

Aus der Klinik für Innere Medizin mit Schwerpunkt
Nephrologie und Internistische Intensivmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Einfluss der High Cut-Off Membran auf die Expression
humoraler und zellulärer Marker der Inflammation

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Christian Epple
aus Schwerte

Datum der Promotion: 04.09.2015

Abstrakt

Christian Epple

Einfluss der High Cut-Off Membran auf die Expression humoraler und zellulärer Marker der Inflammation

Einleitung:

Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz weisen gegenüber der Normalbevölkerung eine erhöhte kardiovaskuläre Mortalität auf. Ein hierfür verantwortlicher Pathomechanismus ist der Zustand der chronischen Mikroinflammation, welcher mit erhöhten Spiegeln von humoralen Markern wie CRP, IL-6 und Pentraxin 3 einhergeht. Zelluläre Adhäsionsmoleküle wie PSGL-1 (CD162), Mac-1 (CD11b) und CXCR-1 (CD181) spielen eine entscheidende Rolle bei der Leukozytenmigration zu Entzündungsherden sowie der Produktion inflammatorischer Mediatoren. Eine neuartige High Cut-Off- (HCO) Membran ermöglicht die Elimination von größeren Mittelmolekülen. Die Fragestellung dieser prospektiven Studie war, ob Dialysetherapie mit HCO-Membranen die Serumkonzentration von inflammatorischen Mediatoren langfristig senken kann und welchen Einfluss sie auf die Expression der Adhäsionsmoleküle auf Leukozyten hat.

Methoden:

Fünfzehn chronische Hämodialyse-Patienten mit erhöhten CRP-Spiegeln ($> 0,5$ mg/dl) wurden nach einem ABA-Design für jeweils drei Wochen zunächst mit einer High-Flux- (HF) Membran, dann mit einer HCO-Membran und anschließend wiederum mit einer HF-Membran dialysiert. Wöchentlich wurden Blutproben entnommen und analysiert. Die Serumspiegel von IL-6, IL-10 und Pentraxin 3 wurden durch Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay bestimmt, CRP durch turbidimetrische Messung. Die Expressionsdichte der Adhäsionsmoleküle PSGL-1, CXCR-1 und Mac-1 auf Leukozyten wurde durch durchflusszytometrische Analysen ermittelt. Weiterhin erfolgte die Bestimmung von Kreatinin, Harnstoff und Albumin. Die High Cut-Off-Phase wurde

gegenüber Woche drei auf Signifikanz überprüft, die zweite HF-Phase gegenüber Woche sechs der HCO-Phase.

Ergebnisse:

In der HCO-Phase unterscheiden sich die Serumspiegel von IL-6, IL-10, CRP sowie die Expressionsdichte von Mac-1 nicht signifikant zu denen aus der HF-Phase. Pentraxin 3 steigt in der HCO-Phase signifikant an. PSGL-1 wird auf allen Leukozyten in der HCO-Phase signifikant geringer exprimiert. Das Expressionsverhalten von CXCR-1 auf Leukozyten nimmt in der HCO-Phase zu, ohne ein Signifikanzniveau zu erreichen. Die Albumin-Spiegel fielen während der Studienphase mit HCO-Membran signifikant ab.

Diskussion:

Die Reduktion von PSGL-1 auf Leukozyten durch die HCO-Membran kann mit einer Reduktion der Inflammation einhergehen und möglicherweise das Atheroskleroserisiko günstig beeinflussen. Durch die HCO-Membran zeigt sich ein Trend zur Normalisierung des bei Niereninsuffizienz unterexprimierten CXCR-1. Im Gegensatz zu kurzfristigen Untersuchungen bei septischen Patienten konnte eine Reduktion von CRP und IL-6 Spiegeln in der vorliegenden Langzeitstudie nicht nachgewiesen werden. Der beobachtete Anstieg von Pentraxin 3 war überraschend; möglicherweise wirkt Pentraxin 3 als kompetitiver Inhibitor der P-Selektin-PSGL-1 Verbindung. Ein Anstieg von Pentraxin 3 führt daher möglicherweise zu einer Verminderung von Leukozytenmigration und damit zur Beeinflussung von Pathomechanismen der Atherosklerose.

Abstract

Christian Epple

The Effect of the High Cut-Off-Membrane on the Expression of Humoral and Cellular Markers of Inflammation

Introduction:

Patients with chronic kidney disease (CKD) have an increased cardiovascular mortality compared to the general population. One pathomechanism is the condition of chronic microinflammation, which is accompanied by increased levels of the humoral markers like CRP, IL-6 and Pentraxin 3. Cellular adhesive molecules like PSGL-1 (CD162), Mac-1 (CD11b) and CXCR-1 (CD181) play a decisive role in the migration of leucocytes to inflammatory sites and the production of inflammatory mediators. A new high cut-off- (HCO) membrane enables the elimination of larger middle molecules. The question of this prospective study was whether the HCO-membrane can lower the serum concentration of the inflammatory mediators in the long term and which effect it has on the expression of the adhesive molecules on leucocytes.

Methods:

Fifteen chronic hemodialysis patients with increased CRP levels (> 0.5 mg/dl) were treated according to an ABA-design for three weeks with a high-flux- (HF) membrane, then with a HCO-membrane and again with a HF-membrane. Weekly blood tests were taken and analysed. The serum levels of IL-6, IL-10 and Pentraxin 3 were determined by Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay; CRP by turbidimetric measurements. The expression density of PSGL-1, CXCR-1 and Mac-1 on leucocytes was determined by flow cytometry. Furthermore creatinin, urea and albumin were determined. The HCO-period was compared with week three for significance, the second HF-period was compared with week six of the HCO-period.

Results:

The serum levels of IL-6, IL-10, CRP and the expression density of Mac-1 in the HCO-period do not significantly differ to those from the HF-period. Pentraxin 3 increases significantly in the HCO-period. The expression density of PSGL-1 on all leucocytes in

the HCO-period is significantly diminished. On all leucocytes, CXCR-1 increases in the HCO-period without significant differences. The albumin levels decreased significantly during the study phase with HCO-membrane.

Discussion:

The reduction of PSGL-1 on leucocytes by the HCO membrane can go along with a reduction of inflammation and possibly influence the risk of atherosclerosis favourably. By the HCO-membrane, a tendency is manifested towards the normalisation of CXCR-1, which is under expressed with CKD. In contrast to short-term investigations with septic patients a reduction of CRP and IL-6 levels could not be proved in the present long-term study. The observed increase of Pentraxin 3 was astonishing; Pentraxin 3 possibly acts as a competitive inhibitor of the P-Selektin-PSGL-1 interaction. An increase of Pentraxin 3 possibly leads to a decrease of leucocyte migration and thus to the influencing of pathomechanisms of atherosclerosis.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	9
1.1 Chronische Niereninsuffizienz.....	9
1.1.1 Epidemiologische Daten.....	10
1.2 Inflammation.....	10
1.2.1 Humorale Marker der Inflammation.....	11
1.2.1.1 Zytokine.....	11
1.2.1.1.1 Interleukin-10.....	12
1.2.1.1.2 Interleukin-6.....	13
1.2.1.2 Pattern recognition molecules.....	15
1.2.1.2.1 CRP.....	15
1.2.1.2.2 Pentraxin 3.....	16
1.2.2 Zelluläre Marker der Inflammation.....	17
1.2.2.1 Selektine und ihr Ligand PSGL-1.....	18
1.2.2.2 Chemokine und ihre Rezeptoren.....	19
1.2.2.3 Integrine und ihre Aktivierung.....	20
1.2.2.4 Leukozytenmarker CD45.....	21
1.2.2.5 Monozytenmarker CD14.....	21
1.3 Ursachen der Mikroinflammation bei Niereninsuffizienz.....	23
1.3.1 Akkumulation inflammatorischer Zytokine bei reduzierter Kreatininclearance.....	23
1.3.2 Vermehrte Produktion inflammatorischer Zytokine.....	24
1.3.3 Hämodialyse als Faktor der Inflammation.....	25
1.4 Zusammenhang von Inflammation und kardiovaskulärem Risiko.....	25
1.4.1 Atherosklerose als inflammatorische Erkrankung.....	26
1.4.2 Plötzlicher Herztod und Inflammation.....	27
1.5 Hämodialyse mit großporigen Membranen.....	27
1.5.1 Indikation von High Cut-Off-Membranen.....	29
1.5.2 Limitation der High Cut-Off Hämodialyse.....	30
1.6 Fragestellung.....	31
2. Material	33
2.1 Puffer und Lösungen.....	35
3. Methoden	36
3.1 Studiendesign.....	36
3.2 Endpunkte.....	37
3.3 Ein- und Ausschlusskriterien.....	37

3.4 Patienten	38
3.5 HCO 1100 Hemofilter	39
3.5.1 Technische Details der Hemofilter	39
3.6 Dialysedetails	39
3.7 High-Flux- und HCO-Phasen	40
3.7.1 Woche 1 - 3	40
3.7.2 Woche 4 – 6	40
3.7.3 Woche 7 – 9	40
3.8 Bestimmung von IL-6 und IL-10	40
3.9 Bestimmung von PTX 3.....	42
3.10 Bestimmung von CRP	43
3.11 Durchflusszytometrie.....	43
3.11.1 Prinzip der Durchflusszytometrie.....	43
3.11.2 Messung der Proben	44
3.11.3 Etablierung der AK-Konzentrationen	46
3.11.4 Analyse der Patientenproben	49
3.11.4.1 Vorbereitung der Proben	49
3.11.4.2 Auswertung der Proben.....	49
3.12 Bestimmung von Albumin, Harnstoff und Kreatinin.....	55
3.12.1 Albumin	55
3.12.3 Harnstoff.....	55
3.12.4 Kreatinin	55
3.13 Erfassung der Daten und statistische Analyse.....	56
4 Ergebnisse.....	57
4.1 CRP, IL-6, PTX3 und IL-10	57
4.2 Albumin	61
4.3 Harnstoff und Kreatinin.....	62
4.4 Ergebnisse Durchflusszytometrie.....	64
4.4.1 Expressionsdichte von CD162	64
4.4.1.1 Expression von CD162 auf Granulozyten	65
4.4.1.2 Expression von CD162 auf Monozyten	66
4.4.1.3 Expression von CD162 auf Lymphozyten	67
4.4.2 Expression von CD181 auf Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten	68
4.4.3 Expression von CD11b auf Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten	70
4.4.4 Expression von CD45/CD14 auf Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten	73
5. Diskussion	77

5.1 Diskussion der Parameter	80
5.1.1 Humorale Marker der Inflammation	80
5.1.1.1 CRP und IL-6.....	80
5.1.1.2 IL-10	83
5.1.1.3 PTX3	84
5.1.2 Zelluläre Marker der Inflammation.....	86
5.1.2.1 PSGL-1 (CD162).....	86
5.1.2.2 CXCR-1 (CD181)	88
5.1.2.3 Mac-1 (CD11b).....	92
5.1.2.4 CD45/CD14	94
5.1.3 Albumin	95
5.1.4 Kreatinin und Harnstoff.....	96
5.2 Diskussion der Methodik	96
6. Abkürzungsverzeichnis.....	98
7. Literaturverzeichnis	100
8. Tabellenverzeichnis	112
9. Abbildungsverzeichnis.....	114
10. Eidesstattliche Versicherung	116
11. Lebenslauf	117
12. Publikationsliste	119
13. Danksagung	120

1. Einleitung

1.1 Chronische Niereninsuffizienz

Die National Kidney Foundation definiert in den Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (KDOQI)-Leitlinien die chronische Niereninsuffizienz (CNI) wie folgt:

Die CNI ist definiert als eine ≥ 3 Monate währende strukturelle oder funktionelle Schädigung der Niere, die sich durch pathologische Veränderungen oder Parameter der Nierenschädigung zeigt, inklusive abweichender Veränderungen in der Zusammensetzung des Blutes oder des Urins oder abnormaler Bildgebung. Die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) kann dabei vermindert sein [1].

Zudem erfüllt eine $GFR < 60 \text{ ml/min/1,73m}^2$ für mehr als 3 Monate mit oder ohne Nierenschädigung ebenfalls die Kriterien der CNI [1].

Die Stadieneinteilung der CNI ist in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt:

Stadium	Beschreibung	GFR (ml/min/1,73m ²)
	Erhöhtes Risiko	> 90 mit CNI Risikofaktoren
1	Nierenschädigung mit normaler oder \uparrow GFR	≥ 90
2	Nierenschädigung mit milder \downarrow GFR	60 - 89
3	Moderate \downarrow GFR	30 - 59
4	Schwere \downarrow GFR	15 - 30
5	Nierenversagen	< 15 (oder Dialyse)

Tabelle 1: Stadieneinteilung der CNI

1.1.1 Epidemiologische Daten

Die CNI ist ein weltweites Problem des Gesundheitswesens mit jährlich steigender Prävalenz [1]. Die in den Vereinigten Staaten von Amerika (USA) durchgeführte nationale Gesundheits- und Ernährungsuntersuchung (NHANES) kam zu dem Ergebnis, dass die Prävalenz der CNI in den USA von 11% (1988-1994) [2] auf 15,3% (1999-2004) [3] gestiegen ist.

Auch die Daten des United States Renal Data Systems (USRDS) dokumentieren die stetige Zunahme der bereits dialysepflichtigen CNI. Aus diesen Daten geht hervor, dass die Zahl der dialysepflichtigen Patienten in den USA von 218.042 im Jahr 1991 [4] auf 517.414 im Jahr 2009 [5] gestiegen ist. Schätzungen gehen davon aus, dass im Jahr 2030 über 2 Millionen Menschen in den USA terminal niereninsuffizient sein werden und eine entsprechende Therapie benötigen [6].

Die Grunderkrankungen, die 2009 zur Einleitung der Nierenersatztherapie in den USA führten, waren Diabetes Mellitus ($\approx 43,8\%$), gefolgt von arterieller Hypertonie ($\approx 28,1\%$), Glomerulonephritiden ($\approx 6,5\%$) und autosomal dominanter polyzystischer Nierenerkrankung (ADPKD) ($\approx 1,9\%$) [7].

1.2 Inflammation

Der Begriff Inflammation bezeichnet eine Antwort des Körpers auf Invasion von infektiösen Erregern, auf Antigene, die als fremd erkannt werden und auf physikalische, chemische oder traumatische Schäden des Körpergewebes [8]. Es handelt sich dabei um einen systemischen Zustand, der durch das Zusammenspiel verschiedener Faktoren vermittelt wird. Dazu gehören unter anderem Zytokine und Komplement auf humoraler Ebene sowie Leukozyten auf zellulärer Ebene.

Bei chronisch niereninsuffizienten Patienten besteht pathophysiologisch eine milde Entzündungsreaktion (Mikroinflammation), die bereits vor Einleitung der Nierenersatztherapie beginnt und chronisch verläuft. Im Blut lassen sich laborchemisch Mediatoren nachweisen, die akute oder chronische Inflammationszustände vermitteln

beziehungsweise kennzeichnen. Ein bekannter Mediator ist das Akute-Phase-Protein C-reaktives Protein (CRP). Stenvinkel et al. zeigten in einer Kohorte von CNI-Patienten, die erstmals hämodialysiert wurden (mittlere GFR 7ml/min/1,73m²), dass die CRP-Serum-Spiegel vergleichbar waren mit denen von Patienten, die schon jahrelang Hämodialyse (HD) erhielten [9, 10].

Boehme et al. untersuchten die Plasmaspiegel von den Entzündungsmediatoren CRP, Pentraxin 3 (PTX3) und Interleukin-6 (IL-6) bei Niereninsuffizienten, die HD, Peritonealdialyse oder noch keine Nierenersatztherapie erhielten, im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe. Die CRP-Spiegel waren im Vergleich zu Gesunden in allen 3 Gruppen signifikant erhöht. PTX3 war nur bei Patienten die HD erhielten signifikant erhöht. In den anderen 3 Gruppen gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied der PTX3-Konzentrationen [11].

Den humoralen und zellulären Bestandteilen des unspezifischen Immunsystems kommt bei der Aufrechterhaltung der Mikroinflammation bei CNI-Patienten eine große Bedeutung zu. Nachfolgend sollen einzelne Komponenten vorgestellt werden.

1.2.1 Humorale Marker der Inflammation

Die Bezeichnung „humoral“ stammt aus dem Lateinischen und bedeutet so viel wie „die Körperflüssigkeit betreffend“. Humorale Marker der Inflammation sind Zytokine sowie so genannte „pattern recognition molecules“ (PRMs), welche man in lösliche und zelluläre PRMs unterscheidet.

1.2.1.1 Zytokine

Der Begriff Zytokine stammt aus dem Griechischen (Zyto und Kinese) und bedeutet soviel wie „sich zwischen den Zellen bewegend“. Balkwill und Burke definierten Zytokine wie folgt:

„Zytokine sind regulatorische Proteine, die von Leukozyten und einer Reihe weiterer Zellen produziert werden; die pleiotropen Funktionen der Zytokine schließen zahlreiche Effekte auf Zellen des Immunsystems und die Regulierung entzündlicher Prozesse ein.“

[12]

Diese Definition ist sehr allgemein gehalten. Man kann ergänzen, dass sie an der Regulierung der Ontogenese, der Gewebereparatur, der Immunabwehr, der Inflammation, der Kontraktilität in Herz und Gefäßen, der Aufrechterhaltung von Körperprozessen sowie des Zellsterbens beteiligt sind. Durch spezifische Rezeptorbindung wirken sie autokrin, parakrin, juxtakrin und endokrin und spielen so bei der Vermittlung von Inflammation eine wichtige Rolle. Die pleiotrope Mediatorfunktion eines Zytokins bedeutet, dass ein Zytokin mehrere Effekte entfaltet, weshalb einem Zytokin verschiedene, in ihrer Beschreibung unterschiedliche Namen zugeordnet werden können. Zusätzlich spricht man auch von einer redundanten Funktion der Zytokine, was bedeutet, dass verschiedene Zytokine den gleichen Effekt vermitteln. Sie können zudem synergistische sowie antagonistische Wirkungen entfalten.

Aufgrund funktioneller Eigenschaften unterscheidet man mehrere Gruppen von Zytokinen: [13]

- Interferone
- Interleukine
- Tumornekrosefaktoren
- Kolonie-stimulierende Faktoren
- Wachstumsfaktoren
- Transformierende Wachstumsfaktoren
- Chemokine
- Virokine

1.2.1.1.1 Interleukin-10

Interleukin-10 (IL-10) hat eine Molekulargröße von 18 kilo Dalton (kDa) und zählt zusammen mit dem trans-growth-factor- β zu den antiinflammatorischen Zytokinen und wird hauptsächlich von regulatorischen T-Zellen und Monozyten produziert. Es wurde zunächst als „*Cytokine-synthesis Inhibitory factor*“ beschrieben, erfüllt jedoch neben der wichtigen Zytokin-inhibierenden Funktion noch weitere, wie zum Beispiel die Förderung der Produktion von Mastzellen und Thymozyten sowie eine kostimulierende Funktion bei der Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen. Die Freisetzung erfolgt in Zuständen der Inflammation als Antwort auf aktivierte Komplementfaktoren und

Endotoxine wie Lipopolysaccharide (LPS). IL-10 antagonisiert die Produktion proinflammatorischer Zytokine wie Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α), Interleukin-1 und Interleukin-6 (IL-6), weiterhin hemmt es die Produktion von Chemokinen wie etwa Interleukin-8 (IL-8) [14], welches an der Leukozytenrekrutierung beteiligt ist und in Gegenwart von Antigen präsentierenden Zellen die Produktion von Interferon- γ aus natürlichen Killerzellen [15]. Es hemmt so die inflammatorische Antwort und stellt als körpereigener Immunmodulator eine wichtige Funktion dar, bei Prozessen, die in eine Sepsis oder einen septischen Schock übergehen können.

CNI-Patienten haben erhöhte IL-10 Plasmaspiegel, da IL-10 hauptsächlich über die Nieren eliminiert und es aufgrund der eingeschränkten Nierenfunktion zu erhöhten Halbwertszeiten kommt [16]. Weiterhin produzieren urämische Monozyten, verglichen mit denen von Gesunden, mehr IL-10 [17]. Ein Grund hierfür könnte der chronische Zustand der Mikroinflammation sein.

1.2.1.1.2 Interleukin-6

Aufgrund seiner pleiotropen Funktion gibt es verschiedene Synonyme für IL-6, unter anderem Interferon- β -2 [18], *B-cell stimulatory factor 2* [19], *cytotoxic T-cell differentiation factor* [20] und *hepatocyte stimulatory factor* [21]. Zur Vereinheitlichung der Nomenklatur wurde 1987 von Yasukawa et al. [22] und Poupart et al. [23] die Bezeichnung IL-6 vorgeschlagen.

IL-6 (22 - 27 kDa) wird als Antwort auf physiologische Stimuli wie TNF- α , Interleukin-1 β , bakterielle Endotoxine, körperliche Anstrengung und oxidativen Stress von Monozyten, Lymphozyten, Mesothelzellen, Adipozyten und Fibroblasten produziert. Es hat sowohl eine pro- als auch antiinflammatorische Funktion und vermittelt diese über ein komplexes Rezeptorsystem, welches aus einer Liganden bindenden (gp 80) und einer Signal vermittelnden Untereinheit (gp 130) besteht [24]. In der frühen Phase von infektiösen sowie nicht-infektiösen Entzündungszuständen, wie Verbrennung oder Gewebeschädigung, wird IL-6 produziert und vermittelt in der Leber die Aktivierung zahlreicher akuter Phase Proteine wie dem CRP, Serum Amyloid A, Haptoglobin, Fibrinogen und Hepcidin, wohingegen die Bildung von Albumin gehemmt wird [25]. Der wichtige Biomarker CRP ist zum Verlauf von akuten oder chronischen

Entzündungszuständen hauptsächlich abhängig von der IL-6-Konzentration, die bei Gesunden etwa 1 pg/ml beträgt. Durch IL-6 induzierte anhaltend hohe Hepcidin-Konzentrationen begünstigen durch Blockade des Eisentransporters Ferroportin 1 in Makrophagen, Hepatozyten und Darmepithelien einen Eisenmangel und die *anemia of chronic inflammation* [26].

Die einleitend genannten zahlreichen Synonyme beschreiben die verschiedenen Funktionen von IL-6. Bei Lymphozyten induziert IL-6 die B-Zell Differenzierung zu Immunglobulin produzierenden Plasmazellen [27] und die Differenzierung von zytotoxischen T-Zellen aus CD8-positiven T-Zellen [28]. Zusammen mit dem trans-growth-factor- β unterstützt es die Differenzierung von Interleukin-17 produzierenden T-Helferzellen, die über ihre Interleukin-17-Produktion eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen haben [29]. Die trans-growth-factor- β induzierte Differenzierung regulatorischer T-Zellen hingegen wird durch IL-6 inhibiert, was zu einem Ungleichgewicht von Interleukin-17 produzierenden T-Zellen zu regulatorischen T-Zellen führt und dadurch Einfluss auf die Pathogenese von verschiedenen Autoimmun- und chronisch-entzündlichen Erkrankungen hat [30].

IL-6 hat weiterhin Einfluss auf die Hämatopoese, indem es die Reifung von Megakaryozyten zu Thrombozyten induziert sowie hämatopoetische Stammzellen aktiviert [31]. Auf Plasmazytomzellen wirkt IL-6 wachstumsstimulierend, dies erklärt ein weiteres Synonym für IL-6: *Plasmazytoma growth factor* [32].

In einer Studie, in die Dialysepatienten, CNI-Patienten, Gesunde und Angina-pectoris Patienten eingeschlossen wurden, zeigte sich, dass IL-6 positiv mit Adhäsionsmolekülen (iCAM-1, vCAM-1, E-Selektin), die an der Leukozytenrekrutierung beteiligt sind, korreliert und dass IL-6-Konzentrationen bei Dialyse- und CNI-Patienten erhöht sind. Zudem zeigte sich hier, dass Kreatinin die Hauptdeterminante der IL-6 Konzentrationen ist [33]. Der Zusammenhang zwischen Inflammation und Niereninsuffizienz wird in Punkt 1.3 eingehend dargestellt.

1.2.1.2 Pattern recognition molecules

Zu den löslichen PRMs zählt man unter anderem C1q und Pentraxine. Pentraxine sind in der Evolution hoch konserviert und lassen sich durch ihre multimerische, für gewöhnlich pentamere Struktur charakterisieren. Man unterscheidet kurze Pentraxine wie CRP und Serum Amyloid P (SAP) sowie lange Pentraxine, zum Beispiel das PTX3. Sie binden verschiedene Liganden, darunter apoptotische Zellen und Mikroorganismen, in einer kalziumabhängigen Weise (CRP und SAP) und tragen so zu ihrer Opsonisierung bei. Man geht davon aus, dass sie den ersten Schritt der unspezifischen Abwehr gegen Infektionen darstellen [34, 35].

1.2.1.2.1 CRP

Das in der Labordiagnostik wohl am weitesten verbreitete Pentraxin ist das CRP, welches schon 1930 identifiziert wurde und seinen Namen aufgrund der Fähigkeit trägt an das C-Polysaccharid von *Streptococcus Pneumoniae* zu binden [36]. Interleukine, vor allem IL-6, aber auch Interleukin-1 und TNF- α stimulieren die Produktion des Plasma-CRPs in den Hepatozyten [37, 38]. Bei jungen gesunden Erwachsenen liegt die mediane Konzentration bei 0,8 mg/l. Nach entsprechendem inflammatorischen Stimulus können bis zu 10.000-fach höhere Werte erreicht werden [38]. Es eignet sich daher als Marker inflammatorischer Prozesse und zur Verlaufskontrolle nach Operationen oder antibiotischer Therapie.

CRP bindet an viele verschiedene Liganden. Dazu gehören körpereigene wie Plasmalipoproteine, beschädigte Zellmembranen, Phospholipide, Ribonukleinspartikel und apoptotische Zellen [39-42]. Zu den extrinsischen Liganden zählen Glykane, Phospholipide und Mikroorganismen, welche über Phosphorylcholin, einem Hauptbestandteil von C-Typ Polysaccharidkapseln, an das CRP binden. So vermittelt das CRP die Phagozytose von Pilzen, Bakterien, Parasiten und Hefen [43]. Aggregiert oder an Liganden von Makromolekülen gebunden, wird es von C1q, der ersten Komponente der klassischen Komplementkaskade, erkannt; Es kommt zur Aktivierung der klassischen Komplementkaskade bis hin zum Membranangriffskomplex, welcher Bakterienmembranen lysiert [44, 45]. An Liganden gebundenes CRP interagiert mit Faktor H, dem löslichen Hauptregulator des alternativen Komplementweges. Durch die pentamere Struktur ist es einem CRP-Molekül möglich an mehrere Faktor H-Moleküle

zu binden und indirekt deren Bindung zu dem Komplementfaktor C3b zu reduzieren. Die Amplifikationsschleife des alternativen Komplementweges wird so durch CRP inhibiert [46].

1.2.1.2.2 Pentraxin 3

Ein weiteres Pentraxin ist das in den frühen 1990iger Jahren als Erstes zu den langen Pentraxinen zählende identifizierte PTX3 [47]. Die Molekülgröße eines PTX3-Monomers liegt bei 40 kDa, wobei Aminoglykosylierung an Asparaginsäure die Molekülgröße um 5 kDa erhöht [48]. Im Gegensatz zum CRP wird es nicht von Hepatozyten, sondern von verschiedenen entsprechend stimulierten Zellen produziert. Dazu gehören Monozyten, myeloische dendritische Zellen, neutrophile Granulozyten, Fibroblasten und Endothelzellen. Im Blut zirkulierende menschliche Monozyten produzieren PTX3 als Antwort auf die Stimulation proinflammatorischer Zytokine wie Interleukin-1 β und TNF- α . Die Aktivierung durch LPS, Lipoarabinomannan, high density lipoprotein, äußere Membranproteine, Toll-like-Rezeptoren und überraschenderweise auch IL-10 trägt ebenfalls zur PTX3 Synthese bei, wohingegen Interferon- γ hemmend auf die PTX3 Produktion wirkt [49, 50].

Neutrophile Granulozyten speichern PTX3 in präformierten Granula und setzen es nach adäquatem Stimulus (Inkubation mit *Staphylococcus aureus*, *Escherichia Coli* und LPS) frei. Dendritische Zellen hingegen reagieren nach Stimulation mit der Proteinbiosynthese, da zunächst die mRNA-Konzentration von PTX3 steigt [51]. Klouche et al. konnten zeigen, dass in glatten Gefäßmuskelzellen die Anwesenheit von oxidiertem LDL verantwortlich für die PTX3-Produktion ist [52]. Wie bei dendritischen Zellen kommt es hier zunächst zur mRNA-Produktion. Dass tatsächlich auch ein Zusammenhang zwischen PTX3 als inflammatorischem Akute Phase Protein und Atherosklerose besteht, konnten Rolph et al. in ihren Untersuchungen zeigen. Sie konnten PTX3 produzierende Makrophagen und Endothelzellen in fortgeschrittenen atherosklerotischen Plaques identifizieren [53].

Neben der Beteiligung an der Entstehung atherosklerotischer Plaques besitzt PTX3 weitere vielfältige Wirkungen. Es ist in der Lage, spezifische Pathogene wie Pilze, Bakterien und Viren zu binden und deren Phagozytose zu vermitteln. Weiterhin besitzt

PTX3 die Fähigkeit als Opsonin zu agieren. Dies zeigte sich in Beobachtungen von PTX3 überexprimierenden Mäusen, die einen erhöhten Phagozytose-Index gegenüber *Paracoccidioides brasiliensis* im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen hatten [54]. So wie CRP und SAP bindet auch PTX3 an C1q und aktiviert diese. Im Gegensatz zum CRP und SAP bindet PTX3 seine Liganden jedoch kalziumunabhängig [48].

1.2.2 Zelluläre Marker der Inflammation

Die Mobilisierung von Leukozyten zu Infektionsherden, bei der Adhäsionsmoleküle eine tragende Rolle spielen, wird als Leukozytenrekrutierung bezeichnet. Diese ist eine der wichtigsten Funktionen der angeborenen Immunität und Teil der Entzündungsreaktion. Erstmals wurde Ende des 19. Jahrhunderts beobachtet und beschrieben, wie Leukozyten aus dem fließenden Blut in entzündetes Gewebe gelangen [55]. Verschiedene Adhäsionsmoleküle, wie Selektine und Integrine, aber auch Chemokine und deren Rezeptoren vermitteln zwischen dem aktivierten Endothel und den Leukozyten und sind so an dem dynamischen Prozess der Rekrutierung beteiligt. Auch während der Hämodialyse (HD) kommt es zur Aktivierung von Leukozyten, die zu einer vermehrten Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine führt, welche wiederum eine vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche von Endothelzellen bedingt [33].

Im Folgenden werden die wichtigsten Mediatoren der Leukozytenrekrutierung beschrieben. Die Tabelle veranschaulicht die Funktionen der Adhäsionsmoleküle.

	Vorkommen	Ligand	Funktion
CD162 (PSGL-1) Review in [56]	Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten	P-Selektin (Endothelzellen, Thrombozyten), E-Selektin (Endothelzellen), L-Selektin (Leukozyten)	Verbindet Leukozyten mit dem aktivierten Endothel, Thrombozyten/Leukozyten Vermittelt die Migration von Leukozyten zum Zielgewebe
CD181 (CXCR-1)	Neutrophile, Monozyten, Makrophagen; (Eosinophile, Basophile, T-Lymphozyten, Mastzellen, dendritische Zellen) [57]	IL-8 [57]	Steigerung der ICAM-1 Expression in proximalen Tubulusepithelzellen [58] Führt zur Konformationsänderung von Integrinen [59]
CD11b (Mac-1) Review in [60]	Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, dendritische Zellen, natürliche Killerzellen	ICAM-1, ICAM-2, ICAM-4, iC3b, Fibrinogen, Faktor X, Heparin, Laminin, LPS, Zymosan, Oligodeoxynucleotide, Kollagen, Elastase	Vermittelt die Adhäsion von Leukozyten an das Endothel Aktiviert Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, dendritische Zellen und natürliche Killerzellen zur Phagozytose
CD45 Review in [61]	Auf allen Zellen der hämatopoetischen Zellreihe mit Ausnahme von Thrombozyten und Erythrozyten	Galektin-1, CD22	Aktivierung und Inhibierung der Ausreifung von T- und B-Zellen
CD14 Review in [62]	Monozyten, Makrophagen	LPS, Lipoarabinomannan, Lipoteichonsäure, Peptidoglykan, Pilze	Freisetzung proinflammatorischer Entzündungsmediatoren

Tabelle 2: Vorkommen, zugehöriger Ligand und Funktion der untersuchten Oberflächenmarker

1.2.2.1 Selektine und ihr Ligand PSGL-1

Die Selektine sind eine kleine Familie lektinähnlicher Adhäsionsmoleküle, bestehend aus drei Mitgliedern, P-Selektin, E-Selektin und L-Selektin [63]. Sie vermitteln das Rollen von Leukozyten entlang der Endotheloberfläche, wobei jedoch zwischen den einzelnen Mitgliedern Unterschiede in ihrem Expressionsmuster und ihrer Effektivität bestehen.

P-Selektin wird maßgebend von Endothelzellen und Thrombozyten produziert und dort in sogenannten Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen beziehungsweise α -

Granula der Plättchen gespeichert [64]. Als Antwort auf inflammatorische Mediatoren wie Thrombin und Histamin kann P-Selektin innerhalb von Minuten aus den Granula freigesetzt werden und auf der Plasmamembran exprimiert werden. Untersuchungen an Mäuse-Endothelzellen zeigten, dass TNF- α und LPS auf transkriptioneller Ebene zu maximalen mRNA-Spiegeln nach 2-4 Stunden führen [65, 66]. Auch für humane Endothelzellen konnte man in weiteren Untersuchungen nachweisen, dass LPS die Synthese von P-Selektin stimuliert [67]. E-Selektin wird nach Stimulation durch LPS, TNF- α , sowie Interleukin-1 auf Endothelzellen exprimiert [68]. Beide Selektine binden den auf der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten exprimierten Liganden P-Selektin Glykoprotein Ligand-1 (PSGL-1) (Cluster of differentiation 162, CD162), über das Sialyl-Lewis^x-Glykolipid, welches wiederum auf PSGL-1 exprimiert wird. Diese Bindung ist jedoch nicht stark genug, um den Scherkräften des Blutes zu widerstehen. Die Zellen rollen auf dem Endothel entlang, da sie kontinuierlich neue Bindungen knüpfen und alte lösen. Das P-Selektin, welches mit einer Länge von 50 nm in das Gefäßlumen ragt [65], erfüllt hierbei die wichtigste Funktion.

