

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

DISSERTATION

Assoziationen von Pentraxin 3 und anderen inflammatorischen
Markern mit Restnierenfunktion, Nierenersatztherapiedauer und
kardiovaskulären Erkrankungen bei Dialysepatienten

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Michael Hjalmar Axel Böhme

aus Heidelberg

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. R. Schindler
 2. Prof. Dr. med. M. Möckel
 3. Prof. Dr. med. P. Mertens

Datum der Promotion: 5.6.2011

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Ralf Schindler danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, die Betreuung während der experimentellen Arbeiten, sowie für zahlreiche Anregungen und die Durchsicht des Manuskripts.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, insbesondere Frau Wilde danke ich für die Unterstützung bei meiner Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	
1.1 Chronische Niereninsuffizienz und Dialyse	3
1.2 Inflammation und Atherosklerose	5
1.3 Inflammation und Urämie	5
1.4 Inflammation und Malnutrition	7
1.5 Inflammation und oxidativer Stress	8
1.6 Inflammation und Dialysetechnik	9
1.7 Pentraxine	9
1.8 C-reaktives Protein (CRP)	11
1.9 Pentraxin3	12
1.9.1 Proteinstruktur und Bindung	12
1.9.3 Funktionen	13
1.9.2 Bildung	13
1.9.4 Pentraxin3 und kardiovaskuläre Erkrankungen	16
2. Fragestellungen	
2.1 Methodische Fragestellung	17
2.2 Klinische Fragestellungen	17
3. Material und Methoden	
3.1 Patientenkollektiv	19
3.2 Chemikalien, Labormaterialien, Geräte und Lösungen	20
3.3 Durchführung eines Pentraxin3 – ELISA	21
3.4 Durchführung eines Interleukin 6 – ELISA	22
3.5 Bestimmung von CRP	23
3.6 In vitro Zellstimulation	23
3.7 Statistik	24
4. Ergebnisse	
4.1 Pentraxin3 Messungen mit verschiedenen Antikoagulantien	25
4.2 Pentraxin3 Standardkurve mit Zugabe verschiedener Antikoagulantien	26
4.3 PTX3-, CRP- und IL-6-Plasmaspiegel bei Dialysepatienten und Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz	27
4.3.1 Korrelation zwischen Restnierenfunktion und PTX3-, CRP- und IL-6-Plasmaspiegeln	31

4.3.2	Korrelation zwischen Dialysedauer und PTX3-, CRP- und IL-6-Plasmaspiegeln	32
4.3.3	Korrelation zwischen Erythropoetindosis und PTX3-, CRP- und IL-6-Plasmaspiegeln	33
4.3.4	Assoziation von PTX3-, CRP- und IL-6-Plasmaspiegeln mit kardiovaskulären Erkrankungen	34
4.4	Pentraxin3-Plasmaspiegel vor und nach Dialyse	40
4.5	Pentraxin3-Spiegel als Kinetik über 48 Stunden	42
4.6	Kinetik der PTX3-Produktion in vitro	43
4.7	Pentraxin3-Konzentrationen von Hämodialysepatienten nach in vitro Zellstimulation	44
5.	Diskussion	
5.1	Methoden	45
5.2	Vergleich der Pentraxin3-Spiegel in der Literatur	46
5.3	Pentraxin3-Spiegel bei chronischer Niereninsuffizienz	47
5.4	Pentraxin3 und seine Assoziationen mit Restnierenfunktion, Nierenersatztherapiedauer und Erythropoetindosis	48
5.5	Pentraxine und ihre Assoziationen zu kardiovaskulären Erkrankungen	50
5.6	PTX3 Spiegel bei Dialysepatienten	52
6.	Zusammenfassung	54
7.	Methodischer Anhang	56
8.	Literaturverzeichnis	58
	Publikationsliste	67
	Lebenslauf	68
	Selbstständigkeitserklärung	69

1. Einleitung

1.1 Chronische Niereninsuffizienz und Dialyse

Im Jahr 2006 wurden in Deutschland 66508 und weltweit rund 1,3 Millionen Patienten dialysiert [1, 2]. Die Zahl der Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz im Stadium 5 hat sich innerhalb der letzten zehn Jahre verdoppelt und diese Zahlen werden Schätzungen zufolge noch deutlich weiter steigen, teils um ca. 7% pro Jahr [2]. Dieser Anstieg ist vor allem mit der erhöhten Lebenserwartung und den damit verbundenen Erkrankungen, vor allem Atherosklerose und Diabetes mellitus, zu erklären [3, 4].

Eine chronische Niereninsuffizienz (CKD= Chronic Kidney Disease) ist irreversibel und schreitet durch permanent einwirkende Schädigungen und den Untergang von Nephronen weiter fort [5]. Die chronische Niereninsuffizienz ist laut Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (K/DOQI) der amerikanischen National Kidney Foundation als Nierenschädigung oder Herabsetzung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) unter 60ml/min/1,73m^2 für ≥ 3 Monate definiert [6]. Die Nierenschädigung ist dabei als pathologische Abnormität oder abnorme Befunde von Blut- und Urintests und bildgebenden Verfahren als Marker der Schädigung charakterisiert.

In den K/DOQI-Leitlinien werden 5 Stadien der CKD unterschieden, wobei die Einteilung auf der verbliebenen glomerulären Filtrationsrate basiert. Ist das Stadium 5 der CKD erreicht, was einer GFR $<15\text{ml/min}$ entspricht, liegt ein Nierenversagen vor und es wird mit einem Nierenersatzverfahren begonnen. Als Verfahren stehen die Hämodialyse, die Peritonealdialyse und die Nierentransplantation zur Verfügung. Von den 66508 Patienten, die 2006 in Deutschland dialysiert wurden, erhielten 63307 eine Hämodialyse und 3201 eine Peritonealdialyse. Im gleichen Zeitraum wurden in Deutschland 2528 Nieren transplantiert [1].

Bei der Hämodialyse (HD) strömen Blut und Dialysierflüssigkeit, durch eine semipermeable Dialysemembran getrennt, im Gegenstrom aneinander vorbei. Der Stoffaustausch erfolgt per Diffusion, Ultrafiltration und Konvektion.

Bei der Peritonealdialyse wird das gut durchblutete Peritoneum des Patienten als körpereigene Filtermembran benutzt. Mehrmals täglich wird über einen Peritonealkatheter eine Dialyseflüssigkeit in den Bauchraum gefüllt und nach Aufnahme von Flüssigkeit und zu dialysierenden Stoffen wieder gewechselt. Jedoch erst mit der Einführung der kontinuierlichen ambulanten Peritonealdialyse (CAPD) durch Popovich und Moncrief 1978 [7] und einer deutlich gesunkenen Peritonitisrate erlangte dieses Verfahren mehr klinische Relevanz [8].

Trotz inzwischen frühzeitiger Erkennung einer Niereninsuffizienz, verbesserter Dialysetechnik und Therapiemöglichkeiten haben Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ein, im Vergleich zur gesunden Normalbevölkerung, deutlich erhöhtes Mortalitäts- und kardiovaskuläres Risiko [9-12]. Das Mortalitätsrisiko der CKD-Patienten ist bereits bei geringer Einschränkung der Nierenfunktion deutlich erhöht und steigt mit zunehmender Nierenfunktionseinschränkung exponentiell an [13]. Die K/DOQI empfiehlt, bereits die frühen Stadien einer CKD in die höchste kardiovaskuläre Risikostufe einzuordnen und eine besonders aggressive Senkung des Cholesterins anzustreben [14].

In Deutschland verstarben im Jahr 2006 11608 Dialysepatienten, was einer Mortalitätsrate von 17% entspricht. Haupttodesursachen waren mit 39,7% kardiale und mit 11,8% vaskuläre Erkrankungen [1]. Mit einer jährlichen Mortalität von 9% durch kardiovaskuläre Erkrankungen haben Dialysepatienten damit ein 10-100fach erhöhtes Risiko gegenüber der Gesamtbevölkerung, selbst wenn Faktoren wie Alter, Geschlecht, Rasse und das Vorhandensein eines Diabetes mellitus mitberücksichtigt werden [10, 15-20].

Neben den traditionellen Risikofaktoren Hypertonie, Dyslipidämie, Rauchen und Diabetes mellitus ist bei Dialysepatienten vor allem eine enge Verknüpfung der drei Faktoren Malnutrition, Inflammation und Atherosklerose (MIA-Syndrom) ursächlich für die hohe Mortalitätsrate durch kardiovaskuläre Erkrankungen [21-25].

Im Folgenden wird auf die Beziehungen der Inflammation zu bekannten kardiovaskulären Risikofaktoren bei chronischer Niereninsuffizienz und speziell auf die Rolle der Pentraxine näher eingegangen.

1.2 Inflammation und Atherosklerose

Als Hauptursache für die Entstehung atherosklerotischer Gefäßveränderungen wird in den letzten Jahren nicht nur bei Patienten mit chronischem Nierenversagen, sondern auch in der Normalbevölkerung ein entzündliches Krankheitsbild (Inflammation) angesehen [26, 27]. Ridker et al. zeigten 1997, dass Patienten mit hohen CRP-Plasmaspiegeln ein zweifach erhöhtes Risiko haben, einen Hirninfarkt zu erleiden und ein dreifach erhöhtes Risiko einen Myokardinfarkt zu bekommen [28]. Es besteht zudem ein Zusammenhang zwischen CRP und dem Ausmaß der Atherosklerose koronarer, peripherer und extrakranieller Hirnarterien [29]. Ross et al. wiesen zudem auf die große Bedeutung inflammatorischer und immunkompetenter Zellen in atherosklerotischen Plaques hin [30]. Es wurde auch eine Korrelation zwischen CRP-Erhöpfung und dem Grad der koronaren Kalzifikation gefunden [31, 32]. Nach jüngsten Untersuchungen scheint CRP auch von glatten Muskelzellen und Endothelzellen in atherosklerotischen Plaques exprimiert zu werden [33-35].

Die Inflammation nimmt Einfluss auf alle Phasen der Atherogenese von der frühen Phase, über die Progression der Läsion, bis hin zu den thrombotischen Komplikationen und zur Plaqueruptur [26]. Im frühen Anfangsstadium der Atherogenese präsentieren Endothelzellen nach Induktion durch Zytokine, wie IL-1 β , Leukozytenadhäsionsmoleküle wie VCAM-1 (vascular-cell-adhesion-molecule-1) und binden damit Monozyten und T-Lymphozyten. Diese findet man in frühen atherosklerotischen Läsionen [36]. Die Monozyten wandern in die Intima ein und führen dort zu einer lokalen Inflammation. Sie exprimieren zytokinvermittelt Scavenger-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche und nehmen dadurch Lipoproteine auf. Durch die Aufnahme der Lipoproteine werden die Monozyten zu sogenannten Schaumzellen [37]. Inflammation hat aber auch Einfluss auf die akuten thrombotischen Ereignisse. So produzieren Makrophagen in atherosklerotischen Plaques proteolytische Enzyme, welche die fibröse Struktur schwächen. Gleichzeitig verhindert γ -Interferon aus aktivierten T-Lymphozyten, dass glatte Muskelzellen neues Kollagen zur Reparatur bilden können [38].

1.3 Inflammation und Urämie

Da die Niere wesentlich für die Ausscheidung der Zytokine verantwortlich ist [39], sinkt mit einer Verschlechterung der exkretorischen Nierenfunktion auch die Ausscheidungsrate für diese Stoffe. Sowohl pro- als auch antiinflammatorische Stoffe reichern sich dadurch im Plasma an. Der Haupteffekt scheint allerdings bei den proinflammatorischen Stoffen zu liegen. Unter urämischen Bedingungen, wie metabolischer Azidose, extrazellulären Volumenschwankungen, Hyper- und Hypokaliämie und Expansion des intrazellulären Volumens ist der Anstieg der Zytokinproduktion von Interleukin-1 (IL-1) und Interleukin-6 (IL-6) doppelt so hoch wie bei Normalpersonen [40, 41].

Zytokine sind hormonähnliche Wirkstoffe, die regulierende Funktionen auf das Wachstum und die Differenzierung von Zellen ausüben [42]. Abb. 1 zeigt die potentiellen Mechanismen, wie pro- und antiinflammatorische Zytokine Atherosklerose und urämische Komplikationen verursachen können.

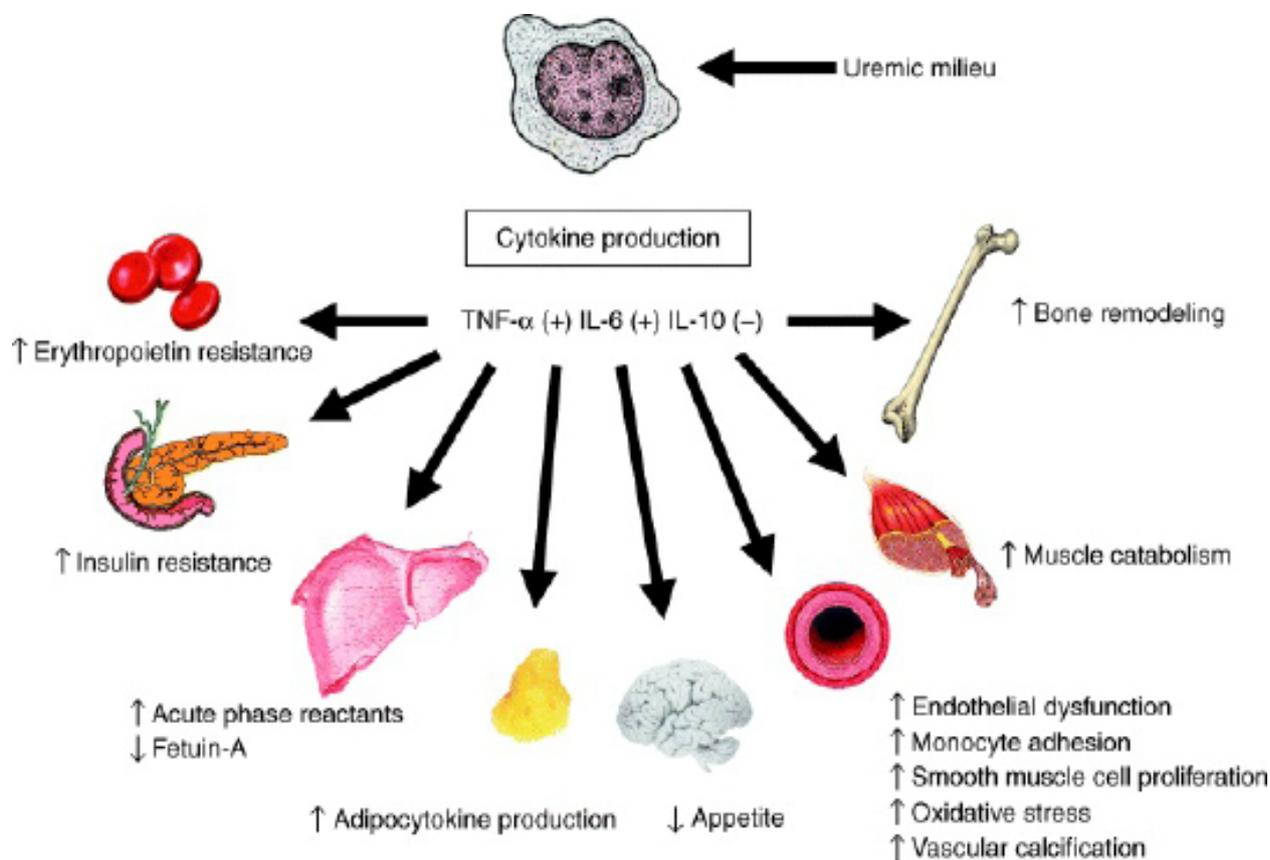


Abb.1 ▲ urämische Komplikationen pro- und antiinflammatorischer Zytokine Quelle: Stenvinkel, P., [40]

Bei Patienten im Stadium 5 der CKD (terminal niereninsuffiziente Patienten) wurden durch Stenvinkel et al. [43] erhöhte Zytokinkonzentrationen, insbesondere von Interleukin-6 nachgewiesen. Diese führten zu Appetitverlust, Hyperkatabolismus und Endothelstörungen. Bei diesen Patienten zeigte sich IL-6 außerdem als Prädiktor für Mortalität und kardiovaskuläre Ereignisse aussagefähiger als CRP [44].

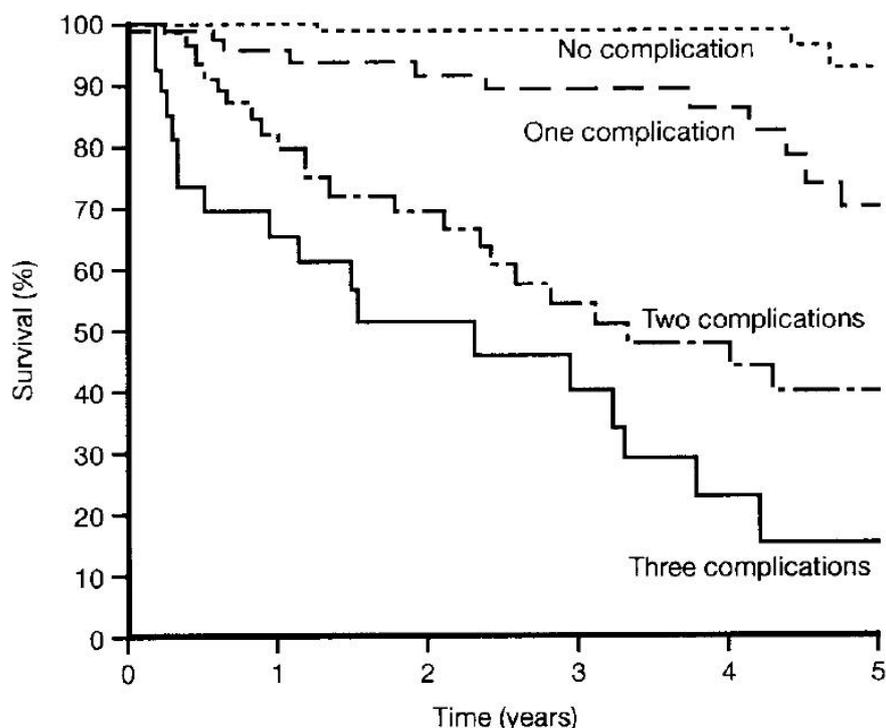
Hauptproduktionsquellen von Interleukin-6 sind aktivierte Makrophagen, Monozyten, sowie T- und B-Zellen nach entsprechender Stimulation. Die Induktion der IL-6-Synthese erfolgt durch LPS, IL-1 β und TNF- α [45, 46]. IL-6 führt zu einer vermehrten Differenzierung von B-Zellen, einer verstärkten T-Lymphozytenproliferation und einer erhöhten Aktivität der natürlichen Killerzellen [47]. IL-6 induziert in der Leber die Synthese verschiedener anderer Mediatoren, wie Fibrinogen, α 1-Antitrypsin, C-reaktives Protein (CRP) und Komplementfaktoren [48]. In einer tierexperimentellen Studie zeigte sich, dass im Rahmen der pathophysiologischen Vorgänge bei Trauma und Sepsis IL-6 einen der wesentlichsten Mediatoren darstellt und hohe Plasmaspiegel mit einem schlechten Outcome assoziiert sind [49].

1.4 Inflammation und Malnutrition

Malnutrition (Mangelernährung) ist bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz häufig, 33% weisen eine klinisch erkennbare milde bis mäßige Protein-Energie-Mangelernährung und 6% eine schwere Protein-Energie-Mangelernährung auf [50]. Dies hat unterschiedliche Gründe. Aufgrund von eiweißreduzierter Kost und einer durch Urämie bedingten Inappetenz können Patienten bereits in der prä-dialytischen Phase eine Malnutrition aufweisen [24]. Ein weiterer bedeutender Faktor ist die metabolische Azidose, diese tritt bei terminaler Niereninsuffizienz häufig auf und führt zu einer Steigerung des Proteinabbaus [51]. Die Azidose bewirkt zudem eine vermehrte Insulinresistenz und dadurch eine verminderte Muskelprotein- und Albuminsynthese. Des Weiteren kommt es unter azidotischen Bedingungen zu einer erhöhten Aktivität des Ubiquitin-Proteasom-Systems und damit zu einem vermehrten Proteinabbau [23].

Auch eine chronische Inflammation kann erheblich zur Malnutrition beitragen. Bei einer Inflammation kommt es zu einem Anstieg proinflammatorischer kataboler Zytokine [52], die wiederum einen Proteinabbau begünstigen und Anorexie verursachen [53]. Patienten mit IL-6 Plasmaspiegeln $>10\text{pg/ml}$ verloren über 3 Jahre 4.6% Körpergewicht, wohingegen Patienten mit IL-6 Plasmaspiegeln $<10\text{pg/ml}$ nur 1.39% verloren [53]. In Studien konnte mehrfach gezeigt werden, dass bei Hämodialysepatienten eine stark positive Korrelation zwischen einer Malnutrition und erhöhter kardiovaskulärer Sterblichkeit [54] und zwischen erniedrigten Serum-Albuminwerten und Mortalität besteht [55].

In Abb. 2 ist das Überleben in Relation zum Ernährungszustand gesetzt.



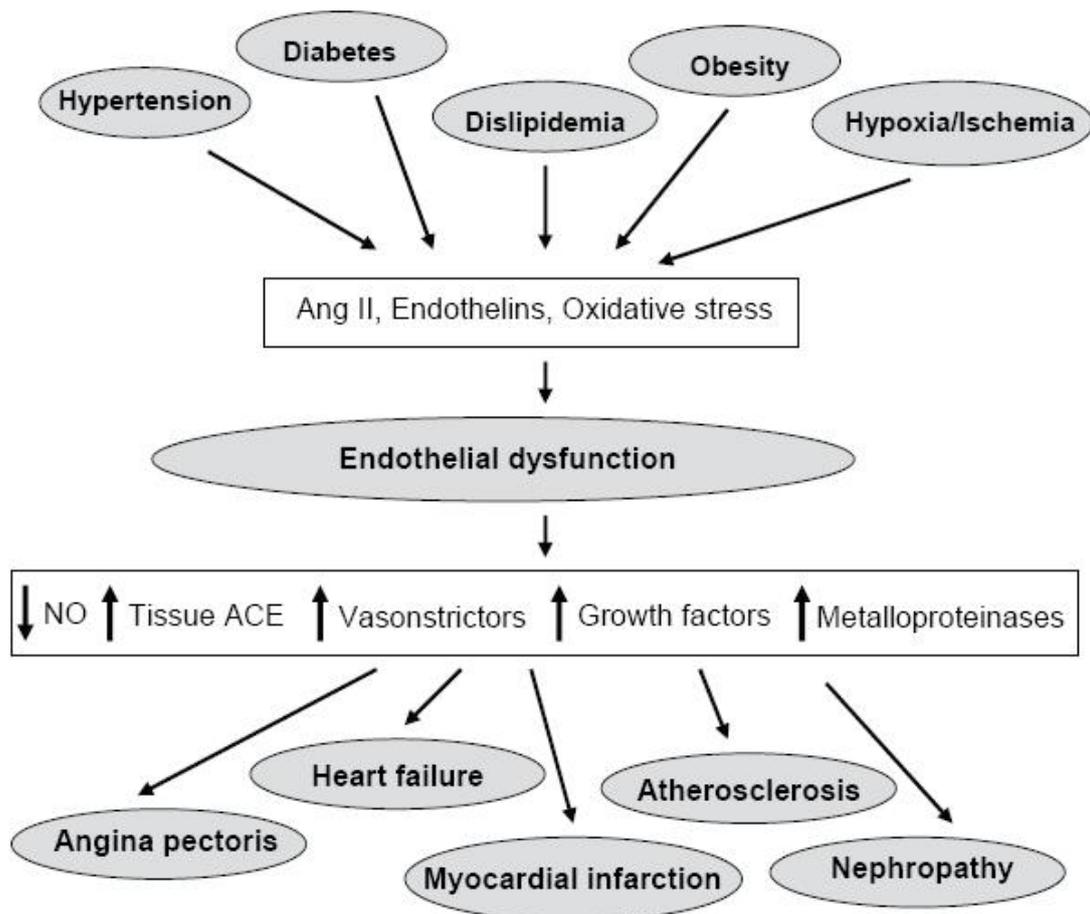
▲ **Abb. 2** Kaplan-Meier Überlebenskurve chronisch niereninsuffizienter Patienten mit normalem Ernährungsstatus (n=46), milder Malnutrition (n=5) und moderater bis schwerer Malnutrition (n=17) Quelle: Qureshi J Am Soc Nephrol 13: S28–S36, 2002

1.5 Inflammation und oxidativer Stress

Eine Erhöhung des oxidativen Stresses ist bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz mehrfach beschrieben worden [56, 57]. Während der Hämodialyse werden niedermolekulare Antioxidantien aus dem Blut entfernt oder durch den oxidativen Stress verbraucht. Die einzuschränkende Kaliumzufuhr bedingt einen geringen Obstverzehr und somit eine geringe Aufnahme von Vitamin C und pflanzlichen Phenolen [58]. Neutrophile und Monozyten von Hämodialysepatienten weisen eine vermehrte spontane Bildung von Sauerstoffradikalen auf [59]. Advanced Glycation Endproducts (AGE), Reaktionsprodukte aus Zuckerarten und Proteinen, die auch bei nichtdiabetischen Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz gebildet werden, reichern sich bei Dialysepatienten im Blut an. Aufgrund ihrer Größe werden die AGE's bei der Hämodialyse nur unzureichend eliminiert und aktivieren über spezifische Rezeptoren (RAGE) Makrophagen und Endothelzellen [60]. Diese produzieren daraufhin vermehrt Zytokine und Sauerstoffradikale und führen zu einer gesteigerten Mikroinflammation [61].

Bei gesteigertem oxidativen Stress kommt es zu einer Imbalance zwischen vasodilatierenden (z.B. NO) und vasokonstriktorisches Faktoren (z.B. Angiotensin II) und somit zu einer endothelialen Dysfunktion mit atherosklerotischen Gefäßveränderungen [62-64].

Abb. 3 zeigt die Pathogenese der endothelialen Dysfunktion.



▲ **Abb. 3** Oxidativer Stress und Endotheliale Dysfunktion. NO = nitric oxide; Ang II = angiotensin II, ACE = angiotensin converting enzyme Quelle: Pechanova [48]

1.6 Inflammation und Dialysetechnik

Der Kontakt von Blut mit Fremdoberflächen kann zu einer Zytokininduktion führen. Bei der Dialyse sind dies die Dialysemembranen. Der Kontakt von Blut mit Low-Flux-Membranen scheint zu einer größeren Zytokinproduktion zu führen als der Kontakt mit High-Flux-Membranen [65].

Für die Zytokininduktion ist zudem bedeutend, wie viele Komplementfaktoren auf der Blutseite aktiviert und dann mit Zytokinen eliminiert werden. Zellulosemembranen induzieren eindeutig mehr Komplement als synthetische Membranen, unabhängig vom Flux [66]. High-Flux-Membranen sind jedoch im Gegensatz zu Low-Flux-Membranen in der Lage, aktivierte Komplementfaktoren wie C5a, C3a und Faktor D, aber auch Zytokine, zu eliminieren, die ihrerseits zur Zytokininduktion beitragen. Solche Zytokin-induzierende Substanzen (ZIS) können vom Dialysat ins Blut gelangen.

Bei unsterilem Dialysat oder Schlauchsystem konnten Endotoxine und Bakterien-DNA nachgewiesen werden, die eine pyrogene Infektion auslösen [67, 68]. Dialysemembranen sind permeabel für diese ZIS, allerdings in unterschiedlichem Ausmaß. Mehrere in-vitro Studien zeigen einen prompten Transfer von ZIS durch Zellulose-Membranen und einen geringeren Transfer durch bestimmte High-Flux-Membranen [65, 69].

Entzündete venöse Zugänge sind ein oft unterschätzter Grund für eine Mikroinflammation. Vor allem der Gebrauch von venösen Verweilkathetern ist mit einer erhöhten Rate von Infektionen assoziiert [70].

1.7 Pentraxine

Bei den Pentraxinen handelt es sich um zirkulierende Proteine mit sogenannten pathogen recognition receptors (PRRs), die eine bedeutsame Rolle beim Zusammenwirken von angeborener (innate) Immunität und Inflammation spielen. Die angeborene Immunität ermöglicht eine frühe Abwehrreaktion gegen pathogene Mikroorganismen und hat eine Schlüsselrolle bei der Aktivierung und Orientierung der späteren Antigen-spezifischen, adaptiven Immunantwort. Das Erkennen von Pathogenen und beschädigtem Gewebe geschieht durch pathogen recognition receptors (PRRs). Die angeborene Immunität besteht aus einem humoralen und einem zellulären Teil. Zellgebundene PRRs gehören zu unterschiedlichen funktionellen und strukturellen Gruppen, wie die Toll-like Rezeptoren und G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Zum humoralen Teil der PRRs gehören die Ficoline, Collectine und Pentraxine [71].

