

Aus der Klinik für Nephrologie und Internistische Intensivmedizin  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Assoziation von inflammatorischen Markern  
mit kardiovaskulären Erkrankungen, Mortalität  
und Erythropoietin-Resistenz bei Hämodialysepatienten

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Anna Tankovics

aus Berlin



Gutachter: 1. Prof. Dr. med. R. Schindler  
2. Prof. Dr. med. P. J. Heering  
3. Prof. Dr. med. F. Eitner

Datum der Promotion: 03.09.2010

## **Abkürzungsverzeichnis**

AK	Antikörper
AS	Aminosäuren
AVF	Arteriovenöse Fistel
AVG	Arteriovenöser Graft
BMI	Body Mass Index
Chol	Cholesterin
CKD	Chronic Kidney Disease (chronische Niereninsuffizienz)
CRP	C-reaktives Protein
CVD	Cardiovascular Disease (kardiovaskuläre Erkrankung)
DC	Dendritische Zellen
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Acetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EPO	Erythropoietin
Fe	Eisen
FGF2	Fibroblast growth factor 2
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
Hb	Hämoglobin
HbA1c	$\alpha$ -1-glykosiliertes Hämoglobin
HD	Hämodialyse
HDL	High-Density-Lipoprotein
hsCRP	high sensitive CRP
IFN	Interferon
IL	Interleukin
KHK	Koronare Herzerkrankung
Kt/v	Dialysedosis
LDL	Low-Density-Lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharide
NP	Neurales Pentraxin
NPR	Neuronaler Pentraxin-Rezeptor
O.D.	Optische Dichte

paVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PRR	Pattern Recognition Receptor
PTH	Parathormon
ptx3 <sup>-/-</sup>	PTX3-Knockout
SAP	Serum Amyloid P
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
TG	Triglyceride
TLR	Toll like receptor
TNF $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor $\alpha$
TSG-14	TNF $\alpha$ -stimuliertes Gen 14
VCAM	Vascular-Cell-Adhesion-Molecule
VHK	Vorhof-Katheter
ZNS	Zentrales Nervensystem

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>4</b>
<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>6</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>9</b>
1.1. Chronische Niereninsuffizienz und Hämodialyse .....	9
1.2. Inflammation und Arteriosklerose.....	12
1.3. Pentraxine .....	16
1.3.1. Die kurzen Pentraxine CRP und SAP .....	16
1.3.2. Pentraxin 3 als Prototyp der langen Pentraxine.....	17
Gen- und Proteinstruktur .....	17
Bildung und Bindungen .....	19
Funktionen .....	20
1.3.3. Die kurzen Pentraxine CRP und SAP und das lange Pentraxin PTX3 im Vergleich.....	24
1.4. Ziele und Fragestellungen.....	25
1.4.1. Methodische Fragestellungen.....	25
1.4.2. Fragestellungen bezüglich der klinischen Relevanz von PTX3 .....	26
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>29</b>
2.1. Patientenpopulation .....	29
2.2. Material .....	31
2.2.1. Puffer.....	32
2.2.2. ELISAs .....	33
2.3. ELISA-Prinzip.....	34
2.4. PTX3-Bestimmung .....	34
2.4.1. Durchführung des ELISAs von R&D-Systems .....	35
2.4.2. Durchführung des ELISAs von ALEXIS.....	37
2.4.3. Auswertung des ELISAs.....	38
2.5. IL-6-Bestimmung.....	38
2.6. CRP-Bestimmung .....	39
2.7. Statistische Auswertung.....	39

<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>40</b>
3.1. PTX3-Konzentration in Abhängigkeit von der EDTA-Konzentration .....	40
3.2. PTX3-Konzentration in Abhängigkeit von der Lagertemperatur und Auftauanzahl .....	42
3.3. Morbidität von HD-Patienten in Abhängigkeit inflammatorischer Marker (PTX3, CRP, IL-6) .....	44
3.3.1. Korrelationen .....	46
3.3.2. Koronare Herzerkrankung .....	48
3.3.3. Periphere arterielle Verschlusskrankheit .....	50
3.3.4. Höhe der PTX3-, CRP- und IL-6-Plasmaspiegel in Abhängigkeit vom Geschlecht.....	52
3.3.5. Höhe der PTX3-, CRP- und IL-6-Plasmaspiegel in Abhängigkeit vom vaskulären Zugang .....	54
3.3.6. Höhe der PTX3-, CRP- und IL-6-Plasmaspiegel in Abhängigkeit von der Erythropoietindosis .....	56
3.4. Mortalität von HD-Patienten in Abhängigkeit von PTX3 .....	58
<b>4. Diskussion</b> .....	<b>61</b>
4.1. Diskussion der Methodik .....	61
4.2. Pentraxine, kardiovaskuläre Morbidität und Erythropoietin-Resistenz bei Hämodialysepatienten.....	63
4.3. Pentraxine und Mortalität bei Hämodialysepatienten .....	69
<b>5. Zusammenfassung</b> .....	<b>74</b>
<b>6. Literatur</b> .....	<b>76</b>
<b>8. Erklärung</b> .....	<b>85</b>
<b>9. Lebenslauf</b> .....	<b>86</b>
<b>10. Publikationsliste</b> .....	<b>88</b>





# 1. Einleitung

## 1.1. Chronische Niereninsuffizienz und Hämodialyse

„Die chronische Niereninsuffizienz ist die Folge einer irreversiblen Verminderung der glomerulären, tubulären und endokrinen Funktionen beider Nieren“ mit einer Inzidenz von 10/100.000 in Westeuropa und 60/100.000 in den USA [1].

Die US-amerikanische National Kidney Foundation definiert in den Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (NKF KDOQI™)-Leitlinien die chronische Niereninsuffizienz (CKD = Chronic Kidney Disease) als Nierenschaden mit oder ohne Verminderung der glomerulären Filtrationsrate (GFR), der länger als 3 Monate besteht bzw. eine Einschränkung der GFR auf  $< 60 \text{ ml/min/1,73m}^2$  mit oder ohne Nierenschaden [2]. Diese Definition mit ihrer Stadieneinteilung ist mittlerweile weltweit anerkannt.

### **Stadieneinteilung der chronischen Niereninsuffizienz**

<b>Stadium</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>GFR (ml/min/1,73m<sup>2</sup>)</b>
<b>1</b>	Nierenschaden mit normaler oder $\uparrow$ GFR	$\geq 90$
<b>2</b>	Nierenschaden mit milder $\downarrow$ GFR	60-89
<b>3</b>	Moderate $\downarrow$ GFR	30-59
<b>4</b>	Schwere $\downarrow$ GFR	15-29
<b>5</b>	Nierenversagen	$< 15$ (oder Dialyse)

Tabelle 1: Stadieneinteilung der chronischen Niereninsuffizienz

Führende Ursachen für die CKD sind in den westlichen, entwickelten Ländern Diabetes mellitus und Hypertonie, gefolgt von einem weitaus geringeren Anteil an Glomerulonephritiden und zystischen Nierenerkrankungen. In Entwicklungsländern stellen glomeruläre Erkrankungen, möglicherweise durch chronische virale Infektionen mitverursacht, die Hauptursache für die CKD dar [3].

Aus der zunehmenden Verminderung der physiologischen Funktionen der Niere resultieren hauptsächlich folgende Komplikationen: Hypertonie, Mangelernährung, Albuminmangel, Urämie, renale Anämie, Störungen im Mineral- und Knochenstoffwechsel und letztendlich toxische Organschädigungen durch Retention harnpflichtiger Substanzen. Patienten im Stadium 4-5 der CKD unterliegen dabei dem höchsten Risiko für die Entwicklung dieser Komplikationen und für das Fortschreiten der CKD bis zum endgültigen Nierenversagen [3].

Im Stadium 5 der CKD, bei einer GFR  $<15\text{ml/min}$ , versagt die Nierenfunktion vollständig. In diesem Stadium ist die Nierenersatztherapie angezeigt, die mittels Peritonealdialyse, Hämofiltration oder Hämodialyse durchgeführt werden kann. Zur Durchführung der Hämodialyse ist ein vaskulärer Zugang in Form einer arteriovenösen Fistel (AVF), eines arteriovenösen Grafts (AVG), also ein Kunststoffinterponat, oder eines Vorhofkatheters (VHK) notwendig. Die beste Möglichkeit des Nierenersatzes ist die Nierentransplantation, die jedoch wegen des ungünstigen Spender-Empfängerverhältnisses nur einigen wenigen zuteil wird.

Trotz ständiger Verbesserungen der Dialysebedingungen und Therapiemöglichkeiten der Niereninsuffizienz unterliegen Patienten mit CKD, insbesondere Hämodialysepatienten (HD-Patienten) einer gegenüber der Normalbevölkerung stark erhöhten Morbidität und Mortalität. Diese ist hauptsächlich durch kardiovaskuläre Erkrankungen (CVD = Cardiovascular Disease) bedingt. So unterliegen Dialysepatienten im Vergleich zur Normalbevölkerung einem 10-20fach erhöhten CVD-Mortalitätsrisiko [4]. Das Risiko für die Entwicklung einer CVD eines 30jährigen mit Niereninsuffizienz im Stadium 5 entspricht dem Risiko eines 70-80jährigen ohne renale Erkrankung [5]. Die meisten Dialysepatienten sterben trotz verbesserter Dialysebedingungen innerhalb von 5 Jahren nach Dialysebeginn [6].

Eine Reihe von Ursachen wurden hierfür in der Forschung der zurückliegenden Jahre in Betracht gezogen. Dabei sind vor allem Mangelernährung und chronische Mikroinflammation mit der erhöhten Morbidität und Mortalität assoziiert [6-10].

Die chronische Mikroinflammation, die sich durch eine Erhöhung von C-reaktivem Protein (CRP) und anderer Akute-Phase-Proteine äußert, lässt sich vor allem bei HD-Patienten beobachten [4,8]. Die Hämodialyse an sich birgt einige Faktoren, die einen entzündlichen Zustand begünstigen bzw. forcieren, wie zum Beispiel der häufige Kontakt des Blutes mit bioinkompatiblen Dialyse-Membranen [11], mit Kunststoffinterponaten über den vaskulären Zugang [12], oder Verunreinigungen des Dialysats mit Lipopolysacchariden (LPS) [8]. Diese Faktoren können jedoch nicht allein für die chronische Erhöhung inflammatorischer Marker verantwortlich sein, da zwar HD-Patienten nach aktueller Studienlage die höchsten CRP- und Zytokin-Level aufweisen [8], eine Erhöhung dieser Marker als Ausdruck einer chronischen Mikroinflammation jedoch auch schon in früheren Stadien der CKD nachweisbar ist [4, 13].

Der dauerhafte Entzündungszustand scheint neben dem renalen Funktionsverlust eine weitere Ursache der chronischen Anämie bei HD-Patienten darzustellen und mit der Erythropoietin (EPO)-Dosis assoziiert zu sein [14].

## **1.2. Inflammation und Arteriosklerose**

50% der Todesursachen bei CKD-Patienten werden durch CVD verursacht. Dazu gehören vor allem durch Arteriosklerose bedingte Erkrankungen [15]. Ein sehr hoher Prozentsatz der HD-Patienten leidet neben der Niereninsuffizienz an progressiver Arteriosklerose, die zu koronarer, cerebraler und peripherer Ischämie führt [16].

Ein möglicher Erklärungsansatz für die erhöhte Herz-Kreislauf-Morbidität und Mortalität bei HD-Patienten ist der durch die Niereninsuffizienz bedingte chronisch inflammatorische Zustand, der zur Entstehung und zum Fortschreiten von Arteriosklerose führt und damit das Risiko für einen Herzinfarkt, Koronare Herzerkrankung (KHK), periphere arterielle Verschlusskrankheit (paVK) und einen Schlaganfall erhöht.

Die Sicht zur Entstehung der Arteriosklerose hat sich in den letzten 30 Jahren stark gewandelt. Während man damals noch von einem reinen Fettstoffwechselproblem ausging, sieht man heute die Arteriosklerose als ein Zusammenspiel komplexer pathophysiologischer Vorgänge. Immunologische und entzündliche Abläufe, die idealerweise beim Menschen eine physiologische Funktion erfüllen, können bei einem Ungleichgewicht selbst zu einem pathologischen Zustand führen. So hat die intensive Forschung bezüglich dieses Themas in den letzten Jahren gezeigt, dass die Arterioskleroseentstehung von der Initiierung bis zur letztendlichen Ruptur eines arteriosklerotischen Plaques mit konsekutivem Gefäßverschluss in jeder Phase mit unterschiedlicher Aktivierung von Entzündungszellen und Produktion entzündlicher Mediatoren verbunden ist [17].

1994 publizierten Heinrich et al. Studienergebnisse, in denen eine Korrelation der Höhe der CRP-Plasmaspiegel mit dem Ausmaß koronarer, cerebraler und peripherer Arteriosklerose beschrieben wird [18].

Ridker et al. erregten mit ihren 1997 im New England Journal of Medicine veröffentlichten Studienergebnissen der Physician's Health Studie zum Zusammenhang von CRP, Entzündung und kardiovaskulären Ereignissen großes Aufsehen. Sie konnten eine Assoziation von hochnormalen CRP-Werten mit dem späteren Auftreten von Myokardinfarkt und ischämischem Schlaganfall bei

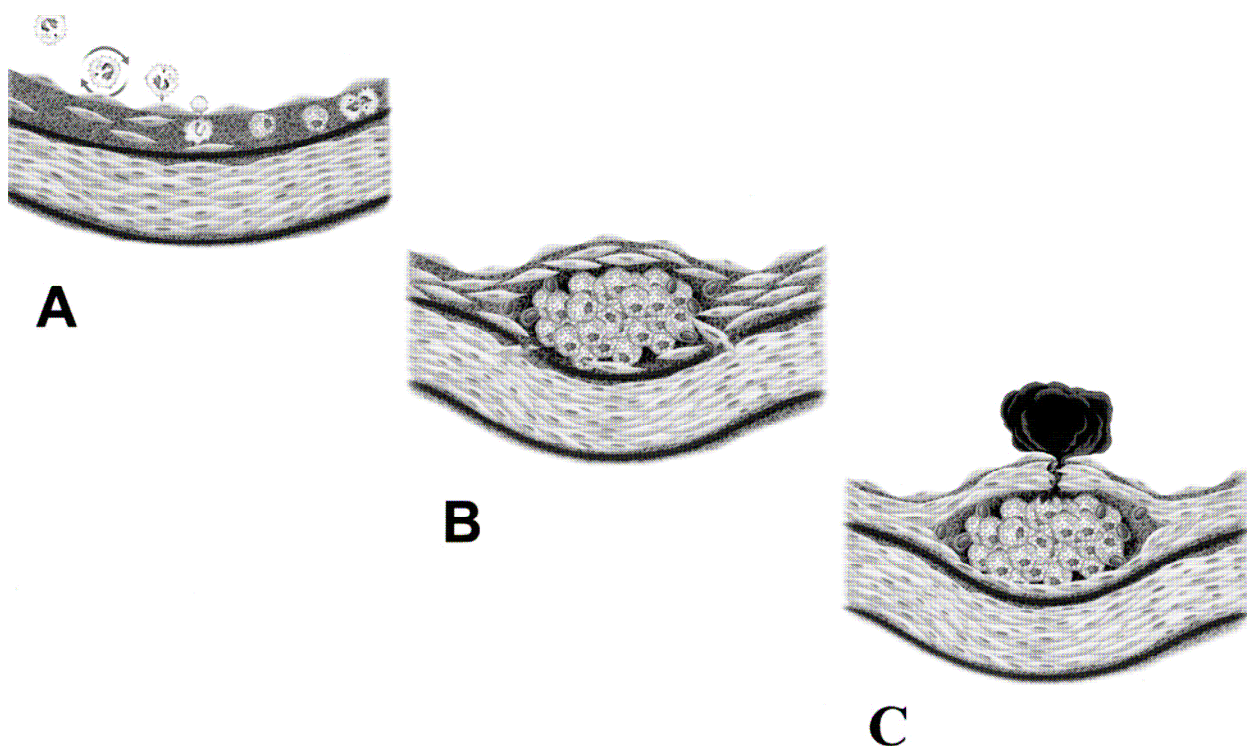
ursprünglich (dass heißt zum Zeitpunkt der CRP-Bestimmung) gesunden männlichen Teilnehmern nachweisen [19]. Auch bei gesunden postmenopausalen Frauen sind erhöhte CRP-Plasmaspiegel ein Prädiktor für das Auftreten zukünftiger arteriosklerotisch bedingter Ereignisse [20]. Bei Teilnehmern der Physician's Health Studie, die im Verlauf eine paVK entwickelten, waren die zu Beginn der Studie bestimmten CRP-Werte im Vergleich zu solchen Teilnehmern, die keine paVK entwickelten, erhöht [21].

So wurde hochnormales CRP zu einem „neuen“ Risikofaktor für die Entwicklung kardiovaskulärer Ereignisse und eine Reihe von Forschungen in Gang gebracht, die die Rolle von Entzündungsmediatoren und inflammatorischen Prozessen bei der Arterioskleroseentstehung näher untersuchen wollten.

Die Arterioskleroseentstehung und die Entwicklung eines arteriosklerotischen Plaques gehen Hand in Hand mit der Aktivierung und Proliferation von Makrophagen, Endothelzellen und glatten Muskelzellen von Gefäßwänden, der Bildung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, der Aktivierung und Deposition von Komplement und der Präsenz von anderen proinflammatorischen Mediatoren [22].

Entzündungszeichen erscheinen gleichzeitig mit der Fettanreicherung in Arterienwänden, einem Initialschritt der Arterioskleroseentstehung [23]. Endothelzellen exprimieren unter physiologischen Bedingungen keine Adhäsionsmoleküle für Leukozyten. Die Expression solcher Adhäsionsmoleküle wie zum Beispiel vascular-cell-adhesion-molecule-1 (VCAM-1) kann jedoch zum einen durch traditionelle Risikofaktoren der Arteriosklerose wie Rauchen, Bluthochdruck, Ernährung mit einem hohen Anteil gesättigter Fettsäuren, Hyperglykämie, Insulinresistenz und Adipositas getriggert werden. Zum anderen konnte nachgewiesen werden, dass auch Zytokine wie Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) und Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) die VCAM-1-Expression von Endothelzellen induzieren. VCAM-1 bindet Monozyten und T-Lymphozyten, die sich in frühen arteriosklerotischen Läsionen nachweisen lassen [23]. Gebiete mit hoher VCAM-1-Expression in arteriellen Gefäßwänden überlappen mit solchen Regionen, die prädestiniert sind für die Arterioskleroseentstehung (Gefäßaufzweigungen, Orte turbulenter Strömung) [23].

Nachdem Monozyten an Endothelzellen angedockt haben, wandern sie zwischen diesen hindurch in die Intima der Gefäßwand ein. In der Intima reifen Monozyten zu Makrophagen, exprimieren vermehrt Scavenger-Rezeptoren und verleiben sich modifizierte Lipoproteine ein. Die Scavenger-Rezeptor-Bildung wird unter anderem durch Interleukin-6 (IL-6) und TNF $\alpha$  reguliert [24]. Cholesterolester kummulieren im Zytoplasma, die Makrophagen werden immer dicker und schließlich zu Schaumzellen. Das morphologische Korrelat in diesem Entwicklungsstand der Arteriosklerose ist der „fatty streak“. Zu diesem Zeitpunkt sezernieren die zu Schaumzellen degenerierten Makrophagen verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren, die den inflammatorischen Prozess aufrechterhalten und weiter verstärken [17]. Es kommt zur Bildung eines arteriosklerotischen Plaques. Das bedeutendste klinische Problem stellt die Plaqueruptur dar (siehe Abbildung 1 [17]).



**Abb. 1: Arteriosklerose: Von der Initiierung bis zur Plaqueruptur** **A** Entzündlich verändertes Endothel exprimiert Adhäsionsmoleküle, an die Leukozyten andocken können. Zytokine bilden einen chemotaktischen Gradienten aus, entlang dessen die angedockten Leukozyten in die Intima einwandern. **B** In der Intima werden die Leukozyten zu Makrophagen. Sie exprimieren Scavenger-Rezeptoren, über die sie Fette aufnehmen und werden so zu Schaumzellen. **C** Lymphozyten wandern ein und produzieren Zytokine, die die Makrophagen zur Sekretion Kollagen-degradierender Enzyme anregen. So wird die fibröse Kappe des arteriosklerotischen Plaques erweicht. Bei einer Ruptur kommt es zur Ausbildung eines Thrombus, der für die meisten akuten Komplikationen der Arteriosklerose verantwortlich ist. [aus: Peter Libby. Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. Am J Clin Nutr 2006;83(suppl):456S-460S.]

Die Plaqueruptur löst eine Thrombusformierung und Ausbreitung der Läsion hervor. Es kommt (sofern die Herzkranzgefäße Ort des Geschehens sind) zum akuten Koronarsyndrom. Damit einher geht eine Erhöhung von CRP, Serum Amyloid A, IL-6 und anderen inflammatorischen Blutbestandteilen [23].

Die Ergebnisse der umfangreichen Forschung wurden in einem Workshop der „Centers for Disease Control and Prevention“ und der „American Heart Association“ im März 2002 gesichtet und für die klinische Anwendung wie folgt zusammengefasst [25]: Eine Einteilung anhand der CRP-Werte in Risikogruppen mit niedrigem ( $<1,0\text{mg/l}$ ), mittlerem ( $1,0 - 3,0\text{mg/l}$ ) und hohem ( $>3,0\text{mg/l}$ ) Risiko für CVD entspricht in etwa Tertilen der Verteilung von hochsensitivem CRP (hsCRP) in der erwachsenen Bevölkerung. Die Hoch-Risiko-Gruppe hat gegenüber der Niedrig-Risiko-Gruppe ein zweifach erhöhtes relatives Risiko für das Auftreten eines kardiovaskulären Ereignisses. HsCRP bedeutet dabei die Verwendung von Assays, die CRP hochsensitiv detektieren, also bis zu einem Wert von  $0,3\text{ mg/l}$  nachweisen, im Gegensatz zu den früher verwendeten Assays, die CRP erst ab Plasmawerten  $>3\text{mg/l}$  detektiert haben. HsCRP ist ein unabhängiger Marker für das Risiko einer CVD-Entwicklung und dessen Messung könnte zur globalen Risikoeinschätzung bei Erwachsenen ohne bekannte CVD herangezogen werden [25].

Da eine ausreichende Evidenz für die Risikoreduktion einer CVD durch Senkung von hsCRP als Primärprävention bislang nicht vorliegt, laufen weitere Studien wie zum Beispiel die JUPITER-Studie [26], die prüft, ob eine Statintherapie bei Menschen mit normalen Low-Density-Lipoprotein- (LDL-) Cholesterin-Werten ( $<130\text{mg/dl}$ ) aber erhöhten CRP-Werten ( $\geq 2\text{mg/l}$ ) das Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen senken kann. Die Ergebnisse wurden kürzlich veröffentlicht: Tatsächlich führt die Einnahme von Rosuvastatin bei Menschen mit LDL-Cholesterin-Werten  $<130\text{mg/dl}$  zu einer Senkung des CRP-Plasmaspiegels und konsekutiver Senkung des kardiovaskulären Risikos [27].

Außerdem bleibt Gegenstand der Forschung, ob inflammatorische Marker eine kausale Rolle in der Entstehung der Arteriosklerose einnehmen, also eigenständige Risikofaktoren darstellen, oder ob nur eine statistische Assoziation mit der Erkrankung vorliegt, die Erhöhung inflammatorischer Marker also als eine Antwort auf etablierte Risikofaktoren aufgefasst werden kann und mit ihnen lediglich der Krankheitsprozess an sich gemessen wird.