Dem erst nach Stunden auf der Plasmamembran exprimierten E-Selektin kommt auch eine wichtige Bedeutung zu. Durch seine Bindung an PSGL-1 sorgt es für eine Verlangsamung der Rollgeschwindigkeit. Grund ist wahrscheinlich eine höhere Dichte von E-Selektin auf der Plasmamembran, die eine höhere Anzahl von Rezeptor-Liganden-Bindungen ermöglicht [69].

L-Selektin wird ausschließlich auf Leukozyten exprimiert. Es unterstützt durch Bindung an E-Selektin das Rollen der Leukozyten [70], weiterhin vermittelt es die Migration von T-Gedächtniszellen hin zu Lymphknoten [71].

1.2.2.2 Chemokine und ihre Rezeptoren

Chemokine gehören zu einer Gruppe chemotaktischer Zytokine mit der Fähigkeit G-Protein-abhängige Rezeptoren zu binden und einerseits Integrine direkt zu aktivieren und andererseits durch einen chemotaktischen Gradienten die Migration der Leukozyten in entzündetes Gewebe zu vermitteln. Unter pathophysiologischen Umständen wie Ischämie, Toxinämie oder Inflammation ist die Produktion inflammatorischer Chemokine signifikant erhöht [72]. Proinflammatorische Zytokine wie

TNF- α und Interleukin-1 β sowie reaktive Sauerstoffspezies sind hauptsächlich an der Stimulation der Chemokin-Expression über den Transkriptionsfaktor NF- κ B beteiligt. Man unterscheidet vier Familien der Chemokine, die CC-, die CXC-, CX3C und die CL-Chemokine. Im Allgemeinen reagieren Monozyten auf Signale von CC-Chemokinen. CXC-Chemokine wie IL-8 stimulieren eher die auf Neutrophilen exprimierten CXCR1- (CD181) und CXCR2-Rezeptoren [73].

Dass IL-8 eine wichtige Rolle bei der Leukozytenrekrutierung spielt, wurde unter anderem durch Untersuchungen an humanen proximalen Tubuluszellen gezeigt. Über CXCR-1 steigert IL-8 die Expression des interzellulären Adhäsionsmoleküls (ICAM) 1 in humanen proximalen Tubuluszellen [58]. Zudem vermittelt IL-8 eine Phosphorylierung des Integrins Mac-1 (CD11b/CD18). Dadurch kommt es zu einer Konformationsänderung, die es Mac-1 ermöglicht, seine Liganden, unter anderem ICAMs, zu binden [59] und den nächsten Schritt der Leukozytenrekrutierung einzuleiten.

1.2.2.3 Integrine und ihre Aktivierung

Integrine sind transmembrane Adhäsionsrezeptoren auf Leukozyten, die an cytoskelettale Proteine binden und extrazelluläre Signale weiterleiten [74]. Sie bestehen aus einer α - und einer β -Untereinheit. Bislang sind 18 α - und 8 β -Untereinheiten bekannt, die insgesamt 24 verschiedene Integrine bilden. Sie sind essentiell für den nächsten Schritt der Leukozytenrekrutierung.

Um die Bindung an Integrin-Liganden zu ermöglichen, müssen Integrine erst aktiviert werden und eine Konformationsänderung vollziehen. Aktivierende Stimuli sind zum einen Signale von Oberflächen-Rezeptoren wie T-Zell-Rezeptoren, B-Zell-Rezeptoren und Chemokin-Rezeptoren, aber auch Liganden, die an die extrazelluläre Domäne der Integrine binden sowie Scherkräfte des Blutes, die über einen mechanischen Reiz die Konformationsänderung vermitteln [60].

Aktivierte Integrine gehen mit ICAMs des Endothels festere Bindungen ein und leiten so die Adhäsion an das Endothel ein und stoppen die Rollbewegung der Leukozyten. Es

kommt zur Extravasation der Leukozyten, indem diese sich zwischen den Endothelzellen hindurchzwängen und zu dem entzündeten Gebiet wandern.

Eine tragende Rolle spielt das bereits erwähnte Integrin Mac-1. Es wird von Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen, Granulozyten und natürlichen Killerzellen exprimiert. Nach Aktivierung kann es an folgende Liganden binden: ICAM-1, ICAM-2, ICAM-4, iC3b, Fibrinogen, factor X, Heparin, Laminin, LPS, Zymosan, Oligodeoxynukleotide, Kollagen und Elastase. Durch so entstehende Zell-Zell- und Zell-Substrat-Verbindungen vermittelt es die Adhäsion von Leukozyten an das Endothel und aktiviert die Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen, Granulozyten und natürlichen Killerzellen zur Phagozytose pathogener Organismen [60].

1.2.2.4 Leukozytenmarker CD45

CD45 ist ein Oberflächen-Glykoprotein, das auf fast allen hämatopoetischen Zellreihen exprimiert wird, mit der höchsten Expressionsdichte auf Lymphozyten. Ausnahmen sind Thrombozyten, Erythrozyten und einige ihrer Progenitorzellen. Es besitzt eine Tyrosin-Phosphatase Domäne, welches sowohl die Phosphorylierung als auch die Abspaltung von Phosphat an Tyrosin in verschiedenen Substraten katalysiert. Dadurch reguliert CD45 die Aktivierung als auch die Inhibierung der Ausreifung von T- und B-Zellen [61]. Bei der Durchflusszytometrie ermöglicht CD45 aufgrund seines Expressionsvorkommens zusammen mit CD14 die Identifizierung von Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten.

1.2.2.5 Monozytenmarker CD14

CD14 wurde 1981 erstmals auf Monozyten und Makrophagen identifiziert. Es hat eine Molekulargröße von 55 kDa und ist über einen Glycosylphosphatidylinositol-Anker mit der Zellmembran verbunden. Lange Zeit war seine Funktion unklar und CD14 galt aufgrund seines überwiegenderem Vorkommens auf Monozyten und Makrophagen als ein Marker dieser Zellpopulationen. Man erkannte später, dass CD14 einen Rezeptor für zahlreiche Liganden mikrobieller Produkte darstellt. Dazu zählen Lipoarabinomannan, Lipoteichonsäure, Peptidoglykan und vor allem LPS. Die Bindung von LPS zusammen mit dem LPS bindenden Protein an CD14 löst eine Signalkaskade über den intrazellulären Transmitter NF- κ B aus, woraufhin es zur Freisetzung von

proinflammatorischen Entzündungsmediatoren kommt. Später wurde CD14 auch auf nicht myeloischen Zellen, wie z.B. Epithelzellen von Gingiva, Kornea, Magendarmtrakt und Haut identifiziert (Review in [62]). Bei der Durchflusszytometrie macht man sich die hohe Expressionsdichte von CD14 auf Monozyten zu Nutze, um diese zu markieren.

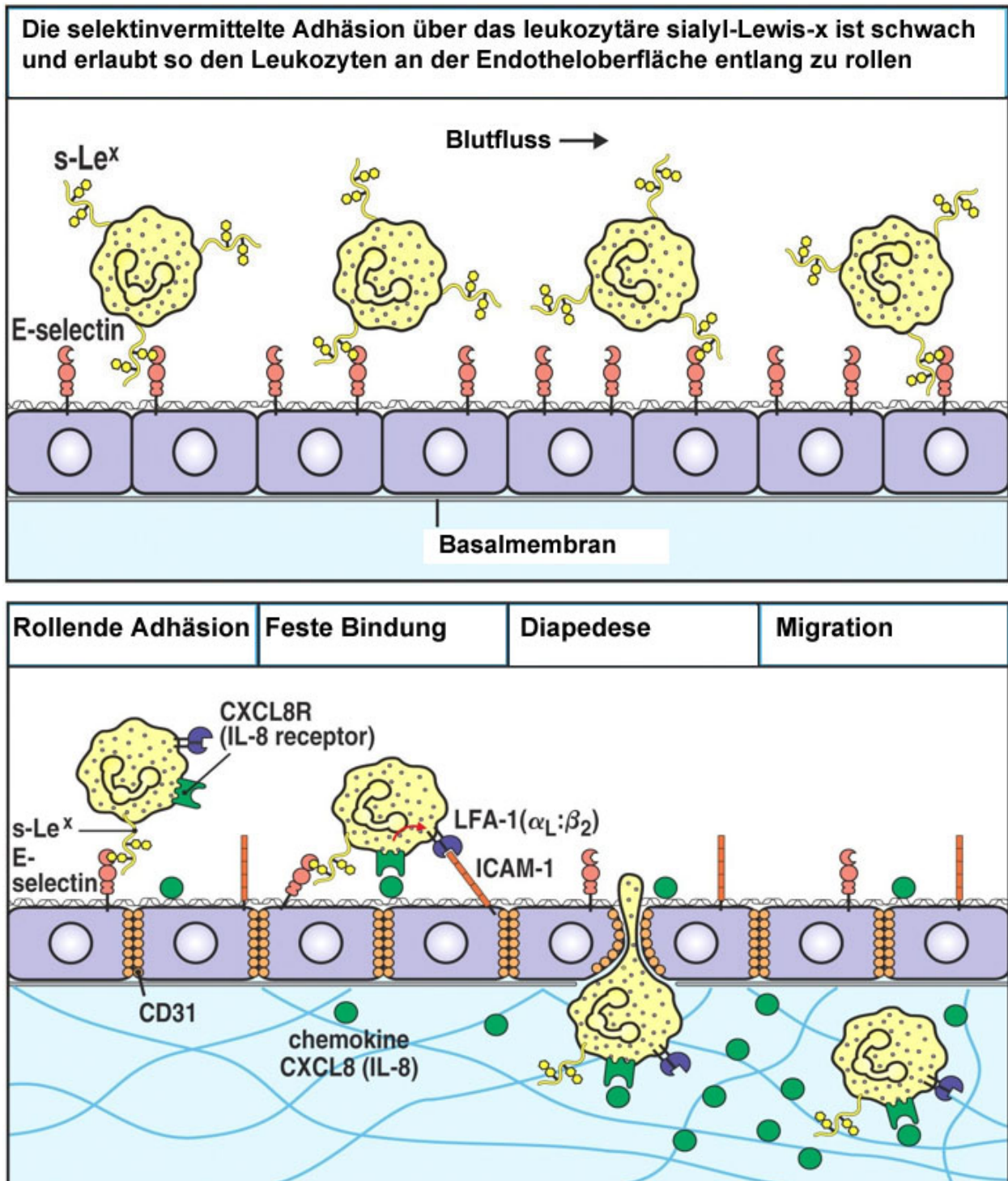


Abbildung 1: Die Leukozyten bewegen sich entlang der Endotheloberfläche. Über Selektine, Integrine und Chemokine wird die Migration zu dem Zielgewebe vermittelt. Modifiziert nach Murphy [75]

1.3 Ursachen der Mikroinflammation bei Niereninsuffizienz

Die der Mikroinflammation bei CNI-Patienten zugrunde liegenden Pathomechanismen sind noch nicht vollständig geklärt, können aber grob in drei Gruppen eingeteilt werden. Einerseits erlaubt die reduzierte Nierenfunktion nicht mehr die adäquate Elimination der Zytokine, andererseits führt die Akkumulation urämischer proinflammatorischer Toxine zu einer gesteigerten Zytokinproduktion, mit der Folge erhöhter Zytokin-Konzentrationen bei CNI. Ein dritter Faktor ist der Einfluss der HD.

1.3.1 Akkumulation inflammatorischer Zytokine bei reduzierter Kreatininclearance

Spoto et al. untersuchten 2010 die Plasmakonzentrationen von TNF- α und IL-6 bei CNI-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden. Dabei kamen sie zu dem Ergebnis, dass TNF- α invers mit der GFR assoziiert ist. Eine GFR von 81 ml/min/1,73 m² konnte als der Grenzwert bestimmt werden, bei dessen Unterschreitung es zur zunehmenden Akkumulation von TNF- α kommt [76]. Dass durch die unzureichende exkretorische Funktion der Nieren Zytokine akkumulieren, zeigte sich auch bei Untersuchungen der Interleukin-1- und Tumor Nekrose Faktor-Clearance an nephrektomierten Ratten sowie in Studien mit CNI-Patienten, denen rekombinantes IL-10 injiziert wurde [77, 78].

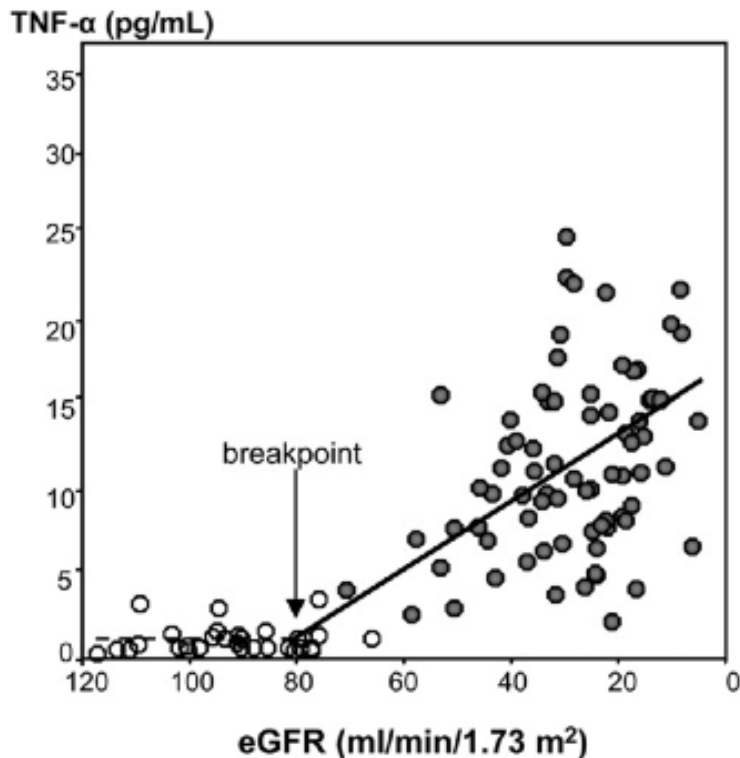


Abbildung 2: Verhältnis zwischen GFR und TNF-alpha Plasmaspiegel in einer Gesamtanalyse von CNI-Patienten (graue Punkte) und Gesunden (weiße Punkte) [76]

1.3.2 Vermehrte Produktion inflammatorischer Zytokine

Mit Abnahme der Nierenfunktion und der Kreatininclearance akkumulieren Urämietoxine, die die Zytokin-Freisetzung aus Monozyten anregen können. Phosphat ist als Urämietoxin bekannt und spielt bei der Entstehung von Inflammation eine Rolle. Eine Querschnittsstudie kam zu dem Ergebnis, dass bei CNI-Patienten (Stadium 3-4), die einen Phosphatserumspiegel von $\geq 5\text{mg/dl}$ hatten, die Serumspiegel von CRP und IL-6 signifikant erhöht sind [79]. So zeigten auch in vitro-Untersuchungen an mit Kalzium-Phosphat Kristallen stimulierten Makrophagen die Freisetzung von TNF- α , IL-8 und Interleukin-1 β [80].

Die von Spoto et al. zusätzlich zu den TNF- α -Plasmakonzentrationen untersuchten IL-6-Plasmakonzentrationen von CNI-Patienten stiegen bei Patienten mit milder, moderater und schwerer CNI in vergleichbarem Ausmaß an. Dies unterstützt die Hypothese, dass IL-6 eher eine frühe Antwort des Körpers auf die verringerte Nierenfunktion darstellt und weniger als ein akkumulatives Phänomen zu werten ist [76].

Weitere Faktoren, die bei Urämie proinflammatorisch wirken, sind Hypervolämie, Advanced Oxidation Protein Products, Advanced Glycation Endproducts und das durch den Homozystein-Metabolismus entstehende asymmetrische Dimethylarginin. Die drei Letzteren fördern oxidativen Stress, der durch ein Ungleichgewicht zwischen übermäßiger Bildung und/oder der insuffizienten Entfernung hoch aktiver Moleküle, so genannter reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und reaktiver Stickstoffspezies definiert ist [81]. Hieraus resultiert eine verminderte Antioxidationskapazität oder ein Überschuss an freien Radikalen, was zur Schädigung von Zell-Lipiden, Proteinen, Desoxyribonukleinsäure und Endothel-Zellen mit konsekutiver Entstehung von atherosklerotischen Läsionen führt [82].

1.3.3 Hämodialyse als Faktor der Inflammation

CNI-Patienten, die hämodialysiert werden, haben im Vergleich zu peritonealdialysierten Patienten signifikant höhere CRP-Spiegel [83]. Der Grund für die weniger stark ausgeprägte Akute-Phase Reaktion bei der Peritonealdialyse ist wahrscheinlich eine verminderte Induktion der Zytokinproduktion. Beim Prozess der HD können verschiedene Faktoren Inflammation vermitteln. Dazu zählen im Dialysat detektierte bakterielle Zytokin-induzierende Substanzen wie LPS und Exotoxine sowie kurze DNA-Abschnitte mit einer Größe von 6-20 Nukleotiden [84]. Der Rückfluss des Dialysates in den Blutkreislauf, bioinkompatible Membranen sowie die unterschiedlichen Porengrößen verschiedener Membranen sind weitere Gründe, die bei der HD Inflammation hervorrufen können. Der milde Entzündungszustand der Mikroinflammation kann durch die Regelmäßigkeit der HD unterstützt bzw. aufrecht erhalten werden.

1.4 Zusammenhang von Inflammation und kardiovaskulärem Risiko

Die Mortalität von CNI-Patienten ist im Vergleich zur Normalbevölkerung drastisch erhöht. Allein die kardiovaskuläre Mortalität, die rund die Hälfte aller Todesursachen bei CNI-Patienten ausmacht, ist bei terminal Niereninsuffizienten im Vergleich zu Gesunden 30-fach erhöht [85]. Auch in frühen Stadien der Niereninsuffizienz, in denen noch keine Nierenersatztherapie eingeleitet worden ist, ist bereits eine reduzierte geschätzte GFR assoziiert mit einem erhöhten Sterberisiko, kardiovaskulären

Ereignissen und Krankenhausaufenthalten, welche unabhängig von bekannten Risikofaktoren sind [86]. Ursächlich kommt die Gefäßsklerose, aber auch die direkte Zytokinwirkung auf das Myokard in Betracht.

1.4.1 Atherosklerose als inflammatorische Erkrankung

Die erhöhte kardiovaskuläre Mortalität als eine Folge der Atherosklerose lässt sich nicht vollständig durch klassische Risikofaktoren wie zum Beispiel höheres Alter, männliches Geschlecht, arterielle Hypertonie, Hyperlipidämie, Diabetes Mellitus und Rauchen erklären [87]. Neben diesen Risikofaktoren spielt Inflammation bei CNI-Patienten, insbesondere bei dialysepflichtigen Patienten, eine Schlüsselrolle. Zahlreiche Studien konnten einen Zusammenhang zwischen Inflammation und der Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion, deren entscheidende Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose bekannt ist, feststellen. Im gesamten Prozess von der Entwicklung atherosklerotischer Läsionen bis hin zu thrombotischen Komplikationen durch deren Ruptur sind inflammatorische Mediatoren beteiligt [88]. In atherosklerotischen Läsionen wurde CRP lokalisiert, wo es modifiziertes Low Density Lipoprotein bindet. Makrophagen phagozytieren modifiziertes Low Density Lipoprotein und bilden Schaumzellen, welche charakteristisch für atherosklerotische Läsionen sind. Die genaue Funktion von CRP in atheromatösen Plaques ist nicht geklärt, jedoch liegt der Verdacht nahe, dass nicht das native pentamere CRP, sondern das inflammatorische pentamere CRP eine Rolle spielt [89]. Auch PTX3 produzierende Makrophagen und Endothelzellen wurden in arteriosklerotischen Plaques nachgewiesen [53].

Gefäßerkrankungen bei CNI-Patienten

Nakano et al. zeigten in ihren autoptischen Untersuchungen, dass Patienten mit niedriger GFR eine signifikant erhöhte Rate an Koronararterienstenosen hatten. Ebenso war die Prävalenz der Intima-Kalzifikation in den Koronararterien bei diesen Patienten signifikant erhöht. Komorbiditäten wie Diabetes Mellitus oder arterielle Hypertonie scheinen die Kalzifikation und Atherosklerose noch zu begünstigen [90].

Neben der Manifestation der Atherosklerose in den Koronararterien sind weitere Gefäßerkrankungen, die sich peripher und zerebral manifestieren können, mit CNI assoziiert. 7% aller CNI-Patienten und sogar 17-48% der Patienten im Stadium 5 leiden

an peripherer arterieller Verschlusskrankheit [91-93]. Die CHOICE (Choices for Healthy Outcomes in Caring for End-stage-renal-disease (ESRD)) Studie, in die 1.041 Patienten im Stadium 5 der CNI eingeschlossen wurden, untersuchte die Häufigkeit von zerebrovaskulären Ereignissen. Tödliche und nicht tödliche Schlaganfälle, sowie Thrombendarteriektomien der Karotiden wurden als solche Ereignisse gewertet. Demnach liegt die Inzidenzrate bei 4,9 Ereignissen pro 100 Personenjahre und ist somit ungefähr 10 Mal so hoch wie in der Normalbevölkerung [94].

1.4.2 Plötzlicher Herztod und Inflammation

In Studien konnte gezeigt werden, dass Inflammation unabhängig von herkömmlichen kardialen Risikofaktoren einen Einfluss auf den plötzlichen Herztod (sudden cardiac death, SCD) hat. Nachdem demographische Charakteristiken, Komorbiditäten und Laborwerte der CHOICE-Kohorte adjustiert worden waren, ergab sich ein um den Faktor 2 erhöhtes Risiko für den SCD bei Probanden mit CRP- und IL-6-Plasmaspiegeln aus der oberen Tertile im Vergleich zu den Probanden aus der unteren Tertile. Niedrige Spiegel des negativen Akute-Phase Proteins Albumin waren mit einem 1,35-fach erhöhten Risiko für SCD assoziiert. Man vermutet, dass Zytokine die Instabilität von atheromatösen Plaques induzieren könnten oder über direkten Einfluss auf das Myokard und das elektrische Reizleitungssystem des Herzens den SCD triggern [95].

1.5 Hämodialyse mit großporigen Membranen

Im Stadium 5 der CNI akkumulieren Moleküle mit kleinem (<0,5 kDa) und mittlerem (0,5 bis ca. 50 kDa) Molekulargewicht. Kleine, wasserlösliche Moleküle wie Harnstoff (HST), Kreatinin und Phosphat können mit üblicherweise verwendeten High-Flux- (HF) Membranen eliminiert werden. Die limitierte Porengröße der HF-Membranen ermöglicht es jedoch nicht mittlere Moleküle adäquat zu eliminieren. Entscheidend für die Elimination von unterschiedlich großen Molekülen ist der „*molecular weight cut-off*“ (MWCO) einer Membran. Er wird in kDa angegeben und stellt die Trenngrenze dar, ab der die Moleküle dieser Größe zu 90 % zurückgehalten werden. Für gewöhnlich haben HF-Membranen einen MWCO von 10 bis 15 kDa. Urämische Toxine wie β_2 -Mikroglobulin (11,8 kDa) und Leptin (16 kDa), aber auch freie Leichtketten, Myoglobin

und verschiedene Zytokine können somit durch HF-HD nicht ausreichend entfernt werden. In den letzten Jahren wurden High Cut-Off- (HCO) Membranen entwickelt, die durch ihren vergrößerten MWCO die Elimination mittlerer Moleküle erlauben und höhere Siebkoeffizienten erreichen. Als Siebkoeffizienten bezeichnet man den Koeffizient aus Konzentration einer Substanz im Ultrafiltrat und im Blut. Er ist spezifisch für jede Substanz und variiert je nach eingesetzter Dialysemembran. Für Substanzen, die die Dialysemembran ungehindert passieren können, ist der Siebkoeffizient 1. Für Substanzen, welche die Membran nicht passieren können, ist er 0.

In der Arbeit von Kneis et. al. konnte gezeigt werden, dass die Dialyse mit großporigen Membranen der konventionellen HF-Dialyse bzgl. der Elimination von Mittelmolekülen überlegen ist. Im Dialysat fand sich nach HCO-Dialyse signifikant mehr β_2 -Mikroglobulin, löslicher Tumor Nekrose Faktor Rezeptor und Faktor D im Vergleich zum Dialysat der HF-Membran [96]. Ein höherer Siebkoeffizient für die genannten Mittelmoleküle wurde erreicht.

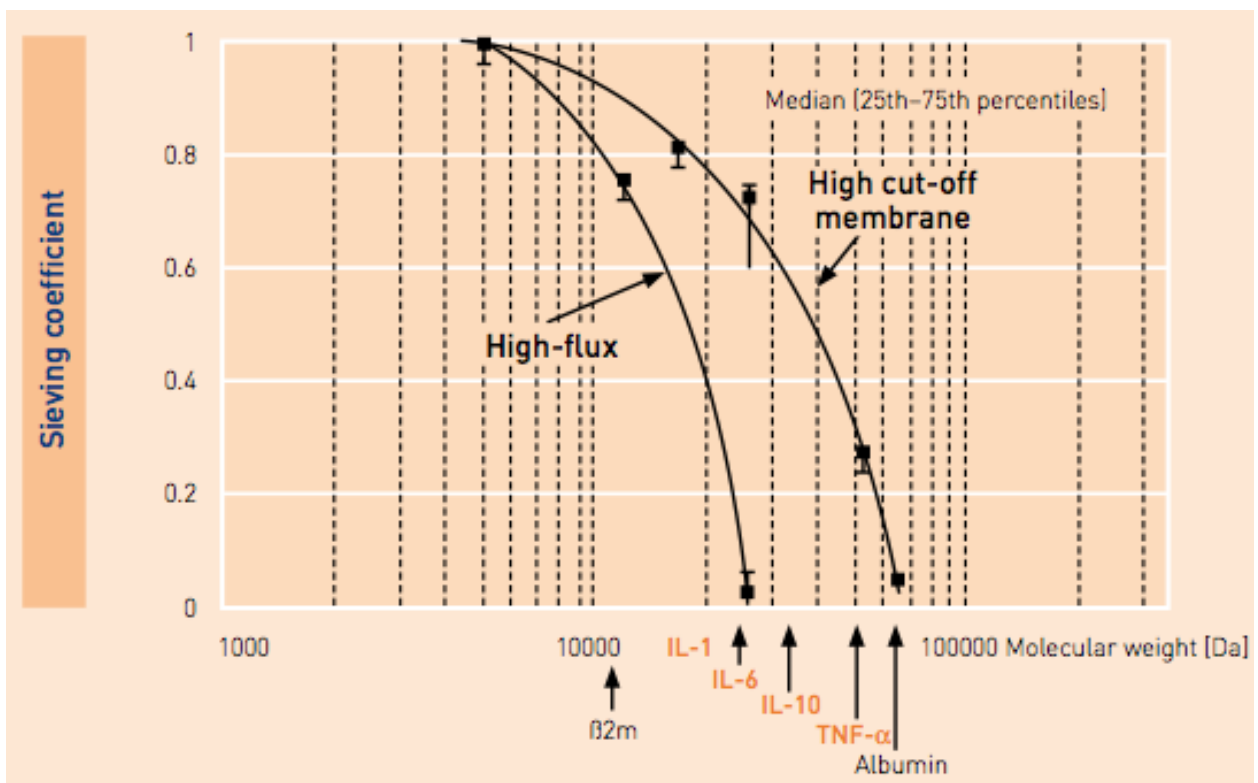


Abbildung 3: Ex vivo Siebkoeffizienten für Zytokine und Albumin [97]

1.5.1 Indikation von High Cut-Off-Membranen

Zum Einsatz kommen HCO-Membranen, wenn mittels konventioneller Nierenersatztherapie Moleküle aufgrund ihrer Größe nicht eliminiert werden können und diese so zu Schäden führen oder schädliche Prozesse im menschlichen Körper einleiten. Bekannte Krankheitsbilder, bei denen der Einsatz von großem Nutzen ist, sind das Plasmozytom, Rhabdomyolyse und Sepsis.

Plasmozytom

Bei Patienten mit Plasmozytom kann es durch die übermäßige Produktion der freien Leichtketten κ und λ zur Nierenschädigung kommen. Die Molekülgröße der Leichtketten beträgt ca. 22,5 kDa für Monomere. Da die freie Leichtkette λ meist als Dimer vorliegt, beträgt sie ca. 45 kDa. Sowohl in vitro- als auch in vivo-Untersuchungen von Hutchison et al. kamen zu dem Ergebnis, dass die Reduktionsrate der freien Leichtketten κ und λ bei HD mit dem HCO 1100 Hemofilter signifikant höher ist im Vergleich zur HD mit HF-Membranen [98].

Rhabdomyolyse

Akutes Nierenversagen (ANV) ist eine der Hauptkomplikationen bei Patienten mit Rhabdomyolyse. Das von verletztem Muskelgewebe in die Blutzirkulation sezernierte Myoglobin (17,8 kDa) wird in den Glomeruli filtriert und führt dabei wahrscheinlich durch intrarenale Vasokonstriktion, direkte und ischämische Tubulusschädigung und Tubulusobstruktion zu renaler Schädigung [99]. In einer Studie von Premru et al. [100] wurden 6 Patienten mit ANV aufgrund von Rhabdomyolyse mit einer HCO-Membran hämodiafiltriert. Nach insgesamt 10 Sitzungen lag die mittlere Myoglobin-Clearance bei 80,7 ml/min und die mittlere Reduktionsrate von Myoglobin bei 76,8 %. Die Studie demonstrierte erstmals eine hoch effiziente Myoglobin-Elimination bei Rhabdomyolyse-bedingtem ANV.

Sepsis

ANV als Komplikation einer Sepsis ist mit einer sehr hohen Morbidität und Mortalität assoziiert. Die exzessive Freisetzung von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen in die Blutzirkulation führt dabei zu einer Störung der Organfunktion, bis hin zum

möglichen Multiorganversagen. Da die meisten Zytokine ein Molekulargewicht von 8 – 70 kDa haben, ist ihre Clearance während HD mit gängigen Dialysemembranen gering.

Bereits 2002 konnten Uchino et al. in einem ex-vivo Experiment mit einer Super-HF Dialysemembran mit einem nominellen MWCO von 100 kDa nachweisen, dass man höhere Siebkoeffizienten für Zytokine (Interleukin-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 und TNF- α) erreicht [101]. In einer randomisierten Phase-1-Studie, in der 10 septische Patienten mit ANV im Stadium F der RIFLE-Kriterien (Risk, Injure, Failure, Loss, ESRD) eingeschlossen wurden, gelang der Nachweis, dass die Plasmakonzentrationen von IL-6 (26 kDa), IL-8 (6-8 kDa) und IL-10 (35-40 kDa) mittels intermittierender HCO-HD im Vergleich zu HF-HD signifikant gesenkt werden konnten. Unerklärlich blieb, warum die Plasmakonzentration von Interleukin-18, einem Molekül geringerer Größe als IL-6, nicht signifikant gesenkt wurde [102].

1.5.2 Limitation der High Cut-Off Hämodialyse

Ein nicht zu vernachlässigendes Problem ist der erhöhte Proteinverlust, vor allem von Albumin, durch die großporige Membran. Die Molekülgröße von Albumin liegt ungefähr bei 66 kDa, sodass einige Moleküle die Poren durchqueren können. Eine randomisierte, doppelblinde Cross-Over Studie von Lee et al., in der 8 stabile HD-Patienten entweder zunächst für 2 Wochen HF-HD oder HCO-HD erhielten und nach einer 1-wöchigen Auswaschphase mit der alternativen Membran für 2 Wochen dialysiert wurden, hatte als sekundären Endpunkt die Serum-Albumin-Konzentration. Es zeigte sich zwar keine signifikante Reduktion der Serum-Albumin-Konzentration nach jeder Dialyseeinheit mit der HCO-Membran, jedoch kam es zu einer signifikanten Abnahme der medianen Konzentration um 5,5 g/l nach der 2-wöchigen HCO-Phase [103]. Auch in der zuvor genannten Studie zur Behandlung des ANV als Komplikation einer Sepsis kam es zu signifikantem Albuminverlust nach HCO-Anwendung [102]. Die Autoren der Plasmozytom- [98] und Rhabdomyolyse-Studie [100] erfassten die Albumin-Konzentration in ihren Ergebnissen zwar nicht, substituierten jedoch einen zu erwartenden Albuminverlust mit Humanalbumin.

Wichtige Gerinnungsparameter, wie etwa die Proteine Antithrombin 3, Protein C und Prothrombin, fallen mit ihrer Molekülgröße von 62-69 kDa in den Bereich, in dem es

durch HCO-HD zu potentiellen Verlusten kommen kann. Morgera et al. evaluierten die Vor- und Nachteile der großporigen Hämofiltration und kontrollierten dabei engmaschig die Gerinnungsparameter. Dabei konnten sie keine signifikanten Verluste von Antithrombin 3, Protein C und Prothrombin messen [104].

1.6 Fragestellung

HD-Patienten unterliegen im Vergleich zur Normalbevölkerung einer erhöhten Morbidität und Mortalität. Ursächlich kommt auch der Zustand der chronischen Mikroinflammation durch die verringerte und ausgefallene Nierenfunktion sowie den Prozess der HD in Betracht. Bei akuten systemischen Entzündungszuständen, wie bei Sepsis, konnte bereits ein Nutzen der HCO-Membran gezeigt werden. Diese Dissertationsschrift soll Erkenntnisse darüber liefern, ob die regelmäßige Anwendung der HCO-Membran den chronischen Entzündungszustand bei CNI-Patienten senken kann.

Folgende Fragen sollen in dieser Arbeit beantwortet werden:

1. Kann HD mit einer HCO-Membran Inflammation bei terminal Niereninsuffizienten senken?
2. Wie ist der Einfluss der HCO-Membran auf die Pentraxine CRP und PTX3?
3. Wie ist der Einfluss der HCO-Membran auf die Interleukine IL-6 und IL-10?

Ein wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunantwort ist die Rekrutierung von Leukozyten hinzu inflammatorischen Herden. Zelluläre Adhäsionsmoleküle, die unter anderem durch Signale von Chemokin-Rezeptoren verstärkt exprimiert werden sind daran beteiligt. Bisher gibt es keine Studien, die den Einfluss der HCO-Membran auf die Expression von zellulären Adhäsionsmolekülen und Chemokin-Rezeptoren untersuchen.

4. Wie verändert sich die Expression von PSGL-1 (CD162) auf Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten während Dialyse mit HCO-Membranen?

5. Wie verändert sich die Expression des Chemokinrezeptors CXCR-1 (CD181) auf Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten während Dialyse mit HCO-Membranen?