Zirkulierende und zellgebundene PRRs binden an bestimmte repetitive Oberflächenstrukturen, sogenannte PAMPs (pathogen-associated molecular patterns), eingedrungener Bakterien und leiten die Abtötung der Erreger ein [72].

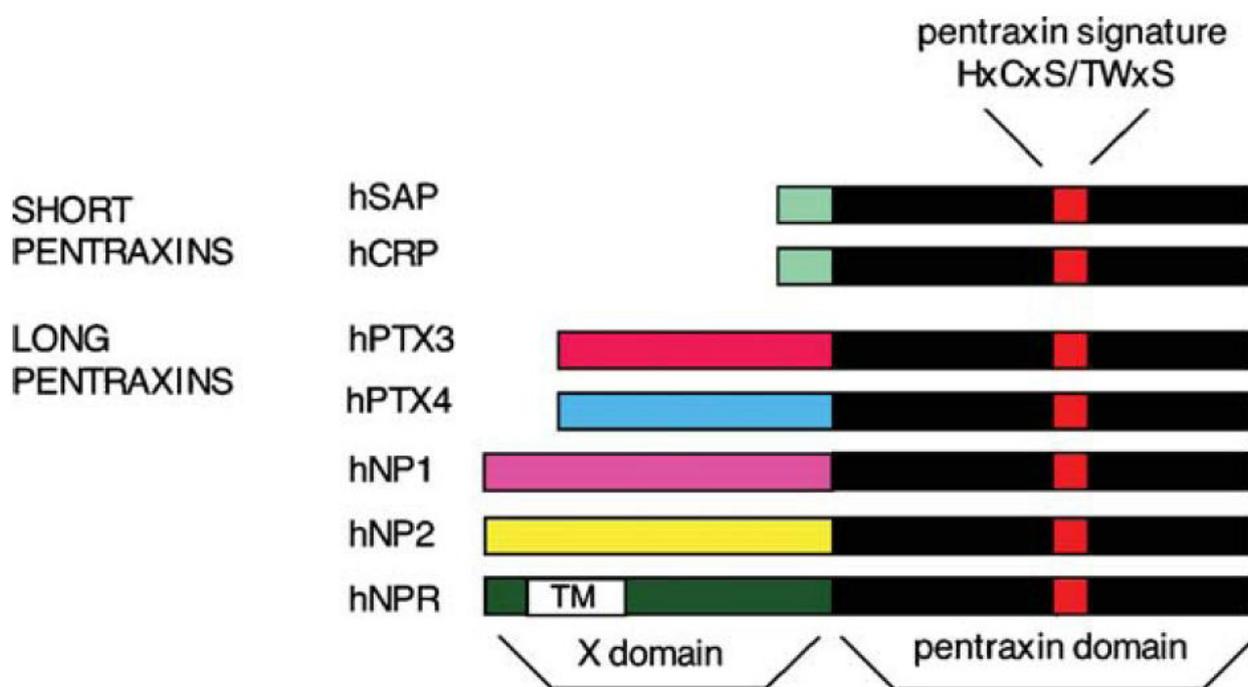
Von den PRRs wird ein breites Spektrum von Krankheitserregern erfasst, da die PAMPS vielen Bakterien und einigen Pilzen gemeinsam sind. Im Unterschied dazu besitzen die Antikörper (Immunglobuline) der adaptiven Immunität strenge Erregerspezifität.

Nach der Bindung an Makrophagen werden die Bakterien phagozytiert und im Zellinnern aufgelöst. Zugleich setzen die Makrophagen Interleukine (Tumornekrosefaktor α [TNF- α], IL-1, IL-6) frei, die eine Entzündungsreaktion induzieren. Die Pentraxine wirken als Opsonine. Sie erleichtern die Phagozytose, indem sie sich mit den PAMPs verbinden. Teilweise können sie an der Zelloberfläche auch das Komplementsystem aktivieren und dadurch die Zerstörung der Bakterien bewirken. Da ihre Produktion durch die inflammatorischen Zytokine aus aktivierten Makrophagen stark gesteigert wird, stellen Pentraxine selbst einen Entzündungsmarker dar. Das trifft auch bei nichtinfektiös bedingten Entzündungen zu, da diese ebenfalls von aktivierten Makrophagen ausgehen.

Die Pentraxine wurden so benannt, weil sie aus 5 identischen Untereinheiten bestehen, die ringförmig miteinander verbunden sind [73]. Sie werden von der Keimbahn kodiert und sind in der Evolution über Millionen von Jahren weitgehend konserviert geblieben. Bereits bei Limuluskrabben sind Pentraxine Bestandteil der unspezifischen Immunabwehr [74, 75].

Basierend auf der Primärstruktur werden die Pentraxine in lange und kurze Pentraxine eingeteilt. Die Gruppe der kurzen Pentraxine beinhaltet CRP und SAP, die beide zu 51% in ihrer Aminosäuresequenz übereinstimmen [76]. Der Prototyp der langen Pentraxine ist das PTX3.

In Abb. 4 sieht man eine Einteilung der Pentraxine.



▲ **Abb. 4:** In den frühen 90er Jahren wurden neue, die Pentaxin-Domain enthaltende Proteine entdeckt. Der Hauptunterschied zwischen PTX3, CRP und SAP ist eine Kette aus 174 Aminosäuren, hier als X-Domain gekennzeichnet, die beim PTX3 mit der Pentraxin-Domain verbunden ist. Quelle: Garlanda C, Bottazzi B, Bastone A, Mantovani

1.8 C-reaktives Protein (CRP)

Das erste bereits 1930 entdeckte Pentraxin war das CRP [77]. Diese Bezeichnung erhielt es wegen seiner Fähigkeit, eine calciumabhängige Bindung mit dem C-Polysaccharid von *Streptococcus pneumoniae* einzugehen [78, 79]. Es aktiviert dabei auch das Komplementsystem. CRP gehört zu den sogenannten Akute-Phase-Proteinen, die bei einer Entzündung unter der Einwirkung von IL-6 und TNF- α von der Leber gebildet und ausgeschüttet werden [80, 81]. Die normale Serumkonzentration (<3 mg/l) kann im Plasma schnell auf weit über 100 mg/l ansteigen [78].

Laut Zimmermann et al. korrelieren erhöhte CRP-Spiegel bei Hämodialysepatienten mit kardiovaskulärem Risiko und Mortalität [82]. Auch andere Arbeitsgruppen haben bereits auf erhöhte CRP-Spiegel bei Hämodialysepatienten im Vergleich zu Patienten mit beginnender Niereninsuffizienz hingewiesen [83]. Nach jüngsten Untersuchungen scheint CRP auch von glatten Muskelzellen und Endothelzellen in atherosklerotischen Plaques exprimiert zu werden [84, 85], was eine aktive Rolle bei der Atherogenese vermuten lässt. Yeh et al. zeigten, dass CRP in Endothelzellen die Expression von ICAM, VCAM, E-Selektin und Chemokinen induziert [86]. Die NO-Synthetase der Endothelzellen wird durch CRP blockiert [87], was zu einer vermehrten Apoptose der Endothelzellen und endothelialer Dysfunktion führt. Prostacyclin, ein sehr potenter Vasodilatator, Inhibitor der Proliferation glatter Muskelzellen und Inaktivator der Plättchenaggregation, wird bei hohen CRP-Konzentrationen von Endothelzellen vermindert ausgeschüttet [88].

CRP fördert die MCP-1-vermittelte (Monozyten Chemoattraktives Protein-1) Einwanderung von Monozyten in ischämisches Gewebe und deren Anheftung an Endothelzellen. Dies geschieht durch Hochregulierung des Chemokin-Rezeptors-2 (CCR2) [89]. Cermak et al. zeigten eine durch CRP induzierte vermehrte Produktion von tissue-factor bei Monozyten [90].

Erhöhte CRP-Spiegel haben durch Stimulierung einer vermehrten Ausschüttung der Matrix-Metalloproteinase-1 (MMP-1) auch Auswirkungen auf die Plaquevulnerabilität [91]. Obwohl der genaue Einfluss der MMP-1 bei der Plaquevulnerabilität noch unklar ist [92], wird sie doch für bedeutsam gehalten, da sie die initiale Spaltung von Kollagen Typ I und III, den Hauptbestandteilen der Matrix atherosklerotischer Plaques, vermittelt.

Angiotensin II ist einer der wichtigsten Faktoren bei der Entstehung und dem Fortschreiten der Atherosklerose. Der Hauptteil der proinflammatorischen Effekte wird über den AT1-Rezeptor vermittelt. CRP erhöht Anzahl und Expression der AT1-Rezeptoren, was zu einer vermehrten Bildung von oxidativen Radikalen führt und die Migration und Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen erleichtert [93].

Abb. 5 zeigt eine Zusammenfassung der proatherogenetischen Effekte des CRP.

proatherogenetische Effekte des CRP		
Endothelzellen	Monozyten-Makrophagen	glatte Gefäßmuskelzellen
ICAM, VCAM erhöht	tissue factor erhöht	AT1-Rezeptor-Konzentration erhöht
E-Selektin und Chemokine erhöht	Interleukinsynthese erhöht	reaktive Sauerstoffradikale vermehrt
MMP-1 erhöht	Chemokin-Rezeptor-2-Synthese erhöht	tissue factor erhöht
Prostacyclinausschüttung erniedrigt	Aufnahme oxidierter LDL Produkte erhöht	
reaktive Sauerstoffradikale vermehrt	MMPs erhöht	
NO Synthese vermindert		
Endotheliale Dysfunktion erhöht		
Apoptose der Endothelialzellen vermehrt		

▲ **Abb.5:** Proatherogenetische Effekte des CRP

1.9 Pentraxin 3

1.9.1 Proteinstruktur und Bindung

Pentraxin 3 (PTX3) ist der Prototyp der erst in den frühen neunziger Jahren des letzten Jahrhunderts entdeckten langen Pentraxine [94]. Es besitzt eine pentamere Struktur, deren 5 identische Untereinheiten eine C-terminale pentraxinähnliche Domäne und daran gekoppelt eine N-terminale Sequenz aus 174 Aminosäuren aufweisen. Im Blutkreislauf existiert PTX3 als Multimer aus zwei Molekülen mit zusammen 10 Untereinheiten (MG 440 kDa) [95].

Die multifunktionellen Eigenschaften von PTX3 können nicht zuletzt durch die Fähigkeit, an viele Liganden zu binden, erklärt werden, eine Fähigkeit, die es mit CRP und SAP teilt. Der erste und am besten beschriebene Ligand von PTX3 ist die Komplementkomponente C1q [95, 96]. Ähnlich wie CRP und SAP bindet PTX3 an apoptotische Zellen und hemmt so deren Elimination [97]. Andere Liganden sind Wachstumsfaktoren, Komponenten der extrazellulären Matrix und bakterielle, fungizide oder virale Pathogene.

Eine spezifische Bindung von PTX3 wurde nachgewiesen für *Aspergillus fumigatus*, *Salmonella typhimurium* und *Pseudomonas aeruginosa* [98, 99], sowie für CMV und Influenzavirus H3N2 [100]. Die Bindung der kurzen Pentraxine CRP und SAP mit ihren Liganden ist generell calciumabhängig [101]. Im Gegensatz dazu findet sich bei PTX3 keine Koordinationsstelle für Calcium, die Bindung an die Komplementkomponente C1q ist calciumunabhängig [95]. Dies ist allerdings nicht generell der Fall, da die Bindung zwischen PTX3 und anderen Liganden, wie dem Fibroblasten Wachstumsfaktor FGF2, calciumabhängig ist [99].

1.9.2 Bildung

Anders als CRP wird PTX3 nicht nur in der Leber, sondern von vielen Zelltypen produziert. Hauptsächlich wird es von mononuklearen Phagozyten und myeloiden dendritischen Zellen, aber auch von Endothelzellen, glatten Gefäßmuskelzellen, Fibroblasten und Adipozyten gebildet [94, 102-106]. Auch in renalen Epithelialzellen und Mesangialzellen von Patienten mit IgA Glomerulonephritis wurde eine PTX3-Produktion nachgewiesen [107, 108]. Die Produktion von PTX3 in den dazu bestimmten Zellen wird durch die inflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 stimuliert [94, 109], aber auch durch Bakteriensubstanzen wie Lipopolysaccharide [104, 110], die an den Toll-like-Rezeptoren der Zellen angreifen. Anders als bei den kurzen Pentraxinen, die hauptsächlich durch IL-6 induziert werden, führt IL-6 beim PTX3 zu keiner oder nur einer geringen Produktion [110]. Vaskuläre Endothelialzellen und glatte Muskelzellen produzieren PTX3 als Antwort auf Entzündungszeichen, wie oxidierte low-density Lipoproteine (ox-LDLs) [105] und dementsprechend wurde PTX3 in atherosklerotischen Plaques nachgewiesen [111]. Es besteht auch eine signifikante Korrelation zwischen erhöhten LDL-Werten und PTX3 mRNA-Expression [112].

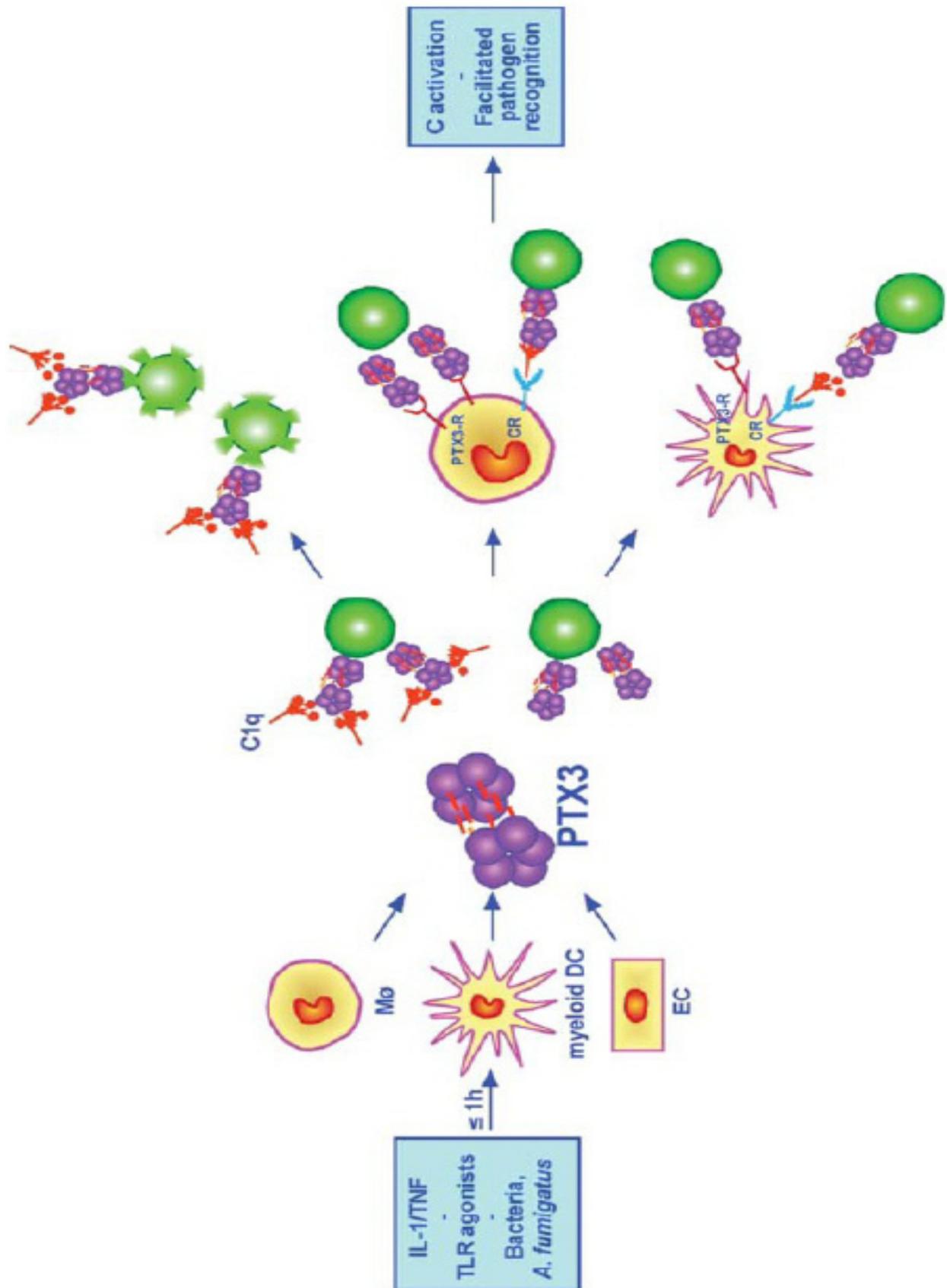
Eine neuere Arbeit zeigte, dass neutrophile Leukozyten PTX3 in Granula speichern und abgeben können [113]. Aus diesen Granula kann PTX3 rasch freigesetzt werden. Obwohl PTX3 kein klassisches Akute-Phase-Protein ist, steigt seine Produktion bei Infektionen akut an, so bei einer Sepsis innerhalb von 6-8 Stunden von 0,2 ng/ml auf 200-800 ng/ml [114, 115]. Die Plasmakonzentration von PTX3 geht auch nach Myokardinfarkt [116, 117] und operativen Eingriffen in die Höhe [118].

1.9.3 Funktionen

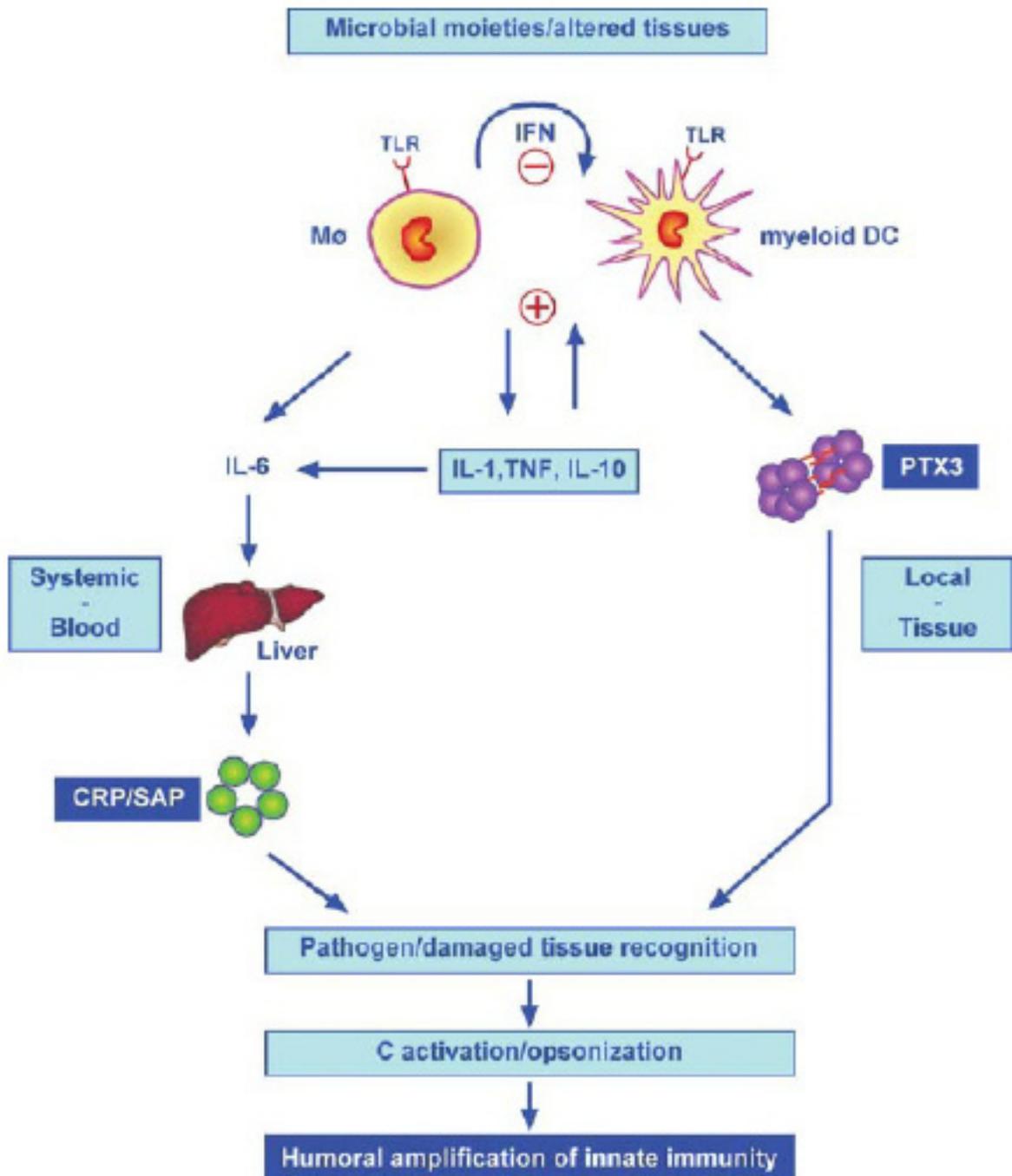
Ebenso wie CRP hat PTX3 die Bedeutung eines unspezifischen Entzündungsmarkers [119, 120]. Die Rolle des PTX3 in der Immunabwehr wird durch Experimente mit PTX3-defizienten Mäusen unterstrichen. Diese waren sowohl für eine invasive pulmonale Aspergillose, als auch für eine Infektion mit dem Cytomegalievirus (CMV) anfälliger als Kontrollmäuse [98, 121]. Eine Gabe von rekombinantem PTX3 bewirkte einen Schutz vor CMV-Infektion und Reaktivierung, sowie vor einer Superinfektion mit *Aspergillus fumigatus* [122]. PTX3-überproduzierende Mäuse zeigen eine gesteigerte inflammatorische Antwort und eine erhöhte Sterblichkeit nach intestinaler Ischämie und Reperfusion [123].

PTX3 bindet an die Komplementkomponente C1q und aktiviert damit die klassische Immunkaskade [96]. Durch die Bindung von PTX3 an verschiedene Pathogene werden diese opsonisiert und besser phagozytiert [97].

Abb. 6 und 7 zeigen die Rolle von PTX3 in Komplementaktivierung und Immunabwehr.



▲ **Abb. 6:** Die Rolle von PTX3 bei der Komplementaktivierung Quelle: 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



▲ **Abb. 7:** Die Rolle von PTX3 bei der angeborenen Immunität Quelle: 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

Die Phagozytose apoptotischer Zellen wird durch PTX3 gehemmt [97]. Dies geschieht durch eine Hemmung der Kreuzpräsentation apoptotischer Epitope. Damit greift PTX3 massiv in die Unterscheidung zwischen Apoptose und Nekrose ein [124]. Apoptose ist der Zelltod, der im Rahmen des normalen Zelluntergangs geschieht und gewährleistet, dass die betreffende Zelle ohne Schädigung des Nachbargewebes zugrundegeht. Bei der Nekrose handelt es sich um einen Zelltod durch Entzündung oder Tumorgewebe.

PTX3 könnte dadurch Einfluss auf die Entstehung und das Fortschreiten von Autoimmunerkrankungen haben. Erhöhte PTX3 Werte finden sich jedoch nur bei wenigen Autoimmunerkrankungen, wie der Small-Vessel-Vasculitis und der rheumatoiden Arthritis [120, 125]. Bei der Small-Vessel-Vasculitis korreliert der PTX3 Wert mit der Schwere der Erkrankung. Immunhistochemisch wurde nachgewiesen, dass die Endothelzellen für die Produktion verantwortlich sind und eine hohe Konzentration von PTX3 in leukozytoklastischen Läsionen vorliegt [126]. Die Tatsache, dass PTX3 im Gegensatz zu den kurzen Pentraxinen CRP und SAP die Aufnahme von apoptotischen neutrophilen Granulozyten durch Makrophagen hemmt, lässt vermuten, dass PTX3 der Hauptfaktor der inkompletten Beseitigung von apoptotischen und sekundär nekrotischen neutrophilen Granulozyten ist, die bei der Small-Vessel-Vasculitis beobachtet wird [126].

PTX3 ist essentiell in der weiblichen Fruchtbarkeit als Knotenpunkt für die Entstehung der extrazellulären Matrix des Eihügels (Cumulus oophorus). PTX3-Knockout($ptx3^{-/-}$)-Mäuse zeigten eine Infertilität, da sich die Cumuluszellen nicht radiär um die Oozyte anlagerten [127].

1.9.4 Pentraxin3 und kardiovaskuläre Erkrankungen

Unterschiedliche Studien zeigen Assoziationen zwischen PTX3 und kardiovaskulären Erkrankungen. Vaskuläre Endothelzellen und glatte Muskelzellen produzieren PTX3 als Antwort auf oxidierte low-density Lipoproteine (ox-LDLs) [105] und PTX3 wurde in atherosklerotischen Plaques nachgewiesen [105, 111]. PTX3-Spiegel steigen bei einem akuten Myokardinfarkt (AMI) rapide an und erreichen ein Maximum 7 Stunden nach Auftreten der ersten Symptome [115]. In einer Studie von 748 Patienten mit AMI wurde PTX3 neben den üblichen Markern, einschließlich CRP, gemessen und zeigte sich dabei als einziger unabhängiger Prädiktor für die Mortalität [116]. Patienten mit instabiler Angina pectoris haben 3fach höhere PTX3 Konzentrationen als die Normalbevölkerung [117].

Bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung zeigten sich in einer Studie mit 20 Patienten, die eine PTCA mit Stent-Implantation erhielten, erhöhte PTX3 Werte sowohl im peripheren Blut, als auch in den Koronararterien. Ein PTX3 Anstieg 24 Stunden nach Intervention war der stärkste Prädiktor für ein „late lumen loss“ [128].

2. Fragestellungen

2.1 Methodische Fragestellungen

Da für die Bestimmung von PTX3 mittels ELISA zum Zeitpunkt der Durchführung der vorliegenden Arbeit keine standardisierten Protokolle existierten, sollte geklärt werden, welches Antikoagulans zur Bestimmung von PTX3 verwendet werden sollte und ob unterschiedliche Antikoagulantien mit dem ELISA oder dem PTX3-Standard interagieren. Daraus ergaben sich folgende Fragestellungen:

Ist die Detektion von PTX3-Plasmaspiegeln abhängig von dem verwendeten Antikoagulans?

Reagieren Antikoagulantien mit dem ELISA-Testsystem oder dem PTX3 Standard?

2.2 Klinische Fragestellungen

Während eine Erhöhung von CRP- und IL-6-Plasmaspiegeln und ihre Assoziation mit kardiovaskulären Erkrankungen bei Patienten mit Niereninsuffizienz gut belegt ist, existieren keine Daten über PTX3 in dieser Population. Daher sollten folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

1. Welchen Effekt hat die Nierenfunktion auf die PTX3-Plasmaspiegel?
2. Wie verhalten sich PTX3-Plasmaspiegel bei Patienten mit unterschiedlichen Graden der Niereninsuffizienz, verglichen mit nierengesunden Probanden und dialysepflichtigen Patienten?
3. Existieren Unterschiede der PTX3-Plasmaspiegel hinsichtlich der Art der Nierenersatztherapie (Hämodialyse vs. Peritonealdialyse)?
4. Verhalten sich PTX3-Plasmaspiegel in diesen Populationen ähnlich wie CRP- und IL-6 Spiegel?
5. Besteht eine Korrelation zwischen Restnierenfunktion und PTX3-Plasmaspiegeln?
6. Lässt sich eine Induktion von PTX3-Plasmaspiegeln durch die Hämodialysetherapie nachweisen?
7. Lässt sich eine PTX3-Induktion in Zellen des peripheren Blutes durch die Hämodialyse nachweisen?

Um mögliche klinische Konsequenzen von erhöhten PTX3-Spiegeln zu untersuchen, sollten folgende Fragen beantwortet werden:

8. Besteht analog zu CRP- und IL-6-Spiegeln eine Korrelation zwischen PTX3-Plasmaspiegeln und der Erythropoetindosis?

9. Besteht bei Hämodialysepatienten eine Assoziation zwischen PTX3-Plasmaspiegeln und der Prävalenz kardiovaskulärer Erkrankungen?

3. Material und Methoden

3.1 Patientenkollektiv

Bei den untersuchten Patientengruppen handelte es sich um Patienten des Virchow-Klinikums der Charité in Berlin und zweier assoziierter Dialysezentren (KfH Bismarckstr. und KfH St. Hedwigs Krankenhaus, Berlin). Alle Patienten erklärten sich nach gegebener Information mit der Teilnahme an der Studie einverstanden.