### **1.3. Pentraxine**

Pentraxine stellen eine Gruppe von Akute-Phase-Proteinen dar, die sich durch ihre gemeinsame multimerische, in der Regel pentamerische Struktur auszeichnen und in der Evolution hochkonserviert sind: Pentraxine konnten in dem Anthropoden *Limulus polyphemus* (horseshoe crab, Pfeilschwanzkrebs) nachgewiesen werden, dessen Gattung sich bis ins Silur, also 440 Millionen Jahre zurückverfolgen lässt. Auch in niederen Vertebraten wie dem japanischen Pufferfisch (*Takifugu rubripes*) und dem Zebrafisch (Zebraquappe, *Danio rerio*) sowie Insekten, Maus, Ratte, Hase, Mensch wurden Pentraxine gefunden [28].

#### **1.3.1. Die kurzen Pentraxine CRP und SAP**

Der klassische Vertreter der kurzen Pentraxine, ist das in den 1930er Jahren entdeckte CRP, so benannt nach seiner Fähigkeit in einer Kalzium-abhängigen Weise mit dem C-Polysaccharid von *Streptococcus pneumoniae* zu reagieren [29, 30]. CRP gehört zu den löslichen Pattern recognition receptors (PRR), die durch ihre Fähigkeit, fremde Mikroorganismen zu erkennen, zu opsonieren und deren Phagozytose zu erleichtern, einen Bestandteil der angeborenen Immunität ausmachen. Die normale Plasmakonzentration beim Gesunden liegt bei <3mg/l. Diese Konzentration kann jedoch im Rahmen akuter Entzündungen, nach Operationen, bei Tumorerkrankungen und Herzinfarkt bis zu 1000fach ansteigen. Im Rahmen dieser Pathologien („Akute-Phase“) wird CRP in der Leber als systemische Antwort auf das Zytokin IL-6 von Hepatozyten gebildet.

Ein weiterer Vertreter der kurzen Pentraxine ist das Serum Amyloid P (SAP), welches das Haupt-Akute-Phase-Protein der Maus darstellt [28, 31]. Die Konzentration im Menschen liegt bei 30-50 µg/ml. SAP wurde ursprünglich wegen seiner Fähigkeit beschrieben, Agarose zu binden. Es ist ein universeller Bestandteil von amyloiden Ablagerungen, die charakteristisch sind für Erkrankungen wie systemische Amyloidose, M. Alzheimer und Prionen-Erkrankungen [28]. CRP und SAP können den klassischen Weg der Komplementreaktion aktivieren und so dabei helfen, zellulären Schutt abzubauen. Beide binden apoptotische Zellen und erleichtern so deren Phagozytose durch dendritische Zellen und Makrophagen [28].



### 1.3.2. Pentraxin 3 als Prototyp der langen Pentraxine

Anfang der 1990er Jahre wurde in humanen Fibroblasten ein durch  $\text{TNF}\alpha$  induzierbares Gen, das sogenannte  $\text{TNF}\alpha$  stimulierte Gen-14 (TSG-14) entdeckt [32, 33]. Das identische Gen wurde in humanen Endothelzellen nach Stimulation mit IL-1 gefunden und Pentraxin 3 (PTX3) genannt [34].

#### Gen- und Proteinstruktur

Das Genprodukt ist ein 381 Aminosäuren (AS) langes sezernierbares Protein, welches am Carboxy-terminalen Ende strukturelle Ähnlichkeiten mit den bekannten kurzen Pentraxinen CRP und SAP aufweist, sich aber von diesen durch eine 178 AS lange Sequenz am N-Terminus unterscheidet (deshalb lange Pentraxine), die keine Homologie zu bisher bekannten Proteinen aufweist [33, 35]. Am Amino-terminalen Ende befindet sich ein 17 AS langes hydrophobes abspaltbares Signalpeptid. Das sezernierte Protein hat ein prediktioniertes Gewicht von 40165 Da [35], in der Gelelektrophorese präzipitieren PTX3-Monomere jedoch bei einem Gewicht von 45000 Da, dieses „Übergewicht“ kommt durch Glykosylierung zustande, da das Protein an AS-Stelle 220 (in der Pentraxin-Domäne) eine N-Glykosylierungsstelle aufweist [36]. Eine Reihe weiterer langer Pentraxine wurde daraufhin entdeckt, darunter Guinea Pig Apexin [37, 38], neuronales Pentraxin 1 (NP1), neuronales Pentraxin 2 (NP2), der neuronale Pentraxin-Rezeptor (NPR), ein transmembranes Molekül und PTX4 [28]. Alle langen Pentraxine haben eine ähnliche molekulare Grundstruktur. Am Carboxy-Ende ist die Übereinstimmung relativ hoch, während im N-terminalen Abschnitt deutliche Unterschiede in der AS-Sequenz bestehen [35]. Humanes PTX3 teilt mit murinem PTX3 82% identische AS [39]. Orthologe Moleküle wurden in Säugetieren, Vögeln (*gallus gallus* Huhn), niederen Vertebraten (*Takifugu rubripes*), *Xenopus laevis* (glatter Krallenfrosch) und auch in *Drosophila melanogaster* (das 1425 AS lange Megapentraxin „swiss cheese protein“) nachgewiesen, was für die hohe evolutionäre Konservierung spricht [28].

Alle Vertreter der Pentraxin-Familie zeichnen sich durch eine gemeinsame Aminosäuresequenz – die Pentraxin „signature“ innerhalb der Pentraxin-Domäne aus: HxCxS/TWxS, wobei x eine beliebige AS darstellt (siehe Abbildung 2 [28]).

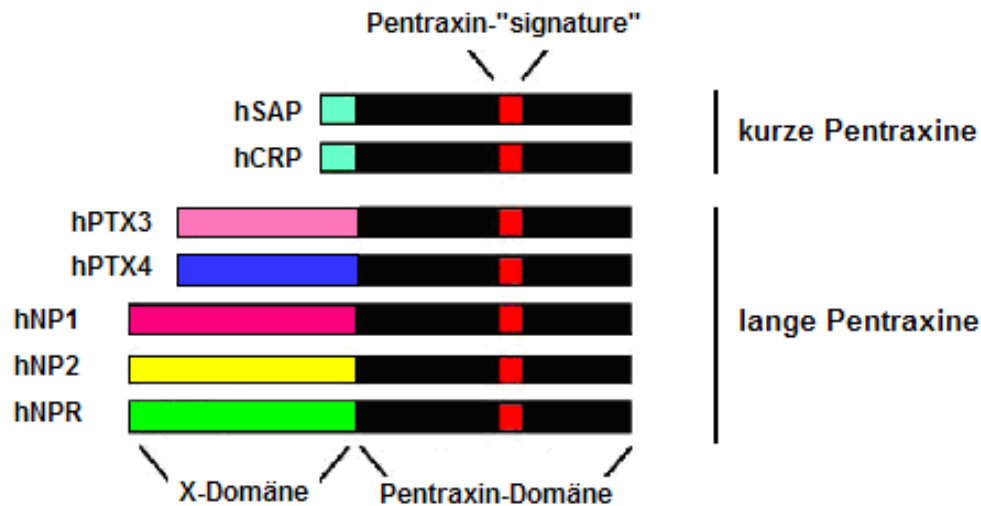


Abb. 2: **Humane (h) kurze und lange Pentraxine** [modifiziert nach: Garlanda C, Bottazzi B, Bastone A, et al. Pentraxins at the crossroads between innate immunity, inflammation, matrix deposition, and female fertility. *Annu Rev Immunol* 2005;23:337-366.]

Pentraxine bilden eine multimerische, in der Regel pentamerische strahlenförmige Symmetrie aus. Mit Hilfe elektrophoretischer Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass PTX3-Monomere Multimere mit einem Molekulargewicht von hauptsächlich ca. 440, seltener 900 kDa bilden, was Decameren bzw. Eikosameren (aus 2 Decameren) entspricht (siehe Abbildung 3 [28]). Die Monomere sind durch kovalente Disulfidbrücken miteinander verbunden [36].

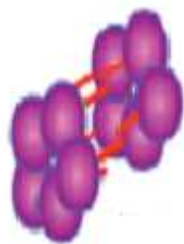


Abb. 3: **Proteinstruktur von PTX3** [modifiziert nach: Garlanda C, Bottazzi B, Bastone A, et al. Pentraxins at the crossroads between innate immunity, inflammation, matrix deposition, and female fertility. *Annu Rev Immunol* 2005;23:337-366.]

## Bildung und Bindungen

Ein weiterer großer Unterschied zu den kurzen Pentraxinen liegt darin, dass das lange Pentraxin PTX3 nicht in der Leber, sondern in zahlreichen Geweben und Zellen gebildet werden kann, unter anderem in Fibroblasten, Endothelzellen, Monozyten (aber nicht T-, B-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen) [40], Makrophagen [41], Dendritischen Zellen (DC) [42, 43], glatten Muskelzellen von Gefäßwänden [44], proximalen Tubulusepithelzellen der Niere [45], Lungenepithelzellen [46] und Adipozyten [47].

Induziert wird die PTX3-Produktion durch bakterielle LPS, durch  $\text{TNF}\alpha$  und Zytokine wie  $\text{IL-1}\beta$  und  $\text{IL-1}\alpha$  [28, 35, 48]. Der Hauptstimulator der kurzen Pentraxine  $\text{IL-6}$  führt nur zu geringer oder keiner Produktion von PTX3 [31], obwohl von Humanen Herpes Viren Typ 8 freigesetztes virales  $\text{IL-6}$  in humanen Kaposi-Sarkom-Zellen die PTX3-Expression induzieren konnte [49]. Andere Zytokine wie  $\text{IL-4}$  und  $\text{IL-13}$  haben keinen Einfluss auf die PTX3-Produktion. Dahingegen konnte für  $\text{IL-10}$  ein kostimulierender Effekt mit LPS auf die PTX3-Produktion in DCs und Makrophagen nachgewiesen werden [28]. Interferon  $\gamma$  ( $\text{IFN}\gamma$ ) hemmt die in Monozyten durch  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}$  und LPS induzierte PTX3-Genexpression [50], in Makrophagen die durch LPS induzierte PTX3-Produktion [41]. Im Gegensatz zu CRP und SAP bindet PTX3 nicht Phosphoethanolamine, Phosphocholine oder Agarose (high pyruvate Agarose) [36]. Es kann jedoch folgende Pathogene direkt erkennen und gehört damit zu den PRRs: *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Paracoccidioides brasiliensis* und Zymosan (Bestandteil von Hefezellwänden) [28]. PTX3 bindet desweiteren *in vitro* Sporen von *Aspergillus fumigatus* (Bindung von Galactomannan, Bestandteil der Zellwand) und erleichtert so die Interaktion mit Macrophagen [51].

Im zentralen Nervensystem (ZNS) wird PTX3 nicht konstant exprimiert. Nach intracerebroventrikulärer (i.c.v.) Injektion von LPS und  $\text{IL-1}\beta$  wurde jedoch die PTX3-Expression im ZNS induziert. Auch peripher (im Herzen) wurde durch i.c.v.-Applikation von LPS und  $\text{IL-1}\beta$  die PTX3-Expression induziert, dagegen ließ sich im umgekehrten Fall (intravenöse Injektion von LPS und  $\text{IL-1}\beta$ ) keine PTX3-Expression im ZNS beobachten [52].

## Funktionen

PTX3 ist zum einen notwendig für die weibliche Fruchtbarkeit [28]: PTX3-Knockout (ptx3<sup>-/-</sup>) -Mäuse waren durch eine Fehlorganisation des Cumulus oophorus infertil. Die exogene Applikation von PTX3 führte zu einer korrekten radiären Anordnung der Cumuluszellen um die Oozyte und so zur Fertilität dieser Knockout-Mäuse [53].

Als Bestandteil der angeborenen Immunität spielt PTX3 eine entscheidene Rolle bei inflammatorischen Prozessen.

Ptx3<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigen im experimentell provozierten Fall einer pulmonaren invasiven Aspergillose eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber der Erkrankung, was mit defekter Rekognition von *Aspergillus fumigatus* durch alveoläre Makrophagen und DCs und einer unangemessenen (überschiessenden) TH2-Antwort assoziiert war [51]. Alle ptx3<sup>-/-</sup>-Mäuse starben, während die Wildtypen ausnahmslos überleben. Invasive Aspergillose stellt bei knochentransplantierten Patienten mit einer defizienten Immunabwehr die Haupttodesursache dar [54]. Die prophylaktische Gabe von PTX3 führte bei knochentransplantierten Mäusen zur Resistenz gegen invasive Aspergillose verbunden mit höherem Überleben (100% nach 60 Tagen), verminderter Pilzmanifestation und geringerem Parenchymschaden in der Lunge im Vergleich zur Kontrolle [54]. So konnte erstmalig ein therapeutischer Ansatz für den Einsatz dieses Pentraxins gefunden werden.

PTX3 ist in der Lage den Wachstumsfaktor Fibroblast growth-factor-2 (FGF2) zu binden, dadurch dessen Interaktion mit endothelialen Rezeptoren zu unterbinden und die FGF2 vermittelte Proliferation und Angiogenese zu hemmen [55].

PTX3 bindet ähnlich wie CRP und SAP den Komplementfaktor C1q und führt so zur Aktivierung des klassischen Weges der Komplementreaktion [56]. Diese Bindung ist zeit- und dosisabhängig. Allerdings konnte PTX3 *in vitro* die Aktivierung von C1q auch hemmen, je nach Art seiner Repräsentation [56]. PTX3 ist auch in der Lage, apoptotische Zellen zu opsonieren und dadurch deren Phagozytose zu erleichtern [57] (siehe Abbildung 4 und 5 [28]).

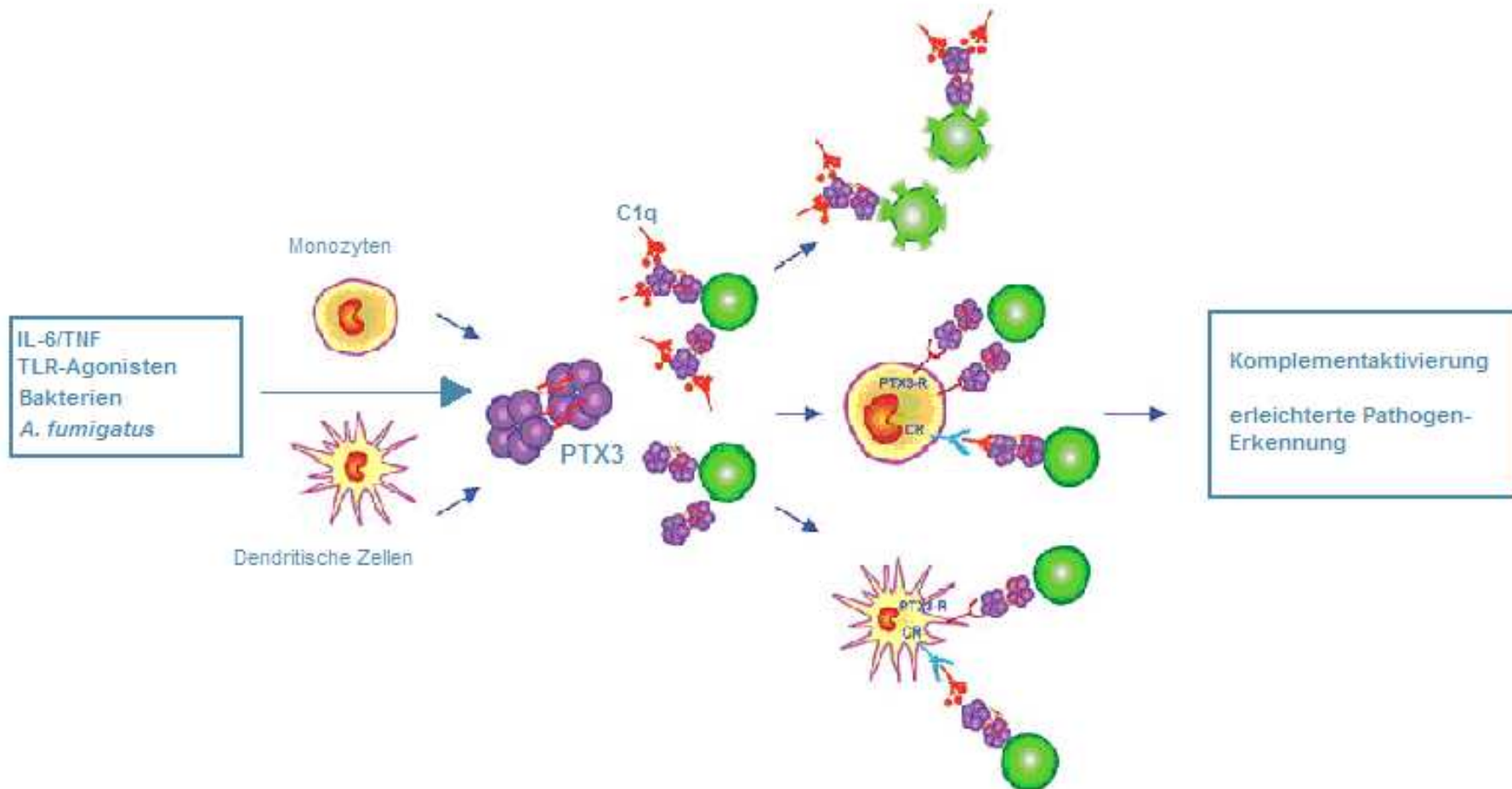


Abb. 4: **Komplementaktivierung und Opsonierung durch PTX3** [modifiziert nach: Garlanda C, Bottazzi B, Bastone A, et al. Pentraxins at the crossroads between innate immunity, inflammation, matrix deposition, and female fertility. *Annu Rev Immunol* 2005;23:337-366.] TLR=Toll like Receptor

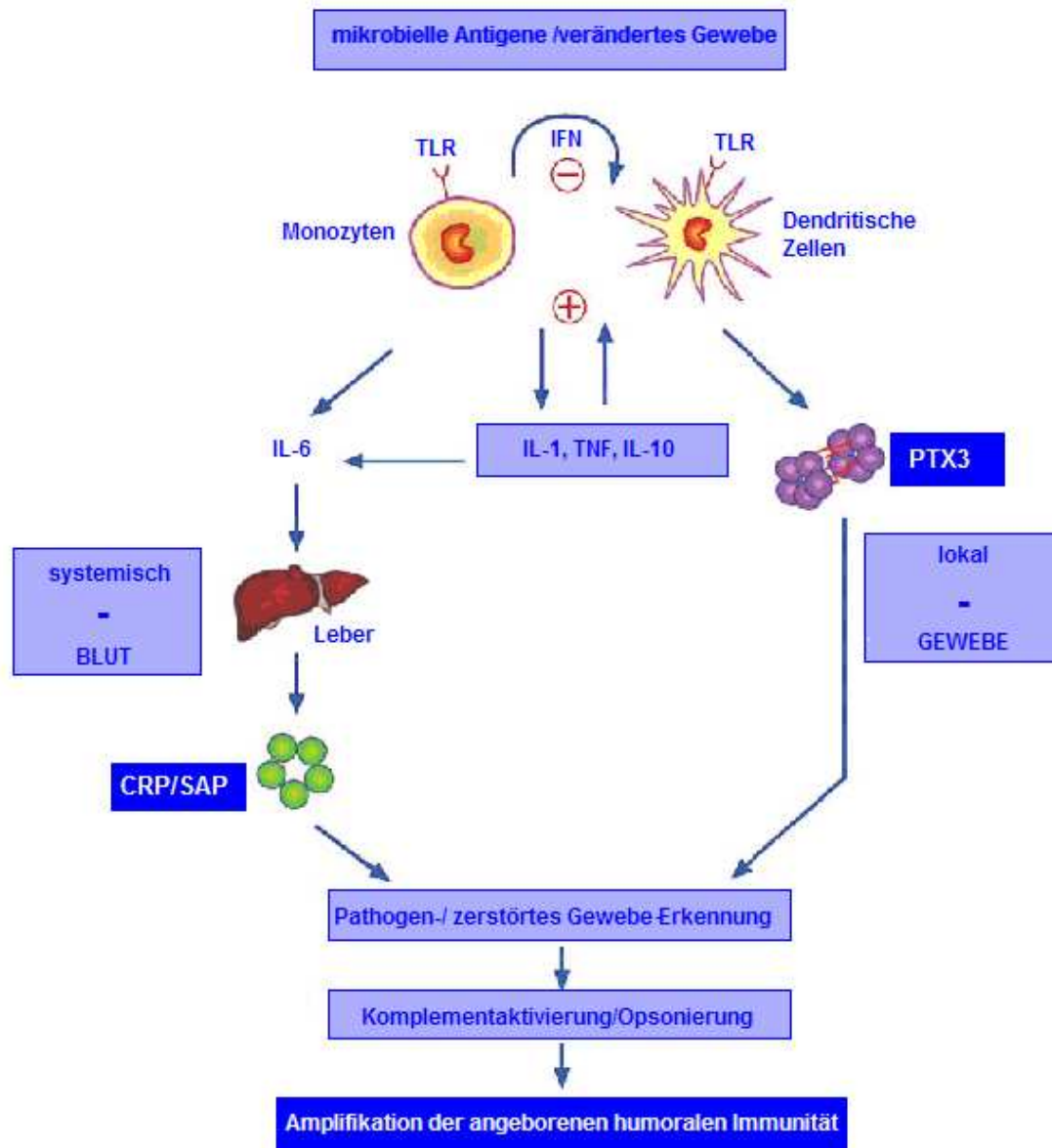


Abb. 5: **Rolle von PTX3 bei der angeborenen Immunität** [modifiziert nach: Garlanda C, Bottazzi B, Bastone A, et al. Pentraxins at the crossroads between innate immunity, inflammation, matrix deposition, and female fertility. *Annu Rev Immunol* 2005;23:337-366.] IFN=Interferon

Andererseits kann PTX3 die Phagozytose von späten apoptotischen Neutrophilen durch Makrophagen [58] inhibieren, womit ihm vielleicht eine Rolle in der Regulation und Kontrolle der Entstehung von Autoimmunerkrankungen zukommt [43]. Bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis produzierten synoviale Zellen signifikant höhere PTX3-Spiegel, die sich auch in der Synovialflüssigkeit fanden, als nicht entzündliche Kontrollen [59]. Auch bei Patienten mit „small vessel Vaskulitiden“ ließen sich höhere PTX3-Spiegel nachweisen und stellten sich sogar als Indikator für die

Aktivität der Erkrankung heraus [60]. Dahingegen weisen andere Autoimmunerkrankungen wie Systemischer Lupus erythematoses und M. Crohn keine Assoziation mit PTX3 auf [61].

Es finden sich erhöhte PTX3-Plasmalevel bei Patienten mit SIRS (Systemic inflammatory response syndrome), Sepsis und septischem Schock und zwar ansteigend in dieser Reihenfolge [62]. Höhere PTX3-Werte waren mit einem schlechteren Outcome assoziiert. CRP korrelierte dabei nicht mit PTX3. Sowohl PTX3 als auch IL-6 waren mit der Mortalität assoziiert.

Normale Plasmawerte für PTX3 werden von verschiedenen Autoren übereinstimmend bis  $\leq 2$  ng/ml postuliert [28, 62-64].

Für einen akuten Herzinfarkt stellt PTX3 einen frühen Indikator dar. Im Gegensatz zu CRP, dessen Höchstwert erst 24 Stunden nach Klinikaufnahme auftritt, steigt PTX3 sehr rasch und deutlich an, mit einem Höchstwert nach 7,5 Stunden, wobei das PTX3 wahrscheinlich aus irreversibel geschädigten, nekrotischen Kardiomyozyten stammt [63]. In einer großen Studie mit 724 Patienten, die einen akuten ST-Hebungs-Infarkt hatten, konnte gezeigt werden, dass hohe PTX3-Werte (die höchste Tertile) mit einer höheren Mortalität nach 3 Monaten assoziiert waren. Außerdem war PTX3 mit dem Alter assoziiert [64].