6. Wie verändert sich die Expression des Integrins Mac-1 (CD11b) auf Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten während Dialyse mit HCO-Membranen?

Es ist bekannt, dass es durch die HCO-Membran zu Verlusten von Albumin kommen kann. In dieser Studie wurde die Albumin-Konzentration gemessen, um die Frage zu beantworten:

7. Kommt es zu einem signifikanten Albuminverlust während Dialyse mit HCO-Membranen?

2. Material

ELISA-Platten	Nunc MaxiSorp (446612), Alexis Biochemicals, Lausen, Schweiz
epT.I.P.S.® Pipettenspitzen 10-100 µl und 100-1000 µl	Eppendorf, Köln, Deutschland
Handschuhe Micro-Touch L	Nitra-Tex
Heraeus Megafuge 11 R	Thermo Scientific, Waltham, USA
Centrifuge	
IL-6-ELISA Kit	Quantikine® HS ELISA Human IL-6 Immunoassay (HS600B), R&D Systems, Minneapolis USA
IL-10-ELISA Kit	Quantikine® ELISA Human IL-10 Immunoassay (D1000B) R&D Systems, Minneapolis, USA
Kühlschrank 4°C	Privileg, Deutschland
Kühlschrank Profi-Line	Liebherr
Messzylinder 100 ml, 1000 ml	Duran Hirschmann EM, Eberstadt, Deutschland
Mikroplatten Reader FLUOstar OPTIMA	BMG Labtech, Offenburg, Deutschland
Mikroplatten Schüttler Titramax 100	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Photometer Ultrospec 2000	Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
Pipette ep/T.I.P.S (µl) 2-200 und 50-1000	Eppendorf, Köln, Deutschland
PTX3-ELISA Kit	PTX3 (human) Detection Set (ALX-850-299) Alexis Biochemicals, Lausen, Schweiz
	- PTX3, mAb, (MNB4) [Capture Antibody] (ALX-804-464)
	- PTX3 (human) (rekombinant) (ALX-201-224)
	- PTX3, pAb (Biotin) [Detection Antibody] (ALX-210-365B)
Spritzflasche	Kautex Textron, Bonn, Deutschland
Streptavidin- Meerrettichperoxidase	Amersham, Braunschweig, Deutschland

Tiefkühltruhe C54285	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Vortexer Reax 2000	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Zentrifuge Jouan CR422	Thermo Scientific, Waltham, USA

Material von Beckton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

BD Vacutainer®, 3 ml K EDTA (1,8 mg/ml) (368499)	FITC Mouse Anti-Human CD181 (555939)
BD Vacutainer®, SST II Advance 5 ml	PE Mouse Anti-Human CD11b/Mac-1 (555388)
FACS Calibur	PE Mouse Anti-Human CD162 (556055)
FACSFlow™	Simultest Control γ 2a/ γ 1 (Ig2a FITC/IgG1 PE) (340394)
Falcon-Röhrchen 5 ml	Simultest LeucoGATE (CD45/CD14) (340040)

Tabelle 3: Material von Beckton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

2.1 Puffer und Lösungen

Casein 0,2 % (1)	Waschpuffer
- 2 g Casein 1 % auf 200 ml 1xPBS - 10ml-weise portionieren und einfrieren - 2 min in der Mikrowelle auftauen - mit 1:5 PBS-Azid verdünnen	900 ml A.d. 100 ml PBS-Azid 10-fach 100 µl Tween®20 (1)
Coating-Puffer (2)	PBS-Azid (Durchflusszytometrie)
- 0,7 g Natriumhydrogenkarbonat + 26 ml destilliertes Wasser (A.d.) (3) - 1,57 g Natriumkarbonat + 74 ml A.d.	0,2 g/l Natriumazid 0,037 g/l EDTA
Gallatipuffer (2)	PBS-Azid 10-fach (ELISA) (2)
42 g/l Zitronensäure-Monohydrat 4 N Kaliumhydroxid Wasserstoffperoxid 30 % (68 µl/200 ml Gallati-Lösung)	2,1 g/l Kaliumdihydrogenphosphat 90 g/l Natriumchlorid 7,26 g/l Natriumhydrogenphosphat
Lysing-Puffer	TMB-Lösung
82,9 g/l Ammoniumchlorid 10,2 g/l Kaliumhydrogenkarbonat 292 mg/l EDTA	- 240 mg Tetramethylbenzidin (4) - 5 ml Dimethylsulfoxid (1) - 5 ml Ethanol (100 %) (5)
Schwefelsäure (2)	
10,65 ml 4 N Schwefelsäure + 100 ml A.d.	

Tabelle 4: Puffer und Lösungen

- (1) Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
- (2) Merck, Darmstadt, Deutschland
- (3) B.Braun, Melsungen, Deutschland
- (4) Fluka, Buchs, Deutschland
- (5) Herbeta Arzneimittel, Berlin, Deutschland

3. Methoden

3.1 Studiendesign

Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Charité am 20.10.2008 genehmigt. Die Studie ist eine monozentrische kontrollierte offene Cross-Over-Studie im ABA-Design, die die HD mit einer HCO-Membran bei Patienten mit HD-pflichtiger chronischer Niereninsuffizienz in Bezug auf die Veränderung von Entzündungsmediatoren und der Mikroinflammation im Vergleich zur konventionellen HF-HD mit einem Polyamid PF14S Dialysator bewerten soll. Dazu wurden die Probanden zunächst drei Wochen, drei Mal pro Woche, mit einer regulären HF-Membran dialysiert, anschließend drei Wochen, drei Mal pro Woche, mit einer HCO-Membran und abschließend wiederum für drei Wochen, drei Mal pro Woche, mit der regulären HF-Membran. Vor jeder zweiten Dialyse-Behandlung einer Woche, mit Ausnahme der Wochen 1 und 7, wurden Blutproben entnommen. Zusätzlich wurden in den Wochen 3, 6 und 9 nach der Behandlung Blutproben entnommen. Das entnommene Gesamtvolumen betrug bei jedem Patienten circa 90 ml Blut während der Studiendauer. Die Proben wurden nach der Entnahme in das Zentrallabor der Charité Universitätsmedizin Berlin transportiert und dort durchflusszytometrisch, mittels Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) und entsprechenden Methoden aus dem Zentrallabor untersucht (siehe unten).

Das Studiendesign in der Übersicht:

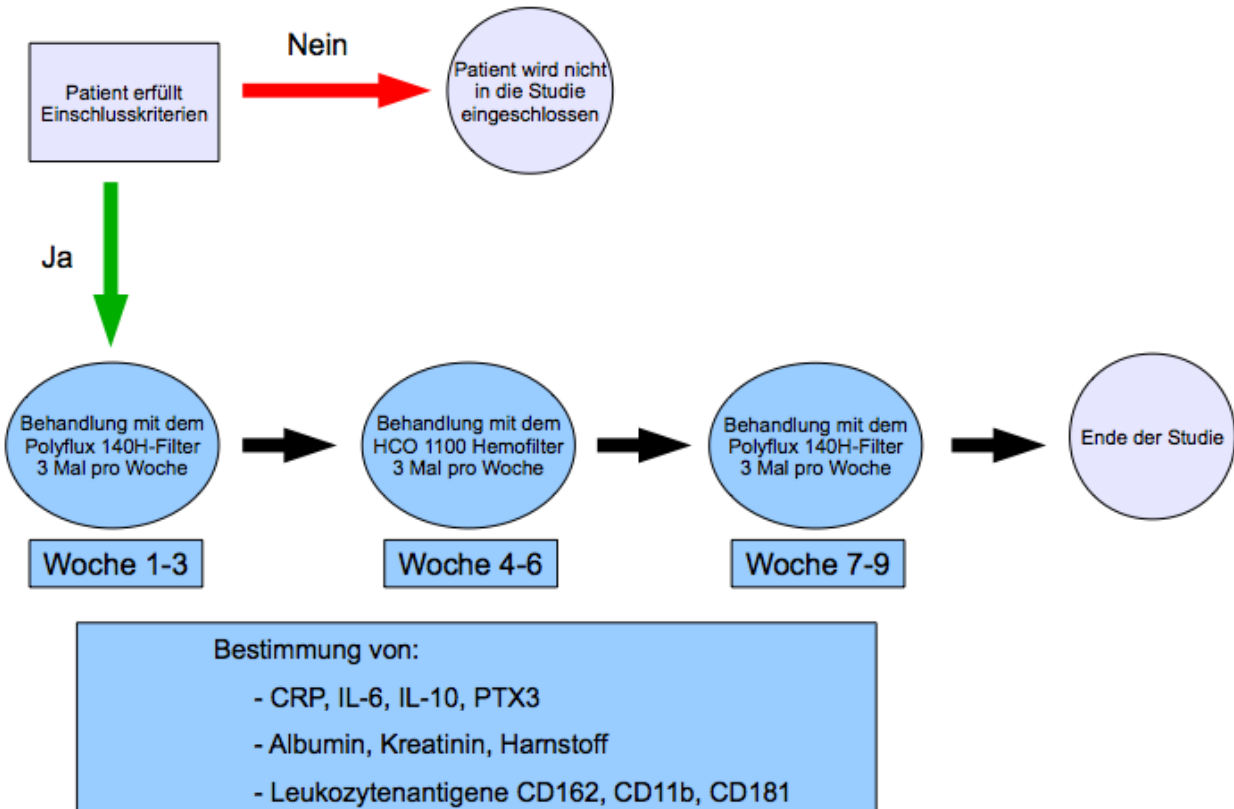


Abbildung 4: Das Studiendesign in der Übersicht

3.2 Endpunkte

Primäre Endpunkte der Studie waren die Bestimmung der Plasmaspiegel von CRP, IL-6 und IL-10. Sekundäre Endpunkte waren die Bestätigung der Sicherheit der HD mit dem Gambro HCO 1100 Hemofilter bei Patienten mit ESRD, weiterhin der Einfluss auf den Serum-Albumin- und Serum-PTX3-Spiegel sowie auf die Expression der Leukozytenantigene CD162, CD11b und CD181.

3.3 Ein- und Ausschlusskriterien

Einschlusskriterien waren Alter > 18 Jahre, seit mindestens 6 Monaten aufgrund von ESRD HD-pflichtig, eine unterschriebene Einwilligungserklärung und ein Serum-CRP Wert von > 0,5 mg/dl oder ein Serum-Albumin Wert von < 3,8 mg/dl in den letzten 6 Monaten. Ausschlusskriterien waren hämodynamische Instabilität, eine fortgeschrittene

maligne Erkrankung oder signifikante Komorbidität mit schlechter Kurzzeitprognose, bekannte HIV-Infektion, aktive unkontrollierte Infektion, Schwangerschaft oder Stillzeit.

3.4 Patienten

Insgesamt wurden 15 Patienten in die Studie aufgenommen, 7 Frauen und 8 Männer im Alter von 44 bis 79 Jahren. Ihnen war es zu jeder Zeit erlaubt von der Studie zurückzutreten. Vor Beginn der Studie trat ein Proband aufgrund einer bei ihm durchgeführten Nierentransplantation freiwillig zurück. Für jeden rekrutierten Patienten wurde eine Patientendokumentation angelegt, in welcher die Anamnese, die Ein- und Ausschlusskriterien, Gründe für den Studienaustritt, die Dokumentation der Nebenwirkungen und die Dokumentation der Dialyse erfasst wurden.

Die nephrologischen Grunderkrankungen der Patienten, Alter und Geschlecht sowie Anzahl der Monate an HD vor Beginn der Studie sind in Tabelle 5 aufgelistet:

	Alter	Geschlecht	Anzahl an HD-Monaten	Nephrologische Grunderkrankung
1	71	w	17	Diabetische Nephropathie
2	65	m	27	autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD)
3	50	w	10	ADPKD
4	74	m	21	V.a. membranöse Glomerulonephritis
5	63	w	27	ADPKD
6	47	m	118	Thrombotische Mikroangiopathie
7	64	w	7	Nephroangiosklerose
8	63	m	46	Nephroangiosklerose
9	70	w	11	Diabetische Nephropathie
10	55	m	9	Fokal segmentale Glomerulosklerose
11	75	m	129	Chronische Glomerulonephritis
12	62	m	17	Diabetische Nephropathie
13	44	w	11	Rezidivierende Pyelonephritiden
14	46	w	6	Chronische Glomerulonephritis
15	79	m	21	Diabetische Nephropathie

Tabelle 5: Patienteninformationen

3.5 HCO 1100 Hemofilter

Der HCO 1100 Hemofilter ist eine High Cut-Off Hohlfaser-Membran mit einer effektiven Membranoberfläche von 1,1 m² und einer größeren Porengröße im Vergleich zu gängigen Dialysemembranen. Die Membran besteht aus einer asymmetrischen 3-schichtigen Struktur, einer sehr dünnen selektiven inneren Schicht, einer schwammartigen mittleren Schicht und einer makroporösen äußeren Schicht. Das Material der Membran besteht aus einem Gemisch aus Polyarylethersulfon (PESU) als hydrophobes Basenpolymer und Polyvinylpyrrolidon (PVP) als hydrophile Komponente. Blut-Membran-Interaktionen werden durch diese Mikrodomänen minimiert, sie sind die Basis für die Biokompatibilität der Membran [105].

3.5.1 Technische Details der Hemofilter

In der nachfolgenden Tabelle sind einige Details der beiden Hemofilter aufgeführt:

Hemofilter	HCO 1100	Polyflux 140 H
Membranoberfläche (m ²)	1,1	1,4
Wandstärke (µm)	50	50
Innendurchmesser (µm)	215	215
Porendurchmesser (nm)	10	Keine Angabe
Sterilisationsart	Dampf	Dampf
Sterile Barriere	Medizinisches Papier	Medizinisches Papier
Membran	PESU/PVP	PolyamixTM (PESU/PVP)
Vergussmasse	Polyurethan	Polyurethan
Gehäuse und Kappen	Polycarbonat	Polycarbonat
Sterilanschlüsse	Polypropylen	Polypropylen
Clearance Vit B12 (ml/min), QB=300 ml/min, UF=0 ml/min	140	149
Clearance Harnstoff (ml/min), QB=300 ml/min, UF=0 ml/min	239	262

Tabelle 6: Technische Details der Hemofilter [105, 106]

3.6 Dialysedetails

Die Behandlung erfolgte ausschließlich im HD-Modus und nur an Dialysegeräten, die mit einem Endotoxin-Filter ausgestattet waren. Die gewählte Puffersubstanz der Dialysatlösung war Natriumbikarbonat. Antikoagulation während der HD erfolgte mit

Heparin-Natrium als Bolus sowie kontinuierlicher Gabe. Der Zielbereich der Activated Clotting Time lag zwischen 180 und 200 Sekunden, um eine adäquate Heparinisierung zu gewährleisten. Dialysatflußrate QD (ml/min) und Blutflußrate QB (ml/min) sollten in allen 3 Phasen konstant sein, sodass die einzige Variable die Dialysemembran ist. Vorgaben für Dialysatflußrate und Blutflußrate waren 500 ml/min und 250 ml/min. Während der HD wurden Herzfrequenz, Blutdruck und Sauerstoff-Sättigung vom Pflegepersonal überwacht.

3.7 High-Flux- und HCO-Phasen

3.7.1 Woche 1 - 3

Die Patienten wurden in der 1. Phase der Studie mit einer konventionellen High-Flux-Membran, einer Polyflux 140H-Membran von der Firma Gambro dialysiert. Die Blutflußrate lag im Mittel bei 326 ml/min. In den Wochen 2 und 3 wurden vor der jeweiligen 2. HD der Woche Blutproben entnommen, in der Woche 3 zusätzlich auch nach der HD.

3.7.2 Woche 4 – 6

In der 2. Phase erfolgte die HD mit einer HCO-Membran, dem Gambro HCO 1100 Hemofilter. Die mittlere Blutflußrate lag bei 312 ml/min. Wie in Phase 1 wurden den Patienten vor jeder 2. HD einer Woche, also in den Wochen 4, 5 und 6, Blutproben entnommen, in Woche 6 auch nach der HD.

3.7.3 Woche 7 – 9

In der 3. Phase der Studie wurden die Patienten wiederum mit der Polyflux 140H-Membran dialysiert. Die mittlere Blutflußrate betrug 318 ml/min. Blutentnahmen erfolgten analog zu Phase 1 in Woche 8 und 9 vor der jeweils 2. HD sowie in Woche 9 auch nach der HD.

3.8 Bestimmung von IL-6 und IL-10

Die Bestimmung erfolgte im nephrologischen Labor Abteilung AG Schindler der Charité Universitätsmedizin-Berlin. Die IL-6- und IL-10-Konzentrationen wurden mittels

hochsensitiven ELISA (R&D Systems) bestimmt. Das benötigte Material war in den jeweiligen Kits enthalten. Ein für IL-6 oder IL-10 spezifischer monoklonaler AK ist auf der Mikrotiterplatte vorgecoated.

Als Erstes wurde eine 96-Well Mikrotiterplatte mit 100 μ l (IL-6) oder 50 μ l (IL-10) Assay Lösung pro well pipettiert, um unspezifische Bindungen zwischen Proteinen der Blutproben und dem Material der Mikrotiterplatte zu reduzieren.

Nun konnten Standard und Proben aufgetragen werden. Die Verdünnungsreihe wurde für IL-6 und IL-10 aus einem Standardstock erzeugt, der mit Reagenzlösung auf 10 pg/ml (IL-6) oder mit destilliertem Wasser auf 5000 pg/ml (IL-10) verdünnt ist. In jede Standardvertiefung wurden 500 μ l Verdünnungslösung für IL-6 pipettiert. Für IL-10 wurden 900 μ l Verdünnungslösung in die Vertiefungen A1 und A2, sowie 500 μ l in die übrigen Vertiefungen pipettiert. Aus dem rekonstituierten Standardstock wurden 500 μ l für IL-6 und 100 μ l für IL-10 in die Vertiefungen A1 und A2 pipettiert. Deren Inhalt wurde durch wiederholtes Aufsaugen und Zugeben gut durchmischt. Nun wurden 500 μ l aus den Vertiefungen A1 und A2 in die Vertiefungen B1 und B2 transferiert. Diese Verdünnungsschritte wurden 5 Mal wiederholt, wodurch jeweils 2 Verdünnungsreihen (Doppelbestimmung) mit den Konzentrationen von 5 pg/ml bis 0,156 pg/ml für IL-6 und von 500 pg/ml bis 7,8 pg/ml für IL-10 hergestellt wurden. Das letzte Well der Reihen 1 und 2 ist der Blindwert und enthält nur Verdünnungslösung.

Von den Proben werden jeweils 100 μ l (IL-6) oder 200 μ l (IL-10) in die Wells pipettiert. Die Platte wurde mit Parafilm bedeckt und inkubiert bei Raumtemperatur 2 Stunden auf einem horizontal stehenden Mikroplatten Schüttler bei 500 1/min. Nach der Inkubation wurde die Platte ausgeklopft und mit 400 μ l des jeweiligen Waschpuffers gewaschen. Ausklopfen und Waschen wurden insgesamt 6 Mal (IL-6) und 4 Mal (IL-10) wiederholt. Nach dem letzten Waschen erfolgte durch vorsichtiges Klopfen auf die umgedrehte Mikrotiterplatte die Entfernung des überschüssigen Waschpuffers.

Im nächsten Schritt benötigt man einen sogenannten Detection-AK, der gegen das jeweilige Zytokin gerichtet ist und an ein die Farbreaktion katalysierendes Enzym gebunden ist. Das mitgelieferte IL-6-Konjugat ist ein polyklonaler Detection-AK gegen IL-6, der mit einer alkalischen Phosphatase konjugiert ist und das im Kit enthaltene IL-10-Konjugat ist ein monoklonaler Detection-AK gegen IL-10, der mit einer Meerrettich-Peroxidase konjugiert ist. 200 μ l des jeweiligen Konjugats wurden nun auf jedes Well

pipettiert, die Mikrotiterplatte mit Parafilm bedeckt und eine Inkubationszeit von 2 Stunden bei Raumtemperatur abgewartet. Das zuvor beschriebene Waschen mit 400 μ l Waschpuffer wurde wiederholt. Es erfolgte nun die Zugabe der Substratlösung. Für IL-6 wurden 50 μ l NADPH auf jedes Well aufgetragen. Die Substratlösung für IL-10 bestand zu gleichen Teilen aus Color Reagent A (Wasserstoffperoxid) und B (Tetramethylbenzidin). Insgesamt wurden 200 μ l pro Well aufgetragen.

Die Mikrotiterplatte wurde wiederum mit Parafilm bedeckt und inkubiert für 60 (IL-6) beziehungsweise 30 Minuten (IL-10) bei Raumtemperatur. Im Anschluss daran wurde nur auf die IL-6 Wells 50 μ l Iodonitrotetrazolium-Violett-haltige Verstärkungslösung pipettiert, die eine Farbreaktion induzierte. Die Platte wurde mit Parafilm bedeckt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Hinzugabe von 50 μ l Stopplösung (1 mol/l Schwefelsäure) auf jedes well beider Mikroplatten blockierte den Farbumwandlungsprozess des Substrates und führte nur bei IL-10 zu einem Farbumschwung von blau zu gelb. Innerhalb von 30 Minuten erfolgte die photometrische Auswertung bei einer Wellenlänge von 490 (IL-6) beziehungsweise 450 (IL-10) nm mit einer Korrektur der Wellenlänge auf 650 (IL-6) beziehungsweise 540 (IL-10) nm.

3.9 Bestimmung von PTX 3

Die Bestimmung erfolgte ebenfalls im nephrologischen Labor Abteilung AG Schindler der Charité Universitätsmedizin-Berlin mittels hochsensitiven ELISAs.

Zunächst wurden 100 μ l eines monoklonalen AKs in jede Vertiefung einer 96-Well Mikrotiterplatte aufgetragen. Durch Zugabe von 100 μ l eines 1 μ g/ml konzentrierten Coating-Puffers bindet der AK an eine feste Phase. Die Mikrotiterplatte inkubiert über Nacht bei 4 °C. Nach der Inkubation wurde die Platte 3 Mal mit 300 μ l Waschpuffer (PBS + 0,05% Tween 20) pro Well gewaschen und anschließend unspezifische Bindungen durch Zugabe von 300 μ l 0,2 % Casein in PBS blockiert.

Nach erneuter Inkubation für 2 Stunden bei Raumtemperatur wurde die Mikrotiterplatte wieder 3 Mal mit dem Waschpuffer gewaschen. Nun wurden 50 μ l des zu untersuchenden Materials, in diesem Fall des EDTA-Blutes der Probanden, und in doppelter Ausführung 50 μ l des rekombinanten humanen PTX3 Standards (75 pg/ml bis

2,4 ng/ml) in jedes Well pipettiert und für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Die Mikrotiterplatte wurde 5 Mal mit Waschpuffer gewaschen und nun 100 µl eines polyklonalen biotinylierten AKs mit einer Konzentration von 50 ng/ml in Waschpuffer in jedes Well gegeben. Bei 37°C inkubierte die Mikrotiterplatte dieses Mal 1 Stunde. Im Anschluss erfolgte das Waschen der Mikrotiterplatte mit 300 µl Waschpuffer 5 Mal hintereinander, um nicht gebundene AK zu entfernen.

Die Farbreaktion wurde eingeleitet durch die Zugabe des katalysierenden Enzyms, eine an Streptavidin gebundene Meerettich-Peroxidase (100 µl in jede Vertiefung). Wiederum wurde die Mikrotiterplatte 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und danach abschließend 5 Mal mit Waschpuffer gewaschen. Das im Anschluss aufgetragene Chromogen, welches erst kurz vorher hergestellt wurde, bestand aus einer 1:100 Mischung aus Tetramethylbenzidin und Gallatipuffer. Nach der Zugabe von 150 µl TMB-Lösung pro Well, 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur und dem Beenden der Farbreaktion mittels 50 µl 4-molarer Schwefelsäure konnte die optische Dichte nach 30 Minuten bei einer Wellenlänge von 450 nm beziehungsweise 540 nm (Referenzfilter) gemessen werden.

3.10 Bestimmung von CRP

Die CRP-Bestimmung erfolgte im Zentrallabor des Virchow-Klinikums mit dem CRP Dynamic HIT / CRP Dynamic HIT917. Dabei gelingt der Nachweis von CRP mit einem partikel-verstärkten immunologischen Trübungstest. Menschliches CRP agglutiniert mit Latexpartikeln, die mit monoklonalen Anti-CRP-AK beschichtet sind. Die entstehenden Aggregate können turbidimetrisch bestimmt werden [107, 108].

3.11 Durchflusszytometrie

3.11.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Mit Durchflusszytometern gelingt die quantitative Vermessung und molekulare Charakterisierung intakter Zellen. Dabei wird eine Suspension von Zellen an einem optischen Messgerät, einem Laserstrahl als monochromatischer Lichtquelle, vorbeigeführt. Hüllflüssigkeit sorgt dafür, dass die Zellen einzeln den Laserstrahl passieren. Hierzu werden Pufferlösungen, Kochsalzlösungen oder auch, mit Ausnahme bei funktionellen Untersuchungen, destilliertes Wasser eingesetzt. Passieren die zuvor

mit fluoreszierenden AK behandelten Zellen den Laserstrahl, absorbieren die Fluoreszenzfarbstoffe die Energie des Laserlichtes und emittieren daraufhin ein Photon größerer Wellenlänge und geringerer Energie. Dabei kehren die Fluoreszenzfarbstoffe in ihren energetischen Grundzustand zurück. Das in einem rechten Winkel zum Laserstrahl abgelenkte Licht ist die Seitwärtslichtstreuung, die durch Filter und Farbteilerspigel getrennt wird und Informationen über die Granularität der Zelle gibt. Um die Lichtsignale in den verschiedenen Spektralbereichen zu detektieren, werden Photomultiplier eingesetzt, die Lichtsignale in elektrische Signale umwandeln. Photomultiplier werden mit zunehmendem spektralen Abstand vom Anregungslicht aufsteigend nummeriert (FL-1, FL-2, FL-3). So erkennt der FL-1 Detektor grünes Licht, der FL-2 Detektor oranges Licht und der FL-3 Detektor rotes Licht nach Anregung mit dem blau-grünen Licht eines 488-nm-Argon-Lasers.

Das Vorwärtsstreulicht ist die Lichtstreuung der Zellen in einem engen Winkel zum Laserlicht. Grob betrachtet gibt die Vorwärtslichtstreuung Auskunft über die Größe der Zellen, je nach Gerät ab einer Zellgröße von 0,5 bis 1 μm [109].

3.11.2 Messung der Proben

Vom Verfasser dieser Dissertation wurden die durchflusszytometrischen Messungen und Analysen selbsttätig durchgeführt. Die Messungen wurden mit dem FACSCalibur von Beckton Dickinson durchgeführt, einem automatischen 4-Farben Durchflusszytometer, das sich zur Immunphänotypisierung eignet. Die vorbereiteten Proben wurden in die Gefäßhalterung gestellt und nach dem Starten der Messung dem Durchflusszytometer unter starkem Druck zugeführt. Die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe Phycoerythrin (PE) und Fluoresceinisothiocyanath (FITC) absorbieren das Laserlicht mit einer Wellenlänge von 488 nm und emittieren daraufhin Licht unterschiedlicher Wellenlängen. Das Emissionsspektrum von PE hat sein Maximum bei 578 nm, das von FITC bei 520 nm. Die beiden Emissionsspektren sind so gut voneinander zu unterscheiden, sodass verschiedene Photomultiplier die emittierten Fluoreszenzen der PE-markierten AK CD162 und CD11b sowie der FITC-markierten AK der Isotypkontrolle und CD181 detektieren können. Abbildung 5 stellt das Schema des optischen Systems des FACSCaliburs von Beckton Dickinson dar, in Tabelle 7 sind die Absorptions- und Emissionsmaxima von PE und FITC dargestellt.

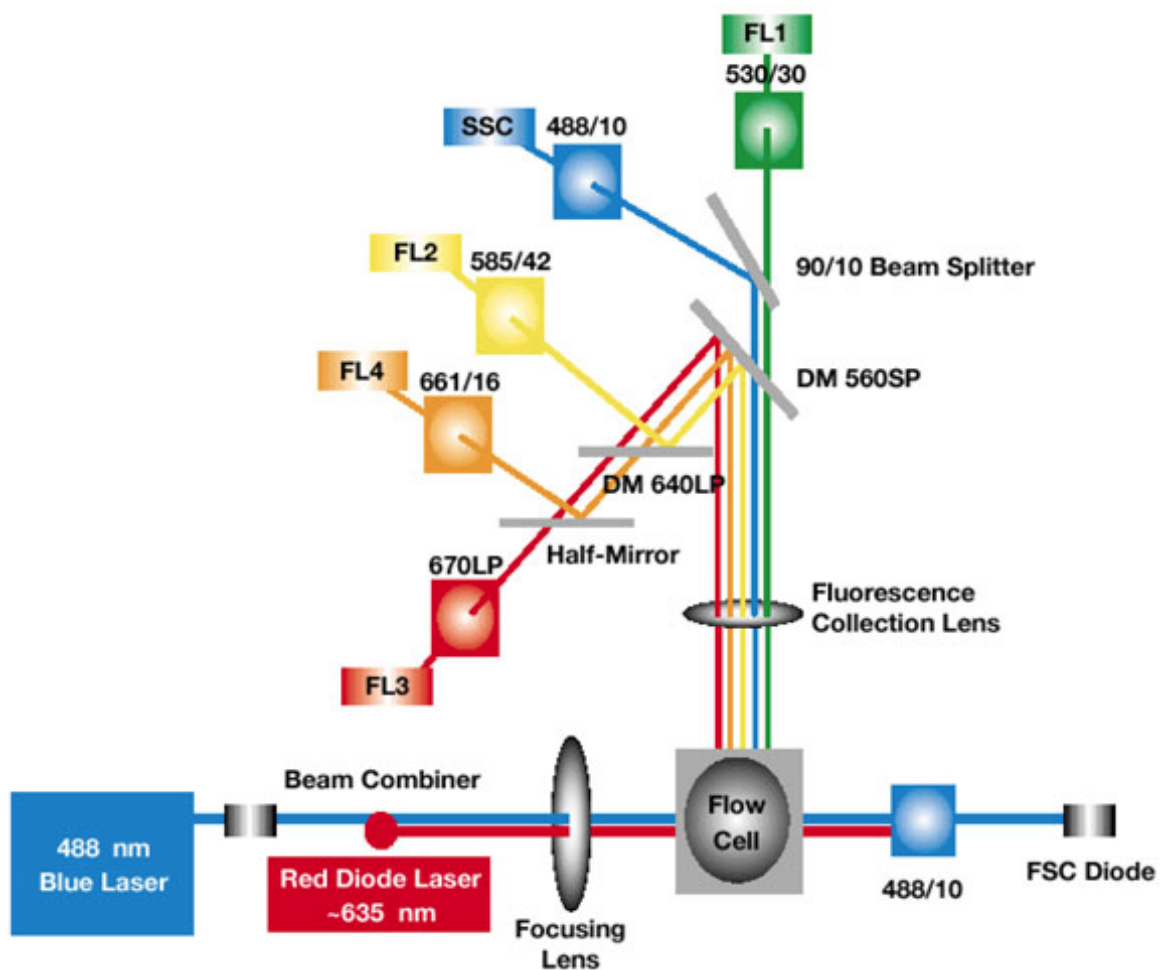


Abbildung 5: Schema des optischen Systems des FACSCaliburs

Das automatische 4-Farben Durchflusszytometer verfügt über zwei Laser, einen luftgekühlten blauen Argonlaser (488 nm) und einen roten Diodenlaser (635 nm). Farbteilerspiegel und Filter trennen das Seitwärtsstreulicht so auf, dass Photomultiplier Fluoreszenzen in verschiedenen Bereichen detektieren können (FITC 530 nm, PE 585 nm, APC 661 nm, PerCP 670 nm) [110].

(<http://www.bdbiosciences.com/instruments/facscalibur/features/index.jsp>)

Fluoreszenzfarbstoff	Absorptionmaximum	Emissionsmaximum
Phycoerythrin	496 nm	578 nm
Fluoreszeinisothiocyanath	494 nm	520 nm

Tabelle 7: Absorptions- und Emissionsmaxima von PE und FITC

Identifikation der zu untersuchenden Zellpopulation

Um die Auswertung der Daten einer eingegrenzten Lichtstreuungsregion (Abbildung 6 A) zu objektivieren, wurden die Zellpopulationen anhand von stabilen Eigenschaften, wie Größe, Granularität und spezifischer Antigenexpression identifiziert. Das Panleukozytenantigen CD45 eignet sich dazu sehr gut, da es auf allen Leukozyten, mit besonders hoher Dichte auf Lymphozyten, exprimiert wird. Der Monozyten Lipopolysaccharid Rezeptor CD14 hingegen wird auf den meisten Monozyten exprimiert. Gegen diese Antigene gerichtete AK erlauben es die eingegrenzten Zellen zu unterscheiden und zu überprüfen, ob die eingegrenzte Lichtstreuungsregion die zu analysierenden Zellen erhält. Die Darstellung erfolgt in sogenannten 4-Quadranten Dotplots, siehe Analyse der Patientenproben in Abbildung 6 B, sowie im Histogramm, siehe Analyse der Patientenproben in Abbildung 6 C.

Isotypkontrolle

Neben dem Leukozyten- und Monozytenmarker CD45/CD14 benötigt man zudem eine Isotypkontrolle, um Signalanteile herauszufiltern, die nicht durch Interaktion von Antigen und AK, sondern durch unspezifische Bindungen der AK an z. B. Fc-Rezeptoren der Leukozyten oder durch Interaktion des an den AK konjugierten Fluorochroms entstehen. Die Isotypkontrolle hat keine Affinität zu den zu untersuchenden Antigenen, beinhaltet aber die gleichen Immunglobulin-Isotypen wie diese [109]. Abbildung 6 D zeigt ein Histogramm, in dem das unspezifische Signal der Isotypkontrolle dargestellt wurde.

3.11.3 Etablierung der AK-Konzentrationen

Da es keine Vorgaben gab, welche Menge eines AKs notwendig ist um eine ausreichende Markierung der Zellen zu erreichen, wurden zunächst Messungen mit verschiedenen Konzentrationen der AK durchgeführt und die Prozentzahl der positiven Zellen bestimmt. Gemischt mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS Azid) wurden verschiedene Verdünnungsreihen erstellt, die anschließend zusammen mit einer Blutprobe durchflusszytometrisch untersucht wurden. Dabei wurde die Granulozytenregion eingegrenzt und anhand der gegateten Zellen entschieden, welche Verdünnungsreihe ausreichend ist.

Von den AK CD11b und CD162 wurden jeweils 2 Verdünnungsreihen hergestellt, zusätzlich wurden die AK auch unverdünnt untersucht. Die nachfolgend aufgelisteten Verdünnungsreihen beziehen sich auf die AK CD 11b und CD162:

Verdünnung 1:10 5 µl AK + 45 µl PBS Azid

Verdünnung 1:5 5 µl AK + 20 µl PBS Azid

Der AK CD181 wurde unverdünnt mit einer Gesamtmenge von 2 µl, sowie in 3 weiteren Verdünnungsreihen untersucht. Hierzu wurde zunächst eine Verdünnung von 1:10 hergestellt, aus der die Mengen von 2, 5 und 10 µl abpipettiert wurden.

Verdünnung 1:10 2 µl CD181 + 18 µl PBS Azid

12 Röhrrchen wurden wie folgt pipettiert:

- 1) 20 µl Simultest LeucoGATE CD14/CD45 + 50 µl Blut
- 2) 20 µl Simultest Control γ 2a/ γ 1 + 50 µl Blut
- 3) 20 µl CD162 + 50 µl Blut
- 4) 20 µl 1:5 CD162 + 50 µl Blut
- 5) 20 µl 1:10 CD162 + 50 µl Blut
- 6) 20 µl CD11b + 50 µl Blut
- 7) 20 µl 1:5 CD11b + 50 µl Blut
- 8) 20 µl 1:10 CD11b + 50 µl Blut
- 9) 2 µl CD181 + 50 µl Blut
- 10) 2 µl 1:10 CD181 + 50 µl Blut
- 11) 5 µl 1:10 CD181 + 50 µl Blut
- 12) 10 µl 1:10 CD181 + 50 µl Blut

Alle Proben wurden gerüttelt und für 10 min dunkel inkubiert. Durch Zugabe von 4 ml Lyse-Puffer und erneuter Inkubation im Dunkeln erfolgte die Lyse der Erythrozyten. Anschließend wurden die Röhrrchen 10 min bei 24 °C und 2000 U/min zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde wiederum gerüttelt und mit 3 ml PBS Azid gewaschen. Nach erneuter

Zentrifugation für 10 min bei 24 °C und 2000 U/min konnte das Zentrifugat durchflusszytometrisch analysiert werden.

Die Darstellung erfolgte im Histogramm. Die Zellzahl wurde auf der y-Achse (linear) gegen die Intensität der Fluoreszenz auf der x-Achse (logarithmisch) aufgetragen. Mit Hilfe der Marker M1 und M2 wurden Grenzwerte so gewählt, dass das unspezifische Signal der Isotypkontrolle im Bereich M1 liegt. Diese Grenzwerte wurden auf die folgenden Histogramme der verschiedenen Verdünnungsreihen übertragen. Das Ziel war mindestens 99 % der eingegrenzten Leukozytenpopulation in Gate M2 zu zählen, siehe Tabelle 8.

Aus den verschiedenen Verdünnungsreihen zeigt folgende Tabelle den prozentualen Anteil der Zellen im positiven Gate M2:

Antikörper	AK-Verdünnung	% gated cells (M2)
CD162	unverdünnt	99,99
CD162	1:5	100
CD162	1:10	99,98
CD11b	unverdünnt	100
CD11b	1:5	99,99
CD11b	1:10	100
CD181	unverdünnt 2 µl	99,80
CD181	10 µl aus Verdünnung 1:10	99,65
CD181	5 µl aus Verdünnung 1:10	99,12
CD181	2 µl aus Verdünnung 1:10	97,98

Tabelle 8: Prozentualer Anteil der Zellen im positiven Gate M2

Schlussfolgerung:

99,98 % der Zellen (CD162) sowie 100 % (CD11b) der Zellen lagen bei einer Verdünnung von 1:10 im Bereich M2. Die Messung mit der Verdünnungsreihe 5 µl aus Verdünnung 1:10 von CD181 erbrachte 99,12 % der eingegrenzten Leukozyten im positiven Gate M2. Die absolute Menge der AK entspricht somit 2 µl von CD162 und CD11b sowie 0,5 µl CD181 pro Röhrchen.

Um bei allen 3 AK mit dem gleichen Volumen zu arbeiten, wurden entsprechend der benötigten absoluten Menge des AKs unterschiedliche Verdünnungsreihen hergestellt, aus denen jeweils das Volumen von 20 µl abpipettiert werden konnte.

	Menge des AKs	Menge von PBS Azid	Verdünnung
Volumen 1	40 µl CD162	360 µl	1:10
Volumen 2	40 µl CD11b	360 µl	1:10
Volumen 3	10 µl CD181	390 µl	1:40

Tabelle 9: Verdünnungsreihen der AK CD162, CD11b und CD181

3.11.4 Analyse der Patientenproben

3.11.4.1 Vorbereitung der Proben

Von jedem Patienten wurden 5 Proben untersucht, die sich wie folgt zusammensetzten:

- 1) 20 µl Simultest LeucoGATE CD14/CD45 + 50 µl Blut
- 2) 20 µl Simultest Control γ 2a/ γ 1 + 50 µl Blut
- 3) 20 µl Volumen 1 + 50 µl Blut
- 4) 20 µl Volumen 2 + 50 µl Blut
- 5) 20 µl Volumen 3 + 50 µl Blut

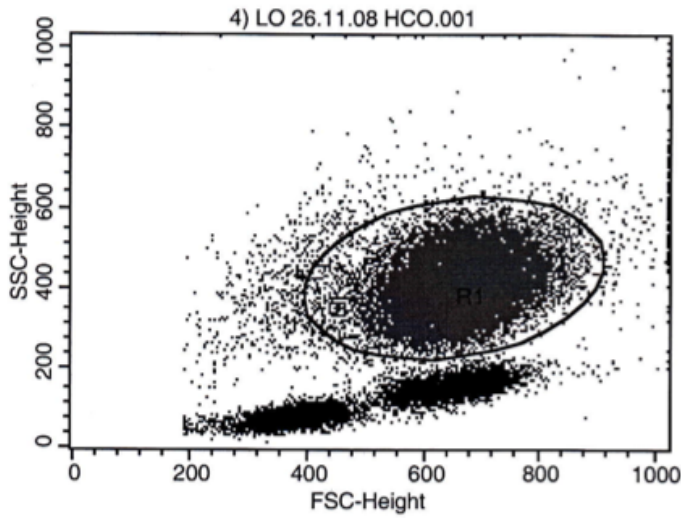
Die Behandlung der Proben erfolgte, wie in Punkt 3.11.3 beschrieben. Im Anschluss wurden die Proben durchflusszytometrisch analysiert.

3.11.4.2 Auswertung der Proben

Die Messdaten wurden mit Hilfe der Software CellQuest Pro von Beckton Dickinson am Computer ausgewertet. Zunächst wurden die gemessenen Signale in zweidimensionalen Dotplots, in denen die Signalintensitäten des Forward-Scatters auf der x-Achse und die Signalintensitäten des Sideward-Scatters auf der y-Achse linear aufgetragen sind, dargestellt. Jede Zelle wird entsprechend ihrer Größe und Granularität repräsentiert, dies wiederum ermöglicht die zu untersuchenden

Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten zu identifizieren und zur Bestimmung der jeweiligen mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) einzugrenzen. In Abbildung 6 A ist exemplarisch die Lichtstreuungsregion der Granulozyten dargestellt. Die Region Statistics gibt neben der MFI noch Auskunft über die Anzahl (in %) der sich im Lichtstreuungsfenster befindlichen Zellen.

A)

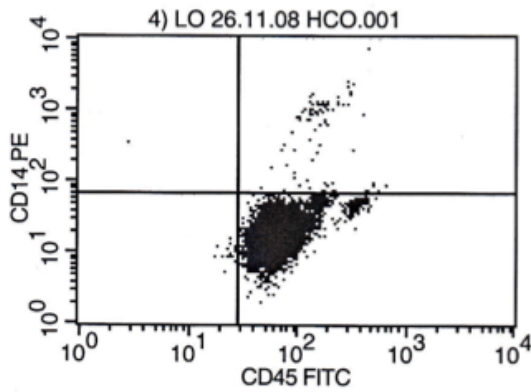


Region Statistics

File: 4) LO 26.11.08 HCO.001
 Acquisition Date: 26-Nov-08
 Gated Events: 29363
 X Parameter: FSC-H FSC-Height (Linear)

Region	Events	% Gated	% Total	X Mean
R1	19603	66.76	66.76	659.48

B)



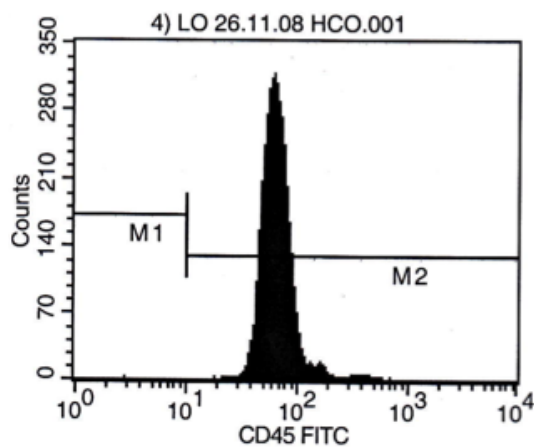
Quadrant Statistics

File: 4) LO 26.11.08 HCO.001
 Acquisition Date: 26-Nov-08
 Gated Events: 19603
 X Parameter: FL1-H CD45 FITC (Log)

Log Data Units:
 Gate: G1
 Total Events: 28

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean
UL	1	0.01	0.00	2.84
UR	89	0.45	0.30	198.90
LL	18	0.09	0.06	24.59
LR	19495	99.45	66.39	67.08

C)



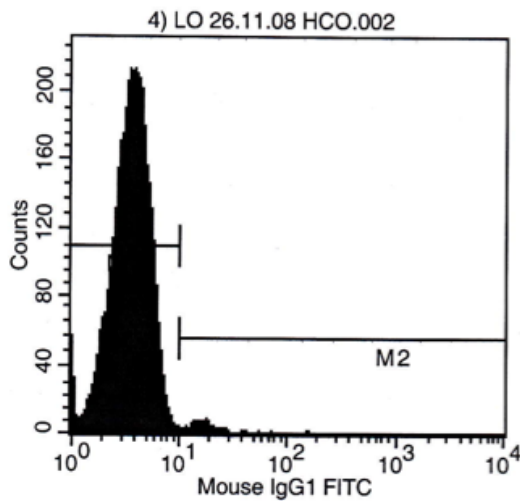
Histogram Statistics

File: 4) LO 26.11.08 HCO.001
 Acquisition Date: 26-Nov-08
 Gated Events: 19603
 X Parameter: FL1-H CD45 FITC (Log)

Log Data Units:
 Gate: G1
 Total Events: 2

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean
All	1, 9910	19603	100.00	66.76	67.64
M1	1, 10	1	0.01	0.00	2.84
M2	10, 9910	19602	99.99	66.76	67.64

D)



Histogram Statistics

File: 4) LO 26.11.08 HCO.002 Log Data U
 Acquisition Date: 26-Nov-08 Gate: G1
 Gated Events: 19564 Total Event
 X Parameter: FL1-H Mouse IgG1 FITC (Log)

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean
All	1, 9910	19564	100.00	65.73	3.83
M1	1, 10	19327	98.79	64.93	3.65
M2	10, 9910	239	1.22	0.80	17.80

Abbildung 6: Dotplots und Histogramme einer Granulozytenpopulation aus Woche 6

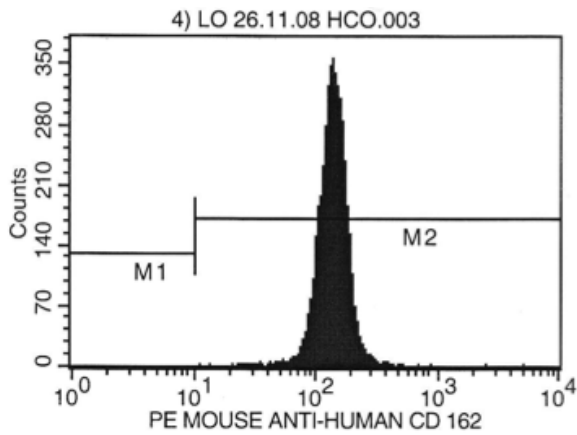
A) Die Abbildung zeigt die eingegrenzten Granulozytenpopulationen in einem Dotplot bei der Auswertung einer Messung aus Woche 6 vor der Dialyse. Darunter erkennt man die Monozyten- sowie die Lymphozytenpopulation, die bei der nächsten Auswertung eingegrenzt worden sind, aber graphisch nicht dargestellt wurden. Die Region Statistics gibt Auskunft über die Anzahl der Ereignisse (Events), wieviel Prozent aller Leukozyten in der gegateten Region R1 liegen und über die MFI der gegateten Zellen.

B) 4-Quadranten Dotplot, in dem die Ereignisse aus der Lichtstreuungsregion A1 von Granulozyten dargestellt sind. Die Signalintensitäten von CD45 (x-Achse) und CD14 (y-Achse) aus der gewählten Region sind hier logarithmisch gegeneinander aufgetragen. Der linke untere Quadrant (LL) enthält CD45- und CD14-negative Zellen, der rechte untere Quadrant (LR) enthält CD45-positive und CD14-negative Zellen, der linke obere Quadrant (UL) enthält CD45-negative und CD14-positive Zellen, und der rechte obere Quadrant (UR) enthält CD45- und CD14-positive Zellen. Die CD45-positiven Granulozyten wurden zu 99,45 % im rechten unteren Quadranten erfasst. 0,45 % der Zellen im rechten oberen Quadranten sind wahrscheinlich in der eingegrenzten Region mit erfasste CD45- und CD14-positive Monozyten.

C) Histogramm, in dem die Fluoreszenzintensität von CD45/CD14 auf der in Abbildung A eingegrenzten Granulozytenpopulation dargestellt ist.

D) Die Abbildung zeigt ein Histogramm, auf der die Fluoreszenzintensität der Isotypkontrolle Simultest Control $\gamma 2a/\gamma 1$ (Ig2a FITC/IgG1 PE) von Beckton Dickinson auf Monozyten logarithmisch dargestellt ist. Die Kontrolle enthält den Immunglobulin-Isotyp 2a, welcher FITC-markiert ist sowie den Immunglobulinisotyp 1, welcher PE-markiert ist. Der Marker M1 wurde bis zum Ende des Signalabfalls eingestellt. Diese Einstellung wurde auf die Histogramme der AK CD162, CD11b und CD181 übertragen.

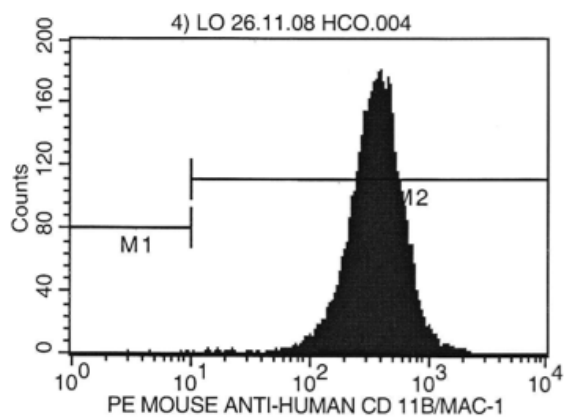
Die anhand der Isotypkontrolle in Abbildung 6 D gesetzten Grenzwerte M1 und M2 wurden auf die folgenden Histogramme, in denen die MFI der AK CD162, CD11b und CD181 dargestellt sind, übertragen. Die MFI der untersuchten Zellen ist in der Histogramm Statistik unter *Mean* angegeben. Die in Abbildung 7 dargestellten Histogramme beziehen sich auf die gatede Granulozyten-Population aus Abbildung 6 A. Im nächsten Schritt wurden Monozyten- und Lymphozyten-Populationen eingegrenzt. Wieder wurden anhand des Signalabfalls der Isotypkontrolle Grenzwerte gewählt und auf die Histogramme der zu untersuchenden AK übertragen.



Histogram Statistics

File: 4) LO 26.11.08 HCO.003
 Acquisition Date: 26-Nov-08
 Gated Events: 19500
 X Parameter: FL2-H PE MOUSE ANTI-HUMAN CD 162 (Log)

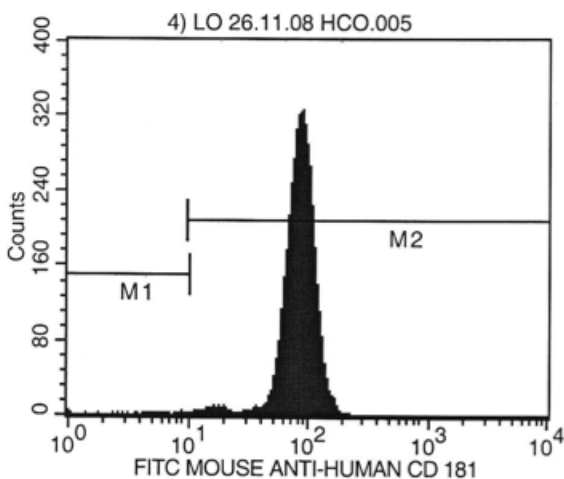
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean
All	1, 9910	19500	100.00	70.17	137.80
M1	1, 10	0	0.00	0.00	***
M2	10, 9910	19500	100.00	70.17	137.80



Histogram Statistic

File: 4) LO 26.11.08 HCO.004
 Acquisition Date: 26-Nov-08
 Gated Events: 19614
 X Parameter: FL2-H PE MOUSE ANTI-HUMAN CD 11B/MAC-1

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean
All	1, 9910	19614	100.00	66.72	386.08
M1	1, 10	6	0.03	0.02	7.27
M2	10, 9910	19608	99.97	66.70	386.20



Histogram Statistics

File: 4) LO 26.11.08 HCO.005
 Acquisition Date: 26-Nov-08
 Gated Events: 19452
 X Parameter: FL1-H FITC MOUSE ANTI-HUMAN CD 181 (Log)

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean
All	1, 9910	19452	100.00	66.06	84.28
M1	1, 10	56	0.29	0.19	6.04
M2	10, 9910	19401	99.74	65.89	84.49

Abbildung 7: MFI der AK CD162, CD11b und CD181 auf Granulozyten

Die Abbildung zeigt drei Histogramme, in denen logarithmisch die Fluoreszenzintensität der AK CD162, CD11b und CD181 auf Granulozyten auf der x-Achse und linear dazu aufgetragen die Anzahl der Ereignisse auf der y-Achse dargestellt ist. Aus der Histogramm Statistik geht hervor, wie viele Ereignisse (Events) in dem vorher definierten Gate registriert wurden, wieviele davon im Bereich M1 oder M2 liegen und somit AK-negative bzw. -positive Zellen sind und wie die gesamte Fluoreszenzintensität ist sowie die in den Bereichen M1 und M2.

3.12 Bestimmung von Albumin, Harnstoff und Kreatinin

Die Bestimmung von Albumin, HST und Kreatinin erfolgte freundlicherweise im Zentrallabor der Charité Universitätsmedizin Berlin. Hierfür wurden laborübliche Verfahren eingesetzt, die im Folgenden beschrieben werden.

3.12.1 Albumin

Bei einem pH-Wert von 4,1 weist Albumin ausreichende kationische Eigenschaften auf, um Bromcresolgrün, einen Anionenfarbstoff, zu binden und einen blaugrünen Komplex zu bilden. Die Intensität der Färbung ist direkt proportional zur Albuminkonzentration der Probe und wird photometrisch gemessen [111].

3.12.3 Harnstoff

Es handelt sich um einen kinetischen Test mit Urease und Glutamatdehydrogenase. HST wird durch Urease zu Ammonium und Carbonat hydrolysiert. Ammonium reagiert mit 2-Oxoglutarat in Anwesenheit von Glutamatdehydrogenase und dem Koenzym NADH zu L-Glutamat, wobei für jedes hydrolysierte Mol HST zwei Mol NADH zu NAD⁺ oxidiert werden. Die Geschwindigkeit der Abnahme der NADH-Konzentration ist direkt proportional zur HST-Konzentration der Probe und kann photometrisch gemessen werden [112-115].

3.12.4 Kreatinin

Der Nachweis basiert auf der Jaffé-Methode, einem kinetischen Farbttest. Kreatinin bildet im alkalischen Milieu mit Pikrat einen gelb-orange gefärbten Komplex. Die Bildungsgeschwindigkeit des Komplexes ist proportional zur Kreatininkonzentration in der Probe. Zur Minimierung von Störungen durch Bilirubin wurde Rate-Blanking eingesetzt. Pseudo-Kreatinin-Chromogene, Proteine und Ketone rufen unspezifische Reaktionen hervor, die eine Kompensation der Ergebnisse um -0,3 mg/dl erfordern [116-118].

3.13 Erfassung der Daten und statistische Analyse

Die Daten wurden mit dem Softwareprogramm Microsoft® Excel® erfasst und in das Statistik- und Graphikprogramm GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA) übertragen, statistisch analysiert und graphisch dargestellt. Bei den analysierten Werten aus einer Studienwoche handelt es sich um Mittelwerte oder Mediane von allen Probanden. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten statistischen Tests werden im Folgenden kurz erläutert:

Die zu untersuchenden Messwerte wurden zunächst mit Hilfe des *Kolmogorow-Smirnow-Tests* und dem *D'Agostino and Pearson omnibus normality* Test auf Normalverteilung überprüft. Ergab sich für die Messwerte eine Normalverteilung und lagen aus jeder untersuchten Woche die gleiche Anzahl an Daten vor, wurde der Test *Repeated measures analysis of variance* durchgeführt. Bei Normalverteilung, aber unvollständigen Daten erfolgte die Analyse mit *one-way analysis of variance*. Mit Hilfe der Bonferroni-Korrektur wurden die einzelnen Wochen untereinander auf signifikante Unterschiede überprüft. Die graphische Darstellung erfolgte bei Normalverteilung in Balkendiagrammen, die Messwerte wurden als Mittelwert angegeben.

Waren die Messwerte nicht normalverteilt, wurden nicht parametrische Tests durchgeführt. Bei vollständigen Daten aus jeder Woche erfolgte die Analyse mit dem *Friedmann-Test*, bei unvollständigen Daten mit dem *Kruskal-Wallis-Test*. Die einzelnen Wochen wurden mit *Dunn's Multiple Comparison Test* untereinander verglichen. Die graphische Darstellung erfolgte in Boxplots, die Messwerte wurden als Median angegeben.

Das Ergebnis eines statistischen Tests wurde als signifikant bewertet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit p unter 5 % lag ($p < 0,05$). Die HCO-Phase wurde gegenüber Woche 3 und die 2. HF-Phase gegenüber Woche 6 auf Signifikanz überprüft.

4 Ergebnisse

4.1 CRP, IL-6, PTX3 und IL-10

CRP

In die Auswertung der Daten für CRP gingen die Werte von 14 Patienten ein. Ein Patient hatte zu jedem Zeitpunkt einer Kontrolle erhöhte CRP-Werte (von 2,04 mg/dl bis 14,31 mg/dl), sodass diese nicht mit in die statistische Auswertung übernommen wurden.

Die unten dargestellte Abbildung 8 zeigt, dass es keine statistisch signifikanten Unterschiede der CRP-Werte zwischen den einzelnen Dialyse-Phasen gibt. Der Median ist in Woche 2 am höchsten (0,425 mg/dl) und in Woche 5 am niedrigsten (0,28 mg/dl). In den Wochen 8 und 9 hatte ein Patient erhöhte CRP-Werte von 3,95 mg/dl und 3,90 mg/dl.

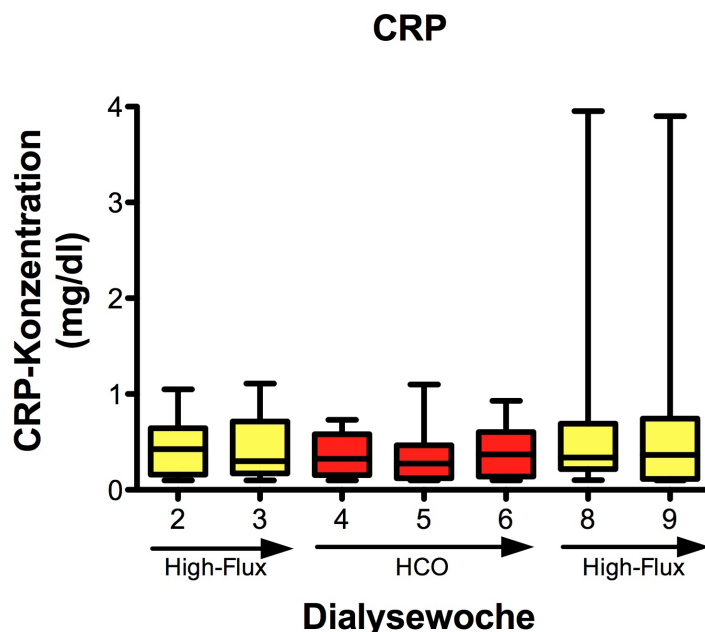


Abbildung 8: Boxplot zur Darstellung der medianen CRP-Konzentrationen in den 3 Phasen der Studie

Nach Analyse mit dem Friedmann-Test unterscheiden sich die einzelnen Wochen nicht statistisch signifikant voneinander. n=14

	Wo. 2	Wo. 3	Wo. 4	Wo. 5	Wo. 6	Wo. 8	Wo. 9
Median (mg/dl)	0,43	0,30	0,33	0,28	0,37	0,34	0,37
Interquartils- spanne (mg/dl)	0,18-0,63	0,18-0,67	0,17-0,51	0,13-0,41	0,17-0,57	0,25-0,64	0,15-0,68
Spannweite (mg/dl)	0,1-1,05	0,1-1,11	0,1-0,73	0,1-1,1	0,1-0,93	0,1-3,95	0,1-3,90

Tabelle 10: Angaben des Medians, der Interquartilsspanne und der Spannweite der CRP-Konzentrationen

IL-6

Die IL-6-Konzentrationen unterscheiden sich nicht statistisch signifikant voneinander. Der geringste Median liegt in der HCO-Phase in Woche 5 (3,44 ng/ml), der höchste Median in Woche 8 (6,53 ng/ml) der HF-Phase.

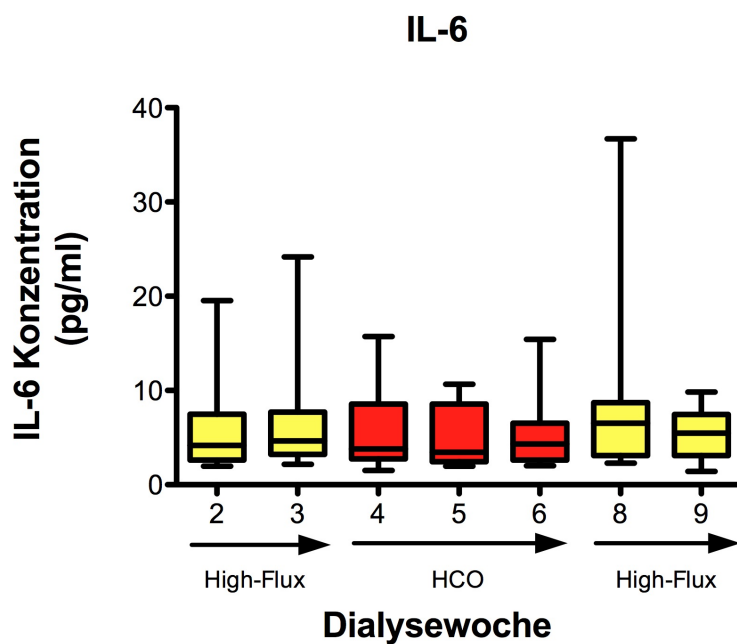


Abbildung 9: Boxplot zur Darstellung der medianen IL-6-Konzentrationen in den 3 Phasen der Studie

Nach Analyse mit dem Kruskal-Wallis-Test unterscheiden sich die einzelnen Wochen nicht statistisch signifikant voneinander. n=14, in Woche 3 und 9 n=13

	Wo. 2	Wo. 3	Wo. 4	Wo. 5	Wo. 6	Wo. 8	Wo. 9
Median (pg/ml)	4,17	4,65	3,8	3,44	4,325	6,53	5,48
Interquartils- spanne (pg/ml)	2,84-6,94	3,29-7,4	2,83-8,00	2,48-7,57	2,69-6,30	3,25-8,41	3,42-6,23
Spannweite (g/ml)	1,97- 19,53	2,18- 24,18	1,52- 15,72	1,97- 10,66	2,03- 15,43	2,29- 36,71	1,41-9,83

Tabelle 11: Angaben des Medians, der Interquartilspanne und der Spannweite der IL-6-Konzentrationen

PTX3

PTX3 zeigt entgegen der Inflammationsmarker CRP und IL-6 seinen niedrigsten Median nicht in der HCO-Phase. Zu Beginn der Studie in Woche 2 ist der Median am geringsten. In Woche 5 steigt er auf 3,5 ng/ml an und unterscheidet sich in Woche 6 mit 3,55 ng/ml signifikant ($p < 0,05$) zu Woche 3. In Woche 6 wird auch die größte Interquartilspanne erreicht, die sich in Woche 8 und 9 wieder verringert, wobei der Median in Woche 8 noch weiter ansteigt (3,92 ng/ml) und in Woche 9 wieder auf 3,55 ng/ml absinkt.

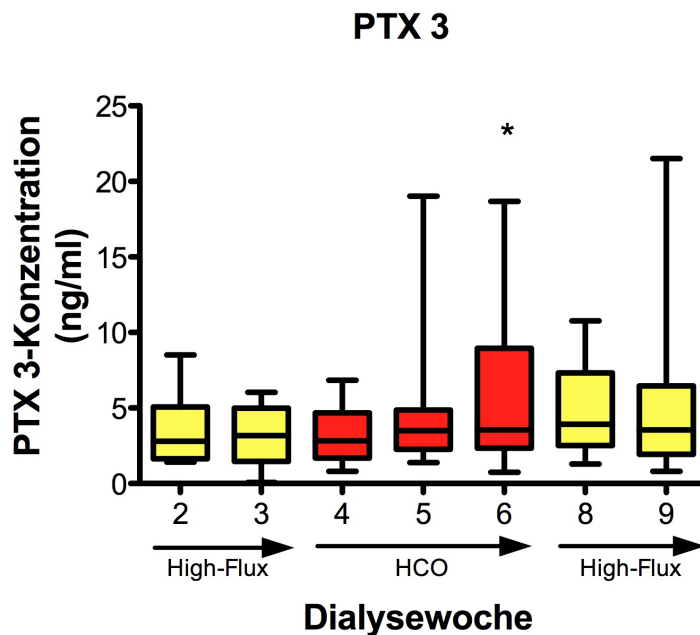


Abbildung 10: Boxplot zur Darstellung der medianen PTX3-Konzentrationen in den 3 Phasen der Studie

Die Analyse erfolgte mit dem Friedmann-Test. $* = p < 0,05$ vs. Woche 3, $n = 15$

	Wo. 2	Wo. 3	Wo. 4	Wo. 5	Wo. 6	Wo. 8	Wo. 9
Median (ng/ml)	2,8	3,17	2,82	3,50	3,55	3,92	3,55
Interquartils- spanne (ng/ml)	1,63-4,80	1,55-4,53	1,82-4,49	2,51-4,69	2,57-7,90	2,65-6,73	3,42-6,23
Spannweite (ng/ml)	1,42-8,52	0,07-6,04	0,80-6,84	1,39- 19,03	0,75- 18,68	1,29- 10,77	0,81- 21,51

Tabelle 12: Angaben der Interquartilsspanne und der Spannweite der PTX3-Konzentrationen

IL-10

Aufgrund der zusätzlich zum normalen Laborbetrieb durchgeführten ELISAs war es nicht immer möglich alle Parameter zu jedem Zeitpunkt zu bestimmen. Damit die Ergebnisse bei IL-6 und PTX3 hinsichtlich der Studienpopulation vollständig sind, wurde bei personellen und zeitlichen Engpässen auf die Durchführung des Quantikine® ELISA Human IL-10 Immunoassay's verzichtet.

Von 4 Patienten konnten in jeder Woche die ELISAs durchgeführt werden, von 2 weiteren Patienten in jeder Woche mit jeweils einer fehlenden Messung. Konnten bei Patienten ELISAs nur ein bis vier Mal durchgeführt werden, so wurden die Ergebnisse aufgrund mangelnder Vergleichbarkeit nicht mit in die statistische Auswertung aufgenommen.

Die Messungen von IL-10 unterscheiden sich statistisch nicht signifikant voneinander. Die Graphik zeigt, dass die Spannweite groß war, in Woche 6 zwischen 1,85 und 97,7 pg/ml. Hier wurde auch die höchste mediane Konzentration erreicht. Die niedrigste mediane Konzentration betrug 3,47 pg/ml in Woche 9.

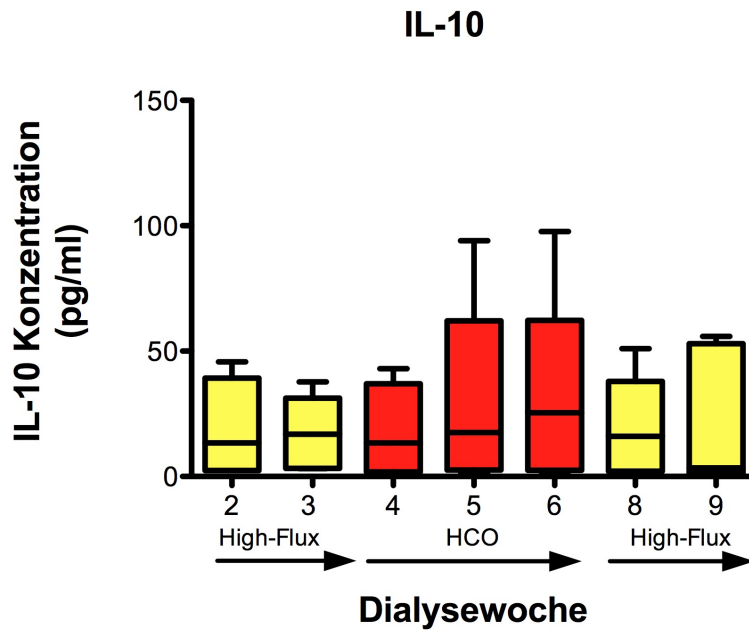


Abbildung 11: Boxplot zur Darstellung der medianen IL-10-Konzentrationen in den 3 Phasen der Studie

Nach Analyse mit dem Kruskal-Wallis-Test unterscheiden sich die einzelnen Wochen nicht statistisch signifikant voneinander. n=5, in Woche 6 und 9, n=6

	Wo. 2	Wo. 3	Wo. 4	Wo. 5	Wo. 6	Wo. 8	Wo. 9
Median (pg/ml)	13,37	16,89	13,38	17,52	25,4	16,05	3,47
Interquartils- spanne (pg/ml)	2,71- 33,63	3,9-28,75	2,35- 32,06	3,09- 46,39	3,07- 26,87	2,84- 32,21	1,35- 49,96
Spannweite (pg/ml)	2,39- 45,71	3,16- 37,77	1,29- 43,02	1,76-94,0	1,85-97,7	1,16-51,0	1,28- 55,91

Tabelle 13: Angaben des Medians, der Interquartilspanne und der Spannweite der IL-10-Konzentrationen

4.2 Albumin

Der Einfluss der HCO-Membran auf den Serum-Albumin-Spiegel der Probanden war ein sekundärer Endpunkt der Studie. Die graphische Darstellung zeigt, dass die Albumin-Konzentration von durchschnittlich 4,2 g/dl in Woche 3 der HF-Phase bis zum Ende der HCO-Phase stetig abfällt und in Woche 6 einen Wert von 3,69 g/dl erreicht. Dieser Abfall ist im Vergleich zu der Konzentration aus Woche 3 statistisch signifikant. Im Anschluss an die HCO-Phase steigt die Konzentration wieder auf 3,91 g/dl, wobei der Ausgangswert von 4,15 g/dl aus Woche 2 nicht erreicht wird.

