.
Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase-
delta auxiliary protein. Nature 326:517-520; 1987

- 55.) Prichard S.
Risk factors for coronary artery disease in patients with renal failure. *Am J Med Sci* 2003; 325(4): 209-213
- 56.) Pucci B, Kasten M, Giordano A.:
Cell cycle and apoptosis. *Neoplasia*. 2000 Jul-Aug;2(4):291-9.
- 57.) Raffael A, Nebe CT, Valet G
Durchflusszytometrie in der klinischen Zelldiagnostik. Schattauer, Stuttgart 1994,
Grundlagen der Durchflusszytometrie. Schmitz-Rothe (Hrsg)S. 3-48
- 58.) Rasaka KJR, Raskova J, Shea SM
T cell subset and cellular immunity in end-stage renal disease *Am J Med* 1983:
83; 764-772
- 59.) Ridker PM, Rifai N, Rose L, Buring JE, Cook NR
Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in
the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med* 347: 1615-1617, 2002
- 60.) Riegel W, Habicht A, Ulrich C, Köhler H.
Elimination of hepatoactive substances in patients with acute renal failure. *J Am
Soc Nephrol* 1998; 9:135A
- 61.) Ross R.:
The pathogenesis of atherosclerosis: A perspective for the 1990's. *Nature* 362:
801-809, 1990
- 62.) Ross R.
Atherosclerosis – an inflammation disease. *New Engl J Med* 1999; 340:115-126

- 63.) Rossig L, Dimmeler S, Zeiher AM.
Apoptosis in the vascular wall and atherosclerosis. *Basic Res Cardiol* 2001; 96(1):
11-22
- 64.) Ruiz P, Gomez F, Schreiber AD.
Impaired function of macrophage Fc- receptors on end stage renal disease *N Engl
J Med* 1990; 322: 717-722
- 65.) Salmi M, Jalkanen S.
Different forms of human vascular adhesion protein-1 (VAP-1) in blood vessels in
vivo and in cultured endothelial cells: implications for adhesion models. *Eur J
Immunol.* 1995; 10: 2803-2812
- 66.) Schindler R, Boenisch O, Fischer HC, Eckardt KU, Frei U.
Plasma C-reactive protein (CRP) and cytokine production in chronic dialysis
patients is influenced by the dialysis membrane. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9:225A
- 67.) Schindler R, Linnenweber S, Schulze M, Oppermann M, Dinarello CA, Shaldon S,
Koch KM.
Gene expression of interleukin-1 β during hemodialysis. *Kidney Int* 1993; 43:712-
721
- 68.) Schindler R, Lonnemann G, Shaldon S, Koch KM, Dinarello CA.
Transcription, not synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by
complement. *Kidney Int* 1990; 37:85-93
- 69.) Scoble JE.
Atherosclerosis and the kidney. *J R Coll Physicians Lond* 1997; 31(1): 19-22
- 70.) Shivji KK, Kenny MK, Wood RD
Proliferating cell nuclear antigen is required for DNA excision repair. *Cell* 69:
367-374; 1992

- 71.) Skorecki K, Green J, Brenner BM. Chronic renal failure in: Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL (Hrsg.) Harrison`s Principles of Internal Medicine, 15th edition, The MC Graw-Hill Companies Inc., 2001: 1551-1562
- 72.) Stenvinkel P, Alvestrand P
Inflammation in end-stage renal disease: Sources, consequences and therapy. Seminar Dial 15:330-338, 2002
- 73.) Stenvinkel P., Pecoits-Filho R., Lindholm B.
Coronary Artery Disease in End-Stage Renal Disease: No Longer a Simple Plumbing Problem; J Am Soc Nephrol 14: 1927–1939, 2003
- 74.) Thomas S, Robinson CJ, Gray E
Responses of HUVEC and EaHy926 to heparin and fibroblast growth factors. In Vitro Cell Dev Biol Anim 1997; 33: 492-494
- 75.) Torzewski J, Torzewski M, Bowyer DE, Fröhlich M, Koenig W, Waltenberger J, Fitzsimmons C, Hombach V.
C-reactive protein frequently colocalizes with the terminal complement complex in the intima of early atherosclerotic lesions of human coronary arteries. Arterioscler Throm Vasc Bil 1998; 18: 1386-1392
- 76.) Vanholder R, De Smet R, Vogeleere P, Hsu C, Ringoir S
The uremic syndrom. in: Jacobs C, Kjellstrand CM, Koch KM, Winchester JF (Hrsg): Replacement of renal function by dialysis, 4th edition; Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 1996: 1-33
- 77.) Verhave JC, Hillege HL, Burgerhof JG, Gansevoort RT, de Zeeuw D, de Jong PE.
The association between atherosclerotic risk factors and renal function in the general population. Kidney Int. 2005 May;67(5):1967-73.

