

Klinik für Innere Medizin IV, Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

Direktor: Prof. Dr. H. Köhler

**BEEINFLUSSUNG VON CHRONISCHER
INFLAMMATION UND ENDOTHELIALER
DYSFUNKTION BEI TERMINALER
NIERENINSUFFIZIENZ DURCH EINE
POLYMETHYLMETHACRYLAT- IM VERGLEICH ZU
EINER HÄMOPHAN-DIALYSEMEMBRAN**

DISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DES GRADES EINES DOKTORS DER MEDIZIN

DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2006

vorgelegt von:

Wiebke Schrempf

geb. am: 26.06.1978 in Winsen / Luhe

1 INHALTSVERZEICHNIS

1	INHALTSVERZEICHNIS	2
1.1	Abkürzungen	6
2	ZUSAMMENFASSUNG	9
2.1	Zusammenfassung	9
2.1.1	Hintergrund und Fragestellung	9
2.1.2	Methoden	10
2.1.3	Ergebnisse	10
2.1.4	Schlussfolgerung	11
2.2	Summary	12
2.2.1	Background	12
2.2.2	Methods	12
2.2.3	Results	13
2.2.4	Conclusions	14
3	EINLEITUNG	15
3.1	Chronische Niereninsuffizienz	15
3.2	Chronisch systemische Inflammation bei Niereninsuffizienz	16
3.3	Einfluss des Nierenersatzverfahrens auf die Inflammation	17
3.4	Beeinflussung der Inflammation durch verschiedene Filtermembranen	18
3.5	Inflammation und Atherosklerose	19
3.6	Endotheliale Dysfunktion und Ultraschallmonitoring	21
3.7	Ziel der Studie	22
4	MATERIAL UND METHODIK	23
4.1	Material	23
4.1.1	Reagenzien und Chemikalien	23
4.1.2	Verbrauchsmaterialien	24

4.1.3	Geräte	25
4.2	Versuchsaufbau (Studiendesign)	27
4.2.1	Klinische Studie	27
4.2.2	<i>In Vitro</i> -Versuch	28
4.3	Patientenkollektiv	29
4.3.1	Auswahl und Einteilung der Patienten und Kontrollpersonen	29
4.3.2	Daten zur Patientencharakterisierung	31
4.4	Hämodialyse	31
4.4.1	Filtermembranen	32
4.4.2	Gewinnung und Vorbereitung der Blutproben	34
4.4.3	Gewinnung und Vorbereitung der Ultrafiltratproben	34
4.5	Leukozytenstimulation	35
4.6	Ultraschallmessung der Arteria Brachialis	36
4.7	Immunologische Diagnostik	38
4.7.1	Interleukin 6-ELISA	38
4.7.2	C3a-des-Arg-ELISA	40
4.7.3	Löslicher Endotoxinrezeptor sCD14- ELISA	42
4.7.4	IL-1 Rezeptor-Antagonist-ELISA	44
4.8	β 2-Mikroglobulin	46
4.9	Statistische Auswertung	46
5	ERGEBNISSE	47
5.1	Vergleich der Patienten- und Kontrollgruppe	47
5.2	Hämodialysepatienten	50
5.2.1	Dialysedauer und Dialysequalität	50
5.2.2	Erythropoetin und antihypertensive Medikation	51

5.2.3	Laborparameter	52
5.3	Entzündungsparameter	54
5.3.1	Akut-Phase-Proteine	54
5.3.2	Interleukin-6	56
5.3.3	Komplementfaktor C3a	59
5.3.4	Löslicher Endotoxinrezeptor (sCD14)	61
5.3.5	IL-1 Rezeptor-Antagonist	64
5.4	β 2-Mikroglobulin	67
5.5	In Vitro Dialyse-Experimente	70
5.5.1	Interleukin-6	70
5.5.2	β 2-Mikroglobulin	72
5.6	Ultraschalluntersuchung der A. Brachialis	74
5.7	Daten zur Hypothese einer Adaptation des Immunsystems an die Dialyse	78
6	DISKUSSION	80
6.1	Patienten- und Kontrollgruppe	80
6.2	Dialyseparameter	80
6.3	Erythropoetin und antihypertensive Medikation	81
6.4	Laborparameter	81
6.5	Entzündungsparameter	82
6.5.1	Positive Akut-Phase-Proteine	82
6.5.2	Negative Akut- Phase- Proteine	83
6.5.3	Interleukin-6	84
6.5.4	Komplementaktivierung	85
6.5.5	Löslicher Endotoxinrezeptor sCD14	86
6.5.6	IL-1 Rezeptor-Antagonist	89
6.6	β 2 Mikroglobulin	90

6.7	Endotheliale Dysfunktion	92
6.8	Zusammenfassung	94
7	LITERATURVERZEICHNIS	95
8	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	107
9	TABELLENVERZEICHNIS	110
10	DANK	113
11	LEBENS LAUF	114

1.1 ABKÜRZUNGEN

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ABTS-Substrat	2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic azid
ADMA	asymmetrisches Dimethyl-Arginin
Ak	Antikörper
ANOVA	ANalysis Of VAriance
BSA	bovine serum albumin, Rinderalbumin
BMI	Body-mass-Index
β2-M	β2-Microglobulin
bzw.	beziehungsweise
C3a	Komplementfaktor
Ca	Calcium
CD	Cluster of Differentiation, Differenzierungsantigen
cm	Centimeter
CRP	C reaktives Protein
CU-Dialysemembran	Cuprophan-Dialysemembran
dest.	destilliert
dl	Deziliter
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunoadsorbent assay
ESRD	Endstage renal disease - Terminale Niereninsuffizienz
etc.	et cetera
FCS	foetal calf serum - fetales Kälberserum
G	Fliehkraft der Zentrifugation
g	Gramm
ges.	gesamt
GEW	Gesamteiweiß
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
H ₂ O	Wasser
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
Hb	Hämoglobin
HCl	Salzsäure

HD	Hämodialyse
HE	Hämophan-Filtermembran
HE vU	HD mit Hämophan-Filtermembran vor Umstellung
HE nU	HD mit Hämophan-Filtermembran nach Rückumstellung
Hkt	Hämatokrit
HRP	Horseradish peroxidase (Indikator-Enzym)
IL-6	Interleukin-6
IL-1Ra	Interleukin-1 Rezeptor-Antagonist
IMT	Intima-media-Dicke
K	Kalium
kB	kilo Basen
kDa	kilo Dalton
Korr.	korrigiert
Kt /V	Marker der Dialyse-Effizienz (K=-Harnstoff-Clearance der Dialysemembran, t=Dialysezeit, V=Gesamt-Körperwasser des Patienten)
L	liter
LPS	Lipopolysaccharid
m	männlich
M	molar
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
Min	Minuten
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mM	millimolar
µM	mikromolar
N	Normal
Na ⁺	Natrium
NaH ₂ PO ₄	Natriumhydrogenphosphat
NaOH	Natronlauge
nm	Nanometer
ng	Nanogramm
NO	Stickstoffmonoxid
nm	Nanometer
ns	nicht signifikant
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells - periphere Blut-Leukozyten
PBS	phosphat buffered saline - phosphatgepufferte Salzlösung

PMMA 1	1 Monat HD mit der PMMA-Dialysemembran
PMMA 2	2 Monate HD mit der PMMA-Dialysemembran
PMMA 3	3 Monate HD mit der PMMA-Dialysemembran
pg	Pikogramm
pH	pondus Hydrogenii
POD	Peroxidase
PO ₄	Phosphat
PMMA	Polymethylmethacrylat
QB	Blutfluß (ml/min)
QD	Dialysatfluß (ml/min)
sCD14	löslicher CD14-Rezeptor für Endotoxine
SD	standard deviation, Standardabweichung
t	Zeitpunkt t nach Beginn Hämodialysesitzung
Tab.	Tabelle
TMB	Tetramethylbenzidindihydrochlorid
TMP	Transmembrandruck (mmHg)
TNF- α	Tumor Necrosis Factor- α
U	Units
UFC	Ultrafiltrationskoeffizient (ml/h/mmHg)
vHD	Vor Beginn Hämodialysesitzung
vs.	versus
w	Weiblich
z.B.	zum Beispiel

2 ZUSAMMENFASSUNG

2.1 ZUSAMMENFASSUNG

2.1.1 HINTERGRUND UND FRAGESTELLUNG

Die chronische, systemische Inflammation bei Dialysepatienten, die zum einen durch die Akkumulation von Urämietoxinen infolge der verringerten Eliminationsfunktion der Niere und zum anderen durch die Nierenersatztherapie selbst entsteht, führt zu einer raschen Progression atherosklerotischer Veränderungen und einer damit einhergehenden erhöhten Morbidität und Mortalität durch kardiovaskuläre Ereignisse. Bei Hämodialysepatienten wurde eine Einschränkung der endothelvermittelten Vasodilatation vorbeschrieben, die als Einflussfaktor der hohen kardiovaskulären Ereignisrate angesehen wird. Die Entwicklung von synthetischen Dialysemembranen erfolgte mit dem Ziel, die Komplement- und Zellaktivierung und die damit verbundenen Eingriffe in die Körperhomöostase und die Auswirkungen auf das Immunsystem, die bei Verwendung von zellulosebasierten Dialysemembranen sichtbar wurden, zu verringern. Die synthetische Dialysemembran vom Polymethylmethacrylate (PMMA) Typ zeichnet sich darüber hinaus durch besondere adsorptive Eigenschaften aus und könnte so besonders effektiv immunaktive Proteine und Mediatoren aus der Zirkulation entfernen.

Die vorliegende Arbeit sollte prüfen, ob bei chronisch intermittierender Hämodialyse Unterschiede zwischen einer neueren, hochadsorptiven synthetischen Dialysemembran und einer modifizierten Zellulose-Dialysemembran im Hinblick auf ihre Biokompatibilität im Sinne der Auswirkung beider Membranen auf Komplementaktivierung, Ausschüttung von Zytokinen und Akut-Phase-Proteinen sowie auf endothelvermittelte Vasodilatation nachweisbar sind.

2.1.2 METHODEN

Sechs durch chronisch intermittierende Hämodialyse mit einer zellulosebasierten Hämophan-Membran (HE) vorbehandelte Patienten wurden zunächst zwölf Wochen lang mit einer synthetischen Polymethylmethacrylat-Membran (PMMA) dialysiert. Anschließend wurde die Behandlung mit der Hämophan-Dialysemembran fortgesetzt. Zum Nachweis der Bildung, Filtration und Adsorption von Zytokinen und Mediatoren wurden Interleukin-6, β 2-Mikroglobulin, der Interleukin-1 Rezeptor-Antagonist, der lösliche Endotoxinrezeptor sCD14 sowie der Komplementfaktor C3a mithilfe der ELISA-Technik in Serum bzw. Plasma und Dialysat sowie Leukozytenkulturüberständen bestimmt. Die Messung der durch eine reaktive Hyperämie auf einen definierten Ischämieerz hervorgerufenen, endothelvermittelten Vasodilatation unter Einfluss beider Membranen erfolgte durch sonographische Untersuchung der Arteria brachialis nach einem standardisierten Protokoll. Zur statistischen Auswertung wurden der One-way-ANOVA bzw. t-Test für unverbundene Stichproben (Mann-Whitney-Test) eingesetzt.

2.1.3 ERGEBNISSE

Bei Behandlung mit der synthetischen PMMA-Filtermembran konnte im Vergleich zu der HE-Dialysemembran eine signifikante Reduktion der Interleukin-6-Produktion durch monozytäre Zellen des peripheren Blutes nach Stimulation mit Lipopolysaccharid gezeigt werden (HE vs. PMMA nach 3 Monaten: $22,0 \pm 11,1$ vs. $13,2 \pm 6,2$ ng/ml, $p < 0,05$). Außerdem ließen sich bei Therapie mit der PMMA-Membran signifikant höhere Serumkonzentrationen des löslichen Endotoxinrezeptors sCD14 vor und nach 2 Stunden Dialyse (vor Dialyse: HE vs. PMMA nach 3 Monaten: $7,06 \pm 0,8$ vs. $12,2 \pm 2,8$ μ g/ml, $p < 0,05$; nach 2 Stunden Dialyse HE vs. PMMA nach 3 Monaten: $7,3 \pm 1,2$ vs. $11,7 \pm 1,9$ μ g/ml, $p < 0,01$) nachweisen. Auch die Komplementaktivierung vor Dialysebeginn war mit der PMMA-Dialysemembran signifikant niedriger als mit der HE-Dialysemembran (HE vs. PMMA nach 3 Monaten: 449 ± 250 vs. $142 \pm 27,9$ ng/ml, $p < 0,05$). Im Dialysat waren bei Behandlung mit der synthetischen Dialysemembran signifikant höhere Mengen des Interleukin-1 Rezeptor-Antagonisten meßbar (HE vs. PMMA nach 2 Monaten: $14,9 \pm 3,5$ vs. $29,0 \pm 12,7$ pg/ml, $p < 0,05$). Bei Verwendung der PMMA-Membran kam es im

Gegensatz zur HE-Dialysemembran zu einem signifikanten Abfall der β 2-Mikroglobulin-Konzentration im Plasma nach 15 Minuten Dialyse durch Adsorption an die Filtermembran (HE vs. PMMA nach 3 Monaten: $33,0 \pm 8,5$ vs. $16,2 \pm 4,5$ mg/l, $p < 0,05$) und zu einer signifikanten Verminderung des Gesamteiweiß im Serum (HE vs. PMMA nach 3 Monaten: $75,0 \pm 5,2$ vs. $68,8 \pm 7,5$ g/dl, $p < 0,01$). Hingegen waren keine signifikanten Unterschiede bei den Konzentrationen der anderen Akut-Phase-Proteine und einer Reihe von Routine-Laborparametern nachweisbar. Ebenso wenig wurden signifikante Differenzen zwischen beiden Membranen im Hinblick auf die endothelvermittelte Vasodilatation beobachtet.

2.1.4 SCHLUSSFOLGERUNG

In der vorliegenden Pilotstudie unterschied sich die synthetische Dialysemembran von der HE-Membran durch eine insbesondere nach drei Monaten nachweisbare Reduktion der Komplementaktivierung, der IL-6 Ausschüttung, eine signifikant höhere Elimination von β 2-Mikroglobulin sowie durch höhere sCD14-Serumspiegel. Das Ausmaß der endothelialen Dysfunktion blieb hingegen unverändert. Die hier erhobenen Befunde sprechen insgesamt für eine gegenüber der HE-Membran günstigere Biokompatibilität der PMMA-Membran. Die verminderte Immunaktivierung (Komplement), eine vermehrte Filtration (IL-1Ra) sowie Adsorption (β 2-M) wirken hierzu synergistisch. Dass sich dies nicht auf eine Veränderung der mit unserem Verfahren meßbaren endothelialen Dysfunktion auswirkt, kann verschiedene Ursachen haben, darunter ein zu geringes Ausmaß der Inflammationssenkung, eine zu geringe Sensitivität des Meßverfahrens oder eine bereits fixierte Gefäßschädigung bei längerfristig dialysepflichtigen Patienten. Langzeitstudien sind notwendig, um eine eventuelle Reversibilität der endothelialen Dysfunktion und den Benefit bei Therapie mit synthetischen Membranen abzuschätzen.

2.2 SUMMARY

2.2.1 BACKGROUND

In patients with chronic renal failure, both the accumulation of uremic toxins and the dialysis associated alterations of homeostasis result in a systemic inflammatory condition, which is responsible for rapid progression of atherosclerotic lesions with consecutively higher morbidity and mortality due to cardiovascular events. In these patients reduced endothelial function was found to be an influencing factor for the high prevalence of cardiovascular events. The development of synthetic dialysis membranes intended to address these issues by decreasing alterations in homeostasis and by reducing the amount of complement- and cell activation associated with the use of cellulosic membranes. Synthetic dialysis membranes in particular polymethylmethacrylate (PMMA) are designed to effectively remove immunoactive proteins and mediators from the circulation by adsorption. The aim of this study was to investigate potential differences between a synthetic dialysis membrane and a modified cellulosic membrane regarding their biocompatibility as defined by effects on complement activation, synthesis of cytokines and acute phase proteins and on endothelial function.

2.2.2 METHODS

Six patients receiving chronic intermittent hemodialysis with a modified cellulosic hemophan dialysis membrane (HE) were switched to treatment with a synthetic polymethylmethacrylate membrane. After a period of 12 weeks, they were switched back to treatment with the hemophane dialysis membrane. Interleukin-6 (IL-6), β 2-microglobuline, Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra), soluble endotoxin receptor (sCD14) and complement factor C3a were examined in plasma, serum and dialysate and also in *in vitro* cultures of peripheral blood cells by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). For the assessment of the endothelial function of the brachial artery, ultrasound

techniques were used after inducing reactive hyperemia according to a defined protocol. For statistical analysis One-way-ANOVA and t-test (Mann-Whitney-Test) were used.

2.2.3 RESULTS

During hemodialysis with the PMMA membrane a significant decrease of LPS-stimulated interleukin-6 synthesis by monocytes was observed compared to the treatment period with the hemophane membrane (HE vs. PMMA after 3 months $22,0 \pm 11,1$ ng/ml vs. $13,2 \pm 6,2$ ng/ml, $p < 0,05$). In addition, serum levels of soluble endotoxin receptor sCD14 before and after 2 hours of hemodialysis were significantly increased during treatment with the PMMA membrane (before dialysis treatment: HE vs. PMMA after 3 months: $7,06 \pm 0,8$ vs. $12,2 \pm 2,8$ $\mu\text{g/ml}$, $p < 0,05$; after 2 hours treatment HE vs. PMMA after 3 months: $7,3 \pm 1,2$ vs. $11,7 \pm 1,9$ $\mu\text{g/ml}$, $p < 0,01$). In addition a significant decrease in complement activation could be demonstrated before dialysis (HE vs. PMMA after 3 months: 449 ± 25 vs. $142 \pm 27,9$ ng/ml, $p < 0,05$). Furthermore, Interleukin-1 receptor antagonist concentrations were significantly higher in dialysate collected from patients treated with the PMMA membrane (HE vs. PMMA after 2 months: $14,9 \pm 3,5$ vs. $29,0 \pm 12,7$ pg/ml, $p < 0,05$). The β_2 -microglobuline plasma concentration was significantly decreased during treatment with the PMMA membrane due to adsorption to the dialysis membrane (HE vs. PMMA after 3 months: $33,0 \pm 8,5$ vs. $16,2 \pm 4,5$ mg/l, $p < 0,05$). There was also a significant reduction in total serum protein when using the PMMA dialysis membrane (HE vs. PMMA after 3 months: $75,0 \pm 5,2$ g/dl vs. $68,8 \pm 7,5$ g/dl, $p < 0,01$). No differences in concentrations of acute phase proteins or routine laboratory parameters were noticed. Also no difference was found regarding the endothelial function.

2.2.4 CONCLUSIONS

The key finding of our study was that the secretion of IL-6 and the complement activation as well as β 2-microglobuline concentration were significantly reduced whereas levels of sCD14 increased when switching from a cellulosic membrane to a synthetic dialysis membrane. No changes in endothelial function could be observed. These findings suggest a higher biocompatibility of the PMMA dialysis membrane. Decreased activation of the immune system (complement activation), increased filtration (IL-1Ra) and adsorption (β 2-M) act on this in a synergistic manner. The lack of an effect on the endothelial function as measured by ultrasound techniques may be due to various reasons: (i) Changes in endothelial function may be below the level of sensitivity of our measurement technique. (ii) Inflammatory parameters may not be sufficiently reduced to induce a sustained improvement of endothelial function. (iii) The vascular damage in longterm dialysed patients might already be firmly established so that it cannot be readily corrected by switching to a more biocompatible membrane. Thus, further longterm-studies using both clinical outcome parameters and surrogate markers are needed to evaluate the reversibility of the endothelial dysfunction and the potential benefit of the synthetic dialysis membrane.

3 EINLEITUNG

3.1 CHRONISCHE NIERENINSUFFIZIENZ

Als chronische Niereninsuffizienz wird eine irreversible Störung der physiologischen in- und exkretorischen sowie der Metabolisierungs- und Ausscheidungsfunktion der Niere bezeichnet. Diese kann primär im Rahmen von Nierenerkrankungen, die glomerulär, tubulointerstitiell oder vaskulär bedingt sein können, oder sekundär aufgrund von Systemerkrankungen entstehen. Die diabetische Nephropathie besonders des Typ-II-Diabetikers ist die häufigste Ursache der chronischen Niereninsuffizienz. Je nach Klinik und verbliebener glomerulärer Filtrationsrate werden fünf verschiedene Schweregrade unterschieden. Das Stadium V entspricht der terminalen Niereninsuffizienz, die durch einen lebensbedrohlichen Ausfall der Nierenfunktion mit Auswirkungen auf das kardiovaskuläre, neurologische, endokrine und hämatologische System durch anfallende Urämietoxine, hormonelle Störungen und Einschränkungen der Zellfunktion gekennzeichnet ist und entweder eine Nierenersatztherapie oder eine Nierentransplantation erforderlich macht. Die vor allem aus dem Purin- und Eiweißstoffwechsel stammenden Urämietoxine, insbesondere Moleküle bis 69000 Dalton, kumulieren, da sie aufgrund der eingeschränkten Nierenfunktion nicht glomerulär filtriert werden können. Hierbei kommt neben Harnstoff und Kreatinin auch den mittelgroßen Molekülen mit einer Größe zwischen 500 und 5000 Dalton, die durch Nierenersatzverfahren nur unzureichend entfernt werden, eine besondere Bedeutung bei der Beeinflussung der Körperhomöostase zu. Aber auch Zytokine und andere immunaktive Proteine, die physiologischerweise renal abgebaut werden, gehören zu den Urämietoxinen. Die Effektivität, mit der Urämietoxine und andere Stoffe durch die Hämodialyse entfernt werden können, wird sowohl durch deren Molekularstruktur, elektrische Ladung, Hydrophilität bzw. Hydrophobität als auch durch die Porengröße der Dialysemembran beeinflusst. Bestimmte synthetische Dialysemembranen können zusätzlich durch Adsorption an ihre Oberfläche immunaktive Proteine aus der Zirkulation entfernen, ohne sie zu filtrieren. Zudem spielen das Vorhandensein von Plasma-Antagonisten und die Rezeptorbindung der Mediatoren eine Rolle bei der Dialyse-

Effektivität, da Substanzen nur in ungebundener Form aus dem Plasma entfernt werden können.

3.2 CHRONISCH SYSTEMISCHE INFLAMMATION BEI NIERENINSUFFIZIENZ

Die chronische Inflammation bei Niereninsuffizienz entsteht durch die Einschränkung der Ausscheidungs- und Metabolisierungsfunktion der Niere, so dass es zu einer veränderten Kinetik mit erhöhten Plasma-Spiegeln sowohl von Zytokinen und deren löslichen Rezeptoren als auch von membrangebundenen Signalmolekülen sowie Komplementfaktoren kommt (HERBELIN, 1991). Diese und die anfallenden Urämietoxine tragen zur verstärkten Voraktivierung von monozytären Zellen mit konsekutiv erhöhter Zytokinproduktion bei. Die Verschiebung des Gleichgewichts zwischen freien Radikalen und Antioxidantien mit Störung der antioxidativen Systeme z.B. des Glutathion-Systems durch die Urämie-assoziierten Veränderungen, die als oxidativer Streß bezeichnet wird (CEBALLOS-PICOT I, 1996), führt zum Überwiegen freier Sauerstoffradikale und ist für die Bildung chemisch modifizierter Struktur- und Funktionsbausteine, die zur Monozytenaktivierung beitragen (WITKO-SARSAT, 1998) und auch in β -Amyloidablagerungen nachgewiesen werden können, verantwortlich. (MIYATA, 1997). Diese Veränderungen führen über verschiedene Mechanismen zu einer rasch progredienten Atherosklerose mit erhöhter kardiovaskulärer Mortalität. Aufgrund der Regulation der hepatischen Akut-Phase-Antwort durch Zytokine, insbesondere durch IL-6, bewirkt deren Retention eine Umstellung der Proteinsynthese auf die Bildung von CRP, Serum-Amyloid-A und Ferritin sowie Fibrinogen mit nachfolgendem Mangel an Proteinen des Erhaltungsstoffwechsels wie z.B. Albumin (MARINKOVIC, 1989, CAVAILLON, 1992). Dies führt u.a. zur Malnutrition, die mit einer erhöhten Mortalität und Morbidität bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz assoziiert ist (IKIZLER, 1999). Durch Einschränkung der Ausscheidungsfunktion kommt es auch zu einer durch β 2-Mikroglobulin-Ablagerung induzierten Amyloidose. Zudem bewirken die Veränderungen der Stoffwechsellage eine Suppression der Erythropoese und Erythropoetin-Bildung sowie ein vermindertes Ansprechen auf exogen zugeführtes Erythropoetin mit konsekutiver Anämie (STENVINKEL, 2001).

3.3 EINFLUSS DES NIERENERSATZVERFAHRENS AUF DIE INFLAMMATION

Das Ziel einer Nierenersatztherapie ist die Elimination der urämischen Toxine, der akkumulierten löslichen Stoffe und die Entfernung überschüssiger Flüssigkeit möglichst ohne einschneidende Eingriffe in die physiologischen Vorgänge des Körpers. Insbesondere kommen hierzu die Hämodialyse und die Peritonealdialyse zum Einsatz, diese tragen jedoch selbst durch verschiedene Mechanismen zu Alterationen des Immunsystems bei. Zum einen wird das Immunsystem, insbesondere die zelluläre Abwehr, durch den Kontakt mit der körperfremden Membran bei der Hämodialyse aktiviert (HAUBITZ, 1996). Zum anderen stören die Nierenersatzverfahren durch die gleichzeitige Elimination von Zytokinen und deren Inhibitoren das physiologische Gleichgewicht von Inflammation und Anti-Inflammation. Als möglicher Zusatzfaktor bei der Aktivierung des Immunsystems wird der Übertritt von Endotoxinfragmenten aus dem Dialysat ins Blutkompartiment diskutiert (PANICHI, 1998). Patienten mit Nierenersatztherapie zeigen eine veränderte Immunreaktion sowohl der zellulären als auch der humoralen Antwort (DESCAMPS-LATSCHA, 1993, MATSUMOTO, 1998). Es läßt sich eine Abwehrschwäche gegenüber bakteriellen Infektionen, eine verminderte phagozytische Aktivität von Makrophagen, Änderungen der Funktion von T- und B-Lymphozyten sowie Natürlichen-Killer-Zellen und eine abgeschwächte Antwort auf Hepatitis-B-Impfungen nachweisen (GIRNDT, 2001). Zudem wurde bei Dialysepatienten eine erhöhte Wahrscheinlichkeit an Krebsleiden zu erkranken, festgestellt.

3.4 BEEINFLUSSUNG DER INFLAMMATION DURCH VERSCHIEDENE FILTERMEMBRANEN

Die bei der Hämodialyse eingesetzten Filtersysteme führen aufgrund ihrer Beschaffenheit zu unterschiedlich starken Beeinträchtigungen des Immunsystems. Hierbei werden insbesondere zellulosebasierende wie z.B. Hämophan-Dialysemembranen (HE) und synthetische, auf Kunststoffpolymeren basierende Dialysemembranen wie z.B. Polymethylmethacrylat-Dialysemembranen (PMMA) unterschieden. Diese werden im Hinblick auf ihre Biokompatibilität, die allgemein als das Fehlen störender Einflüsse auf Blutkomponenten definiert wird, beurteilt (CHEUNG, 1990). Als Bioinkompatibilitäts-Messgrößen wurden bisher vor allem die Stärke der Aktivierung des Komplementsystems sowie die Ausschüttung von Zytokinen wie TNF α , IL-1 und IL-6 bestimmt. CAPPELLI et al (1989) wiesen eine deutlich geringere Komplementaktivierung durch eine Polymethylmethacrylat-Dialysemembran im Vergleich zu einer Hämophan- und einer Cuprophan-Dialysemembran nach. Unterschiede in Bezug auf die Filtration und insbesondere Adsorption von löslichen Mediatoren und Zytokinen wurden vor allem im Hinblick auf β 2-Mikroglobulin untersucht. Hierbei ließ sich eine Adsorption von Mediatoren lediglich bei synthetischen Membranen in unterschiedlichem Ausmaß je nach Membranbeschaffenheit beobachten. In Bezug auf die Mortalität konnte bisher nur in retrospektiven Analysen ein Überlebensvorteil der mit synthetischen Membranen und modifizierten Zellulose-Dialysemembranen behandelten Patienten gegenüber herkömmlichen Zellulose-Membranen gezeigt werden (HAKIM, 1996). Jedoch konnte in prospektive Studien bisher kein Überlebensvorteil durch die Behandlung mit synthetischen Dialysemembranen gezeigt werden. BLOEMBERGEN und Mitarbeiter (1999) wiesen eine signifikante Reduktion der Sterblichkeit bezogen auf bestimmte Todesursachen wie Infektionen und KHK bei Verwendung synthetischer oder modifizierter Zellulose- im Vergleich zu herkömmlichen Zellulose-Dialysemembranen, jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede bei anderen Todesursachen wie z.B. cerebrovaskulären Ereignissen nach.

3.5 INFLAMMATION UND ATHEROSKLEROSE

Die Mortalität bei Hämodialyse-Patienten ist im Vergleich zur Normalbevölkerung erhöht, dies ist insbesondere auf kardiovaskuläre Erkrankungen, die bei Dialysepatienten häufiger auftreten als bei Gesunden, zurückzuführen. Zusätzlich zu den bekannten Risikofaktoren wie erhöhten Blutdruck- und Cholesterinwerten, Rauchen sowie Diabetes mellitus und nicht traditionellen Risikofaktoren wie der Hyperhomozysteinämie nehmen mit der Niereninsuffizienz und den Nierenersatzverfahren assoziierte Faktoren wie anfallende Urämietoxine, oxidativer Stress, Malnutrition und die dadurch entstehende chronische Entzündung Einfluß und führen zu einer rasch progredient verlaufenden Atherosklerose mit kardiovaskulären Ereignissen, die mehr als 50% der Todesfälle bei Dialysepatienten ausmachen. Von prädiktiver Bedeutung für die Mortalität und Morbidität sind hierbei sowohl erniedrigte Albumin-Spiegel als auch erhöhte CRP- und Zytokinkonzentrationen insbesondere von Interleukin-6 (BOLOGA, 1998; ZIMMERMANN, 1999). Selbst bei Gesunden zeigten sich erhöhte CRP-Konzentrationen als Prädiktoren für das Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen (RIDKER, 1997; RIDKER, 2000). Monozyten und Makrophagen sind direkt an der Entstehung und Progredienz der Atherosklerose beteiligt, da sie sich an Endothelläsionen anheften, Zytokine und Chemokine ausschütten und somit zu einer Rekrutierung anderer Entzündungszellen führen, die in den subendothelialen Raum einwandern. Es kommt zur Unterbrechung der Integrität der Endothelschicht durch die Einlagerung von Lipiden in die Gefäßwand, der Entstehung fibröser Plaques und Gewebsnekrosen und zum Umbau von glatten Muskelzellen zu Fasergewebe. Dies führt zur Einschränkung der endothelialen Funktion und birgt die Gefahr der Thrombenbildung und des Gefäßverschlusses bei Ruptur der Plaques (ROSS, 1999). Die bei Dialysepatienten im Vergleich zur Normalbevölkerung in höherer Anzahl zur Verfügung stehenden inflammatorisch aktivierten Monozyten wirken sich umso stärker auf das Fortschreiten der Gefäßwandveränderungen aus.

In mehreren Studien wurde ein Zusammenhang zwischen Einschränkungen der renalen Funktion und endothelialer Dysfunktion nachgewiesen. So zeigte sich bei Dialyse-Patienten und bei Patienten mit langjähriger Niereninsuffizienz sonographisch eine höhere Intima-media-Dicke (IMT) (KAWAGISHI, 1995) und eine im Vergleich zu altersentsprechenden Kontroll-Personen verstärkte Plaquebildung in den Carotiden, die mit erhöhten Spiegeln von oxidiertem LDL und erhöhten CRP-Konzentrationen korrelierte

(STENVINKEL, 1999). Ein Zusammenhang zwischen chronischer Entzündung und Atherosklerose erhärten z.B. auch die Ergebnisse einer Studie, die bei HD-Patienten signifikant höhere IL-6-Serumwerte als bei Gesunden und eine Korrelation mit der Zunahme des Durchmessers der Intima-media (IMT) nachwies (KATO, 2002).

3.6 ENDOTHELIALE DYSFUNKTION UND ULTRASCHALLMONITORING

Die sogenannte flussabhängige Vasodilatation entsteht wahrscheinlich durch die Registrierung von Abscher- bzw. Reibungsstress des Endothels bei Erhöhung der Blutflussgeschwindigkeit z.B. als Reaktion auf eine kurzdauernde Ischämie bei Belastung. Diese Vasodilatation wirkt der kontinuierlichen adrenergen und myotonen Vasokonstriktion entgegen und dient dazu, unter Belastung einen höheren Blutfluß zu ermöglichen und den Dehnungsreiz des Endothels auch bei erhöhten Blutflußgeschwindigkeiten durch die Aktivierung von Kalium- und Natriumkanälen im Endothel konstant zu halten. Der wichtigste Effektor scheint hierbei vom Endothel freigesetztes Stickstoffmonoxid (NO) zu sein (JOANNIDES, 1995), das aus L-Arginin durch die endotheliale Synthase gebildet wird. Kontinuierlich ausgeschüttete Mengen werden im Gegensatz zu intermittierend ausgeschüttetem NO für Lipidperoxidation und Endothelschädigung und somit für die endotheliale Dysfunktion mitverantwortlich gemacht. Oxidativer Stress entsteht durch ein Ungleichgewicht zwischen freien Radikalen und antioxidativen Systemen wie dem Gluthation-System und scheint einen direkten Einfluß auf die Entwicklung atherosklerotischer Plaques zu haben (HALLIWELL; 1993). Mögliche Ursachen der urämievermittelten Endotheldysfunktion bei Hämodialysepatienten könnten ein Mangel an NO durch eine reduzierte Aktivität der konstitutiven NO-Synthasen oder die Abnahme der Bioverfügbarkeit von L-Arginin sowie die Akkumulation von Inhibitoren der NO-Synthase z.B. von asymmetrischem Dimethyl-Arginin (ADMA) sein (VALLANCE, 1992, MACALLISTER, 1996). Diese These unterstützen Ergebnisse von CROSS et al (2001), die eine Verbesserung der endothelialen Funktion bei abnehmenden Serum-Spiegeln von ADMA nachwiesen. MIYAZAKI et al (2000) fanden eine negative Korrelation zwischen der endothelvermittelten Vasodilatation und Plasma-Spiegeln von oxidiertem LDL. In mehreren Studien wurde gezeigt, daß die Sonographie eine ausgezeichnete Methode zum Monitoring der endothelialen Funktion darstellt. CELERMAJER und Mitarbeiter (1992) beschrieben als erste die nicht-invasive Untersuchung der flussabhängigen Vasodilatation der A. brachialis durch die Okklusion der Arterie mit konsekutiver, reaktiver Hyperämie und Dilatation der Arterie nach Aufheben der Blutsperre. Seitdem wurde in

verschiedenen Studien die endotheliale Funktion mittels Ultraschall gemessen, da diese Methode wenig invasiv und gut reproduzierbar ist.

3.7 ZIEL DER STUDIE

Die vorliegende Arbeit sollte prüfen, ob Unterschiede zwischen einer synthetischen Dialysemembran im Vergleich zu einer modifizierten Zellulose-Dialysemembran bei chronisch intermittierender Hämodialyse im Hinblick auf die Biokompatibilität und die endotheliale Funktion bei Dialysepatienten nachweisbar sind. Es sollte erfasst werden, ob sich Unterschiede der Komplementaktivierung und der Stimulation von Leukozyten des peripheren Blutes mit unterschiedlichen Zytokin- und Akut-Phase-Protein-Spiegeln zeigen, die durch unterschiedliche Synthese oder auch durch unterschiedliche Elimination dieser Mediatoren durch Filtration und Adsorption erklärbar sind. Zudem wurde wegen der mit der Hämodialyse assoziierten Komplikationen wie Amyloidose das β 2-Mikroglobulin gemessen. Aufgrund des Einflusses der chronischen Inflammation auf atherosklerotische Veränderungen und der bei Dialysepatienten hohen Morbidität und Mortalität sollten anhand der Erfassung der endothelvermittelten Vasodilatation mittels Ultraschall mögliche klinisch relevante Unterschiede zwischen unterschiedlichen Dialysemembranen nachgewiesen werden. Hierbei sollte zudem geprüft werden, ob die Ultraschallmethodik in der Praxis durchführbar und aussagekräftig ist, insbesondere vor dem Hintergrund eines älteren Patientenkollektivs.

Somit sollten folgende Fragen in dieser Arbeit geklärt werden:

1. Unterscheiden sich beide Dialysemembranen im Hinblick auf ihre Biokompatibilität?
2. Ist eine Endotheldysfunktion bei Dialysepatienten nachweisbar ?
3. Haben die ggf. nachweisbaren Unterschiede der laborchemischen Parameter zwischen beiden Membranen Auswirkungen auf die Endotheldysfunktion ?

4 MATERIAL UND METHODIK

4.1 MATERIAL

4.1.1 REAGENZIEN UND CHEMIKALIEN

Aqua inieciabilia	Braun, Melsungen
Anti-human IL-6 (monoklonal), 554543	BD Pharmingen, Heidelberg
Anti-human IL-6 (biotinyliert), 554546	BD Pharmingen, Heidelberg
Avidin-Peroxidase, A 3151	Sigma-Aldrich, Seelze
ABTS Substrat, A 1888	Sigma-Aldrich, Seelze
(2,2 Azino-bis-3ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)	
BSA (Bovine Albumin Fraktion V), 8076.3	Roth, Karlsruhe
Citronensäureanhydrat, C-0759	Sigma-Aldrich, Seelze
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat, 6580	Merck, Darmstadt,
EDTA (Ethylenediamine tetraacetic.4Na salt)	Sigma-Aldrich, Seelze
Ethanol absolut	Sigma-Aldrich, Seelze
Fetales Kälberserum FCS, 0150 HQ,	PAALaboratories, Linz, Österreich
Glutamin 200mM	Gibco-linovitrogen 25030-24, Karlsruhe
IL-6-human rekombinant, IL6 CC	Strathman Biotech, Hamburg
LPS (<i>E. coli</i> O55:B5), L4524	Sigma-Aldrich, Seelze
Natriumchloridlösung (isoton)	Delta GmbH, Pfullingen
Natriumhydrogencarbonat, 6329,	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid, 6498	Merck, Darmstadt

Nunc-Immuno-Module, 469914 A,	Nunc, Wiesbaden
PBS (Dulbecco's Phosphat Puffer) L 182-10,	Biochrom, Berlin
Penicillin 100IU	PAALaboratories, Linz, Österreich
RPMI 1640, F1215	Biochrom, Berlin
Salzsäure (HCL) 31%, 9277.2,	Roth Karlsruhe
Schwefelsäure 95-97 %, 731	Merck, Darmstadt
Streptomycin 100µg	PAALaboratories, Linz, Österreich
TMB-Peroxidase-Substrat	Sigma-Aldrich, Seelze
Tween-20, 170-6531,	Bio-Rad, Hercules, USA
Wasserstoffperoxid 30 %, 21,676-3	Sigma-Aldrich, Seelze

ELISA-Kits:

IL-1Ra Cytoscreen Kit, KAC1181,	Biosource Europe Nivelles, Belgien
sCD14 ELISA, RE 59271,	BL Hamburg
C3a-desArg-ELISA, PR 59011	Progen, Heidelberg

4.1.2 VERBRAUCHSMATERIALIEN

Gewebekulturplatte 24 well steril, 662 160	Greiner, Frickenhausen
Ammonium-Heparin-Monovette	Saarstedt, Nürbrecht
Deckgläschen	Menzel, Braunschweig
Dialyse-Babyschlauch-System, A 5128-B4	Gambro, medical line, Hechingen
Einmal-Plastikpipetten (1ml,2ml,5ml,10ml,25ml)	Cornig Costar, Wiesbaden
Filterpipettenspitzen (10µl,20µl,100µl,1000µl)	Greiner, Frickenhausen
Monovette (EDTA)	Saarstedt, Nürbrecht

Monovette (Li-Heparin)	Saarstedt, Nürbrecht
Monovette (Serum)	Saarstedt, Nürbrecht
Mikrolance Nr.1 20G	Becton Dickinson, Heidelberg
Multiadapter	Sarstedt, Nürbrecht
Pipettenspitzen für Kolbenhubpipetten	Greiner, Frickenhausen
0,5 ml Reaktionsgefäße	NeoLab, Heidelberg
1,5 ml Reaktionsgefäße	Brand, Wertheim
15 ml-Röhrchen	Greiner, Frickenhausen
50 ml-Röhrchen	Greiner, Frickenhausen

4.1.3 GERÄTE

Brutschrank	Heraeus Instruments, Hanau
Eisflockenmaschine (Scotsman)	Tepa, Barsbüttel
Eppendorffzentrifuge (Minifuge), 5415C	Eppendorf, Hamburg
Gefrierschrank -20°C	Bosch, Einzelhandel
Gilson Kolbenhubpipetten (10µl,20µl,100µl,1000µl)	Abimed, Langenfeld
Infusomat fm	Braun, Melsungen
Kühlschrank +4°C	Liebherr, Einzelhandel
Laborwaage Sartorius	Sartorius, Göttingen
Manometer	ATP, Kappel-Grafenhausen
Mikroskop	Nikon, Düsseldorf
Photometer, MR5000	Dynatech, Braunschweig
	Bio-Rad, Microplate Reader 450
pH-Meter CG 825	Schott, Mainz

Pipetboy plus	Integra Biosciences, Fernwald
Ultraschallgerät	Acuson Sequoia, Malvern, USA
Schüttler	Dynatech, Varishaker, Braunschweig
Spannungsquelle Consort E452	UniEquip, Martinsried
Standautoklav 2540 EL	Systemec, Wettenberg
Sterilarbeitsplatz	IntegraBiosc., Technoflow, Zürich, Schweiz
Sterile Werkbank HB2472	Heraeus Instruments, Hanau
Wasserbad	Köttermann, Uetze, Deutschland
Vortex Mixer	neoLab, Heidelberg
Vortex Reax 2000	Heidolph, Schwabach
Wasseraufbereiter MilliQ UF plus	Millipore, Eschborn
Wasserbad W13	Haake, Karlsruhe
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus Instruments, Hanau
Zentrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg

4.2 VERSUCHSAUFBAU (STUDIENDESIGN)

4.2.1 KLINISCHE STUDIE

In der klinischen Studie sollte der Einfluß einer PMMA- und einer Hämophan-Dialysemembran auf die systemische, inflammatorische Aktivierung und die endotheliale Funktion bei Dialysepatienten verglichen werden. Die Studie wurde als Pilotstudie angelegt, mit der die Durchführbarkeit und Aussagekraft der Ultraschallmethodik festgelegt werden sollte.

In die Studie wurden sechs Patienten, die aufgrund einer terminalen Niereninsuffizienz seit mindestens drei Monaten eine Hämodialysebehandlung mit einer Hämophan-Dialysemembran (GFSplus20®, Gambro, Hechingen, Deutschland) erhielten, eingeschlossen. Die Hämodialyse wurde nach den initialen Messungen für die Dauer von drei Monaten mit einer Polymethylmethacrylat-Dialysemembran (1.6BK-F®, Toray, Japan) fortgesetzt. Anschließend erfolgte die erneute Umstellung auf die ursprüngliche zellulosebasierende Filtermembran. Zusätzlich zu den monatlichen Blutentnahmen der Routine-Laborparameter wurden Blutproben aus dem venösen Schenkel des Systems zur Bestimmung des Komplementfaktors C3a, des Zytokins IL-6, des löslichen Endotoxinrezeptors (sCD14), des β 2-Mikroglobulin (β 2-M) und des IL-1 Rezeptor-Antagonisten (IL-1Ra) gewonnen. Die Blutentnahmen erfolgten während der Behandlung mit der HE-Dialysemembran, dreimal in vierwöchentlichen Abständen während der Behandlung mit der PMMA- und nach Rückumstellung auf die HE-Filtermembran. Die Ultraschall-Messungen der A. brachialis zur Einschätzung der endothelvermittelten Vasodilatation erfolgten jeweils vor und 30 min nach Beginn einer Hämodialysesitzung während der Behandlung mit der HE- und dreimal in monatlichen Abständen während der Behandlung mit der PMMA- Dialysemembran.

4.2.2 IN VITRO-VERSUCH

Um Filtration und Adsorption von IL-6 und β 2-M durch die synthetische PMMA-Dialysemembran zu messen, wurden *in vitro*-Versuche durchgeführt. Um die Filtrationskinetik zu erfassen, wurde ein *in vitro*-System mit einem Infusomaten (fm, Braun) eingesetzt. Die bei der Patientenbehandlung eingesetzte PMMA-Filtermembran (1,6 BK-F®, Toray) wurde mit einem Dialyse-Babyschlauch-System arteriell an den Infusomaten angeschlossen. und mit einem Reservoir von insgesamt 240 ml gepooltem, heparinisierendem, verdünntem Plasma (Verdünnungsverhältnis 1:4) von 15 chronischen Hämodialysepatienten bestückt. Der venöse Schlauch wurde in den Abfluß abgeleitet, an den Dialysatzufluß des Filters wurde eine Wasserabsaugpumpe mit einem Manometer angebracht, um einen kontinuierlichen Unterdruck erzeugen zu können. Nach Spülen des Filters mit isotoner Kochsalzlösung wurde der arterielle Ausgangswert aus der Plasma-Lösung gewonnen und das Plasma mit einer Geschwindigkeit von 30 ml/min im Durchlauf und einem transmembranösen Druck (TMP) von 0 mmHg in das System infundiert. Nach Beginn der Durchlaufs wurde zum Zeitpunkt 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 und 9 Minuten jeweils eine Probe von 1ml mittels einer Einmal-Spritze aus dem venösen Schlauch entnommen und in 2 Eppendorf-Röhrchen aufgefangen. Ab dem Zeitpunkt 10 min wurde der TMP-Druck durch Inbetriebnahme der Wasserabsaugpumpe und Kompression des zuführenden Schlauchsystems mittels einer Klemme auf weniger als 30 mmHg eingestellt. Zum Zeitpunkt 0, 2, 3, 5, 7, 8 und 9 min nach Filtrationsbeginn wurden Proben aus dem venösen System, zum Zeitpunkt 5 und 9 min Filtrat aus dem Dialysatabfluß des Filters entnommen. Die Proben wurden direkt auf Eis gekühlt und sofort bis zur weiteren Verarbeitung bei -70 °C gelagert.

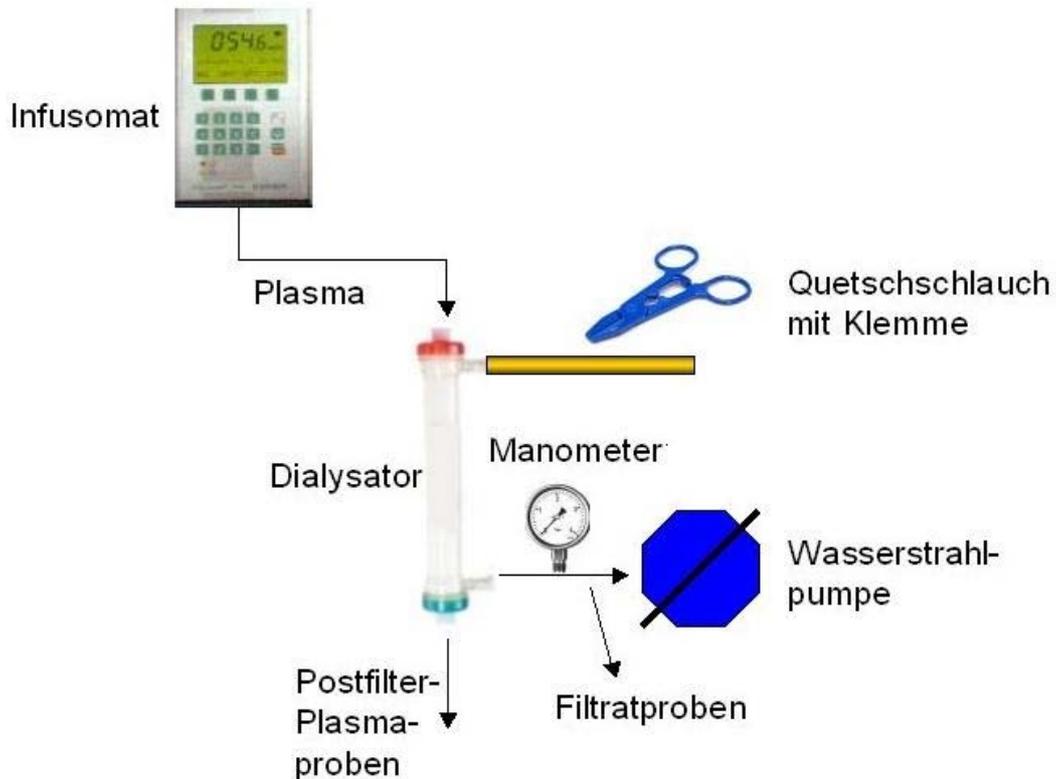


Abb. 1: Flussschema des *in vitro*-Versuchs

4.3 PATIENTENKOLLEKTIV

4.3.1 AUSWAHL UND EINTEILUNG DER PATIENTEN UND KONTROLLPERSONEN

Das Patientenkollektiv umfaßte sechs Patienten, die aufgrund eines terminalen Nierenversagens mit chronisch-intermittierender Hämodialyse in der Klinik für Innere Medizin IV des Universitätsklinikums des Saarlandes behandelt wurden. Einschlusskriterien waren eine Dauerdialysebehandlung länger als 3 Monate mit einer Hämophan-Membran (GFSplus20®, Gambro), ein stabiler, komplikationsloser Verlauf, das Einverständnis des Patienten, das Fehlen einer immunsuppressiven Medikation, einer

Bluttransfusion in den letzten vier Wochen vor Studienbeginn und eines aktiven Tumorleidens. Die Daten zur Patientencharakterisierung wurden aus den Krankenakten der Klinik für Innere Medizin IV gewonnen. Als personenbezogene Daten wurden Geschlecht und Alter, als anamnestische Angaben die Ätiologie der terminalen Niereninsuffizienz und die Dauer der Dialysepflichtigkeit erfaßt. Vor und nach der Dialyse wurden Gewicht, Blutdruck und Dialysedauer dokumentiert. Bei drei Patienten waren eine diabetische Nephropathie, bei einer Patientin eine familiäre, autosomal-dominant vererbte, polyzystische Nierenerkrankung, bei einem Patienten eine chronisch interstitielle Nephritis und bei einem Patienten eine intra- und extrakapillär proliferative Glomerulonephritis die Ursache des terminalen Nierenversagen. Die Patienten hatten keine Restdiurese mehr ($<500\text{ml}/24\text{h}$), die durchschnittliche Zeit seit Beginn der Dialysebehandlung betrug 16.7 ± 10.1 Monate. Alle Patienten litten unter einem arteriellen Hypertonus, vier Patienten wurden aufgrund eines Diabetes mellitus behandelt. Ein Patient hatte bereits einen Myokardinfarkt erlitten, bei einem weiteren Patienten bestand eine koronare Herzerkrankung, dieser und ein weiterer Patient litt unter peripherer arterieller Verschlusskrankheit. Bei zwei Patienten ließ sich ein ehemaliger Nikotinabusus eruieren.

Die Kontrollgruppe für die Messung der Endothelfunktion bestand aus Patienten der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums des Saarlandes. Eingeschlossen wurden Patienten des gleichen Geschlechts und der gleichen Altersgruppe ohne laborchemischen oder anamnestischen Anhalt für eine Nierenschädigung, die sich zu der Untersuchung bereit erklärten. Patienten mit kardiovaskulären Ereignissen als Grund des stationären Aufenthaltes wurden ausgeschlossen. Die bestehenden kardiovaskulären Risikofaktoren wurden anamnestisch erhoben und den stationären Patientenakten entnommen. An neurologischen Grunderkrankungen bestand bei den Kontrollpersonen ein kryptogenes Anfallsleiden mit komplex-fokalen Anfällen, ein symptomatisches Anfallsleiden mit fokal eingeleiteten, sekundär generalisierten Krampfanfällen, eine nekrotisierende Polymyositis und eine amyotrophe Lateralsklerose. Bei zwei Patienten war eine Polyneuropathie Grund der stationären Behandlung. Bei vier Patienten waren eine arterielle Hypertonie und bei zwei Patienten ein ehemaliger Nikotinabusus als kardiovaskuläre Risikofaktoren bekannt, ein Patient hatte einen Herzinfarkt erlitten, weitere kardiovaskuläre Ereignisse waren nicht zu eruieren.

4.3.2 DATEN ZUR PATIENTENCHARAKTERISIERUNG

Die Laborparameter der Hämodialysepatienten wurden im Rahmen der monatlichen Blutabnahme in der Klinik für Innere Medizin IV bestimmt. Als Retentionsparameter wurden Harnstoff (mg/dl) und Kreatinin (mg/dl) , als Entzündungsparameter CRP (mg/l), Ferritin (mg/dl) und Leukozyten-Zahl (1/ μ l) und zur Beurteilung des Ernährungszustandes Albumin (mg/dl) und Gesamteiweiß (mg/dl) gemessen. Zusätzlich wurden die Elektrolyte Kalium (mmol/l) und Calcium (mmol/l) sowie Phosphat (mg/dl) und die Anzahl der Thrombozyten (1/ μ l), Hämatokrit (%) und Hämoglobin (g/dl) bestimmt. Die Laborparameter der Kontrollgruppe wurden im Routineaufnahmelabor der Klinik für Neurologie gemessen.

4.4 HÄMODIALYSE

Die Behandlung wurde bei jedem Patienten dreimal wöchentlich für eine Dauer von 240 bis 270 Minuten durchgeführt. Die Dialysebedingungen waren individuell unterschiedlich, aber im Verlauf der Studie für jeden Patienten konstant. Die Dialysemembranen waren Einmalmaterial und wurden nicht wiederverwendet. Der vaskuläre Zugang wurde durch perkutane Punktion der arteriovenösen Fisteln (Dialyseshunt) an den Unterarmen gewonnen. Die Dialyse erfolgte gegen eine Standard-Bicarbonat-Lösung. Vor Start der Hämodialyse wurden die Hämofilter mit 2 l isotonischer Natriumchlorid-Lösung (0,9%) und Heparin gespült. Danach wurde das System mit dem Patienten verbunden. Die Blutpumpen liefen mit einer Geschwindigkeit von 250-330 ml/min. Der Dialysatfluß betrug 500ml/min. Die Antikoagulation erfolgte durch einen Bolus Heparin von 1000-3000 IU bei Beginn der Behandlung und dann kontinuierlich 1-2 ml/h entsprechend 1000-2000IU/h.

4.4.1 FILTERMEMBRANEN

Die Filtermembranen unterscheiden sich in bezug auf die verwendeten Materialien, ihre Membranoberfläche, die Wandstärke ihrer Membran und die unterschiedlichen Clearance-Eigenschaften. Zudem werden herstellerseits unterschiedliche Sterilisationsmethoden benutzt (Tab.1).

	Gambro GFSplus 20® (Hämophan)	Toray 1,6 BK-F ® (Polymethylmethacrylat)
Membranoberfläche (m²)	1,8	1,6
Innendurchmesser (µm)	200	200
Wandstärke (µm)	6,5	30
UF-Koeffizient (ml/h/mmHg) (<i>invitro</i>)	11,4	20
Füllvolumen (ml) (<i>in vitro</i>) bei TMP = 100 mmHg	100	94
Clearance (<i>in vitro</i>) (ml/min) bei wässriger Lösung, 37°C QB=200ml/min, QD=500ml/min		
Harnstoff	192	190
Kreatinin	173	172
Vitamin B12	91	111
Phosphat	176	157
Bestandteile	Materialien	Materialien
Membran	Hämophan	Polymethylmethacrylat
Eingießmaterial	Polyurethan	Polyurethan
Gehäuse und Endkappen	Polycarbonat	Polystyrene
Sterilisationsart	Dampf	Gammastrahlen

Tab. 1: Beschreibung der Hämodialyse-Membranen (Gebrauchsinformation der Hersteller)

Darstellung der Unterschiede zwischen der Hämophan und Polymethylmethacrylat-Dialysemembran in Bezug auf Membrancharakteristika wie die Membranoberfläche in m², den Innendurchmesser, die Wandstärke und das Füllvolumens. Zudem werden der Ultrafiltrationskoeffizient als Maß der bei einem bestimmten transmembranösen Druck filtrierten Flüssigkeitsmenge und die bei bestimmten festgelegten Bedingungen der Geschwindigkeit des Blut- und des Dialysatflusses erreichte Elimination bestimmter Stoffe (Clearance) der Filtermembranen gezeigt. Unterschiede ergeben sich auch im Hinblick auf die verwendeten Materialien und die Art der angewandten Sterilisationsmethode.

4.4.2 GEWINNUNG UND VORBEREITUNG DER BLUTPROBEN

Die Blutproben wurden bei der ersten Ultraschallmessung während der Dialyse mit der Hämophan-Dialysemembran sowie 1, 2 und 3 Monate nach Umstellung auf die Polymethylmethacrylat-Dialysemembran und 1 Monat nach Rückumstellung auf die Hämophan-Dialysemembran entnommen. Vor Dialysebeginn wurden 4,7 ml als Lithium-Heparin-Vollblut, 2,7 ml Blut mit EDTA als Zusatz und 4,7 ml zur Serumgewinnung aus der arteriellen Nadel nach Shuntpunktion gewonnen. Nach 15 min wurde nochmals Blut für Plasma- und nach 2h für die Serumaufbereitung aus dem venösen Schenkel des Dialysesystems entnommen.

Die Proben wurden sofort nach Entnahme auf Eis gekühlt. Serum und Plasma wurden durch Zentrifugation bei 1500 *g für 10 min gewonnen, aliquotiert und dann bei -70°C (Plasma) bzw. -20°C (Serum) bis zur Weiterverarbeitung eingefroren. Das Vollblut wurde auf Eis gestellt und anschließend sofort in 24-well-Platten aufgetragen und mit Kulturmedium (Abb.1) kultiviert. Vor Messung der Proben mittels ELISA wurden diese bei Raumtemperatur aufgetaut, wiederholtes Einfrieren und Auftauen wurde vermieden. Proben, die eine Trübung aufwiesen, wurden vor dem Test zentrifugiert.

4.4.3 GEWINNUNG UND VORBEREITUNG DER ULTRAFILTRATPROBEN

Die Ultrafiltrat-Proben wurden ebenfalls bei der ersten Ultraschallmessung während der Dialyse mit der Hämophan-Dialysemembran sowie 1, 2 und 3 Monate nach Umstellung auf die PMMA-Dialysemembran und 1 Monat nach Rückumstellung auf die Hämophan-Dialysemembran entnommen. 10 Minuten nach Beginn der Dialyse wurde der Dialysatfluß unterbrochen und nach vollständigem Abfließen der Spülflüssigkeit wurden 10-13ml Filtrat aus dem unteren Anschluß für das abführende Schlauchsystem abgenommen. Das Filtrat wurde in sterilen Röhrchen aufgefangen, sofort auf Eis gestellt und bei minus 20 °C bis zur Auswertung gelagert.

4.5 LEUKOZYTENSTIMULATION

500µl Vollblut wurden 1:2 mit Kulturmedium (Abb.1) in 24 well-Platten verdünnt (Triplikate). Stimulierte (LPS 0,05 µg/ml) und unstimulierte Proben wurden 22,5 Stunden im Brutschrank bei 5% CO₂ und 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Überstände abgenommen, die verbliebenen Zellen bei 2000*g (Eppendorfzentrifuge) abzentrifugiert und die zellfreien Überstände bei -70°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

RPMI 1640	
FCS	5%
Glutamin	2 mmol/l
Streptomycin/ Penicillin	1%

Abb. 2: Zusammensetzung des Kulturmediums für die *in vitro*-Kultivierung von Leukozyten im Vollblutansatz

4.6 ULTRASCHALLMESSUNG DER ARTERIA BRACHIALIS

Die Ultraschallmessungen der Arteria brachialis wurden in der Medizinischen Klinik IV am Bett des Patienten vor Dialysebeginn sowie nach 30 Minuten Hämodialyse durchgeführt. Die Messungen der Kontrollgruppe erfolgten ebenfalls in der Medizinischen Klinik IV des Universitätsklinikums des Saarlandes. Es erfolgte eine effektive Ruhigstellung der Extremität des Patienten durch Lagerung in einer gepolsterten Schiene auf einem Kissen. Die 16 cm breite Blutdruckmanschette wurde direkt unterhalb des Ellbogengelenks angelegt. Um die Aufzeichnungen EKG-getriggert vornehmen zu können, wurden EKG - Elektroden an rechter und linker Schulter und am linken Unterbauch des Patienten befestigt. Die Untersuchung erfolgte am Nicht-Shunt-Arm mit einem Ultraschallgerät Acuson Sequoia mittels 8MHz linear-array-Schallkopf und der Einstellung auf extracranielle Gefäße. Die gesamte Untersuchung wurde kontinuierlich durch ein Videogerät aufgezeichnet. Das proximale Schallkopfe wurde 5 cm oberhalb des Ellbogengelenkes positioniert, die Darstellung der Arteria brachialis erfolgte mit beiden Intima-media-Lamellen im Längsschnitt. Nach Bestimmung des Ausgangswertes wurde unter kontinuierlicher Beibehaltung der Schallkopfposition die Blutdruckmanschette auf 200 mmHg aufgepumpt und dieser Druck für 270 Sekunden beibehalten. Nach Ablassen des Drucks wurde die Arteria brachialis im Längsschnitt weitere 13 Minuten lang kontinuierlich dargestellt. Die Auswertung erfolgte durch die Messung des Durchmesser zwischen beiden Intima-media-Lamellen an drei nebeneinanderliegenden Messpunkten während der Systole und anschließender Berechnung des Mittelwerts mit Standardabweichung. Die endothelvermittelte Vasodilatation nach Ischämie wurde prozentual im Vergleich zum Ausgangswert berechnet.

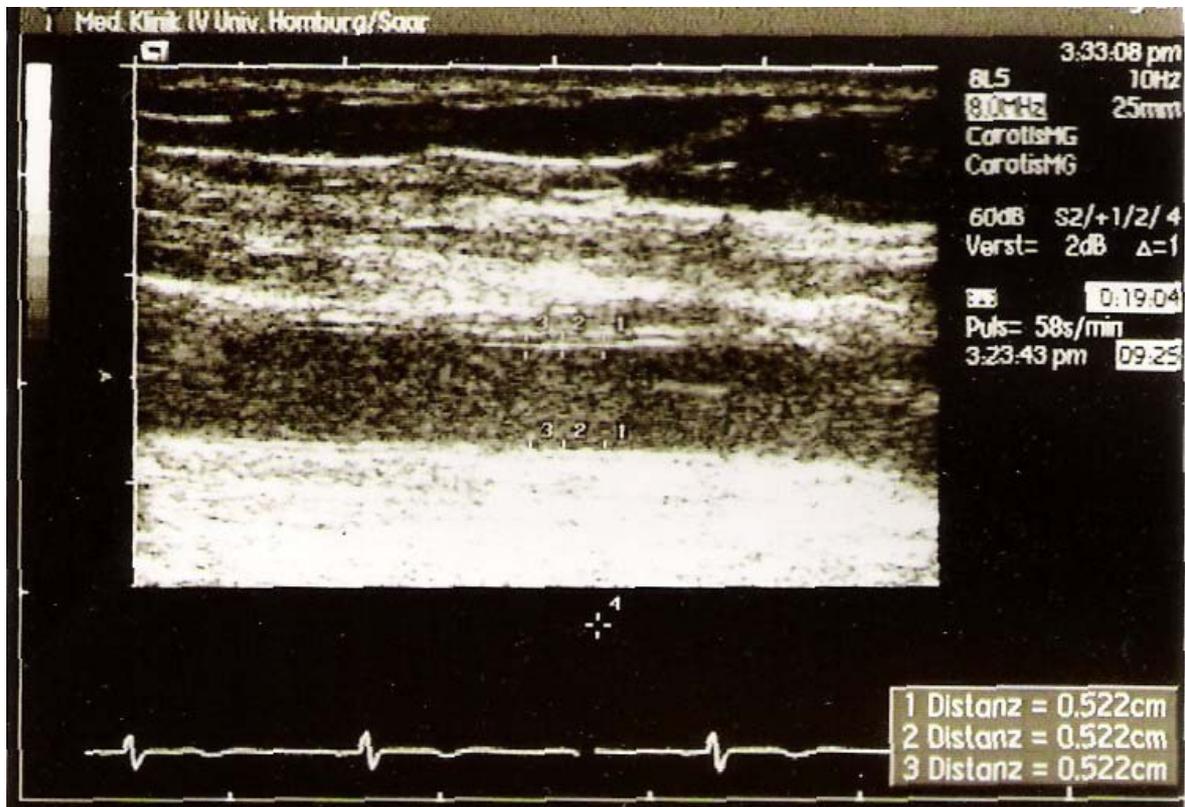


Abb. 3: Ultraschallmessung der Art. brachialis

Die Auswertung erfolgte durch die Messung des Durchmessers zwischen beiden Intima-media-Lamellen an drei nebeneinanderliegenden Messpunkten während der Systole

4.7 IMMUNOLOGISCHE DIAGNOSTIK

4.7.1 INTERLEUKIN 6-ELISA

Das Zytokin IL-6 wurde mittels Elisa-Technik aus den Überständen der im Vollblutansatz stimulierten Leukozyten bestimmt. Dazu wurden NUNC-Immuno-Module mit je 50µl verdünntem monoklonalen Antikörper (1 µg/ml) gegen IL-6 beladen und für 19 Stunden bei 4°C inkubiert ("gecoatet"). Die Überstände der stimulierten Leukozyten wurden bei Raumtemperatur aufgetaut. Um ungebundene Antikörper zu entfernen, wurde die Platte viermal unter Zugabe von 300 µl PBS-Tween je well mittels eines Waschgerätes und nachfolgendem Ausklopfen auf einem saugfähigen Zellulosehandtuch gewaschen. Nach Zugabe von 200 µl Blocking Puffer pro well, um die unspezifischen Bindungen zu blockieren, und Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur wurden nach dreimaligem Waschen je 100µl der mit Blocking Puffer verdünnten Proben aufgetragen und im Brutschrank bei 37°C zwei Stunden lang inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit PBS-Tween wurden je 100 µl des verdünnten biotinylierten Detektions-Antikörpers (1 µg/ml) zugefügt. Nach fünfundvierzigminütiger Inkubation bei 37°C wurde der ungebundene Zweitantikörper ausgewaschen und anschließend 100µl Avidin-Peroxidase je well zugefügt. Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte das achtmalige Waschen der Platte und anschließend die zügige Füllung jeder Vertiefung mit 100 µl ABTS-Substrat und die Inkubation für 15 min auf dem Schüttlert. Die Farbreaktion wurde im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 405 nm photometrisch gemessen. Die Auswertung erfolgte mittels nichtlinearer Regression unter Verwendung einer Standardverdünnungsreihe.

Material IL-6-ELISA:	
Antikörper:	1. <u>Antikörper</u> : Monoklonaler gereinigter Maus-anti-human IL 6-Antikörper Verdünnung 1:500 in Binding Solution (1 µg/ml)
	2. <u>Antikörper</u> : monoklonaler biotinylierter anti-human IL 6 Verdünnung 1 : 500 in Probenpuffer (1 µg/ml)
Proben:	Vollblut, stimuliert mit 50ng/ml LPS: Verdünnung 1:50 mit Blocking Puffer, unstimuliert: Verdünnung 1:2 mit Blocking Puffer
Standard	Stocklösung gelöst in 2ml H ₂ O Verdünnung in PBS/ 1% humanes Serumalbumin 100U/µl Aliquots a 10µl bei -20°C gelagert Für ELISA 1000 U/ml :10µl in 990ml PBS/1% BSA lösen
Binding Solution	0,1 molare Na ₂ HPO ₄ pH 9.0(mit HCL einstellen)
Blocking Puffer	1% BSA (Pulver) in 1x PBS
Waschpuffer:	PBS Tween 0,05 % in 1L 1 x PBS
ABTS Substrat	150 mg 2,2Äzino-bis-(3ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) in 500 ml 0,1 M Zitronensäureanhydrat lösen mit NaOH einstellen (pH 4,35) in Portionen zu je 11 ml aliquotieren und bei -20°C einfrieren
Avidin-Peroxidase	in 1 ml sterilem 1x PBS anlösen zu 30 µl aliquotieren , bei - 20 °C wegfrieren
Detektionsgrenze	30pg/ml

Abb. 4: IL-6-ELISA-Material

4.7.2 C3a-des-Arg-ELISA

Der Test diente zur quantitativen Bestimmung der Komplementkomponente C3a-desArg, das aus dem kurzlebigen Anaphylatoxin C3a entsteht und stöchiometrisch die Aktivierung von C3 reflektiert. Die bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefrorenen Proben wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und anschließend auf Eis gelagert, alle anderen Materialien wurden auf Raumtemperatur gebracht. Als Probenverdünnung wurde 1:100 vor Dialyse und 1:400 bis 1:1000 nach 15 min Dialyse gewählt. Es erfolgte das Auftragen von je $100\mu\text{l}$ Standard und Proben pro well, da die 96-well-Platte bereits mit dem ersten Antikörper beschichtet ("gecoatet") war. Die Inkubationszeit betrug eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach der Entleerung der Mikrotiterstreifen wurden je $200\mu\text{l}$ Waschpuffer pro well zugefügt, entleert und die Platte auf einem Papierhandtuch ausgeschlagen (= Waschvorgang). Nach dreimaligem Waschen wurde das Elisa-Sandwich durch Befüllen der wells mit $100\mu\text{l}$ des mit Peroxidase konjugierten zweiten Antikörper vervollständigt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluß wurde erneut dreimal gewaschen, bevor je $100\mu\text{l}$ gebrauchsfertige Substratlösung pro well zugefügt wurden, um die quantitative photometrische Bestimmung der optischen Dichte zu ermöglichen. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für zwölf Minuten auf dem Schüttler. Die Zugabe von je $100\mu\text{l}$ Stopplösung in jede Vertiefung erfolgte im gleichen Zeittakt und gleicher Reihenfolge wie die Zugabe des Substrates. Die optische Dichte wurde mit einem Dynatech Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 630 nm photometrisch gemessen, die Vertiefung "Blank" diente zum Abgleich, die Verdünnung 1:100 wurde in der Auswertung bereits berücksichtigt. Die Auswertung erfolgte mittels nichtlinearer Regression unter Verwendung einer Standardverdünnungsreihe.

Material C3a-des-Arg-ELISA:	
Antikörper	1. Antikörper: Anti-C3a-Ak Platte bereits beschichtet
	2. Antikörper: Anti-C3a-Peroxidase-konjugierter Antikörper Verdünnung 1 : 50 in Probenpuffer
Proben	Plasma 1:100 verdünnt vor Dialyse, Plasma 1.400 bis 1:1000 verdünnt nach 15 min Dialyse in Probenpuffer
Standard	Lyophilisierten Standard in 1ml Probenpuffer auflösen, Verdünnungsreihe Standardkonzentrationsbereich: 0-1100 ng/ml in Probenpuffer
Negativkontrolle	Lyophilisiertes Negativkontrollplasma in 1ml Probenpuffer auflösen
Probenpuffer:	Konzentrat 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnen, (20ml in 200 ml)
Waschpuffer	Konzentrat 1:20 mit destilliertem Wasser verdünnen (20 ml in 400 ml)
Anti-C3a-Peroxidase-Konjugat	Konzentrat 1:50 mit gebrauchsfertigem Probenpuffer verdünnen
Substratlösung	TMB gebrauchsfertig
Stopplösung	1N Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)
Detektionsgrenze	45ng/ml
Normwerte	150ng/ml

Abb. 5: C3a-des-Arg-ELISA-Material

4.7.3 LÖSLICHER ENDOTOXINREZEPTOR SCD14- ELISA

Die bereits mit einem oligoklonalen Antikörper gegen sCD14 beladene 96-well-Platte wurde mit jeweils 50µl Standard und Standardverdünnungen, Kontrollserum und verdünnten Proben sowie je 50 µl Biotin-konjugiertem monoklonalen Antikörper gegen sCD14 befüllt, mit Haftfolie versiegelt und zwei Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Der Überstand wurde entleert, die Platte jeweils dreimal mit gebrauchsfertigem Waschpuffer mit einer 20ml Einmalspritze bzw. mit dem Wascherät gefüllt, entleert und auf saugfähigem Papier ausgeklopft. In alle Vertiefungen wurden je 150 µl frisch angesetztes Enzymkonjugat pipettiert, die Mikrotiterplatte mit Haftfolie verschlossen und 1 Stunde lang bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Das Enzymkonjugat bindet sich an das Biotin, welches an den Detektionsantikörper gekoppelt ist. Das ungebundene Enzym wurde durch dreimaliges Waschen entfernt und je 200µl TMB-Substratlösung, die zu einer enzymatischen Farbreaktion führt, in alle wells gefüllt. Nach einer je nach Raumtemperatur unterschiedlichen Inkubationszeit von 20 min bei 18 °C und 10 min bei 25°C, um den optimalen Meßbereich der optischen Dichte von 1,5 bis 2,5 zu erreichen, wurden je 100µl Stopplösung je Vertiefung im gleichen Zeitintervall und Takt wie das Substrat zugefügt. Nach kurzem Schütteln wurde die optische Dichte mit einem Dynatech Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 600-650 nm unmittelbar nach Zugabe der Stopplösung photometrisch gemessen. Die Auswertung erfolgte mittels nichtlinearer Regression unter Verwendung einer Standardverdünnungsreihe.

Material sCD 14-ELISA	
Antikörper	1. <u>Antikörper</u> : oligoklonaler anti-sCD14-Antikörper Platte bereits beschichtet
	2. <u>Antikörper</u> : Biotin-konjugierter Antikörper Verdünnung 1 : 41 mit Verdünnungspuffer
Proben	Serum 1:101 bzw 1: 201 verdünnt, Lagerung aliquotiert bei –20°C
Standard	sCD14 Lyophilisat in 0.5 ml Verdünnungspuffer lösen, für längere Lagerung aliquotiert bei –20°C einfrieren Standardkonzentrationsbereich: 0-100 ng/ml in Verdünnungspuffer
Kontrollserum	Humanserum 1:101 vorverdünnt, Lyophilisat in 0.5 ml Verdünnungspuffer lösen
Verdünnungspuffer	Enthält BSA, lyophilisiertes Konzentrat mit 5 ml Waschpuffer rekonstituieren, Inhalt in Meßzylinder mit gebrauchsfertigem Waschpuffer auf 40 ml auffüllen, bei 2-8°C 24 Stunden haltbar
Waschpuffer	Enthält Phosphatpuffer und Tween, 50 ml 20 fach Konzentrat, mit Aqua dest. 1:20 verdünnen, bei 2-8°C 4 Wochen haltbar
Enzymkonjugat	Konjugat-Konzentrat 1:101 in Verdünnungspuffer ansetzen
Substratlösung	Tetramethylbenzidin mit stabilisierenden Zusätzen, 1ml Konzentrat mit TMB-Substratpuffer 1:51 verdünnen, 48 Stunden bei 2-8°C stabil
TMB-Substratpuffer	Citratpuffer mit Wasserstoffperoxid und stabilisierenden Zusätzen, 30 ml gebrauchsfertig
TMB-Stopplösung	Enthält 1M Schwefelsäure, 15 ml gebrauchsfertig
Detektionsgrenze	140 ng/ml
Normalwerte	1400 – 4500 ng/ml im Serum

Abb. 6: sCD-14-ELISA-Material

4.7.4 IL-1 REZEPTOR-ANTAGONIST-ELISA

Die Serum-Proben, die vor Dialysebeginn und nach zwei Stunden gewonnen worden waren, wurden bei Raumtemperatur aufgetaut. Jede Vertiefung der bereits mit einem Antikörper gegen IL-1Ra beladenen 96-well-Platte wurde mit 100µl Inkubationspuffer und jeweils 100µl Standard, Kontroll-, unverdünnten Serum- oder Dialysat-Proben sowie 50µl biotin-konjugiertem IL-1Ra-Antikörper gefüllt, mit Haftfolie versiegelt und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Der Überstand wurde entleert, 0.4 ml Waschlösung mit dem Waschgerät in jede Vertiefung pipettiert und die Platte auf weichem Tuch ausgeklopft. Dieser Waschvorgang wurde dreimal durchgeführt. Es wurden 100µl verdünntes Streptavidin-Konjugat pro well zugefügt, die Platte mit Haftfolie versiegelt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde viermal gewaschen, je 100µl TMB-Substratlösung zugefügt und unter Vermeidung direkter Sonneneinstrahlung 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 100µl Stopplösung je well im gleichen Intervall und Zeittakt wie bei der Substratlösung wurde die Platte unmittelbar im DynatecReader bei 450 nm mit einer Referenzwellenlänge von 630 nm photometrisch gemessen. Die Auswertung erfolgte mittels nichtlinearer Regression anhand einer Standard-Verdünnungskurve.

Material IL-1 Ra-ELISA	
Antikörper	1. Antikörper: anti-IL-1 Ra-Antikörper Platte bereits beschichtet
	2. Antikörper: Anti-IL-1 Ra- Biotin-konjugierter Antikörper 6 ml gebrauchsfertige Lösung
Proben	Serum- und Dialysat-Proben unverdünnt
Standardverdün- nungslösung	gebrauchsfertig (15ml)
Standard	Standard auf 10000 pg/ml mit Standard-Verdünnungslösung rekonstituieren, vorsichtig mischen und 10 min stehenlassen, Standard 2000 pg/ml herstellen aus 4ml Standard-Verdünnungslösung und 1ml des rekonstituierten Standards (10000pg/ml), Verdünnungsreihe herstellen mit je 400µl Verdünnungslösung plus 400µl Standard (0- 1000 pg/ml)
Kontrollen	in 2ml destilliertem Wasser auflösen, stehenlassen bis sie vollständig aufgelöst sind, vorsichtig mischen haltbar 4 Tage bei 2-8°C, bei -20°C für 2 Monate
Verdünnungspuffer	Lyophilisat in 40 ml gebrauchsfertigem Waschpuffer lösen
Waschpuffer	Verdünnung 1:25, 100 ml Waschlösungs-Konzentrat (25-fach) in 2400 ml destilliertem Wasser auflösen 14 Tage bei Raumtemperatur haltbar
Inkubationspuffer	(25ml) gebrauchsfertig
Streptavidin-HRP	Verdünnung 1:100, Streptavidin-Konzentrat in sauberem Glasgefäß in Streptavidin-Verdünnungslösung lösen, bei 96 wells 110µl in 11ml, unmittelbare Zubereitung
Substrat	Chromogen-Tetramethylbenzidin (25ml) gebrauchsfertig
Stopplösung	Enthält 1M Schwefelsäure, 25 ml gebrauchsfertig
Detektionsgrenze	4 pg/ml
Normwerte	EDTA-Plasma 124 ± 91pg/ml, Serum 119 ± 71pg/ml

Abb. 7: Material IL-1 Ra-ELISA

4.8 β 2-MIKROGLOBULIN

Das β 2-Mikroglobulin wurde durch das Zentrallabor der Universitätskliniken des Saarlandes mittels Nephelometrie bestimmt. Die untere Nachweisgrenze des Assays betrug 0.04 mg/l.

4.9 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die statistische Auswertung erfolgte mittels des Computer-Programms GraphPad Prism™. Es wurde von einer nicht normalverteilten Population ausgegangen. Die Ergebnisse der ELISAs wurden mittels nichtlinearer Regression anhand einer Standardverdünnungsreihe ausgewertet. Zum Vergleich der Ergebnisse bei Behandlung mit den unterschiedlichen Membranen in der klinischen Studie wurde der One-way-Anova für verbundene, nicht-normalverteilte Stichproben (Friedmann-Test mit anschließendem Dunn's Test), beim Vergleich der Patientengruppe mit der Kontrollgruppe der Mann-Whitney-Test angewandt. Zudem wurde der Wilcoxon-Test zum Vergleich verbundener Stichproben angewandt. Die Angaben erfolgten als Mittelwert \pm Standardabweichung. Das Signifikanzniveau wurde mit $p < 0.05$ festgelegt. Die nach zwei Stunden Dialyse in den Serum-Proben gemessenen Werte sCD14 und IL-1 Ra wurden entsprechend dem während der Dialyse entzogenen Volumen korrigiert.

Bei einem Volumenentzug von weniger als 800ml/h während der Dialysebehandlung wurde der korrigierte Messwert (W_{korr}) anhand des gemessenen Ausgangswertes ($W_{\text{meß}}$) und dem Körpergewicht vor und nach Dialyse berechnet:

$$W_{\text{korr}} = W_{\text{meß}} \times \text{KG nach Dialyse} / \text{KG vor Dialyse}$$

Bei einem Volumenentzug von mehr als 800ml/h wurde der korrigierte Messwert (W_{korr}) wie folgt berechnet:

$$W_{\text{korr}} = W_{\text{meß}} \times \text{KG (vor Dialyse - 800mg/h Dialysezeit) } / \text{KG vor Dialyse}$$

5 ERGEBNISSE

5.1 VERGLEICH DER PATIENTEN- UND KONTROLLGRUPPE

Die Kontrollgruppe wurde so gewählt, daß sie sich in Bezug auf die Geschlechts- und Altersverteilung nicht signifikant von der Patientengruppe unterschied. Weder im Body-Mass-Index (BMI) noch im Nikotinkonsum waren Unterschiede zwischen beiden Gruppen nachweisbar, die Anzahl der eingenommenen Blutdruckmedikamente unterschied sich nicht signifikant (Tab. 2).

	Patienten (n=6)	Kontrollen (n=6)	Statistik
Alter (Jahre)	74,7 ± 10,3	69,2 ± 9,0	p>0.31
packyears	9,4 ± 17.7	9,0 ± 16,5	p>0.8
Anzahl Antihypertonika	3,2 ± 1,5	1,7 ± 1,4	p>0.13
BMI	26,2 ± 1.7	25,6 ± 3,7	p>0.7
Männlich	5	5	
Weiblich	1	1	

Tab. 2: Vergleich des Patienten- und Kontrollkollektivs

Die Daten zur Patientencharakterisierung wurden den Akten der Klinik für Innere Medizin IV und der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums des Saarlandes entnommen.

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± SD angegeben, die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney-Test für unverbundene Stichproben.

Abkürzungen: packyears: 1 packyear entspricht dem Rauchen von 20 Zigaretten/Tag über 1 Jahr

Aufgrund der eingeschränkten Nierenfunktion waren die Phosphat-, Kalium-, Kreatinin- und Harnstoff-Werte der Patientengruppe signifikant höher als die des Kontrollkollektivs.

Zudem zeigten sich in der Gruppe der Dialysepatienten verminderte Hämoglobin- und Hämatokrit-Werte. Die CRP-Spiegel der Dialysepatienten zeigten sich im Vergleich mit der Kontrollgruppe deutlich erhöht, jedoch war der Unterschied nicht statistisch signifikant und auch die übrigen laborchemischen Parameter unterschieden sich nicht (Tab. 3).

	Patienten (n=6)	Kontrollen (n=6)	Statistik
Kalium (mmol/l)	5,05 ± 0,78	4,10 ± 0,45	p<0,01
Calcium (mmol/l)	2,28 ± 0,22	2,34 ± 0,15	p>0,41
Phosphat (mmol/l)	6,28 ± 1,22	3,65 ± 0,39	p<0,001
Kreatinin (mg/dl)	8,81 ± 1,80	0,92 ± 0,11	p<0,0003
Harnstoff (mg/dl)	138,2 ± 21,5	42,20 ± 11,30	p<0,0003
Leukozyten (10 ³ /µl)	6,86 ± 1,50	6,23 ± 1,18	p>0,39
Hämoglobin (g/dl)	12,33 ± 0,78	14,0 ± 1,49	p<0,01
Hämatokrit (%)	36,9 0 ± 2,50	41,20 ± 4,32	p<0,02
Thrombozyten (10 ³ /µl)	258,9 ± 100,9	205,20 ± 70,89	p>0,27
CRP (mg/l)	7,14 ± 3,778	3,77 ± 1,50	p>0,11
Gesamteiweiß (g/dl)	71,47 ± 6,21	74,40 ± 2,70	p>0,12

Tab. 3: Laborparameter von Patienten- und Kontrollgruppe im Vergleich

Die Laborparameter wurden während der monatlichen Routineblutentnahmen der Dialysepatienten in der Klinik für Innere Medizin IV, die der Kontrollgruppe zu Beginn des stationären Aufenthaltes in der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums des Saarlandes im Routine-Aufnahmelaor gemessen. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± SD angegeben, die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney-Test für unverbundene Stichproben.

5.2 HÄMODIALYSEPATIENTEN

5.2.1 DIALYSEDAUER UND DIALYSEQUALITÄT

Im Rahmen der klinischen Studie wurden die Dialyseparameter der sechs Patienten bei Behandlung mit den beiden unterschiedlichen Membranen verglichen. Die verabreichte Dosis und Effektivität als Maß für die Dialysequalität festgelegt anhand des Kt/v, blieb über den gesamten Zeitraum konstant (Tab. 4). Auch die Dialyседauer veränderte sich während der Behandlung nicht signifikant (HE 235 ± 12 min vs PMMA 245 ± 12 min, $p > 0,5$).

	HE vU (n=6)	PMMA 1 (n=6)	PMMA 2 (n=6)	PMMA 3 (n=6)	Statistik
Kt/v	0,94 ± 0,27	1,03 ± 0,12	1,04 ± 0,06	1,07 ± 0,09	p>0,38

Tab. 4: Dialyседauer und Dialysequalitätsparameter

Die Daten bezüglich der Dauer der Behandlungsdauer und des Parameters Kt/v als Maß für die Dialysequalität wurden den Akten der Klinik für Innere Medizin IV des Universitätsklinikums des Saarlandes entnommen.

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± SD angegeben, die statistische Auswertung erfolgte mittels One-way-Anova für verbundene Stichproben (Friedmann-Test mit anschließendem Dunn's Test). Die Werte nach Rückumstellung auf die Hämophan-Membran wurden aufgrund der Auswertbarkeit von nur vier Patienten statistisch nicht berücksichtigt.

Abkürzungen: HE vU: HD mit Hämophan-Filtermembran vor Umstellung, PMMA 1-3: Werte nach 1/2/3 Monaten während HD mit Polymethylmethacrylat-Membran

5.2.2 ERYTHROPOETIN UND ANTIHYPERTENSIVE MEDIKATION

Bei Betrachtung der unter der Therapie zum Ausgleich der renalen Anämie benötigten Erythropoetin-Dosis konnten keine signifikanten Unterschiede bei Behandlung mit den verschiedenen Dialysemembranen nachgewiesen werden. Die antihypertensive Therapie mußte bei Umstellung nicht verändert werden. Ein Patient mit vorbestehenden kardiovaskulären Ereignissen verstarb während des Behandlungszeitraums mit der PMMA-Dialysemembran (Tab. 5).

	HE vU (n=6)	PMMA 1 (n=6)	PMMA 2 (n=6)	PMMA 3 (n=6)	HE nU (n=4)	Statistik
EPO-Dosis	2417 ± 665	2167 ± 408	2167 ± 408	2167 ± 408	2000 ± 816	p>0,29
Antihypertensiva	3,2 ± 1,5	3,2 ± 1,5	3,2 ± 1,5	3,2 ± 1,5	3,2 ± 1,5	p>0,99
Letalität	n=0	n=0	n=0	n=1	n=0	

Tab. 5: Medikamentenverbrauch und Letalität unter Dialyse

Die Daten wurden den Akten der Klinik für Innere Medizin IV des Universitätsklinikums des Saarlandes entnommen. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SD angegeben, die statistische Auswertung erfolgte mittels One-way-Anova für verbundene Stichproben (Friedman-Test mit anschließendem Dunn's Test). Die Werte nach Rückumstellung auf die Hämophan-Membran wurden statistisch nicht berücksichtigt.

Abkürzungen: HE vU: HD mit Hämophan-Filtermembran vor Umstellung, PMMA 1-3: Werte nach 1/2/3 Monaten während HD mit Polymethylmethacrylat-Membran, HE nU: Werte nach Rückumstellung auf Hämophan-Membran

5.2.3 LABORPARAMETER

Bei Behandlung mit den unterschiedlichen Filtermembranen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Hb-Werte oder des Hämatokrit. Auch die Elektrolyt- und Retentionswerte wie Kreatinin und Harnstoff unterschieden sich nicht signifikant (Tab. 6).

	HE vU (n=6)	PMMA 1 (n=6)	PMMA 2 (n=6)	PMMA 3 (n=6)	HE nU (n=4)	Statisti k
Kalium (mmol/l)	5,01 ± 0,92	5,02 ± 0,83	5,48 ± 0,90	5,0 ± 0,62	5,03 ± 0,76	p> 0,27
Calcium (mmol/l)	2,28 ± 0,18	2,30 ± 0,17	2,20 ± 0,19	2,28 ± 0,25	2,39 ± 0,28	p>0,3
PO4 (mmol/l)	6,58 ± 1,21	6,25 ± 0,92	6,78 ± 1,67	6,27 ± 0,82	5,40 ± 0,73	p>0,98
Kreatinin (mg/dl)	8,60 ± 1,79	8,50 ± 1,86	9,25 ± 2,12	9,20 ± 1,84	8,74 ± 1,71	p>0,39
Harnstoff (mg/dl)	144,9 ± 24,73	135,8 ± 17,35	141,8 ± 15,80	136,1 ± 28,96	140,60 ± 12,42	p>0,89
Hb (g/dl)	12,85 ± 0,59	12,30 ± 0,85	12,28 ± 0,86	12,05 ± 0,79	12,13 ± 0,59	p>0,99
Hkt (%)	38,17 ± 1,99	36,67 ± 3,20	37,00 ± 2,97	36,17 ± 2,80	36,50 ± 1,65	p>0,13
Thrombozyten (10 ⁹ /μl)	272,8 ± 105,2	236,8 ± 77,1	242,0 ± 78,9	266,3 ± 121,5	265,5 ± 104,8	p>0,39

Tab. 6: Laborparameter der Patienten während der Behandlung mit beiden Membranen

Die Laborwerte wurden den Akten der Klinik für Innere Medizin IV des Universitätsklinikums des Saarlandes entnommen. Es erfolgten monatliche routinemäßige Laborkontrollen.

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SD angegeben, die statistische Auswertung erfolgte mittels One-way-Anova für verbundene Stichproben (Friedman-Test mit anschließendem Dunn's Test). Die Werte nach Rückumstellung auf die Hämophan-Membran wurden statistisch nicht berücksichtigt.

Abkürzungen: **HE vU:** HD mit Hämophan-Filtermembran vor Umstellung, **PMMA 1-3:** Werte nach 1/2/3 Monaten während HD mit Polymethylmethacrylat-Membran, **HE nU:** Werte nach Rückumstellung auf Hämophan-Membran

5.3 ENTZÜNDUNGSPARAMETER

5.3.1 AKUT-PHASE-PROTEINE

Über den gesamten Untersuchungszeitraum zeigten sich Schwankungen der Konzentrationen von CRP und Ferritin, hierbei wurden akute Infektionen anzeigende Anstiege statistisch nicht berücksichtigt. Signifikante Unterschiede der Konzentrationen dieser Parameter ließen sich beim Vergleich beider Membranen nicht beobachten. Der Gesamteiweiß-Spiegel war während der Behandlung mit der Polymethylmethacrylat-Dialysemembran signifikant niedriger als während der Behandlung mit der HE-Dialysemembran (- 8,3%, #: $p < 0.01$), hingegen unterschieden sich die Albumin-Werte nicht signifikant (Tab. 7).

	HE vU (n=6)	PMMA 1 (n=6)	PMMA 2 (n=6)	PMMA 3 (n=6)	HE nU (n=4)	Statistik
Ferritin (mg/dl)	563,4 ± 215,6	560,8 ± 486,4	406,0 ± 204,2	455,5 ± 315,7	419,4 ± 78,7	p>0,07
Leukozyten (10⁹/µl)	6,91 ± 1,27	6,06 ± 1,23	6,93 ± 1,92	6,80 ± 1,60	7,15 ± 1,43	p>0,56
CRP (mg/l)	8,6 ± 3,9	6,57 ± 4,26	9,36 ± 4,57	6,83 ± 3,93	5,28 ± 2,75	p>0,71
GEW (g/dl)	75,0 ± 5,22 #	71,67 ± 6,53	70,50 ± 7,04	68,83 ± 7,48 #	71,20 ± 5,27	p<0,01
Albumin (mg/dl)	37,0 ± 2,17	35,67 ± 3,33	35,17 ± 2,23	35,25 ± 2,38	36,20 ± 2,01	p>0,13

Tab. 7: Inflammationsparameter der Patienten während der Behandlung mit beiden Membranen

Die Laborwerte wurden den Akten der Klinik für Innere Medizin IV des Universitätsklinikums des Saarlandes entnommen. Es erfolgten monatliche routinemäßige Laborkontrollen.

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± SD angegeben, die statistische Auswertung erfolgte mittels One-way-Anova für verbundene Stichproben (Friedman-Test mit anschließendem Dunn's Test). Die Werte nach Rückumstellung auf die Hämophan-Membran wurden statistisch nicht berücksichtigt.

Erläuterungen: # : p<0.01, HE vU vs PMMA3

Abkürzungen: HE vU: HD mit Hämophan-Filtermembran vor Umstellung, PMMA 1-3: Werte nach 1/2/3 Monaten während HD mit Polymethylmethacrylat-Membran, HE nU: Werte nach Rückumstellung auf Hämophan-Membran

5.3.2 INTERLEUKIN-6

Die spontane IL-6-Ausschüttung durch mononukleäre Zellen im Vollblutansatz ohne Stimulation unterschied sich nicht zwischen beiden Filtermembranen (Abb.7). Nach Stimulation mit LPS zeigte sich eine signifikant geringere Ausschüttung von IL-6 nach dreimonatiger Behandlung mit der PMMA-Filtermembran im Vergleich zu den während der Behandlung mit der HE-Filtermembran gemessenen Werten (Abb. 8). Im Dialysat ließen sich keine signifikanten Unterschiede nachweisen (Tab. 8).

	HE vU (n=6)	PMMA 1 (n=6)	PMMA 2 (n=6)	PMMA 3 (n=6)	HE nU (n=4)	Statistik
IL-6 im Dialysat (pg/ml)	58,3 ± 13,4	60,9 ± 12,3	60,4 ± 4,9	58,7 ± 13,7	72,5 ± 11,8	p>0,34

Tab. 8: IL-6-Konzentration im Dialysat

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SD angegeben, die statistische Auswertung erfolgte mittels One-way-Anova für verbundene Stichproben (Friedman-Test mit anschließendem Dunn's Test). Die Werte nach Rückumstellung auf die Hämophan-Membran wurden statistisch nicht berücksichtigt.

Abkürzungen: **HE vU:** HD mit Hämophan-Filtermembran vor Umstellung, **PMMA 1-3:** Werte nach 1/2/3 Monaten während HD mit Polymethylmethacrylat-Membran, **HE nU:** Werte nach Rückumstellung auf Hämophan-Membran

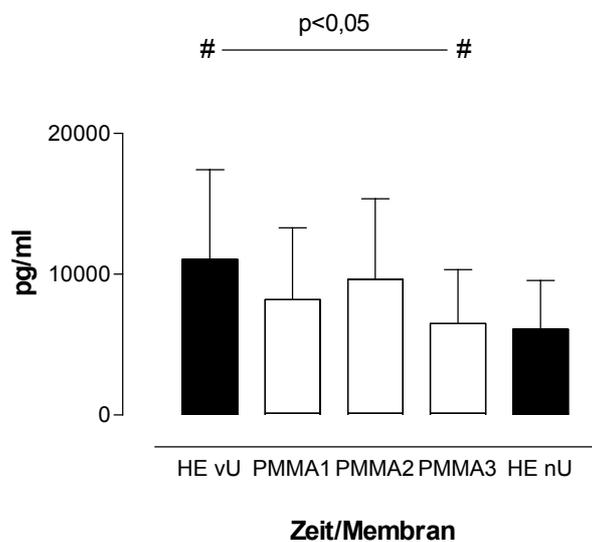


Abb.9: IL-6 Ausschüttung durch Leukozyten nach Stimulation mit LPS

Die im Vollblutansatz kultivierten Leukozyten wurden nach Stimulation mit LPS für 22.5 Stunden inkubiert. Die induzierte IL-6-Sekretion wurde im Überstand mittels ELISA gemessen. Man beachte die gegenüber Abb 7 unterschiedliche Skalierung.

Erläuterungen: # : $p < 0.05$, HE vU vs PMMA 3

Abkürzungen: HE vU: Behandlung mit der Hämophan-Membran vor Umstellung, PMMA 1-3: Monate unter der Behandlung mit der Polymethylmethacrylat-Membran, HE nU: Rückumstellung auf die Hämophan-Membran

5.3.3 KOMPLEMENTFAKTOR C3a

Bei den Dialysepatienten zeigte sich eine im Vergleich zu Gesunden bereits vor Beginn der Dialyse im dialysefreien Intervall ($t=vHD$) deutlich höhere Komplementaktivierung. Nach drei Monaten Behandlung mit der synthetischen Membran waren die C3a-Konzentrationen signifikant niedriger als während der Therapie mit der Hämophan-Dialysemembran. Nach Dialysebeginn ($t=15min$) zeigte sich bei beiden Membranen eine deutliche Aktivierung des Komplementsystems. Nach drei Monaten Behandlung mit der synthetischen Membran fiel die Komplementaktivierung im Vergleich zu den anderen Werten sehr viel geringer aus. Signifikant geringer war diese jedoch nur im Vergleich zu den nach zwei Monaten Behandlung mit der PMMA-Dialysemembran gemessenen Werten.

Die nach 15 Minuten Dialyse im Vergleich zu den Ausgangswerten ($(t=15min)$ vs $(t=vHD)$) gemessenen Werte waren bei beiden Dialysemembranen signifikant höher ($p<0,03$), aber auch der prozentuale Anstieg unterschied sich nicht signifikant zwischen beiden Filtermembranen (Tab. 9).

Filter	HE vU (n=6)	PMMA 1 (n=6)	PMMA 2 (n=6)	PMMA 3 (n=6)	HE nU (n=4)	Statistik
C3a vor HD (ng/ml)	449 ± 251 #	332 ± 140 §	335 ± 141	142 ± 27,9 # §	229 ± 38,8	p<0,05
C3a nach 15 min HD (ng/ml)	3599 ± 2071	3334 ± 1249	3399 ± 1362 Ψ	977 ± 375 Ψ	2542 ± 406	p<0,05
% Anstieg nach 15 min HD	+ 701	+ 904	+ 914	+ 588	+ 1010	p>0,56

Tab. 9: Vergleich der Komplementaktivierung (C3a-des-Arg)

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SD angegeben, die statistische Auswertung erfolgte mittels One-way-Anova für verbundene Stichproben (Friedman-Test mit anschließendem Dunn's Test)

Erläuterungen: #: $p<0,05$, HE vU vs PMMA 3; §: $p<0,05$, PMMA 1 vs PMMA 3, Ψ: $p<0,05$, PMMA 2 vs PMMA 3

Abkürzungen: HE vU: Behandlung mit der Hämophan-Membran vor Umstellung, PMMA 1-3: Monate unter der Behandlung mit der Polymethylmethacrylat-Membran, HE nU: Rückumstellung auf die Hämophan-Membran

5.3.4 LÖSLICHER ENDOTOXINREZEPTOR (sCD14)

Nach Umstellung der Dialyse von der HE- auf die PMMA-Dialysemembran kam es zu einem Anstieg der im dialysefreien Intervall (t=vHD) gemessenen sCD14-Konzentrationen. Auch die intradialytischen sCD14-Spiegel (t=2h) stiegen - abgesehen von dem Wert nach einem Monat Dialyse mit der PMMA-Dialysemembran - im Verlauf an. Nach drei Monaten Dialyse mit der PMMA-Dialysemembran waren sowohl die vor (t=vHD) als auch die nach zwei Stunden Dialyse (t=2h) gemessenen sCD14-Konzentrationen signifikant höher als während der Behandlung mit der HE-Filtermembran (Abb.9, Abb.10).

Die Dialysebehandlung mit der PMMA-Dialysemembran führte zwar nach zwei Stunden zu einer Reduktion der Serum-Spiegel um 17,5% (PMMA 1), 7,0% (PMMA 2) bzw. 3,8% (PMMA 3) im Vergleich zu den Ausgangswerten, während die Hämodialyse mit der HE-Dialysemembran einen intradialytischen Anstieg (HEvU 4%, HEnU 7,4%) bewirkte, die Unterschiede waren jedoch nicht statistisch signifikant.

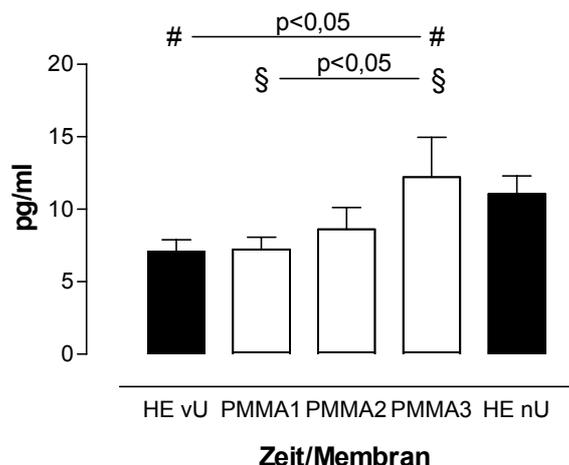


Abb. 10: sCD14 im Serum vor Dialysebeginn (t=vHD)

Die Serum-Proben wurden vor Beginn der Dialyse gewonnen und die sCD14-Werte mittels ELISA gemessen. Die nach Rückumstellung gemessenen Werte wurden statistisch nicht berücksichtigt.

Die Proben wurden vor Beginn und nach 2 Stunden Dialyse gewonnen, die Werte wurden mittels ELISA gemessen. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SD angegeben, die statistische Auswertung erfolgte mittels One-way-Anova für verbundene Stichproben (Friedman-Test mit anschließendem Dunn's Test).

Erläuterungen: # : $p < 0,05$, HE vU vs. PMMA 3, § : $p < 0,05$, PMMA 1 vs PMMA 3

Abkürzungen: HE vU: HD mit Hämophan-Filtermembran vor Umstellung, PMMA 1-3: Werte nach 1/2/3 Monaten während HD mit Polymethylmethacrylat-Membran, HE nU: Werte nach Rückumstellung auf Hämophan-Membran

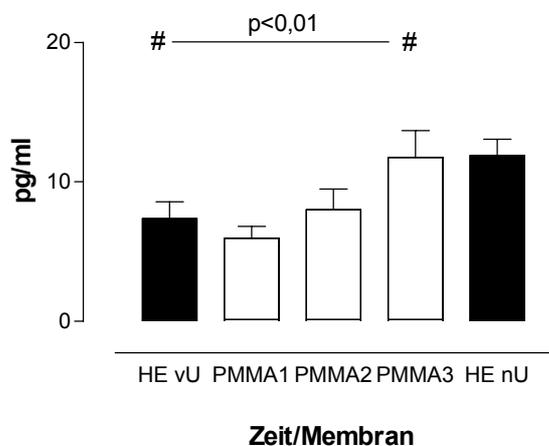


Abb. 11: sCD14 im Serum 2 Stunden nach Dialysebeginn (t=2h)

Die Serum-Proben wurden nach 2 Stunden Dialyse gewonnen und die sCD14-Werte mittels ELISA gemessen. Die nach Rückumstellung gemessenen Werte wurden statistisch nicht berücksichtigt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SD angegeben, die statistische Auswertung erfolgte mittels One-way-Anova für verbundene Stichproben (Friedman-Test mit anschließendem Dunn's Test). Die nach 2 Stunden Dialyse gemessenen Werte wurden entsprechend dem während der Behandlung entzogenen Volumen korrigiert.

Erläuterungen: #: $p < 0,01$, HE vU vs. PMMA 3

Abkürzungen: HE vU: HD mit Hämophan-Filtermembran vor Umstellung, PMMA 1-3: Werte nach 1/2/3 Monaten während HD mit Polymethylmethacrylat-Membran, HE nU: Werte nach Rückumstellung auf Hämophan-Membran

5.3.5 IL-1 REZEPTOR-ANTAGONIST

Die prädialytischen Serum-Werte (t=vHD) veränderten sich nach Umstellung von der HE- auf die PMMA-Dialysemembran nicht signifikant und auch die nach zwei Stunden Dialyse (t=2h) gemessenen Konzentrationen unterschieden sich nicht. Bei Behandlung mit beiden Dialysemembranen kommt es im Vergleich zu den Ausgangswerten nach zwei Stunden Dialyse zu einem Anstieg der Plasma-Konzentrationen, hier ließen sich jedoch auch keine signifikanten Unterschiede nachweisen (Tab. 10). Im Dialysat wurden jedoch nach einem und nach zwei Monaten Dialyse mit der PMMA-Membran signifikant höhere Mengen als während der Behandlung mit der Hämophan-Membran gemessen (Abb. 11).

	HE vU (n=6)	PMMA 1 (n=6)	PMMA 2 (n=6)	PMMA 3 (n=6)	HE nU (n=4)	Statisti k
IL-1Ra im Serum (t=vHD) (pg/ml)	180,6 ± 96,6	162,0 ± 92,8	170,1 ± 106,5	142,9 ± 89,2	140,6 ± 101,7	p>0.36
IL-1Ra im Serum (t=2h) (pg/ml)	195,3 ± 118,4	177,2 ± 97,2	208,4 ± 127,8	180,0 ± 113,9	175,2 ± 137,9	p>0.2

Tab.10: IL-1Ra im Serum vor Dialyse, nach 2 Stunden Dialyse

Die Proben wurden vor Beginn und nach 2 Stunden Dialyse gewonnen, die Werte wurden mittels ELISA gemessen. Die nach 2 Stunden Dialyse gemessenen Werte wurden entsprechend dem während der Behandlung entzogenen Volumen korrigiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SD angegeben, die statistische Auswertung erfolgte mittels One-way-Anova für verbundene Stichproben (Friedman-Test mit anschließendem Dunn's Test). Die Werte nach Rückumstellung auf die Hämophan-Membran wurden statistisch nicht berücksichtigt.

Abkürzungen: HE vU: HD mit Hämophan-Filtermembran vor Umstellung, PMMA 1-3: Werte nach 1/2/3 Monaten während HD mit Polymethylmethacrylat-Membran, HE nU: Werte nach Rückumstellung auf Hämophan-Membran

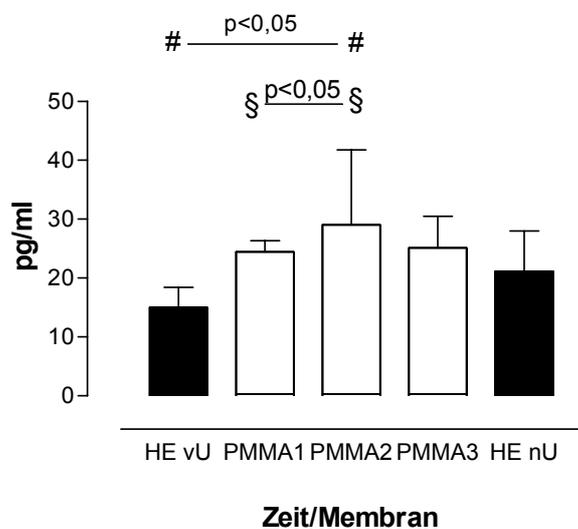


Abb.12: IL-1Ra im Dialysat nach 15 Minuten Dialyse

Die Dialysat-Proben wurden nach 15 Minuten Dialyse gewonnen und die IL-1Ra-Werte mittels ELISA gemessen. Die nach Rückumstellung gemessenen Werte wurden statistisch nicht berücksichtigt.

Erläuterungen: #: $p < 0.05$, HE vU vs PMMA 1; §: $p < 0.05$, HE vU vs PMMA 2

Abkürzungen: HE vU: HD mit Hämophan-Filtermembran vor Umstellung, PMMA 1-3: Werte nach 1/2/3 Monaten während HD mit Polymethylmethacrylat-Membran, HE nU: Werte nach Rückumstellung auf Hämophan-Membran

5.4 β 2-MIKROGLOBULIN

Bei den vor Beginn der Dialysebehandlung gewonnenen Plasma-Proben ($t=vHD$) ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Dialysemembranen nachweisen. Die nach fünfzehn Minuten Dialyse gemessenen Werte ($t=15min$) waren jedoch nach drei Monaten Dialyse mit der PMMA-Dialysemembran signifikant niedriger im Vergleich zu den Werten vor Umstellung ($p<0.05$; HE vU vs PMMA 3), (Tab. 11). Im Dialysat war bei Behandlung mit der PMMA-Dialysemembran im Gegensatz zur HE-Filtermembran kein β 2-Mikroglobulin messbar. Während der Dialysebehandlung mit der PMMA-Dialysemembran zeigte sich nach fünfzehn Minuten Dialyse im Vergleich zu den Ausgangswerten ein Abfall der Plasma-Konzentrationen um 32 bis 34%, während die Behandlung mit der HE-Dialysemembran vor Umstellung zu einem Anstieg um 15 % führte. Der Unterschied fällt nach zwei und drei Monaten Dialysebehandlung mit der synthetischen Dialysemembran signifikant im Vergleich zur Behandlung mit der zellulosebasierenden Dialysemembran aus (Abb. 12).

	HE vU (n=6)	PMMA 1 (n=6)	PMMA 2 (n=6)	PMMA 3 (n=6)	HE nU (n=4)	Statistik
β2-M im Plasma (t=vHD) (mg/l)	28,7 ± 7,8	25,0 ± 4,9	28,3 ± 8,4	24,4 ± 6,9	31,7 ± 6,7	p>0.26
β2-M im Plasma (t=15min) (mg/l)	33,0 ± 8,5 ¥	16,8 ± 4,8	18,6 ± 5,1	16,2 ± 4,5 ¥	31,8 ± 13,8	p<0.05
β2-M im Dialysat (mg/l)	0,14 ± 0,06 † Ψ #	<0,04 †	<0.04 Ψ	<0,04 #	0,09 ± 0,07	p<0.05

Tab.11: β2-M im Plasma vor Dialyse, nach 15 Minuten Dialyse und im Dialysat

Die Proben wurden vor Beginn und nach 15 Minuten Dialyse gewonnen, die Werte wurden mittels Nephelometrie gemessen.

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± SD angegeben, die statistische Auswertung der Werte vHD und t=15 zwischen beiden Membranen über den Zeitverlauf erfolgte mittels One-way-Anova für verbundene Stichproben (Friedman-Test mit anschließendem Dunn's Test). Die Werte nach Rückumstellung auf die Hämophan-Membran wurden statistisch nicht berücksichtigt. Der Vergleich der Werte zu einzelnen Messzeitpunkten vor Dialyse und nach 15 Minuten wurde mittels t-test für verbundene Stichproben (Wilcoxon-matched pairs-Test) ausgewertet.

Erläuterungen: ¥: p<0.05 HE vU vs PMMA3, #: p<0,05, HE vU vs PMMA 3, Ψ: p<0,05, HE vU vs PMMA 2; †: p<0,05, HE vU vs PMMA 1;

Abkürzungen: HE vU: HD mit Hämophan-Filtermembran vor Umstellung, PMMA 1-3: Werte nach 1/2/3 Monaten während HD mit Polymethylmethacrylat-Membran, HE nU: Werte nach Rückumstellung auf Hämophan-Membran

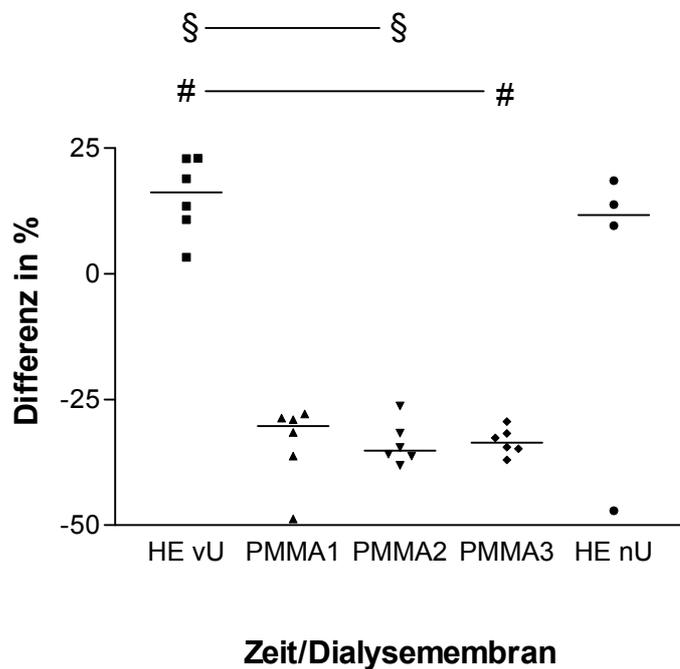


Abb. 13: Prozentuale Differenz von β 2-M im Serum nach 15 Minuten Dialyse im Vergleich zu den Ausgangswerten vor Dialyse

Dargestellt ist die mittlere Differenz vor Dialyse und nach 15 Minuten Dialyse als Median.

Die nach Rückumstellung gemessenen Werte wurden statistisch nicht berücksichtigt.

Erläuterungen: § : $p < 0,01$, HE vU vs PMMA 2; # : $p < 0,05$, HE vU vs PMMA 3,

Abkürzungen: HE vU: HD mit Hämophan-Filtermembran vor Umstellung, PMMA 1-3: Werte nach 1/2/3 Monaten während HD mit Polymethylmethacrylat-Membran, HE nU: Werte nach Rückumstellung auf Hämophan-Membran

5.5 IN VITRO DIALYSE-EXPERIMENTE

5.5.1 INTERLEUKIN-6

Beim *in vitro* Versuch mit gepooltem Plasma mehrerer Spender zeigten sich im Durchlauf nahezu konstante IL-6-Konzentrationen im Bereich der unteren Nachweisgrenze (Abb.13), nach 8 Minuten Filtration wurde ein leichter Anstieg der IL-6-Spiegel verzeichnet, diese fielen jedoch nicht signifikant aus (Abb.14). Die im Filtrat gemessenen Mengen an IL-6 lagen sämtlich unterhalb der Nachweisgrenze. (Abb.15).

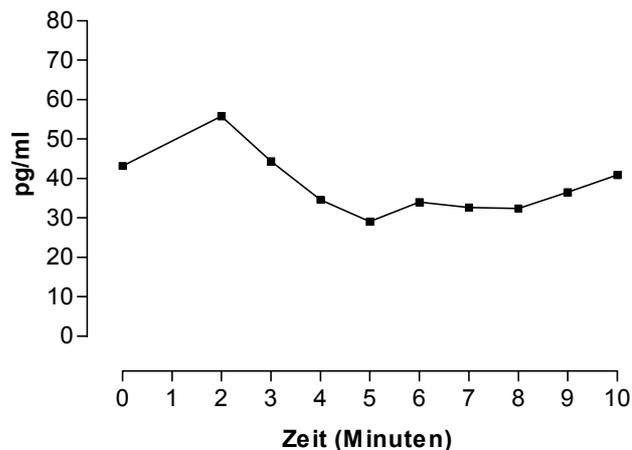


Abb.14: IL 6 *in vitro* im Plasma bei Durchlauf (PMMA-Membran)

Die Proben wurden während des *in vitro*-Versuchs vor Beginn und in minütlichen Abständen während des Durchlaufs gewonnen. Die IL-6-Werte wurden mittels ELISA gemessen.

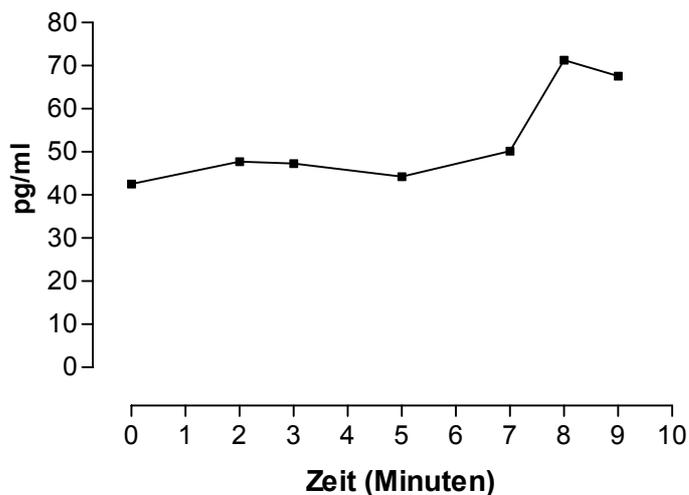


Abb.15: IL-6 *in vitro* im Plasma bei Filtration (PMMA-Membran)

Die Proben wurden während des *in vitro*-Versuchs vor Beginn und dann in 1- bzw. 2-minütlichen Abständen während der Filtration gewonnen. Die IL-6-Werte wurden mittels ELISA gemessen.

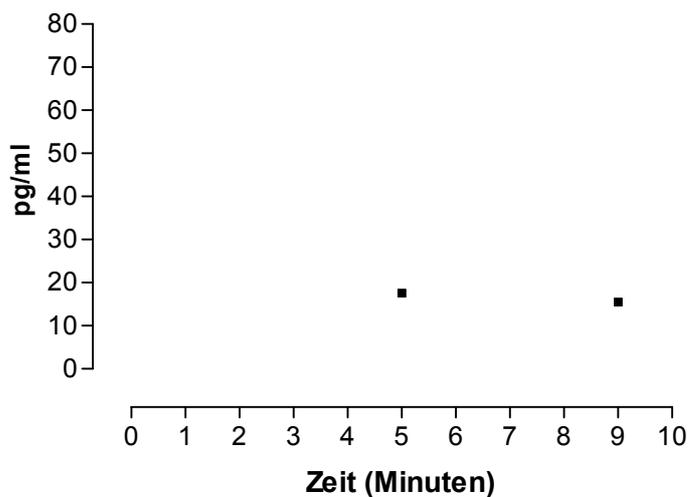


Abb.16: IL-6 *in vitro* im Filtrat (PMMA-Membran)

Die Proben wurden während des *in vitro*-Versuchs 5 und 9 Minuten nach Beginn der Filtration gewonnen und die IL-6-Werte mittels ELISA gemessen.

5.5.2 β 2-MIKROGLOBULIN

Beim *in vitro* Versuch mit der PMMA-Membran ließ sich β 2-Mikroglobulin lediglich vor Beginn des Durchlaufs im Plasma nachweisen, alle anschließend während des Durchlaufs und der Filtration gemessenen Proben wiesen lediglich minimale Konzentrationen auf (Abb. 16, Abb. 17). Im Filtrat lag das β 2-Mikroglobulin unterhalb der Nachweisgrenze.

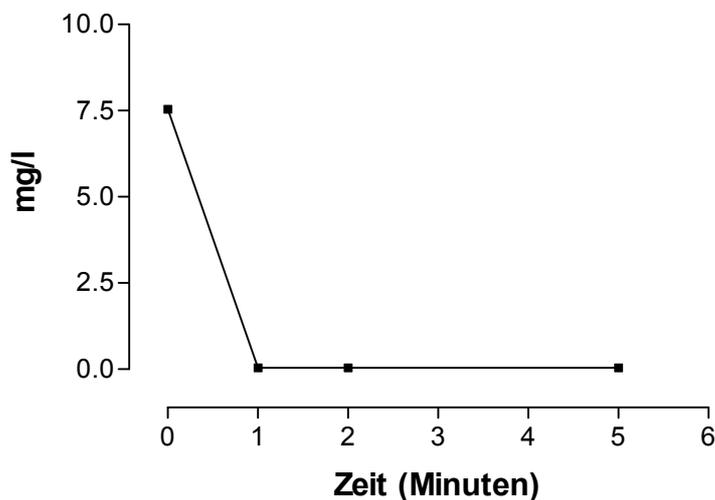


Abb. 17: β 2-M *in vitro* im Plasma bei Durchlauf (PMMA-Membran)

Die Proben wurden während des *in vitro*-Versuchs vor Beginn und nach 1, 2 und 5 Minuten während des Durchlaufs gewonnen. Die IL-6-Werte wurden mittels Nephelometrie gemessen.

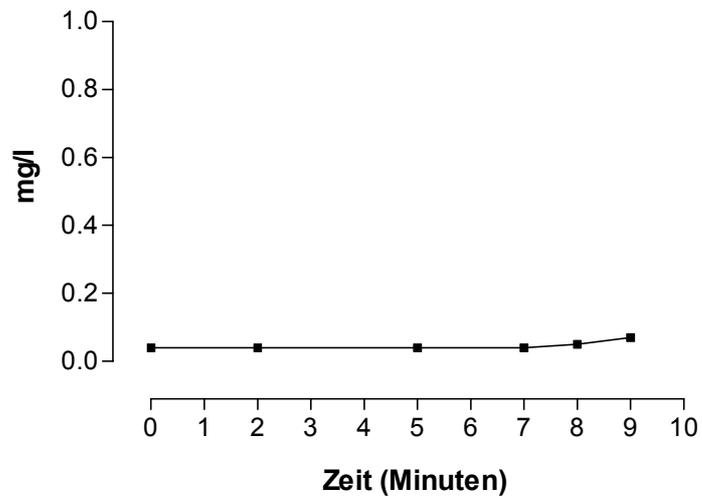


Abb.18: β 2-M *in vitro* im Plasma bei Filtration (PMMA-Membran)

Die Proben wurden während des *in vitro*-Versuchs vor Beginn und nach 1, 2, 5, 7, 8 und 9 Minuten während der Filtration gewonnen. Die β 2-M-Werte wurden mittels Nephelometrie gemessen.

5.6 ULTRASCHALLUNTERSUCHUNG DER A. BRACHIALIS

Die Messung des maximalen Gefäßdurchmessers der A. brachialis ergab weder bei den prädialytischen (t=vHD) noch den intradialytischen (t=30min) Werten signifikante Unterschiede zwischen beiden Dialysemembranen. Und auch die prozentuale maximale Dilatation bei Vergleich der vor und nach Ischämie gemessenen maximalen Gefäßdurchmesser als Reaktion auf die Ischämie unterschied sich nicht signifikant bei Behandlung mit den unterschiedlichen Filtermembranen. Jedoch ließ sich bei den maximalen Gefäßdurchmessern nach dreißig Minuten Dialyse ein Trend im One-way-ANOVA nachweisen ohne dass sich signifikante Unterschiede im Dunn's Test fanden (Tab. 12). Im Vergleich mit der Kontrollgruppe ließ sich auch keine signifikante Einschränkung der maximalen Dilatation bei den Dialysepatienten beobachten (Tab. 13),(Abb. 18).

Die maximale Dilatation trat bei verschiedenen Individuen und Messpunkten zu unterschiedlichen Zeitpunkten auf. Es wurde jeweils der maximal gemessene Durchmesser berücksichtigt.

	HE vU (n=6)	PMMA 1 (n=6)	PMMA 2 (n=6)	PMMA 3 (n=6)	Statistik
Max. Durchmesser (cm) (vHD) vor Ischämie	0,43 ± 0,05	0,43 ± 0,05	0,46 ± 0,06	0,43 ± 0,03	p>0,77
Max. Durchmesser (cm) (vHD) nach Ischämie	0,45 ± 0,04	0,46 ± 0,04	0,48 ± 0,06	0,45 ± 0,04	p>0,19
Max. Durchmesser (cm) (t=30min) vor Ischämie	0,44 ± 0,05	0,43 ± 0,06	0,44 ± 0,07	0,45 ± 0,05	p>0,54
Max. Durchmesser (cm) (t=30min) nach Ischämie	0,46 ± 0,05	0,46 ± 0,05	0,46 ± 0,06	0,47 ± 0,05	p>0,68
Max. Dilatation (vHD) (%)	4,22 ± 2,28	6,44 ± 3,13	4,81 ± 2,2	3,78 ± 1,91	p>0,06
Max Dilatation (t=30min) (%)	4,11 ± 1,91	5,85 ± 2,80	4,51 ± 1,87	3,52 ± 2,36	p<0,04 OWA, aber Dunns neg

Tab.12: Ultraschall-Daten Patienten vor Dialyse und nach 30 Minuten Dialyse

Maximaler Durchmesser sowie maximale Dilatation in % vom Ausgangswert vor Dialyse und 30 Minuten nach Dialyse jeweils vor Ischämie und nach Ischämie. Die nach Rückumstellung gemessenen Werte wurden statistisch nicht berücksichtigt.

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SD angegeben, die statistische Auswertung der Patientengruppe erfolgte mittels One-way-Anova für verbundene Stichproben (Friedman-Test mit anschließendem Dunn's Test). Die statistische Auswertung der Messwerte der Patienten- und der Kontrollgruppe erfolgte mittels Mann-Whitney-Test.

Abkürzungen: HE vU: HD mit Hämophan-Filtermembran vor Umstellung, PMMA 1-3: Werte nach 1/2/3 Monaten während HD mit Polymethylmethacrylat-Membran, HE nU: Werte nach Rückumstellung auf Hämophan-Membran

	Patienten (n=6)	Kontrollen (n=6)	Statistik
Max. Durchmesser (cm) vor Ischämie	0,44 ± 0,05	0,41 ± 0,07	p>0.49
Max. Durchmesser (cm) nach Ischämie	0,46 ± 0,05	0,43 ± 0,07	p>0.41
Max. Dilatation in %	4,81 ± 2,48	4,79±-2,59	p>0.89

Tab. 13: Vergleich der Durchmesser und der maximalen, endothelvermittelten Vasodilatation bei Patienten und Kontrollen

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SD angegeben, die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney-Test für unverbundene Stichproben.

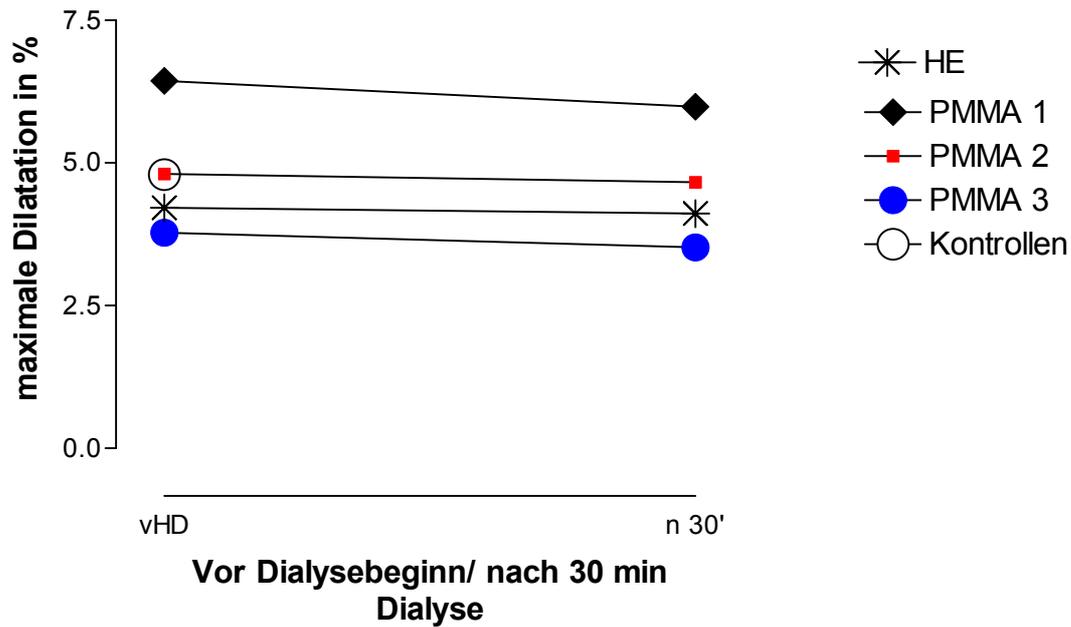


Abb. 19: Vergleich der maximalen, endothelvermittelten Vasodilatation nach Ischämie vor und 30 Minuten nach Dialysebeginn (in Prozent) bei den Dialysepatienten und den Kontrollen

Die endothelvermittelte Vasodilatation auf einen definierten Ischämieerz wurde nach sonographischer Darstellung an der A.brachialis bei Hämodialysepatienten während der Behandlung mit beiden Membranen gemessen.

Abkürzungen: **vHD:** vor Hämodialysebeginn; **n 30':** 30 Minuten nach Dialysebeginn; **HE:** HD mit Hämophan-Filtermembran vor Umstellung, **PMMA 1-3:** Werte nach 1/2/3 Monaten während HD mit Polymethylmethacrylat-Membran, **Kontrollen:** Werte der Kontrollen

5.7 DATEN ZUR HYPOTHESE EINER ADAPTATION DES IMMUNSYSTEMS AN DIE DIALYSE

Um einen direkten Vergleich der einzelnen in dieser Studie untersuchten im weitesten Sinne inflammatorischen Parameter in einer Graphik zu ermöglichen, wurden von den jeweils 6 Patienten die Medianwerte errechnet und diese prozentual zum arithmetischen Mittel der Werte nach 1, 2 und 3 Monaten in Beziehung gesetzt (Abb. 19).

Nach drei Monaten Dialyse liess sich eine deutliche Reduktion der IL-6 Werte nach Stimulation mit LPS, der Komplementaktivierung, sowie der Konzentrationen an IL-1Ra und des β 2-Mikroglobulin nachweisen; bei drei der fünf Parameter beobachtete man den höchsten Wert nach 2 Monaten. Lediglich das sCD14 stieg stetig über den Behandlungszeitraum an.

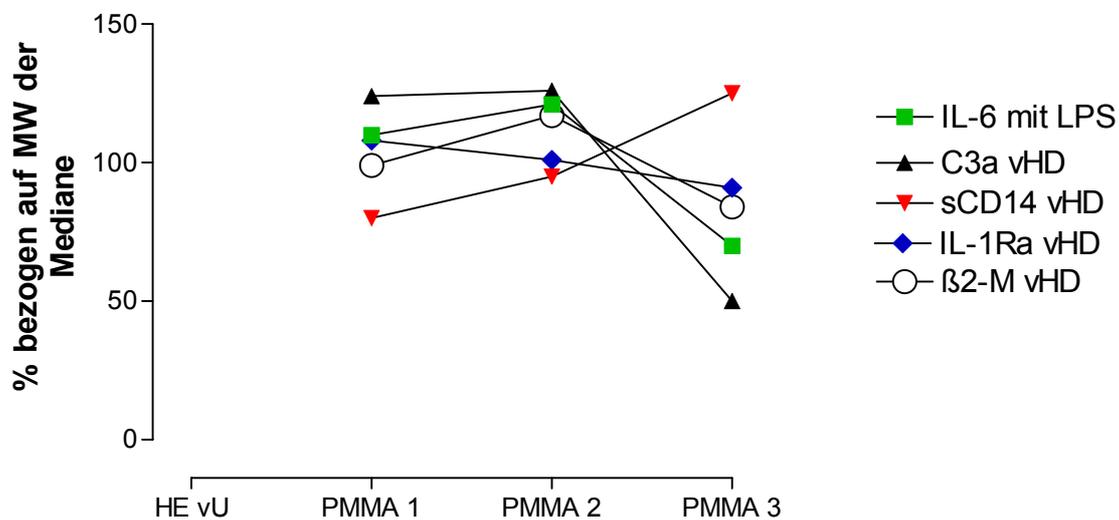


Abb. 20: Prozentualer Zeitverlauf des Mittelwertes der Mediane von IL-6, C3a, IL-1Ra, sCD14 und β2-Mikroglobulin über den Dialysezeitraum mit der PMMA-Membran

Dargestellt wurde IL-6 nach Stimulation mit LPS sowie die Werte von C3a, IL-1Ra, sCD14 und β2-Mikroglobulin jeweils vor Dialysebeginn.

Abkürzungen: HE: HD mit Hämophan-Filtermembran vor Umstellung, PMMA 1-3: Zeitpunkt 1/2/3 Monate Dialyse mit der PMMA-Membran

6 DISKUSSION

Die Lebenserwartung bei Dialysepatienten liegt trotz Fortschritten in der Dialysetechnik weiterhin unter der des Vergleichskollektivs. Hierfür sind in den letzten Jahren insbesondere kardiovaskuläre Ereignisse, die mit einer chronischen Inflammation und mit einer eingeschränkten Endothelfunktion einhergehen, verantwortlich gemacht worden. Somit ist die Weiterentwicklung von Dialysemembranen zur Verbesserung des Überlebens und zur Verminderung der dialyseassoziierten Komplikationen dringend notwendig. Die vorliegende Pilotstudie befasst sich mit der Frage nach Unterschieden zwischen einer synthetischen und einer zellulosebasierten Dialysemembran im Hinblick auf die chronische Inflammation mit besonderer Betrachtung der Induktion der Bildung und der Entfernung von Zytokinen und deren Rezeptoren sowie der Komplementaktivierung und der Frage, ob Auswirkungen auf die bei Dialysepatienten eingeschränkte Endothelfunktion nachweisbar sind.

6.1 PATIENTEN- UND KONTROLLGRUPPE

Es gibt keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten- und Kontrollgruppe in bezug auf Alter, Geschlecht und antihypertensive Medikation sowie Anzahl der gerauchten Zigaretten. Somit beruhen Unterschiede wahrscheinlich auf der renalen Funktion, eine Vergleichbarkeit ist gegeben.

6.2 DIALYSEPARAMETER

Es ließen sich keine signifikanten Unterschiede bei den dialyseassoziierten Parametern zwischen beiden Membranen nachweisen. Dies belegt, dass nachweisbare Effekte nicht auf eine aus Studiensicht unerwünschte, effektivere Entfernung von immunaktiven

Molekülen durch Verlängerung der Dialysezeit oder Erhöhung der Dialyse-Effektivität bei der Verwendung unterschiedlich strukturierter Membranen zurückzuführen sind.

6.3 ERYTHROPOETIN UND ANTIHYPERTENSIVE MEDIKATION

Die Erythropoetin-Dosis konnte zwar bei Verwendung der synthetischen Membran tendenziell leicht, jedoch nicht signifikant reduziert werden. Dies steht im Einklang mit Untersuchungen von RICHARDSON et al (2003), der beim Vergleich einer zellulosebasierten und einer synthetischen Membran keine signifikanten Unterschiede bezüglich der benötigten Erythropoetin-Dosis nachweisen konnte. Die Fragestellung stand jedoch nicht im Fokus unserer Pilotstudie, die niedrige Fallzahl erlaubt keine definitive Stellungnahme.

6.4 LABORPARAMETER

Der Hämoglobingehalt und der Hämatokrit blieben in unserer Studie im Verlauf unverändert, somit war trotz einer leichten Reduktion die Erythropoetin-Dosis effektiv zur Einhaltung der Zielwerte. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen konnten in einer Studie bei Verwendung einer high-flux-PMMA-Membran stabile Hämatokrit-Werte über einen Zeitraum von 11 Monaten ohne die Notwendigkeit einer Verabreichung von Erythropoetin aufrechterhalten werden (KOBAYASHI, 1993). Auch die Retentionswerte blieben konstant als Ausdruck einer unveränderten Dialyseeffizienz. Insbesondere kam es auch nicht zu einer relevanten Veränderung des Serumphosphats.

6.5 ENTZÜNDUNGSPARAMETER

6.5.1 POSITIVE AKUT-PHASE-PROTEINE

Das CRP ist ein positives Akut-Phase-Protein mit einer Halbwertszeit von 19h Stunden, das Zytokin-vermittelt, insbesondere durch IL-6, in der Leber gebildet wird. Etwa 8-10 Stunden nach einem entzündlichen Stimulus wird CRP mit einer bis zu 100fach erhöhten Konzentration freigesetzt. Es dient u.a. als opsonierendes Protein zur Unterstützung der antibakteriellen Abwehr und führt *in vivo* und *in vitro* zur Komplementaktivierung (WOLBINK, 1996). Gegenüber Gesunden sind die CRP-Konzentrationen bei Dialysepatienten aufgrund der Akkumulation von Toxinen, Zytokinen und deren löslichen Rezeptoren chronisch erhöht (MEMOLI, 2000). Erhöhte CRP-Spiegel gehen nicht nur bei Dialysepatienten (WANNER, 2002), sondern auch bei gesunden - Menschen mit einem höheres Mortalitätsrisiko einher (RIDKER, 1997) und sind ein Prädiktor für kardiovaskuläre Ereignisse bei Gesunden. Die Hämodialyse selbst führt jedoch im Vergleich zu unbehandelten Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz zu einem weiteren Anstieg der CRP-Konzentrationen (HAUBITZ, 1996).

Die Ergebnisse bezüglich der Entzündungsparameter wie CRP, Ferritin und Fibrinogen beim Vergleich verschiedener Dialysemembranen werden bisher kontrovers diskutiert. Während SCHINDLER und Mitarbeiter (2000) signifikant niedrigere CRP-Werte bei Hämodialyse mit einer synthetischen Dialysemembran im Vergleich zu einer Cuprophan-Dialysemembranen nachwiesen, konnten SCHOUTEN und Mitarbeiter (2000) keine Unterschiede aufzeigen. Auch in der hier vorgelegten Studie waren keine Unterschiede zwischen beiden Dialysemembranen beobachtbar, hierbei muß allerdings auch die geringe Zahl der eingeschlossenen Patienten und die relativ kurze Studiendauer berücksichtigt werden. Denn GALLI und Mitarbeiter (2005) wiesen bei Hämodialyse mit der auch von uns verwendeten PMMA-Dialysemembran erst mit einer zeitlichen Verzögerung von 6 Monaten eine signifikante Reduktion des CRP nach, wobei auch eine signifikanter Abfall von IL-1 und IL-6 beobachtet wurde. Worauf diese Verzögerung des nachweisbaren Effekts zurückzuführen ist, ist noch nicht geklärt.

6.5.2 NEGATIVE AKUT-PHASE-PROTEINE

Während der Behandlung mit der synthetischen Dialysemembran zeigte sich in der vorgelegten Studie nach drei Monaten eine signifikante Abnahme des Gesamt-Eiweißgehalts und eine tendenzielle, wenngleich nicht signifikante Verringerung des Albumingehalts. In einer Studie von TESSITORE (2004) war trotz einer Reduktion des Serumalbumin von 8% über einen Zeitraum von 7 Monaten bei Behandlung mit einer PMMA-Membran keine Malnutrition anhand des BMI nachweisbar. Jedoch muß hierbei auch die relativ niedrige Aussagekraft des BMI bedacht werden. GALLI und Mitarbeiter (2005) wiesen passend zu unseren Ergebnissen nach einem Monat Hämodialyse mit der auch von uns verwendeten PMMA-Filtermembran einen vorübergehenden Abfall des Albumin um 8% und des Gesamteiweiß um 9% nach. Albumin und Gesamtprotein blieben im Vergleich zum Ausgangsniveau leicht erniedrigt. In der SDS-Page Analyse konnten sie zeigen, daß durch die PMMA-Membran 1 bis 4 g Protein während einer einzigen Dialysesitzung entfernt wurden, so waren es in der Kontrollgruppe mit einer high-flux PMMA mit geringerer Porengröße oder mit zellulosebasierenden Filtermembranen lediglich 0.2 bis 0.3 g Protein (2005). BONOMINI und Mitarbeiter (1996) fanden bei der Untersuchung der auch von uns verwendeten PMMA-Dialysemembran, Moleküle mit einem Molekulargewicht von über 50 kDa (z.B. Albumin) und sogar Moleküle von 500 kDa (z.B. Erythropoetin-Inhibitoren) im Filtrat, die bei Verwendung anderer PMMA-Dialysemembranen mit einem niedrigeren Porendurchmesser nicht bestimmt werden konnten. Es erscheint jedoch unwahrscheinlich, dass dies ausreicht, um ein vermindertes Serum-Gesamteiweiß zu erklären, da der Verlust von Proteinen während der Dialysesitzung durch eine erhöhte Lebersynthese ausgeglichen werden müsste. Offensichtlich reicht die in unserer Studie nachweisbare Reduktion inflammatorischer Zytokine und die partielle Restitution der Immunfunktion nicht aus, um eine Abnahme des Gesamt-Eiweißes im Plasma zu verhindern. Da ein Zusammenhang zwischen Hypalbuminämie und erhöhter Morbidität und Mortalität besteht (LOWRIE, 1990; OWEN, 1993), müssen hier Effekte in Langzeitstudien beobachtet werden. Möglicherweise müßte eine Anwendung dieser Membran jedoch auf Patienten ohne eine vorbestehende schwere Malnutrition beschränkt bleiben.

6.5.3 INTERLEUKIN-6

Interleukin-6 ist der wichtigste Regulator der hepatischen Akut-Phase-Reaktion bei Entzündung. Es stimuliert die Synthese von CRP, Serum-Amyloid-A und Fibrinogen und führt zu einer verminderten Synthese von Transferrin und Serum-Albumin (KAIZU, 1998). Man nimmt an, daß IL-6 synergistisch mit IL-1 und TNF-alpha zu einer Herunterregulierung von Albumin-messenger-RNA führt und dadurch die Albumin-Synthese in der Leber inhibiert (MOSHAGE, 1987). In verschiedenen Studien zeigten sich bei Dialysepatienten und Patienten mit Niereninsuffizienz deutlich höhere IL-6-Spiegel als bei gesunden Kontrollen (YU, 2004). Zudem konnte ein Zusammenhang zwischen erhöhten IL-6-Konzentrationen und Mortalität der Dialysepatienten nachgewiesen werden (KIMMEL, 1998). STENVINKEL und Mitarbeiter (2002) zeigten eine Assoziation zwischen erhöhten IL-6-Spiegeln und Malnutrition sowie kardiovaskulären Ereignissen. Während der Hämodialyse konnte ein Anstieg des IL-6 und des Fibrinogen als Hinweis auf eine direkte Aktivierung des Immunsystems durch die Dialysebehandlung nachgewiesen werden (CAGLAR, 2002). Dieser Anstieg ließe sich zum einen durch eine direkte Aktivierung der Leukozyten durch die Adhärenz an die Dialysemembranen, die Aktivierung von immunkompetenten Zellen durch Komplementfaktoren oder durch während der Dialyse über die Membran eindringende Endotoxine erklären. Hierbei wird eine unterschiedliche Aktivierung der Zellen durch die verschiedenen Dialysemembranen propagiert. In unserer Studie zeigten sich keine membranbezogenen signifikanten Unterschiede bei der basalen IL-6 Synthese im Vollblutansatz. Nach Stimulation mit LPS sezernierten jedoch die nach drei Monaten Therapie mit der PMMA-Dialysemembran gewonnenen Leukozyten eine signifikant geringere Menge an IL-6 als während der Dialysebehandlung mit der Hämophan-Dialysemembran. Passend hierzu zeigte eine andere Studie eine sowohl basale als auch nach Stimulation mit LPS signifikant geringere IL-6-Sekretion durch PBMC bei Behandlung mit der PMMA-Filtermembran allerdings im Vergleich mit einer CU-Dialysemembran (MEMOLI, 2000), die als noch weniger biokompatibel als die HE-Membran gilt. Hingegen fanden SCHINDLER und Mitarbeiter (2000) keine Unterschiede zwischen der LPS-stimulierten IL-6-Ausschüttung bei Verwendung zellulosebasierender und synthetischer Dialysemembranen. MORIYAMA und Mitarbeiter (1998) zeigten, daß bei Verwendung von PMMA-Membranen unter Hämodiafiltrations- oder Hämofiltrationsbedingungen IL-6 als Polypeptid mit einem

Molekulargewicht von 21 kDa nicht in relevantem Ausmaß filtriert wird, obwohl die Porengröße der Membran von 100 μ m dies zulassen müsste. Auch in unserer Studie konnten wir weder im Dialysat der HD-Patienten signifikante IL-6-Mengen nachweisen, noch zeigten sich in den *in vitro*-Versuchen relevante Veränderungen des Plasmaspiegels durch Filtration. In den von uns durchgeführten *in vitro*-Versuchen bestimmten wir konstante Serumspiegel während des Durchlaufs, die zudem gegen eine relevante Adsorption an die PMMA-Membran sprechen. Es ist daher wahrscheinlich, dass sich die in der vorgelegten Studie gefundenen Unterschiede der LPS-induzierten IL-6-Sekretion durch eine geringere Voraktivierung der mononukleären Zellen bei Verwendung der synthetischen Dialysemembran erklären lassen.

6.5.4 KOMPLEMENTAKTIVIERUNG

Das Komplementsystem ist ein funktionelles System von thermolabilen Plasmaproteinen, die Aktivierung des klassischen Weges erfolgt durch Antigen-Antikörper-Komplexe, die des alternativen Weges durch freigesetzte Lipopolysaccharide und Immunglobuline. Das Komplementsystem führt über eine Zellmembranschädigung zur Lyse von Fremdzellen und zur Freisetzung von biologisch wirksamen Stoffen wie Entzündungsmediatoren. Die Interaktionen an Dialysemembranen bewirken die Aktivierung des Komplementsystems v.a. über den alternativen Aktivierungsweg (CHEUNG, 1989), zusätzlich wird allerdings auch die Aktivierung über den klassischen Weg durch Cuprophan-Dialysemembranen postuliert (LHOTTA, 1998). Eine unterschiedliche Komplementaktivierung durch verschiedene Dialysemembranen könnte sowohl durch die unterschiedliche Bindung von Proteinen an die Membranoberfläche, die für die Aktivierung des alternativen Weges benötigt werden, als auch durch sterische Veränderungen an der Oberfläche bedingt sein. Zudem könnten unterschiedliche Sterilisationsmethoden Einfluß auf die Biokompatibilität nehmen (CHEUNG, 1989). Weiterhin wird die unterschiedliche Fähigkeit zur Adsorption von Aktivatoren und Inhibitoren der Komplementaktivierung als Faktor diskutiert.

In unserer Studie ließ sich eine signifikante Reduktion der Komplementaktivierung durch die PMMA- im Vergleich zu der HE-Dialysemembran nachweisen. Die Dialyseprozedur selbst führte zudem bei beiden Dialysemembranen zu einer ausgeprägten

Komplementaktivierung. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen konnten CAPELLI und Mitarbeiter (1989) bei Dialyse mit einer PMMA-Filtermembran einen Abfall der C3a-Level während der Dialyse zeigen, während bei Verwendung einer HE-Filtermembran ein Anstieg der C3a-Konzentrationen nachweisbar war. Im Vergleich zu Cuprophan-Dialysemembranen ließ sich in mehreren Studien sowohl bei PMMA- als auch HE-Dialysemembranen eine geringere Komplementaktivierung beobachten (HAKIM, 1984; WEGMULLER, 1986; FALKENHAGEN, 1987; LUCCHI, 1989; HAAG-WEBER, 1994). Eine Adsorption an die Hämophan-Membran ist bisher nicht beschrieben, eine relevante Adsorption an die PMMA-Dialysemembran konnte jedoch gezeigt werden (FUJIMORI, 1998). Auch bei Verwendung einer synthetischen Polyacrylonitril (PAN)-Filtermembran war aufgrund der Adsorption von Komplementfaktoren an die Membran eine deutlich geringere Konzentration in der Zirkulation nachweisbar als bei Verwendung einer Cuprophan-Filtermembran, während die Gesamtmenge an Komplement, die sich nach Eluierung der Proteine aus dem Membranfilter zeigte, bei Verwendung der synthetischen Membran sogar höher lag als bei der Cuprophan-Membran (CHEUNG, 1986). Hierzu passen auch Ergebnisse von BÖHLER und Mitarbeitern (1991), die eine vergleichbare Elastase-Ausschüttung als Marker für die Granulozytenaktivierung bei Verwendung einer PMMA-Membran fanden, wie sie von CU-Membranen bekannt ist, obwohl sie sogar eine Abnahme der Konzentrationen von C3a im Blut nachweisen konnten. Dies könnte dafür sprechen, dass die eigentliche Leukozytenaktivierung bei synthetischen Dialysemembranen nicht geringer ist als bei zellulosebasierenden Membranen. Und die Biokompatibilität der PMMA-Dialysemembran aufgrund der reinen Beurteilung der im Plasma frei vorliegenden und somit messbaren Komplementfaktoren möglicherweise überschätzt wird. Worauf die zeitliche Verzögerung der von uns nachweisbaren Unterschiede zwischen beiden Membranen beruht, bleibt unklar. Hier müssen Langzeitstudien bzw. systematische Untersuchungen zur Adsorption von Komplementfaktoren für die abschließende Beurteilung durchgeführt werden.

6.5.5 LÖSLICHER ENDOTOXINREZEPTOR sCD14

Der Endotoxinrezeptor kommt in membrangebundener Form (mCD14) insbesondere auf Monozyten und Makrophagen vor. Die lösliche Form (sCD14) entsteht durch Abstreifen von der Zelloberfläche durch sogenannte „Shedding-Prozesse“ oder durch direkte

Freisetzung aus intrazellulären Depots (LABETA, 1993). Erhöhte Konzentrationen von sCD14 wurden nach Zugabe von LPS und bei Infektionen beobachtet und es wird deswegen als Marker für die Aktivierung von Monozyten und Makrophagen angesehen. Diese werden durch die Stimulation mit LPS sowohl über membrangebundenes CD14 (mCD14) als auch über LPS/sCD14-Komplexe zu einer erhöhten Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 angeregt (VITA, 1997). Zudem konnte nachgewiesen werden, dass LPS/sCD14-Komplexe zur Aktivierung von Endothelzellen führen (PUGIN, 1993) Auch *in vitro*-Daten einer anderen Studie zeigen eine direkte, über sCD14 vermittelte Aktivierung von Endothelzellen durch LPS, die zu einer vermehrten Bildung von Adhäsionsmolekülen führte, so dass ein direkter Einfluß auf die bei Dialysepatienten nachweisbare Endotheldysfunktion möglich erscheint (HAZIOT, 1993). Es konnte gezeigt werden, dass Monozyten, die *in vitro* mit LPS in Anwesenheit von menschlichem Serum stimuliert wurden, erhöhte Mengen an Sauerstoffradikalen freisetzen. Nach Erhöhung der sCD14-Konzentration auf das 4-10-fache konnte LPS die Monozyten jedoch nicht mehr aktivieren (SCHÜTT, 1992). Bei unphysiologisch hohen sCD14-Konzentrationen wirkte es somit antiinflammatorisch und neutralisierte offensichtlich die Effekte von LPS. Auch HAZIOT und Mitarbeiter (1994) beobachteten, dass rekombinantes sCD14 die LPS-induzierte Ausschüttung von Tumor necrosis factor- α (TNF- α), einem proinflammatorischen Zytokin, durch Makrophagen und Monozyten inhibiert. Zudem wiesen sie nach, dass im Tiermodell des septischen Schocks nach Applikation von rekombinantem sCD14 eine geringere Letalität zu verzeichnen war (HAZIOT, 1995). NOCKER und Mitarbeiter (1995) fanden im Serum von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz und von Dialysepatienten im Vergleich zu Gesunden deutlich erhöhte sCD14-Konzentrationen. Diese könnten zum einen aufgrund einer Akkumulation des normalerweise tubulär filtrierte sCD14 zum anderen aufgrund einer erhöhten Synthese bei urämie- und dialysebedingten Aktivierungsprozessen entstehen. Wir wiesen bei unseren Patienten ebenfalls deutlich erhöhte sCD14-Serumspiegel im Vergleich zu den bei Gesunden erwarteten Spiegel nach. Nach drei Monaten Behandlung mit der PMMA-Dialysemembran fielen signifikant höhere sCD-14-Konzentration im Vergleich zu den während der Behandlung mit der HE-Dialysemembran gemessenen Werten auf, die durch eine stärkere Aktivierung von Monozyten erklärbar wären. Dies steht jedoch nicht im Einklang mit den anderen von uns untersuchten Parametern wie z.B. Interleukin-6 und C3a, die insbesondere nach drei Monaten Dialyse mit der synthetischen Membran, eine eher abnehmende Aktivierung des Immunsystems

zeigten. Zudem kommt es während der Dialyse selbst nicht zu einem signifikanten Anstieg des sCD14, bei Umstellung der Filtermembranen auf die PMMA-Dialysemembran zeigt sich intradialytisch sogar ein Abfall der im Serum nachweisbaren sCD14-Konzentrationen. KAWANAKA und Mitarbeiter (2002) fanden im Gegensatz zu unseren Ergebnissen keine signifikanten Unterschiede der sCD14-Serum-Konzentrationen beim Vergleich zwischen einer low- und einer high-flux-Membran und konnten auch keinen signifikanten Anstieg während der Dialyse selbst zeigen. Auch NOCKER und SCHERBERICH (1995) fanden keine Unterschiede zwischen zellulosebasierenden (CU- und HE-Dialysemembranen) und synthetischen Dialysemembranen (Polysulfon), beobachteten hingegen einen signifikanten intradialytischen Anstieg der sCD14-Serum-Konzentrationen. Sie fanden auch eine Aktivierung von Monozyten *in vitro* durch bereits geringste Mengen LPS, die durchaus während der Dialyse im Dialysat vorliegen könnten. Möglicherweise kommt es aufgrund der höheren Porengröße doch zu einer teilweisen Rückfiltration von LPS oder einer erhöhten LPS-Adsorption an die synthetische Dialysemembran als Erklärung für die erhöhten sCD14-Konzentrationen. Eine Filtration des sCD14 ist aufgrund der Molekülgröße unwahrscheinlich. Auch die Ergebnisse von NOCKER et al. (1995), die in ihrer Studie konstante Serum-Spiegel von Hämopexin messen konnten, das das gleiche Molekulargewicht wie sCD14 aufweist und dessen Synthese durch die Hämodialyse nicht beeinflusst wird, sprechen gegen eine Filtration dieses Moleküls. Möglicherweise liegt eine Adsorption von sCD14 an die Dialysemembran vor, die die nach Dialysebeginn mit der synthetischen Dialysemembran nachweisbare Reduktion der Serumspiegel erklären könnte.

Zusammenfassend ist also durch sCD14 sowohl eine inflammationsinduzierende Wirkung durch die Aktivierung von Zellen, die kein membrangebundenes CD14 an ihrer Oberfläche besitzen, aber auch in Abhängigkeit von der Konzentration eine antiinflammatorische Regulation möglich. Während einer Sepsis gibt es eine negative Korrelation zwischen der CD14-Expression auf Monozyten, dem CRP und der Leukozytenelastase sowie der Schwere der Sepsis, d.h. niedrigere Konzentrationen von mCD14 zeigen einen schweren Verlauf an. Hingegen scheint vermehrt auftretendes sCD14 im Verlauf einer Sepsis eher für eine günstigere Prognose zu sprechen, da es Hinweise auf eine Heilungstendenz zu geben scheint (GLUCK, 2001). Somit bleibt die Bedeutung des während der Behandlung mit der PMMA-Dialysemembran ansteigenden sCD14 unklar, möglicherweise könnte dies jedoch insbesondere unter Berücksichtigung der anderen Parameter wie des IL-6 und des

C3a, die eher eine höhere Biokompatibilität der PMMA-Dialysemembran zeigen, auch Hinweis auf eine günstigere Immunkompetenz sein.

6.5.6 IL-1 REZEPTOR-ANTAGONIST

Der IL-1 Rezeptor-Antagonist hat ein Molekulargewicht von 22-25 kD und wird von Monozyten sowie von Makrophagen und Neutrophilen zusammen mit IL-1 α und IL-1 β , die proinflammatorisch wirken, sezerniert (ANDERSSON, 1992). Er verhindert durch Bindung an den IL-1 Rezeptor eine Signaltransduktion durch IL-1 α und IL-1 β und ist somit ein kompetitiver Inhibitor dieser Zytokine. IL-1Ra ist zudem auch als Reaktion auf einen inflammatorischen Stimulus wie die Freisetzung von LPS mit zeitlicher Verzögerung auf eine erhöhte IL-1 Synthese im Plasma nachweisbar und wird von Hepatozyten auch nach Stimulation durch IL-1 und IL-6 freigesetzt (GABAY, 1997). Obwohl IL-1Ra durch die Blockierung von IL-1 Effekten anti-inflammatorisch wirkt, kann es als Marker für die Leukozytenaktivierung betrachtet werden (PEREIRA, 1992). Insbesondere scheint die Balance zwischen beiden Cytokinen von großer Bedeutung zu sein, da IL-1 auch in der Abwehr von Infektionen von Bedeutung ist. In mehreren entzündlichen Erkrankungen z.B. bei Glomerulonephritis konnte in den Glomeruli ein lokales Übergewicht von IL-1 nachgewiesen werden, zudem reduzierte die Applikation von IL-1Ra die Monozyten/Makrophagen-Infiltration (TAM, 1994; TANG, 1994). IL-1Ra wird bereits erfolgreich in der Therapie bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis eingesetzt. In einer Langzeit FOLLOW-UP Studie bei 37 Dialysepatienten zeigte sich eine Korrelation zwischen der Synthese von IL-1 Ra durch Endotoxin-stimulierte PBMC *in vitro* und kardiovaskulären Ereignissen (BALAKRISHNAN, 2000). In mehreren Studien wurde IL-1 Ra bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz und bei Dialyse-Patienten sowohl im Serum und Plasma als auch intrazellulär in erhöhten Konzentrationen gefunden (PEREIRA, 1994; MROWKA, 1999; CANAUD, 2001). Als Hinweis auf den zusätzlich aktivierenden Einfluß der Nierenersatztherapie waren die Werte bei Dialysepatienten signifikant höher als bei unbehandelten ESRD-Patienten (HIGUCHI, 1997). Bei Dialysepatienten ließ sich zudem im Gegensatz zu Gesunden nach Stimulation mit LPS eine deutlich höhere IL-1Ra-Synthese durch PBMC *in vitro* als Hinweis auf eine Imbalance zwischen IL-1 und IL-1 Ra nachweisen (GU, 2000).

In der hier vorgelegten Studie ließen sich keine signifikanten Unterschiede der prä- und intradialytischen IL-1 Ra-Konzentrationen zwischen beiden Membrantypen nachweisen. Auch der prozentuale Anstieg der Werte nach zwei Stunden Dialyse unterschied sich nicht signifikant zwischen beiden Membranen. Jedoch zeigte sich eine signifikant höhere Filtration durch die PMMA-Membran. Eine Adsorption erscheint aufgrund der Werte nicht wahrscheinlich. Die vermehrte Elimination wirkt sich quantitativ jedoch nicht messbar auf die Serumwerte aus. Im Einklang damit stehen auch Untersuchungen von GROOTEMAN und Mitarbeitern (1997) sowie von MROWKA und Mitarbeitern (1999), die bei Dialyse mit einer Cuprophan-, einer modifizierten Zellulose-Filtermembran und einer synthetischen Membran (Polysulphon) ebenfalls keine Unterschiede zwischen den Dialysemembranen finden konnten.

Die Bedeutung dieser Befunde ist noch nicht vollständig geklärt, zum einen wird IL-1 Ra als Marker der Leukozytenaktivierung verstanden, zum anderen müsste es aufgrund seiner antagonistischen Eigenschaften als anti-inflammatorischer Parameter angesehen werden. Es wird zunehmend als Reaktion auf eine vermehrte IL-1-Synthese verstanden. Es zeigte sich, dass eine etwa 1000fache Menge an IL-1Ra notwendig ist, um die entsprechenden Effekte des IL-1 zu inhibieren. Somit könnte die Produktion von IL-1Ra lediglich ein Indikator der Leukozytenaktivierung mit konsekutiver Freisetzung des Antagonisten sein. Letztlich muß die Bedeutung dieses Parameters im Zusammenspiel des Netzwerks aus Zytokinen und deren Antagonisten eingehender beleuchtet werden. Wovon eine Veränderung der Produktion abhängig ist und ob ein Zusammenhang mit der Dialysemembran oder dem Dialysat besteht, bleibt unklar. Zudem bleibt fraglich, ob IL-1 Ra ein verlässlicher Parameter zur Charakterisierung der Akut-Phase-Reaktion ist.

6.6 β 2 MIKROGLOBULIN

β 2-Mikroglobulin (β 2-M) ist ein mittelgroßes Molekül mit einem Molekulargewicht von 11.8 kD, das außer bei Krebspatienten und bei Vorliegen einer systemischen Inflammation in konstanten Raten synthetisiert und normalerweise renal eliminiert wird. Bei Dialysepatienten kumuliert es aufgrund der mangelnden Elimination und möglicherweise auch aufgrund einer gesteigerten Sekretion (CAMPISTOL, 1993; MIYATA, 1994) und

führt durch seine Ablagerung in Gelenken, Knochen und Bändern in Form von β -Faltblattstrukturen zur Amyloidose (KOCH, 1992). Zudem könnte es aufgrund seines appetithemmenden Effekts für die bei Dialysepatienten beobachtete Mangelernährung mitverantwortlich sein. Die Prävalenz von β 2-M-Ablagerungen ist eng mit der Dauer der Dialyse korreliert (JADOUL, 1997), bei Fortentwicklung der Dialysemembranen wurde die Elimination dieses Moleküls durch Adsorption und Filtration angestrebt. Eine relevante Adsorption von β 2-M an PMMA-Membranen bei der Hämodialyse wurde z.B. von KLINKE (1989) und KOBAYASHI (1993) vorbeschrieben. Diese war vergleichbar mit der anderer synthetischer Dialysemembranen, aber signifikant höher als die durch eine Cuprophan-Dialysemembran. Eine Verringerung der β 2-Mikroglobulin-Konzentrationen im Serum bei Behandlung mit PMMA-Dialysemembranen ist mit einer Abnahme von Gelenkschmerzen und niedrigeren Inzidenz des Auftretens von Karpaltunnelsyndromen assoziiert (AIOKE, 1995). LIAN et al (1993) konnten zeigen, daß die Elimination von β 2-M durch eine PMMA-Dialysemembran höher war als die durch eine Polysulfon-Membran. Eine Reduktion der Plasma-Konzentrationen war jedoch nicht in allen Studien nachweisbar, AIOKE und Mitarbeiter (1995) ebenso wie ARAKAWA und Mitarbeiter (1991) jedoch beobachteten eine signifikante Reduktion der Plasma β 2-M Spiegel durch die Dialyse mit der synthetischen Dialysemembran.

In unserer Studie war ebenfalls eine signifikante intradialytische Reduktion des Serum- β 2-Mikroglobulins um etwa 33% durch die PMMA-Filtermembran beobachtbar, die bei fehlendem Nachweis einer relevanten Filtration als reiner Adsorptionseffekt angesehen werden muß. Unterstützend zeigte sich auch in den *in vitro* Versuchen die Adsorption des gesamten β 2-Mikroglobulins an die PMMA-Dialysemembran. Trotz dieser signifikanten Reduktion während der Dialyse konnten im dialysefreien Intervall keine erniedrigten Serumwerte gemessen werden. Dies ließe sich dadurch erklären, dass die eliminierten Mengen nicht groß genug sind, um innerhalb einiger Wochen zur Absenkung der Serumspiegel zu führen oder es kommt parallel zu einer gesteigerten Synthese. Dagegen spricht eine Studie von FLOEGE und Mitarbeitern (1991), die bei Gesunden und Hämodialyse-Patienten eine gleiche Syntheserate von β 2-Mikroglobulin bei eingeschränkter Clearance nachwiesen. Durch die Hämodialyse mit der Hämophan-Filtermembran konnte hingegen nur eine geringe Filtration des β 2-M und sogar ein Anstieg der intradialytischen Werte während der Dialyse beobachtet werden. Dies steht im Einklang mit einer Studie, die beim Vergleich zwischen einer high-flux und einer konventionellen CU-Membran sowie einer PMMA-Membran eine Reduktion des β 2-M um

32 % durch die PMMA-Membran und eine Reduktion um 10% durch die high-flux CU-Membran nachweisen konnte, während die Behandlung mit der konventionellen Membran das β 2-M nicht entfernen konnte (SCHAEFER, 1989).

6.7 ENDOTHELIALE DYSFUNKTION

In unserer Studie fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Dialysemembranen in bezug auf die Endothelfunktion. Ein initial nachweisbarer Trend der Verbesserung der endothelvermittelten Vasodilatation nach Umstellung der Dialysebehandlung auf die synthetische Dialysemembran ließ sich im Verlauf nicht bestätigen. Nach dreißig Minuten Dialyse konnte jedoch immerhin eine Signifikanz im ANOVA dargestellt werden, dieser Trend ließe sich möglicherweise in einer größer angelegten Langzeitstudie beweisen. Wir konnten eine Einschränkung der Endothelfunktion nach Beginn der Dialysesitzung im Vergleich zu den vor Dialysebeginn gemessenen Werten feststellen, die Unterschiede fielen jedoch nicht signifikant aus. Auch MIGLIACCI und Mitarbeiter (2004) fanden keine signifikante Reduktion der post- im Vergleich zur prädialytischen endothelialen Funktion. Hingegen wurde in einer anderen Studie eine Einschränkung der Endothelfunktion durch nur eine Hämodialyse-Behandlung mit einer zellulosebasierten Dialysemembran nachgewiesen, die bei Dialyse mit einer Vitamin-E-beschichteten Dialysemembran wiederhergestellt wurde (MATSUOKA 2001). Hierbei mag zum einen die in dieser Studie nachgewiesene begleitende Reduktion freier Radikaler ein Rolle spielen, da als Mechanismus der Einschränkung der endothelialen Funktion das Entstehen von vermehrtem oxidativem Streß während der Hämodialyse verantwortlich gemacht wird, zum anderen aber auch möglicherweise die Beschaffenheit der Dialysemembran Einfluß nehmen. Die Vitamin-E-beschichtete Dialysemembran ist von ihrer Biokompatibilität her a.e. mit einer Hämophan-Dialysemembran vergleichbar. Daß in der hier vorgelegten Studie somit zwei relativ biokompatible Membranen verglichen wurden, könnte auch der Grund sein, warum keine Einschränkung der Endothelfunktion im Vergleich zu den Kontrollen und insbesondere auch keine signifikante Einschränkung der Endothelfunktion nach Beginn der Dialysesitzung nachweisbar war. Eine andere Studie konnte mit einer synthetischen Dialysemembran (Polysulphon) ebenfalls keine Einschränkung der endothelialen Funktion durch die

Hämodialyse nachweisen, bei Behandlung mit einer Cuprophan-Dialysemembran zeigte sich hingegen eine deutliche Einschränkung (KOSCH, 2003).

In der hier vorgelegten Studie konnten zudem keine Unterschiede der basalen Gefäßdurchmesser bei Behandlung mit beiden Dialysemembranen und auch keine Unterschiede zu der Kontrollgruppe beobachtet werden. Auch in anderen Studien zeigten sich weder signifikante Unterschiede zwischen den basalen Gefäßdurchmessern noch Unterschiede der maximalen Flussgeschwindigkeiten zwischen Patienten und Kontrollpersonen (JOANNIDES, 1997). Wir fanden allerdings im Vergleich zu anderen Studien, die deutliche Einschränkungen der flussabhängigen Vasodilatation bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz im Vergleich zu Gesunden zeigen konnten (VAN GULDENER, 1997, KOCAK, 2005), keine Unterschiede der endothelialen Funktion zwischen der Patienten- und der Kontrollgruppe. Die Kontroll-Gruppe war jedoch in der Studie von KOCAK und Mitarbeitern im Gegensatz zu unserer Kontroll-Gruppe aus normotensiven Gesunden gewählt worden, so dass hier möglicherweise auch die bei unseren Kontrollpersonen bereits aufgrund anderer kardiovaskulärer Risikofaktoren bestehende Vorschädigung des Endothels durch atherosklerotische Veränderungen eine Rolle spielt. Passend hierzu zeigen die Ergebnisse einer Studie bereits bei Patienten mit Hypercholesterinämie und Zigarettenrauchen ohne Niereninsuffizienz eine Einschränkung der endothelialen Funktion (CELERMAJER 1992). Die von uns getroffene Auswahl der Kontrollgruppe erscheint jedoch zur Beurteilung eines spezifischen dialyse-assoziierten Effekts wesentlich geeigneter.

Trotzdem erstaunt es, daß in unserer Studie keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen trotz der Einschränkung der Nierenfunktion in der Patientengruppe nachweisbar waren, insbesondere da in mehreren Studien nach Nierentransplantation eine Verbesserung der endothelvermittelten Vasodilatation im Vergleich zu Hämodialyse-Patienten nachgewiesen werden konnte (KOCAK, 2005). Bei den transplantierten Patienten zeigten sich allerdings auch signifikante geringere Kreatinin-Spiegel und inflammatorische Parameter wie IL-6, d.h es verbesserte sich auch das Milieu im Sinne eines verminderten Einfluß von Inflammation und Urämie auf die Endothelfunktion (OFLAZ, 2003). Möglicherweise ist der direkt nach der Umstellung der Dialysebehandlung auf die PMMA-Dialysemembran nachweisbare Effekt der verbesserten Endothelfunktion nur sehr kurzlebig. Andererseits könnte ein verlängertes Beobachtungsintervall Langzeiteffekte sichtbar machen, die über den Beobachtungszeitraum von drei Monaten noch nicht deutlich wurden. In unserer Studie zeigten sich zudem ausgeprägte

interindividuelle Unterschiede, dies trägt auch dazu bei, dass bei kleiner Fallzahl kein sicherer Trend aufgezeigt werden konnte. Ferner konnten wir in unserer Studie nicht die erwartete erhebliche Beeinflussung der systemischen Inflammation durch den Wechsel auf die PMMA-Membran belegen. Ohne diese Einflüsse kommt offenbar auch keine wesentliche Veränderung der endothelialen Funktion zustande. Dies müsste in auf einen längeren Beobachtungszeitraum ausgelegten Studien überprüft werden, wobei die Unterschiede zwischen Dialysemembranen sicher deutlicher würden, wenn weniger biokompatible Filter verwendet würden. Allein zu Studienzwecken auf die bereits generell etablierten, höher biokompatiblen Membranen zu verzichten, erscheint jedoch nicht mehr vertretbar.

6.8 ZUSAMMENFASSUNG

Zusammenfassend unterscheiden sich die beiden Membranen im Prinzip nicht im Hinblick auf die Elimination von Harnstoff, Kreatinin und Phosphat. Unterschiede ergeben sich aber bei Betrachtung der Entfernung mittelgroßer und großer Moleküle. Wir fanden eine durch die PMMA-Membran in niedrigerem Ausmaß hervorgerufenen Ausschüttung von Interleukin-6, eine im Verlauf nachweisbare geringere Komplementaktivierung und eine Adsorption immunaktiver Substanzen wie β 2-Mikroglobulin an die Dialysemembran. Die erst mit einer zeitlichen Latenz von drei Monaten nachzuweisende Absenkung aller Inflammationsmarker - abgesehen von sCD14 – spricht für eine höhere Biokompatibilität der PMMA-Dialysemembran. Der sCD14-Anstieg ist in diesem Zusammenhang aufgrund der durch sCD14 modulierbaren Antwort der Monozyten auf LPS möglicherweise auch als Zeichen der besseren Verträglichkeit der PMMA-Dialysemembran zu interpretieren. Es gelang in unserer Studie nicht, anhand der Ultraschalluntersuchungen positive Auswirkungen der Reduktion der Zytokin-Konzentrationen auf die endotheliale Dysfunktion nachzuweisen. Dies kann als Hinweis darauf gewertet werden, dass der Einfluß des Membrantyps für die Inflammation und die Endothelfunktion nicht überschätzt werden sollte. Insgesamt zeigt sich, dass weitere Langzeitstudien mit größeren Fallzahlen zur besseren Sichtbarmachung einer möglicherweise höheren Biokompatibilität der synthetischen Dialysemembran von Interesse sind.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Andersson J, Bjork L, Dinarello C, Towbin H, Andersson U (1992): Lipopolysaccharide induces human interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 production in the same cells Eur J Immunol. 22:2617-2623
- Aoike I, Gejyo F, Arakawa M (1995): Learning From The Japanese Registry: How Will We Prevent Long-Term Complications? Niigata Research Programm For Beta-2-M Removal Membrane. Nephrol Dial Transplant..10 Suppl 7:7-15
- Arakawa M (1991): Long-Term Multicentre Study On Beta-2-Microglobulin Removal By PMMA Bk Membrane. Neprol. Dial. Transplant.6 Supplement 2:69-74
- Balakrishnan V, Schmid C, Jaber B, Natov S, King A, Pereira B (2000) : Interleukin-1 Receptor Antagonist Synthesis by Peripheral Blood Mononuclear Cells: A Novel Predictor of Morbidity amongst Hemodialysis Patients. J. Am. Soc. Nephrol. 11: 2114-2121
- Bloembergen W, Hakim R, Stannard D, Held P, Wolfe R, Agodoa L, Port F (1999): Relationship of dialysis membrane and cause-specific mortality. Am. J. Kidney Dis. 33:1-10
- Bologa R, Levine D, Parker T, Cheigh J, Serur D, Stenzel Kh, Rubin A (1998): Interleukin-6 Predicts Hypoalbuminemia, Hypocholesterolemia And Mortality In Hemodialysis Patients. Am.J.Kidney Dis. 32:107-144
- Bonomimi M, Fiederling B, Bucciarelli T, Manfrini V, Di Ilio C, Albertazzi A (1996): A new polymethylmethacrylate membrane. Int. J. Artif. Organs. 19:232-239
- Caglar K, Peng Y, Pupim L, Flakoll P, Levenhagen D, Hakim R, Ikizler T (2002) : Inflammatory Signals Associated With Hemodialysis.Kidney Int. 62:1408-1416.
- Campistol J, Molina R, Bernard Db, Rodriguez, R, Mirapeix E, Munoz Gomez J, Revert L (1993) : Synthesis Of Beta-2-Microglobulin In Lymphocyte Culture:

- Role Of Hemodialysis, Dialysis Membranes, Dialysis-Amyloidosis And Lymphokines. *Am.J. Kidney Dis.* 22:691-699
- Canaud B, Wizemann V, Pizzarelli F, Greenwood R, Schultze G, Weber C, Falkenhagen D (2001): Cellular interleukin1 receptor antagonist production in patients receiving on-line haemodiafiltration therapy. *Nephrol. Dial. Transplant.*16:2181-2187
- Cappelli G, Lucchi L, Bonucchi D, Cenci A, Montagnani G, De Palma M, Lusvardi E (1989): Polymorphonuclear Oxygen Free Radical Production And Complement Activation Induced By Dialysis Membranes As Assayed In An Experimental Model. *Blood Purif.*7:293-300
- Cavaillon JM, Poignet JI; Fitting C, Delons A (1992) Serum Interleukin-6 In Long-Term Hemodialyzed Patients *Nephron* 60:307-313
- Ceballos-Picot I, Witko-Sarsat V, Merad-Boudia M, Nguyen A, Thevenin M, Jaudon M, Zingraff J, Verger C, Jungers P, Descamps-Latscha B (1996): Glutathione Antioxidant System As A Marker Of Oxidative Stress In Chronic Renalfailure.*Free Radic Biol Med.*21:845-853
- Celermajer D, Sorensen K, Gooch V, Spiegelhalter D, Miller O, Sullivan I, Lloyd J, Deanfield J (1992): Non-Invasive Detection Of Endothelial Dysfunction In Children And Adults At Risk Of Atherosclerosis. *Lancet* 340 :1111- 1115
- Cheung A, Chenoweth D, Otsuka D, Henderson L (1986): Compartemental Distri-bution Of Complement Activation Products In Artificial Kidneys. *Kid Int.* 30:74-80
- Cheung A, Parker C, Wilcox L, Janatova J (1989): Activation Of The Alternative Pathway Of Complement By Cellulosic Hemodialysis Membranes. *Kidney Int.* 36:257-265
- Cheung A; Parker C, Wilcox L, Janatova J (1990): Activation Of Complement By Hemodialysis Membranes: Polyacrylonitrile Binds More C3a Than Cuprophan. *Kidney Int.* 37:1055-1059

- Cross J, Donald A, Vallance P, Deanfield J, Woolfson R, Macallister R (2001): Dialysis Improves Endothelial Function In Humans. *Nephrol. Dial. Transplant.*16:1823-1829
- Descamps-Latscha B (1993): The immune system in end-stage renal disease. *Curr.Opin. Nephrol. Hypertens.* 2:883-891
- Falkenhagen D, Bosch T; Brown Gs; Schmidt B; Holtz M; Baurmeister U; Gurland H; Klinkmann H (1987): A Clinical Study On Different Cellulosic Dialysis Membranes. *Nephrol. Dial. Transplant.*2:537-545
- Floege J, Bartsch A, Schulze M, Shaldon S, Koch KM, Smeby LC (1991): Clearance and synthesis rates of beta 2-microglobulin in patients undergoing hemodialysis and in normal subjects. *J. Lab. Clin. Med.* 118:153-165
- Fujimori A, Naito H, Miyazaki T (1998): Adsorption Of Complement, Cytokines And Proteins By Different Dialysis Membrane Materials: Evaluation By Confocal Laser Scanning Fluorescence Microscopy. *Artificial Organs* 22:1014
- Galli F, Benedetti S, Floridi A, Canestrari F, Piroddi M, Buonchristiani E, Buonchristiani U (2005): Glycooxidation And Inflammatory Markers In Patients On Treatment With Pmma-Based Protein-Leaking Dialyzers. *Kidney Int.* 67:750-759
- Girndt M, Sester M, Sester U, Kaul H, Köhler H (2001): Defective Expression Of B7-2 (Cd86) On Monocytes Of Dialysis Correlates To The Uremia-Associated Immune Defect *Kidn. Int.* 59:1382-1389
- Gluck T, Silver J, Epstein M, Cao P, Farber B, Goyert SM (2001): Parameters influencing membrane CD14 expression and soluble CD14 levels in sepsis. *Eur. J. Med. Res.* 6:351-358
- Grooteman M, Nube M, Daha M, Van Limbeek J, Van Deuren M, Schoorl M, Bet P; Van Houte A (1997): Cytokine Profiles During Clinical High-Flux Dialysis: No Evidence For Cytokine Generation By Circulating Monocytes. *J Am. Soc. Nephrol.* 8:1745-1754

- Gabay C, Eidlen D, Arend W (1997): Interleukin 1 receptor antagonist (IL-1Ra) is an acute phase protein. *J. Clin. Invest.* 99:2930-2940.
- Gu Y, Ding F, Qin H, Zhao H, Lin S (2000): Synergetic effect of dialyzer membrane and lipopolysaccharide on peripheral blood mononuclear cell cytokine production in uremic patients. 113:315-319
- Haag-Weber M, Mai B; Deppisch R, Gohl H, Horl W (1994): Studies Of Biocompatibility Of Different Dialyzer Membranes: Role Of Complement System, Intracellular Calcium And Inositol-Triphosphate. *Clin Nephrol.* 41:245-251
- Hakim R, Fearon D, Lazarus J, Perzanowski C (1984): Biocompatibility Of Dialysis Membranes: Effect Of Chronic Complement Activation. *Kidney Int* 26:194-200
- Hakim R, Schafer A (1985): Hemodialysis associated platelet activation and thrombocytopenia. *Am J. Med.* 78:575-580
- Hakim R, Held P, Stannard D, Wolfe R, Port F, Daugirdas J, Agodoa L (1996): Effect of the dialysis membrane on mortality of chronic hemodialysis patients. *Kidney Int.* 50:566-570
- Halliwell B. (1993): The role of oxygen radicals in human disease, with particular reference to the vascular system. *Haemostasis.* 23 Suppl 1:118-26.
- Harris T, Ferruchi L, Tracy R, Corti M, Wacholder S, Ettinger W, Heimowitz H, Cohen H, Wallace R (1999): Associations Of Elevated Interleukin-6 And C-Reactive Protein Levels With Mortality In The Elderly. *Am. J. Med.* 106:506-512
- Haubitz M, Brunkhors R, Wrenger E, Froese P, Schulze M, Koch Km (1996): Chronic Induction Of C-Reactive Protein By Hemodialysis But Not By Peritoneal Dialysis Therapy *Perit. Dial. Int.* 16 :158-162
- Haziot A, Rong G, Silver J, Goyert S (1993): Recombinant soluble CD14 mediates the activation of endothelial cells by lipopolysaccharide. *J. Immunol.* 151:1500-1507

- Haziot A, Rong G, Bazil V, Silver J, Goyert S (1994): Recombinant soluble CD14 inhibits LPS-induced Tumor Necrosis Factor- α production by cells in whole blood. *The Journal of Immunology* 152:5868-5876
- Haziot A, Rong G, Lin X, Silver J, Goyert S (1995): Recombinant soluble CD14 prevents mortality in mice treated with endotoxin (lipopolysaccharide). *The Journal of Immunology* 154:6529-6532
- Herbelin A, Urena P, Nguen At, Zingraff J, Descamps-Latscha B (1991) Elevated Circulating Levels Of Interleukin-6 In Patients With Chronic Renal Failure. *Kidney International* 39:954-960
- Higuchi T, Yamamoto C, Kuno T, Mizuno M, Takahashi S, Kanmatsuse K (1997): Increased Production Of Interleukin-1 β And Interleukin-1 Receptor Antagonist By Pe-ripheral Blood Mononuclear Cells In Undialyzed Chronic Renal Failure. *Nephron*76 :26-31
- Ikizler T, Wingard R, Harvell J, Shyr Y, Hakim R (1999): Association Of Morbidity With Markers Of Nutrition And Inflammation In Chronic Hemodialysis Patients: A Prospective Study. *Kidney Int.* 55:1945-1951
- Jadoul M, Garbar C, Noel H, Sennesael J, Vanholder R, Bernaert P, Rorive G, Hanique G, Van Ypersele De Strihou C (1997): Histological Prevalence Of Beta-2-Microglobulin Amyloidosis In Hemodialysis Patients: A Prospective Post-Mortem Study, *Kidney Int* 51: 1928-1932
- Joannides R, Haefeli W, Linder L, Richard V, Bakkali E, Thuillez C (1995): Nitric Oxide Is Responsible For Flow-Dependent Dilation Of Human Peripheral Conduit Arteries In Vivo. *Circulation* 91:1314-1319
- Joannides R, Bakkali E, Le Roy F (1997): Altered Flowdependent Vasodilatation Of Conduit Arteries In Maintenance Haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 12:2623–2628
- Kato A, Odamaki M, Takita T, Maruyama Y, Kumagai H, Hishida A (2002): Association Between Interleukin-6 And Carotid Atherosclerosis In Hemodialysis Patients. *Kidn. Int.* 61:1143-1152

- Kaizu Y, Kimura M, Yoneyama T, Miyaji K, Hibi I, Kumagai H (1998): Interleukin-6 mediates malnutrition in chronic hemodialysis patients. *Am. J. Kidney Dis.* 31:93-100
- Kawagishi T, Nishizawa Y, Konishi T, Kawasaki K, Emoto M, Shoji T, Tabata T, Inoue T, Morii H (1995): High-resolution ultrasonography in evaluation of atherosclerosis in uremia. *Kidney International* 48:820-826
- Kawanaka N, Nagake Y, Yamamura M, Makino H (2002): Expression Of Fc Gamma Receptor Iii (Cd16) On Monocytes During Hemodialysis In Patients With Chronic Renal Failure. *Nephron* 90:64-71
- Kimmel P, Phillips T, Simmens S, Peterson R, Weihs K, Alleyne S, Cruz I, Yanovski J, Veis J (1998): Immunologic Function And Survival In Hemodialysis Patients. *Kidney Int.* 54:2236-2244,
- Klinke B, Rockel A, Abdelhamid S, Fiegel P, Walb D (1989): Transmembranous Transport And Adsorption Of Beta-2-Microglobulin During Hemodialysis Using Polysulfone, Polyacrylonitrile, Polymethylmethacrylate And Cuprammonium Rayon Membranes. *Int J Artif Organs.* 12:697-702
- Kobayashi H, Ono T, Yamamoto N, Hashimoto T, Fukuda T, Yamada S, Kai C, Kataoka H, Kobayashi T, Sonoda T (1993): Removal Of Large Molecular Weight Substances By Highly Porous Membrane (Bk-F). *Kidney Dial Suppl.* 2:86-90
- Kocak H, Ceken K, Yavuz A, Yucel S, Gurkan A; Erdogan O, Ersoy F, Yakupoglu G, Demirbas A, Tuncer M (2006): Effect Of Renal Transplantation On Endothelial Function In Haemodialysis Patients. *Nephrol. Dial. Transplant .* 21: 203-207
- Koch KM (1992): Dialysis-Related Amyloidosis, *Kidney Int.* 41:1416-1429
- Kosch M, Levers A, Fobker M, Barenbrock M; Schaefer R, Rahn K, Hausberg M (2003): Dialysis Filter Type Determines The Acute Effect Of Haemodialysis On Endothelial Function And Oxidative Stress. *Nephrol. Dial. Transplant.* 18:1370

- Labeta M, Durieux J, Fernandez N, Hermann R, Ferrara P (1993): Release From A Human Monocyte-Like Cell Line Of Two Different Soluble Forms Of The Lipopolysaccharide Receptor, Cd14, Eur. J. Immunol. 23:2144-2151
- Lhotta K, Wurzner R, Kronenberg F, Oppermann M, König P (1998): Rapid activation of the complement system by cuprophan depends on complement component C4. *Kidney Int.* 53:1044-1051
- Lian J, Cheng C, Chang Y, Hsiung C, Lee C (1993): Clinical Experience And Model Analysis On Beta-2-Microglobulin Kinetics In High-Flux Hemodialysis. *Artif. Organs* 17: 758-763
- Lowrie E, Lew N (1990): 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.* 15:458-482
- Lucchi L; Bonucchi D; Acerbi M, Capelli G, Spattini A, Innocenti M, Castellani A, Lusvarghi E (1989): Improved Biocompatibility By Modified Cellulosic Membranes: The Case Of Hemophan. *Artif Organs.*13:417-421
- Macallister R, Rambašek M, Vallance P, Williams D, Hoffmann R, Ritz E (1996): Concentration Of Dimethyl-L-Arginine In The Plasma Of Patients With End-Stage-Renal Failure. *Nephrol Dial Transplant.* 11:2449-2452
- Marinkovic S, Jahreis G, Wong G, Baumann H (1989): IL-6 modulates the synthesis of a specific set of acute phase plasma proteins in vivo. *J. Immunology* 142:808-812
- Matsumoto Y, Shinzato T, Takai I, Nishimoto A, Nakai S, Sakai T, Amano I, Maeda K (1998): Peripheral Deletion Of Gammadelta T-Cells In Haemodialysis Patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* 13:2861-2866
- Matsuoka H (2001): Endothelial Dysfunction Associated With Oxidative Stress In Human. *Diabetes Res Clin Pract.* 54:65-72
- Memoli B, Postiglione L, Cianciaruso B, Bisesti V, Cimmaruta C, Marzano L, Minutolo R, Cuomo V; Guida B, Andreucci M, Rossi G (2000): Role Of Different

- Dialysis Membranes In The Release Of Interleukin-6-Soluble Receptor In Uremic Patients. *Kidney Int* 58 :417-24
- Migliacci R, Falcinelli F, Imperiali P, Floridi A, Nenci Gg, Gresele (2004): Endothelial Dysfunction In Patients With Kidney Failure And Vascular Risk Factors: Acute Effects Of Hemodialysis. *Ital. Heart J.* 5:371-377
- Miyata T, Inagi R, Iida Y, Sato M, Yamada N, Oda O; Maeda K, Seo H (1994): Involvement Of Beta-2-Microglobulin Modified With Advanced Glycation End Products In The Pathogenesis Of Hemodialysis-Associated Amyloidosis. Induction Of Human Monocyte Chemotaxis And Macrophage Secretion Of Tumor Necrosis Factor-Alpha And Interleukin-1. *J.Cli.Invest.* 93:521-528
- Miyata T, Wada Y, Cai Z, Iida Y, Horie K, Yasuda Y, Maeda K, Kurokawa K, van Ypersele de Strihou C (1997): Implication of an increased oxidative stress in the formation of advanced glycation end products in patients with end-stage renal failure. *51:1170-1181*
- Miyazaki H, Matsuoka H, Itabe H, Usui M, Ueda S, Okuda S, Imaizumi T (2000): Hemodialysis Impairs Endothelial Function Via Oxidative Stress-Effects Of A Vitamin-E-Coated Dialyzer. *Circulation* 101:1002-1006
- Moriyama K, Soejima Y (1998): Continuous Hemodiafiltration Using PMMA Membrane: Clinical Efficiency And Its Mechanisms . *Polymethylmethacrylate. A Flexible Membran For A Tailored Dialysis. Contrib Nephrol. Basel, Karger, Vol 125, pp 222-232*
- Moshage H, Jansen J, Franssen J, Hafkenscheid J, Yap S (1987): Study of the molecular mechanism of decreased liver synthesis of albumin in inflammation. *J. Clin. Invest.* 79:1635-1641
- Mrowka C, Heintz B, Sieberth Hg (1999): Is Dialysis Membrane Type Responsible For Increased Circulating Adhesion Molecules During Chronic Hemodialysis ? *Clin. Nephrol.* 52:312-321
- Nocker A, Scherberich J (1995): Monocyte Cell-Surface Cd14-Expression And Soluble Cd14 Antigen In Hemodialysis: Evidence For Chronic Exposure To Lps. *Kidney International*, 48:1469-1476

- Oflaz H, Pusuroglu H, Genchallac H, Demirel S, Bugra Z, Sever Ms, Yildiz A (2003): Endothelial Function Is More Impaired In Hemodialysis Patients Than Renal Transplant Recipients. *Clin. Tranplant.* 17:528-533
- Owen WF Jr., Lew NL, Liu Y, Lowrie E, Lazarus J (1993): The urea reduction ratio and serum albumin concentration as predictors of mortality in patients undergoing hemodialysis. *N. Engl. J. Med.* 329:1001-1006
- Panichi V, Tetta C, Rindi P, Palla R, Lonnemann G (1998): Plasma C-Reactive Protein Is Linked To Backfiltration Associated Interleukin-6 Production. *Asaio J* 44:415–417
- Pereira B, Poutsiaka D, King A, Strom J, Narayan G, Levey A, Dinarello C (1992): In Vitro Production Of Interleukin-1 Receptor Antagonist In Chronic Renal Failure, *Capd And Hd. Kidney Int.* 42:1419-1424
- Pereira Bj, Shapiro L, King Aj, Falagas Me, Strom Ja, Dinarello Ca (1994): Plasma Levels Of Il-1 Beta, Tnf Alpha And Their Specific Inhibitors In Undialyzed Chronic Renal Failure, *Capd And Hemodialysis Patients. Kidney Int.* 45:890-896
- Pohl U, Holtz J, Busse R, Bassenge E (1985): Crucial Role Of The Endothelium In The Vasodilator Response To Flow In Vivo. *Hypertension* 8:37-44
- Pugin, J, Schürer-Maly C, Leturcq D, Moriarty A, Ulevitch R, Tobias P (1993): Lipopolysaccharide activation of human endothelial and epithelial cells is mediated by lipopolysaccharid-binding protein and soluble CD14. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:2744-2748
- Richardson D; Lindley E, Bartlett C, Will E (2003): A Randomized, Controlled Study Of The Consequences Of Hemodialysis Membrane Composition On Erythropoietic Re-sponse. *Am J Kidney Dis.* 42:551-560.
- Ridker P, Cushman M, Stampfer M, Tracy R, Hennekens C (1997): Inflammation, aspirin and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *NEJM* 336: 973-979
- Ridker P, Hennekens C, Buring J, Rifai N (2000): C-Reactive Protein And Other Markers Of Inflammation In The Prediction Of Cardiovascular Disease In Women. *N. Engl. J. Med.* 342:836-843

- Ross R (1999): Mechanisms of disease: Atherosclerosis- An Inflammatory Disease. N.Engl. J. Med. 340:115-126
- Schaefer Rm, Huber L, Gilge U, Bausewein K, Vienken J, Heidland A(1989): Clinical Evaluation Of A New High-Flux Zellulose Acetate Membrane. Int J Artif Organs. 12:85-90
- Schindler R, Boenisch O, Fischer C, Frei U (2000): Effect Of The Hemodialysis Membrane On The Inflammatory Reaction In Vivo. Clin Nephrol. 53:452-459
- Schouten W, Grooteman M, Van Houte A, Schoorl M; Van Limbeek J, Nube Mj (2000): Effects Of Dialyser And Dialysate On The Acute Phase Reaction In Clinical Bicarbonate Dialysis. Nephrol Dial Transplant 15:379-384
- Schütt C, Schilling T, Grunwald U, Schönfeld W, Krüger C (1991): sCD14 prevents endotoxin inducible oxidative burst response to human monocytes. Allerg. Immunol. 37:159-164
- Schütt C, Schilling T, Grunwald U, Schonfeld W, Krüger C (1992): Endotoxin-neutralizing capacity of soluble CD14. Res. Immun. 143:71-78
- Stenvinkel P, Heimbürger O; Paultre F, Diczfalusy U, Wang T; Berglund L, Jogestrand T (1999): Strong Association Between Malnutrition, Inflammation And Atherosclerosis In Chronic Renal Failure., Kidney Int. 55:1899-1911
- Stenvinkel P (2001): The role of inflammation in the anaemia of end-stage renal disease. Nephrol. Dial. Transplant. 16:36-40
- Stenvinkel P, Barany P, Heimbürger O, Pecoits-Filoho R, Lindholm B (2002): Mortality, malnutrition and atherosclerosis in ESRD: What is the role of interleukin-6? Kidney Int. 80:103-108
- Tam F, Smith J, Cashman S, Wang Y, Thompson E, Rees A (1994): Glomerular expression of interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1beta genes in antibody-mediated glomerulonephritis. Am. J. Path. 145:126-136
- Tang W, Feng L, Vannice J, Wilson C (1994): Interleukin 1-receptor antagonist ameliorates experimental anti-glomerular basement membrane-antibody associated glomerulonephritis. J. Clin. Invest. 93:273-279

- Tessitore N, Lapolla A, Arico Nc, Poli A, Gammaro L, Bassi A, Bedogna V, Corgnati A; Reitano R; Fedele D; Lupo A (2004): Effect Of Protein Leaking Bk-F Pmma-Based Hemodialysis On Plasma Pentosidine Levels. *Journal Of Nephrol* 17:707-714
- Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S (1992): Accumulation Of An Endogenous Inhibitor Of Nitric Oxide Synthesis In Chronic Renal Failure. *Lancet* 339:572-575
- Van Guldener C, Lambert J, Janssen M, Donker A, Stehouwer C. (1997): Endothelium-Dependent Vasodilatation And Distensibility Of Large Arteries In Chronic Haemodialysis Patients. *Nephrol Dial Transplant* 12:14–18
- Vita N, Lefort S, Sozzani P, Reeb R, Richards S, Borysiewicz L, Ferrara P (1997): Detection and biochemical characteristics of the receptor for complexes of soluble CD14 and bacterial lipopolysaccharide. *158:3457-3462*
- Wanner C, Zimmermann J, Schwedler S, Metzger T (2002): Inflammation And Cardiovascular Risk In Dialysis Patients. *Kidney Int. Suppl.*80:99-102
- Wegmüller E, Montadon A, Nydegger U, Descoedres C (1986): Biocompatibility of different hemodialysis membranes: activation of complement and leukopenia. *Int. J. Artif. Organs* 9:85-92
- Witko-Sarsat V, Friedlander M, Nguyen Khoa T, Capeillère-Blandin C, Thu Nguyen A, Canteloup S, Dayer J, Jungers P, Drüeke T, Descamps-Latscha B (1998): Advanced Oxidation Protein Products As Novel Mediators Of Inflammation And Monocyte Activation In Chronic Renal Failure. *The Journal Of Immunology* 161:2524-2532.
- Wolbink G, Brouwer M, Buysmann S, ten Berge I, Hack C (1996): CRP-mediated activation of complement in vivo: assessment by measuring circulating complement-C-reactive complexes. *J. Immunol.* 157:473-479
- Yu Y, Hou F, Zhang X, Zhou H, Liu Z (2004): Hyperhomocysteinämie, Oxidative Stress And Microinflammation In Chronic Renal Failure: Their Roles In Atherogene; *Zhonghua Nei Ke Za Zhi.*43:292-295

Zimmermann J, Herrlinger S, Pruy A, Metzger T, Wanner C (1999): Inflammation Enhances Cardiovascular Risk And Mortality In Hemodialysis Patients, *Kidney Int.* 55:648-658

8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Flussschema des *in vitro*-Versuchs

Abb.2: Zusammensetzung des Kulturmediums für die *in vitro*-Kultivierung von Leukozyten im Vollbutansatz

Abb. 3: Ultraschallmessung der Art. brachialis

Die Auswertung erfolgte durch die Messung des Durchmessers zwischen beiden Intima-media-Lamellen an drei nebeneinanderliegenden Messpunkten während der Systole

Abb.4: IL-6-ELISA-Material

Abb.5: C3a-des-Arg-ELISA-Material

Abb.6: sCD14-ELISA-Material

Abb.7: IL-1Ra-ELISA-Material

Abb.8: IL-6 Ausschüttung ohne Stimulation (LPS)

Die im Vollblutansatz kultivierten Leukozyten wurden für 22.5 Stunden inkubiert. Die induzierte IL-6-Sekretion wurde im Überstand mittels Elisa gemessen.

Abb.9: IL-6 Ausschüttung nach Stimulation mit LPS

Die im Vollblutansatz kultivierten Leukozyten wurden nach Stimulation mit LPS für 22.5 Stunden inkubiert. Die induzierte IL-6-Sekretion wurde im Überstand mittels Elisa gemessen.

Abb.10: sCD14 im Serum vor Dialysebeginn (t=vHD)

Die Serumproben wurden vor Beginn der Dialyse gewonnen und die Scd14-Werte mittels Elisa gemessen. Die nach Rückumstellung gemessenen Werte wurden statistisch nicht berücksichtigt

Abb.11: sCD14 im Serum 2 Stunden nach Dialysebeginn (t=2h)

Die Serumproben wurden nach 2 Stunden Dialyse gewonnen und die sCD14-Werte mittels Elisa gemessen. Die nach Rückumstellung gemessenen Werte wurden statistisch nicht berücksichtigt.

Abb.12: IL-1Ra im Dialysat nach 15 Minuten Dialyse

Die Dialysatproben wurden nach 15 Minuten Dialyse gewonnen und die IL-1Ra-Werte mittels Elisa gemessen. Die nach Rückumstellung gemessenen Werte wurden statistisch nicht berücksichtigt.

Abb.13: Prozentuale Differenz von β 2-M im Serum nach 15 Minuten Dialyse im Vergleich zu den Ausgangswerten vor Dialyse

Die nach Rückumstellung gemessenen Werte wurden statistisch nicht berücksichtigt

Abb.14: IL-6 *in vitro* im Plasma bei Durchlauf (PMMA-Membran)

Die Proben wurden während des *in vitro*-Versuchs vor Beginn und in minütlichen Abständen während des Durchlaufs gewonnen. Die IL-6-Werte wurden mittels Elisa gemessen.

Abb.15: IL-6 *in vitro* im Plasma bei Filtration (PMMA-Membran)

Die Proben wurden während des *in vitro*-Versuchs vor Beginn und dann in 1- bzw. 2-minütlichen Abständen während der Filtration gewonnen. Die IL-6-Werte wurden mittels Elisa gemessen.

Abb.16: IL-6 *in vitro* im Filtrat (PMMA-Membran)

Die Proben wurden während des *in vitro*-Versuchs 5 und 9 Minuten nach Beginn der Filtration gewonnen und die IL-6-Werte mittels Elisa gemessen.

Abb.17: β 2-M *in vitro* im Plasma bei Durchlauf (PMMA-Membran)

Die Proben wurden während des *in vitro*-Versuchs vor Beginn und nach 1, 2 und 5 Minuten während des Durchlaufs gewonnen. Die IL-6-Werte wurden mittels Nephelometrie gemessen.

Abb.18: β 2-M *in vitro* im Plasma bei Filtration (PMMA-Membran)

Die Proben wurden während des *in vitro*-Versuchs vor Beginn und nach 1, 2, 5, 7, 8 und 9 Minuten während der Filtration gewonnen. Die β 2-M-Werte wurden mittels Nephelometrie gemessen.

Abb.19: Vergleich der maximalen, endothelvermittelten Vasodilatation nach Ischämie vor und 30 Minuten nach Dialysebeginn (in Prozent) bei den Dialysepatienten und Kontrollen.

Die endothelvermittelte Vasodilatation auf einen definierten Ischämieereiz wurde nach sonographischer Darstellung an der A. brachialis bei Hämolysepatienten während der Behandlung mit beiden Membranen gemessen.

Abb.20: Prozentualer Anteil des Mittelwertes der Mediane von IL-6, C3a, IL-1Ra, sCD14 und β 2-Mikroglobulin über den Dialysezeitraum mit der PMMA-Membran

Dargestellt wurde IL-6 nach Stimulation mit LPS sowie die Werte von C3a, IL-1Ra, sCD14 und β 2-Mikroglobulin jeweils vor Dialysebeginn.

Die Mediane der Meßparameter zu den einzelnen Zeitpunkten wurden berechnet, die Darstellung zeigt die berechnete Abweichung vom Mittelwert der Mediane.

9 TABELLENVERZEICHNIS

Tab.1: Beschreibung der Hämodialysemembranen [Gebrauchsinformation der Hersteller]

Tab.2: Vergleich Kontroll- und Patientenkollektiv

Die Daten zur Patientencharakterisierung wurden den Patienten-Akten der Klinik für Innere Medizin und der Klinik für Neurologie der Universitätskliniken des Saarlandes entnommen. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SD angegeben, die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney-Test für unverbundene Stichproben.

Tab.3: Laborparameter Patienten- und Kontrollgruppe im Vergleich

Die Laborparameter wurden während der monatlichen Routineblutentnahmen der Dialysepatienten in der Klinik für Innere Medizin der Universität des Saarlandes gemessen. Die Laborparameter der Kontrollgruppe wurden zu Beginn des stationären Aufenthaltes in der Klinik für Neurologie der Universitätskliniken des Saarlandes mittels des Routine-Aufnahmelabors gemessen. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SD angegeben, die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney-Test für unverbundene Stichproben.

Tab.4: Dialysedauer und Dialysequalitätsparameter

Die Dauer der Behandlung in Minuten und die allgemein als Maß für die Dialysequalität anerkannten Parameter Kt/v wurden erfasst. Die Daten wurden den Patienten-Akten der Klinik für Innere Medizin IV der Universitätskliniken des Saarlandes entnommen.

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SD angegeben, die statistische Auswertung erfolgte mittels One-way-Anova für verbundene Stichproben (Friedmann-Test mit anschließendem Dunn's Test). Die Werte nach Rückumstellung auf die Hämophan-Membran wurden aufgrund der Auswertbarkeit von nur vier Patienten statistisch nicht berücksichtigt.

Tab.5: Medikamentenverbrauch und Letalität unter Dialyse

Die Daten wurden den Patienten-Akten der Klinik für Innere Medizin IV der Universitätskliniken des Saarlandes entnommen. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte

± SD angegeben, die statistische Auswertung erfolgte mittels One-way-Anova für verbundene Stichproben (Friedman-Test mit anschließendem Dunn's Test). Die Werte nach Rückumstellung auf die Hämophan-Membran wurden statistisch nicht berücksichtigt.

Tab.6: Laborparameter der Patienten während der Behandlung mit beiden Membranen

Die Laborwerte wurden den Patienten-Akten der Klinik für Innere Medizin IV der Universitätskliniken des Saarlandes entnommen. Es erfolgten monatliche routinemäßige Laborkontrollen.

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± SD angegeben, die statistische Auswertung erfolgte mittels One-way-Anova für verbundene Stichproben (Friedman-Test mit anschließendem Dunn's Test). Die Werte nach Rückumstellung auf die Hämophan-Membran wurden statistisch nicht berücksichtigt.

Tab.7: Inflammationsparameter der Patienten während der Behandlung mit beiden Membranen

Die Laborwerte wurden den Patienten-Akten der Klinik für Innere Medizin IV der Universitätskliniken des Saarlandes entnommen. Es erfolgten monatliche routinemäßige Laborkontrollen.

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± SD angegeben, die statistische Auswertung erfolgte mittels One-way-Anova für verbundene Stichproben (Friedman-Test mit anschließendem Dunn's Test). Die Werte nach Rückumstellung auf die Hämophan-Membran wurden statistisch nicht berücksichtigt.

Tab.8: IL-6 vor Dialyse mit und ohne Stimulation mit LPS im Vollblutansatz

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± SD angegeben, die statistische Auswertung erfolgte mittels One-way-Anova für verbundene Stichproben (Friedman-Test mit anschließendem Dunn's Test). Die Werte nach Rückumstellung auf die Hämophan-Membran wurden statistisch nicht berücksichtigt.

Tab.9: Vergleich der Komplementaktivierung (C3a-des-Arg)

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± SD angegeben, die statistische Auswertung erfolgte mittels One-way-Anova für verbundene Stichproben (Friedman-Test mit anschließendem Dunn's Test)

Die Werte nach Rückumstellung auf die Hämophan-Membran wurden statistisch nicht berücksichtigt.

Tab.10: IL-1Ra im Serum vor Dialyse, nach 2 Stunden Dialyse und im Dialysat

Die Proben wurden vor Beginn und nach 2 Stunden Dialyse gewonnen, die Werte wurden mittels ELISA gemessen. Die nach 2 Stunden Dialyse gemessenen Werte wurden entsprechend dem während der Behandlung entzogenen Volumen korrigiert.

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SD angegeben, die statistische Auswertung erfolgte mittels One-way-Anova für verbundene Stichproben (Friedman-Test mit anschließendem Dunn's Test). Die Werte nach Rückumstellung auf die Hämophan-Membran wurden statistisch nicht berücksichtigt.

Tab.11: β 2-M im Plasma vor Dialyse, nach 15 Minuten Dialyse und im Dialysat

Die Proben wurden vor Beginn und nach 15 Minuten Dialyse gewonnen, die Werte wurden mittels Nephelometrie gemessen.

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SD angegeben, die statistische Auswertung erfolgte mittels One-way-Anova für verbundene Stichproben (Friedman-Test mit anschließendem Dunn's Test). Die Werte nach Rückumstellung auf die Hämophan-Membran wurden statistisch nicht berücksichtigt.

Tab.12: Ultraschall-Daten Patienten vor Dialyse und nach 30 Minuten Dialyse

Messung nach Ischämie vor Dialyse und 30 Minuten nach Dialysebeginn. Die nach Rückumstellung gemessenen Werte wurden statistisch nicht berücksichtigt.

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SD angegeben, die statistische Auswertung der Patientengruppe erfolgte mittels One-way-Anova für verbundene Stichproben (Friedman-Test mit anschließendem Dunn's Test).

Tab.13: Vergleich der Durchmesser und der maximalen, endothelvermittelten Vasodilatation bei Patienten und Kontrollen

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SD angegeben, die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney-Test für unverbundene Stichproben.

10 DANK

Ich möchte mich bei Herrn PD Dr. med. M. Girndt herzlich für die freundliche Überlassung des Themas und die Betreuung der Experimente und Korrektur der Arbeit bedanken.

Den Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des nephrologischen Labors, insbesondere Herrn Dr. C. Ulrich, danke ich für die praktische Anleitung im Labor, die kritische Diskussion bei der Planung und Ausführung von Experimenten, Hilfestellung bei der Formulierung des schriftlich experimentellen Teils der Arbeit sowie sein stets offenes Ohr für Fragen und Probleme.

Mein Dank gilt den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Dialyse-Abteilung der Medizinischen Klinik IV für ihre Hilfe und Kooperation bei der Durchführung meiner Arbeit.

Herrn Dr. med T. Magnus und Herrn Dr. med T. Korn danke ich für die Hilfe bei der Rekrutierung der Kontroll-Gruppe und die Unterstützung bei der Fertigstellung der Arbeit.

Meine Eltern ermutigten mich bei meiner Arbeit und ermöglichten mein Studium.

11LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Wiebke Schrempf
Geburtsdatum: 26.06.1978
Geburtsort: Winsen/Luhe
Adresse: Mainzer Str. 27, 66111 Saarbrücken
Telefon: 0681-5846357
e-mail: wiebkeschrempf@hotmail.com
Familienstand: ledig

AUSBILDUNG

Schul Ausbildung

1984-1988 Grundschule Melbeck
1988-1990 Orientierungsstufe Embsen
1990-1997 Gymnasium Oedeme/Lüneburg
Juni 1997 Abitur

Hochschulausbildung

Okt.1997 Immatrikulation an der Universität des Saarlandes, Homburg /Saar
(Humanmedizin)
Sommer 1999 Ärztliche Vorprüfung
Frühjahr 2001 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Frühjahr 2003 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Frühjahr 2004 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Famulaturen

- Sep. 2000 Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar, Klinik für Innere Medizin II, Gastroenterologie, Prof. Dr. med. Zeuzem
- Aug. 2001 Städtisches Klinikum Lüneburg, Klinik für Anästhesiologie, Prof. D. med. C. Frenkel
- Sep. 2001 Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar, Klinik für Innere Medizin IV, Nephrologie, Professor Dr. med. Köhler
- Aug. 2002 Praxis Neurologie und Psychiatrie, Saarbrücken, Dr. M. Battlehner, Facharzt für Nervenheilkunde

Praktisches Jahr April 2003 - April 2004

- Apr - Aug 2003 Universitätskliniken des Saarlandes, Homburg/Saar, Klinik für Neurologie, Prof. Dr. med. G. Becker
- Aug - Dez 2003 University of Manchester, Wythenshawe Hospital, Department of General Medicine, Consultants Dr. G. Brear MRCP/ Dr.R.Rowe MRCP
- Dez 2003 - Apr 2004 Winterbergkliniken, Saarbrücken, Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie / Klinik für Unfallchirurgie , Prof. Dr. med.J. Limmer / Prof. Dr. med L. Zwank

Tätigkeiten als Ärztin

- Juli – Okt 2004 Ärztin im Praktikum, Klinik für Neurologie, Universitätsklinikum
Homburg/Saar, kommissarischer Direktor PD Dr. S. Jung
- Okt. 2004-Dez. 2005 Assistenzärztin, Klinik für Neurologie, Universitätsklinikum
Homburg/Saar,
kommissarischer Direktor PD Dr. med. S. Jung,
- ab März 2005 Direktor Prof. Dr. med. K. Faßbender
- Seit Februar 2006 Assistenzärztin, Klinik für Neurologie, Universitätsklinikum Gustav-
Carus TU Dresden, Direktor Prof. Dr. med.H.Reichmann