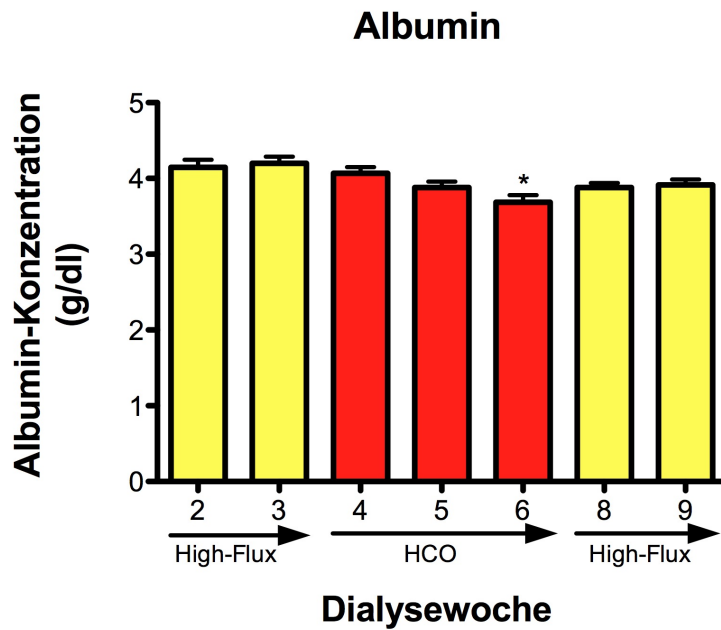


Abbildung 12: Balkendiagramm zur Darstellung der durchschnittlichen Albumin-Konzentrationen in den 3 Phasen der Studie

Die Analyse erfolgte mit One-way analysis of variance (ANOVA). *= $p < 0,05$ vs. Woche 3, n=15, in Woche 9 n=14

	Wo. 2	Wo. 3	Wo. 4	Wo. 5	Wo. 6	Wo. 8	Wo. 9
Mittelwert (g/dl)	4,147	4,200	4,067	3,880	3,687	3,880	3,914
Standardabweichung	0,3833	0,3402	0,3155	0,3028	0,3583	0,2336	0,2713
Standardfehler	0,09898	0,08783	0,08146	0,07819	0,09251	0,06032	0,07252

Tabelle 14: Angaben des Mittelwertes, der Standardabweichung und des Standardfehlers der Albumin-Konzentrationen

4.3 Harnstoff und Kreatinin

Die beiden Graphiken zeigen die durchschnittlichen Kreatinin- und HST-Konzentrationen vor bzw. nach der HD, wobei in den Wochen 6 nach der HD und in der Woche 9 vor der HD nur von 14 Patienten die Daten statistisch erfasst wurden. Vor der Behandlung mit HF-Membranen waren beide Konzentrationen durchschnittlich niedriger als vor der Behandlung mit HCO-Membranen. In den HF-Phasen lag die Kreatinin-Konzentration im Mittel bei 7,36 mg/dl, die HST-Konzentration bei 120,88 mg/dl. Im Vergleich dazu betragen die mittleren Kreatinin- und HST-Konzentrationen in der HCO-Phase 7,94 mg/dl und 134,16 mg/dl. Der Unterschied ist statistisch nicht signifikant.

In den Wochen 3, 6 und 9 erfolgte eine nochmalige Blutentnahme nach der HD. Diese Werte sind in den Graphiken blau dargestellt. Es zeigte sich, dass in den HF-Phasen

die Eliminationsrate von HST und Kreatinin höher war als in der HCO-Phase. In Woche 3 und 9 wurden 59,24 % und 60,49 % Kreatinin eliminiert gegenüber 53,67 % in Woche 6. Die HST-Eliminationsrate war höher als die von Kreatinin und erreicht in Woche 3 und 9 71,59 % und 67,26 % gegenüber 59,46 % in Woche 6.

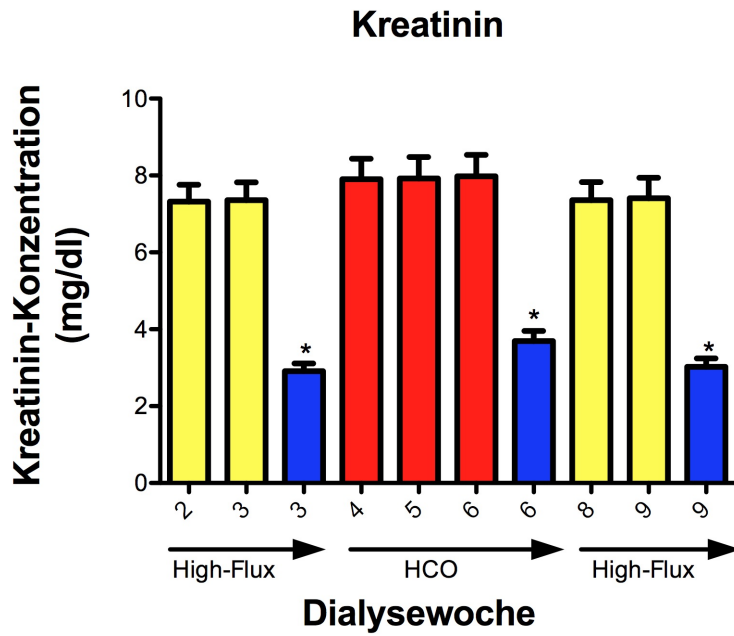


Abbildung 13: Balkendiagramm zur Darstellung der durchschnittlichen Kreatinin-Konzentrationen in den 3 Phasen der Studie vor und nach der HD

Die Analyse erfolgte mit One-way ANOVA. Die blauen Balken stellen die Post-HD-Konzentrationen dar. Die Post-HD-Konzentrationen unterscheiden sich signifikant von den Prä-HD-Konzentrationen, $*=p<0,05$; $n=15$, in Woche 6 und 9 $n=14$

	Wo. 2	Wo. 3	Wo. 3	Wo. 4	Wo. 5	Wo. 6	Wo. 6	Wo. 8	Wo. 9	Wo. 9
Mittelwert (mg/dl)	7,32	7,36	2,91	7,90	7,93	7,98	3,70	7,36	7,41	3,02
Standardabweichung	1,716	1,792	0,7860	2,058	2,147	2,161	0,9655	1,800	1,992	0,8541
Standardfehler	0,4431	0,4627	0,2029	0,5315	0,5542	0,5579	0,2580	0,4648	0,5323	0,2205

Tabelle 15: Angaben des Mittelwertes, der Standardabweichung und des Standardfehlers der Kreatinin-Konzentrationen

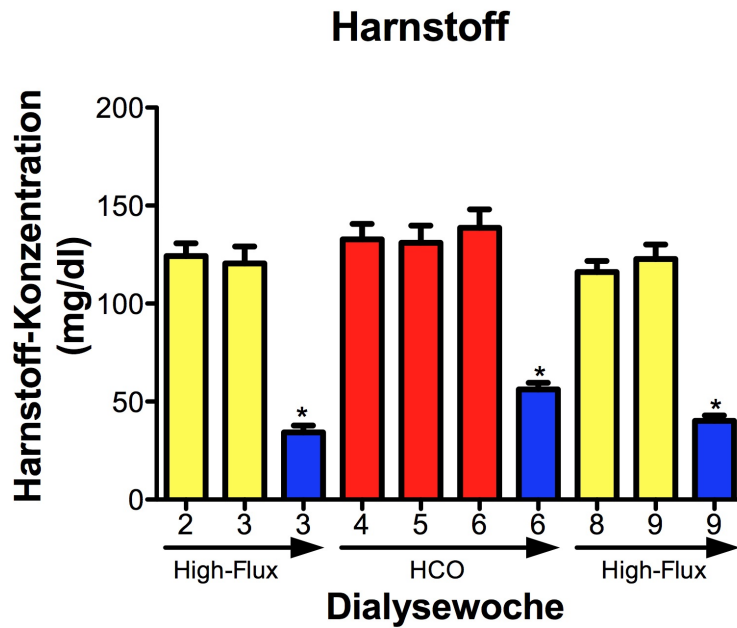


Abbildung 14: Balkendiagramm zur Darstellung der durchschnittlichen HST-Konzentrationen in den 3 Phasen der Studie vor und nach der HD

Die Analyse erfolgte mit One-way ANOVA. Die blauen Balken stellen die Post-HD-Konzentrationen dar. Die Post-HD-Konzentrationen unterscheiden sich hoch signifikant von den Prä-HD-Konzentrationen, $*=p<0,05$; n=15, in Woche 6 und 9, n=14

	Wo. 2	Wo. 3	Wo. 3	Wo. 4	Wo. 5	Wo. 6	Wo. 6	Wo. 8	Wo. 9	Wo. 9
Mittelwert (mg/dl)	124,2	120,5	34,23	132,8	131,0	138,7	56,21	116,1	122,8	40,20
Standardabweichung	25,45	33,45	13,88	30,37	33,96	36,52	12,57	22,12	27,40	10,73
Standardfehler	6,572	8,637	3,585	7,842	8,767	9,429	3,360	5,713	7,322	2,769

Tabelle 16: Angaben des Mittelwertes, der Standardabweichung und des Standardfehlers der Harnstoff-Konzentrationen

4.4 Ergebnisse Durchflusszytometrie

4.4.1 Expressionsdichte von CD162

Die höchste MFI von CD162 wurde auf Monozyten gemessen, gefolgt von Granulozyten und Lymphozyten. Ihre Einheit sind arbitrary units (AU).

4.4.1.1 Expression von CD162 auf Granulozyten

Die MFI von CD162 nimmt von Beginn der Studie bis zur 8. Woche kontinuierlich ab und steigt in Woche 9 wieder an. Am höchsten ist sie in Woche 2 mit 176,1 AU, am niedrigsten in Woche 8 mit 136,1 AU. Der größte Abfall erfolgte von Woche 3 der HF-Phase zu Woche 4 der HCO-Phase mit einer Reduktion der MFI von 172 AU auf 151,9 AU. Die MFI aus den Wochen 5 und 6 unterscheidet sich statistisch signifikant von der MFI aus Woche 3.

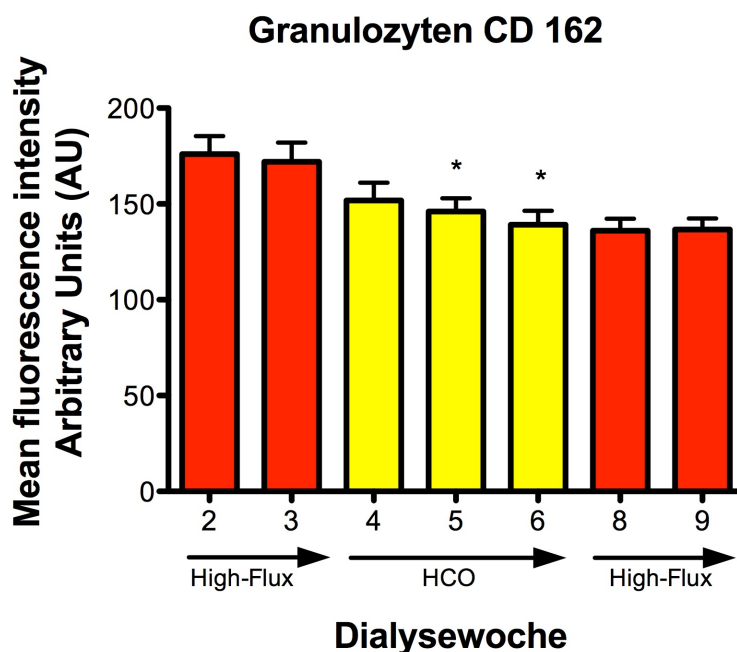


Abbildung 15: Balkendiagramm zur Darstellung der durchschnittlichen MFI von CD162 auf Granulozyten in den 3 Phasen der Studie

Die Analyse erfolgte mit Repeated measures one-way ANOVA. $*=p<0,05$ vs. Woche 3, $n=15$

	Wo. 2	Wo. 3	Wo. 4	Wo. 5	Wo. 6	Wo. 8	Wo. 9
Mittelwert (AU)	176,1	172,0	151,9	146,0	139,2	136,1	136,6
Standardabweichung	35,99	38,89	35,78	26,66	28,22	23,97	22,71
Standardfehler	9,292	10,04	9,238	6,884	7,288	6,189	5,864

Tabelle 17: Angaben des Mittelwertes, der Standardabweichung und des Standardfehlers der MFI von CD162 auf Granulozyten

4.4.1.2 Expression von CD162 auf Monozyten

Der Verlauf der Expression des Oberflächenantigens CD162 auf Monozyten verhält sich in den einzelnen Studienphasen ähnlich wie die Expression von CD162 auf Granulozyten. In Woche 2 ist die MFI am höchsten (267,5 AU). Von Woche 3 der HF-Phase (264,4 AU) zu Woche 4 der HCO-Phase (234,1 AU) ist die Verringerung der MFI am höchsten. Während der HCO-Phase nimmt die MFI in Woche 5 und Woche 6 weiter ab und erreicht in der darauffolgenden HF-Phase in Woche 8 ihren niedrigsten Wert (210,2 AU). In der letzten Studienwoche steigt die MFI wieder an (auf 215,3 AU), bleibt jedoch unter der gemessenen Intensität aus Woche 6 der HCO-Phase. In den Wochen 4, 5 und 6 der HCO-Phase unterscheiden sich die MFI statistisch signifikant von den MFI aus Woche 3.

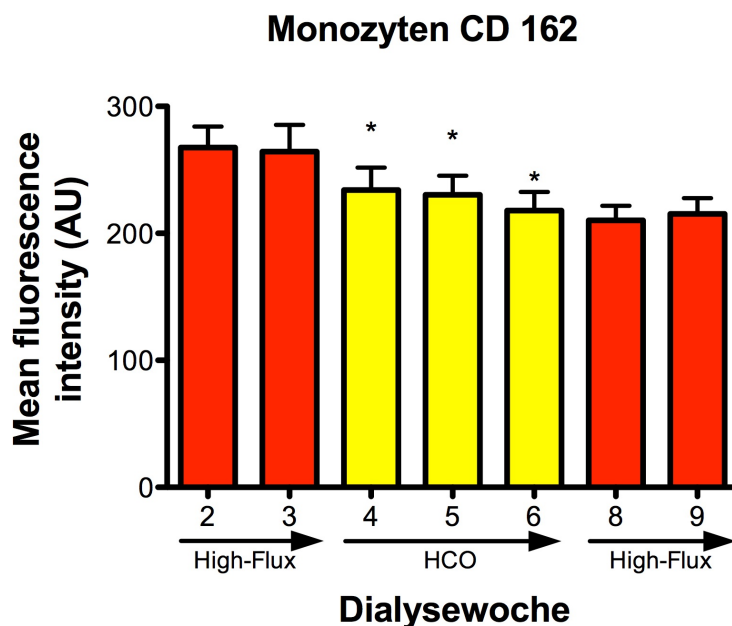


Abbildung 16: Balkendiagramm zur Darstellung der durchschnittlichen MFI von CD162 auf Monozyten in den 3 Phasen der Studie

Die Analyse erfolgte mit Repeated measures one-way ANOVA. $*=p<0,05$ vs. Woche 3, $n=15$

	Wo. 2	Wo. 3	Wo. 4	Wo. 5	Wo. 6	Wo. 8	Wo. 9
Mittelwert (AU)	267,5	264,4	234,1	230,3	217,9	210,2	215,3
Standardabweichung	64,36	81,42	68,70	58,25	56,94	44,84	48,33
Standardfehler	16,62	21,02	17,74	15,04	14,70	11,58	12,48

Tabelle 18: Angaben des Mittelwertes und des Standardfehlers der MFI von CD162 auf Monozyten

4.4.1.3 Expression von CD162 auf Lymphozyten

Es zeigt sich auch für die Expression von CD162 auf Lymphozyten ein Abfall der MFI mit Beginn der HCO-Phase. So beträgt die MFI in Woche 3 140,6 AU und in Woche 4 122,1 AU. Dieser Abfall nimmt bis zum Ende der HCO-Phase weiter zu und ist statistisch signifikant. Im Vergleich zu Woche 3 unterbieten die MFI aus Woche 4, 5 und 6 das Signifikanzniveau von 0,05.

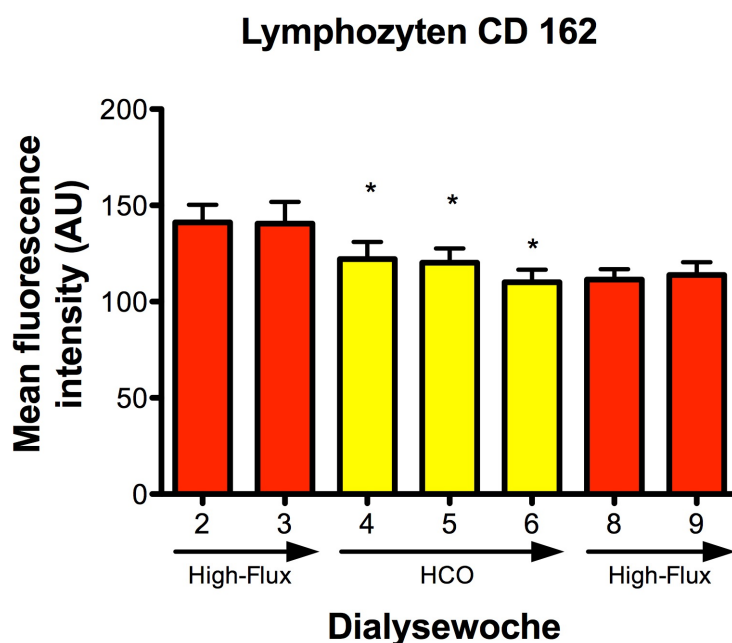


Abbildung 17: Balkendiagramm zur Darstellung der durchschnittlichen MFI von CD162 auf Lymphozyten in den 3 Phasen der Studie

Die Analyse erfolgte mit Repeated measures one-way ANOVA. * $p < 0,05$ vs. Woche 3, $n = 15$

	Wo. 2	Wo. 3	Wo. 4	Wo. 5	Wo. 6	Wo. 8	Wo. 9
Mittelwert (AU)	141,2	140,6	122,1	120,2	110,1	111,5	113,8
Standardabweichung	35,33	43,68	34,35	29,07	25,03	20,77	25,69
Standardfehler	9,122	11,28	8,870	7,505	6,464	5,364	6,632

Tabelle 19: Angaben des Mittelwertes, der Standardabweichung und des Standardfehlers der MFI von CD162 auf Lymphozyten

4.4.2 Expression von CD181 auf Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten

Die Abbildungen 18 - 20 zeigen die MFI von CD181 auf Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten in den verschiedenen Phasen der Studie. Die höchsten MFI werden bei Granulozyten erreicht, gefolgt von Monozyten und Lymphozyten.

Betrachtet man die Abbildung 18, erkennt man, dass die MFI von CD181 bei Granulozyten in der HCO-Phase höher ist als in beiden HF-Phasen. Der niedrigste gemessene Wert in Woche 9 unterscheidet sich jedoch nicht signifikant zu dem Wert aus Woche 6.

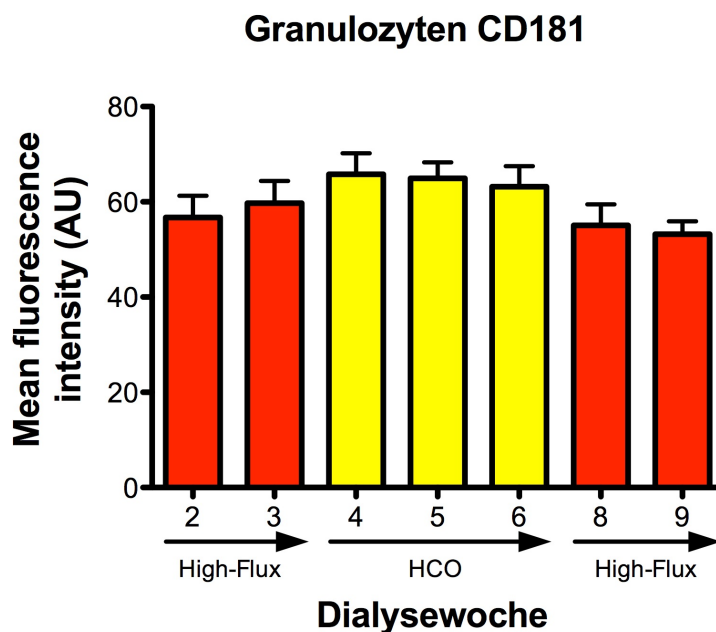


Abbildung 18: Balkendiagramm zur Darstellung der durchschnittlichen MFI von CD181 auf Granulozyten in den 3 Phasen der Studie

Die Analyse erfolgte mit Repeated measures one-way ANOVA. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Wochen waren statistisch nicht signifikant. n=15

	Wo. 2	Wo. 3	Wo. 4	Wo. 5	Wo. 6	Wo. 8	Wo. 9
Mittelwert (AU)	56,71	59,74	65,79	64,95	63,16	55,08	53,20
Standardabweichung	17,59	17,91	16,99	12,92	16,74	17,08	10,45
Standardfehler	4,542	4,625	4,386	3,335	4,322	4,409	2,698

Tabelle 20: Angaben des Mittelwertes, der Standardabweichung und des Standardfehlers von CD181 auf Granulozyten

Die medianen MFI von CD181 auf Monozyten steigen von Woche 2 bis Woche 6 an und nehmen ab Woche 8 wieder ab. Ein Signifikanzniveau wird nicht unterboten.

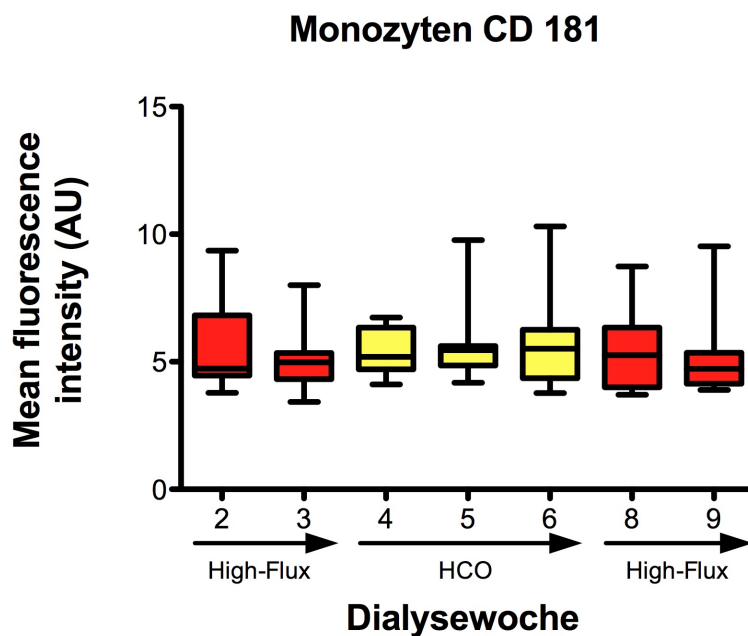


Abbildung 19: Boxplot zur Darstellung der medianen MFI von CD181 auf Monozyten in den 3 Phasen der Studie

Die Analyse erfolgte mit dem Friedman-Test. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Wochen waren statistisch nicht signifikant. n=15

	Wo. 2	Wo. 3	Wo. 4	Wo. 5	Wo. 6	Wo. 8	Wo. 9
Median (AU)	4,73	4,98	5,19	5,46	5,51	5,25	4,72
Interquartils-spanne	4,46-6,82	4,32-5,34	4,70-6,34	4,85-5,62	4,36-6,25	3,99-6,33	4,14-5,35
Spannweite	3,78-9,36	3,43-8,00	4,11-6,73	4,18-9,77	3,77-10,31	3,70-8,73	3,90-9,53

Tabelle 21: Angaben des Medians, der Interquartilspanne und der Spannweite der MFI von CD181 auf Monozyten

Bei der MFI von CD181 auf Lymphozyten steigt der Median ebenfalls von Woche 2 (2,87) bis Woche 6 (3,61) an und nimmt in der letzten Phase der Studie wieder ab. In Woche 9 beträgt die mediane MFI noch 2,73. Es gibt keine signifikanten Unterschiede zwischen der HCO-Phase und Woche 3 bzw. der 2. HF-Phase und Woche 6.

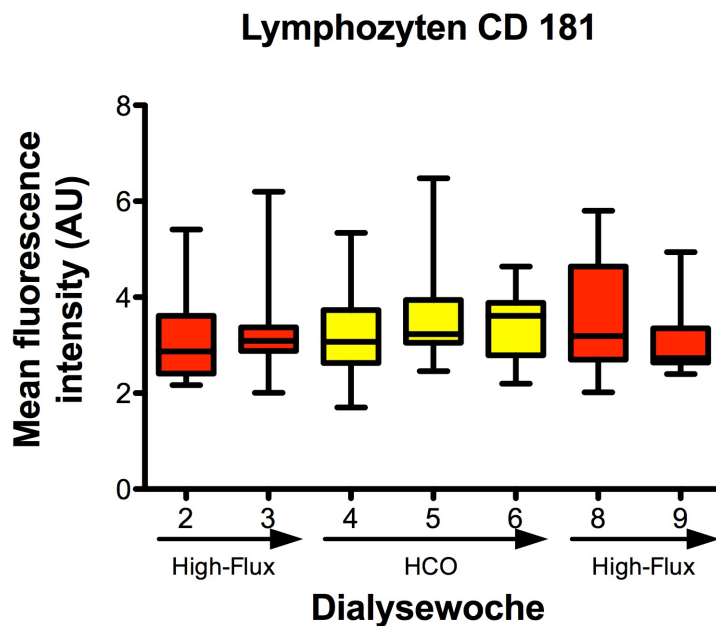


Abbildung 20: Boxplot zur Darstellung der medianen MFI von CD181 auf Lymphozyten in den 3 Phasen der Studie

Die Analyse erfolgte mit dem Friedmann-Test. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Wochen waren statistisch nicht signifikant. n=15

	Wo. 2	Wo. 3	Wo. 4	Wo. 5	Wo. 6	Wo. 8	Wo. 9
Median (AU)	2,87	3,09	3,07	3,23	3,61	3,19	2,73
Interquartilsspanne	2,41-3,61	2,88-3,37	2,63-3,73	3,05-3,94	2,79-3,88	2,70-4,64	2,64-3,35
Spannweite	2,17-5,41	2,01-6,20	1,70-5,34	2,46-6,48	2,20-4,64	2,02-5,80	2,40-4,94

Tabelle 22: Angaben des Medians, der Interquartilsspanne und der Spannweite der MFI von CD181 auf Lymphozyten

4.4.3 Expression von CD11b auf Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten

Die Abbildungen 21 - 23 zeigen die durchschnittlichen bzw. medianen MFI von CD11b auf den verschiedenen Leukozyten. Sowohl auf Granulozyten als auch auf Monozyten und Lymphozyten lassen sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der

Antigenexpression in den verschiedenen Phasen der Studie erkennen.

Vergleicht man die MFI aller untersuchten Leukozyten, so ist die Expressionsdichte von CD11b auf Monozyten am höchsten, gefolgt von der auf Granulozyten und der auf Lymphozyten.

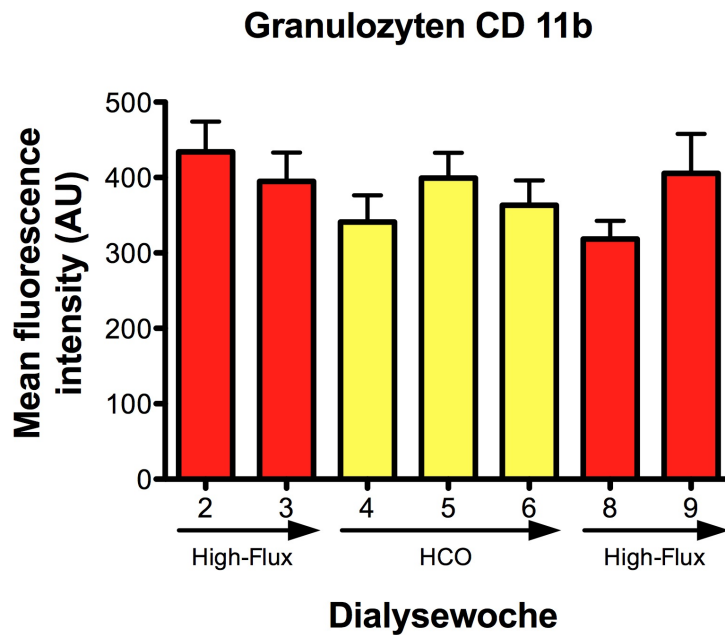


Abbildung 21: Balkendiagramm zur Darstellung der durchschnittlichen MFI von CD11b auf Granulozyten in den 3 Phasen der Studie

Die Analyse erfolgte mit Repeated measures one-way ANOVA. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Wochen waren statistisch nicht signifikant. n=15

	Wo. 2	Wo. 3	Wo. 4	Wo. 5	Wo. 6	Wo. 8	Wo. 9
Mittelwert (AU)	434,1	394,8	341,0	399,3	363,1	318,5	405,6
Standardabweichung	155,1	147,6	136,8	130,3	127,6	92,65	202,5
Standardfehler	40,05	38,12	35,31	33,66	32,96	23,92	52,29

Tabelle 23: Angaben des Mittelwertes, der Standardabweichung und des Standardfehlers der MFI von CD11b auf Granulozyten

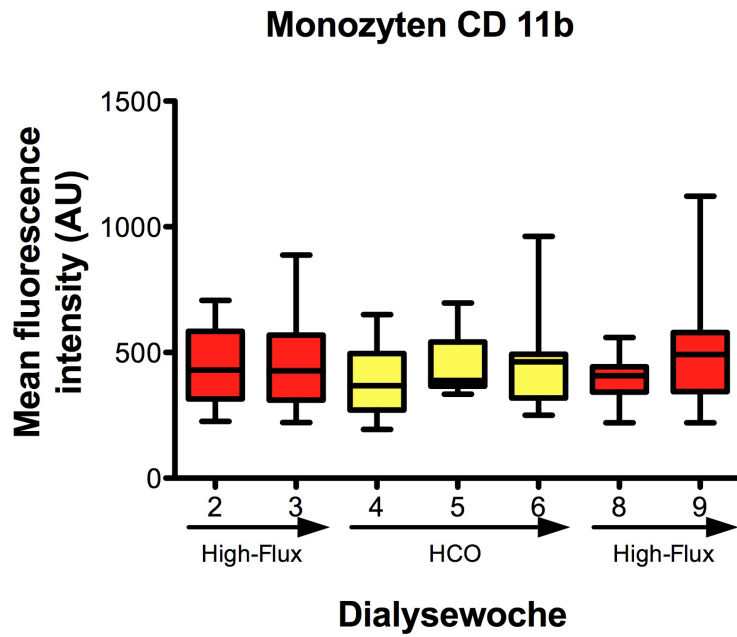


Abbildung 22: Boxplot zur Darstellung der medianen MFI von CD11b auf Monozyten in den 3 Phasen der Studie

Die Analyse erfolgte mit dem Friedmann-Test. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Wochen waren statistisch nicht signifikant. n=15

	Wo. 2	Wo. 3	Wo. 4	Wo. 5	Wo. 6	Wo. 8	Wo. 9
Median (AU)	430,2	426,7	368,2	388,9	462,8	407,5	491,9
Interquartils- spanne	315,3- 584,2	310,8- 568,7	271,3- 495,6	366,5- 542,2	319,0- 492,8	342,9- 443,1	344,9- 579,3
Spannweite	226,4- 707,4	221,2- 888,0	194,0- 650,9	333,9- 696,8	250,2- 962,3	220,3- 559,3	220,7- 1121

Tabelle 24: Angaben des Medians, der Interquartilsspanne und der Spannweite der MFI von CD11b auf Monozyten

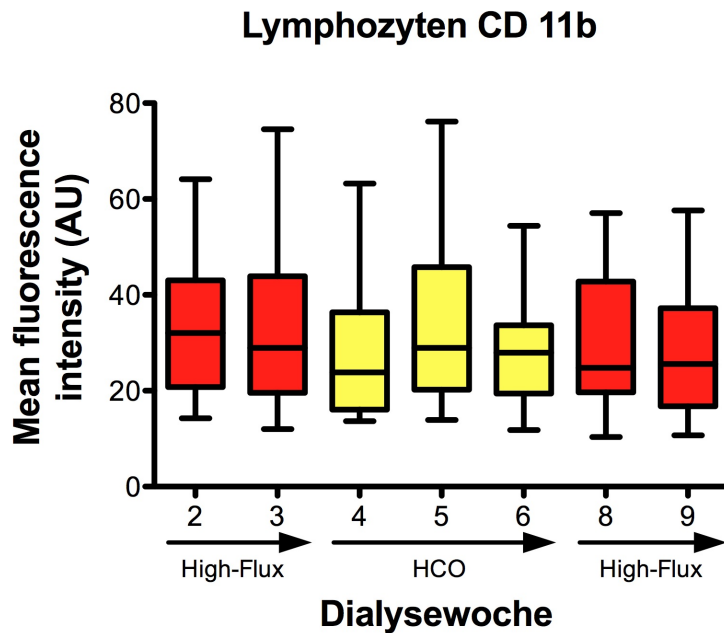


Abbildung 23: Boxplot zur Darstellung der medianen MFI von CD11b auf Lymphozyten in den 3 Phasen der Studie

Die Analyse erfolgte mit dem Friedmann-Test. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Wochen waren statistisch nicht signifikant. n=15

	Wo. 2	Wo. 3	Wo. 4	Wo. 5	Wo. 6	Wo. 8	Wo. 9
Median (AU)	32,07	28,96	23,81	28,93	27,92	24,77	25,57
Interquartils- spanne	20,76- 43,04	19,57- 43,88	16,09- 36,35	20,25- 45,80	19,42- 33,66	19,65- 42,80	16,75- 37,23
Spannweite	14,28- 64,16	12,02- 74,55	13,68- 63,21	13,92- 76,18	11,81- 54,40	10,36- 57,08	10,70- 57,60

Tabelle 25: Angaben des Medians, der Interquartilsspanne und der Spannweite der MFI von CD11b auf Lymphozyten

4.4.4 Expression von CD45/CD14 auf Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten

Die Analyse von CD45/CD14 war kein primärer oder sekundärer Endpunkt dieser Studie. Sie erfolgte ursprünglich, um mit den MFI der zu untersuchenden Oberflächenantigenen eine Ratio zu der MFI von CD45/CD14 zu bilden. Die Abbildungen 24 - 26 zeigen, dass die MFI bei Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten in der HCO-Phase signifikant zunimmt und in der darauffolgenden HF-Phase wieder abnimmt, ohne jedoch einen signifikanten Unterschied zu Woche 6 zu erreichen.

Granulozyten CD 45/CD14

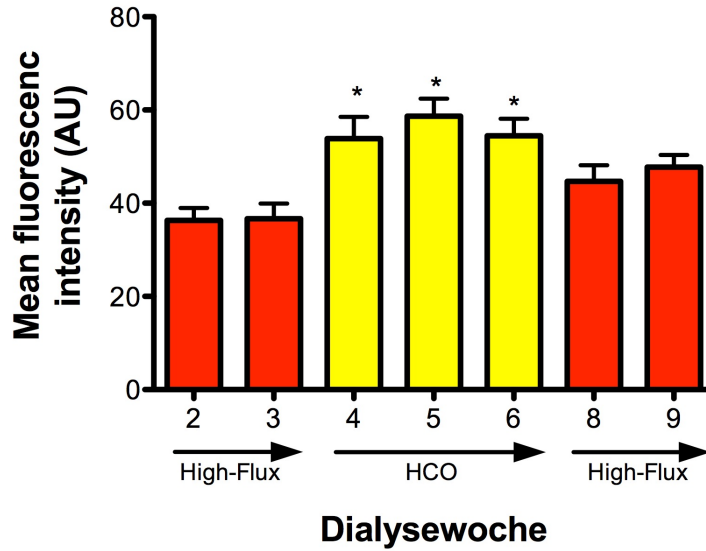


Abbildung 24: Balkendiagramm zur Darstellung der durchschnittlichen MFI von CD45/CD14 auf Granulozyten in den 3 Phasen der Studie

Die Analyse erfolgte mit Repeated measures one-way ANOVA. *= $p < 0,05$ vs. Woche 3, $n=15$

	Wo. 2	Wo. 3	Wo. 4	Wo. 5	Wo. 6	Wo. 8	Wo. 9
Mittelwert (AU)	36,33	36,66	53,82	58,66	54,47	44,67	47,75
Standardabweichung	10,28	12,65	18,09	14,52	14,08	13,48	10,11
Standardfehler	2,654	3,266	4,670	3,749	3,636	3,481	2,610

Tabelle 26: Angaben des Mittelwertes, der Standardabweichung und des Standardfehlers der MFI von CD45/CD14 auf Granulozyten

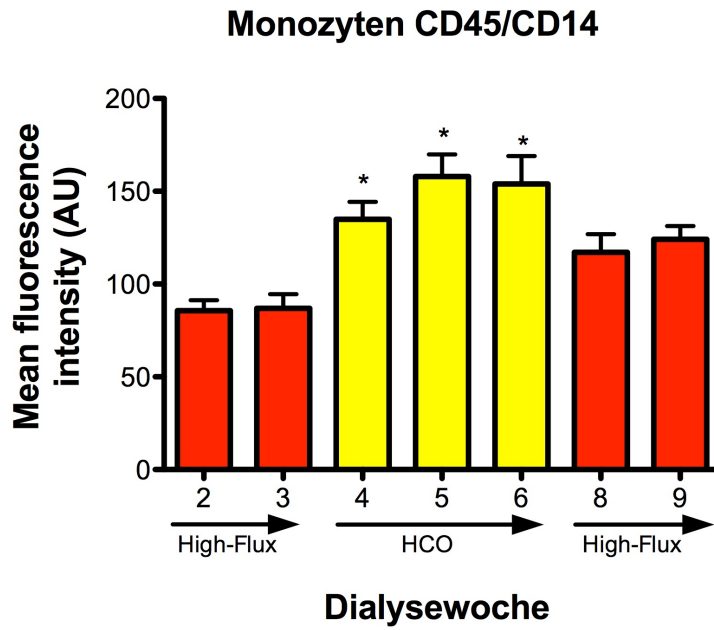


Abbildung 25: Balkendiagramm zur Darstellung der durchschnittlichen MFI von CD45/CD14 auf Monozyten in den 3 Phasen der Studie

Die Analyse erfolgte mit Repeated measures one-way ANOVA. *= $p < 0,05$ vs. Woche 3, $n = 15$

	Wo. 2	Wo. 3	Wo. 4	Wo. 5	Wo. 6	Wo. 8	Wo. 9
Mittelwert (AU)	85,67	86,86	134,9	158,0	153,9	117,1	124,1
Standardabweichung	21,70	30,01	36,26	45,87	58,48	37,94	27,86
Standardfehler	5,603	7,749	9,362	11,84	15,10	9,795	7,194

Tabelle 27: Angaben des Mittelwertes, der Standardabweichung und des Standardfehlers der MFI von CD45/CD14 auf Monozyten

Lymphozyten CD45/CD14

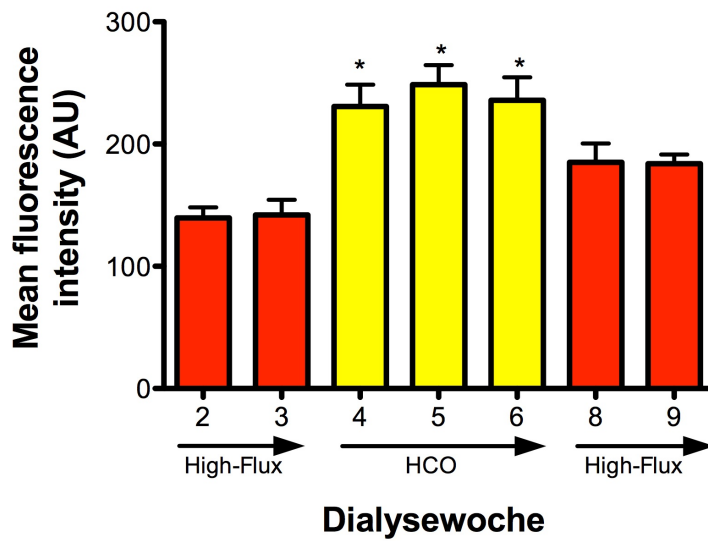


Abbildung 26: Balkendiagramm zur Darstellung der durchschnittlichen MFI von CD45/CD14 auf Lymphozyten in den 3 Phasen der Studie

Die Analyse erfolgte mit Repeated measures one-way ANOVA. *= $p < 0,05$ vs. Woche 3, $n=15$

	Wo. 2	Wo. 3	Wo. 4	Wo. 5	Wo. 6	Wo. 8	Wo. 9
Mittelwert (AU)	139,5	142,0	230,7	248,6	235,9	185,0	184,0
Standardabweichung	33,82	48,23	69,49	62,39	72,09	59,71	29,00
Standardfehler	8,733	12,45	17,94	16,11	18,61	15,42	7,488

Tabelle 28: Angaben des Mittelwertes, der Standardabweichung und des Standardfehlers der MFI von CD45/CD14 auf Lymphozyten

5. Diskussion

Die erhöhte Morbidität und Mortalität bei Niereninsuffizienten ist trotz vieler technologischer und medizinischer Fortschritte unverändert hoch. Bereits vor Erreichen der terminalen Niereninsuffizienz besteht ein erhöhtes Sterberisiko und ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse [86]. Bei terminal Niereninsuffizienten besteht im Vergleich zu Gesunden sogar eine 30-fach erhöhte kardiovaskuläre Mortalität [85]. Ein Grund hierfür könnte der Zustand der chronischen Mikroinflammation bei Niereninsuffizienten sein. Dieser Zustand entsteht einerseits durch Akkumulation und Produktion inflammatorischer Moleküle, andererseits beeinflusst der Dialyseprozess die Bildung inflammatorischer Moleküle. Einige urämische Toxine, wie etwa mittlere Moleküle, haben ein Molekulargewicht, das den MWCO einer Dialysemembran nicht unterschreitet. Dies kann zur Akkumulation der urämischen Toxine führen. Unterschiedliche Porengrößen von Dialysemembranen sowie der Einfluss der Dialyседosis sind daher Bestandteil von Forschung und gegenwärtiger Therapie.

Der Einfluss unterschiedlicher Porosität von Dialysatoren auf die Mortalität und Morbidität wurde bereits in mehreren Studien untersucht. Eine der umfangreichsten Studien war die 1995 begonnene HEMO Studie. Diese randomisierte kontrollierte klinische Studie untersuchte in 2x2-faktoriellem Design, ob eine Erhöhung der Dialyседosis oder ein höherer Flux einer Dialysemembran das Überleben von dialysepflichtigen Patienten verbesserte. Im Kontrast zu früheren Studien, welche ein 20-24 % geringeres Sterberisiko assoziiert mit HF-Dialyse aufwiesen [119, 120], zeigte sich in der HEMO-Studie nur ein um 8 Prozentpunkte geringeres Sterberisiko gegenüber Dialyse mit low-flux-Membranen. Bei der Gesamtmortalität wurde das Signifikanzniveau verfehlt, jedoch verringerte sich in der HF-Gruppe das Sterberisiko und die erstmalige Hospitalisation aufgrund kardialer Ursachen signifikant. Weiterhin profitierten Patienten, die bereits länger als 3,7 Jahre Dialyse erhalten haben, von HF-Membranen. Das Sterberisiko lag 32 % unter dem von Patienten, die länger als 3,7 Jahre mit low-flux Membranen dialysiert wurden [121].

Die europäische *Membrane permeability outcome* MPO-Studie verglich HF- und low-flux-Dialyse bei hyp- und normalalbuminämischen Patienten. Für Patienten, deren Albumin-Konzentration < 4g/dl betrug, ergab sich eine signifikante Reduktion der Gesamtmortalität bei Dialyse mittels HF-Membranen [122]. Sowohl die HEMO- als auch die MPO-Studie konnten nachweisen, dass bei Dialyse mit HF-Membranen die Konzentration des mittleren Makromoleküls β_2 -Mikroglobulins signifikant gesenkt werden konnte [121, 122]. Zudem konnte in der HEMO-Studie ein Zusammenhang zwischen höheren β_2 -Mikroglobulin-Konzentrationen und erhöhtem Sterberisiko hergestellt werden [123]. Dies unterstreicht die Wichtigkeit der Elimination von β_2 -Mikroglobulin und wahrscheinlich anderer proinflammatorischer mittlerer Makromoleküle, die jedoch aufgrund des MWCO von HF-Membranen (10-15 kDa) nicht in ausreichendem Maße eliminiert werden können.

Das Verfahren der Hämodiafiltration (HDF) kombiniert Diffusion und Konvektion und erreicht so eine größere Clearance kleinerer und mittlerer Moleküle wie β_2 -Mikroglobulin [124]. Die DOPPS Studie (*Dialysis Outcomes And Practice Patterns Study*) verglich die Mortalitätsraten von Patienten, die mit HDF und HD behandelt wurden und konnte einen signifikanten Überlebensvorteil für HDF mit einem hohen Substitutionsvolumen (15 – 24,9 l) im Vergleich zu low-flux- und HF-HD nachweisen. Dies war die erste größere Kohortenstudie, die diesen Vorteil nachwies [125]. Die prospektive Contrast Studie (Convective Transport Studie) konnte keine verbesserte Gesamtmortalität von HDF oder einer verringerten Inzidenz kardiovaskulärer Ereignisse im Vergleich zu low-flux-HD nachweisen. Wie bei DOPPS verringert sich jedoch die Mortalität in der Gruppe mit hohem Konvektionsvolumen (> 21,95 l) [126].

Die türkische HDF Studie von Ok et. al war die erste klinische randomisierte Studie, die HDF mit HF-HD bezüglich Gesamtmortalität und der Inzidenz kardiovaskulärer Ereignisse verglich. Ein statistisch signifikanter Vorteil für HDF ergab sich nicht, wobei die Subgruppe der Patienten, die ein größeres medianes Substitutionsvolumen von 17,4 l erhielt, eine signifikant bessere Gesamtmortalität sowie kardiovaskuläre Mortalität im Vergleich zu HF-HD hatte [127]. Die Konzentrationen des Urämietoxins Phosphat konnten in der HDF-Gruppe mit hohem Substitutionsvolumen im Vergleich zu der HDF-Gruppe mit niedrigerem Substitutionsvolumen (< 17,4 l) und HF-HD signifikant

gesenkt werden. Es gelang jedoch in keiner der Gruppen das 11,8 kDa große β_2 -Mikroglobulin zu senken. Ein Grund hierfür kann die Molekulargröße sein, die über dem MWCO der benutzten Dialysemembranen liegt.

In der randomisierten, kontrollierten, multizentrischen Studie von Maduell et. al. konnte erstmals die Gesamtmortalität durch Online-HDF gegenüber Standard-HD signifikant gesenkt werden. Die 456 Patienten, die Postdilutions-Online-HDF erhielten, hatten im Vergleich zu den 450 HD-Patienten ein 30 % niedrigeres Gesamtmortalitätsrisiko. In den Untergruppen der Todesursachen konnte die Mortalität aufgrund von Infektionen und die Mortalität nach einem Schlaganfall signifikant gesenkt werden. Die geschätzte number-needed-to-treat betrug 8 Patienten, um einen Todesfall pro Jahr zu vermeiden [128].

Aufgrund der mit der Inflammationsreaktion assoziierten hohen kardiovaskulären Mortalität von CNI-Patienten bedarf es der Weiterentwicklung der Dialysetechniken, um die inflammatorische Antwort zu reduzieren, mit dem Ziel die kardiovaskuläre Mortalität zu senken. Dialysemembranen mit einem höheren MWCO könnten es ermöglichen, die Clearance von mittleren Molekülen wie β_2 -Mikroglobulin, AGE, Leptin und verschiedenen Zytokinen zu erhöhen. Wie eingangs beschrieben, erreichen HCO-Membranen höhere Siebkoeffizienten und konnten in Studien die Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine sowie mittlerer Moleküle bereits signifikant senken [98, 100, 101]. Im Rahmen der hier vorliegenden Studie wurde der Einfluss einer HCO-Membran mit einem MWCO von 100 kDa auf die Expression zellulärer und humoraler Marker der Inflammation bei terminal Niereninsuffizienten im Vergleich zur Dialyse mit einer HF-Membran untersucht. Im ABA-Design wurden die Konzentrationen der humoralen und zellulärer Inflammationsmarker vor HF-HD und HCO-HD gemessen. Speziell der Einfluss der HCO-Membran auf die Veränderung ihrer Serumkonzentrationen bzw. Expressionsdichte wurde untersucht.

5.1 Diskussion der Parameter

5.1.1 Humorale Marker der Inflammation

5.1.1.1 CRP und IL-6

Obwohl die geringste mediane CRP-Konzentration in Woche 5 (0,28 mg/dl) der HCO-Phase lag, wurde eine signifikante Verringerung der Serum-Spiegel durch Behandlung mit der HCO-Membran nicht erreicht. Die IL-6 Konzentrationen erreichten ebenfalls in Woche 5 der HCO-Phase ihren niedrigsten Median (3,44 ng/ml), ohne das Signifikanzniveau zu unterschreiten. Beide Konzentrationen stiegen in Woche 6 der HCO-Phase wieder an, sodass man einen Trend zur Reduktion der Konzentrationen durch HCO-HD nicht feststellen kann.

Fiedler et. al. untersuchten an 19 dialysepflichtigen Patienten mit erhöhten CRP-Spiegeln ebenfalls den Einfluss des HCO 1100 Hemofilters unter anderem auf humorale Marker der Inflammation. Die Patienten wurden randomisiert und in 6 aufeinanderfolgenden Sitzungen (2 Wochen) entweder HF- oder HCO-dialysiert. Im Anschluss erfolgte eine 2-wöchige Auswaschphase mit einer Standard-HD Membran. In den letzten 2 Wochen der Studie wechselten die Patienten in den jeweils anderen Dialysemodus. Blutproben wurden zu Beginn und gegen Ende einer jeden Phase entnommen. CRP und IL-6 wurden durch die HCO-Membran im Vergleich zur Dialyse mit der HF-Membran (Polyflux 11S, Gambro) nicht gesenkt [129].

Wie auch in den Ergebnissen dieser Dissertationsschrift ergaben sich keine signifikanten Unterschiede für CRP und IL-6. Fiedler et. al. analysierten zusätzlich das Dialysat und konnten neben einem signifikant höheren Proteinverlust nach Anwendung des HCO 1100 Hemofilters auch IL-6 im Dialysat detektieren, während sich im Dialysat der HF-Membran kein IL-6 nachweisen ließ [129]. Weitere Studien, die den Einfluss der HCO-Membran auf Marker der Inflammation bei chronisch dialysepflichtigen Patienten untersuchen, gibt es derzeit nicht. Es gibt Studien, in denen bei Patienten in Zuständen massiver Interleukinproduktion wie bei Sepsis HCO-Anwendungen erfolgten. Deren Methoden und Ergebnisse werden nachfolgend vorgestellt und diskutiert.

In einer Pilotstudie, die den Effekt einer HCO-Membran unter anderem auf IL-6 und CRP-Konzentrationen bei 28 septischen Patienten mit ANV untersuchte, konnten im

Vergleich zum Ausgangswert signifikant niedrigere Konzentrationen (IL-6, $p=0,0465$; CRP, $p=0,02$) nach 48 Stunden kontinuierlicher HCO-Hämodialyse gemessen werden. Die konventionelle HF-Hämodialyse erzielte keine signifikante Reduktion der IL-6- und CRP-Konzentrationen [130]. Gemeinsamkeiten der Pilotstudie und der hier vorliegenden Studie sind eine geringe Anzahl an Patienten so wie die technischen Daten der verwendeten HCO-Membran (P2SH). Membranoberfläche, Poren- und Innendurchmesser sowie die Wandstärke entsprachen denen des HCO 1100 Hemofilters (s. Tabelle 6). Der Vergleich der beiden Studien ist jedoch nur eingeschränkt möglich, da die Pilotstudie nach 48 Stunden endete und die Dialyse im konvektiven Modus der kontinuierlichen Hämodialyse erfolgte.

In einer randomisierten, prospektiven Studie von Morgera et. al. wurde an 24 Patienten mit Sepsis-bedingtem ANV der Einfluss der kontinuierlichen venovenösen HD und der kontinuierlichen venovenösen Hämodialyse mit der HCO-Membran P2SH auf die Clearance der Interleukine IL-6 (28 kDa) und IL-1ra (17 kDa) untersucht. Die Therapien erfolgten mit hohem (2,5 l/h) und niedrigem (1 l/h) Substitutionsvolumen. Die hochvolumige Gruppe, die Hämodialyse erhielt, erreichte die höchsten Clearance-Werte für IL-6 und war der HD leicht überlegen, ohne jedoch das Signifikanzniveau zu unterschreiten ($p=0,0935$). Clearance-Werte für IL-1ra waren im konvektiven Modus sogar signifikant höher als im diffusiven Modus der HD. Die Erhöhung des Ultrafiltrationsvolumen oder des Dialysatflusses erhöhte die Clearance-Werte für IL-6 und IL-1ra hoch signifikant [131].

Sowohl in den Ergebnissen dieser Dissertationsschrift, als auch in den Ergebnissen von Morgera et. al. wurde im HD-Modus keine signifikante IL-6 Reduktion durch die HCO-Membran erreicht. Der HD-Modus könnte ein Grund hierfür sein, da bei der Hämodialyse der Stofftransport über Konvektion erfolgt und sich im Gegensatz zum diffusiven Stofftransport, wie er bei der HD zum Einsatz kommt, durch eine höhere Clearance von Mittelmolekülen auszeichnet [132]. Morgera et. al. stellten zudem fest, dass Patienten, bei denen es zu einer signifikanten Reduktion von IL-6 kam, deutlich erhöhte Ausgangswerte hatten als Patienten, bei denen es zu keiner signifikanten Reduktion kam. In den Ergebnissen dieser Arbeit liegen die medianen IL-6-Werte der einzelnen Wochen zwischen 3,44 pg/ml und 6,53 pg/ml im Vergleich zu ca. 100-fach erhöhten IL-6-Ausgangswerten (mediane Ausgangswerte der 4 Gruppen: 1. 355 pg/ml,

2. 585 pg/ml, 3. 464 pg/ml, 4. 831 pg/ml) bei den septischen Patienten von Morgera et. al. [131]. Da sich bei diffusivem Stofftransport die gelösten Substanzen entlang eines Konzentrationsgradienten vom Ort der höheren Konzentration (Blutflußseite) zum Ort der niedrigeren Konzentration (Dialysatflußseite) bewegen, kann auch die Eliminationsrate bei hohen Konzentrationen höher sein. Dies könnte zudem erklären, warum in den Ergebnissen dieser Arbeit keine signifikant niedrigeren Werte erreicht wurden.

Eine Studie, die HCO-HD mit HF-HD bezüglich der Eliminationseigenschaft von Zytokinen verglich, wurde bereits einleitend vorgestellt. Haase et. al. konnten in der randomisierten Phase-1-Studie an 10 septischen Patienten mit ANV den Nachweis erbringen, dass intermittierende HCO-HD mit dem HCO 1100 Hämofilter im Vergleich zu HF-HD die Plasmakonzentrationen von IL-6, IL-8 und IL-10 signifikant senkt. Die IL-6-Konzentrationen sanken nach 4-stündiger Therapie mit der HCO Membran um 30,3 % während bei der konventionellen Therapie keine Reduktion der IL-6-Konzentrationen erreicht werden konnte (s. Abb. 27) [102].

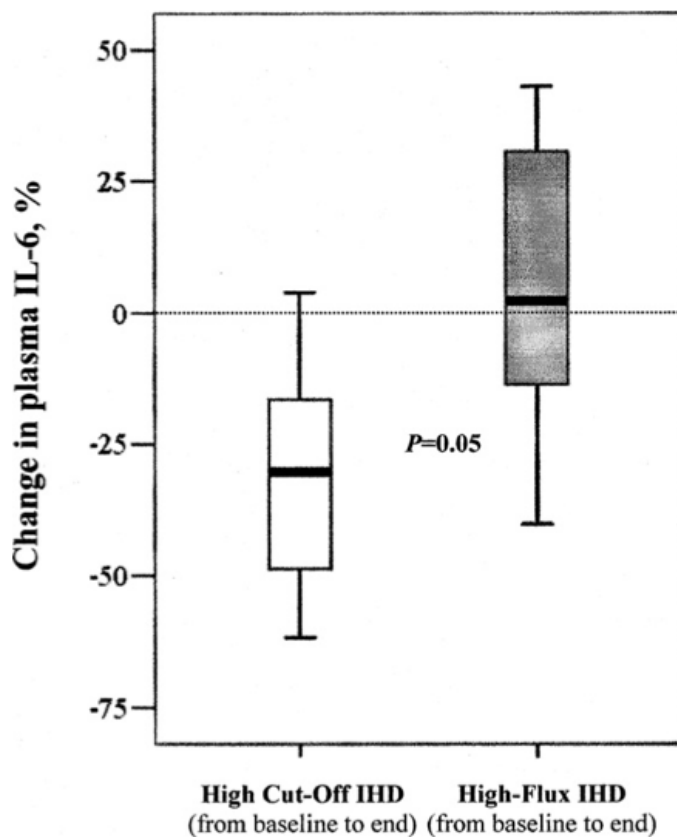


Abbildung 27: Relative Veränderungen der IL-6 Plasmakonzentration von 10 septischen Patienten während intermittierender HCO-HD und intermittierender HF-HD von Beginn bis zum Ende der Behandlung [102]

Zusammenfassend kann man sagen, dass die HCO-Membran in septischen Zuständen gute Clearancekapazitäten für IL-6 erzielt, insbesondere im Modus der Hämofiltration. Während HCO-Hämofiltration konnte zudem CRP signifikant gesenkt werden. Bei kontinuierlichen Verfahren ist also die kurzfristige Senkung proinflammatorischer Zytokine möglich. Im Gegensatz dazu zeigte sich in der vorliegenden Studie keine anhaltende bzw. nachhaltige Senkung der Zytokinspiegel bei CNI-Patienten. Ein Grund hierfür könnte u.a. die unterschiedliche Konzentration der zu eliminierenden Zytokine bei septischen und bei niereninsuffizienten Patienten sein. In einer Akut-Phase-Reaktion wie bei Sepsis sind diese um ein Vielfaches höher als bei chronisch dialysepflichtigen Patienten. Kann man die Limitationen der HCO-Anwendung weiter minimieren und die Anwendungsdauer bei einer größeren Studienpopulation verlängern, sollten weitere Studien durchgeführt werden, um einen möglichen Benefit auch für chronisch dialysepflichtige Patienten nachzuweisen.

5.1.1.2 IL-10

In Woche 6 der HCO-Phase wurde die höchste Spannweite sowie der höchste Median (25,4 pg/ml) des antiinflammatorischen Zytokins erreicht. In Woche 5 der HCO-Phase wurde der zweithöchste Median gemessen. Die Ergebnisse unterschieden sich in keiner Woche statistisch signifikant von den Ergebnissen aus der HF-Phase. Aufgrund der geringen Anzahl an Patienten (n=5, n=6 in Woche 6 und 9) und der großen Spannweite der gemessenen Konzentrationen, ist die Interpretation der Ergebnisse nur sehr eingeschränkt möglich. Wegen der Molekulargröße (35-40 kDa) und seiner Eigenschaft als Mittelmolekül ist es möglich, mittels HCO-HD IL-10 zu eliminieren. Dies wurde auch in den Ergebnissen von Haase et. al. gezeigt [102]. Wie auch IL-6 und CRP konnte IL-10 in der Studie von Fiedler et. al. nicht gesenkt werden [129]. Durch seine Eigenschaft proinflammatorische Zytokine und Adhäsionsmoleküle herunter zu regulieren [133] und somit Inflammationsprozesse eher zu dämpfen, ist ein möglicher übermäßiger Verlust über die HCO-Membran kritisch zu betrachten.

5.1.1.3 PTX3

Die medianen PTX3-Konzentrationen lagen im Bereich von 2,8 ng/ml in Woche 2 und 3,92 ng/ml in Woche 8. Die höchste Interquartilsspanne wurde in Woche 6 erreicht mit einem Median von 3,55 ng/ml. Im Vergleich zu Woche 3 besteht hier ein signifikanter Unterschied.

Aufgrund der Molekulargröße von 40 kDa zählt PTX3 zu den Mittelmolekülen, bei denen HCO-Membranen einen höheren Siebkoeffizienten als HF-Membranen erreichen können. Entgegen der Erwartung einer vermehrten Elimination von PTX3 in der HCO-Phase stieg PTX3 an. Da zahlreiche Stimuli zu einer vermehrten Expression von PTX3 führen, können verschiedene Gründe für einen Anstieg in der HCO-Phase diskutiert werden. Anhand der in dieser Studie gemessenen PTX3-Konzentrationen erkennt man, dass die Mediane in der letzten Phase der Studie das hohe Niveau halten, sogar in Woche 8 den höchsten Median erreichen. Ob wirklich die HCO-Membran einen Einfluss auf den Anstieg hat, bleibt somit nicht geklärt. Aktuell gibt es keine weiteren Studien, die den Einfluss der HCO-Membran auf die PTX3-Konzentrationen untersuchen.

Man weiß, dass der Dialyseprozess einen Einfluss auf die vermehrte Produktion inflammatorischer Mediatoren hat. In einer Studie von Oldani et. al. wurden bei 31 HD-Patienten die CRP- und PTX3-Konzentration zu Beginn (time-0) und zu Ende (time-1) einer HD-Behandlung gemessen sowie erneut vor der nächsten HD-Behandlung (time-2). Zum Zeitpunkt time-1 waren die PTX3-Konzentrationen signifikant erhöht im Vergleich zu time-0 und time-2. Da die PTX3-Konzentrationen zum Zeitpunkt time-2 wieder in etwa ihren Ausgangswert von time-0 erreicht hatten, kann man daraus schlussfolgern, dass der HD-Prozess einen unmittelbaren Einfluss auf die Expression von PTX-3 hat [134]. Der Tatsache, dass HD per se als inflammatorischer Trigger wirkt, steht gegenüber, dass sich bei denselben Patienten die CRP-Konzentrationen zu jedem Zeitpunkt nicht signifikant unterschieden [134]. Ist PTX3 also ein Marker für die Biokompatibilität von Membranen?

Oldani et. al. untersuchten ebenfalls die Konzentration von neutrophilen Granulozyten, von denen man weiß, dass sie PTX3 freisetzen können, zu den Zeitpunkten time-0,

time-1 und time-2. Die intrazelluläre Konzentration von PTX3 in Neutrophilen wurde daher miterfasst. Sowohl die Neutrophilen als auch die intrazelluläre PTX3-Konzentration waren zum Zeitpunkt time-1 signifikant verringert. Parallel dazu wurden die prä- und postdialysären mRNA-Konzentrationen von PTX3 aus Monozyten der Patienten bestimmt. Hier ergaben sich keine Unterschiede. Die Hypothese, dass Blut-Membran-Interaktionen eine Rolle für den intradialysären Konzentrationsanstieg von PTX3 spielen und dass PTX3 während HD aus neutrophilen Granulozyten freigesetzt wird, kann somit untermauert werden.

Die Membranen, die in dieser Studie verwendet wurden, bestehen beide aus PESU und PVP. Die einzigen Unterschiede sind der Innendurchmesser der Poren und der dadurch entstehende MWCO. Das Material der Membran ist also nicht ursächlich für die höheren PTX3-Konzentrationen in der HCO-Phase dieser Studie, zumal die analysierten Blutproben immer vor der HD abgenommen und untersucht wurden, sodass eher mittelfristige Regulationsmechanismen für den Anstieg verantwortlich sind.

Einfluss von PTX3 auf die Leukozytenrekrutierung

Um festzustellen, ob PTX3 ebenfalls mit Schlüsselmolekülen interagiert, die an der Rekrutierung von Leukozyten in Inflammationsherde beteiligt sind, untersuchten Deban et al. *in vitro*, ob PTX3 an Selektine bindet. Es zeigte sich, dass rekombinantes humanes PTX3 weder an E- noch L-Selektin bindet, sondern selektiv an P-Selektin; hier konkurriert es mit dem PSGL-1, welches auf der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten exprimiert wird. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass in Zuständen massiver Leukozyten-Aktivierung die Freisetzung von PTX3 aus hämatopoetischen Zellen zu einem negativen Feedback-Mechanismus führt, der die P-Selektin abhängige Leukozyten Rekrutierung mindert. PTX3 wirkt so als kompetitiver Inhibitor der P-Selektin-PSGL-1 Verbindung und blockiert die P-Selektin abhängige Migration der Leukozyten [135].

In vivo Untersuchungen von Deban et. al. an PTX3^{-/-} Mäusen zeigten, dass deren Leukozyten signifikant höhere Interaktionen mit zellulären Adhäsionsmolekülen hatten als Leukozyten von Wildtyp-Mäusen [135]. Die Daten von Deban et. al. zeigen, dass

endogen sezerniertes PTX3 das Rollen der Leukozyten entlang des Endothels beeinflusst und die Migration zu Entzündungsherden dämpft.

Die tendenziell höheren PTX3-Konzentrationen in Woche 8-9 sowie die signifikant höhere PTX3-Konzentration aus Woche 6 lassen sich dadurch nicht erklären, jedoch besteht in den Ergebnissen dieser Arbeit ein Zusammenhang zwischen PTX3-Konzentration und der PSGL-1-Expression. Denn wirkt PTX3 wirklich als kompetitiver Inhibitor an P-Selektin und kommt es zu einem negativen Feedback-Mechanismus der P-Selektin abhängigen Leukozyten Rekrutierung, könnten sich die höheren PTX3-Konzentrationen auf die Expression von PSGL-1 auswirken. In den Ergebnissen meiner Arbeit verringerte sich die MFI von PSGL-1 auf Neutrophilen, Monozyten und Lymphozyten in der HCO-Phase signifikant zu der MFI aus Woche 3. Zudem blieben die MFI in den darauffolgenden Wochen 8-9 der HD-Phase erniedrigt. Die höheren PTX-3 Konzentrationen könnten ein Grund hierfür sein. Aufgrund der geringen Studienpopulation von 15 und weiteren möglichen Gründen für das verminderte Expressionsverhalten von PSGL-1 während der HCO-Phase ist diese Kausalität unter Vorbehalt zu beurteilen. Es besteht die Möglichkeit, dass zelluläre inflammatorische Prozesse, an denen PSGL-1 beteiligt ist, durch PTX3 gebremst werden. Dennoch bleibt festzuhalten, dass PTX3 in der HCO-Phase ansteigt und dafür bekannt ist, Inflammation und vaskuläre Kalzifikation zu vermitteln [53]. Im nachfolgenden Kapitel werden weitere Gründe für das Expressionsverhalten der Adhäsionsmoleküle diskutiert.

5.1.2 Zelluläre Marker der Inflammation

5.1.2.1 PSGL-1 (CD162)

In den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit konnte die MFI von PSGL-1 auf Neutrophilen, Monozyten und Lymphozyten in der HCO-Phase signifikant gesenkt werden. Nach Wiederbeginn mit HF-HD blieb die Expressionsdichte auf dem niedrigen Niveau mit Tendenz zum Wiederanstieg in der letzten Studienwoche bei allen untersuchten Leukozytenpopulationen. Das unterbotene Signifikanzniveau von $p < 0,05$ in Woche 5 und 6 bei Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten zeigt, dass die HCO-Membran mit einer geringen Irrtumswahrscheinlichkeit Einfluss auf das Expressionsverhalten von PSGL-1 hat. Die Tatsache, dass die Expressionsdichte nach

Ende der HCO-Phase niedrig bleibt, könnte auf einen nachhaltigen Effekt hinweisen. Doch was bedeutet die verminderte Expressionsdichte von PSGL-1?