In fortgeschrittenen arteriosklerotischen Läsionen konnte PTX3 nachgewiesen werden, wobei es durch immunhistochemische Anfärbung vor allem in Makrophagen und Endothelzellen sichtbar ist, zum Teil auch in glatten Muskelzellen. In intakten Gefäßwänden konnte dagegen kein PTX3 nachgewiesen werden [65]. Die Tatsache, dass enzymatisch degradiertes LDL zu einer Induktion der PTX3-mRNA-Expression und PTX3-Freisetzung in glatten Muskelzellen von Gefäßwänden führt [44], lässt einen kausalen Zusammenhang zwischen der Entstehung von Arteriosklerose und PTX3 als einen lokal gebildeten inflammatorischen Modulator vermuten.

Bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz weisen HD-Patienten im Vergleich zu Peritonealdialyse-, chronisch niereninsuffizienten Patienten und gesunden Probanden signifikant höhere PTX3-Plasmaspiegel auf. Es besteht eine signifikante Korrelation zwischen PTX3-Leveln und der Dauer der Dialysetherapie sowie der wöchentlich applizierten EPO-Dosis. Bei Patienten mit KHK und paVK finden sich signifikant höhere PTX3-Werte als bei Patienten ohne KHK oder paVK [66].

### 1.3.3. Die kurzen Pentraxine CRP und SAP und das lange Pentraxin PTX3 im Vergleich

	CRP	SAP	PTX3
<b>Genlokalisierung</b>	Chromosom1 [67]; 1q23 [28]	Chromosom1 [67]	Chromosom 3 [28]; 3q25 [28]
<b>Genorganisation</b>	2 Exons [28]	2 Exons [28]	3 Exons [39]
<b>Anzahl Aminosäuren</b>	206 [67,68]		381 [33]
<b>Proteinstruktur</b>	Pentamer [67,68]	Pentamer [28]	Decamer, selten Eicosamer [36]
<b>Molekulargewicht</b>	25 kDa (Monomer) [28]	25kDa (Monomer) [28]	45 kDa (Monomer) [28]
<b>Glykosylierung</b>	Nein [28]		Ja (AS 220 am C-terminalen Ende) [28]
<b>Plasmaspiegel</b>	< 3 mg/l [28]	30-50 µg/ml [28]	< 2 ng/ml [28]
<b>Bildungsort</b>	Leber [28]		vaskuläres Endothel Skelett- u. Herzmuskel [39] nicht in Leber [29]
<b>Bildende Zellen</b>	Hepatozyten [28]		Fibroblasten, Endothelzellen [39] Mononukleäre Phagozyten [39,40] Denritische Zellen [42] Glatte Muskelzellen in Gefäßwänden [44] Fettzellen [47]
<b>Induktion</b>	IL-6 [28]		IL-1, TNFα [35]
<b>Erscheinung in</b>		Amyloiden Ablagerungen [28]	arteriosklerotischen Läsionen [65]
<b>Liganden-Bindung</b>	Kalzium abhängig [67]	Kalzium abhängig [36,69]	Keine Kalzium-Koordinationsstelle [36]
<b>Liganden</b>	C-Polysaccharid von <i>Str. pneumoniae</i> [28] Glykane, Phospholipide von Bakterien, Pilzen u. Parasiten [67] Plasma-Lipoproteine [70] Phospholipide [68] DNA & Chromatin [36] Small nuclear ribonucleoprotein-Partikel [67]  C1q [28] Apoptotische Zellen [71]	<i>Str. Pyogenes, N. meningitides,</i> Influenza-Viren [28]  Lipopolysaccharide [28] DNA & Chromatin [36] Phosphoethanolamin [69] Glykoaminoglykane [36]  C1q [28] Apoptotische Zellen [69]	<i>Pseudomonas, Salmonella typhimurium,</i> <i>Aspergillus fumigatus</i> [51], <i>Klebsiela pneumoniae</i> [35]  H1-Histon [36] FGF2 [35]  C1q [56,36] Apoptotische Zellen [56,57]
<b>Funktion</b>	Bestandteil der angeborenen Immunität Opsonierung Aktivierung des klassischen Weges der Komplementreaktion, Erleichterung der Phagozytose [67-69]	Haupt-Akute-Phase-Protein der Maus [68,28]	Bestandteil der angeborenen Immunität [35] Komplementaktivierung [56] Opsonierung [35] Interaktion mit Makrophagen u. mononukleären Phagozyten → Erleichterung der Phagozytose [35]

Tabelle 2: Vergleich der kurzen Pentraxine CRP und SAP und dem langen Pentraxin PTX3



## **1.4. Ziele und Fragestellungen**

### **1.4.1. Methodische Fragestellungen**

Bei der Bestimmung von PTX3 im Blutplasma gibt es im Gegensatz zur Bestimmung von CRP noch kein standardisiertes Verfahren.

Unterschiede der gemessenen PTX3-Konzentration zeigen sich in Abhängigkeit des verwendeten Antikoagulanz [66]. Die höchsten PTX3-Konzentrationen wurden in EDTA-Plasma gemessen.

Es soll untersucht werden, welche Auswirkungen andere Einflussfaktoren auf die gemessene PTX3-Konzentration haben.

**Ist die PTX3-Konzentration abhängig von der EDTA-Konzentration im verwendeten Blutabnahmesystem?**

**Hat die Lagertemperatur der Plasmaproben einen Einfluss auf die bestimmte PTX3-Konzentration?**

**Verändert zwischenzeitliches Auftauen der Proben die gemessene PTX3-Konzentration?**

### **1.4.2. Fragestellungen bezüglich der klinischen Relevanz von PTX3**

HD-Patienten unterliegen einer gegenüber der Normalbevölkerung und auch gegenüber Patienten in niedrigeren Stadien der chronischen Niereninsuffizienz stark erhöhten Mortalität und Morbidität. Eine Ursache hierfür könnte der chronische Entzündungszustand verursacht durch den Ausfall der Nierenfunktion sein. Ausdruck der chronischen Mikroinflammation ist unter anderem eine Erhöhung inflammatorischer Marker wie CRP und PTX3.

Eine Assoziation von CRP und arteriosklerotisch bedingten kardiovaskulären Ereignissen bei chronischer Niereninsuffizienz ist in der Literatur hinreichend beschrieben. Die Datenlage bezüglich PTX3 sieht dagegen noch sehr spärlich aus.

**Gibt es eine Assoziation von PTX3 mit KHK und paVK bei Hämodialysepatienten?**

**Ist PTX3 mit der Mortalität bei Hämodialysepatienten assoziiert?**

**Besteht ein Zusammenhang von PTX3 mit demographischen Faktoren wie Alter und Geschlecht bei Hämodialysepatienten?**

Der chronische Entzündungszustand kann neben der renalen Ursache auch die chronische Anämie bei HD-Patienten forcieren. Es gibt Hinweise, dass die Erhöhung entzündlicher Mediatoren mit der Höhe der notwendigen EPO-Dosis korreliert [72]. Eine Assoziation mit PTX3 wurde bisher nicht untersucht.

**Gibt es eine Assoziation von PTX3 mit der Erythropoietin-Dosis bei Hämodialysepatienten?**

Den bestmöglichen vaskulären Zugang zur Hämodialyse stellt die AVF dar. Ist eine solche AVF durch Gefäßkomplikationen nicht mehr möglich, kann ein Kunststoffinterponat in Form eines AVG als Zugang angelegt werden. Diese Kunststoffinterponate scheinen den chronischen Entzündungszustand bei dialysepflichtigen Patienten zu amplifizieren [12].

**Ist die Art des vaskulären Zugangs mit der Höhe entzündlicher Mediatoren wie PTX3, CRP oder IL-6 assoziiert?**

Zum Vergleich werden das kurze Pentraxin CRP und das Zytokin IL-6 herangezogen.



## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Patientenpopulation**

Zur Untersuchung der klinischen Relevanz von PTX3 wurden 155 HD-Patienten aus zwei Berliner ambulanten Dialyseeinrichtungen nach ausführlicher Aufklärung über Art und Umfang der Teilnahme sowie schriftlicher Einverständniserklärung für die Studie ausgewählt. Die Patienten kommen in der Regel drei Mal pro Woche für durchschnittlich zwei bis vier Stunden zur Dialyse. Eingesetzte Dialysatoren sind synthetische Membranen aus Polysulfon oder Polyamid (Polyflux 14L bzw. 11L von Gambro; Fresenius 60 S). Ausschlusskriterien waren akute Entzündungen, vorangehende Operationen und maligne Tumoren.

Im Juli 2006 wurde nach dem langen dialysefreien Intervall vor Anschluss an die Hämodialyse Blut in EDTA-Röhrchen aufgefangen, das Plasma abzentrifugiert und in Eppendorfgefäßen bei -80°C bis zur weiteren Untersuchung zwischengelagert. Die PTX3-Bestimmung wurde mit dem Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) von R&D-Systems (siehe unten) durchgeführt.

Patientendaten hinsichtlich des Alters, der Nierenersatztherapiedauer (Zeitraum Dialysepflicht), der Restdiurese, des Vorliegens einer KHK oder paVK, der wöchentlichen EPO-Dosis sowie der wöchentlichen Eisen- (Fe) Dosis, der Dialyседosis (Kt/v), des Body Mass Index (BMI) und weitere Laborparameter (Hämoglobin (Hb),  $\alpha$ -1-glykosyliertes Hämoglobin (HbA1c), Parathormon (PTH), Gesamt-Cholesterin (Chol), LDL-Cholesterin, High-Density-Lipoprotein- (HDL-) Cholesterin, Triglyceride (TG)) wurden mit Hilfe der Patienten, Krankenakten sowie der dort tätigen Ärzte erfasst.

Die Patienten wurden über einen Zeitraum von 25 Monaten beobachtet und eingetretene Todesfälle registriert. Mit Hilfe der Kaplan-Meier-Methode wurde das kumulative Überleben der HD-Patienten in Abhängigkeit von PTX3, CRP und IL-6 analysiert. Mit der Cox Regressions-Analyse wurde die Abhängigkeit der Überlebensfunktion von PTX3, CRP, IL-6, Alter der Patienten und dem Zeitraum der Dialysepflicht überprüft.

Zur Untersuchung, ob die EDTA-Konzentration im verwendeten Blutabnahmesystem einen Einfluss auf die gemessene PTX3-Konzentration hat, wurde von 7 stationären dialysepflichtigen Patienten vor Anschluss an die Hämodialyse Blut in 10 ml Spritzen abgenommen und sofort mit verschiedenen Konzentrationen an EDTA versetzt. Nach Zentrifugation und Abpipettieren des Plasmas wurde das Plasma in Eppendorfgefäßen bis zur PTX3-Bestimmung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  zwischengelagert. Die PTX3-Bestimmung erfolgte mit dem ELISA von Alexis (siehe unten).

Zur Untersuchung, ob die Lagerungstemperatur oder zwischenzeitliches Auftauen der Proben die gemessene PTX3-Konzentration beeinflusst, wurde von 10 hospitalisierten Patienten vor Anschluss an die Hämodialyse Blut in EDTA-Röhrchen (EDTA-Konzentration=1,6mg/ml) aufgefangen, zentrifugiert und je fünf Plasmaproben bei verschiedenen Temperaturen bis zur PTX3-Bestimmung zwischengelagert. Eine Probe wurde bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert und nur einmal zur ELISA-Anwendung aufgetaut. Die restlichen vier Proben wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert und vor der Auftauung zur PTX3-Bestimmung 1. gar nicht, 2. einmal, 3. fünfmal bzw. 4. zehnmal aufgetaut. Die PTX3-Bestimmung wurde mit dem ELISA von Alexis (siehe unten) durchgeführt.

## **2.2. Material**

EDTA-Röhrchen:	2,7 ml s-Monovette® KE (1,6 mg/ml EDTA)	(1)
Eppendorfgefäße 1,5ml:		(2)
EDTA:		(3)
ELISA-Platten:		(4)
Streptavidinperoxidase-Komplex:		(5)
Tween® 20 = Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat:		(3)
BSA (Bovines Serum Albumin):		(3)
Casein 0,2%:		(3)
Schwefelsäure:		(6)
TMB-Lösung:	240 mg Tetramethylbenzidin:	(7)
	5 ml Dimethylsulfoxid:	(3)
	5 ml Ethanol (100%):	(8)

1 Sarstedt Ag & Co., Nümbrecht, Deutschland

2 Safe Seal

3 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

4 Nunc-Immuno Module, Nunc A/S, Roskilde, Dänemark

5 Amersham, Braunschweig, Deutschland

6 Merck, Darmstadt, Deutschland

7 Fluka, Buchs, Deutschland

8 Herbeta Arzneimittel, Berlin, Deutschland

### 2.2.1. Puffer

#### **Materialien von R&D Systems, Minneapolis, USA:**

- Pretreatment D: Vorbereitungslösung (Part 895578)
- Calibrator Diluent RD5-24 Concentrate: 21 ml konzentrierte Puffer-Protein-Lösung (Part 895325)
- Assay Diluent RD1-56: 17 ml Puffer-Protein-Lösung (Part 895102)

#### **Materialien von Merck, Darmstadt, Deutschland:**

- Wasch-Puffer: PBS-Puffer + 0,05% Tween® 20
- Galatti-Puffer: 42 g/l Zitronensäure-Monohydrat (210,14 g/mol)  
4 N Kaliumhydroxid  
Wasserstoffperoxid 30% (34 µl/100ml Gallati-Lösung)
- Coating-Puffer: 5,52 g/l Natriumkarbonat (105,99 g/mol)  
5,03 g/l Natriumhydrogenkarbonat (84,01 g/mol)
- Block-Puffer: 1% BSA, 5% Saccharose in PBS mit 0,05% NaN<sub>3</sub>
- PBS-Puffer: 2,1 g/l Kaliumhydrogenphosphonat (174,18 g/mol)  
90 g/l Natriumchlorid (58,44 g/mol)  
7,26 Natriumhydrogenphosphat (142 g/mol)



## 2.2.2. ELISAs

- PTX3-ELISA:**
- Quantikine®, Humanes Pentraxin 3/TSG-14 Immunoassay DPTX30 von R&D Systems, Minneapolis, USA:
    - Capture-Antikörper (AK): 21 ml biotinylierter monoklonaler AK gegen humanes PTX3 (Part 893272)
    - Detection-AK: 21 ml mit Meerrettich-Peroxidase konjugierter monoklonaler AK gegen humanes PTX3 (Part 893049)
    - Standard: 200 ng humanes rekombinantes PTX3 (Part 893050)
  - PTX3 (human) Detection Set von Alexis Biochemicals, Lausen, Schweiz (ALX-850-299)
    - Capture-AK: monoklonaler AK gegen humanes PTX3 (MNB4) (ALX-804-464)
    - Detection-AK: biotinylierter polyklonaler AK gegen humanes PTX3 (ALX-210-365B)
    - Standard: humanes rekombinantes PTX3 (ALX-201-124)
- IL6-ELISA:**
- DuoSet ELISA Development System human IL-6 DY206 von R&D Systems, Minneapolis, USA:
- Capture-AK: AK von der Maus gegen humanes IL-6 (Part 840113)
  - Detection-AK: biotinylierter AK von der Ziege gegen humanes IL-6 (Part 840114)
  - Standard: 35ng rekombinantes humanes IL-6 (Part 840115)

### **2.3. ELISA-Prinzip**

Bei einem ELISA handelt es sich um ein immunologisches Nachweisverfahren eines gesuchten Moleküls mittels einer enzymatischen Farbreaktion. Die verwendeten ELISAs sind allesamt sogenannte Sandwich-ELISAs, bei dem zwei Antikörper (AK) nacheinander das gesuchte Molekül spezifisch binden und so mit ihm einen AK-Antigen-AK-Komplex, also bildlich einen „sandwich“ bilden. Der erste AK ist der „Capture“-AK, der zunächst an eine feste Phase gebunden wird. Nach Zugabe des zu untersuchenden Materials, in dem sich das gesuchte Molekül befindet, wird dieses durch den Capture-AK gebunden. Dann wird der zweite AK, der sogenannte „Detection“-AK hinzugegeben, der erneut das gesuchte Molekül bindet. Am zweiten AK ist ein Enzym (Meerrettich-Peroxidase) gebunden, welches nach Zugabe eines Substrates eine Farbstoffreaktion katalysiert. Die Konzentration des entstandenen Farbstoffes ist proportional zur Konzentration des gesuchten Moleküls und kann mit Hilfe eines Photometers bestimmt werden.

### **2.4. PTX3-Bestimmung**

Beim ELISA von R&D-Systems ist der Capture-AK biotinyliert. Er wird auf eine mit Streptavidin beschichtete Mikrotiterplatte aufgetragen. Biotin geht mit Streptavidin eine kovalente Bindung ein. Der Detection-AK ist direkt an die Meerrettich-Peroxidase gebunden.

Beim ELISA von Alexis wird der Capture-AK über einen „Coating“-Puffer an die Mikrotiterplatten gebunden. Der Detection-AK ist biotinyliert. Die Meerrettich-Peroxidase ist an Streptavidin gebunden und geht mit dem zweiten AK über Biotin eine kovalente Bindung ein.

Die Sensitivität wird bei ALEXIS mit einer Detektionsgrenze von 75 pg/ml angegeben.

### 2.4.1. Durchführung des ELISAs von R&D-Systems

Zunächst werden die Mikrotiterplatten präpariert. Dazu wird der erste AK (je 200 µl), ein monoklonaler biotinylierter AK gegen humanes PTX3, in jede Vertiefung der mit Streptavidin beschichteten 96-Loch-Mikrotiterplatten aufgetragen. Der biotinylierte AK geht durch das Biotin mit Streptavidin eine kovalente Bindung ein. Die Platten werden 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation werden die Platten zwei Mal mit je 400 µl Wasch-Puffer pro Vertiefung gewaschen. Danach werden die Platten ausgeschüttelt.

In der Zwischenzeit werden 100 µl einer zu untersuchenden Plasmaprobe mit je 10 µl der Vorbereitungslösung D in ein Polypropylen-Röhrchen gegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Zur Herstellung des PTX3-Standards werden 200 ng rekombinantes humanes PTX3 in 1 ml destilliertem Wasser gelöst und 15 Minuten inkubiert. Man erhält so eine Lösung mit einer Konzentration von 200 ng/ml PTX3. Zur Veranschaulichung der weiteren Arbeitsschritte dient folgende Abbildung:

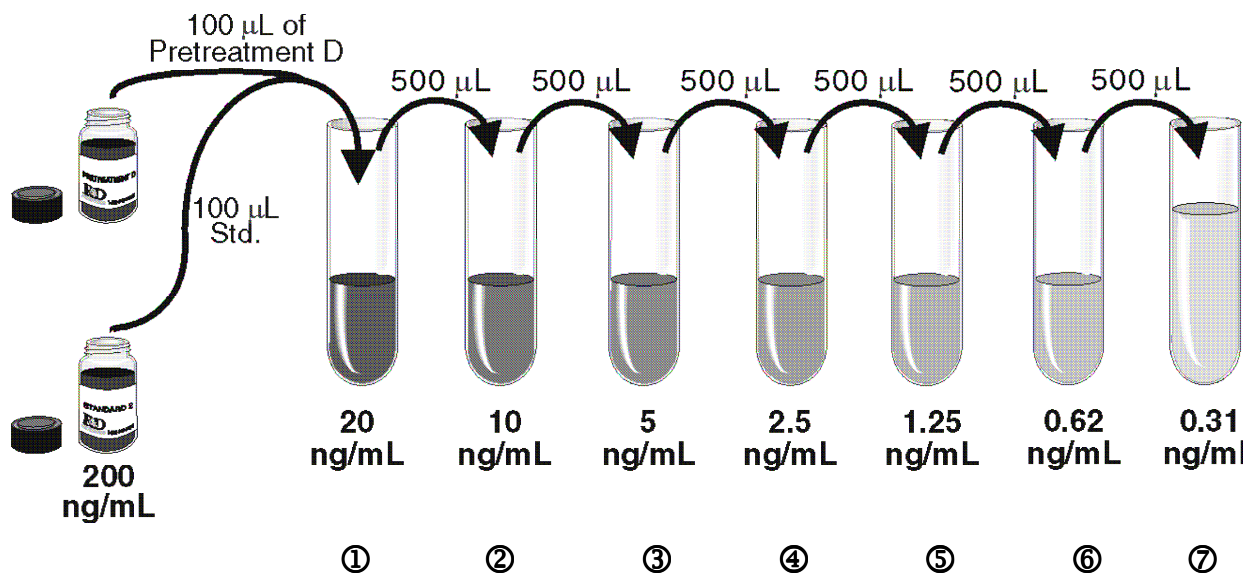


Abb.6: Herstellung eines PTX3-Standards

[aus: [www.rndsystems.com/pdf/DPTX30.pdf](http://www.rndsystems.com/pdf/DPTX30.pdf)]

In das erste Röhrchen gibt man 100 µl der angefertigten 200ng/ml-PTX3-Lösung. Hinzu kommen 900 µl Puffer-Lösung (Calibrator Diluent RD5-24) und 100 µl Vorbereitungslösung D. Es wird sanft geschüttelt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach gibt man in Röhrchen 2-7 je 500 µl Puffer-Lösung (Calibrator Diluent RD5-24). Ausgehend vom ersten Röhrchen wird nun eine Verdünnungsreihe hergestellt, aus der sich die in der Abbildung angezeigten Konzentrationen von PTX3 ergeben. Die reine Puffer-Lösung (Calibrator Diluent RD5-24) wird als 0-Standard (0 ng/ml PTX3) verwendet.

In jede Vertiefung der vorbereiteten Mikrotiterplatten werden je 100 µl Pufferlösung (Assay Diluent RD1-56) gegeben. Hinzu kommen je 20 µl der zu untersuchenden Plasmaproben und der Standardreihe. Es folgt eine Inkubation bei Raumtemperatur von zwei Stunden. Danach wird vier Mal mit je 400 µl Waschpuffer gewaschen und am Ende die Platten ausgeschüttelt.

Als nächster Schritt werden je 200 µl des mit Meerrettich-Peroxidase konjugierten PTX3-Aks, der sogenannte Detection-AK, in jedes Loch hinzugefügt und die Platten für weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden die Platten vier Mal gewaschen wie vorher beschrieben.

Nun wird die Substratlösung, also je 200 µl einer 1:1 Mischung aus Gallati-Puffer (enthält Farbreagenz A = H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) und TMB-Lösung (enthält Farbreagenz B = Tetramethylbenzidin) in die Vertiefungen gegeben und unter Ausschluss von Licht 30 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Durch die Meerrettichperoxidase wird zwischen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Tetramethylbenzidin eine Farbstoffreaktion katalysiert. Diese Reaktion wird nach 30 Minuten durch Zugabe von je 50 µl Schwefelsäure in jede Vertiefung der Mikrotiterplatten gestoppt.

Die Konzentration des entstandenen Farbstoffes wird innerhalb von 30 Minuten durch Extinktionsmessung mittels Photometer bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt.

#### **2.4.2. Durchführung des ELISAs von ALEXIS**

Zunächst wird der erste AK, ein monoklonaler AK gegen humanes PTX3, an eine feste Phase gebunden. Dazu wird er in coating-Puffer (15 mM Karbonat-Puffer, pH=9,6) auf 700 ng/ml verdünnt, je 100 µl in jede Vertiefungen von 96-Well-Mikrotiterplatten aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Nach der Inkubation werden die Platten drei Mal mit 300 µl Wasch-Puffer pro Vertiefung gewaschen.

