

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin II
der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

(Direktor: Prof. Dr. med. Matthias Girndt)

**C-Peptid-Plasma-Konzentrationen und inflammatorische Monozyten
bei chronisch Nierenkranken**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Veronika Bode

geboren am 07.11.1991 in Braunschweig

Gutachterin/Gutachter:

1. Prof. Dr. med. Matthias Girndt
2. Prof. Dr. rer. nat. Andreas Simm
3. Prof. Dr. med. Sylvia Stracke (Greifswald)

20.02.2018

14.02.2019

Referat

Bei einer verminderten Nierenfunktion kumulieren renal zu eliminierende Moleküle. Eines davon könnte das aus dem Proinsulin abgespaltene C-Peptid sein, jedoch fehlen bislang systematische Analysen bei Nierenkranken. Das C-Peptid steht im Verdacht sich in Gefäßwänden abzulagern und Monozyten anzulocken, wodurch ein Entzündungsprozess mit nachfolgender Atherosklerose entsteht. Somit könnte auch C-Peptid zu einer weiteren Steigerung der ohnehin erhöhten kardiovaskulären Mortalität dieser Patienten beitragen.

An der Querschnittstudie nahmen 25 nichtdiabetische Nierengesunde, 13 diabetische Dialysepatienten, 21 nichtdiabetische Dialysepatienten und 20 Patienten mit CKD 3-4 mit und ohne Diabetes teil. Die kardiovaskulären Diagnosen wurden ermittelt, wobei Nierenkranke signifikant häufiger von einer arteriellen Hypertonie, Thrombose, KHK und z.n. Koronarintervention betroffen waren als Nierengesunde.

Die mittels ELISA bestimmte C-Peptid-Konzentration im Plasma war bei Nierenkranken, unabhängig des Stadiums der Niereninsuffizienz, signifikant höher als bei Nierengesunden. Sowohl bei Dialysepatienten als auch bei Patienten mit CKD 3-4 war die C-Peptid-Konzentration von der Erkrankung des Diabetes mellitus Typ 2 unabhängig.

Monozyten wurden durchflusszytometrisch analysiert, wobei eine Unterteilung in $CD14^{++}CD16^{-}$ (Mo1), $CD14^{++}CD16^{+}$ (Mo2) und $CD14^{+}CD16^{++}$ -Monozyten (Mo3) stattfand. Die als proinflammatorisch eingestuften Mo2 und Mo3 zeigten sich bei chronisch Nierenkranken signifikant erhöht. Untersuchte Oberflächenmoleküle der Monozytengruppen waren CD11a (Adhäsionsrezeptor), CD36 (Scavenger-Rezeptor) und CX3CR1 (Adhäsions- und Migrationsrezeptor). Neben unsystematischen Effekten bei CD11a und CD36 boten Nierenkranke überwiegend eine höhere Frequenz und Expressionsdichte von CX3CR1 als Nierengesunde.

Mittels Real-Time-PCR wurde bei Nierenkranken keine systematisch vermehrte mRNA-Expression einiger Marker festgestellt, die mit Entzündung (TNF- α , TNFRSF-1A, TNFRSF-1B), Inflammasom (CASP1, IL-1 β , NLRP3) und Migration (CCL2, CX3CR1) assoziiert sind.

Insgesamt zeigte sich keine Korrelation zwischen C-Peptid-Konzentration und den Ausprägungen der analysierten monozytären Oberflächenproteine bzw. der mRNA-Expression von Entzündungs- und Migrationsrelevanten Markern.

In vitro konnte keine Migration der Monozyten durch physiologisch konzentriertes C-Peptid als chemotaktischer Stimulus nachgewiesen werden.

Demnach lässt sich schlussfolgern, dass die C-Peptid-Konzentration bei Niereninsuffizienz kumuliert, jedoch unabhängig des Schweregrads der Niereninsuffizienz und der zusätzlichen Erkrankung an Diabetes mellitus Typ 2. Trotz Erhöhung von proinflammatorischen Mo2 und Mo3 konnten bei Nierenkranken jedoch keine systematischen Veränderungen von monozytären Oberflächenproteinen oder von Markern auf mRNA-Ebene belegt werden, die auf eine vermehrte Entzündung mit resultierender Atherosklerose hinweisen. Aufgrund der zudem fehlenden chemotaktischen Wirkung des C-Peptids auf Monozyten in vitro bleibt der Nachweis einer aktiven Beteiligung des C-Peptids an dem Prozess der Inflammation weiterhin aus.

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen.....	IV
1. Einleitung	1
1.1 Die Rolle der Monozyten	1
1.2 Die Bedeutung der Monozyten bei Atherosklerose, insbesondere bei Nierenkranken .	2
1.3 Die Rolle des C-Peptids	4
2. Zielstellung.....	7
3. Material und Methodik.....	11
3.1 Material	11
3.1.1 Verbrauchsmaterialien	11
3.1.2 Chemikalien, Medien, Puffer	11
3.1.3 Monoklonale Antikörper	12
3.1.4 Gene von TaqMan.....	13
3.1.5 Geräte und Software.....	13
3.2 Methodik	14
3.2.1 Studiendesign	14
3.2.2 Studienablauf.....	16
3.2.3 Ermittlung klinischer Daten	16
3.2.4 Labordiagnostik.....	17
3.2.5 C-Peptid Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	17
3.2.6 Immunologische Untersuchung der Monozyten	17
3.2.7 Reduktion des Gesamtkollektivs um ausgewählte Patienten bei immunologischen Experimenten.....	26
3.2.8 Migrationsexperimente	26
3.2.9 Statistische Auswertung	28
4. Ergebnisse	29
4.1 Deskriptive Merkmale der Studienpopulation	29
4.1.1 Art und Häufigkeit von Nierenerkrankungen in jeder Gruppe.....	32
4.1.2 Gruppenvergleich einiger kardiovaskulärer Risikofaktoren und Diagnosen	33

4.1.3	Gruppenvergleich der Medikationen.....	37
4.2	C-Peptid-Konzentration bei Nierengesunden und Nierenkranken.....	39
4.3	Vergleich der immunophänologischen Ausprägungen in den Gruppen	42
4.3.1	Verifizierung der Leukozytenzahlmessung des Durchflusszytometers	42
4.3.2	Betrachtung der Leukozytendifferenzierung und Monozytensubpopulationen inklusive deren Expression von CD11a, CD36 und CX3CR1 im Gruppenvergleich	42
4.4	Genexpressions-Analyse.....	48
4.4.1	Entzündungs- und Migrationsrelevante Genexpression.....	48
4.5	Korrelationen bezüglich der Konzentration des C-Peptids	50
4.5.1	Korrelation zwischen C-Peptid-Konzentration und klinischen Routine- Laborwerten.....	50
4.5.2	Korrelation zwischen C-Peptid-Konzentration und Ausprägungen der Monozytensubpopulationen	50
4.5.3	Korrelation zwischen C-Peptid-Konzentration und Ausprägung der Genexpression	51
4.6	Betrachtung der Migration von Monozyten und THP-1-Zellen in vitro.....	52
4.6.1	Migrationsassays von Monozyten.....	52
4.6.2	Ausgewählter Migrationsassay von THP-1-Zellen	54
5.	Diskussion	56
5.1	Häufigkeit von kardiovaskulären Diagnosen bei Nierenkranken.....	56
5.2	C-Peptid-Konzentration im Zusammenhang mit Nierenerkrankung	57
5.3	Rolle der Monozytensubpopulationen bei chronisch Nierenkranken	59
5.4	Genexpressionslevel von an Entzündung und Migration beteiligten Proteinen bei chronisch Nierenkranken	63
5.5	Migration der Monozyten und THP-1-Zellen in vitro	64
5.6	Einschränkungen.....	65
6.	Zusammenfassung	67
7.	Literaturverzeichnis.....	69
8.	Thesen	77
9.	Anlage	79

10. Selbstständigkeitserklärung.....	IX
11. Erklärung über frühere Promotionsversuche.....	X
12. Tabellarischer Lebenslauf	XI
13. Danksagung.....	XIII

Verzeichnis der Abkürzungen

Tabelle 1: Verzeichnis der alphabetisch sortierten Abkürzungen dieser Arbeit

Σ	Summe
Δ	Differenz
\uparrow	Anstieg
+	positiv
++	hoch positiv
-	negativ
\bar{x}	Mittelwert
%	Prozent
°C	Grad Celsius
7-AAD	7-Aminoactinomycin
α	Signifikanzniveau
α_1 -Antagonist	α_1 -Adrenorezeptor-Antagonist
α_2 -Antagonist	α_2 -Adrenorezeptor-Antagonist
Aa.	Arterien
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ACTB	Actin- β
ADP	Adenosindiphosphat
ADPKD	autosomal-dominante polyzystische Nierenerkrankung
ASS	Acetylsalicylsäure
AT ₁ -Rezeptor-Antagonist	Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp-1-Antagonist
β -Zellen	Beta-Zellen
BD	Becton Dickinson
BMI	Body-Mass-Index
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CASP1	Caspase-1
CCL2	CC-Chemokinligand 2
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	complementary DNA
CKD	Chronic Kidney Disease; hier auch: Patienten mit chronischer Nierenin-

Verzeichnis der Fremd- und Fachwörtererläuterungen

	suffizienz III-IV, mit und ohne Diabetes mel- litus Typ 2
CNI	chronische Niereninsuffizienz
C-Peptid	Connecting Peptide
CRP	C-reaktives Protein
CT	Cycle Thresholds
CX3CR1	CX3C chemokine receptor 1
D	Nichtdiabetische Dialysepatienten
DDb	Diabetische Dialysepatienten
dl	Deziliter
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP Mix	deoxynucleotide Mix
EDTA	Ethylendiaamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
et al.	et alia
f	weiblich
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FcR	Fc-Rezeptor
FCS	fetal calf serum
Fc- γ -III-Rezeptor	Fc-gamma-receptor type III
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
FSC	Forward scatter
g	Vielfaches der Erdbeschleunigung ($\approx 9,81 \text{ m/s}^2$)
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
ggf.	gegebenenfalls
G-Protein	Guanosintri-phosphat-bindendes Protein
Gpt	Gigapartikel
h	Stunden
Hb	Hämoglobin
HbA1c	glykiertes Hämoglobin
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1
IgA	Immunglobulin A
IKL	Internistische Kurzliegerstation

Verzeichnis der Fremd- und Fachwörtererläuterungen

IL	Interleukin
inkl.	inklusive
IUIS	International Union of Immunological Societies
KfH	Kuratorium für Dialyse und Nierentransplantation e.V.
kg	Kilogramm
KHK	koronare Herzkrankheit
l	Liter
LAE	Lungenarterienembolie
LDL	Low Density Lipoprotein
LFA-1	Leukocyte function-associated antigen type 1
Li	Lithium
LPS	Lipopolysaccharide
m	männlich
m ²	Quadratmeter
MACS	magnetic activated cell sorting
MCP-1	monocyte chemotactic protein 1
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
MDRD	Modification of Diet in Renal Disease
MFI	mean fluorescence intensity
mg	Milligramm
MHC	major histocompatibility complex
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
min	Minute
min.	mindestens
Mio.	Million/-en
ml	Milliliter
mmol	Millimol
Mo1-3	Monozytensubgruppen 1-3
MODS	Multiple Organ Dysfunction Syndrome
MPO	mikroskopische Polyangiitis
mRNA	messenger RNA
MVZ	Medizinisches Versorgungszentrum

Verzeichnis der Fremd- und Fachwörtererläuterungen

N	Fallzahl
N.	Nervus
Na ⁺ -K ⁺ -ATPase	Natrium-Kalium-Adenosintriphosphatase
NALP3	NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3
NaN ₃	Natriumazid
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
ng	Nanogramm
NG	Nierengesunde, nichtdiabetische Patienten
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NLRP3	Gen für NALP3
nm	Nanometer
nM (= nmol/l)	Nanomolar
nmol	Nanomol
NO-Synthase	Stickstoffmonoxid-Synthase
p	probability
Pat.	Patient/-en
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	Phycoerythrin
p-Wert	Signifikanzwert
r	Pearson- Korrelationskoeffizient
RNA	ribonucleic acid
RNase	Ribonuklease
RPGN	rapid progressive glomerulonephritis
RPMI	Zellkulturmedium; entwickelt am Roswell Park Memorial Institute (≅ RPMI)
RQ	Relative Quantitation
r _s	Spearman-Korrelationskoeffizient
RT	Reverse Transkriptase
RTD-PCR	Real-Time Detection Polymerase Chain Reaction
s.	siehe

Verzeichnis der Fremd- und Fachwörtererläuterungen

SMC	smooth muscle cells
SSC	side scatter
THP-1-Zellen	human acute monocytic leukemia cell line
TNFRSF-1A	TNF-Rezeptor Superfamilie 1A
TNFRSF-1B	TNF-Rezeptor Superfamilie 1B
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TTP	Thrombotisch-thrombozytopenische Purpura
U	Units
u.a.	unter anderem
UKH	Universitätsklinikum Halle (Saale)
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1
vgl.	vergleiche
VSMCs	vascular smooth muscle cells
WHO	World Health Organization
z.B.	zum Beispiel
Z.n.	Zustand nach

1. Einleitung

1.1 Die Rolle der Monozyten

Im Knochenmark können hämatopoetische pluripotente Stammzellen über myelische Vorläuferzellen und Monoblasten zu Monozyten differenzieren, die anschließend einen Anteil von ca. 5-8% der Leukozyten im Blut darstellen. Hier zirkulieren sie für 1-3 Tage und übernehmen verschiedene Effektor- wie Überwachungsaufgaben. Weiterhin werden Monozyten in der Milz gespeichert, um bei akuten Entzündungen in hohem Maß freigesetzt zu werden (Swirski et al. 2009). Monozyten ist es möglich aktiv in Gewebe einzuwandern, vor allem migrieren sie vermehrt in geschädigtes oder entzündetes Gewebe (Sunderkötter et al. 2004; Geissmann et al. 2008). Sie differenzieren dort zu Makrophagen oder dendritischen Zellen, um noch mehrere Wochen eine aktive Funktion im Immunsystem auszuüben. So dienen dendritische Zellen durch Antigenpräsentation in Lymphknoten der erworbenen Immunabwehr. Den Makrophagen hingegen obliegt durch Phagozytose die Elimination von Bakterien, apoptotischen Zellen oder toxischen Partikeln wie z.B. LDL. Darüber hinaus erschaffen sie durch die Produktion von Cytokinen sowohl ein proinflammatorisches Milieu als auch eine Steuerung des Immunsystems.

Insgesamt präsentieren Monozyten wenig morphologische, aber einige immunologische und funktionelle Unterschiede untereinander. Bereits 1989 stellten Passlick et al. erstmalig mittels Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenz eine Heterogenität bei Monozyten fest (Passlick et al. 1989). Eine vereinheitlichte Unterteilung der Monozyten in Subgruppen existiert seit 2010 durch die Nomenklatur der Monozyten der WHO und IUIS (International Union of Immunological Societies) (Ziegler-Heitbrock et al. 2010). Demnach weisen Monozyten stets das Oberflächenprotein CD14 (LPS-Rezeptor) auf, jedoch werden sie anhand der Expression von CD16 (Fc- γ -III-Rezeptor) auf ihrer Oberfläche in 3 Subgruppen unterteilt. Die CD14⁺⁺CD16⁻-Monozyten (Mo1) stellen mit ca. 90% den größten Anteil der Monozyten dar und üben die „klassischen“, bereits beschriebenen Funktionen aus. Innerhalb von Tagen können sie sich zu CD16⁺-Monozyten weiterentwickeln (Ziegler-Heitbrock et al. 1993), die wiederum zwei verschiedenen Gruppen zuzuordnen sind: die sog. intermediären CD14⁺⁺CD16⁺-Monozyten (Mo2) und die nicht-klassischen CD14⁺CD16⁺⁺-Monozyten (Mo3). Sie weisen im Vergleich zu Mo1 eine geringere Größe, verminderte Phagozytoseaktivität, erhöhte Antigenpräsentation über doppelt so viele MHC-II-Komplexe (Passlick et al. 1989) und verstärkte Cytokinproduktion auf. Letzteres bewiesen u.a. Thieblemont et al., die bei CD16⁺-Monozyten eine höhere Produktion des inflammatorisch wirksamen IL-1 α und TNF- α im Vergleich zu CD16⁻-Monozyten aufzeigten (Thieblemont et al. 1995). Später gelang es Frankenberger et al. bei dieser Zellart eine verminderte mRNA-Expression von IL-10 (anti-inflammatorisch) und

zudem eine verstärkte mRNA-Expression von inflammatorisch wirksamen Cytokinen wie TNF- α , IL-1 und IL-6 nachzuweisen (Frankenberger et al. 1996). Zusätzlich führten Belge et al. die CD16⁺-Zellen als einen Hauptproduzenten des TNF- α an (Belge et al. 2002) und auch die Erkenntnisse unserer Arbeitsgruppe um Ulrich et al. stützen die Auffassung, dass den CD16⁺-Monozyten somit insgesamt pro-inflammatorische Eigenschaften zugeschrieben werden können (Ulrich et al. 2008).

1.2 Die Bedeutung der Monozyten bei Atherosklerose, insbesondere bei Nierenkranken

Die Atherosklerose ist ein pathologischer, progressiver Prozess, dem vor allem eine Schädigung des Endothels der mittleren und großen Arterien zugrunde liegt. Diese entsteht z.B. durch Moleküle wie oxidiertes LDL, mechanische Verletzung oder Bluthochdruck. Früher wurde besonders der Hypercholesterinämie hierbei eine entscheidende Rolle als Risikofaktor zugeschrieben. Bereits 1973 berichteten Ross und Glomset von atherosklerotischen Plaques, die histopathologisch u.a. aus Lipiden und Kalk in der Intima der Gefäßwand bestanden (Ross und Glomset 1973). Im Verlauf bildet das geschädigte Endothel fortan Adhäsionsmoleküle (z.B. ICAM-1) und produziert pro-inflammatorische Cytokine und Chemokine wie M-CSF, um Zellen des Immunsystems zur entstehenden Läsion zu locken. Durch Gerrity et al. wurden 1979 erstmalig Leukozyten, vornehmlich Makrophagen, in frühen Atheromen nachgewiesen (Gerrity et al. 1979). Mittlerweile gilt ein Zusammenhang zwischen Atherosklerose, Entzündung und inflammatorischen Monozyten/Makrophagen als bewiesen (Ross 1999). So interagieren Leukozyten mit dem Endothel durch vorherige Stimulation von proinflammatorischen Cytokinen wie TNF- α und IL-1 β (Kunkel et al. 1997; Thorlacius et al. 1997). Angelockt vom M-CSF des Endothels migrieren auch Monozyten in die geschädigte Gefäßwand, wofür spezifische Oberflächenmoleküle wie z.B. CD11a (Integrin für Zelladhäsion) und CX3CR1 (Transmembranrezeptor für Adhäsion und Migration) nötig sind. Die Monozyten tragen nun als Makrophagen maßgeblich zum Progress der Atherosklerose bei (Smith et al. 1995). Einerseits sezernieren sie proinflammatorische Cytokine, um sowohl weitere Monozyten anzulocken als auch die Replikation von SMC (smooth muscle cells) in der Media zu verstärken (Ross 1999). Andererseits nehmen sie über Scavenger-Rezeptoren (z.B. CD36) beispielsweise apoptotische Zellen und oxidiertes LDL auf und bauen dieses ab. Besonders letzteres wird als entscheidender Beginn der Bildung eines atherosklerotischen Plaques angesehen, da hierdurch aus Makrophagen die für die Atherosklerose charakteristischen Schaumzellen entstehen, falls sie das Cholesterin des internalisierten LDLs als Lipidtropfen einlagern (Hansson 2005). Solche Plaques werden in frühen Stadien „fatty streaks“ genannt und bilden sich auch schon in der fetalen Entwick-

lung aus, vordringlich verstärkt beim Vorliegen einer maternalen Hypercholesterinämie (Napoli et al. 1997).

Durch Ausschüttung von proinflammatorischen Cytokinen und lysosomalen Enzymen sind Immunzellen weiterhin in der Lage die fibrinösen Kappen eines Atheroms zu destabilisieren und dadurch eine eventuelle Ruptur des vulnerablen Plaque mit herbeizuführen (Hansson 2005). Anschließend folgt oftmals eine lokale Koagulation des Blutes bis hin zur Thrombose des Gefäßes. Mögliche Folgen wären z.B. ein Myokardinfarkt, Schlaganfall oder Herz-Kreislauf-Erkrankung, die allesamt zu den führenden Todesursachen gehören (Primatesta et al. 2007). Eine Hochrisikogruppe für solche kardiovaskulären Ereignisse stellen Patienten mit einer chronischen Nierenerkrankung dar. Einerseits liegen bei ihnen häufig klassische Risikofaktoren der Atherosklerose vor: Bluthochdruck, Hyperlipidämie, Diabetes mellitus, Rauchen und Adipositas. Andererseits entsteht durch die gestörte glomeruläre Filtration von harnpflichtigen Substanzen wie Harnstoff eine chronische Urämie mit atherosklerotischem Potential z.B. durch resultierende Hyperhomocysteinämie, Hypo- oder Hyperkaliämie, Dyslipidämie, oxidativer Stress oder metabolische Azidose (Foley und Parfrey 1999). Foley und Parfrey wiesen weiterhin auf ein verstärktes Auftreten von kardiovaskulären Erkrankungen beim Eintritt in die Dialysebehandlung hin und schlussfolgerten, dass Patienten mit chronischer Nierenerkrankung bereits in frühen Stadien einem hohen kardialen Risiko unterliegen (Foley und Parfrey 1999). Herz-Kreislauf-Erkrankungen stehen bei Morbidität und Mortalität von Dialysepatienten an erster Stelle (Collins et al. 2015). Im Vergleich zu Nierengesunden ist die kardiovaskuläre Mortalität von Dialysepatienten um mehr als das 10-fache erhöht (Foley und Parfrey 1999), schließlich verstirbt etwa die Hälfte aller Dialysepatienten an ihnen (Executive summary. United States Renal Data System 1999 Annual Data Report 1999). Eine weitere Patientengruppe mit Herz-Kreislauf-Erkrankungen als Haupttodesursache sind Diabetiker, deren Prävalenz weiterhin steigt. Sie weisen ebenfalls häufiger kardiovaskuläre Risikofaktoren auf, sodass mehr als 60% von ihnen an einer Herz-Kreislauf-Erkrankung oder resultierenden Komplikationen versterben (Fox et al. 2007). Eine bestehende Niereninsuffizienz in Kombination mit einer diabetischen Erkrankung bedeutet eine Erhöhung des kardiovaskulären Risikoprofils. So zeigten Foley et al. in einer früheren Studie nach Adjustierung nach Alter und Geschlecht bei diabetischen Dialysepatienten eine höhere Rate an neu diagnostizierter KHK, kardiovaskulärer und genereller Mortalität als bei nichtdiabetischen Dialysepatienten (Foley et al. 1997). Dementsprechend sollen in der vorliegenden Studie kardiovaskuläre Risikofaktoren und Erkrankungen bei Nierenkranken überprüft werden. Aufgrund der bereits erläuterten Zusammenhänge zwischen den Monozyten und der häufig den kardiovaskulären Erkrankungen zugrunde liegenden Atherosklerose liegt es nahe weiterhin die Monozyten systematisch bei chronisch Nierenkranken zu untersuchen.

1.3 Die Rolle des C-Peptids

Bereits 1967 wurde das von den β -Zellen des Pankreas sezernierte Proinsulin als Vorläufermolekül des Insulins erstmalig beschrieben (Steiner et al. 1967). Durch die Verbindung der α - und β -Kette im Proinsulin dient das Connecting Peptide (C-Peptid) zuerst der korrekten Faltung des Proinsulins im rauen Endoplasmatischen Retikulum, ehe es im Golgi-Apparat vom Proinsulin proteolytisch abgespalten wird. Somit entstehen C-Peptid und Insulin aus Proinsulin. Das aus 31 Aminosäuren bestehende C-Peptid wird abhängig vom Insulin in äquivalenten Mengen ins Blut abgegeben, wobei das C-Peptid mit einer Halbwertszeit von ca. 30 Minuten länger und somit einfacher im Blut nachweisbar ist als Insulin (Polonsky et al. 1986). Folglich schwankt die C-Peptid-Konzentration abhängig von der Nahrungsaufnahme und wird diagnostisch zur Messung der Bauchspeicheldrüsenfunktion herangezogen.

Bis in die 1990er Jahre herrschte die allgemeine Auffassung, dass C-Peptid im Gegensatz zu Insulin ohne vorherigen First Pass Effekt der Leber renal ausgeschieden würde und keine biologische Aktivität aufwies (Kitabchi 1977). Mittlerweile ist die Substanz stärker in den Fokus der Wissenschaft gerückt und Erkenntnisse über das C-Peptid als aktiver Mediator häufen sich. So wiesen Kitamura et al. eine Hochregulierung der endothelialen NO-Synthase in der Aorta von Ratten durch Stimulation von C-Peptid nach und schlossen auf eine Auswirkung des C-Peptids auf den Gefäßtonus (Kitamura et al. 2003). Weiterhin zeigten Ohtomo et al. am Beispiel von renalen Tubuluszellen der Ratten, dass C-Peptid konzentrationsabhängig zu einer verstärkten Aktivierung der Na^+ - K^+ -ATPase führt (Ohtomo et al. 1996). Dieser Effekt wurde anschließend in anderen Organsystemen ebenfalls nachgewiesen, z.B. auf Erythrozyten (Djemli-Shipkolye et al. 2000), Zellen in Granulationsgewebe und Zellen des N. ischiadicus bei Ratten (Ido et al. 1997). Außerdem zeigte sich eine Bindung des C-Peptids an murine Fibroblasten (Swiss 3T3Zellen) (Kitamura et al. 2001) und humane Fibroblasten der Haut (Henriksson et al. 2001). Es drängt sich die Frage auf, über welchen Rezeptor das C-Peptid seine Aktivität ausübt. Hierfür demonstrierten Rigler et al. eine hoch affine Bindung des C-Peptids an renale Tubuluszellen, die in Anwesenheit von Pertussis-Toxin nicht nachweisbar war (Rigler et al. 1999). Da Pertussis-Toxin die Funktion von G-Proteinen inhibiert, liegt die Vermutung nahe, dass C-Peptid über einen G-Protein gekoppelten Rezeptor interagiert (Rigler et al. 1999; Kitamura et al. 2001). Bis heute gelang es jedoch nicht einen spezifischen Rezeptor zu identifizieren.

Im Falle einer Erkrankung an Diabetes mellitus mit Zerstörung der pankreatischen β -Zellen (Typ 1) oder peripherer Insulinresistenz (Typ 2) verändern sich die C-Peptid-Spiegel in Abhängigkeit von der Insulinsekretion. Da die Prävalenz dieser Erkrankung weltweit steigt (Wild et al. 2004), mehren sich die Studien zu Auswirkungen des C-Peptids auf diabetische Patienten. Hier-

bei werden makrovaskuläre (z.B. Myokardinfarkt, Schlaganfall, KHK, pAVK) von mikrovaskulären Komplikationen (Nephro-, Retino-, Neuropathie) des Diabetes unterschieden. In extern verabreichtem Insulin befindet sich kein C-Peptid, sodass bei Diabetes mellitus Typ 1 relativ weniger C-Peptid zirkuliert. Die zusätzliche Applikation von C-Peptid wirkt sich positiv auf den Verlauf des Diabetes mellitus Typ 1 aus. So verbessert es z.B. den mikrovaskulären Blutfluss (Forst et al. 2008), die Nervenleitgeschwindigkeit (Cotter et al. 2003) und die Nierenfunktion (Johansson et al. 2000). Beim Diabetes mellitus Typ 2 treten aufgrund der peripheren Insulinresistenz häufig zunächst eine hohe Insulinproduktion und dementsprechend eine hohe C-Peptid-Bildung auf, ehe diese Konzentrationen im Verlauf meist abfallen. Zu diesem Typen des Diabetes mellitus liegen hingegen weniger und zudem kontroverse Erkenntnisse bezüglich der Auswirkung von C-Peptid vor. So zeigten Inukai et al. einen inversen Zusammenhang zwischen C-Peptid-Konzentration und mikrovaskulären Komplikationen bei Typ-2-Diabetikern auf (Inukai et al. 1999). Kim et al. stellten darüber hinaus fest, dass bei Koreanern mit Diabetes mellitus Typ 2 mehr mikrovaskuläre Komplikationen existierten, je geringer die Differenz zwischen post- und präprandialer C-Peptid-Konzentration war (Kim et al. 2012). Auch Bo et al. bestätigten den negativen Zusammenhang zwischen C-Peptid-Konzentration und mikrovaskulären Komplikationen bei Typ-2-Diabetikern, zudem fanden sie keine Korrelation zwischen C-Peptid-Konzentration und Gesamtüberleben (Bo et al. 2012). Allerdings ermittelten Pikkemaat et al. wiederum einen Zusammenhang zum Zeitpunkt der Erstdiagnose des Diabetes mellitus Typ 2 zwischen C-Peptid-Konzentration und Gesamtmortalität, jedoch nicht zwischen C-Peptid-Konzentration und kardiovaskulären Ereignissen oder Retinopathie (Pikkemaat et al. 2015). Die Studie von Mavrakanas et al. hingegen sprach den makrovaskulären Komplikationen und der Nephropathie eine Rolle bei Typ-2-Diabetikern zu, da bei diesen ein positiver Zusammenhang zwischen C-Peptid-Konzentration und Vorliegen eines metabolischen Syndroms existierte (Mavrakanas et al. 2009). Weiterhin präsentierten Sari und Balci bei Typ-2-Diabetikern die positive Korrelation zwischen C-Peptid-Konzentration und makrovaskulären Komplikationen (pAVK, KHK), jedoch nicht mikrovaskulären Komplikationen (Sari und Balci 2005). Zusammengefasst liegt somit eine widersprüchliche Studienlage bezüglich der Auswirkungen des C-Peptids bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 bezüglich Mortalität, mikro- und makrovaskulären Komplikationen vor.

Aufgrund solcher Zusammenhänge zwischen C-Peptid und kardiovaskulären Erkrankungen oder diabetischen Komplikationen ist eine Beteiligung des C-Peptids an der Atherosklerose denkbar, da sowohl bei Insulinresistenz beim Diabetes mellitus Typ 2 als auch bei Atherosklerose eine Schädigung des Endothels vorliegt. In einer Studie von Marx et al. wies die Intima der Aorta thoracica von 21 verstorbenen Typ-2-Diabetikern unter 35 Jahren mehr C-Peptid auf als diejenige von Nichtdiabetikern (Marx et al. 2004). Diese Studie zeigte weiterhin bei 77% der

Diabetikern eine Co-Existenz von C-Peptid und CD86⁺-Monozyten/-Makrophagen in der Intima. Mittels Immunofluoreszenzbildern konnte zudem nachgewiesen werden, dass sich 96% aller Monozyten/Makrophagen in der Nähe des C-Peptids ansammelten. Insgesamt schlossen Marx et al. auf eine primäre C-Peptid-Infiltration der Gefäßwand mit sekundärer Migration der Monozyten, sodass dies den Anfang eines entzündlich-atherosklerotischen Prozesses markieren könnte. Außerdem belegten sie dafür in vitro den chemotaktischen Effekt von C-Peptid auf Monozyten gesunder Probanden. Hierbei wurden die vorab für 16 Stunden in RPMI+0,5%FCS kultivierten Monozyten in das obere Well eingesät, das durch eine Membran mit der Porengröße von 5 µm vom unteren Well mit verschiedenen C-Peptid-Konzentrationen getrennt wurde. Nach einer Inkubation von 2,5 Stunden bei 37°C wurden die Monozyten lichtmikroskopisch quantitativ bestimmt. Laut Marx et al. existierte ein maximaler Migrationseffekt der Monozyten bei einer C-Peptid-Konzentration von 1 nmol/l im unteren Well, sodass dem C-Peptid eine chemotaktisch aktive Rolle zugeschrieben werden könnte (Marx et al. 2004). Dem gegenüber stehen Erkenntnisse von Haidet et al., derer nach das C-Peptid bei Hyperglykämie in vitro die Cytokinsekretion von LPS-stimulierten Monozyten (z.B. IL-6, IL-8) und ihre Adhäsion an Endothelzellen der humanen Aorta reduziert (Haidet et al. 2012). Demnach könnte dem C-Peptid ebenso ein anti-inflammatorischer Effekt unter bestimmten Bedingungen zugeordnet werden.