Bei den Hämodialysepatienten handelte es sich um Patienten, die 3 bis 4mal die Woche dialysiert wurden, in 90% der Fälle mit einer Low-Flux-Membran.

Bei den Peritonealdialysepatienten handelte es sich um Patienten mit chronischer ambulanter Peritonealdialyse (CAPD). In der Regel wurden von diesen Patienten täglich 3-5 Dialysatwechsel mit 2-2,5 Litern durchgeführt.

Bei den Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (CKD), die noch nicht dialysepflichtig waren, handelte es sich um Patienten mit Glomerulonephritiden, Zystennieren, diabetischer, vaskulärer und hereditär/kongenitaler Nephropathie, sowie Systemerkrankungen, bei denen im Rahmen von ambulanten Verlaufskontrollen Blut abgenommen wurde. Im 1. Stadium der CKD nach K/DOQI befanden sich 3%, im 2. Stadium 5%, im 3. Stadium 18%, im 4. Stadium 44% und im 5. Stadium 30% der Patienten.

Patienten mit Tumoren, entzündlichen Erkrankungen, wie z.B. diabetischen Ulcera oder pulmonalen Infekten und Patienten unter immunsuppressiver Therapie wurden von der Untersuchung ausgeschlossen. Kein Patient zeigte klinische oder laborchemische Infektzeichen wie Fieber, Husten, gerötete Punktionsstellen und im Vorfeld der Untersuchungen nachgewiesene Leukozytenzahlen $>10.000/\mu\text{l}$.

Bei der gesunden Kontrollgruppe handelte es sich um Teilnehmer einer Yogagruppe und Labormitarbeiter, die zum Zeitpunkt der Probenentnahme keine klinischen Infektzeichen aufwiesen und bei denen keine schweren Allgemeinerkrankungen bekannt waren.

Für die Vorversuche zur Auswahl des geeigneten Antikoagulans zur PTX3-Bestimmung wurde bei 8 stationären Hämodialysepatienten vor Beginn der Dialyse aus der arteriellen Punktionsnadel Blut abgenommen. Dabei wurden handelsübliche Sarstedtröhrchen mit verschiedenen Antikoagulantien (EDTA, Citrat, Heparin und ohne) verwendet. Die Proben wurden sofort gekühlt, für 5 Minuten bei 4000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und in Eppendorf-Röhrchen bei -20°C eingefroren.

Zum Vergleich der PTX3-, CRP- und IL-6-Plasmaspiegel bei HD, CAPD und CKD Patienten, wurde bei 44 ambulanten Hämodialysepatienten, bei 35 ambulanten Peritonealdialysepatienten, bei 39 Patienten mit nicht dialysepflichtiger Niereninsuffizienz, sowie bei 14 Gesunden Blut entnommen. Die Blutabnahme erfolgte bei den Hämodialysepatienten vor Beginn der Dialyse aus der arteriellen Punktionsnadel und bei den übrigen Gruppen aus einer peripheren Vene. Es wurden handelsübliche EDTA Standardröhrchen (Sarstedt, Deutschland) verwendet.

Die Patientendaten dieser Gruppe bezüglich des Patientenalters, Body Mass Index (BMI), der Nierenersatztherapiedauer, der wöchentlichen Erythropoetindosis und des Vorliegens einer KHK oder pAVK wurden mit Hilfe der Krankenakten und den behandelnden Ärzte erfasst. Die Restnierenfunktion wurde bei Hämodialysepatienten und Peritonealdialysepatienten mittels 24 Stunden Sammelurin bestimmt, wenn noch eine Diurese vorhanden war. Bei den Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ohne Nierenersatztherapie und der gesunden Kontrollgruppe wurde die GFR mittels vereinfachter MDRD Formel berechnet: $GFR = 175 \times \text{standardisiertes Serum Kreatinin in mg/dl}^{-1.154} \times \text{Alter}^{-0.203} \times 1.212 \text{ (wenn schwarz)} \times 0.742 \text{ (wenn weiblich)}$.

Für den Vergleich der PTX3-Plasmaspiegel vor und nach Dialyse, wurde bei 22 anderen, als den oben beschriebenen, ambulanten Hämodialysepatienten Blut abgenommen. Die Abnahme erfolgte vor der Dialyse aus der arteriellen Punktionsnadel und 3 Stunden nach Beginn der Dialyse aus dem arteriellen Entnahmeport. Genaue demographische Angaben zu diesen Patienten liegen nicht vor, jedoch wurden auch von diesen Patienten die oben genannten Kriterien erfüllt.

Zur Beobachtung der längerfristigen Kinetiken der PTX3-Spiegel nach Hämodialysebehandlung entnahmen wir Proben bei 11 stationären Hämodialysepatienten vor und direkt nach der Dialyse, sowie 24 und 48 Stunden nach Hämodialyse. Die Entnahme erfolgte bei stationären Patienten, um die Entnahmezeitpunkte nach 24 und 48 Stunden zu erleichtern.

Von diesen 11 stationären Hämodialysepatienten wurde auch das Blut für die Messungen der PTX3-Produktion im Vollblut nach in vitro Stimulation abgenommen. Da bei diesen Patienten lediglich gepaarte Vergleiche vor, während und nach Dialyse vorgenommen wurden, diente jeder Patient als die eigene Kontrolle. Daher wurde in dieser Population auf die Erhebung von demographischen Faktoren verzichtet.

3.2 Chemikalien, Labormaterialien, Geräte und Lösungen

Eine genaue Auflistung der verwendeten Chemikalien, Labormaterialien, Geräte und Lösungen findet sich im methodischen Anhang.

3.3 Durchführung eines PTX3 – ELISA:

Die PTX3 Konzentrationen wurden mittels ELISA-KIT von Alexis Biochemicals bestimmt.

Zuerst wird der 1. Antikörper gegen PTX3 auf einer Mikrotiterplatte (96 Well-Platte) immobilisiert. Dazu wird dieser zuerst 1:1000 mit Coating-Puffer verdünnt und dann in jedes Well 50 µl der Lösung pipettiert. Die Inkubationszeit beträgt einen bis drei Tage bei einer Temperatur von 4°C.

Danach wird die Platte ausgeschüttet, ausgeklopft und mit Waschpuffer dreimal gewaschen (Aspirieren des Überstandes und erneutes Auffüllen). Anschließend wird sie erneut auf Zellstoff ausgeklopft.

Die nicht von dem spezifischem ersten Antikörper bedeckten Oberflächen der Vertiefungen werden durch Zugabe von 300 µl/Well einer 5%-igen Trockenmilchpulver-Lösung geblockt. Die Inkubation erfolgt eine Stunde bei Raumtemperatur.

Nach dem Blocken wird die Platte erneut ausgeschüttet, ausgeklopft und mit Waschpuffer dreimal gewaschen.

Jetzt können Standard und Proben aufgetragen werden. Von den Proben wurden jeweils 50 µl in die Näpfe der Reihen 3 bis 12 pipettiert. Für die Verdünnungsreihe wurde der Standardstock mit Waschpuffer auf 5 ng/ml verdünnt und davon 100µl in die Näpfe A1 und A2 pipettiert. In 6 Verdünnungsschritten mit jeweils 50 µl der vorigen Verdünnung und 50 µl Waschpuffer wurde eine Verdünnungsreihe in doppelter Ausführung erstellt. Das letzte Well der Reihen 1 und 2 ist der Leerwert und enthält daher nur Waschpuffer. Anschließend wird die Platte bei 37°C für eine Stunde inkubiert.

Die Platte wird nun fünfmal, wie vorgeschrieben, gewaschen.

Im nächsten Schritt wird ein weiterer, gegen PTX3 gerichteter Antikörper hinzugegeben, der mit einem Enzym gekoppelt ist. Dieser zweite Antikörper wird 1:10 000 in Waschpuffer verdünnt. Pro Well werden wieder 50 µl aufgetragen. Die Inkubationszeit bei 37°C beträgt ebenfalls eine Stunde.

Die Platte wird erneut fünfmal, wie vorgeschrieben, gewaschen.

Durch Zugabe eines Substrates wird eine Enzymreaktion in Gang gesetzt, die das farblose Substrat in ein farbiges Produkt überführt. Hierzu wird nun ein Streptavidin-Peroxidase-Komplex (POD) aufgetragen. Dieser Komplex wird ebenfalls mit Waschpuffer 1:200 verdünnt. In jedes Well werden 50 µl der Lösung pipettiert. Die Inkubationszeit bei Raumtemperatur beträgt 45 Minuten. Die Platte muss in dieser Zeit im Dunkeln stehen.

Die Platte wird erneut fünfmal, wie vorgeschrieben gewaschen.

Nun erfolgt die Detektion mittels Farbreaktion. Dazu wird TMB mit Gallatipuffer 1:100 verdünnt und 150 µl in jedes Well gegeben. Die blaue Farbreaktion des Substrats wird durch Zugabe von 50 µl Schwefelsäure pro Napf gestoppt.

Die entsprechenden Produkte werden kolorimetrisch bestimmt. Die Extinktion der entstehenden

Farblösung ist proportional zur Konzentration des Proteins in der Probe und damit ein Mittel zur quantitativen Proteinbestimmung einer Probe.

Die Messung der optischen Dichte erfolgt bei einer Wellenlänge von 450 nm mit einer Referenzwellenlänge von 630 nm.

Antikörper PTX3 für ELISA

1. Antikörper PTX3

2. Antikörper PTX3

Alexis Biochemicals

MAb to PTX3 human, MNB4 (ALX-804-464)

Pab to PTX3 biotin (ALX-210-365B)

PTX3-Standards

PTX3

PTX

PTX3 human recombinant (ALX-201-124)

Recombinant Human Pentraxin 3/TSG-14 R&D
Systems

3.4 Durchführung eines Interleukin 6 - ELISA

Die IL-6 Konzentrationen wurden mittels hochsensitiven ELISA (R&D Systems) bestimmt. Die benötigten Chemikalien sind im Kit enthalten.

Der 1. Antikörper wird 1:180 mit PBS verdünnt und dann eine 96-Well Mikrotiterplatte mit 100µl pro Well gecoatet. Die Platte wird mit Parafilm versiegelt und inkubiert bei Raumtemperatur über Nacht.

Danach wird die Platte ausgeklopft und mit 400 µl des mitgelieferten Waschpuffers (0,05% Tween 20 in PBS, pH 7,2-7,4) gewaschen. Der Vorgang wird zweimal wiederholt, insgesamt also 3 Waschgänge.

Die Platte wird durch Zugabe von 300 µl Reagenzlösung (1% BSA in PBS, pH 7,2-7,4) in jedes well geblockt. Die Platte muß mindestens 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubieren.

Die Platte wird erneut ausgeklopft und dreimal mit Waschpuffer gewaschen.

Nun werden Standard und Proben aufgetragen. Für die Verdünnungsreihe wird der Standardstock mit Reagenzlösung auf 600 pg/ml verdünnt und davon 100µl in die Näpfe A1 und A2 pipettiert. In 6 Verdünnungsschritten wird mit jeweils 50 µl der vorherigen Verdünnung und 50 µl Reagenzlösung eine Verdünnungsreihe in doppelter Ausführung erstellt. Das letzte Well der Reihen 1 und 2 ist der Leerwert und enthält daher nur Reagenzlösung. Von den Proben werden jeweils 100µl in die Wells pipettiert. Anschließend wird die Platte für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Platte wird erneut ausgeklopft und dreimal mit Waschpuffer gewaschen.

Danach werden 100 µl des 2. Antikörpers, der mit Reagenzlösung 1:180 verdünnt ist, in jedes

Well pipettiert und die Platte für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.
 Die Platte wird erneut ausgeklopft und dreimal mit Waschpuffer gewaschen.
 Jetzt werden 100µl des mitgelieferten Streptavidinkomplexes in jedes Well pipettiert und die Platte für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert.
 Die Platte wird erneut ausgeklopft und dreimal mit Waschpuffer gewaschen.
 In jedes well werden 100 µl TMB-Lösung pipettiert und die Platte für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert.
 Die Farbreaktion wird mit 50 µl 2 N Schwefelsäure pro well gestoppt.
 Die Messung der optischen Dichte erfolgt bei einer Wellenlänge von 450 nm mit einer Referenzwellenlänge von 570 nm.

Antikörper Interleukin 6 für ELISA	R&D Systems, Minneapolis, USA
1. Antikörper Interleukin 6	Recombinant human IL-6, monoclonal, rh IL-6
2. Antikörper Interleukin 6	anti-r IL-6, Detektion Antibody, BAF 206
Standard	Recombinant human R&D Systems

3.5 Bestimmung von CRP

Die CRP Konzentrationen der Proben wurden vom laborchemischen Institut des Virchow-Klinikums mittels Immunoturbidimetrie (Modular Analytics ROCHE) bestimmt. Es handelt sich dabei um einen Latex-Agglutination-Assay. Latexpartikel, die mit spezifischen Antikörpern beschichtet sind, agglutinieren dabei mit CRP. Die entstehende Agglutination ist proportional zur CRP Konzentration und wird immunturbidimetrisch gemessen.

3.6 In vitro Zellstimulation

Um eine Aussage zur möglichen Induktion der PTX3 Produktion durch die Hämodialyse treffen zu können, wählten wir als leicht anzuwendendes Verfahren die in vitro Zellstimulation. Dabei wird die Zytokinsekretion mit Hilfe verschiedener Stimulantien (Mitogene) induziert. Da die Konzentration spontan freigesetzter Zytokine im peripheren Blut oft sehr gering ist und unter der Nachweisgrenze der Bestimmungsmethoden liegen kann, ermöglicht der Einsatz von Mitogenen (Lipopolysaccharid, Lektine) so einen Zytokinnachweis. Eine Induktion der PTX3 Produktion durch Lipopolysaccharid (LPS) ist mehrfach beschrieben worden [94, 109].

Für unsere Versuche entwarfen wir folgendes Protokoll:

- aus einer peripheren Vene Blut mit einer heparinisierten Spritze abnehmen
- auf eine 24 Napfplatte je Napf 1 ml heparinisiertes Blut vorlegen
- bei 12 Nöpfen Zugabe von 1 ml RPMI-Medium
- bei 12 Nöpfen Zugabe von 900 µl RPMI-Medium und 100µl Mitogenlösung (Endkonzentra-

tion des LPS 100ng/ml)

- Inkubation bei 37°C, 5% CO² und 95% Luftfeuchtigkeit für 0,8,24,48,72,96 oder 120 Stunden
- Nach der jeweiligen Inkubationszeit dem Napf EDTA in einer Endkonzentration von 1,6 mg/ml hinzufügen, Inhalt mischen und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführen
- Zentrifugation für 5 Minuten bei 4000 Umdrehungen pro Minute
- zellfreien Überstand abpipettieren und in Eppendorf-Reaktionsgefäß überführen; bei -20°C bis zur PTX3-Messung lagern

Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer Zellkulturbank mit Laminarströmung durchgeführt. Vorversuche zeigten, dass EDTA zum Nachweis von PTX3 vor der Zentrifugation zugegeben werden muss, da ansonsten kein PTX3 nachweisbar war.

Initial wurde ein Versuch bei gesunden Probanden mit dem oben dargestellten Protokoll durchgeführt.

Zur Untersuchung der PTX3 Spiegel bei Hämodialysepatienten vor und nach Dialyse änderten wir das Protokoll nur in Bezug auf die Inkubationsdauer, so dass alle Proben für 96 Stunden inkubiert wurden.

3.7 Statistik

Zur statistischen Auswertung wurden die Computerprogramme Instat und Graphpad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA) verwendet.

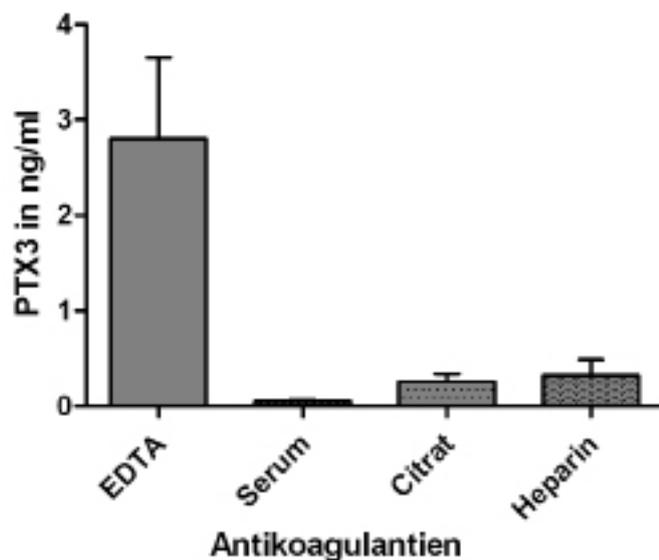
Beim Vergleich der HD, CAPD und CKD Patienten wurden beim Vergleich von zwei Gruppen der Mann-Whitney-Test und bei mehr als zwei Gruppen der Kruskal-Wallis-Test mit Post-Hoc Korrektur durch Dunnett's C Test angewendet. Ein P-Wert <0,05 bedeutet hierbei eine statistische Signifikanz. Bivariate Korrelationen wurden mit dem Spearman Korrelations Faktor geprüft. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte ± SEM (Standard error of the mean) und graphisch als Boxplot Diagramm mit Median dargestellt.

Beim Vergleich der Plasmaspiegel vor und nach Hämodialyse, bei der Untersuchung zur Kinetik, sowie beim Vergleich der Plasmaspiegel nach in vitro Zellstimulation, wurde zur Prüfung auf Unterschiede zwischen zwei Gruppen ein Student's T-Test angewandt. Bei mehr als zwei Gruppen wurde eine einfache Varianzanalyse (ANOVA) mit Post-Hoc Korrektur durch den Bonferroni Test durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte ± SEM (Standard error of the mean) oder graphisch als Boxplot Diagramm mit Median dargestellt.

4. Ergebnisse

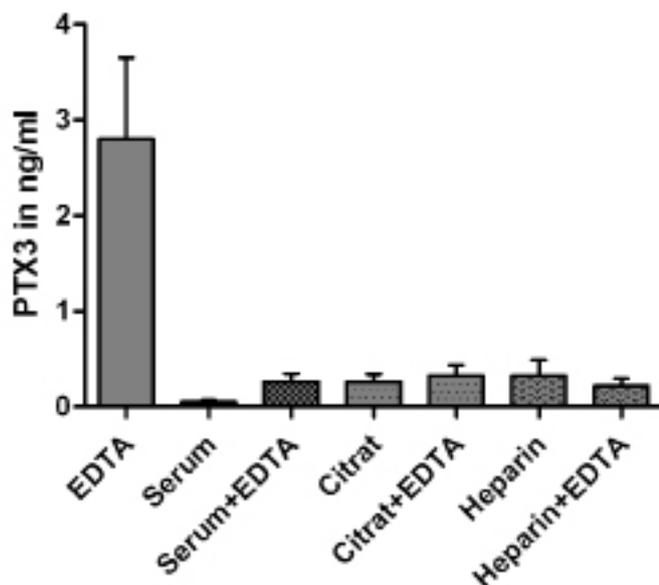
4.1 PTX3 Messungen mit verschiedenen Antikoagulantien

Für die erste Messung von PTX3 Plasmaspiegeln bei Hämodialysepatienten wurde bei 8 stationären Hämodialysepatienten eine PTX3-Bestimmung im EDTA-, Citrat- und Heparinplasma, sowie im Serum durchgeführt. Wie in Abb. 8 dargestellt, zeigten sich große Unterschiede in den PTX3 Konzentrationen, je nachdem welches Antikoagulans verwendet wurde. Die Messwerte im EDTA-Plasma ($2,8 \pm 0,8 \text{ ng/ml}$) waren höher, als bei Serum- ($0,04 \pm 0,02 \text{ ng/ml}$), Citrat- ($0,2 \pm 0,08 \text{ ng/ml}$) und Heparinplasma ($0,32 \pm 0,16 \text{ ng/ml}$).



► **Abb. 8:** PTX3-Bestimmung bei 8 stationären HD-Patienten im EDTA-, Citrat- und Heparinplasma, sowie im Serum. EDTA ($2,8 \pm 0,8 \text{ ng/ml}$), Serum ($0,04 \pm 0,02 \text{ ng/ml}$), Citrat ($0,2 \pm 0,08 \text{ ng/ml}$) und Heparin ($0,32 \pm 0,16 \text{ ng/ml}$)

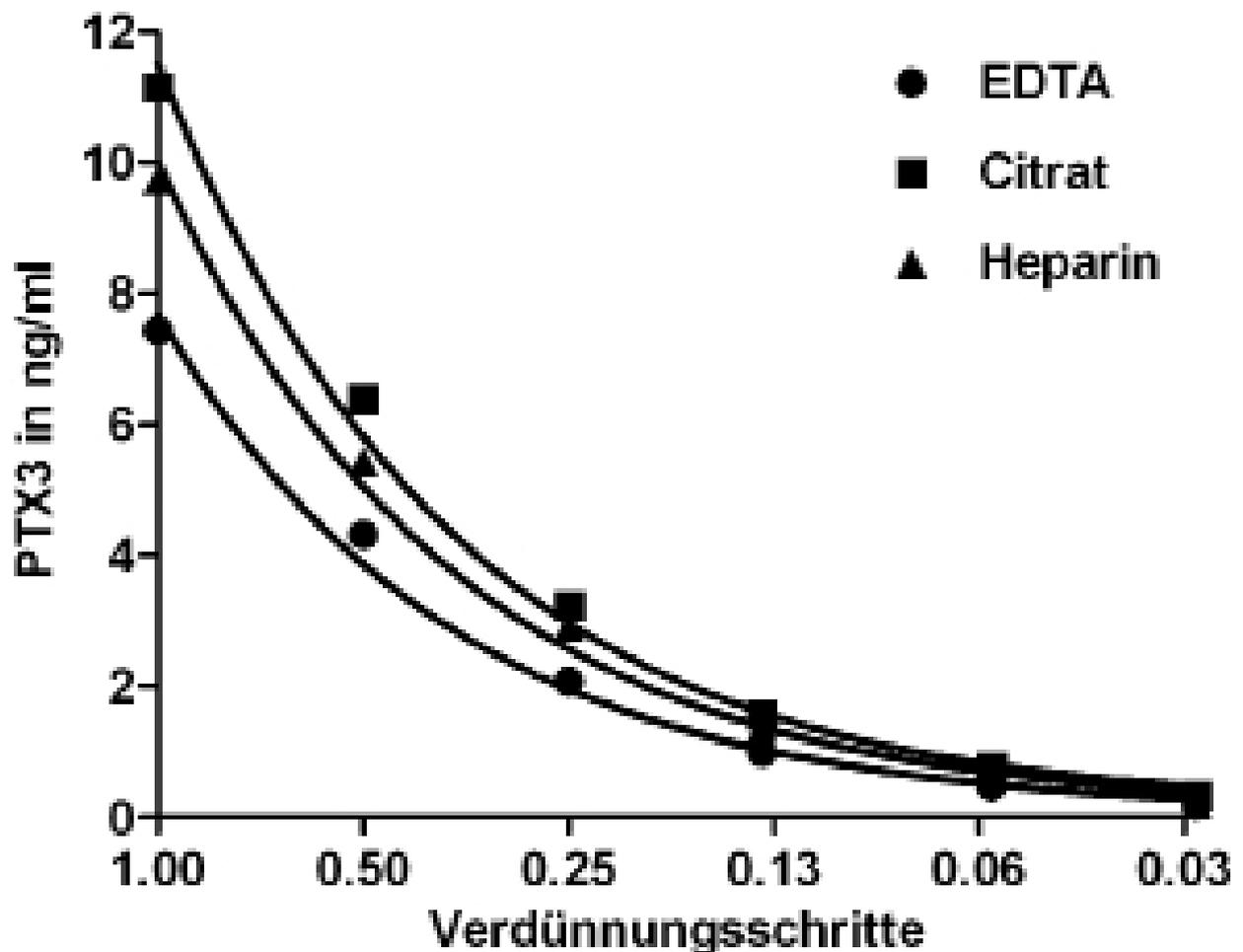
Abb. 9 zeigt, dass auch ein nachträgliches Hinzufügen von EDTA in einer Konzentration von $1,6 \text{ mg/ml}$ zu allen Plasmaproben die Relationen der Messergebnisse nicht veränderte.



► **Abb. 9:** Nachträgliches Hinzufügen von EDTA ($1,6 \text{ mg/ml}$) zu den gewonnenen Plasmaproben

4.2 PTX3 Standardkurve mit Zugabe verschiedener Antikoagulantien

Um eine Reaktion von Antikoagulantien mit den ELISA-Antikörpern oder mit PTX3 auszuschließen, prüften wir, ob nach Zugabe verschiedener Antikoagulantien zu einem PTX3-Standard noch eine verlässliche Standardkurve erstellt werden kann. Dazu wurde einer Verdünnungsreihe eines PTX3-Standard (10ng/ml) EDTA, Citrat oder Heparin in einer Konzentration zugesetzt, die der Endkonzentration der jeweiligen Blutröhrchen entsprach. Aus Abb. 10 ist ersichtlich, dass die verschiedenen Antikoagulantien die PTX3-Standardkurve nicht oder kaum beeinflussen.



▲ Abb. 10 PTX3-Standardkurve mit verschiedenen Antikoagulantien

4.3 PTX3-, CRP- und IL-6-Plasmaspiegel bei Dialysepatienten und Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz

Bei einem Patientenkollektiv, bestehend aus 44 chronischen Hämodialysepatienten, 35 Peritonealdialysepatienten, 39 Patienten mit nichtdialysepflichtiger Niereninsuffizienz und 14 altersgematchten Normalpersonen wurden EDTA-Plasma Proben zur Bestimmung ihrer PTX3-, CRP- und IL-6-Plasmaspiegel gewonnen.

Tab.1 zeigt die demographischen Parameter.

	HD	PD	CNI	Kontrollen
N	44	35	39	14
Alter in Jahren	59,8 ±2,2	55,6 ±2,3	60,4 ±2,2	60,3 ±1,1
Männlich	55%	54%	33%	43%
Weiblich	46%	46%	67%	57%
GFR (ml/min)	1,0 ±0,2	4,3 ±0,7	27 ±3,3	88 ±6,0
BMI	25 ±0,9	24,8 ±0,7	25,5 ±0,7	n.v.
Dialysedauer (Monate)	69 ±10	34 ±5	n.v.	n.v.
Diabetes mellitus	25%	42%	28%	n.v.
Nikotinabusus	29%	25%	18%	n.v.
KHK	56%	42%	30%	n.v.
pAVK	34%	34%	23%	n.v.
Glomerulonephritis	34%	20%	33%	n.v.
diabetische Nephropathie	14%	20%	13%	n.v.
vaskuläre Nephropathie	25%	26%	21%	n.v.
hereditär/kongenitale Nephropathie	7%	9%	15%	n.v.
Zystennieren	7%	17%	3%	n.v.
sonstige Nephropathie	14%	9%	16%	n.v.

◀ Tab.1

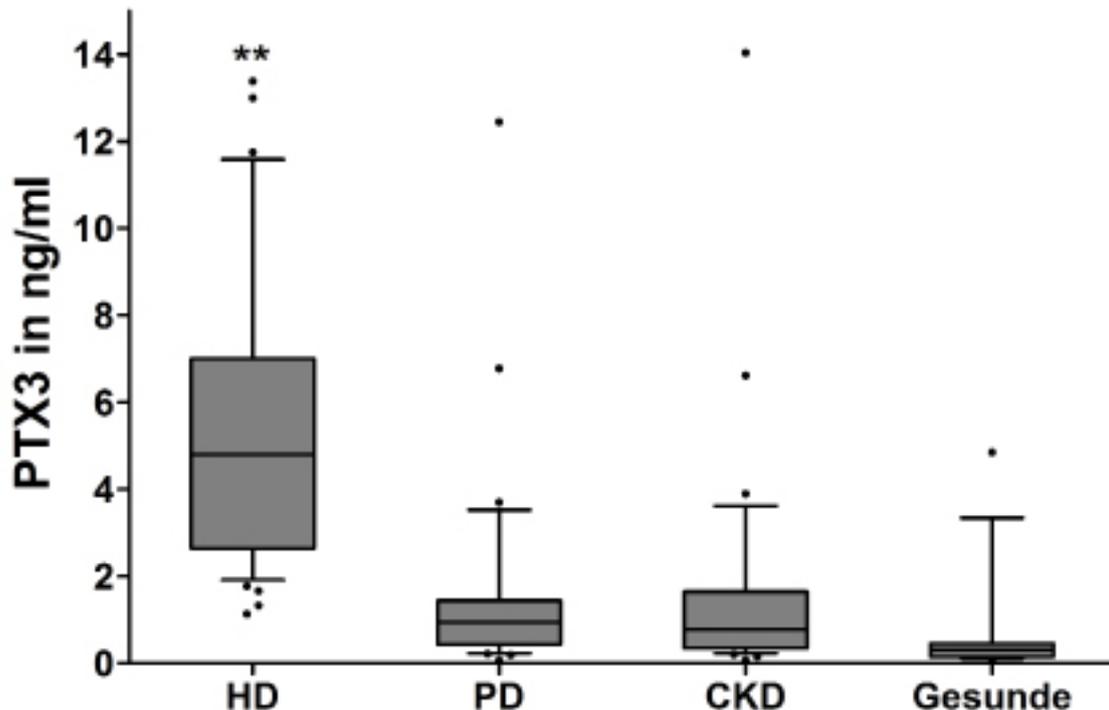
Die Patienten waren in Bezug auf Alter, Geschlecht, Body Mass Index (BMI) und das Vorhandensein von Begleiterkrankungen wie KHK, Diabetes mellitus und pAVK vergleichbar.