Danach wird pro Vertiefung je 300 µl 0,2% Casein in PBS zugegeben, um unspezifische Bindungen zu blockieren. Nach erneuter zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur wird wieder drei Mal mit Waschpuffer gewaschen.

Nun werden je 50 µl des zu untersuchenden Materials, in diesem Fall das Patienten-EDTA-Plasma und zweifach ein Standard (rekombinantes humanes PTX3 mit einer definierten Konzentration von 75 pg/ml bis 2,4 ng/ml) jeweils in Waschpuffer in die Vertiefungen gegeben und für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wird fünf Mal mit Waschpuffer gewaschen.

Daraufhin wird der zweite AK, der sogenannte Detection-AK, ein biotinylierter polyklonaler AK gegen humanes PTX3, mit einer Konzentration von 25ng/ml in Waschpuffer in jede Vertiefung aufgetragen (100 µl pro Vertiefung). Wiederum erfolgt eine Inkubation von diesmal einer Stunde bei 37°C und danach eine fünffache Waschung mit je 300µl Waschpuffer, um nicht gebundene Detektion-AK zu entfernen.

Nun wird das die Farbreaktion katalysierende Enzym hinzugeben (100 µl pro Vertiefung), in diesem Fall an Streptavidin gebundene Meerrettich-Peroxidase, und bei Raumtemperatur eine Stunde inkubiert. Streptavidin bindet über Biotin den zweiten Antikörper und die Meerrettich-Peroxidase ist das die Farbreaktion katalysierende Enzym.

Abschließend werden die Platten fünf Mal gewaschen, um überschüssige Peroxidase zu entfernen, das Chromogen hinzugegeben (Galatti-Puffer und TMB-Lösung) und die Konzentration des entstandenen Farbstoffes nach 15 Minuten durch Extinktionsmessung mittels Photometer bei einer Wellenlänge von 405 nm bestimmt.

### **2.4.3. Auswertung des ELISAs**

Durch den auf die Mikrotiterplatten mit aufgetragenen Standard erhält man bei der Extinktionsmessung die optische Dichte (O.D.) bei bekannten Konzentrationen an PTX3. Trägt man die Konzentration gegen die optische Dichte in einem Diagramm auf, können so die gesuchten Konzentrationen im Probenmaterial anhand der gemessenen O.D. bestimmt werden.

### **2.5. IL-6-Bestimmung**

Bei diesem ELISA ist der Detection-AK biotinyliert. Der Capture-AK, ein gegen humanes IL-6 gerichteter AK von der Maus wird mittels coating-Puffer (15 mM Karbonat-Puffer, pH=9,6) durch Inkubation über Nacht an unbeschichtete Mikrotiterplatten gebunden. (360 µg/ml, jeweils 100 µl pro Vertiefungen.)

Daraufhin folgt dreimaliges Waschen mit Waschpuffer (400 µl pro Vertiefung). Anschließend werden zum Blockieren überschüssiger Bindungen je 300µl Block-Puffer (0,2% Casein in PBS-Puffer) in jede Vertiefung hinzugefügt und bei Raumtemperatur für mindestens eine Stunde inkubiert. Waschvorgang wie vorher beschrieben. Nach Zugabe von je 100 µl des Standards und des zu untersuchenden Probenmaterials wird zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Waschvorgang. Anschließend Zugabe des Detection-AK (je 100 µl, Konzentration 36 µl/ml) bei dem es sich diesmal um einen biotinylierten Ziegen-anti-humanes-IL-6-AK handelt. Inkubationszeit zwei Stunden bei Raumtemperatur. Waschvorgang. Nun Auftragen einer an Streptavidin gebundenen Meerrettich-Peroxidase und Inkubation für 20 Minuten bei Raumtemperatur, wobei direkte Lichteinstrahlung vermieden wird. Streptavidin bindet über Biotin den zweiten AK und die Meerrettich-Peroxidase ist das die Farbreaktion katalysierende Enzym. Waschvorgang. Jetzt Zugabe des Substrats für die enzymatisch katalysierte Farbreaktion (1:1 Mischung aus Gallati-Puffer und TMB-Lösung) und erneute Inkubation für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Abbruch der Farbreaktion mittels Zugabe von je 50 µl Schwefelsäure („stop solution“) pro Vertiefung. Daraufhin wird die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt.

## **2.6. CRP-Bestimmung**

Die CRP-Bestimmung wurde im Zentrallabor des Virchow-Klinikums mit dem CRP-Dynamic HIT / CRP Dynamic HIT917 von Invicon (München, Deutschland) durchgeführt. Dort wird ein latexverstärkter immunturbimetrischer Test angewendet, bei dem mit spezifischen AK beschichtete Latexpartikel mit CRP aus der Probe agglutinieren. Die Agglutination ist proportional zur Analytkonzentration und wird turbimetrisch gemessen.

## **2.7. Statistische Auswertung**

Die statistische Analyse der Fragestellungen bezüglich der klinischen Relevanz von PTX3 wurde mit Hilfe von SPSS 13.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) und PRISM (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA) durchgeführt.

Korrelation und Regression wurde der Spearman-Korrelationskoeffizient zu Grunde gelegt. Zum Gruppenvergleich wurde bei zwei Gruppen der Mann-Whitney-U-Test herangezogen, bei mehr als zwei Gruppen der Kruskal-Wallis-Test.

Bei der Kaplan-Meier-Methode zur Analyse des kumulativen Überlebens von HD-Patienten in Abhängigkeit verschiedener Parameter wurden signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen mittels des Log-Rank-Tests geprüft. Eine Multivarianzanalyse wurde nach dem Cox-Regressions-Modell durchgeführt. Die angewandte Methode für den Einschluss in das endgültige Modell war Likelihood-Ratio (Vorwärts schrittweise).

Als signifikant wurde ein p-Wert  $< 0,05$  definiert.

Die statistische Analyse der methodischen Untersuchungen wurde mit Hilfe von InStat (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA) mittels ANOVA (Friedman Test) für verbundene Stichproben analysiert. Auch hier gilt ein p-Wert  $< 0,05$  als signifikant.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. PTX3-Konzentration in Abhängigkeit von der EDTA-Konzentration

Bei verschiedenen EDTA-Konzentrationen im Blutabnahmesystem zeigten sich Unterschiede in der gemessenen PTX3-Konzentration. Ein deutlicher Anstieg der gemessenen PTX3-Konzentration ist von 0 mg/ml bis 2 mg/ml EDTA zu verzeichnen, während bei höherer EDTA-Konzentration die gemessene PTX3-Konzentration wieder abfällt. Höchstwerte der gemessenen Konzentration liegen im Bereich von 1-2 mg/ml EDTA-Konzentration (siehe Abbildung 7). Die Unterschiede zwischen den verschiedenen EDTA-Konzentrationen sind bei einem p-Wert von 0,0054 sehr signifikant.

		EDTA-Konzentration (mg/ml)						
		0	0,2	0,6	1	2	4	8
PTX3-Konz. (ng/ml)	1	0,21	0,56	0,53	0,94	1,31	1,17	
	2	0,03	0,24	0,93	0,48	1,26	0,52	0,28
	3	0,07	0,24	0,15	0,25	0,12	0,2	0,04
	4	0,14	0,26	0,27	0,32	0,78	0,19	0,06
	5	0,87	1,72	1,43	1,43	1,89	0,92	0,94
	6	0,29	2,32	3,54	2,7	3,44		
	7	0,01	3,9	2,55	4,35	2,87	2,86	1,15
<b>Mittelwert ± SEM</b>		0,23 ± 0,11	1,32 ± 0,53	1,34 ± 0,48	1,5 ± 0,57	1,67 ± 0,44	0,98 ± 0,41	0,49 ± 0,23

**p=0,0054** (Friedman Test)

Tabelle 3: Ergebnisse des PTX3-ELISAs bei den angegebenen EDTA-Konzentrationen;

1-7 entspricht Plasmaproben der Patienten

SEM = Standardfehler des Mittelwerts



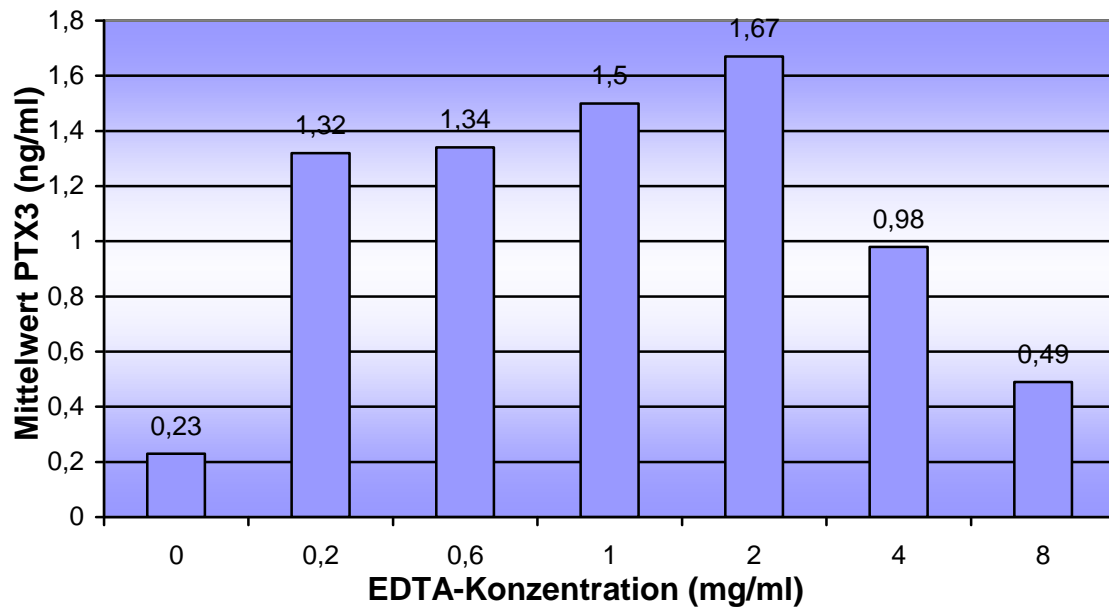


Abb. 7: PTX3-Konzentration in Abhängigkeit der EDTA-Konzentration

### 3.2. PTX3-Konzentration in Abhängigkeit von der Lagertemperatur und Auftauanzahl

Es fanden sich bei verschiedenen Lagertemperaturen und Auftauanzahlen unterschiedliche PTX3-Konzentrationen. Die PTX3-Konzentration ist bei  $-80^{\circ}\text{C}$  niedriger als bei  $-20^{\circ}\text{C}$ . Werden die Proben bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert und zwischendurch aufgetaut, zeigt sich ein Anstieg der bestimmten PTX3-Konzentration von 1-6 Mal Auftauen, während sie bei 11 Mal Auftauen wieder niedriger ausfällt (siehe Abbildung 8). Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen sind mit einem p-Wert von 0,0001 extrem signifikant.

		Lagertemperatur / Auftauanzahl				
		-80°C / 1x	-20°C / 1x	-20°C / 2x	-20°C / 6x	-20°C / 11x
<b>PTX3-Konz. (ng/ml)</b>	<b>1</b>	10,1	20	14,2	29,2	31,8
	<b>2</b>	3,39	16,18	54,14	9,04	1,7
	<b>3</b>	3,64	5,47	6,18	8,67	7,93
	<b>4</b>	2,76	4,6	4,8	22,12	9,69
	<b>5</b>	4,77	7,81	9,5	33,3	12,2
	<b>6</b>	6,08	7,22	11,48	10,39	15,68
	<b>7</b>	8,18	7,64	7,45	15,67	12,82
	<b>8</b>	1,3	23,3	34,5	41,7	41,6
	<b>9</b>	1,98	0,92	1,5	2,94	3,13
	<b>10</b>	1,74	18,62	23,18	24,58	33,43
<b>Mittelwert ± SEM</b>	4,39 ± 0,92	11,18 ± 2,42	16,69 ± 5,18	19,76 ± 3,96	17,0 ± 4,34	

**p=0,0001** (Friedman-Test)

Tabelle 4: Ergebnisse des PTX3-ELISAs bei der angegebenen Lagertemperatur und Auftauanzahl;  
1-10 entspricht Plasmaproben der Patienten  
SEM = Standardfehler des Mittelwerts

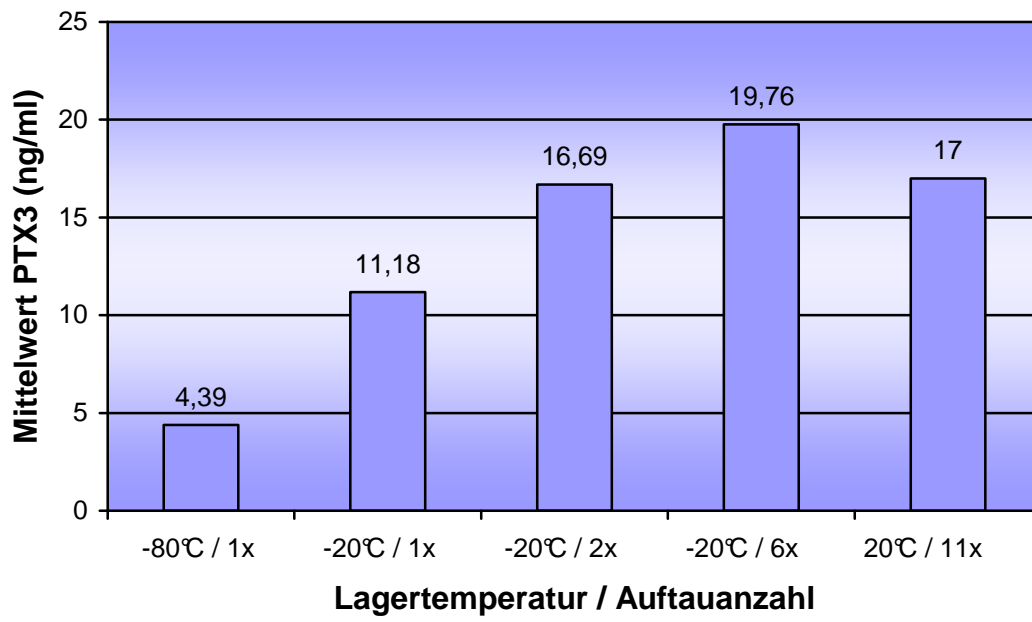


Abb. 8: PTX3-Konzentration in Abhängigkeit der Lagertemperatur und Auftauanzahl

### **3.3. Morbidität von HD-Patienten in Abhängigkeit inflammatorischer Marker (PTX3, CRP, IL-6)**

In einer Querschnittsstudie wurde von 155 nicht-hospitalisierten HD-Patienten Blutplasma zur Bestimmung von PTX3, CRP und IL-6 gewonnen. Folgende weiteren Patientendaten wurden mit Hilfe der behandelnden Ärzte und anhand der Krankenakten erhoben:

	<b>Anzahl</b>	<b>Mittelwert ± SD</b>	<b>Median</b>	<b>Spannweite</b>
<b>Patienten</b>	155			
<b>KHK</b>	50 (32,3%)			
<b>paVK</b>	46 (29,6%)			
<b>Alter</b>	155	61,4 ± 16,9	64	19 – 90
<b>Zeitraum Dialysepflicht (Monate)</b>	155	63 ± 68	45	1 – 459
<b>EPO-Dosis (IE/Woche)</b>	155	7409 ± 4498	6000	1000-20000
<b>Fe-Dosis (mg/Woche)</b>	155	77,9 ± 49,3	80	0 – 240
<b>Hb (g/dl)</b>	155	12,3 ± 1,3	12,3	7,4 – 15,3
<b>HbA1c (%)</b>	68	5,9 ± 1,09	5,7	4,1 – 8,2
<b>Restdiurese (ml/Tag)</b>	155	551 ± 506	500	0 – 2000
<b>Kt/v</b>	155	1,43 ± 0,31	1,38	0,66 – 2,54
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	98	26,2 ± 6,4	25,2	17,7 – 54,5
<b>PTH (pmol/l)</b>	155	17,9 ± 28,7	10,5	0,2 – 300,6
<b>Chol (mg/dl)</b>	155	170,6 ± 44,9	170	27 – 300
<b>LDL (mg/dl)</b>	78	96 ± 45	93	21 – 395
<b>HDL (mg/dl)</b>	79	50 ± 25	45	25 – 238
<b>TG (mg/dl)</b>	155	206 ± 149	168	35 – 1438

Tabelle 5: erhobene Daten der untersuchten Hämodialysepatienten;

SD = Standardabweichung

	<b>Anzahl</b>	<b>Mittelwert ± SD</b>	<b>Median</b>	<b>Spannweite</b>
<b>PTX3 (ng/ml)</b>	146	3,44 ± 3,14	2,38	0,01 – 18,32
<b>CRP (mg/dl)</b>	153	0,95 ± 1,82	0,44	0,02 – 19,07
<b>IL6 (pg/ml)</b>	152	9,28 ± 8,05	6,47	0,86 – 34,88

Tabelle 6: Ergebnisse der PTX3-, IL-6- und CRP-Bestimmung

Von 155 Hämodialysepatienten hatten 36 Patienten (23,2%) eine diabetische Nephropathie als Grunderkrankung, 33 (21,3%) eine hypertensive Nephropathie, insgesamt 33 (21,3%) chronische Glomerulonephritiden, 14 (9%) Zystennieren und 7 eine interstitielle Nephritis. Weitere Ursachen der chronischen Niereninsuffizienz waren Autoimmunerkrankungen (Systemischer Lupus erythematoses, Alport-Syndrom, Goodpasture-Syndrom), chronische Pyelonephritiden, Refluxnephropathie, Medikamentenabusus (Analgetika, Diuretika und Laxantien) und andere.

Der Großteil der Patienten (77,1%) hatte eine arteriovenöse Fistel (AVF) als Zugang zur Hämodialyse, 17,6% ein Kunststoffimplantat (AVG) und 5,3% einen Vorhof-Katheter.

Jeweils knapp 1/3 der untersuchten HD-Patienten leiden an einer KHK oder paVK. Von den Diabetikern haben 55% eine KHK und 61% eine paVK. Von den Hypertonikern haben 52% eine KHK und 36% eine paVK. Bei den übrigen Grunderkrankungen liegt der Anteil an KHK bei 15% und paVK bei 13%.

### **3.3.1. Korrelationen**

PTX3 korreliert positiv mit CRP ( $p=0,005$ ) und IL-6 ( $p=0,007$ ). Weiterhin besteht eine positive Korrelation mit dem Zeitraum der Dialysepflicht ( $p=0,05$ ), dem Alter ( $p=0,002$ ) und dem Alter bei Dialysebeginn ( $p=0,03$ ). PTX3 korreliert negativ mit der Restdiurese ( $p=0,008$ ).

CRP korreliert positiv mit IL-6 ( $p=0,0001$ ), dem Alter ( $p=0,0001$ ), dem Alter bei Dialysebeginn ( $p=0,0001$ ) und der Dialysedosis ( $p=0,02$ ). CRP korreliert negativ mit dem Hb-Wert ( $p=0,02$ ).

IL-6 korreliert positiv mit dem Alter ( $p=0,001$ ), dem Alter bei Dialysebeginn ( $p=0,005$ ), der wöchentlichen EPO-Dosis ( $p=0,02$ ) sowie der wöchentlichen Eisendosis ( $p=0,003$ ).

	<b>CRP</b>	<b>IL-6</b>	<b>Alter</b>	<b>Zeitraum Dialysepflicht</b>	<b>Alter bei Dialysebeginn</b>	<b>Restdiurese</b>
<b>PTX3</b>	0,241** p=0,005	0,232** p=0,007	0,256** p=0,002	0,166* p=0,05	0,186* p=0,03	-0,217** p=0,008
<b>CRP</b>	1	0,544** p=0,0001	0,288** p=0,0001	n.s.	0,288** p=0,0001	n.s.
<b>IL-6</b>	0,544** p=0,0001	1	0,267** p=0,001	n.s.	0,229** p=0,005	n.s.

	<b>Epo-Dosis</b>	<b>Fe-Dosis</b>	<b>Hb</b>	<b>Kt/v</b>	<b>Chol</b>	<b>LDL</b>	<b>HDL</b>	<b>TG</b>	<b>BMI</b>
<b>PTX3</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>CRP</b>	n.s.	n.s.	-0,187* p=0,02	0,185* p=0,02	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>IL-6</b>	0,186* p=0,02	0,241** p=0,003	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tabelle 7: Korrelationen der angegebenen Parameter.

Angabe: Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho, p-Wert. n.s. = nicht signifikant.

\* Die Korrelation ist auf dem 0,05 Niveau signifikant

\*\* Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant

### 3.3.2. Koronare Herzerkrankung

Die Abbildungen 9-11 zeigen den Zusammenhang zwischen der Höhe der PTX3-, CRP- und IL-6-Plasmaspiegel und einer manifesten KHK bei HD-Patienten. PTX3 ist signifikant mit einer KHK assoziiert ( $p=0,038$ ). Die CRP-Spiegel zeigen dagegen bei vorhandener KHK nur einen Trend zu höheren Plasmawerten als bei nicht manifester KHK ( $p=0,059$ ). Dieser Zusammenhang verfehlt jedoch knapp das statistische Signifikanzniveau. Auch IL-6 ist signifikant mit KHK assoziiert ( $p=0,007$ ). Das höchste Signifikanzniveau erreicht IL-6, gefolgt von PTX3.