2. Zielstellung

Bedingt durch die widersprüchliche Funktionalität von C-Peptid untersucht die Arbeit C-Peptid-Konzentrationen in verschiedenen Nierenkranken, teilweise diabetischen Patientenkollektiven und sucht Assoziationen zu monozytären Parametern, die das Inflammationsgeschehen betreffen. Dies erscheint umso wichtiger, da bislang keine systematischen Analysen bei chronisch Nierenkranken vorliegen.

Bislang wurde vornehmlich das C-Peptid bei Nierengesunden mit Blick auf Diabetes mellitus Typ 1 erforscht, hingegen rückten Effekte auf den hyperinsulinämischen Typ 2 noch nicht verstärkt in den Fokus der Wissenschaft. Bei Nierengesunden dienen C-Peptid-Werte als Marker für die Funktion der Bauchspeicheldrüse, um die Diabetes-Typen und deren Verlauf einzuschätzen (Wahren et al. 2012). Allerdings scheint dies nicht auf Nierenkranke zuzutreffen. So fanden Covic et al. stark erhöhte C-Peptid-Konzentrationen bei Nierenkranken, anhand derer Diabetiker Typ 1 und Typ 2 nicht voneinander unterschieden werden konnten (Covic et al. 2000). Zudem zeigten sie, dass die C-Peptid-Konzentrationen von diabetischen (Typ 1 und Typ 2 gepoolt) Dialysepatienten sich nicht signifikant von denen der nichtdiabetischen Dialysepatienten unterschieden. Allerdings war die C-Peptid-Konzentration bei diabetischen Dialysepatienten 2,5-fach höher als bei diabetischen Geschwistern mit normaler Nierenfunktion. Insgesamt fehlen hier die Betrachtung der diabetischen und nichtdiabetischen Patienten mit CKD im Stadium 3-4 und der Vergleich zu nichtdiabetischen Nierengesunden. Zwar wiesen Di Mauro et al. bei 6 Patienten mit Diabetes und chronischer Nierenerkrankung (GFR: $37,3 \pm 4,9$ ml/min) eine bis zu zehnfach erhöhte C-Peptid-Konzentration im Vergleich zu 6 diabetischen Nierengesunden nach, jedoch bestand das lediglich kleine Kollektiv insgesamt nur aus Patienten mit einem Diabetes mellitus Typ 2 (Di Mauro et al. 2001).

Ein Ziel der vorliegenden Studie ist es, die C-Peptid-Konzentrationen von nichtdiabetischen Nierengesunden systematisch mit denen von Patienten zu vergleichen, die sich in verschiedenen Stadien der Niereninsuffizienz befinden und teilweise zusätzlich von einem Diabetes mellitus Typ 2 betroffen sind. Hierbei werden erstmalig Werte von diabetischen und nichtdiabetischen Patienten mit CKD 3-4 und zudem Werte von Dialysepatienten, Patienten mit CKD 3-4 und nichtdiabetischen Nierengesunden verglichen. Es wird angenommen, dass C-Peptid-Spiegel bei Nierenkranken generell höher sind als bei Nierengesunden. Hierbei werden wegen der physiologisch geringeren Elimination des C-Peptids höhere Werte bei Dialysepatienten als bei Patienten mit CKD 3-4 erwartet. Weiterhin wird wegen der o.g. Studien analog den Dialysepatienten auch kein signifikanter Unterschied in der C-Peptid-Konzentration von diabetischen und nichtdiabetischen Patienten mit CKD 3-4 erwartet.

Da Monozyten an dem entzündlichen Prozess der Atherosklerose beteiligt sind und bei chronisch Nierenkranken zudem ein urämisches, inflammatorisches Mikromilieu vorherrscht, liegt eine Untersuchung der Monozyten nahe. Bisher wurde mehrfach aufgezeigt, dass mehr proinflammatorische CD16⁺-Monozyten bei Dialysepatienten im Vergleich zu Nierengesunden vorhanden sind (Nockher und Scherberich 1998; Merino et al. 2011). Auch unsere Arbeitsgruppe konnte bereits einen erhöhten Anteil von proinflammatorischen Monozyten bei Dialysepatienten nachweisen und schlug einen Zusammenhang zwischen der Monozytensubgruppe Mo2 und verstärkter Atherosklerose vor (Heine et al. 2008). Um die Qualität des Studienkollektivs und der anvisierten Analysen der Monozyten zu überprüfen soll in dieser Arbeit verifiziert werden, dass Patienten mit chronischer Nierenerkrankung Stadium 3-4 und Hämodialysepatienten unabhängig des Diabetes mellitus Typ 2 einen größeren Anteil an proinflammatorischen Monozyten (sprich Mo2 und Mo3) aufweisen als Nierengesunde.

Die Bestimmung der Ausprägung einiger Oberflächenantigene in den einzelnen Monozytensubgruppen jeder Patientengruppe stellt ein weiteres Ziel dieser Arbeit dar, schließlich wurden schon verstärkte Expressionen von zahlreichen Antigenen in Mo1-3 ermittelt (Ancuta et al. 2003). Es stellt sich die Frage, welche Oberflächenmoleküle bei Monozyten in den Vorgang der Atherosklerose eingebunden sein könnten. Somit fokussiert diese Arbeit die Analyse der Antigene CD11a, CD36 und CX3CR1. Als Bestandteil des LFA-1 (Leukocyte function-associated antigen type 1) vermittelt das Integrin CD11a durch Bindung seines Liganden ICAM-1 die Endotheladhäsion von Leukozyten. Neben seinen diversen anderen Funktionen bindet CD 36 u.a. oxidiertes LDL und spielt sowohl bei Phagozytose als auch Entzündungsprozessen eine Rolle. CX3CR1 ist als Transmembranprotein an der Adhäsion und Migration von Monozyten in Gefäßwände beteiligt. Da alle drei Moleküle in die Interaktion der Monozyten mit dem Endothel und in den Prozess der Entzündung mit möglicher Atherosklerose involviert sind, folgt die Annahme, dass sie bei Monozyten von chronisch Nierenkranken erhöht sein sollten. Weiterhin wird eine Korrelation dieser Moleküle mit der C-Peptid-Konzentration der chronisch Nierenkranken erwartet.

Es ist denkbar, dass ebenfalls Veränderungen auf Genexpressionsebene bei Nierenkranken vorliegen, die das vorherrschende inflammatorische Milieu und die verstärkten atherosklerotischen Prozesse widerspiegeln. Die vorliegende Arbeit soll prüfen, ob einige an Entzündungsprozessen beteiligte Rezeptoren und Cytokine bei chronisch Nierenkranken auf der mRNA-Ebene stärker ausgeprägt sind und ob diese mit der C-Peptid-Konzentration korrelieren. Falls bei chronisch Nierenkranken mehr proinflammatorische CD16⁺-Monozyten inklusive einer erhöhten TNF- α -Produktion vorhanden sind, so erscheint es schlüssig, dass die Gene für TNF- α und dessen Rezeptoren TNFRSF-1A und TNFRSF-1B bei diesen Patienten stärker exprimiert werden. Weiterhin wird bei chronisch Nierenkranken durch die starke Rekrutierung von Makrophagen deren

erhöhte Expression von IL-1 β angenommen, dessen Vorläufer von Caspase-1 (CASP1) aktiviert wird. Caspase-1 wiederum wird vom Inflammasom aktiviert, bei dem NLRP3 ein Bestandteil darstellt. Dementsprechend wird vermutet, dass IL-1 β , CASP1 und NLRP3 bei chronisch Nierenkranken, einhergehend mit chronischen Entzündungen, auch auf Genebene hoch reguliert sind. Schlussendlich werden auch erhöhte Genexpressionslevel für CX3CR1 und CCL2 bei chronisch Nierenkranken angenommen. Wie bereits erläutert ist CX3CR1 an der Adhäsion und Migration der Leukozyten beteiligt. CCL2 ist identisch mit MCP-1 (monocyte chemotactic protein 1) und wird u.a. von Monozyten an Orten der Entzündung gebildet, um weitere Immunzellen dorthin zu locken. Folglich liegen erhöhte Expressionen dieser Gene bei chronisch Nierenkranken mit deren urämischen, inflammatorischen Mikromilieu nahe.

Weiterhin soll die Replikation des Experiments von Marx et al. erfolgen, um eine Migration der Monozyten durch C-Peptid als chemotaktischen Stimulus *in vitro* aufzuzeigen (Marx et al. 2004). Der von ihnen ermittelte maximale Migrationseffekt bei 1 nM C-Peptid soll bestätigt werden. Es wird angenommen, dass die erhöhte C-Peptid-Konzentration die Aktivität der Monozyten verstärkt und dadurch eine bedeutende Rolle an dem hohen Ausmaß der Atherosklerose bei chronisch Nierenkranken einnimmt. Folglich gilt es ebenfalls zu verifizieren, dass chronisch Nierenkranke häufiger an kardiovaskulären Erkrankungen leiden als Nierengesunde.

Zusammenfassend soll die vorliegende Studie folgende Hypothesen prüfen:

- (1) Die Plasmakonzentration von C-Peptid ist bei chronisch Nierenkranken, sprich Dialysepatienten und Patienten mit Niereninsuffizienz Stadium CKD 3-4, höher als bei Nierengesunden.
- (2) Die Plasmakonzentration von C-Peptid ist bei Dialysepatienten höher als bei Patienten mit Niereninsuffizienz Stadium CKD 3-4.
- (3) Die Plasmakonzentration von C-Peptid unterscheidet sich zwischen diabetischen und nichtdiabetischen Patienten mit Niereninsuffizienz Stadium CKD 3-4 nicht.
- (4) Monozytäre Aktivierungsmarker für Adhäsion und Entzündung (CD11a, CD36, CX3CR1) sind bei chronisch Nierenkranken auf Proteinebene im Vergleich zu Nierengesunden erhöht und korrelieren mit den C-Peptid-Konzentrationen.
- (5) Monozytäre Marker für Entzündung (TNF- α , TNFRSF-1A und TNFRSF-1B), Inflammasomaktivität (CASP1, IL-1 β , NLRP3) und Migration (CCL2, CX3CR1) sind auf RNA-Ebene bei chronisch Nierenkranken im Vergleich zu Nierengesunden erhöht und korrelieren mit den C-Peptid-Konzentrationen.

Zusätzlich soll die Studie folgende Hypothesen erneut verifizieren:

- (6) Bei chronisch Nierenkranken liegt eine höhere Rate an kardiovaskulären Ereignissen vor als bei Nierengesunden.
- (7) Die C-Peptid-Konzentrationen unterscheiden sich zwischen diabetischen und nichtdiabetischen Dialysepatienten nicht.
- (8) Die Anzahl der inflammatorischen CD16⁺-Monozyten ist bei chronisch Nierenkranken höher als bei Nierengesunden.
- (9) Monozyten migrieren in vitro durch C-Peptid als chemotaktischen Stimulus, wobei der maximale Migrationseffekt bei einer Konzentration von 1nM C-Peptid vorliegt.

3. Material und Methodik

3.1 Material

3.1.1 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: In der Studie genutzte Verbrauchsmaterialien, alphabetisch sortiert

Verbrauchsmaterial	Hersteller
4,5ml-Li-Heparin-,5,5ml-Serum-Monovetten®	Sarstedt, Nümbrecht, D
24-Well-Platte, einzeln, steril	Schubert Laborfachhandel, Leipzig, D
Anatomische Pinzette, stumpf, l.: 14,5cm	Schubert Laborfachhandel, Leipzig, D
Einmalplastikpipetten 10ml und 25ml	Schubert Laborfachhandel, Leipzig, D
Falcon 50ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Filterpipettenspitzen 0,1-10µl/0,5-20µl/10-200µl/100-1000µl	VWR, Darmstadt, D
Filterpipettenspitzen 0,5-20µl/2-20µl/1-200µl/100-1000µl	Schubert Laborfachhandel, Leipzig, D
Gestopfte Pipettenspitzen 1-100µl	VWR, Darmstadt, D
KIMTECH® Science Präzisionstücher	Roth, Karlsruhe, D
MACS Separation Columns MS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Messzylinder 100ml	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate (0,1ml)	AB Applied Biosystems, Foster City, USA
MicroAmp™ Fast Reaction Tubes	AB Applied Biosystems, Foster City, USA
Multi-Adapter	Sarstedt, Nümbrecht, D
Optical Adhesive Covers, PCR Compatible	AB Applied Biosystems, Foster City, USA
Pasteurpipetten (Glas)	Roth, Karlsruhe, D
Pipettenspitzen 1-5ml Makro	Schubert Laborfachhandel, Leipzig, D
Pipettenspitzen 1-5ml, makro	VWR, Darmstadt, D
Pipettenspitzen mit Aerosolfilter 0,1-10µl	VWR, Darmstadt, D
Pipettenspitzen mit Aerosolfilter 1-100µl	VWR, Darmstadt, D
Probenröhrchen 5ml, farbcodiert	Novodirect, Kehl/Rhein, D
Reaktionsgefäße 0,5ml und 1,5ml EasyFit	Schubert Laborfachhandel, Leipzig, D
Tempus™ Blood RNA Tubes	Invitrogen/lifeTechnologies, Darmstadt, D
ThinCert™ für 24-Well-Platten, transluzent, PET-Membran, Porendurchmesser 3,0µm/5,0µm/8,0µm	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D

3.1.2 Chemikalien, Medien, Puffer

Tabelle 3: In der Studie genutzte Chemikalien, Medien und Puffer, alphabetisch sortiert

Bezeichnung	Firma bzw. Herstellung
7-AAD Viability Staining Solution	eBioscience, Frankfurt, D
Aqua ad iniectabilia	Braun, Melsungen, D
BD FACS™ Lysing Solution	BD Life Sciences, Heidelberg, D
BD-Lyse-Lösung	BD FACS™ Lysing Solution 1:10 in Aqua ad iniectabilia
C-Peptid (Dichte: 3616,99g/l)	antibodies-online GmbH, Aachen, D

C-Peptid (human) (Dichte: 3026,00g/l)	Biotrend, Köln, D
Easycoll (Dichte 1,077g/ml)	60,50ml Easycoll (Dichte: 1,124g/ml) + 39,50ml PBS
Easycoll (Dichte 1,124g/ml)	Biochrom AG, Berlin, D
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Roth, Karlsruhe, D
Ethanol; absolut	Sigma-Aldrich life science, Steinheim, D
FACS Clean	BD Life Sciences, Heidelberg, D
FACS Rinse	BD Life Sciences, Heidelberg, D
FcR Blocking Reagent Human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
FCS	Biochrom, Berlin, D
High Capacity cDNA RT Kit	Invitrogen/lifeTechnologies, Darmstadt, D
HSA (20%)	CSL Behring, Hattersheim am Main, D
L-Glutamine (200mM) LE Low Endotoxin	Biochrom, Berlin, D
MACS-Puffer (filtriert)	500ml PBS + 5,0ml HSA (2,0%) + 2,0ml 0,5mM EDTA + 3,5ml 10% NaN ₃
MACSQuant Running Buffer	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
NaN ₃	Roth, Karlsruhe, D
Nuclease-freies Wasser	Promega, Mannheim, D
Pan Monocyte Isolation Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
PBS Dulbecco w/o Ca ²⁺	Biochrom, Berlin, D
PBS-2mM EDTA	1000ml PBS + 4ml 0,5mM EDTA-Lösung
Penicillin / Streptomycin (100x)	PAA Cell Culture Company, Cambridge, UK
Quantikine® ELISA Human Insulin C-Peptide Immunoassay	R&D Systems, Minneapolis, USA
RPMI 1640	Sigma-Aldrich life science, Steinheim, D
RPMI komplett	100ml RPMI 1640 + 1ml L-Glutamine (200mM) LE + 1ml Penicillin / Streptomycin (100x)
Sterilium	Bode, Hamburg, D
Tempus™ Spin RNA Isolation Kit	AB Applied Biosystems, Foster City, USA
THP-1 (human acute monocytic leukemia cell line)	DSMZ, Braunschweig, D

3.1.3 Monoklonale Antikörper

Tabelle 4: In der Studie genutzte monoklonale, murine Antikörper, alphabetisch sortiert

Monoklonaler Antikörper (murin)	Hersteller
Anti-CD11a FITC	BD Life Sciences, Heidelberg, D
Anti-CD14 PE-Cy7	eBioscience, Frankfurt am Main, D
Anti-CD143 FITC	AbD Serotec, Puchheim, D
Anti-CD16 APC	Invitrogen/lifeTechnologies, Darmstadt, D
Anti-CD36 PE	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Anti-CD86 PE-Cy5	eBioscience, Frankfurt am Main, D
Anti-CX3CR1 PE	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Anti-IgG FITC	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D
Anti-IgG PE	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D

3.1.4 Gene von TaqMan

Tabelle 5: In der Studie genutzte Gene von TaqMan, alphabetisch sortiert

Gene von TaqMan	TaqMan-Sonde	Hersteller
ACTB	Hs01060665_g1	AB Applied Biosystems, Foster City, USA
CASP1	Hs00354836_m1	AB Applied Biosystems, Foster City, USA
CCL2	Hs00234140_m1	AB Applied Biosystems, Foster City, USA
CX3CR1	Hs00365842_m1	AB Applied Biosystems, Foster City, USA
IL-1 β	Hs01555411_g1	AB Applied Biosystems, Foster City, USA
NLRP3	Hs00918082_m1	AB Applied Biosystems, Foster City, USA
TNF- α	Hs01113624_g1	AB Applied Biosystems, Foster City, USA
TNFRSF1A	Hs01042313_m1	AB Applied Biosystems, Foster City, USA
TNFRSF1B	Hs00961749_m1	AB Applied Biosystems, Foster City, USA

3.1.5 Geräte und Software

Tabelle 6: In der Studie genutzte Geräte und Software, alphabetisch sortiert

Brutschrank NU-5510 (37°C)	IBS INTEGRA Bioscience, Biebertal, D
GraphPad Prism 5	GraphPad Software Inc., La Jolla, USA
Infinite [®] 200 PRO NanoQuant	Tecan, Crailsheim, D
Kühlschrank GNP 3056 (-20°C)	Liebherr, Biberach an der Riß, D
Kühlschrank HERAfreeze (-80°C)	Heraeus, Hanau, D
Kühlschrank KGGSUU41A (-20°C)	Siemens Healthcare, Erlangen, D
Kühlschrank Labo-100 (4°C)	Philipp Kirsch GmbH, Offenburg, D
Kühlschrank MDF-U74V (-80°C)	Sanyo, München, D
Kühlschrank Spezial-468 (4°C)	Philipp Kirsch GmbH, Offenburg, D
Macro Pipettierhelfer, neutral	Brand, Wertheim, D
MACSQuant TM Analyser MACS Quant	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Magneten-Separations-Säule für Ficoll MiniMACS Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Microsoft Office Excel und Word 2003	Microsoft, Redmond, USA
Mikroplate Reader	BioRad, Kabela, D
Mikrozentrifuge UniFuge	Roth, Karlsruhe, D
Pipette variable 0,5-10 μ l	VWR, Darmstadt, D
Pipette variable 2-20 μ l	VWR, Darmstadt, D
Pipette variable 10-100 μ l	VWR, Darmstadt, D
Pipette variable 20-200 μ l	VWR, Darmstadt, D
Pipette variable 100-1000 μ l	VWR, Darmstadt, D
Pipette variable 1000-5000 μ l	VWR, Darmstadt, D
Real Time PCR Systems Step One Plus	Applied Biosystems, Foster City, USA
Saugpumpe oder Wasserstrahlpumpe	Roth, Karlsruhe, D
Sicherheitswerkbank Labgard Klasse II, La- minar Flow	NuAire, Plymouth, USA
Software für MACS-Auswertung: MACSQuantify [®] Software	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
SPSS 21.0	SPSS, Chicago, USA
Thermocycler PCR Express	Thermo Life Sciences, Waltham, USA
Varishaker-Incubator	Dynatech, Denkendorf, D
Vortexer Genie 2 TM G-560 E	Bender & Hobein AG, Zürich, CH
Vortexer Q1	VWR, Darmstadt, D

VWR Ergonomic High-Performance-Pipette	VWR, Darmstadt, D
Zentrifuge MEGAFUGE11R	Heraeus, Hanau, D
Zentrifuge MIKRO220R	Hettich, Tuttlingen, D
Zentrifuge Universal 320	Hettich, Tuttlingen, D

3.2 Methodik

3.2.1 Studiendesign

Im Zeitraum Dezember 2015 bis März 2016 wurden fortlaufend Patienten im KfH (Kuratorium für Dialyse und Nierentransplantation e.V., Bachstelzenweg 4, 06120 Halle (Saale), Leiter: Prof. Dr. med. Matthias Girndt) und im UKH (Universitätsklinikum Halle (Saale)) für eine potentielle Teilnahme an der Studie angesprochen. Dabei wurden im KfH sowohl ambulante Hämodialysepatienten als auch Patienten mit CKD 3-4 in der nephrologischen Ambulanz akquiriert. Weitere Patienten wurden im UKH in der nephrologischen Fachambulanz (Leitung OA Dr. Silke Markau), auf den Stationen 3 und 5 und 7 (Klinik für Innere Medizin II) und auf der internistischen Kurzliegerstation (Klinik für Innere Medizin I) eingeschlossen. Jeder Patient wurde hinsichtlich einer Erkrankung an Diabetes mellitus Typ 2 und der Dialysepflicht beurteilt. Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 wurden aufgrund geringer Fallzahlen nicht in die Studie einbezogen, der Begriff „Diabetes“ bezieht sich im Weiteren stets auf den Diabetes mellitus Typ 2.

Die Patienten wurden nach folgenden Kriterien ausgewählt:

Einschlusskriterien:

- Alter 18-99 Jahre
- Fähigkeit die Studie und die Aufklärungsunterlagen zu verstehen
- Bereitschaft zur Teilnahme
- Bei Patienten mit Nierenerkrankung (Gruppe b, c, d):
 - chronische Niereninsuffizienz Stadium CKD 3 bis CKD 4
 - alle Krankheitsursachen
 - Behandlung im KfH oder UKH
- Bei Patienten ohne Nierenerkrankung (Gruppe a):
 - Keine bekannte Nierenkrankheit
 - Kein bekannter Diabetes mellitus
 - Behandlung im UKH (nephrologische Ambulanz, Station 3, Station 5, internistische Kurzliegerstation)

Ausschlusskriterien:

- Fehlende Einwilligung
- Aktive, floride Infektion mit CRP>50 mg/l oder immunsuppressive Therapie
- Aktives Malignom und/oder Chemotherapie
- Anämie in einer Ausprägung, die nach Einschätzung des behandelnden Arztes eine wissenschaftliche Blutentnahme ausschließt

Im Sinne einer prospektiven, explorativen Querschnittsstudie blieb es bei einer geringen Gruppenstärke von 79 Probanden, wodurch auch eine gewisse Heterogenität der nachfolgend aufgelisteten Gruppen untereinander nicht vermeidbar war.

Das potentielle Patientenkollektiv wurde vorab in vier unterschiedliche Gruppen unterteilt:

- a) Nierengesunde ohne Diabetes (NG) als Kontrollgruppe
- b) Hämodialysepatienten mit Diabetes (DDb)
- c) Hämodialysepatienten ohne Diabetes (D)
- d) Patienten mit CKD 3-4 ohne Dialyse, mit und ohne Diabetes (CKD)

Die willkürlich festgelegte Fallzahl von N=20 pro Gruppe konnte einzig in Gruppe DDb nicht erreicht werden, da nicht genügend Hämodialysepatienten mit Diabetes für diese Studie zu Verfügung standen. Letztendlich nahmen 25 Nierengesunde ohne Diabetes, 13 Hämodialysepatienten mit Diabetes, 21 Hämodialysepatienten ohne Diabetes und 20 Patienten mit CKD 3-4 ohne Dialyse, mit und ohne Diabetes, an der Studie teil (s. Tabelle 7). Aufgrund der insgesamt doch nur geringen Anzahl der verfügbaren Probanden konnte nicht in allen Gruppen das Geschlechterverhältnis ausgeglichen werden.

Tabelle 7: Übersicht der Gruppenstärken inklusive Aufteilung nach der Diagnose Diabetes

	Diabetes	Kein Diabetes	Σ
NG	0	25	25
DDb	13	0	13
D	0	21	21
CKD	6	14	20
Σ	19	60	79

Folgendes muss zur Gruppe CKD hinzugefügt werden: Sie bestand aus 11 Patienten mit CKD 3 und 9 Patienten mit CKD 4, unabhängig davon ob diese an Diabetes erkrankt waren oder nicht. Es bleibt anzumerken, dass die Gruppe CKD ursprünglich auch Patienten mit dem Stadium CKD 5 ohne Dialyse enthalten sollte, jedoch gab es in dem Studienzeitraum keinen Probanden mit dieser Diagnose vor Ort.

Das Studienprotokoll wurde durch die Ethikkommission der Universitätsklinik Halle bestätigt. Die in der Deklaration von Helsinki des Weltärztebundes dokumentierten ethischen Grundsätze für die medizinische Forschung am Menschen wurden eingehalten und das informierte Einverständnis der Patienten schriftlich eingeholt.

3.2.2 Studienablauf

Nachdem die Studie inklusive Ablauf von der Doktorandin erläutert und eventuelle Rückfragen seitens Patienten geklärt wurden, bestätigten die Patienten ihre Teilnahme an der Studie mit der Unterschrift der Einverständniserklärung.

Die Blutentnahme im KfH, der Akutdialyse und den nephrologischen Ambulanzen erfolgte freundlicherweise durch das dortige Fachpersonal und auf den restlichen Stationen durch die Doktorandin selbst. Hierbei handelte es sich immer um ohnehin notwendige Blutentnahmen, in deren Rahmen nun auch einmalig Blut in 3 Monovetten für diese Studie gewonnen wurde. Bei Hämodialysepatienten wurde das Blut vor der anschließenden Dialyse gewonnen.

Eine 4,5ml-Lithium-Heparin-Monovette[®] wurde für Experimente mit Monozyten entnommen und zwischen Blutentnahme und Experimenten vergingen nicht mehr als 3 Stunden, währenddessen das Blut im Eisbad (4°C) auf Trockeneis gelagert wurde. Die 5,5ml-Serum-Monovette[®] wurde sofort zentrifugiert und das abgetrennte Serum bei -20°C eingefroren, um im Verlauf die C-Peptid-Konzentration aller Proben gesammelt zu bestimmen. In dem Tempus[™] Blood RNA Tube wurden 3 ml Blut gewonnen und bis zur Präparation der Gesamt-RNA bei -20°C eingefroren.

3.2.3 Ermittlung klinischer Daten

Die deskriptiven Daten, Diagnosen und derzeitige Medikation stammten aus den Patientenakten. Als kardiovaskuläre Diagnosen wurden arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus Typ 2, koronare Herzkrankheit (KHK), Z.n. Koronarintervention und Herzinsuffizienz dokumentiert. Des Weiteren wurden die Diagnosen Z.n. Myokardinfarkt, Z.n. Schlaganfall, pAVK, Z.n. LAE und Z.n. Thrombose sowohl einzeln erhoben als auch unter der Kategorie „Gefäßverschluss allgemein“ zusammengefasst, die bereits schon beim Vorliegen von nur einer dieser Diagnosen als positiv ausgeprägt galt. Codiert wurde in dichotomer Ausprägung, z.B. Z.n. Herzinfarkt „ja/nein“ = „1/0“. Des Weiteren wurden die Patienten zu Größe und Gewicht befragt und der BMI errechnet. Es erfolgte eine weitere Einteilung in Nichtraucher und Ever-Smoker.

3.2.4 Labordiagnostik

Die ärztlicherseits angeordnete Blutentnahme diente der Bestimmung routinemäßiger Laborparameter durch das Zentrallabor des UKH und MVZ Labor Dr. Reising-Ackermann und Kollegen GbR, Strümpellstraße 40, 04289 Leipzig. Folgende relevante Blutwerte konnten übernommen werden: Kreatinin, Harnstoff, Calcium, Phosphat, Glukose, HbA1c, Hb, CRP, Leukozyten. Vereinzelt fehlende Laborwerte wurden durch die in den Patientenakten vorhandenen Laborwerte ersetzt, falls diese weniger als eine Woche alt waren (Ausnahme: beim HbA1c waren Werte der letzten drei Monate akzeptabel). Die eGFR wurde mittels MDRD-Formel berechnet.

3.2.5 C-Peptid Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Bei dem Quantikine® ELISA Human Insulin C-Peptide Immunoassay handelt es sich um einen Sandwich-ELISA durch den die Konzentration des C-Peptids aller Patientenseren quantitativ bestimmt werden kann. Dieses Verfahren dient dem Nachweis eines spezifischen Antigens mittels Antikörper. Dabei führt die Reaktion eines an den zweiten Antikörper konjugierten Enzyms zu einem Farbumschlag, der durch eine quantitative, photometrische Messung die C-Peptid-Konzentration jeder Probe liefert.

Auf einer 96-Well-Mikrotiterplatte immobilisierte monoklonale Antikörper binden das im Serum vorhandene C-Peptid. Anschließend folgt ein ebenfalls an das C-Peptid bindender Antikörper, sog. Detektionsantikörper, der an die Meerrettich-Peroxidase gebunden ist. Das hinzugefügte Substrat Tetramethylbenzidin wird von diesem Enzym umgesetzt und der resultierende Farbumschlag wird quantitativ mittels Photometer bei einer Extinktion von 450 nm gemessen. Aufgrund der ebenfalls mitgeführten Standards kann eine C-Peptid-Konzentration für jedes Patientenserum ermittelt werden.

3.2.6 Immunologische Untersuchung der Monozyten

3.2.6.1 Immunologische Kategorisierung der Monozytensubpopulationen

Monozyten werden abhängig von Größe und Granularität von anderen peripheren Blutzellen unterschieden. So sind Monozyten beispielsweise größer als Lymphozyten und weisen zudem eine geringere Granularität als Granulozyten auf. Weiterhin können Zellen und auch Monozytensubgruppen anhand ihrer Oberflächenproteine nach der CD-Nomenklatur (Cluster of Differentiation) näher spezifiziert werden. Prinzipiell werden Leukozyten wegen ihrer Expression von Oberflächenantigenen u.a. in Monozyten (CD14⁺), B-Lymphozyten (CD19⁺), T-Lymphozyten (CD3⁺) und NK-Zellen (CD56⁺) unterteilt. Im heparinisierten Vollblut der Patienten werden Oberflächenantigene mit Fluoreszenzfarbstoff konjugierten Antikörpern mar-

kiert, um die zugeordneten Zellen bei der anschließenden Durchflusszytometrie quantitativ zu bestimmen. Anhand ihrer unterschiedlichen Ausprägungen von CD 14⁺ (LPS-Rezeptor) und CD 16 (Fc- γ -III-Rezeptor) konnten somit die Monozyten in die drei Subgruppen Mo1 (CD14⁺⁺CD16⁻), Mo2 (CD14⁺⁺CD16⁺) und Mo3 (CD14⁺CD16⁺⁺) eingeteilt werden.

Darüber hinaus soll die Ausprägung weiterer Oberflächenantigene in den einzelnen Monozytensubgruppen jeder Patientengruppe bestimmt werden. Hierbei handelt es sich um CD11a, CD36 und CX3CR1, die allesamt in den Prozess der Entzündung involviert sind. Als Bestandteil des LFA-1 (Leukocyte function-associated antigen type 1) vermittelt das Integrin CD11a durch Bindung seines Liganden ICAM-1 die Endotheladhäsion von Leukozyten. Neben seinen vielfachen anderen Funktionen bindet CD 36 u.a. oxidiertes LDL und spielt sowohl bei Phagozytose als auch Entzündungsprozessen eine Rolle. CX3CR1 ist als Transmembranprotein an der Migration von Monozyten beteiligt, vermittelt allerdings nicht deren Adhäsion.

Um diese Oberflächenantigene anschließend mittels Durchflusszytometrie zu bestimmen werden murine, fluorkonjugierte Antikörper eingesetzt. Wie in Tabelle 8 dargestellt müssen drei verschiedene Ansätze von Antikörperkombinationen hergestellt werden, da die Anzahl der Laser des Durchflusszytometers die Summe der synchron messbaren Fluorochrome limitiert.