Die häufigste Ursache für die Niereninsuffizienz waren Glomerulonephritiden, gefolgt von vaskulärer und diabetischer Nephropathie. Eine hereditär/kongenitale Nephropathie und Zystennieren waren seltener. Andere Ursachen wie Autoimmunerkrankungen (Systemischer Lupus erythematodes, Alport-Syndrom, Goodpasture-Syndrom), chronische Pyelonephritiden, Refluxnephropathie und Medikamentenabusus (Analgetika, Diuretika und Laxantien) sind in der Tabelle 1 unter sonstigen Nephropathien zusammengefasst.

Die Restnierenfunktion (GFR) war bei Patienten ohne Nierenersatztherapie und in der gesunden Kontrollgruppe signifikant ($p < 0,05$) höher als bei den Hämodialyse- und Peritonealdialysepatienten.

Bei den Hämodialysepatienten bestand bereits signifikant ($p < 0,01$) länger eine Nierenersatztherapie (69 ± 10 Monate), als bei Peritonealdialysepatienten (34 ± 5 Monate).

Die PTX3-Plasmaspiegel der Hämodialysepatienten waren signifikant ($p < 0,01$) höher ($5,8 \pm 0,6$ ng/ml) als bei Peritonealdialysepatienten, chronisch niereninsuffizienten Patienten und Gesunden (Abb. 11). Es bestanden keine signifikanten Unterschiede der PTX3-Plasmaspiegel zwischen Peritonealdialysepatienten ($1,5 \pm 0,4$ ng/ml), Patienten mit Niereninsuffizienz ($1,5$

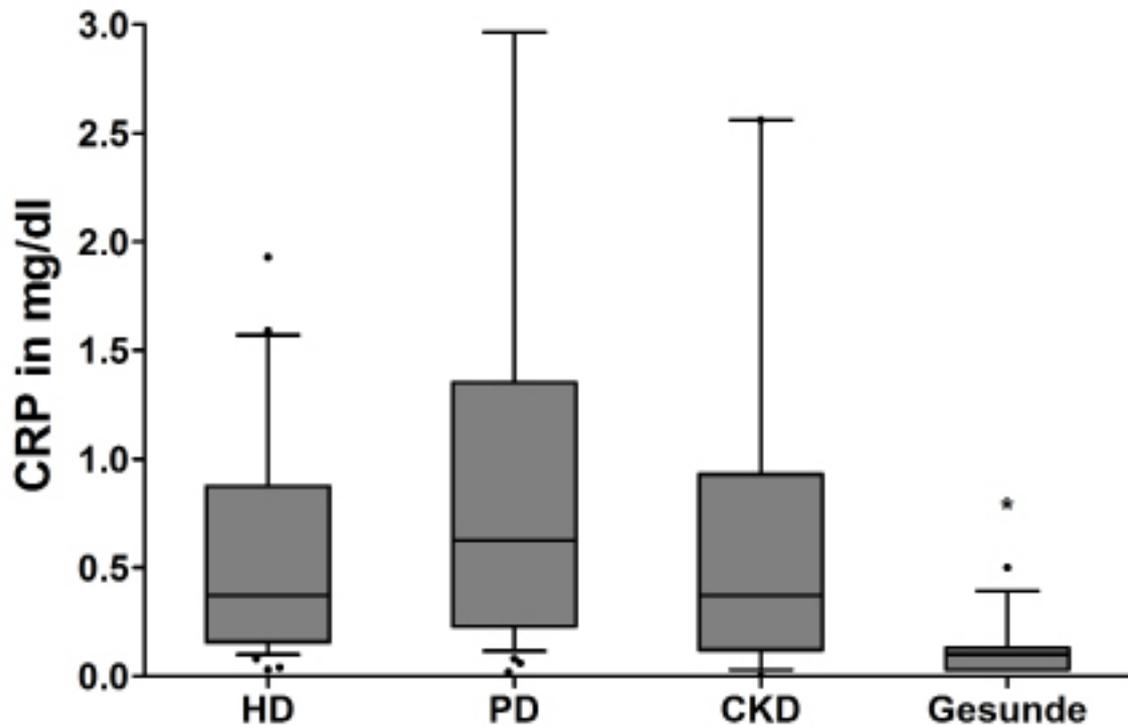


▲ **Abb. 11** PTX3-Plasmaspiegel wurden bei 44 chronischen Hämodialysepatienten (HD), 35 Peritonealdialysepatienten (PD), 39 Patienten mit nicht-dialysepflichtiger Niereninsuffizienz (CKD) und 14 altersgematchten Normalpersonen aus EDTA Blut bestimmt. Das Diagramm zeigt Box-Plots mit Median. PTX3-Plasmaspiegel sind bei den ambulanten HD-Patienten signifikant ** ($p < 0,01$) höher ($5,8 \pm 0,6$ ng/ml) als bei Peritonealdialysepatienten, chronisch Niereninsuffizienten und Gesunden

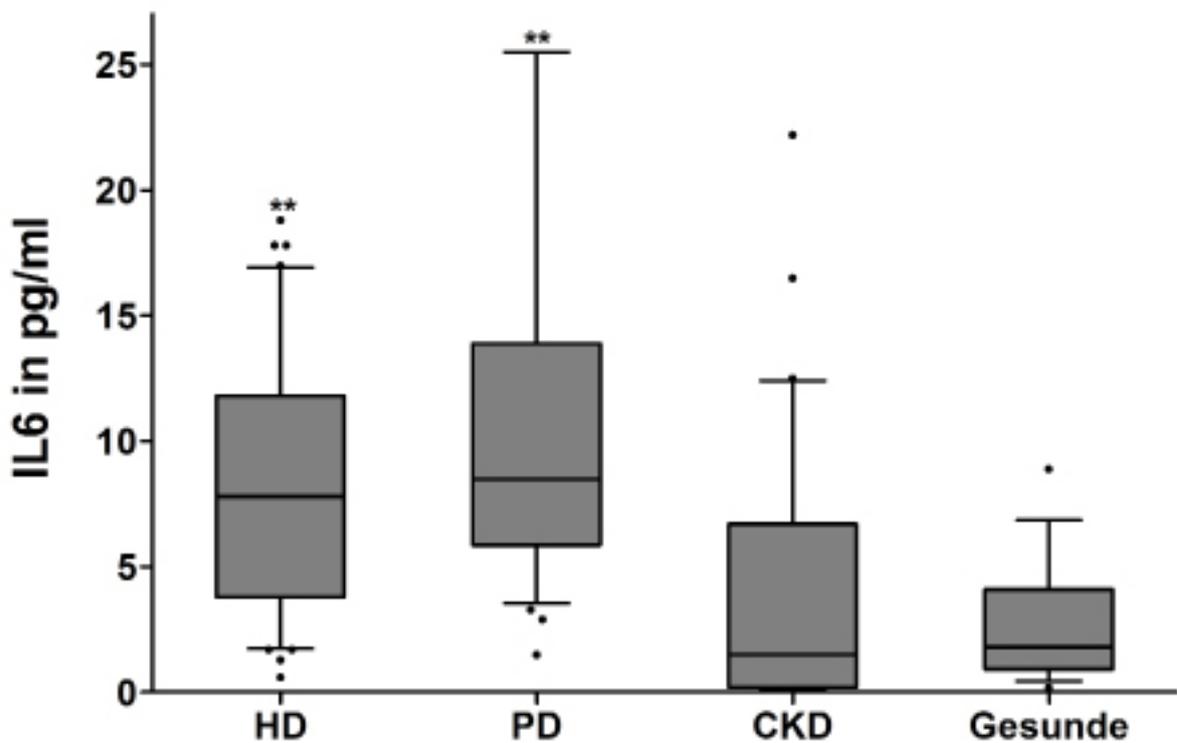
$\pm 0,4$ ng/ml) und Gesunden ($0,71 \pm 0,3$ ng/ml) (Tab. 2).

Wie in Abb. 12 dargestellt, waren im Gegensatz dazu die CRP-Spiegel aller drei Gruppen mit Niereninsuffizienz erhöht (HD: $0,8 \pm 0,2$ mg/dl; PD: $1,1 \pm 0,2$ mg/dl; CKD $0,9 \pm 0,2$ mg/dl) und nur verglichen mit der gesunden Kontrollgruppe ($0,12 \pm 0,03$ mg/dl) signifikant ($p < 0,05$) unterschiedlich (Tab. 3).

Aus Abb. 13 ist ersichtlich, dass die Interleukin-6-Werte bei den Peritonealdialysepatienten am höchsten waren ($10,8 \pm 1,3$ pg/ml), gefolgt von denen der Hämodialysepatienten ($8,2 \pm 0,8$ pg/ml), chronisch niereninsuffizienten Patienten ($4 \pm 0,8$ pg/ml) und Gesunden ($2,7 \pm 0,6$ pg/ml). Die Werte der Patienten unter Nierenersatztherapie (HD und CAPD) waren signifikant höher ($p < 0,01$) als die der beiden anderen Gruppen (Tab. 4).



▲ **Abb. 12** Die CRP-Spiegel aller drei Gruppen mit Niereninsuffizienz sind erhöht (HD: $0,8 \pm 0,2$ mg/dl; PD: $1,1 \pm 0,2$ mg/dl; CKD: $0,9 \pm 0,2$ mg/dl) und verglichen mit der gesunden Kontrollgruppe ($0,12 \pm 0,03$ mg/dl) signifikant ($p < 0,05$) unterschiedlich



▲ **Abb. 13** IL-6-Spiegel der Patienten unter Nierenersatztherapie (HD und PD) sind signifikant ** ($p < 0,01$) höher als bei CKD-Patienten

	PTX3 in ng/ml			
Patientengruppe	HD	CAPD	CKD	Gesunde
Mittelwert	5,84	1,59	1,55	0,71
Median	4,81	0,94	0,78	0,32
Min-Max	1,13 - 24,5	0,06 - 12,45	0,07 - 14,04	0,08 - 4,85
Standardabweichung	4,31	2,34	2,48	1,27
Standardfehler	0,65	0,40	0,41	0,34

Dunn`s Test	Rangsummendifferenz	P < 0,05?	Summary
HD vs PD	49,08	ja	***
HD vs CNI	50,77	ja	***
HD vs Gesunde	73,51	ja	***
PD vs CNI	1,694	nein	n.s.
PD vs Gesunde	24,43	nein	n.s.
CNI vs Gesunde	22,74	nein	n.s.

◀ **Tab.2**
 Statistische Auswertung mit Kruskal-Wallis-Test und Post-Hoc Korrektur durch Dunnett. Ein * bedeutet Signifikanz (P < 0,05)

	CRP in mg/dl			
Patientengruppe	HD	CAPD	CKD	Gesunde
Mittelwert	0,81	1,06	0,93	0,12
Median	0,37	0,63	0,37	0,10
Min-Max	0,03 - 6,74	0,02 - 5,8	0 - 6,54	0,03 - 0,5
Standardabweichung	1,37	1,29	1,54	0,13
Standardfehler	0,21	0,22	0,25	0,04

Dunn`s Test	Rangsummendifferenz	P < 0,05?	Summary
HD vs PD	-10,73	nein	n.s.
HD vs CNI	2,703	nein	n.s.
HD vs Gesunde	43,13	ja	**
PD vs CNI	13,43	nein	n.s.
PD vs Gesunde	53,85	ja	***
CNI vs Gesunde	40,42	ja	**

◀ **Tab. 3**
 Statistische Auswertung mit Kruskal-Wallis-Test und Post-Hoc Korrektur durch Dunnett. Ein * bedeutet Signifikanz (P < 0,05)

	IL6 in pg/ml			
Patientengruppe	HD	CAPD	CKD	Gesunde
Mittelwert	8,18	10,84	4,02	2,68
Median	7,80	8,50	1,50	1,80
Min-Max	0,6 - 18,8	1,5 - 28	0 - 22,2	0,2 - 8,9
Standardabweichung	5,19	7,28	5,30	2,31
Standardfehler	0,79	1,25	0,86	0,62

Dunn`s Test	Rangsummendifferenz	P < 0,05?	Summary
HD vs PD	-10,26	nein	n.s.
HD vs CNI	34,56	ja	***
HD vs Gesunde	39	ja	**
PD vs CNI	44,83	ja	***
PD vs Gesunde	49,26	ja	***
CNI vs Gesunde	4,43	nein	n.s.

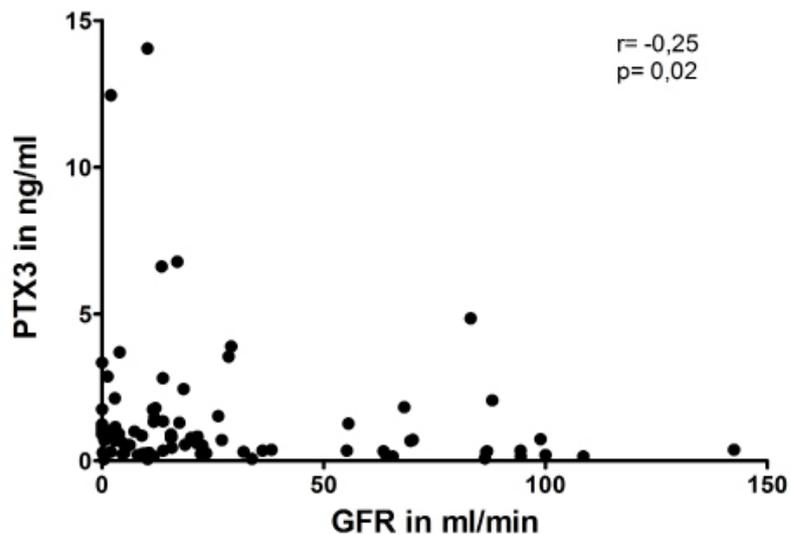
◀ **Tab.4**
 Statistische Auswertung mit Kruskal-Wallis-Test und Post-Hoc Korrektur durch Dunnett. Ein * bedeutet Signifikanz (P < 0,05)

4.3.1 Korrelation zwischen Restnierenfunktion und PTX3-, CRP- und IL-6-Plasmaspiegeln

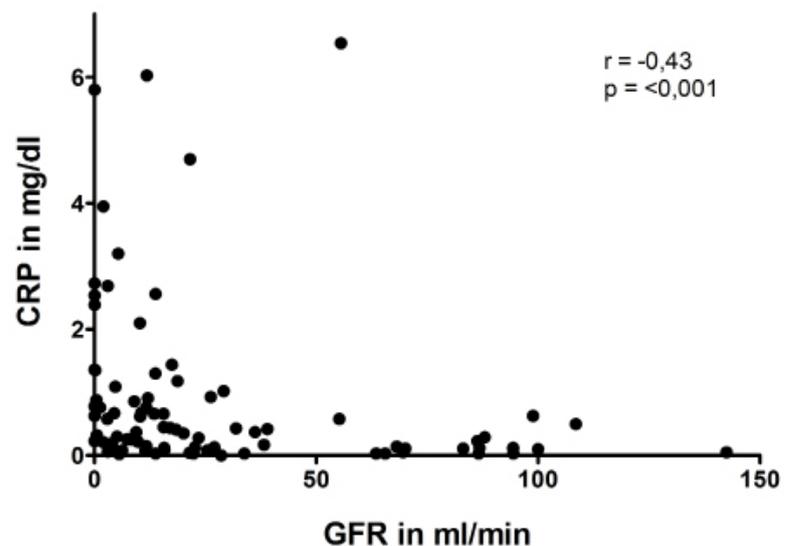
Bei den Peritonealdialysepatienten und den Patienten mit nicht dialysepflichtiger Niereninsuffizienz, sowie den 14 altersentsprechenden Gesunden des oben vorgestellten Patientenkollektivs, wurde das Verhältnis zwischen PTX3-Werten und Restnierenfunktion mittels Scatter-Plot bestimmt. Die glomeruläre Filtrationsrate wurde errechnet (CKD und Gesunde) oder gemessen (PD).

Zwischen erhöhten PTX3-Werten und Restnierenfunktion (GFR) zeigte sich eine signifikante negative Korrelation $r=-0,25$ und $p=0,02$. Zwischen CRP und der Restnierenfunktion zeigte sich eine signifikante negative Korrelation ($p<0,001$ und $r=-0,43$), genauso wie zwischen erhöhten IL-6 Werten und der GFR ($p<0,001$ und $r=-0,55$) (Abb.14-16).

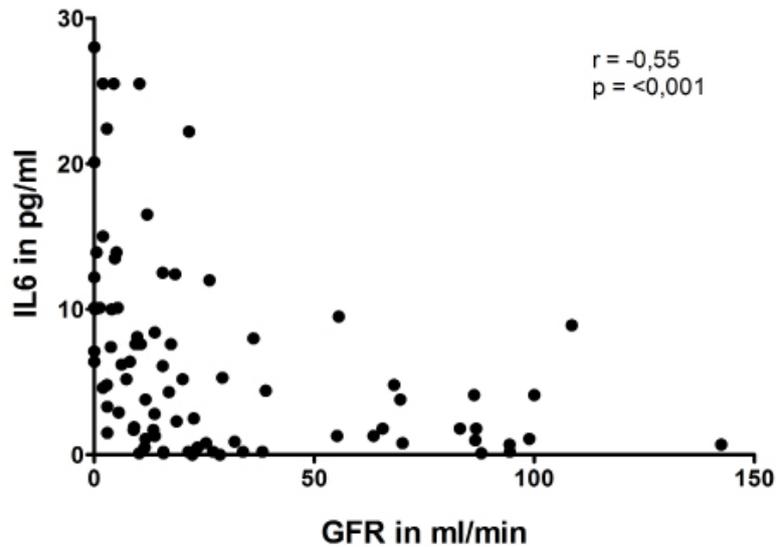
► **Abb. 14** PTX3-Werte in Korrelation zur Restnierenfunktion (GFR) bei 35 Peritonealdialysepatienten und 39 Patienten mit nicht-dialysepflichtiger Niereninsuffizienz und 14 altersentsprechenden Gesunden. Es zeigt sich eine signifikante Korrelation



► **Abb. 15** CRP-Werte in Korrelation zur Restnierenfunktion (GFR) bei 35 Peritonealdialysepatienten und 39 Patienten mit nicht-dialysepflichtiger Niereninsuffizienz und 14 altersentsprechenden Gesunden. Es zeigt sich eine signifikante Korrelation ($p<0,001$ und $r=-0,43$).

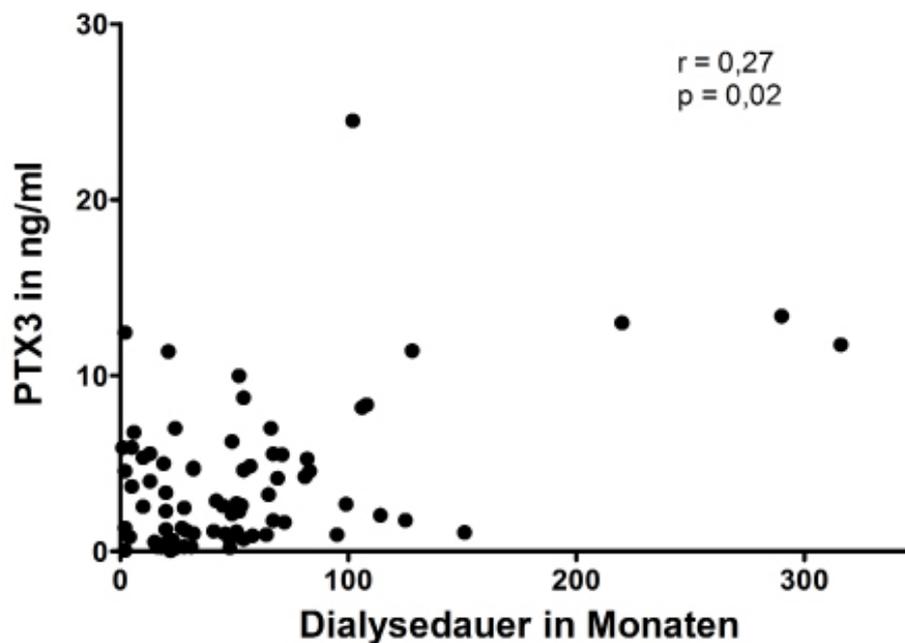


► **Abb. 16** IL-6-Werte in Korrelation zur Restnierenfunktion (GFR) bei 35 Peritonealdialysepatienten und 39 Patienten mit nicht-dialysepflichtiger Niereninsuffizienz und 14 altersentsprechenden Gesunden. Es zeigt sich eine signifikante Korrelation ($p < 0,001$ und $r = -0,55$)



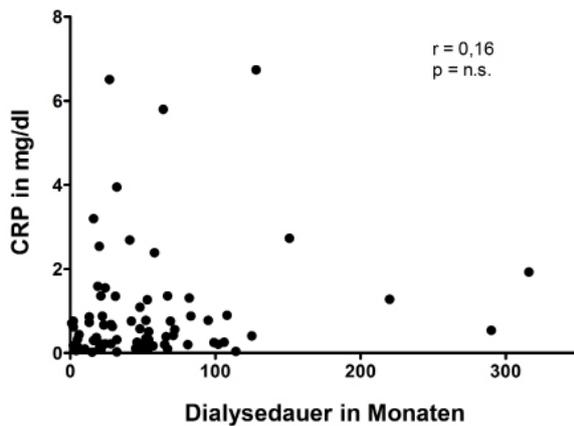
4.3.2 Korrelation zwischen Dialysedauer und PTX3-, CRP- und IL-6-Plasmaspiegeln

Bei den dialysepflichtigen Patienten (HD und PD) fanden wir eine signifikante Korrelation zwischen erhöhten PTX3 Spiegeln und Dialysedauer $r = 0,27$ $p < 0,02$ (Abb. 17).

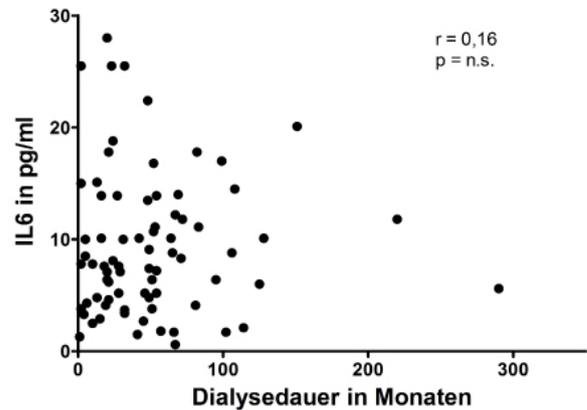


▲ **Abb. 17** Es besteht eine signifikant ($p < 0,02$ $r = 0,27$) positive Korrelation zwischen erhöhten PTX3-Werten und Dialysedauer in Monaten

Bei den CRP und IL-6 Spiegeln dieser Patienten zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen erhöhten Plasmaspiegeln und Dialysedauer (Abb.18-19).



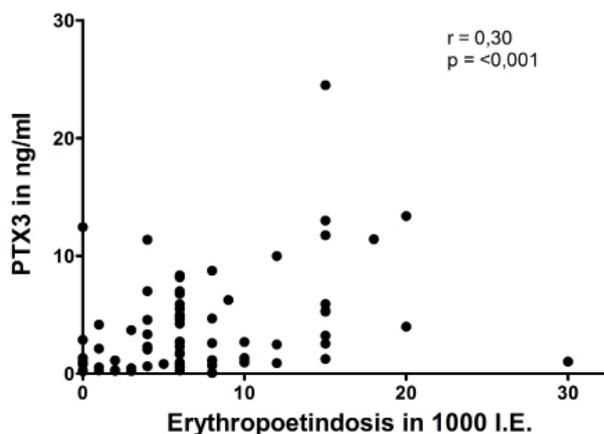
▲ **Abb.18** Es besteht keine signifikante Korrelation zwischen Dialysedauer und Höhe der CRP-Plasmaspiegel bei Dialysepatienten



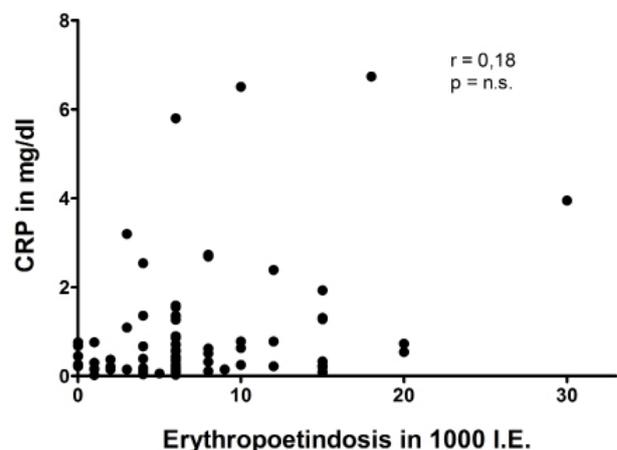
▲ **Abb.19** Es besteht keine signifikante Korrelation zwischen Dialysedauer und Höhe der IL-6-Plasmaspiegel bei Dialysepatienten

4.3.3 Korrelation zwischen Erythropoetindosis und PTX3-, CRP- und IL-6-Plasmaspiegeln

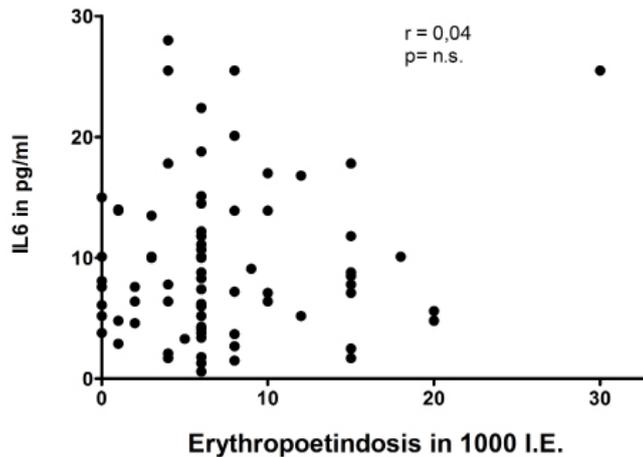
Bei den dialysepflichtigen Patienten (HD und CAPD) zeigte sich eine signifikant positive Korrelation zwischen erhöhten PTX3 Spiegeln und der Höhe der Erythropoetindosis ($p < 0,001$, $r = 0,30$). Erhöhte CRP Werte korrelierten nicht mit der Erythropoetindosis ($p = 0,10$ und $r = 0,18$), siehe auch Abb. 20 und 21, sowie Tabelle 3. Ebenfalls keine signifikante Korrelation bestand zwischen IL-6-Plasmaspiegeln und Erythropoetindosis (Abb. 22). Die übrigen Korrelationen zeigt Tabelle 5. Zwischen PTX3 und CRP bestand keine Korrelation ($r = 0,16$, $p = 0,07$), genauso wie zwischen PTX3 und IL-6 ($r = 0,16$, $p = 0,08$). Eine hochsignifikante Korrelation zeigte sich



▲ **Abb. 20** Es besteht eine signifikant positive Korrelation $p < 0,05$, $r = 0,22$ zwischen hohen PTX3-Plasmaspiegeln und Erythropoetindosis (44 ambulante Hämodialysepatienten und 35 Peritonealdialysepatienten)



▲ **Abb. 21** Es besteht keine Korrelation $p = 0,1$, $r = 0,18$ zwischen hohen CRP-Plasmaspiegeln und Erythropoetindosis (44 ambulante Hämodialysepatienten und 35 Peritonealdialysepatienten)



◀ **Abb. 22** Es besteht keine Korrelation zwischen IL-6-Plasmaspiegeln und Erythropoetindosis (44 ambulante Hämodialysepatienten und 35 Peritonealdialysepatienten)

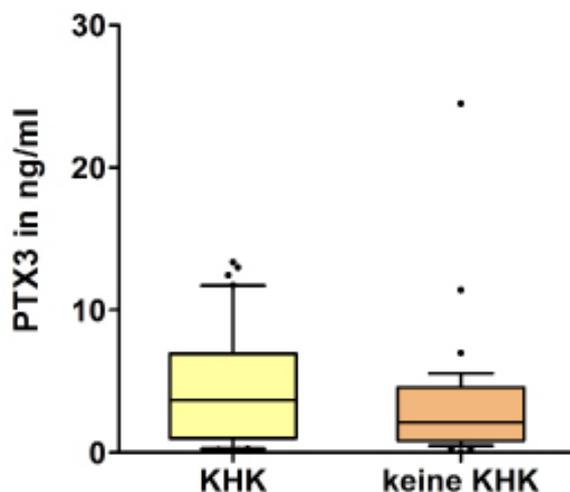
	PTX3	CRP	IL6
GFR	-0,25 (0,02)	-0,43 (<0,001)	-0,55 (<0,001)
Dialysedauer	0,27 (<0,02)	0,16 (n.s.)	0,16 (n.s.)
Erythropoetindosis	0,30 (0,001)	0,18 (n.s.)	0,04 (n.s.)
BMI	0,08 (n.s.)	0,14 (n.s.)	0,03 (n.s.)
Alter	0,08 (n.s.)	0,19 (0,03)	0,13 (n.s.)

