

Aus der Klinik für Nieren- und Hochdruckkrankheiten  
(Direktor: Prof. Dr. K. H. Neumann)  
der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Expressionsmuster ausgewählter Oberflächenmarker peripherer  
mononukleärer Zellen bei Hämodialysepatienten nach Hepatitis-B-Impfung  
und unter dem Einfluss von rekombinantem Erythropoietin (rhEPO)

**Dissertation**  
**zur Erlangung des Doktorgrades**  
**Dr. med.**  
**(doctor medicinae)**

an der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Stefan Wahlstab  
geb. 24.11.1975 in Magdeburg  
Hohendodeleben 2008

## Dokumentationsblatt

### Bibliographische Beschreibung

Wahlstab, Stefan:

Expressionsmuster ausgewählter Oberflächenmarker peripherer mononukleärer Zellen bei Hämodialysepatienten nach Hepatitis-B-Impfung und unter dem Einfluss von rekombinantem Erythropoietin (rhEPO) -2008-  
74 Bl.: 26 Abb., 9 Tab.

### Kurzreferat

Hämodialysepatienten weisen im Vergleich zur Normalbevölkerung Veränderungen des Immunsystems, z.B. eine verminderte Impfansprechrates nach einer Hepatitis B-Impfung, auf. In den neunziger Jahren zeigten mehrere Studien, dass Erythropoietin, welches zur Therapie der renalen Anämie eingesetzt wird, eine immunmodulatorische Potenz besitzt. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Wirkung von Erythropoietin auf die Expression von ausgewählten Oberflächenmarkern auf peripheren mononukleären Zellen (PMNZ) von Hämodialysepatienten und einer gesunden Kontrollgruppe zu untersuchen. Wir unterschieden die Patientengruppen anhand des Impferfolges nach einer Hepatitis B-Impfung in Responder und Nonresponder. Ein weiteres Differenzierungsmerkmal war die therapeutische Gabe von Erythropoietin an der Dialyse. Die Messung der Zellen erfolgte am Tag der Blutentnahme im Durchflusszytometer. Weitere Messungen führten wir nach Inkubation mit rhEPO und PWM durch. Unsere Ergebnisse weisen auf einen modulierenden Einfluss von Erythropoietin auf verschiedene Zellen des Immunsystems hin.

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1 Einführung</b>	<b>1</b>
1.1. Hepatitis B	2
1.2. Veränderungen der humoralen Immunantwort von Hämodialysepatienten	3
1.2.1. B-Lymphozyten	4
1.2.2. T-Lymphozyten	4
1.2.3. Monozyten	5
1.2.4. NK-Zellen	6
1.3. Erythropoietin	7
1.4. Erythropoietin zur Behandlung der renalen Anämie	7
1.5. Erythropoietin - ein pluripotentes Hormon	8
<b>2 Aufgabenstellung</b>	<b>10</b>
<b>3 Material und Methodik</b>	<b>11</b>
3.1. Hämodialysepatienten	11
3.1.1. Responder mit Erythropoietin	11
3.1.2. Responder ohne Erythropoietin	11
3.1.3. Nonresponder mit Erythropoietin	12
3.1.4. Nonresponder ohne Erythropoietin	12
3.2. Kontrollgruppe	12
3.3. Blutentnahme und Verarbeitung der Blutproben	12
3.4. Bestimmung des Differentialblutbildes	12
3.5. Bestimmung des Immunstatus	13
3.6. Separation der PMNZ durch Dichtegradientenzentrifugation	13
3.7. Vorbereiten der Kulturansätze	14
3.8. Vorbereitung und Messung der separierten PMNZ mit Hilfe der Durchflusszytometrie	15
3.8.1. Vorbereitung für Tag 0	15
3.8.2. Vorbereitung für Tag 1 bis 3	15
3.8.3. Inkubation	15
3.9. Statistik	16

<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>17</b>
4.1.	Klinische Charakterisierung der Patienten	17
4.1.1.	Ätiologie der terminalen Niereninsuffizienz im Patientenkollektiv	17
4.2.	Gruppenunterschiede zum Zeitpunkt der Blutentnahme	18
4.2.1.	Differentialblutbild	18
4.2.2.	Messung im Vollblut	20
4.2.2.1.	T-Lymphozyten	20
4.2.2.2.	B-Lymphozyten	22
4.2.2.3.	Monozyten	22
4.2.2.4.	NK-Zellen	23
4.2.2.5.	Aktivierungsmarker	23
4.2.3.	Messung nach Isolierung der PMNZ	25
4.2.3.1.	T-Lymphozyten	25
4.2.3.2.	B-Lymphozyten	25
4.2.3.3.	Monozyten	26
4.2.3.4.	NK-Zellen	26
4.2.3.5.	Aktivierungsmarker	27
4.3.	In vitro-Untersuchungen an Zellkulturen mit PMNZ nach Zugabe von Pokeweed-Mitogen und definierter Konzentrationen von Erythropoietin	29
4.3.1.	T-Zellen	29
4.3.2.	B-Zellen	31
4.3.3.	Monozyten	31
4.3.4.	NK-Zellen	32
4.3.5.	Aktivierungsmarker	32
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>38</b>
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>51</b>
<b>7.</b>	<b>Tabellenanhang</b>	<b>53</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>61</b>

## Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
AK-Titer	Antikörpertiter
APZ	Antigen präsentierende Zellen
Anti-HBs	Antikörper gegen Hepatitis-B-surface-Antigen
Bcl-2	B-Zell-Lymphoma-Gen-2
BFU	Erythropoetische Vorläuferzelle (engl. burst forming units)
BZR	B-Zell-Rezeptor
CD	Differenzierungsantigen (engl. cluster of differentiation)
CFU	Erythropoetische Vorläuferzelle (engl. colony forming units.)
CRP	C-reaktives Protein
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure (engl. ethylene diamine tetraacetic acid)
rhEPO	Rekombinantes humanes Erythropoietin
FACS	Durchflusszytometrie (engl. fluorescence-activated cell sorter)
Fc-Rezeptor	Rezeptor für die konstante Region der Immunglobuline (frz. fragment crystalline)
FcγRIII (CD16)	Rezeptor für Fc-Fragment von IgG
FCS	fötales Kälberserum (engl. fetal calf serum)
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GN	Glomerulonephritis
Gpt/l	Gigapartikel pro Liter
Hb	Hämoglobin
HBcAg	Hepatitis B-Kern-(engl. core) Antigen
HBeAg	Hepatitis B-e-Antigen (kryptische Form des HBcAG)
HBsAg	Hepatitis B-Oberflächen-(engl. surface) Antigen
HD	Hämodialyse
HIF	Hypoxie-indizierbarer-Faktor (engl. hypoxia-inducible-factor)
HLA-DR	Humanes Leukozytenantigen-DR (engl. human leucocyte antigen)
IE/l	Internationale Einheiten pro Liter
IFN-α	Interferon alpha

IFN-β	Interferon beta
IFN-γ	Interferon gamma
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. major histocompatibility complex)
m-RNA	Boten-Ribonukleinsäure (engl. messenger ribonucleic acid)
N	Anzahl der Patienten / Probanden
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (engl. phosphate buffered saline)
PHA	Phythämagglutinin
PMNZ	Periphere mononukleäre Zellen
PN	Pyelonephritis
PTH	Parathormon
PWM	Pokeweed-Mitogen
rhEPO	Rekombinantes humanes Erythropoietin
RPMI	Kulturmedium (engl. Roswell Park Memorial Institute)
TCR	T-Zell-Rezeptor (engl. T cell receptor)
TH	T-Helferzellen
TNF-α	Tumor-Nekrose-Faktor alpha

# 1. Einführung

Die Hämodialyse stellt vor der Peritonealdialyse und der Nierentransplantation das mit Abstand am häufigsten genutzte Verfahren in Deutschland zur Nierenersatztherapie dar. Im Jahr 2003 wurden 55871 Patienten mit der Hämodialyse und 2708 Patienten mittels Peritonealdialyse behandelt. Die Zahl der in Nachsorge befindlichen nierentransplantierten Patienten betrug 19702. Das Durchschnittsalter der dialysepflichtigen Patienten stieg von 59 Jahren 1996 auf 64 Jahre im Jahr 2003 an. Die häufigsten Ursachen der Niereninsuffizienz waren der Diabetes mellitus, die Glomerulonephritis, die interstitielle Nephritis, die vaskuläre Nephropathie sowie Zystennieren. Im Vergleich zu 1996 weist sowohl die diabetische als auch die vaskuläre Nephropathie eine Zunahme der Inzidenz auf, während die anderen Ursachen leicht abnehmen (Frei et al. 2003/2004).

Zu den häufigsten Todesursachen bei Patienten mit dialysepflichtiger Niereninsuffizienz zählen nach kardiovaskulären Erkrankungen, welche etwa 50 Prozent der Todesfälle ausmachen (Gurland et al. 1973, Degoulet et al. 1982, Disney 1990), Infektionen mit ca. 16 Prozent (Keane et al. 1989, U.S. Renal Data System 1998, Frei et al. 2003/2004). Im Vergleich dazu verstirbt nur gut 1 Prozent der Normalbevölkerung an einer Infektionskrankheit (Statistisches Bundesamt Deutschland 2003). Als Erreger sind meist grampositive Keime wie *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis* nachzuweisen (Bradley et al. 1987, Keane et al. 1989). Der Dialysehunt oder der intravenöse Dialysekatheter stellen dabei die häufigste Eintrittspforte dar, gefolgt von pulmonalen und gastrointestinalen Infekten.

Neben der im Vergleich zur Normalbevölkerung deutlich erhöhten Zahl bakterieller Infektionen, weisen Dialysepatienten auch eine erhöhte Tumorzinzidenz und eine verminderte Impfansprechrage (zum Beispiel gegen Hepatitis B, Influenza oder Tetanus) auf (Cappel et al. 1983, Köhler et al. 1984, Girndt et al. 1995). Descamps-Latscha bezeichnete dieses Nebeneinander konträrer Zeichen der Immunaktivierung und Immunsuppression zutreffend als „das Paradoxon des Immunsystems in der Urämie.“ (Descamps-Latscha et al. 2002). Als wichtige Einflussfaktoren der gestörten Immunantwort sind zum einen die Hämodialyse per se und die damit verbundenen mikroinflammatorischen Reaktionen durch den Blutkontakt mit künstlichen Oberflächen zu erwähnen, zum anderen befinden sich Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz trotz effektiver Eliminationsverfahren unter dem Einfluss erhöhter Urämietoxine.

In den vergangenen Jahren wurde eine große Zahl von Untersuchungen durchgeführt, um Ursachen dieses deutlich geringeren Ansprechens nach Vakzination zu klären. Dabei zeigten sich Funktionsstörungen der neutrophilen Granulozyten, der Monozyten, der B- und T-Lymphozyten sowie des Komplementsystems. In einigen Studien fiel auf, dass bei Patienten, welche auf Grund einer renalen Anämie eine Therapie mit rhEPO erhielten, eine Stimulierung des Immunsystems zu beobachten war (Sennesael et al. 1991, Schäfer et al. 1992).

### **1.1. Hepatitis B**

Das Hepatitis B-Virus gehört zur Familie der Hepadnaviren und wurde 1965 erstmalig nachgewiesen. Es besteht aus einem Kern (HBc-Ag und HBe-Ag) und einer Lipidhülle mit eingelagerten Proteinen (hauptsächlich HBs-Ag). Die Übertragung der Viren erfolgt über Blut oder andere Körperflüssigkeiten. Die Virusreplikation ist in den Hepatozyten lokalisiert. Der Verlauf der Erkrankung ist sehr variabel und reicht von klinisch inapparenten Infektionen bis zum fulminanten Leberversagen. Etwa 10 Prozent der Erkrankungen gehen in einen chronischen Verlauf über. Als Folge sind hier insbesondere die Entwicklung einer Leberzirrhose oder eines Leberzellkarzinoms von Bedeutung.

Weltweit sind ca. 300-420 Millionen Menschen (5-7 Prozent der Weltbevölkerung) chronisch mit dem Hepatitis B-Virus infiziert. In der deutschen Bevölkerung sind ca. 0,4-0,7 Prozent Virusträger (Robert-Koch-Institut 2005). In Deutschland treten jährlich etwa 50000 Neuinfektionen mit dem Hepatitis B-Virus auf, 2500-5000 davon nehmen einen chronischen Verlauf. Etwa 1500-2000 Patienten sterben in Deutschland pro Jahr an den Folgen einer Hepatitis B-Infektion (Jilg et al. 2001). Dass diese Erkrankung auch eine erhebliche volkswirtschaftliche Bedeutung hat, veröffentlichten Habbarth et al. 2000. Nach deren Daten lagen die durch Hepatitis B verursachten Kosten in Deutschland im Jahr 1997 bei ca. 1,2 Milliarden DM (614 Mio. Euro). Als Risikogruppen gelten: medizinisches Personal, Patienten mit vielen Bluttransfusionen, Prostituierte, männliche Homosexuelle, Drogenabhängige, Patienten in Heimen und psychiatrischen Anstalten und Dialysepatienten. Einen Schutz vor dieser Infektionskrankheit stellt die aktive Immunisierung dar. Rekombinante Hepatitis B-Impfstoffe sind in Deutschland seit 1986 zugelassen. Nach dem von der ständigen Impfkommision veröffentlichten Impfschema (Robert-Koch-Institut 2002: Erstimpfung, Zweitimpfung nach 4 Wochen, 3. Impfung nach ½ Jahr) sollte nach abgeschlossener Vakzination eine HBs-Antikörpertiter-Kontrolle erfolgen.



Als ausreichender Impfschutz gilt dabei ein Titer von  $> 100$  IE/l. Sollte der Titer darunter liegen, werden weitere Impfungen empfohlen. Eine besonders geringe Ansprechrate nach Hepatitis B-Vakzination ist bei Dialysepatienten zu beobachten. Daher enthält der Impfstoff bei diesen Patienten die 4-fache Dosis (40 Mikrogramm). Des Weiteren wird in mehreren Studien die 4-malige Impfung von Dialysepatienten diskutiert. Trotz dieser Maßnahmen liegt die Ansprechrate mit 50-63 Prozent (Docci et al. 1990, Carletti et al. 1992) deutlich unter der der Normalbevölkerung mit 90-95 Prozent (Zuckermann 1996). Ein höheres Alter stellt ebenfalls ein signifikantes Risiko für das Nichtansprechen nach einer Hepatitis B-Impfung dar. Dialysedauer und -frequenz, Ernährungszustand, Geschlecht, Art der Dialysemembran, PTH-Wert, Calcitriolbehandlung und Hb-Wert scheinen keinen Einfluss zu haben (Peces et al. 1997).

## 1.2. Veränderungen der humoralen Immunantwort von Hämodialysepatienten

Nach Antigenkontakt gibt es zwei Möglichkeiten der Aktivierung von B-Zellen. Große Antigene (z.B. Pneumokokken-Vakzine) können direkt von Rezeptoren auf B-Zellen (BZR) erkannt werden. Diese produzieren anschließend entsprechende Antikörper. Viele andere Antigene werden nicht direkt von den B-Zellen erfasst. Diese Antigene (z.B. Hepatitis B-Vakzine) benötigen zum Auslösen einer Immunantwort (Antikörperbildung) mehrere Zwischenschritte. Zunächst wird das Antigen in APZ (z.B. Monozyten, Makrophagen) prozessiert. Anschließend wird ein Ag-Peptid mit Hilfe eines HLA-KI.II-Moleküls auf der Zelloberfläche präsentiert. Nun sind T-Helferzellen in der Lage, das Antigen zu erkennen, sie werden aktiviert und induzieren die Antikörperbildung der B-Zellen (Abb. 1).

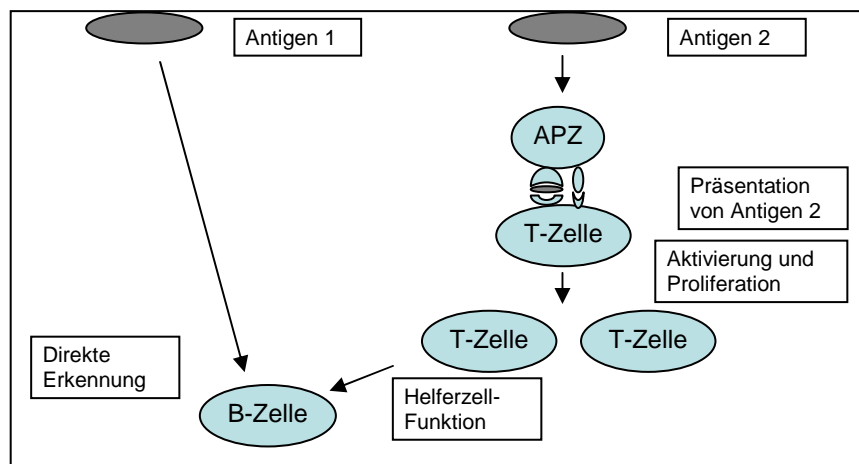


Abb. 1: Unterschiedliche Wege der B-Zell-Aktivierung (nach Girndt, 2002)

### **1.2.1. B-Lymphozyten**

Der Anteil der B-Lymphozyten ist bei Dialysepatienten im Vergleich zur Normalbevölkerung reduziert (Ueki et al. 1993, Deenitchina et al. 1995, Moser et al. 2003, Bouts et al. 2004). Das ist vermutlich zum Teil auf eine erhöhte Apoptoserate der B-Lymphozyten zurückzuführen (Fernandez-Fresnedo et al. 2000). Die B-Zell-Proliferation nach PWM wie auch die Immunantwort prozessierter Antigene (T-Zell-abhängig), z.B. nach einer Hepatitis B-Impfung, sind bei Dialysepatienten deutlich im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe vermindert (Bommer et al. 1985, Köhler et al. 1988, Docci et al. 1990, Majdan et al. 1995, Belèed et al. 2002). Widersprüchliche Angaben existieren bezüglich der T-Zell-unabhängigen B-Zell-Antwort. So fanden Raskova et al. 1987 und Gaciong et al. 1991 nach Stimulation mit *Staphylococcus aureus* eine geringere B-Zell-Antwort von Dialysepatienten im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe. Hingegen konnten Degannis et al. 1987 und Girndt et al. 2001 eine normale B-Zell-Funktion bei Dialysepatienten nachweisen. Als ein Grund der verminderten B-Zell-Proliferation und Immunglobulinproduktion wird ein bestehender Hyperparathyreoidismus der Dialysepatienten diskutiert (Alexiewicz et al. 1990). Dass eine dabei bestehende erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration durch Gabe eines Calciumkanalblockers vermindert werden kann und es anschließend zu einer Verbesserung der B-Zell-Funktion kommt, konstatierte die Arbeitsgruppe um Smogorzewski et al. 2001.

### **1.2.2. T-Lymphozyten**

Bei Dialysepatienten ist im Vergleich zur Normalbevölkerung auch ein verminderter Anteil der T-Lymphozyten nachzuweisen (Raska et al. 1983, Chatenoud et al. 1986, Ueki et al. 1993). Insbesondere ist der Anteil der T-Helferzellen reduziert (Moser et al. 2003, Meier et al. 2005). Die CD4/CD8-Ratio weist dabei jedoch keine Veränderung auf (Deenitchina et al. 1995). Eine geringere Proliferation der T-Zellen von Dialysepatienten nach Stimulation mit Mitogen beschreiben mehrere Arbeitsgruppen (Kurz et al. 1986, Dumann et al. 1990, Donati et al. 1991). Verbunden war diese Beobachtung mit einer verminderten IL-2-Produktion der T-Helferzellen sowie einer Hochregulation der IL-2-Rezeptoren auf PMNZ (Dumann et al. 1990, Kohler et al. 1988).

Ob dieser Proliferationsdefekt ein primärer T-Zell-Defekt ist oder durch eine fehlerhafte Kostimulation durch APZ bedingt ist, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Dass eher ein Fehler der Kostimulation (z.B. CD28, CD46) vorliegt,

wird durch Studien bekräftigt, in welchen Monozyten von gesunden Probanden den Proliferationsdefekt von Lymphozyten bei Dialysepatienten aufheben konnten (Tsakalos et al. 1986, Meuer et al. 1987). Nach *in vitro* Stimulation mit anti-CD46 und anti-CD28 kam es bei PMNZ von Hämodialysepatienten zu einem signifikanten Anstieg der T-Helferzell-Aktivierung (Brinkkoetter et al. 2005). Nach Gabe von IL-2 beschreiben mehrere Arbeitsgruppen eine verstärkte Proliferationsantwort der T-Lymphozyten von Dialysepatienten (Meuer et al. 1987, Dumann et al. 1990) sowie eine erhöhte Ansprechrate nach Vakzination mit HBs-Ag (Meuer et al. 1989). Keine Veränderung der Proliferation durch IL-2 beschrieben im Gegensatz dazu Donati et al. 1991.

Der Anteil an aktivierten T-Lymphozyten ist bei Hämodialysepatienten erhöht (Chatenoud et al. 1986, Beaurin et al. 1989, Walz et al. 1989, Meier et al. 2005). Dabei haben Nonresponder nach einer Hepatitis B- Vakzination im Vergleich zu Respondern einen verminderten Anteil aktivierter T-Lymphozyten (Goncalves et al. 2004).

### **1.2.3. Monozyten**

Dialysepatienten weisen einen erhöhten Anteil von Monozyten sowie von aktivierten Monozyten auf (Betz et al. 1988, Girndt et al. 1998, Sester et al. 2000). Dieses ist verbunden mit einer erhöhten Produktion proinflammatorischer Zytokine (IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$ ) (Dinarello et al. 1992, Girndt et al. 2001).

Monozyten als APZ aktivieren T-Helferzellen zum einen über die Ag-Präsentation durch HLA-Kl. II-Moleküle, des Weiteren ist eine Kostimulation erforderlich. Dazu exprimieren die APZ z.B. CD80 und CD86. Auf der Zelloberfläche der T-Lymphozyten sind entsprechende Liganden vorhanden (z.B. CD28) (Abb. 2). In einer fehlerhaften Kostimulation wird von vielen Autoren der Schlüssel der geringeren Proliferation von T-Lymphozyten von Dialysepatienten gesehen (Girndt et al. 1993, Girndt et al. 2001, Vlassopoulos et al. 2003). Eine verminderte Expression von CD86 auf Monozyten fanden Girndt et al. 2001 als Ursache einer gestörten Kostimulation und verminderten T-Zell-Proliferation.

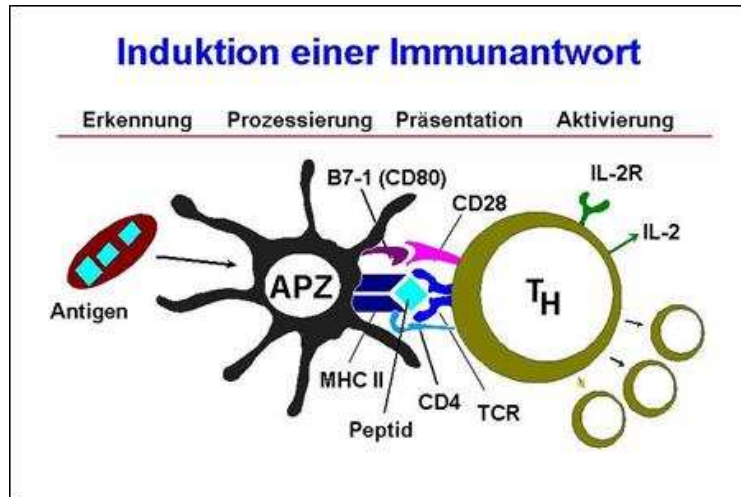


Abbildung 2: T-Helferzell-Immunantwort, Ag-Präsentation und Ag-Erkennung (nach Pleyer und Ritter, 2003)

#### 1.2.4. NK-Zellen

Natürliche Killerzellen sind große lymphatische Zellen und ein wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems. Sie tragen Fc-Rezeptoren an ihrer Oberfläche (FcγRIII). Nach Bindung an IgG-Antikörper, welche an Zielzellen gekoppelt sind, können diese zytotoxisch zerstört werden. Für die Funktion der NK-Zellen spielt deshalb eine normale Antikörperbildung eine entscheidende Rolle.

Widersprüchliche Angaben in der Literatur existieren hinsichtlich der Zahl und Aktivität der NK-Zellen von Hämodialysepatienten. So wiesen Lisza et al. 1998 einen verminderten Anteil von NK-Zellen nach. Cala et al. konnten 1990 eine geringere Aktivierung dieser Zellen beobachten. Hingegen lag in den Untersuchungen von Baj et al. 1992 die Zahl der NK-Zellen von HD-Patienten über denen der Kontrollgruppe. Keine Unterschiede bezüglich der NK-Zellen zwischen Dialysepatienten und einer Kontrollgruppe fand die Arbeitsgruppe von Sennesael et al. 1991. Albarran et al. 2005 belegten, dass bei Nonrespondern nach einer Hepatitis B-Impfung eine verminderte Aktivität der NK-Zellen vorliegt.

### **1.3. Erythropoietin**

Erythropoietin ist ein sialisiertes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 34000 Dalton und wird bei Erwachsenen zu etwa 90 Prozent in der Niere gebildet (Jacobson et al. 1957). Peritubuläre Zellen in der Nierenrinde stellen den Syntheseort dar (Schuster et al. 1987, Koury et al. 1988). Weniger als 10 Prozent werden bei Erwachsenen in der Leber produziert (Fried 1972), während in der Fetalzeit die Leber das Hauptbildungsorgan ist (Lucarelli et al. 1968). Auch in Makrophagen wurde Erythropoietin-mRNA nachgewiesen (Rich et al. 1982). In Tierexperimenten fanden sich auch sehr geringe Mengen von Erythropoietin-mRNA im Gewebe von Milz, Lunge, Gehirn und Hoden bei Ratten (Fandrey und Bunn 1993).

Seine Wirkung wird über die Bindung an einen Erythropoietin-Rezeptor vermittelt. Dieser Rezeptor gehört zu einer Zytokin-Rezeptor-Superfamilie und konnte im Knochenmark an hämatopoetischen Vorläuferzellen (BFU-erythroide, CFU-erythroide) nachgewiesen werden. Dabei stimuliert Erythropoietin die Vermehrung der reifen BFU-Zellen (burst forming units-erythroide) in CFU-Zellen (colony forming units-erythroide) und lässt sie wachsen und differenzieren (Gregory 1978). Des Weiteren verhindert es die Apoptose in späteren Differenzierungsstadien.

Die normale Erythropoietin-Konzentration im Plasma beträgt etwa 6-32 IE pro Liter (Miller et al. 1981). Unter Anämie oder Gewebshypoxie kann es, vermittelt durch den Transkriptionsfaktor HIF, bis zur 500-fachen Steigerung kommen (Jelkmann 1992, Eckardt 2005). Auch Hypernephrome und Zystennieren können die Hormonsynthese stimulieren. Ursachen für eine Anämie mit relativ verminderter Erythropoietinproduktion sind unter anderem chronische Entzündungen und maligne Erkrankungen (Ward et al. 1971). Dabei wirken IL-1 und TNF-alpha hemmend auf die Erythropoietinbildung (Fandrey et al. 1994). Auch der relative Erythropoietinmangel bei der chronischen Niereninsuffizienz scheint unter anderem durch diese Zytokine bedingt zu sein (Chandra et al. 1988).

### **1.4. Erythropoietin zur Behandlung der renalen Anämie**

Ein relativer Mangel an Erythropoietin, wie er beispielsweise bei der Niereninsuffizienz (etwa ab GFR <40 ml/min.) vorkommen kann, führt zur renalen Anämie. Diese Form der normozytären, normochromen und hyporegenerativen Anämie wird zusätzlich durch eine verkürzte Erythrozytenüberlebenszeit bedingt.

Weitere Ursachen der Anämie bei Niereninsuffizienz können eine toxische Hämolyse, Fibrosierung des Knochenmarks, Hemmung der Erythropoese durch Urämietoxine (z.B. Spermin) und erhöhte Blutverluste durch häufige Blutentnahmen und gastrointestinale Blutungen sein.

Vor der Verfügbarkeit von rhEPO benötigten ca. 30 Prozent der Dialysepatienten intermittierend oder regelmäßig Erythrozytenkonzentrate (Eschbach et al. 1987). Fast zwei Drittel aller Hämodialysepatienten erhalten heute nach Ausgleichen des Eisenhaushaltes eine Therapie mit rekombinantem humanen Erythropoietin (rhEPO). Dieses ist in seiner Struktur dem nativen Erythropoietin sehr ähnlich (Davis et al. 1987). Die erste gentechnologische Herstellung erfolgte mit Hilfe von Ovarialzellen des chinesischen Hamsters. 1989 wurde rhEPO erstmalig durch die FDA (Food and Drug Administration) in den USA zur Behandlung der renalen Anämie zugelassen. In Westeuropa und Japan kam es kurz darauf ebenfalls zur Markteinführung. Weitere Zulassungen zur Therapie der Anämie bei Autoimmunerkrankungen (z.B. rheumatoide Arthritis) oder Malignomen folgten. Es sollte ein Ziel-Hämatokrit von >33 Prozent erreicht werden (Locatelli et al. 2004). Dabei sind sowohl eine intravenöse als auch eine subkutane Therapie möglich. Beide Applikationen sind ähnlich wirksam (Sunder-Plassmann et al. 1995). Bei etwa 10-30 Prozent der mit rhEPO behandelten Patienten ist die Entstehung einer Hypertonie bzw. die Verschlechterung einer vorbestehenden Hochdruckerkrankung zu beobachten (Raine et al. 1991). Auch Kopfschmerzen, Tachykardien, Übelkeit, Gerinnungsstörungen, eine Hyperkaliämie und Diarrhoe können auftreten.

### **1.5. Erythropoietin - ein pluripotentes Hormon**

Erythropoietin hat neben der bereits beschriebenen Stimulation der Proliferation und der Differenzierung der erythroiden Vorläuferzellen noch weitere Wirkungen im Knochenmark, im peripheren Blut sowie in anderen Organen. Erythropoietinrezeptoren wurden auch auf mesangialen und endothelialen Zellen, sowie auf kardialen und glatten Muskelzellen nachgewiesen.

In mehreren Studien konnte eine kardioprotektive Wirkung von rhEPO nach einer Myokardischämie belegt werden (Calvillo et al. 2003, Parsa et al. 2003).

Nach einem Schlaganfall ließen sich durch die Gabe von rhEPO die Schwere der Gewebsschäden sowie das Ausmaß der neurologischen Ausfälle verringern (Ehrenreich et al. 2002). Aus welchem Grund Erythropoietin kardio- und neuroprotektiv wirkt, ist noch nicht genau geklärt. Es scheint, dass rhEPO über Rezeptoren auf Endothelzellen auf diese zellprotektiv (Apoptose wird gehemmt)

und regenerativ (erhöhte Mitose und Proliferation) wirkt (Ribiatti et al. 1999, Chong et al. 2002, Digicaylioglu et al. 2004). Weiterhin steigert rhEPO das Ausschwemmen von endothelialen Vorläuferzellen, die für die Reparatur von Gefäßwandschäden verantwortlich sind (Bahmann et al. 2003 und 2004). Die Ergebnisse der Arbeiten von Becker et al. 2002 und Mohanram et al. 2004 lassen vermuten, dass dieser Mechanismus zu einer nephroprotektiven Wirkung des rhEPO führt.

Erythropoietinrezeptoren sind weiterhin im ZNS zu finden, wo sie die Differenzierung neuronaler Stammzellen in Astrozyten vermitteln (Lee et al. 2004).

In mehreren Arbeiten konnte die Stimulation von Kolonie-bildenden Einheiten der Granulozyten-, Megakaryozyten- und der Monozyten-Makrophagenreihe im Knochenmark durch rhEPO gezeigt werden (Ganser et al. 1988, Dessypris et al. 1988, Neumann et al. 1999). Verbeelen et al. 1988 und Nielsen et al. 1989 fanden bei Hämodialysepatienten mit renaler Anämie nach der Behandlung mit rhEPO einen Anstieg der Thrombozyten- und Leukozytenzahl. Einen direkt stimulierenden Einfluss von rhEPO auf B-Lymphozyten von Dialysepatienten mit einer Steigerung der Immunglobulinproduktion konnten die Arbeitsgruppen von Kimata et al. 1991, Schäfer et al. 1992 und Katz et al. 2007 nachweisen. Eine Aktivierung von T-Lymphozyten durch rhEPO beschrieben Kaneko et al. 1993 und Pruttchi-Sagiv et al. 2006. Eine Erhöhung der CD4/CD8-Ratio bei Dialysepatienten durch Erythropoietin wurde von Pfäffl et al. 1988 gezeigt. In einer Arbeit von Sennesael et al. 1991 wurde bei rhEPO-behandelten Dialysepatienten 12 Monate nach einer 4-fach Hepatitis B-Vakzination eine Responderrate von 80 Prozent gefunden, während im Vergleich dazu die Responderrate einer Kontrollgruppe ohne rhEPO bei 54 Prozent lag.

Neben den oben genannten Veränderungen der B- und T-Lymphozyten unter dem Einfluss von rhEPO wurden andere PMNZ bisher wenig untersucht. So finden sich kaum Arbeiten über das Expressionsmuster von Monozyten, NK-Zellen sowie zellulärer Aktivierungsmarker bei Hämodialysepatienten unter der Behandlung mit rhEPO.

## 2. Aufgabenstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Veränderungen im Immunstatus von Hämodialysepatienten in Abhängigkeit von der Responderrate nach einer Hepatitis B-Vakzination aufzuzeigen. Weiterhin sollte der Einfluss von rhEPO auf PMNZ bei Hämodialysepatienten untersucht werden. Insbesondere waren dabei folgende Teilfragen zu beantworten:

1. Welchen Einfluss hat die Therapie mit rekombinantem Erythropoietin auf die Expression ausgewählter Oberflächenmarker peripherer mononukleärer Zellen von Hämodialysepatienten?
2. Unterscheiden sich die Expressionsmuster bestimmter Oberflächenmarker von PMNZ bei Hämodialysepatienten unter Berücksichtigung des Ansprechens nach Hepatitis B-Vakzination?
3. Wie unterscheiden sich Hämodialysepatienten, die eine rhEPO-Therapie erhalten von denen ohne rhEPO-Therapie hinsichtlich ausgewählter Oberflächenmarker auf PMNZ?
4. Lassen sich für die PMNZ ausgewählter Patientengruppen unter *in vitro* Bedingungen nach Stimulation mit Erythropoietin (konzentrations- und zeitabhängig) verschiedene Expressionsmuster von ausgewählten Oberflächenmarkern induzieren?



## **3. Material und Methodik**

### **3.1. Hämodialysepatienten**

Um Unterschiede hinsichtlich des Immunstatus bei terminal niereninsuffizienten Patienten herauszufinden, wurde das Blut eines Kollektivs von 39 dialysepflichtigen Patienten (24 Männer und 15 Frauen) untersucht. 32 Patienten wurden im Kuratorium für Dialyse und Nierentransplantation e.V. Magdeburg behandelt, 7 weitere wurden in der Dialysepraxis in Schönebeck betreut. Es erfolgte eine Unterscheidung der Patienten anhand des Anti-HBs-Titers nach 3-maliger Hepatitis B-Vakzination in Responder (Antikörper >100 IE) und Nonresponder (Antikörper <10 IE). Ein weiteres Kriterium zur Einteilung der Patientengruppen war die Behandlung oder Nichtbehandlung mit Erythropoietin (rhEPO). Es wurden nur Patienten berücksichtigt, bei denen ein Tumorleiden, eine Systemerkrankung oder eine akute oder chronische Infektion ausgeschlossen werden konnte. Alle Patienten gaben nach Aufklärung über die Studie ihr Einverständnis zur Teilnahme an den Untersuchungen.

#### **3.1.1. Responder mit Erythropoietin**

Diese Gruppe umfasste 17 Dialysepatienten (9 Frauen und 8 Männer), die einen Anti-HBs-Titer >100 IE aufwiesen und mit rhEPO behandelt wurden. Das Durchschnittsalter betrug  $61,9 \pm 11,0$  Jahre.

#### **3.1.2. Responder ohne Erythropoietin**

Die Patientengruppe setzte sich aus 9 Patienten (3 Frauen und 6 Männer) zusammen. Diese hatten einen Anti-HBs-Titer >100 IE und wurden nicht mit rhEPO behandelt. Das Durchschnittsalter lag bei  $54,9 \pm 11,5$  Jahre.

### **3.1.3. Nonresponder mit Erythropoietin**

In diese Gruppe fielen 11 Patienten (3 Frauen und 8 Männer) mit einem Durchschnittsalter von  $67,5 \pm 14,9$  Jahren. Sie hatten einen Anti-HBs-Titer  $<10$  IE und wurden mit rhEPO behandelt.

### **3.1.4. Nonresponder ohne Erythropoietin**

2 Patienten (männlich) hatten einen Anti-HBs-Titer  $<10$  IE und wurden nicht mit rhEPO behandelt. Das Durchschnittsalter betrug  $76 \pm 15,6$  Jahre.

## **3.2. Kontrollgruppe**

Bei den Vergleichspersonen handelte es sich um 17 freiwillige, gesunde Probanden, die entsprechend dem Alter der Patienten ausgewählt wurden. Darunter waren 8 Frauen und 9 Männer. Das Durchschnittsalter dieses Kollektivs betrug  $60,3 \pm 8,6$  Jahre.

## **3.3. Blutentnahme und Verarbeitung der Blutproben**

Die Entnahme von 100 ml Blut erfolgte über einen Dialyseshunt bzw. aus einer Cubitalvene jeweils morgens gegen 7 Uhr, um tageszeitlich bedingte Schwankungen als mögliche Fehlerquelle auszuschließen. Das entnommene Blut wurde in ein steriles Gefäß mit 50 ml phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) (Life Technologies GmbH Karlsruhe) und 250 IE Heparin (Biochrom AG) überführt.

Zur Bestimmung des Differentialblutbildes sowie zur durchflusszytometrischen Messung der PMNZ im Vollblut entnahmen wir 4,5 ml Blut in ein EDTA gepuffertes Vacutainerröhrchen.

## **3.4. Bestimmung des Differentialblutbildes**

Zur Bestimmung des Differentialblutbildes wurde das Blut aus dem EDTA-Röhrchen im Differentialblutbild-Automaten (Cell Dyn 1600 Abbott) untersucht.

### 3.5. Immunphänotypisierung

Je 100 µl Vollblut wurden mit monoklonalen Antikörpern (Becton-Dickinson Heidelberg) für 20 Minuten inkubiert. Diese Antikörper erfassten folgende Oberflächenantigene (cluster of differentiation): CD2, CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD14, CD13, CD16, CD25, CD26, CD69 sowie HLA-DR. Es erfolgte die Zugabe von 1 ml FACS-Lyse (Becton Dickinson Heidelberg). Nach 15 Minuten wurde das Blut bei 500 g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert. Nach einmaliger Waschung mit 1 ml PBS wurden die Zellen im Durchflusszytometer (FACSCalibur, Becton Dickinson Heidelberg) gemessen. Die Auswertung der Messergebnisse auf den PMNZ erfolgte durch ein entsprechendes Eingrenzen der Zellpopulationen (gating) von Lymphozyten und Monozyten sowie für die Bestimmung der Aktivierungsmarker auf T- und B-Zellen durch ein gating der Lymphozyten und der entsprechenden Antikörperkombinationen (siehe Tabelle 1).

**Tabelle 1: Kombination der monoklonalen Antikörper, mit Klonnamen  
Fluoreszenzfarbstoffe: FITC-Fluoresceinisothiocyanat  
PE-Phycoerythrin  
PerCP-Peridininchlorophyllprotein**

	FITC (10 µl)	PE (5 µl)	PerCP (10 µl)
1.	IgG1 (X40)	IgG2a (X39)	IgG1 (X40)
2.	CD14 (MΦP9)	CD13 (L138)	CD45 (2D1)
3.	CD20 (L27)	CD69 (L78)	CD3 (SK7)
4.	CD2 (S5.2)	HLA-DR (L243)	CD19 (4G7)
5.	CD4 (SK3)	CD25 (2A3)	CD8 (SK1)
6.	CD16 (NKP15)	CD26 (L272)	CD3 (SK7)

### 3.6. Separation der PMNZ mittels Dichtegradientenzentrifugation

Zur Isolierung der PMNZ aus dem Blut-PBS-Heparin-Gemisch verwendeten wir die Dichtegradientenzentrifugation (Boyum 1968). Zunächst legten wir in sechs 50 ml-Zentrifugenröhrchen jeweils 15 ml Ficoll (Linaris biol. Prod. GmbH Bertingen) vor und überschichteten dieses vorsichtig mit je 30 ml Blut-PBS-Heparin-Gemisch. Wir zentrifugierten 30 min bei 500 g. Anschließend wurden die PMNZ, die sich an der Phasengrenze anreichern, mittels einer 1000 µl-Pipette aufgenommen und auf vier weitere 50 ml-Zentrifugenröhrchen verteilt und auf insgesamt je 30 ml mit RPMI-Lösung (PAA Laboratories GmbH Cölbe) aufgefüllt.

Nun erfolgten drei Waschungen. Dazu zentrifugierten wir je 10 min bei 500 g, dekantierten den Überstand, resuspendierten das Zellpellet und gaben nach der ersten und zweiten Waschung erneut RPMI-Lösung bis zu einer Füllhöhe von 30 ml dazu. Nach der zweiten Waschung wurde die Resuspension in zwei Zentrifugenröhrchen und nach der dritten Waschung in ein Zentrifugenröhrchen überführt.

### 3.7. Vorbereiten der Kulturansätze

Zur Bestimmung der Konzentration der Zellen in der Lösung wurden 50 µl entnommen und in einem Differentialblutbild-Automaten (Cell Dyn 1600 Abbott) gemessen. Anschließend erfolgte die Verdünnung auf 3 Gpt/l. Als Medium verwendeten wir ein selbst hergestelltes 9:1-Gemisch aus RPMI-Lösung und FCS-Lösung (PAA Laboratories GmbH Cölbe). Dann wurde 1 ml pro well in eine Kulturplatte mit 24 well pipettiert. Anschließend gaben wir rhEPO (Epoetin alpha, Janssen-Cilag GmbH) in folgenden Mengen hinzu: 1. horizontale Reihe 0 IE, 2. horizontale Reihe 5 IE, 3. horizontale Reihe 50 IE und 4. horizontale Reihe 100 IE. In jede 2. vertikale Reihe kam als Stimulans PWM (Serva Heidelberg) in einer Konzentration von 2 µg/ml hinzu (Abbildung 3).

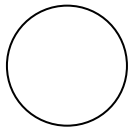
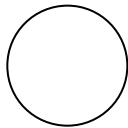
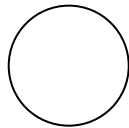
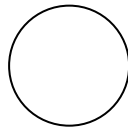
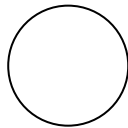
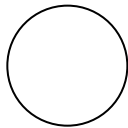
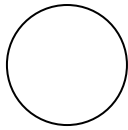
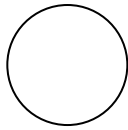
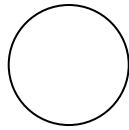
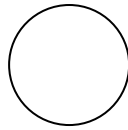
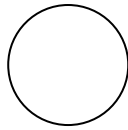
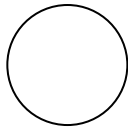
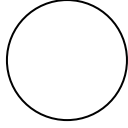
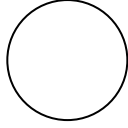
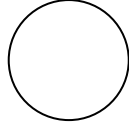
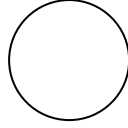
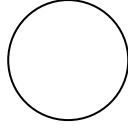
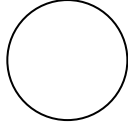
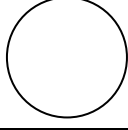
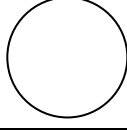
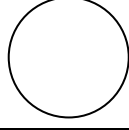
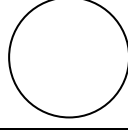
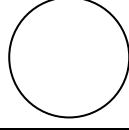
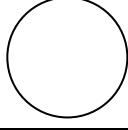
	Tag1	Tag1 + PWM 2 µl/ml	Tag2	Tag2 + PWM 2 µl/ml	Tag 3	Tag 3 + PWM 2 µl/ml
rhEPO 0 IE						
rhEPO 5 IE						
rhEPO 50 IE						
rhEPO 100 IE						

Abbildung 3: Kulturplatte mit 24 well

### **3.8. Analyse der separierten PMNZ mit Hilfe der Durchflusszytometrie (Immunphänotypisierung)**

#### **3.8.1 Vorbereitung der PMNZ am Tag 0**

Aus der verbliebenen Menge des Röhrchens zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Lösung mit einer Konzentration von 7 Gpt/l PMNZ hergestellt.

#### **3.8.2. Vorbereitung der PMNZ am Tag 1 bis 3**

Die ersten beiden vertikalen Reihen untersuchten wir nach 24 Stunden, die mittleren beiden vertikalen Reihen nach 48 Stunden und die rechten beiden vertikalen Reihen nach 72 Stunden. Von der Kulturplatte wurde je well 1 ml Überstand vorsichtig abgenommen. In die nun vorliegenden 8 well pro Tag gaben wir jeweils 1 ml 4°C kaltes PBS. Die PMNZ re suspendierten wir und überführten sie in je ein Probenröhrchen. Diesen Vorgang wiederholten wir erneut mit 1 ml 4°C kaltem PBS. Nach der anschließenden Zentrifugation der Probenröhrchen bei 500 g über 10 Minuten wurde der Überstand dekantiert, mit 1 ml PBS resuspendiert und wieder unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Nach der erneuten Entfernung des Überstandes resuspendierten wir die Zellen mit 400 µl PBS.

#### **3.8.3. Inkubation**

50 µl der Zellsuspension von Tag 0 (Konzentration von 7 Gpt/l) sowie von Tag 1 bis Tag 3 (Konzentration von 3 Gpt/l) pipettierten wir in ein Probenröhrchen. Anschließend erfolgte die Zugabe monoklonaler Antikörper (Becton-Dickinson Heidelberg), welche die folgenden cluster of differentiation (CD) erfassten: CD2, CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD14, CD13, CD16, CD25, CD26, CD69 sowie HLA-DR (Tabelle 1). Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 4 °C gaben wir 1 ml FACS-Puffer dazu. Nach anschließender Zentrifugation mit 500 g über 10 Minuten dekantierten wir den Überstand. Nach Zugabe von 300 µl Fixativ (Becton-Dickinson Heidelberg) waren die Zellen zur Messung im Durchflusszytometer (Becton-Dickinson Heidelberg) vorbereitet.

### 3.9. Statistik

Die Daten wurden als Mittelwert mit Standardabweichung, sowie dem 95%-Konfidenzintervall dargestellt.

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms „SPSS 10.0 for MS Windows“.

Um signifikante Unterschiede zwischen den Patienten- und der Vergleichsgruppe statistisch zu sichern, wurde die Varianzanalyse und anschließend der Standard-t-Test (Irrtumswahrscheinlichkeit:  $p < 0,05$ ) angewandt. Der Vergleich der Patientengruppen untereinander erfolgte mit Hilfe des Tuckey-Tests (Irrtumswahrscheinlichkeit:  $p < 0,05$ ).

Zur Verifizierung der Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der gemessenen Zellveränderungen wurde die repeated-measurement-Analyse durchgeführt. Wenn bei der Zeit- oder Konzentrationsabhängigkeit Veränderungen zu beobachten waren, wurde anschließend der Standard-t-Test (Irrtumswahrscheinlichkeit:  $p < 0,05$ ) angewandt. Um Abweichungen der Untersuchungsgruppen untereinander in Abhängigkeit der Veränderungen im Expressionsmuster nach Gabe von rhEPO oder PWM nachzuweisen, benutzten wir das General Linear Model (Irrtumswahrscheinlichkeit:  $p < 0,05$ ).

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Klinische Charakterisierung der Patienten

#### 4.1.1. Ätiologie der terminalen Niereninsuffizienz im Patientenkollektiv

Die beiden häufigsten Ursachen der chronischen Niereninsuffizienz in unserem Untersuchungskollektiv waren mit je 8 Patienten die diabetische Nephropathie sowie Zystennieren, gefolgt von Glomerulonephritiden (6 Patienten). Bei jeweils 5 Patienten lag eine chronische Pyelonephritis bzw. Nephrosklerose als Ursache der Dialysepflichtigkeit zu Grunde. Bei zwei Patienten war die Niereninsuffizienz die Folge einer Tumornephrektomie, ein Patient hatte ein Alport-Syndrom und bei weiteren drei Patienten war die Ursache für das Nierenversagen unbekannt. Die letzten drei Patientengruppen sind im Diagramm unter „andere Ursachen“ zusammengefasst (Abbildung 4).

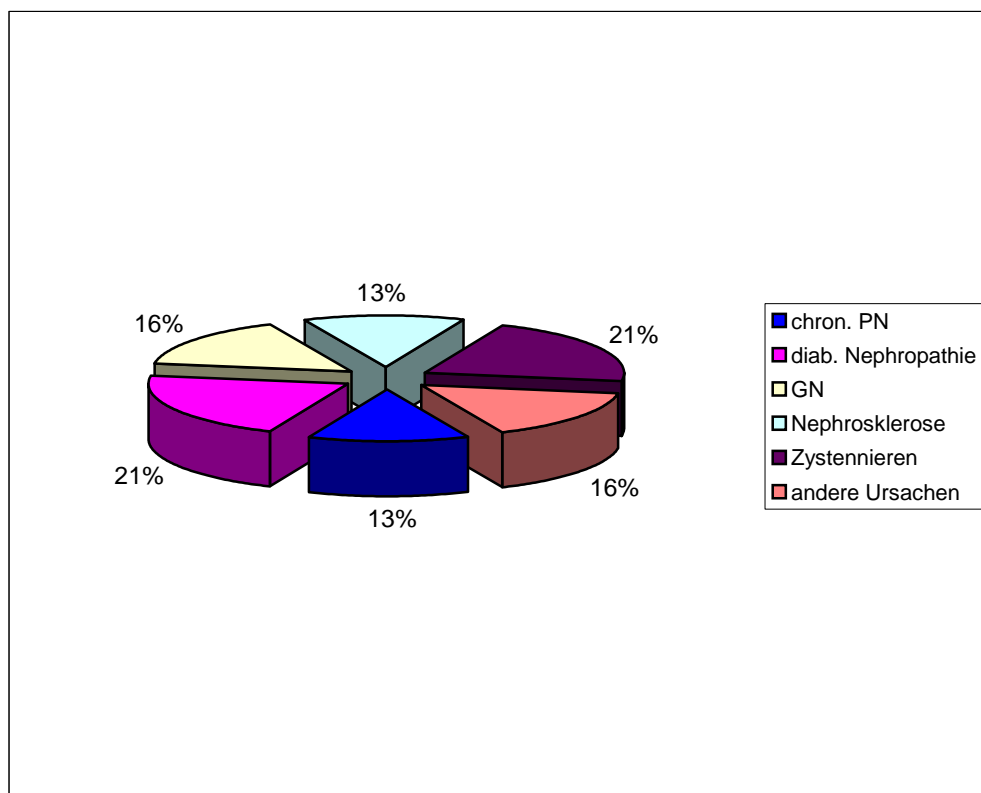


Abbildung 4: Ursachen der chronischen Niereninsuffizienz im Untersuchungskollektiv

## 4.2. Gruppenunterschiede zum Zeitpunkt der Blutentnahme

Wir teilten die Dialysepatienten nach der Höhe ihres Antikörpertiters nach Hepatitis B-Impfung und anhand der Applikation oder Nichtapplikation von Erythropoietin in 4 Patientengruppen ein.

In der Gruppe ohne Antikörpertiter und ohne Erythropoietin (ohne AK, ohne rhEPO) konnten nur zwei Patienten rekrutiert werden. Diese Gruppe wurde in den Untersuchungen zur Frage von Gruppenunterschieden nicht berücksichtigt.

Als Kontrolle wurden Blutproben altersentsprechender, gesunder Probanden untersucht.

Signifikante Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle wurden mit + ( $p < 0,05$ ), ++ ( $p < 0,01$ ) bzw. +++ ( $p < 0,001$ ) beschriftet.

Signifikanzen im Vergleich zur Gruppe mit EPO, mit AK wurden mit \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ) bzw. \*\*\* ( $p < 0,001$ ) dargestellt.

Im Tabellenanhang sind die entsprechenden Mittelwerte mit der Standardabweichung zusammengefasst.

### 4.2.1. Differentialblutbild

Die Zahl der Leukozyten in den einzelnen Patientengruppen waren im Vergleich mit der gesunden Kontrollgruppe signifikant erhöht ( $p < 0,01$ ). Zwischen den Patientengruppen gab es keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 5). Bei der Betrachtung des Anteils der Lymphozyten war in den Patientengruppen ein hochsignifikant ( $p < 0,001$ ) niedrigerer Wert im Vergleich zur Gruppe der Probanden nachweisbar. Dabei traten die niedrigsten Werte in der Gruppe ohne AK-Titer und mit rhEPO auf. Auch innerhalb der Patientengruppen gab es signifikante Unterschiede. Die Gruppe ohne AK-Titer und mit rhEPO hatte im Vergleich zur Gruppe mit AK-Titer und mit rhEPO einen deutlich verminderten Lymphozytenanteil ( $p < 0,05$ ) (Abbildung 6). Die Messung des Anteiles der Granulozyten ergab einen signifikant höheren Wert ( $p < 0,001$ ) in den Patientengruppen verglichen mit der gesunden Kontrollgruppe. Die Gruppe ohne AK und mit rhEPO wies dabei den höchsten Anteil auf. Innerhalb der Patientengruppen gab es keine Unterschiede (Abbildung 7). Der Anteil der Monozyten war zwischen allen Gruppen etwa gleich verteilt. Diese Daten wurden nicht als Abbildung dargestellt, sind aber in der Gesamtübersicht enthalten (Tabelle 2, Seite 54).



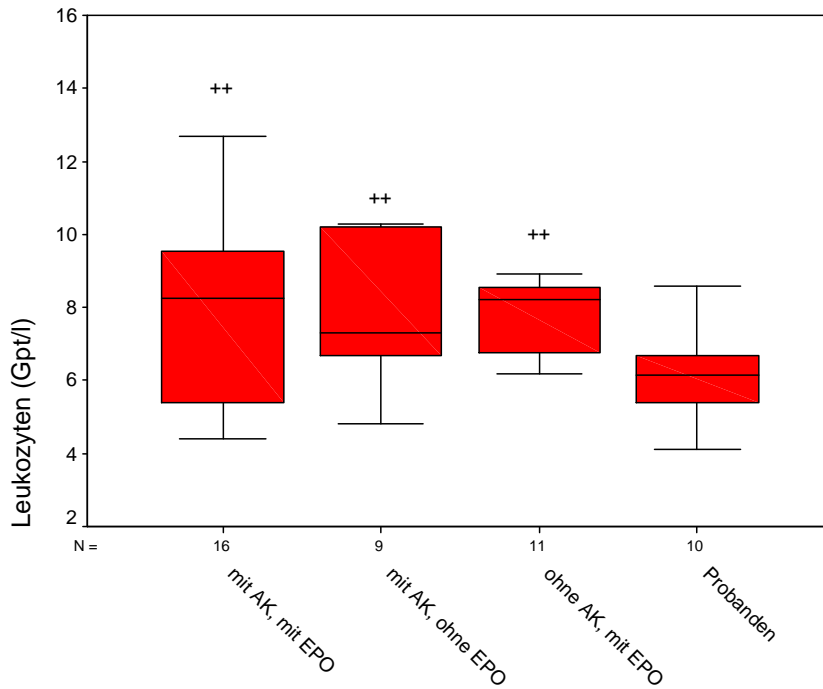


Abbildung 5: Leukozytenzahl im Vollblut der Untersuchungsgruppen im Vergleich zu den Probanden (++  $p < 0,01$ )

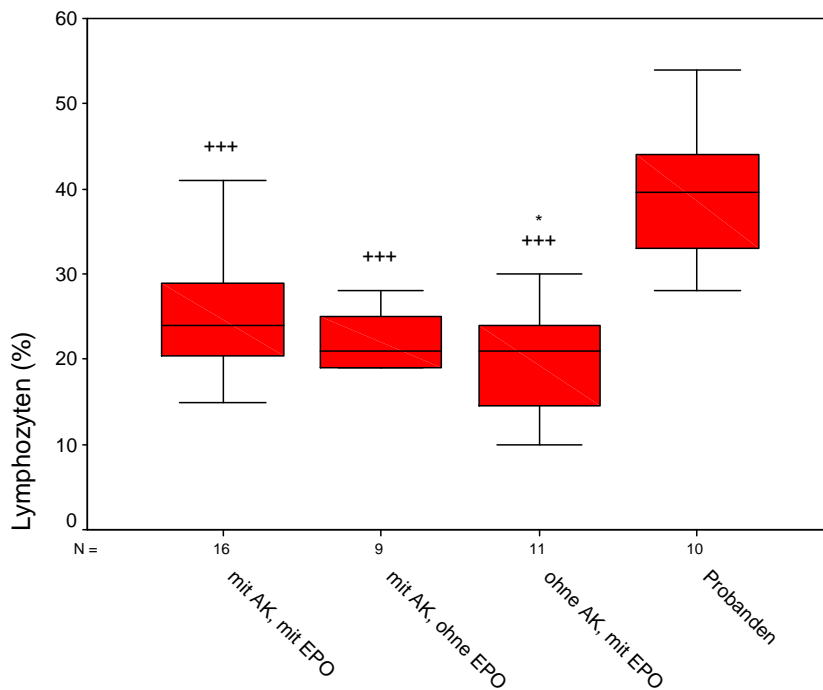


Abbildung 6: Relativer Anteil der Lymphozyten im Vollblut der Untersuchungsgruppen im Vergleich zu den Probanden (+++  $p < 0,001$ ) und im Vergleich zur Patientengruppe mit AK, mit EPO (\* $p < 0,05$ )

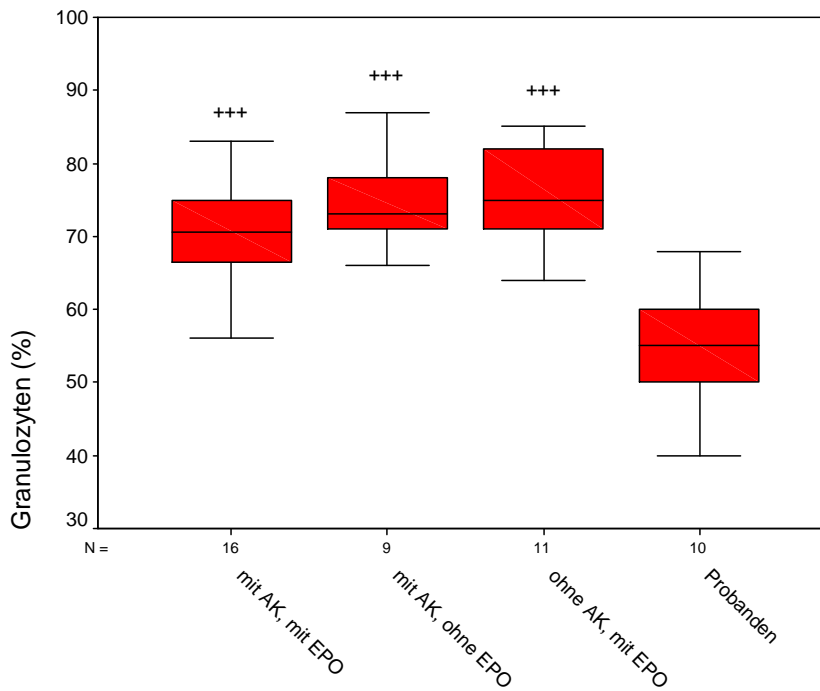


Abbildung 7: Relativer Anteil der Granulozyten im Vollblut der Untersuchungsgruppen im Vergleich zu den Probanden (+++  $p < 0,001$ )

#### 4.2.2. Messung im Vollblut

##### 4.2.2.1. T-Lymphozyten

Die Zellen, die CD2, CD3, CD4 bzw. CD8 auf ihrer Oberfläche exprimieren, wurden im Durchflusszytometer gemessen. Die Patientengruppe ohne AK-Titer und mit rhEPO sowie die Gruppe mit AK-Titer und ohne rhEPO zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikant geringere Expression von CD2 ( $p < 0,01$ ) und CD3 ( $p < 0,01$ ) (Abbildung 8). Die Bestimmung CD4-positiver Zellen erbrachte ebenfalls eine signifikant ( $p < 0,01$ ) niedrigere Expression in der Gruppe ohne AK-Titer, mit rhEPO und der Gruppe mit AK-Titer, ohne rhEPO im Vergleich zur Kontrollgruppe. Weiterhin war die Expression von CD4 in der Gruppe ohne AK-Titer und mit rhEPO, verglichen mit der Gruppe mit AK-Titer und mit rhEPO signifikant ( $p < 0,01$ ) vermindert (Abbildung 9). Keine signifikanten Gruppenunterschiede traten sowohl bei den CD8-positiven Zellen, als auch bei der CD4/CD8-Ratio auf. Diese Daten wurden nicht als Abbildung dargestellt, sind aber in der Gesamtübersicht enthalten (Tabelle 3, Seite 55).

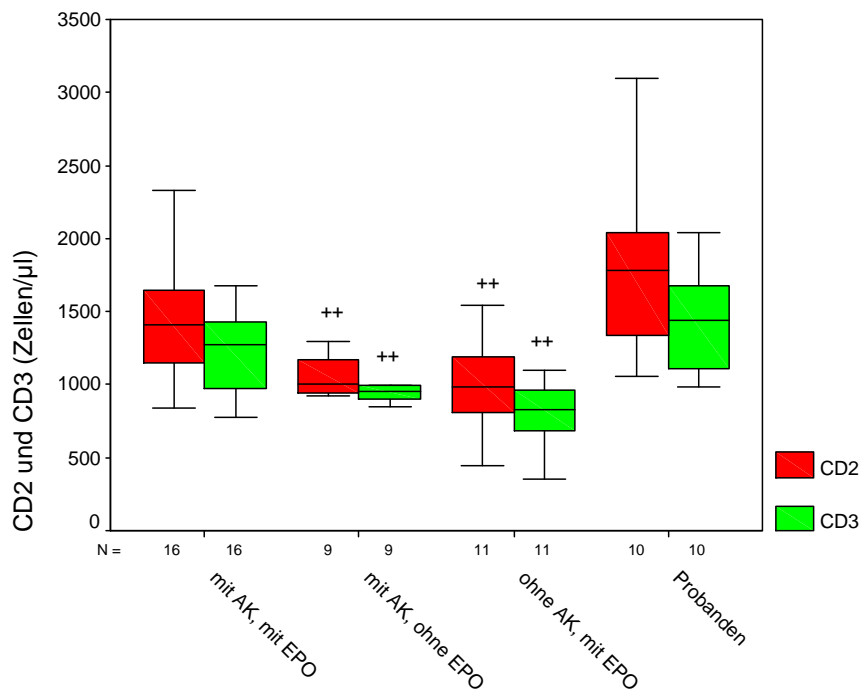


Abbildung 8: Absoluter Anteil der CD2- und CD3-positiven PMNZ im Vollblut der Untersuchungsgruppen im Vergleich zu den Probanden (++)  $p < 0,01$ )

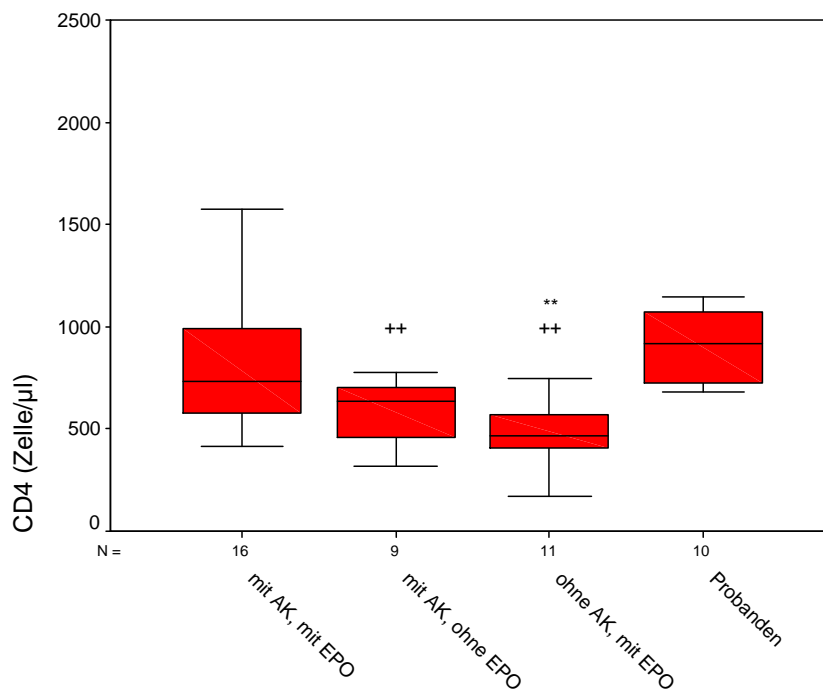


Abbildung 9: Absoluter Anteil der CD4-positiven PMNZ im Vollblut der Untersuchungsgruppen im Vergleich zu den Probanden (++)  $p < 0,01$ ) und im Vergleich zur Patientengruppe mit AK, mit EPO (\*\* $p < 0,01$ )

#### 4.2.2.2. B-Lymphozyten

Die B-Lymphozyten wurden mit den Oberflächenmarkern CD19 und CD20 erfasst.

Die Patientengruppen unterschieden sich untereinander und im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht. In der Summe aller Patientengruppen war aber eine signifikant geringere Expression von CD19 und CD20 im Vergleich zur Kontrollgruppe nachweisbar ( $p < 0,05$ ) (Abbildung 10). Die geringste Zahl CD19- und CD20-positiver Zellen wiesen dabei die Patienten mit AK und ohne rhEPO auf.

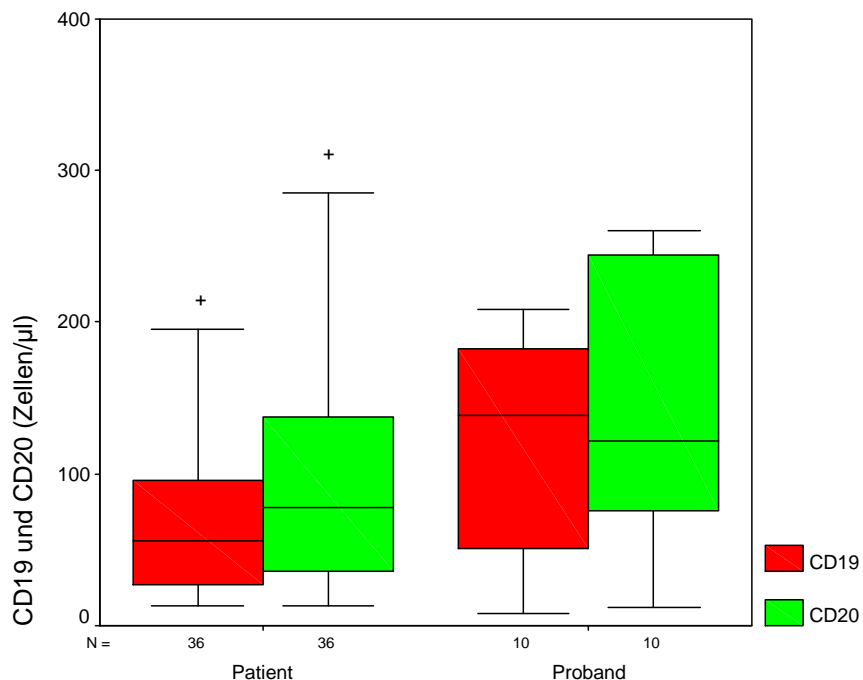


Abbildung 10: Absoluter Anteil der CD19- und CD20-positiven PMNZ im Vollblut der Untersuchungsgruppen im Vergleich zu den Probanden (+  $p < 0,05$ )

#### 4.2.2.3. Monozyten

Die Bestimmung der Monozyten erfolgte mit Hilfe der Antikörper gegen CD13 und CD14. Beim Vergleich der Patientengruppen mit den Probanden sowie innerhalb der Patientengruppen traten keine Unterschiede auf (keine Abbildung, siehe Tabelle 3, Seite 55).

#### **4.2.2.4. NK-Zellen**

Die NK-Zellen wurden anhand des CD16 bestimmt.

In unseren Untersuchungen waren keine Unterschiede zwischen den einzelnen Patientengruppen oder zwischen den Patientengruppen und den Probanden nachweisbar (keine Abbildung, siehe Tabelle 3, Seite 55).

#### **4.2.2.5. Aktivierungsmarker**

Aktivierungsmarker sind Oberflächenmoleküle, die bei Zellaktivierung vermehrt auf der Zelloberfläche exprimiert werden. Als Aktivierungsmarker verwendeten wir HLA-DR, CD25, CD26 sowie CD69. Durch entsprechendes Eingrenzen der Zellpopulationen (gating) im Durchflusszytometer wurden diese Oberflächenmoleküle sowohl auf PMNZ als auch separat auf T- und B-Lymphozyten gemessen.

HLA-DR und CD69 wurden in allen Untersuchungsgruppen gleichstark exprimiert (keine Abbildung, siehe Tabelle 3, Seite 55).

Die Patientengruppe ohne AK-Titer und mit rhEPO wies im Vergleich zur Gruppe mit AK-Titer und mit rhEPO eine verminderte Expression von CD25 auf PMNZ ( $p < 0,05$ ), CD25 auf T-Lymphozyten ( $p < 0,01$ ), CD26 auf PMNZ ( $p < 0,05$ ) und CD26 auf T-Lymphozyten ( $p < 0,05$ ) auf. Die Gruppe ohne AK-Titer und mit rhEPO exprimierte auch im Vergleich zur Kontrollgruppe vermindert CD26 auf PMNZ ( $p < 0,05$ ) und CD26 auf T-Lymphozyten ( $p < 0,05$ ) (Abbildung 11 und 12).

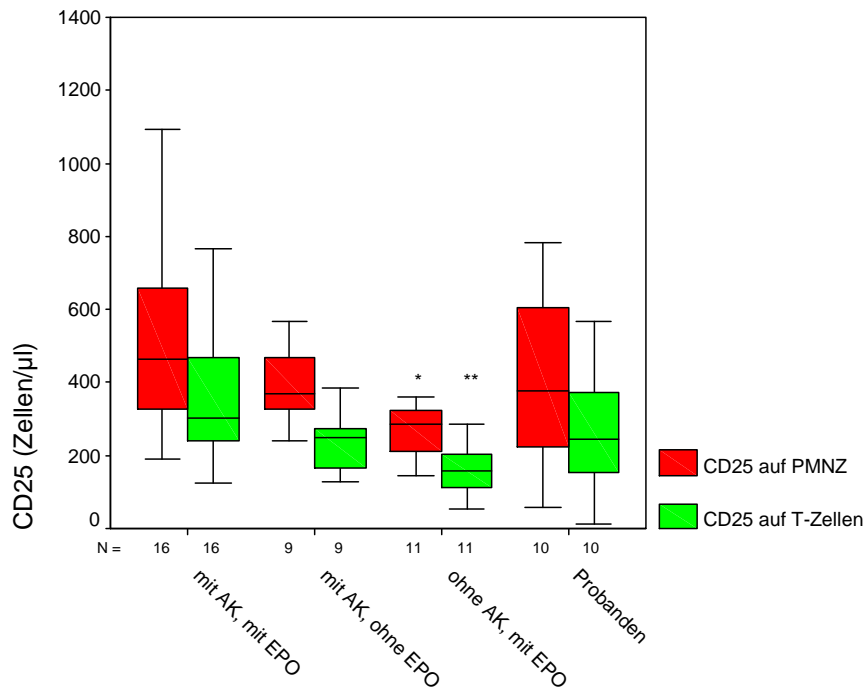


Abbildung 11: Absoluter Anteil der CD25-positiven PMNZ und CD25-positiven T-Zellen im Vollblut der Untersuchungsgruppen im Vergleich zur Patientengruppe mit AK, mit EPO (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ )

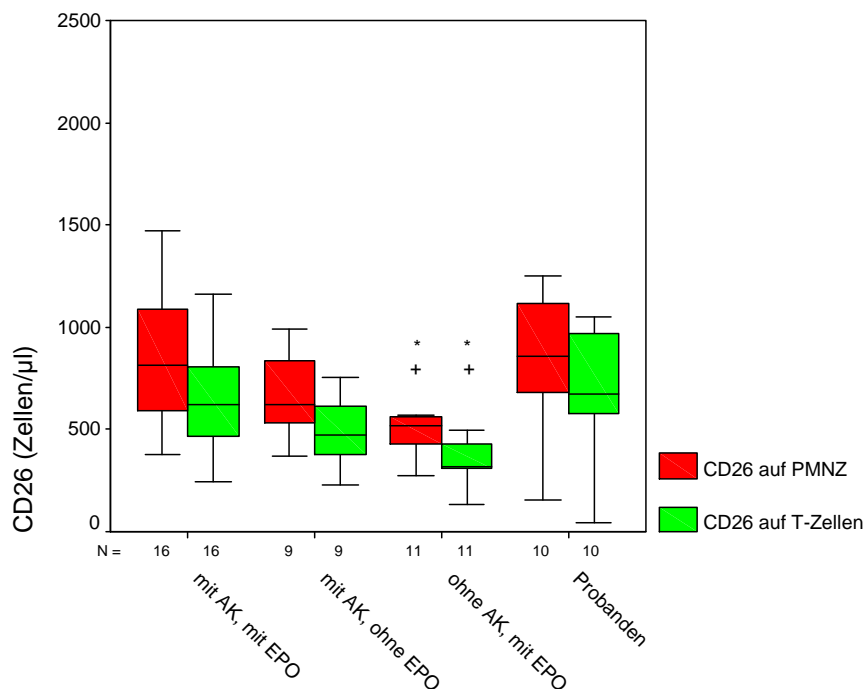


Abbildung 12: Absoluter Anteil der CD26-positiven PMNZ und CD26-positiven T-Zellen im Vollblut der Untersuchungsgruppen im Vergleich zu den Probanden (+  $p < 0,05$ ) und im Vergleich zur Patientengruppe mit AK, mit EPO (\* $p < 0,05$ )

### 4.2.3. Messung nach Isolierung der PMNZ

#### 4.2.3.1. T-Lymphozyten

Die Bestimmung der T-Lymphozyten erfolgte durch die Oberflächenantigene CD2, CD3, CD4 und CD8. Es traten keine Expressionsunterschiede in den Untersuchungsgruppen auf, auch die errechnete CD4/CD8-Ratio blieb ohne signifikanten Gruppenunterschied (keine Abbildung, siehe Tabelle 4, Seite 56).

#### 4.2.3.2. B-Lymphozyten

Die B-Lymphozyten wurden mit Hilfe der Oberflächenmarker CD19 und CD20 bestimmt. Die Patientengruppe mit AK-Titer und mit rhEPO hatte verglichen mit der Kontrollgruppe einen geringeren Anteil CD19-positiver Zellen ( $p < 0,01$ ).

Die CD20-positiven Zellen waren in den Patientengruppen ohne AK-Titer und mit rhEPO sowie mit AK-Titer und ohne rhEPO im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe ( $p < 0,01$ ) vermindert (Abbildung 13).

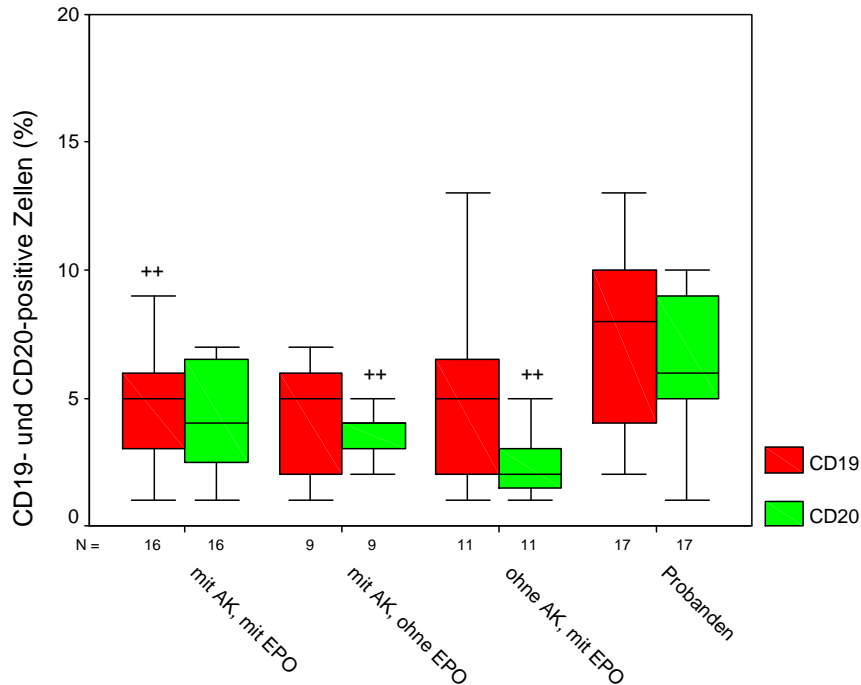


Abbildung 13: Relativer Anteil der CD19- und CD20-positiven Zellen nach Isolierung der PMNZ der Untersuchungsgruppen im Vergleich zu den Probanden (++)  $p < 0,01$ )

#### 4.2.3.3. Monozyten

Beim Vergleich der CD13-positiven Zellen konnte ein signifikant erhöhter Wert ( $p < 0,01$ ) in der Patientengruppe mit AK, ohne rhEPO sowohl im Vergleich zu den anderen beiden Patientengruppen als auch zur gesunden Kontrollgruppe gefunden werden. (Abbildung 14).

Für CD14 konnte aufgrund der niedrig gemessenen Werte keine sichere Aussage getroffen werden (keine Abbildung, siehe Tabelle 4, Seite 56).

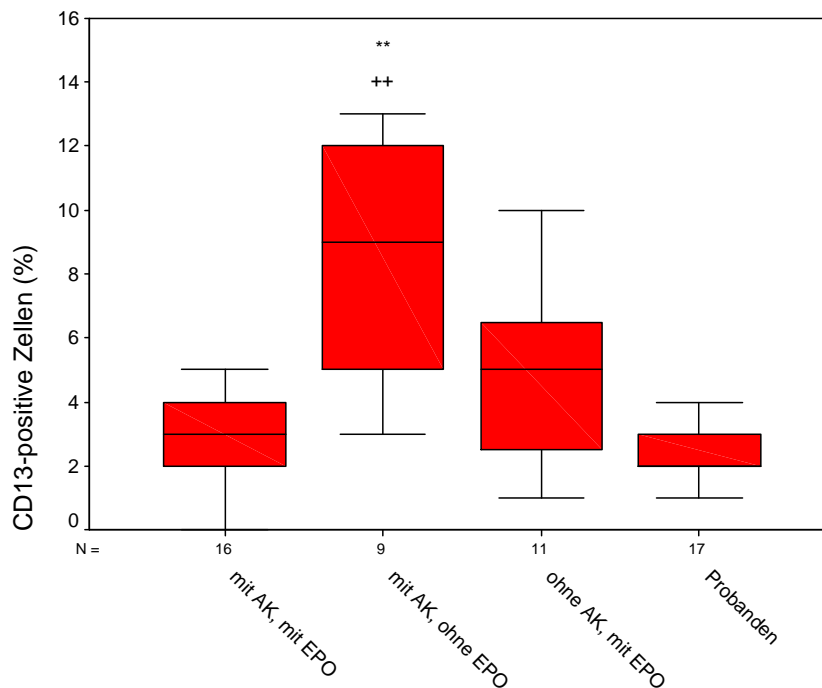


Abbildung 14: Relativer Anteil der CD13-positiven Zellen nach Isolierung der PMNZ der Untersuchungsgruppen im Vergleich zu den Probanden (++  $p < 0,01$ ) und im Vergleich zur Patientengruppe mit AK, mit EPO (\*\* $p < 0,01$ )

#### 4.2.3.4. NK-Zellen

Die Bestimmung der CD16-positiven Zellen zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Vergleichsgruppen (keine Abbildung, siehe Tabelle 4, Seite 56).



#### 4.2.3.5. Aktivierungsmarker

Wir verwendeten die gleichen Aktivierungsmarker, die auch in der Untersuchung des Vollblutes eingesetzt wurden.

In den Patientengruppen mit AK-Titer, mit rhEPO und ohne AK-Titer, mit rhEPO war eine geringere Expression ( $p < 0,01$ ) des HLA-DR auf B-Lymphozyten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe nachweisbar (Abbildung 15).

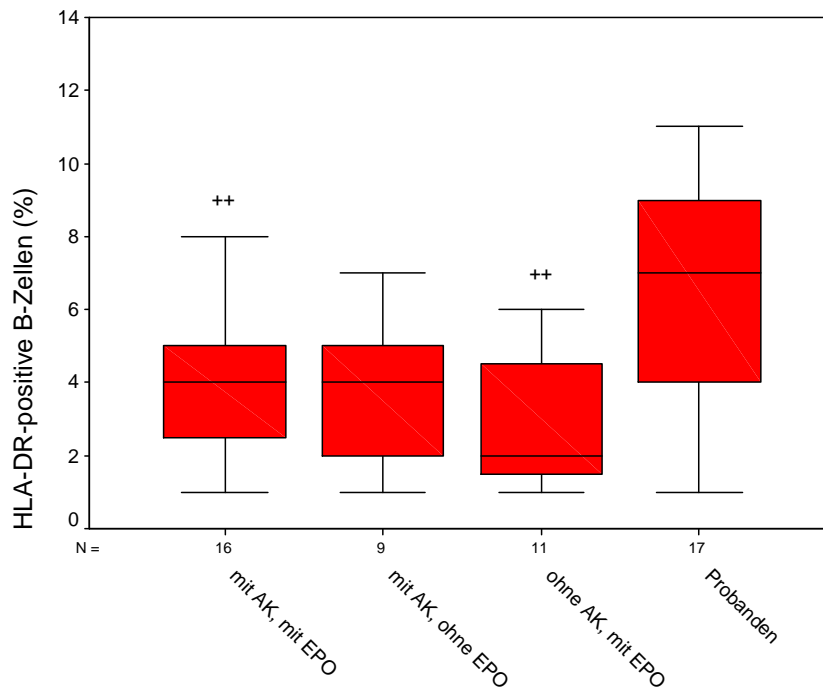


Abbildung 15: Relativer Anteil der HLA-DR-positiven B-Zellen nach Isolierung der PMNZ der Untersuchungsgruppen im Vergleich zu den Probanden (++  $p < 0,01$ )

Die Untersuchungen des CD25 erbrachten keine signifikanten Gruppenunterschiede (keine Abbildung, siehe Tabelle 4, Seite 56).

Der Anteil der CD26-positiven PMNZ und CD26-positiven T-Zellen war in der Patientengruppe ohne AK-Titer, mit rhEPO im Vergleich zur Gruppe mit AK-Titer, mit rhEPO signifikant erniedrigt ( $p < 0,05$ ) (Abbildung 16).

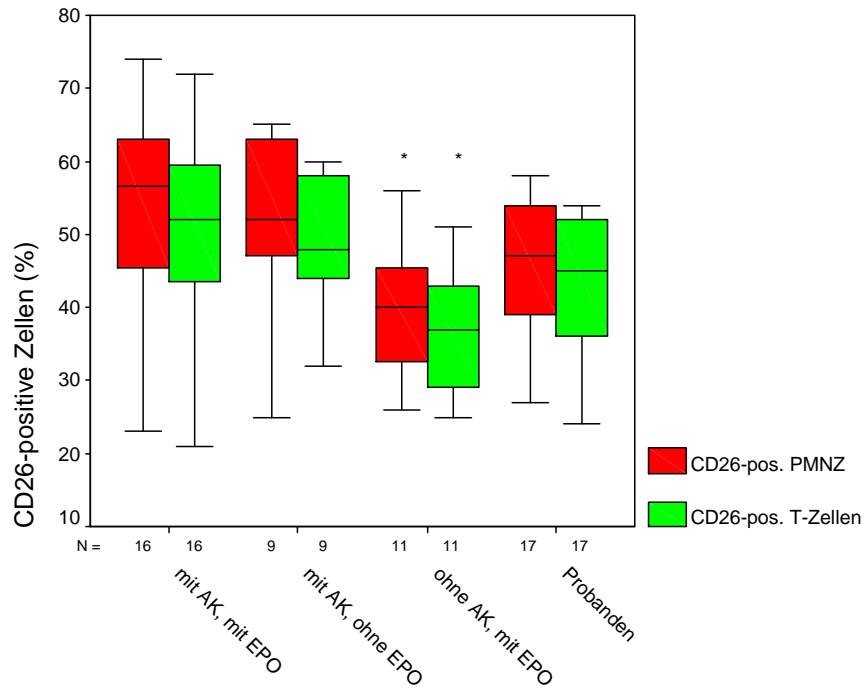


Abbildung 16: Relativer Anteil der CD26-positiven PMNZ und CD26-positiven T-Zellen nach Isolierung der PMNZ der Untersuchungsgruppen im Vergleich zur Patientengruppe mit AK, mit EPO (\* $p < 0,05$ )

### **4.3. *In vitro*-Untersuchungen an Zellkulturen mit PMNZ nach Zugabe von Pokeweed Mitogen und Erythropoietin**

Zur Bestimmung der Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit wurden alle Studienteilnehmer in einer Gruppe zusammengefasst. Eingeschlossen wurde auch die Patientengruppe ohne AK und ohne rhEPO, die in den Gruppenvergleichen aufgrund der geringen Patientenzahl (n=2) nicht statistisch ausgewertet wurde. Auf Grund der erhöhten Proliferation, und der damit verbundenen größeren Unterschiede, beziehen sich die folgenden Ergebnisse nur auf die mit PWM stimulierten Zellkulturen. In den Zellkulturen ohne PWM gab es verglichen mit den Stimulierten keine statistisch nachweisbaren Abweichungen.

Signifikante Unterschiede im Vergleich zu rhEPO 0 sind mit \*(p<0,05), \*\*(p<0,01) bzw. \*\*\*(p<0,001) gekennzeichnet.

Traten Unterschiede in den einzelnen Untersuchungsgruppen hinsichtlich der Veränderungen nach Stimulation mit PWM oder rhEPO auf, wurden diese graphisch gesondert gezeigt. Dabei verwendeten wir \*(p<0,05), \*\*(p<0,01) bzw. \*\*\*(p<0,001) zur Darstellung der signifikanten Abweichungen der Patientengruppen von der Kontrollgruppe.

#### **4.3.1. T-Zellen**

Nach 24stündiger Inkubation mit unterschiedlichen Erythropoietinkonzentrationen waren keine Unterschiede im Expressionsmuster der T-Zell-Marker nachweisbar. Nach 48 Stunden konnte eine erhöhte Expression von CD3 in den Zellkulturen mit rhEPO 50 und rhEPO 100 im Vergleich zu rhEPO 0 gemessen werden (p<0,01) (Abbildung 17). Auch fanden wir nach 48 Stunden eine vermehrte Expression von CD4 auf PMNZ, die mit rhEPO 100 inkubiert waren im Vergleich zu rhEPO 0 (p<0,05) (Abbildung 18). Bei der Bestimmung der CD8-positiven Zellen war keine signifikante Veränderung in Abhängigkeit von der rhEPO-Dosis feststellbar (keine Abbildung, siehe Tabelle 5, Seite 57). Die Ermittlung der CD4/CD8-Ratio blieb ohne signifikante Erythropoietinwirkung (keine Abbildung, siehe Tabelle 5, Seite 57).

Beim Vergleich der Gruppen untereinander fiel eine verminderte Zunahme der Expression von CD4 nach 72 Stunden unter Stimulation mit PWM in der Gruppe der Nonresponder verglichen mit der Kontrollgruppe auf (p<0,01) (Abbildung 19). Die Gabe von rhEPO hatte dabei keinen Einfluss.

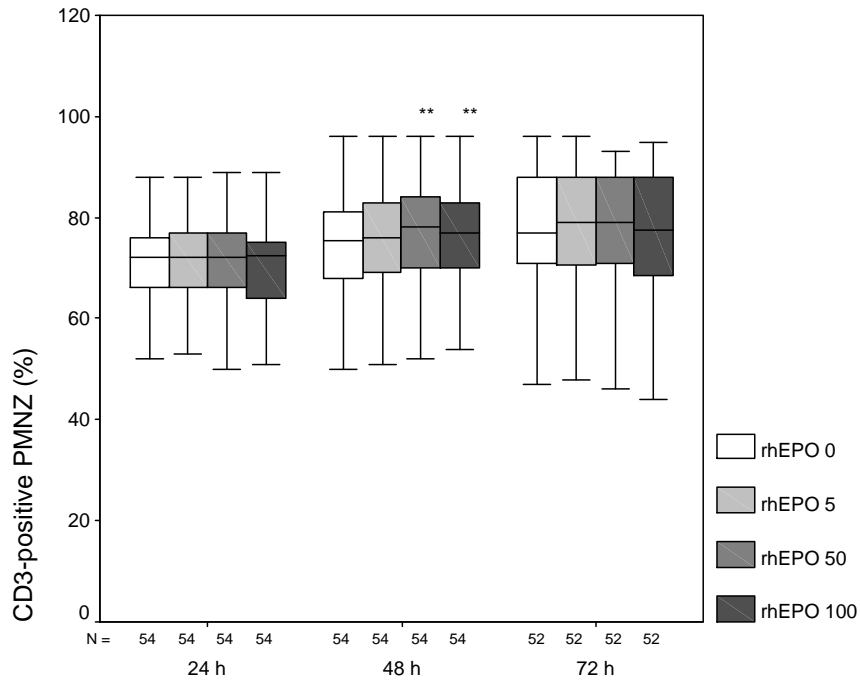


Abbildung 17: Relativer Anteil der CD3-positiven PMNZ der Untersuchungsgruppen in Abhängigkeit vom Zeitpunkt nach Zugabe von rhEPO in unterschiedlicher Dosis im Vergleich zu rhEPO 0 (\*\* p<0,01)

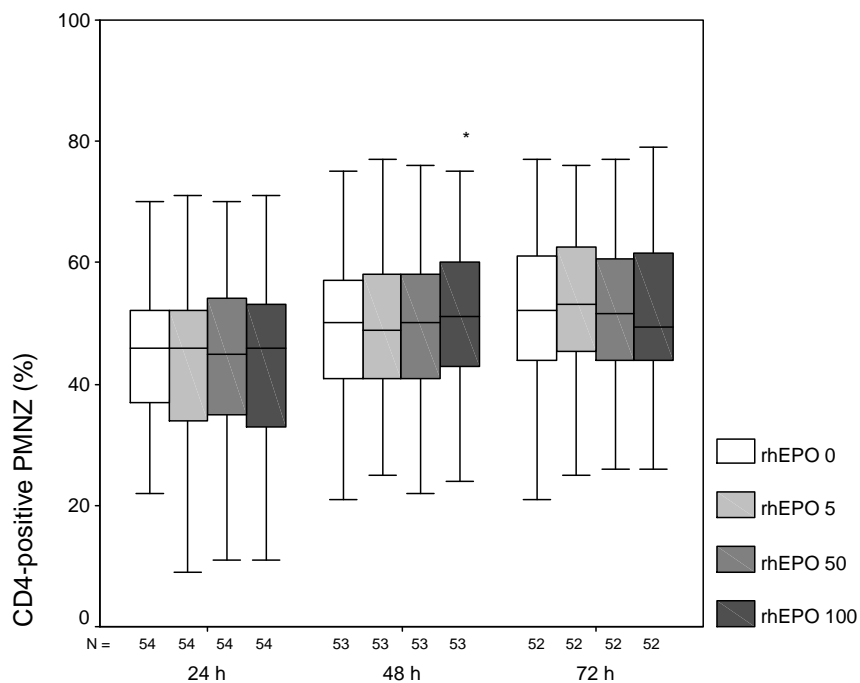


Abbildung 18: Relativer Anteil der CD4-positiven PMNZ der Untersuchungsgruppen in Abhängigkeit vom Zeitpunkt nach Zugabe von rhEPO in unterschiedlicher Dosis im Vergleich zu rhEPO 0 (\*p<0,05)

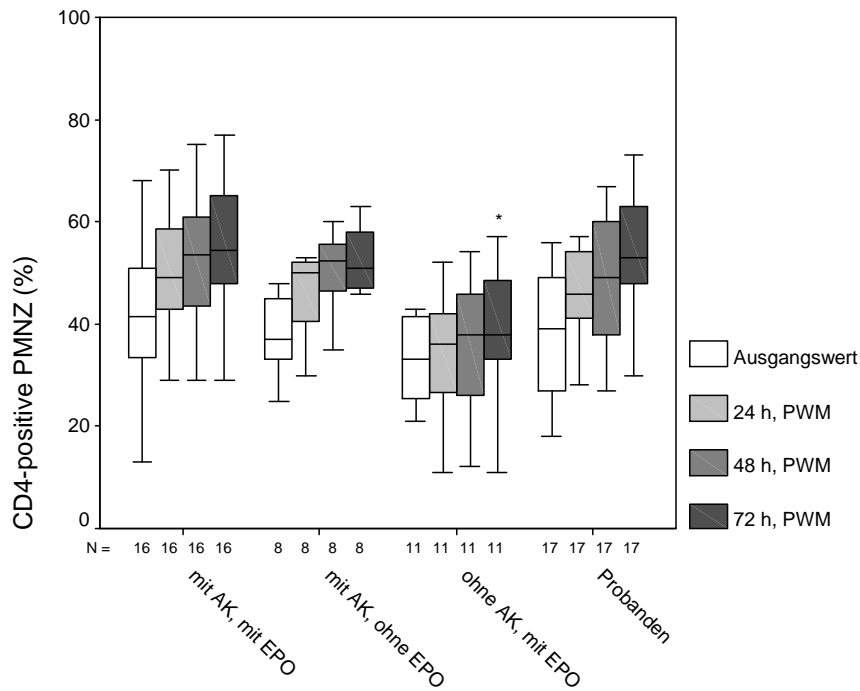


Abbildung 19: Relativer Anteil der CD4-positiven PMNZ der Untersuchungsgruppen nach Stimulation mit PWM im Vergleich zur Kontrollgruppe (\* $p < 0,05$ )

#### 4.3.2. B-Zellen

Der Anteil der B-Lymphozyten wurde mit Hilfe der Oberflächenmarker CD19 und CD20 gemessen. Zwischen den Untersuchungsgruppen traten keine Unterschiede im Expressionsmuster nach Stimulation mit PWM auf. Unter Erythropoietin waren keine signifikanten Veränderungen von CD19 und CD20 nachweisbar (keine Abbildung, siehe Tabelle 6, Seite 58).

#### 4.3.3. Monozyten

Nach 24 und 48 Stunden konnte mit ansteigender Erythropoietindosis eine deutlich verminderte Expression des CD13 nachgewiesen werden (nach 24 Stunden bei rhEPO 100 ( $p < 0,001$ ) und rhEPO 50 ( $p < 0,01$ ) im Vergleich zu rhEPO 0 und nach 48 Stunden bei rhEPO 50 ( $p < 0,001$ ) und rhEPO 100 ( $p < 0,001$ ) im Vergleich zu rhEPO 0 (Abbildung 20).

Zum CD14-Marker lässt sich auf Grund der sehr niedrig gemessenen Werte keine sichere Aussage treffen (keine Abbildung, siehe Tabelle 6, Seite 58).

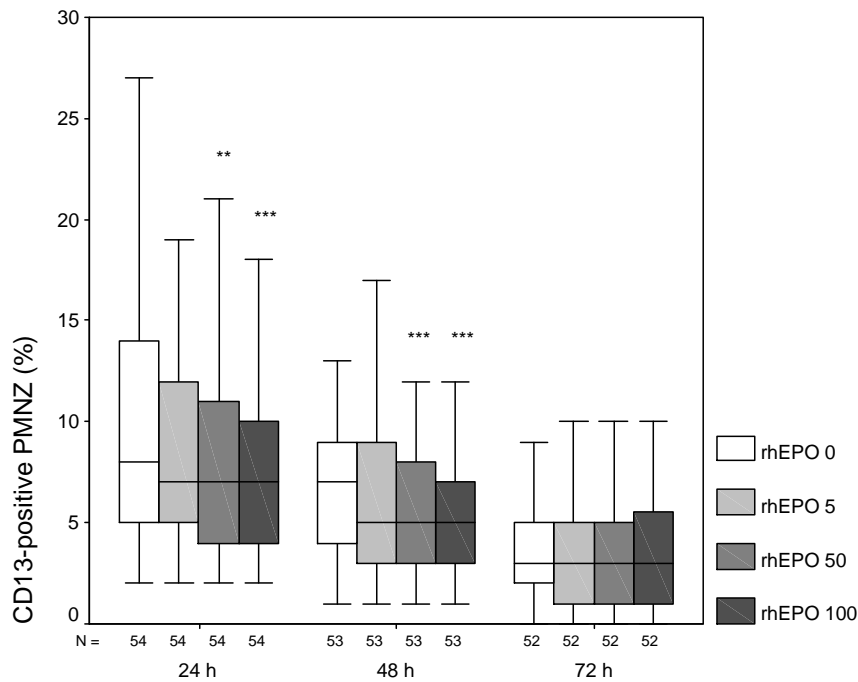


Abbildung 20: Relativer Anteil der CD13-positiven PMNZ der Untersuchungsgruppen in Abhängigkeit vom Zeitpunkt nach Zugabe von rhEPO in unterschiedlicher Dosis im Vergleich zu rhEPO 0 (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ )

#### 4.3.4. NK-Zellen

Die Expression von CD16 wies zwischen den Untersuchungsgruppen nach Stimulation mit PWM keine Unterschiede auf. Unter rhEPO waren keine Veränderungen der Proliferation von natürlichen Killerzellen nachzuweisen (keine Abbildung, siehe Tabelle 6, Seite 58).

#### 4.3.5. Aktivierungsmarker

HLA-DR auf PMNZ, auf T-Zellen und auf B-Zellen:

In Abhängigkeit von der zugegebenen Menge an rhEPO war nach 24 und 48 Stunden eine Abnahme der Expression von HLA-DR messbar. Nach 24 Stunden fand sich eine verminderte Expression der HLA-DR-positiven Zellen bei rhEPO 100 ( $p < 0,001$ ), rhEPO 50 ( $p < 0,001$ ) und rhEPO 5 ( $p < 0,05$ ) verglichen mit rhEPO 0. Auch nach 48 Stunden war eine verminderte Expression nachweisbar, in diesem Fall jedoch nur bei rhEPO 100 ( $p < 0,001$ ) und rhEPO 50 ( $p < 0,001$ ) verglichen mit rhEPO 0 (Abbildung 21).

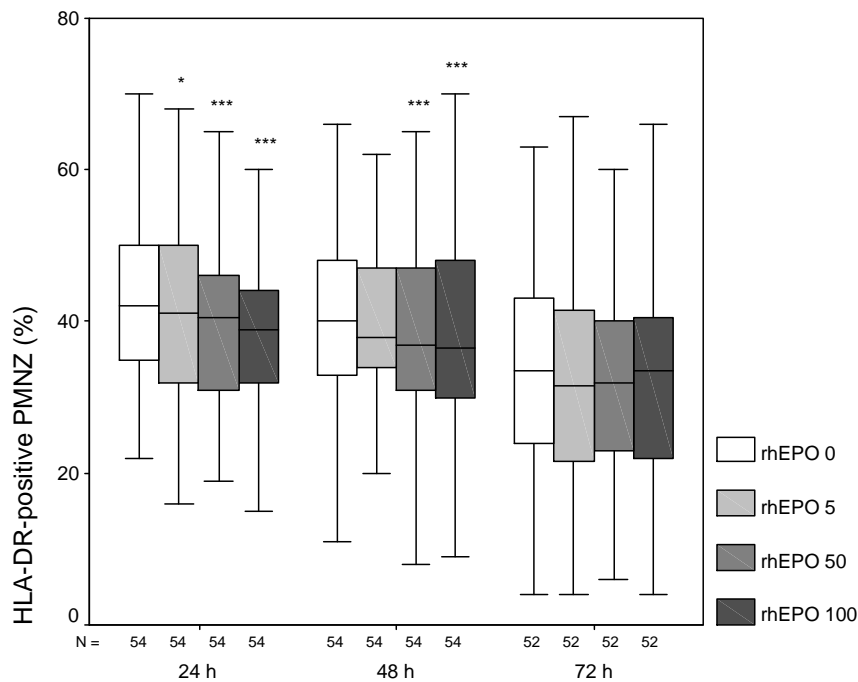


Abbildung 21: Relativer Anteil der HLA-DR-positiven PMNZ der Untersuchungsgruppen in Abhängigkeit vom Zeitpunkt nach Zugabe von rhEPO in unterschiedlicher Dosis im Vergleich zu rhEPO 0 (\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ )

Auch die HLA-DR-positiven T-Zellen wiesen mit steigender rhEPO-Dosis eine verminderte Expression auf. So konnte nach 24 Stunden in den Kulturen mit rhEPO 100 ( $p < 0,001$ ), rhEPO 50 ( $p < 0,001$ ) sowie rhEPO 5 ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zu rhEPO 0 ein geringerer Anteil HLA-DR-positiver T-Zellen gemessen werden. Nach 48 Stunden fanden wir bei rhEPO 100 ( $p < 0,001$ ) und rhEPO 50 ( $p < 0,001$ ) verglichen mit rhEPO 0 eine verminderte Expression von HLA-DR auf T-Lymphozyten (Abbildung 22).

Unter der Gabe von rhEPO traten keine Veränderungen der Expression von HLA-DR auf B-Lymphozyten auf (keine Abbildung, siehe Tabelle 7, Seite 59).

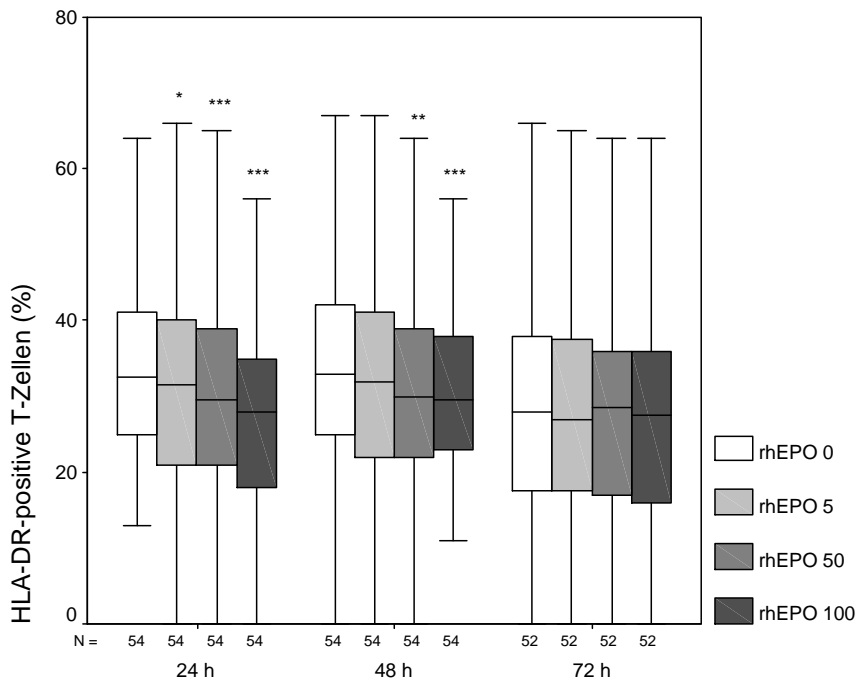


Abbildung 22: Relativer Anteil der HLA-DR-positiven T-Zellen der Untersuchungsgruppen in Abhängigkeit vom Zeitpunkt nach Zugabe von rhEPO in unterschiedlicher Dosis im Vergleich zu rhEPO 0 (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ )

#### CD25 auf PMNZ und T-Zellen:

Die Expression von CD25 auf PMNZ verringerte sich nach 24 Stunden unter rhEPO 100 ( $p < 0,01$ ) verglichen mit rhEPO 0 (Abbildung 23). Sowohl nach 48 wie auch nach 72 Stunden waren keine Veränderungen in Abhängigkeit von der rhEPO-Konzentration nachweisbar.

Auf die Expression von CD25 auf T-Zellen hatte rhEPO keinen Einfluss (keine Abbildung, siehe Tabelle 7, Seite 59).

Beim Vergleich der Gruppen untereinander fiel ein unterschiedliches Proliferationsverhalten nach Stimulation mit PWM auf. Die Expression von CD 25 auf PMNZ wies in der Gruppe der Nonresponder im Vergleich zur Kontrollgruppe nach 24 Stunden ( $p < 0,01$ ) und 48 Stunden ( $p < 0,05$ ) einen deutlich verminderten Anstieg auf (Abbildung 24). Die Gabe von rhEPO hatte darauf keinen Einfluss.



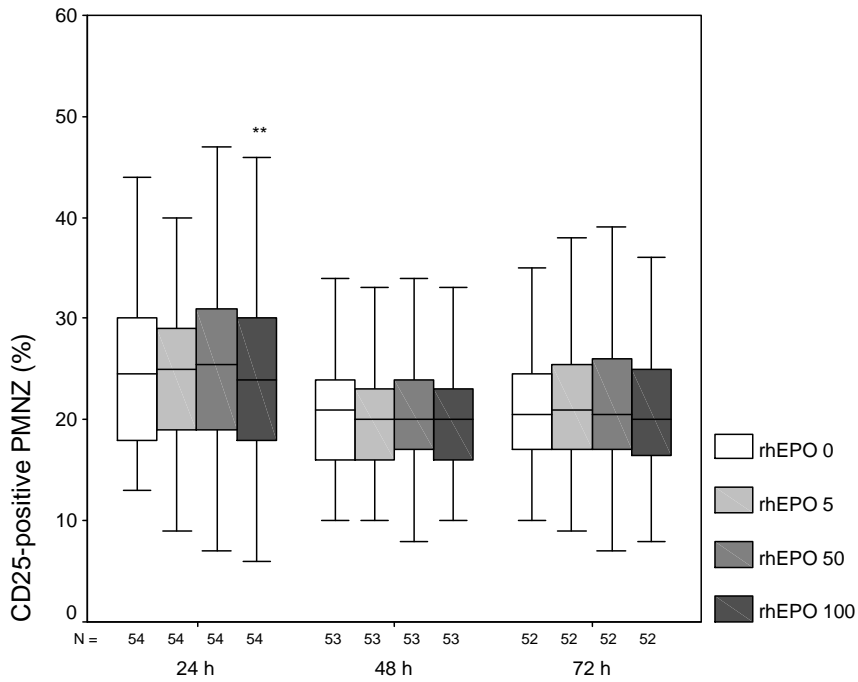


Abbildung 23: Relativer Anteil der CD25-positiven PMNZ der Untersuchungsgruppen in Abhängigkeit vom Zeitpunkt nach Zugabe von rhEPO in unterschiedlicher Dosis im Vergleich zu rhEPO 0 (\*\*p<0,01)

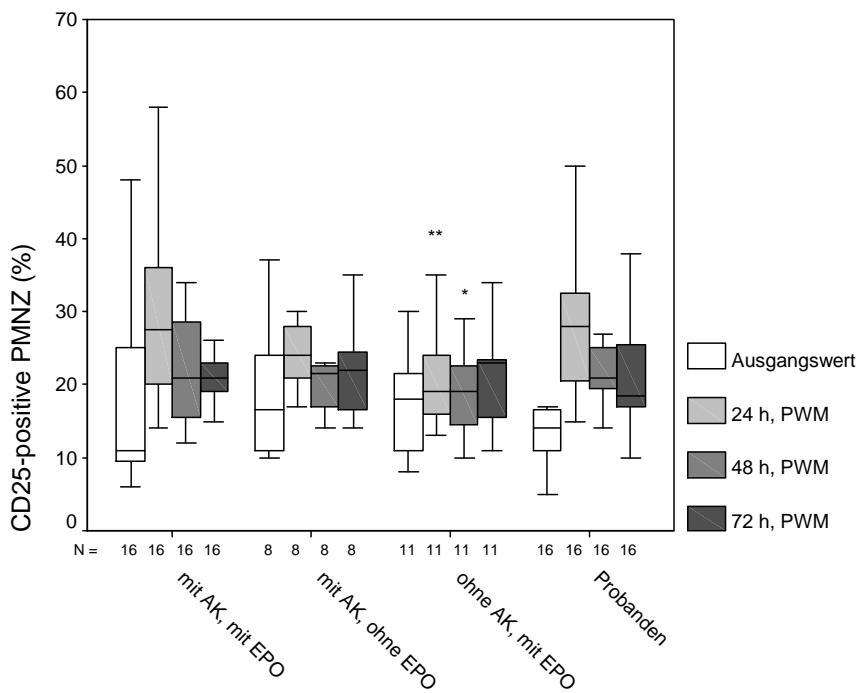


Abbildung 24: Relativer Anteil der CD25-positiven PMNZ der Untersuchungsgruppen nach Stimulation mit PWM im Vergleich zur Kontrollgruppe (\*p<0,05; \*\*p<0,01)

## CD26 auf PMNZ und auf T-Zellen:

Die Untersuchungen bezüglich des Oberflächenmarkers CD26 zeigten sowohl für PMNZ als auch für T-Zellen keine signifikanten Veränderungen in Abhängigkeit von den unterschiedlichen Erythropoietinkonzentrationen (keine Abbildung, siehe Tabelle 8, Seite 60).

## CD69 auf PMNZ, auf T-Zellen und auf B-Zellen:

Der Anteil der CD69-positiven PMNZ war nach 24 Stunden in der Kultur mit rhEPO 100 im Vergleich zu rhEPO 0 vermindert ( $p < 0,01$ ) (Abbildung 25). Auch die Untersuchung des CD69 bei T-Lymphozyten offenbarte nach 24 Stunden eine verminderte Expression bei rhEPO 100 verglichen mit rhEPO 0 ( $p < 0,01$ ) (Abbildung 26). Nach 48 und 72stündiger Inkubation mit verschiedenen rhEPO-Konzentrationen traten keine Veränderungen der Expression von CD69 auf PMNZ und T-Lymphozyten auf. Die Untersuchung der CD69-positiven B-Lymphozyten konnte ebenfalls keine signifikanten Expressionsunterschiede nach Inkubation mit rhEPO aufzeigen (keine Abbildung, siehe Tabelle 8, Seite 60).

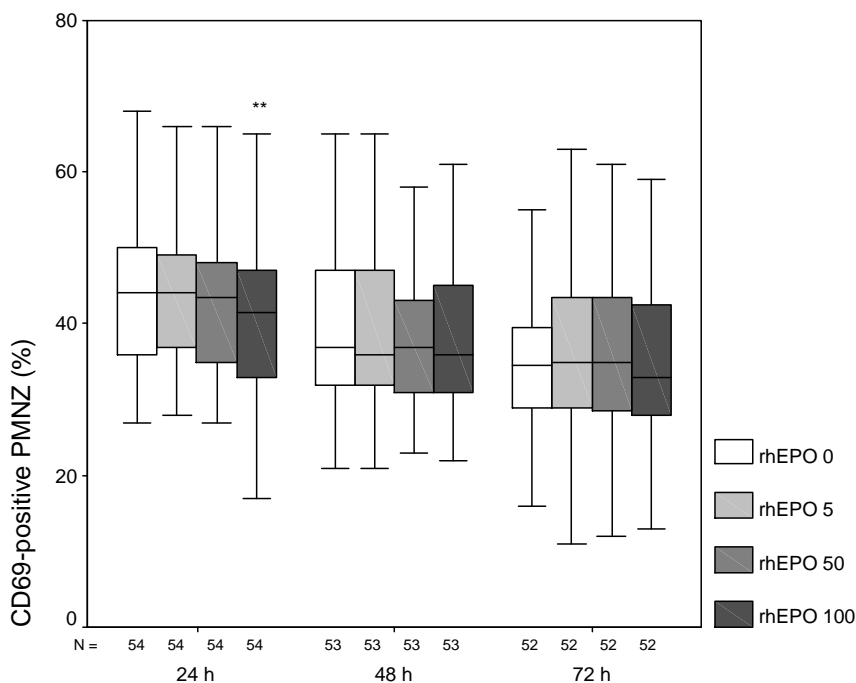


Abbildung 25: Relativer Anteil der CD69-positiven PMNZ der Untersuchungsgruppen in Abhängigkeit vom Zeitpunkt nach Zugabe von rhEPO in unterschiedlicher Dosis im Vergleich zu rhEPO 0 (\*\* $p < 0,01$ )

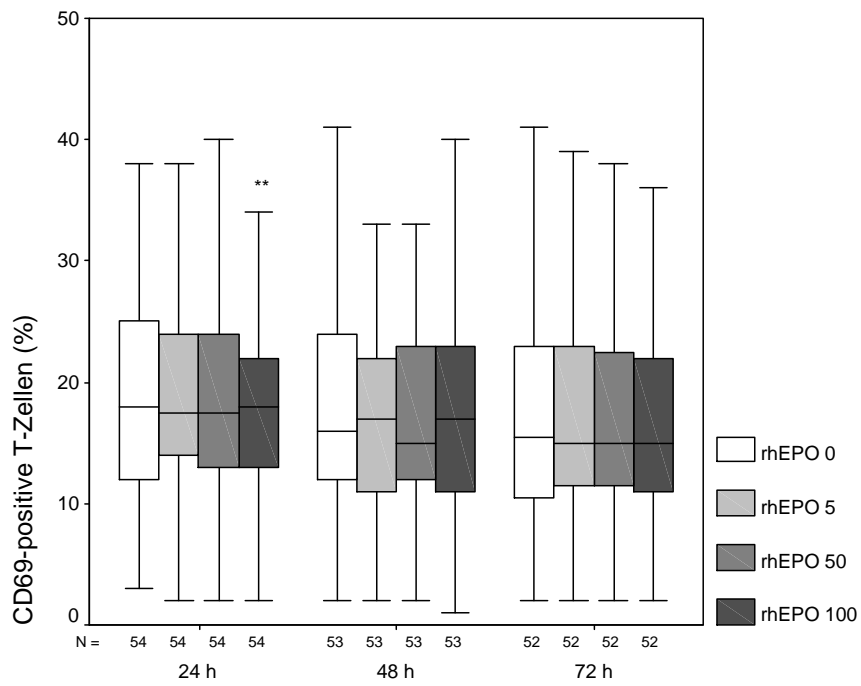


Abbildung 26: Relativer Anteil der CD69-positiven T-Zellen der Untersuchungsgruppen in Abhängigkeit vom Zeitpunkt nach Zugabe von rhEPO in unterschiedlicher Dosis im Vergleich zu rhEPO 0 (\*\* $p < 0,01$ )

## 5. Diskussion

Immunologische Veränderungen bei Dialysepatienten sind in den vergangenen Jahren vielfach untersucht worden. Einige Arbeitsgruppen fanden Hinweise dafür, dass Erythropoietin einen immunstimulierenden Effekt hat.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, den Einfluss von Erythropoietin auf ausgewählte Oberflächenmarker immunologischer Zellen von Hämodialysepatienten sowie einer gesunden Kontrollgruppe zu untersuchen.

Die Messungen erfolgten mit Hilfe der Durchflusszytometrie.

Die Dialysepatienten wurden aufgrund der Impfantwort nach Hepatitis B-Impfung in Responder und Nonresponder eingeteilt. Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal war die Behandlung oder Nichtbehandlung mit Erythropoietin. Anhand dieser Auswahlkriterien wurden vier Patientengruppen unterschieden, diese wurden untereinander und mit einer gesunden Kontrollgruppe verglichen. Damit konnte der längerfristige Einfluss des Erythropoietins untersucht werden.

Im zweiten Untersuchungsabschnitt erfolgten *in vitro*-Untersuchungen an separierten peripheren mononukleären Zellen der vier Patientengruppen und einer gesunden Kontrollgruppe. Dazu wurden ausgewählte Oberflächenmarker nach Stimulation peripherer mononukleärer Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Erythropoietin über mehrere Tage bestimmt. Auf diese Weise versuchten wir, kurzfristige und konzentrationsabhängige Effekte nachzuweisen.

### Differentialblutbild

Im Differentialblutbild unterschieden sich bei dieser Untersuchung die Dialysepatienten und die gesunden Probanden deutlich.

Als Ausdruck der gesteigerten Aktivierung des Immunsystems bei Dialysepatienten ist die Gesamtleukozytenzahl erhöht. Das resultiert aus einer massiv gesteigerten Anzahl von Granulozyten als Folge einer chronischen Entzündungsreaktion durch den immer wieder stattfindenden Kontakt mit Fremdmaterial (Dialysemembran). Die dadurch ausgelöste Akut-Phase-Reaktion führt zum Beispiel zur Bildung von CRP, Amyloid A und der Aktivierung des Komplementsystems.

Der Anteil der Lymphozyten war bei den Dialysepatienten (insbesondere in den Gruppen mit Antikörpern, ohne rhEPO und ohne Antikörper, mit rhEPO im

Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant vermindert. Dies führt trotz der Immunaktivierung zu einem Defizit der adaptativen Immunantwort (Chatenoud et al. 1986, Kurz et al. 1986, Alexiewicz et al. 1991).

## **T-Lymphozyten**

T-Lymphozyten spielen eine zentrale Rolle im Immunsystem. Durch Interaktion mit antigenpräsentierenden Zellen sind T-Zellen an der Immunantwort nach Antigenkontakt beteiligt. An ihrer Oberfläche wird unter anderem CD2 und CD3 exprimiert. Für die Wechselwirkung von Lymphozyten und antigenpräsentierenden Zellen ist CD2 für die Zellbindung von entscheidender Bedeutung. CD3 ist ein Bestandteil des T-Zell-Rezeptors, welcher an HLA-Klasse I- und II-Moleküle der antigenpräsentierenden Zellen bindet.

In unseren Untersuchungen zeigten die Zellen im Vollblut der Nonresponder mit rhEPO-Therapie und die der Responder ohne rhEPO-Therapie im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikant geringere Expression von CD2 und CD3 ( $p < 0,01$ ). Nach Separierung der PMNZ konnten dagegen keine Gruppenunterschiede beobachtet werden. Das ist ein Hinweis darauf, dass zwar die absolute Zahl der CD2- und CD3-positiven Zellen bei Dialysepatienten vermindert ist, nicht aber ihr Anteil an den Lymphozyten. Auch andere Arbeitsgruppen stellten eine reduzierte Zahl an CD2- und CD3-positiven Zellen bei Hämodialysepatienten fest (Raska et al. 1983, Chatenoud et al. 1986, Ueki et al. 1993, Rabb et al. 1994, Moser et al. 2003, Meier et al. 2005). Eine verminderte Expression von CD3 bei Nonrespondern im Vergleich zu Respondern nach einer Hepatitis B-Impfung von Hämodialysepatienten fand die Arbeitsgruppe um Stachowski et al. 1994.

Weitere Zelloberflächenmoleküle werden auf T-Zell-Subpopulationen exprimiert. So ist CD4 ein Korezeptor des T-Zell-Rezeptors für HLA-Klasse II restringierte T-Helferzellen. Ihre hauptsächliche Funktion ist die Aktivierung von Makrophagen und B-Zellen.

CD8 hat ebenfalls eine Funktion als Korezeptor, allerdings für HLA-Klasse I restringierte zytotoxische T-Zellen, deren Funktion die Zerstörung infizierter Zielzellen ist.

So sind T-Zellen sowohl für die humorale als auch für die zellvermittelte Immunantwort von entscheidender Bedeutung.

Wir konnten in unserer Arbeit eine geringere Expression von CD4 in der Patientengruppe der Nonresponder mit rhEPO-Therapie und der Responder ohne rhEPO-Therapie im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellen ( $p < 0,01$ ). Eine verminderte Expression von CD4 bei Hämodialysepatienten im Vergleich zur

Normalbevölkerung konnten auch andere Studien belegen (Raska et al. 1983, Chatenoud et al. 1986, Ueki et al. 1993, Rabb et al. 1994, Moser et al. 2003, Meier et al. 2005). Einen signifikanten Unterschied gab es auch innerhalb der Patientengruppen. Die Zellen der Nonresponder mit rhEPO-Therapie wiesen eine geringere Expression von CD4 als die Zellen der Respondergruppe ( $p < 0,01$ ) auf. Das bedeutet, dass eine Verminderung der T-Zellen, insbesondere der T-Helferzellen, mitverantwortlich sein kann für die unzureichende Immunantwort nach einer Hepatitis B-Impfung. Die Ergebnisse der Arbeit von Fanelli et al. 1992 scheinen diese Annahme zu bestätigen. In seiner Untersuchung an Dialysepatienten war die Zahl der T-Helferzellen bei Nonrespondern verglichen mit Respondern und einer Kontrollgruppe signifikant verringert.

Die zelluläre Expression von CD8 war ohne signifikanten Gruppenunterschied. Die Gabe von Erythropoietin an der Dialyse hatte auf die Expression von CD2, CD3, CD4 und CD8 keinen Einfluss.

Eine weitere Differenzierung der T-Helferzellen erfolgt nach Antigenkontakt in TH1- und TH2-Zellen. Die TH1-Zellen sind für die zellvermittelte Immunantwort (z.B. durch Aktivierung von Makrophagen) verantwortlich, während die TH2-Zellen die B-Lymphozyten zur Sekretion von Immunglobulinen anregen. Es sind mehrere Faktoren bekannt, welche die Differenzierung in TH1- oder TH2-Zellen beeinflussen. IL-12, das beispielsweise von antigenpräsentierenden Zellen gebildet wird, fördert TH1-Zellen, während IL-4 von T-Zellen und Mastzellen die Bildung von TH2-Zellen begünstigt (Swain et al. 1999, Constant et al. 1997).

Nach einer Untersuchung von Sester et al. 2000 weisen Dialysepatienten eine Erhöhung der TH1-Zellen bei einer normalen Zahl von TH2-Zellen auf. Diese Imbalance der T-Zell-Aktivierung war mit einer erhöhten Produktion von IL-12 durch Monozyten verbunden und scheint ein wichtiger Grund für die mangelnde humorale Immunantwort bei Dialysepatienten zu sein.

Nach Stimulation mit Pokeweed Mitogen kam es in allen Untersuchungsgruppen zu einer Proliferation der CD2-, CD3- und CD4-positiven Zellen. Die Patientengruppe der Nonresponder wies im Vergleich zur Kontrollgruppe jedoch eine geringere Zunahme der Expression von CD4 nach 72 Stunden auf. Andere Autoren beschrieben ebenfalls eine verminderte Stimulierbarkeit der T-Helferzellen von Dialysepatienten durch Mitogene (Dumann et al. 1990, Donati et al. 1991, Kurz et al. 1986, Ladefoged et al. 1990, Ankersmit et al. 2001). Insbesondere Nonresponder wiesen eine verminderte Proliferation auf (Meuer et al. 1987). Dass diese Abweichung wahrscheinlich kein primärer T-Zell-Defekt ist, sondern nur sekundär aufgrund einer fehlerhaften Kostimulation durch antigenpräsentierende Zellen auftritt, ist in mehreren Arbeiten dokumentiert. Girndt et al. konnten 1993 zeigen, dass eine Störung des kostimulatorischen

Signals B7/CD28 vorliegt. Nach Zugabe von anti-CD28-Antikörpern kam es *in vitro* zur Aufhebung des Proliferationsdefektes der T-Zellen. Dumann et al. beschrieben 1990 eine gesteigerte Proliferationskapazität durch IL-2. 2003 veröffentlichten van Riemsdijk et al. eine Untersuchung, in der Lymphozyten *in vitro* nach Zugabe von IL-2, IL-15 oder TNF-alpha einen Anstieg ihrer Proliferationskapazität zeigten. Nach intramuskulärer Gabe von IL-2 beobachteten Meuer et al. 1989 eine deutliche Zunahme der Immunantwort auf eine Hepatitis B-Impfung.

Das Expressionsmuster der untersuchten Zellen nach *in vitro*-Stimulation mit Erythropoietin unterschied sich zwischen den Gruppen nicht. Aus diesem Grund wurden alle Untersuchungsgruppen zusammengefasst. Nach Zugabe definierter Erythropoietinkonzentrationen waren Veränderungen im Expressionsmuster von CD3 und CD4 nachweisbar. Nach 48 Stunden Inkubationszeit war die Expression von CD3 bei rhEPO 50 und rhEPO 100 im Vergleich zu rhEPO 0 erhöht. Des Weiteren konnten wir nach 48 Stunden auch eine vermehrte Expression von CD4 bei rhEPO 100 verglichen mit rhEPO 0 beobachten. Das lässt vermuten, dass Erythropoietin einen stimulierenden Effekt auf die Proliferation von T-Lymphozyten und T-Helferzellen hat und dieser Effekt vorwiegend bei höherer Konzentration auftritt. Ein Anstieg von CD4, CD8 und der CD4/CD8-Ratio nach einer Behandlung mit rhEPO fanden Kaneko et al. 1993 in ihren Untersuchungen. Ueki et al. (1993) konnten ebenfalls einen Anstieg der T-Helferzellen nach Gabe von rhEPO beobachten. Einen Anstieg der T-Zell-Proliferation bei Hämodialysepatienten (nach Zugabe von Mitogen) unter Erythropoietin stellte die Arbeitsgruppe von Shurtz-Swirski et al. 1996 fest. Eine Untersuchung an Prädialysepatienten erbrachte eine Abnahme von CD4 und CD8 nach Gabe von Erythropoietin (Hannula et al. 2006). Eine Zunahme der CD4/CD8-Ratio nach Behandlung mit rhEPO beschrieben weitere Arbeitsgruppen (Pfäffl et al. 1988, Baj et al. 1992, Yorioka et al. 1993, Wiecek et al. 1995, Trzonkowski et al. 2002). Keine Veränderung der CD4/CD8-Ratio fanden sowohl William et al. 1998, Tanabe et al. 1994 als auch Huraib et al. 1997. Auch in unseren Untersuchungen war kein Unterschied der CD4/CD8-Ratio in Abhängigkeit von unterschiedlichen Erythropoietinkonzentrationen festzustellen. Zu einem Anstieg der Expression des Kostimulationssignals CD28 auf CD8-positiven Zellen nach Gabe von Erythropoietin kam es in einer Arbeit von Pruchi-Sagiv et al. 2006. Barber et al. (1994) vermuteten, dass Erythropoietin auf Grund der Ähnlichkeit seines Rezeptors mit dem IL-2-Rezeptor eventuell einen direkten Einfluss auf T-Lymphozyten ausübt. Auch ist es möglich, dass rhEPO durch Stimulation der Produktion von IL-2 (Bryl et al. 1999) indirekt die Proliferation der T-Lymphozyten unterstützt.

## B-Lymphozyten

Die B-Lymphozyten wurden mit den Oberflächenantigenen CD19 und CD20 erfasst. CD19 ist als Bestandteil des B-Zell-Korezeptors für die Aktivierung der B-Zelle von Bedeutung. CD20 ist an der Regulation der B-Zellen beteiligt, vermutlich über die Bildung von Kalziumkanälen.

Wir konnten zwischen unseren Untersuchungsgruppen keine Unterschiede hinsichtlich des B-Lymphozytenanteils im Vollblut nachweisen. Die Gesamtheit aller untersuchten Dialysepatienten exprimierte jedoch weniger CD19 und CD20 verglichen mit der Kontrollgruppe. Dies bestätigen auch die Untersuchungen von Fernández-Fresnedo et al. 2000. Diese Arbeitsgruppe fand bei Prädialysepatienten und Hämodialysepatienten im Vergleich zur Kontrollgruppe eine verminderte Zahl von B-Lymphozyten. Weiterhin wiesen diese beiden Patientengruppen *in vitro* eine erhöhte Apoptoserate auf, wobei eine Korrelation mit einer verminderten Bcl-2-Expression auffällt. Weitere Autoren konnten bei Hämodialysepatienten im Vergleich zu einer Kontrollgruppe eine Verminderung der B-Lymphozyten nachweisen (Ueki et al. 1993, Moser et al. 2003). Eine verminderte Zahl von B-Gedächtnis-Zellen bei niereninsuffizienten Kindern mit Hämo- oder Peritonealdialyse im Vergleich zu einer Kontrollgruppe beschrieben Bouts et al. 2004.

Die unterschiedlichen Aktivierungswege der B-Zelle weisen darauf hin, dass es sich vermutlich nicht um einen primären B-Zell-Defekt handelt. So können große polysaccharide Antigene (z.B. Pneumokokken) direkt vom B-Zell-Rezeptor erkannt werden. Impfungen gegen Pneumokokken führen z.B. zu einem normalen Antikörperspiegel bei Dialysepatienten (Friedmann et al. 1980, Cosio et al. 1981). Andere Arbeitsgruppen fanden demgegenüber nach Stimulation mit *Staphylococcus aureus* eine geringere B-Zell-Antwort von Dialysepatienten im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe (Raskova et al. 1987 und Gaciong et al. 1991). In wieweit die direkte Stimulation der B-Zellen durch Antigene bei Hämodialysepatienten gestört ist, wird zurzeit noch kontrovers diskutiert. Der zweite Weg zur B-Zell-Aktivierung führt über eine Präsentation des Antigens durch APZ, einer anschließenden Aktivierung und Proliferation von TH-Zellen, welche letztendlich die AK-Produktion der B-Zellen induzieren. Dass ein Defekt auf diesem Weg (APZ, T-Zelle) zur Aktivierung der B-Zelle zu finden ist, wird allgemein angenommen.

In den Untersuchungen nach Isolierung der PMNZ traten auch bei den einzelnen Dialysepatientengruppen Unterschiede auf. So war CD19 in der Gruppe mit AK-Titer und rhEPO-Behandlung geringer exprimiert als in der Kontrollgruppe. Die CD20-positiven Zellen waren bei den Patienten mit AK-Titer, ohne rhEPO und



ohne AK-Titer, mit rhEPO im Vergleich zur Kontrollgruppe vermindert. Zwischen den Patientengruppen gab es keine Unterschiede. Diese Ergebnisse bestätigen die Aussage, dass Dialysepatienten im Vergleich zur Kontrollgruppe eine verminderte Zahl von B-Lymphozyten aufweisen. Dabei scheint es keinen Einfluss zu haben, ob die Patienten Responder oder Nonresponder sind, bzw. ob sie Erythropoietin an der Dialyse erhalten. Im Gegensatz dazu fanden Collard et al. 1990 und Kaneko et al. 1993 eine Verminderung der B-Lymphozyten bei Dialysepatienten, die Erythropoietin erhielten.

Unter *in vitro*-Stimulation mit PWM traten keine Gruppenunterschiede bezüglich der Proliferation auf. Einen Einfluss des Erythropoietin auf die Expression von CD19 oder CD20 konnte in unseren Untersuchungen nicht nachgewiesen werden. Auch Steffensen et al. konnten 1996 keinen Einfluss des Erythropoietins auf die Proliferation von B-Lymphozyten nachweisen. Andere Autoren beschreiben hingegen einen direkten, stimulierenden Einfluss von Erythropoietin auf B-Lymphozyten mit einer vermehrten Produktion von Immunglobulinen in Zellkulturen (Kimata et al. 1991, Schäfer et al. 1992). Eine gesteigerte Immunglobulinproduktion *in vivo* bei Hämodialysepatienten nach Gabe von rhEPO fanden Yorioka et al. 1993 und Wiecek et al. 1995. Es lässt vermuten, dass Erythropoietin zwar die Immunglobulinproduktion, jedoch nicht die Proliferation von B-Lymphozyten stimulieren kann. In der Studie von Birmingham et al. 1996 kam es unter rhEPO-Therapie bei Hämodialysepatienten nach Vaccination mit Tetanustoxoid zu einem deutlichen Anstieg der Responderrate, hingegen trat nach Vakzination mit Pneumokokken-Antigen keine Veränderung der Responderrate auf. Dieses Ergebnis untermauert, dass Erythropoietin die T-Zell-abhängige B-Zell-Antwort stimulieren kann.

## **Monozyten**

Monozyten gehören zu den antigenpräsentierenden Zellen. An ihrer Oberfläche exprimieren sie unter anderem CD13 und CD14. Diese cluster of differentiation wurden zur Identifizierung der Monozyten in unserer Arbeit verwendet. CD13 ist eine Zink-Metalloproteinase (Exopeptidase), deren Aufgabe in der Antigenpräsentation HLA-Klasse II-gebundener Peptide liegt. Die Reifung und Differenzierung der Monozyten ist mit einer vermehrten Expression von CD13 verbunden (Laouar et al. 1993). CD14 ist ein Rezeptor für Lipopolysaccharide und hat damit die Erkennung von bakteriellen Antigenen zur Aufgabe.

Eine Störung der Ag-Präsentation und Ag-Erkennung wird als Hauptursache für die veränderte Immunantwort von Dialysepatienten diskutiert.

In vielen Untersuchungen fand sich bei Dialysepatienten im Vergleich zu Kontrollgruppen eine erhöhte Zahl von Monozyten. Die Zahl der aktivierten Monozyten war ebenfalls vermehrt (Betz et al. 1988, Girndt et al. 1998, Sester et al. 2000, Scherberich et al. 2003, Liang et al. 2003, Girndt et al. 2003). Außerdem wiesen Dialysepatienten eine Überproduktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 beta, IL-6 und TNF-alpha auf (Schindler et al. 1993, Girndt et al. 1995, Malaponte et al. 2002, Carracedo et al. 2002). Das lässt den Schluss zu, dass es durch Urämietoxine sowie den Kontakt mit Fremdmaterial (Dialysemembranen, Schlauchsysteme) zu einer inflammatorischen Aktivierung kommt.

Unsere Untersuchungen bestätigen diese Ergebnisse. So weisen die Dialysepatienten ohne rhEPO, mit AK-Titer im Vergleich zu den anderen Gruppen einen deutlich erhöhten Monozytenanteil auf. Die geringste Monozytenzahl fanden wir in der gesunden Kontrollgruppe. Die Dialysepatienten, die Erythropoietin an der Dialyse erhielten, hatten nur geringgradig mehr Monozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Vermutlich führt Erythropoietin zu einer Normalisierung der Monozytenzahl. In unseren Untersuchungen traten zwischen den Respondern und Nonrespondern keine signifikanten Unterschiede der Monozytenzahl auf. Im Gegensatz dazu fanden Fanelli et al. 1992 bei Dialysepatienten ohne AK-Titer nach Hepatitis B-Impfung eine deutlich erhöhte Zahl von Monozyten verglichen mit Respondern und einer gesunden Kontrollgruppe. Dieses Ergebnis bestätigt noch einmal den Verdacht, dass eine vermehrte Zahl von Monozyten eine wichtige Bedeutung für die gestörte Immunantwort nach einer Hepatitis B-Impfung hat.

In anderen Studien wurde beschrieben, dass Monozyten von gesunden Probanden den oben genannten Proliferationsdefekt der T-Lymphozyten von Dialysepatienten aufheben können und auf der anderen Seite Monozyten von Dialysepatienten die Proliferation und IL-2-Sekretion von T-Zellen gesunder Probanden reduzieren (Meuer et al. 1987, Tsakolos et al. 1986). Diese Ergebnisse belegen, dass Monozyten von Dialysepatienten in Ihrer Fähigkeit zur Antigenpräsentation eingeschränkt sind. Die Ursache für die defekte Interaktion zwischen der APZ und der T-Zelle wird unter anderem in einer Störung der Kostimulation des T-Zell-Rezeptors gesehen. So liegt bei Dialysepatienten eine verminderte Expression des kostimulatorischen Signals B7-2 (CD86) auf Monozyten vor (Girndt et al. 1993, 2001, Vlassopoulos et al. 2003). Daraus resultiert eine verminderte Aktivierung von T-Helferzellen.

In unseren *in vitro*-Untersuchungen an Zellkulturen fanden wir sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden die Zahl der CD13-positiven Zellen nach Zugabe von rhEPO 50 und rhEPO 100 signifikant vermindert im Vergleich zu rhEPO 0.

Dieses Ergebnis ist ein Hinweis dafür, dass Erythropoietin auch einen kurzfristigen Einfluss auf die pathologisch erhöhte Monozytenaktivität hat.

Die Arbeitsgruppe von Huraib et al. fand 1997 nach einer dreimonatigen Behandlung mit rhEPO eine Verminderung der zuvor erhöhten Monozytenaktivität bei Dialysepatienten. Im Gegensatz dazu konnten andere Studien keine Veränderungen der Monozyten nach Gabe von Erythropoietin nachweisen (Sperschneider et al. 1996, Neumann et al. 1999).

Ob Erythropoietin einen Einfluss auf das kostimulatorische Signal B7-2 ausübt, ist bisher noch nicht untersucht worden. Das ist ein interessanter Ansatzpunkt für weitergehende Arbeiten.

## **NK-Zellen**

NK-Zellen gehören zum angeborenen Immunsystem. Ihre Funktion liegt in der frühen Phase der Immunabwehr. Die durch eine Virusinfektion induzierte Produktion von Interferonen und Cytokinen (z.B. IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , TNF- $\alpha$  und IL-12) führt zu ihrer Aktivierung. NK-Zellen ermöglichen durch Freisetzung zytotoxischer Granula den programmierten Zelltod (Apoptose) der gebundenen Zielzelle.

Zur Bestimmung der NK-Zellen verwendeten wir den Oberflächenmarker CD16. Dieser ist ein Bestandteil des niedrigaffinen Fc-Rezeptors und vermittelt die Phagozytose und die antikörperabhängige, zellvermittelte Zytotoxizität.

In der Literatur finden sich bezüglich der Veränderungen von NK-Zellen bei Dialysepatienten diskrepante Ergebnisse. Lisza et al. konnten 1998 eine verminderte Zahl an NK-Zellen bei dialysepflichtigen Patienten, verglichen mit gesunden Probanden, belegen. Auch Cala et al. wiesen 1990 bei Dialysepatienten eine Reduktion der Zahl der NK-Zellen und ihrer Aktivität nach. Im Gegensatz dazu beschrieben Baj et al. 1992 und Nishimoto et al. 2001 eine erhöhte Zahl von NK-Zellen bei Dialysepatienten.

Die von uns untersuchten Hämodialysepatienten wiesen im Vergleich zur Kontrollgruppe keine Unterschiede in der Expression von CD 16 auf. Auch die Ergebnisse der Arbeitsgruppe von Sennesael et al. 1991 offenbarten keine signifikanten Abweichungen in der Zahl der NK-Zellen von Dialysepatienten und einer Kontrollgruppe. In der gleichen Arbeit wurden auch Dialysepatienten mit und ohne rhEPO-Behandlung verglichen und bezüglich der Anzahl der NK-Zellen kein Unterschied festgestellt. Diese Aussage konnten auch Steffenson et al. 1996 bestätigen.

In unseren *in vitro*-Untersuchungen war ebenfalls kein Einfluss des Erythropoietins auf die Expression von CD16 nachweisbar. Andere Autoren

hingegen fanden nach einer Therapie mit Erythropoietin Veränderungen in der Anzahl der NK-Zellen. So konnten Baj et al. 1992, Kaneko et al. 1993 und Huraib et al. 1997 eine Verminderung der NK-Zellen nach Erythropoietingabe nachweisen. Im Gegensatz dazu beschrieben Collard et al. 1990 und Yorioka et al. 1993 eine Zunahme der NK-Zellen nach Erythropoietingabe. Ursächlich für diese völlig unterschiedlichen Ergebnisse können zum einen die geringen Fallzahlen der einzelnen Studien sein, zum anderen müssen auch weitere immunmodulatorische Einflüsse berücksichtigt werden (z.B. Eisenhaushalt, Vitamin D).

### **Aktivierungsmarker (HLA-DR, CD25, CD26 und CD69)**

Aktivierungsmarker sind Zelloberflächenmoleküle, die einen Hinweis auf die Zellaktivierung nach Stimulation geben.

HLA-DR:

HLA-DR ist ein transmembranöses Glykoprotein und stellt eine der 3 Formen (HLA-DR, -DQ und -DP) der MHC-Klasse II dar. Seine Expression ist Ausdruck einer Zellaktivierung. Exprimiert wird dieses Antigen auf B- und T-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen.

Wir bestimmten die Expression auf PMNZ, T-Lymphozyten und B-Lymphozyten. Die Dialysepatienten, die Erythropoietin an der Dialyse erhielten, hatten im Vergleich zur Kontrollgruppe eine verminderte Zahl von HLA-DR positiven B-Lymphozyten. Die Expression von HLA-DR auf anderen Zellen sowie Vergleiche zwischen den Patientengruppen erbrachten keine signifikanten Unterschiede. Im Gegensatz dazu beschrieben Ueki et al. 1993 eine vermehrte Expression von HLA-DR auf T-Lymphozyten von Dialysepatienten im Vergleich zu einer Kontrollgruppe. In der gleichen Arbeit wurde nach längerfristiger Gabe von Erythropoietin eine Abnahme der zuvor erhöhten HLA-DR-Expression auf T-Lymphozyten bei Dialysepatienten beobachtet.

Wir konnten einen kurzfristigen Effekt des Erythropoietin auf HLA-DR nachweisen. Wir fanden sowohl nach 24 Stunden als auch nach 48 Stunden eine Verminderung der HLA-DR-Oberflächendichte auf PMNZ und T-Lymphozyten nach Inkubation mit Erythropoietin. Die Expressionsabnahme korrelierte mit der zugegebenen Erythropoietinkonzentration. Diese Beobachtung scheint zu belegen, dass Erythropoietin die durch die Dialysetherapie vorbestehende Zellaktivierung korrigieren kann, und zwar konzentrationsabhängig. Im Gegensatz dazu beschrieben Kaneko et al. 1993 und Tanabe et al. 1994 eine

Zunahme der HLA-DR-Expression auf T-Lymphozyten von Dialysepatienten, die mit Erythropoietin behandelt werden. Diese Ergebnisse führen andererseits zu dem Schluss, dass Erythropoietin zu einer Aktivierung von T-Lymphozyten führt.

CD25:

Es handelt sich bei CD25 um einen Aktivierungsmarker für T-Lymphozyten, welcher der  $\alpha$ -Kette des Interleukin-2-Rezeptors entspricht. Interleukin-2 ist ein Wachstumsfaktor für T-Zellen. Der Zelloberflächenmarker wird exprimiert, wenn die Zelle durch ein Antigen stimuliert wurde. Zum Teil ist dieses Molekül auch auf der Zelloberfläche aktivierter B-Lymphozyten und aktivierter Monozyten zu finden.

Neuere Untersuchungen belegen, dass CD25 auch auf einer nicht aktivierten Subpopulation von T-Helferzellen exprimiert wird. Diese so genannten TR1-Zellen (regulatorische T-Zellen) sind in der Lage, die antigeninduzierte Aktivierung anderer CD4-positiver Zellen zu unterdrücken und sind damit entscheidend für eine kontrollierte Immunantwort verantwortlich. Diese Zellpopulation zeichnet sich durch ihre Heterogenität aus. Es finden sich CD25-positive und CD25-negative regulatorische Zellen in dieser Gruppe. Als weitere aktivierungsunabhängige Oberflächenmerkmale konnten das Neuropilin-1 (Bruder et al. 2004) und das Integrin- $\alpha 4\beta 7$  (Stassen et al. 2004) identifiziert werden. Beim Fehlen dieser Zellen kommt es zu einer Überreaktion des Immunsystems, wie es unter anderem für die rheumatoide Arthritis (Frey et al. 2005), die Multiple Sklerose (Lutton et al. 2004) und den Diabetes mellitus Typ I (Lindley et al. 2005) belegt ist. Ob bei Dialysepatienten ebenfalls eine Alteration der TR1-Zellen vorliegt, ist bisher noch nicht weiter untersucht, aber ein interessanter Ansatzpunkt für künftige Forschungen.

Im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen weisen sowohl Prädialysepatienten, Hämodialysepatienten als auch Peritonealdialysepatienten eine erhöhte Zahl CD25-positiver T-Zellen auf (Brinkkoetter et al. 2005). Auch andere Arbeitsgruppen beschrieben die vermehrte Expression dieses Aktivierungsmarkers auf T-Lymphozyten von Dialysepatienten im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe (Meuer et al. 1987, Langhoff et al. 1987, Beaurain et al. 1989, Dumann et al. 1990, Meier et al. 2000, Meier et al. 2005). Unsere Untersuchungen ergaben im Gegensatz dazu keine Unterschiede zwischen den Patientengruppen und der gesunden Kontrollgruppe. Indessen ist beim Vergleich der Patientengruppen untereinander bei den Nonrespondern eine verminderte Expression von CD25 im Vergleich zu den Respondern nachweisbar. Das könnte bedeuten, dass die T-Zellen der Nonresponder einen geringeren Anteil aktivierter Zellen aufweisen als die der Responder. Da die Aktivierungsmarker HLA-DR und

CD69 bei den Nonrespondern nicht vermindert sind, muss man eher davon ausgehen, dass es sich um regulatorische CD25-positive T-Zellen handelt. Auch in einer Arbeit von Goncalves et al. 2004 war die Expression von CD25 bei Nonrespondern im Vergleich zu Respondern verringert. Im Unterschied dazu beschrieben Dumann et al. 1990 eine vermehrte Expression des IL-2-Rezeptors bei Nonrespondern verbunden mit einer Verminderung des T-Zell-Wachstumsfaktors IL-2. Shu et al. und Meier et al. konnten 1998 bzw. 2005 nachweisen, dass lösliche IL-2-Rezeptoren bei Dialysepatienten im Vergleich zur Kontrollgruppe vermehrt freigesetzt werden. Man kann nun vermuten, dass die gesteigerte Rezeptorexpression eine Folge erhöhter IL-2-Verluste, z.B. durch Adsorption, ist oder diese Zellen durch den häufigen Antigenkontakt (z.B. Dialysator) präaktiviert sind. In einer Arbeit von Köhler et al. 1988 konnte nach lokaler IL-2-Gabe ein Anstieg der Immunantwort nach einer Hepatitis B-Vakzination beobachtet werden. Dagegen beschrieb die Arbeitsgruppe von Jungers et al. 1995 keine Veränderung der Impfansprechrates nach lokaler IL-2-Gabe. Inwieweit ein Mangel an IL-2 maßgeblich an der verminderten Responderrate bei Dialysepatienten beteiligt ist, lässt sich aus diesen Ergebnissen noch nicht abschließend sagen.

In unserem *in vitro*-Untersuchungsmodell war die Expression von CD25 auf PMNZ nach 24 Stunden bei rhEPO 100 im Vergleich zu rhEPO 0 vermindert. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Tanabe et al. 1994. Diese Arbeitsgruppe konnte unter der Therapie mit Erythropoietin bei Peritonealdialysepatienten eine Abnahme und Normalisierung der Expression von CD25 auf T-Lymphozyten nachweisen. Sennesael et al. (1995) stellten ebenfalls eine Abnahme der löslichen IL-2-Rezeptoren nach einer Therapie mit Erythropoietin fest. Diese Ergebnisse scheinen zu bestätigen, dass Erythropoietin einen inhibierenden Einfluss auf aktivierte Zellen hat. Nach Stimulation mit PHA wiesen T-Zellen von Dialysepatienten im Vergleich zur Kontrollgruppe eine geringere Zunahme der Expression von CD25 auf T-Lymphozyten auf (Meier et al. 2005). In unseren Untersuchungen konnte nach Stimulation mit PWM in der Gruppe der Nonresponder im Vergleich zur Kontrollgruppe eine geringere Zunahme der Expression von CD25 nach 24 und 48 Stunden beobachtet werden. Daraus kann man schlussfolgern, dass die Fähigkeit zur adäquaten T-Zell-Aktivierung bei diesen Patienten eingeschränkt ist. Weiterhin lässt sich daraus eine mögliche Ursache der geringeren Impfansprechrates nach einer Hepatitis B-Impfung ableiten.

CD26:

CD26, auch als Dipeptidyl-peptidase IV bezeichnet, ist ein membranständiges Glykoprotein. Es inaktiviert als Protease regulatorische Proteine und ist zum anderen ein Bindungsprotein. Es wird auf aktivierten B- und T-Lymphozyten, NK-Zellen sowie Makrophagen exprimiert. Zu den Aufgaben zählen Zelladhäsion, Zellbewegung und Kostimulation im Rahmen der T-Zell-Aktivierung. Insbesondere T-Gedächtniszellen weisen eine hohe Expressionsdichte auf. CD26-positive T-Lymphozyten fördern TH1-Zellen durch Sekretion von Interferon-Gamma und IL-2. Bezüglich der Niereninsuffizienz ist dieser Oberflächenmarker bisher wenig erforscht.

In unseren Untersuchungen war die Expression von CD26 auf PMNZ und T-Lymphozyten in der Gruppe der Nonresponder im Vergleich zu den Respondern und der Kontrollgruppe signifikant vermindert.

Nach spezifischer Hemmung von CD26 konnte *in vitro* eine Reduktion der T-Zell-Proliferation, eine geringere Sekretion von IL-2 und IFN- $\gamma$  und eine verminderte Antikörperproduktion nachgewiesen werden (Kubota et al. 1992, Reinhold et al. 1997, Reinhold et al. 2006). Ob Urämietoxine bei Dialysepatienten möglicherweise durch einen ähnlichen Mechanismus zu einer verminderten Expression von CD26 führen, könnte ein Ansatzpunkt weitergehender Untersuchungen sein. In einer Arbeit von Nakao et al. 2002 wurden lösliche CD26-Serumspiegel von Dialysepatienten und nichtdialysepflichtigen niereninsuffizienten Patienten gemessen. Die bestimmten Serumspiegel waren dabei in der Dialysegruppe niedriger als in der Vergleichsgruppe. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass die Sekretion von IL-2 durch T-Lymphozyten von Dialysepatienten und insbesondere Nonrespondern vermindert ist. Eine mögliche Folge davon wäre eine Imbalance der TH1- und TH2-Zellen zu Gunsten der TH2-Zellen. Dies steht aber im Gegensatz zu anderen Untersuchungen, in denen Dialysepatienten eine erhöhte Zahl an TH1-Zellen aufwiesen (Sester et al. 2000). Zur weiteren Klärung sollten Untersuchungen an einem größeren Patientenkollektiv erfolgen. In Anbetracht der Funktion der TH1- und TH2-Zellen ist eher ein Überwiegen der TH1-Zellen bei Dialysepatienten anzunehmen.

Unsere *in vitro*-Ergebnisse konnten keine signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit von der rhEPO-Gabe belegen. Auch traten keine Gruppenunterschiede hinsichtlich der Proliferation nach Stimulation mit PWM auf.

CD69:

CD69 ist ein frühes Aktivierungsantigen, welches schon 2 Stunden nach Stimulation auf aktivierten T- und B-Lymphozyten, NK-Zellen sowie Makrophagen nachweisbar ist.

In unseren Untersuchungen konnte zwischen den Untersuchungsgruppen kein Unterschied bezüglich der Expression von CD69 auf PMNZ, T- oder B-Lymphozyten festgestellt werden. Im Gegensatz dazu findet sich in der Literatur bei Dialysepatienten im Vergleich zu nichtdialysepflichtigen niereninsuffizienten Patienten sowie gesunden Probanden eine vermehrte Expression von CD69 auf T-Lymphozyten (Meier et al. 2000, Meier et al. 2002, Meier et al. 2005). Dieses Ergebnis ist ebenfalls ein Hinweis auf eine Präaktivierung der T-Lymphozyten von Dialysepatienten. Goncalves et al. (2004) beobachten nach einer Hepatitis B-Impfung eine verminderte Expression von CD69 im Vergleich von Nonrespondern und Respondern. Daraus lässt sich möglicherweise schlussfolgern, dass bei den T-Lymphozyten von Nonrespondern nach Antigenkontakt eine Einschränkung der Aktivierung vorliegt.

In unseren Zellkulturen fanden wir nach 24 Stunden Inkubation mit rhEPO 100 eine verminderte Expression von CD69 auf PMNZ und T-Lymphozyten. Auch auf diesen Aktivierungsmarker scheint Erythropoietin inhibierend zu wirken. Es gibt bisher keine Arbeiten, die sich mit dem Einfluss von Erythropoietin auf CD69 auseinandersetzen.



## 6. Zusammenfassung

Dialysepatienten weisen eine Reihe von Störungen physiologischer Abläufe auf. Insbesondere Alterationen des Immunsystems mit der Folge einer erhöhten Infektanfälligkeit sowie einer verminderten Impfansprechrate sind sowohl für den einzelnen Patienten als auch gesundheitsökonomisch von größter Bedeutung. In den neunziger Jahren zeigten mehrere Studien, dass Erythropoietin, welches zur Therapie der renalen Anämie eingesetzt wird, eine immunmodulatorische Potenz besitzt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss von rekombinantem Erythropoietin auf die Expression von ausgewählten Oberflächenmarkern peripherer mononukleärer Zellen von Hämodialysepatienten zu untersuchen.

Wir untersuchten vier Patientengruppen und eine gesunde Kontrollgruppe. Anhand des Impferfolges nach einer Hepatitis B-Impfung teilten wir die Hämodialysepatienten in Responder und Nonresponder ein. Ein weiteres Differenzierungsmerkmal war die therapeutische Gabe von Erythropoietin an der Dialyse.

Wir untersuchten das Expressionsmuster bestimmter Oberflächenmerkmale auf PMNZ der verschiedenen Untersuchungsgruppen mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Anschließend wurden die Zellen über 24, 48 und 72 Stunden mit rhEPO inkubiert und nachfolgend die ausgewählten Oberflächenmarker mittels Durchflusszytometer bestimmt.

In allen Patientengruppen war im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Erhöhung der Leukozytenzahl, verbunden mit einem Anstieg der Granulozyten und einer Verminderung der Lymphozyten, nachweisbar. Weiterhin fiel bei den Hämodialysepatienten eine signifikante Verminderung der B-Lymphozytenmarker CD19 und CD20 sowie des Aktivierungsmarkers HLA-DR auf B-Lymphozyten auf. Möglicherweise führt eine erhöhte Apoptose bei Dialysepatienten zu dieser B-Lymphopenie.

In der Patientengruppe mit rhEPO-Therapie und ohne AK-Titer (Nonresponder) hatten die PMNZ eine signifikant geringere Expression von CD3, CD4, CD25 und CD26 im Vergleich zur Kontrollgruppe, beziehungsweise zur Patientengruppe mit rhEPO-Therapie und einem positiven AK-Titer (Responder). Auf den T-Lymphozyten war der Aktivierungsmarker CD26 vermindert. Nach *in vitro*-Stimulation mit PWM fiel eine geringere Zunahme der Expression von CD4 und CD25 im Vergleich zu den Probanden auf. Aus diesen Ergebnissen leiteten wir eine Störung der T-Zellabhängigen Immunreaktion in der Gruppe der Nonresponder ab.

Die Patienten ohne rh-EPO, mit einem positiven AK-Titer hatten ebenfalls eine verminderte Expression von CD3 und CD4 im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auffällig war eine hochsignifikant vermehrte Expression von CD13 im Vergleich zu den Probanden und der Patientengruppe mit rh-EPO und mit AK-Titer. Möglicherweise kann Erythropoietin diese gesteigerte Expression wieder normalisieren.

Die Ergebnisse der *in vitro*-Untersuchungen weisen auf eine immunmodulierende Wirkung des Erythropoietins hin. Nach 48 Stunden Inkubation mit Erythropoietin kam es zu einer vermehrten Expression von CD3 und CD4, was einer Proliferation von T-Lymphozyten und T-Helferzellen entspricht. Die Expression von CD13 nahm mit steigender Erythropoietinkonzentration nach 24 und 48 Stunden kontinuierlich ab. Eine ähnliche Beobachtung war ebenfalls bei den Aktivierungsmarkern HLA-DR auf PMNZ und HLA-DR auf T-Lymphozyten zu beobachten. Auch diese beiden Oberflächenantigene wiesen mit steigender Erythropoietinkonzentration eine Abnahme der Expression nach 24 und 48 Stunden auf. Dass CD13, wie oben beschrieben, bei den Dialysepatienten ohne rhEPO-Therapie deutlich stärker exprimiert wird, weist neben der kurzfristigen, auch auf eine langfristige suppressive Wirkung von Erythropoietin auf diesen Marker hin.

Weitere Aktivierungsmarker (CD25 auf PMNZ, CD69 auf PMNZ und CD69 auf T-Lymphozyten) werden in ihrer Expression durch Erythropoietin gehemmt.

Insgesamt lassen unsere Ergebnisse die Schlussfolgerung zu, dass Erythropoietin eine modulierende Wirkung an verschiedenen Zellen des Immunsystems ausübt. Der suppressive Effekt von rhEPO auf HLA-DR und CD13 weist eine eindeutige Konzentrationsabhängigkeit auf und ist statistisch gut untermauert. Diese Beobachtung gibt Hinweise auf einen antiinflammatorischen Effekt von Erythropoietin. Die Überaktivierung der Monozyten von Hämodialysepatienten, mit der Folge einer „Erschöpfung“ dieser Zellen und den beschriebenen Störungen der Antigenpräsentation und der lymphozytären Abwehr, kann möglicherweise durch die Gabe von Erythropoietin normalisiert werden. Bezüglich dieser Oberflächenmarker könnten weitergehende Untersuchungen interessante Ergebnisse offenbaren.

## 7. Tabellen-Anhang:

Differentialblutbild:

Tabelle 2: Differentialblutbilder der Patientengruppen und der gesunden Probanden zu Studienbeginn (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung).

	Pat. mit AK, mit EPO	Pat. mit AK, ohne EPO	Pat. ohne AK, mit EPO	Gesunde Probanden
Leukozyten (Gpt/l)	8,1 $\pm$ 2,5	7,8 $\pm$ 2,1	7,7 $\pm$ 1,0	6,1 $\pm$ 1,3
Lymphozyten (%)	25,4 $\pm$ 7,3	20,0 $\pm$ 7,0	19,4 $\pm$ 6,3	39,9 $\pm$ 7,4
Monozyten (%)	4,7 $\pm$ 1,9	4,6 $\pm$ 1,0	4,7 $\pm$ 1,1	4,8 $\pm$ 1,8
Granulozyten (%)	69,9 $\pm$ 8,6	75,4 $\pm$ 7,4	76,0 $\pm$ 6,8	55,1 $\pm$ 7,7

Immunphänotypisierung:

Tabelle 3: Absoluter Anteil der untersuchten Zellpopulationen (Zellen/ $\mu$ l) und der CD4/CD8-Ratio im Vollblut der Patientengruppen und der gesunden Probanden (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung).

(Zellen/ $\mu$ l)	Pat. mit AK, mit EPO	Pat. mit AK, ohne EPO	Pat. ohne AK, mit EPO	Gesunde Probanden
CD2 auf PMNZ	1449 $\pm$ 443	1071 $\pm$ 352	1051 $\pm$ 480	1730 $\pm$ 776
CD3 auf PMNZ	1241 $\pm$ 365	990 $\pm$ 357	868 $\pm$ 452	1451 $\pm$ 694
CD4 auf PMNZ	813 $\pm$ 318	625 $\pm$ 339	481 $\pm$ 176	939 $\pm$ 493
CD8 auf PMNZ	480 $\pm$ 170	394 $\pm$ 164	413 $\pm$ 327	556 $\pm$ 281
CD4/CD8-Ratio	1,92 $\pm$ 1,01	1,79 $\pm$ 0,71	1,71 $\pm$ 1,27	1,78 $\pm$ 0,80
CD19 auf PMNZ	77 $\pm$ 55	58 $\pm$ 43	88 $\pm$ 101	155 $\pm$ 145
CD20 auf PMNZ	105 $\pm$ 64	77 $\pm$ 59	84 $\pm$ 83	174 $\pm$ 170
CD14 auf PMNZ	418 $\pm$ 210	356 $\pm$ 115	411 $\pm$ 104	361 $\pm$ 163
CD13 auf PMNZ	511 $\pm$ 240	500 $\pm$ 163	527 $\pm$ 203	471 $\pm$ 206
CD16 auf PMNZ	110 $\pm$ 112	141 $\pm$ 124	82 $\pm$ 125	104 $\pm$ 156
HLA-DR auf PMNZ	829 $\pm$ 264	696 $\pm$ 224	828 $\pm$ 313	814 $\pm$ 318
HLA-DR auf T-Zellen	168 $\pm$ 104	128 $\pm$ 90	203 $\pm$ 211	197 $\pm$ 122
HLA-DR auf B-Zellen	60 $\pm$ 50	40 $\pm$ 33	62 $\pm$ 81	126 $\pm$ 126
CD25 auf PMNZ	545 $\pm$ 297	390 $\pm$ 106	310 $\pm$ 174	469 $\pm$ 371
CD25 auf T-Zellen	363 $\pm$ 199	237 $\pm$ 83	160 $\pm$ 75	319 $\pm$ 284
CD26 auf PMNZ	899 $\pm$ 407	743 $\pm$ 323	533 $\pm$ 182	949 $\pm$ 523
CD26 auf T-Zellen	684 $\pm$ 330	551 $\pm$ 269	363 $\pm$ 144	790 $\pm$ 490
CD69 auf PMNZ	305 $\pm$ 179	255 $\pm$ 235	243 $\pm$ 138	354 $\pm$ 230
CD69 auf T-Zellen	105 $\pm$ 68	66 $\pm$ 38	68 $\pm$ 30	92 $\pm$ 58
CD69 auf B-Zellen	28 $\pm$ 20	20 $\pm$ 31	14 $\pm$ 18	35 $\pm$ 35

Nach Separation der PMNZ:

Tabelle 4: Relativer Anteil der untersuchten Zellpopulationen (%) und der CD4/CD8-Ratio nach Separation der PMNZ der Patientengruppen und der gesunden Probanden (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung).

(%)	Pat. mit AK, mit EPO	Pat. mit AK, ohne EPO	Pat. ohne AK, mit EPO	Gesunde Probanden
CD2 auf PMNZ	81 $\pm$ 6	75 $\pm$ 7	74 $\pm$ 12	77 $\pm$ 7
CD3 auf PMNZ	73 $\pm$ 8	70 $\pm$ 9	64 $\pm$ 14	65 $\pm$ 9
CD4 auf PMNZ	42 $\pm$ 15	37 $\pm$ 8	33 $\pm$ 8	38 $\pm$ 12
CD8 auf PMNZ	30 $\pm$ 9	29 $\pm$ 7	30 $\pm$ 13	27 $\pm$ 9
CD4/CD8-Ratio	1,65 $\pm$ 0,99	1,33 $\pm$ 0,38	1,34 $\pm$ 0,78	1,68 $\pm$ 0,92
CD19 auf PMNZ	5 $\pm$ 2	4 $\pm$ 2	5 $\pm$ 4	7 $\pm$ 3
CD20 auf PMNZ	5 $\pm$ 3	3 $\pm$ 1	3 $\pm$ 2	7 $\pm$ 4
CD14 auf PMNZ	0 $\pm$ 1	3 $\pm$ 4	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 1
CD13 auf PMNZ	3 $\pm$ 2	8 $\pm$ 4	5 $\pm$ 3	3 $\pm$ 1
CD16 auf PMNZ	12 $\pm$ 5	11 $\pm$ 7	17 $\pm$ 10	19 $\pm$ 11
HLA-DR auf PMNZ	19 $\pm$ 7	22 $\pm$ 8	19 $\pm$ 7	19 $\pm$ 7
HLA-DR auf T-Zellen	8 $\pm$ 5	8 $\pm$ 4	10 $\pm$ 8	8 $\pm$ 8
HLA-DR auf B-Zellen	4 $\pm$ 2	4 $\pm$ 2	3 $\pm$ 3	7 $\pm$ 3
CD25 auf PMNZ	18 $\pm$ 13	18 $\pm$ 9	17 $\pm$ 7	15 $\pm$ 7
CD25 auf T-Zellen	14 $\pm$ 12	13 $\pm$ 5	10 $\pm$ 3	12 $\pm$ 7
CD26 auf PMNZ	53 $\pm$ 15	51 $\pm$ 14	39 $\pm$ 10	46 $\pm$ 9
CD26 auf T-Zellen	51 $\pm$ 15	47 $\pm$ 13	36 $\pm$ 10	43 $\pm$ 9
CD69 auf PMNZ	8 $\pm$ 6	10 $\pm$ 6	7 $\pm$ 7	6 $\pm$ 4
CD69 auf T-Zellen	5 $\pm$ 3	3 $\pm$ 2	3 $\pm$ 2	3 $\pm$ 2
CD69 auf B-Zellen	1 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	0 $\pm$ 1	0 $\pm$ 0

Einfluss von rhEPO nach Inkubation der PMNZ:

Tabelle 5: Relativer Anteil der untersuchten Zellpopulationen (%) sowie der CD4/CD8-Ratio in Abhängigkeit von der rhEPO-Dosis und der Inkubationszeit (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung)

CD2 auf PMNZ (%)	Ausgangswert $77 \pm 9$			
rhEPO (IE)	rhEPO 0	rhEPO 5	rhEPO 50	rhEPO 100
24h	$83 \pm 10$	$82 \pm 10$	$82 \pm 11$	$82 \pm 10$
48h	$85 \pm 11$	$85 \pm 12$	$85 \pm 11$	$85 \pm 11$
72h	$87 \pm 14$	$87 \pm 12$	$87 \pm 11$	$86 \pm 12$
CD3 auf PMNZ (%)	Ausgangswert $67 \pm 12$			
rhEPO (IE)	rhEPO 0	rhEPO 5	rhEPO 50	rhEPO 100
24h	$70 \pm 12$	$70 \pm 12$	$71 \pm 12$	$70 \pm 12$
48h	$74 \pm 14$	$74 \pm 14$	$75 \pm 14$	$75 \pm 13$
72h	$76 \pm 15$	$76 \pm 15$	$77 \pm 14$	$76 \pm 14$
CD4 auf PMNZ (%)	Ausgangswert $37 \pm 13$			
rhEPO (IE)	rhEPO 0	rhEPO 5	rhEPO 50	rhEPO 100
24h	$45 \pm 12$	$44 \pm 12$	$45 \pm 12$	$44 \pm 12$
48h	$47 \pm 14$	$49 \pm 14$	$48 \pm 14$	$49 \pm 13$
72h	$51 \pm 14$	$52 \pm 14$	$51 \pm 13$	$52 \pm 13$
CD8 auf PMNZ (%)	Ausgangswert $29 \pm 9$			
rhEPO (IE)	rhEPO 0	rhEPO 5	rhEPO 50	rhEPO 100
24h	$27 \pm 10$	$27 \pm 10$	$27 \pm 11$	$27 \pm 11$
48h	$27 \pm 12$	$27 \pm 11$	$28 \pm 12$	$27 \pm 12$
72h	$27 \pm 11$	$26 \pm 11$	$27 \pm 11$	$26 \pm 11$
CD4/CD8-Ratio	Ausgangswert $1,5 \pm 0,9$			
rhEPO (IE)	rhEPO 0	rhEPO 5	rhEPO 50	rhEPO 100
24h	$2,00 \pm 1,14$	$2,02 \pm 1,18$	$2,01 \pm 1,19$	$2,05 \pm 1,24$
48h	$2,16 \pm 1,33$	$2,22 \pm 1,37$	$2,18 \pm 1,42$	$2,25 \pm 1,36$
72h	$2,29 \pm 1,44$	$2,39 \pm 1,36$	$2,37 \pm 1,43$	$2,40 \pm 1,37$

Tabelle 6: Relativer Anteil der untersuchten Zellpopulationen (%) in Abhängigkeit von der rhEPO-Dosis und der Inkubationszeit (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung)

CD19 auf PMNZ (%)	Ausgangswert $6 \pm 4$			
rhEPO (IE)	rhEPO 0	rhEPO 5	rhEPO 50	rhEPO 100
24h	$5 \pm 6$	$6 \pm 6$	$5 \pm 6$	$5 \pm 6$
48h	$6 \pm 7$	$6 \pm 7$	$5 \pm 7$	$5 \pm 7$
72h	$6 \pm 7$	$5 \pm 6$	$5 \pm 7$	$6 \pm 7$
CD20 auf PMNZ (%)	Ausgangswert $5 \pm 4$			
rhEPO (IE)	rhEPO 0	rhEPO 5	rhEPO 50	rhEPO 100
24h	$8 \pm 7$	$8 \pm 7$	$8 \pm 7$	$7 \pm 5$
48h	$6 \pm 7$	$6 \pm 8$	$6 \pm 7$	$6 \pm 7$
72h	$6 \pm 8$	$6 \pm 8$	$6 \pm 7$	$6 \pm 7$
CD13 auf PMNZ (%)	Ausgangswert $4 \pm 3$			
rhEPO (IE)	rhEPO 0	rhEPO 5	rhEPO 50	rhEPO 100
24h	$9 \pm 6$	$9 \pm 6$	$8 \pm 5$	$8 \pm 7$
48h	$7 \pm 6$	$7 \pm 7$	$7 \pm 5$	$6 \pm 6$
72h	$4 \pm 3$	$4 \pm 4$	$4 \pm 4$	$4 \pm 4$
CD14 auf PMNZ (%)	Ausgangswert $1 \pm 2$			
rhEPO (IE)	rhEPO 0	rhEPO 5	rhEPO 50	rhEPO 100
24h	$0 \pm 0$	$0 \pm 0$	$0 \pm 0$	$0 \pm 0$
48h	$0 \pm 0$	$0 \pm 0$	$0 \pm 0$	$0 \pm 0$
72h	$0 \pm 1$	$0 \pm 0$	$0 \pm 0$	$0 \pm 0$
CD16 auf PMNZ (%)	Ausgangswert $15 \pm 9$			
rhEPO (IE)	rhEPO 0	rhEPO 5	rhEPO 50	rhEPO 100
24h	$10 \pm 7$	$10 \pm 7$	$9 \pm 6$	$9 \pm 7$
48h	$8 \pm 7$	$9 \pm 8$	$8 \pm 7$	$8 \pm 7$
72h	$8 \pm 6$	$8 \pm 7$	$7 \pm 6$	$8 \pm 7$

Tabelle 7: Relativer Anteil der untersuchten Zellpopulationen (%) in Abhängigkeit von der rhEPO-Dosis und der Inkubationszeit (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung)

HLA-DR auf PMNZ (%)	Ausgangswert $20 \pm 7$			
rhEPO (IE)	rhEPO 0	rhEPO 5	rhEPO 50	rhEPO 100
24h	$43 \pm 14$	$41 \pm 14$	$40 \pm 14$	$38 \pm 14$
48h	$41 \pm 15$	$40 \pm 15$	$39 \pm 14$	$38 \pm 14$
72h	$35 \pm 14$	$34 \pm 15$	$33 \pm 14$	$33 \pm 15$
HLA-DR auf T-Zellen (%)	Ausgangswert $9 \pm 7$			
rhEPO (IE)	rhEPO 0	rhEPO 5	rhEPO 50	rhEPO 100
24h	$33 \pm 14$	$31 \pm 14$	$30 \pm 14$	$29 \pm 13$
48h	$33 \pm 15$	$32 \pm 13$	$32 \pm 14$	$31 \pm 14$
72h	$29 \pm 15$	$28 \pm 15$	$27 \pm 14$	$27 \pm 15$
HLA-DR auf B-Zellen (%)	Ausgangswert $5 \pm 4$			
rhEPO (IE)	rhEPO 0	rhEPO 5	rhEPO 50	rhEPO 100
24h	$3 \pm 5$	$3 \pm 5$	$3 \pm 5$	$3 \pm 5$
48h	$4 \pm 7$	$4 \pm 6$	$3 \pm 6$	$3 \pm 6$
72h	$3 \pm 5$	$3 \pm 4$	$3 \pm 4$	$2 \pm 4$
CD25 auf PMNZ (%)	Ausgangswert $17 \pm 10$			
rhEPO (IE)	rhEPO 0	rhEPO 5	rhEPO 50	rhEPO 100
24h	$26 \pm 9$	$26 \pm 9$	$26 \pm 9$	$25 \pm 9$
48h	$22 \pm 7$	$21 \pm 7$	$21 \pm 7$	$21 \pm 7$
72h	$22 \pm 7$	$22 \pm 7$	$22 \pm 8$	$21 \pm 7$
CD25 auf T-Zellen (%)	Ausgangswert $12 \pm 8$			
rhEPO (IE)	rhEPO 0	rhEPO 5	rhEPO 50	rhEPO 100
24h	$13 \pm 7$	$13 \pm 7$	$13 \pm 7$	$12 \pm 7$
48h	$11 \pm 5$	$11 \pm 5$	$11 \pm 5$	$10 \pm 5$
72h	$11 \pm 5$	$12 \pm 6$	$12 \pm 5$	$11 \pm 5$



Tabelle 8: Relativer Anteil der untersuchten Zellpopulationen (%) in Abhängigkeit von der rhEPO-Dosis und der Inkubationszeit (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung)

CD26 auf PMNZ (%)	Ausgangswert $47 \pm 13$			
rhEPO (IE)	rhEPO 0	rhEPO 5	rhEPO 50	rhEPO 100
24h	$56 \pm 14$	$55 \pm 13$	$56 \pm 14$	$56 \pm 13$
48h	$62 \pm 14$	$61 \pm 14$	$63 \pm 14$	$62 \pm 15$
72h	$65 \pm 16$	$64 \pm 15$	$66 \pm 15$	$64 \pm 15$
CD26 auf T-Zellen (%)	Ausgangswert $44 \pm 13$			
rhEPO (IE)	rhEPO 0	rhEPO 5	rhEPO 50	rhEPO 100
24h	$51 \pm 13$	$50 \pm 13$	$51 \pm 14$	$51 \pm 14$
48h	$55 \pm 16$	$55 \pm 15$	$57 \pm 15$	$56 \pm 15$
72h	$59 \pm 16$	$59 \pm 15$	$60 \pm 15$	$58 \pm 15$
CD69 auf PMNZ (%)	Ausgangswert $8 \pm 6$			
rhEPO (IE)	rhEPO 0	rhEPO 5	rhEPO 50	rhEPO 100
24h	$44 \pm 10$	$44 \pm 11$	$43 \pm 11$	$42 \pm 11$
48h	$40 \pm 10$	$39 \pm 11$	$38 \pm 10$	$38 \pm 11$
72h	$36 \pm 11$	$37 \pm 12$	$36 \pm 11$	$36 \pm 11$
CD69 auf T-Zellen (%)	Ausgangswert $4 \pm 3$			
rhEPO (IE)	rhEPO 0	rhEPO 5	rhEPO 50	rhEPO 100
24h	$20 \pm 9$	$19 \pm 10$	$20 \pm 9$	$18 \pm 9$
48h	$19 \pm 10$	$18 \pm 10$	$18 \pm 10$	$18 \pm 10$
72h	$18 \pm 10$	$18 \pm 10$	$18 \pm 9$	$18 \pm 9$
CD69 auf B-Zellen (%)	Ausgangswert $1 \pm 1$			
rhEPO (IE)	rhEPO 0	rhEPO 5	rhEPO 50	rhEPO 100
24h	$7 \pm 4$	$7 \pm 4$	$8 \pm 5$	$7 \pm 4$
48h	$7 \pm 4$	$6 \pm 4$	$7 \pm 4$	$6 \pm 4$
72h	$6 \pm 4$	$6 \pm 4$	$6 \pm 4$	$6 \pm 4$

Einfluss von PWM auf ausgewählte Oberflächenmarker von PMNZ:

Tabelle 9: Relativer Anteil der CD4 und CD25-positiven PMNZ (%) der Patientengruppen und der gesunden Probanden nach Stimulation mit PWM (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung)

	Pat. mit AK, mit EPO	Pat. mit AK, ohne EPO	Pat. ohne AK, mit EPO	Gesunde Probanden
CD4 auf PMNZ (%)				
Ausgangswert	42 $\pm$ 15	37 $\pm$ 8	33 $\pm$ 8	38 $\pm$ 12
24h	50 $\pm$ 12	46 $\pm$ 8	38 $\pm$ 9	46 $\pm$ 9
48h	53 $\pm$ 13	50 $\pm$ 8	39 $\pm$ 11	50 $\pm$ 12
72h	56 $\pm$ 13	49 $\pm$ 12	43 $\pm$ 10	56 $\pm$ 11
CD25 auf PMNZ (%)				
Ausgangswert	18 $\pm$ 13	18 $\pm$ 9	17 $\pm$ 7	15 $\pm$ 7
24h	29 $\pm$ 12	23 $\pm$ 5	21 $\pm$ 7	28 $\pm$ 9
48h	21 $\pm$ 8	21 $\pm$ 6	18 $\pm$ 6	23 $\pm$ 7
72h	22 $\pm$ 5	21 $\pm$ 9	21 $\pm$ 8	21 $\pm$ 7

## 6. Literaturverzeichnis

1. Aguilera A, Bajo MA, Diez JJ, Ruiz-Caravaca ML, Vicenta Cuesta M, Alvarez V, Codoceo R, Selgas R. Effects of human recombinant erythropoietin on inflammatory status in peritoneal dialysis patients. *Adv Perit Dial* 2002; 18: 200-5
2. Albarran B, Goncalves L, Salmen S, Borges L, Fields H, Soyano A, Montes H, Berrueta L. Profiles of NK, NKT cell activation and cytokine production following vaccination against hepatitis B. *APMIS* 2005; 113: 526-35
3. Alexiewicz JM, Klinger M, Pitts TO, Gaciong Z, Linker-Israeli M, Massry SG. Parathyroid hormone inhibits B cell proliferation: implications in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 1990; 1: 236-44
4. Alexiewicz JM, Smogorzewski M, Fadda GZ, Massry SG. Impaired phagocytosis in dialysis patients: Studies on mechanism. *Amer. J. Nephrol.* 1991; 11: 102-111
5. Ankersmit HJ, Deicher R, Moser B, Teufel I, Roth G, Gerlitz S, Itescu S, Wolner E, Boltz-Nitulescu G, Kovarik J. Impaired T cell proliferation, increased soluble death-inducing receptors and activation-induced T cell death in patients undergoing hemodialysis. *Clin Exp Immunol.* 2001; 125: 142-8
6. Bahlmann FH, De Groot K, Duckert T, Niemczyk E, Bahlmann E, Boehm SM, Haller H, Fliser D. Endothelial progenitor cell proliferation and differentiation is regulated by erythropoietin. *Kidney int.* 2003; 64: 1648-52
7. Bahlmann FH, De Groot K, Spandau JM, Landry AL, Hertel B, Duckert T, Boehm SM, Menne J, Haller H, Fliser D. Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells. *Blood* 2004; 103: 921-26
8. Baj Z, Pokoca L, Majewska E, Luciak M, Tochorzewski H. T lymphocyte subsets and NK cell cytotoxicity in chronic hemodialysis patients. The effect of recombinant human erythropoietin (rHu-EPO) treatment. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 1992; 40: 201-6
9. Barber DL, D'Andrea AD. Erythropoietin and interleukin-2 activate distinct JAK kinase familie members. *Mol Cell Biol.* 1994; 14: 6506-14
10. Beaurain G, Naret C, Marcon L, Gateau G, Drueke T, Urena P, Nelson DL, Bach JF, Chatenoud L. In vivo T cell preactivation in chronicuremic hemodialyzed and non hemodialyzed patients. *Kidney int.* 1989; 36: 636-44

11. Becker BN, Becker YT, Levenson G, Heisey DM. Erythropoietin therapy may retard progression in chronic renal transplant dysfunction. *NDT* 2002; 17: 1667-73
12. Belèed K, Wright M, Eadington D, Farr M, Sellars L. Vaccination against hepatitis B infection in patients with end stage renal disease. *Postgrad Med J* 2002; 78: 538-40
13. Betz M, Haensch GM, Rauterberg EW, Bommer J, Ritz E. Cuprammonium membranes stimulate interleukin 1 release and arachidonic acid metabolism in monocytes in the absence of complement. *Kidney Int* 1988; 34: 437-42
14. Birmingham DJ, Shen XP, Hartman JA, Dillon JJ, Herbert LA. Effect of chronic human recombinant erythropoietin therapy on antibody responses to immunization in chronic hemodialysis patients. *Kidney Int.* 1996; 50: 543-9
15. Bommer J, Grussendorf M, Jilg W, Deinhardt F, Koch HG, Darai G, Bommer G, Rambašek M, Ritz E. Vaccination against hepatitis B in patients with renal insufficiency. *Proc Eur Dial Transplant Assoc Eur Ren Assoc* 1985; 21: 300-5
16. Bouts AH, Davin JC, Krediet RT, Monnens LA, Nauta J, Schroder CH, van Lier RA, Out TA. Children with chronic renal failure have reduced numbers of memory B cells. *Clin Exp Immunol* 2004; 137: 589-94
17. Boyum A. Separation of leucocytes from blood and bone marrow. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1968; 97: 77-89
18. Bradley JR, Evans DB, Clane RY. Long-term survival in hemodialysis patients. *Lancet* 1987; 7: 295-6
19. Brinkkoetter PT, Marinaki S, Gottmann U, Fleckenstein S, Stump C, Van Der Woude FJ, Braun C, Yard BA. Altered CD46-mediated T cell co-stimulation in haemodialysis patients. *Clin Exp Immunol.* 2005; 139: 534-41
20. Bruder D, Probst-Kepper M, Westendorf AM, Geffers R, Beissert S, Loser K, von Boemer H, Buer J, Hansen W. Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells. *Eur J Immunol.* 2004; 34: 623-30
21. Bryl E, Mysliwska J, Debska-Slizien A, Rachon D, Bullo B, Lizakowski S, Mysliwski A, Rutkowski B. The influence of recombinant human erythropoietin on tumor necrosis factor alpha and interleukin-10 production by whole blood cell cultures in hemodialysis patients. *Artif Organs* 1998; 22: 177-81

22. Bryl E, Mysliwska J, Debska-Slizien A, Trzonkowski P, Rachon D, Bullo B, Zdrojewski Z, Mysliwski A, Rutkowski B. Recombinant human erythropoietin stimulates production of interleukin 2 by whole blood cell cultures of hemodialysis patients. *Artif Organs*. 1999; 23: 809-16
23. Cala S, Mazuran R, Kordic D. Negative effect of uraemia and cuprophane haemodialysis on natural killer cells. *NDT*. 1990; Vol 5: 6437-440
24. Calvillo L, Latini R, Kajstura J. Recombinant human erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury and promotes beneficial remodeling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 4802-6
25. Cappel R, van Beers D, Liesnard C, Dratwa M. Impaired humoral and cell mediated immune response in dialyzed patients after influenza vaccination. *Nephron* 1983; 33: 21-25
26. Carletti P, Bibiano L, Boggi R, Bordoni E, Riccatti AM, Oella Bella S, Pauri P, Salvoni G, Mioli VA. HBV infection in hemodialysss patients: monitoring and prevention. *Nephron*. 1992; 61(3): 269-70
27. Carracedo J, Ramirez R, Madueno JA, Soriano S, Rodriguez-Benot A, Rodriguez M, Martin-Malo A, Aljama P. Cell apoptosis and hemodialysis-induced inflammation. *Kidney Int Suppl*. 2002; 80: 89-93
28. Chandra M, Clemons GK, McVicar MI. Relation of serum erythropoietin levels to renal excretory funktion: Evidence for lowered set point of erythropoietin production in chronic renal failure. *J Pediatr*. 1988; 113: 1015-21
29. Chatenoud L, Dugas B, Beaurin M, Touam M, Drueke T, Vasquez P, Galanaud P, Bach JF, Delfraissy JF. Presence of preactivated T cells in hemodialyzed patients: their possible role in altered immunity. *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)* 1986; 83: 7457-61
30. Chong ZZ, Kang JQ, Maiese K. Erythropoietin is a novel vascular protectant through activation of Akt 1 and mitochondrial modulation of cysteine proteases. *Circulation* 2002; 106: 2973-79
31. Collard FE, Dratwa M, Wittek M, Wens R. Effekt of recombinant erythropoietin on T lymphocyte subsets in hemodialysis patients. *ASAIO Trans* 1990; 36: 219-23
32. Constant SL, Bottomly K. Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: The alternative approaches. *Ann Rev Immunol* 1997; 15: 297-322
33. Cosio FG, Giebink GS, Le CT, Schiffman G. Pneumococcal vaccination in patients with chronic renal disease and renal allograft recipients. *Kidney Int*. 1981; 20: 254-8

34. Davis JM, Arakawa T, Strickland TW et al. Characterization of recombinant human erythropoietin produced in chinese hamster ovary cells. *Biochemistry* 1987; 26: 2633-38
35. Debska-Slizien A, Rutkowski B, Manitus J, Zdrojewski Z, Szolkiewicz M, Bullo B, Lizakowski S, Mysliwska J, Mysliwski A, Bryl E, Trzonkowski P, Bakowska A, Rachon D. Influence of erythropoietin on immunological system of patients with chronic renal failure. *Pol Merkurusz Lek.* 2003; 15: 326-7
36. Deenitchina SS, Ando T, Okuda S, Kinukawa N, Hirakata H, Nagashima A, Fujishima M. Cellular immunity in hemodialysis patients: a quantitative analysis of immune cell subsets by flow cytometry. *Am J Nephrol.* 1995; 15: 57-65
37. Degiannis D, Mowat AM, Galloway E, Tsakiris DJ, Briggs JD, Junor BJR, Parrott DM. In vitro analysis of B lymphocyte function in uraemia. *Clin Exp Immunol* 1987; 70: 463-70
38. Degoulet P, Legrain M, Reach I, et al. Mortality risk factors in patients treated by chronic hemodialysis. *Nephron* 1982; 31: 103-10
39. Descamps-Latscha B, Chatenoud L. T cells und B cells in chronic renal failure. *Semin Nephrol.* 1996; 16: 183-91
40. Descamps-Latscha B, Jungers P, Witko-Sarsat V. Immune system dysregulation in uremia: role of oxidative stress. *Blood Purif* 2002; 20: 481-84
41. Dessypris EN, Graber SE, Krantz SB, Stone WJ. Effect of recombinant erythropoietin on the concentration and cycling status of human marrow hematopoietic progenitor cells in vivo. *Blood* 1988; 72: 2060-62
42. Digicaylioglu M, Garden G, Timberlake S, Fletcher L, Lipton SA. Acute neuroprotective synergy of erythropoietin and insulin-like growth factor I. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 9855-60
43. Dinarello CA. Cytokines: Agents provocateurs in hemodialysis? *Kidney int* 1992; 41: 683-94
44. Disney APS. Dialysis treatment in Australia, 1982-1988. *Am J Kidney Dis* 1990; 15: 402-9
45. Docci D, Cipolloni PA, Baldrati L, Capponcini C, Turci F, Feletti C. Immune response to a recombinant hepatitis B vaccine in hemodialysis patients. *Int J Artif Organs.* 1990; 13(7): 451-3
46. Donati D, Degiannis D, Homer L, Gastaldi L, Raskowa J, Raska KJ. Immunodeficiency in uremia: Interleukin-2 receptor expression and release. *Nephron* 1991; 58: 268-75

47. Dumann H, Meuer SC, Köhler H. Uremic serum inhibits monocytes-dependent, but not interleukin-2-dependent Steps of T cell proliferation. *Nephron* 1990; 56: 162-5
48. Dumann H, Meuer SC, Meyer zum Büschenfelde KH, Köhler H. Hepatitis B vaccination and interleukin 2 receptor expression in chronic renal failure. *Kidney int.* 1990; 38: 1164-68
49. Ehrenreich H, Hasselblatt M, Dembrowski C. Erythropoietin therapie for acute stroke is both safe and beneficial. *Mol Med* 2002; 8: 495-505
50. Fandrey J, Bunn HF. In vivo and in vitro regulation of erythropoietin in mRNA: Measurement by competitive polymerase chain reaction. *Blood* 1993; 81: 617-23
51. Fandrey J, Freude S, Jelkmann W. Inhibition of erythropoietin gene expression in vivo by cytokines. *Blood* 1994; 84: 131a
52. Fanelli V, Sanna G, Solinas A. Expectation of impaired response to recombinant hepatitis B vaccination. *Nephron.* 1992; 61(3): 293-5
53. Fernández-Fresnedo G, Ramos MA, Gonzalez-Pardo MC, de Francisco AL, López-Hoyos M, Arias M. B lymphopenia in uremia is related to an accelerated in vitro apoptosis and dysregulation of Bcl-2. *NDT* 2000; 15: 502-10
54. Frei U., Schober-Halstenberg H.-J.: Nierenersatztherapie in Deutschland. *QuaSi-Niere Jahresbericht 2003/2004*, Berlin, Deutschland.
55. Frey O, Petrow PK, Gajda M, Siegmund K, Huehn J, Scheffold A, Hamann A, Radbruch A, Brauer R. The role of regulatory T cells in antigen-induced arthritis: aggravation of arthritis after depletion and amelioration after transfer of CD4+CD25+ T cells. *Arthritis Re Ther.* 2005; 7: R291-301
56. Fried W. The liver as a source of extrarenal erythropoietin production. *Blood* 1972; 40:671-77
57. Friedman EA, Beyer MM, Hirsch SR, Schiffman G. Intact antibody response to pneumococcal capsular polysaccharides in uremia and diabetes. *JAMA* 1980; 244: 2310-1
58. Gaciong Z, Alexiewicz JM, Linker-Israeli M, Shulman IA, Pitts TO, Massry SG. Inhibition of immunoglobulin production by parathyroid hormone. Implications in chronic renal failure. *Kidney Int.* 1991; 40: 96-106
59. Ganser A, Völkers B, Scigalla P, Hoelzer D. Effect of human recombinant erythropoietin on human hemopoietic progenitor cells in vitro. *Klin Wschr* 1988; 66: 236-40

60. Girndt M, Köhler H, Schiedhelm Weick E, Schlaak JF, Meyer zum Büschenfelde KH, Fleischer B. Production of interleukin-6, tumor necrosis factor alpha and interleukin-10 in vitro correlates with the clinical immune defect in chronic hemodialysis patients. *Kidney int.* 1995; 47: 559-65
61. Girndt M, Köhler H, Schiedhelm-Weick E, Meyer zum Büschenfelde KH, Fleischer B. T cell activation defect in hemodialysis patients: Evidence for a role of the B7/CD28 pathway. *Kidney int.* 1993; 44: 359-65
62. Girndt M, Pietsch M, Köhler H. Tetanus immunization and association to hepatitis B vaccination in patients with chronic renal failure. *Am J Kidney Dis* 1995; 26: 454-60
63. Girndt M, Sester M, Sester U, Kaul H, Köhler H. Defective expression of B7-2 (CD86) on monocytes of dialysis patients correlates to the uremia-associated immun defect. *Kidney int.* 2001; 59: 1382-89
64. Girndt M, Sester U, Kaul H, Hüngrer F, Köhler H. Produktion of proinflammatory and regulatory monokines in hemodialysis patients shown at a single cell level. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9: 1689-96
65. Girndt M, Ulrich C, Kaul H, Sester U, Sester M, Kohler H. Uremia-associated immune defect: the IL-10-CRP axis. *Kidney Int Suppl.* 2003; 84: 76-9
66. Goncalves L, Albarran B, Salmen S, Borges L, Fields H, Montes H, Sojano A, Diaz Y, Berrueta L. The Nonresponse to hepatitis B vaccination is associated with impaired lymphocyte activation. *Virology* 2004; 326(1): 20-8
67. Gregory CJ, Eaves AC. Three stages of erythropoietic progenitor cell differentiation distinguished by a number of physical and biological properties. *Blood* 1978; 51: 527-37
68. Gurland HJ, Brunner FP, von Dehn HV, Harlen H, Parson FM, Scharer K. Combined report on regulardialysis and transplantation in Europe. *Proc Eur Dial Transplant* 1973; 10: 17-58
69. Hannula P, Ala-Houhala I, Saha H, Lagerstedt A, Parviainen T, Pasternack A, Antonen J. Effects of erythropoietin treatment on cell-mediated immune responses in predialysis patients. *Scand J Urol Nephrol* 2006; 40: 241-6
70. Huraib S, Abu-Aisha H, al-Momen A, al-Wakeel J, Memon N, al-Tuwaijri A. Effect of recombinant erythropoietin on lymphocyte phenotyping and phagocyte activity in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 1997; 29: 866-70



71. Jacobson LO, Goldwasser e, Fried W, Plzak L. Role of the kidney in erythropoiesis. *Nature* 1957; 179: 633-34
72. Jelkmann W. Erythropoietin : Structure control of production and function. *Physiol Rev* 1992; 72: 449-89
73. Jilg W, Hottentrager B, Weinberger K, Schlottmann K, Frick E, Holstege A, Scholmerisch J, Palitzsch KD. Prevalence of markers of hepatitis B in the adult German population. *J Med Virol* 2001; 63: 96-102
74. Jungers P, Devillier P, Salomon H, Cerisier JE, Courouce AM. Randomised placebo controlled trial of recombinant interleukin-2 in chronic uraemic patients who are non-responders to hepatitis B vaccine. *Lancet* 1994; 344: 856-7
75. Kaneko Y, Motomiya Y, Arai K, Kagebayashi Y, Okada H, Sasaki K, Yoneda T, Yoshida K, Ozono S, Hirao Y et al. Lymphocyte subpopulations in maintenance hemodialysis patient receiving recombinant human erythropoietin. *Nippon Jinzo Gakkai Shi.* 1993; 35: 743-9
76. Katz O, Gil L, Lifshitz L, Prutchi-Sagiv S, Gassmann M, Mittelmann M, Neumann D. Erythropoietin enhances immune responses in mice. *Eur J Immunol.* 2007; 37: 1427-30
77. Keane WF, Maddy MM. Host defenses and infectious complications in maintenance haemodialysis patients. *Replacement of renal function by dialysis* 1989; 3: 865-80
78. Kimata H, Yoshida A, Ishioka C, Masuda S, Sasaki R, Mikawa H. Human recombinant erythropoietin direktly stimulates B cell immunoglobulin production and proliferation in serum-free medium. *Clin Exp Immunol.* 1991; 85: 151-6
79. Köhler H, Arnold W, Renschin G, Dormeyer HH, Meyer zum Büschenfelde KH. Active hepatitis B vaccination of dialysis patients and medical staff. *Kidney int.* 1984; 25: 124-28
80. Köhler H, Dumann H, Meyer zum Buschenfelde KH, Meuer S. Secondary immune deficiency in renal failure exemplified by hepatitis B vaccination. *Klin. Wochenschr.* 1988; 66: 865-72
81. Koury ST, Bondurant MC, Koury MJ. Localization of erythropoietin synthezising cells in murine Kidneys by in situ hybridization. *Blood* 1988; 71: 524-27
82. Kubota T, Flentke GR, Bachovchin WW, Stollar BD. Involvement of dipeptidyl peptidase IV in an in vivo imunne response. *Clin Exp Immunol.* 1992; 89: 192-7

83. Kurz P, Kohler H, Meuer S, Hutteroth T, Meyer zum Büschenfelde KA. Impaired cellular immune responses in chronic renal failure: evidence for a T cell defect. *Kidney int.* 1986; 29: 1209-14
84. Ladefoged J, Langhoff E. Accessory cell functions in mononuclear cell cultures from uremic patients. *Kidney int.* 1990; 37: 126-30
85. Langhoff E, Hofmann B, Odum N, Ladefoged J, Platz P, Ryder LP, Svejgaard A. Kinetic analysis of interleukin 2 production and expression of interleukin-2 receptors by uraemic and normal lymphocytes. *Scand. J. Immunol.* 1987; 25: 29-36
86. Laouar A, Wietzerbin J, Bauvois B. Divergent regulation of cell surface protease expression in HL-60 cells differentiated into macrophages with granulocyte macrophage colony stimulating factor or neutrophils with retinoic acid. *Int Immunol.* 1993; 5: 965-73
87. Lee SM, Hong Nga NT, Park MH, Kim KS, Cho KJ, Moon DC, Kim HY, Yoon do Y, Hong JT. EPO receptor-mediated ERK kinase and NF-KappaB activation in erythropoietin-promoted differentiation of astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 320: 1087-95
88. Liang M, Wang L, Hou FF, Liu J, Liu ZQ, Tian JW. Inflammatory status in patients with end-stage renal disease: role of monocyte activation. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* 2003; 23: 781-4
89. Lindley S, Daydan CM, Bishop A, Roep BO, Peakman M, Tree TI. Defective suppressor function in CD4+CD25+ T-cells from patients with type I diabetes. *Diabetes* 2005; 54: 92-9
90. Liszka M, Zukowska-Szzechowska E, Grzeszczak W, Moczulski D, Religa Z. Natural killer cell count in hemodialysis patients. *Pol. Arch. Med. Wewn* 1998; 100(1): 9-18
91. Locatelli F, Aljama P, Barany P, Canaud B, Carrera F, Eckardt KU, Horl WH, Macdougall IC, Macleod A, Wiecek A, Cameron S; European Best Practice Guidelines Working Group Revised European best practice guidelines for the management of anaemia in patients with chronic renal failure. *NDT* 2004;19 Suppl 2: 1-47
92. Lucarelli G, Porcellini A, Carnevali C et al. Fetal and neonatal erythropoiesis. *Ann N Y Acad Sci* 1968; 149: 544-59
93. Lutton JD, Winston R, Rodman TC. Multiple sclerosis: etiological mechanisms and future directions. *Exp Biol Med (Maywood)* 2004; 229: 12-20
94. Majdan M, Polz M, Ksiazek A, Janicka L, Koziol M, Swatowski A, Orłowska G. The response to the hepatitis B virus in patients undergoing hemodialysis and peritoneal dialysis. *Przegl-Lek* 1995; 52: 307-10

95. Malaponte G, Bevelacqua V, Fatuzzo P, Rapisarda F, Emmanuele G, Travali S, Mazzarino MC. IL-1 beta, TNF-alpha and IL-6 from monocytes in haemodialysis patients in relation to dialytic age. *NDT* 2002; 17: 1964-70
96. Meier P, Dayer E, Blanc E, Wauters J-P. Early T Cell Activation Correlates with Expression of Apoptosis Markers in Patients with End-Stage Renal Disease. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 204-12
97. Meier P, Dayer E, Ronco P, Blabc E. Dysregulation of IL-2/IL-2R system alters proliferation of early activated CD4+ T cell subset in patients with end-stage renal failure. *Clin Nephrol.* 2005; 63(1): 8-21
98. Meier P, von Fliedner V, Markert M, van Melle G, Deppisch R, Wauters JP. One-Year Immunological Evaluation of Chronic Hemodialysis in End-Stage Renal Disease Patients. *Blood Purif* 2000; 18:128-37
99. Meuer SC, Dumann H, Meyer zum Büschenfelde KH, Kohler H. Low dose interleukin-2 induces systemic immune responses against HBsAg in immunodeficient nonresponders to hepatitis B vaccination. *Lancet* 1989; 1: 15-18
100. Meuer SC, Dumann H, Meyer zum Büschenfelde KH, Kohler H. Selective blockade of the antigen receptor mediated pathway of T cell activation in patients with impaired primary immune responses. *J clin. Invest.* 1987; 80: 743-49
101. Miller ME, Garcia JF, Cohen RA et al. Diurnal levels of immunoreactive erythropoietin in normal subjects and subjects with chronic lung disease. *Br J Haematol* 1981; 49: 189-200
102. Mohanram A, Zhang Z, Shahinfar S, Keane WF, Brenner BM, Toto RD. Anemia and end-stage renal disease in patients with Typ 2 diabetes and nephropathy. *Kidney Int.* 2004; 66: 1131-8
103. Moser B, Roth G, Brunner M, Lilaj T, Deicher R, Wolner E, Kovarik J, Boltz-Nitulescu G, Vychytil A, Ankersmit HJ. Aberrant T cell activation and heightened apoptotic turnover in end-stage renal failure patients: a comparative evaluation between non-dialysis, haemodialysis and peritoneal dialysis. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 308: 581-5
104. Nakao K, Nagake Y, Okamoto A, Ichikawa H, Yamamura M, Makino H. Serum levels of soluble CD26 and CD30 in patients on hemodialysis. *Nephron* 2002; 91(2):215-21
105. Neumann K, Kunert C, Sperschneider H. The Effekt of erythropoietin (rh-EPO) in vitro proliferation of granulocyte/monocyte-determined stem cells in bone marrow and peripheral blood. *Med Klin (Munich)* 1999; 94: 133-6

106. Nielsen OJ, Thaysen JH. Response to erythropoietin in anaemic haemodialysis patients. *J intern Med* 1989; 226: 89-94
107. Nishimoto A, Matsumoto Y. Increase of peripheral natural killer T cells in hemodialysis patients. *Clin. Nephrol.* 2001; 55(2): 121-6
108. Parsa CJ, Matsumoto A, Kim J, Rirl RU, Pascal LS, Walton GB, Thomson RB, Petrofski JA, Annex BH, Stamler JS, Koch WJ. A novel protective effect of erythropoietin in the infarcted heart. *J Clin Invest* 2003; 112: 999-1007
109. Peces R, de la Torre M, Alcazar R, Urra JM. Prospective analysis of the factors influencing the antibody response to hepatitis B vaccine in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis.* 1997; 29(2): 239-45
110. Pfäffl W, Gross HJ, Neumeier D, Nattermann U, Samtleben W, Gurland HJ. Lymphocyte subsets and delayed cutaneous hypersensitivity in hemodialysis patients receiving recombinant human erythropoietin. *Contr Nephrol.* 1988; 66: 195-204
111. Prutchi-Sagiv S, Golishevsky N, Oster HS, Katz O, Cohen A, Naparstek E, Neumann D, Mittelman M. Erythropoietin treatment in advanced multiple myeloma is associated with improved immunological functions: could it be beneficial in early disease? *Br J Haematol.* 2006; 135: 660-72
112. Rabb H, Agosti SJ, Pollard S, Bittle PA, Ramirez G. Activated and regulatory T lymphocyte populations in chronic hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 1994; 24: 443-52
113. Raine AEG, Roger SD. Effects of erythropoietin on blood pressure. *Am J Kidney* 1991; 18: 76-83
114. Raska K, Raskowa J, Shea SM. T-cell subsets and cellular immunity in end stage renal disease. *Amer. J. Med.* 1983; 75: 734-40
115. Raskova J, Ghobrial I, Czerwinski DK, Shea SM, Eisinger RP, Raska KJ. B.cell activation and immunoregulation in end-stage renal disease patients receiving hemodialysis. *Arch intern Med* 1987; 147: 89-93
116. Reinhold D, Bank U, Bühling F, Lendeckel U, Faust J, Neubert K, Ansorge S. Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV induce secretion of Transforming growth factor-beta 1 in PWM-stimulated PBMC and T cells. *Immunology* 1997; 91: 354-60
117. Reinhold D, Biton A, Pieper S, Lendeckel U, Faust J, Neubert K, Bank U, Täger M, Ansorge S, Brocke S. Dipeptidyl peptidase IV (DP IV, CD26) and aminopeptidase N (APN, CD13) as regulators of T cell function and targets of immunotherapy in CNS inflammation. *Int Immunopharmacol.* 2006; 6: 13-14

118. Ribiatti D, Presta M, Vacca A, Ria R, Giuliani R, Dellera P, Nico B, Roncali L, Dammacco F. Human erythropoietin induced a pro-angiogenetic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. *Blood* 1999; 93: 2627-36
119. Rich IN, Heit W, Kubanek B. Extrarenal erythropoietin production by macrophages. *Blood* 1982; 60: 1007-18
120. Robert Koch Institut. Empfehlungen der ständigen Impfkommision (STIKO) am Robert Koch Institut / Stand: Juli 2002. *Epidemiologisches Bulletin* 2002; 28: 227-42
121. Robert Koch Institut. Zur Situation wichtiger Infektionskrankheiten in Deutschland – Virushepatitis B,C und D im Jahr 2004. *Epidemiologisches Bulletin* 2005; 46: 421-25
122. Schäfer RM, Paczek L, Berthold G, Gilge U, Heidland A. Improved immunoglobulin production in dialysis patients treated with recombinant erythropoietin. *Int. J. Artif. Organs.* 1992; 15: 204-8
123. Scherberich JE. Proinflammatory blood monocytes: main effector and target cells in systemic and renal disease; background and therapeutic implications. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2003; 41: 459-64
124. Schindler R, Linnenweber S, Schulze M et al.. Gene expression of interleukin-1 beta during hemodialysis. *Kidney Int.* 1993; 43: 712-21
125. Schuster SJ, Wilson JH, Erslev AJ, Caro J. Physiologic regulation and tissue localization of renal erythropoietin messenger RNA. *Blood* 1987; 70: 316-18
126. Sennesael JJ, Demanet CG, Verbeelen DL. Serum soluble interleukin 2 receptor in hemodialysis patients treated with recombinant human erythropoietin. *Blood Purif.* 1995; 13: 347-56
127. Sennesael JJ, van der Niepen P, Verbeelen DL. Treatment with recombinant human erythropoietin increases antibody titers after hepatitis B vaccination in dialysis patients. *Kidney international* 1991; Vol 40: 121-28
128. Sester U, Sester M, Hauk M, Kaul H, Köhler H, Girndt M. T-cell activation follows Th1 rather than Th2 pattern in hemodialysis patients. *NDT* 2000; 15: 1217-23
129. Shu KH, Lu YS, Cheng CH, Lian JD. Soluble interleukin 2 receptor in dialysed patients. *Artif Organs.* 1998; 22: 142-4
130. Shurtz-Swirski R, Kristal B, Shkolnik T, Weissmann I, Shapiro G, Shasha SM. Short-term effect of erythropoietin on T-cell mitogenic proliferation in chronic renal failure patients. *Nephron.* 1996; 72: 27-9

131. Singh AB, Singh M, Palekar S, Levy S, Nunn C, Mann RA. The effects of recombinant human erythropoietin on the cell mediated immune response of renal failure patients. *J Med.* 1992; 23: 289-302
132. Smogorzewski M, Massry SG. Defects in B-cell funktion and metabolism in uremia: role of parathyroid hormone. *Kidney Int Suppl.* 2001; 78: 186-9
133. Sperschneider H, Neumann K, Ruffert K, Stein G. Influence of recombinant human erythropoietin therapie on in vivo chemotaxis and in vitro phagocytosis of polymorphonuclear cells of hemodialysis patients. *Blood Purif.* 1996; 14: 157-64
134. Stachowski J, Pollok M, Barth C, Maciejewski J, Baldamus CA. Non-responsivness to hepatitis B vaccination in haemodialysis patients: Association with impaired TCR/CD3 antigen receptor expression regulating co-stimulatory processes in antigen presentation and recognition. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1994; 9: 144-52
135. Stassen M, Fondel S, Bopp T, Richter C, Muller C, Kubach J, Becker C, Knop J, Enk AH, Schmitt S, Schmitt E, Jonuleit H. Human CD25+ regulatory T cells: two subsets defined by the integrins alpha 4 beta 7 or alpha 4 beta 1 confer distinct suppressive properties upon CD4+ T helper cells. *Eur J Immunol.* 2004; 34: 1303-11
136. Steffenson G, Aunsholt NA, Povlsen JV. Evidence that treatment of ESRD patients with recombinant human erythropoietin induced immunosuppression without affecting the distribution of peripheral blood mononuclear cell subpopulations. *Clin Nephrol.* 1996; 45: 98-103
137. Sunder-Plassmann G, Heinz G, Wagner L, Prychzy B, Derfler K. T-cell selection and T-cell receptor variable beta-chain usage in chronic hemodialysis patients. *Clin Nephrol.* 1992; 37: 252-9
138. Sunder-Plassmann G, Hörl WH. Importance of iron supply for erythropoietin therapy. *Nephrol Dial Transplant* 1995; 10/11: 2070-76
139. Swain SL. Helper T cell differentiation. *Curr Opin Immunol* 1999; 11: 180-85
140. Tanabe R. Numerical and functional alterations in T and B lymphocyte subpopulations in CAPD patients treated with recombinant human erythropoietin. *Nippon Jinzo Gakkai Shi* 1994; 36: 1159-68
141. Trzonkowski P, Mysliwska J, Debska-Slizien A, Bryl E, Rachon D, Mysliwski A, Rutkowski B. Long-term therapy with recombinant human erythropoietin decreases percentage of CD 152(+) lymphocytes in primary glomerulonephritis haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2002; 17: 1070-80

142. Tsakolos ND, Theoharides TC, Hendler J, Goffinet J, Dwyer JM, Wisler RL, Askenase PW. Immune defects in chronic renal impairment: Evidence of defective regulation of lymphocyte response by makrophages from patients with chronic renal impairment on hemodialysis. *Clin. Exp. Immunol.* 1986; 63: 218-27
143. Ueki Y, Nagata M, Miyake S, Tominaga Y. Lymphocyte subsets in hemodialysis patients treated with recombinant human erythropoietin. *J Clin Immunol.* 1993; 13: 279-87
144. US Renal Data System: 1998 annual data report. *Am J Kidney Dis* 1998; 32: 9-162
145. Van Riemsdijk IC, Baan CC, Loonen EH, Zietze R, Weimar W. Patients on chronic hemodialysis have no intrinsic lymphocyte defect upon stimulation with interleukin-2, interleukin-15 or tumor necrosis factor-alpha. *Blood Purif.* 2003; 21: 158-62
146. Verbeelen D, Hauglustaine D, Sennesael J. Treatment of the anaemia of end stage renal disease with recombinant human erythropoietin. *Netherlands J Med* 1988; 33: 60-67
147. Vlassopoulos D. Recombinant hepatitis B vaccination in renal failure patients. *Curr Pharm Biotechnol.* 2003; 4: 141-51
148. Walz G, Kunzendorf U, Haller H, Keller F, Offermann G, Josimovic-Alesevic O, Diamantenstein T. Factors influencing the response to hepatitis B vaccination of hemodialysis patients. *Nephron* 1989; 51: 474-77
149. Ward HP, Kurnick JE, Pisarczyk. Serum level of erythropoietin in anaemias associated with chronic infection, malignancy and primary haematopoietic disease. *J Clin Invest* 1971; 50: 332-35
150. Wiecek A, Kyrz-Krzemien S, Franek E, Kokot F, Holowiecki J, Klin M. The Effect of short-term erythropoietin therapy on selected parameters of cell mediated and humoral immunity in hemodialyzed uremic patients. *Pol Arch Med Wewn.* 1995; 93: 41-7
151. Willheim M, Ebner C, Baier K, Kern W, Schratlbauer K, Thien R, Kraft D, Breiteneder H, Reinsch W, Scheiner O. Cell surface characterization of T lymphocytes and allergen specific T cell clones: correlation of CD 26 expression with Th1 subsets. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 100: 348-55
152. William J, Saad N, Salib M, Riad H, Mahran KS, Iskander I, Cozma G, Barsoum R. The acute effect of intravenously administered recombinant human erythropoietin on the immun response of uremic patients maintained on regular hemodialysis. *Artif Organs* 1998; 22: 192-96

153. Yorioka N, Hamaguchi N, Takasugi N, Shigemoto K, Harada S, Fujiwara K, Ishida A, Maeda T, Kawai A, Yamakido M. Effect of recombinant human erythropoietin administration on immunological indices in patients undergoing chronic hemodialysis. *Nippon Jinzo Gakkai Shi* 1993; 35: 981-8
154. Zuckermann JN. Nonresponse to hepatitis B vaccines and the kinetics of anti-HBs production. *J Med Virol* 1996; 50: 283-88
155. Eckardt KU, Kurtz A. Regulation of erythropoietin production. *Eur J Clin Invest.* 2005; 35 Suppl. 3: 13-9



# Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abb. 1 Unterschiedliche Wege der B-Zell-Aktivierung (nach Girndt, 2002)	3
Abb. 2 T-Helferzell-Immunantwort, Ag-Präsentation und Ag-Erkennung (nach Pleyer und Ritter, 2003)	6
Abb. 3 Kulturplatte mit 24 well	14
Abb. 4 Ursachen der chronischen Niereninsuffizienz im Untersuchungskollektiv	17
Abb. 5 Leukozytenzahl im Vollblut der Untersuchungsgruppen	19
Abb. 6 Relativer Anteil der Lymphozyten im Vollblut der Untersuchungsgruppen	19
Abb. 7 Relativer Anteil der Granulozyten im Vollblut der Untersuchungsgruppen	20
Abb. 8 Absoluter Anteil der CD2- und CD3-positiven PMNZ im Vollblut der Untersuchungsgruppen	21
Abb. 9 Absoluter Anteil der CD4-positiven PMNZ im Vollblut der Untersuchungsgruppen	21
Abb. 10 Absoluter Anteil der CD19- und CD20-positiven PMNZ im Vollblut der Untersuchungsgruppen	22
Abb. 11 Absoluter Anteil der CD25-positiven PMNZ und CD25- positiven T-Zellen im Vollblut der Untersuchungsgruppen	24
Abb. 12 Absoluter Anteil der CD26-positiven PMNZ und CD26- positiven T-Zellen im Vollblut der Untersuchungsgruppen	24

Abb. 13	Relativer Anteil der CD19- und CD20-positiven Zellen nach Isolierung der PMNZ der Untersuchungsgruppen	25
Abb. 14	Relativer Anteil der CD13-positiven Zellen nach Isolierung der PMNZ der Untersuchungsgruppen	26
Abb. 15	Relativer Anteil der HLA-DR-positiven B-Zellen nach Isolierung der PMNZ der Untersuchungsgruppen	27
Abb. 16	Relativer Anteil der CD26-positiven PMNZ und CD26-positiven T-Zellen nach Isolierung der PMNZ der Untersuchungsgruppen	28
Abb. 17	Relativer Anteil der CD3-positiven PMNZ der Untersuchungsgruppen in Abhängigkeit vom Zeitpunkt nach Zugabe von rhEPO in unterschiedlicher Dosis	30
Abb. 18	Relativer Anteil der CD4-positiven PMNZ der Untersuchungsgruppen in Abhängigkeit vom Zeitpunkt nach Zugabe von rhEPO in unterschiedlicher Dosis	30
Abb. 19	Relativer Anteil der CD4-positiven PMNZ der Untersuchungsgruppen nach Stimulation mit PWM	31
Abb. 20	Relativer Anteil der CD13-positiven PMNZ der Untersuchungsgruppen in Abhängigkeit vom Zeitpunkt nach Zugabe von rhEPO in unterschiedlicher Dosis	32
Abb. 21	Relativer Anteil der HLA-DR-positiven PMNZ der Untersuchungsgruppen in Abhängigkeit vom Zeitpunkt nach Zugabe von rhEPO in unterschiedlicher Dosis	33
Abb. 22	Relativer Anteil der HLA-DR-positiven T-Zellen der Untersuchungsgruppen in Abhängigkeit vom Zeitpunkt nach Zugabe von rhEPO in unterschiedlicher Dosis	34

Abb. 23	Relativer Anteil der CD25-positiven PMNZ der Untersuchungsgruppen in Abhängigkeit vom Zeitpunkt nach Zugabe von rhEPO in unterschiedlicher Dosis	35
Abb. 24	Relativer Anteil der CD25-positiven PMNZ der Untersuchungsgruppen nach Stimulation mit PWM	35
Abb. 25	Relativer Anteil der CD69-positiven PMNZ der Untersuchungsgruppen in Abhängigkeit vom Zeitpunkt nach Zugabe von rhEPO in unterschiedlicher Dosis	36
Abb. 26	Relativer Anteil der CD69-positiven T-Zellen der Untersuchungsgruppen in Abhängigkeit vom Zeitpunkt nach Zugabe von rhEPO in unterschiedlicher Dosis	37

## Tabellenverzeichnis

	Seite
Tab. 1 Kombination der monoklonalen Antikörper	13
Tab. 2 Differentialblutbilder der Patientengruppen und der gesunden Probanden zu Studienbeginn	53
Tab. 3 Absoluter Anteil der untersuchten Zellpopulationen (Zellen/ $\mu$ l) und der CD4/CD8-Ratio im Vollblut der Patientengruppen und der gesunden Probanden	54
Tab. 4 Relativer Anteil der untersuchten Zellpopulationen (%) und der CD4/CD8-Ratio nach Separation der PMNZ der Patientengruppen und der gesunden Probanden	55
Tab. 5 Relativer Anteil der untersuchten Zellpopulationen (%) sowie der CD4/CD8-Ratio in Abhängigkeit von der rhEPO-Dosis und der Inkubationszeit	56
Tab. 6 Relativer Anteil der untersuchten Zellpopulationen (%) in Abhängigkeit von der rhEPO-Dosis und der Inkubationszeit	57
Tab. 7 Relativer Anteil der untersuchten Zellpopulationen (%) in Abhängigkeit von der rhEPO-Dosis und der Inkubationszeit	58
Tab. 8 Relativer Anteil der untersuchten Zellpopulationen (%) in Abhängigkeit von der rhEPO-Dosis und der Inkubationszeit	59
Tab. 9 Relativer Anteil der CD4 und CD25-positiven PMNZ (%) der Patientengruppen und der gesunden Probanden nach Stimulation mit PWM	60

## Danksagungen

Herrn Prof. Dr. med. K. H. Neumann und Herrn Prof. Dr. rer. nat. S. Ansorge danke ich für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit in den von ihnen geleiteten Einrichtungen, der Klinik für Nephrologie und dem Institut für Experimentelle Innere Medizin, die notwendigen Untersuchungen und Experimente durchführen zu können.

Ganz besonders möchte ich mich an dieser Stelle für die Betreuung der Arbeit und Unterstützung bei den Messungen bei Herrn Dr. med. H.-P. Bosselmann und Frau Dr. rer. nat. A. Ittenson bedanken.

Für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Daten danke ich hiermit Herrn Dr. rer. nat. F. W. Röhl aus dem Institut für Biometrie und Medizinische Informatik (Direktor: Prof. Dr. rer. nat. J. Läuter).

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. G. Hoffman und Frau Dipl. med. H. Deicke (Dialysepraxis Schönebeck) für die Unterstützung bei der Auswahl eines Teiles des Patientenkollektivs.

Auch allen anderen Mitarbeitern der Klinik für Nephrologie und des Instituts für Experimentelle Innere Medizin möchte ich an dieser Stelle für die gewährte Unterstützung danken.

Hervorheben möchte ich die große Unterstützung und das Verständnis von Frau Simone Nitschke und Frau Bärbel Rößler bei der Versuchsdurchführung. Ihnen bin ich zu großem Dank verpflichtet.

## Erklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel:

**Expressionsmuster ausgewählter Oberflächenmarker peripherer mononukleärer Zellen bei Hämodialysepatienten nach Hepatitis-B-Impfung und unter dem Einfluss von rekombinantem Erythropoietin (rhEPO)**

An der Klinik für Nieren- und Hochdruckkrankheiten  
(Direktor: Prof. Dr. K. H. Neumann)  
und am Institut für Experimentelle Innere Medizin  
(Direktor: Prof. Dr. S. Ansorge, jetzt Prof. Dr. M. Naumann)  
der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

mit Unterstützung durch OA Dr. H.-P. Bosselmann und Dr. A. Ittenson

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Hohendodeleben, 27.02.2008

Stefan Wahlstab

## Lebenslauf

### **Angaben zur Person:**

Name: Stefan Wahlstab  
Wohnort: 39167 Hohendodeleben, Ernst-Thälmann-Str. 19  
Geburtstag: 24.11.1975  
Geburtsort: Magdeburg  
Familienstand: verheiratet  
Kinder: Niklas (geb. 21.08.2002), Julius (geb. 13.04.2006)

### **Schulbildung:**

1982-1986 Grundschule in Hohendodeleben  
1986-1990 Karl-Liebknecht-Oberschule in Hohendodeleben  
1990-1991 Tamara-Bunke-Oberschule in Magdeburg  
1991-1994 Wilhelm-Raabe-Gymnasium in Magdeburg

### **Zivildienst:**

1994-1995 Innere Klinik der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

### **Studium:**

1995 – 2002 Humanmedizin an der Otto-von-Guericke Universität  
Magdeburg, Abschluss: Staatsexamen im Mai 2002

### **Praktisches Jahr:**

April-Aug. 2001 Pädiatrie an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg  
Aug.-Nov. 2001 Innere Medizin/Nephrologie an der Otto-von-Guericke-  
Universität Magdeburg  
Nov.01-März 2002 Allgemeinchirurgie an der Otto-von-Guericke-Universität  
Magdeburg

### **Weiterer Werdegang:**

Juni 02 - Dez. 04 AiP/Assistenzarzt, Innere Medizin/Nephrologie an der Otto-  
von-Guericke-Universität Magdeburg  
(Rotation 3 Monate Pulmologie, 3 Monate Innere Med.  
Ohrenklinik, Standort Wolmirstedt)

Jan. 05 – Dez. 05 Assistenzarzt, Chirurgie, Kreiskrankenhaus Schönebeck

Jan. 06- Juni 06 Assistenzarzt, Innere Klinik Ohrenklinik, Standort  
Wolmirstedt

Juli 06 – Dez. 06 Weiterbildungsassistent für Allgemeinmedizin in der  
Kinderarztpraxis Dres. Gosch, Karstedt, Schwitalla,  
Magdeburg

Jan. 07- Dez. 07 Weiterbildungsassistent in der Allgemeinarztpraxis  
MR Dr. med. F.-W. Onnasch, Magdeburg

Seit Jan. 2008 Weiterbildungsassistent in der Allgemeinarztpraxis  
MR Dr. med. G. Kudela, Magdeburg

Aus der Dissertation hervorgegangene Veröffentlichung:

Kongressbeitrag

Abstract / Poster:

Wahlstab S, Bosselmann H-P, Ittenson A, Röhl F-W, Neumann K H.

Expressionsmuster ausgewählter Oberflächenmarker peripherer mononukleärer Zellen bei Hämodialysepatienten nach Hepatitis-B-Impfung und unter dem Einfluss von rekombinantem Erythropoietin (rhEPO); Kongress für Nephrologie 2006, Essen