Im Folgenden wird ein im nephrologischen Labor des UKH (Leitung: Dr. Christof Ulrich) etabliertes Protokoll für die Oberflächenfärbung von Monozyten im Vollblut mit vorheriger Lyse der Erythrozyten und Fixierung der Leukozyten näher erläutert. Pro Patient werden wegen der bereits erläuterten Vielzahl an Antikörpern jeweils drei Ansätze durchgeführt. Zur Gewinnung eines Zellpellets werden jeweils 100 μ l Lithium-Heparin-Vollblut des Patienten in ein Reagenzglas überführt, anschließend mit 2 ml MACS-Puffer ergänzt und nach Mischen mittels Vortex-Mixer für 5 Minuten bei 300g zentrifugiert. Der resultierende Überstand wird abgesaugt und der Waschvorgang erneut wiederholt. Nun wird der entsprechende Antikörper-Mix 1, 2 oder 3 (siehe Tabelle 8) dem jeweiligen Röhrchen hinzugefügt. Hierbei verhindert das enthaltene murine FcR Blocking Reagenz eine unspezifische Bindung der Antikörper an humane Zellen mit Fc-Rezeptoren (z.B. Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, B-Lymphozyten, NK-Zellen, dendritische Zellen). Nach einem erneuten Durchmischen folgt eine Inkubation bei 4°C in Dunkelheit für 15 Minuten. Daraufhin müssen die aus dem Vollblut noch vorhandenen Erythrozyten lysiert und die Monozytenoberflächenfärbung gestoppt werden. Dies geschieht durch die Zugabe von 2 ml BD-Lyse-Lösung und nach ausreichendem Durchmischen muss die Zellsuspension nun für 15 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubieren. Nach dieser Zeit ist eine stattgehabte Lyse der Erythrozyten optisch zu verifizieren, da das Röhrchen zwar noch rot, aber nun durchsichtig ist. Eine Zentrifugation für 5 Minuten bei 300g schließt sich an und es folgt ein letzter Waschschritt mit 2 ml MACS-Puffer wie oben bereits beschrieben. Abschließend wird

das Pellet in 200µl MACS-Puffer aufgenommen und nach einem letzten Mischen ohne Zeitverzug durchflusszytometrisch gemessen.

Tabelle 8: Zusammensetzungen der Antikörper-Mixe 1-3

Mix 1	Menge	Mix 2	Menge	Mix 3	Menge
CD11a FITC	Je 5,0 µl	CD143 FITC	Je 5,0 µl	IgG FITC	Je 5,0 µl
CX3CR1 PE	Je 5,0 µl	CD36 PE	Je 5,0 µl	IgG PE	Je 5,0 µl
CD86 PE-Cy5	Je 5,0 µl	CD86 PE-Cy5	Je 5,0 µl	CD86 PE-Cy5	Je 5,0 µl
CD14 PE-Cy7	Je 1,5 µl	CD14 PE-Cy7	Je 1,5 µl	CD14 PE-Cy7	Je 1,5 µl
CD16 APC	Je 2,0 µl	CD16 APC	Je 2,0 µl	CD16 APC	Je 2,0 µl
FcR-Block	Je 5,0 µl	FcR-Block	Je 5,0 µl	FcR-Block	Je 5,0 µl
MACS-Puffer	Je 26,5 µl	MACS-Puffer	Je 26,5 µl	MACS-Puffer	Je 26,5 µl
Summe	Je 50,0 µl	Summe	Je 50,0 µl	Summe	Je 50,0 µl

3.2.6.2 FACS-Analyse/Durchflusszytometrie

Eine Durchflusszytometrie, auch FACS-Analyse (Fluorescence Activated Cell Sorting oder Scanning) genannt, ermöglicht sowohl die quantitative Bestimmung als auch nähere Typisierung von interessierenden Zellarten. In gemischten Zellpopulationen können somit verschiedene Zellen anhand der relativen Größe, Granularität und eventuell vorhandenen Fluoreszenzsignalen voneinander abgegrenzt werden. Das Prinzip basiert auf einer Aussendung von Laserlicht, das beim Treffen auf eine Zelle in Streulicht umgewandelt wird, welches wiederum differenziert detektiert wird. Bei vorheriger Markierung der Zelle mit einem Fluorchrom entsteht zusätzlich ein Fluoreszenzsignal. Zusammenfassend kann jedem Zelltyp ein charakteristisches Streulicht und Fluoreszenzmuster zugeordnet werden.

Die Mikrokanalküvette saugt automatisiert ein definiertes Volumen einer Zellsuspension ein. Die Zellen passieren in hohem Tempo möglichst einzeln einen Laserstrahl, wobei dieser von der Zelloberfläche abgelenkt wird. Das entstandene neue Signal wird Streulicht genannt und von verschiedenen Detektoren empfangen, verstärkt und analysiert. Es gibt zwei Arten von Streulicht. Das Vorwärtsstreulicht (forward scatter=FSC) resultiert aus der Beugung des Laserlichts und bestimmt dadurch die relative Größe der Zelle. Das Signal ist demnach davon abhängig, in welchem Querschnitt die Zelle vom Laserlicht getroffen wird. Je größer die Zelle, desto größer das FSC. Wird das Licht hingegen an der Zelloberfläche gebrochen, so wird es stärker abgelenkt und es entsteht Seitwärtsstreulicht (side scatter=SSC). Es hängt stark von der relativen Granularität und Komplexität des Zellinhalts (z.B. Zellkernstruktur) ab. Beispielsweise ist das Signal umso größer, je mehr Granula in der Zelle vorhanden sind. Durch das SSC ist es möglich unabhängig von der Zellgröße die wichtigsten Leukozytengruppen bereits voneinander abzugrenzen (z.B. Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten). Weiterhin unterscheiden sich Zellen in ihren komplexen Kombinationen an Oberflächenproteinen, die bereits im Voraus einer FACS-

Analyse mit Fluorchrom konjugierten Antikörpern markiert wurden. Diese fluoreszierende Gruppe (z.B. FITC=Fluoreszein-Isothiocyanat, PE=Phycoerythrin) leuchtet bei Bestrahlung mit Laserlicht einer bestimmten Wellenlänge als sog. Fluoreszenzsignal auf. Bei der Fluoreszenz werden zwei verschiedene Parameter erhoben: Die spezifische Fluoreszenz beschreibt den Anteil der Zellen, auf denen der Marker vorhanden ist. Mit der relativen Fluoreszenz (mean fluorescence intensity=MFI) hingegen wird die Expressionsdichte des Markers auf jeder Zelle gekennzeichnet. Die gleichzeitige Verwendung von mehreren Oberflächenantikörpern, Lasern mit unterschiedlichen Wellenlängen und Filtern erlaubt es die Ausprägung von etlichen Antigenen gleichzeitig zu analysieren, sodass mehr Informationen einer einzelnen Zelle zu einem Zeitpunkt gewonnen werden können. Das für diese Studie verwendete Durchflusszytometer der Firma Miltenyi Biotec (MACSQuant Analyzer) besitzt dafür drei Laserlichtquellen und neun optische Kanäle, von denen in sieben Kanälen die Fluoreszenzsignale und in zwei Kanälen die Streulichtsignale detektiert werden.

Es folgt die Auswertung der empfangenen Signale aller analysierten Zellen in einer Graphik. Den Koordinatenachsen können nun interessierende Parameter zugeordnet werden. Jede einzelne Zelle wird dabei abhängig von ihren spezifischen Signalen als ein Punkt abgebildet, sodass sich insgesamt ein Punkthistogramm, auch Dot Plot genannt, ergibt. Indem mit dem Computer eine individuell zu definierende Region im ersten Dot Plot eingezeichnet wird, können näher zu betrachtende Zellen ausgewählt und zu vernachlässigende Zellen ausgegrenzt werden. Daraufhin werden nur die selektierten Zellen dieser Region in einem zweiten Dot Plot dargestellt, dessen zwei Achsen nun ebenfalls mit ausgesuchten Parametern belegt werden. Dieser Vorgang nennt sich „Gating“ und erfolgt gemäß der festgelegten Gating-Strategie.

In dieser Studie werden zuerst alle Zellen nach ihren Streulichteigenschaften aufgeschlüsselt. Hierfür wird auf der Abszisse das FSC für die Zellgröße und auf der Ordinate das SSC für die Zellgranularität aufgetragen. Je weiter rechts sich eine Zelle in der Graphik befindet, desto größer, und je weiter oben, desto granulärer ist sie. Somit bilden sich unterschiedliche Zellanhäufungen in der Abbildung, die vor allem die Anteile der Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten in der Zellsuspension darstellen. Dies wird in Abb. 1 ersichtlich, in der nun manuell die Leukozyten gated werden, um den Debris von den weiteren Analysen auszuschließen.

Auf einem zweiten Dot Plot wird anschließend von den ausgewählten Zellen die Expression von CD86 in Abhängigkeit von der Zellgröße (FSC) dargestellt (vgl. Abb. 2). Sowohl B-Lymphozyten als auch Monozyten sind CD86⁺, jedoch weisen davon nur Monozyten zusätzlich CD14 an ihrer Oberfläche auf. Deswegen können die gateden CD86⁺-Zellen in einem dritten Dot Plot anhand ihrer Ausprägung von CD14 differenziert werden. Als Grundlage weite-

rer Betrachtungen dient die Einteilung der $CD14^+CD86^+$ -Monozyten in ihre 3 Subgruppen anhand der unterschiedlichen Ausprägungen von CD16 (Abb. 3). Wie in 3.2.6.1 bereits näher beschrieben werden die $CD14^{++}CD16^-$ -Monozyten als Mo1, die $CD14^{++}CD16^+$ -Monozyten als Mo2 und die $CD14^+CD16^{++}$ -Monozyten als Mo3 getaget. Bei diesen Subpopulationen wird anschließend in weiteren Dot Plots die Expressionsstärke von CD11a (Leukozytenadhäsions-Rezeptor), CD36 (Scavenger-Rezeptor) und CX3CR1 (Chemokinrezeptor, Migrationsmarker) analysiert.

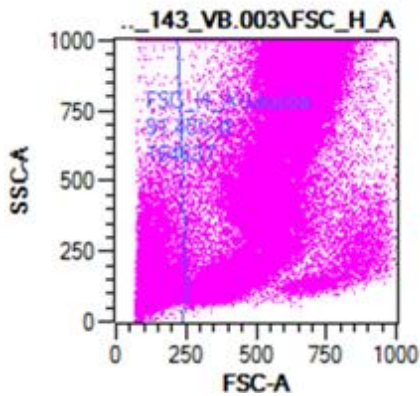


Abb. 1: Dotplot SSC vs. FSC

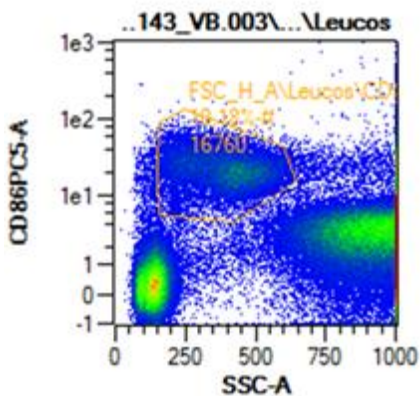


Abb. 2: Dotplot CD86 vs. SSC der in Abb. 1 ausgewählten Leukozyten

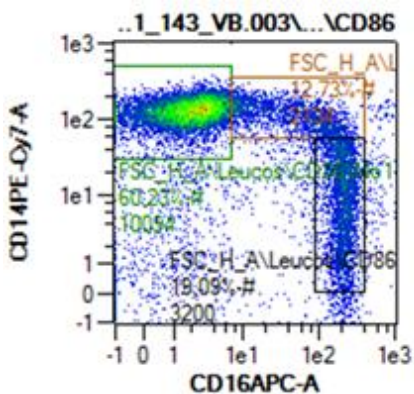


Abb. 3: Dotplot CD14 vs. CD16 der in Abb. 2 ausgewählten CD86⁺-Monozyten

3.2.6.3 RNA Isolation

Das Blut des TempusTM Blood RNA Tube dient der Isolation der zellulären RNA, womit anschließend eine PCR und Genexpressionsanalyse der zu untersuchenden Gene durchgeführt werden kann. In einem luftleeren TempusTM Blood RNA Tube werden ca. 3 ml Blut des Patienten gewonnen, das auch die primär instabile RNA beinhaltet. Durch das in dem Tube bereits vorhandene RNA Stabilizing Reagent gelingt eine Stabilisierung, eine höhere Isolationsquote und zusätzlich eine besser erhaltene Qualität der RNA.

Nach der Blutentnahme wurde das Tube für 10 Sekunden geschüttelt und für 2 Stunden bei Raumtemperatur in aufrechter Position abgestellt. Anschließend folgte eine Einlagerung bei -20°C bis Tempus Tubes von mehreren Patienten vorlagen, damit deren weitere Bearbeitung mit dem TempusTM Spin RNA Isolation Kit effizient parallel durchgeführt werden konnte. Dafür wurden die Proben schonend bei Raumtemperatur aufgetaut und deren Inhalt anschließend in ein 50ml Falcon überführt. Das Volumen wurde auf 12 ml mit PBS-Puffer aufgefüllt. Nachdem das Falcon für 30 Sekunden mit dem Vortex-Mixer durchmischt wurde, schloss sich die Zentrifugation für 30 Minuten bei 2443g und 4°C an. Der resultierende Überstand wurde abgossen und das unsichtbare RNA Pellet blieb am Boden zurück. Nach zweiminütigem Stand des umgedrehten Falcons wurde der Rand mit absorbierenden Tissues abgewischt. Es wurden 400 µl RNA Purification Resuspension Solution dem Falcon hinzugefügt und nach ausreichender Resuspension mit der Pipette, gefolgt von der Durchmischung mittels Vortex-Mixer, wurde die RNA-Lösung vorübergehend auf Trockeneis gestellt. Ein RNA Purification Filter wurde in ein 2ml Collection-Tube gestellt und mit 100 µl RNA Purification Wash Solution 1 benetzt. Darauf folgten die Applikation von 400 µl der resuspendierten RNA-Lösung auf den Filter und die Zentrifugation für 1 Minute bei 16000g. Nun wurde der Filter heraus genommen, der Inhalt des Tubes verworfen und der Filter erneut auf das Tube gesetzt. Beim nächsten Zyklus wurden 500 µl RNA Purification Wash Solution 1 auf den Filter pipettiert, nach der Zentrifugation für 1 Minute bei 16000g das Tube erneut entleert und der Filter wieder hinein gesteckt. Dieser Waschschrift wurde noch zweimal mit jeweils 500 µl RNA Purification Wash Solution 2 wiederholt. Um nun die Membran des Filters zu trocknen schloss sich eine Leerzentrifugation ohne jegliche neue Substanzapplikation für 1 Minute bei 16000g an. Hieraufhin wurde der Filter in ein neues 2ml Collection Tube überführt und mit 100 µl Nucleic Acid Purification Elution Solution benetzt. Nach einer Inkubation für 2 Minuten bei 70°C im Thermoblock folgte die Zentrifugation für 1 Minute bei 16000g. Das entstandene Eluat wurde abermals auf den Filter pipettiert und nach der nun letzten Zentrifugation für 2 Minuten bei 16000g konnte der Filter verworfen werden. Es blieb das RNA-enhaltende Eluat im Collection Tube, wovon 90 µl in ein neues 1,5ml-Eppendorf-Gefäß transferiert und bei -80°C eingelagert wurden.

3.2.6.4 PCR und Messung der Genexpression

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist es die vier Patientengruppen gezielt auf Unterschiede bezüglich einiger an Entzündungsprozessen beteiligten Rezeptoren und Cytokinen zu untersuchen. Hierfür sollen die Transkripte der einzelnen Targetgene quantitativ mittels einer RTD-PCR (Real-Time Detection Polymerase Chain Reaction) bestimmt werden. Die zu analysierenden Gene/Proteine inklusive jeweiliger Funktionen und TaqMan-Sonde können der Tabelle 9 entnommen werden.

Tabelle 9: analysierte Gene/Proteine mit ihren Funktionen und Bezeichnungen der Sonden

Gen	mit Entzündung assoziierte Funktionen	TaqMan-Sonde
CASP1	Caspase-1 aktiviert IL-1 und IL-18	Hs00354836_m1
IL-1β	Von Monozyten produzierter, zentraler Entzündungsmediator; Akut-Phase-Proteine \uparrow	Hs01555411_g1
NLRP3	Inflammasom-Sensorprotein; hauptsächlich von Makrophagen exprimiert	Hs00918082_m1
CCL2 (=MCP-1)	Chemoattraktant; lockt u.a. Monozyten zu Entzündungsherden	Hs00234140_m1
CX3CR1	Fraktalkin-Rezeptor; in Migration von Leukozyten involviert	Hs00365842_m1
TNF-α	Hauptsächlich von Makrophagen ausgeschüttet; zentraler Entzündungsmediator; Akut-Phase-Proteine \uparrow	Hs01113624_g1
TNFRSF1A	TNF-Rezeptor Superfamilie 1A	Hs01042313_m1
TNFRSF1B	TNF-Rezeptor Superfamilie 1B	Hs00961749_m1

Für eine RT-PCR wird nicht die bereits isolierte, einsträngige RNA benötigt, stattdessen ist deren Umschreibung mittels High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit von der Firma AB in die doppelsträngige cDNA erforderlich. Im Folgenden wird die cDNA-Synthese beschrieben. Zu Beginn wurde die Konzentration der isolierten RNA jeder Probe mit dem Thermo Scientific NanoDrop spektrophotometrisch bestimmt und anschließend berechnet, welches Volumen jeder Probe für eine Herstellung von 500 ng cDNA benötigt wird. Das jeweilige Volumen wurde in ein PCR Tube pipettiert und mit Nuclease-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20 μ l aufgefüllt. Die Lagerung der gesamten Substanzen und die Durchführung erfolgten konstant auf Trockeneis. Anschließend wurde der Master-Mix hergestellt (vgl. Tabelle 10), bestehend aus RT Buffer, Oligonukleotiden als dNTP Mix, RT Random Primers, dem Enzym MultiScribeTM Reverse Transkriptase (50 U/ μ l) und Nuclease-freiem Wasser. Jedem Tube wurde nun 20 μ l des

Master-Mixes hinzugefügt. Die Tabelle 11 stellt beispielhaft den nun vorliegenden Inhalt des Tubes bei 3 Patienten dar. Nach Durchmischen mittels Vortex-Mischer und der Zentrifugation fand die reverse Transkription im Thermocycler in 4 Schritten mit unterschiedlichen Temperaturen statt. Nach 10 Minuten bei 25°C erhitzte das Gerät die Proben für 120 Minuten auf 37°C. Hierbei synthetisierte die MultiScribe™ Reverse Transkriptase (50 U/µl) zuerst als RNA-abhängige DNA-Polymerase aus hinzugefügten Oligonukleotiden den erforderlichen komplementären Strang der RNA. Anschließend sorgte ihre RNase-Aktivität für den Abbau des verbliebenen RNA-Anteils, um schlussendlich mit der DNA-abhängigen DNA-Polymerase die doppelsträngige DNA herzustellen. Danach folgte eine Inaktivierung der reversen Transkriptase für 5 Minuten bei 85°C, um anschließend die Proben auf 4°C zu kühlen. Bei -20°C wurden die 500 ng cDNA eingelagert.

Tabelle 10: Bestandteile des Master-Mixes

Master-Mix	Menge
10x RT Buffer	Je 4,0 µl
25x dNTP Mix	Je 1,6 µl
10x RT Random Primers	Je 4,0 µl
MultiScribe™ RT (50U/µl)	Je 1,0 µl
Nuclease-freies Wasser	Je 9,4 µl
Summe	Je 20,0 µl

Tabelle 11: Beispiele für den Inhalt der Tubes bei der Umschreibung von RNA in 500ng cDNA

Proband-Nr.	1	2	49
RNA	2,89 µl	4,16 µl	12,07 µl
Nuclease-freies H ₂ O	17,11 µl	15,84 µl	7,93 µl
Master-Mix	20,00 µl	20,00 µl	20,00 µl
Summe	40,00 µl	40,00 µl	40,00 µl

Nach der Herstellung der cDNA folgt nun die Durchführung einer PCR, bei der die Real-Time PCR von der klassischen PCR unterschieden wird. Die klassische PCR stellt eine enzymabhängige in-vitro-Vervielfältigung ausgewählter Genabschnitte einer DNA dar. Diese Amplifikation besteht aus drei sich beliebig oft wiederholenden Vorgängen, die heutzutage automatisiert durch einen Thermocycler ausgeführt werden. Zuerst werden im Denaturierungsschritt bei 96°C die Wasserstoffbrücken zwischen den Doppelsträngen der cDNA gespalten, sodass nun zwei Einzelstränge vorliegen. Im folgenden Annealingschritt findet bei 55°C die Hybridisierung von reichlich vorhandenen Oligonucleotidprimer statt, welche an das Ende der interessierenden und damit zu replizierenden Gensequenzen binden. Während des letzten Schrittes der Elongation synthetisiert die thermostabile Taq-Polymerase bei 72°C jeweils den komplementären Strang, sodass nach diesem Vorgang nun zwei identische DNA-Doppelstränge vorliegen. Durch diese

drei Schritte gelingt demnach jeweils eine Verdoppelung der Genabschnitte, wodurch bei Wiederholung des Zyklus die Anzahl der PCR-Produkte im Verlauf exponentiell ansteigt.

Für die Real-Time PCR dieser Studie wurde das Gerät Real Time PCR Systems Step One Plus von AB verwendet, bei dem die DNA insgesamt 44 Zyklen der Vorgänge der Denaturierung, des Annealings und der Elongation durchlief. Im Gegensatz zur klassischen PCR wird dabei die Menge der entstandenen DNA bereits nach jedem einzelnen Amplifikationszyklus gemessen. Dies geschieht durch eine mit einem Fluoreszenzfarbstoff-markierte Gensonde, die an die zu analysierenden Gensequenzen des komplementären Stranges bindet. Ist dies der Fall, so führt anschließend das anregende Laserlicht zu der Emission einer Fluoreszenz, das durch zusätzliche Fluoreszenzkanäle im Thermocycler nun empfangen und quantifiziert wird. Die Fluoreszenz nimmt linear mit der Anzahl der PCR-Produkte zu. Es ist möglich mehrere Gensonden gleichzeitig zu benutzen, um damit verschiedene Fluoreszenzen parallel zu messen. Zur individuellen Quantifizierung der einzelnen Target-Gensonden und gleichzeitig internen Kontrolle des Verfahrens wird ein Housekeeping-Gen, hier ACTB (=Actin- β ; TaqMan-Sonde: Hs01060665_g1), mitgeführt. Die Menge des PCR-Produkts von ACTB kann mit dem der interessierenden Gene in Relation gesetzt werden, um deren Ausprägung zu quantifizieren. Eine absolute Quantifizierung ohne Bezug auf ein Referenz-Gen gilt hingegen als aufwändiger und ungenauer. Als zweite interne Kontrolle wurde die cDNA eines gesunden Menschen als Standard stets mitgeführt, um einen weiteren Vergleich der RT-PCRs untereinander zu ermöglichen und deren korrekte Durchführung zu überprüfen. Die Ergebnisse der Quantifizierung werden in Cycle Thresholds (CT) ausgedrückt. Hierbei wird zuerst der Schwellenwert (=Threshold) individuell definiert, bei dem die Fluoreszenz der Gensonde des Probanden erstmals größer als die konsequent auftretende Hintergrund-Fluoreszenz ist. Der CT-Wert wird durch den Schnittpunkt der Expressionskurve der jeweiligen Gensondenfluoreszenz mit der Threshold dargestellt. Nun erfolgt eine Berechnung zur Quantifizierung der CT-Werte durch die Relativierung über die internen Kontrollen. Der Δ CT-Wert der einzelnen Sonde des Probanden drückt die Differenz zwischen dem CT-Wert der Target-Sonde und dem CT-Wert der Housekeeping-Sonde aus (siehe Formel (1) der Abb. 4). Dieser Δ CT-Wert kann nun auch für den internen Standard des gesunden Menschen berechnet werden (siehe Formel (2) der Abb. 4). Abschließend können die beiden Δ CT-Werte derselben Sonde des Probanden und des gesunden Menschen mit Hilfe der Formel (3) der Abb. 4 in Relation gesetzt werden. Der Quotient RQ (Relative Quantitation) beschreibt, um wie vielfach das Target-Gen beim Probanden stärker als bei dem gesunden Menschen des internen Standards ausgeprägt ist.

$$(1) \Delta\text{CT-Wert (Target,Proband)} = \text{CT (Target-Sonde)} - \text{CT (Housekeeping-Sonde)}$$

$$(2) \Delta\text{CT-Wert (Target,interner Standard)} = \text{CT (Target-Sonde)} - \text{CT (Housekeeping-Sonde)}$$

$$(3) \text{ RQ} = \frac{2^{-\Delta\text{CT}(\text{Target-Gen, Proband})}}{2^{-\Delta\text{CT}(\text{Target-Gen, gesunder Standard})}}$$

Abb. 4: Berechnung der CT-Werte durch Relativierung über interne Kontrollen

3.2.7 Reduktion des Gesamtkollektivs um ausgewählte Patienten bei immunologischen Experimenten

In der Auswertung der Oberflächenfärbung von Monozyten erfolgte eine Elimination von ausgewählten Daten zweier Probanden aus der Gruppe der nichtdiabetischen Dialysepatienten. Zum einen betraf dies die immunologischen Ergebnisse eines Patienten, bei dem im Zentrallabor des UKH lediglich eine Leukozytenkonzentration von 1,47 Gpt/l gemessen wurden (Referenzbereich 3,8-9,8 Gpt/l). In der durchflusszytometrischen Analyse seiner angefärbten Zellen präsentierten sich viele Extremwerte. Sie standen nicht annähernd in Relation zu den restlichen Patienten dieser Gruppe und verfälschten die Mittelwerte der Gruppe D. Es erfolgte die Einschätzung, dass wegen einer zu geringen Leukozytenzahl unrealistische Werte im Durchflusszytometer gemessen wurden. Aufgrund dessen wurde dieser Patient von den Analysen der Oberflächenfärbungen von Monozyten ausgeschlossen. Zum anderen ergab bei einer zweiten Patientin derselben Gruppe die Messung der Leukozytenzahl im Zentrallabor des UKH einen Wert von 9,3 Gpt/l im Normbereich, hingegen maß das Durchflusszytometer einen Wert von umgerechnet 26,8 Gpt/l. Da diese Werte enorm differierten und mit einem CRP von 3,0 mg/l eine Entzündung als eher unwahrscheinlich galt, wurde der durchflusszytometrisch bestimmte Wert dieser Patientin als wahrscheinlich inkorrekt zu hoch eingestuft. Eine Korrekturmessung war zu dem Zeitpunkt nicht mehr möglich, sodass nur dieser einzelne Wert eliminiert wurde. Letztlich bestand dadurch die Gruppe D in der immunologischen Auswertung aus 20 Patienten.

Weiterhin wurde bei insgesamt 7 Patienten keine PCR durchgeführt, da sie vorab von diesem Experiment exkludiert wurden. Bei ihnen wurde eine zu geringe Menge an RNA isoliert, sodass sich in der weiteren Präparation dementsprechend zu wenig cDNA für eine PCR ergab. Somit verringerte sich die Gruppe der Nierengesunden von ursprünglich 25 auf 19 Patienten und die der CKD-Patienten von 20 auf 19 Patienten. Folglich lagen für diese Studienteilnehmer keine Werte auf Genexpressionsebene vor.

3.2.8 Migrationsexperimente

Der Aufbau der Migrationsassays wurde aus dem Versuch von Marx et al. (2004) abgeleitet. Die folgenden Experimente wurden mit einem einzelnen gesunden Probanden durchgeführt, um als Vorversuch für die Untersuchung der Monozytenmigration bei nierenkranken Patienten zu gelten. Hierbei diente RPMI als Serum-freies Medium und MCP-1 wurde aus Kostengründen

durch FCS ersetzt. Nach der Durchführung des Ficolls aus frischem antikoaguliertem Vollblut erfolgte die negative Isolierung der Monozyten mittels Pan Monocyte Isolation Kit von Miltenyi. Im Experiment 1 schloss sich eine Inkubation mit 0,5% Serum für 16 Stunden bei 37°C an. Nachfolgend wurde die Zellzahl durchflusszytometrisch bestimmt und jeweils 400000 Monozyten pro oberes Well mit einer Vitalität von 89% eingesät. In den unteren Wells wurden jeweils reines RPMI (Negativkontrolle), RPMI+10%FCS (Positivkontrolle), 10 nM C-Peptid, 1 nM C-Peptid oder 0,1 nM C-Peptid zugefügt. Die Porengröße der verwendeten Membran belief sich auf 8 µm. Nach einer Inkubation von 3 Stunden bei 37°C wurden jeweils 700 µl dem unteren Well entnommen, um diese mit dem Avitalitätsfarbstoff 7-AAD anzufärben und anschließend die Menge der vitalen Monozyten durchflusszytometrisch zu bestimmen.

Da wie unter 4.6.1 aufgeführt keine Migration der Monozyten außerhalb der Positivkontrolle erzielt werden konnte, mussten im Verlauf verschiedene Parameter des Versuchsaufbaus variiert werden. So wurde bei den Experimenten mit den Monozyten auf die Inkubation mit autologem 0,5% Serum für 16 Stunden bei 37°C verzichtet, die unterschiedlichen Filterporengrößen von anfänglich 3 µm bzw. 5 µm und abschließend 8 µm getestet und die Inkubationszeit der Monozyten mit den jeweiligen Testsubstanzen zwischen 2 h und 20 h variiert. Die Versuche wurden sowohl mit dem C-Peptid von Biotrend als auch mit dem C-Peptid von antibodies-online GmbH durchgeführt, um eine fälschlicherweise fehlende Aktivität der Substanz auszuschließen. Am stärksten wurde die C-Peptid-Konzentration des unteren Wells abgeändert. Dementsprechend wurden neben den bereits genannten C-Peptid-Konzentrationen von 0,1 nM, 1 nM und 10 nM auch letztendlich Konzentrationen von 600 nM, 6000 nM und 60000 nM (jeweils Doppelwerte in Experiment 2) getestet. In diesem Versuchsaufbau erfolgte zudem keine Inkubation mit autologem Serum und die Inkubation des Migrationsassay dauerte 2 Stunden. In der Auswertung wurden zudem die Zellen in die Kategorien PBMCs, vitale PBMCs und Monozyten unterteilt. Ferner wurde ein Migrationsassay anstatt mit Monozyten eines gesunden Probanden nun mit erworbenen THP-1-Zellen durchgeführt. Grundlegend entstammen THP-1-Zellen einer Monozytenzelllinie eines einjährigen Patienten mit akuter myeloischer Leukämie und werden für Forschungszwecke in der Immunhistochemie genutzt. In diesem Experiment erfolgte die Inkubation dieser Zellen für 20 Stunden mit RPMI (Negativkontrolle), RPMI+10%FCS (Positivkontrolle) und C-Peptid-Konzentrationen mit dem C-Peptid der Firma Biotrend von 0,1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM und 1000 nM bei einer Filterporengröße von 8 µm. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Messung der THP-1-Zellen des jeweiligen unteren Wells.

3.2.9 Statistische Auswertung

Die Daten wurden mit Hilfe von SPSS 21.0 und Graph Pad Prism 5 ausgewertet. Zuerst erfolgte mit SPSS die Durchführung eines Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstests mit einer Stichprobe im Sinne eines nicht-parametrischen Tests, um die Ausprägungen jeder metrischen Variable auf eine Normalverteilung hin zu untersuchen. Im Falle einer Normalverteilung (bei $\alpha > 0,05$) schloss sich die einfaktorielle ANOVA als Varianzanalyse im SPSS an, bei der mit einem t-Test mehrere Gruppen gegeneinander auf einen Unterschied hin getestet werden. Es wurde dabei der Bonferroni-Test als Post-Hoc-Test gewählt. Bei nicht normalverteilten Variablen ($\alpha \leq 0,05$) fand die Varianzanalyse mit Graph Pad Prism 5 statt, mit dem ein Dunn's Multiple Comparison Test als Post-Hoc-Test gerechnet wurde. In beiden Fällen ergaben sich Mittelwerte der einzelnen Patientengruppe und Signifikanzen der Mehrfachvergleiche der Patientengruppen untereinander, wobei $* \leq 0,05$ und $** \leq 0,01$ und $*** \leq 0,001$ galt. Um weiterhin Korrelationen der Variablen untereinander zu bestimmen wurden die Pearson-Korrelation bei normalverteilten und die Spearman-Korrelation bei nicht normalverteilten Daten genutzt. Für kategoriale Variablen wurde hingegen der Chi-Square-Test genutzt.

4. Ergebnisse

4.1 Deskriptive Merkmale der Studienpopulation

In diese Studie zur Untersuchung von C-Peptid-Konzentrationen und assoziierten Entzündungen bei chronisch Nierenkranken wurden 79 Studienteilnehmer einbezogen. Sie mussten min. 18 Jahre alt sein und ihre Einwilligung zur Teilnahme erklärt haben. Ausgeschlossen wurden Patienten mit Malignomkrankung, Chemotherapie, immunsuppressiver Therapie, nach ärztlicher Einschätzung zu geringem Hb oder CRP > 50mg/dl wegen des Verdachts einer Infektion. Wie in Tabelle 12 ersichtlich konnten somit 25 Nierengesunde Patienten (Gruppe NG) als Kontrollgruppe, 13 Patienten mit aktueller Dialysebehandlung und Diabetes mellitus Typ 2 (Gruppe DDb), 21 Patienten mit aktueller Dialysebehandlung und ohne Diabetes (Gruppe D) und 20 Patienten mit CKD 3-4 mit und ohne Diabetes (Gruppe CKD) akquiriert werden. Es erklärten sich Patienten des Kuratoriums für Dialyse und Nierentransplantation e.V. (KfH) für eine Teilnahme in den Gruppen DDb (N=13) und D (N=21) bereit. In dessen nephrologischer Ambulanz nahmen weitere 9 Patienten mit CKD 3-4 teil, zudem konnten in der nephrologischen Ambulanz des Universitätsklinikums Halle (Saale) (UKH) 5 CKD-Patienten und 1 NG-Patient für die Studie gewonnen werden. Auf weiteren Stationen des UKH partizipierten jeweils die folgende Anzahl an Nierengesunden und CKD-Patienten: Station 3 (N(CKD) = 1), Station 5 (N(NG) = 1), Station 7 (N(NG) = 1, N(CKD) = 3) und internistische Kurzliegerstation (IKL) (N(NG) = 22, N(CKD) = 2).

Tabelle 12: Anzahl der Patienten pro Gruppe, aufgeteilt nach Ort der Rekrutierung

	NG	DDb	D	CKD	Σ
KfH ambulante Hämodialyse	0	13	21	0	34
KfH nephrologische Ambulanz	0	0	0	9	9
UKH nephrologische Ambulanz	1	0	0	5	6
UKH Station 3	0	0	0	1	1
UKH Station 5	1	0	0	0	1
UKH Station 7	1	0	0	3	4
UKH IKL	22	0	0	2	24
Σ	25	13	21	20	79

4. Ergebnisse

Tabelle 13: Mittelwert \pm SD von deskriptiven Daten und Laborwerten je Gruppe, zusätzlich Signifikanzen der Varianzanalyse

	NG (N=25)	DDb (N=13)	D (N=21)	CKD (N=20)	ANOVA					
					NG vs. DDb	NG vs. D	NG vs. CKD	DDb vs. D	DDb vs. CKD	D vs. CKD
Alter (Jahre)	58,0 \pm 14,0	69,5 \pm 11,0	66,8 \pm 11,4	75,3 \pm 10,2	0,430	0,100	<0,001	1,000	1,000	0,166
Geschlecht (%f)	52,0	61,5	38,0	60,0	p=0,455					
BMI (kg/m²)	27,2 \pm 3,5	31,0 \pm 7,1	25,0 \pm 3,4	28,4 \pm 7,0	0,229	1,000	1,000	0,012	1,000	0,264
eGFR (ml/min)	93,5 \pm 14,5	8,8 \pm 5,5	6,3 \pm 2,0	35,0 \pm 12,8	0,001^a	0,001^a	0,01^a	ns ^a	0,05^a	0,001^a
Kreatinin (μmol/l)	71,0 \pm 12,9	647,8 \pm 285,6	770,8 \pm 194,5	171,3 \pm 65,1	0,001^a	0,001^a	0,01^a	ns ^a	0,05^a	0,001^a
Harnstoff (mmol/l)	4,8 \pm 0,9	18,1 \pm 6,5	20,5 \pm 4,0	12,6 \pm 7,7	0,001^a	0,001^a	0,01^a	ns ^a	ns ^a	0,05^a
Calcium (mmol/l)	2,4 \pm 0,07	2,2 \pm 0,1	2,3 \pm 0,2	2,3 \pm 0,3	0,006	0,072	0,129	1,000	1,000	1,000
Phosphat (mmol/l)	1,1 \pm 0,03	1,5 \pm 0,4	1,6 \pm 0,4	1,2 \pm 0,3	0,365	0,165	1,000	1,000	0,142	0,230
Glukose (mmol/l)	5,4 \pm 0,7	8,5 \pm 3,0	6,8 \pm 2,0	5,9 \pm 1,6	0,001^a	0,05^a	ns ^a	ns ^a	0,01^a	ns ^a
HbA1c (%)	5,4 \pm 0,3	6,5 \pm 1,7	5,5 \pm 0,7	6,1 \pm 1,3	0,05^a	ns ^a	ns ^a	ns ^a	ns ^a	ns ^a
Hb (mmol/l)	8,7 \pm 0,6	6,7 \pm 0,7	7,0 \pm 0,6	7,8 \pm 0,9	<0,001	<0,001	<0,001	1,000	<0,001	0,006
CRP (mg/l)	2,5 \pm 2,4	6,8 \pm 6,7	10,2 \pm 10,0	9,9 \pm 11,4	ns ^a	0,05^a	0,05^a	ns ^a	ns ^a	ns ^a
Leukozyten (Gpt/l)	7,4 \pm 1,8	7,2 \pm 2,0	6,5 \pm 2,1	7,0 \pm 2,0	1,000	0,765	1,000	1,000	1,000	1,000

a=Dunn's Multiple Comparison Test mit GraphPad Prism, da nicht normal verteilte Daten

fett=statistisch signifikant

Die Tabelle 13 gibt sowohl einen Überblick über die Mittelwerte jeder einzelnen Gruppe bezüglich Alter, Geschlechterverteilung, BMI und Laborwerte als auch über deren Vergleich mittels ANOVA und Dunn's Multiple Comparison Test. Demnach waren Nierengesunde in dieser Untersuchung durchschnittlich 58,0 Jahre alt, Patienten der Gruppe DDb mit 69,5 Jahren etwa so alt wie die der Gruppe D mit 66,8 Jahren und lediglich die CKD-Gruppe wies ein Durchschnittsalter von 75,3 Jahren auf. Laut Varianzanalyse bestand hierbei jedoch kein signifikanter Unterschied, allein die CKD-Gruppe war signifikant älter als die NG-Gruppe ($p < 0,001$). Die Geschlechter waren über beide Gruppen ohne signifikante Unterschiede ($p = 0,455$) gleichmäßig verteilt. Mit einem durchschnittlichen BMI von $27,2 \text{ kg/m}^2$ bei NG, von $25,0 \text{ kg/m}^2$ bei D und $28,4 \text{ kg/m}^2$ bei CKD galten die Patienten dieser Gruppen als präadipös. Patienten der Gruppe DDb wurde mit einem durchschnittlichen BMI von $31,0 \text{ kg/m}^2$ bereits eine Adipositas Grad I zugeordnet, allerdings zeigte sich nur im Vergleich der Gruppen DDb und D ein statistisch signifikanter Unterschied ($p = 0,012$).

Wie erwartet drückten sich die Unterschiede der Nierenfunktion jeder Gruppe in der signifikanten Erhöhung der Nierenretentionsparameter aus. Im Gruppenvergleich ergaben sich somit Divergenzen bezüglich eGFR, Kreatinin und Harnstoff, lediglich der Vergleich der beiden Dialyse-Gruppen DDb und D blieb statistisch nicht signifikant. Ein ebenfalls signifikant erwarteter Unterschied in der Calciumkonzentration wurde nur in der Gegenüberstellung von NG mit einem Wert von $2,4 \text{ mmol/l}$ und DDb mit $2,2 \text{ mmol/l}$ deutlich ($p = 0,006$). Des Weiteren ergaben sich keine signifikant unterschiedlichen Phosphatwerte. Durch die partielle Einteilung der Patienten anhand der Diagnose Diabetes entstanden zusätzliche Unterschiede in den Stoffwechselparametern Glukose und HbA1c. Nierengesunde besaßen einen signifikant geringeren Glukosewert als Patienten der Gruppe DDb ($p = 0,001^a$) und D ($p = 0,05^a$), außerdem wiesen Dialysepatienten mit Diabetes einen signifikant höheren Glukosewert als CKD-Patienten ($p = 0,01^a$) auf. Bezüglich ihres HbA1c-Wertes unterschieden sich nur NG mit einem HbA1c von $5,4\%$ von DDb mit $6,5\%$ signifikant ($p = 0,05^a$). Darüber hinaus gab es insgesamt keine Differenzen in den Werten der Leukozyten aller Gruppen, allerdings lag ein signifikant geringerer CRP bei NG im Vergleich zu DDb ($p = 0,05^a$) und zu CKD ($p = 0,05^a$) vor. Schließlich existierten signifikante Unterschiede bei Hb. So fiel dieser Wert bei NG signifikant höher aus als bei allen drei anderen Gruppen (jeweils $p < 0,001$). Zusätzlich wies die CKD-Gruppe einen signifikant höheren Hb als die DDb-Gruppe ($p < 0,001$) und als die D-Gruppe ($p = 0,006$) auf. Lediglich die Gruppen DDb und D zeigten bei Betrachtung des Hb-Wertes keinen statistisch signifikanten Unterschied auf ($p = 1,000$).

4.1.1 Art und Häufigkeit von Nierenerkrankungen in jeder Gruppe

Tabelle 14: absolute Häufigkeiten der Nierenerkrankungen je Gruppe

	NG (N=25)	DDb (N=13)	D (N=21)	CKD (N=20)
Keine Nierenerkrankung	25	0	0	0
Diabetische Nephropathie	0	12	0	1
Chronische Glomerulonephritis, RPGN	0	0	2	0
Interstitielle Nephritis	0	0	2	0
Harnstauungsniere, Harnabflussstö- rung, Hydronephrose, Pyelonephritis	0	0	1	0
Hypertensive Nephropathie, vaskuläre Nephropathie, Nephrosklerose, CNI Nephropathie	0	0	8	14
Zystennieren, ADPKD, polyzystische Nieren	0	1	2	0
Schrumpfnieren	0	0	1	1
Neurogene Blasenentleerungsstörung, Nierentrauma, Tumoren	0	0	0	1
Autoimmune Genese: IgA- Nephropathie, Alport-Syndrom, TTP, Wegener-Granulomatose, Lupus- Antikörper, MPO Vaskulitis	0	0	3	0
MODS, Sepsis	0	0	2	0
Unbekannt, nicht näher klassifiziert	0	0	0	3

Die Klassifikation der Nierenerkrankungen erfolgte anhand von 12 unterschiedlichen Kategorien, die von Prof. Dr. med. Matthias Girndt (Direktor der Universitätsklinik und Poliklinik II für Endokrinologie/Diabetologie, Nephrologie und Rheumatologie in Halle (Saale)) bereits für frühere Studien der dazugehörigen Forschungsgruppe unter der Leitung des Labors von Dr. Christof Ulrich definiert wurden. In Tabelle 14 sind die absoluten Häufigkeiten sämtlicher einzelnen Kategorien für jede einzelne Patientengruppe aufgeführt. Per definitionem war bei niemandem der NG-Gruppe mit N=25 eine Nierenerkrankung festzustellen. In der Gruppe der diabetischen Dialysepatienten (N=13) litten 12 Patienten an einer diabetischen Nephropathie und bei 1 weiteren wurde eine polyzystische Nieren- und Leberdegeneration (ADPKD Potter III) hauptsächlich angeführt. Die Gruppe der nichtdiabetischen Dialysepatienten (N=21) wies

weitaus mehr Ursachen für eine eingeschränkte Nierenfunktion auf. Dabei bestand die größte Gruppe aus 8 Patienten, von denen 7 an einer hypertensiven oder vaskulären Nephropathie und 1 weiterer an einer Nephrosklerose erkrankt waren. Jeweils 2 weitere litten an einer chronischen Glomerulonephritis, interstitiellen Nephritis oder polyzystischen Nieren- und Leberdegeneration (ADPKD Potter III). Eine autoimmune Genese lag bei 3 Patienten vor, hiervon wurde zwei Patienten die IgA-Nephropathie und einem weiteren die TTP unklarer Genese zugeordnet. Die verbliebenen Patienten dieser Gruppe wiesen die Diagnosen Z.n. MODS oder Sepsis (N=2), Harnabflussstörung (N=1) und eine Schrumpfniere unklarer Genese (N=1) auf. Die Gruppe der Patienten mit CKD3-4 (N=20) bestand sowohl aus Diabetikern als auch aus Nichtdiabetikern. Obwohl bei 30% die Diagnose eines Diabetes gestellt wurde, galt die diabetische Nephropathie nur bei 1 Patienten als Hauptursache der herab gesetzten Nierenfunktion. Bei dem Großteil (N=14) wurde die hypertensive oder vaskuläre Nephropathie für die chronische Nierenerkrankung verantwortlich gemacht. Des Weiteren blieb bei 3 weiteren Patienten dieser Gruppe die Ursache unklar bzw. wurde ärztlicherseits nicht näher klassifiziert. Die Gruppe der CKD-Patienten wurde durch 1 Patienten mit Schrumpfnieren unklarer Genese und durch 1 Patienten mit Z.n. Urothelkarzinom der Blase inkl. Nephroureterektomie links komplettiert.

4.1.2 Gruppenvergleich einiger kardiovaskulärer Risikofaktoren und Diagnosen

Neben den bereits erwähnten, unveränderlichen Risikofaktoren wie Alter und Geschlecht existieren weitere variable kardiovaskuläre Risikofaktoren, von denen einige in dieser Studie erhoben worden sind. Zusammen mit relevanten kardiovaskulären Erkrankungen sind sie in ihrer prozentualen Häufigkeit innerhalb jeder Gruppe in der Tabelle 15 aufgeführt.

Der prozentuale Anteil von Nichtrauchern an den vier Gruppen unterschied sich signifikant ($p=0,047$). Einerseits rauchte die Mehrheit der Gruppen der diabetischen Dialysepatienten (69,2%) und der CKD-Patienten (55,0%) nicht. Andererseits bestanden die Gruppe der Nierengesunden aus 40% und die Gruppe der nichtdiabetischen Dialysepatienten lediglich aus 23,8% Nichtrauchern. Hier überwog demnach der Anteil der Ever-Smoker und den beiden Gruppen konnte damit der kardiovaskuläre Risikofaktor Rauchen zugeordnet werden. Weiterhin wies ein signifikant geringerer Anteil an Nierengesunden eine arterielle Hypertonie auf als nierenkranke Patienten der anderen Gruppen ($p=0,036$). Dieser signifikante Unterschied lag vor, obwohl die Klientel der NG-Gruppe größtenteils der IKL-Station entstammte, auf der u.a. mit Begleitdiagnosen wie einer häufig vorliegenden arteriellen Hypertonie (72,0%) zu rechnen war. Des Weiteren unterschieden sich die vier Gruppen hinsichtlich des Risikofaktors Diabetes mellitus Typ 2 statistisch hoch signifikant ($p<0,001$), schließlich erfolgte eine Zuteilung der Probanden zu der jeweiligen Gruppen anhand dieser Erkrankung. Allein für die CKD-Gruppe war dies unerheb-

lich, sodass sich ihr Anteil an Diabetikern letztlich auf 30,0% belief. Unter 4.1.2.1 werden deshalb dieselben Risikofaktoren und Diagnosen dieser CKD-Gruppe in Abhängigkeit vom Diabetes differenziert betrachtet. Die prozentualen Verteilungen einiger wichtiger kardiovaskulärer Risikofaktoren innerhalb der Gruppen werden inklusive ihrer statistischen Signifikanzen in Abbildung 5 verdeutlicht.

Tabelle 15: Raucherstatus und Diagnosen der Gruppen, in Prozent und absoluter Häufigkeit

	NG (N=25)	DDb (N=13)	D (N=21)	CKD (N=20)	p-Wert
Nichtraucher, % (N)	40,0 (10)	69,2 (9)	23,8 (5)	55,0 (11)	0,047
Ever-Smoker, % (N)	60,0 (15)	30,8 (4)	76,2 (16)	45,0 (9)	
Arterielle Hypertonie, % (N)	72,0 (18)	100,0 (13)	95,2 (20)	90,0 (18)	0,036
Diabetes, % (N)	0,0 (0)	100,0 (13)	0,0 (0)	30,0 (6)	<0,001
Gefäßverschluss allg., % (N)	16,0 (4)	38,5 (5)	42,9 (9)	25,0 (5)	0,194
Myokardinfarkt, % (N)	8,0 (2)	23,1 (3)	14,3 (3)	5,0 (1)	0,387
Schlaganfall, % (N)	0,0 (0)	7,7 (1)	4,8 (1)	5,0 (1)	0,729
pAVK, % (N)	4,0 (1)	7,7 (1)	4,8 (1)	15,0 (3)	0,520
LAE, % (N)	4,0 (1)	15,4 (2)	9,5 (2)	0,0 (0)	0,291
Thrombose, % (N)	4,0 (1)	30,8 (4)	14,3 (3)	0,0 (0)	0,021
KHK, % (N)	24,0 (6)	53,8 (7)	33,3 (7)	65,0 (13)	0,028
Koronarintervention, % (N)	8,0 (2)	46,2 (6)	33,3 (7)	45,0 (9)	0,023
Herzinsuffizienz, % (N)	16,0 (4)	30,8 (4)	23,8 (5)	45,0 (9)	0,343

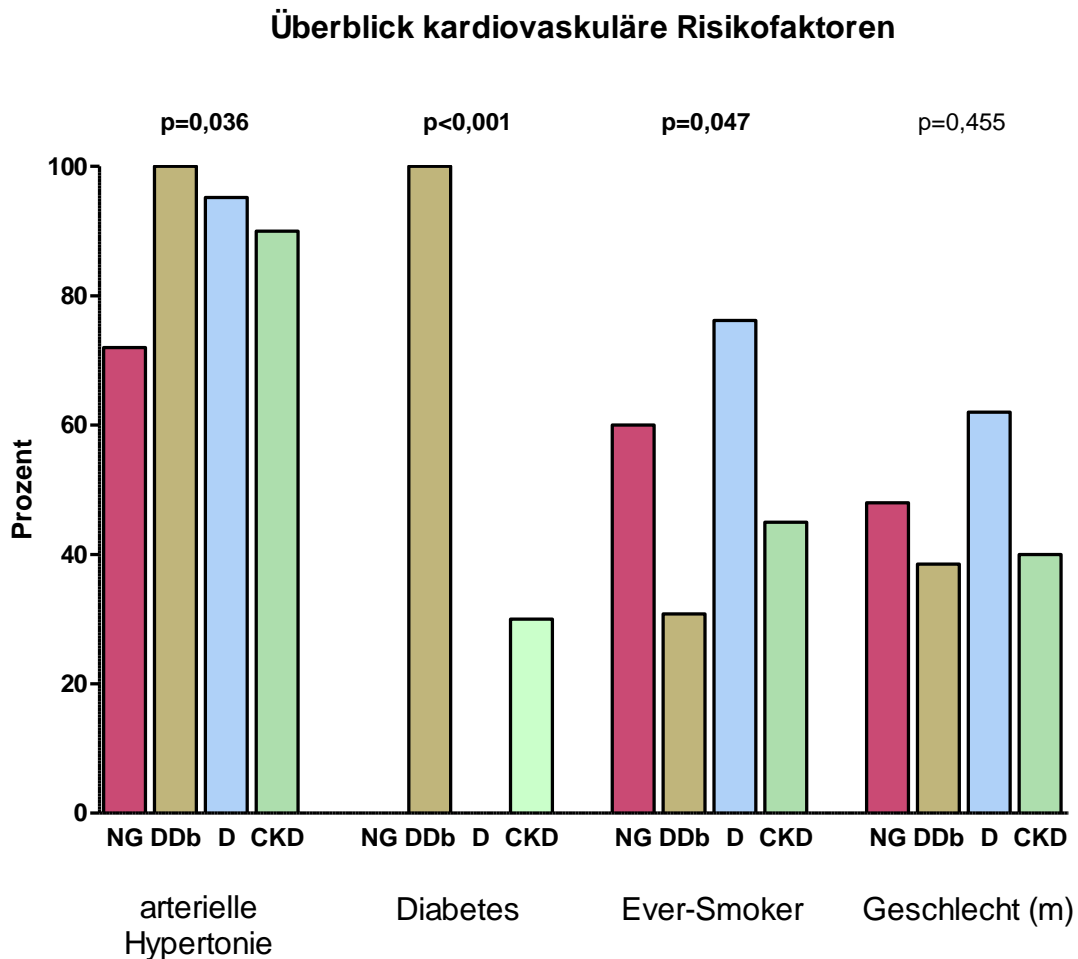


Abb. 5: Ausprägung einiger kardiovaskulärer Risikofaktoren je Gruppe und Signifikanzen

Es erfolgte eine zusätzliche Auswertung hinsichtlich kardiovaskulärer Ereignisse und Diagnosen (siehe ebenfalls Tabelle 15). Der Vergleich der vier Patientengruppen erbrachte keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich des einstigen Auftretens eines Myokardinfarkts ($p=0,387$), eines Schlaganfalls ($p=0,729$), einer pAVK ($p=0,520$) oder einer LAE ($p=0,291$). Lediglich in der Häufigkeit einer Thrombose zeigte sich ein signifikanter Unterschied ($p=0,021$). Dabei litten signifikant mehr Patienten der Gruppen DDb (30,8%) und D (14,3%) an einer Thrombose als diejenigen der Gruppen NG (4,0%) und CKD (0,0%). Zusätzlich wurde bei der Erhebung der Parameter „Gefäßverschluss allgemein“ geschaffen, um einen Überblick zu erhalten, ob dem einzelnen Patienten überhaupt mindestens eine der Diagnosen Myokardinfarkt, Schlaganfall, pAVK, LAE oder Thrombose zugeschrieben werden konnte. Auch hier zeigten sich in der Auswertung keine signifikant unterschiedlichen Verteilungen zwischen den Gruppen ($p=0,194$). Es schließt sich die Auswertung weiterer Faktoren an, die das System der Koronargefäße betreffen. Die Diagnose der KHK war bei CKD-Patienten mit 65,0% und diabetischen Dialysepatienten mit 53,8% signifikant häufiger vertreten als bei nichtdiabetischen Dialysepatienten mit 33,3% und Nierengesunden mit 24,0% ($p=0,028$). Eine Analyse der Gruppen hinsichtlich einer stattgefundenen Koronarintervention ergab einen signifikant geringeren Anteil in der

Gruppe der Nierengesunden im Vergleich zu den restlichen Gruppen ($p=0,023$). Schließlich wurde der Faktor Herzinsuffizienz betrachtet, deren zwei häufigen Ursachen, die arterielle Hypertonie und die KHK, in den nierenkranken Gruppen signifikant erhöht waren wie bereits erörtert (mit Ausnahme der KHK bei CKD-Patienten). Allerdings wiesen die Gruppen keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Herzinsuffizienz auf ($p=0,343$). Die Abbildung 6 zeigt die prozentuale Häufigkeit der jeweiligen Patientengruppe von einigen ausgewählten Erkrankungen inklusive ihrer statistischen Signifikanz im Gruppenvergleich.

Überblick kardiovaskuläre Pathologien

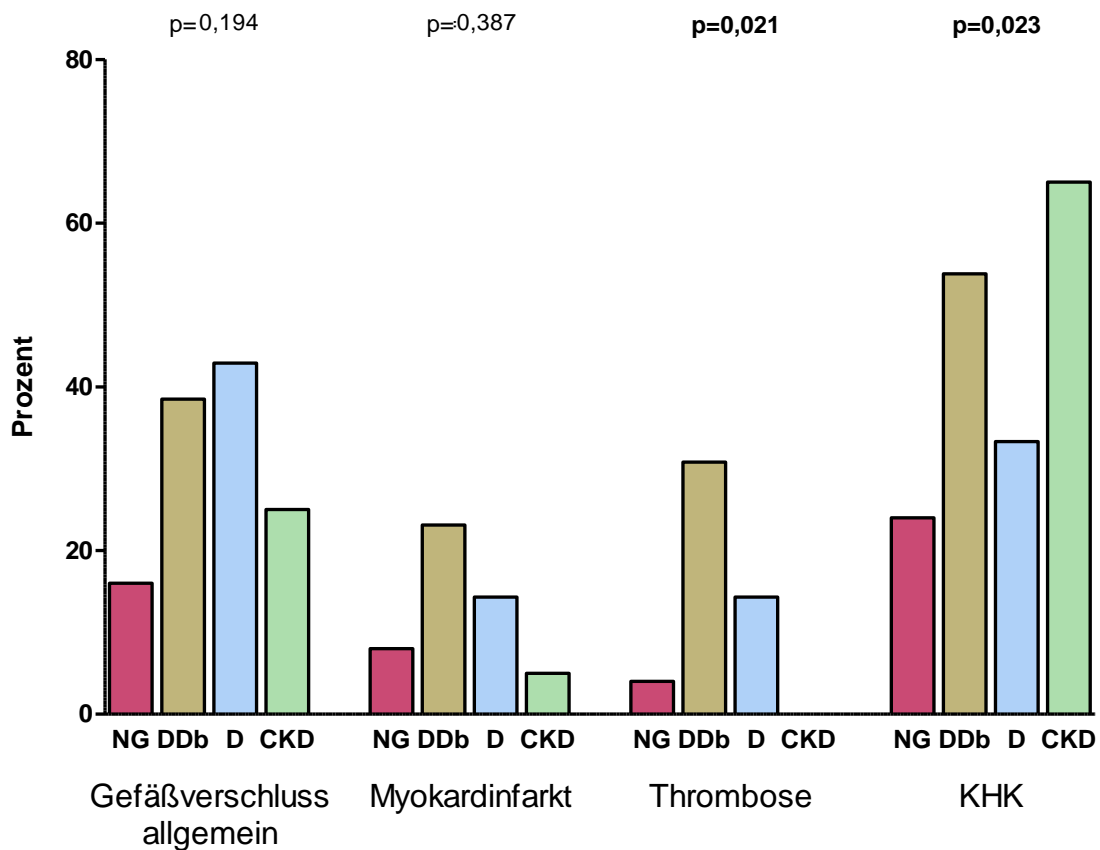


Abb. 6: Ausprägung einiger kardiovaskulärer Pathologien je Gruppe inkl. Signifikanzen

4.1.2.1 Unterteilung der Gruppe CKD3-4 hinsichtlich einer Erkrankung an Diabetes mellitus Typ2 und kardiovaskulären Diagnosen

Angelehnt an das Kapitel 4.1.2 sind im Folgenden erneut der Raucherstatus und die kardiovaskulären Diagnosen aufgeführt, jedoch dient hier nun lediglich die Gruppe CKD als Kollektiv. Zusätzlich wird es in die Gruppen „CKD 3-4 ohne Diabetes“ mit $N=14$ und „CKD mit Diabetes“ mit $N=6$ aufgeteilt, um anschließend die relative Verteilung der Nichtraucher und der relevanten Diagnosen erneut zu betrachten. Wie in Tabelle 16 ersichtlich besteht bei keinem der

Parameter ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit CKD3-4 mit und ohne Diabetes, da stets $p > 0,05$. In diesem Stadium der Niereninsuffizienz liegt kein unterschiedliches kardiovaskuläres Profil in den Untergruppen vor. Demnach bestätigt diese Analyse das Design der durchgeführten Studie, in der CKD3-4 Patienten eine eigene Gruppe darstellten, unabhängig davon ob sie an Diabetes erkrankt waren oder nicht.

Tabelle 16: Raucherstatus und kardiovaskuläre Diagnosen der diabetischen und nichtdiabetischen Pat. der Gruppe CKD 3-4 und deren Signifikanzen

	CKD 3-4 ohne Diabetes (N=14)	CKD 3-4 mit Diabetes (N=6)	p-Wert
Nichtraucher, % (N)	57,1 (8)	50,0 (3)	0,769
Ever-Smoker, % (N)	42,9 (6)	50,0 (3)	
Arterielle Hypertonie, % (N)	85,7 (12)	100,0 (6)	0,329
Gefäßverschluss allg., % (N)	21,4 (3)	33,3 (2)	0,573
Myokardinfarkt, % (N)	0,0 (0)	16,7 (1)	0,117
Schlaganfall, % (N)	14,3 (2)	0,0 (0)	0,621
pAVK, % (N)	14,3 (2)	16,7 (1)	0,891
LAE, % (N)	0,0 (0)	0,0 (0)	-
Thrombose, % (N)	0,0 (0)	0,0 (0)	-
KHK, % (N)	57,1 (8)	83,3 (5)	0,260
Koronarintervention, % (N)	42,9 (6)	50,0 (3)	0,769
Herzinsuffizienz, % (N)	50,0 (7)	33,3 (2)	0,492

4.1.3 Gruppenvergleich der Medikationen

Die Wirkstoffe der Medikamente wurden in insgesamt 41 Kategorien eingeteilt, von denen in der Tabelle 17 nur die kardiovaskulär relevanten aufgeführt wurden. Tabellarisch bleiben die für diese Studie als irrelevant eingestuft und gleichzeitig statistisch nicht signifikanten Medikamentengruppen wie z.B. Laxantien, Benzodiazepine und Antikonvulsiva unerwähnt. Die Patientengruppen weisen in den restlichen 21 Arzneimittelgruppen nur wenige signifikante Unterschiede auf. So nimmt im Vergleich zu Nierenkranken ein signifikant geringerer Anteil an Nierengesunden ein Diuretikum ein ($p < 0,001$). Des Weiteren nehmen CKD-Patienten mit 30,0% signifikant am häufigsten und Nierengesunde mit 0,0% signifikant am seltensten einen α_2 -Antagonisten zu sich ($p = 0,039$). Aufgrund der unterschiedlichen Häufigkeit der Diabetiker in den Patientengruppen weist die Gruppe DDb wie erwartet den größten Anteil von Patienten mit

einer Insulintherapie auf (92,3%), gefolgt von der CKD-Gruppe (20,0%). Es besteht ein statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zu den nichtdiabetischen Dialysepatienten und den nichtdiabetischen Nierengesunden ($p < 0,001$). Zudem bestehen Differenzen zwischen den Gruppen bezüglich der Antikoagulantien. Patienten der DDb-Gruppe sind zu 46,2% mit Heparin antikoaguliert, hingegen weisen die Gruppen D (9,5%), CKD (10,0%) und NG (0,0%) einen geringeren Anteil auf ($p = 0,001$). Ähnlich verhält es sich mit der Betrachtung der Verordnung von Vitamin-K-Antagonisten. Hier weisen jedoch CKD-Patienten mit 30,0% den signifikant höchsten Anteil auf ($p = 0,003$). Da bei einer Verschlechterung der Nierenfunktion u.a. die Harnsäure ansteigt, erscheint deren Eliminierung sinnvoll. Dies kann sowohl durch eine Dialyse als auch durch den Einsatz eines Urikostatikums geschehen. Demnach erklärt sich der signifikant höhere Anteil der CKD-Patienten von 40,0%, die ein Urikostatikum einnehmen ($p = 0,004$).

Tabelle 17: Medikation der einzelnen Gruppen, in Prozent und absolut, und Signifikanzen

	NG (N=25)	DDb (N=13)	D (N=21)	CKD (N=20)	p-Wert
Beta-Blocker	76,0 (19)	69,2 (9)	85,7 (18)	90,0 (18)	0,402
ACE-Hemmer	8,0 (2)	30,8 (4)	28,6 (6)	30,0 (6)	0,206
AT₁-Rezeptor-Antagonist	36,0 (9)	30,8 (4)	47,6 (10)	50,0 (10)	0,606
ACE-Hemmer/ AT₁-Rezeptor-Antagonist	44,0 (11)	61,5 (8)	76,2 (16)	80,0 (16)	0,082
Calcium-Antagonist	28,0 (7)	38,5 (5)	42,9 (9)	45,0 (9)	0,639
Diuretikum	16,0 (4)	61,5 (8)	47,6 (10)	80,0 (16)	<0,001
α_2-Antagonist	0,0 (0)	15,4 (2)	14,3 (3)	30,0 (6)	0,039
Nitrate/NO-Donator	0,0 (0)	23,1 (3)	14,3 (3)	15,0 (3)	0,144
α_1-Antagonist	4,0 (1)	15,4 (2)	14,3 (3)	5,0 (1)	0,466
Insulin	0,0 (0)	92,3 (12)	0,0 (0)	20,0 (4)	<0,001
Orales Antidiabetikum	0,0 (0)	15,4 (2)	9,5 (2)	15,0 (3)	0,255
Heparin	0,0 (0)	46,2 (6)	9,5 (2)	10,0 (2)	0,001
Vitamin-K-Antagonist	0,0 (0)	15,4 (2)	0,0 (0)	30,0 (6)	0,003
ASS	48,0 (12)	69,2 (9)	38,1 (8)	45,0 (9)	0,355
ADP-Rezeptor-Antagonist	20,0 (5)	7,7 (1)	9,5 (2)	10,0 (2)	0,610
Glucocorticoid	0,0 (0)	0,0 (0)	4,8 (1)	0,0 (0)	0,424
Statin	36,0 (9)	46,2 (6)	42,9 (9)	65,0 (13)	0,265
Urikostatikum	4,0 (1)	7,7 (1)	9,5 (2)	40,0 (8)	0,004

4.2 C-Peptid-Konzentration bei Nierengesunden und Nierenkranken

Die erste Übersicht diente der Gegenüberstellung der C-Peptid-Konzentrationen von nichtdiabetischen Nierengesunden („NG“ mit N=25) und Nierenkranken in verschiedenen Stadien der Niereninsuffizienz. Dafür erfolgte die Einteilung der Nierenkranken in „Dialyse total“ (N=34) mit jeglichen Dialysepatienten und in „CKD total“ (N=20) mit jeglichen Patienten mit CKD 3-4, jeweils unabhängig des Diabetes mellitus Typ 2. Die mittleren C-Peptid-Konzentrationen der Dialysepatienten ($2546,0 \pm 1106,0$ pmol/l) und der Patienten mit CKD 3-4 ($1832,0 \pm 886,1$ pmol/l) unterschieden sich nicht signifikant. Es sei darauf hingewiesen, dass der Mittelwert der Dialysepatienten zwar höher als derjenige der Patienten mit CKD 3-4 war, jedoch durch die große Streuung keine Signifikanz im Vergleich der C-Peptid-Konzentrationen existierte. Allerdings lagen signifikante Unterschiede zwischen den C-Peptid-Konzentrationen dieser beiden Gruppen der Nierenkranken und derjenigen der Nierengesunden ($\bar{x}=833,3 \pm 347,1$ pmol/l) vor. In der nachfolgenden Abb. 7 werden durch den Boxplot der Median, jeweils die 25. und 75. Perzentile und den Minimum- und Maximumwert für diese drei Patientengruppen demonstriert.

Im Gegensatz zu den normalverteilten C-Peptid-Konzentrationen in der Gruppe „CKD total“ bot die Gruppe „Dialyse total“ in diesem Vergleich nicht normalverteilte Werte dar. Es erfolgte eine weitere Analyse mit Aufteilung dieser Gruppe in diabetische Dialysepatienten (N(DDb)=13) und nichtdiabetische Dialysepatienten (N(D)=21) (vgl. Abb. 8). Hierbei unterschieden sich die Werte der Nierengesunden ($\bar{x}=833,3$ pmol/l) signifikant von allen nierenkranken Patientengruppen (DDb: $2156,0 \pm 1433,1$ pmol/l; D: $2787,8 \pm 792,0$ pmol/l; CKD total: $1832,5 \pm 886,1$ pmol/l). Weiterhin gab es keine signifikanten Unterschiede in der C-Peptid-Konzentration sowohl zwischen den diabetischen und nichtdiabetischen Dialysepatienten als auch zwischen den Patienten mit CKD 3-4 und den beiden Dialysegruppen. Somit unterschied sich die C-Peptid-Konzentration von Nierenkranken nicht signifikant voneinander. Erneut fiel die gewisse Graduierung der Mittelwerte sowohl von Patienten mit CKD 3-4 zu Dialysepatienten als auch von diabetischen Dialysepatienten zu nichtdiabetischen Dialysepatienten auf, die in dem vorliegenden Kollektiv jedoch wegen der hohen Standardabweichungen nicht signifikant unterschiedlich waren.

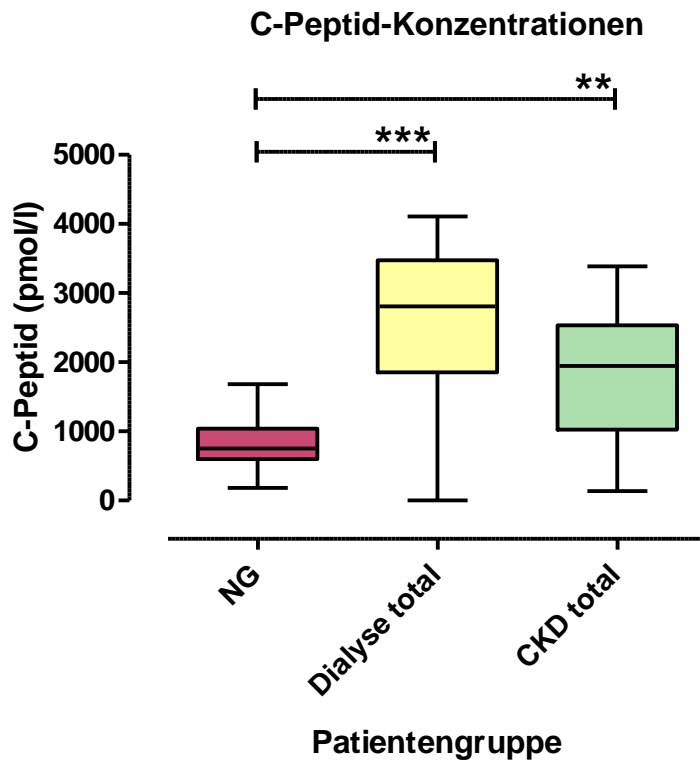


Abb. 7: C-Peptid-Konzentration von Nierengesunden (NG), jeglichen Dialysepatienten (Dialyse total) und jeglichen Patienten mit CKD 3-4 (CKD total)

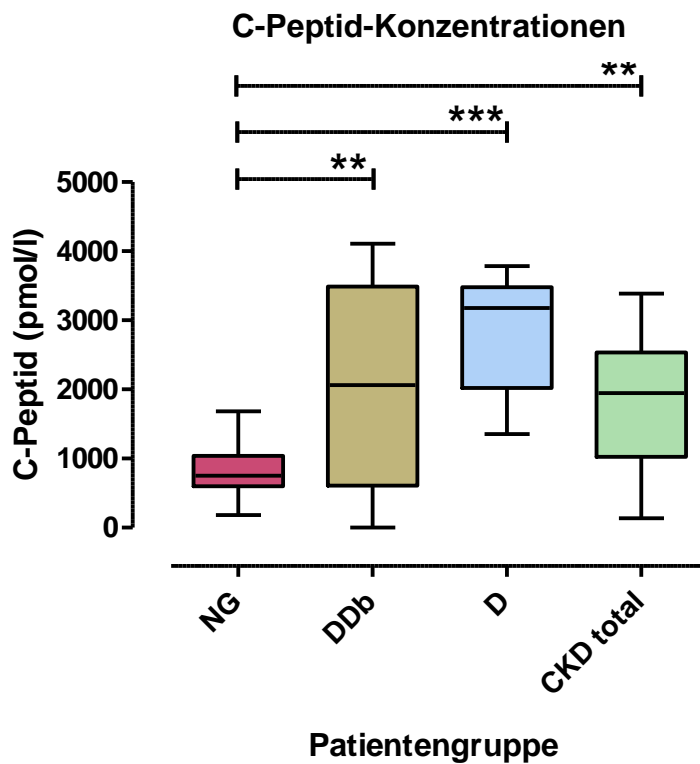


Abb. 8: C-Peptid-Konzentration von Nierengesunden (NG), diabetischen Dialysepatienten (DDb), nichtdiabetischen Dialysepatienten (D) und jeglichen Pat. mit CKD 3-4 (CKD total)

In einer dritten Analyse wurden weiterhin die C-Peptid-Konzentrationen aller Patienten mit CKD 3-4 hinsichtlich einer Erkrankung des Diabetes mellitus Typ 2 differenziert betrachtet (vgl. Abb. 9). Die diabetischen Patienten mit CKD 3-4 (CKDDb+: 1276,0±864,1 pmol/l mit N=6) unterschieden sich in ihrer mittleren C-Peptid-Konzentration nicht signifikant von den nichtdiabetischen Patienten mit CKD 3-4 (CKDDb- :2071,0±810,2 pmol/l mit N=14). Analog den Dialysepatienten sei auch hier trotz fehlender Signifikanz auf den höheren Mittelwert bei den nichtdiabetischen Patienten mit CKD 3-4 im Vergleich zu jenem der diabetischen Patienten mit CKD 3-4 inklusive der großen Streuungen hingewiesen. Im Vergleich zu Nierengesunden zeigte sich ein signifikanter Unterschied zu der C-Peptid-Konzentration der nichtdiabetischen Patienten mit CKD 3-4, allerdings nicht zu derjenigen der diabetischen Patienten mit CKD 3-4. Da die Werte in allen drei Gruppen normalverteilt waren und sich die Subgruppen der Patienten mit CKD 3-4 wie erwähnt nicht in ihrer mittleren C-Peptid-Konzentration signifikant unterschieden, wurden Patienten mit CKD 3-4 mit und ohne Diabetes in den Folgeexperimenten gesammelt als Gruppe „CKD“ betrachtet.

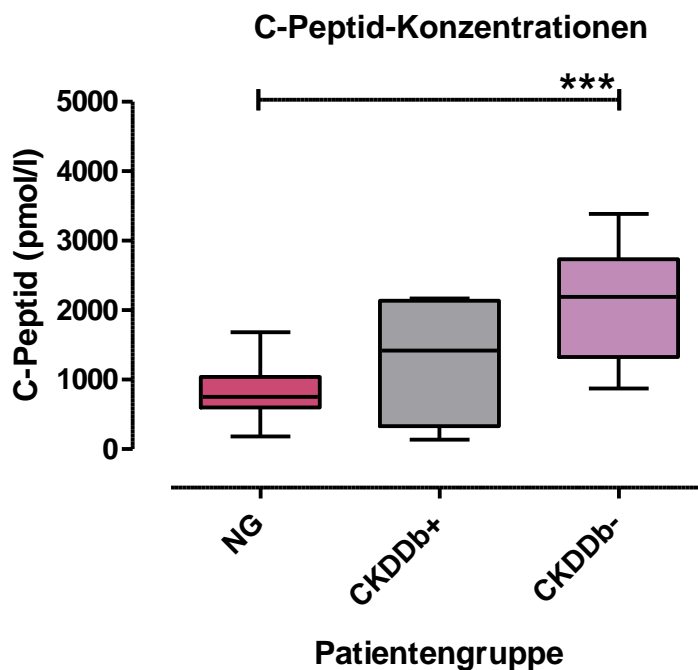


Abb. 9: C-Peptid-Konzentrationen von Nierengesunden (NG), diabetischen Patienten mit CKD 3-4 (CKDDb+) und nichtdiabetischen Patienten mit CKD 3-4 (CKDDb-)

4.3 Vergleich der immunophänologischen Ausprägungen in den Gruppen

4.3.1 Verifizierung der Leukozytenzahlmessung des Durchflusszytometers

Die Konzentration der Leukozyten wurde sowohl durch die Durchflusszytometrie als auch standardmäßig durch das Zentrallabor des UKH bestimmt. Da wie in 3.2.7 bereits erläutert bei einer Patientin stark unterschiedliche Werte in diesen beiden Messungen auffielen, soll in diesem Abschnitt die Verifikation der Messung des Durchflusszytometers erfolgen. Für diesen Zweck wurde die Korrelation dieser beiden Messungen bestimmt und in der Tabelle 18 dargestellt. Demnach besteht ein signifikanter linearer Zusammenhang ($r=0,724$ mit $p<0,001$) zwischen der Messung des Zentrallabors und derjenigen der Durchflusszytometrie. Folglich können die Leukozytenwerte des Durchflusszytometers als realistisch angesehen werden.

Tabelle 18: Korrelation der Leukozytenzahl des Zentrallabors des UKH und des MACSQuant

	Pearson-Korrelationskoeffizient r	Signifikanz (2-seitig)	N
Leukozyten (Zentrallabor UKH) und Leukozyten (MACS QUANT)	0,724	<0,001	77

4.3.2 Betrachtung der Leukozytendifferenzierung und Monozytensubpopulationen inklusive deren Expression von CD11a, CD36 und CX3CR1 im Gruppenvergleich

Zu Beginn wurde die Verteilung einiger Leukozytengruppen in den vier Patientengruppen betrachtet (vgl. Tabelle 19 und Tabelle 20). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den prozentualen Anteilen der NK-Zellen (CD56⁺) und der Monozyten (CD14⁺). Der Anteil der B-Zellen (CD19⁺) war sowohl bei der NG-Gruppe als auch bei der CKD-Gruppe signifikant höher als bei der DDb- und der D-Gruppe (jeweils $p<0,001$). Diesbezüglich unterschieden sich die NG- und CKD-Gruppe ebenso wenig wie die DDb- und D-Gruppe (jeweils $p=1,000$). Zusätzlich wiesen Nierengesunde prozentual mehr T-Zellen (CD3⁺) als die beiden Dialysegruppen auf (jeweils $p<0,001$). Im Gruppenvergleich ergaben sich keine weiteren signifikanten Unterschiede bezüglich der prozentualen Verteilung der Leukozytenkategorien (vgl. Tabelle 20).

Tabelle 19: prozentuale Anteile von NK-Zellen (CD56⁺), B-Zellen (CD19⁺), T-Zellen (CD3⁺) und Monozyten (CD14⁺) in den Gruppen

	NG (N=25)	DDb (N=13)	D (N=20)	CKD (N=20)
%CD56anLeukos	2,2±1,8	2,5±0,6	3,1±1,6	2,4±1,6
%CD19anLeukos	7,2±3,6	2,3±2,5	1,8±1,2	6,6±3,1
%CD3anLeukos	22,0±6,8	12,0±4,9	13,2±5,7	17,0±7,9
%CD14anLeukos	7,2±2,3	7,2±1,9	6,6±1,9	8,1±2,1

Tabelle 20: Signifikanzen des Gruppenvergleichs der Leukozytenkategorien

	ANOVA					
	NG vs. DDb	NG vs. D	NG vs. CKD	DDb vs. D	DDb vs. CKD	D vs. CKD
%CD56anLeukos	1,000	0,403	1,000	1,000	1,000	1,000
%CD19anLeukos	<0,001	<0,001	1,000	1,000	<0,001	<0,001
%CD3anLeukos	<0,001	<0,001	0,078	1,000	0,206	0,425
%CD14anLeukos	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,176

Es folgt die differenzierte Betrachtung der einzelnen Monozytensubpopulationen Mo1, Mo2 und Mo3 im Gruppenvergleich. Die Gruppe Mo1 mit den „klassischen“ Monozyten (CD14⁺⁺CD16⁻) präsentierte sich am größten in der NG-Gruppe mit 80,4%, gefolgt von der CKD-Gruppe (75,7%), der D-Gruppe (68,2%) und DDb-Gruppe (67,5%). Wie in Abb. 10 dargestellt war in der statistischen Analyse jedoch lediglich der Mo1-Anteil bei der DDb-Gruppe (p=0,001) und bei der D-Gruppe (p<0,001) im Vergleich zu Nierengesunden signifikant erniedrigt. Jegliche andere Unterschiede erwiesen sich als statistisch nicht relevant.

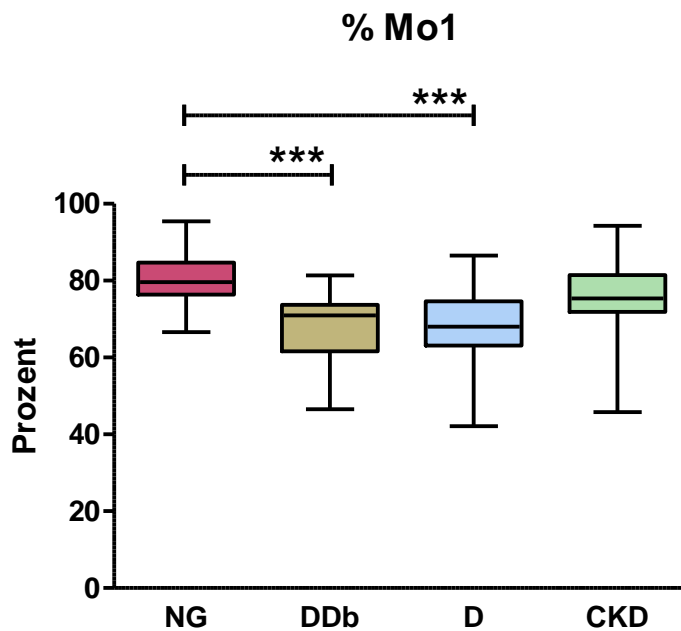


Abb. 10: Prozentualer Anteil von Mo1 im Gruppenvergleich inkl. statistischer Signifikanzen

Eine andere Aufteilung ergab die Betrachtung der Population Mo2 mit den proinflammatorischen, „intermediate“ CD14⁺⁺CD16⁺-Monozyten (siehe Abb. 11). Am stärksten war die Mo2-Gruppe bei den diabetischen Dialysepatienten (10,3%), leicht geringer bei den diabetischen Dialyse- und CKD-Patienten (jeweils 9,2%) und wie erwartet am geringsten bei den Nierengesunden (5,7%) ausgeprägt. Statistisch signifikant geringer war der Mo2-Anteil bei

Nierengesunden im Vergleich zu allen anderen drei Patientengruppen (jeweils $p < 0,001$). Die restlichen Gruppenanalysen ergaben keine weiteren Signifikanzen.

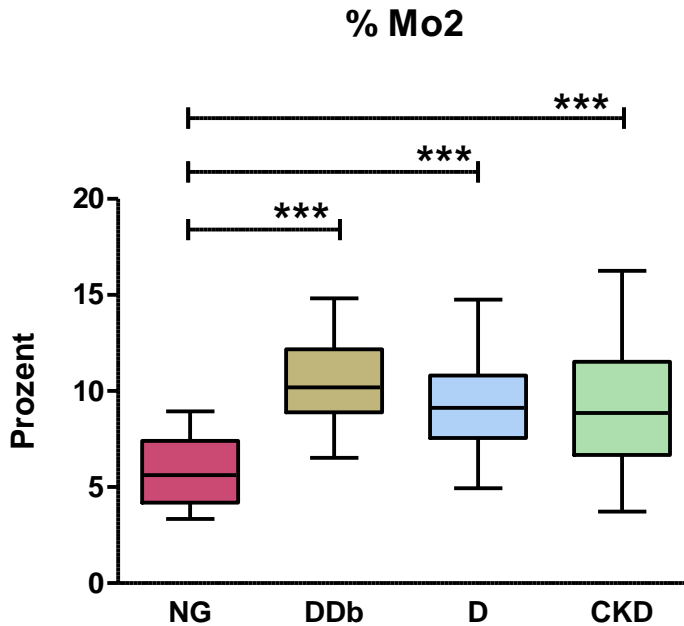


Abb. 11: Prozentualer Anteil von Mo2 im Gruppenvergleich inkl. statistischer Signifikanzen

Die aus den proinflammatorischen, nicht-klassischen Monozyten gebildete Subpopulation Mo3 war mit 22,6% am größten in der D-Gruppe und mit 22,2% annähernd so groß in der DDb-Gruppe (vgl. Abb. 12). Geringere Mo3-Anteile besaßen die CKD-Gruppe (15,1%) und letztlich die NG-Gruppe (14,0%). In der Varianzanalyse erzielten jedoch nur Nierengesunde signifikant geringere Werte als die DDb-Gruppe ($p=0,014$) und die D-Gruppe ($p=0,002$), zudem boten CKD-Patienten einen signifikant geringeren Mo3-Anteil als DDb-Patienten dar ($p=0,016$).

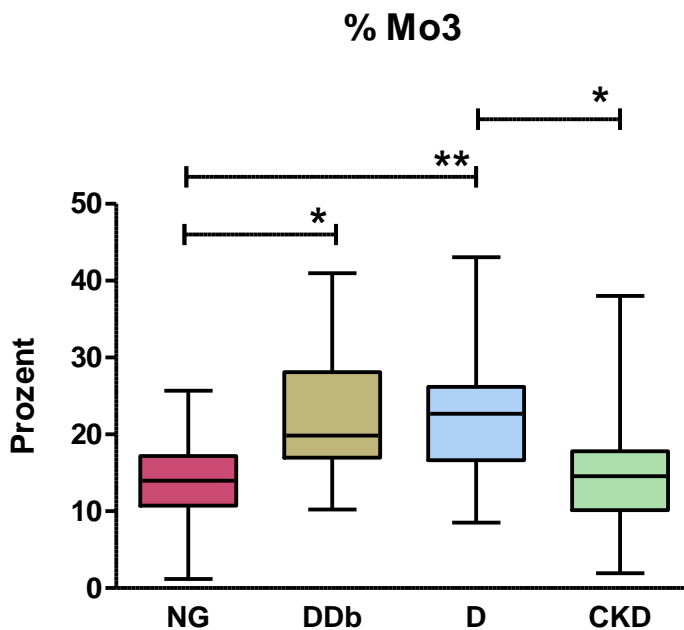


Abb. 12: Prozentualer Anteil von Mo3 im Gruppenvergleich inkl. statistischer Signifikanzen

Im Folgenden werden die Ausprägungen der Oberflächenproteine CD11a (ein Zelladhäsionsmolekül), CD36 (Scavenger-Rezeptor, Integrin u.a. für langkettige Fettsäuren und oxidiertes LDL) und CX3CR1 (Transmembranprotein für Migration) in den einzelnen Monozytensubpopulationen der Patientengruppen verglichen. Eine Übersicht der Häufigkeiten und der MFIs stellt die nachfolgende Tabelle 21 dar.

In den Patientengruppen war der Anteil der CD11a⁺-Monozyten in den Populationen Mo1-3 nicht signifikant unterschiedlich, außer dass diabetische Dialysepatienten signifikant mehr CD11a⁺-Monozyten in der Mo3-Gruppe demonstrierten als Nierengesunde ($p=0,05^a$). Es zeigten sich weiterhin signifikante Unterschiede zwischen den vier Patientengruppen in der Expressionsdichte von CD11a auf Mo1 und Mo2, bezüglich Mo3 ergab die Statistik jedoch keine Signifikanzen. Demnach exprimierten nichtdiabetische Dialysepatienten sowohl bei Mo1 ($p=0,004$) als auch bei Mo2 ($p=0,009$) signifikant mehr CD11a auf den jeweiligen Monozyten als Nierengesunde. Zusätzlich gab es eine signifikant stärkere CD11a-Expression auf Mo1 bei nichtdiabetischen Dialysepatienten als bei CKD-Patienten ($p=0,003$).

Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patientengruppen bezüglich des CD36⁺-Anteils in Mo1-3. Die einzige Ausnahme stellte ein signifikant höherer Anteil von CD36⁺-Monozyten in der Mo2-Population bei diabetischen Dialysepatienten als bei Nierengesunden dar ($p=0,01^a$). Allerdings zeigten sich im Gruppenvergleich weitere signifikante Differenzen in der Expressionsdichte von CD36 auf den drei Monozytensubpopulationen. Die CD36-Konzentration auf den Oberflächen der Mo1-Population war bei nichtdiabetischen Dialysepatienten im Vergleich zu Nierengesunden signifikant höher ($p=0,022$). Ebenso exprimierten nichtdiabetische Dialysepatienten signifikant mehr CD36 auf Mo1 und Mo2 als CKD-Patienten (jeweils $p<0,001$). Bezüglich der Mo3-Fraktion erzielte die NG-Gruppe eine signifikant höhere CD36-Expressionsdichte als die D-Gruppe.

Die meisten signifikanten Unterschiede zwischen den Patientengruppen wurden in der Ausprägung von CX3CR1 erzielt (siehe Tabelle 21). So präsentierten Nierengesunde eine signifikant geringere CX3CR1⁺-Mo1-Frequenz in Mo1 als nichtdiabetische Dialysepatienten ($p=0,01^a$), allerdings unterschieden sie sich hierbei knapp nicht signifikant in ihrer Expressionsdichte ($p=0,072$). Des Weiteren wurden bei diabetischen Dialysepatienten ebenfalls mehr Monozyten in Mo1 mit CX3CR1 ($p=0,05^a$) und auch eine erhöhte CX3CR1-Konzentration an deren Oberfläche gemessen ($p=0,014$) als bei Nierengesunden. Davon abgesehen bestanden keine weiteren Signifikanzen in der Analyse der Mo1-Population. In der Mo2-Fraktion fiel ein signifikant erhöhter Wert an CX3CR1⁺-Monozyten bei diabetischen Dialysepatienten ($p=0,01^a$), nichtdiabetischen Dialysepatienten ($p=0,01^a$) und CKD-Patienten ($p=0,05^a$) im Vergleich zu Nierengesunden auf. Weitere Vergleiche der vier Patientengruppen untereinander blieben diesbezüglich

nicht signifikant. Jedoch erzielten die Patientengruppen signifikante Unterschiede in der Expressionsdichte von CX3CR1 auf Mo2. So wies die Mo2-Population sowohl in der DDb-Gruppe ($p=0,001$) als auch in der CKD-Gruppe signifikant mehr ($p<0,001$) CX3CR1-Moleküle an ihrer Oberfläche auf als in der Kontrollgruppe der Nierengesunden. Des Weiteren zeigte sich eine signifikant höhere CX3CR1-Expressionsdichte auf Mo2 bei CKD-Patienten als bei nichtdiabetischen Dialysepatienten ($p=0,039$), obwohl sich diese beiden Patientengruppen nicht signifikant in dem Anteil der CX3CR1⁺-Monozyten in Mo2 unterschieden. In der Auswertung von CX3CR1 in der Mo3-Population wurden keine signifikanten Veränderungen festgestellt, außer dass CKD-Patienten signifikant mehr CX3CR1 auf Mo3 exprimierten als Nierengesunde ($p=0,047$), obwohl sie sich nicht signifikant in ihrer Häufigkeit von CX3CR1⁺-Monozyten in Mo3 unterschieden.

4. Ergebnisse

Tabelle 21: relative Häufigkeiten und Expressionsdichten der Oberflächenmoleküle CD11a, CD36 und CX3CR1 auf Monozytensubpopulationen Mo1-3

	NG (N=25)	DDb (N=13)	D (N=20)	CKD (N=20)	ANOVA					
					NG vs. DDb	NG vs. D	NG vs. CKD	DDb vs. D	DDb vs. CKD	D vs. CKD
%CD11a_Mo1	99,8±0,42	99,9±0,04	99,9±0,09	99,6±0,64	ns ^a	ns ^a	ns ^a	ns ^a	ns ^a	ns ^a
%CD11a_Mo2	99,6±0,8	99,8±0,2	99,8±0,2	99,8±0,3	ns ^a	ns ^a	ns ^a	ns ^a	ns ^a	ns ^a
%CD11a_Mo3	92,3±10,4	97,6±1,9	96,2±3,4	92,1±13,5	0,05^a	ns ^a	ns ^a	ns ^a	ns ^a	ns ^a
MFI_CD11a_Mo1	15,1±3,6	16,4±5,0	19,2±3,0	14,8±4,1	1,000	0,004	1,000	0,270	1,000	0,003
MFI_CD11a_Mo2	19,9±5,0	22,9±3,3	24,5±4,3	22,3±5,3	0,359	0,009	0,485	1,000	1,000	0,906
MFI_CD11a_Mo3	27,5±6,8	32,6±7,9	32,2±5,8	32,7±7,5	0,209	0,160	0,094	1,000	1,000	1,000
%CD36_Mo1	99,8±0,2	99,8±0,1	99,8±0,2	99,7±0,4	ns ^a	ns ^a	ns ^a	ns ^a	ns ^a	ns ^a
%CD36_Mo2	98,5±1,7	99,7±0,1	99,3±0,8	99,2±1,4	0,01^a	ns ^a	ns ^a	ns ^a	ns ^a	ns ^a
%CD36_Mo3	73,5±8,7	74,9±9,0	67,8±13,1	69,8±10,6	ns ^a	ns ^a	ns ^a	ns ^a	ns ^a	ns ^a
MFI_CD36_Mo1	120,5±18,8	120,4±19,9	142,2±30,2	107,9±25,4	1,000	0,022	0,516	0,079	0,897	<0,001
MFI_CD36_Mo2	132,8±20,4	128,9±35,7	152,3±25,9	113,1±18,5	1,000	0,058	0,054	0,055	0,444	<0,001
MFI_CD36_Mo3	17,9±6,2	14,0±2,4	13,1±3,3	17,2±5,8	0,147	0,011	1,000	1,000	0,486	0,073
%CX3CR1_Mo1	66,2±20,6	84,6±14,6	84,6±12,8	76,2±16,0	0,05^a	0,01^a	ns ^a	ns ^a	ns ^a	ns ^a
%CX3CR1_Mo2	87,7±12,8	96,8±3,3	96,0±3,8	94,9±5,4	0,01^a	0,01^a	0,05^a	ns ^a	ns ^a	ns ^a
%CX3CR1_Mo3	91,5±12,6	92,5±7,5	89,2±10,5	89,2±11,0	ns ^a	ns ^a	ns ^a	ns ^a	ns ^a	ns ^a
MFI_CX3CR1_Mo1	8,6±2,0	12,7±5,1	11,5±3,7	11,6±4,5	0,014	0,072	0,059	1,000	1,000	1,000
MFI_CX3CR1_Mo2	13,5±5,3	22,1±8,1	17,2±5,7	23,8±10,2	0,006	0,563	<0,001	0,410	1,000	0,039
MFI_CX3CR1_Mo3	29,3±8,3	37,5±7,8	34,8±11,0	39,4±18,4	0,333	0,828	0,047	1,000	1,000	1,000

a=Dunn's Multiple Comparison Test mit GraphPad Prism, da nicht normal verteilte Daten

fett=statistisch signifikant

4.4 Genexpressions-Analyse

4.4.1 Entzündungs- und Migrationsrelevante Genexpression

Es schließt sich die Auswertung der in dem Kapitel 3.2.6.4 beschriebenen Real-Time PCR an. Vermutet wurde bei Nierenkranken eine stärkere Expression der ausgewählten Gene, da sie für Proteine des Entzündungsprozesses codieren. Die Ergebnisse können der nachstehenden Tabelle 22 entnommen werden.

Bei Nierengesunden wurde eine signifikant geringe Expression des Caspase-1-Gens detektiert als bei diabetischen Dialysepatienten ($p=0,016$), nichtdiabetischen Dialysepatienten ($p=0,032$) und CKD-Patienten ($p=0,029$). Des Weiteren war der Entzündungsmediator IL-1 β auf Genebene signifikant stärker bei der D-Gruppe als bei der CKD-Gruppe ausgeprägt ($p=0,05^a$). Die Expression des NRLP3 Inflammasom-Sensors war bei Nierengesunden signifikant geringer exprimiert als bei nichtdiabetischen Dialysepatienten ($p=0,007$) und CKD-Patienten ($p=0,022$). Das in die Leukozytenmigration involvierte Protein CX3CR1 war auf Genebene nur bei CKD-Patienten signifikant im Vergleich zu Nierengesunden erhöht ($p=0,002$). Letztlich erbrachte die Auswertung der Gene bezüglich der TNF-Rezeptoren und TNF- α selbst lediglich einen signifikanten Unterschied zwischen zwei Gruppen. So war TNFRSF1B signifikant stärker bei CKD-Patienten als bei Nierengesunden exprimiert ($p=0,030$).

4. Ergebnisse

Tabelle 22: Ausprägung der Genexpression, aufgeteilt nach Patientengruppen

	NG (N=19)	DDb (N=13)	D (N=21)	CKD (N=19)	ANOVA					
					NG vs. DDb	NG vs. D	NG vs. CKD	DDb vs. D	DDb vs. CKD	D vs. CKD
CASP1	0,9±0,3	1,4±0,6	1,3±0,3	1,3±0,6	0,016	0,032	0,029	1,000	1,000	1,000
IL-1β	1,1±0,4	1,3±0,4	0,9±0,3	1,6±0,9	ns ^a	ns ^a	ns ^a	ns ^a	ns ^a	0,05^a
NLRP3	0,7±0,2	0,9±0,2	1,0±0,4	1,0±0,3	0,586	0,007	0,022	1,000	1,000	1,000
CCL2	1,0±0,6	1,1±1,0	1,5±1,3	2,8±4,4	ns ^a	ns ^a	ns ^a	ns ^a	ns ^a	ns ^a
CX3CR1	0,6±0,2	0,8±0,3	0,8±0,3	1,1±0,7	1,000	0,596	0,002	1,000	0,187	0,164
TNF-α	0,9±0,3	0,9±0,3	0,9±0,3	1,0±0,5	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
TNFRSF-1A	1,0±0,3	1,0±0,2	1,0±0,3	1,3±0,5	1,000	1,000	0,578	1,000	0,641	0,246
TNFRSF-1B	0,9±0,3	1,1±0,3	1,2±0,3	1,2±0,6	0,963	0,130	0,030	1,000	1,000	1,000

a=Dunn's Multiple Comparison Test mit GraphPad Prism, da nicht normal verteilte Daten

Tabelle 23: Korrelationen zwischen C-Peptid-Konzentration und klinischen Laborwerten (Koeffizient Rho nach Spearman bei Nicht-Normalverteilungen)

	Kreatinin	eGFR	Harnstoff	Calcium	Glucose	Hb	CRP
C-Peptid	0,618 ***	-0,606***	0,690***	-0,259*	0,422***	-0,458***	0,239*

4.5 Korrelationen bezüglich der Konzentration des C-Peptids

4.5.1 Korrelation zwischen C-Peptid-Konzentration und klinischen Routine-Laborwerten

Es wurden die Zusammenhänge zwischen der Konzentration des C-Peptids und den klinischen Laborwerten für das gesamte Kollektiv gesammelt betrachtet. Die Korrelationen sind in Tabelle 23 dargestellt. Wie erwartet zeigte sich ein signifikant positiv linearer Zusammenhang zwischen der C-Peptid-Konzentration und den Nierenretentionsparametern Kreatinin ($r_s=0,618$ mit $p\leq 0,001$) und Harnstoff ($r_s=0,690$ mit $p\leq 0,001$), ebenso wie ein signifikant negativ linearer Zusammenhang zwischen der C-Peptid-Konzentration und der eGFR ($r_s=-0,606$ mit $p\leq 0,001$). Außerdem ergaben die weiteren Berechnungen signifikant positiv lineare Zusammenhänge zwischen der C-Peptid- und der Glucose-Konzentration ($r_s=0,422$ mit $p\leq 0,05$) und der CRP-Konzentration ($r_s=0,239$ mit $p\leq 0,05$). Signifikant negativ lineare Zusammenhänge bestanden zwischen der C-Peptid-Konzentration und dem Wert für Calcium ($r_s=-0,259$ mit $p\leq 0,05$) und für Hämoglobin ($r_s=-0,458$ mit $p\leq 0,001$).

4.5.2 Korrelation zwischen C-Peptid-Konzentration und Ausprägungen der Monozyten-subpopulationen

Wie aus Tabelle 24 hervorgeht zeigten sich einige geringe Korrelationen zwischen den C-Peptid-Konzentrationen und den immunologischen Charakteristika der Monozyten-subpopulationen innerhalb der einzelnen Patientengruppen. So wurde ein signifikant positiv linearer Zusammenhang zwischen der C-Peptid- und der Mo2-Konzentration in der Gruppe der nichtdiabetischen Dialysepatienten ($r_s=0,544$ mit $p\leq 0,05$) und der CKD-Patienten ($r_s=0,459$ mit $p\leq 0,05$) festgestellt. Parallel muss hierbei auf die unerwartete Differenz zwischen den Korrelationen der beiden Dialysegruppen hingewiesen werden, schließlich ergab sich keine signifikante Korrelation zwischen der C-Peptid- und der Mo2-Konzentration bei diabetischen Dialysepatienten. Die nichtdiabetischen Dialysepatienten wiesen einen signifikant positiv linearen Zusammenhang zwischen C-Peptid-Konzentration und dem Anteil der CD36⁺-Monozyten auf Mo3 auf ($r_s=0,495$ mit $p\leq 0,05$) auf. Weiterhin errechnete sich hier eine signifikant negativ lineare Korrelation zwischen der C-Peptid-Konzentration und dem Anteil der CX3CR1⁺-Monozyten in Mo1 ($r_s=-0,480$ mit $p\leq 0,05$) und in Mo2 ($r_s=-0,562$ mit $p\leq 0,01$). Außerdem ergab sich in dieser D-Gruppe eine signifikant negativ lineare Korrelation zwischen der C-Peptid-Konzentration und der Expressionsdichte von CX3CR1 auf Mo1 ($r_s=-0,635$ mit $p\leq 0,01$), auf Mo2 ($r_s=-0,668$ mit $p\leq 0,001$) und auf Mo3 ($r_s=-0,577$ mit $p\leq 0,01$).

Tabelle 24: Korrelationen zwischen C-Peptid-Konzentration und immunologischen Charakteristika der Monozytensubpopulationen in den Patientengruppen

	C-Peptid-Konzentration			
	NG (N=25)	DDb (N=13)	D (N=20)	CKD (N=20)
%_Mo1	0,178	0,176	-0,174	-0,373
%_Mo2	0,167	-0,247	0,544*	0,459*
%_Mo3	-0,205	-0,126	-0,008	0,171
%CD11a_Mo1	-0,255	0,325	-0,124	0,048
%CD11a_Mo2	0,162	0,028	-0,247	-0,295
%CD11a_Mo3	-0,011	-0,319	0,004	-0,141
MFI_CD11a_Mo1	-0,286	0,418	0,283	0,019
MFI_CD11a_Mo2	-0,225	0,159	-0,024	0,189
MFI_CD11a_Mo3	-0,105	0,088	0,038	-0,022
%CD36_Mo1	-0,108	0,404	-0,073	0,157
%CD36_Mo2	0,002	0,127	-0,003	0,009
%CD36_Mo3	0,235	0,192	0,495*	-0,063
MFI_CD36_Mo1	<0,001	0,055	0,002	-0,078
MFI_CD36_Mo2	-0,029	0,319	-0,438	-0,248
MFI_CD36_Mo3	0,020	-0,099	0,444	0,011
%CX3CR1_Mo1	-0,182	-0,181	-0,480*	-0,048
%CX3CR1_Mo2	-0,134	-0,192	-0,562**	0,099
%CX3CR1_Mo3	-0,042	0,066	0,227	-0,238
MFI_CX3CR1_Mo1	-0,192	-0,033	-0,635**	0,073
MFI_CX3CR1_Mo2	-0,128	-0,126	-0,668***	0,059
MFI_CX3CR1_Mo3	-0,082	-0,324	-0,577**	-0,159

4.5.3 Korrelation zwischen C-Peptid-Konzentration und Ausprägung der Genexpression

In den einzelnen Patientengruppen ergaben sich keine Korrelationen zwischen C-Peptid-Konzentration und Gen-Expressionslevel für die Gene CASP1, IL-1 β , NLRP3, CCL2, CX3CR1, TNF- α , TNFRSF-1A und TNFRSF-1B (vgl. Tabelle 25).

Tabelle 25: Korrelationen zwischen C-Peptid-Konzentration und Genexpressionsanalysen

	C-Peptid-Konzentration			
	NG (N=19)	DDb (N=13)	D (N=21)	CKD (N=19)
CASP1_Sonde	0,198	0,209	-0,173	0,075
IL-1β_Sonde	0,177	-0,258	-0,043	-0,425
NLRP3_Sonde	0,051	0,379	0,058	0,009
CCL2_Sonde	0,123	-0,220	0,026	-0,240
CX3CR1_Sonde	-0,151	0,038	-0,219	0,086
TNF-α_Sonde	0,191	-0,055	-0,170	0,054
TNFRSF-1A_Sonde	-0,002	-0,044	-0,116	-0,246
TNFRSF-1B_Sonde	0,379	0,341	-0,132	0,151

4.6 Betrachtung der Migration von Monozyten und THP-1-Zellen in vitro

4.6.1 Migrationsassays von Monozyten

Experiment 1

Wie in der nachstehenden Abb. 13 ersichtlich migrierten die Monozyten in der Positivkontrolle (42400 Zellen/ml), jedoch kaum in der Negativkontrolle (3950 Zellen/ml). Dies bestätigte einen Migrationseffekt in der Positivkontrolle, demnach funktionierte der Assay als solches. Die ermittelte Anzahl an Monozyten im unteren Well bei einer dortigen C-Peptid-Konzentration von 10 nM belief sich auf 3300 Zellen/ml, bei 1 nM auf 2780 Zellen/ml und bei 0,1 nM auf 3590 Zellen/ml. Dementsprechend konnte kein relevanter Unterschied zwischen den Zellzahlen der verschiedenen C-Peptid-Konzentrationen und der Zellzahl der Negativkontrolle hervorgehoben werden.

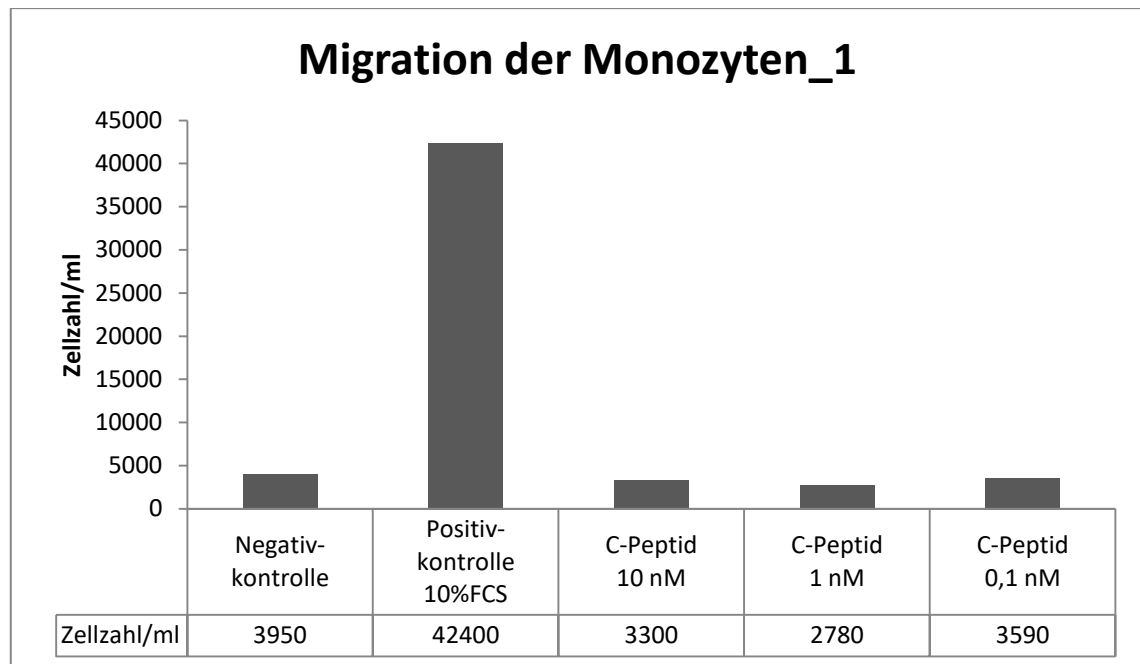


Abb. 13: Monozyten in unteren Wells bei Stimulation mit 10 nM, 1 nM oder 0,1 nM C-Peptid; C-Peptid der Firma Biotrend; vorherige Inkubation mit autologem 0,5% Serum; Filterporengröße 8µm; Inkubation des Assays für 3 Stunden

Experiment 2

Da die Migration in diesem ersten Experiment nicht gelang, wurden konsequent Parameter verändert, um eine eventuelle Migration bei leicht veränderten Versuchsbedingungen zu untersuchen. Zusätzlich wurden die Zellen weiterhin in die Kategorien PBMCs, vitale PBMCs und Monozyten unterteilt. Die Ergebnisse werden in der nachfolgenden Abb. 14 wiedergegeben. Demnach migrierten in der Positivkontrolle 50200 Monozyten/ml und in der Negativkontrolle lediglich 10 Monozyten/ml. Dies stellte zugleich die in den diversen Migrationsexperimenten jemals erzielte größte Differenz zwischen der Zellzahl der Positiv- und Negativkontrolle dar. In der weiteren Auswertung war ein Zusammenhang zwischen C-Peptid-Konzentration und Zellzahl im unteren Well erkennbar. Die zwei Ansätze mit der C-Peptid-Konzentration von 60000 nM erzielten 8690 bzw. 8680 Monozyten/ml, allerdings zeigte die Konzentration der Positivkontrolle im Vergleich mehr als das 6-fache an Monozyten auf. Bereits weniger Monozyten (836 bzw. 420 Monozyten/ml) boten die zwei Proben mit der C-Peptid-Konzentration von 6000 nM. Abermals geringere Zellzahlen wurden in der Analyse der C-Peptid-Konzentration von 600 nM festgestellt (10 bzw. 55 Monozyten/ml).

Migration der Monozyten_2

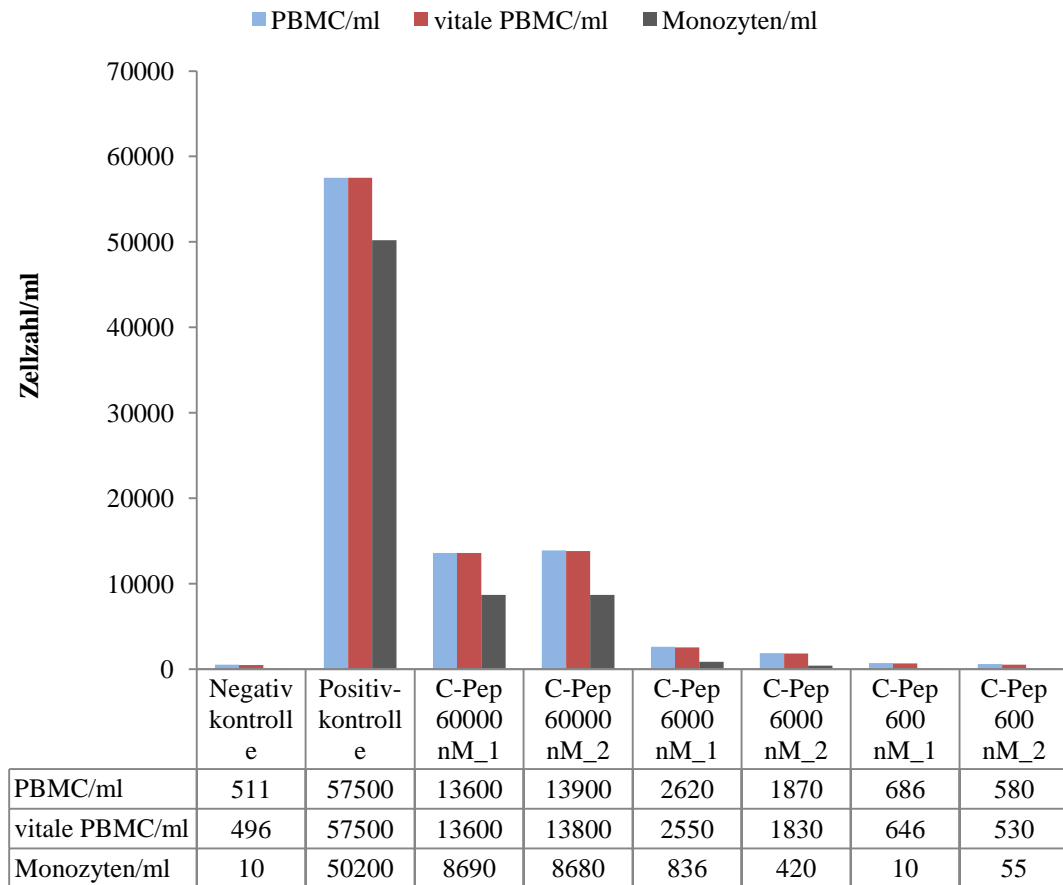


Abb. 14: Zellen in unteren Wells bei Stimulation mit 60000 nM, 6000 nM oder 600 nM C-Peptid (jeweils Doppelwerte); C-Peptid der Firma Biotrend; Filterporengröße 8 μm ; Inkubation des Assays für 2 Stunden

4.6.2 Ausgewählter Migrationsassay von THP-1-Zellen

Darüber hinaus wurde der Assay zusätzlich mit THP-1-Zellen im oberen Well durchgeführt, die für 20 Stunden mit C-Peptid der Firma antibodies-online GmbH inkubiert wurden. Dabei handelte es sich um die verschiedenen C-Peptid-Konzentrationen von 1000 nM, 100 nM, 10 nM, 1 nM und 0,1 nM im unteren Well. Die Abbildung 15 gibt für jeden Ansatz die durchflusszytometrisch gemessene Zellzahl/ml an und stellt dies zudem graphisch dar. Es wird ersichtlich, dass am meisten THP-1-Zellen in der Positivkontrolle migrierten (26316 Zellen/ml). Erneut wurden in den unteren Wells mit den verschiedenen C-Peptid-Konzentrationen nicht Zellzahlen im Bereich der Positivkontrolle nachgewiesen, stattdessen glichen die Zellzahlen der unterschiedlichen C-Peptid-Konzentrationen allesamt annähernd derjenigen der Negativkontrolle (vgl. nachstehende Abb. 15).

Migration der THP-1-Zellen

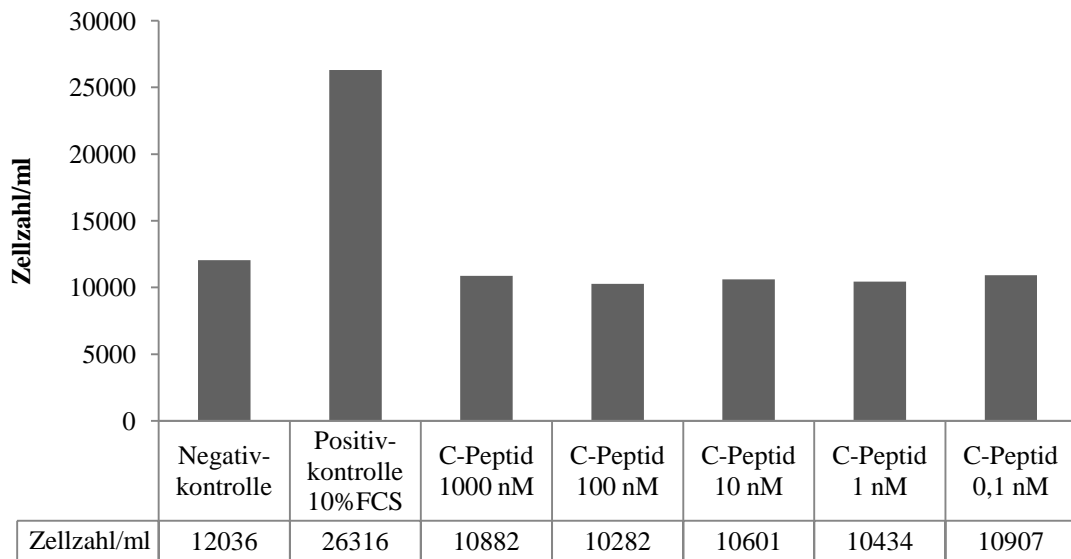


Abb. 15: Migration der THP-1-Zellen durch verschiedene C-Peptid-Konzentrationen als Stimulus; C-Peptid der Firma antibodies-online GmbH; Filterporengröße 8 μm ; Inkubation des Assays für 20 Stunden

5. Diskussion

Chronisch Nierenkranke sind häufiger von kardiovaskulären Erkrankungen und einem erhöhten Mortalitätsrisiko im Vergleich zu Nierengesunden betroffen (Go et al. 2004). Da in den Prozess der oftmals zugrunde liegenden Atherosklerose aktiv Monozyten involviert sind (Woollard und Geissmann 2010), liegt eine Untersuchung der Monozyten und ihren Subpopulationen bei chronisch Nierenkranken nahe. Des Weiteren ist das kardiovaskuläre Risiko bei einer zusätzlichen Diabetes-mellitus-Erkrankung noch stärker erhöht. So wurde bei Nierenkranken einen Zusammenhang zwischen kardiovaskulären Erkrankungen und dem Risikofaktor Diabetes mellitus aufgezeigt (Ramírez et al. 2011). Demnach erscheint eine differenzierte Betrachtung von Nierenkranken mit und ohne Diabetes in unserer Studie angebracht. Als Abspaltung des Proinsulins steht das C-Peptid im Verdacht an der Atherosklerose beteiligt zu sein, jedoch existieren bislang keine systematischen Analysen zu C-Peptid-Konzentrationen bei chronisch Nierenkranken im Vergleich zu Nierengesunden.

5.1 Häufigkeit von kardiovaskulären Diagnosen bei Nierenkranken

In dieser Studie litten Nierenkranke deutlich häufiger an einer arteriellen Hypertonie als Nierengesunde, wobei die Dialysegruppen relativ mehr Hypertoniker als die CKD-Gruppe aufwiesen. Es gilt als erwiesen, dass Nierenerkrankung und Bluthochdruck vergesellschaftet sind. So kann einerseits eine bereits bestehende arterielle Hypertonie z.B. durch folgende Atherosklerose die Nierenfunktion beeinträchtigen. Andererseits kann aber auch eine vorliegende eingeschränkte Nierenfunktion zu einer arteriellen Hypertonie führen, z.B. durch eine erhöhte Volumenlast. Unsere Ergebnisse stehen im Einklang mit den Erkenntnissen von Zheng et al., in der nahezu 9000 chinesische Patienten mit CKD und ohne Dialyse auf eine Erkrankung an Bluthochdruck untersucht wurden, wobei sich eine signifikant positive Korrelation zwischen CKD-Stadium und Prävalenz von arterieller Hypertonie ergab (Zheng et al. 2013). Zudem gilt der starke Zusammenhang zwischen arterieller Hypertonie und terminaler Niereninsuffizienz als bewiesen (Klag et al. 1996). Weiterhin scheint es nur folgerichtig, dass in der vorliegenden Studie bei mehr dialysepflichtigen Diabetikern als Nicht-Diabetikern eine arterielle Hypertonie erhoben wurde, da ein Zusammenhang zwischen arterieller Hypertonie und Diabetes mellitus belegt wurde (Hanefeld et al. 1991).

Weiterhin zeigten sich in unserem Studienkollektiv signifikant mehr Thrombosen in den beiden Dialysegruppen im Vergleich zu CKD-Patienten und Nierengesunden. Dies war zu erwarten, da Dialysepatienten häufig über einen Thrombose-anfälligen Shunt verfügen und bei ihnen bereits

ein höhere Prävalenz an Thrombosen im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe nachgewiesen wurde (Ocak et al. 2011).

Die Herz-Kreislauf-Erkrankungen gelten als Hauptursache für Morbidität und Mortalität bei CKD-Patienten (Collins et al. 2015). Hierfür werden u.a. Entzündungsprozesse, Endotheldysfunktion, oxidativer Stress und verstärkte Atherosklerose verantwortlich gemacht (Phan et al. 2016). In der Analyse von über 1,12 Mio. Amerikanern wurde ein positiver Zusammenhang zwischen dem Stadium der Nierenfunktionseinschränkung und dem Risiko für ein kardiovaskuläres Ereignis festgestellt (Go et al. 2004). Dies steht im Einklang mit unseren Daten, da Nierenkranke signifikant häufiger an einer KHK litten als Nierengesunde. Hierbei waren Patienten mit CKD 3-4 und diabetische Dialysepatienten häufiger betroffen als nichtdiabetische Dialysepatienten oder Nierengesunde. Diese Ergebnisse bestätigen die Erkenntnisse von Foley et al., wonach bei diabetischen Dialysepatienten höhere Inzidenzen der KHK nach Adjustierung für Alter und Geschlecht als bei nichtdiabetischen Dialysepatienten ermittelten wurden (Foley et al. 1997). Zwar wurde bei CKD-Patienten ein hohes kardiales Erkrankungsrisiko bereits vor dem Eintritt in die Dialyse erörtert (Foley und Parfrey 1999), jedoch erscheint es bislang unerklärlich, warum in unserer Studienpopulation relativ mehr Patienten mit CKD 3-4 von einer KHK betroffen waren als Dialysepatienten. Eine mögliche Erläuterung wäre, dass 25% unserer CKD-Patienten auf der allgemein-internistischen Station 7 bzw. auf der internistischen Kurzlieger-Station mit noch durchzuführender Koronarangiographie akquiriert wurden. Da sie hier vornehmlich nicht nur wegen Nieren-, sondern vor allem Herzerkrankungen behandelt wurden, könnte die erhöhte Rate an KHK in der Gruppe der CKD-Patienten hierdurch erklärt werden.

5.2 C-Peptid-Konzentration im Zusammenhang mit Nierenerkrankung

Das Proinsulin der β -Zellen des Pankreas wird physiologisch in Insulin und renal zu eliminierendes C-Peptid gespalten, woraus die Annahme folgt, dass C-Peptid bei chronisch Nierenkranken akkumuliert. Bislang wurde das C-Peptid bei chronisch Nierenkranken, vor allem mit Blick auf eine zusätzliche Erkrankung an Diabetes mellitus Typ 2, nicht systematisch untersucht. Zwar wiesen Di Mauro et al. bei 6 Patienten mit Diabetes und chronischer Nierenerkrankung (GFR: $37,3 \pm 4,9$ ml/min) eine bis zu zehnfach erhöhte C-Peptid-Konzentration im Vergleich zu 6 diabetischen Nierengesunden nach, jedoch bestand das lediglich kleine Kollektiv insgesamt nur aus Patienten mit einem Diabetes mellitus Typ 2 und untersucht wurden zudem nur Patienten mit CKD 3 (Di Mauro et al. 2001). Diese Erkenntnisse können durch die vorliegende Studie erweitert werden, da erstmalig die C-Peptid-Konzentrationen sowohl von diabetischen als auch nichtdiabetischen Nierenkranken mit nichtdiabetischen Nierengesunden verglichen wurden und zusätzlich verschiedene Stadien der Nierenerkrankung betrachtet wurden. Es konnte aufgezeigt

werden, dass sowohl Patienten mit CKD 3-4 als auch Dialysepatienten, jeweils mit und ohne Diabetes mellitus Typ 2 oder gepoolt, eine signifikant höhere C-Peptid-Konzentration als nichtdiabetische Nierengesunde aufwiesen. Der fehlende signifikante Unterschied zwischen nichtdiabetischen Nierengesunden (N(NG)=25) und diabetischen Patienten mit CKD 3-4 (N(CKDDb+)=6) war mit hoher Wahrscheinlichkeit der geringen Gruppengröße geschuldet. Insgesamt schien somit im Kollektiv zwar eine gewisse Graduierung der C-Peptid-Konzentrationen von CKD 3-4 zu CKD 5D (sprich terminale Niereninsuffizienz mit Dialysebehandlung) vorzuliegen, da die Mittelwerte der C-Peptid-Konzentrationen mit fortschreitender Niereninsuffizienz anstiegen, jedoch konnten wegen der großen Streuungen der Werte keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden. Somit wären in folgenden Studien eine größere Studienpopulation und zudem eine weitere Integration von allen 5 Stadien der Niereninsuffizienz anzustreben, um die Streuungen der C-Peptid-Konzentrationen zu präzisieren und einen eventuell doch vorhandenen Effekt aufzudecken.

Es stellte sich ferner die Frage, ob Nierenkranke unabhängig einer Erkrankung an Diabetes mellitus Typ 2 erhöhte C-Peptid-Werte aufweisen. Bislang demonstrierten Covic et al. lediglich keine signifikanten Unterschiede in der C-Peptid-Konzentration zwischen nichtdiabetischen und diabetischen, gepoolten (Diabetes mellitus Typ 1 und Typ 2) Dialysepatienten (Covic et al. 2000). In ihrer Studie erzielten die diabetischen, gepoolten Dialysepatienten zudem 2,5-fach höhere C-Peptid-Konzentrationen im Vergleich zu diabetischen Geschwistern mit normaler Nierenfunktion. Durch die vorliegende Studie gelingt nicht nur der Vergleich zwischen diabetischen und nichtdiabetischen Dialysepatienten, sondern erstmalig auch derer zwischen diabetischen und nichtdiabetischen Patienten mit CKD 3-4, wobei nur der Diabetes mellitus Typ 2 betrachtet wird. Wie bei Covic et al. zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der C-Peptid-Konzentration zwischen nichtdiabetischen und diabetischen Dialysepatienten, was trotz geringer Gruppengröße die Qualität der durchgeführten Studie untermauert. Zusätzlich konnte jedoch auch keine Signifikanz beim Vergleich der diabetischen und nichtdiabetischen Patienten mit CKD 3-4 ermittelt werden. Es sei erwähnt, dass sich sowohl bei Patienten mit CKD 3-4 als auch bei Dialysepatienten durchschnittlich geringere C-Peptid-Konzentrationen bei den Diabetikern als bei den Nicht-Diabetikern zeigten, wobei wegen der großen Streuungen keine signifikanten Unterschiede erzielt wurden. Stark differierende bzw. geringere Werte könnten möglicherweise durch die zuerst zunehmende, dann abnehmende Funktion des Pankreas bei Diabetes mellitus Typ 2 erklärt werden. Insgesamt schien das Vorliegen eines Diabetes mellitus Typ 2 jedoch in diesem Studienkollektiv keinen signifikanten Einfluss auf die C-Peptid-Konzentration zu haben.

Zusammenfassend existierten in dieser Studie somit keine signifikanten Unterschiede in der C-Peptid-Konzentration zwischen den Gruppen der Nierenkranken, unabhängig eines zusätzlichen Diabetes mellitus Typ 2 oder des Schweregrads der Nierenerkrankung. Folglich könnte die

Kumulation des C-Peptids bei Nierenkranken nicht primär mit der Erkrankung des Diabetes mellitus Typ 2, sondern vielmehr mit der Existenz einer Niereninsuffizienz selbst begründet werden, da Nierenkranke stets höhere C-Peptid-Konzentrationen aufwiesen als Nierengesunde. Es sei allerdings auf die differierenden Mittelwerte der unterschiedlichen Gruppen der Nierenkranken hingewiesen, jedoch blieben jegliche Vergleiche wegen stets hoher Standardabweichungen, insbesondere bei diabetischen Nierenkranken, nicht signifikant. Weiterhin kann im untersuchten Kollektiv abgeleitet werden, dass die C-Peptid-Konzentration im Falle einer verminderten Nierenfunktion nicht in Abhängigkeit vom Stadium der Niereninsuffizienz zunimmt, stattdessen könnte bereits eine maximale Retention des C-Peptids ab einer Niereninsuffizienz Stadium CKD III vorliegen. Es wäre wünschenswert diese Erkenntnisse in einer größeren Studienpopulation zu verifizieren, wobei möglichst jedes Stadium der Niereninsuffizienz untersucht werden und ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen Diabetikern und Nichtdiabetikern in den jeweiligen Gruppen vorliegen sollte.

5.3 Rolle der Monozytensubpopulationen bei chronisch Nierenkranken

Mittlerweile hat sich die Unterteilung der Monozyten anhand der Existenz des Oberflächenproteins CD16 (Fc- γ -III-Rezeptor) in klassische CD16⁻-Monozyten (Mo1) und als proinflammatorisch eingestufte CD16⁺-Monozyten (Mo2 und Mo3) etabliert (Ziegler-Heitbrock et al. 2010). Die vorliegende Studie präsentierte signifikante Unterschiede in der Verteilung dieser Monozytensubpopulationen bei Nierenkranken im Vergleich zu Nierengesunden. Unabhängig des Diabetes mellitus Typ 2 zeigten Dialysepatienten einen signifikant größeren Anteil an CD16⁺-Monozyten als Nierengesunde auf. Unsere Daten stehen im Einklang mit bisherigen Studien, die ein verstärktes Auftreten von CD16⁺-Monozyten bei Dialysepatienten darlegten (Heine et al. 2008; Ramírez et al. 2011). Selbiges konnte ebenfalls von unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen werden (Ulrich et al. 2008). Außerdem werden durch die Analyse der Nierenkranken die Erkenntnisse von bisherigen Studien zu Nierengesunden erweitert, bei denen bereits kein Unterschied im CD16⁺-Monozyten-Anteil zwischen Diabetikern Typ 1 oder 2 und Nichtdiabetikern ermittelt wurde (Patiño et al. 2000). Die Studie zeigt zudem auf, dass bei CKD-Patienten nur eine Erhöhung der Monozytensubgruppe Mo2 (CD14⁺⁺CD16⁺-Monozyten), nicht jedoch Mo3 (CD14⁺CD16⁺⁺-Monozyten) im Vergleich zu Nierengesunden auftrat.

Eine entzündliche Stoffwechsellage, wie bei chronisch Nierenkranken vorhanden, fördert über die Hochregulierung von CD16 die Weiterentwicklung der klassischen CD14⁺⁺CD16⁻-Monozyten (Mo1) zu den proinflammatorischen CD16⁺-Monozyten. Gesichert ist, dass die Zahl der CD16⁺-Monozyten im Falle einer akuten Entzündung ansteigt (Nockher und Scherberich 1998). Weiterhin besitzen Mo2 und Mo3 die Fähigkeit vermehrt proinflammatorische Cytokine

wie TNF- α und nur eine sehr geringe Menge an anti-inflammatorisch wirkendem IL-10 zu produzieren. Dadurch wird diesen Monozytensubgruppen neben ihrer Funktion in Entzündungen ebenfalls die Beteiligung an einem Endothelschaden zugesprochen. Laut Ramírez et al. könnten die Cytokine über eine vorherige Endotheladhäsion der Monozyten lokal verstärkt wirken und so die endotheliale Dysfunktion punktuell forcieren (Ramírez et al. 2011), jedoch bleibt die jeweilige Rolle der Cytokine weiterhin unklar. Eine Schädigung des Gefäßendothels markiert den Anfang des Atheroskleroseprozesses. So ist es den Monozyten möglich mittels spezifischen Adhäsions- und Migrationsmolekülen in die Gefäßwand einzudringen, die dortige lokale Infektion durch Cytokine zu verstärken und sich hier später als Makrophage durch Aufnahme von LDL zu Schaumzellen weiterzuentwickeln, um schließlich einen atherosklerotischen Plaque zu bilden. Zwar sind die einzelnen Funktionen jeder Monozytensubpopulation nicht abschließend geklärt, jedoch demonstrierte unsere Arbeitsgruppe durch den sonographischen Nachweis von subklinischer Atherosklerose in den Aa. carotides bereits den Zusammenhang zwischen CD16⁺-Monozyten und Atherosklerose (Ulrich et al. 2008). Zudem konstatierten bereits Rogacev et al. 2011, dass eher CD16⁺-Monozyten als CD16⁻-Monozyten bei der Atherosklerose von CKD-Patienten eine wichtige Rolle spielen (Rogacev et al. 2011). Demnach ließe sich schlussfolgern, dass in unserer Studie der erhöhte Anteil an CD16⁺-Monozyten bei chronisch Nierenkranken auf vermehrte Entzündungen einhergehend mit einem erhöhten Vorkommen an Atherosklerose hinweisen könnte. Das würde wiederum unsere erhöhte Rate an arterieller Hypertonie, Thrombosen und KHK bei chronisch Nierenkranken erklären. Ein Zusammenhang zwischen KHK und CD16⁺-Monozyten wurde zudem bereits bei Nierengesunden hergestellt (Schlitt et al. 2004). Bislang wurde jedoch nur ein direkter Zusammenhang zwischen dem Anteil an Mo2 und kardiovaskulären Ereignissen nachgewiesen (Rogacev et al. 2012). Dies könnte im Einklang mit unseren Ergebnissen stehen, da sich die CKD-Patienten unserer Studie lediglich in Mo2, nicht jedoch Mo1 oder Mo3 von Nierengesunden unterscheiden.

Die vorliegende Studie untersuchte erstmals Korrelationen zwischen C-Peptid-Konzentrationen und den unterschiedlichen Subgruppen der Monozyten. Hier konnte eine positive Korrelation zwischen der C-Peptid-Konzentration und dem Anteil an Mo2 bei nichtdiabetischen Dialysepatienten und CKD-Patienten nachgewiesen werden. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass bei einer stärkeren Akkumulation von C-Peptid ebenso prozentual mehr proinflammatorische Monozyten vorliegen. Es ließe die Annahme zu, dass bei chronisch Nierenkranken einhergehend mit einer erhöhten C-Peptid-Konzentration mehr Entzündungen als bei Nierengesunden vorliegen, die den Beginn eines atherosklerotischen Prozesses markieren könnten. Es muss allerdings erwähnt werden, dass dieser Effekt nicht bei der ebenfalls als proinflammatorisch geltenden Mo3-Gruppe und nicht bei diabetischen Dialysepatienten zu finden war und es bleibt fraglich, ob dies einzig der geringen Gruppengröße und -heterogenität zuzuschreiben ist.

Weiterhin wurden in dieser Studie die Monozytensubpopulationen chronisch Nierenkranker auf Veränderungen der Oberflächenmoleküle CD11a, CD36 und CX3CR1 hin untersucht, um einen Effekt der Monozyten in den Prozess der verstärkten Atherosklerose zu untermauern. CD11a vermittelt als Bestandteil des LFA-1 (Leucocyte function-associated antigen type 1) auf allen Leukozyten die Zelladhäsion. Es wurde bei Nierengesunden bereits aufgezeigt, dass alle drei Monozytengruppen jeweils 95-100% CD11a⁺-Monozyten aufweisen und CD16⁺-Monozyten relativ mehr CD11a auf ihrer Oberfläche exprimierten (Ancuta et al. 2003; Gabriel et al. 1994). Erstmals konnten diese Erkenntnisse sowohl auf CKD-Patienten als auch auf diabetische und nichtdiabetische Dialysepatienten übertragen werden. Hierbei zeigte sich zwar im Vergleich zu Nierengesunden ein signifikant erhöhter Anteil an CD11a⁺-Monozyten in Mo3 bei diabetischen Dialysepatienten und eine verstärkte Expressionsdichte auf Mo1 und Mo2 bei nichtdiabetischen Dialysepatienten, jedoch scheint hier bislang keine Systematik erkennbar, sodass die Effekte in nachfolgenden Studien mit größeren Fallzahlen erneut überprüft werden sollten. Insgesamt folgt die Annahme, dass CD11a sich bei Monozyten von Nierenkranken als unverändert präsentiert und somit nicht zu einer verstärkten Migration der Monozyten in die Gefäßwand mit resultierender Atherosklerosebildung beiträgt.

Als Scavenger-Rezeptor bindet CD36 oxidiertes LDL und bewirkt eine verstärkte Ausschüttung von proinflammatorischen Cytokinen bei Makrophagen. Wie bei Nierengesunden demonstrieren CKD- und Dialysepatienten gleichermaßen einen nahezu identischen Anteil an CD36⁺-Monozyten in Mo1 und Mo2 und einen wesentlich geringeren in Mo3. Ebenso war in allen Patientengruppen die CD36-Expressionsdichte in Mo2 am größten und in Mo3 mit Abstand am geringsten. Unsere Ergebnisse ähneln denjenigen von Nierengesunden, bei denen bereits eine erhöhte Expression von CD36 auf Mo1 und Mo2 und eine verringerte Expression auf Mo3 erhoben wurde (Tallone et al. 2011). Es existierten nahezu keine Unterschiede im Gruppenvergleich, einzig die bereits ermittelte erhöhte CD36-Expression auf PBMCs bei Nierengesunden mit Diabetes mellitus Typ 2 (Sun et al. 2010) wurde durch diese Studie bei diabetischen Dialysepatienten bei Mo2 ebenfalls festgestellt. Bezüglich der Mo3-Fraktion erzielten Nierengesunde eine signifikant höhere CD36-Expressionsdichte als nichtdiabetische Dialysepatienten, jedoch betrug dies auf Mo3 nur etwa ein Achtel derjenigen auf Mo2. Damit wurde der Effekt als nahezu vernachlässigbar eingestuft, obwohl die Funktionen von CD36 eher den Diabetikern mit dem verstärkt auftretenden Entzündungsmilieu als den Nichtdiabetikern zuzuordnen wären.

Das Transmembranprotein CX3CR1 der Monozyten bindet den passenden Liganden auf Endothelzellen und ist in die Adhäsion und Migration von Leukozyten involviert, wobei deren exakte Funktion bislang ungeklärt ist. Nierenkranke haben im Vergleich zu Nierengesunden erhöhte Frequenzen an CX3CR1⁺-Mo1 und CX3CR1⁺-Mo2. Die höchste Frequenz innerhalb der Monozytensubgruppen findet man jedoch auf Mo3, was den bisherigen Erkenntnissen von

Nierengesunden gleicht (Ancuta et al. 2003). Weiterhin zeigte sich eine geringere Expressionsdichte in Mo1 und Mo2 bei Nierengesunden im Vergleich zu diabetischen Dialysepatienten. Eine Erklärung unserer Daten wäre das vermehrte Auftreten von chronischen Entzündungen und damit eine etwaige Hochregulierung von CX3CR1 bei Nierenkranken, da CX3CR1 und seinem Liganden neben der Beteiligung an Atherosklerose bereits bei mehreren Immunerkrankungen wie z. B. Rheumatoide Arthritis oder HIV eine Rolle zugewiesen wurde (Ziegler-Heitbrock 2007). Weiterhin wurde eine stärkere Endothelbindung über CX3CR1 der CD16⁺-Monozyten im Vergleich zu CD16⁻-Monozyten bereits vorgeschlagen (Ancuta et al. 2003) und auch der Zusammenhang zwischen CX3CR1 und Atherosklerose steht weiterhin im Raum. So betonten bereits Tacke et al. in Mäuseexperimenten die Rolle des CX3CR1 bei Atherosklerose, da die klassischen Mo1 mit reduziertem CX3CR1 in geringerer Anzahl in die atherosklerotischen Plaques migrierten als die unbehandelten Monozyten (Tacke et al. 2007). Unsere Studie gibt weitere Hinweise darauf, dass CX3CR1 als Oberflächenmolekül der humanen Monozyten bei chronisch Nierenkranken verstärkt exprimiert wird und unterstützt die Vorstellung der Beteiligung dieses Rezeptors an der Entstehung von Atherosklerose.

Ein Anliegen dieser Studie ist es den Zusammenhang zwischen den Ausprägungen der untersuchten monozytären Oberflächenproteinen und der C-Peptid-Konzentration zu untersuchen, jedoch gaben unsere Daten insgesamt nur wenige Hinweise für eine etwaige Korrelation. Einzig nichtdiabetische Dialysepatienten offenbarten negative Korrelationen zwischen C-Peptid-Konzentration und sowohl dem Anteil an CX3CR1⁺-Monozyten in Mo1 und Mo2 als auch der Expressionsdichte von CX3CR1 auf Mo1-3. Weiterhin korrelierte die C-Peptid-Konzentration der nichtdiabetischen Dialysepatienten positiv mit dem Anteil der CD36⁺-Monozyten in Mo3. Jegliche Effekte konnten in den anderen Gruppen jedoch nicht demonstriert werden. Ob die jeweiligen aufgezeigten Unterschiede zwischen Nierengesunden und den Dialysegruppen systematisch auftreten, bleibt aufgrund der geringen Gruppengröße und geringen Korrelationen fraglich. Dies könnte allenfalls erneut gesondert in einem größeren Kollektiv analysiert werden, für starke Effekte ergeben sich jedoch bislang keine Anhaltspunkte. Insgesamt wurden somit keine Hinweise gefunden, dass das bei Nierenkranken verstärkt kumulierende C-Peptid zusammen mit systematischen Veränderungen einiger Oberflächenmoleküle der Monozyten auftritt, die in die Adhäsion und Migration von Monozyten in die Gefäßwand im Sinne der beginnenden Atherosklerose involviert sind. Dementsprechend bleibt weiterhin die Frage nach den möglicherweise durch das C-Peptid hoch regulierten Oberflächenproteinen auf Monozyten offen, um eine aktive Rolle des C-Peptids bei der Migration der Monozyten in den Atheroskleroseprozess zu stützen.

5.4 Genexpressionslevel von an Entzündung und Migration beteiligten Proteinen bei chronisch Nierenkranken

Weiterhin zeigten unsere Daten nur geringe Unterschiede zwischen Nierenkranken und Nierengesunden bezüglich einiger in Entzündung involvierter Proteine auf Genexpressionsebene. Hervorzuheben ist dabei eine höhere Expression von Caspase-1 bei Nierenkranken. Dies könnte durch das chronisch inflammatorische Milieu bei Nierenerkrankungen bedingt sein, da Caspase-1 vom Inflammasom aktiviert wird und daraufhin proinflammatorische Cytokine wie IL-1 β aktiviert. Es scheint ein Zusammenhang zwischen erhöhtem Caspase-1-Genexpressionslevel und Atherosklerose nahezuliegen, da eine Beteiligung von Caspase-1 bei Gefäßentzündung und Atherosklerose bei Nierengesunden (Shen et al. 2010) und zusätzlich an der Bildung der Neointimahyperplasie bei CKD-Patienten (Ferrer et al. 2016) bereits nachgewiesen wurde. Weiterhin bestätigten sich die Erkenntnisse von Granata et al., die bereits erhöhte mRNA-Level von CASP1 und NLRP3 bei Dialysepatienten nachwies (Granata et al. 2015). In unserer Studie ergaben sich höhere NLRP3-Genexpressionslevel nur für nichtdiabetische Dialysepatienten und CKD-Patienten, wobei der fehlende Effekt bei den diabetischen Dialysepatienten in deren geringer Gruppengröße (N=13) begründet sein könnte. Als Bestandteil des Inflammasoms erscheint eine Hochregulierung von NLRP3 im urämischen, entzündlichen Milieu der Nierenkranken schlüssig, jedoch müssen weitere Studien den Einfluss des Diabetes dabei präzisieren.

Die Betrachtung der Genexpressionslevel für IL-1 β , CCL2, CX3CR1, TNF- α , TNFRSF-1A und TNFRSF-1B ergab allenfalls marginale, unsystematische Unterschiede zwischen Nierenkranken und Nierengesunden bzw. nahezu keine beim Vergleich der CKD- und Dialyse-Patienten untereinander, sodass ein konsequent vorliegender Effekt nicht anzunehmen ist.

In der vorliegenden Arbeit wurden positive Zusammenhänge zwischen den analysierten Entzündungs- und Migrationsmarkern auf mRNA-Ebene und der C-Peptid-Konzentration angenommen. Theoretisch wäre es möglich, dass neben einer erhöhten C-Peptid-Konzentration die chronisch Nierenkranken vermehrt die o.g. Proteine exprimieren, die mit dem ohnehin inflammatorischen Milieu im Einklang ständen. Allerdings konnten keine Korrelationen zwischen C-Peptid-Konzentration und jeweiligem Genexpressionslevel dieser Proteine aufgezeigt werden. Insgesamt ist somit keine systematische Erhöhung dieser Proteine auf Genexpressionsebene im Falle einer Niereninsuffizienz anzunehmen.

5.5 Migration der Monozyten und THP-1-Zellen in vitro

Um eine Kausalität zwischen C-Peptid-Konzentration und Migration der Monozyten aufzuzeigen wurden in vitro Monozyten Chemotaxis Assays durchgeführt. Hierbei stellte die Reproduktion des Assays von Marx et al. ein Ziel dieser Arbeit dar, um es anschließend für folgende Experimente, ggf. mit Nierenkranken, modifizieren zu können (Marx et al. 2004). In deren Studie wurden Monozyten gesunder Probanden für 16 Stunden in RPMI+0,5%FCS kultiviert, um sie anschließend auf der Basis von Serum-freiem Medium im oberen Well des Micro Chemotaxis Chamber einzusäen. Während der Inkubationszeit von 2,5 Stunden migrierten die Monozyten durch die Membran mit der Porengröße von 5 μm am stärksten ins untere Well, wenn dort rekombinantes C-Peptid (der Firma Sigma) oder MCP-1 als chemotaktischer Reiz vorhanden waren. Der maximale Migrationseffekt der Monozyten existierte bei einer C-Peptid-Konzentration von 1 nmol/l, wobei die Zellzahl lichtmikroskopisch bestimmt wurde. In unserem Experiment 1 wurde dieser Aufbau weitestgehend übernommen, jedoch mit dem C-Peptid von Biotrend, einer Porengröße von 8 μm und einer Inkubation von 3 Stunden mit anschließender durchflusszytometrischer Bestimmung der Zellzahl des unteren Wells. Unser Daten deuteten darauf hin, dass der gewählte Versuchsaufbau im Gegensatz zum Experiment von Marx et al. keine vermehrte Monozytenmigration durch die C-Peptid-Konzentrationen von 0,1 nM, 1 nM und 10 nM als Stimulus zuließ. In Experiment 2 ohne vorherige Zellkultivierung inkubierten die Zellen für 2 Stunden bei Konzentrationen von 600 nM, 6000 nM und 60000 nM C-Peptid. Erneut bestätigte die Positivkontrolle den Aufbau des Assays. Da hier Doppelwerte jeweils sehr ähnliche Zellzahlen aufzeigten und die Monozytenkonzentration mit der Zunahme der C-Peptid-Konzentration im unteren Well anstieg, konnte ein geringer Migrationseffekt aufgezeigt werden. Dieser trat jedoch erst bei einer unphysiologisch hohen C-Peptid-Konzentration auf und entsprach bei Weitem nicht der Konzentration von 1 nM C-Peptid, bei der Marx et al. den maximalen Effekt nachwies. Allerdings verwendeten Marx et al. keine C-Peptid-Konzentrationen jenseits 1nM, sodass ein etwaiger größerer Migrationseffekt bei höheren Stimuluskonzentrationen von ihnen nicht untersucht wurde. Da in unserer Studie weiterhin auch keine Migration von THP-1-Zellen bei einer Inkubation von 0,1 nM, 1 nM oder 10 nM C-Peptid für 20 Stunden auftrat, scheint ein chemotaktischer Effekt beim C-Peptid insgesamt eher unwahrscheinlich. Hiermit wage ich es einerseits die von Marx et al. publizierten Daten anzuzweifeln, da wider Erwarten die Replikation des Experiments nicht gelang, obwohl etliche Parameter wie Porengröße, Inkubationszeit, C-Peptid-Substanz und deren Konzentration zusätzlich variiert wurden. Somit konnte im Verlauf kein geeignetes Versuchsmodell etabliert und der Einfluss des C-Peptids auf die Monozytenmigration bei chronisch Nierenkranken im Vergleich zu Nierengesunden nicht systematisch analysiert werden. Andererseits passen die vorliegenden gescheiterten Experimente zur Heterogenität der bisher publizierten Daten des C-Peptids. So ist das C-Peptid bei Monozyten in der Lage die Cytokinsekretion und Adhäsion an Endothelzellen der

humanen Aorta über eine Inhibition des NF- κ B-Signalweges zu reduzieren (Haidet et al. 2012), wodurch dem C-Peptid eine anti-inflammatorische Rolle zugesprochen werden könnte. Weiterhin wiesen Luppi et al. neben der Reduktion der Adhäsion an Endothelzellen ebenfalls eine Reduktion des endothelialen VCAM-1 (=vascular cell adhesion molecule 1) in Anwesenheit von 0,05 nM C-Peptid nach und postulierten einen anti-inflammatorischen, eventuell sogar anti-atherogenetischen Effekt durch das C-Peptid (Luppi et al. 2008). Hingegen wurde von Marx et al. neben dem migratorischen Effekt weiterhin eine Ablagerung von C-Peptid und Monozyten/Makrophagen in der Gefäßintima der Aorta von Diabetikern beschrieben und als Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen C-Peptid und Entzündung eingestuft (Marx et al. 2004). Dies wurde später von Walcher et al. bestätigt, die zudem einen proliferativen Effekt von C-Peptid auf VSMCs aufzeigten und das C-Peptid dadurch im Prozess der Atherosklerose beteiligt sahen (Walcher et al. 2006). Mögliche Erklärungen für diese Differenzen der Studien wären Unterschiede in dem Studiendesign und der Studienpopulation. Aufgrund der Fülle der widersprüchlichen Daten ist jedoch eine Doppelfunktion des C-Peptids nicht auszuschließen, sodass es situationsabhängig inflammatorisch als auch anti-inflammatorisch wirken könnte.

5.6 Einschränkungen

Die größte Limitation dieser Studie stellt die Fallzahl der einzelnen Patientengruppen dar. Mit 79 Probanden lassen sich allenfalls tendenzielle Zusammenhänge aufzeigen, wobei besonders die Gruppe der diabetischen Dialysepatienten mit N=13 und die Subgruppe der diabetischen Patienten mit CKD 3-4 zu klein sind. Hierfür wäre es angebracht generell größere Hämodialysezentren einzubinden oder Kooperationen zwischen mehreren Krankenhäusern, vorzugsweise mit Akutdialyse, für eine erneute Studie einzugehen. Bei den Blutentnahmen konnte die vorgeschriebene Nüchternheit der Patienten nicht überprüft werden, besonders bei Patienten mit einer ambulanten Dialyse am Nachmittag erscheint dies fragwürdig. Demnach spiegeln die gemessenen C-Peptid-Konzentrationen bisweilen nicht den tatsächlichen Wert dar, allerdings vermitteln unsere Daten trotz dieser Einschränkung zumindest den Eindruck eines vorliegenden Effektes. Zudem erscheint es schlüssig, dass die C-Peptid-Konzentration im Verlauf einer Erkrankung an Diabetes mellitus Typ 2 zuerst bei erhöhter Insulinproduktion wegen peripherer Insulinresistenz ansteigt, um danach abzufallen. Es stellt sich die Frage, in welchem Stadium dieses höchst variabel verlaufenden Prozesses sich jeder einzelne diabetische Proband zum Zeitpunkt der Blutentnahme befand und wie dieser Zustand hätte erhoben werden können. Ein Vorschlag wäre statt unserer Querschnittstudie eine Längsschnittstudie mit Bestimmung der C-Peptid- und Insulin-Konzentration über einen gewissen Zeitraum durchzuführen.

Weiterhin werden in dieser Studie die Lipidwerte nicht betrachtet, da bei den meisten Patienten eine Bestimmung dieser Werte ärztlicherseits nicht angeordnet wurde und sie nur für unsere Zwecke nicht eigenständig angefordert werden durften. Dies wäre jedoch im Hinblick auf das Vorliegen eines metabolischen Syndroms wünschenswert gewesen, um weitere Zusammenhänge zwischen C-Peptid-Konzentration und kardiovaskulärem Risikoprofil und Atherosklerose herstellen zu können.

Eine nichtdiabetische Dialysepatientin erzielte durchflusszytometrisch eine sehr hohe Leukozytenkonzentration, die stark von der vom Zentrallabor als durchschnittlich gemessenen Konzentration abwich (vgl. 3.2.7), sodass dieser Leukozytenwert ausgeschlossen wurde. Rückblickend hätten die Werte der Oberflächenfärbung der Monozyten dieser Patientin von der Studie ebenfalls eliminiert werden sollen, da trotz CRP von 3,0 mg/l eine Entzündung nicht ausgeschlossen werden konnte. Demnach ist eine Verfälschung der Mittelwerte der monozytären Oberflächenfärbungen in der Gruppe mit nichtdiabetischen Dialysepatienten nicht auszuschließen. Weiterhin wurden auf Genexpressionsebene nur sehr geringe Werte für alle Gene erzielt, sodass die signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Patientengruppen unter Vorbehalt zu bewerten sind. So gilt es vorliegende Korrelationen zwischen C-Peptid-Konzentration und jeweiligem Genexpressionslevel eher als Hinweis zu verstehen und diesen möglichen Effekt in einer größeren Studienpopulation zu belegen.

Schlussendlich sei erwähnt, dass in unseren Migrationsexperimenten im Vergleich zu Marx et al. eine geringfügig größere Porengröße von 8 μm genutzt wurde und die Assays statt 3 Stunden nur 2,5 Stunden inkubierten (Marx et al. 2004). Jedoch sollte dies die fehlende Migration nicht erklären können, da die Zellen ebenfalls durch größere Poren migrieren können und ein geringer Effekt nach einer Inkubation von 2,5 Stunden bereits hätte erkennbar sein müssen, da die Positivkontrolle schließlich allzeit unseren Experimentaufbau validierte. Zusätzlich erfolgte die quantitative Bestimmung der Monozyten durchflusszytometrisch, bei Marx et al. hingegen lichtmikroskopisch. Unsere Vorgehensweise stellt eine objektive, häufig angewandte Methode dar und dürfte als Ursache der unterschiedlichen Ergebnisse nicht in Betracht gezogen werden.

6. Zusammenfassung

Zusammengefasst erbringt die Studie erstmalig den Nachweis, dass chronisch Nierenkranke eine höhere C-Peptid-Konzentration als Nierengesunde aufweisen, wobei sich chronisch Nierenkranke in verschiedenen Stadien der Niereninsuffizienz nicht voneinander unterscheiden. Letzteres kann eventuell den großen Streuungen zugerechnet werden. Jedoch wäre es entgegen der Erwartungen möglich, dass die C-Peptid-Konzentration im Falle einer verminderten Nierenfunktion nicht in Abhängigkeit vom Stadium der Niereninsuffizienz zunimmt, stattdessen könnte bereits eine maximale Retention des C-Peptids ab einer Niereninsuffizienz Stadium CKD III vorliegen. Weiterhin vergleicht die Studie erstmalig diabetische und nichtdiabetische chronisch Nierenkranke in verschiedenen Stadien mit nur nichtdiabetischen Nierengesunden als Kontrollgruppe. Die bisherige Erkenntnis, dass sich die C-Peptid-Konzentration bei diabetischen und nichtdiabetischen Dialysepatienten nicht unterscheidet, wurde bestätigt und darüber hinaus erstmalig auf Patienten im Stadium CKD 3-4 übertragen. Allerdings wiesen in beiden Gruppen Diabetiker geringere Mittelwerte auf als Nichtdiabetiker, deren Vergleich wegen großer Streuungen nicht signifikant blieb. Es lässt sich schlussfolgern, dass im untersuchten Kollektiv im Falle einer Niereninsuffizienz die C-Peptid-Konzentration solange nicht von einer zusätzlichen Erkrankung an Diabetes mellitus Typ 2 abhängt wie der Patient zu einer physiologischen C-Peptid-Produktion in der Lage ist. Diese Erkenntnisse sollten in folgenden Studien mit einem größeren Studienkollektiv verifiziert werden, bei dem alle Stadien der Niereninsuffizienz ausgewogen vorliegen und das Verhältnis von Diabetikern zu Nichtdiabetikern ausgeglichen ist.

Die durchflusszytometrische Analyse erbrachte ein vermehrtes Auftreten von den proinflammatorischen CD16⁺-Monozytensubgruppen Mo2 und Mo3 bei chronisch Nierenkranken. Die weitere Untersuchung der Oberflächenmoleküle der Monozytensubgruppen zeigte bei CD11a und CD36 teilweise geringfügig erhöhte und bei CX3CR1 überwiegend erhöhte Expressionen und -dichten, jedoch konnte kein systematischer Effekt festgestellt werden. Es wurden keine Hinweise auf eine Korrelation zwischen C-Peptid-Konzentration und systematischen Veränderungen von CD11a, CD36 und CX3CR1 festgestellt. Lediglich nichtdiabetische Dialysepatienten offenbarten negative Korrelationen zwischen C-Peptid-Konzentration und sowohl dem Anteil an CX3CR1⁺-Monozyten in Mo1 und Mo2 als auch der Expressionsdichte von CX3CR1 auf Mo1-3 und positive Korrelation zwischen C-Peptid-Konzentration und dem Anteil der CD36⁺-Monozyten in Mo3. Jegliche Effekte konnten in den anderen Gruppen jedoch nicht demonstriert werden.

Weiterhin war die mRNA-Expression von IL-1 β , CCL2, CX3CR1, TNF- α , TNFRSF-1A und TNFRSF-1B bei Nierenkranken nicht erhöht, allerdings wurde CASP1 und teilweise auch NRLP3 bei Nierenkranken auf Genebene geringfügig verstärkt exprimiert. Insgesamt wurde

jedoch keine Korrelation zwischen der C-Peptid-Konzentration und den Gen-Expressionsleveln für CASP1, IL-1 β , NLRP3, CCL2, CX3CR1, TNF- α , TNFRSF-1A und TNFRSF-1B festgestellt.

Darüber hinaus konnte jedoch keine Migration der Monozyten in vitro mit 1 nM C-Peptid als chemotaktischer Stimulus bestätigt werden, lediglich bei einer C-Peptid-Konzentration von 60000 nM wurde eine geringe Migration der Monozyten festgestellt.

Die Annahme, dass das C-Peptid chemotaktisch aktiv sei, Monozyten in Entzündungsmilieus anlocke und so die Grundlage für atherosklerotische Plaques bilde, konnte mit dieser Studie somit nicht bestätigt werden. Neben dem fehlenden Migrationseffekt in vitro begründet sich dies vor allem in den fehlenden Veränderungen der Oberflächenmoleküle der Monozyten und der Genexpressionen, die jeweils mit Adhäsion, Entzündung und Migration im Zusammenhang stehen. Die teils nur geringfügig ausgeprägten Effekte stehen allerdings im Einklang mit der Heterogenität der bisherigen Studienlage des C-Peptids bei Diabetes mellitus Typ 2. Dementsprechend bleibt weiterhin die Frage nach den möglicherweise durch das C-Peptid hoch regulierten Oberflächenproteinen auf Monozyten offen, um eine aktive Rolle des C-Peptids bei der Migration der Monozyten in den Inflammations- und Atheroskleroseprozess zu stützen.

Im Hinblick auf die theoretische Rolle des C-Peptids im Prozess der Atherosklerose ist es für weitere Studien wünschenswert neben C-Peptid- auch Insulin-Konzentration, Lipidprofil und metabolische Werte von Nierenkranken zu ermitteln, um weitere Zusammenhänge zu erkennen.

7. Literaturverzeichnis

- Ancuta, Petronela; Rao, Ravi; Moses, Ashlee; Mehle, Andrew; Shaw, Sunil K.; Luscinskas, F. William; Gabuzda, Dana (2003): Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes. In: *The Journal of experimental medicine* 197 (12), S. 1701–1707.
- Belge, K.-U.; Dayyani, F.; Horelt, A.; Siedlar, M.; Frankenberger, M.; Frankenberger, B. et al. (2002): The Proinflammatory CD14+CD16+DR++ Monocytes Are a Major Source of TNF. In: *The Journal of Immunology* 168 (7), S. 3536–3542.
- Bo, S.; Gentile, L.; Castiglione, A.; Prandi, V.; Canil, S.; Ghigo, E.; Ciccone, G. (2012): C-peptide and the risk for incident complications and mortality in type 2 diabetic patients: a retrospective cohort study after a 14-year follow-up. In: *European journal of endocrinology* 167 (2), S. 173–180.
- Collins, Allan J.; Foley, Robert N.; Gilbertson, David T.; Chen, Shu-Cheng (2015): United States Renal Data System public health surveillance of chronic kidney disease and end-stage renal disease. In: *Kidney international supplements* 5 (1), S. 2–7.
- Cotter, M. A.; Ekberg, K.; Wahren, J.; Cameron, N. E. (2003): Effects of Proinsulin C-Peptide in Experimental Diabetic Neuropathy. Vascular Actions and Modulation by Nitric Oxide Synthase Inhibition. In: *Diabetes* 52 (7), S. 1812–1817.
- Covic, A. M.; Schelling, J. R.; Constantiner, M.; Iyengar, S. K.; Sedor, J. R. (2000): Serum C-peptide concentrations poorly phenotype type 2 diabetic end-stage renal disease patients. In: *Kidney Int.* 58 (4), S. 1742–1750.
- Di Mauro, M.; Papalia, G.; Le Moli, R.; Nativo, B.; Nicoletti, F.; Lunetta, M. (2001): Effect of octreotide on insulin requirement, hepatic glucose production, growth hormone, glucagon and c-peptide levels in type 2 diabetic patients with chronic renal failure or normal renal function. In: *Diabetes Research and Clinical Practice* 51 (1), S. 45–50.
- Djemli-Shipkolye, A.; Gallice, P.; Coste, T.; Jannot, M. F.; Tsimaratos, M.; Raccach, D.; Vague, P. (2000): The effects ex vivo and in vitro of insulin and C-peptide on Na/K adenosine triphosphatase activity in red blood cell membranes of type 1 diabetic patients. In: *Metabolism: clinical and experimental* 49 (7), S. 868–872.
- Executive summary. United States Renal Data System 1999 Annual Data Report (1999). In: *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 34 (2 Suppl 1), S. 9-19.

- Ferrer, Lucas M.; Monroy, Alexandra M.; Lopez-Pastrana, Jahaira; Nanayakkara, Gayani; Cueto, Ramon; Li, Ya-Feng et al. (2016): Caspase-1 Plays a Critical Role in Accelerating Chronic Kidney Disease-Promoted Neointimal Hyperplasia in the Carotid Artery. In: *Journal of cardiovascular translational research* 9 (2), S. 135–144.
- Foley, R. N.; Culeton, B. F.; Parfrey, P. S.; Harriett, J. D.; Kent, G. M.; Murray, D. C.; Barre, Paul E. (1997): Cardiac disease in diabetic end-stage renal disease. In: *Diabetologia* 40 (11), S. 1307–1312.
- Foley, R. N.; Parfrey, P. S. (1999): The Clinical Epidemiology of Cardiac Disease in Chronic Renal Failure. In: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 10 (7).
- Forst, T.; Kunt, T.; Wilhelm, B.; Weber, M. M.; Pfützner, A. (2008): Role of C-Peptide in the Regulation of Microvascular Blood Flow. In: *Experimental diabetes research* 2008, S. 176245.
- Fox, Caroline S.; Coady, Sean; Sorlie, Paul D.; D'Agostino, Ralph B.; Pencina, Michael J.; Vasan, Ramachandran S. et al. (2007): Increasing cardiovascular disease burden due to diabetes mellitus. The Framingham Heart Study. In: *Circulation* 115 (12), S. 1544–1550.
- Frankenberger, M.; Sternsdorf, T.; Pechumer, H.; Pforte, A.; Ziegler-Heitbrock, L. (1996): Differential Cytokine Expression in Human Blood Monocyte Subpopulations: A Polymerase Chain Reaction Analysis. In: *Blood* 87 (1).
- Gabriel, H.; Urhausen, A.; Brechtel, L.; Müller, H. J.; Kindermann, W. (1994): Alterations of regular and mature monocytes are distinct, and dependent of intensity and duration of exercise. In: *European journal of applied physiology and occupational physiology* 69 (2), S. 179–181.
- Geissmann, Frederic; Auffray, Cedric; Palframan, Roger; Wirrig, Christiane; Ciocca, Alice; Campisi, Laura et al. (2008): Blood monocytes: distinct subsets, how they relate to dendritic cells, and their possible roles in the regulation of T-cell responses. In: *Immunology and Cell Biology* 86, S. 398–408.
- Gerrity, R. G.; Naito, H. K.; Richardson, M.; Schwartz, C. J. (1979): Dietary Induced Atherogenesis in Swine. Morphology of the Intima in Prelesion Stages. In: *The American journal of pathology* 95 (3), S. 775–792.
- Go, A. S.; Chertow, G. M.; Fan, D.; McCulloch, C. E.; Hsu, C. Y. (2004): Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. In: *The New England Journal of Medicine* 351 (13), S. 1296–1305.
- Granata, Simona; Masola, Valentina; Zoratti, Elisa; Scupoli, Maria Teresa; Baruzzi, Anna; Messa, Michele et al. (2015): NLRP3 inflammasome activation in dialyzed chronic kidney disease patients. In: *PloS one* 10 (3), e0122272.

- Haidet, Jaime; Cifarelli, Vincenza; Trucco, Massimo; Luppi, Patrizia (2012): C-peptide reduces pro-inflammatory cytokine secretion in LPS-stimulated U937 monocytes in condition of hyperglycemia. In: *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]* 61 (1), S. 27–35.
- Hanefeld, M.; Fischer, S.; Schmechel, H.; Rothe, G.; Schulze, J.; Dude, H. et al. (1991): Diabetes Intervention Study. Multi-intervention trial in newly diagnosed NIDDM. In: *Diabetes care* 14 (4), S. 308–317.
- Hansson, G. K. (2005): Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. In: *The New England Journal of Medicine* 352 (16), S. 1685-95.
- Heine, G. H.; Ulrich, C.; Seibert, E.; Seiler, S.; Marell, J.; Reichart, B. et al. (2008): CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes but not total monocyte numbers predict cardiovascular events in dialysis patients. In: *Kidney international* 73 (5), S. 622–629.
- Henriksson, M.; Pramanik, A.; Shafqat, J.; Zhong, Z.; Tally, M.; Ekberg, K. et al. (2001): Specific binding of proinsulin C-peptide to intact and to detergent-solubilized human skin fibroblasts. In: *Biochemical and biophysical research communications* 280 (2), S. 423–427.
- Ido, Y.; Vindigni, A.; Chang, K.; Stramm, L.; Chance, R.; Heath, W. F. et al. (1997): Prevention of Vascular and Neural Dysfunction in Diabetic Rats by C-Peptide. In: *Science (New York, N.Y.)* 277, S. 563–566.
- Inukai, T.; Matsutomo, R.; Tayama, K.; Aso, Y.; Takemura, Y. (1999): Relation between the serum level of C-peptide and risk factors for coronary heart disease and diabetic microangiopathy in patients with type-2 diabetes mellitus. In: *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association* 107 (1), S. 40–45.
- Johansson, B. L.; Borg, K.; Fernqvist-Forbes, E.; Kernell, A.; Odergren, T.; Wahren, J. (2000): Beneficial effects of C-peptide on incipient nephropathy and neuropathy in patients with Type 1 diabetes mellitus. In: *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* 17 (3), S. 181–189.
- Kim, Bo-Yeon; Jung, Chan-Hee; Mok, Ji-Oh; Kang, Sung-Koo; Kim, Chul-Hee (2012): Association between serum C-peptide levels and chronic microvascular complications in Korean type 2 diabetic patients. In: *Acta diabetologica* 49 (1), S. 9–15.
- King, G. L.; Buzney, S. M.; Kahn, C. R.; Hetu, N.; Buchwald, S.; Macdonald, S. G.; Rand, L. I. (1983): Differential responsiveness to insulin of endothelial and support cells from micro- and macrovessels. In: *J. Clin. Invest.* 71 (4), S. 974–979.

- Kitabchi, Abbas E. (1977): Proinsulin and C-peptide. A review. In: *Metabolism* 26 (5), S. 547–587.
- Kitamura, T.; Kimura, K.; Jung, B. D.; Makondo, K.; Okamoto, S.; Cañas, X. et al. (2001): Proinsulin C-peptide rapidly stimulates mitogen-activated protein kinases in Swiss 3T3 fibroblasts: requirement of protein kinase C, phosphoinositide 3-kinase and pertussis toxin-sensitive G-protein. In: *Biochemical Journal* 355 (Pt1), S. 123–129.
- Kitamura, T.; Kimura, K.; Makondo, K.; Furuya, D. T.; Suzuki, M.; Yoshida, T.; Saito, M. (2003): Proinsulin C-peptide increases nitric oxide production by enhancing mitogen-activated protein-kinase-dependent transcription of endothelial nitric oxide synthase in aortic endothelial cells of Wistar rats. In: *Diabetologia* 46 (12), S. 1698–1705.
- Klag Michael J.; Whelton Paul K.; Randall Bryan L.; Neaton James D.; Brancati Frederick L.; Ford Charles E. et al. (1996): Blood Pressure and End-Stage Renal Disease in Men. In: *The New England Journal of Medicine* 334 (1).
- Kunkel, E. J.; Jung, U.; Ley, K. (1997): TNF-alpha induces selectin-mediated leukocyte rolling in mouse cremaster muscle arterioles. In: *The American journal of physiology* 272 (3 Pt 2), S. 1391-400.
- Luppi, P.; Cifarelli, V.; Tse, H.; Piganelli, J.; Trucco, M. (2008): Human C-peptide antagonises high glucose-induced endothelial dysfunction through the nuclear factor-kappaB pathway. In: *Diabetologia* 51 (8), S. 1534–1543.
- Marx, Nikolaus; Walcher, Daniel; Raichle, Claudia; Aleksic, Milos; Bach, Helga; Grüb, Miriam et al. (2004): C-peptide colocalizes with macrophages in early arteriosclerotic lesions of diabetic subjects and induces monocyte chemotaxis in vitro. In: *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24 (3), S. 540–545.
- Mavrakanas, Thomas; Frachebois, Claire; Soualah, Arezki; Aloui, Fadhela; Julier, Ingrid; Bastide, Dominique (2009): C-peptide and chronic complications in patients with type-2 diabetes and the metabolic syndrome. In: *La Presse Médicale* 38 (10), S. 1399–1403.
- Merino, Ana; Buendia, Paula; Martin-Malo, Alejandro; Aljama, Pedro; Ramirez, Rafael; Carracedo, Julia (2011): Senescent CD14+CD16+ monocytes exhibit proinflammatory and proatherosclerotic activity. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 186 (3), S. 1809–1815.
- Napoli, C.; D'Armiento, F. P.; Mancini, F. P.; Postiglione, A.; Witzum, J. L.; Palumbo, G.; Palinski, W. (1997): Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxi-

- dation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. In: *The Journal of clinical investigation* 100 (11), S. 2680–2690.
- Nockher, W. A.; Scherberich, J. E. (1998): Expanded CD14+ CD16+ Monocyte Subpopulation in Patients with Acute and Chronic Infections Undergoing Hemodialysis. In: *Infection and Immunity* 66 (6).
- Ocak, Gurbey; Vossen, Carla Y.; Rotmans, Joris I.; Lijfering, Willem M.; Rosendaal, Frits R.; Parlevliet, Karien J. et al. (2011): Venous and arterial thrombosis in dialysis patients. In: *Thrombosis and haemostasis* 106 (6), S. 1046–1052.
- Ohtomo, Y.; Aperia, A.; Sahlgren, B.; Johansson, B. L.; Wahren, J. (1996): C-peptide stimulates rat renal tubular Na⁺, K(+)-ATPase activity in synergism with neuropeptide Y. In: *Diabetologia* 39 (2), S. 199–205.
- Passlick, B.; Flieger, D.; Ziegler-Heitbrock, H. W. (1989): Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. In: *Blood* 74 (7), S. 2527–2534.
- Patiño, R.; Ibarra, J.; Rodriguez, A.; Yagüe, M. R.; Pintor, E.; Fernandez-Cruz, A.; Figueredo, A. (2000): Circulating monocytes in patients with diabetes mellitus, arterial disease, and increased CD14 expression. In: *The American journal of cardiology* 85 (11), S. 1288–1291.
- Phan, Kevin; Au, Cheryl; Mitchell, Paul; Liew, Gerald; Plant, Adam J. H.; Wang, Sarah B. et al. (2016): Chronic kidney disease and the severity of coronary artery disease and retinal microvasculature changes: a cross-sectional study. In: *Journal of thoracic disease* 8 (8), S. 2111–2114.
- Pikkemaat, M.; Melander, O.; Mölstad, S.; Garberg, G.; Bostroö, K. B. (2015): C-peptide concentration, mortality and vascular complications in people with Type 2 diabetes. The Skaraborg Diabetes Register. In: *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* 32 (1), S. 85–89.
- Polonsky, K. S.; Licinio-Paixao, J.; Given, B. D.; Pugh, W.; Rue, P.; Galloway, J. et al. (1986): Use of biosynthetic human C-peptide in the measurement of insulin secretion rates in normal volunteers and type I diabetic patients. In: *The Journal of clinical investigation* 77 (1), S. 98–105.
- Primatesta, Paola; Allender, Steven; Ciccarelli, Paola; Doring, Angela; Graff-Iversen, Sidsel; Holub, Jiri et al. (2007): Cardiovascular surveys: manual of operations. In: *European journal of cardiovascular prevention and rehabilitation : official journal of the European Society of Cardiology, Working Groups on Epidemiology & Prevention and Cardiac Rehabilitation and Exercise Physiology* 14 (Suppl 3), S. 43-61.
- Ramírez, Rafael; Carracedo, Julia; Merino, Ana; Soriano, Sagrario; Ojeda, Raquel; Alvarez-Lara, Maria Antonia et al. (2011): CD14+CD16+ monocytes from chronic kidney disease pa-

tients exhibit increased adhesion ability to endothelial cells. In: *Contributions to nephrology* 171, S. 57–61.

Rigler, R.; Pramanik, A.; Jonasson, P.; Kratz, G.; Jansson, O. T.; Nygren, P.-Å et al. (1999): Specific binding of proinsulin C-peptide to human cell membranes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (23), S. 13318–13323.

Rogacev, Kyrill S.; Cremers, Bodo; Zawada, Adam M.; Seiler, Sarah; Binder, Nadine; Ege, Philipp et al. (2012): CD14++CD16+ monocytes independently predict cardiovascular events: a cohort study of 951 patients referred for elective coronary angiography. In: *Journal of the American College of Cardiology* 60 (16), S. 1512–1520.

Rogacev, Kyrill S.; Seiler, Sarah; Zawada, Adam M.; Reichart, Birgit; Herath, Esther; Roth, Daniel et al. (2011): CD14++CD16+ monocytes and cardiovascular outcome in patients with chronic kidney disease. In: *European heart journal* 32 (1), S. 84–92.

Ross, R. (1999): Atherosclerosis--an inflammatory disease. In: *The New England Journal of Medicine* 340 (2), S. 115–126.

Ross, R.; Glomset, J. A. (1973): Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell. Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. In: *Science (New York, N.Y.)* 180 (4093), S. 1332–1339.

Sari, Ramazan; Balci, Mustafa Kemal (2005): Relationship between C peptide and chronic complications in type-2 diabetes mellitus. In: *Journal of the National Medical Association* 97 (8), S. 1113–1118.

Schlitt, Axel; Heine, Gunnar H.; Blankenberg, Stefan; Espinola-Klein, Christine; Doppeide, Joern F.; Bickel, Christoph et al. (2004): CD14+CD16+ monocytes in coronary artery disease and their relationship to serum TNF-alpha levels. In: *Thrombosis and haemostasis* 92 (2), S. 419–424.

Shen, Jerry; Yin, Ying; Mai, Jietang; Xiong, Xinyu; Pansuria, Meghana; Liu, Jingshan et al. (2010): Caspase-1 recognizes extended cleavage sites in its natural substrates. In: *Atherosclerosis* 210 (2), S. 422–429.

Smith, J. D.; Trogan, E.; Ginsberg, M.; Grigaux, C.; Tian, J.; Miyata, M. (1995): Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92 (18), S. 8264–8268.

Steiner, D. F.; Cunningham, D.; Spigelman, L.; Aten, B. (1967): Insulin biosynthesis. Evidence for a precursor. In: *Science (New York, N.Y.)* 157 (3789), S. 697–700.

- Sun, Yijuan; Scavini, Marina; Orlando, Robert A.; Murata, Glen H.; Servilla, Karen S.; Tzamaloukas, Antonios H. et al. (2010): Increased CD36 expression signals monocyte activation among patients with type 2 diabetes. In: *Diabetes care* 33 (9), S. 2065–2067.
- Sunderkötter, C.; Nikolic, T.; Dillon, M. J.; van Rooijen, N.; Stehling, M.; Drevets, D. A.; Leenen, P. J. M. (2004): Subpopulations of Mouse Blood Monocytes Differ in Maturation Stage and Inflammatory Response. In: *The Journal of Immunology* 172 (7), S. 4410–4417.
- Swirski, Filip K.; Nahrendorf, Matthias; Etzrodt, Martin; Wildgruber, Moritz; Cortez-Retamozo, Virna; Panizzi, Peter et al. (2009): Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. In: *Science (New York, N.Y.)* 325 (5940), S. 612–616.
- Tacke, Frank; Alvarez, David; Kaplan, Theodore J.; Jakubzick, Claudia; Spanbroek, Rainer; Llodra, Jaime et al. (2007): Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. In: *The Journal of clinical investigation* 117 (1), S. 185–194.
- Tallone, Tiziano; Turconi, Giovanna; Soldati, Gianni; Pedrazzini, Giovanni; Moccetti, Tiziano; Vassalli, Giuseppe (2011): Heterogeneity of human monocytes: an optimized four-color flow cytometry protocol for analysis of monocyte subsets. In: *Journal of cardiovascular translational research* 4 (2), S. 211–219.
- Thieblemont, N.; Weiss, L.; Sadeghi, H. M.; Estcourt, C.; Haeffner-Cavaillon, N. (1995): CD14^{low}CD16^{high}. A cytokine-producing monocyte subset which expands during human immunodeficiency virus infection. In: *European journal of immunology* 25 (12), S. 3418–3424.
- Thorlacius, H.; Lindbom, L.; Raud, J. (1997): Cytokine-induced leukocyte rolling in mouse cremaster muscle arterioles in P-selectin dependent. In: *The American journal of physiology* 272 (4 Pt 2), H1725-9.
- Ulrich, C.; Heine, G. H.; Gerhart, M. K.; Köhler, H.; Girndt, M. (2008): Proinflammatory CD14⁺CD16⁺ monocytes are associated with subclinical atherosclerosis in renal transplant patients. In: *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 8 (1), S. 103–110.
- Wahren, John; Kallas, Åsa; Sima, Anders A. F. (2012): The clinical potential of C-peptide replacement in type 1 diabetes. In: *Diabetes* 61 (4), S. 761–772.
- Walcher, Daniel; Babiak, Christina; Poletsek, Paulina; Rosenkranz, Stephan; Bach, Helga; Betz, Susanne et al. (2006): C-Peptide induces vascular smooth muscle cell proliferation. Involvement of SRC-kinase, phosphatidylinositol 3-kinase, and extracellular signal-regulated kinase 1/2. In: *Circulation research* 99 (11), S. 1181–1187.

Wild, S.; Roglic, G.; Green, A.; Sicree, R.; King, H. (2004): Global Prevalence of Diabetes. Estimates for the Year 2000 and Projections for 2030: Response to Wild et al. In: *Diabetes care* 27 (5), S. 1047–1053.

Woollard, Kevin J.; Geissmann, Frederic (2010): Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions. In: *Nature reviews. Cardiology* 7 (2), S. 77–86.

Zheng, Y.; Cai, G. Y.; Chen, X. M.; Fu, P.; Chen, J. H.; Ding, X. Q. et al. (2013): Prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension in the non-dialysis chronic kidney disease patients. In: *Chinese medical journal* 126 (12), S. 2276–2280.

Ziegler-Heitbrock, H. W. Loems; Fingerle, G.; Ströbel, M.; Schraut, W.; Stelter, F.; Schütt, C. et al. (1993): The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages. In: *European journal of immunology* 23 (9), S. 2053–2058.

Ziegler-Heitbrock, Loems (2007): The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. In: *Journal of leukocyte biology* 81 (3), S. 584–592.

Ziegler-Heitbrock, Loems; Ancuta, Petronela; Crowe, Suzanne; Dalod, Marc; Grau, Veronika; Hart, Derek N. et al. (2010): Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. In: *Blood* 116 (16), e74-80.

8. Thesen

- (1) Die Plasmakonzentration von C-Peptid ist bei chronisch Nierenkranken, sprich Dialysepatienten und Patienten mit Niereninsuffizienz Stadium CKD 3-4, höher als bei Nierengesunden. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied.
- (2) Die Plasmakonzentration von C-Peptid ist bei Dialysepatienten höher als bei Patienten mit Niereninsuffizienz Stadium CKD 3-4. Es zeigten sich zwar höhere Mittelwerte bei Dialysepatienten, jedoch blieb der Vergleich wegen großer Streuungen nicht signifikant.
- (3) Die Plasmakonzentration von C-Peptid unterscheidet sich zwischen diabetischen und nichtdiabetischen Patienten mit Niereninsuffizienz Stadium CKD 3-4 nicht. Es zeigten sich zwar höhere Mittelwerte bei nichtdiabetischen Patienten im Stadium CKD 3-4, jedoch blieb der Vergleich wegen großer Streuungen nicht signifikant.
- (4) Monozytäre Aktivierungsmarker für Adhäsion und Entzündung (CD11a, CD36, CX3CR1) sind bei chronisch Nierenkranken auf Proteinebene im Vergleich zu Nierengesunden erhöht und korrelieren mit den C-Peptid-Konzentrationen. Es zeigten sich teilweise geringfügig erhöhte Frequenzen und Expressionsdichten von CD11a, CD36 und CX3CR1 auf den Monozytensubpopulationen von chronisch Nierenkranken im Vergleich zu Nierengesunden. Allerdings handelte es sich stets um sehr geringe Werte ohne erkennbaren systematischen Effekt, zudem lag keine Korrelation zur C-Peptid-Konzentration vor.
- (5) Monozytäre Marker für Entzündung (TNF- α , TNFRSF-1A und TNFRSF-1B), Inflammationaktivität (CASP1, IL-1 β , NLRP3) und Migration (CCL2, CX3CR1) sind auf RNA-Ebene bei chronisch Nierenkranken im Vergleich zu Nierengesunden erhöht und korrelieren mit den C-Peptid-Konzentrationen. Insgesamt ergaben unsere Analysen keine handfesten Indizien, dass die untersuchten Marker im Zusammenhang mit der vorhandenen C-Peptid-Konzentration stehen.

Zusätzlich werden die erneut zu verifizierenden Hypothesen und deren Ergebnisse aufgelistet:

- (6) Bei chronisch Nierenkranken liegt eine höhere Rate an kardiovaskulären Ereignissen vor als bei Nierengesunden. Es zeigten sich signifikante Unterschiede für arterielle Hypertonie, Thrombose, KHK und Z.n. Koronarintervention, jedoch nicht für Myokardinfarkt, Schlaganfall, pAVK, LAE und Herzinsuffizienz.
- (7) Die C-Peptid-Konzentrationen unterscheiden sich zwischen diabetischen und nichtdiabetischen Dialysepatienten nicht. Es lagen keine signifikanten Unterschiede vor.

- (8) Die Anzahl der inflammatorischen CD16⁺-Monozyten ist bei chronisch Nierenkranken höher als bei Nierengesunden. Es lagen signifikante Unterschiede für CD16⁺-Monozyten (Mo2 und Mo3) vor, lediglich der Vergleich von Mo3 bei Patienten mit CKD 3-4 und Nierengesunden blieb statistisch nicht signifikant.
- (9) Monozyten migrieren in vitro durch C-Peptid als chemotaktischen Stimulus, wobei der maximale Migrationseffekt bei einer Konzentration von 1nM C-Peptid vorliegt. Der chemotaktische Einfluss des 1 nM C-Peptids auf die Monozyten konnte nicht nachgewiesen werden. Allerdings zeigte sich ein geringer stimulatorischer Effekt auf die Monozyten in der unphysiologischen Konzentration von 60000 nM C-Peptid.

9. Anlage

Patienteninformation und Einverständniserklärung

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient!

Wir bitten Sie um Teilnahme an einer wissenschaftlichen Studie, bei der wir mehr Erkenntnisse über die Folgekrankheiten bei chronisch Nierenkranken erarbeiten wollen. Wir wären für Ihre Unterstützung sehr dankbar.

Bei chronisch Nierenkranken kommt es häufig zu fortschreitenden Veränderungen der Blutgefäße durch Atherosklerose (Gefäßverkalkung und -verengung). Folgeerscheinungen können Herzinfarkt, Schlaganfall oder Durchblutungsstörungen der Beine sein. Bisher ist nicht vollständig bekannt, warum diese Folgekrankheiten gerade bei Nierenerkrankungen so häufig sind. Eine Hypothese besagt, dass die Atherosklerose durch körpereigene Eiweißstoffe begünstigt wird, die von gesunden Nieren ausgeschieden werden, bei Nierenkrankheit jedoch in hoher Konzentration im Blut verbleiben. Ein solcher Eiweißstoff ist das C-Peptid. Es entsteht bei der Produktion des Hormons Insulin durch die Bauchspeicheldrüse, seine Produktion ist normal. Beim Gesunden wird dieser Stoff jedoch rasch nach der Bildung wieder ausgeschieden. Bei Nierenkrankheit könnte er in hohen Konzentrationen im Blut vorhanden sein und Entzündungsmechanismen sowie Atherosklerose auslösen. Dies wollen wir in einer klinischen Studie untersuchen, um später möglicherweise neue Behandlungsmaßnahmen zu entwickeln.

Studienablauf

Wir planen, bei Ihnen einmalig ca. 24ml Blut für die wissenschaftliche Untersuchung abzunehmen. Diese Blutproben werden nur im Zusammenhang mit ohnehin notwendigen Blutentnahmen oder Shuntpunktionen abgenommen, sie werden also nicht zusätzlich gestochen. Wir werden im Blut die Konzentration von C-Peptid messen, die Eigenschaften der weißen Blutkörperchen bestimmen und testen, welchen Einfluss das Serum auf weiße Blutkörperchen in der Zellkultur hat. Außerdem werden – in pseudonymisierter Form – Informationen zu Ihrer Erkrankung und zu ihren Medikamenten aus den Krankenunterlagen erfasst. Die Ergebnisse werden dann mit denen nierengesunder bzw. nierenkranker Patienten verglichen.

Risiken

Die Risiken für Sie als Patienten sind in dieser Studie als sehr gering einzuschätzen. Trotzdem bitten wir Sie, diesen Abschnitt sorgfältig zu lesen. Die Blutentnahme erfolgt bei einer ohnehin notwendigen Blutentnahme oder Shuntpunktion. Eine Infektion ist bei sachgerechtem Vorgehen nicht zu erwarten. Ein relevanter Abfall des Blutfarbstoffs (Hämoglobin) oder des Blutdruckes ist aufgrund der sehr geringen Blutmenge nicht zu erwarten, jedoch potentiell möglich. Dennoch bitten wir Sie - auch nach Beendigung der Studie - bei Auftreten von Beschwerden jederzeit den Prüfarzt zu kontaktieren.

Rechte

Die bei dieser Studie erhobenen Daten zu Ihrer Person und Ihrer Erkrankung werden in einem Prüfbogen festgehalten, der nicht mit Ihrem Namen, sondern lediglich mit einer Kennziffer versehen ist. Der Prüfarzt kontrolliert die Daten. Vertreter der zuständigen Überwachungsbehörden erhalten auf Wunsch ebenfalls Einsicht in die Unterlagen. Wir garantieren Ihnen, dass Ihr Name

und Ihre Teilnahme sowie alle anderen Informationen streng vertraulich behandelt werden. Die kommerzielle Nutzung der Blutproben und der Daten wird ausgeschlossen.

Diese Studie wurde von einer Ethikkommission zustimmend bewertet. Die international geltenden Richtlinien für die Durchführung von Studien werden streng eingehalten.

Die Teilnahme ist freiwillig. Wenn Sie teilnehmen möchten, geben Sie dazu bitte Ihr schriftliches Einverständnis. Dieses können Sie während der Studie zu jedem Zeitpunkt zurückziehen und Ihre Studienteilnahme beenden. Wann immer Sie Fragen haben, wenden Sie sich bitte an Ihren Prüfarzt / ihre Prüferin. Sollten Sie nicht teilnehmen wollen oder später aus der Studie ausscheiden wollen, hat dies natürlich keinerlei Folgen für die weitere medizinische Betreuung.

Namen der Prüfarzte: PD Dr. Roman Fiedler, Prof. Dr. med. Girndt
Krankenhausadresse: Klinik für Innere Medizin II, Martin Luther-Universität Halle-Wittenberg
Telefon: 0345 557 2717

Ich, (Name), wurde umfassend von Herrn/Frau über die o.g. Studie informiert. Alle meine Fragen zur Studie wurden zu meiner Zufriedenheit beantwortet. Die Formulare „Patienteninformation“ und „Einverständniserklärung“ habe ich erhalten.

Ich verstehe meine Rechte und Verantwortlichkeiten als Teilnehmer an dieser Beobachtungsstudie und weiß, dass ich jederzeit und ohne Angabe von Gründen die Teilnahme widerrufen kann, ohne dass mir daraus irgendwelche Nachteile erwachsen. Weiterhin bin ich mit der Erhebung, Speicherung und Auswertung meiner personenbezogenen Daten in pseudonymisierter Form einverstanden.

Ich erkläre, aus eigenem und freiem Willen teilzunehmen und gewissenhaft mit dem Prüfarzt/der Prüferin und seinen Mitarbeitern zusammenzuarbeiten.

Ort..... Datum.....

Unterschrift der Probandin/ des Probanden

Unterschrift des Prüfarztes/ der Prüferin, der/die hiermit erklärt, die Studie gemäß dem vorgelegten Protokoll durchzuführen.

Ort..... Datum.....

Unterschrift der Prüferin/ des Prüfarztes

10. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit direkt oder indirekt verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Die Regeln guter wissenschaftlicher Praxis, die aktuellen gesetzlichen Vorgaben in Bezug auf die Zulassung der klinischen Studien und die allgemeinen Datenschutzbestimmungen wurden eingehalten.

Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar eine Vergütung oder geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt.

Halle (Saale), den

Veronika Bode

11. Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit erkläre ich, dass ich bisher keine Promotionsversuche unternommen habe. Weder diese noch eine andere Dissertationsschrift wurde von mir an anderen Institutionen bzw. an einer anderen medizinischen Fakultät zu Promotionszwecken eingereicht.

Halle (Saale), den

Veronika Bode

12. Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name, Vorname: Bode, Veronika
Geburtsdatum, -ort: 07.11.1991, Braunschweig
Familienstand: ledig, keine Kinder
Nationalität: deutsch

Schulischer Werdegang:

Grundschule: Grundschule Querum Nord, Braunschweig (1997-2001)
Orientierungsstufe: Orientierungsstufe Gliesmarode, Braunschweig (2001-2003)
Gymnasium: Gaußschule Gymnasium am Löwenwall, Braunschweig
(2003-2010)

- Auslandsaufenthalt am Lord Wandsworth College, Long Sutton, Hook, Großbritannien (09/2007-04/2008)
- Abitur: Note: 1,4 (22.06.2010)

Universitärer Werdegang:

2010-2011 Studium der Psychologie an der Georg-August-Universität
Göttingen

2011-2018 Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg

- Erstes Staatsexamen: Note 2,0 (17.09.2013)
- Famulaturen in den Bereichen: Innere Medizin (9 Wochen),
Allgemeinmedizin (4 Wochen), Neurologie (2 Wochen),
Augenheilkunde (2 Wochen)
- Zweites Staatsexamen: Note: 2,0 (13.10.2016)

- Praktisches Jahr:
 - Augenheilkunde, Universitätsklinikum Halle(Saale)
(05/17-09/17)
 - Innere Medizin, Städtisches Klinikum Wolfenbüttel
(09/17-12/17)
 - Chirurgie, Klinikum Osnabrück
(12/17-04/18)
- Drittes Staatsexamen: Note 1,0 (03.05.2018)

Halle (Saale), den

Veronika Bode

13. Danksagung

Hiermit möchte ich folgenden Personen danken, die mich bei der Bearbeitung unterstützt haben:

An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Matthias Girndt, für die Ermöglichung der Promotion, der Vergabe des attraktiven Themas und der jederzeit angenehmen Betreuung.

Mein besonderer Dank gilt dem Betreuer meiner Arbeit, Herrn Dr. rer. nat. Christof Ulrich. Er hat sich in sehr hohem Maße für mich engagiert, Ratschläge erteilt und durch sein konstruktives Korrekturlesen bei der Abschließung der Promotion geholfen. Herzlichen Dank für die enorm freundliche Atmosphäre und die vollkommene, stetige Unterstützung.

Vielen Dank an PD Dr. Roman Fiedler, Oberarzt für Innere Medizin II, für die Betreuung der Arbeit im KfH-Nierenzentrum (Dialysezentrum) Halle.

Ein großer Dank gebührt Herrn Dr. rer. medic. Trojanowicz, Frau Manuela Hajri und Frau Beate Heinze für die großartige Einarbeitung und Unterstützung im Labor.

Weiterhin bedanke ich mich beim gesamten Team des KfH-Nierenzentrums Halle, der nephrologischen Ambulanz und der Stationen 3,5,7 und IKL des Universitätsklinikums Halle (Saale).

Schließlich möchte ich mich von ganzem Herzen bei meiner Familie bedanken, die mir nicht nur das Studium ermöglicht, sondern mir überdies auch beständige Zuversicht, Fürsorge und Rückhalt zukommen lässt. Dafür bin ich unendlich dankbar.