◀ **Tab. 5** Übersicht über die Korrelationen, gezeigt sind r und p-Wert (Spearman)

jedoch zwischen IL-6 und CRP ($r=0,56$, $p<0,0001$). Bei Alter und BMI zeigte sich nur eine signifikante Korrelation zwischen hohen CRP-Plasmaspiegeln und Alter ($r=0,19$, $p=0,03$).

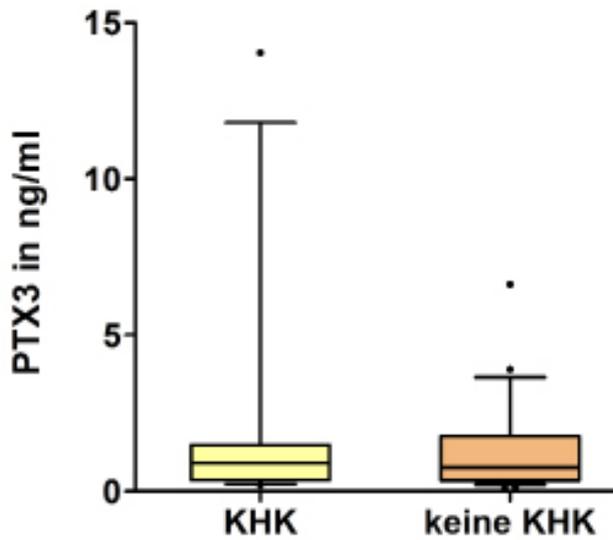
4.3.4 Assoziation von PTX3-, CRP- und IL-6-Plasmaspiegeln mit kardiovaskulären Erkrankungen

Bei dem oben genannten Patientenkollektiv wurden die Assoziationen zwischen Vorhandensein einer koronaren Herzerkrankung (KHK) und der Höhe der Plasmaspiegel von PTX3, CRP und IL-6 (IL-6) bestimmt. Als KHK galt eine mittels Herzkatheteruntersuchung nachgewiesene koronare Gefäßerkrankung.

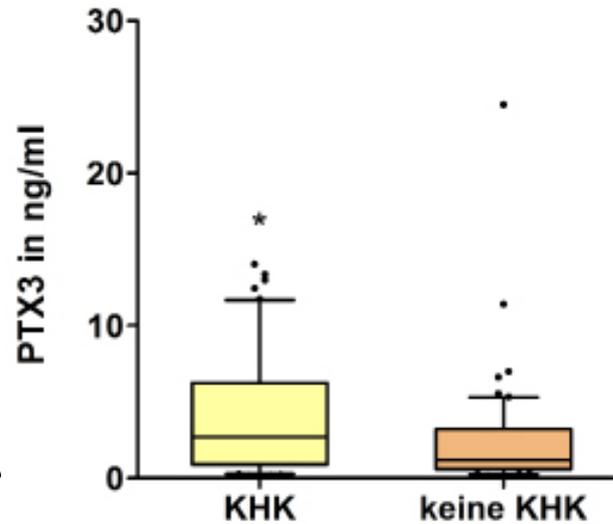


▲ **Abb. 23** PTX3-Plasmaspiegel in Abhängigkeit von der Prävalenz einer KHK bei HD und CAPD Patienten, $p=0,06$

Die Abb. 23 zeigt, dass dialysepflichtige Patienten (HD und CAPD) mit KHK im Durchschnitt höhere PTX3-Plasmaspiegel hatten, als Patienten ohne KHK, dieser Trend jedoch das Signifikanzniveau verfehlt ($p=0,06$). Die nicht dialysepflichtigen chronisch niereninsuffizienten Patienten (CKD) mit KHK hatten keine signifikant höheren PTX3 Werte ($p=0,82$) (Abb. 24). Fasst man die Werte beider Gruppen zusammen, um eine höhere Fallzahl zu erreichen, so zeigt sich eine signifikante ($p=0,025$) Assoziation zwischen hohen PTX3 Werten und Vorhandensein einer KHK (Abb. 25 und Tab. 6).



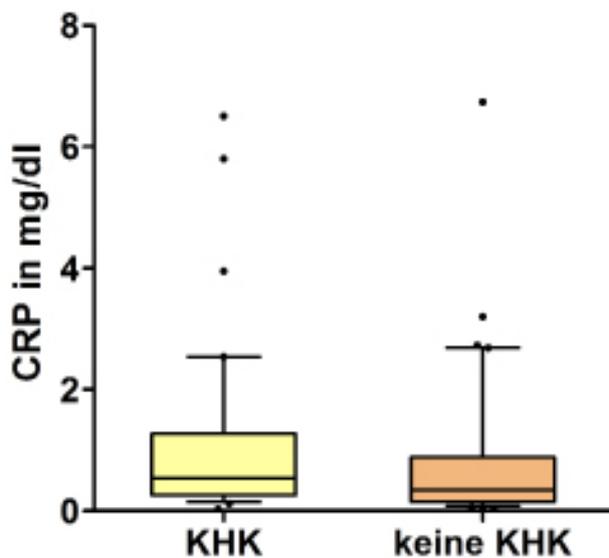
▲ **Abb. 24** PTX3-Plasmaspiegel in Abhängigkeit von der Prävalenz einer KHK bei CKD Patienten



▲ **Abb. 25** PTX3-Plasmaspiegel in Abhängigkeit von der Prävalenz einer KHK bei HD, CAPD und CKD Patienten, $p=0,025$

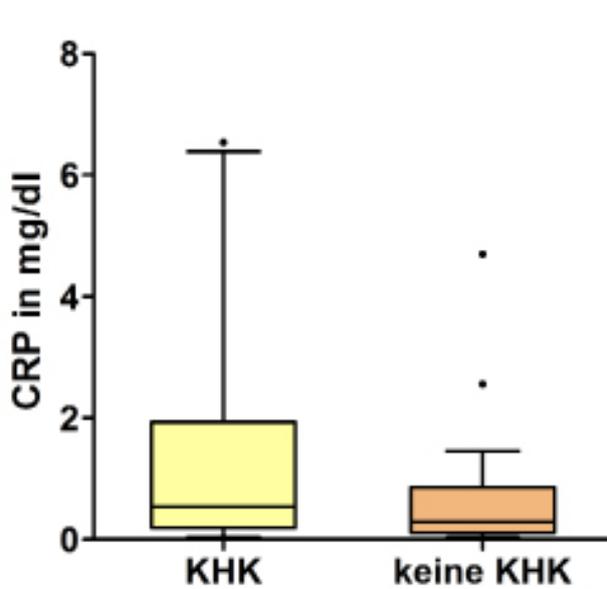
	HD, CAPD und CKD		HD und CAPD		CKD	
	PTX3 in ng/ml		PTX3 in ng/ml		PTX3 in ng/ml	
KHK	ja	nein	ja	nein	ja	nein
Mittelwert	4,09	2,42	4,62	3,18	2,15	1,29
Median	2,70	1,18	3,68	2,13	0,9	0,76
Min-Max	0,06 - 14,04	0,05 - 24,5	0,06 - 13,38	0,05 - 24,5	0,07 - 6,62	0,2 - 14,04
P-Wert	0,03		0,06		0,82	

▲ **Tab. 6** Statistische Auswertung: es besteht eine signifikante Assoziation zwischen PTX3 und KHK in der Gruppe mit HD, CAPD und CKD Patienten (Mann-Whitney-Test).

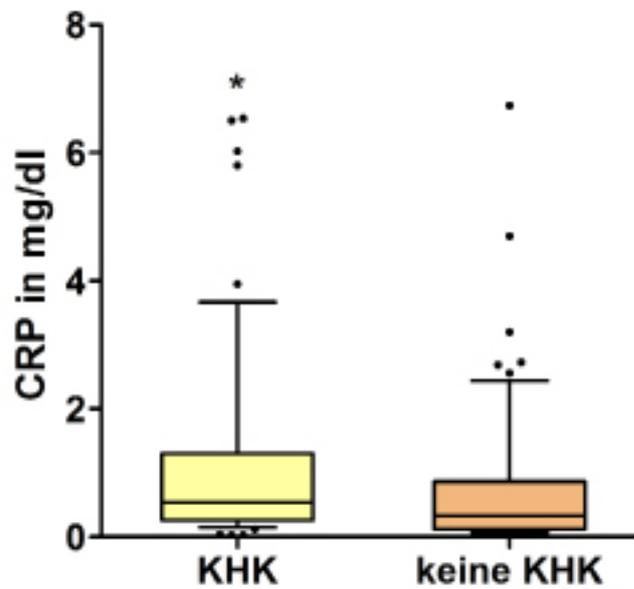


▲ **Abb. 26** CRP-Plasmaspiegel in Abhängigkeit von der Prävalenz einer KHK bei HD und CAPD Patienten

Bei den CRP-Plasmaspiegeln der dialysepflichtigen Patienten (Abb. 26) zeigte sich kein signifikanter ($p=0,09$) Unterschied zwischen Patienten mit und ohne KHK. Die CKD Patienten mit KHK hatten leicht höhere CRP Spiegel, ohne dass dieser Unterschied signifikant war ($p=0,17$) (Abb. 27). Nimmt man auch hier die Werte beider Gruppen zusammen, so zeigt sich eine signifikante ($p=0,023$) (Tab. 7) Assoziation zwischen hohen CRP Werten und dem Vorhandensein einer KHK (Abb. 28).



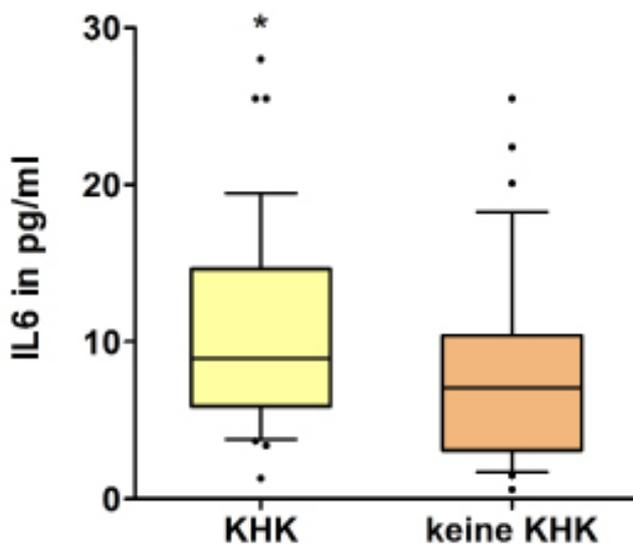
▲ **Abb. 27** CRP-Plasmaspiegel in Abhängigkeit von der Prävalenz einer KHK bei CKD Patienten



▲ **Abb. 28** CRP-Plasmaspiegel in Abhängigkeit von der Prävalenz einer KHK bei HD, PAPD und CKD Patienten

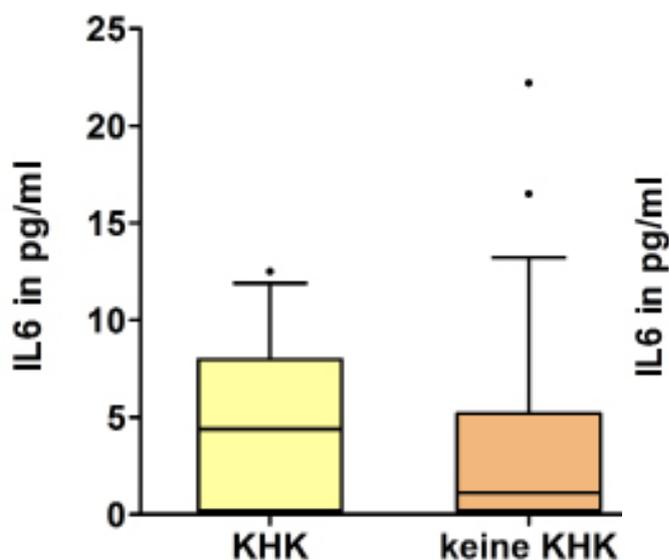
	HD, CAPD und CKD		HD und CAPD		CKD	
	CRP in mg/ml		CRP in mg/ml		CRP in mg/ml	
KHK	ja	nein	ja	nein	ja	nein
Mittelwert	1,17	0,75	1,04	0,83	1,61	0,63
Median	0,54	0,34	0,54	0,35	0,54	0,29
Min-Max	0,03 - 6,54	0,11 - 6,74	0,03 - 6,51	0,02 - 6,74	0,03 - 6,54	0,0 - 4,7
P-Wert	0,02		0,096 (n.s.)		0,170 (n.s.)	

▲ **Tab. 7** Statistische Auswertung: Es besteht eine signifikante Assoziation zwischen CRP und KHK in der Gruppe mit HD,CAPD und CKD Patienten (Mann-Whitney-Test)

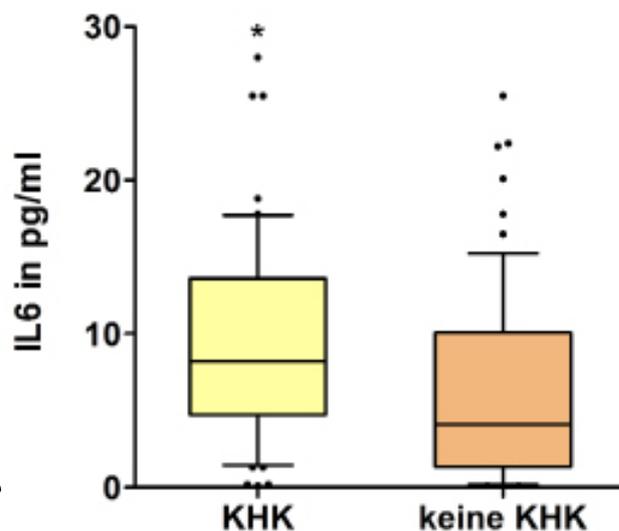


▲ **Abb. 29** IL-6-Plasmaspiegel in Abhängigkeit von der Prävalenz einer KHK bei HD und CAPD Patienten

Die IL-6-Plasmaspiegel der dialysepflichtigen Patienten mit KHK waren signifikant ($p=0,03$) höher als bei Patienten ohne KHK (Abb. 29). Bei den IL-6 Plasmaspiegeln der CKD Patienten zeigten sich keine Unterschiede ($p=0,28$) zwischen Patienten mit und ohne KHK (Abb. 30) (Tab.8). Nimmt man auch hier beide Gruppen zusammen, findet man ebenfalls eine signifikante Assoziation ($p=0,002$) hoher IL-6 Plasmaspiegel und dem Vorhandensein einer KHK (Abb. 31).



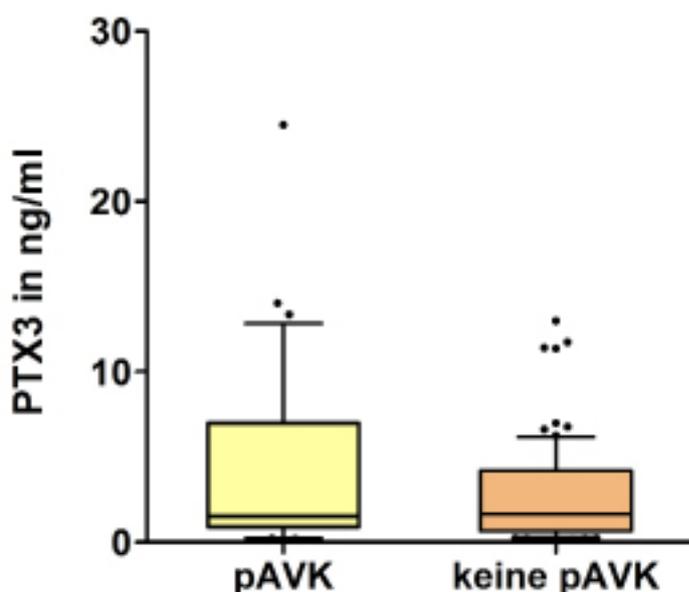
▲ **Abb. 30** IL-6-Plasmaspiegel in Abhängigkeit von der Prävalenz einer KHK bei CKD Patienten



▲ **Abb. 31** IL-6-Plasmaspiegel in Abhängigkeit von der Prävalenz einer KHK bei HD, CAPD und CKD Patienten

	HD, CAPD und CKD		HD und CAPD		CKD	
	IL6 in pg/ml		IL6 in pg/ml		IL6 in pg/ml	
KHK	ja	nein	ja	nein	ja	nein
Mittelwert	9,39	6,17	10,84	7,98	4,82	3,7
Median	8,20	4,10	8,95	7,10	4,4	1,1
Min-Max	0,1 - 28	0,0 - 25,5	1,3 - 28	0,6 - 25,5	0,1 - 12,5	0,0 - 22,1
P-Wert	0,00		0,03		0,28 (n.s.)	

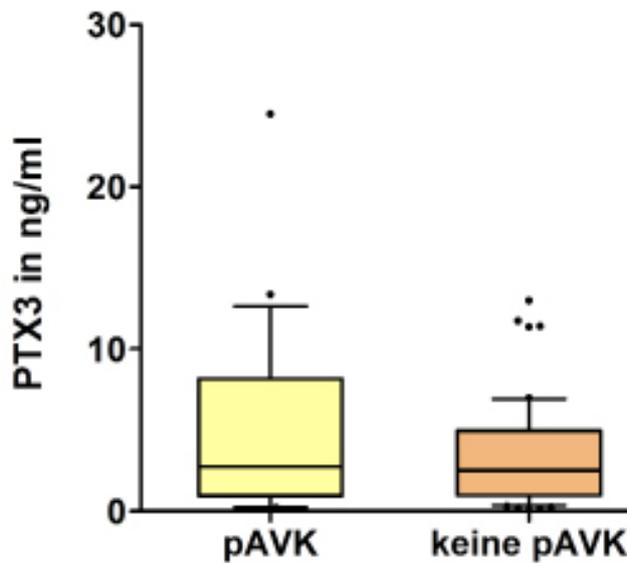
▲ **Tab. 8** Statistische Auswertung: Es besteht eine signifikante Assoziation zwischen CRP und KHK bei den dialysepflichtigen Patienten (HD und CAPD) und in der Gruppe mit HD, CAPD und CKD Patienten (Mann-Whitney-Test).



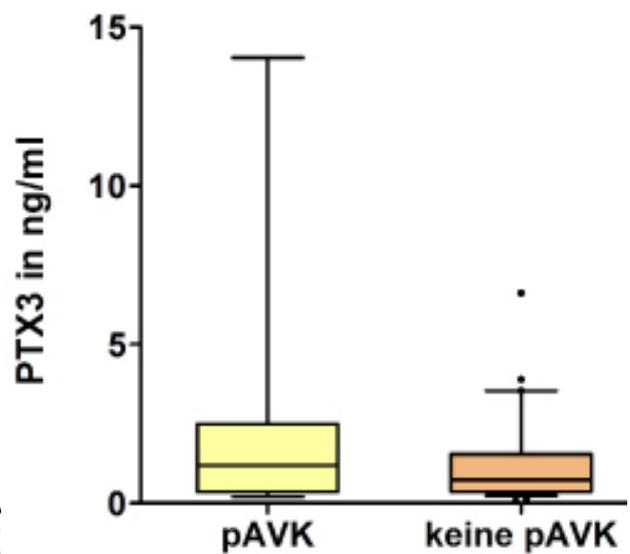
▲ **Abb. 32** PTX3-Plasmaspiegel in Abhängigkeit von der Prävalenz einer pAVK bei HD, CAPD und CKD Patienten

Bei den Patienten wurden auch die Assoziationen zwischen Prävalenz einer peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) und der Höhe der Plasmaspiegel von PTX3, CRP und IL-6 bestimmt.

Es zeigte sich zwischen hohen PTX3-Plasmaspiegeln und pAVK keine signifikante Assoziation ($p=0,24$) (Abb. 32). Auch eine alleinige Betrachtung von HD und CAPD Patienten (Abb. 33), sowie von CKD Patienten zeigte keine signifikante Assoziation von PTX3 Spiegeln und pAVK, siehe (Abb. 34)



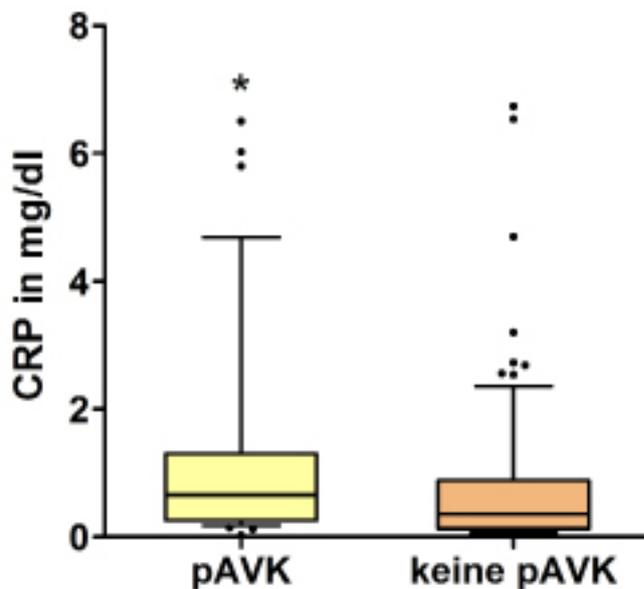
▲ Abb. 33 PTX3-Plasmaspiegel in Abhängigkeit von der Prävalenz einer pAVK bei HD und CAPD Patienten



▲ Abb. 34 PTX3-Plasmaspiegel in Abhängigkeit von der Prävalenz einer pAVK bei CKD Patienten

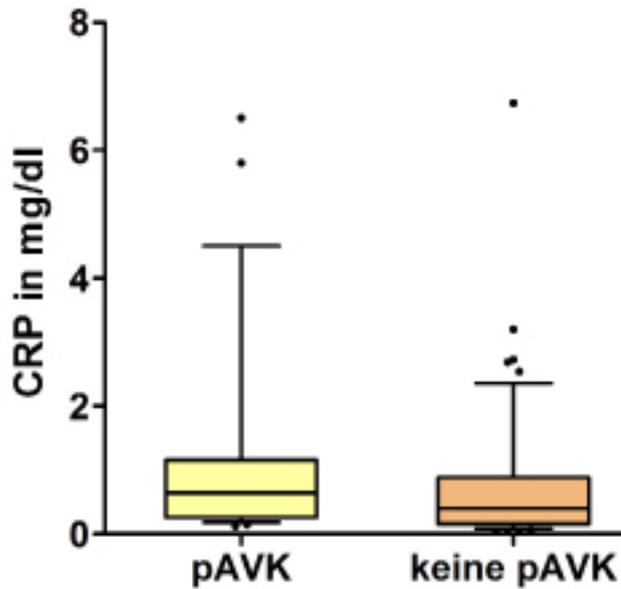
	HD, CAPD und CKD		HD und CAPD		CKD	
	PTX3 in ng/ml		PTX3 in ng/ml		PTX3 in ng/ml	
pAVK	ja	nein	ja	nein	ja	nein
Mittelwert	4,34	2,64	4,82	3,43	2,71	1,23
Median	1,52	1,66	2,74	2,52	1,19	0,74
Min-Max	0 - 24,5	0,0 - 13	0,6 - 24,5	0,05 - 13	0,2 - 14,0	0,07 - 6,62
P-Wert	0,246 (n.s.)		0,583 (n.s.)		0,542 (n.s.)	

▲ Tab. 9 Statistische Auswertung: Es besteht keine signifikante Assoziation zwischen PTX3 und pAVK (Mann-Whitney-Test)

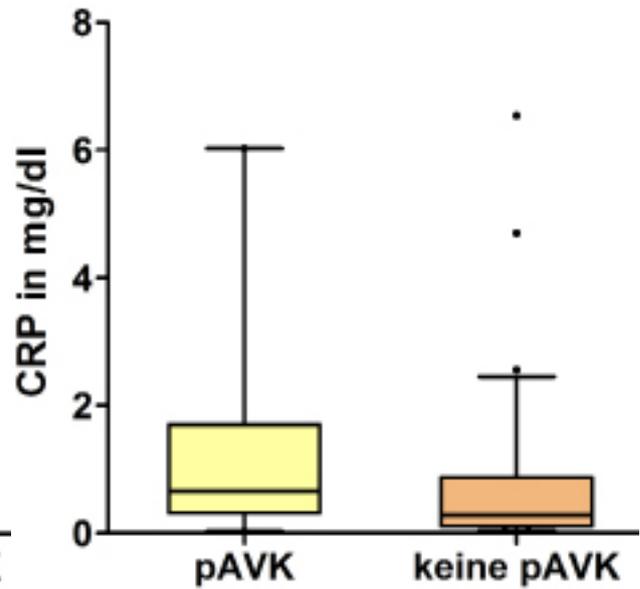


▲ Abb. 35 CRP-Plasmaspiegel in Abhängigkeit von der Prävalenz einer pAVK bei HD, CAPD und CKD Patienten

Die CRP-Plasmaspiegel waren bei Vorhandensein einer pAVK signifikant ($p < 0,02$) höher als bei Patienten ohne pAVK (Abb. 35). Bei einer Unterteilung in dialysepflichtige Patienten und CKD Patienten, zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen CRP und pAVK (Abb. 36 + 37) (Tab. 10).



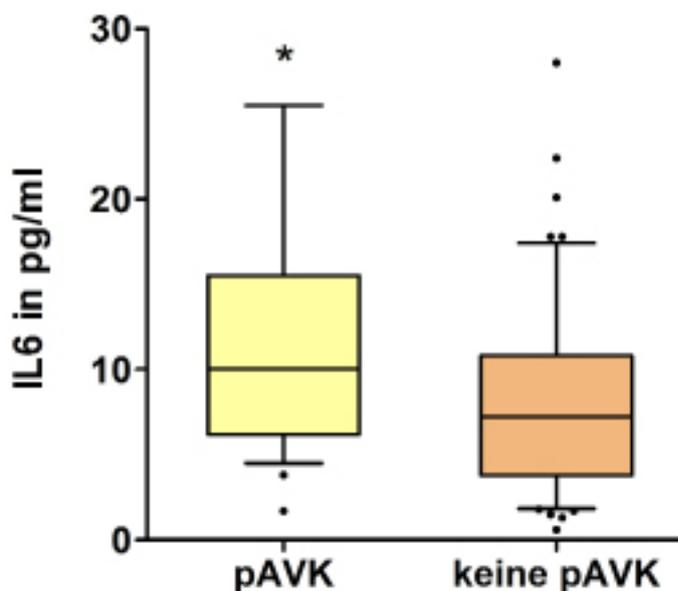
▲ **Abb. 36** CRP-Plasmaspiegel in Abhängigkeit von der Prävalenz einer pAVK bei HD und CAPD Patienten



▲ **Abb. 37** CRP-Plasmaspiegel in Abhängigkeit von der Prävalenz einer pAVK bei CKD Patienten

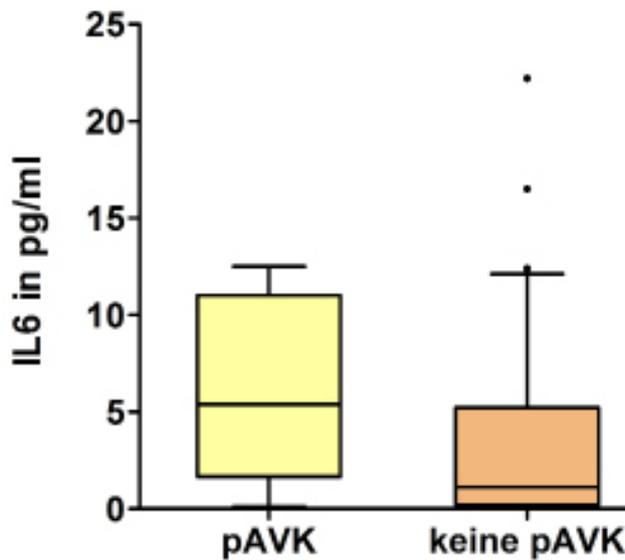
	HD, CAPD und CKD		HD und CAPD		CKD	
	CRP in mg/ml		CRP in mg/ml		CRP in mg/ml	
pAVK	ja	nein	ja	nein	ja	nein
Mittelwert	1,24	0,80	1,21	0,80	1,34	0,81
Median	0,66	0,36	0,65	0,40	0,66	0,29
Min-Max	0,03 - 6,51	0,11 - 6,74	0,12 - 6,51	0,02 - 6,74	0,03 - 6,03	0,0 - 6,54
P-Wert	0,03		0,109 (n.s.)		0,151 (n.s.)	