PSGL-1 spielt vor allem als Ligand auf neutrophilen Granulozyten, aber auch Monozyten und Lymphozyten eine wichtige Rolle bei der Leukozytenmigration. Er vermittelt Interaktionen zwischen Leukozyten, Thrombozyten und Endothelzellen. Die Aktivierung von Leukozyten sowie die Generation von ROS und die Produktion von TNF- α wird durch PSGL-1 induziert [136-138]. Bei dialysepflichtigen Patienten stimuliert vor allem die Anwendung hydrophober Dialysemembranen die Komplexbildung von Plättchen und neutrophilen Granulozyten [139], welche während der HD im Gegensatz zu den nicht Plättchen-adhärenenten neutrophilen Granulozyten fast die gesamte ROS-Produktion übernehmen [140]. Itoh et. al. konnten zeigen, dass AK gegen PSGL-1 die Komplexbildung effektiv verringern. Sie schlussfolgerten, dass die P-Selektin-PSGL-1 Interaktion eine Hauptrolle in der Komplexbildung zwischen neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten spielt [141]. Die verminderte Expressionsdichte von PSGL-1 in der HCO-Phase kann also dazu führen, dass sich weniger Neutrophilen-Thrombozyten-Komplexe bilden. Dadurch würden weniger ROS generiert, weniger Leukozyten aktiviert und weniger TNF- α -Produktion induziert. Die in dieser Studie gewonnenen Kenntnisse liefern also Hinweise, dass Inflammation durch die Reduktion der Expressionsdichte von PSGL-1 auf Leukozyten durch die HCO-Membran gesenkt werden kann.

Eine mögliche Erklärung für den Verlust von PSGL-1 auf Leukozyten wurde bereits im Kapitel zuvor erläutert. Kommt es durch PTX3 zu einem negativen Feedback-Mechanismus, der die P-Selektin abhängige Leukozyten Rekrutierung mindert, könnte es auch zu einer verminderten Expression von PSGL-1 kommen.

PSGL-1 ist ein entscheidendes Adhäsionsmolekül, das die Leukozyten-Migration und -Interaktion vermittelt und somit zelluläre inflammatorische Prozesse beeinflusst. Durch die HCO-Membran wird seine Expressionsdichte auf Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten signifikant verringert. Ob die verminderte Expressionsdichte von PSGL-1 tatsächlich Inflammation senkt, muss in weiteren Studien mit HCO-Membranen untersucht werden. Neutrophilen-Thrombozyten-Komplexe, entstehende ROS sowie TNF- α sollten dann miterfasst werden. Interessant wäre auch ein Verlauf, ob und wann

die Expressionsdichte von PSGL-1 nach konventioneller HF-HD wieder ansteigt. Möglicherweise kann intermittierende HCO-Anwendung einen nachhaltigen Effekt der verminderten Expression von PSGL-1 bedingen. Hierzu müssen weitere Studien durchgeführt werden.

5.1.2.2 CXCR-1 (CD181)

Expression auf Monozyten

Monozyten exprimieren überwiegend die Chemokin-Rezeptoren CCR1, CCR2 und CCR5. An diese Rezeptoren binden Chemokine der CC-Familie wie zum Beispiel RANTES/CCL5 und vermitteln so die Migration der Monozyten. Der Chemokinrezeptor CXCR-1 ist in geringerer Dichte auf Monozyten exprimiert und vermittelt vor allem die autokrine IL-8-Produktion [142]. In den Ergebnissen dieser Arbeit ergeben die Messungen in den unterschiedlichen Phasen der Studie keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der CXCR-1-Expression auf Monozyten. Die maximale MFI beträgt 10,3 bei einem Patienten in Woche 6. Interessant wären Folgestudien, die den Einfluss der HCO-Membran auf die Expression von CCR1, CCR2 und CCR5 auf Monozyten untersuchen. Bezüglich der Bedeutung von CXCR-1 bei Niereninsuffizienten und der Vermittlung von Inflammation wurden keine vergleichbaren Studien gefunden.

Expression auf Lymphozyten

Auf Lymphozyten wird CXCR-1 vorwiegend auf NK-Zellen und T-Zellen exprimiert. Zusammen mit CXCR-2 und anderen Chemokin-Rezeptoren spielt es eine Rolle bei der Chemotaxis von Lymphozyten sowie der Rückkehr der Lymphozyten zu Lymphknoten und Milz (Homing). In den Ergebnissen dieser Arbeit zeigte sich im Vergleich zu Granulozyten und Monozyten die geringste MFI von CXCR-1 auf Lymphozyten. Die geringste mediane MFI aus Woche 9 unterscheidet sich statistisch nicht signifikant zu der aus Woche 6. Die Literaturrecherche ergab keine vergleichbaren Studien bezüglich des Einflusses der HCO-Membran auf die Expression von CXCR-1 auf Lymphozyten, des Expressionsverhaltens von CXCR-1 auf Lymphozyten von Niereninsuffizienten oder seine Bedeutung bei der Vermittlung von Inflammation bei Niereninsuffizienten.

Expression auf Granulozyten

Die MFI von CXCR-1 auf Granulozyten steigt in der HCO-Phase an und fällt in der sich anschließenden HD-Phase wieder ab. Die höchste Expressionsdichte liegt somit in den Wochen 4-6. In den beiden HF-Phasen erkennt man in Abbildung 18 die jeweilige verminderte Expressionsdichte, jedoch unterscheiden sich weder die MFI aus der HCO-Phase gegenüber Woche 3 noch die MFI aus der 2. HF-Phase gegenüber Woche 6 statistisch signifikant. Dennoch zeigt sich hier ein Trend zur vermehrten Expression von CXCR-1 in der HCO-Phase. Die in dieser Studie gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der Expression von CXCR-1 auf Granulozyten zeigen, dass Dialyse mit einer HCO-Membran zu einer Normalisierung des Expressionsverhaltens führen kann. Es gibt Hinweise, dass durch diese Normalisierung Inflammation gesenkt werden kann.

In einer prospektiven Studie [143], in die 30 terminal niereninsuffiziente Kinder (21 HD, 9 Peritonealdialyse) und 16 gesunde Kinder im Alter von 6 Monaten bis 18 Jahren eingeschlossen wurden, zeigte sich, dass die niereninsuffizienten Kinder im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe den Chemokinrezeptor CXCR-1 auf neutrophilen Granulozyten in geringerem Ausmaß exprimieren. Dieser Unterschied war statistisch signifikant ($p < 0,026$). Teilte man die Gruppe der niereninsuffizienten Kinder in solche mit drei oder mehr ernstesten bakteriellen Infektionen im letzten Jahr, zeigte sich, dass die infektfreien Kinder eine signifikant höhere Expressionsdichte von CXCR-1 auf Neutrophilen hatten ($p < 0,0042$, Abbildung 28). In der Studie wurde der Einfluss der HD auf das Expressionsverhalten von CXCR-1 untersucht. Bei 6 Patienten wurden vor und nach der HD Blutproben untersucht. Hier zeigte sich, dass die Expression von CXCR-1 unabhängig vom Infektionsstatus mit der Dauer der HD abnimmt (Abbildung 28).

Eine weitere Studie von Pereira et. al [144], die den Zusammenhang zwischen Erythropoetin-Resistenz und das Ausmaß der Leukozyten-Aktivierung bei niereninsuffizienten Patienten untersuchte, konnte feststellen, dass CXCR-1 auf neutrophilen Granulozyten auch bei Erwachsenen niereninsuffizienten Patienten unterexprimiert war. 34 Patienten, die regelmäßig Darbopoetin- α substituierten, wurden in Responder und Nonresponder auf Darbopoetin- α eingeteilt (26 Responder, 8 Non-Responder). Die Einteilung erfolgte anhand der European Best Practice Guidelines, welche Erythropoetin-Resistenz definiert als fehlendes Ansprechen (Ziel-Hämoglobin

zwischen 11 und 12 g/dl) auf 1,5 µg/kg/Woche Erythropoetin-Substitution. Im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe hatten Responder und Nonresponder signifikant niedrigere ($p < 0,05$) MFI von CXCR-1. Gegenüber Respondern hatten Nonresponder zudem signifikant niedrigere MFI ($p < 0,05$) von CXCR-1. CRP wurde ebenfalls untersucht und war bei Nonrespondern signifikant erhöht. Bei beiden Gruppen kam es nach der HD zu einem signifikanten Abfall von CXCR-1 ohne Unterschiede in den beiden Subgruppen.

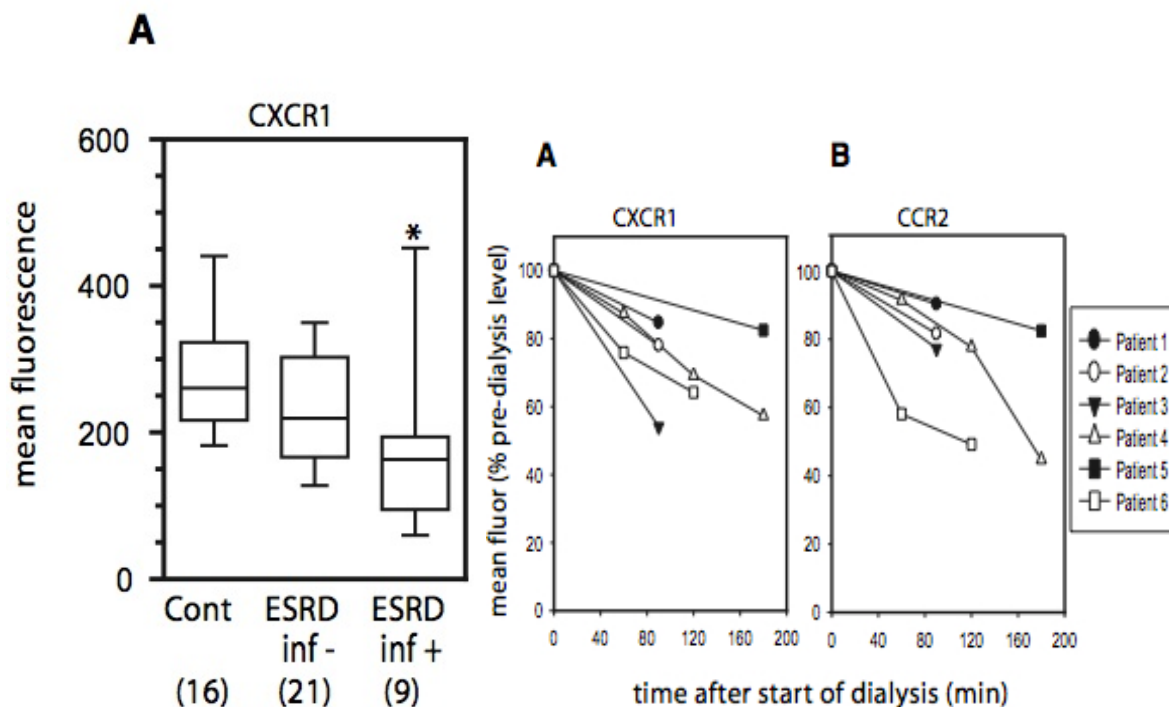


Abbildung 28: Links: MFI von CXCR-1 bei niereninsuffizienten Kindern und einer Kontrollgruppe; Rechts: Prozentuale Abnahme von CXCR-1 auf neutrophilen Granulozyten nach Beginn der HD

Links: Vollblut von niereninsuffizienten Kinder mit mehr als 3 ernsten bakteriellen Infektionen im letzten Jahr (ESRD inf +) und ohne ernste bakterielle Infektionen (ESRD inf -) sowie von einer gesunden Kontrollgruppe (Cont) wurde durchflusszytometrisch untersucht und die MFI von CXCR-1 auf neutrophilen Granulozyten gemessen (*= $p < 0,0042$ vs Cont). Rechts: Dargestellt ist die prozentuale Abnahme von CXCR-1 auf neutrophilen Granulozyten sowie CCR2 auf Monozyten nach Beginn der HD bei 6 niereninsuffizienten Kindern. [143]

In beiden genannten Studien erfolgte die Nierenersatztherapie mit HF-HD und in beiden Studien kam es zu einem Abfall von CXCR-1 nach der HD. Weiterhin wurde gezeigt, dass Gesunde signifikant mehr CXCR-1 auf Granulozyten exprimieren und ein

Zusammenhang zwischen Inflammation und CXCR-1 Expression dargestellt. Aufgrund der jeweiligen statistischen Signifikanz ist ein kausaler Zusammenhang sehr wahrscheinlich. Je ausgeprägter also der Zustand der Inflammation, desto geringer wird CXCR-1 auf Granulozyten exprimiert. In den Ergebnissen der hier vorgelegten Arbeit stieg CXCR-1 in der HCO-Phase an. In der sich anschließenden HF-Phase sank CXCR-1 wieder ab. Ein Signifikanzniveau wurde zwar nicht unterboten, dennoch zeigt sich hier ein Trend.

Ist dieser Anstieg in der HCO-Phase im Umkehrschluss also eine Folge der Elimination inflammatorischer Mediatoren durch die HCO-Membran, und wird Inflammation dadurch gesenkt? Die Korrelation zwischen dem Zustand der Inflammation und dem Expressionsverhalten von CXCR-1 auf Granulozyten legt zumindest nahe, dass eine hohe CXCR-1-Dichte auf Granulozyten mit einer geringeren inflammatorischen Reaktion einhergeht. Eine mögliche Erklärung könnte das Prinzip der Rezeptor-Down-Regulation sein, welches für die Regulierung von den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren CXCR-1 und CXCR-2 bereits beschrieben wurde [145]. Durch eine hohe Konzentration seiner Liganden (IL-8) oder anderer inflammatorischer Mediatoren könnte es zu der Down-Regulation kommen und somit die geringe Expressionsdichte in Zuständen der Inflammation erklären.

Geht man davon aus, dass die HCO-Membran wesentlich größere Mengen von IL-8 eliminieren kann, so muss man bedenken, dass die relativ geringe Molekulargröße von IL-8 (≈ 8 kDa) es jedoch auch HF-Membranen ermöglicht, einen Siebkoeffizienten von ca. 90 % (im Vergleich: Der Siebkoeffizient der HCO-Membran liegt bei ca. 95 %, s. Abbildung 3) zu erreichen, sodass allein der größere MWCO der HCO-Membran zur Erklärung vermehrter IL-8 Elimination und damit vermehrter Expression von CXCR-1 nicht ausreicht. Pereira et. al. vermuten, dass das urämische Milieu und die chronische Exposition zu inflammatorischen Mediatoren für den Verlust von CXCR-1 auf neutrophilen Granulozyten verantwortlich ist. Hinweise hierfür erbrachte eine Vorgängerstudie von Pereira et. al., in der gezeigt wurde, dass niereninsuffiziente Nonresponder auf Erythropoetin signifikant höhere CRP-Spiegel hatten als die Responder, und somit möglicherweise Inflammation und die Expression von CXCR-1 auf neutrophilen Granulozyten negativ miteinander korrelieren [146]. Für die proinflammatorischen Zytokine TNF- α und Interleukin-1 β konnte gezeigt werden, dass

sie keinen Einfluss auf die Expression von CXCR-1 haben. TNF- α hat lediglich Einfluss auf die Down-Regulation von CXCR-2 auf neutrophilen Granulozyten [147].

Die Erkenntnisse müssen weiter untersucht werden. IL-8 sollte in Folgestudien zusätzlich zu CRP und anderen proinflammatorischen Interleukinen bestimmt werden, um Informationen über einen möglichen Einfluss auf die Regulierung von CXCR-1 zu bekommen. Da in dieser Studie nicht zwischen neutrophilen, eosinophilen und basophilen Granulozyten differenziert wurde, wäre dies ein weiterer Punkt, der sich in Folgestudien optimieren ließe.

5.1.2.3 Mac-1 (CD11b)

Die Adhäsion von zirkulierenden neutrophilen Granulozyten und Monozyten über β 2-Integrine an aktivierte Endothelzellen ist ein entscheidender Schritt, der zu inflammatorischen Gefäßveränderungen beiträgt und das Risiko der Entstehung der Atherosklerose erhöht. Bereits 1998 konnte von Dou et. al. gezeigt werden, dass Niereninsuffiziente im Stadium 5 (GFR 14 ml/min/1,73 m²) ohne Nierenersatzverfahren Mac-1 auf neutrophilen Granulozyten in höherer Dichte exprimieren als Gesunde und bereits dialysepflichtige Patienten. Im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe waren die Unterschiede statistisch signifikant. Der Vergleich zwischen dialysepflichtigen Patienten und Gesunden ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede, obgleich die Expressionsdichte bei den Dialysepflichtigen höher war. Auf Monozyten und Lymphozyten zeigte sich kein Unterschied zwischen den drei Gruppen [148]. Weitere Studien konnten jedoch zeigen, dass Mac-1 auch bei dialysepflichtigen Patienten sowohl auf Granulozyten, als auch auf Monozyten im Vergleich zu Gesunden signifikant höher exprimiert wird und dass das Expressionsverhalten einerseits durch das Urämietoxin Phenyllessigsäure stimuliert wird und andererseits mit der leukozytären ROS-Produktion korreliert [149, 150]. Mac-1 vermittelt also zelluläre Inflammationsreaktionen und wird von humoralen Komponenten selbst stimuliert.

Die Hypothese in der hier vorgelegten Studie ist, dass durch den größeren MWCO der HCO-Membran eine größere Clearance von Mittelmolekülen erreicht wird und so ein anderer Einfluss auf das Expressionsverhalten der verschiedenen Adhäsionsmoleküle ausgeübt wird. Die Ergebnisse in dieser Studie können diese Hypothese für Mac-1

leider nicht bestätigen. Bei allen 3 untersuchten Leukozyten-Populationen ergaben sich in der HCO-Phase keine signifikanten Unterschiede. Wie zu erwarten, exprimierten Monozyten und Granulozyten am meisten Mac-1, Lymphozyten hatten die geringste Expressionsdichte.

Stavroulopoulos et. al. untersuchten bereits die unterschiedliche Auswirkung von HF- und low-flux-Membranen (Polysulfon) auf das Expressionsverhalten von Mac-1 auf Monozyten und konnten keinen Unterschied feststellen. Unmittelbar nach der Dialyse exprimierten die Monozyten in beiden Gruppen mehr Mac-1 [151]. Neben dem Nachweis, dass Mac-1 mit der ROS-Produktion von Leukozyten korreliert, kamen Yoon et. al. zu dem Ergebnis, dass sich unmittelbar nach der Dialyse die Expressionsdichte von Mac-1 auf Granulozyten und Monozyten verringert, wobei die Ergebnisse nur für Granulozyten statistisch signifikant waren. Angaben über die Filtergröße bzw. das Dialyseverfahren fehlten, die verwendete Membran bestand aus Cellulose-Azetat [149]. In dieser Studie erfolgten die Analysen nicht mit dem direkt nach dem Dialyseprozess gewonnenem Blut, sodass kein Vergleich möglich ist, wie sich der Dialyseprozess unmittelbar auf die Expression von Mac-1 auswirkt. Vergleichbare Studien, die über einen längeren Zeitraum unterschiedliche flux-Verfahren auf die Auswirkung der Expression von Adhäsionsmolekülen wie Mac-1 untersuchten, erscheinen nicht in der gegenwärtigen Literatur.

Die Ergebnisse aus den zitierten Studien sind divergent, sodass auch ein weiterer beeinflussender Faktor auf das Expressionsverhalten der Adhäsionsmoleküle berücksichtigt werden muss, das unterschiedliche Membranmaterial. Wie sich verschiedene Dialysemembranen auf die Expression von Mac-1 auswirken, wurde umfangreich untersucht. Für verschiedene Membranmaterialien (Polysulfon, Cuprophan, Haemophan, Cellulose Diazetat, Benzyl Cellulose) wurde gezeigt, dass es periinterventionell zu einem Anstieg von Mac-1 auf Granulozyten kommt, wobei Cuprophan-Membranen auch nach Beendigung der Dialyse im Vergleich zu allen anderen Membranen und zum Ausgangswert zu signifikant höheren Expressionsdichten auf Granulozyten führten [152].

In der hier vorliegenden Studie wurde bei beiden Verfahren eine Polysulfonmembran verwendet, sodass sich aufgrund des Membranmaterials keine Unterschiede in den

Ergebnissen ergeben können. Sollte es zu einem möglichen positivem Effekt der HCO-Membran durch vermehrte Elimination von Mittelmolekülen kommen, könnte dieser Effekt durch vermehrten Endotoxinkontakt aufgrund erhöhter Rückfiltration, welche bei hoch permeablen Membranen beobachtet wurde, ausgeglichen werden [153]. Die Ergebnisse sind nicht wegweisend. Die HCO-Membran scheint keinen Einfluss auf das Expressionsverhalten von Mac-1 zu haben. In jedem Fall sollte in Folgestudien, die den Einfluss der HCO-Membran längerfristig untersuchen, erneut das Expressionsverhalten von Mac-1 untersucht werden und in Bezug zur Produktion von ROS gestellt werden.

5.1.2.4 CD45/CD14

Die Oberflächenmarker CD 45 und CD14 wurden bei der Durchflusszytometrie als AK-Gemisch zur Identifizierung der Zellen angewandt. Die Erwartung war, dass CD45/CD14 nach Anwendung mit beiden Membranen stabil bleibt und somit zum Vergleich und zur Bildung einer Ratio zu dem zu untersuchten Adhäsionsmolekül eingesetzt werden kann. Die Bestimmung der MFI von CD45/CD14 war kein Endpunkt dieser Studie. Es zeigte sich jedoch, dass bei allen drei Leukozytenpopulationen CD45/CD14 während der HCO-Phase signifikant anstieg und in der darauffolgenden HF-Phase wieder abfiel. In der gegenwärtigen Literatur wurde CD45/CD14 bei CNI-Patienten und nach Dialyseanwendungen nicht untersucht. Die Interpretation der Ergebnisse ist nicht möglich, da es sich zudem um ein AK-Gemisch handelt, welches hergestellt wird um Leukozyten bei der Durchflusszytometrie zu identifizieren.

CD45 reguliert die Aktivierung und Inhibierung von T- und B-Lymphozyten. Durch seine Eigenschaft, auf fast allen hämatopoetischen Zellreihen exprimiert zu werden, kommt ihm Bedeutung als Leukozytenmarker bei der Durchflusszytometrie und als Marker von Stammzellen zu. Einen Zusammenhang zu Inflammation oder zu Dialyseanwendungen gibt es in der gegenwärtigen Literatur kaum. In einer Studie, die zahlreiche Oberflächenmarker untersuchte, ist beschrieben, dass CD45 während HD mit einer Cuprophan-Membran vermehrt auf Neutrophilen exprimiert wird [154]. Die Bedeutung ist jedoch unklar.

Man weiß, dass das proinflammatorische LPS die Konzentration von CD14 auf Monozyten hochreguliert [155] und eine Signalkaskade über den intrazellulären

Transmitter NF- κ B ausgelöst wird und Entzündungsmediatoren freigesetzt werden. Daher könnte man in Folgestudien das separate Expressionsverhalten von CD14 und CD45 vor und nach HCO-Anwendung bestimmen. Die Konzentration von LPS sollte dabei berücksichtigt werden. Möglicherweise ergeben sich dann Erkenntnisse, welcher der beiden Marker nach HCO-Anwendung hochreguliert wird und ob sich das Ergebnis bestätigen lässt.

5.1.3 Albumin

Einige Studien, unter anderem die von Lee et. al. [103] und Galli et. al. [156], konnten nachweisen, dass es durch Dialyse mit großporigen Membranen zu einem signifikanten Albuminverlust kommen kann. Auch Haase et. al. bestimmten neben den inflammatorischen Mediatoren die Albuminkonzentration bei septischen Patienten vor und nach 4-stündiger HCO- oder HF-HD. Der kumulative Albuminverlust betrug 7,7 g nach HCO-HD im Vergleich zu 1,0 g nach HF-HD. Der Unterschied war signifikant ($p < 0,01$) [102].

Die Ergebnisse aus dieser Dissertationsschrift zeigen, dass die Albuminkonzentration in der HCO-Phase von Woche 4 bis Woche 6 stetig sinkt. Im Vergleich zu Woche 3 (4,2 g/dl) unterscheidet sich die Albuminkonzentration aus Woche 6 (3,687 g/dl) signifikant. Im Anschluss an die HCO-Phase steigen die Konzentrationen wieder an. Die Ergebnisse stimmen mit denen gegenwärtiger Studien überein. Durch einen höheren MWCO gehen mehr Albuminmoleküle im Dialysat verloren. Diese Tatsache ist nicht zu vernachlässigen, denn etwa 60 % der Plasmaeiweißmenge ist Albumin und fast 80 % des kolloidosmotischen Drucks werden durch Albumin reguliert. Es erfüllt wichtige Transportfunktionen für körpereigene Kationen, v.a. Kalzium und einige körperfremde Stoffe.

Kaynar et. al. konnten in einer 6-monatigen Studie mit 22 HD-Patienten feststellen, dass Albumin negativ mit CRP und positiv mit Hämoglobin korreliert [157]. Chronische Inflammationszustände korrelieren also mit niedrigen Albumin-Konzentrationen. In der HEMO-Studie konnte unabhängig von der Dialysedosis oder unterschiedlicher Flux-Eigenschaften eines Filters gezeigt werden, dass eine um 0,5 g/dl höhere Albumin-Serumkonzentration die Mortalität um 49 % verringert [121]. Unabhängig von der

körpereigenen Albumin-Synthese sollte daher ein zusätzlicher Albumin-Verlust aus den zuvor genannten Gründen vermieden werden. Der Albuminverlust nach HCO-Dialyse ist daher ein entscheidender limitierender Faktor der dauerhaften Anwendung, es sei denn, die Elimination proinflammatorischer Mediatoren überwiegt den Albuminverlust, und es resultiert ein Überlebensvorteil für die Patienten. Der Albuminverlust könnte auch substituiert werden, was jedoch an den relativ hohen Kosten für Humanalbumin und den bereits hohen Kosten der Behandlung terminal Niereninsuffizienter scheitern könnte.

5.1.4 Kreatinin und Harnstoff

Die Eliminationsraten von Kreatinin und Harnstoff waren in der HCO-Phase geringer. Ihre Molekulargrößen ermöglichen sowohl HF-, als auch HCO-Membranen eine ausreichende Elimination und einen Siebkoeffizienten von 1, sodass der Unterschied auf die geringere Membranoberfläche der HCO-Membran zurückgeführt werden kann.

5.2 Diskussion der Methodik

Die Studie hat limitierende Faktoren. Die Studienpopulation ist klein, Schwankungen der gemessenen Parameter können deshalb schlechter kompensiert werden und die statistische Aussagekraft ist eingeschränkt. Die Ergebnisse von IL-10 sind aufgrund der sehr geringen Studienpopulation nicht zu interpretieren. Aufgrund des zu erwartenden Proteinverlustes und bislang fehlenden Erkenntnissen zu den Auswirkungen einer mehrwöchigen Therapie mit der HCO-Membran sollte die Studienpopulation nicht zu groß sein um auftretende Komplikationen gering zu halten.

Die Dialysatflußrate konnte in allen 3 Phasen bei jeder Behandlung konstant bei 500 ml/min gehalten werden. Im Gegensatz dazu ist die Blutflußrate jedoch an die individuellen hämodynamischen Gegebenheiten des Patienten gebunden, daher variierte diese in den 3 Phasen der Studie und lag im Durchschnitt über der Vorgabe von 250 ml/min (siehe Kapitel 3.7), wodurch Unterschiede bei der Clearance der verschiedenen Mediatoren auftreten könnten. Allerdings war die Blutflussrate in allen drei Studienperioden nicht signifikant unterschiedlich, so dass Vergleiche der Clearanceraten statthaft sind.

Das zum Nachweis von IL-6, IL-10 und PTX3 verwandte Verfahren ELISA ist eine kostengünstige und etablierte Methode zum Nachweis von Zytokinen, Antikörpern und anderen Antigenen. Vorteile des Testverfahrens sind die relative einfache Durchführung sowie die Quantifizierung des photometrischen Signals. Aufgrund der hohen Sensitivität können geringe Konzentrationen im Picogramm-Bereich nachgewiesen werden. Da ELISA-Tests jedoch empfindlich auf Temperaturschwankungen reagieren, kann es hierdurch und durch den Transport der Blutproben in die Klinik zu Schwankungen der Messergebnisse kommen. Einerseits können aufgrund der hohen Sensitivität zu positive Ergebnisse entstehen, andererseits kann es während der Vorbereitung der Messungen aus oben genannten Gründen und der relativ kurzen Halbwertszeit der verschiedenen Zytokine zu unterschätzten Ergebnissen kommen. Die Ergebnisse von ELISA-Testverfahren sind aufgrund unterschiedlicher Antikörper und Standards der verschiedenen Hersteller nicht immer vergleichbar.

Das Prinzip der Durchflusszytometrie ist ein anerkanntes Verfahren zur quantitativen Vermessung und molekularen Charakterisierung intakter Zellen [109]. Jede in der Suspension enthaltene Zelle wird analysiert und die Gesamtheit der Informationen in Dotplots dargestellt. Im Dotplot erfolgt die Eingrenzung der Punktwolke subjektiv. Je nach Größe des gewählten Fensters liegen mehr oder weniger Zellen im Messbereich. Dadurch ergeben sich abhängig vom Untersucher eine unterschiedliche Anzahl an Zellen, deren Informationen ausgewertet werden und somit andere Ergebnisse. Hierbei würde eine automatisierte, maschinelle Auswertung zu mehr Objektivität führen. Auf der anderen Seite wirkt die Durchführung der durchflusszytometrischen Untersuchungen in der vorliegenden Studie durch immer dieselbe Person des Verfassers der Variabilität der gewählten Fenstergröße entgegen.

Die Untersuchungen der Proben erfolgten zu jedem Zeitpunkt mit dem Wissen, in welcher Studienphase der Patient sich befand und zu welchem Probanden die Proben zugehörig waren. Die Studie war somit nicht verblindet. Eine Verblindung wäre das bessere Studiendesign gewesen, ließ sich jedoch aufgrund der Personalausstattung nicht realisieren, da dieselben Personen für Probenabnahme und Analyse zuständig waren.

6. Abkürzungsverzeichnis

A.d.	destilliertes Wasser
ADPKD	autosomal dominant polycystic kidney disease
AK	Antikörper
ANOVA	analysis of variance
ANV	Akutes Nierenversagen
CD	Cluster of differentiation
CRP	C-reaktives Protein
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Azetat
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ESRD	End-stage renal disease
FACS	fluorescence activated cell sorting
FITC	Fluoreszein-Isothiozyanat
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
HCO	High Cut-Off
HD	Hämodialyse
HDF	Hämodiafiltration
HF	High-Flux
HST	Harnstoff
ICAM	interzelluläre Adhäsionsmoleküle
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
IL-10	Interleukin-10
kDa	kilo Dalton
LPS	Lipopolysaccharid
MFI	mittlere(n) Fluoreszenz-Intensität(en)
MWCO	molecular weight cut-off
PBS Azid	phosphatgepufferte Salzlösung
PESU	Polyarylethersulfon
PRM	pattern recognition molecules
PSGL-1	P-Selektin Glykoprotein Ligand-1

PTX3	Pentraxin 3
PVP	Polyvinylpyrrolidon
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SAP	Serum Amyloid P
SCD	Sudden cardiac death
TNF-α	Tumor Nekrose Faktor α
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
USRDS	United States Renal Data System

7. Literaturverzeichnis

1. *K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification*. Am J Kidney Dis, 2002. **39**(2 Suppl 1): p. S1-266.
2. Coresh, J., et al., *Prevalence of chronic kidney disease and decreased kidney function in the adult US population: Third National Health and Nutrition Examination Survey*. Am J Kidney Dis, 2003. **41**(1): p. 1-12.
3. Whaley-Connell, A.T., et al., *CKD in the United States: Kidney Early Evaluation Program (KEEP) and National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999-2004*. Am J Kidney Dis, 2008. **51**(4 Suppl 2): p. S13-20.
4. Agodoa, L.Y., C.A. Jones, and P.J. Held, *End-stage renal disease in the USA: data from the United States Renal Data System*. Am J Nephrol, 1996. **16**(1): p. 7-16.
5. Collins, A.J., et al., *'United States Renal Data System 2011 Annual Data Report: Atlas of chronic kidney disease & end-stage renal disease in the United States*. Am J Kidney Dis, 2012. **59**(1 Suppl 1): p. A7, e1-420.
6. Collins, A.J., et al., *Excerpts from the United States Renal Data System 2004 annual data report: atlas of end-stage renal disease in the United States*. Am J Kidney Dis, 2005. **45**(1 Suppl 1): p. A5-7, S1-280.
7. *Incident counts of reported ESRD, 2009/1Q - 2011/1Q*. 2009 -2011; Available from: <http://www.usrds.org/qtr/default.aspx>.
8. Suliman, M.E. and P. Stenvinkel, *Contribution of inflammation to vascular disease in chronic kidney disease patients*. Saudi J Kidney Dis Transpl, 2008. **19**(3): p. 329-45.
9. Stenvinkel, P., et al., *Strong association between malnutrition, inflammation, and atherosclerosis in chronic renal failure*. Kidney Int, 1999. **55**(5): p. 1899-911.
10. Zimmermann, J., et al., *Inflammation enhances cardiovascular risk and mortality in hemodialysis patients*. Kidney Int, 1999. **55**(2): p. 648-58.
11. Boehme, M., et al., *Pentraxin 3 is elevated in haemodialysis patients and is associated with cardiovascular disease*. Nephrol Dial Transplant, 2007. **22**(8): p. 2224-9.

12. Balkwill, F.R. and F. Burke, *The cytokine network*. Immunol Today, 1989. **10**(9): p. 299-304.
13. Loppnow, H., [*Cytokines: classification, receptors, mechanisms of action*]. Internist (Berl), 2001. **42**(1): p. 13-4, 17-27.
14. Olszyna, D.P., et al., *Interleukin 10 inhibits the release of CC chemokines during human endotoxemia*. J Infect Dis, 2000. **181**(2): p. 613-20.
15. Schroder, M., et al., *Different modes of IL-10 and TGF-beta to inhibit cytokine-dependent IFN-gamma production: consequences for reversal of lipopolysaccharide desensitization*. J Immunol, 2003. **170**(10): p. 5260-7.
16. Morita, Y., et al., *Increased production of interleukin-10 and inflammatory cytokines in blood monocytes of hemodialysis patients*. Res Commun Mol Pathol Pharmacol, 1997. **98**(1): p. 19-33.
17. Brunet, P., et al., *IL-10 synthesis and secretion by peripheral blood mononuclear cells in haemodialysis patients*. Nephrol Dial Transplant, 1998. **13**(7): p. 1745-51.
18. Zilberstein, A., et al., *Structure and expression of cDNA and genes for human interferon-beta-2, a distinct species inducible by growth-stimulatory cytokines*. EMBO J, 1986. **5**(10): p. 2529-37.
19. Hirano, T., et al., *Purification to homogeneity and characterization of human B-cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(16): p. 5490-4.
20. Takai, Y., et al., *B cell stimulatory factor-2 is involved in the differentiation of cytotoxic T lymphocytes*. J Immunol, 1988. **140**(2): p. 508-12.
21. Gauldie, J., et al., *Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(20): p. 7251-5.
22. Yasukawa, K., et al., *Structure and expression of human B cell stimulatory factor-2 (BSF-2/IL-6) gene*. EMBO J, 1987. **6**(10): p. 2939-45.
23. Poupart, P., et al., *B cell growth modulating and differentiating activity of recombinant human 26-kd protein (BSF-2, HuIFN-beta 2, HPGF)*. EMBO J, 1987. **6**(5): p. 1219-24.
24. Taga, T., et al., *Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130*. Cell, 1989. **58**(3): p. 573-81.

25. Heinrich, P.C., J.V. Castell, and T. Andus, *Interleukin-6 and the acute phase response*. Biochem J, 1990. **265**(3): p. 621-36.
26. Nemeth, E., et al., *IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin*. J Clin Invest, 2004. **113**(9): p. 1271-6.
27. Hirano, T., et al., *Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin*. Nature, 1986. **324**(6092): p. 73-6.
28. Okada, M., et al., *IL-6/BSF-2 functions as a killer helper factor in the in vitro induction of cytotoxic T cells*. J Immunol, 1988. **141**(5): p. 1543-9.
29. Korn, T., et al., *IL-17 and Th17 Cells*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 485-517.
30. Kimura, A. and T. Kishimoto, *IL-6: regulator of Treg/Th17 balance*. Eur J Immunol, 2010. **40**(7): p. 1830-5.
31. Ishibashi, T., et al., *Interleukin-6 is a potent thrombopoietic factor in vivo in mice*. Blood, 1989. **74**(4): p. 1241-4.
32. Kawano, M., et al., *Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas*. Nature, 1988. **332**(6159): p. 83-5.
33. Bolton, C.H., et al., *Endothelial dysfunction in chronic renal failure: roles of lipoprotein oxidation and pro-inflammatory cytokines*. Nephrol Dial Transplant, 2001. **16**(6): p. 1189-97.
34. Bottazzi, B., et al., *Pentraxins as a key component of innate immunity*. Curr Opin Immunol, 2006. **18**(1): p. 10-5.
35. Bottazzi, B., et al., *An integrated view of humoral innate immunity: pentraxins as a paradigm*. Annu Rev Immunol, 2010. **28**: p. 157-83.
36. Abernethy, T.J. and O.T. Avery, *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**(2): p. 173-82.
37. Wanner, C., C. Drechsler, and V. Krane, *C-reactive protein and uremia*. Semin Dial, 2009. **22**(4): p. 438-41.
38. Pepys, M.B. and G.M. Hirschfield, *C-reactive protein: a critical update*. J Clin Invest, 2003. **111**(12): p. 1805-12.
39. Pepys, M.B., I.F. Rowe, and M.L. Baltz, *C-reactive protein: binding to lipids and lipoproteins*. Int Rev Exp Pathol, 1985. **27**: p. 83-111.

40. Volanakis, J.E. and K.W. Wirtz, *Interaction of C-reactive protein with artificial phosphatidylcholine bilayers*. *Nature*, 1979. **281**(5727): p. 155-7.
41. Du Clos, T.W., *C-reactive protein reacts with the U1 small nuclear ribonucleoprotein*. *J Immunol*, 1989. **143**(8): p. 2553-9.
42. Gershov, D., et al., *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**(9): p. 1353-64.
43. Szalai, A.J., *The antimicrobial activity of C-reactive protein*. *Microbes Infect*, 2002. **4**(2): p. 201-5.
44. Volanakis, J.E., *Complement activation by C-reactive protein complexes*. *Ann N Y Acad Sci*, 1982. **389**: p. 235-50.
45. Mold, C., H. Gewurz, and T.W. Du Clos, *Regulation of complement activation by C-reactive protein*. *Immunopharmacology*, 1999. **42**(1-3): p. 23-30.
46. Jarva, H., et al., *Regulation of complement activation by C-reactive protein: targeting the complement inhibitory activity of factor H by an interaction with short consensus repeat domains 7 and 8-11*. *J Immunol*, 1999. **163**(7): p. 3957-62.
47. Breviario, F., 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**(31): p. 22190-7.
48. Bottazzi, B., 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**(52): p. 32817-23.
49. Alles, V.V., et al., *Inducible expression of PTX3, a new member of the pentraxin family, in human mononuclear phagocytes*. *Blood*, 1994. **84**(10): p. 3483-93.
50. Garlanda, C., et al., *Pentraxins at the crossroads between innate immunity, inflammation, matrix deposition, and female fertility*. *Annu Rev Immunol*, 2005. **23**: p. 337-66.
51. Jaillon, S., et al., *The humoral pattern recognition receptor PTX3 is stored in neutrophil granules and localizes in extracellular traps*. *J Exp Med*, 2007. **204**(4): p. 793-804.

52. Klouche, M., et al., *Modified atherogenic lipoproteins induce expression of pentraxin-3 by human vascular smooth muscle cells*. *Atherosclerosis*, 2004. **175**(2): p. 221-8.
53. Rolph, M.S., et al., *Production of the long pentraxin PTX3 in advanced atherosclerotic plaques*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002. **22**(5): p. e10-4.
54. Diniz, S.N., et al., *PTX3 function as an opsonin for the dectin-1-dependent internalization of zymosan by macrophages*. *J Leukoc Biol*, 2004. **75**(4): p. 649-56.
55. Cohnheim, J., *Vorlesungen über allgemeine Pathologie.*, ed. A.H. Verlag. 1877, Berlin.
56. Zarbock, A., et al., *PSGL-1-dependent myeloid leukocyte activation*. *J Leukoc Biol*, 2009. **86**(5): p. 1119-24.
57. Murphy, P.M., et al., *International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors*. *Pharmacol Rev*, 2000. **52**(1): p. 145-76.
58. Li, H. and E.P. Nord, *IL-8 amplifies CD40/CD154-mediated ICAM-1 production via the CXCR-1 receptor and p38-MAPK pathway in human renal proximal tubule cells*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2009. **296**(2): p. F438-45.
59. Fagerholm, S.C., et al., *alpha-Chain phosphorylation of the human leukocyte CD11b/CD18 (Mac-1) integrin is pivotal for integrin activation to bind ICAMs and leukocyte extravasation*. *Blood*, 2006. **108**(10): p. 3379-86.
60. Zhang, Y. and H. Wang, *Integrin signalling and function in immune cells*. *Immunology*, 2012. **135**(4): p. 268-75.
61. Hermiston, M.L., Z. Xu, and A. Weiss, *CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells*. *Annu Rev Immunol*, 2003. **21**: p. 107-37.
62. Jersmann, H.P., *Time to abandon dogma: CD14 is expressed by non-myeloid lineage cells*. *Immunol Cell Biol*, 2005. **83**(5): p. 462-7.
63. Rosen, S.D., *Cell surface lectins in the immune system*. *Semin Immunol*, 1993. **5**(4): p. 237-47.
64. McEver, R.P., et al., *GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies*. *J Clin Invest*, 1989. **84**(1): p. 92-9.
65. Ley, K., et al., *Sequential contribution of L- and P-selectin to leukocyte rolling in vivo*. *J Exp Med*, 1995. **181**(2): p. 669-75.

66. Sanders, W.E., et al., *Molecular cloning and analysis of in vivo expression of murine P-selectin*. *Blood*, 1992. **80**(3): p. 795-800.
67. Toothill, V.J., et al., *Characterization of the enhanced adhesion of neutrophil leukocytes to thrombin-stimulated endothelial cells*. *J Immunol*, 1990. **145**(1): p. 283-91.
68. Bevilacqua, M.P., et al., *Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins*. *Science*, 1989. **243**(4895): p. 1160-5.
69. Lawrence, M.B. and T.A. Springer, *Neutrophils roll on E-selectin*. *J Immunol*, 1993. **151**(11): p. 6338-46.
70. Zollner, O., et al., *L-selectin from human, but not from mouse neutrophils binds directly to E-selectin*. *J Cell Biol*, 1997. **136**(3): p. 707-16.
71. von Andrian, U.H. and T.R. Mempel, *Homing and cellular traffic in lymph nodes*. *Nat Rev Immunol*, 2003. **3**(11): p. 867-78.
72. Segerer, S., P.J. Nelson, and D. Schlondorff, *Chemokines, chemokine receptors, and renal disease: from basic science to pathophysiologic and therapeutic studies*. *J Am Soc Nephrol*, 2000. **11**(1): p. 152-76.
73. Chung, A.C. and H.Y. Lan, *Chemokines in renal injury*. *J Am Soc Nephrol*, 2011. **22**(5): p. 802-9.
74. Hynes, R.O., *Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion*. *Cell*, 1992. **69**(1): p. 11-25.
75. Murphy, M., *Janeway Immunologie*. 2009. **7**.
76. Spoto, B., et al., *Plasma cytokines, glomerular filtration rate and adipose tissue cytokines gene expression in chronic kidney disease (CKD) patients*. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2011.
77. Andersen, S.R., et al., *Disposition of recombinant human interleukin-10 in subjects with various degrees of renal function*. *J Clin Pharmacol*, 1999. **39**(10): p. 1015-20.
78. Poole, S., et al., *Fate of injected interleukin 1 in rats: sequestration and degradation in the kidney*. *Cytokine*, 1990. **2**(6): p. 416-22.
79. Navarro-Gonzalez, J.F., et al., *Mineral metabolism and inflammation in chronic kidney disease patients: a cross-sectional study*. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2009. **4**(10): p. 1646-54.

80. Nadra, I., et al., *Proinflammatory activation of macrophages by basic calcium phosphate crystals via protein kinase C and MAP kinase pathways: a vicious cycle of inflammation and arterial calcification?* *Circ Res*, 2005. **96**(12): p. 1248-56.
81. Diplock, A.T., et al., *Functional food science and defence against reactive oxidative species*. *Br J Nutr*, 1998. **80 Suppl 1**: p. S77-112.
82. Libetta, C., et al., *Oxidative stress and inflammation: Implications in uremia and hemodialysis*. *Clin Biochem*, 2011. **44**(14-15): p. 1189-98.
83. Haubitz, M., et al., *Chronic induction of C-reactive protein by hemodialysis, but not by peritoneal dialysis therapy*. *Perit Dial Int*, 1996. **16**(2): p. 158-62.
84. Schindler, R., et al., *Short bacterial DNA fragments: detection in dialysate and induction of cytokines*. *J Am Soc Nephrol*, 2004. **15**(12): p. 3207-14.
85. Foley, R.N., P.S. Parfrey, and M.J. Sarnak, *Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease*. *Am J Kidney Dis*, 1998. **32**(5 Suppl 3): p. S112-9.
86. Go, A.S., et al., *Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization*. *N Engl J Med*, 2004. **351**(13): p. 1296-305.
87. Sarnak, M.J., 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*. *Hypertension*, 2003. **42**(5): p. 1050-65.
88. Libby, P., *Inflammation and cardiovascular disease mechanisms*. *Am J Clin Nutr*, 2006. **83**(2): p. 456S-460S.
89. Agrawal, A., D.J. Hammond, Jr., and S.K. Singh, *Atherosclerosis-related functions of C-reactive protein*. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*, 2010. **10**(4): p. 235-40.
90. Nakano, T., et al., *Association of kidney function with coronary atherosclerosis and calcification in autopsy samples from Japanese elders: the Hisayama study*. *Am J Kidney Dis*, 2010. **55**(1): p. 21-30.
91. Lash, J.P., et al., *Chronic Renal Insufficiency Cohort (CRIC) Study: baseline characteristics and associations with kidney function*. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2009. **4**(8): p. 1302-11.

92. Miskulin, D., et al., *Key comorbid conditions that are predictive of survival among hemodialysis patients*. Clin J Am Soc Nephrol, 2009. **4**(11): p. 1818-26.
93. O'Hare, A. and K. Johansen, *Lower-extremity peripheral arterial disease among patients with end-stage renal disease*. J Am Soc Nephrol, 2001. **12**(12): p. 2838-47.
94. Sozio, S.M., et al., *Cerebrovascular disease incidence, characteristics, and outcomes in patients initiating dialysis: the choices for healthy outcomes in caring for ESRD (CHOICE) study*. Am J Kidney Dis, 2009. **54**(3): p. 468-77.
95. Parekh, R.S., et al., *The association of sudden cardiac death with inflammation and other traditional risk factors*. Kidney Int, 2008. **74**(10): p. 1335-42.
96. Kneis, C., et al., *Elimination of middle-sized uremic solutes with high-flux and high-cut-off membranes: a randomized in vivo study*. Blood Purif, 2013. **36**(3-4): p. 287-94.
97. *Latest news from Gambro research relating to hyperinflammation*. Available from: <http://www.gambro.com/PageFiles/1801/septeX.pdf?epslanguage=en>.
98. Hutchison, C.A., et al., *Efficient removal of immunoglobulin free light chains by hemodialysis for multiple myeloma: in vitro and in vivo studies*. J Am Soc Nephrol, 2007. **18**(3): p. 886-95.
99. Zager, R.A. and L.M. Gamelin, *Pathogenetic mechanisms in experimental hemoglobinuric acute renal failure*. Am J Physiol, 1989. **256**(3 Pt 2): p. F446-55.
100. Premru, V., et al., *High cut-off membrane hemodiafiltration in myoglobinuric acute renal failure: a case series*. Ther Apher Dial. **15**(3): p. 287-91.
101. Uchino, S., et al., *Cytokine dialysis: an ex vivo study*. ASAIO J, 2002. **48**(6): p. 650-3.
102. Haase, M., et al., *Hemodialysis membrane with a high-molecular-weight cutoff and cytokine levels in sepsis complicated by acute renal failure: a phase 1 randomized trial*. Am J Kidney Dis, 2007. **50**(2): p. 296-304.
103. Lee, D., et al., *A pilot, randomized, double-blind, cross-over study of high cut-off versus high-flux dialysis membranes*. Blood Purif, 2009. **28**(4): p. 365-72.
104. Morgera, S., *Großporige Hämofiltration bei septischen Patienten im akuten Nierenversagen*, in *Medizinische Fakultät der Charité – Humboldt-Universität zu Berlin*. 2005, Charité Universitätsmedizin Berlin: Berlin. p. 55.
105. *Investigator's Brochure HCO 1100 High Cut-Off Hemofilter*. 2008, Gambro Dialysatoren GmbH & Co KG.

106. *Polyflux H*. Available from:
http://www.gambro.com/Global/Localweb/Austria/Products/Broschuren/Dialysatoren/HCDE2489_2_Polyflux_H_LOW.pdf.
107. Price, C., et al., *Development and validation of a particle-enhanced turbidimetric assay for C-reactive protein*. J Immunol Methods, 1987. **99**: p. 205-211.
108. Eda, S., et al., *Development of a new microparticle-enhanced turbidimetric assay for C-reactive protein with superior features in analytical sensitivity and dynamic*. J Clin Lab Anal, 1998. **12**: p. 137-144.
109. Sack U, T.A., Rothe A, *Zelluläre Diagnostik Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*, ed. Karger. 2007.
110. *BD FACSCalibur Flow Cytometry System Technical Specifications*, B. Dickinson, Editor. 2010.
111. Doumas, B., W. Watson, and H. Biggs, *Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green*. Clinica Chimica Acta, 1971. **31**: p. 87-96.
112. Richterich, R. and J. Colombo, *Klinische Chemie*. Vol. 4. 1978, Basel: Karger S. 319-324.
113. Talke, H. and G. Schubert, *Enzymatische Harnstoffbestimmung in Blut und Serum im optischen Test nach Warburg*. Klin. Wochenschr, 1965. **43**: p. 174.
114. Tiffany, T., et al., *Enzymatic kinetic rate and end-point analyses of substrate, by use of a GeMSAEC Fast Analyzer*. Clinical Chemistry, 1972. **18**: p. 829-840.
115. Sampson, E., et al., *A coupled-enzyme equilibrium method for measuring urea in serum: Optimization and evaluation of the AACC study group on urea candidate reference method*. Clinical Chemistry, 1980. **26**: p. 816-826.
116. Jaffé, M., *Über den Niederschlag, welchen Pikrinsäure in normalem Harn erzeugt und über eine neue Reaktion des Kreatinins*. Zeitschrift für Physiologische Chemie 10, 1886: p. 391-400.
117. Fabiny, D. and G. Ertinghausen, *Automated reaction-rate method for determination of serum creatinine with the CentrifChem*. Clinical Chemistry, 1971. **8**: p. 696-700.
118. Bartels, H. and M. Böhmer, *Micro-determination of creatinine*. Clinica Chimica Acta, 1971. **32**(1): p. 81-85.

119. Port, F.K., et al., *Mortality risk by hemodialyzer reuse practice and dialyzer membrane characteristics: results from the usrds dialysis morbidity and mortality study*. Am J Kidney Dis, 2001. **37**(2): p. 276-86.
120. Hornberger, J.C., et al., *A multivariate analysis of mortality and hospital admissions with high-flux dialysis*. J Am Soc Nephrol, 1992. **3**(6): p. 1227-37.
121. Eknoyan, G., et al., *Effect of dialysis dose and membrane flux in maintenance hemodialysis*. N Engl J Med, 2002. **347**(25): p. 2010-9.
122. Locatelli, F., et al., *Effect of membrane permeability on survival of hemodialysis patients*. J Am Soc Nephrol, 2009. **20**(3): p. 645-54.
123. Cheung, A.K., et al., *Serum beta-2 microglobulin levels predict mortality in dialysis patients: results of the HEMO study*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(2): p. 546-55.
124. Kerr, P.B., et al., *Comparison of hemodialysis and hemodiafiltration: a long-term longitudinal study*. Kidney Int, 1992. **41**(4): p. 1035-40.
125. Canaud, B., et al., *Mortality risk for patients receiving hemodiafiltration versus hemodialysis: European results from the DOPPS*. Kidney Int, 2006. **69**(11): p. 2087-93.
126. Grooteman, M.P., et al., *Effect of online hemodiafiltration on all-cause mortality and cardiovascular outcomes*. J Am Soc Nephrol, 2012. **23**(6): p. 1087-96.
127. Ok, E., et al., *Mortality and cardiovascular events in online haemodiafiltration (OL-HDF) compared with high-flux dialysis: results from the Turkish OL-HDF Study*. Nephrol Dial Transplant, 2013. **28**(1): p. 192-202.
128. Maduell, F., et al., *High-efficiency postdilution online hemodiafiltration reduces all-cause mortality in hemodialysis patients*. J Am Soc Nephrol, 2013. **24**(3): p. 487-97.
129. Fiedler, R., et al., *Randomized controlled pilot study of 2 weeks' treatment with high cutoff membrane for hemodialysis patients with elevated C-reactive protein*. Artif Organs, 2012. **36**(10): p. 886-93.
130. Morgera, S., et al., *Pilot study on the effects of high cutoff hemofiltration on the need for norepinephrine in septic patients with acute renal failure*. Crit Care Med, 2006. **34**(8): p. 2099-104.
131. Morgera, S., et al., *Renal replacement therapy with high-cutoff hemofilters: Impact of convection and diffusion on cytokine clearances and protein status*. Am J Kidney Dis, 2004. **43**(3): p. 444-53.

132. Brunet, S., et al., *Diffusive and convective solute clearances during continuous renal replacement therapy at various dialysate and ultrafiltration flow rates*. Am J Kidney Dis, 1999. **34**(3): p. 486-92.
133. Stenvinkel, P., et al., *IL-10, IL-6, and TNF-alpha: central factors in the altered cytokine network of uremia--the good, the bad, and the ugly*. Kidney Int, 2005. **67**(4): p. 1216-33.
134. Oldani, S., et al., *Plasma pentraxin-3 as a marker of bioincompatibility in hemodialysis patients*. J Nephrol, 2012. **25**(1): p. 120-6.
135. Deban, L., et al., *Regulation of leukocyte recruitment by the long pentraxin PTX3*. Nat Immunol, 2010. **11**(4): p. 328-34.
136. Nagata, K., et al., *Activated platelets induce superoxide anion release by monocytes and neutrophils through P-selectin (CD62)*. J Immunol, 1993. **151**(6): p. 3267-73.
137. Nagata, K., et al., *Redistribution of selectin counter-ligands induced by cytokines*. Int Immunol, 2000. **12**(4): p. 487-92.
138. Koike, J., et al., *Density-dependent induction of TNF-alpha release from human monocytes by immobilized P-selectin*. FEBS Lett, 2000. **477**(1-2): p. 84-8.
139. Itoh, S., C. Susuki, and T. Tsuji, *Platelet activation through interaction with hemodialysis membranes induces neutrophils to produce reactive oxygen species*. J Biomed Mater Res A, 2006. **77**(2): p. 294-303.
140. Bonomini, M., et al., *Neutrophil reactive oxygen species production during hemodialysis: role of activated platelet adhesion to neutrophils through P-selectin*. Nephron, 1997. **75**(4): p. 402-11.
141. Itoh, S., et al., *Redistribution of P-selectin ligands on neutrophil cell membranes and the formation of platelet-neutrophil complex induced by hemodialysis membranes*. Biomaterials, 2008. **29**(21): p. 3084-90.
142. Browning, D.D., et al., *Autocrine regulation of interleukin-8 production in human monocytes*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000. **279**(6): p. L1129-36.
143. Sherry, B., et al., *Dysregulated chemokine receptor expression and chemokine-mediated cell trafficking in pediatric patients with ESRD*. Clin J Am Soc Nephrol, 2008. **3**(2): p. 397-406.
144. Pereira, R., et al., *Neutrophil and monocyte activation in chronic kidney disease patients under hemodialysis and its relationship with resistance to recombinant*

- human erythropoietin and to the hemodialysis procedure.* Hemodial Int, 2010. **14**(3): p. 295-301.
145. Nasser, M.W., et al., *CXCR1 and CXCR2 activation and regulation. Role of aspartate 199 of the second extracellular loop of CXCR2 in CXCL8-mediated rapid receptor internalization.* J Biol Chem, 2007. **282**(9): p. 6906-15.
146. Costa, E., et al., *Neutrophil activation and resistance to recombinant human erythropoietin therapy in hemodialysis patients.* Am J Nephrol, 2008. **28**(6): p. 935-40.
147. Asagoe, K., et al., *Down-regulation of CXCR2 expression on human polymorphonuclear leukocytes by TNF-alpha.* J Immunol, 1998. **160**(9): p. 4518-25.
148. Dou, L., et al., *Effect of uremia and hemodialysis on soluble L-selectin and leukocyte surface CD11b and L-selectin.* Am J Kidney Dis, 1998. **31**(1): p. 67-73.
149. Yoon, J.W., M.V. Pahl, and N.D. Vaziri, *Spontaneous leukocyte activation and oxygen-free radical generation in end-stage renal disease.* Kidney Int, 2007. **71**(2): p. 167-72.
150. Cohen, G., J. Raupachova, and W.H. Horl, *The uraemic toxin phenylacetic acid contributes to inflammation by priming polymorphonuclear leucocytes.* Nephrol Dial Transplant, 2013. **28**(2): p. 421-9.
151. Stavroulopoulos, A., et al., *Monocyte expression of adhesion molecules during low- and high-flux polysulfone hemodialysis and the effect of atorvastatin administration.* Blood Purif, 2010. **29**(3): p. 274-9.
152. Bonomini, M., et al., *Surface antigen expression and platelet neutrophil interactions in haemodialysis.* Blood Purif, 1999. **17**(2-3): p. 107-17.
153. Rangel, A.V., et al., *Backfiltration: past, present and future.* Contrib Nephrol, 2011. **175**: p. 35-45.
154. Skubitz, K.M., et al., *Changes in neutrophil surface phenotype during hemodialysis.* Inflammation, 1998. **22**(6): p. 559-72.
155. Marchant, A., et al., *Lipopolysaccharide induces up-regulation of CD14 molecule on monocytes in human whole blood.* Eur J Immunol, 1992. **22**(6): p. 1663-5.
156. Galli, F., et al., *Glycooxidation and inflammatory markers in patients on treatment with PMMA-based protein-leaking dialyzers.* Kidney Int, 2005. **67**(2): p. 750-9.
157. Kaynar, K., et al., *Evaluation of nutritional parameters of hemodialysis patients.* Hippokratia, 2012. **16**(3): p. 236-40.

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stadieneinteilung der CNI	9
Tabelle 2: Vorkommen, zugehöriger Ligand und Funktion der untersuchten Oberflächenmarker	18
Tabelle 3: Material von Beckton Dickinson, Heidelberg, Deutschland.....	34
Tabelle 4: Puffer und Lösungen.....	35
Tabelle 5: Patienteninformationen	38
Tabelle 6: Technische Details der Hemofilter	39
Tabelle 7: Absorptions- und Emissionsmaxima von PE und FITC	45
Tabelle 8: Prozentualer Anteil der Zellen im positiven Gate M2	48
Tabelle 9: Verdünnungsreihen der AK CD162, CD11b und CD181	49
Tabelle 10: Angaben des Medians, der Interquartilsspanne und der Spannweite der CRP-Konzentrationen.....	58
Tabelle 11: Angaben des Medians, der Interquartilsspanne und der Spannweite der IL- 6-Konzentrationen	59
Tabelle 12: Angaben der Interquartilsspanne und der Spannweite der PTX3- Konzentrationen.....	60
Tabelle 13: Angaben des Medians, der Interquartilsspanne und der Spannweite der IL- 10-Konzentrationen	61
Tabelle 14: Angaben des Mittelwertes, der Standardabweichung und des Standardfehlers der Albumin-Konzentrationen.....	62
Tabelle 15: Angaben des Mittelwertes, der Standardabweichung und des Standardfehlers der Kreatinin-Konzentrationen.....	63
Tabelle 16: Angaben des Mittelwertes, der Standardabweichung und des Standardfehlers der Harnstoff-Konzentrationen	64
Tabelle 17: Angaben des Mittelwertes, der Standardabweichung und des Standardfehlers der MFI von CD162 auf Granulozyten.....	65
Tabelle 18: Angaben des Mittelwertes und des Standardfehlers der MFI von CD162 auf Monozyten	67
Tabelle 19: Angaben des Mittelwertes, der Standardabweichung und des Standardfehlers der MFI von CD162 auf Lymphozyten.....	68
Tabelle 20: Angaben des Mittelwertes, der Standardabweichung und des Standardfehlers von CD181 auf Granulozyten.....	69

Tabelle 21: Angaben des Medians, der Interquartilsspanne und der Spannweite der MFI von CD181 auf Monozyten	69
Tabelle 22: Angaben des Medians, der Interquartilsspanne und der Spannweite der MFI von CD181 auf Lymphozyten	70
Tabelle 23: Angaben des Mittelwertes, der Standardabweichung und des Standardfehlers der MFI von CD11b auf Granulozyten.....	71
Tabelle 24: Angaben des Medians, der Interquartilsspanne und der Spannweite der MFI von CD11b auf Monozyten	72
Tabelle 25: Angaben des Medians, der Interquartilsspanne und der Spannweite der MFI von CD11b auf Lymphozyten	73
Tabelle 26: Angaben des Mittelwertes, der Standardabweichung und des Standardfehlers der MFI von CD45/CD14 auf Granulozyten	74
Tabelle 27: Angaben des Mittelwertes, der Standardabweichung und des Standardfehlers der MFI von CD45/CD14 auf Monozyten	75
Tabelle 28: Angaben des Mittelwertes, der Standardabweichung und des Standardfehlers der MFI von CD45/CD14 auf Lymphozyten	76

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Leukozyten bewegen sich entlang der Endotheloberfläche. Über Selektine, Integrine und Chemokine wird die Migration zu dem Zielgewebe vermittelt. Modifiziert nach Murphy	22
Abbildung 2: Verhältnis zwischen GFR und TNF-alpha Plasmaspiegel in einer Gesamtanalyse von CNI-Patienten (graue Punkte) und Gesunden (weiße Punkte)	24
Abbildung 3: Ex vivo Siebkoeffizienten für Zytokine und Albumin	28
Abbildung 4: Das Studiendesign in der Übersicht.....	37
Abbildung 5: Schema des optischen Systems des FACSCaliburs	45
Abbildung 6: Dotplots und Histogramme einer Granulozytenpopulation aus Woche 6 .	52
Abbildung 7: MFI der AK CD162, CD11b und CD181 auf Granulozyten.....	54
Abbildung 8: Boxplot zur Darstellung der medianen CRP-Konzentrationen in den 3 Phasen der Studie	57
Abbildung 9: Boxplot zur Darstellung der medianen IL-6-Konzentrationen in den 3 Phasen der Studie	58
Abbildung 10: Boxplot zur Darstellung der medianen PTX3-Konzentrationen in den 3 Phasen der Studie	59
Abbildung 11: Boxplot zur Darstellung der medianen IL-10-Konzentrationen in den 3 Phasen der Studie	61
Abbildung 12: Balkendiagramm zur Darstellung der durchschnittlichen Albumin-Konzentrationen in den 3 Phasen der Studie	62
Abbildung 13: Balkendiagramm zur Darstellung der durchschnittlichen Kreatinin-Konzentrationen in den 3 Phasen der Studie vor und nach der HD	63
Abbildung 14: Balkendiagramm zur Darstellung der durchschnittlichen HST-Konzentrationen in den 3 Phasen der Studie vor und nach der HD	64
Abbildung 15: Balkendiagramm zur Darstellung der durchschnittlichen MFI von CD162 auf Granulozyten in den 3 Phasen der Studie	65
Abbildung 16: Balkendiagramm zur Darstellung der durchschnittlichen MFI von CD162 auf Monozyten in den 3 Phasen der Studie	66
Abbildung 17: Balkendiagramm zur Darstellung der durchschnittlichen MFI von CD162 auf Lymphozyten in den 3 Phasen der Studie	67

Abbildung 18: Balkendiagramm zur Darstellung der durchschnittlichen MFI von CD181 auf Granulozyten in den 3 Phasen der Studie	68
Abbildung 19: Boxplot zur Darstellung der medianen MFI von CD181 auf Monozyten in den 3 Phasen der Studie	69
Abbildung 20: Boxplot zur Darstellung der medianen MFI von CD181 auf Lymphozyten in den 3 Phasen der Studie	70
Abbildung 21: Balkendiagramm zur Darstellung der durchschnittlichen MFI von CD11b auf Granulozyten in den 3 Phasen der Studie	71
Abbildung 22: Boxplot zur Darstellung der medianen MFI von CD11b auf Monozyten in den 3 Phasen der Studie	72
Abbildung 23: Boxplot zur Darstellung der medianen MFI von CD11b auf Lymphozyten in den 3 Phasen der Studie	73
Abbildung 24: Balkendiagramm zur Darstellung der durchschnittlichen MFI von CD45/CD14 auf Granulozyten in den 3 Phasen der Studie.....	74
Abbildung 25: Balkendiagramm zur Darstellung der durchschnittlichen MFI von CD45/CD14 auf Monozyten in den 3 Phasen der Studie	75
Abbildung 26: Balkendiagramm zur Darstellung der durchschnittlichen MFI von CD45/CD14 auf Lymphozyten in den 3 Phasen der Studie.....	76
Abbildung 27: Relative Veränderungen der IL-6 Plasmakonzentration von 10 septischen Patienten während intermittierender HCO-HD und intermittierender HF-HD von Beginn bis zum Ende der Behandlung	82
Abbildung 28: Links: MFI von CXCR-1 bei niereninsuffizienten Kindern und einer Kontrollgruppe; Rechts: Prozentuale Abnahme von CXCR-1 auf neutrophilen Granulozyten nach Beginn der HD	90

10. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Christian Epple, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: **„Einfluss der High Cut-Off Membran auf die Expression humoraler und zellulärer Marker der Inflammation“** selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

11. Lebenslauf

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

12. Publikationsliste

Daniel Zickler, MD, Christian Epple, Andreas Lun, PhD, Markus Storr, MD, Werner Beck, MD, Sonia Briese, MD und Ralf Schindler, MD

Randomized controlled trial with high cut-off-membranes in chronic hemodialysis patients: humoral and cellular markers of inflammation

Vortrag, International Society of Blood Purification (ISBP), 17.09.2009 - 19.09.2009, Stockholm, Schweden

Daniel Zickler, MD, Christian Epple, Andreas Lun, PhD, Markus Storr, MD, Werner Beck, MD, Sonia Briese, MD und Ralf Schindler, MD

Randomisierte, kontrollierte Studie mit High Cut-Off-Membranen bei chronischen Hämodialysepatienten: Humorale und zelluläre Marker der Inflammation

Posterpräsentation, Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, 07.10.2009 - 10.10.2009, Leipzig, Deutschland

Daniel Zickler, MD, Christian Epple, Andreas Lun, PhD, Markus Storr, MD, Werner Beck, MD, Sonia Briese, MD und Ralf Schindler, MD

Randomized controlled trial with high cut-off-membranes in chronic hemodialysis patients: humoral and cellular markers of inflammation

Posterpräsentation, ASN (American Society of Nephrology), 27.10.2009 - 01.11.2009, San Diego, USA

13. Danksagung

Ich bedanke mich ganz besonders bei meinem Betreuer und kommissarischem Leiter dieser Abteilung, Prof. Dr. Schindler, für die Bereitstellung des Themas und die kompetente Betreuung in allen Phasen meiner Arbeit.

Dank gebührt auch PD Dr. Andreas Lun und den medizinisch technischen Assistentinnen aus dem Zentrallabor der Charité, die mir die Kenntnisse der Durchflusszytometrie vermittelt haben.

Herr Dr. Daniel Zickler war für mich bei Fragen, vor allem in der Anfangszeit meiner Arbeit aber auch darüber hinaus, jederzeit ein Ansprechpartner, weswegen ich mich auch bei ihm bedanken möchte. Weiterhin möchte ich mich bei Frau Dr. Angelika Kusch und Adelheid Wilde für ihre methodische Unterstützung bedanken.

Meinen Freunden danke ich für ihren Zuspruch, die vielen Aufmunterungen und das Korrekturlesen.

Der größte Dank gebührt meinen Eltern, die mir mein Studium und damit auch diese Dissertation erst ermöglicht haben. Ihre Unterstützung und vor allem ihr Ansporn zum Fertigstellen dieser Arbeit haben großen Anteil daran!