78.) Walter R, Mischak H, Haller H.

Haemodialysis, atherosclerosis and inflammation-identifying molecular mechanisms of chronic vascular disease in ESDR patients. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17 Suppl 3: 24-29

79.) Zimmermann J, Herrlinger S, Pruy A, Metzger T, Wanner C.

Inflammation enhances cardiovascular risk and mortality in hemodialysis patients. *Kidney Int* 1999; 55:648-658

80.) Zimmermann J, Schramm L, Kulzer P, Korhammer M, Wanner C.

Infektionsgefährdung und Wundheilungsstörungen bei Dialysepatienten *Zentralbl Chir* 1996; 121: 58-60

VI. Abkürzungen

<i>Abkürzung</i>	<i>Bedeutung</i>
Abb. / s. Abb.	Abbildung / siehe Abbildung
AK	Antikörper
AG	Antigen
Ca ²⁺	Kalzium
CRP	C-reaktives Protein
d. h.	das heißt
FCS	fetales Kälberserum (Wachstumsfaktoren)
GIP I + II	Granulozyten inhibierendes Protein I + II
h	Stunde(n)
HUVEC	human umbilical vein endothelial cell
IL-6	Interleukin 6
Kap.	Kapitel
LPS	Lipopolysaccharide
MHC	major histocompatibility complex
max.	maximal
Mio.	Million
mM, µM	Millimol, Mikromol
NK-Zellen	natural-killer- Zellen
Nr.	Nummer
oxLDL	oxidized low-density-lipoproteins
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
s. / s.a.	siehe / siehe auch
TGF	tumor growth factor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
V-CAM	vascular cell adhesion molecule
z. B.	zum Beispiel

VII. Lebenslauf

25.10.1976	Geburt als erstes Kind der Eheleute Klaus und Maria Magdalena Franziska Frieler, geb. Schäfers, in Bielefeld
1983 – 1987	Grundschule Katholische Grundschule Stukenbrock
1987 - 1996	Gymnasium Verl; Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife
1996 - 1997	Grundwehrdienst als Sanitätssoldat im Ausbildungsmusikkorps der BW, Hilden
1997 - 2003	Studium der Humanmedizin an der Westfälischen Wilhelms- Universität Münster (12 Semester)
10.11.2003	Ärztliche Prüfung und Approbation als Arzt
seit Januar 2004	Tätigkeit als Assistenzarzt in der Medizinischen Klinik des Evangelischen Krankenhauses Bielefeld

Schloß Holte-Stukenbrock, den 27.10.2006

Fabian Frieler

VIII. Publikationen

1.) Karthaus M, Frieler F.

Essen und Trinken am Ende des Lebens. Ernährung bei Krebspatienten in der palliativen Onkologie und Palliativmedizin. Wien Med Wochenschr (2004); 154; 9 – 10: 192-198

2.) Karthaus M, Frieler F, Vasquez N, Pfeil N, Wiegand U, Plahl A, Hornyk K, Schmidt M, Baysal F, Tagizadeh K, Trapp M

Pemetrexed/ Platinum for Patients with advanced malignant peritoneal mesothelioma (AbM) ; Poster; DGHO 06 / ASCO 2006

IX. Danksagung

Meinen Dank möchte ich an dieser Stelle Herrn Privatdozent Dr. med. D. Lang für die Bereitstellung des Themas, die fachliche Betreuung und Anleitung beim Erlernen der für diese Arbeit erforderlichen Tätigkeiten aussprechen.

Herrn Prof. Dr. med. S. Heidenreich gilt meine aufrichtige Verbundenheit für die medizinische Ausbildung in klinischer und laborwissenschaftlicher Tätigkeit auf dem Gebiet der Nephrologie.

Insbesondere danke ich an dieser Stelle Herrn Dr. med. Schulte- Vorwick (KfH Münster) für die Vermittlung der Probenakquisition bei seinen Patienten und gleichermaßen Herrn Dr. H. G. Pauels die Unterstützung in technischen Fragen der FACS- Analysen.

Abschließend möchte ich meinen Eltern Klaus und Maria Magdalena Franziska Frieler meinen besonderen Dank aussprechen, da sie mir mit ihrer Unterstützung das Studium der Medizin ermöglichten und es stets begleitet haben.