▲ **Tab. 10** Statistische Auswertung: es besteht eine signifikante Assoziation zwischen hohen CRP-Plasmaspiegeln und pAVK bei HD; CAPD und CKD Patienten (Mann-Whitney-Test)

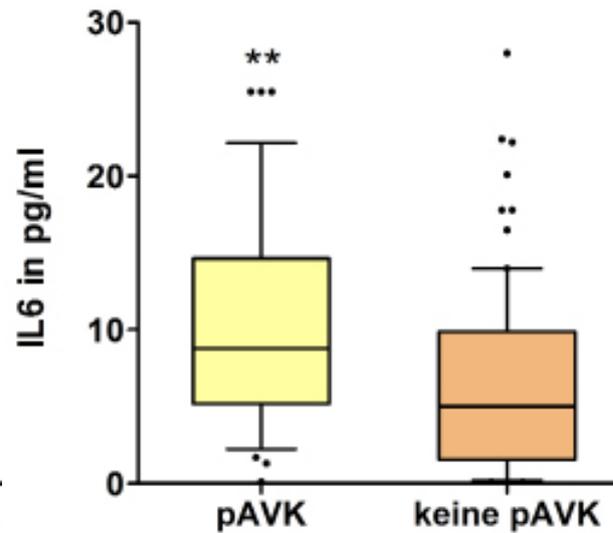


▲ **Abb. 38** IL-6-Plasmaspiegel in Abhängigkeit von der Prävalenz einer pAVK bei HD und CAPD Patienten

Es besteht eine signifikante ($p=0,013$) Assoziation von hohen IL-6 Plasmaspiegeln und der Prävalenz einer pAVK bei dialysepflichtigen Patienten (Abb. 38). Bei den CKD Patienten ergibt sich keine Assoziation ($p=0,09$) zwischen IL-6 Plasmaspiegeln und pAVK (Abb.39) Betrachtet man die IL-6 Plasmaspiegel aller Patienten (HD, CAPD und CKD), zeigt sich eine hoch signifikante ($p=0,001$) Assoziation von IL-6 und pAVK (Abb. 40) (Tab.11).



▲ **Abb. 39** IL-6-Plasmaspiegel in Abhängigkeit von der Prävalenz einer pAVK bei CKD Patienten



▲ **Abb. 40** IL-6-Plasmaspiegel in Abhängigkeit von der Prävalenz einer pAVK bei HD, CAPD und CKD Patienten

	HD, CAPD und CKD		HD und CAPD		CKD	
	IL6 in pg/ml		IL6 in pg/ml		IL6 in pg/ml	
pAVK	ja	nein	ja	nein	ja	nein
Mittelwert	10,46	6,359	11,85	8,066	5,938	3,513
Median	8,8	5	10,05	7,25	5,4	1,1
Min-Max	0 - 28	0,0 - 25,5	0,6 - 28	1,7 - 25,5	0,1 - 12,5	0,0 - 22,2
P-Wert	0,001		0,013		0,091 (n.s.)	

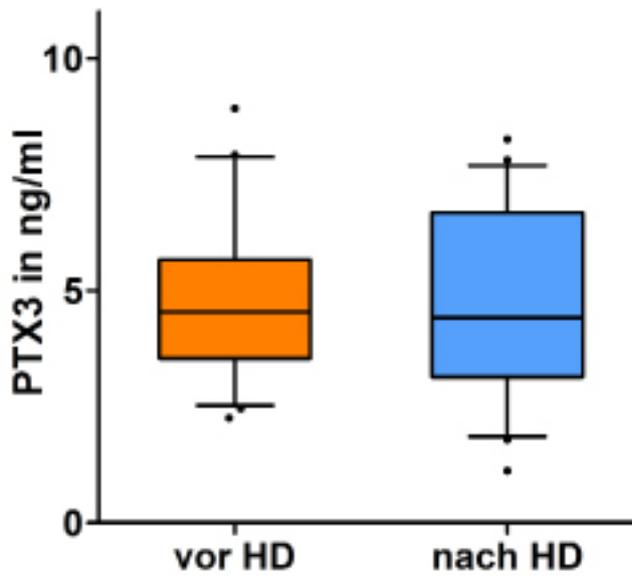
▲ **Tab. 11** Statistische Auswertung: es besteht eine signifikante Assoziation zwischen hohen IL-6-Plasmaspiegeln und pAVK bei HD, CAPD und CKD Patienten, sowie bei dialysepflichtigen Patienten (Mann-Whitney-Test)

4.4 PTX3-Plasmaspiegel vor und nach Dialyse

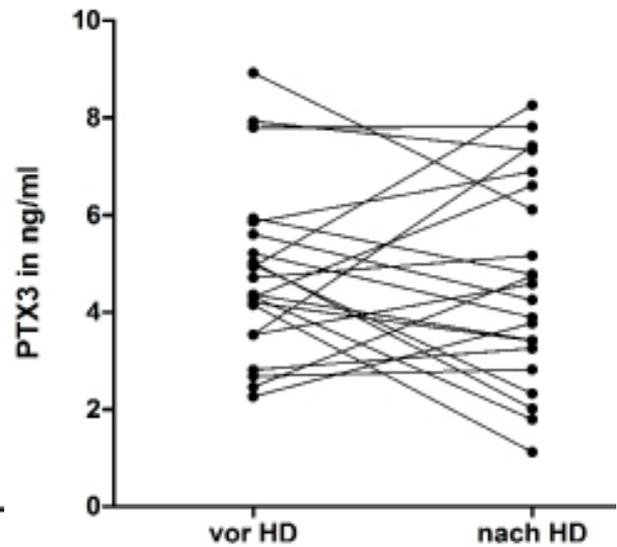
Da der Unterschied der PTX3-Plasmaspiegel zwischen Hämodialysepatienten und den übrigen Patientengruppen, insbesondere den Peritonealdialysepatienten, überraschte, wollten wir untersuchen, ob durch eine Hämodialysebehandlung die PTX3 Konzentration im Blut ansteigt. Hierzu entnahmen wir bei 22 ambulanten Hämodialysepatienten (anderen, als den zuvor vorgestellten) unmittelbar vor und 3 Stunden nach Beginn der Dialyse Blut und bestimmten die PTX3-Plasmaspiegel. Zur Dialyse wurden low- und high-Flux-Membranen verwendet.

Wie aus Abb. 41 ersichtlich, kam es zu keinem signifikanten ($p=0,69$) Anstieg der PTX3-Konzentration während der Hämodialyse. In Abb.42 ist die Entwicklung der PTX3 Werte für jeden Patienten einzeln dargestellt. Es zeigt sich keine einheitliche Tendenz.

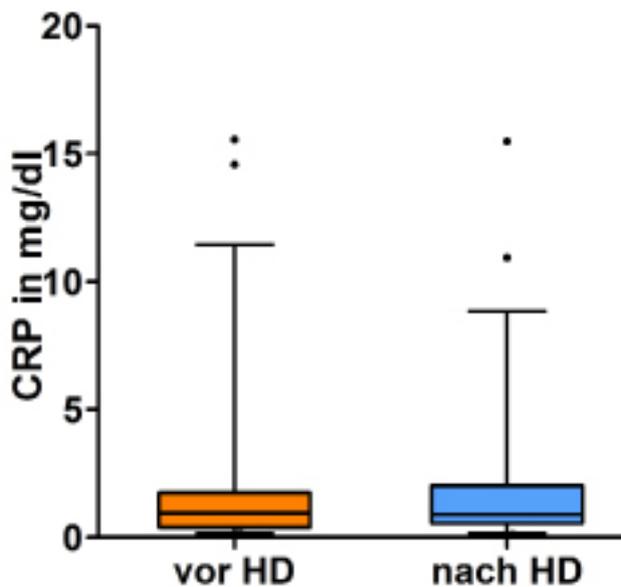
Abb. 43 und 44 zeigen, dass sich die CRP- und IL-6-Plasmaspiegel vor und nach Hämodialyse nicht signifikant unterscheiden.



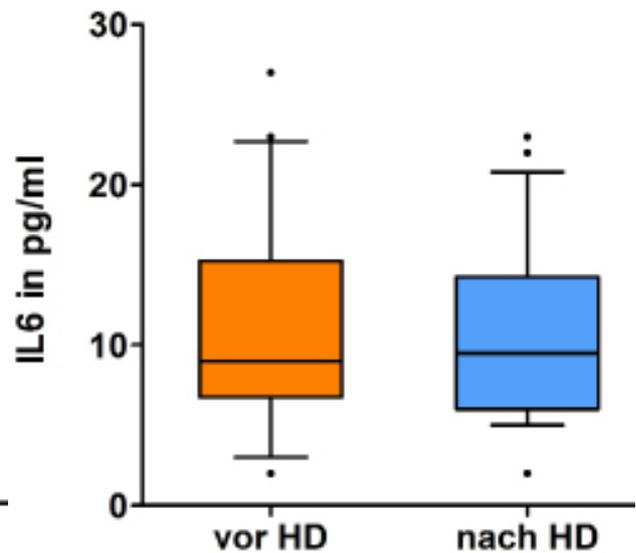
▲ Abb. 41 Bestimmung von PTX3-Plasmaspiegeln bei 22 ambulanten Hämodialysepatienten vor und nach Hämodialyse. Die Unterschiede sind nicht signifikant



▲ Abb. 42 Entwicklung der PTX3-Plasmaspiegel für jeden Patienten einzeln dargestellt. Es zeigt sich keine einheitliche Tendenz zwischen vor und nach Hämodialyse



▲ Abb. 43 Bestimmung von CRP-Plasmaspiegeln bei 22 ambulanten Hämodialysepatienten vor und nach Hämodialyse. Die Unterschiede sind nicht signifikant



▲ Abb. 44 Bestimmung von IL6-Plasmaspiegeln bei 22 ambulanten Hämodialysepatienten vor und nach Hämodialyse. Die Unterschiede sind nicht signifikant

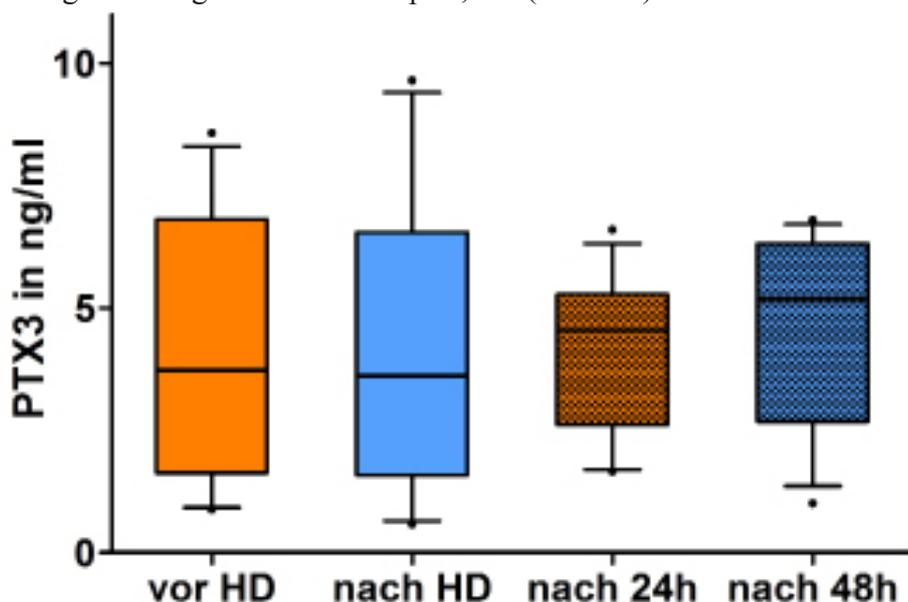
	PTX3 in ng/ml		CRP in mg/dl		IL6 in pg/ml	
	vor HD	nach 3 h	vor HD	nach 3 h	vor HD	nach 3 h
Mittelwert	4,80	4,62	2,3	2,25	10,95	10,41
Median	4,54	4,42	0,94	0,89	9	9,5
Min-Max	2,26 - 8,92	1,12 - 8,26	0,07 - 15,56	0,06 - 15,48	2,0 - 27	2,0 - 27
P-Wert	0,698 (n.s.)		0,853 (n.s.)		0,638 (n.s.)	

▲ Tab. 12 Statistische Auswertung aufgrund einer Gleichverteilung mit Student's T-Test

4.5 PTX3 Spiegel als Kinetik über 48 Stunden

Um einen gegebenenfalls verzögerten Anstieg der PTX3-Konzentration nach Hämodialyse zu untersuchen, entnahmen wir bei 11 stationären Hämodialysepatienten vor, direkt nach, sowie 24 und 48 Stunden nach Hämodialyse Blut zur Bestimmung ihrer PTX3-Plasmaspiegel. Um die Blutentnahme nach 24 und 48 Stunden zu vereinfachen, wurden die Untersuchungen bei stationären Patienten durchgeführt.

Es zeigte sich ein leichter Anstieg der PTX3-Plasmaspiegel nach 24 und 48 Stunden, dieser erreichte allerdings kein Signifikanzniveau $p=0,954$ (Abb. 45).



▲ **Abb. 45** PTX3-Plasmaspiegelbestimmung bei 11 stationären Hämodialysepatienten vor, nach, 24h nach und 48 h nach Hämodialyse. Der Anstieg der PTX3 Konzentration ist nicht signifikant.

Abnahmezeitpunkt	PTX3 in ng/ml			
	vor HD	nach 3 h	nach 24h	nach 48 h
Mittelwert	4,11	4,27	4,11	4,59
Median	3,73	3,62	4,53	5,18
Min-Max	0,88 - 8,58	0,58 - 9,65	1,66 - 6,6	1,01 - 6,8

Bonferroni's Test	Mean Diff	t	P < 0,05?	Summary	95% CI of diff
vor HD vs nach HD	-0,16	0,16	nein	n.s.	-2,875 to 2,557
vor HD vs nach 24h	0,00	0,00	nein	n.s.	-2,713 to 2,719
vor HD vs nach 48h	-0,48	0,49	nein	n.s.	-3,200 to 2,232
nach HD vs nach 24h	0,16	0,17	nein	n.s.	-2,554 to 2,879
nach HD vs nach 48h	-0,33	0,33	nein	n.s.	-3,041 to 2,391
nach 24h vs nach 48h	-0,49	0,50	nein	n.s.	-3,204 to 2,229

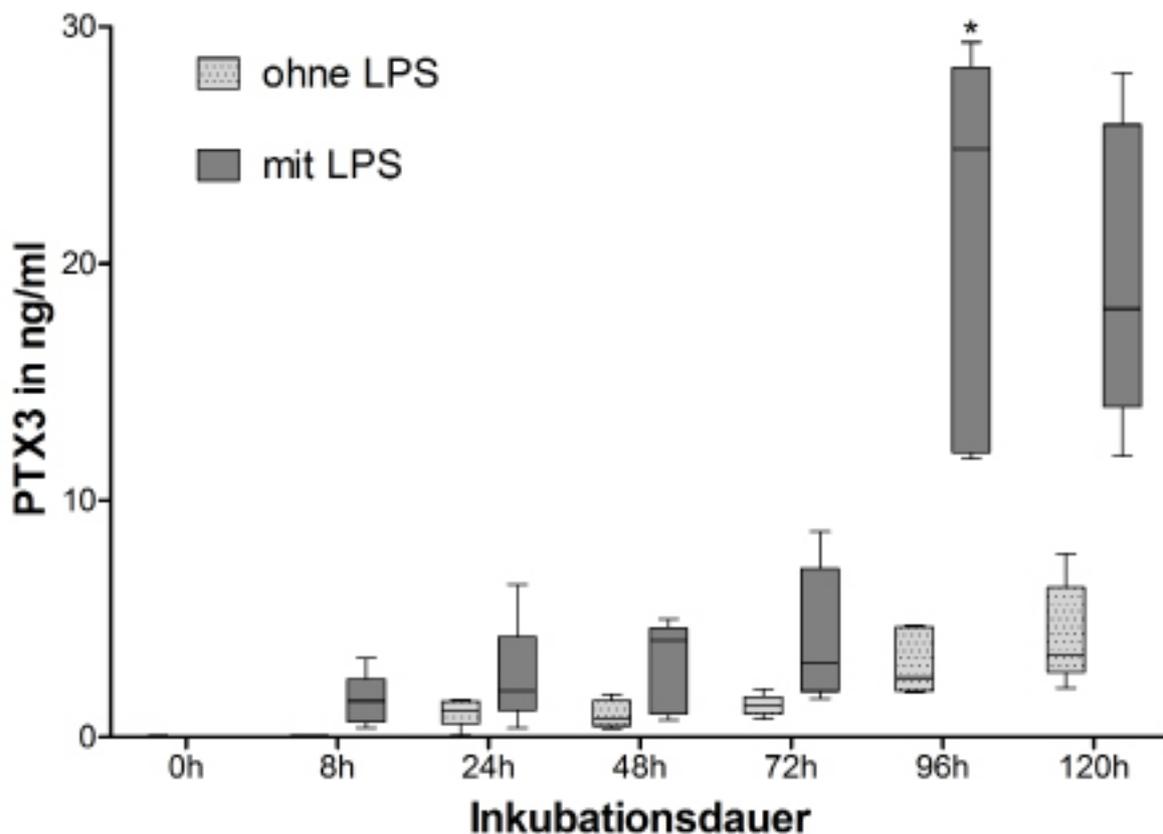
◀ **Tab. 13** Statistische Auswertung: Varianzanalyse (ANOVA) mit Post-Hoc Korrektur durch den Bonferroni Test

4.6 Kinetik der PTX3-Produktion in vitro

PTX3 wird, anders als CRP, nicht nur in der Leber, sondern unter anderem auch von Monozyten produziert. Um zu untersuchen, ob es während einer Hämodialyse zu einer Induktion der PTX3 Produktion durch Monozyten kommt, entschieden wir uns zu einer in vitro Zellstimulation von Blutproben, die vor und nach Dialyse gewonnen wurden.

Um die ideale Inkubationszeit für die Bestimmung von PTX3 festzustellen, wurde in einem Vorversuch Vollblut von 5 gesunden Probanden mit und ohne Stimulation durch LPS für 120 Stunden inkubiert. Die PTX3 Konzentrationen wurden zu Beginn, nach 4, 8, 24, 48, 72, 96 und 120 Stunden bestimmt. In Abb. 46 erkennt man einen deutlichen Anstieg der PTX3 Konzentration, vor allem bei den Proben mit Zusatz von LPS. Der Unterschied zwischen den Proben mit und ohne LPS-Stimulation ist signifikant ($p < 0,05$).

Nach 96 Stunden Inkubationszeit sind in den Proben mit LPS die höchsten Konzentrationen an PTX3 messbar, im weiteren Verlauf der Inkubation sinkt die PTX3 Konzentration wieder ab. Es besteht ein signifikanter Unterschied in der Höhe der PTX3 Werte zwischen 96 Stunden und 0 bis 72 Stunden Inkubationszeit ($p < 0,05$). Die PTX3 Konzentration ist nach 120 Stunden Inkubation geringer als nach 96 Stunden, der Unterschied ist jedoch nicht signifikant.



▲ **Abb. 46:** PTX3-Bestimmung nach Vollblutinkubation (37°C, 5% CO₂). Heparinisiertes Vollblut von 5 gesunden Probanden wurde mit und ohne LPS 120h im CO₂ Brutschrank inkubiert. Die PTX3 Konzentrationen wurden zu Beginn, nach 4, 8, 24, 48, 72, 96 und 120 Stunden nach Zugabe von EDTA (1,6mg/ml) gemessen. Es besteht ein signifikanter * ($p < 0,05$) Unterschied zwischen 96 Stunden und 0 Stunden Inkubationszeit. Ein signifikanter Unterschied besteht auch zwischen den Proben mit und ohne LPS ($p < 0,05$).

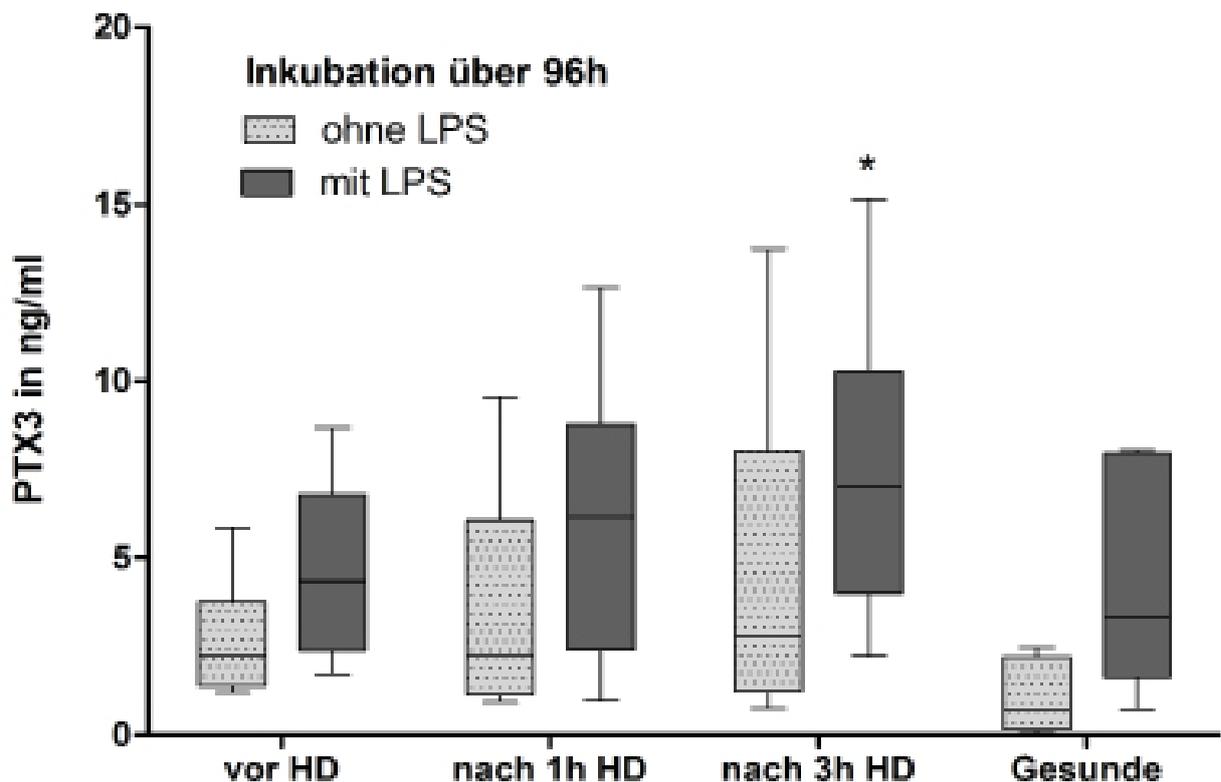
4.7 PTX3-Konzentrationen von Hämodialysepatienten nach in vitro Zellstimulation

Bei 11 stationären Dialysepatienten wurde vor einer Hämodialyse, nach 1 Stunde und nach 3 Stunden, sowie zusätzlich als Kontrollgruppe bei 7 gesunden Probanden Blut entnommen. Die Proben wurden mit und ohne LPS Stimulation im CO² Brutschrank inkubiert. Die Inkubationszeit betrug 96 Stunden, in Anlehnung an oben erwähnte Vorversuche.

Wie in Abb. 47 ersichtlich, bildete Blut, das 1 und 3 Stunden nach Hämodialyse entnommen wurde, mehr PTX3, als Blut das vor der Hämodialyse entnommen wurde. Diese Tendenz zeigte sich sowohl bei Stimulation mit LPS, als auch in der Gruppe ohne LPS-Stimulation.

Ein signifikanter Unterschied der PTX3-Konzentration zeigte sich jedoch nur beim Vergleich vor Hämodialyse und 3 Stunden nach Hämodialyse unter LPS Stimulation ($p=0.0087$).

Die PTX3-Konzentration der Proben, die vor der Hämodialyse entnommen wurden, war höher als im Blut der normalen Kontrollgruppe, dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant.



▲ **Abb. 47** Spontane und LPS induzierte PTX3 Produktion in Vollblut nach einer Inkubationszeit von 96 Stunden. Blutentnahme vor und nach Hämodialyse, N=11, PTX3-Werte 3h nach HD waren signifikant höher im Vergleich zu den Proben die vor HD gewonnen wurden ($p = 0.0087$).

5. Diskussion

5.1 Methoden

Da PTX3 erst 1992 entdeckt wurde, waren die Messmethoden zum Zeitpunkt der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht so etabliert und gut untersucht wie zum Beispiel für CRP, das 1930 erstbeschrieben wurde. Aus diesem Grund gibt es für die Bestimmung von PTX3-Plasmaspiegeln noch kein standardisiertes Verfahren.

So fehlen in der Literatur häufig genaue Angaben zum verwendeten Antikoagulans, zur Verarbeitung der Proben nach Blutentnahme und zur Lagerungstemperatur. Zumeist werden EDTA Röhrchen zur Blutabnahme genutzt und die Proben bei -20°C gelagert [115-117]. Es werden aber auch Lagerungstemperaturen von -70° [129] oder -80° [130] beschrieben.

In der vorliegenden Arbeit beschränkten wir uns auf die Auswirkungen verschiedener Antikoagulantien auf die PTX3-Plasmaspiegel. Es ist jedoch auch von einer Beeinflussung der PTX3-Konzentration durch andere Variablen, wie zum Beispiel der Lagerungstemperatur, Lagerungsstabilität (Anzahl der Auftauvorgänge) und Blutentnahmetechnik auszugehen.

Die Beobachtung, dass PTX3-Plasmaspiegel nur in EDTA antikoagulierte Plasma und nicht in Plasma, das mit anderen Antikoagulantien versetzt war oder im Serum messbar war, hat überrascht. Einschränkend muss darauf hingewiesen werden, dass die verschiedenen Antikoagulantien nur bei Hämodialysepatienten und nicht bei Gesunden getestet wurden.

Der Entzug der Calciumionen ist als Ursache unwahrscheinlich, da auch im calciumfreien Citratplasma die PTX3-Werte sehr niedrig waren. Jedoch konnten Wang et al. bei Untersuchungen zur Dekalzifizierung von Fischschuppen zeigen, dass EDTA in größerem Umfang Calcium bindet als Citrat und es bei der Verwendung von EDTA zu einer geringeren Denaturierung von Proteinen kommt [131]. Die Unterschiede waren allerdings gering und stark konzentrationsabhängig. Zur Rolle der Calciumionen sind genauere Untersuchungen noch ausstehend und auch die Bindungseigenschaften von PTX3 sind weitaus weniger genau untersucht, als die von CRP [132]. Die Bindung von PTX3 an den Komplementfaktor C1q ist calciumunabhängig, jedoch gibt es auch calciumabhängige Bindungen. So ist die Bindung an die extrazelluläre Matrixkomponente TSG-6 (TNFstimuliertes Gen 6) und an den Fibroblasten Wachstumsfaktor FGF2 calciumabhängig [99, 133]. Als weitere mögliche Ursache kommt in Betracht, dass die langgestreckten großen Moleküle des PTX3 im Blut überwiegend in reversibler Bindung an Blutzellen vorliegen, von denen sie *in vitro* durch EDTA eluiert werden. Dazu passt, dass bei unseren *in vitro* Versuchen PTX3 auch in heparinisiertem Vollblut nachgewiesen werden konnte, allerdings nur wenn EDTA nach der Inkubation und vor der Zentrifugation hinzugefügt wurde. Die Ergebnisse dieser Vorversuche sind nicht im Einzelnen dargestellt.