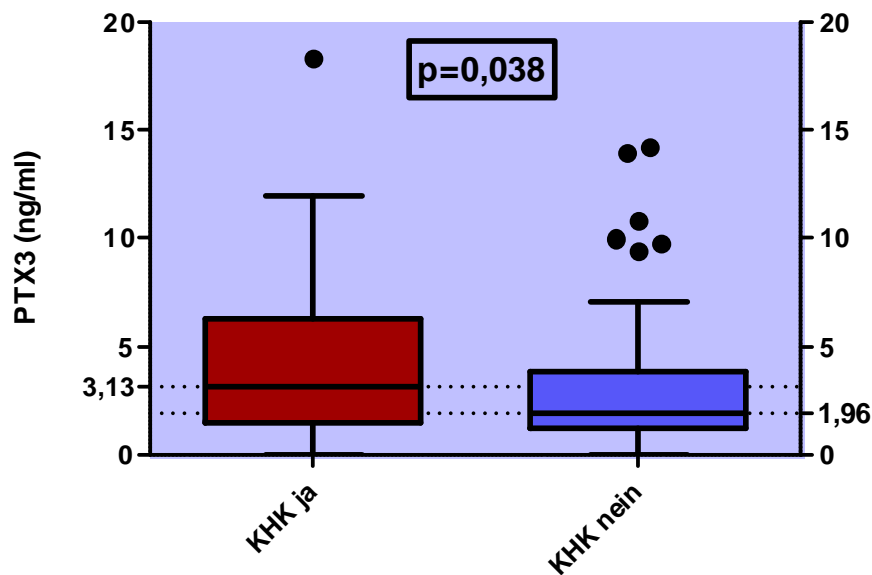


Abb. 9: Boxplot zur Darstellung der Höhe der PTX3-Plasmaspiegel in Abhängigkeit einer KHK

	PTX3 (ng/ml)		CRP (mg/dl)		IL-6 (pg/ml)	
KHK	ja	nein	ja	nein	ja	nein
Median	3,13	1,96	0,51	0,39	8,68	5,40
Spannweite	0,04-18,32	0,01-14,21	0,05-7,80	0,02-19,07	1,74-34,52	0,86-34,88
P-Wert	<b>0,038</b>		<b>0,059 (n.s.)</b>		<b>0,007</b>	

Tabelle 8: Statistische Auswertung der Boxplots



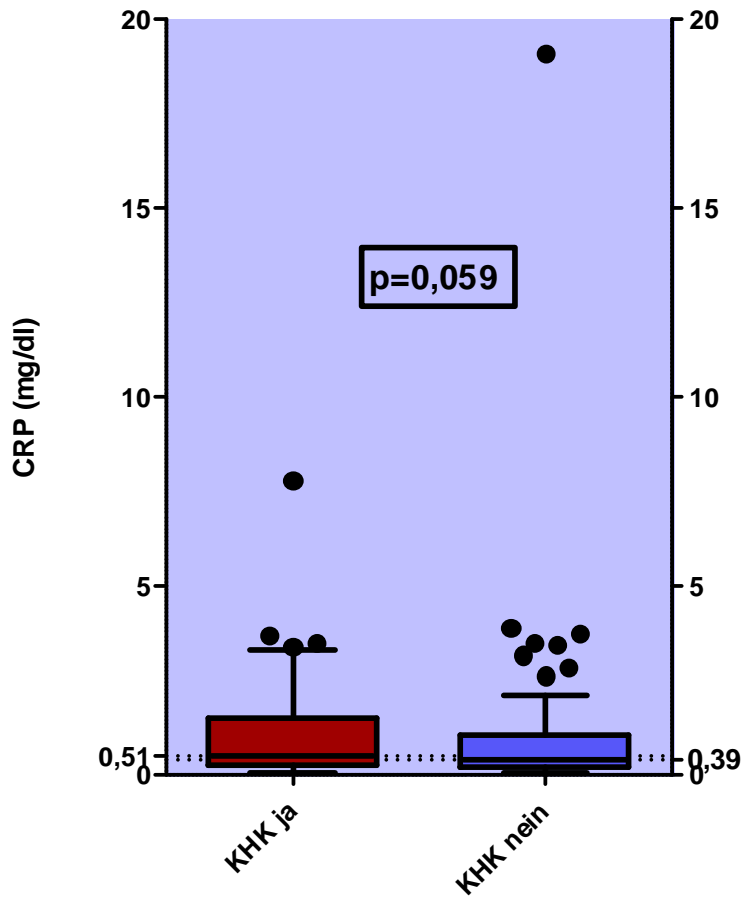


Abb. 10: Boxplot zur Darstellung der Höhe der CRP-Plasmaspiegel in Abhängigkeit einer KHK

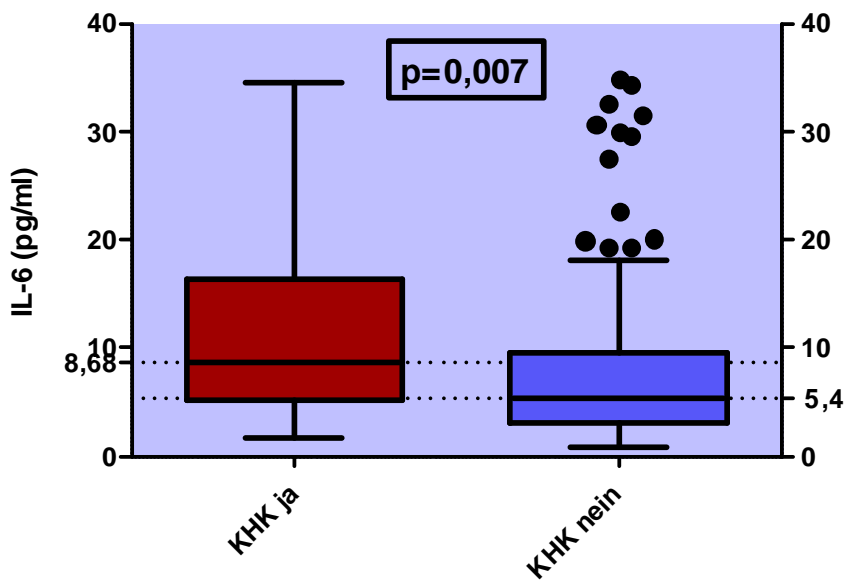


Abb. 11: Boxplot zur Darstellung der Höhe der IL-6-Plasmaspiegel in Abhängigkeit einer KHK

### 3.3.3. Periphere arterielle Verschlusskrankheit

Die Abbildungen 12-14 zeigen die Assoziation einer paVK mit der Höhe der angegebenen inflammatorischen Marker.

PTX3 ist signifikant mit einer paVK assoziiert ( $p=0,039$ ). Für die Höhe der CRP-Werte ergibt sich keine signifikante Assoziation ( $p=0,22$ ). Auch IL-6 ist signifikant mit paVK assoziiert ( $p=0,01$ ) und erreicht das höchste Signifikanzniveau.

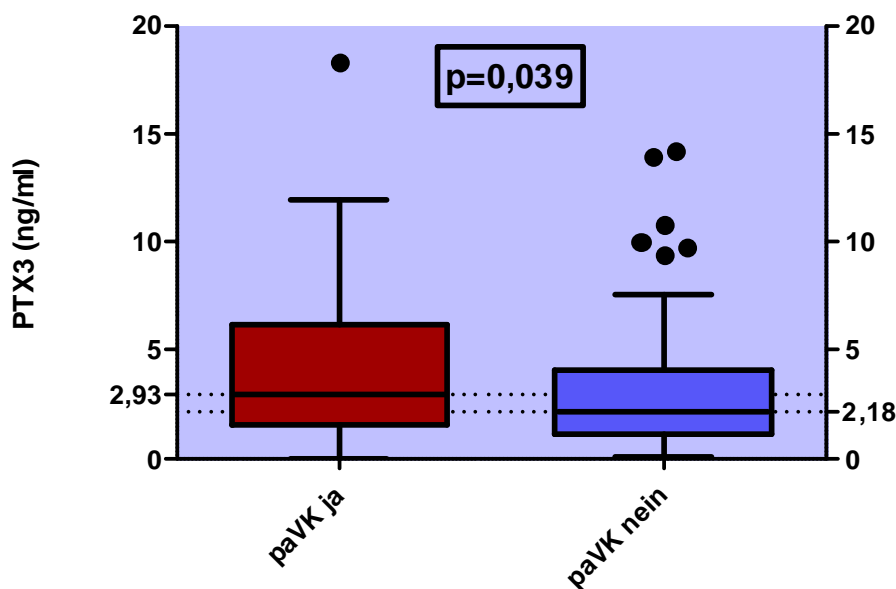


Abb. 12: Boxplot zur Darstellung der Höhe der PTX3-Plasmaspiegel in Abhängigkeit einer paVK

	PTX3 (ng/ml)		CRP (mg/dl)		IL-6 (pg/ml)	
paVK	ja	nein	ja	nein	ja	nein
<b>Median</b>	2,93	2,18	0,49	0,41	8,12	5,38
<b>Spannweite</b>	0,01-18,32	0,04-14,21	0,05-7,80	0,02-19,07	1,85-34,88	0,86-34,52
<b>P-Wert</b>	<b>0,039</b>		<b>0,22 (n.s.)</b>		<b>0,01</b>	

Tabelle 9: Statistische Auswertung der Boxplots

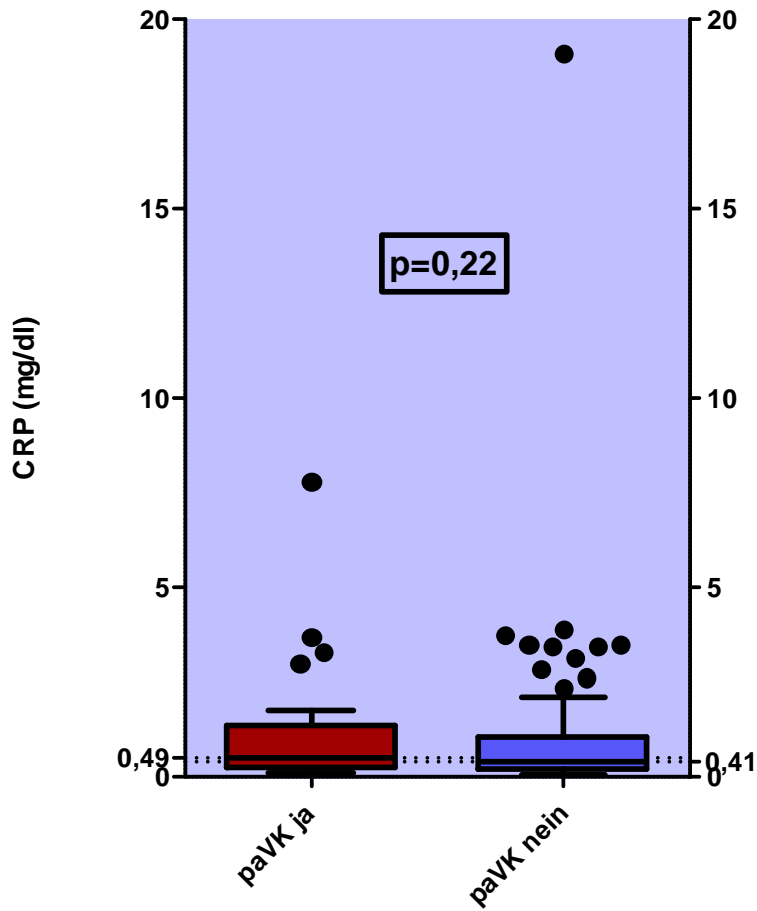


Abb. 13: Boxplot zur Darstellung der Höhe der CRP-Plasmaspiegel in Abhängigkeit einer paVK

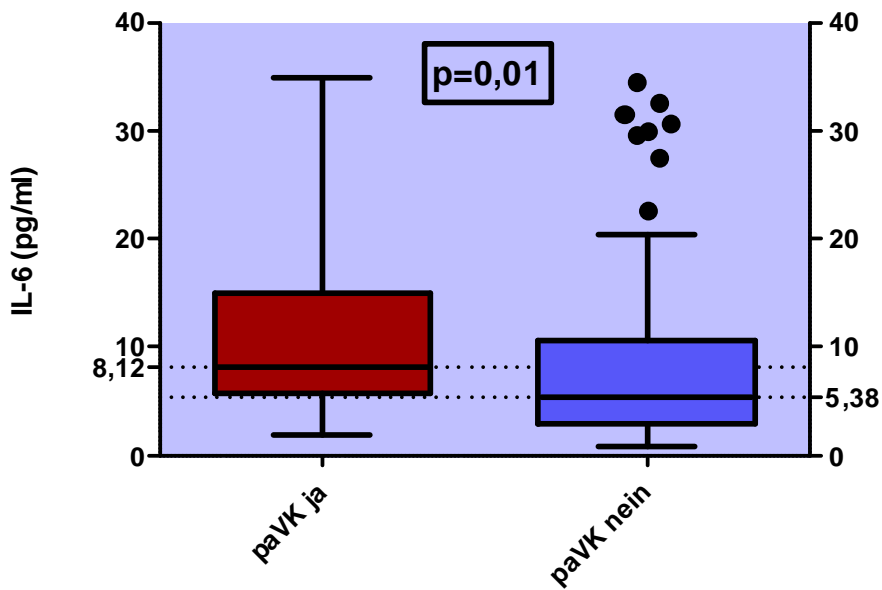


Abb. 14: Boxplot zur Darstellung der Höhe der IL-6-Plasmaspiegel in Abhängigkeit einer paVK

### 3.3.4. Höhe der PTX3-, CRP- und IL-6-Plasmaspiegel in Abhängigkeit vom Geschlecht

Weder PTX3 noch CRP noch IL-6 sind mit dem Geschlecht assoziiert (siehe Abbildung 15-17).

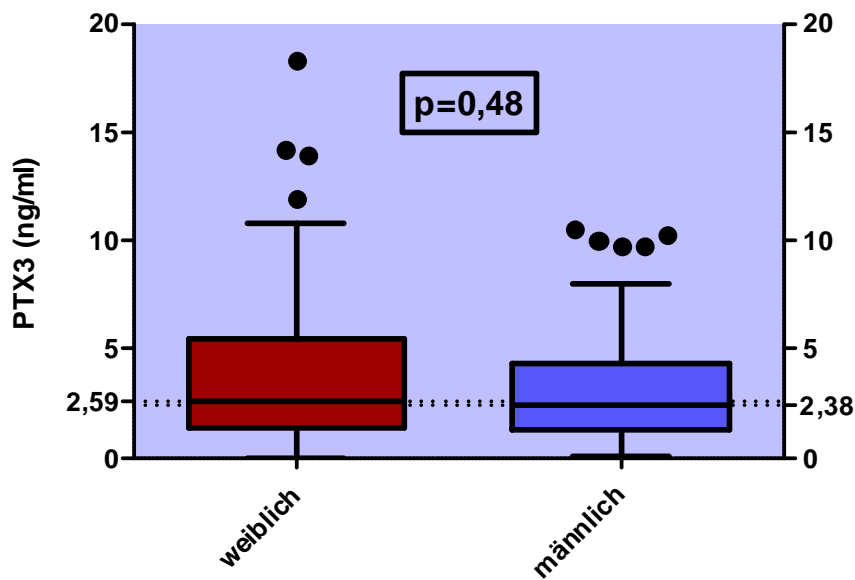


Abb. 15: Boxplot zur Darstellung von PTX3 in Abhängigkeit vom Geschlecht

	PTX3 (ng/ml)		CRP (mg/dl)		IL-6 (pg/ml)	
	weiblich	männlich	weiblich	männlich	weiblich	männlich
<b>Geschlecht</b>	weiblich	männlich	weiblich	männlich	weiblich	männlich
<b>Median</b>	2,59	2,38	0,45	0,44	7,55	5,64
<b>Spannweite</b>	0,04-10,57	0,01-18,32	0,02-19,07	0,02-7,8	1,05-34,88	0,86-34,52
<b>P-Wert</b>	<b>0,48 (n.s.)</b>		<b>0,71 (n.s.)</b>		<b>0,24 (n.s.)</b>	

Tabelle 10: Statistische Auswertung der Boxplots

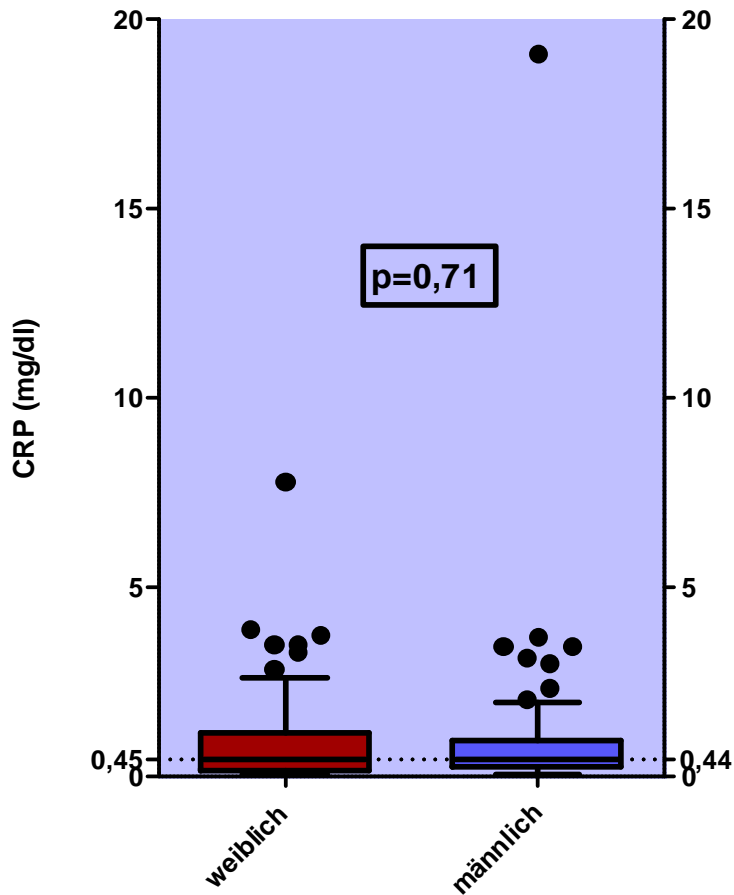


Abb. 16: Boxplot zur Darstellung von CRP in Abhängigkeit vom Geschlecht

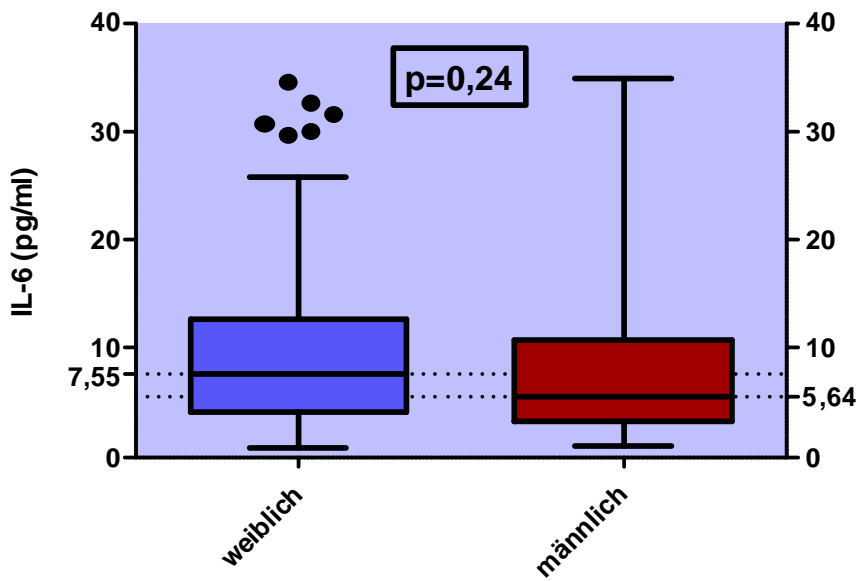


Abb. 17: Boxplot zur Darstellung von IL-6 in Abhängigkeit vom Geschlecht

### 3.3.5. Höhe der PTX3-, CRP- und IL-6-Plasmaspiegel in Abhängigkeit vom vaskulären Zugang

Die Art des vaskulären Zugangs ist nicht mit der Höhe inflammatorischer Marker bei HD-Patienten assoziiert (siehe Abbildung 18-20). Eine Tendenz liegt für PTX3 vor: die höchsten PTX3-Werte fanden sich bei HD-Patienten mit VH-Katheter. Bei HD-Patienten mit AVG fanden sich höhere Werte als bei solchen mit AVF. Dieser Zusammenhang ist allerdings statistisch nicht signifikant. Für CRP zeigte sich die gleiche Tendenz: Patienten mit VH-Katheter haben die höchsten Werte und Patienten mit AVG höhere CRP-Werte als solche mit AVF. Hinsichtlich IL-6 fanden sich keine Unterschiede bei verschiedenen Zugängen zur Hämodialyse.

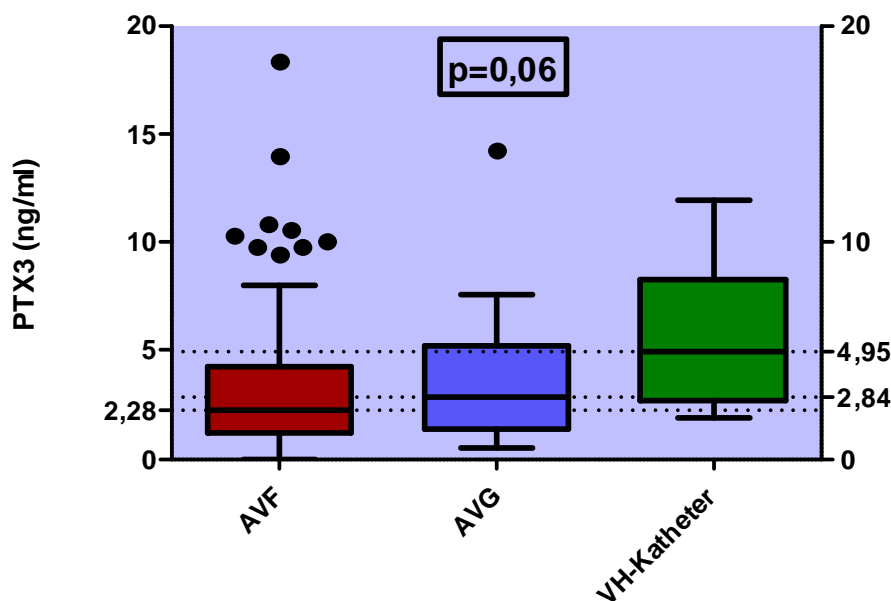


Abb. 18: Boxplot zur Darstellung von PTX3 in Abhängigkeit vom vaskulären Zugang

	PTX3 (ng/ml)			CRP (mg/dl)			IL-6 (pg/ml)		
Zugang	AVF	AVG	VH-K.	AVF	AVG	VH-K.	AVF	AVG	VH-K.
Median	2,28	2,84	4,95	0,38	0,65	1,4	6,28	6,72	6,61
Chi-Quadrat	5,6			3,03			0,17		
P-Wert	<b>0,06 (n.s.)</b>			<b>0,22 (n.s.)</b>			<b>0,92 (n.s.)</b>		

Tabelle 11: Statistische Auswertung der Boxplots

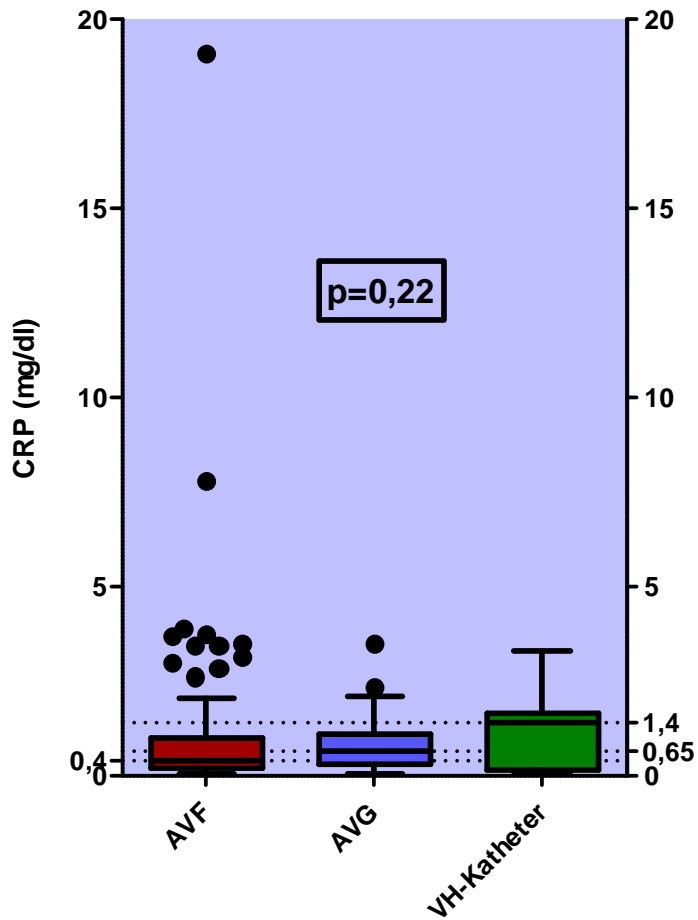


Abb. 19: Boxplot zur Darstellung von CRP in Abhängigkeit vom vaskulären Zugang

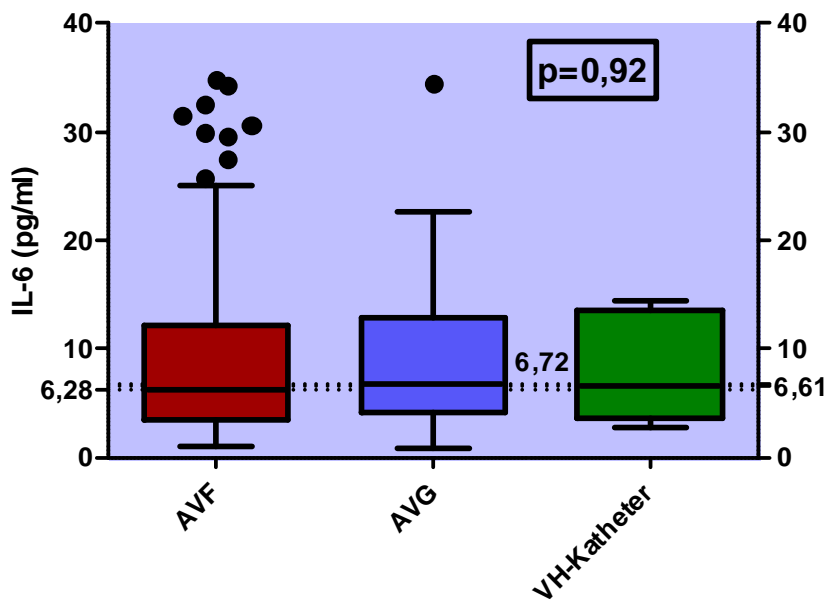


Abb. 20: Boxplot zur Darstellung von IL-6 in Abhängigkeit vom vaskulären Zugang

### 3.3.6. Höhe der PTX3-, CRP- und IL-6-Plasmaspiegel in Abhängigkeit von der Erythropoietindosis

Die PTX3-Plasmapiegel weisen keine Unterschiede hinsichtlich der Höhe der wöchentlichen EPO-Dosis auf. (siehe Abbildung 21-23). Lediglich eine Tendenz zu höheren PTX3-Plasmaspiegeln ist bei höheren wöchentlichen EPO-Dosen zu verzeichnen. CRP zeigt einen nicht signifikanten, aber immerhin stärkeren Trend zu höheren CRP-Spiegeln bei einer höheren wöchentlichen EPO-Dosis. Die IL-6 Plasmaspiegel sind bei einer wöchentlichen EPO-Dosis von >6000 IE signifikant höher als bei einer wöchentlichen EPO-Dosis von  $\leq 6000$  IE.

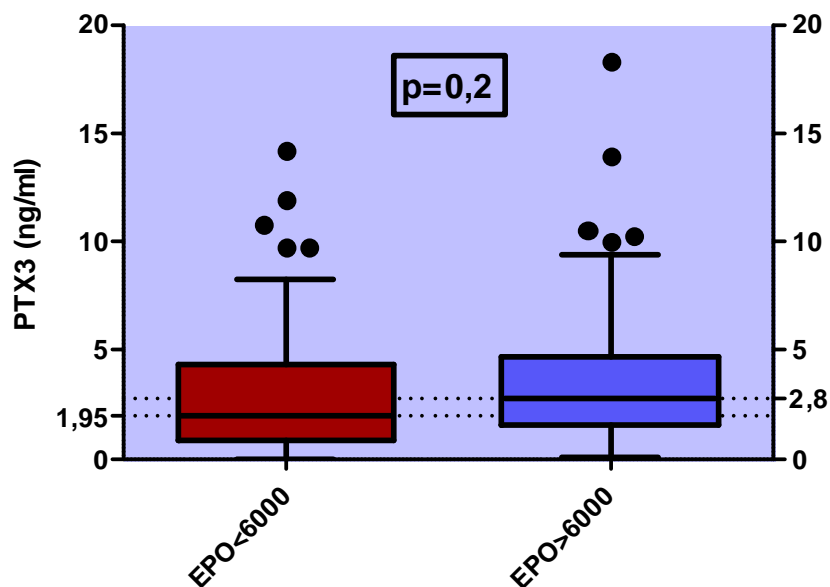


Abb. 21: Boxplot zur Darstellung von PTX3 in Abhängigkeit der EPO-Dosis

EPO-Dosis	PTX3 (ng/ml)		CRP (mg/dl)		IL-6 (pg/ml)	
	$\leq 6000$	$> 6000$	$\leq 6000$	$> 6000$	$\leq 6000$	$> 6000$
<b>Median</b>	1,95	2,8	0,39	0,58	5,94	8,24
<b>Spannweite</b>	0,01-14,21	0,04-18,32	0,02-19,07	0,03-7,8	0,86-34,88	1,05-34,4
<b>P-Wert</b>	<b>0,2 (n.s.)</b>		<b>0,1 (n.s.)</b>		<b>0,04</b>	

Tabelle 12: Statistische Auswertung der Boxplots



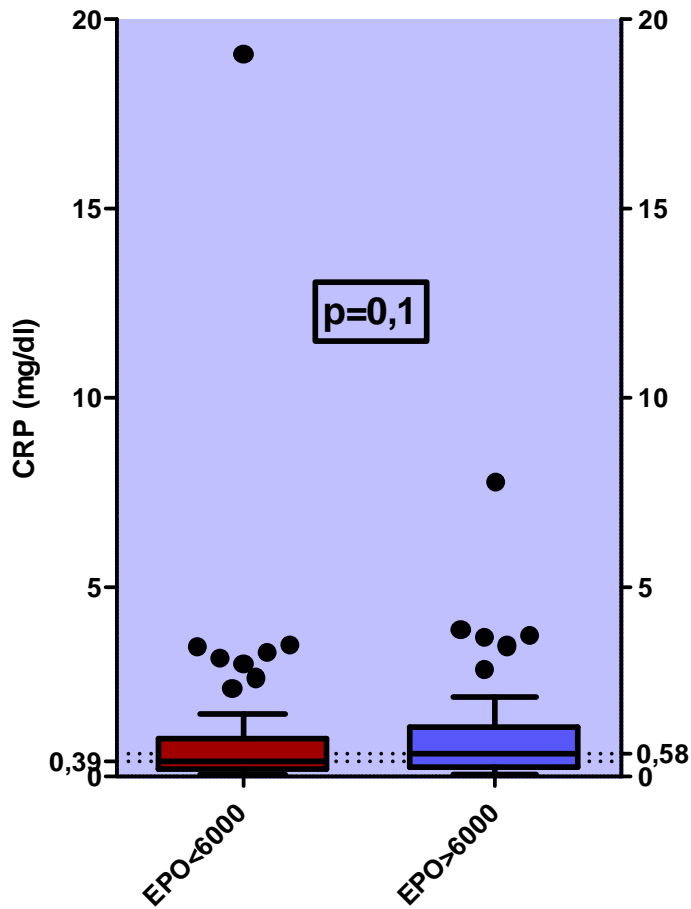


Abb. 22: Boxplot zur Darstellung von CRP in Abhängigkeit der EPO-Dosis

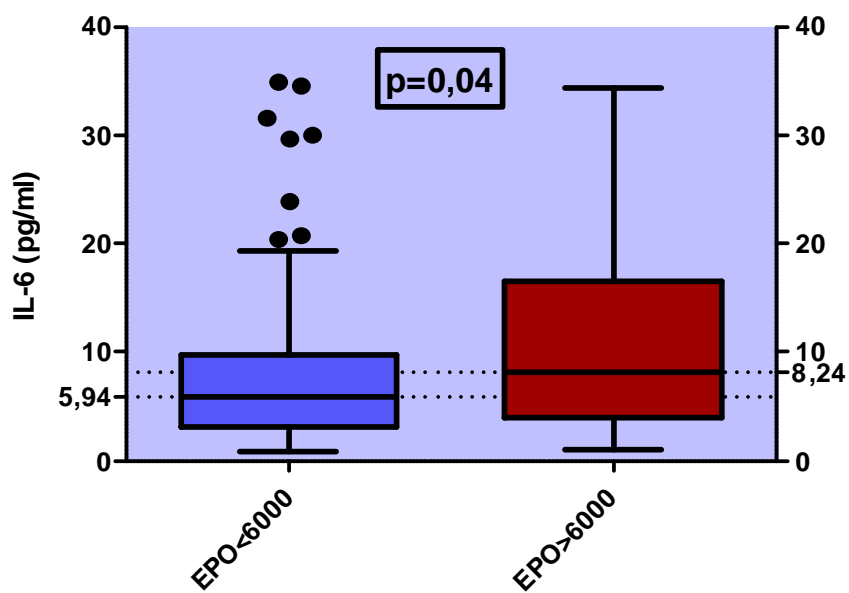


Abb. 23: Boxplot zur Darstellung von IL-6 in Abhängigkeit der EPO-Dosis

### 3.4. Mortalität von HD-Patienten in Abhängigkeit von PTX3

Die 155 HD-Patienten wurden zwei Jahre und einen Monat lang beobachtet und hinsichtlich ihres Überlebens erfasst. 31 Patienten starben während des Beobachtungszeitraums von 25 Monaten.

	<b>GESAMT</b>
<b>Todesfälle</b>	31 (20%)

Tabelle 13: Anzahl der Todesfälle

Das kumulative Überleben wurde mit der Kaplan-Meier-Methode in Abhängigkeit der PTX3-, CRP- und IL-6-Plasmaspiegel (siehe Abbildungen 24-26) analysiert.

Patienten mit einem PTX3-Plasmaspiegel in der höchsten Quartile (4,46-18,32 ng/ml) zeigten eine signifikant höhere Mortalität als Patienten mit PTX3-Plasmaspiegeln in der 1.-3. Quartile (0,01-4,45 ng/ml). 50% der gestorbenen Patienten wiesen PTX3-Werte in der höchsten Quartile auf. Der p-Wert beträgt 0,0001. Auch Patienten mit höheren IL-6-Werten zeigten eine signifikant höhere Mortalität als solche mit niedrigeren IL-6-Werten ( $p=0,01$ ). Hinsichtlich CRP war eine Tendenz zu höherer Mortalität bei höheren CRP-Werten zu verzeichnen. Dieser Zusammenhang war allerdings statistisch nicht signifikant.

Das höchste Signifikanzniveau erreichte PTX3 hinsichtlich der Mortalität bei HD-Patienten.

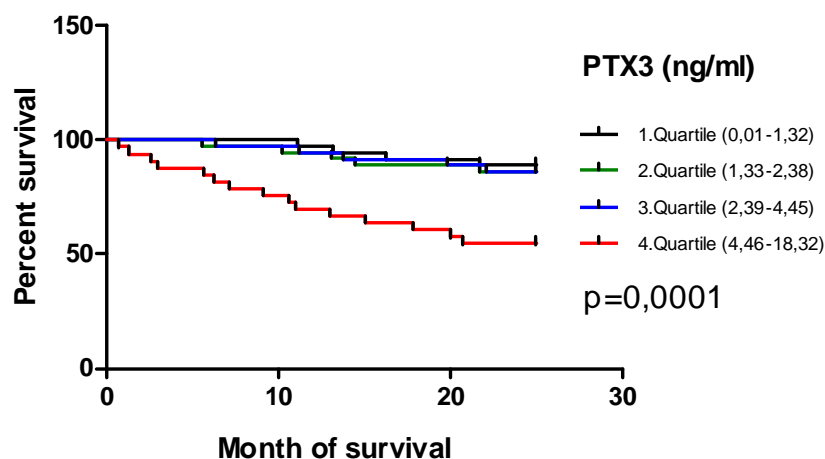


Abb. 24: Überleben von Dialysepatienten in Abhängigkeit der PTX3-Plasmaspiegel

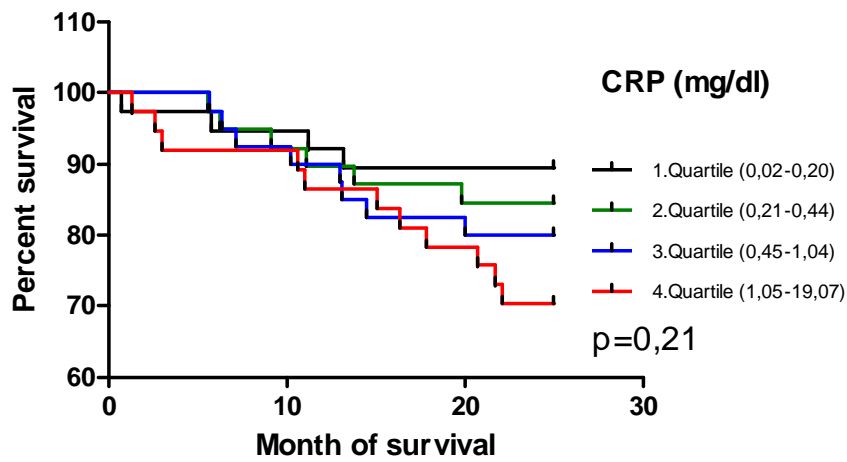


Abb. 25: Überleben von Dialysepatienten in Abhängigkeit der CRP-Plasmaspiegel

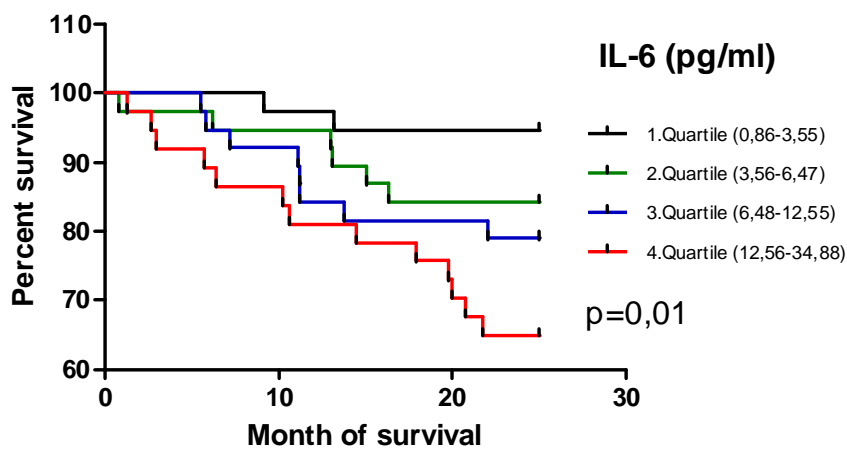


Abb. 26: Überleben von Dialysepatienten in Abhängigkeit der IL-6-Plasmaspiegel

Log-rank (Mantel-Cox) Test	PTX3	CRP	IL-6
Chi-Quadrat	20,85	4,56	11,16
P-Wert	0,0001	0,21	0,01

Tabelle 14: Statistische Auswertung der Kaplan-Meier-Kurven

Zur Untersuchung der Frage, ob die berechneten Überlebenswahrscheinlichkeiten bezüglich der Variablen PTX3, CRP und IL-6 unabhängig voneinander sowie unabhängig vom Alter und dem Zeitraum der Dialysepflicht sind, wurde eine Multivarianzanalyse nach dem Cox-Regressions-Modell durchgeführt. Das Modell beinhaltet Alter und PTX3 als unabhängige Einflussfaktoren für das Überleben. Die anderen Faktoren (IL6, CRP und Zeitraum der Dialysepflicht) tragen nicht zu einer Verbesserung des Modells bei.

	$\beta$	SE	Wald-Test	p-Wert	Exp( $\beta$ )
<b>PTX3</b>	0,21	0,05	17,9	0,0001	1,24
<b>Alter</b>	0,05	0,02	10,8	0,001	1,06
<b>IL-6</b>					0,25
<b>CRP</b>					0,36
<b>Zeitraum Dialysepflicht</b>					0,85

Tabelle 15: Ergebnis der Multivarianzanalyse nach dem Cox-Regressionsmodell  
Einschlussmethode = Likelihood.

$\beta$  = Regressionskoeffizient, SE=Standardfehler von  $\beta$ ,

Exp( $\beta$ ) = relativer Hazard (Hazard Ratio)

Nur PTX3 und Alter sind unabhängige Prädiktoren für die Mortalität bei HD-Patienten.

## **4. Diskussion**

### **4.1. Diskussion der Methodik**

Im Gegensatz zu CRP stellt PTX3 (noch) keinen etablierten Entzündungsmarker dar, weshalb für die Bestimmung von PTX3-Plasmaspiegeln auch noch kein standardisiertes Verfahren zur Verfügung steht.

Für die Vergleichbarkeit von Studienergebnissen wäre eine Standardisierung der PTX3-Bestimmung jedoch erforderlich, da sonst viele Fehlerquellen und Einflussfaktoren die Ergebnisse verzerren können.

Schon die Art des verwendeten Antikoagulanz hat eine Bedeutung bei der PTX3-Bestimmung. In Heparin- und Citrat-Plasma sowie in Serum ohne zugesetztes Antikoagulanz kann kein bzw. können nur geringe Mengen an PTX3 nachgewiesen werden [66]. PTX3 lässt sich nur in EDTA-Plasma nachweisen.

Die bestimmte PTX3-Konzentration ist abhängig von der Höhe der EDTA-Konzentration. Die höchsten PTX3-Konzentration werden in einem Bereich zwischen 1 und 2 mg/ml EDTA gemessen. In herkömmlichen Blutabnahmesystemen liegt die EDTA-Konzentration bei 1,6 mg/ml, also im optimalen Bereich für die PTX3-Bestimmung. Dabei sind die Röhrchen mit einer definierten Menge EDTA beschichtet, sodass auch eine genau definierte Blutmenge notwendig ist, um eine EDTA-Konzentration von 1,6 mg/ml zu erreichen. Weicht die Füllmenge jedoch von dem notwendigen Volumen ab, so resultiert eine EDTA-Konzentration, die von 1,6 mg/ml abweicht. Dies kann bei der PTX3-Bestimmung zu falsch niedrigen Werten führen.

Auch die Temperatur, bei der die Proben bis zur weiteren Untersuchung gelagert werden, hat einen Einfluss auf die letztendlich gemessene PTX3-Konzentration: bei einer Lagerungstemperaturen von  $-80^{\circ}$  Celsius werden niedrigere PTX3-Spiegel bestimmt, als bei einer Lagerungstemperatur von  $-20^{\circ}$  Celsius.

Taut man die Proben bis zu sechs Mal auf, erhöht sich die bestimmte PTX3-Konzentration, während nach elfmaligem Auftauen wieder niedrigere Konzentrationen gemessen werden. Hier wirft sich die Frage auf, aus welchem Grund mehrmaliges Auftauen bis zu einer gewissen Anzahl zur Bestimmung einer jeweils höheren PTX3-Konzentration führt. Da es sich bei den Proben um Blutplasma handelt, also keine zellulären Bestandteile mehr enthalten sind, kann während des Auftauens keine Neusynthese von PTX3 stattfinden. Eventuell werden Bindungen zwischen PTX3 und bestimmten Trägerproteinen oder anderen Stoffen durch das Auftauen gelöst, und die Bindungsstelle für den Antikörper an PTX3 so zugänglich, während sie vorher durch die Bindungen maskiert wurde. So könnte nach fünfmaligem Auftauen das gesamte PTX3 frei gelöst sein und damit die maximale Konzentration erklären. Bei weiterem Auftauen kommt es dann zu einem Zerfall oder Abbau des Proteins und es resultiert ein Abfall in der Konzentrationsbestimmung.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die genaue Darstellung der methodischen Vorgehensweise sehr wichtig ist. So wird zwar die PTX3-Messung mittels ELISA immer detailliert beschrieben, genaue Angaben zu den Abnahmesystemen fehlen jedoch häufig [62]. Auch die Aufbewahrungstemperatur wird unterschiedlich gehandhabt: Plasmaproben werden sowohl bei  $-80^{\circ}$  [73] als auch bei  $-20^{\circ}$  bis zur weiteren Analyse gelagert [63].

So können vermeintlich statistisch relevante Zusammenhänge entstehen, die letztendlich auf methodischen Fehlern beruhen. Deshalb ist eine Vereinheitlichung der Abläufe zur Bestimmung der PTX3-Konzentration von der Blutabnahme über die Lagerung bis zur Analyse mit dem ELISA in Zukunft unabdingbar, um tatsächliche statistische Assoziationen aufzudecken, und um Ergebnisse besser reproduzieren und auch vergleichen zu können.

In der Literatur sind Untersuchungen zu solchen methodischen Fragestellungen bezüglich der PTX3-Bestimmung bisher nicht veröffentlicht worden.

## **4.2. Pentraxine, kardiovaskuläre Morbidität und Erythropoietin-Resistenz bei Hämodialysepatienten**

Der etablierte Entzündungsmarker CRP stellt mittlerweile einen anerkannten Risikofaktor für die Entstehung von Arteriosklerose dar.

Ridker et al. wiesen mit ihren Untersuchungen ein erhöhtes Risiko für das Auftreten eines Herzinfarkts, Schlaganfalls und venöser Thrombose bei CRP-Werten im oberen Grenzbereich bei gesunden Männern nach [19]. Ein hochnormales CRP ist mit einem höheren Risiko für das Auftreten solcher Ereignisse assoziiert. Auch bei postmenopausalen Frauen ist CRP ein starker Prädiktor für das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse [20]. In dieser Studie von 28263 Teilnehmer stellte sich neben CRP auch IL-6 als Risikofaktor für später auftretende kardiovaskuläre Ereignisse dar. Ridker et al. untersuchte weiterhin den Zusammenhang von CRP und paVK bei gesunden Männern. Dabei wiesen diejenigen, die später eine paVK entwickelten, höhere CRP-Werte auf als solche, die keine paVK in der Zukunft entwickelten [21]. Haverkate et al. untersuchten den Aussagewert von CRP bei stabiler und instabiler Angina pectoris. Dabei war erhöhtes CRP mit einem höheren Risiko für das spätere Auftreten eines koronaren Ereignisses assoziiert [22].

Einen ersten klinischen Ansatz hinsichtlich hochnormaler CRP-Werte stellen die kürzlich veröffentlichten Ergebnisse der JUPITER-Studie [27] dar: Hier wurden 1780 gesunde Männer und Frauen mit normalen LDL-Cholesterin-Werten ( $<130\text{mg/dl}$ ) und hochnormalen CRP-Werten ( $\geq 2\text{mg/l}$ ) placebokontrolliert mit 20 mg Rosuvastatin täglich behandelt und im Mittel 1,9 Jahre lang beobachtet. In der Rosuvastatin-Gruppe traten signifikant weniger kardiovaskuläre Ereignisse (akuter Myokardinfarkt, Schlaganfall, instabile Angina pectoris oder Tod durch kardiovaskuläres Ereignis) auf, als in der Placebo-Gruppe. CRP wurde im Durchschnitt um 37% gesenkt. Die „number needed to treat“ beläuft sich auf 25.

Untersuchungen hinsichtlich PTX3 umfassen dagegen vor allem dessen physiologische bzw. pathophysiologische Funktion; Studien im klinischen Zusammenhang existieren bisher nur spärlich.

Boehme et al. wiesen bei Dialysepatienten eine Korrelation zwischen PTX3 und dem Zeitraum der Nierenersatztherapie sowie der EPO-Dosis nach [66].

Die eigenen Untersuchungen von 155 HD-Patienten konnten eine Korrelation von PTX3 mit dem Zeitraum der Dialyse bestätigen ( $p=0,047$ ).

Je länger ein Patient also dialysiert wird, desto höher das PTX3. Dies könnte Ausdruck dafür sein, dass durch die Hämodialyse zum Beispiel durch die Verwendung bioinkompatibler Membranen immunologische Prozesse in Gang gesetzt werden, die eine Erhöhung entzündlicher Mediatoren nach sich ziehen und somit einen entzündlichen Vorgang im Körper unterhalten und vorantreiben.

PTX3 korreliert negativ mit der verbleibenden Restdiurese ( $p=0,008$ ). Nimmt also die Restharnausscheidung ab, steigt PTX3 an. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Niere an der Elimination von PTX3 beteiligt ist, nicht durch glomeruläre Filtration, da diese durch die Hämodialyse imitiert wird, sondern eventuell durch aktive Sekretion oder Verstoffwechslung von PTX3. Die Niere könnte andererseits im Falle ihrer Schädigung zu einem Bildungsort von PTX3 werden.

Die Ergebnisse von Tong et al. ergeben eine negative Korrelation der GFR mit PTX3: PTX3 steigt an, sobald die glomeruläre Filtration abfällt [73].

PTX3 korreliert positiv mit CRP ( $p=0,005$ ) und IL-6 ( $p=0,007$ ). Ein Ausdruck dafür, wie komplex das Zusammenspiel immunologischer Vorgänge ist, und dass alle drei Mediatoren an der Aufrechterhaltung der chronischen Mikroinflammation bei CKD-Patienten beteiligt sind.

In anderen Studien konnte dagegen keine Korrelation von PTX3 mit CRP oder IL-6 nachgewiesen werden [62, 63, 66].

Sowohl PTX3 ( $p=0,002$ ), als auch CRP ( $p=0,0001$ ) als auch IL-6 ( $p=0,001$ ) korrelieren positiv mit dem Alter der HD-Patienten. Die PTX3-Plasmakonzentration steigt also mit zunehmendem Alter an. Aber auch mit dem Alter bei Dialysebeginn konnte eine positive Korrelation für alle drei inflammatorischen Marker (PTX3:  $p=0,025$ , CRP:  $p=0,0001$ , IL-6:  $p=0,005$ ) nachgewiesen werden. Gibt es eine Potenzierung des Risikos beim Zusammentreffen mehrerer Faktoren wie hohes Alter und Dialysepflichtigkeit?



Im Gegensatz zu PTX3 korreliert das Zytokin IL-6 relativ stark mit der wöchentlichen EPO-Dosis ( $p=0,02$ ) und mit der wöchentlichen Fe-Dosis ( $p=0,003$ ). Bei den Ergebnissen von Sood et al. wurde ein Zusammenhang zwischen dem Eisengehalt im Blut (anhand von Ferritin und der Transferrinsättigung) und oxidativem Stress (anhand von Malondialdehyde, Hexanal und Nonenal) bei HD-Patienten nachgewiesen [74]. So könnte die intravenöse Eisentherapie bei HD-Patienten und ein hoher Eisengehalt im Blut zu vermehrtem oxidativen Stress führen. Oxidativer Stress hat eine proinflammatorische Wirkung und könnte die Produktion von Zytokinen wie IL-6 induzieren. Die eigenen Ergebnisse untermauern durch die positive Korrelation von IL-6 mit der wöchentlichen Eisen-Dosis diese Hypothese. Die intravenöse Eisen-Applikation führt über oxidativen Stress auch zu endothelialer Dysfunktion, sie kann inflammatorische Prozesse bis hin zur Arteriosklerose in Gang setzen und könnte damit einen weiteren ursächlichen Faktor für die chronische Mikroinflammation bei HD-Patienten darstellen [75].

Mit Parametern des Fettstoffwechsels korreliert keiner der untersuchten inflammatorischen Marker.

Boehme et al. konnten eine Assoziation von PTX3 mit Arteriosklerose bei Dialysepatienten nachweisen [66]. So fanden sich bei HD- und Peritonealdialyse-Patienten mit KHK oder paVK höhere PTX3-Werte als bei solchen Patienten, die nicht an diesen arteriosklerotisch bedingten Erkrankungen leiden.

Die eigene Untersuchung von 155 HD-Patienten kommt zum gleichen Ergebnis: Hohe PTX3-Werte sind signifikant mit dem Auftreten von arteriosklerotisch bedingten Erkrankungen wie KHK ( $p=0,038$ ) und paVK ( $p=0,039$ ) assoziiert.

Im Gegensatz zu PTX3 war CRP nicht mit KHK ( $p=0,059$ ) und paVK ( $p=0,22$ ) assoziiert. Stellt PTX3 vielleicht einen aussagekräftigeren Prädiktor für Arteriosklerose als CRP bei CKD-Patienten dar?

Auch Tong et al. wiesen bei CKD-Patienten eine Assoziation von PTX3 mit CVD nach ( $p<0,001$ ) [73]. Hier wurden insgesamt 347 Patienten untersucht, davon 71 im Stadium 3 oder 4 und 276 im Stadium 5 der chronischen Niereninsuffizienz.

Das Zytokin IL-6 weist eine deutlich signifikante Assoziation mit KHK ( $p=0,007$ ) und paVK ( $p=0,01$ ) auf: höhere IL-6-Plasmaspiegel liegen bei solchen HD-Patienten vor, die an einer paVK oder KHK leiden, als bei solchen, die nicht an KHK oder paVK leiden.

Peri et al. haben Untersuchungen zur Rolle von PTX3 im Vergleich mit CRP bei akutem Myokardinfarkt durchgeführt [63]. Es wurden 37 Patienten mit akutem Myokardinfarkt untersucht, bei denen sich eine deutliche Erhöhung des PTX3-Spiegels auf Werte von  $6,94 \pm 11,26$  ng/ml mit einem Höchstwert 7,5 Stunden nach Klinikaufnahme zeigte.

Bei dieser Untersuchung wurden hohe interindividuelle Unterschiede hinsichtlich der PTX3-Plasmaspiegel dokumentiert, was auch für CRP schon in anderen Veröffentlichungen beschrieben wird [76]. Diese Unterschiede ließen sich mit keinem klinischen Parameter wie zum Beispiel Zeit seit Symptombeginn, der Ausbreitung des Infarktgebietes, dem Zeitpunkt des Creatininkinase-Höchstwertes, der Tatsache eines Myokardinfarkts in der Vorgeschichte oder der Killip-class-Einteilung bei Aufnahme in Zusammenhang bringen. Lediglich Patienten höheren Alters, also über 64 Jahre, zeigten höhere PTX3-Werte als jüngere Patienten. Die Behandlung im Sinne einer Thrombolyse oder Aspiringabe hat die PTX3-Spiegel nicht beeinflusst. Die Arbeitsgruppe untersuchte weiterhin Kardiomyozyten auf ihren PTX3-Gehalt und konnte in nekrotischen Zellen kein PTX3 nachweisen. Im Gegensatz dazu lässt sich CRP auch in nekrotischen Zellregionen gleichzeitig mit den Komplementkomponenten C3 und C4 nachweisen, jedoch nicht im gesunden Myokard, wo sich wiederum PTX3 nachweisen lässt. Weiterhin wurde mit Patienten verglichen, die wegen instabiler Angina pectoris ( $N=26$ ) oder nicht ischämisch bedingtem Herzversagen ( $N=29$ ) in die Klinik aufgenommen wurden. Bei den 26 Angina pectoris-Patienten betrug der durchschnittliche PTX3-Spiegel  $2,38 \pm 2,35$  ng/ml, wobei nur 12 Patienten erhöhte, also über dem Normwert von 2,01 ng/ml liegende PTX3-Plasmaspiegel aufwiesen. Von den 29 Patienten mit Herzversagen mit einem durchschnittlichen PTX3-Spiegel von  $1,78 \pm 0,93$  ng/ml zeigten 12 Patienten Werte über 2,01 ng/ml. Der durchschnittliche PTX3-Wert von gesunden Individuen ohne kardiovaskuläre Ereignisse in der Vorgeschichte lag bei  $0,99 \pm 0,51$  ng/ml. So findet man also auch bei anderen Herzkreislauferkrankungen durchschnittlich höhere PTX3-Werte als bei gesunden Individuen.

Im Gegensatz zu CRP wird PTX3 lokal gebildet. Da PTX3 in der Lage ist, C1q zu binden, und die Aktivierung des klassischen Komplementweges eine Amplifizierung der Gewebeerstörung bedeutet, stellt PTX3 möglicherweise einen Mediator dar, der bei akutem Myokardinfarkt von untergehenden Myozyten freigesetzt wird und so zur Auflösung des infarzierten Gebietes beiträgt [63].

Weitere Untersuchungen zu PTX3 im klinischen Zusammenhang wurden von Muller et al. bei Patienten mit Sepsis, SIRS und septischen Schock durchgeführt. Hierbei korrelierte die Höhe der PTX3-Plasmaspiegel mit dem Schweregrad der Erkrankung. Im Vergleich zur Norm (Durchschnittswert von 25 gesunden Individuen lag bei 1,04 +/- 0,09 ng/ml) fanden sich bei allen eingeschlossenen Patienten (N=101) erhöhte PTX3-Plasmaspiegel [62].

Der Verschluss des vaskulären Zugangs bei HD-Patienten durch Thrombose, was mit einer Intima-Hyperplasie assoziiert ist, stellt ein sehr häufiges Problem bei HD-Patienten dar. Chou et al. konnten in ihren Untersuchungen zeigen, dass hohe CRP-Werte (>8mg/l) das Auftreten einer Thrombose in der AVF begünstigen [77]. Bei den eigenen Untersuchungen konnte dagegen kein Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer solchen Thrombose und der Höhe der untersuchten inflammatorischen Marker nachgewiesen werden (die Ergebnisse sind nicht abgebildet).

Die Forschungen von Movilli et al. [12] ergaben signifikante Höhenunterschiede der CRP-Plasmaspiegel bei verschiedenen Zugängen zur Hämodialyse. Dabei fanden sich bei HD-Patienten mit getunnelten Permanentkathetern signifikant höhere CRP-Plasmaspiegel als bei Patienten mit AVG, bei denen wiederum signifikant höhere Werte als bei Patienten mit AVF zu verzeichnen waren. Auch die EPO-Dosis unterschied sich signifikant zwischen den Gruppen mit verschiedenen Zugängen. Sie nahm in gleicher Reihenfolge wie die CRP-Plasmawerte ab.

Die eigenen Ergebnisse können Unterschiede bei verschiedenen vaskulären Zugängen in der Plasmakonzentration der untersuchten inflammatorischen Marker nicht mit Signifikanz bestätigen. PTX3 und auch CRP zeigten allerdings eine Tendenz von höheren Plasmaspiegeln bei HD-Patienten mit einem VH-Katheter als bei solchen mit AVG und AVF. IL-6 differierte nicht hinsichtlich AVG, AVF oder VH-Katheter.

In der vorliegenden Untersuchung war bei den HD-Patienten mit höheren IL-6-Plasmawerten eine höhere EPO-Dosis notwendig. Diese Beziehung ist mit einem p-Wert von 0,04 signifikant. Für CRP ergibt sich ein Trend in diese Richtung, der jedoch das statistische Signifikanzniveau nicht erreicht. Auch die PTX3-Plasmaspiegel waren bei einer wöchentlich applizierten EPO-Dosis >6000 IE höher als bei einer wöchentlich applizierten EPO-Dosis ≤6000 IE. Dieser Zusammenhang ist allerdings statistisch nicht signifikant.

Locatelli et al. konnten nachweisen, dass bei HD-Patienten die EPO-Dosis mit Malnutrition und Entzündung assoziiert ist [14]. Hier wurden 677 HD-Patienten anhand der wöchentlichen EPO-Dosis in vier Gruppen eingeteilt: eine ohne EPO-Therapie, eine mit niedriger, eine mit normaler und eine mit hoher wöchentlicher EPO-Dosis. In der Gruppe mit hoher wöchentlicher EPO-Dosis ließen sich einerseits erniedrigte Albumin- und BMI-Werte und andererseits erhöhte CRP-Werte im Vergleich zu allen anderen Gruppen nachweisen.

Barany et al. fanden eine Assoziation von CRP und der EPO-Dosis: Von 30 HD-Patienten benötigten Patienten mit höheren CRP-Plasmaspiegeln höhere wöchentliche EPO-Dosen, um einen Hb von 12 g/dl zu erreichen, als Patienten mit niedrigeren CRP-Plasmaspiegeln [78].

IL-6 stellt in Bezug auf die untersuchten Merkmale den Marker mit der höchsten Aussagekraft hinsichtlich der statistischen Signifikanz dar. Dieses Zytokin spielt vielleicht in der Pathophysiologie der Arteriosklerose-Entstehung eine initiiierende Rolle und steht in der Kaskade der Entzündungsreaktionen weit oben, woraufhin dann andere entzündliche Prozesse, und mit diesen weitere entzündliche Marker folgen.

Die Rolle von PTX3 muss weiterhin aufgeklärt und vor allem in klinischen Studien mit größeren Patientenzahlen erforscht werden. Eine Beteiligung am komplexen Zusammenspiel bei der Entstehung der Arteriosklerose ist durch die bisher veröffentlichten Ergebnisse nicht abzustreiten und weitere Untersuchungen sollten klären, ob PTX3 nicht eine prognostische Bedeutung zukommt.

### **4.3. Pentraxine und Mortalität bei Hämodialysepatienten**

Bei den 155 HD-Patienten ergibt sich nach einem Beobachtungszeitraum von 25 Monaten beginnend Anfang August 2006 und endend Ende August 2008 eine Assoziation von PTX3 mit der Mortalität. Dieser Zusammenhang ist mit einem P-Wert von 0,0001 sehr signifikant.

Auch Patienten mit hohen IL-6-Werten überleben signifikant kürzer als solche mit niedrigeren IL-6-Plasmaspiegeln ( $p=0,01$ ).

CRP zeigt dagegen keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen der Höhe der Plasmaspiegel und der Mortalität von HD-Patienten ( $p=0,21$ ). Allerdings starben HD-Patienten mit höheren CRP-Werten tendenziell früher, als solche mit niedrigeren Werten.

Es wurden mittlerweile Ergebnisse veröffentlicht, die darauf hinweisen, dass CRP teilweise eine paradoxe Rolle bei der Arterioskleroseentstehung spielen kann. So veröffentlichte Schwedler et al. Untersuchungen, die zeigten, dass CRP in seiner monomeren Form Arteriosklerose in Apolipoprotein E-Knockout Mäusen reduzieren konnte [79].

Die vorgestellten Ergebnisse von Tong et al. [73] beziehen sich auf PTX3 bei Patienten mit CKD im Stadium 3-5. Bei Patienten im Stadium 5 fand diese Arbeitsgruppe die höchsten PTX3-Werte im Vergleich zu CKD-Patienten im Stadium 3,4 und Gesunden. Patienten mit PTX3-Werten in der höchsten Tertile wiesen das schlechteste 5-Jahres-Überleben auf. Die Patienten wurden bei dieser Studie in einem Zeitraum von 60 Monaten beobachtet. PTX3 hatte hinsichtlich der Mortalität einen gleich starken prädiktiven Wert wie IL-6. Sowohl PTX3 als auch IL-6 waren in ihrer Aussagekraft CRP überlegen.

Klinische Untersuchungen zum Verhalten von PTX3 in bestimmten Krankheitsfällen, insbesondere hinsichtlich einer Assoziation von Mortalität und der Höhe der PTX3-Plasmaspiegel existieren bisher in der Literatur nur sehr spärlich.

Latini et al. untersuchten in einer größeren Patientenpopulation mit 724 Teilnehmern den Zusammenhang zwischen Mortalität und Höhe der PTX3-Plasmaspiegel nach

Myokardinfarkt. Hier wurde ein ähnlicher Sachverhalt dokumentiert: die höchste Tertile der PTX3-Plasmaspiegel war mit einer höheren Mortalität assoziiert. Der Beobachtungszeitraum umfasste jedoch lediglich drei Monate. Gleichzeitig bestimmte CRP-Werte hatten hinsichtlich der Mortalität keine Aussagekraft [64].

Auch die Ergebnisse von Müller et al. zeigen bei 101 Intensivstationspatienten mit SIRS, Sepsis oder septischen Schock eine statistisch signifikante Assoziation der PTX3- Werte sowie IL-6-Werte mit der Mortalität [62]. Diese Assoziation blieb jedoch nicht bestehen, wenn Faktoren zur Beurteilung der Schwere der Erkrankung gleichzeitig in die Analyse mit einbezogen wurden.

So weisen all diese Untersuchungen im Einklang mit den eigenen Ergebnissen auf negative Einflüsse von PTX3 hinsichtlich der Mortalität hin.

Der etablierte Entzündungsmarker CRP ist hinreichend hinsichtlich seiner Assoziation mit der Mortalität untersucht worden. Auch das Zytokin IL-6, als der Hauptstimulator von CRP in der Akuten-Phase-Antwort, wurde in diesem Zusammenhang erforscht.

Honda et al. beobachteten in einem Zeitraum von 26 Monaten 176 Patienten mit terminalem Nierenversagen. Beobachtungsbeginn war der Zeitpunkt des Dialysebeginns. Dabei prädestinierten hohe IL-6 Werte zu Mortalität, jedoch nicht erhöhtes CRP [7]. IL-6 ist schon bei Patienten, die noch nicht dialysepflichtig sind, jedoch an chronischer Niereninsuffizienz leiden, erhöht [13, 80]. Auch bei Patienten mit dialysepflichtiger Niereninsuffizienz finden sich erhöhte IL-6-Werte im Vergleich zu gesunden Individuen [81, 82].

Sogar in der gesunden, älteren Population sind hohe IL-6 Werte mit einer erhöhten Mortalität assoziiert [83]. Dabei war die höchste Quartile von IL-6 mit einem zweifach höheren relativen Sterberisiko assoziiert. In dieser Untersuchung von 1293 über 65jährigen Personen ohne sonstige Erkrankungen wurde auch CRP untersucht. Dabei ergab sich eine nochmalige Erhöhung des relativen Todesrisikos, wenn sowohl IL-6 als auch CRP erhöht waren.

IL-6 ist ein Zytokin, das von Monozyten, Makrophagen, Endothelzellen und Fibroblasten gebildet werden kann, als Antwort auf  $\text{TNF}\alpha$ -Stimulation,  $\text{IL-1}\beta$ , durch Endotoxine sowie oxidativen Stress und körperliche Bewegung. Gründe für die Erhöhung von IL-6 bei chronischer Niereninsuffizienz sind vielfältig: der Nierenfunktionsverlust, die Urämie per se (und ihre Folgeerscheinungen wie Flüssigkeitsüberladung, oxidativer Stress und erhöhte Infektanfälligkeit) sowie Faktoren, die mit der Dialyse direkt zusammenhängen, wie Verunreinigungen des Dialysats, Kontakt mit Dialysemembranen [84].

Rao et al. untersuchten bei 206 HD-Patienten den Zusammenhang zwischen IL-6 und der Mortalität [85]. Bei HD-Patienten, die zusätzlich an vaskulären Erkrankungen litten und bei solchen mit einer höheren Anzahl an Nebenerkrankungen zeigte sich ein erhöhter IL-6-Plasmaspiegel im Vergleich zu HD-Patienten ohne vaskuläre Erkrankungen bzw. mit einem niedrigeren Komorbiditätslevel. In der höchsten IL-6 Quartile zeichnete sich ein signifikant kürzeres Überleben ab, als in der niedrigsten IL-6 Quartile (durchschnittlich 1200 gegenüber 800 Tagen).

In den Untersuchungen von Menon et al. von 697 Teilnehmer der MDRD-Studie (The Modification of Diet in Renal Disease [86]) mit vor allem nichtdiabetischer Nierenerkrankung und eingeschränkter GFR waren neben erhöhtem CRP auch ein erniedrigtes Albumin Prädiktor für die Gesamtmortalität [87]. Dabei starben während eines mittleren Beobachtungszeitraum von 125 Monaten 20% der Patienten, wobei die Herzkreislaufmortalität 50% ausmachte. Im Gegensatz zur Gesamtmortalität war erniedrigtes Albumin kein Prädiktor für Herz-Kreislaufmorbidity, hier behielt nur CRP seinen prädiktorischen Wert.

Auch Fernández-Reyes et al. fanden in ihrer Untersuchung von 64 HD-Patienten und einem Beobachtungszeitraum von zwei Jahren CRP als unabhängigen Prädiktor der Mortalität [88]. Neben anderen Faktoren stellte sich auch die Anzahl der Nebenerkrankungen als ein unabhängiger Vorhersager der Mortalität heraus.

CRP verhält sich in seiner Vorhersagekraft jedoch nicht immer gleichwertig. Böger et al. veröffentlichten Resultate hinsichtlich des Zusammenhangs von CRP und Mortalität bei 445 HD-Patienten mit Diabetes in Abhängigkeit einer vorhandenen paVK und des Stadiums der paVK [89]. Dabei ergab sich für erhöhtes CRP nur eine signifikante Assoziation mit der Gesamtmortalität sowie Herz-Kreislaufmortalität, wenn ein Stadium einer paVK Fontaine IV vorlag. In niedrigeren Stadien der paVK war CRP nicht mit der Mortalität assoziiert.

Ein interessantes Ergebnis veröffentlichten Qureshi et al.: Hier wurden das Zusammenspiel von Inflammation (anhand erhöhten CRPs), Malnutrition (erniedrigtes Albumin) und kardiovaskulärer Erkrankung bei 128 HD-Patienten in einem follow-up von drei Jahren untersucht [90]. Wenn weder Malnutrition, Inflammation noch CVD vorlagen, war die Mortalität 0% innerhalb der drei Jahre. Lagen dagegen alle drei dieser Risikofaktoren vor, betrug die Mortalität 75%. Dies unterstreicht nochmals eindrucksvoll, dass bei HD-Patienten nicht ein Faktor allein, wie zum Beispiel die chronische Entzündung für die erhöhte Mortalität verantwortlich ist, sondern mehrere Faktoren, wie das gleichzeitige Vorliegen eines erniedrigten Serum-Albumins oder das Vorhandensein einer CVD, sich gegenseitig potenzieren und so die Mortalität enorm steigern.

Tripepi et al. verglichen verschiedene Entzündungsmarker und Zytokine hinsichtlich der Stärke des prädiktorischen Wertes der Mortalität [91]. Dabei waren CRP und IL-6 die stärksten Prädiktoren gegenüber  $\text{TNF}\alpha$ , IL-1 $\beta$  und VCAM1. IL-6 hatte des weiteren gegenüber CRP hinsichtlich der kardiovaskulären Mortalität eine doppelt stärkere Aussagekraft.  $\text{TNF}\alpha$ , IL-1 $\beta$  und VCAM1 hingegen zeigten in dieser Untersuchung von 217 HD-Patienten mit einem follow-up von bis zu 70 Monaten gar keine Aussagekraft bezüglich der Mortalität.

Auch Zoccali et al. untersuchten die Aussagekraft von CRP hinsichtlich der Mortalität beim Vorliegen erhöhter anderer Zytokine wie IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18 und  $\text{TNF}\alpha$ . Das relative Risiko für Tod steigerte sich mit zunehmender Anzahl gleichzeitig erhöhter Zytokine [92]. In den vielen vorliegenden Studienergebnissen wird übereinstimmend eine Assoziation von CRP mit der Mortalität postuliert. So veröffentlichten auch Zimmermann et al. [9], Selim et al. [93] und Racki et al. [94] vergleichbare



Ergebnisse, die alle die Rolle von CRP als Risikofaktor für sowohl erhöhte Gesamtmortalität, als auch insbesondere erhöhte Herzkreislaufmortalität unterstreichen.

Die eigenen Untersuchungen ergaben eine signifikante Assoziation von PTX3 mit der Mortalität bei HD-Patienten, die sogar das Signifikanzniveau von IL-6 übersteigt. Der prädiktorische Wert von PTX3 hinsichtlich der Mortalität ist in der Multivarianzanalyse unabhängig von Alter, Zeitraum seit Dialysebeginn, IL-6 und CRP. Damit könnte PTX3 bei HD-Patienten einen aussagekräftigeren Prädiktor für die Mortalität darstellen, als andere inflammatorische Marker wie CRP und IL-6. Weitere Untersuchungen gerade im klinischen Zusammenhang müssen deshalb in Zukunft folgen, um die Rolle und Aussagekraft von PTX3 weiter aufzuklären.

## **5. Zusammenfassung**

Pentraxine sind eine Gruppe evolutionär hoch konservierter Proteine in Pentamerform, die eine Schlüsselrolle in der angeborenen Immunität und inflammatorischen Prozessen spielen. Während für den klassischen Vertreter der Pentraxine, das kurze Pentraxin C-reaktives Protein (CRP) eine Assoziation mit kardiovaskulären Erkrankungen hinreichend belegt ist, liegen für das Anfang der 1990er Jahre entdeckte lange Pentraxin 3 (PTX3) nur wenige Daten vor.

In der vorliegenden Arbeit wurde im Hauptteil die Assoziation von PTX3 mit kardiovaskulärer Morbidität und Mortalität bei Hämodialyse -(HD-)Patienten untersucht. Ein kleiner methodischer Teil befasst sich mit der Frage, welchen Einfluss verschiedene Faktoren bei der Bestimmung von PTX3 auf die gemessene PTX3-Konzentration haben.

Von 155 HD-Patienten wurde in einer Querschnittsstudie nach dem langen dialysefreien Intervall Blut in EDTA-Röhrchen gewonnen. Im Plasma wurden PTX3 und Interleukin-6 (IL-6) mittels ELISA bestimmt, CRP wurde turbimetrisch gemessen. Demographische und klinische Daten wie Komorbiditäten (Koronare Herzkrankheit, KHK, und periphere arterielle Verschlusskrankheit, paVK), Alter, Zeitraum der Dialysepflicht, Restdiurese sowie Erythropoietin-Dosis wurden von den Patienten erhoben. Die Patienten wurden über einen Zeitraum von 25 Monaten beobachtet und Todesfälle sowie Todeszeitpunkte registriert.

Es zeigte sich eine deutliche Abhängigkeit der gemessenen PTX3-Konzentration von der EDTA-Konzentration im Blutabnahmesystem, der Lagertemperatur und der Auftauanzahl der Plasmaproben.

Bei 155 HD-Patienten fand sich PTX3 signifikant höher bei Patienten mit KHK als bei solchen ohne KHK (3,13 ng/ml gegenüber 1,96 ng/ml,  $p=0,038$ ). Ebenso war PTX3 höher bei Patienten mit paVK als solchen Patienten ohne paVK (2,93 ng/ml gegenüber 2,18 ng/ml,  $p=0,039$ ). PTX3 korreliert signifikant mit CRP ( $p=0,005$ ) und

IL-6 ( $p=0,007$ ). Außerdem korreliert PTX3 signifikant positiv mit dem Alter der Patienten ( $p=0,002$ ), dem Alter bei Dialysebeginn ( $p=0,025$ ) und dem Zeitraum der Dialysepflicht ( $p=0,047$ ). PTX3 korreliert signifikant negativ mit der Restdiurese ( $p=0,008$ ).

20% der HD-Patienten ( $N=31$ ) starben während der 25 Monate Beobachtungszeit. 50% der gestorbenen Patienten wiesen PTX3-Werte in der höchsten Quartile auf. Die PTX3-Plasmaspiegel waren signifikant mit der Mortalität ( $p=0,0001$ ) bei HD-Patienten assoziiert. Diese Assoziation ist unabhängig von Alter, Zeitraum der Dialysepflicht, CRP und IL-6. Auch IL-6 war signifikant mit der Mortalität assoziiert ( $p=0,01$ ), während für CRP nur eine schwache, nicht signifikante Assoziation mit der Mortalität nachgewiesen wurde.

Bei HD-Patienten ist PTX3 mit KHK und paVK assoziiert. PTX3 stellt einen unabhängigen Prädiktor für die Mortalität bei HD-Patienten dar und scheint in seiner Aussagekraft CRP und IL-6 überlegen zu sein.

## **6. Literatur**

1. Gerd Herold: **Innere Medizin** 2006; 551.
2. National Kidney Foundation. **K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification.** Am J Kidney Dis 2002;39(2 suppl 1):S1-266.
3. Levey AS, Andreoli SP, DuBose T, et al. **Chronic Kidney Disease: Common, Harmful, and Treatable – World Kidney Day 2007.** J Am Soc Nephrol 2007;18:374-378.
4. Arici M and Walls J. **End-stage renal disease, atherosclerosis, and cardiovascular mortality: Is C-reactive protein the missing link?** Kidney International 2001;59:407-414.
5. Stenvinkel P, Pecoits-Filho R and Lindholm B. **Coronary Artery Disease in End-Stage Renal Disease: No Longer a Simple Plumbing Problem.** J Am Soc Nephrol 2003;14:1927-1939.
6. Stenvinkel P. **Inflammation in end-stage renal disease: The hidden enemy.** Nephrology 2006;11:36-41.
7. Honda H, Qureshi AR, Heimbürger O, et al. **Serum albumin, C-reactive protein, interleukin 6, and fetuin a as predictors of malnutrition, cardiovascular disease, and mortality in patients with ESRD.** Am J Kidney Dis 2006;47(1):139-148.
8. Kaysen GA and Eiserich JP. **Characteristics and Effects of Inflammation in End-Stage Renal Disease.** Seminars in Dialysis – Vol 16, No 6 (November–December) 2003 pp. 438-446.
9. Zimmermann J, Herrlinger S, Pruy A, Metzger T and Wanner C. **Inflammation enhances cardiovascular risk and mortality in hemodialysis patients.** Kidney Int 1999;55:648-658.
10. Collins AJ, Shuling L, Ma JZ and Herzog C. **Cardiovascular disease in end-stage renal disease patients.** Am J Kidney Dis 2001;38(suppl 1):S26–S29.
11. Schindler R, Boenisch O, Fischer C, et al. **Effect of the hemodialysis membrane on the inflammatory reaction in vivo.** Clin Nephrol 2000;53(6):452-459.

12. Movilli E, Brunori G, Camerini C, et al. **The Kind of Vascular Access Influences the Baseline Inflammatory Status and Epoetin Response in Chronic Hemodialysis.** *Patients Blood Purif* 2006;24:387-393.
13. Panichi V, Migliori M, De Pietro S, et al. **C-reactive protein and interleukin-6 levels are related to renal function in predialytic chronic renal failure.** *Nephron* 2002;91(4):594-600.
14. Locatelli F, Andrulli S, Memoli B, et al. **Nutritional-inflammation status and resistance to erythropoietin therapy in haemodialysis patients.** *Nephrol Dial Transplant* 2006;21:991-998.
15. Sarnak MJ, Levey AS, Schoolwerth AC, et al. **Kidney Disease as a Risk Factor for Development of Cardiovascular Disease. A Statement From the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention.** *Circulation* 2003;108:2154 -2169.
16. Pecoits-Filho R, Lindholm B and Stenvinkel P. **The malnutrition, inflammation, and atherosclerosis (MIA) syndrome – the heart of the matter.** *Nephrol Dial Transplant* 2002;17(Suppl 11):28-31.
17. Libby P. **Inflammation and cardiovascular disease mechanisms.** *Am J Clin Nutr* 2006;83(suppl):456S-460S.
18. Heinrich J, Schulte H, Schönfeld R, et al. **Association of variables of coagulation, fibrinolysis and acute-phase with atherosclerosis in coronary and peripheral arteries and those arteries supplying the brain.** *N Engl J Med* 1994;331:417-424.
19. Ridker PM, Cushman M, et al. **Inflammation, Aspirin, and the Risk of Cardiovascular Disease in Apparently Healthy Men.** *N Engl J Med* 1997;336:973-979.
20. Ridker, PM, Hennekens, CH, Buring JE and Rifai N. **C-Reactive Protein and Other Markers of Inflammation in the Prediction of Cardiovascular Disease in Women.** *N Engl J Med* 2000;342:836-843.
21. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, et al. **Plasma Concentration of C-Reactive Protein and Risk of Developing Peripheral Vascular Disease.** *Circulation* 1998;97:425-428.

22. Haverkate F, Thompson SG, Pyke SDM, et al. **Production of C-reactive protein and risk of coronary events in stable and unstable angina.** *Lancet* 1997;349:462-466.
23. Libby P, Ridker PM and Maseri A. **Inflammation and Atherosclerosis.** *Circulation* 2002;105:1135-1143.
24. Hansson GK. **Immune Mechanisms in Atherosclerosis.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1876-1890.
25. Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, et al. **Markers of Inflammation and Cardiovascular Disease. Application to Clinical and Public Health Practice. A Statement for Healthcare Professionals From the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association.** *Circulation.* 2003;107:499-511.
26. Ridker PM. **Rosuvastatin in the Primary Prevention of Cardiovascular Disease Among Patients With Low Levels of Low-Density Lipoprotein Cholesterol and Elevated High-Sensitivity C-Reactive Protein Rationale and Design of the JUPITER Trial.** *Circulation.* 2003;108:2292-2297.
27. Ridker PM, Danielson E, Fonseca FAH, et al. **Rosuvastatin to Prevent Vascular Events in Men and Women with Elevated C-reactive Protein.** *N Engl J Med* 2008;359:2195-2207.
28. Garlanda C, Bottazzi B, Bastone A, et al. **Pentraxins at the crossroads between innate immunity, inflammation, matrix deposition, and female fertility.** *Annu Rev Immunol* 2005;23:337-366.
29. Tillett WS and Francis T Jr . **Serological reactions in pneumonia with a non protein somatic fraction of pneumococcus.** *J. Exp. Med.* 1930;52:561–585
30. Abernethy TJ and Avery OT. **The occurrence during acute infections of a protein not normally present in the blood. I. Distribution of the reactive protein in patients' sera and the effect of calcium on the flocculation reaction with C. polysaccharide of pneumococcus.** *J. Exp. Med.* 1941;73:173-182.
31. Lee GW, Goodman AR, Lee TH and Vilcek J. **Relationship of TSG-14 Protein to the Pentraxin Family of Major Acute Phase Proteins.** *The Journal of Immunology* 1994;153:3700-3707.

32. Lee TH, Lee GW, Ziff EB and Vilcek J. **Isolation and characterization of eight tumor necrosis factor-induced gene sequences from human fibroblasts.** Mol. Cell. Biol. 1990;10:1982-1988.
33. Lee GW, Lee TH and Vilcek J. **TSG-14, A Tumor Necrosis Factor- and IL-1-Inducible Protein, is a Novel Member of the Pentaxin Family of Acute Phase Proteins.** Journal of Immunology 1993;150:1804-1812.
34. Breviario F, d'Aniello EM, Golay J, et al. **Interleukin-1-inducible genes in endothelial cells. Cloning of a new gene related to C-reactive protein and serum amyloid P component.** J Biol Chem 1992;267:22190-22197.
35. Bottazzi B, Garlanda C, Salvatori G, et al. **Pentraxins as a key component of innate immunity.** Curr Opin Immunol 2006;18:10-15.
36. Bottazzi B, Vouret-Craviari V, Bastone A, et al.: **Multimer Formation and Ligand Recognition by the Long Pentraxin PTX3. Similarities and differences with the short pentraxins C-reactive protein and serum amyloid P component.** J Biol Chem 1997;272:32817-32823.
37. Noland TD, Friday BB, Maulit MT and Gerton GL. **The sperm acrosomal matrix contains a novel member of the pentaxin family of calcium-dependent binding proteins.** J. Biol. Chem. 1994;269:32607-32614.
38. Reid MS and Blobel CP. **Apexin, an acrosomal pentaxin.** J. Biol. Chem. 1994;269:32615-32620.
39. Introna M, Alles VV, Castellano M, et al. **Cloning of mouse ptx3, a new member of the pentraxin gene family expressed at extrahepatic sites.** Blood 1996;87:1862-1872.
40. Alles VV, Bottazzi B, Peri G, Golay J, Introna M and Mantovani A. **Inducible expression of PTX3, a new member of the pentraxin family, in human mononuclear phagocytes.** Blood 1994;84:3483-3493.
41. Goodman AR, Levy DE, Reis LF and Vilcek J. **Differential regulation of TSG-14 expression in murine fibroblasts and peritoneal macrophages.** J. Leukoc. Biol. 2000;67:387-395.
42. Doni A, Peri G, Chieppa M, Allavena P, Pasqualini F, et al. **Production of the soluble pattern recognition receptor PTX3 by myeloid, but not plasmacytoid, dendritic cells.** Eur. J. Immunol. 2003;33:2886-2893.

43. Baruah P, Propato A, Dumitriu IE and Rovere-Querini P. **The pattern recognition receptor PTX3 is recruited at the synapse between dying and dendritic cells, and edits the cross-presentation of self, viral, and tumor antigens.** *Blood*. 2006;107:151-158.
44. Klouche M, Peri G, Knabbe C, et al. **Modified atherogenic lipoproteins induce expression of pentraxin-3 by human vascular smooth muscle cells.** *Atherosclerosis* 2004;175:221-228.
45. Nauta AJ, De Haij S, Bottazzi B, et al. **Human renal epithelial cells produce the long pentraxin PTX3.** *Kidney International* 2005;67:543-553.
46. Han B, Mura M, Andrade CF, et al. **TNF $\alpha$ -Induced Long Pentraxin PTX3 Expression in Human Lung Epithelial Cells via JNK.** *The Journal of Immunology* 2005;175:8303-8311.
47. Abderrahim-Ferkoune A, Bezy O, Chiellini C, et al. **Characterization of the long pentraxin PTX3 as a TNF $\alpha$ -induced secreted protein of adipose cells.** *Journal of Lipid Research* 2003;44:994-1000.
48. He X, Han B and Liu M. **Long pentraxin PTX3 in pulmonary infection and acute lung injury.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007;292(5):L1039-1049.
49. Klouche M, Brockmeyer N, Knabbe C and Rose-John S. **Human herpesvirus 8-derived viral IL-6 induces PTX3 expression in Kaposi's sarcoma cells.** *AIDS* 2002;16:F9-18.
50. Polentarutti N, Picardi G, Basile A, et al. **Interferon- $\gamma$  inhibits expression of the long pentraxin PTX3 in human monocytes.** *Eur. J. Immunol*. 1998;28:496-501.
51. Garlanda C, Hirsch E, Bozza S, et al. **Non-redundant role of the long pentraxin PTX3 in antifungal innate immune response.** *Nature* 2002;420:182-186.
52. Polentarutti N, Bottazzi B, Di Santo E, et al. **Inducible expression of the long pentraxin PTX3 in the central nervous system.** *J. Neuroimmunol*. 2000;106: 87-94.
53. Salustri A, Garlanda C, Hirsch E, et al. **PTX3 plays a key role in the organization of the cumulus oophorus extracellular matrix and in in vivo fertilization.** *Development* 2004;131:1577-1586.



54. Gaziano R, Bozza S, Bellocchio S, et al. **Anti-*Aspergillus fumigatus* Efficacy of Pentraxin 3 Alone and in Combination with Antifungals.** Antimicrob Agents Chemother 2004;48(11):4414-4421.
55. Rusnati M, Camozzi M, Moroni E, et al. **Selective recognition of fibroblast growth factor-2 by the long pentraxin PTX3 inhibits angiogenesis.** Blood 2004;104:92-99.
56. Nauta AJ, Bottazzi B, Mantovani A, et al. **Biochemical and functional characterization of the interaction between pentraxin 3 and C1q.** Eur. J. Immunol. 2003;33:465-473.
57. Rovere P, Peri G, Fazzini F, et al. **The long pentraxin PTX3 binds to apoptotic cells and regulates their clearance by antigen-presenting dendritic cells.** Blood 2000;96:4300-4306.
58. Van Rossum AP, Fazzini F, Limburg PC and Manfredi AA. **The Prototypic Tissue Pentraxin PTX3, in Contrast to the Short Pentraxin Serum Amyloid P, Inhibits Phagocytosis of Late Apoptotic Neutrophils by Macrophages.** Arthritis & Rheumatism 2004;50:2667-2674.
59. Luchetti MM, Piccinini G, Mantovani A, et al. **Expression and production of the long pentraxin PTX3 in rheumatoid arthritis (RA).** Clin. Exp. Immunol. 2000;119:196-202.
60. Fazzini F, Peri G, Doni A, et al. **PTX3 in small-vessel vasculitides: an independent indicator of disease activity produced at sites of inflammation.** Arthritis Rheum. 2001;44:2841-2850.
61. Mantovani A, Garlanda C, Bottazzi B and Peri G. **The long pentraxin PTX3 in vascular pathology.** Vascular Pharmacology 2006;45:326-330.
62. Muller B, Peri G, Doni A, et al. **Circulating levels of the long pentraxin PTX3 correlate with severity of infection in critically ill patients.** Crit Care Med 2001;29:1404-1407.
63. Peri G, Introna M, Corradi D, et al. **PTX3, a prototypic long pentraxin, is an early indicator of acute myocardial infarction in man.** Circulation 2000;102:636-641.
64. Latini R, Maggioni AP, Peri G, et al. **Prognostic significance of the long pentraxin PTX3 in acute myocardial infarction.** Circulation 2004;110:2349-2354.

65. Rolph MS, Zimmer S, Bottazzi B, Garlanda C, Mantovani A and Hansson GK. **Production of the long pentraxin PTX3 in advanced atherosclerotic plaques.** *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002;22:e10-14.
66. Boehme M, Kaehne F, Kuehne A, et al. **Pentraxin 3 is elevated in haemodialysis patients and is associated with cardiovascular disease.** *Nephrol Dial Transplant* 2007;22:2224-2229.
67. Hirschfield GM and Pepys MB. **C-reactive protein and cardiovascular disease: new insights from an old molecule.** *Q J Med* 2003;96:793-807.
68. Pepys MB and Hirschfield GM. **C-reactive protein: a critical update.** *J. Clin. Invest.* 2003;111:1805-1812.
69. Gewurz H, Zhang XH and Link TF. **Structure and function of the pentraxins.** *Current Opinion in Immunology* 1995;7:54-64.
70. Pepys MB, Rowe IF and Baltz ML. **C-reactive protein: binding to lipids and lipoproteins.** *Int. Rev. Exp. Pathol.* 1985;27:83-111.
71. Gershov D, Kim S, Brot N and Elkon KB. **C-reactive protein binds to apoptotic cells, protects the cells from assembly of the terminal complement components, and sustains an antiinflammatory innate immune response: implications for systemic autoimmunity.** *J. Exp. Med.* 2000;192:1353-1363.
72. Stenvinkel P, Heimbürger O, Paulsen O, et al. **Strong association between malnutrition, inflammation and atherosclerosis in chronic renal failure.** *Kidney Int* 1999;55:1899-1911.
73. Tong M, Carrero JJ, Qureshi AR, et al. **Plasma Pentraxin 3 in Patients with Chronic Kidney Disease: Associations with Renal Function, Protein-Energy Wasting, Cardiovascular Disease, and Mortality.** *Clin J Am Soc Nephrol* 2007;2:889-897.
74. Sood MM, Oudit GY, Mohammadi H, et al. **Effects of parenteral iron on inflammation and the myocardium in hemodialysis patients.** *Hemodial Int.* 2008;12:362-368.
75. Kalkidan Bishu and Rajiv Agarwal. **Acute Injury with Intravenous Iron and Concerns Regarding Long-Term Safety.** *Clin J Am Soc Nephrol* 2006;1:S19-23.

76. Boenisch O, Ehmke KD, Heddergott A, et al. **C-reactive-protein and cytokine plasma levels in hemodialysis patients.** J NEPHROL 2002;15:547-551.
77. Chou CY, Kuo HL, Yung YF, et al. **C-reactive protein predicts vascular access thrombosis in hemodialysis patients.** Blood Purif. 2006;24(4):342-346.
78. Barany P, Divino Filho JC and Bergstrom J. **High C-reactive protein is a strong predictor of resistance to erythropoietin in hemodialysis patients.** Am J Kidney Dis. 1997;29:565-568.
79. Schwedler SB, Amann K, Wernicke K, et al.: **Native C-Reactive Protein Increases Whereas Modified C-Reactive Protein Reduces Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Knockout Mice.** Circulation. 2005;112:1016-1023.
80. Panichi V, Migliori M, De Pietro S, et al. **C reactive protein in patients with chronic renal diseases.** 2001;23:551-562.
81. Erten Y, Tulmac M, Derici U, et al. **An association between inflammatory state and left ventricular hypertrophy in hemodialysis patients.** Ren Fail. 2005;27:581-589.
82. Panichi V, Taccola D, Manca Rizza G, et al. **Ceruloplasmin and acute phase protein levels are associated with cardiovascular disease in chronic dialysis patients.** J Nephrol 2004;17:715-720.
83. Cohen HJ and Wallace R. **Associations of elevated interleukin-6 and C-reactive protein levels with mortality in the elderly.** Am J Med 1999;106:506-512.
84. Pecoits-Filho R, Lindholm B, Axelsson J and Stenvinkel P. **Update on interleukin-6 and its role in chronic renal failure.** Nephrol Dial Transplant 2003;18:1042-1045.
85. Rao M, Guo D, Perianayagam MC, et al. **Plasma interleukin-6 predicts cardiovascular mortality in hemodialysis patients.** Am J Kidney Dis. 2005 Feb;45(2):324-333.
86. Klahr S, Levey AS, Beck GJ, et al: **The effects of dietary protein restriction and blood-pressure control on the progression of chronic renal disease. Modification of Diet in Renal Disease Study Group.** N Engl J Med 1994;330:877-884

87. Menon V, Greene T, Xueleiwang, et al. **C-reactive protein and albumin as predictors of all-cause and cardiovascular mortality in chronic kidney disease.** *Kidney International* 2005;68:766-772.
88. Fernández-Reyes MJ, Álvarez-Ude F, Sánchez R, et al. **Inflammation and malnutrition as predictors of mortality in patients on hemodialysis.** *J NEPHROL* 2002;15:136-143.
89. Böger CA, Götz A, Stubanus M, et al. **C-reactive protein as predictor of death in end-stage diabetic nephropathy: Role of peripheral arterial disease.** *Kidney International* 2005;68:217-227.
90. Qureshi AR, Alvestrand A, Divino-Filho JC, et al. **Inflammation, Malnutrition, and Cardiac Disease as Predictors of Mortality in Hemodialysis Patients.** *J Am Soc Nephrol* 2002;13:28-36.
91. Tripepi G, Mallamaci F and Zoccali C. **Inflammation Markers, Adhesion Molecules, and All-Cause and Cardiovascular Mortality in Patients with ESRD: Searching for the Best Risk Marker by Multivariate Modeling** *J Am Soc Nephrol* 2005;16:83-88.
92. Zoccali C, Tripepi G and Mallamaci F. **Dissecting Inflammation in ESRD: Do Cytokines and C-Reactive Protein Have a Complementary Prognostic Value for Mortality in Dialysis Patients?** *J Am Soc Nephrol.* 2006;17:169-173.
93. Selim G, Stojceva-Taneva O, Zafirovska, et al. **Inflammation predicts all-cause and cardiovascular mortality in haemodialysis patients.** *Prilozi.* 2006;27:133-144.
94. Racki S, Zaputović L, Mavrić Z, et al. **C-reactive protein is a strong predictor of mortality in hemodialysis patients.** *Ren Fail.* 2006;28:427-433.

## **8. Erklärung**

„Ich, Anna Tankovics, geb. Kühne, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Assoziation von inflammatorischen Markern mit kardiovaskulären Erkrankungen, Mortalität und Erythropoietin-Resistenz bei Hämodialysepatienten“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

## **9. Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.



## **10. Publikationsliste**

Aus dieser Arbeit sind folgende Publikationen hervorgegangen:

Anna Tankovics, Christoph Fischer, Adelheid Wilde, Olaf Boenisch, Daniel Zickler, Michael Boehme and Ralf Schindler. **Pentraxin 3 (PTX3) levels are associated with coronary artery disease, peripheral artery disease and all-cause mortality in hemodialysis (HD)-patients.** World Congress of Nephrology 2009, Milan, May 22-26.

Michael Boehme, Fenja Kaehne, Anna Kuehne, Wanja Bernhardt, Matthias Schröder, Wolfgang Pommer, Christoph Fischer, Helmut Becker, Christian Müller and Ralf Schindler. **Pentraxin 3 is elevated in haemodialysis patients and is associated with cardiovascular disease.** Nephrol Dial Transplant 2007;22:2224-9.