Bei den mit unterschiedlichen Antikoagulantien gewonnenen und bereits zentrifugierten

Plasmaproben zeigte das nachträgliche Hinzufügen von EDTA zu Citrat- und Heparinplasma keinen Effekt auf die PTX3-Spiegel. Dies lässt ebenfalls vermuten, dass EDTA PTX3 von Blutzellen eluiert. An dieser Stelle weisen wir jedoch darauf hin, dass bei Citratblut eine Zugabe von EDTA vor der Zentrifugation mit anschließender PTX3 Messung nicht getestet wurde.

Wir schlossen einen verfälschenden Effekt von EDTA, Citrat und Heparin auf den ELISA-Test aus, da sich bei den gemessenen PTX3 Standardkurven kein Effekt durch die Zugabe von EDTA, Citrat oder Heparin zeigte.

Um unsere Ergebnisse, trotz des noch nicht gelösten Problems der methodischen Vereinheitlichung, mit anderen Studien [115-117] vergleichen zu können, entschieden wir uns, die Versuche mit EDTA als Antikoagulans durchzuführen. Zudem wurden die Proben nach Blutentnahme sofort gekühlt und das Plasma bei -20°C gelagert.

Solange es kein einheitliches methodisches Verfahren zur PTX3 Bestimmung gibt, sind auch statistisch relevante Zusammenhänge kritisch zu hinterfragen, da sie letztlich auch auf methodischen Fehlern beruhen können. Aus diesem Grund ist ein solches Verfahren für die Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der Studien wünschenswert.

5.2 Vergleich der PTX3 Spiegel in der Literatur

Für gesunde Individuen wurde von PTX3-Plasmaspiegeln um die $0,99 \pm 0,5$ ng/ml berichtet [115], andere Studien zeigten Werte um $1,34 \pm 0,9$ ng/ml bei 100 Probanden [116]. Damit lagen die von uns erstmals bei Hämodialysepatienten bestimmten PTX3-Plasmaspiegel mit $2,8 \pm 0,8$ ng/ml höher. Bei Patienten mit akutem Herzinfarkt waren jedoch auch noch höhere PTX3-Spiegel beschrieben worden. So zeigten Latini et al. bei Patienten, die 3 Monate nach akutem Herzinfarkt eventfrei geblieben waren, PTX3-Plasmaspiegel von $7,08$ ng/ml [116].

Die von uns gemessenen PTX3-Plasmaspiegel der Kontrollgruppe sind mit $0,71 \pm 0,3$ ng/ml etwas niedriger, aber trotzdem mit früheren Studien [114-117] gut vergleichbar, da auch von anderen Autoren PTX3-Plasmaspiegeln ≤ 2 ng/ml als normal angesehen werden [71, 114]. Tabelle 14 zeigt eine Auflistung von PTX3 Plasmaspiegeln der gesunden Kontrollgruppe bei unterschiedlichen Studien.

Autor	PTX3 in ng/ml
Peri, G. [115]	$0,99 \pm 0,5$
Latini, R. [116]	$1,34 \pm 0,9$
Böhme, M. [134]	$0,71 \pm 0,3$
Inoue, K. [117]	$1,98 \pm 0,3$
Muller, B. [114]	$\leq 2,0$
Tong, M. [130]	$1,80 \pm 0,6$

◀ **Tab. 14** PTX3-Plasmaspiegel bei Gesunden

5.3 Pentraxin3 Spiegel bei chronischer Niereninsuffizienz

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals die PTX3-Plasmaspiegel bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz und Nierenersatztherapie bestimmt.

Wie wir zeigen konnten (Tab. 15), waren die PTX3-Plasmaspiegel bei Hämodialysepatienten im Gegensatz zu Patienten mit Peritonealdialyse und nichtdialysepflichtiger Niereninsuffizienz stark erhöht. Gegenüber Gesunden wiesen bereits nichtdialysepflichtige Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz erhöhte PTX3-Plasmaspiegel auf. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant.

	PTX3 in ng/ml			
	HD	CAPD	CKD V	CKD III-IV
Böhme [134]	5,8 ±0,6	1,5 ±0,4	1,5 ±0,4	
Tong [130]	n.v.	n.v.	5,7 (0,9–64,3)	2,2 (0,4-16)
Suliman [129]	10,6 (2,4-75,1)	n.v.	n.v.	n.v.

◀ Tab. 15

In einer bald nach der eigenen Publikation [134] erschienenen Arbeit berichten Tong et al. [130] über PTX3-Plasmaspiegel bei 347 Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz. Davon waren 71 Patienten im Stadium 3 bis 4 der CKD und 276 Patienten im Stadium 5, wobei noch nicht mit einer Nierenersatztherapie begonnen worden war. Bezüglich einer Erhöhung der PTX3-Plasmaspiegel bei Patienten mit nicht dialysepflichtiger chronischer Niereninsuffizienz bestätigen Tong et al. unsere Ergebnisse. Jedoch zeigten sich in dieser Studie schon bei nichtdialysierten Patienten im Stadium 5 der CKD, PTX3-Plasmaspiegel um 5,7ng/ml. Ähnlich hohe Konzentrationen hatten wir in unserer Studie nur bei den Hämodialysepatienten gemessen (5,8ng/ml). Schaut man auf die minimalen und maximalen Konzentrationen von PTX3, fallen jedoch bei beiden Studien große interindividuelle Unterschiede auf. Tong et al. geben für PTX3 bei den CKD Patienten eine Spanne von 0,9 bis 64,3 ng/ml an. Bei uns betrug die Spanne für PTX3 0,07 bis 14,0ng/ml bei den CKD Patienten. Hohe interindividuelle Unterschiede hinsichtlich der PTX3-Plasmaspiegel sind auch durch weitere Studien dokumentiert [115].

Kürzlich erschien aus der schwedischen Arbeitsgruppe von Tong et al. eine weitere Publikation [129], diesmal über PTX3-Plasmaspiegel bei 200 Hämodialysepatienten und ihre Assoziation mit Co-Morbiditäten und Mortalität. In Übereinstimmung mit uns fanden die Autoren bei den Hämodialysepatienten mit 10,6ng/ml (2,4–75,1) stark erhöhte PTX3-Plasmaspiegel.

In allen drei von uns untersuchten Patientengruppen war die Serumkonzentration des CRP gegenüber den Gesunden signifikant erhöht, wobei die Peritonealdialysepatienten die höchsten Konzentrationen aufwiesen. Signifikante Unterschiede der CRP-Plasmaspiegel zwischen den einzelnen Patientengruppen bestanden jedoch nicht. In der Literatur sind die CRP-Plasmaspiegel von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz und Dialysepatienten in einer großen Schwankungsbreite beschrieben worden. Docci et al. berichteten über CRP-Konzentrationen von

7.4mg/dl [83] und Zimmermann et al. fanden eine Erhöhung der CRP-Plasmaspiegel um 46% bei Hämodialysepatienten [82]. Owen beobachtete einen Anstieg des CRP nach Hämodialyse um 35% [135]. Borazan et al. geben als durchschnittliche CRP-Plasmaspiegel bei Hämodialyse- und Peritonealdialysepatienten 2,0mg/dl an [136].

Für CRP sind große interindividuelle und intraindividuelle Unterschiede hinsichtlich der Plasmaspiegel festgestellt worden [137, 138]. So variierten die CRP Spiegel bei 26 gesunden Blutspendern innerhalb von 6 Monaten interindividuell um 92,5% und intraindividuell um 42,2% [137].

Die Konzentrationen des IL-6 waren bei den dialysepflichtigen Patienten (HD und CAPD) signifikant höher als bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz und der gesunden Kontrollgruppe. Diese Werte sind gut vergleichbar mit den Ergebnissen früherer Studien zu IL6 bei niereninsuffizienten Patienten[43, 44].

5.4 PTX3 und seine Assoziationen mit Restnierenfunktion, Nierenersatztherapiedauer und Erythropoetindosis

Wir konnten zeigen, dass bei den Peritonealdialysepatienten und den Patienten mit nicht-dialysepflichtiger Niereninsuffizienz PTX3 negativ mit der Restnierenfunktion korreliert. Bei einem Abfall der glomerulären Filtrationsrate steigt PTX3 also an. Tong et al. bestätigen dieses Ergebnis [130]. Eine der Ursachen für den Anstieg der PTX3 Konzentration bei Abfall der Nierenfunktion, könnte die verschlechterte renale Clearance sein, da PTX3 ein sehr großes Molekül (40kDa) ist [71]. Versuche mit Gel-Elektrophorese zeigen zudem, dass PTX3 Multimere bildet, die überwiegend ein Molekulargewicht von 440kDa haben, was einer Decamer-Struktur entspricht. Mittels Gel-Filtration konnten auch noch größere Formen nachgewiesen werden, mit Molekulargewichten bis zu 900 kDa [8, 94]. Eine andere Ursache könnte eine mögliche Beteiligung der Niere an der Verstoffwechslung von PTX3 sein.

PTX3 korreliert mit der Dialysedauer. Je länger die Zeit einer Nierenersatztherapie war, desto höher waren die PTX3-Spiegel. Daher erklärt die längere Nierenersatztherapiedauer bei Hämodialysepatienten (69+/-10 Monate) im Vergleich zu Peritonealdialysepatienten (34+/-5 Monate), eventuell auch deren erhöhte PTX3-Plasmaspiegel. Aber auch wenn wir die Zeitdauer der Nierenersatztherapie adaptierten, zeigten sich immer noch signifikant höhere PTX3-Werte bei Hämodialysepatienten (5,5 ±0,52ng/ml, Konfidenzintervall 4,46-6,5) im Vergleich zu Peritonealdialysepatienten (2,0 ±0,62ng/ml, Konfidenzintervall 0,79-3,3). Da Suliman [129] diese Befunde bei seiner Untersuchung von 200 Hämodialysepatienten nicht bestätigen konnte, bedürfen sie jedoch der Kontrolle in einer größeren Kohortenstudie.

Unsere Ergebnisse zeigen eine positive Korrelation zwischen Erythropoetindosis und PTX3-

Plasmaspiegeln bei Dialysepatienten. Patienten mit hohen PTX3-Plasmaspiegeln brauchten auch eine höhere Erythropoetindosis/Woche. Eine Assoziation ist zwischen Erythropoetindosis und CRP bekannt. In einer Studie mit 30 Hämodialysepatienten brauchten die Patienten mit höheren CRP-Plasmaspiegeln eine höhere Erythropoetindosis, um einen Hämoglobinwert von 12 g/dl zu erreichen, als die Patienten mit niedrigeren CRP-Plasmaspiegeln [139]. Die Erythropoetindosis ist zudem mit Inflammation und Malnutrition assoziiert. Locatelli et al. zeigten eine Assoziation zwischen erniedrigtem Serumalbumin und einer hohen Erythropoetindosis, sowie eine Assoziation zwischen hohen CRP-Plasmaspiegeln und einer hohen Erythropoetindosis [140]. Eine Korrelation zwischen CRP und Erythropoetindosis konnten wir bei den von uns untersuchten Patienten nicht bestätigen.

Tong et al. fanden bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz eine stark positive Korrelation zwischen Fibrinogen und PTX3, weshalb eine Verbindung zwischen Inflammation und erhöhter Gerinnungsaktivität diskutiert wird [141]. Fibrinogen gilt zudem als Prädiktor für Mortalität bei Hämodialysepatienten und Patienten mit koronarer Herzkrankung [142, 143]. Patienten mit koronarer Herzkrankheit hatten höhere PTX3-Plasmaspiegel als nicht Betroffene. Die PTX3-Werte der innerhalb von 5 Jahren Verstorbenen übertrafen die der Lebenden.

Die PTX3-Plasmaspiegel unserer Patienten korrelierten nicht mit CRP und IL-6. Es zeigte sich jedoch eine Korrelation zwischen IL6 und CRP. Es könnte daran liegen, dass CRP nur in der Leber und speziell unter dem Einfluss von IL-6 gebildet wird, während die Synthese von PTX3 in vielen Zelltypen stattfindet und durch TNF- α und IL-1 stimuliert wird. Man kann sich vorstellen, dass bereits eine lokale Aktivierung von Makrophagen oder Endothelzellen genügt, um die Produktion von PTX3 in Gang zu setzen. Dass zwischen Konzentrationen von PTX3 und CRP bisweilen unterschiedliche Korrelationen bestehen, wurde schon bei Infektionen und beim akuten Infarkt nachgewiesen. So fanden Peri et al. keine Assoziation zwischen PTX3 und CRP bei Patienten mit Myokardinfarkt [115], jedoch zeigte dieselbe Arbeitsgruppe bei Patienten mit schwerer Sepsis eine Korrelation zwischen Konzentrationen von PTX3 und CRP [114]. In einer neueren Studie von Suliman et al. bei 200 Hämodialysepatienten zeigte sich eine Korrelation zwischen PTX3 und CRP Konzentrationen [129].

5.5 Pentraxine und ihre Assoziationen zu kardiovaskulären Erkrankungen

Über die Rolle des CRP bei der Entstehung von Artherosklerose ist in der Literatur eingehend diskutiert worden [26]. Für einen Beitrag zur Pathogenese könnte zudem die Beobachtung sprechen, dass Infarkte bei Ratten weniger ausgedehnt waren, wenn CRP gehemmt wurde [132]. CRP wird inzwischen als etablierter Risikofaktor für die Entstehung einer Atherosklerose angesehen.

Dies spiegelt sich in der JUPITER Studie und den entsprechenden Empfehlungen der American Heart Association wieder. Bei den teilnehmenden Männern und Frauen über 60 Jahren war das CRP erhöht ($\geq 2,0$ mg/l). Die Studie sollte klären, ob in dieser Situation eine cholesterinsenkende Therapie sinnvoll ist, auch wenn die Cholesterinwerte gar nicht erhöht sind. Die Teilnehmer wurden auf eine Langzeittherapie mit 20 mg/Tag Rosuvastatin oder Placebo randomisiert. Es zeigten sich in der mit dem Statin behandelten Gruppe signifikant weniger kardiovaskuläre Ereignisse [144].

Was PTX3 betrifft, so zeigte sich bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt eine deutliche Erhöhung des PTX3-Plasmaspiegels auf Werte von $6,94 \pm 11,26$ ng/ml mit einem Höchstwert nach 7,5 Stunden [115]. Auch in anderen vaskulären Erkrankungen, wie der Small-Vessel-Vasculitis und bei Angina pectoris wurden erhöhte PTX3 Konzentrationen nachgewiesen, die mit der Schwere der Erkrankung korrelierten [116, 117, 125]. Eine PTX3 Expression wurde in Makrophagen und Endothelzellen fortgeschrittener atherosklerotischer Läsionen nachgewiesen [111]. In Arterien ohne atherosklerotische Läsionen wurde keine Expression von PTX3 festgestellt. Ob PTX3 zur Gefäßwandschädigung beiträgt, ist damit aber noch nicht geklärt. Die niedrige absolute Plasmakonzentration des PTX3, die eine Zehnerpotenz unter der des CRP liegt, würde biologische Effekte bei der Größe des Moleküls [95] natürlich nicht ausschließen.

Neueste Untersuchungen zur Funktion von PTX3 wurden an Knockout-Mäusen durchgeführt, bei denen man die Produktion von PTX3 ausgeschaltet hatte. Wenn bei solchen Mäusen durch koronare Ligatur ein Myokardinfarkt erzeugt wurde, waren die Infarktareale um 33% größer und die neutrophile Infiltration stärker als bei Kontrollmäusen. Die Zahl der Kapillargefäße war geringer und die Zahl apoptotischer Kardiomyozyten nahm zu. Mit exogenem PTX3 ließ sich der Effekt umkehren. Danach schrieben die Autoren dem PTX3 einen kardioprotektiven Effekt zu, der auf einer Modulation der Komplementkaskade beruhen könnte [145]. In eine andere Richtung weisen die Untersuchungen von Souza et al. [146]. Nach einer intestinalen Ischämie durch Drosselung der Mesenterialarterie zeigten PTX3-defiziente Mäuse eine geringere Sterblichkeit und Inflammation als normale Kontrollmäuse. Unter Applikation von PTX3 kam es zu einer dosisabhängigen Steigerung von Sterblichkeit und Inflammation sowohl bei PTX3-defizienten, als auch bei normalen Kontrollmäusen. Bei diesem Experiment ist zu berücksichtigen, dass eine Ischämie der Darmschleimhaut schnell zur bakteriellen Invasion führt, die das angeborene Immunsystem und damit die Opsoninproduktion maximal aktiviert. Beim

sterilen Myokardinfarkt dürften Opsonine wie PTX3 dagegen die Aufgabe haben, geschädigtes Gewebe schnell der Beseitigung durch Makrophagen zuzuführen. Es ist gut vorstellbar, dass es in den bei der Atherosklerose entstehenden sterilen Gefäßwandläsionen durch Bildung bzw. Ablagerung des oberflächenaktiven PTX3 zu einer moderaten Aktivierung von Makrophagen und dadurch zur langsamen Ausdehnung der Läsionen kommt.

Wir untersuchten einen Zusammenhang zwischen PTX3-Spiegeln und dem Vorhandensein von KHK und pAVK. Hämodialysepatienten mit koronarer Herzkrankheit wiesen höhere PTX3-Plasmaspiegel auf als die nicht Betroffenen, dieser Trend verfehlte jedoch knapp das Signifikanzniveau. Betrachtet man dialysepflichtige und chronisch niereninsuffiziente Patienten gemeinsam, zeigt sich allerdings eine signifikante Korrelation zwischen PTX3 Konzentration und der Prävalenz einer KHK, nicht jedoch einer pAVK. Eine Kombination aller drei Patientengruppen führten wir durch, um eine höhere Fallzahl zu erreichen. Die CRP- und IL-6-Plasmaspiegel aller Patientengruppen korrelierten jeweils mit dem Bestehen einer KHK und pAVK.

Tong et al. zeigten mit ihrer Arbeit bei chronisch niereninsuffizienten Patienten ebenfalls eine Korrelation zwischen dem Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen und erhöhten PTX3 Konzentrationen ($p=0,03$). Die Patienten mit den höchsten PTX3-Plasmaspiegeln wiesen zudem das schlechteste 5-Jahres-Überleben auf. PTX3 hatte hinsichtlich der Mortalität einen gleich starken prädiktiven Wert wie IL-6. Sowohl PTX3 als auch IL-6 waren in ihrer Aussagekraft CRP überlegen [130].

Suliman et al. berichteten kürzlich über PTX3-Plasmaspiegel bei Hämodialysepatienten und ihre Assoziation mit Komorbiditäten, unter anderem kardiovaskuläre Erkrankungen und Mortalität. In Übereinstimmung mit uns fanden die Autoren bei den Hämodialysepatienten stark erhöhte PTX3-Plasmaspiegel, die mit dem Vorliegen einer koronaren Herzkrankheit sogar signifikant korrelierten ($p<0,05$). Beim Vorliegen von Komorbiditäten zeigte sich ein zusätzlicher Anstieg der PTX3 Konzentration und erhöhtes Plasma-PTX3 war unabhängig mit dem Mortalitätsrisiko assoziiert [129].

Zu unseren Daten muss kritisch angemerkt werden, dass sich erst bei einer gemeinsamen Betrachtung von Dialysepatienten und niereninsuffizienten Patienten eine Korrelation zwischen PTX3 und KHK zeigte. Auch das Stadium der KHK und pAVK wurde nicht näher bestimmt und die Fallzahl war klein. Genauere Aussagen werden größere Kohortenstudien mit einer genaueren Differenzierung der kardiovaskulären Erkrankungen treffen können.

5.6 PTX3 Spiegel bei Dialysepatienten

Unsere Feststellung, dass die PTX3-Plasmaspiegel bei Hämodialysepatienten stark erhöht sind, wurde inzwischen von einer anderen Arbeitsgruppe bestätigt [129]. Auffallend an unseren Ergebnissen waren die unterschiedlichen PTX3-Plasmaspiegel bei den Dialysepatienten. Da Peritonealdialysepatienten erheblich niedrigere PTX3-Plasmaspiegel aufwiesen als Hämodialysepatienten, vermuten wir als Ursache für die unterschiedlichen PTX3-Konzentrationen eine Induktion der PTX3-Produktion durch das Hämodialyseverfahren. In diesem Zusammenhang ist darauf hinzuweisen, dass die Zirkulation des Blutes bei der Hämodialyse im Gegensatz zur Peritonealdialyse durch Schläuche mit körperfremder Oberfläche erfolgt, was eine stärkere Immunantwort zur Folge haben kann.

Es wäre aber auch möglich, dass bei der Peritonealdialyse mehr PTX3 entfernt wird als bei der Hämodialyse. Allerdings ist PTX3 ein sehr großes Molekül [71], was eine Entfernung durch Peritonealdialyse höchst unwahrscheinlich macht [8]. Zur weiteren Klärung könnten in zukünftigen Studien PTX3-Konzentrationen im Peritonealdialysat gemessen werden.

Eine weitere andere Ursache könnte sein, dass die Nierenersatztherapiedauer der untersuchten Hämodialysepatienten im Durchschnitt länger war (69 ± 10 Monate), als bei den Peritonealdialysepatienten (34 ± 5 Monate). Aber wenn man, wie wir bereits beschrieben haben, die Zeitdauer der Nierenersatztherapie adaptiert, zeigen sich immer noch signifikant höhere PTX3-Plasmaspiegel bei Hämodialysepatienten im Vergleich zu Peritonealdialysepatienten. In Anbetracht dieser Tatsache spricht die Korrelation von Nierenersatztherapiedauer und PTX3, auch für eine Stimulation der PTX3-Produktion durch die Hämodialyse.

Aufgrund der von uns gefundenen Korrelation zwischen Restnierenfunktion und PTX3-Plasmaspiegeln, könnte auch die Restnierenfunktion die Unterschiede der PTX3-Konzentrationen verursachen. Da der Unterschied bei der Restnierenfunktion von CAPD- und CKD-Patienten groß und die Differenz der PTX3-Plasmaspiegel beider Gruppen klein war, betrachten wir allerdings die Restnierenfunktion nicht als Hauptgrund für die hohen PTX3 Konzentrationen bei Hämodialysepatienten. Dies ist jedoch noch nicht geklärt. Die Daten von Tong et al. [130] sprechen dafür, dass die Retention doch eine Rolle spielt, da er schon bei nichtdialysierten Patienten im Stadium 5 der CKD ähnlich hohe PTX3-Spiegel findet, wie wir bei Hämodialysepatienten.

Bei unseren Untersuchungen konnten wir beim Vergleich der PTX3-Plasmaspiegel vor und nach Hämodialyse keinen direkten Anstieg des PTX3 nachweisen. Auch eine Kinetik der PTX3-Konzentrationen konnten wir nicht nachweisen. Die PTX3-Plasmaspiegel waren zwar 24 und 48 Stunden nach Hämodialyse leicht erhöht, aber dieser Trend verfehlte deutlich das Signifikanzniveau. Bei der Studie von Suliman et al. mit 200 Hämodialysepatienten wurden keine Messungen des PTX3 vor und nach der Hämodialyse durchgeführt [129].

Da wir nach der in vitro Zellstimulation, in den am Ende der Hämodialyse entnommenen Blutproben signifikant höhere PTX3-Konzentrationen fanden, als in den Blutproben vor Dialysebeginn, könnte auch in vivo durch die Hämodialyse eine vermehrte PTX3-Produktion induziert werden. Natürlich muss man aufgrund der geringen Fallzahl in diesem Versuch die Unterschiede der PTX3-Konzentration mit Vorsicht betrachten. Sollte dieser Versuch mit größeren Fallzahlen wiederholt werden, können durch inter- und intraindividuelle Unterschiede der PTX3 Konzentrationen die Ergebnisse anders ausfallen. Als mögliche Fehlerquelle kommt bei diesem Versuchsaufbau auch die Freisetzung von PTX3 durch Neutrophile in Betracht, die nachweislich PTX3 in ihren Granula speichern [113] und in vitro bei 37°C nicht lange überleben. Eine Inkubation nur der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) könnte genauere Aussagen treffen, auch bezüglich der Vitalität der Zellen und gegebenenfalls einen schnelleren Anstieg des PTX3 zeigen. Die schnelle in vivo Produktion von PTX3, zum Beispiel nach coronarem Stent (>10ng/ml nach 24 Stunden) [147], widerspricht jedoch nicht der, von uns gefundenen, langsamen in vitro Produktion. Es wurde schon häufiger gezeigt, dass in vitro die Produktion von Zytokinen wie dem IL-1 nach 24 Stunden am höchsten war [148], während die Plasmaspiegel in vivo schon nach 2 Stunden maximal erhöht waren [149].

6. Zusammenfassung

Einleitung:

Mit einer jährlichen Mortalität von 9% durch kardiovaskuläre Erkrankungen haben Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz je nach Alter ein 10-100fach erhöhtes Risiko gegenüber der Gesamtbevölkerung. Es wird diskutiert ob Pentraxine wie das CRP oder das PTX3 kausal für die Entstehung der Atherosklerose verantwortlich sind.

Pentraxine sind eine Familie von Akute-Phase-Proteinen die Mediatoren und Marker einer akuten Entzündungsreaktion im Körper sind. Während erhöhte CRP Werte bei Patienten mit renaler Insuffizienz und ihre Assoziationen mit kardiovaskulären Erkrankungen gut beschrieben sind, gibt es kaum Daten zu PTX3 in dieser Population.

Methoden:

Bei 44 Patienten mit chronischer Hämodialyse, 35 Patienten mit Peritonealdialyse und 39 Patienten mit nicht-dialysepflichtiger Niereninsuffizienz (GFR $27 \pm 3,3$ ml/min), sowie 14 Gesunden wurden PTX3-Plasmaspiegel bestimmt. Für Vergleiche zwischen, vor und nach der Hämodialyse wurden bei 22 ambulanten Hämodialysepatienten PTX3-Plasmaspiegel bestimmt. Bei 11 stationären Hämodialysepatienten wurden PTX3-Plasmaspiegel vor Hämodialyse, sowie nach 3, 24 und 48 Stunden bestimmt. Vor und nach der Hämodialyse gewonnenes Vollblut dieser Patienten wurde für 96 Stunden inkubiert.

Ergebnisse:

Die PTX3-Plasmaspiegel von Hämodialysepatienten waren signifikant ($p < 0,01$) höher ($5,8 \pm 0,6$ ng/ml) als die aller anderen drei Gruppen. Es bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen Peritonealdialysepatienten ($1,5 \pm 0,4$ ng/ml), Patienten mit nicht-dialysepflichtiger Niereninsuffizienz ($1,5 \pm 0,4$ ng/ml) und Gesunden ($0,71 \pm 0,3$ ng/ml). Bei den Patienten unter Nierenersatztherapie (HD und PD) fanden wir eine signifikante ($p < 0,02$, $r = 0,27$) Korrelation zwischen erhöhten PTX3-Spiegeln und Dialysedauer, eine signifikante Korrelation zwischen PTX3-Plasmaspiegeln und Erythropoetindosis ($p = 0,001$, $r = 0,30$), sowie eine signifikante negative Korrelation zwischen PTX3-Plasmaspiegeln und Restnierenfunktion ($p = 0,02$, $r = -0,25$). Hämodialysepatienten mit koronarer Herzkrankheit hatten höhere PTX3-Plasmaspiegel als die nicht Betroffenen ($p = 0,06$). PTX3 korreliert besser mit pAVK und KHK als CRP.

Ein unmittelbarer Anstieg der PTX3-Plasmaspiegel während der Hämodialyse konnte nicht nachgewiesen werden. Auch 24 und 48 Stunden nach Hämodialyse zeigte sich kein signifikanter Anstieg der PTX3-Plasmaspiegel.

Inkubationsversuche mit und ohne LPS zeigten, dass 3 Stunden nach der Dialyse entnommenes Blut signifikant mehr PTX3 produzierte, als Blut, das vor der Hämodialysesitzung gewonnen wurde.

Diskussion:

PTX3-Plasmaspiegel bei Hämodialysepatienten sind im Gegensatz zu den Spiegeln von Patienten mit Peritonealdialyse und nichtdialysepflichtiger Niereninsuffizienz stark erhöht. Als mögliche Ursache kommt in Betracht, dass die Nierenersatztherapiedauer der untersuchten Hämodialysepatienten im Durchschnitt deutlich länger war, als bei Peritonealdialysepatienten. Zudem korreliert PTX3 mit der Dialysedauer. Für eine Retention als Ursache spricht, dass die Peritonealdialysepatienten eine bessere Restnierenfunktion und niedrigere PTX3-Plasmaspiegel hatten.

Auch eine Induktion der PTX3-Produktion durch das Hämodialyseverfahren ist möglich, da Blut, das nach Hämodialyse entnommen wurde *in vitro* mehr PTX3 produzierte, als Blut das vor Hämodialyse entnommen wurde. Es besteht jedoch eine Diskrepanz zwischen den PTX3-Plasmaspiegeln nach Hämodialyse und zellulärer PTX3 Produktion nach Hämodialyse.

Die Assoziation von PTX3 und kardiovaskulären Erkrankungen zeigt eine mögliche Verbindung zwischen den Pentraxinen und dem erhöhten Mortalitätsrisiko von Hämodialysepatienten.

7. Methodischer Anhang

Chemikalien

Es wurden handelsübliche Chemikalien in Analysequalität der Firma Merck (Darmstadt) und Sigma Chemical (Deisenhofen) verwendet.

EDTA	Delta Select
Heparin	Hoffmann-LaRoche AG
RPMI-Medium	PAA Laboratories GmbH, Linz Austria
LPS	Sigma L2880, Deisenhofen, Deutschland
TMB (Tetramethylbenzidin)	Fluka –Chemie, Buchs, Schweiz
Polyoxyethylenesorbitan (Tween 20)	Sigma, St. Louis, USA
DMSO (Dimethyl Sulfoxid)	Sigma, Deisenhofen Deutschland
Milchpulver	Heirler Cenovis, Radolfzell, Deutschland
Streptavidinperoxidasekomplex	Amershan, Braunschweig, Deutschland

Labormaterialien

Pipetten	Eppendorff, Finnpietten
Handschuhe	Ansell Derma Clean
Kanülen	Becton Dickinson, New Jersey, USA
Spritzen	Braun, Melsungen, Deutschland
Falcon-Röhrchen (50 ml)	Becton Dickinson, New Jersey, USA
Falcon-Röhrchen (6 ml)	Becton Dickinson, New Jersey, USA
Parafilm „M“ Laboratory Film	American Can Company, Greenwich, CT, USA
ELISA-Platten	Nunc-Immuno Module, Nunc A/S Roskilde, Dänemark
24-Well Platten	Nunc, Roskilde, Dänemark

Geräte

Elisa-Photometer	MR 5000, Dynatech, Denkendorf, Deutschland
Brutschrank	CO2 Brutschrank, Heraeus Instruments
Zentrifuge	Biofuge fresco, Heraeus Instruments
Sterilbank	Laminair HBB 2448, Heraeus Instruments

Lösungen

CoatingPuffer:

21,2 g/l Natriumcarbonat (Na_2CO_3)

12,8 g/l Natriumhydrogencarbonat (Na_2HCO_3)

Natronlauge zur pH-Einstellung auf 10,5

PBS-Puffer:

2,1 g/l Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4),

90 g/l Natriumchlorid (NaCl)

7,26 g/l Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)

Natronlauge zur pH-Einstellung auf 7,4

Waschpuffer:

200 ml PBS-Puffer in 1800 ml destilliertem Wasser

100 μl Tween 20

Gallatipuffer:

8,4 g Zitronensäure-Monohydrat in 160 ml Aqua dest.

4N Kalilauge (KOH) zur pH-Einstellung auf 3,95

Wasserstoffperoxyd (H_2O_2) 30% (68 μl / 100ml Gallati-Lösung)

TMB-Lösung:

240 mg TMB (Tetramethylbenzidin)

5 ml DMSO (Dimethylsulfoxid)

5 ml 100% Ethanol

8. Literaturverzeichnis

1. Bundesverband_Niere, *QuaSi-Niere Bericht 2006/2007*. 2008.
2. Lysaght, M.J., *Maintenance dialysis population dynamics: current trends and long-term implications*. J Am Soc Nephrol, 2002. 13 Suppl 1: p. S37-40.
3. Fillastre, J.P., [*A priority mission: prevention, early detection, identification of risk factors of progression of chronic renal insufficiency*]. Bull Acad Natl Med, 1999. 183(1): p. 79-85.
4. Manes, M., G. Paternoster, and S. Alloatti, [*Dialysis in the elderly. Indications for and efficacy of hemodialysis*]. Minerva Urol Nefrol, 1999. 51(2): p. 75-8.
5. Piper, W., *Innere Medizin*. Springer Lehrbuch, 2007: p. 284.
6. *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.
7. Popovich, R.P., et al., *Continuous ambulatory peritoneal dialysis. 1978*. J Am Soc Nephrol, 1999. 10(4): p. 901-10.
8. Nolph, K.D., *Peritoneal dialysis update 1994*. J Postgrad Med, 1994. 40(3): p. 151-7.
9. 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.
10. Foley, R.N., P.S. Parfrey, and M.J. Sarnak, *Epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease*. J Am Soc Nephrol, 1998. 9(12 Suppl): p. S16-23.
11. Mallick, N.P. and R. Gokal, *Haemodialysis*. Lancet, 1999. 353(9154): p. 737-42.
12. Pastan, S. and J. Bailey, *Dialysis therapy*. N Engl J Med, 1998. 338(20): p. 1428-37.
13. Tonelli, M., et al., *Chronic kidney disease and mortality risk: a systematic review*. J Am Soc Nephrol, 2006. 17(7): p. 2034-47.
14. 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.
15. Baigent, C., K. Burbury, and D. Wheeler, *Premature cardiovascular disease in chronic renal failure*. Lancet, 2000. 356(9224): p. 147-52.
16. Lameire, N., et al., *Cardiovascular risk factors and their management in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis*. Kidney Int Suppl, 1994. 48: p. S31-8.
17. Lindner, A., et al., *Accelerated atherosclerosis in prolonged maintenance hemodialysis*. N Engl J Med, 1974. 290(13): p. 697-701.
18. Luft, F.C., *Renal disease as a risk factor for cardiovascular disease*. Basic Res Cardiol, 2000. 95 Suppl 1: p. I72-6.
19. Ma, K.W., E.L. Greene, and L. Raij, *Cardiovascular risk factors in chronic renal failure and hemodialysis populations*. Am J Kidney Dis, 1992. 19(6): p. 505-13.
20. Sarnak, M.J. and A.S. Levey, *Cardiovascular disease and chronic renal disease: a new*

- paradigm*. Am J Kidney Dis, 2000. 35(4 Suppl 1): p. S117-31.
21. Coresh, J., et al., *Epidemiology of cardiovascular risk factors in chronic renal disease*. J Am Soc Nephrol, 1998. 9(12 Suppl): p. S24-30.
 22. Jungers, P., et al., *Incidence and risk factors of atherosclerotic cardiovascular accidents in predialysis chronic renal failure patients: a prospective study*. Nephrol Dial Transplant, 1997. 12(12): p. 2597-602.
 23. Qureshi, A.R., et al., *Inflammation, malnutrition, and cardiac disease as predictors of mortality in hemodialysis patients*. J Am Soc Nephrol, 2002. 13 Suppl 1: p. S28-36.
 24. Stenvinkel, P., et al., *Strong association between malnutrition, inflammation, and atherosclerosis in chronic renal failure*. Kidney Int, 1999. 55(5): p. 1899-911.
 25. Wanner, C., et al., *Inflammation and cardiovascular risk in dialysis patients*. Kidney Int Suppl, 2002(80): p. 99-102.
 26. Libby, P., P.M. Ridker, and A. Maseri, *Inflammation and atherosclerosis*. Circulation, 2002. 105(9): p. 1135-43.
 27. Stenvinkel, P., *C-reactive protein--does it promote vascular disease?* Nephrol Dial Transplant, 2006. 21(10): p. 2718-20.
 28. Ridker, P.M., et al., *Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men*. N Engl J Med, 1997. 336(14): p. 973-9.
 29. Heinrich, J., et al., *Association of variables of coagulation, fibrinolysis and acute-phase with atherosclerosis in coronary and peripheral arteries and those arteries supplying the brain*. Thromb Haemost, 1995. 73(3): p. 374-9.
 30. Ross, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. N Engl J Med, 1999. 340(2): p. 115-26.
 31. Jung, H.H., S.W. Kim, and H. Han, *Inflammation, mineral metabolism and progressive coronary artery calcification in patients on haemodialysis*. Nephrol Dial Transplant, 2006. 21(7): p. 1915-20.
 32. Oh, J., et al., *Advanced coronary and carotid arteriopathy in young adults with childhood-onset chronic renal failure*. Circulation, 2002. 106(1): p. 100-5.
 33. Krupinski, J., et al., *Endogenous expression of C-reactive protein is increased in active (ulcerated noncomplicated) human carotid artery plaques*. Stroke, 2006. 37(5): p. 1200-4.
 34. Peng, N., et al., *Angiotensin II-induced C-reactive protein generation: inflammatory role of vascular smooth muscle cells in atherosclerosis*. Atherosclerosis, 2007. 193(2): p. 292-8.
 35. Yeh, E.T., *CRP as a mediator of disease*. Circulation, 2004. 109(21 Suppl 1): p. II11-4.
 36. Li, H., et al., *An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium*. Arterioscler Thromb, 1993. 13(2): p. 197-204.
 37. Qiao, J.H., et al., *Role of macrophage colony-stimulating factor in atherosclerosis:*

- studies of osteopetrotic mice. Am J Pathol, 1997. 150(5): p. 1687-99.*
38. Libby, P., et al., *Macrophages and atherosclerotic plaque stability. Curr Opin Lipidol, 1996. 7(5): p. 330-5.*
 39. Kudo, S., et al., *Clearance and tissue distribution of recombinant human interleukin 1 beta in rats. Cancer Res, 1990. 50(18): p. 5751-5.*
 40. 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.*
 41. Schindler, R., et al., *Effect of the hemodialysis membrane on the inflammatory reaction in vivo. Clin Nephrol, 2000. 53(6): p. 452-9.*
 42. Loppnow, H., *[Cytokines: classification, receptors, mechanisms of action]. Internist (Berl), 2001. 42(1): p. 13-4, 17-27.*
 43. Stenvinkel, P. and A. Alvestrand, *Inflammation in end-stage renal disease: sources, consequences, and therapy. Semin Dial, 2002. 15(5): p. 329-37.*
 44. Tripepi, G., F. Mallamaci, and C. Zoccali, *Inflammation markers, adhesion molecules, and all-cause and cardiovascular mortality in patients with ESRD: searching for the best risk marker by multivariate modeling. J Am Soc Nephrol, 2005. 16 Suppl 1: p. S83-8.*
 45. Shalaby, M.R., A. Waage, and T. Espevik, *Cytokine regulation of interleukin 6 production by human endothelial cells. Cell Immunol, 1989. 121(2): p. 372-82.*
 46. Watanabe, E., et al., *Extremely high interleukin-6 blood levels and outcome in the critically ill are associated with tumor necrosis factor- and interleukin-1-related gene polymorphisms. Crit Care Med, 2005. 33(1): p. 89-97; discussion 242-3.*
 47. Heinrich, P.C., et al., *Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. Biochem J, 2003. 374(Pt 1): p. 1-20.*
 48. 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.*
 49. Biffl, W.L., et al., *Interleukin-6 in the injured patient. Marker of injury or mediator of inflammation? Ann Surg, 1996. 224(5): p. 647-64.*
 50. Pecoits-Filho, R., B. Lindholm, and P. Stenvinkel, *The malnutrition, inflammation, and atherosclerosis (MIA) syndrome -- the heart of the matter. Nephrol Dial Transplant, 2002. 17 Suppl 11: p. 28-31.*
 51. Kalantar-Zadeh, K., et al., *Malnutrition-inflammation complex syndrome in dialysis patients: causes and consequences. Am J Kidney Dis, 2003. 42(5): p. 864-81.*
 52. Kalantar-Zadeh, K., et al., *Inflammation and nutrition in renal insufficiency. Adv Ren Replace Ther, 2003. 10(3): p. 155-69.*
 53. Kaizu, Y., et al., *Interleukin-6 may mediate malnutrition in chronic hemodialysis patients. Am J Kidney Dis, 1998. 31(1): p. 93-100.*
 54. Keane, W.F. and A.J. Collins, *Influence of co-morbidity on mortality and morbidity in patients treated with hemodialysis. Am J Kidney Dis, 1994. 24(6): p. 1010-8.*

55. Lowrie, E.G. and N.L. Lew, *Death risk in hemodialysis patients: the predictive value of commonly measured variables and an evaluation of death rate differences between facilities*. Am J Kidney Dis, 1990. 15(5): p. 458-82.
56. Tepel, M., *Oxidative stress: does it play a role in the genesis of essential hypertension and hypertension of uraemia?* Nephrol Dial Transplant, 2003. 18(8): p. 1439-42.
57. Himmelfarb, J., *Oxidative stress in hemodialysis*. Contrib Nephrol, 2008. 161: p. 132-7.
58. Hasselwander, O. and I.S. Young, *Oxidative stress in chronic renal failure*. Free Radic Res, 1998. 29(1): p. 1-11.
59. Himmelfarb, J., J.M. Lazarus, and R. Hakim, *Reactive oxygen species production by monocytes and polymorphonuclear leukocytes during dialysis*. Am J Kidney Dis, 1991. 17(3): p. 271-6.
60. Kalousova, M., et al., *Advanced glycoxidation end products in chronic diseases-clinical chemistry and genetic background*. Mutat Res, 2005. 579(1-2): p. 37-46.
61. Nguyen, P.T., et al., *Prevalence and determinants of coronary and aortic calcifications assessed by chest CT in renal transplant recipients*. Am J Nephrol, 2007. 27(4): p. 329-35.
62. Parthasarathy, S., et al., *Oxidants and antioxidants in atherogenesis. An appraisal*. J Lipid Res, 1999. 40(12): p. 2143-57.
63. Rodriguez-Ayala, E., et al., *Enhanced RAGE-mediated NFkappaB stimulation in inflamed hemodialysis patients*. Atherosclerosis, 2005. 180(2): p. 333-40.
64. Pechanova, O. and F. Simko, *The role of nitric oxide in the maintenance of vasoactive balance*. Physiol Res, 2007. 56 Suppl 2: p. S7-S16.
65. Pereira, B.J., et al., *Diffusive and convective transfer of cytokine-inducing bacterial products across hemodialysis membranes*. Kidney Int, 1995. 47(2): p. 603-10.
66. Schindler, R., et al., *Gene expression of interleukin-1 beta during hemodialysis*. Kidney Int, 1993. 43(3): p. 712-21.
67. 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.
68. Kaysen, G.A. and V. Kumar, *Inflammation in ESRD: causes and potential consequences*. J Ren Nutr, 2003. 13(2): p. 158-60.
69. Lonnemann, G., et al., *Permeability of dialyzer membranes to TNF alpha-inducing substances derived from water bacteria*. Kidney Int, 1992. 42(1): p. 61-8.
70. Jaar, B.G., et al., *Septicemia in diabetic hemodialysis patients: comparison of incidence, risk factors, and mortality with nondiabetic hemodialysis patients*. Am J Kidney Dis, 2000. 35(2): p. 282-92.
71. 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.
72. Janeway, C.A., Jr., *The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self*. Immunol Today, 1992. 13(1): p. 11-6.

73. Gewurz, H., X.H. Zhang, and T.F. Lint, *Structure and function of the pentraxins*. *Curr Opin Immunol*, 1995. 7(1): p. 54-64.
74. Pepys, M.B., et al., *Analogues in other mammals and in fish of human plasma proteins, C-reactive protein and amyloid P component*. *Nature*, 1978. 273(5658): p. 168-70.
75. Shrive, A.K., et al., *C-reactive protein and SAP-like pentraxin are both present in Limulus polyphemus haemolymph: crystal structure of Limulus SAP*. *J Mol Biol*, 1999. 290(5): p. 997-1008.
76. Rubio, N., et al., *Structure, expression, and evolution of guinea pig serum amyloid P component and C-reactive protein*. *J Biochem*, 1993. 113(3): p. 277-84.
77. Tillett, W.S. and T. Francis, *Serological Reactions in Pneumonia with a Non-Protein Somatic Fraction of Pneumococcus*. *J Exp Med*, 1930. 52(4): p. 561-71.
78. Pepys, M.B. and G.M. Hirschfield, *C-reactive protein: a critical update*. *J Clin Invest*, 2003. 111(12): p. 1805-12.
79. 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.
80. Steel, D.M. and A.S. Whitehead, *The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein*. *Immunol Today*, 1994. 15(2): p. 81-8.
81. Herbelin, A., et al., *Elevated circulating levels of interleukin-6 in patients with chronic renal failure*. *Kidney Int*, 1991. 39(5): p. 954-60.
82. Zimmermann, J., et al., *Inflammation enhances cardiovascular risk and mortality in hemodialysis patients*. *Kidney Int*, 1999. 55(2): p. 648-58.
83. Docci, D., et al., *Elevated serum levels of C-reactive protein in hemodialysis patients*. *Nephron*, 1990. 56(4): p. 364-7.
84. Yasojima, K., et al., *Generation of C-reactive protein and complement components in atherosclerotic plaques*. *Am J Pathol*, 2001. 158(3): p. 1039-51.
85. Kobayashi, S., et al., *Interaction of oxidative stress and inflammatory response in coronary plaque instability: important role of C-reactive protein*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. 23(8): p. 1398-404.
86. Pasceri, V., J.T. Willerson, and E.T. Yeh, *Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells*. *Circulation*, 2000. 102(18): p. 2165-8.
87. Singh, U., et al., *C-reactive protein decreases endothelial nitric oxide synthase activity via uncoupling*. *J Mol Cell Cardiol*, 2007. 43(6): p. 780-91.
88. Venugopal, S.K., S. Devaraj, and I. Jialal, *C-reactive protein decreases prostacyclin release from human aortic endothelial cells*. *Circulation*, 2003. 108(14): p. 1676-8.
89. Han, K.H., et al., *C-reactive protein promotes monocyte chemoattractant protein-1-mediated chemotaxis through upregulating CC chemokine receptor 2 expression in*

- human monocytes*. *Circulation*, 2004. 109(21): p. 2566-71.
90. Cermak, J., et al., *C-reactive protein induces human peripheral blood monocytes to synthesize tissue factor*. *Blood*, 1993. 82(2): p. 513-20.
 91. Williams, T.N., et al., *C-reactive protein stimulates MMP-1 expression in U937 histiocytes through Fc[gamma]RII and extracellular signal-regulated kinase pathway:: an implication of CRP involvement in plaque destabilization*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. 24(1): p. 61-6.
 92. Shah, P.K. and Z.S. Galis, *Matrix metalloproteinase hypothesis of plaque rupture: players keep piling up but questions remain*. *Circulation*, 2001. 104(16): p. 1878-80.
 93. Wang, C.H., et al., *C-reactive protein upregulates angiotensin type I receptors in vascular smooth muscle*. *Circulation*, 2003. 107(13): p. 1783-90.
 94. 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.
 95. 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.
 96. Nauta, A.J., et al., *Biochemical and functional characterization of the interaction between pentraxin 3 and C1q*. *Eur J Immunol*, 2003. 33(2): p. 465-73.
 97. Rovere, P., et al., *The long pentraxin PTX3 binds to apoptotic cells and regulates their clearance by antigen-presenting dendritic cells*. *Blood*, 2000. 96(13): p. 4300-6.
 98. Garlanda, C., et al., *Non-redundant role of the long pentraxin PTX3 in anti-fungal innate immune response*. *Nature*, 2002. 420(6912): p. 182-6.
 99. Jeannin, P., et al., *Complexity and complementarity of outer membrane protein A recognition by cellular and humoral innate immunity receptors*. *Immunity*, 2005. 22(5): p. 551-60.
 100. 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.
 101. Szalai, A.J., et al., *C-reactive protein: structural biology and host defense function*. *Clin Chem Lab Med*, 1999. 37(3): p. 265-70.
 102. Abderrahim-Ferkoune, A., et al., *Characterization of the long pentraxin PTX3 as a TNFalpha-induced secreted protein of adipose cells*. *J Lipid Res*, 2003. 44(5): p. 994-1000.
 103. Doni, A., et al., *Production of the soluble pattern recognition receptor PTX3 by myeloid, but not plasmacytoid, dendritic cells*. *Eur J Immunol*, 2003. 33(10): p. 2886-93.
 104. Inrona, M., et al., *Cloning of mouse ptx3, a new member of the pentraxin gene family expressed at extrahepatic sites*. *Blood*, 1996. 87(5): p. 1862-72.
 105. 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.

106. Lee, G.W., T.H. Lee, and J. Vilcek, *TSG-14, a tumor necrosis factor- and IL-1-inducible protein, is a novel member of the pentaxin family of acute phase proteins*. J Immunol, 1993. 150(5): p. 1804-12.
107. Bussolati, B., et al., *The long pentraxin PTX3 is synthesized in IgA glomerulonephritis and activates mesangial cells*. J Immunol, 2003. 170(3): p. 1466-72.
108. Nauta, A.J., et al., *Human renal epithelial cells produce the long pentraxin PTX3*. Kidney Int, 2005. 67(2): p. 543-53.
109. Vouret-Craviari, V., et al., *Expression of a long pentraxin, PTX3, by monocytes exposed to the mycobacterial cell wall component lipoarabinomannan*. Infect Immun, 1997. 65(4): p. 1345-50.
110. Lee, G.W., et al., *Relationship of TSG-14 protein to the pentraxin family of major acute phase proteins*. J Immunol, 1994. 153(8): p. 3700-7.
111. 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.
112. Bosutti, A., et al., *Relation between the plasma levels of LDL-cholesterol and the expression of the early marker of inflammation long pentraxin PTX3 and the stress response gene p66ShcA in pacemaker-implanted patients*. Clin Exp Med, 2007. 7(1): p. 16-23.
113. 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.
114. Muller, B., et al., *Circulating levels of the long pentraxin PTX3 correlate with severity of infection in critically ill patients*. Crit Care Med, 2001. 29(7): p. 1404-7.
115. Peri, G., et al., *PTX3, A prototypical long pentraxin, is an early indicator of acute myocardial infarction in humans*. Circulation, 2000. 102(6): p. 636-41.
116. Latini, R., et al., *Prognostic significance of the long pentraxin PTX3 in acute myocardial infarction*. Circulation, 2004. 110(16): p. 2349-54.
117. Inoue, K., et al., *Establishment of a high sensitivity plasma assay for human pentraxin3 as a marker for unstable angina pectoris*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. 27(1): p. 161-7.
118. Hampel, D.J., et al., *Living kidney donation: anemia and inflammation in the early postoperative period*. Transplant Proc, 2006. 38(3): p. 661-3.
119. Bevelacqua, V., et al., *Long pentraxin 3: a marker of inflammation in untreated psoriatic patients*. Int J Mol Med, 2006. 18(3): p. 415-23.
120. Luchetti, M.M., et al., *Expression and production of the long pentraxin PTX3 in rheumatoid arthritis (RA)*. Clin Exp Immunol, 2000. 119(1): p. 196-202.
121. Cenci, E., et al., *Th1 and Th2 cytokines in mice with invasive aspergillosis*. Infect Immun, 1997. 65(2): p. 564-70.
122. Bozza, S., et al., *Pentraxin 3 protects from MCMV infection and reactivation through TLR sensing pathways leading to IRF3 activation*. Blood, 2006. 108(10): p. 3387-96.

123. Souza, D.G., et al., *Increased mortality and inflammation in tumor necrosis factor-stimulated gene-14 transgenic mice after ischemia and reperfusion injury*. *Am J Pathol*, 2002. 160(5): p. 1755-65.
124. Baruah, P., et al., *The pattern recognition receptor PTX3 is recruited at the synapse between dying and dendritic cells, and edits the cross-presentation of self, viral, and tumor antigens*. *Blood*, 2006. 107(1): p. 151-8.
125. Fazzini, F., et al., *PTX3 in small-vessel vasculitides: an independent indicator of disease activity produced at sites of inflammation*. *Arthritis Rheum*, 2001. 44(12): p. 2841-50.
126. van Rossum, A.P., et al., *Abundance of the long pentraxin PTX3 at sites of leukocytoclastic lesions in patients with small-vessel vasculitis*. *Arthritis Rheum*, 2006. 54(3): p. 986-91.
127. Salustri, A., et al., *PTX3 plays a key role in the organization of the cumulus oophorus extracellular matrix and in in vivo fertilization*. *Development*, 2004. 131(7): p. 1577-86.
128. Kotooka, N., et al., *Prognostic value of pentraxin 3 in patients with chronic heart failure*. *Int J Cardiol*, 2008. 130(1): p. 19-22.
129. Suliman, M.E., et al., *The long pentraxin PTX-3 in prevalent hemodialysis patients: associations with comorbidities and mortality*. *Qjm*, 2008. 101(5): p. 397-405.
130. Tong, M., et al., *Plasma pentraxin 3 in patients with chronic kidney disease: associations with renal function, protein-energy wasting, cardiovascular disease, and mortality*. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2007. 2(5): p. 889-97.
131. Wang, Y. and J.M. Regenstein, *Effect of EDTA, HCl, and citric acid on Ca salt removal from Asian (silver) carp scales prior to gelatin extraction*. *J Food Sci*, 2009. 74(6): p. C426-31.
132. Pepys, M.B., et al., *Targeting C-reactive protein for the treatment of cardiovascular disease*. *Nature*, 2006. 440(7088): p. 1217-21.
133. Bottazzi, B., et al., *Pentraxins as a key component of innate immunity*. *Curr Opin Immunol*, 2006. 18(1): p. 10-5.
134. 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.
135. Owen, W.F. and E.G. Lowrie, *C-reactive protein as an outcome predictor for maintenance hemodialysis patients*. *Kidney Int*, 1998. 54(2): p. 627-36.
136. Borazan, A., et al., *The effects of peritoneal dialysis and hemodialysis on serum tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6, interleukin-10 and C-reactive-protein levels*. *Mediators Inflamm*, 2004. 13(3): p. 201-4.
137. Macy, E.M., T.E. Hayes, and R.P. Tracy, *Variability in the measurement of C-reactive protein in healthy subjects: implications for reference intervals and epidemiological applications*. *Clin Chem*, 1997. 43(1): p. 52-8.
138. Boenisch, O., et al., *C-reactive-protein and cytokine plasma levels in hemodialysis patients*. *J Nephrol*, 2002. 15(5): p. 547-51.
139. Barany, P., J.C. Divino Filho, and J. Bergstrom, *High C-reactive protein is a strong*

- predictor of resistance to erythropoietin in hemodialysis patients.* Am J Kidney Dis, 1997. 29(4): p. 565-8.
140. Locatelli, F., et al., *Nutritional-inflammation status and resistance to erythropoietin therapy in haemodialysis patients.* Nephrol Dial Transplant, 2006. 21(4): p. 991-8.
 141. Napoleone, E., et al., *Long pentraxin PTX3 upregulates tissue factor expression in human endothelial cells: a novel link between vascular inflammation and clotting activation.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. 22(5): p. 782-7.
 142. Shlipak, M.G., et al., *Elevations of inflammatory and procoagulant biomarkers in elderly persons with renal insufficiency.* Circulation, 2003. 107(1): p. 87-92.
 143. Zoccali, C., et al., *Fibrinogen, mortality and incident cardiovascular complications in end-stage renal failure.* J Intern Med, 2003. 254(2): p. 132-9.
 144. Ridker, P.M., et al., *Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein.* N Engl J Med, 2008. 359(21): p. 2195-207.
 145. Salio, M., et al., *Cardioprotective function of the long pentraxin PTX3 in acute myocardial infarction.* Circulation, 2008. 117(8): p. 1055-64.
 146. Souza, D.G., et al., *The long pentraxin PTX3 is crucial for tissue inflammation after intestinal ischemia and reperfusion in mice.* Am J Pathol, 2009. 174(4): p. 1309-18.
 147. Kotooka, N., et al., *Pentraxin3 is a novel marker for stent-induced inflammation and neointimal thickening.* Atherosclerosis, 2008. 197(1): p. 368-74.
 148. Schindler, R., et al., *Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF.* Blood, 1990. 75(1): p. 40-7.
 149. Granowitz, E.V., et al., *Production of interleukin-1-receptor antagonist during experimental endotoxaemia.* Lancet, 1991. 338(8780): p. 1423-4.

Publikationsliste

Michael Boehme, F. Kaehne, A. Kuehne, W. Bernhardt, M. Schröder, W. Pommer, C. Fischer, H. Becker, C. Müller and Ralf Schindler, *Pentraxin 3 is elevated in haemodialysis patients and is associated with cardiovascular disease*. *Nephrol Dial Transplant*, 2007. 22(8): p. 2224-9.

Lebenslauf

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

Selbstständigkeitserklärung

„Ich, Michael Hjalmar Axel Böhme, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Assoziationen von Pentraxin3 und anderen inflammatorischen Markern mit Restnierenfunktion, Nierenersatztherapiedauer und kardiovaskulären Erkrankungen bei Dialysepatienten“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift