

**Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin II  
der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Universitätsklinikum Halle (Saale)  
(Direktor: Universitäts-Professor Dr. med. Matthias Girndt)**

**Lipoprotein assoziierte Phospholipase A2 als Prädiktor für subklinische Atherosklerose bei  
chronisch nierenkranken dialysepflichtigen Patienten**

**Dissertation  
zur Erlangung des akademischen  
Grades Doktor der Medizin (Dr. med.)  
vorgelegt  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

**von Felix Christian Kohler**

**geboren am 04. Januar 1986 in Najran (Saudi-Arabien)**

**Gutachter/Gutachterin:**

**Gutachter 1: Prof. Dr. Matthias Girndt**

**Gutachter 2: PD Dr. Christoph Wanner**

**Gutachter 3: PD Dr. Sibylle von Vietinghoff**

**01.12.2015**

**31.05.2016**

## Referat

Die Suche nach Biomarkern, die zukünftige kardiovaskuläre Ereignisse bei Patienten unter Nierenersatztherapie anzeigen könnten, ist in der außergewöhnlich hohen kardiovaskulären Mortalitätsrate bei diesen Patienten begründet. Die Kombination aus Entzündungszellen, welche atherogene Moleküle innerhalb der Plaques exprimieren, macht die Monozyten / Lp-PLA2-Achse zu einem interessanten Ansatzpunkt bei dialysepflichtigen Patienten (CKD-5D).

In atherosklerotischen Plaques ist die Expression von Lp-PLA2 stark hochreguliert. In verschiedenen Studien wurde Lp-PLA2 als Prädiktor für kardiovaskuläre Erkrankungen beschrieben, und das unabhängig von anderen Entzündungswerten wie CRP sowie klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren.

60 CKD-5D Patienten ( $62,3 \pm 15,5$  Jahre) und 39 gesunde Probanden ( $54,0 \pm 8,4$  Jahre) wurden in einer Querschnittsstudie untersucht. Eine Charakterisierung der Probanden mit (A+) und ohne (A-) Atherosklerose wurde mittels Karotisarterien - Ultraschallmessung vorgenommen. Die Lp-PLA2-Aktivität im Plasma wurde durch einen enzymatisch kinetischen Test und die leukozytäre Lp-PLA2-mRNA-Expression durch Real-Time-PCR gemessen. Die Monozytensubtypen wurden durchflusszytometrisch analysiert und definiert als klassische CD14 ++ CD16- (Mo1), intermediäre CD14 ++ CD16 + (Mo 2) und nicht-klassische CD14 + CD16 ++ Monozyten (Mo3).

Die leukozytäre Lp-PLA2-mRNA-Expression und die plasmatische Lp-PLA2-Aktivität sind bei CKD-5D-Patienten signifikant höher im Vergleich zu gesunden Probanden. CKD-5D-Patienten mit subklinischer Atherosklerose (A+) zeigten signifikant höhere Lp-PLA2-Aktivitäts-Werte. Diese Werte blieben auch weiterhin signifikant unterschiedlich im Vergleich zu A- nach Adjustierung für Alter und HbA1c.

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Monozyten die Hauptquelle für die Lp-PLA2-mRNA-Expression unter hämatopoetischen Zellen sind. Die leukozytäre Expression von Lp-PLA2 kann mit der monozytären gleichgesetzt werden.

Wir schlussfolgern, dass die plasmatische Lp-PLA2-Aktivität ein unabhängiger Prädiktor für subklinische Atherosklerose bei CKD-5D-Patienten ist. Es konnte zwar gezeigt werden, dass die leukozytäre Lp-PLA2-mRNA-Expression hauptsächlich in Monozyten stattfindet, die leukozytäre Lp-PLA2-mRNA-Expression und die Aktivität des Enzyms im Plasma korrelieren allerdings nicht miteinander. Haupt-LP-PLA2-Aktivitätsquelle sind höchstwahrscheinlich Makrophagen, deren Ursprung in erster Linie in Mo1 und Mo2 zu finden ist. Sie könnten die wahren Quellen dieser Enzymaktivität nach Differenzierung der Vorläuferzellen darstellen. Lp-PLA-mRNA-Expressionsanalysen auf Monozytensubpopulationsebene müssen diese Hypothese verifizieren.

**Inhaltsverzeichnis**

**Referat** ..... 1

**Abkürzungsverzeichnis**.....V

**1 Einleitung** ..... 1

    1.1 Pathophysiologie der Atherosklerose ..... 1

    1.2 Bedeutung der Atherosklerose bei chronisch nierenkranken Patienten ..... 2

    1.3 Bedeutung der Monozyten..... 3

    1.4 Die Rolle der Lipoprotein-assoziierten-Phospholipase-A2 (Lp-PLA2) ..... 4

    1.5 Die Rolle des Angiotensin Converting Enzyme (ACE) ..... 7

**2 Zielsetzung der vorliegenden Studie**..... 7

**3 Material und Methoden** ..... 10

    3.1 Methoden ..... 10

    3.2 Klinischer Teil ..... 10

        3.2.1 Studiendesign..... 10

        3.2.2 Studienablauf ..... 11

        3.2.3 Erhebung mittels Fragebogen ..... 12

        3.2.4 Erhebung klinischer Parameter..... 12

        3.2.5 Labordiagnostik..... 12

        3.2.6 Nachweis der Atherosklerose ..... 13

    3.3 Immunologisch-experimenteller Teil ..... 14

        3.3.1 Immunphänotypisierung der Monozytensubpopulationen mittels Durchflusszytometrie ..... 14

        3.3.2 Durchflusszytometrische Analyse ..... 16

        3.3.3 Isolation von Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten ..... 18

        3.3.4 Stabilisierung und Isolierung von Gesamt RNA..... 19

        3.3.5 Hintergrund der Reversen Transkriptase - quantitativen (Real-time) PCR (RT-qPCR) – Quantifizierung der Lp-PLA2-Expression ..... 21

3.3.6	Beschreibung der cDNA-Synthese.....	22
3.3.7	Beschreibung der quantitativen PCR .....	23
3.3.8	Messung der LP-PLA2-Aktivität .....	24
3.4	Statistische Methoden.....	25
3.5	Material .....	26
3.5.1	Verbrauchsmaterialien.....	26
3.5.2	Geräte .....	27
3.5.3	Monoklonale Antikörper .....	28
3.5.4	Substanzen .....	28
3.5.5	Puffer und Medien .....	29
3.5.6	Verwendete Gene von TaqMan .....	31
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>31</b>
4.1	Charakteristika des Gesamtkollektivs.....	31
4.2	Stratifikation bezüglich manifester Atherosklerose .....	31
4.2.1	Erfassung relevanter Unterschiede zwischen der CKD-5D- und der Kontrollgruppe.....	31
4.2.2	Vergleich der Monozytensubpopulationen, der LP-PLA2 - Aktivität sowie der mRNA -Expression von Lp-PLA2 und ACE zwischen der CKD-5D-Gruppe und der gesunden Kontrollgruppe (KO-Gruppe).....	32
4.2.3	Grafiken.....	35
4.3	Lineares Regressionsmodell: Betrachtung der Lp-PLA2-Aktivität und -Expression, der drei Monozyten-Subpopulationen sowie der ACE-mRNA-Expression nach Adjustierung für Alter, Geschlecht und LDL-Profil zwischen CKD-5D und Kontrollen .....	36
4.4	Korrelationen der Lp-PLA2-Gen-Expression und der LP-PLA2-Aktivität .....	40
4.4.1	Grafiken.....	42
4.5	Stratifizierung innerhalb des Ausgangskollektivs (CKD-5D-Gruppe) hinsichtlich des Atherosklerosegrades .....	43
4.5.1	Grafiken.....	46
4.6	Lp-PLA2-Genexpression und Lp-PLA2-Aktivität bei CKD-5D-Patienten mit (A+) und ohne Atherosklerose (A-) .....	47

4.6.1	Lineares Regressionsmodell: Die Lp-PLA2-Aktivität unterscheidet sich zwischen Patienten mit und ohne Atherosklerose nach Adjustierung für Alter und HbA1c .....	47
4.6.2	Korrelation der Plasma Lp-PLA2-Aktivität und Lp-PLA2-mRNA-Expression mit Lipidparametern bei CKD-5D-Patienten mit (A+) und ohne (A-) Atherosklerose.....	47
4.7	Lp-PLA2-mRNA-Expression in verschiedenen Zellpopulationen .....	49
4.8	Erfassung der Medikamenteneinnahme innerhalb des CDK-5D-Kollektivs.....	49
4.9	Spaltung der CDK5-Gruppe anhand einer Diabetes- Mellitus- Erkrankung .....	52
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>54</b>
5.1	Die Rolle der Monozyten .....	54
5.1.1	Monozytensubpopulationen bei Dialysepatienten.....	54
5.2	Die Rolle der Lp-PLA2 .....	56
5.2.1	Plasma Lp-PLA2-Aktivität und Lp-PLA2-mRNA-Expression im Kontext der dialysepflichtigen Niereninsuffizienz .....	56
5.2.2	Korrelationen der Lp-PLA2-Aktivität sowie der Lp-PLA2-mRNA-Expression .....	58
5.3	Die Rolle des ACE.....	59
5.3.1	ACE-mRNA-Expression im Kontext der Dialysebehandlung.....	59
5.4	Einfluss der Medikamenteneinnahme bei den Dialysepatienten .....	60
5.5	Einfluss einer Diabetes- Mellitus- Erkrankung auf die Ergebnisse .....	61
5.6	Einschränkungen .....	61
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>62</b>
	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>64</b>
	<b>Thesen .....</b>	<b>71</b>
	<b>Anhang.....</b>	<b>72</b>
	Fragebogen zur Erhebung von Herz Kreislaufbeschwerden sowie kardiovaskulären Risikofaktoren.....	72
	Einverständniserklärung – Dialysepatienten.....	74
	<b>Tabellarischer Lebenslauf.....</b>	<b>X</b>
	<b>Selbstständigkeitserklärung .....</b>	<b>XII</b>
	<b>Erklärung über frühere Promotionsversuche.....</b>	<b>XII</b>

**Danksagung.....XIII**

## Abkürzungsverzeichnis

**Tabelle 1:** Abkürzungsverzeichnis: In der Arbeit verwendete Abkürzungen in alphabetischer Reihenfolge

Abkürzung	Bezeichnung
<	weniger als
>	mehr als
∞	unendlich
°C	Grad Celsius
%	Prozent
A+	Atherosklerose positiv
A-	Atherosklerose negativ
A.; Aa.	Arterie; Arterien
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ACE-I	ACE-Inhibitoren
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
APC	Allophycocyanin
Apo	Apolipoprotein
ARB	Angiotensin-Rezeptor-Blocker
ASS	Acetylsalicylsäure
BD	Becton Dickinson
BMI	Body-Mass-Index
BP	Blood Pressure
BSA	Bovine serum albumin
bspw.	beispielsweise
BY	Bypass-Operation
BZ	Blutzucker
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa

CCB	Calcium channel Blocker
CCS	Canadian Cardiovascular Society
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	copy DNA
CI	Konfidenzintervall
CKD-5	Chronic Kidney Disease Stage 5
CKD-5D	CKD-5 under dialysis
CRP	C-reaktives Protein
D+	Diabetes positiv
D-	Diabetes negativ
dl	Deziliter
DNA	Deoxyribonucleicacid
DTNB	5,5' -Dithiobis-2-nitrobenzoesäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
et al.	et alia
EtOH	Reines Ethanol
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Foetal calf serum
FCR	Fc-Rezeptor
FGF-23	Fibroblast Growth Factor 23
FRET	Fluoreszenz resonance energy transfer
FSC	Forward scatter
g	Gramm
g*	Vielfaches der Erdbeschleunigung (Zentrifuge)
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
h	Stunde
Hb	Hämoglobin
HD	Hämodialyse
HDL	High density lipoprotein
HDL-C	HDL-Cholesterin

HI	Herzinfarkt
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HLA	Human Leukozyte Antigen
HMG-CoA-Reduktase	$\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IL	Interleukin
IMT	Intima-Media-Thickness
KfH	Kuratorium für Dialyse und Nierentransplantation e.V.
KHK	Koronare Herzkrankheit
KO	Kontrollgruppe
LDL	Low density lipoprotein
LDL-C	LDL-Cholesterin
Lp-PLA2	Lipoprotein assoziierte Phospholipase A2
LPS	Lipopolysaccharid
M-CSF	Macrophage Colony Stimulating Factor
M-CSFR	M-CSF Rezeptor
MCT	microcentrifuge tube
mg	Milligramm
MHC	Major histocompatibility complex
MHz	Megahertz
Min.	Minute
ml	Milliliter
$\mu$ l	Mikroliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MW	Mittelwert
MCP-1	monocyte chemotactic protein 1
Mo (1-3)	Monozytensubpopulation (1-3)
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
N	Anzahl
NaN <sub>3</sub>	Natriumazid

NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
NYHA	New York Heart Association
PAF	Plättchen aktivierender Faktor
PAF-AH	Plättchen aktivierender Faktor-Acetylhydrolase
pAVK	Peripher arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphat buffered saline
PBL	Periphere Blutleukozyten
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PCR	Polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldehyd
pH	Pondus Hydrogenii
PRC	PAXgene RNA spin column
PT	Processing Tube
PTCA	Perkutane Transluminale Coronare Angioplastie
RNA	Ribonucleic Acid
Rpm	Rounds per Minute
RR	Blutdruckmessung nach Riva-Rocci
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	Reverse Transkriptase – quantitative (Real time) PCR
SD	Standardabweichung („standard deviation“)
s.o.	siehe oben
SSC	Sideward scatter
Taq	Thermus aquaticus
TBQ	Tibio-brachialer Quotient
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
Total-C	Gesamt-Cholesterin
u.a.	unter anderem
u.s.w.	und so weiter
UKH	Universitätsklinikum Halle (Saale)

VCAM	vascular cell adhesion molecule
vgl.	Vergleiche
VitD	Vitamin D
VLDL	Very low density Lipoprotein
vs	versus
Z.n.	Zustand nach

## 1 Einleitung

### 1.1 Pathophysiologie der Atherosklerose

Noch in den 90er Jahren ging man beim Prozess der Atherogenese von einer rein passiven Lipidakkumulation in Gefäßwänden aus. Dementsprechend galt die Hypercholesterinämie als der entscheidende Risikofaktor im Hinblick auf atherosklerotisch bedingte Gefäßveränderungen, begleitet von schädigenden Einflüssen anderer Risikofaktoren wie Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie und Nikotinabusus. Ross postulierte in einem 1999 erschienenen Artikel die wichtige Bedeutung einer weiteren Komponente für die Entstehung von Atherosklerose, der Inflammation (Ross, 1999).

Neuere Forschungen von 2005 zeigen, dass die inflammatorische Komponente eine Schlüsselrolle bei kardiovaskulären Erkrankungen wie etwa der KHK spielt. Immunzellen, wie zum Beispiel monozytäre Zellen, dominieren frühe atherosklerotische Läsionen (Hansson, 2005). Ross zeigte in seiner Arbeit von 1999 den interagierenden Zusammenhang der Hypercholesterinämie einerseits (insbesondere des LDL-Cholesterins) und der Inflammation, initiiert durch Immunzellen, andererseits (Ross, 1999). Von diesen Immunzellen sekretierte Effektormoleküle beschleunigen die Progression der Läsionen (Hansson, 2005).

Am Anfang der Bildung atherosklerotischer Läsionen steht eine Schädigung des Gefäßendothels. Initial kann zum Beispiel oxidiertes LDL eine Läsion hervorrufen. Es folgt eine Aktivierung der innersten Gefäßschicht, die mit der Bildung von Adhäsionsmolekülen wie Selektinen und Integrinen (ICAM und VCAM) beginnt. Außerdem werden vom Endothel chemotaktisch wirksame Moleküle wie z.B. das MCP-1 sowie proinflammatorische Zytokine produziert. Diese Moleküle führen in Kombination auf der einen Seite zu einer Rekrutierung von Leukozyten (u.a. Monozyten), auf der anderen Seite zu der Gefäßläsion. Monozyten werden durch die chemotaktisch wirksamen Botenstoffe angelockt. Es folgt eine Migration der Monozyten in den subendothelialen Raum der Gefäßwand. Dort entwickeln sich die Monozyten unter dem Einfluss von M-CSF zu Gewebsmakrophagen, die wiederum beginnen, inflammatorische und chemotaktisch wirksame Moleküle zu produzieren. Durch diesen Prozess werden einerseits weitere Monozyten aus dem zirkulierenden Blut zur Läsion gelockt, andererseits kommt es zur Einwanderung glatter Muskelzellen aus der Media. Es resultiert ein sich selbst unterhaltender Entzündungsprozess, der wesentlich an der Bildung atherosklerotischer Plaques beteiligt ist (Rajavashisth et al., 1990; Yla-Herttuala, 1991). Der nächste Schritt in der Bildung atherosklerotischer Läsionen ist die Aufnahme von oxidierten LDL-Partikeln über den Scavenger Rezeptor (CD36) in Makrophagen, die sich daraufhin zu Schaumzellen umwandeln. Sowohl Monozyten als auch Makrophagen sind in jeder Phase der Bildung atherosklerotischer Plaques nachweisbar (van der Wal, A C et al., 1989; Yla-Herttuala, 1991) .

Betrachtet man nun die Entstehung atherosklerotischer Plaques und die hohe Inzidenz von kardiovaskulären Ereignissen bei chronisch nierenkranken Patienten, so liegt es nahe, eine Bestimmung der Zellen

durchzuführen, die in den komplexen Prozess der Entstehung der Atherosklerose eingebunden sind. Madjid et al. führten in ihrer Arbeitsgruppe 2004 den Beweis, dass eine Erhöhung der Gesamtleukozytenzahl mit einer erhöhten klinischen Manifestation kardiovaskulärer Ereignisse einhergeht. Zahlreiche epidemiologische und klinische Studien haben gezeigt, dass Leukozytose ein unabhängiger Prädiktor für zukünftige kardiovaskuläre Ereignisse ist (Madjid et al., 2004). Innerhalb der Leukozytenpopulation wiederum konnten Assoziationen zwischen kardiovaskulärem Risiko und der neutrophilen Granulozyten-Population nachgewiesen werden. Diese Assoziation konnte zunächst für Monozyten/Makrophagen nicht gezeigt werden. Dies erschien allerdings bei Kenntnis der Atherogenese unplausibel (Gurm et al., 2003; Grau et al., 2004; Wheeler et al., 2004). Inzwischen hat in zahlreichen Studien eine Unterteilung verschiedener Monozyten Subpopulationen stattgefunden. Zunächst wurden die Monozyten in zwei Untergruppen unterteilt (CD14++CD16- und CD14+CD16+). Schlitt et al. wiesen 2004 bei nierengesunden KHK-Patienten in einer Studie den Zusammenhang zwischen der CD16+ Monozytenpopulation (CD14+CD16+) und dem Vorliegen der KHK nach (Schlitt et al., 2004).

Ferner konnte gezeigt werden, dass die Gefäß-Komplikationsrate stark mit Anzeichen der Inflammation und der Aktivierung von Monozyten bei Patienten mit Nierenversagen assoziiert ist (Heine et al., 2007; Ulrich et al., 2010, 2011).

## **1.2 Bedeutung der Atherosklerose bei chronisch nierenkranken Patienten**

Patienten mit chronischem Nierenversagen sind durch verschiedene Prozesse in besonderer Weise von vaskulären Komplikationen betroffen. Sie haben eine sehr hohe vaskuläre Ereignisrate, zehn bis mehrere hundert Mal höher als die der allgemeinen Bevölkerung (Foley et al., 1998). Kardiovaskuläre Ereignisse stellen die führenden Todesursachen bei chronisch dialysepflichtigen Patienten (CKD-5D) dar (Cheung et al., 2000). Wie Longenecker et al. bereits 2002 zeigten, sind atherosklerotische kardiovaskuläre Erkrankungen die Todesursache bei etwa der Hälfte der dialysepflichtigen Patienten (Longenecker, 2002). Interessant ist, dass es offensichtlich eine positive Korrelation zwischen der Schwere der Nierenfunktionseinschränkung und dem Risiko für Gefäßerkrankungen gibt. Wie Hoberg et al. in ihrer Arbeit beschreiben, geht eine Einschränkung der Nierenfunktion mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung für kardiovaskuläre Erkrankungen einher. Bereits im ersten Stadium einer Nierenerkrankung ist diese Risikoerhöhung feststellbar. Mit steigender Einschränkung der Nierenfunktion steigt auch das Risiko kardiovaskulärer atherosklerotischer Veränderungen (Hoberg und Galle, et. al., 2007). Kardiovaskuläre Erkrankungen und andere Komplikationen bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung werden durch oxidativen Stress, Entzündungsreaktionen und Dyslipidämie vermittelt. Diese Patienten weisen beispielsweise Fettstoffwechselstörungen auf, welche die Entstehung atherosklerotischer Veränderungen begünstigen. Menschen mit chronisch eingeschränkter Nierenfunktion zeigen reduzierte ApoA-1- und HDL-Serumkonzentrationen. Außerdem sind die antioxidativen, entzündungshemmenden und reversen Cholesterintransporteigenschaften der HDL-Partikel eingeschränkt. Die Clearance von VLDL und Chylomikronresten durch Muskel- und Fettgewebe sowie durch die Leber ist eingeschränkt. Dies führt zu einer Hypertriglyzeridämie, einer Akkumulation von verschiedenen Fettstoffwechselprodukten sowie einer

oxidativen Modifikation von LDL und Lipoproteinresten. Alle diese Veränderungen führen dazu, dass oxidierte LDL-Partikel und andere Restpartikel u.a. durch Makrophagen vermehrt in der Arterienwand aufgenommen werden und zusammen mit der eingeschränkten Rücktransportfähigkeit der HDL-Partikel die Schaumzell- und Atherosklerose-Bildung unterhalten (Vaziri und Norris, 2011). Auch die verminderten antioxidativen und entzündungshemmenden Fähigkeiten der HDL-Partikel leisten ihren Beitrag bei der verstärkten Unterhaltung dieser Prozesse (Cacciagiú et al., 2012).

Die enorme kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität bei Patienten mit dialysepflichtiger Nierenerkrankung (CKD-5D) kann durch die hohe Belastung durch teilweise bereits beschriebene, nicht-klassische Risikofaktoren erklärt werden, mit welcher diese Patienten konfrontiert sind. Zusätzlich zu atherosklerotischen Risikofaktoren, die auch für die allgemeine Bevölkerung relevant sind (Bluthochdruck, Rauchen, Diabetes, Übergewicht, Lipidstörung), spielen Urämie-spezifische Probleme wie Urämietoxine, Mikro-Entzündungen, oxidativer Stress, mineralische Knochenerkrankungen, ein verändertes Lipid- und Lipoprotein-Profil (s.o.) eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Störungen des Herz-Kreislauf Systems bei Patienten mit Nierenversagen im Endstadium (Ortiz et al., 2014). Momentan befindet sich eine Vielzahl von Risikofaktoren und Risikomarkern in Untersuchung, die helfen könnten, zukünftige kardiovaskuläre Ereignisse bei CDK-5D Patienten vorherzusagen. Beispiele hierfür sind: FGF-23 (Kendrick et al., 2011; Scialla et al., 2014), Cystatin-C (Svensson-Färbom et al., 2014; Astor et al., 2012), Paraoxonase (Sztanek et al., 2012), serum free p-cresyl sulfate levels (Wu et al., 2012), Macrophage migration inhibitory factor (Ramos et al., 2013), Macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1/GDF15) (Breit et al., 2012). Es konnte von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass entzündliche Monozyten (CD14 ++ CD16 +, Mo2) mit der Expression von hohen ACE Levels in Verbindung mit der Entstehung von Atherosklerose stehen und Teil des Entzündungszyklus in atherosklerotischen Plaques sein könnten (Ulrich et al. 2010; Ulrich et al. 2011). Diese Arbeit wird sich auf die Rolle der Lp-PLA2, auch als Plättchen-aktivierender-Faktor-Acetylhydrolase bezeichnet, sowie des ACE konzentrieren.

### **1.3 Bedeutung der Monozyten**

Monozyten sind weiße Blutkörperchen (Leukozyten) und werden, wie jede andere Blutzelle auch, aus der hämatopoetischen Stammzelle im Knochenmark gebildet. Von dort aus werden die Monozyten in das periphere Blut ausgeschwemmt und können verschiedene Aufgaben übernehmen. Die etwa 5-10 % der Gesamtleukozyten ausmachende Zellpopulation differenziert, in Gewebe ausgewandert, zu Makrophagen. Dort phagozytieren die Zellen bspw. körperfremde Moleküle und bauen diese intrazellulär ab. Eine andere Rolle spielen Monozyten als professionell Antigen präsentierende dendritische Zellen, lokalisiert im lymphatischen Gewebe. Das Monozyten/Makrophagen-System ist entscheidender Bestandteil sowohl des angeborenen als auch des erworbenen Immunsystems (Hume, 2006). Durch die Sekretion von Chemokinen werden andere Immunzellen in das Entzündungsgebiet gelockt. Ein Entzündungsmilieu wird ebenfalls durch Monozyten/Makrophagen geschaffen, indem proinflammatorische Zytokine produziert und sekretiert werden. Zunächst ging man von nur einer Monozytenpopulation aus. Im Verlauf der letzten zwanzig Jahre wurde immer

deutlicher, dass es sich bei den Monozyten/Makrophagen um eine heterogene Zellpopulation handelt, die sich immunologisch, morphologisch sowie funktionell unterteilen lässt (Passlick et al., 1989). Die Gesamtmonozytenpopulation wurde bis zu diesem Zeitpunkt durch die Expression eines Oberflächenmoleküls definiert (CD14 = LPS-Rezeptor). Zunächst definierten Passlick et al. 1989 eine weitere Untergruppe, die anhand eines weiteren Oberflächenmoleküls unterschieden wurde: ein IgG-Rezeptor (CD16 = FcγIII-Rezeptor). Trotz aller morphologischen Ähnlichkeiten der Monozytengruppen konnten funktionelle Unterschiede festgestellt werden. So zeigten die CD16 positiven Zellen (CD14+CD16+) im Vergleich zu der CD16 negativen Monozytenpopulation (CD14+CD16-) eine verringerte Phagozytenaktivität und eine doppelt so hohe Expression des MHC-II-Moleküls auf deren Oberfläche (Passlick et al., 1989). Erst deutlich später im Jahre 2003 zeigte eine weitere Arbeitsgruppe um Ancuta et al., dass die CD16+ Monozyten weiter unterteilt werden können. Die weitere Unterteilung gelang anhand der CD14 Expression, so dass man nun eine klassische Population (CD14++CD16-, Mo1), eine Population mit CD14++CD16+ (Mo2) und eine dritte Population (Mo3), die CD14+CD16++ exprimiert (Ancuta et al., 2003), unterscheiden konnte. Obwohl in der Literatur oftmals „CD16+ Monozyten“ als gemeinsamer Begriff für die Mo2 und Mo3 Population zu finden ist, wird in dieser Arbeit im Folgenden die Einteilung in drei Subpopulationen wie oben beschrieben beibehalten.

In zahlreichen Publikationen wurden die CD16+ Monozyten als proinflammatorische Zellreihe bezeichnet (Ziegler-Heitbrock, 1996; Belge et al., 2002; Ulrich et al., 2007). In verschiedenen Arbeiten wurde die Annahme, dass diese Zellreihe deutlich höhere inflammatorische Eigenschaften als die CD16- Population aufweist, verifiziert. Nach Stimulation mit LPS, einem starken Monozyten-Stimulator, der von gramnegativen Bakterien sekretiert wird, zeigten die CD16 positiven Monozyten deutlich höhere proinflammatorische Eigenschaften. Dies äußerte sich zum Beispiel in einer gesteigerten Produktion der Entzündungsmediatoren TNF-α, IL-6 und IL-1α sowie einer herabgesetzten Nachweisbarkeit des anti-inflammatorisch-wirkenden Zytokins IL-10 (Thieblemont et al., 1995; Ziegler-Heitbrock, 1996, 2007; Belge et al., 2002). Dass die CD16+ Monozyten Population bei vielen systemischen Entzündungsreaktionen, wie bei HIV, AIDS oder Tuberkulose, einen vermehrten Anteil an der Gesamtmonozytenpopulation aufweist, unterstützt die These, dass diese Population entscheidende Bedeutung in der Initiierung inflammatorischer Ereignisse besitzt (Thieblemont et al., 1995; Ziegler-Heitbrock, 1996, 2007). 2011 zeigten bereits Ramirez et al., dass die Population von CD16+ Monozyten bei Patienten mit CKD signifikant erhöht ist (Ramirez et al., 2011).

#### **1.4 Die Rolle der Lipoprotein-assoziierten-Phospholipase-A2 (Lp-PLA2)**

Mit der Erkenntnis, dass die Initiierung einer inflammatorischen Reaktion an der Atherogenese beteiligt ist, wuchs das Interesse, Marker zu identifizieren, die sowohl als Indikator für die Inflammation im Körper und im Bereich atherosklerotischer Plaques als auch als Prädiktor und Gradmesser für kardiovaskuläre Ereignisse dienen könnten. Ein seit langem in der klinischen Diagnostik eingesetzter etablierter Marker für Entzündungsgeschehen im Körper ist das CRP. Ridker et al. beschrieben 1997 die Höhe des CRP-Wertes im peripheren Blut als einen Prädiktor für kardiovaskuläre Ereignisse (Ridker et al., 1997). Diese Einschätzung

Ridkers konnte sich allerdings in den letzten Jahren so nicht durchsetzen. Berücksichtigt man etablierte kardiovaskuläre Risikofaktoren als Prädiktor für Ereignisse, konnte der prädiktive Wert des CRPs in verschiedenen Kohortenstudien sowie einer großen Metaanalyse nicht bzw. nicht vollständig bestätigt werden. So zeigte sich in diesen Analysen eine eher begrenzte Aussagekraft dieses Entzündungsparameters (Danesh et al., 2004; Wang et al., 2006; Vivona et al., 2009).

Auf der Suche nach einem sinnvolleren Marker der vaskulären Inflammation mit einer Verknüpfung zum kardiovaskulärem Risiko beschrieben Caslake und Packard et al. erstmals im Jahre 2000 einen potentiellen neuen Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen: die Lipoprotein-assoziierte-Phospholipase A2 (Lp-PLA2), auch Plättchen-aktivierender-Faktor-Acetylhydrolase (PAF-AH) genannt, eine Calcium unabhängige Phospholipase (Caslake et al., 2000). Wie bereits beschrieben, stellt die Infiltration von Monozyten in die Gefäßintima einen kritischen Prozess in der Pathophysiologie der Atherosklerose dar. Dort werden oxidierte LDL-Partikel durch die Monozyten/Makrophagen aufgenommen und die Schaumzellbildung wird eingeleitet. Macphee et al. beschrieben 1999 die Rolle der Lp-PLA2 bei der Oxidation von LDL Molekülen (Macphee et al., 1999). Das Enzym ist bekannt als Mitglied der Phospholipase A2 Superfamilie und Inaktivator des Plättchen-aktivierenden-Faktors (PAF) (Vadas et al., 2008). Lp-PLA2 liegt im Plasma überwiegend gebunden an LDL-Partikeln vor, teilweise in geringerem Maße auch an HDL-Partikeln. Es ist entscheidend an der oxidativen Modifikation dieser Lipoproteine beteiligt (Steinbrecher und Pritchard, 1989; Tew et al., 1996; Macphee et al., 1999). Im menschlichen Plasma zirkuliert die PAF-AH in Verbindung mit LDL- und HDL-Partikeln sowohl mit hoher als auch niedriger Dichte. 70-80% der Gesamtaktivität des Enzyms liegen als Komplex mit LDL vor. 20-30% binden an HDL-Partikel. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Lp-PLA2-Aktivität sowohl mit LDL als auch mit HDL assoziiert ist (Stafforini, 2009). Eine weitere Untersuchung der LDL Bindung führte zu der Erkenntnis, dass PAF-AH die Verbindung mit den dichtesten und elektronegativsten LDL-Fraktionen präferiert. Benitez et al. konnten in ihrer Arbeit nachweisen, dass Lp-PLA2, im Vergleich zu der nicht elektronegativen Fraktion, in 5fach höherer Konzentration an eine elektronegative Subfraktion der LDL-Partikel bindet (Benitez et al., 2003).

Caslake et al. beschreiben in ihrer Arbeit aus dem Jahre 2000, dass die Enzym-Level signifikant positiv mit dem LDL-Cholesterin der Probanden korrelierten. Auch bei sich nicht unterscheidendem Plasma-LDL-Spiegel konnte in dieser Arbeit ein signifikant erhöhter Lp-PLA2-Spiegel bei Patienten mit gesicherter KHK nachgewiesen werden (Caslake et al., 2000). Da die Phospholipase zu einem großen Teil von Makrophagen und Schaumzellen in der vaskulären Intima produziert wird, ist es sehr viel mehr gefäßspezifisch als das CRP, oder andere Akute-Phase-Proteine, die in der Leber produziert werden (McConnell und Hoefner, 2006).

Steinbrecher zeigte bereits 1989, dass die Lp-PLA2 den Abbau von Phosphatidylcholin zu Lysophosphatidylcholin bei der oxidativen Modifikation von LDL katalysiert, welches proinflammatorisch wirkt (Steinbrecher und Pritchard, 1989). Weitere proinflammatorische Mediatoren, die durch dieses Enzym beim oxidativen Umbau von LDL generiert werden, sind oxidierte Fettsäuren. Die ursächliche Beteiligung von Lp-

PLA2 bei der Entstehung von Atherosklerose wird bedingt durch seine Aufgabe, den Thrombozytenaktivierungsfaktor zu spalten sowie Glycerophospholipide zu oxidieren. Wie oben beschrieben entstehen durch diese Vorgänge proinflammatorische Mediatoren (Rosenson und Hurt-Camejo, 2012).

In atherosklerotischen Plaques ist die Expression von Lp-PLA2 stark hochreguliert. Außerdem konnten die Produkte des Enzyms in Plaques nachgewiesen werden (Zalewski et al., 2005; Anderson, 2008; White et al., 2013). Insbesondere Makrophagen und Schaumzellen in der vaskulären Intima exprimieren große Mengen an Lp-PLA2 (McConnell und Hoefner, 2006). Die höchste Expression wurde in Schaumzellen gemessen (Saionji und Ohsaka, 2001; Kawanaka et al., 2002). In verschiedenen Studien wurde Lp-PLA2, Marker für vaskuläre Entzündungen, als Prädiktor für kardiovaskuläre Erkrankungen beschrieben, und das unabhängig von anderen Entzündungswerten wie CRP sowie klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren wie beispielsweise Diabetes mellitus, Hypertonie oder Hypercholesterinämie (Packard et al., 2000; McConnell und Hoefner, 2006; Anderson, 2008; White et al., 2013). Sowohl die Konzentration als auch die Aktivität des Enzyms scheinen deutlich prädiktiv für die Entstehung von Atherosklerose bei Patienten mit normaler Nierenfunktion zu sein (Thompson et al., 2010). Wie bereits gezeigt werden konnte, führt eine Hemmung der Lp-PLA2 zu einem verringerten Entzündungsprozess sowie einer Verlangsamung der atherosklerotischen Krankheitsprogression. Dies könnte darauf hindeuten, dass dieses Enzym nicht nur ein prognostischer Marker, sondern selbst ein direkter Risikofaktor für Atherogenese sein könnte (Anderson, 2008).

Bei Hämodialyse-Patienten behandelten bisher wenige Autoren Fragen im Zusammenhang mit der Lp-PLA2-Aktivität. Während Hasselwander et al. keine Unterschiede bei der Lp-PLA2-Aktivität zwischen niereninsuffizienten Patienten und gesunden Kontrollpersonen fanden (Hasselwander et al., 1999), lieferten Miliones et al. den Beweis für eine erhöhte Plasma PAF-AH-Aktivität bei Patienten mit Nierenversagen, mit oder ohne Nierenersatztherapie (Milionis et al., 1999). Etwa 10 Jahre später untersuchte die Gruppe um Bitla und Kollegen die Auswirkungen der Aktivierung einer einzelnen Dialysesitzung auf Entzündungsmarker. Sie fanden heraus, dass bei post-HD Patienten eine höhere Lp-PLA2-Aktivität gegenüber dem vor-HD Zustand vorlag (Bitla et al. 2010). Bei der Untersuchung von Hämodialyse-Patienten mit Typ 2 Diabetes in der Deutschen Diabetes Dialyse-Studie konnten Winkler und Mitarbeiter zeigen, dass Patienten mit der höchsten Quartile der Lp-PLA2-Aktivität ein signifikant höheres Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse aufwiesen. Interessanterweise zeigten Patienten unter einer Atorvastatin-Therapie eine niedrigere Lp-PLA2-Aktivität und ein reduziertes Todesrisiko (Winkler et al. 2012a). Eine weitere interessante Arbeit von Charniot et. al. beschreibt die Korrelation des Lp-PLA2-Levels mit ACE-Inhibitoren sowie ARB (Charniot et al., 2013).

Neben den zahlreichen epidemiologischen Studien, die einen klaren positiven Zusammenhang zwischen der Aktivität von Lp-PLA2 und der Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen zeigen (Mallat et al., 2010; Thompson et al., 2010), gibt es Stimmen, die die Rolle des Enzyms als proatherogenen Faktor bezweifeln. Rosenson und Stafforini beschreiben in ihrem 2012 erschienenen Artikel, dass in verschiedenen Tierexperimenten sogar ein protektiver Effekt von Lp-PLA2 auf vaskuläre Inflammation ausgehen könnte

(Rosenson und Stafforini, 2012b). Die genaue Rolle von Lp-PLA2 im Bereich der Entstehung atheromatöser Plaques bleibt weiterhin nicht geklärt.

In einer multizentrischen, randomisierten, doppelblinden, placebokontrollierten Studie, die 2014 von White et al. veröffentlicht wurde, wurde die Wirkung von Darapladib, einem selektiven, oral zu verabreichenden Hemmer der Lipoprotein-assoziierten Phospholipase A2, bei insgesamt 15.828 Patienten auf folgende Endpunkte im Vergleich zu der Einnahme eines Placebos getestet: kardiovaskulärer Tod, Myokardinfarkt oder Schlaganfall. Zusammenfassend konnte Darapladib bei Patienten mit stabiler KHK das Risiko der primären Endpunkte, im Vergleich zu der Einnahme eines Placebos, nicht signifikant senken (White et al., 2014).

### **1.5 Die Rolle des Angiotensin Converting Enzyme (ACE)**

In verschiedenen Studien zeigte sich, dass durch die Gabe von ACE-Inhibitoren eine signifikante Reduktion der Mortalität und der kardiovaskulären Komplikationen bei Hochrisikopatienten erreicht werden konnte (Lonn et al., 1994; Yusuf et al., 2000). Diese Ergebnisse lenkten die Aufmerksamkeit auf das ACE im Zusammenhang mit der Atherogenese.

Wie bereits in dieser Einleitung beschrieben, sind Monozyten direkt in die Pathogenese der Atherosklerose involviert. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass Monozyten bzw. Makrophagen, die sich im Bereich atherosklerotischer Plaques befinden, das Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE/CD143) auf ihrer Oberfläche exprimieren (Diet et al., 1996; Ribichini et al., 2006). Es wurde vermutet, die Präsenz des Enzyms in der Gefäßwand könnte relevant für den Progress der Plaqueentstehung sein, indem eine lokale Angiotensinaktivierung durch ACE stattfindet, welches wiederum oxidativen Stress und damit endothelialen Schaden nach sich ziehen könnte (Rajagopalan et al., 1996). Es wurde durch Ulrich et al. bereits gezeigt, dass dialysepflichtige Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen eine erhöhte ACE-Expression auf Monozytenoberflächen aufweisen. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass die höchste Expressionsdichte auf CD14++CD16+ Monozyten (Mo2-Population) zu finden ist. Diese Subpopulation der Monozyten mit einer hohen Expressionsdichte des ACE zeigen einen hohen prädiktiven Wert für die Mortalität; sie korrelieren außerdem mit der Schwere der Karotis-Sklerose - als Gradmesser für systemische Atherosklerose - bei chronisch nierenkranken Patienten (Ulrich et al., 2006, 2010, 2011).

## **2 Zielsetzung der vorliegenden Studie**

Das Grundkonzept der vorliegenden Arbeit ist es, Informationen über die Lp-PLA2-Aktivität im Plasma und die leukozytäre Lp-PLA2-mRNA-Expression bei Patienten mit und ohne Anzeichen einer subklinischen Atherosklerose innerhalb eines dialysepflichtigen Kollektivs zu erhalten. Weiterhin sollen die Ergebnisse der CKD-5D Patienten im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe Aussagen über die Unterschiede, die aufgrund der Niereninsuffizienz herrschen, ermöglichen.

In unserer Arbeitsgruppe konnte bereits ein Zusammenhang zwischen CD16+ Monozyten und der Intima-Media-Dicke als Maß für atherosklerotische Veränderungen bei nierentransplantierten Patienten sowie gesunden Teilnehmern der Studie gezeigt werden (Ulrich et al., 2007). Ebenfalls konnten Heine et al. 2007 CD14++CD16+ Monozyten (Mo2) als prognostischen Marker für kardiovaskuläre Ereignisse bei Dialysepatienten identifizieren (Heine et al., 2007). Die Lp-PLA2-Aktivität sowie -Masse gelten als Prognosemarker bei diversen kardiovaskulären Erkrankungen bei nicht-niereninsuffizienten Patienten (Packard et al., 2000 ; Caslake et al., 2000 ; Anderson, 2008; Thompson et al., 2010). Dass die Messung der Lp-PLA2-Aktivität und -Konzentration signifikant mit KHK und kardiovaskulären Ereignissen assoziiert ist, steht außer Frage (Caslake et al., 2010; Charniot et al., 2013).

Ziel der Studie ist es, potentielle Atherosklerosemarker gezielt bei niereninsuffizienten Patienten unter einer Dialysebehandlung (CKD5) zu überprüfen. Als mögliche Marker werden die proinflammatorischen Monozyten (Mo2, Mo3), die Lp-PLA-Aktivität sowie die leukozytäre Expression der Lp-PLA2- und ACE-mRNA untersucht. Diese Parameter wurden für die vorliegende Untersuchung ausgewählt, da die Mo2-Subpopulation, wie oben beschrieben, bereits in einer prospektiven Studie als prädiktiver Marker für kardiovaskuläre Ereignisse bei Dialysepatienten nachgewiesen werden konnte (Heine et al., 2007). Es gilt nun zu überprüfen, ob sich die proinflammatorischen Monozytenpopulationen als Marker für eine subklinische Atherosklerose bei CKD-5D-Patienten etablieren können.

Die Lp-PLA2-Aktivität und -Masse sind als prädiktive Marker für kardiovaskuläre Erkrankungen und Ereignisse bei nierengesunden Personen bekannt (Caslake et al., 2000, 2010). Bisher wurde kein Nachweis erbracht, dass die Messung der Lp-PLA2-Aktivität als unabhängiger Marker für eine subklinische Atherosklerose bei endgradig niereninsuffizienten Patienten etabliert werden kann.

Ebenso fehlen innerhalb dieses Patientengutes Erkenntnisse über die Expression der Lp-PLA2-mRNA im Plasma der Patienten, verglichen mit den Werten einer gesunden Kontrollgruppe. Es soll in der vorliegenden Arbeit die Verbindung zwischen der Lp-PLA2-Aktivität und der leukozytären bzw. monozytären Lp-PLA2 Expression überprüft werden, d.h. die Verbindung zwischen potentiell inflammatorischen Zellen und potentiell entzündlichen Markern, die von diesen Zellen generiert werden. Zusammen mit einer Überprüfung der Transkripte auf zellulärer Ebene innerhalb der Leukozyten kann so der Produktionsort des plasmatischen Lp-PLA2 weiter eingegrenzt werden. Es ist bekannt, dass die Expression der Lp-PLA2 erst im Zuge der Differenzierung zu Makrophagen und vor allem in Schaumzellen hochreguliert wird (Stafforini et al., 1990; McConnell und Hoefner, 2006; Ferguson et al., 2012). Wie genau die Lp-PLA2-Aktivität aber von im Plasma zirkulierenden Zellen, insbesondere den monozytären Vorläufern der Makrophagen, beeinflusst wird, ist nicht bekannt. Daher ist es wichtig, die Expression auf leukozytärer Ebene zu überprüfen und mit der Aktivität des Enzyms zu korrelieren. Dialysepflichtige Patienten weisen im Vergleich zu gesunden Menschen einen höheren Anteil CD16+ Zellen auf (Ramirez et al., 2011). Möglicherweise kommt es bereits bei der Differenzierung zu CD16+ Monozyten zu einer Hochregulation der Lp-PLA2-Expression innerhalb der Monozyten. Da Lp-PLA2 als

kardiovaskulärer Prädiktor bei Nierengesunden identifiziert werden konnte, liegt es nahe, diesen in einem Patientengut zu überprüfen, bei dem kardiovaskuläre Ereignisse die mit Abstand häufigste Todesursache ausmachen (Cheung et al., 2000).

Die Messungen der Expression der ACE-mRNA bei den Probanden beruhen auf der Erkenntnis unserer Arbeitsgruppe, dass dialysepflichtige Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen eine erhöhte ACE-Expression auf Monozytenoberflächen aufweisen. Die höchste Expressionsdichte ist auf der Mo2-Population zu finden (Ulrich et al. 2006, 2010, 2011). Es gilt bezüglich der ACE-Expression zu überprüfen, ob dieser Wert, untersucht im Rahmen einer Querschnittstudie, als unabhängiger Prädiktor für eine subklinische Atherosklerose bei CKD-5D-Patienten fungieren kann. Weiterhin wurde bisher noch nicht analysiert, ob die leukozytäre mRNA-Expression des ACE bei dialysepflichtigen Patienten im Vergleich zu einer gesunden Kontrollpopulation, erhöht ist.

Eine interessante Arbeit von Bitla et al. aus dem Jahre 2010 betrachtete die Effekte einer einzelnen Hämodialyse-Sitzung auf entzündliche Parameter wie das CRP und die Lp-PLA2-Aktivität. Es konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass die dialysierten Patienten im Vergleich zu einer alters- und geschlechtsgematchten Kontrollgruppe signifikant höhere CRP-Werte sowie Messungen der Lp-PLA2-Aktivität aufwiesen (Bitla et al. 2010). Es gilt zu überprüfen, ob Aktivität und Expression des Enzyms allein aufgrund der endgradigen Nierenerkrankung mit Dialysepflicht erhöht sein könnten, oder ob auch der Grad der Atherosklerose innerhalb der Dialysegruppe Einflüsse auf die inflammatorischen Werte hat.

Die Bestätigung bzw. Widerlegung dieser Zusammenhänge kann eine hohe klinische Relevanz für das untersuchte Kollektiv besitzen, da sich momentan spezifische Lp-PLA2-Inhibitoren in der Entwicklung befinden, die eine erhebliche Reduktion der atherosklerotischen Progression bewirken könnten. Sollte sich eine starke Rolle des Enzyms bei der sich rapide entwickelnden Atherosklerose bei chronisch niereninsuffizienten Patienten bestätigen, wären diese Substanzen von erheblichem Interesse für dieses Patientengut. Im Jahre 2012 konnten bereits Winkler et al. neben der Untermauerung der Assoziation der Lp-PLA2-Aktivität mit dem kardiovaskulären Outcome und der Mortalität zeigen, dass es erstens zu einer Reduktion der Lp-PLA2-Aktivität durch den HMG-CoA-Reduktasehemmer Atorvastatin kam und zweitens auch zu einer Reduktion der Mortalität bei Typ-2-Diabetikern unter Hämodialyse (Winkler et al., 2012a). Auch den Ansatz des Einflusses der Medikation der Probanden, u.a. einer Statintherapie, auf die inflammatorischen Marker verfolgten wir in der vorliegenden Studie.

Allerdings zeigte eine im Jahr 2014 groß angelegte Studie von White et al. bei Patienten mit stabiler KHK keine signifikante Verminderung des Risikos für kardiovaskulären Tod, Myokardinfarkt oder Schlaganfall durch die Einnahme des spezifischen Lp-PLA2-Hemmers Darapladib (White et al., 2014). Der Nutzen der neu entwickelten Medikamente, gerade im Hinblick auf das hier untersuchte Kollektiv (Patienten mit dialysepflichtiger Nierenerkrankung), ist bisher nicht überprüft worden und bleibt also zu beobachten.

Es wurden folgende Hypothesen aufgestellt:

- 1) Die Lp-PLA2-Aktivität ist bei Dialysepatienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen erhöht.
- 2) Die leukozytäre mRNA-Expression des Gens für die Enzyme Lp-PLA2 und ACE ist bei Dialysepatienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen erhöht.
- 3) Die Anzahl der inflammatorischen CD16+ Monozyten ist bei Dialysepatienten gegenüber gesunden Probanden erhöht.
- 4) Die Anzahl der CD16+ Monozyten ist bei A+ Patienten innerhalb der CKD-5D-Gruppe gegenüber A- erhöht.
- 5) Lp-PLA2-Aktivität, LpPLA2 – mRNA -Expression sowie ACE - mRNA - Expression unterscheiden sich innerhalb der CKD-5D-Gruppe bei Patienten mit Atherosklerose (A+) von dem Level bei Patienten ohne Atherosklerose (A-).
- 6) Die leukozytäre Lp-PLA2-Expression findet fast ausschließlich in Monozyten statt.
- 7) Die leukozytäre Lp-PLA2-Aktivität stellt einen unabhängigen Prädiktor für Atherosklerose bei CKD-5D-Patienten dar.

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Methoden**

#### **3.2 Klinischer Teil**

##### **3.2.1 Studiendesign**

60 dialysepflichtige Nierenkranke (CKD-5D) und 39 gesunde Kontroll-Personen wurden in die prospektive Querschnittstudie eingeschlossen.

Die CKD-5D Patienten wurden aus einem Kollektiv von Patienten, die sich zu einer ambulanten Dialysebehandlung im KfH Nierenzentrum Halle/S. (Kuratorium für Dialyse und Nierentransplantation e.V. – Ärztliche Leitung: Prof. Dr. med. Matthias Girndt) befanden, ausgewählt. Die Ursachen für die Nierenerkrankungen waren diabetische Nephropathie (n = 17), Glomerulonephritis (n = 8), polyzystische Nierenerkrankung (n = 5), interstitielle Nierenerkrankungen (n = 1), Nephrosklerose (n = 10) und andere bzw. unbekannte Ursachen (n = 19). Die Kontrollgruppe bestand aus nierengesunden Personen, die keine Anzeichen von Entzündungen oder bekannte atherosklerotische Krankheiten (KHK, pAVK, Apoplex etc.) aufwiesen. Die Kontrollpersonen wurden entweder durch Mitarbeiter der Abteilung Innere Medizin II der Universitätsklinik in Halle (N = 7) oder Mitarbeiter der Chirurgischen Abteilung des Sankt Josef-Hospital Xanten (N = 24) rekrutiert. Eine zweite Gruppe der Kontrollpersonen wurde durch Patienten rekrutiert, die regelmäßig die ambulante Beratung für Bluthochdruck-Behandlung im Universitätsklinikum in Halle (Klinik für Innere Medizin II – Leitung Prof. Dr. med. M. Girndt) aufsuchten (N = 8).

Folgende Ein- und Ausschlusskriterien waren für eine Teilnahme an der Studie ausschlaggebend.

Einschlusskriterien:

- Alter  $\geq$  18 Jahre
- Einwilligung nach Aufklärung
- Beide Geschlechter
- Chronische Niereninsuffizienz Grad 5 (GFR unter 15 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>) mit Hämö- oder Peritonealdialyse
- Renale Ersatztherapie für mindestens 2 Monate vor Beginn des Studieneinschlusses

Ausschlusskriterien:

- Systemisch relevante immunsuppressive Therapie
- Aktive Tumorerkrankung
- Temporärer oder permanenter Zentraler Venenkatheter, welcher die Karotis-Sonografie verhindert
- Vorangegangene Operation oder Stent Implantation an den Aa. Carotides communes
- CRP > 40mg/ml für Dialysepatienten und CRP > 10 mg/ml für Kontrollpersonen

Insgesamt nahmen 60 Patienten im Rahmen einer Querschnittsanalyse teil. Alle teilnehmenden Probanden wurden mit freundlicher Unterstützung des Teams des KfH rekrutiert; sowohl die klinischen als auch die experimentellen Untersuchungen wurden selbstständig durchgeführt.

Der klinische Anamnesebogen wurde zusammen mit Prof. Dr. med. Matthias Girndt erstellt. Die Studie wurde nach der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Eine Einverständniserklärung liegt von allen Studienteilnehmern vor. Die Untersuchung ist durch die Ethikkommission der Universitätsklinik Halle bestätigt worden.

### **3.2.2 Studienablauf**

Nach einer ausführlichen Aufklärung durch mich als Autor dieser Arbeit und einen Oberarzt der Klinik für Innere Medizin II der Universitätsklinik Halle wurden bei Einverständnis der Patienten verschiedene Blutproben unter standardisierten Bedingungen abgenommen. Zwei 4,5 ml-Lithium-Heparin-Gel-Monovetten® wurden zur Bestimmung der Lp-PLA2 Plasmakonzentration und zur Bestimmung der Monozyten Subpopulationen benötigt. Eine Monovette 2,7 ml EDTA diente der Anfertigung eines klinischen Routine-Labors (u.a. Plasma Glucose, Kreatinin, Gesamtcholesterin, Triglyzeride, HDL, LDL, CRP); ein PAXgene RNA Tube wurde zur Isolierung und Stabilisierung der Gesamt-RNA aus dem Vollblut verwendet.

Das Blut wurde am Morgen vor der Dialyse entnommen und gekühlt in das Labor der Klinik für Innere Medizin II - Nephrologie transportiert. Zwischen Abnahme und Weiterverarbeitung bzw. Analyse vergingen nicht mehr als 2 Stunden.

### **3.2.3 Erhebung mittels Fragebogen**

Zur Erhebung von Patientencharakteristika, die im Zusammenhang mit Artherosklerose, Angina pectoris sowie peripher arterieller Verschlusskrankheit von Bedeutung sind, wurde ein standardisierter Fragebogen (siehe Anhang) verwendet. Es wurden folgende Punkte als typische Anamnese für kardiovaskuläre Erkrankungen dokumentiert: Rauchgewohnheiten, Schlaganfall oder Herzinfarkt bei erstgradig Verwandten vor dem 60. Lebensjahr, Vorhandensein und Medikation eines Diabetes mellitus, Sportgewohnheiten, beim Patienten abgelaufene Herzinfarkte, Schlaganfälle, Operationen im Zusammenhang mit arteriellen Verschlusskrankheiten, Alltagseinschränkung durch Luftnot (NYHA Klassifikation, I-IV), Alltagseinschränkung durch Brustschmerz (CCS Klassifikation, I-IV) sowie eine Alltagseinschränkung durch belastungsabhängige Schmerzen in den Unterschenkeln (pAVK Klassifikation, I-III). Relevante Vorerkrankungen und Medikationen wurden, soweit die Voraussetzungen gegeben waren, ärztlichen Berichten und der Dokumentation entnommen. Als aktive Raucher wurden alle Patienten verifiziert, die mindestens eine Zigarette am Tag geraucht haben.

### **3.2.4 Erhebung klinischer Parameter**

Größe, Gewicht sowie der errechnete BMI wurden aus der Dokumentation des KfH entnommen (Daten nie älter als 2 Wochen). Patienten, die selbst angaben, an Diabetes Mellitus zu leiden, die einen nicht-nüchternen BZ von  $> 200$  mg/dl, einen Nüchtern-BZ von  $>126$  mg/dl oder eine BZ-senkende Medikation erhielten, wurden als Diabetiker kategorisiert. Der systolische und diastolische Blutdruck (BP) wurde in Rückenlage nach 5 Minuten Ruhe am linken und rechten Arm gemessen. Der mittlere arterielle Blutdruck wurde in dieser Arbeit wie folgt definiert: (Mittlerer diastolischer/systolischer Blutdruck:  $\text{diastolischer/systolischer RR rechter Arm} + \text{diastolischer/systolischer RR linker Arm} / 2$ ).

Des Weiteren wurde in einer weiteren Untersuchung der Blutdruck der Patienten an beiden Armen sowie mittels Dopplersonographie an beiden Beinen bestimmt, um mit diesen Werten den TBQ (Tibio-brachialer-Quotient) zu errechnen. Vor der Blutdruckmessung lagen die Patienten mindestens 10 Minuten in waagerechter Position.

### **3.2.5 Labordiagnostik**

Neben der speziellen Labordiagnostik wie Monozytenfärbung und RNA-Analyse wurden mittels Standardverfahren einige Routineparameter im Zentrallabor des UKH (Akademische Leitung: OÄ Dr. med. B. Ludwig-Kraus) bestimmt.

Zu dieser Laboranalyse zählen: Differential- Blutbild, Triglyzeride, Gesamtcholesterin, LDL-Cholesterin, HDL-Cholesterin, CRP, Albumin, Gesamt-Eiweiß, Glukose, HbA1c, Kreatinin, Hämoglobin, Phosphat, Elektrolyte (Calcium, Natrium, Kalium u.a.).

Diese Laborparameter wurden sowohl bei dem Patientenkollektiv als auch bei den Kontrollpatienten untersucht.

### 3.2.6 Nachweis der Atherosklerose

Die Sonografie der Aa. Carotides communes wurde bei jeder teilnehmenden Person in engem zeitlichen Rahmen zur Blutuntersuchung durchgeführt (nicht mehr als eine Woche Differenz).

Es wurden beide Halsschlagadern mit folgendem Gerät untersucht: 7,5-MHz-Linearsonde (Toshiba Nemio SSA-550A) im Carotiden-Programm.

Zur Beurteilung der Plaquebildung wurde die A. carotis communis zunächst im Querschnittsbild dargestellt; unter langsamer Kranialisierung des Schallkopfes wurde die Bifurkation der Arterie aufgesucht. In gleicher Weise wurde auf jeder Seite im Längsschnitt verfahren.

Die Intima-Media-Dicke (IMT) der A. carotis communis wurde anhand von hochauflösenden 2-dimensionalen B-Mode-Ultraschallbildern durch das oben genannte Ultraschallgerät im Carotiden-Programm gemessen. Die Patienten befanden sich in Rückenlage, der Kopf wurde leicht überstreckt und in die entgegengesetzte Richtung gedreht. Der distale Anteil der A. carotis communis und der Bulbus wurden durch Längs-Scan identifiziert. Die IMT ist als Abstand zwischen der Vorderkante der Lumen-Schnittstelle und der Media - Adventitia Schnittstelle der Hinterwand definiert worden.

Drei repräsentative IMT Messungen wurden jeweils auf der linken und rechten Seite in der hinteren Wand der Arteria carotis communis durchgeführt. Diese sechs IMT Messwerte wurden gemittelt.

Die Stenosierung des Bulbus der A. carotis communis sowie die Wandbeschaffenheit mit Plaqueeinlagerungen wurde zusammen mit Prof. Dr. med. Matthias Girndt durch folgenden Score beurteilt:

#### Atherosklerose-Score Carotiden

	rechts	links
• ACC glattwandig	0	0
• ACC vereinzelte Plaques <25%	1	1
• ACC viele Plaques > 25%	2	2
• Bulbus plaquefrei oder < 1/4 Zirkumferenz	0	0

- |                                       |   |   |
|---------------------------------------|---|---|
| • Bulbus 1/4 bis 1/2 der Zirkumferenz | 1 | 1 |
| • Bulbus > 1/2 der Zirkumferenz       | 2 | 2 |
- 
- Score von 0-8 Punkten

Insgesamt wurde die Stenosierung des Bulbus an insgesamt vier Ultraschallbildern begutachtet. Von jeder Arterie wurden sowohl ein Querschnitt- als auch ein Längsschnittbild angefertigt. Durch das Zusammenzählen der Punkte (s.o.) erhielt jeder Patient einen individuellen Gesamtscore, der zur Beurteilung des Atherosklerose - Grades herangezogen wurde.

Es konnte durch diese Punktevergabe ein maximaler Score von 8 Punkten erreicht werden. Als relevante Atherosklerose („Athero-positiv“ =A+) wurde ein Punktescore von  $\geq 4$  definiert.

### 3.3 Immunologisch-experimenteller Teil

#### 3.3.1 Immunphänotypisierung der Monozytensubpopulationen mittels Durchflusszytometrie

Die Unterscheidung von verschiedenen Zellarten des peripheren Blutes kann durch Größe, Granularität und anhand von Oberflächenmerkmalen (antigenen Strukturen) stattfinden.

Die antigenen Oberflächeneigenschaften werden mittels einer internationalen Klassifikation (Cluster of Differentiation - CD) eingeteilt. Es ist möglich, durch Bindung von fluorchromkonjugierten Antikörpern an die CD diese im Durchflusszytometer nachzuweisen und auf diese Weise Zellgruppen zu unterteilen.

Das Vollblut der Patienten wurde in Vorbereitung auf die Durchflusszytometrie mit einer bestimmten Antikörpermixtur behandelt. Auf diese Weise wurden die verschiedenen Zellgruppen des menschlichen Blutes durch Antikörper markiert, und die relevante Population der Monozyten konnte identifiziert werden. Die Gesamtheit der Monozyten wurde durch Markierung von CD45, einem membranständigen Protein mit intrazellulärer Tyrosin-Phosphatase-Aktivität, gefärbt (panmonozytärer Antikörper) und sowohl durch diesen Marker als auch durch die Identifikation der Größe und Granularität der Zellen mittels durchflusszytometrischer Analyse definiert. Die Population der Granulozyten wurde durch die Markierung mit einem Antikörper gegen CD15 (3-fucosyl-N-acetyl-lactosamine) definiert und exkludiert. Innerhalb dieser Gruppe von monozytären Zellen kann eine weitere Unterteilung in Subpopulationen stattfinden. Durch die Markierung von HLA-DR wurden alle für diesen Marker positiven Monozyten separiert. In umfangreichen Studien konnte gezeigt werden, dass die Expressionsdichte des HLA-DR auf den Monozyten ein sehr guter Surrogatmarker für die Fähigkeit der Monozyten ist, nach einer Stimulation (z.B. mit LPS) mit der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (Z.B. TNF alpha, IL-1, IL-6, IL-8 etc.) zu reagieren. Die Markierung dieses Markers ist natürlich sehr interessant im Hinblick auf die proinflammatorischen Eigenschaften der Monozyten. Durch

die Expressionsdichte der antigenen Oberflächenstrukturen CD14 (LPS-Rezeptor) und CD16 (FcγIII-Rezeptors) konnten drei Untergruppen der Monozyten unterschieden werden (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> = Mo1, CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> = Mo2, CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> = Mo3).

Bei den fluorkonjugierten Antikörpern, die zur Analyse der Zellreihen verwendet wurden, handelt es sich um murine Antikörper gegen humane antigene Strukturen. Die Tabelle 2 zeigt eine Zusammenfassung der in der Durchflusszytometrie verwendeten Antikörper.

Für die durchflusszytometrische Untersuchung von Oberflächenmerkmalen der gesamten Monozyten-Population wurde in der durchgeführten Untersuchung die Oberflächenfärbung aus Vollblut mit einer Lyse der Erythrozyten sowie Fixierung der Leukozyten verwendet. Diese Methode mit dem nachfolgend beschriebenen Protokoll hat sich als Standardverfahren im nephrologischen Labor des UKH (Leitung: Dr. Christof Ulrich) durchgesetzt.

Es wurden 100 µl EDTA-Vollblut des Patienten abpipettiert und in einem Polypropylen-Röhrchen 2 ml MACS<sup>®</sup>-Puffer (siehe Tabelle 11) hinzugegeben. Nach Durchmischung mit einem Vortex-Mixer wurde die Zellsuspension 5 Min. bei 300 g\* zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Nach dem zweiten Waschgang wurde das Zellpellet in 50 µl FcR-Block (siehe Tabelle 11, bestehend aus 46 µl MACS<sup>®</sup>-Puffer und 4 µl FcR-Block) aufgenommen und erneut mit dem Vortex-Mixer durchmischt. Durch den FcR-Block wurde eine ungewollte Bindung von Antikörpern an humanen FcR-Rezeptoren verhindert. Nach 10 Min. Wartezeit bei Raumtemperatur wurde der in Tabelle 2 angegebene Mix aus Antikörpern hinzugegeben, durch den Vortex-Mixer vermischt und 20 Min. bei 4°C in Dunkelheit inkubiert.

Nach der Inkubation wurden 2 ml BD-Lyse-Lösung (siehe Tabelle 10 + 11) zu dem Mix hinzugegeben. Wichtig ist, hierbei auf gute Durchmischung mittels Vortex-Mixer zu achten. Durch die Lysing-Solution wurde die Färbereaktion gestoppt und die Lyse der Erythrozyten eingeleitet, die nach weiteren 15 Minuten Inkubation in Dunkelheit bei Raumtemperatur abgeschlossen war. Nach erneuter Zentrifugation (5 Min. bei 300 g\*) wurde der Überstand abgegossen und wie oben beschrieben zweimal mit 2 ml MACS<sup>®</sup>-Puffer gewaschen. Das Pellet wurde nach dem zweiten Waschgang in 400 µl MACS<sup>®</sup>-Puffer aufgenommen und ohne Zeitverzug durchflusszytometrisch gemessen.

**Tabelle 2:** Verwendete Antikörpermixtur in der Vollblutfärbung (Hersteller und Klon siehe Tabelle 9)

<u>Substanz</u>	<u>Menge</u>
Anti-CD14 PeCy7	1,5 µl
Anti-CD16 APC	1,0 µl
Anti-CD15 eFluor450	2,0 µl
Anti-CD45 APC-Vio770	5,0 µl
Anti-HLA-DR PerCP	8,0 µl
	je 27,5 µl

### 3.3.2 Durchflusszytometrische Analyse

Die durchflusszytometrische Analyse ist ein Verfahren, das der schnellen und einfachen Zählung und Charakterisierung von verschiedenen Zellarten dient. Es funktioniert durch die Aussendung von Lichtsignalen. Als Synonym für die Durchflusszytometrie wird FACS® (Fluorescence activated cell sorting), ein durch die Firma BD Biosciences Heidelberg geschützter Begriff, verwendet.

Die Zellen, die sich in Suspension befanden, wurden einzeln in eine Kapillare gesaugt und passierten dort an einem Sensormodul einen Laserstrahl. Diese Bestrahlung der Zellen durch das Laserlicht verursacht auf der einen Seite die Emission von Streulicht, welches abhängig ist von der Größe, der Granularität und der Oberfläche der Zellen, auf der anderen Seite kommt es bei Bindung von fluorchromkonjugierten Antikörpern zur Aussendung von Fluoreszenzsignalen, anhand derer man auf spezifische Oberflächenmerkmale der Zelle schließen kann.

In der Beurteilung des emittierten Streulichtes unterscheidet man Vorwärts- (FSC) von Seitwärtsstreulicht (SSC). Das FSC entsteht durch eine Beugung des Lichts und weist auf die relative Größe einer Zelle hin. Das SSC hat seinen Ursprung in der Brechung des auf die Zelle gerichteten Lichts und ist ein Maß für die relative Granularität und die komplexen intrazellulären Bestandteile der Zelle (Zellkern, Ribosomen). Durch die Analyse dieser Merkmale der Zellen kann diese bereits grob zu einer der verschiedenen leukozytären Bestandteile des peripheren Blutes (z.B. Lymphozyten, Granulozyten oder Monozyten) zugeordnet werden. Eine genaue Zuordnung der Zellen (in unserer Untersuchung v.a. die der Monozyten) zu den einzelnen Zellpopulationen erfolgt durch die emittierten Fluoreszenzmerkmale, die auf die gebundenen fluorchromkonjugierten Antikörper hinweisen, welche gegen Oberflächenantigene auf den Zellen gerichtet sind. Die Charakterisierung des Oberflächenmarkers erfolgt auf der einen Seite durch den Anteil der für diesen Marker positiven Zellen (sog. spezifische Fluoreszenz), auf der anderen Seite ist die Expressionsdichte und damit auch die Dichte der

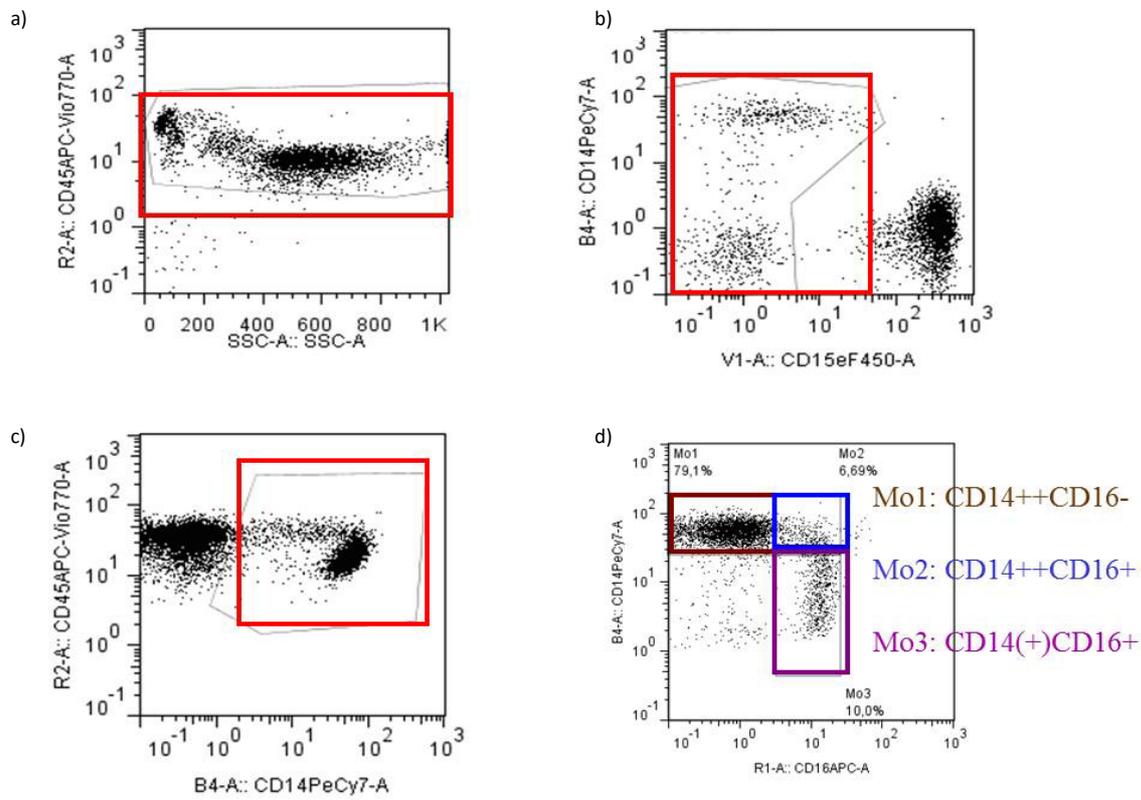
gebundenen Antikörper auf jeder einzelnen Zelle entscheidend (relative Fluoreszenz). Bei der Durchflusszytometrie können verschiedene Laser mit unterschiedlichen Anregungswellenlängen verwendet werden, um die Breite der anwendbaren Fluorochrome zu erhöhen und damit die Informationsdichte zu verbessern.

In dieser Studie wurde für die dargestellte FACS Analyse ein Gerät mit drei Laserquellen sowie neun optischen Kanälen der Firma Miltenyi Biotec eingesetzt (MACSQuant<sup>®</sup> Analysator, Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, D). Im Folgenden ist aufgezeigt, wie die Ergebnisse der FACS<sup>®</sup>-Analyse dargestellt werden. In einem Dotplot steht jeder Punkt für eine gemessene Zelle, aufgetrennt nach der Expression eines Oberflächenantigens (in diesem Falle von CD14 und CD16) oder nach allgemeineren Merkmalen wie Größe und Granularität.

In einem ersten Schritt wurden Leukozyten über CD45 detektiert. Anschließend wurden die Granulozyten in einem CD14 versus CD15 Dotplot exkludiert. Die Gesamtheit der Monozyten wurde als CD14 und HLA-DR positiv definiert. Eine weitere Aufteilung der Monozyten konnte nun erfolgen, indem die definierte Gesamtheit der ausgewählten Zellen in einem dritten Dotplot dargestellt wird. In diesem wird die Expressionsdichte von CD14 auf der Ordinate gegen CD16 auf der Abzisse aufgetragen. Nun zeigt sich die Population der Monozyten nicht mehr als homogene Punktwolke, sondern es kommt eine Heterogenität zum Vorschein, die eine weitere Unterteilung der Monozyten in Subpopulationen erlaubt.

Mit Hilfe der Gatingstrategie wurden in dieser Arbeit drei Subpopulationen unterschieden:

- Hohe CD14 Expression, geringe CD16 Expression = CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> Monozyten (Mo1)
- Hohe CD14 Expression, hohe CD16 Expression = CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten (Mo2)
- Niedrige CD14 Expression, hohe CD16 Expression = CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> Monozyten (Mo3)



**Abbildung 1:** Gatingstrategie - nach CD14 und CD16 Expression aufgetrennt dargestellt; Jeder Punkt entspricht einem Monozyten; a) CD45-positive Leukozyten; b) CD15-negative Leukozyten; c) HLA-DR-positive Monozyten; d) Monozytensubgruppen

### 3.3.3 Isolation von Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten

Zur Isolation von Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten wurde EDTA-antikoaguliertes Blut (9ml) mittels Dichtezentrifugationsgradienten (Ficol, 1,07, PAA) aufgetrennt. Der in Lymphozyten und Monozyten enthaltene PBL-Ring wurde entnommen und bis zur Weiterverarbeitung bei 4°C gelagert.

Die Gesamtmonozyten wurden mit Hilfe des Pan Monocyte Isolation Kit (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, D) und dem Gerät autoMACS Separator® (Miltenyi Biotec) als Negativfraktion („untouched“) isoliert.

Zunächst wurde allen teilnehmenden Probanden, wie oben beschrieben, EDTA-antikoaguliertes Blut (9ml) abgenommen. Eine Zentrifugation der Zellsuspension bei 300 g\* wurde für 10 Minuten durchgeführt. Der Überstand wurde vollständig aspiriert und das Zellpellet in 30 µl Puffer pro 10<sup>7</sup> Zellen resuspendiert. Anschließend wurden 10 µl FcR-Blocking-Reagenz sowie 10 µl Biotin-Antikörper-Cocktail pro 10<sup>7</sup> Zellen hinzugegeben. Nach Durchmischung der Proben wurden diese 5 Minuten lang bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Anschließend wurden 30 µl Puffer und daraufhin 20 µl Anti-Biotin-Mikrobeads pro 10<sup>7</sup> Zellen

hinzugefügt. Nach einer erneuten Durchmischung lagerten die Proben erneut für 10 Minuten bei 4 °C im Kühlschrank. Es wurden anschließend bis zu  $10^8$  Zellen in 500 µl Puffer resuspendiert und anschließend die Monozyten „untouched“ als Negativfraktion isoliert sowie die Lymphozyten als Positivfraktion gelabelt.

Als Programm für den Zellseparator wurde das „Posseld – Programm“ verwendet. Bei dem Pan Monocyte Isolation Kit handelt es sich um ein indirektes magnetisches Labeling - System zur Isolierung von Monozyten aus menschlichem PBMCs. Nicht-Monozyten, wie T-Zellen, NK-Zellen, B-Zellen, dendritische Zellen und Basophile Granulozyten wurden mit einem Cocktail aus Biotin-konjugierten Antikörpern und Anti-Biotin Micro-Kügelchen indirekt magnetisch markiert. Die in der positiven Fraktion befindlichen T-, B-, und NK-Zellen sowie minimale Verunreinigungen mit Erythrozyten und Granulozyten wurden als Lymphozytenfraktion bezeichnet. Nach der beschriebenen Isolierung der jeweiligen Zellen wurde die RNA-Isolation innerhalb der Monozyten-, Lymphozyten- und Granulozytenfraktion durchgeführt.

Die über der Erythrozytenschicht befindlichen Granulozyten wurden vorsichtig in ein 50er Falcon-Röhrchen überführt, die restlichen Erythrozyten durch 30 Sekunden dauernde Aqua dest. Inkubation lysiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1,8% NaCl-Lösung abgestoppt. Nach Pelletieren der Zellen (300 g, 5min, 4°C) wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 30 ml PBS/EDTA gewaschen. Die Zellen wurden in 1ml 0,2% HSA-Lösung suspendiert und anschließend die RNA-Isolation mittels ZR RNA MiniPrep Kit (Zymo Research, Freiburg, D) durchgeführt.

Zur RNA-Isolation mittels ZR RNA MiniPrep Kit wurde das Leukozytenpellet in 400 µl RNA Lysis Puffer suspendiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 12000 g\*. Dann wurde das Lysat in ein „Zymo-Spin™ IIC Column“ (siehe Tabelle 8) überführt und bei 8000 g\* zentrifugiert. Der Durchfluss wurde mit 800 µl 100% Ethanol gefällt. Anschließend wurde das Lysat gevortext und 600 µl des Mixes in ein „Zymo-Spin™ IIC Column“ (siehe Tabelle 8) überführt. Der Vorgang wurde mit den verbliebenen 600 µl wiederholt. Nach Zentrifugation bei 12000 g\* wurde der Durchfluss verworfen und 400 µl RNA Prep Puffer (siehe Tabelle 11) in das IIC Column gegeben. Wiederum wurde das Lysat bei 12000 g\* zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Es folgten 2 Waschschrte mit 800 µl RNA bzw. 400 µl RNA Wasch Puffer (siehe Tabelle 11) bei 12000 g\* für 30 Sekunden. Zur kompletten Trockenlegung der Matrix wurde anschließend bei 12000 g\* für 2 Min. zentrifugiert. Das IIC Column wurde in ein RNA / DNase freies Tube platziert und  $\geq 25$  µl DNA / RNase freies Wasser direkt auf die Column Membran gegeben. Durch Zentrifugation bei 10000 g\* für 30 Sekunden wurde die RNA aus dem Column eluiert und entweder direkt verwertet oder bei  $\leq -70^\circ\text{C}$  gelagert. Die Bestimmung der mRNA-Expression in den einzelnen Zellgruppen erfolgte exakt wie bei der Quantifizierung der Gesamt-leukozytären-RNA mittels quantitativer (Real-time) PCR, die im Folgenden beschrieben wird.

#### **3.3.4 Stabilisierung und Isolierung von Gesamt RNA**

Den Patienten der Studie wurde für die Isolierung der RNA aus den Zellen Blut mit einem PAXgene Blood RNA Röhrchen (PreAnalytiX®, Qiagen/BD, Hombrechtikon, Switzerland) abgenommen. Das PAXgene Blood RNA

System ist ein System zur Stabilisierung und Isolierung der Gesamt-RNA aus Vollblut. Die Röhrchen enthalten ein Additiv, welches die zelluläre RNA stabilisiert und auf diese Weise die Genexpressionsanalyse ermöglicht. Da die RNA bereits während der Blutentnahme stabilisiert wird, werden sekundäre Effekte, wie bspw. die Induktion von Stressgenen oder RNA-Degradationen, minimiert. Die Patientenproben wurden 2 h bei Raumtemperatur gelagert, um eine zuverlässige Lysis der Blutzellen zu gewährleisten. Nach dieser Zeit wurden die Röhrchen zunächst bei -20 °C für zwei Tage eingefroren. Die endgültige Lagerung bis zur weiteren Verarbeitung der Proben fand bei -80 °C statt. Mithilfe der Real-time quantitativen PCR, die im Folgenden näher erläutert wird, sollte die Expression der Gene für Lp-PLA2 und ACE auf leukozytärer Ebene gemessen werden.

Die Proben wurden schonend über mehrere Stunden aufgetaut. Der nächste Schritt der Weiterverarbeitung war eine Zentrifugation der Tubes für 10 Min. bei 2443 g\*. Der Überstand der Proben wurde dekantiert und 4 ml RNase freies Wasser zum Pellet hinzu-gegeben. Nach sorgfältiger Durchmischung mittels Vortex-Mixer erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 2443 g\* mit nachfolgender möglichst vollständiger Dekantierung des Überstandes. Im nächsten Schritt wurden 350 µl „resuspensions buffer“ (BR1, siehe Tabelle 11) zum Pellet gegeben und dieses durch Durchmischung mittels Vortex-Mixer gelöst. Nach Überführung in ein 1,5 ml Eppendorftube (MCT) wurde 300 µl „binding buffer“ (BR2, siehe Tabelle 11) und 40 µl Proteinase K (PK) in das Tube gegeben. Die Durchmischung erfolgte erneut durch den Vortex-Mixer. Für 10 Min. wurde das Gemisch im Thermo Schüttler (siehe Tabelle 8) bei 1000 rpm inkubiert. Im Folgenden wurde bei 12000 g\* für 3 Min. zentrifugiert und die Flüssigkeit ohne Pellet und möglichst vollständig in ein neues 1,5 ml MCT positioniert. Die Zugabe von 350 µl EtOH (Ethanol rein) war der nächste Schritt des Protokolls, gefolgt von einer Durchmischung durch den Vortex-Mixer und kurzer Zentrifugation bei 500-1000 g\*. 700 µl des Gesamtvolumens wurden in ein „PAXgene RNA spin column“ (PRC) pipettiert und für 1 Min. bei 12000 g\* zentrifugiert. Der Überstand aus dem PT wurde verworfen und das PRC in ein neues PT gestellt. Die restliche Flüssigkeit des Gesamtvolumens wurde auf das PRC gegeben und für 1 Minute bei 12000 g\* zentrifugiert. Der Überstand des 2,0 ml PT wurde verworfen und das PRC in ein neues PT gestellt. Es folgt ein erneuter Waschschriff durch Zugabe von 350 µl „wash buffer 1“ (BR3, siehe Tabelle 11) in das PRC, anschließender Zentrifugation und Verwerfung des Überstandes aus dem PT. Das PRC wurde in ein neues PT gestellt. In einem 1,5 ml MCT wurden 10 µl „DNAse I stock solution“ (siehe Tabelle 11) und 70 µl „DNA digestion buffer“ (RDD) gemischt (DNA-Inkubationsmix). Der DNA- Inkubationsmix (80 µl) wurde direkt auf das PRC gegeben und für 15 Min. bei RT inkubiert. Es folgen drei Waschschriffe zunächst durch Zugabe von 350 µl BR3 und folgend zweimal 500 µl „wash buffer 2“ (BR4, Tabelle 11) mit jeweils anschließender Zentrifugation bei 12000 g\* für 1 Min. Nach den beiden Waschschriffen mit BR4 wurde der Überstand aus dem 2,0 ml PT verworfen und das PRC in ein neues PT gestellt. Nach einem erneuten Zentrifugationsschriff für 1 Min. bei 12000 g\* und Verwerfung des Überstandes im PT wurde das PRC in ein 1,5 ml MCT gestellt und 40 µl „elution buffer“ (BR5, Tabelle 11) auf die Membran gegeben. Der nächste Zentrifugationsschriff bei 12000 g\* für 1 Min. diente der Eluierung der RNA. Der zuletzt beschriebene Schriff wurde nochmals durchgeführt (Zugabe von 40 µl BR5 und nachfolgender Zentrifugation). Die Eluate wurden für

5 Min. bei 65 °C im Thermo Schüttler, ohne Schütteln der Tubes, inkubiert. Die Proben wurden anschließend bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert bzw., wenn diese nicht am gleichen Tag stattfand, bei -70 °C eingefroren. Die RNA-Konzentration und Qualität ( 260/280 Verhältnis:  $2,05 \pm 0,005$  ) wurde von Nanodrop - Technik (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen , Deutschland) getestet. Diese Qualitätstestung beschreibt, ob die gewonnene Probanden-RNA noch stark mit Proteinen verunreinigt ist oder, wie in unserem Falle wenig Verunreinigungen enthält. Es wurden exakt gleiche Mengen der RNA (500 ng) mit der „QuantiTect Reverse-Transkription-Kit“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) revers transkribiert.

### **3.3.5 Hintergrund der Reversen Transkriptase - quantitativen (Real-time) PCR (RT-qPCR) – Quantifizierung der Lp-PLA2-Expression**

Die RT-qPCR wurde zur Quantifizierung der Gen-Transkripte aus dem Vollblut der Patienten eingesetzt. Die RT-qPCR stellt eine moderne Methode der Quantifizierung von Nucleinsäuren dar und beruht auf dem Prinzip der klassischen Polymerasekettenreaktion (PCR) sowie einer zusätzlichen Quantifizierung der aus der RNA transkribierten DNA (mittels reverser Transkriptase). Die Standard – PCR besteht aus einem Denaturierungsschritt, einem Annealingschritt sowie einem Elongationsschritt bzw., wie in unserem Fall, aus einem kombinierten Annealing-/Elongationsschritt bei 60°C. In unserer Studie musste zunächst aus der isolierten RNA mit Hilfe thermostabiler DNA- Polymerasen mit Reverser-Transkriptase-Aktivität cDNA gewonnen werden.

Im Denaturierungsschritt wurden bei 95 °C die cDNA Stränge getrennt, so dass es nach Absenkung der Temperatur auf 60 °C zur Hybridisierung der im Überschuss hinzugegebenen Oligonucleotidprimer (Primer für den codierenden Genabschnitt für die LP-PLA2 bzw. die ACE) kam. Die Temperatur wurde anschließend auf das Optimum für die Taq-Polymerase (thermostabile Polymerase) erhöht, welche damit begann, die Primer und damit den gewünschten Genabschnitt zu verlängern, bis wieder eine doppelsträngige DNA vorlag. Dieser DNA Abschnitt entsprach exakt der ursprünglichen Template-DNA. Da die Komplementierung an beiden Strängen der Ausgangs-cDNA ablief, erhielt man im ersten Elongationsschritt die doppelte Menge Template – dann, nach Wiederholung des Zyklus, die vierfache Menge usw..

Die Besonderheit der RT-qPCR besteht nun in einer Quantifizierung durch Messung von Fluoreszenz-Signalen, die während des PCR- Zyklus emittiert und erfasst werden (Real-time). Die Quantifizierung erfolgt also während der PCR – Zyklen und nicht, wie bei anderen quantitativen PCR-Methoden, erst nach Ablauf der PCR. Durch die gemessenen Fluoreszenzsignale am Ende eines Laufes kann auf die Quantifizierung der Genprodukte in der exponentiellen Phase der PCR geschlossen werden. Für die RT-qPCR wurden sog. FRET Sonden (TaqMan Sonden) eingesetzt. FRET steht für „Fluoreszenz resonance energy transfer“ und bedeutet, dass ein Donor-Fluorochrom (Reporter) einen Teil der absorbierten Energie an ein Akzeptor-Fluorochrom (im Zusammenhang mit TaqMan Sonden auch als dark Quencher bezeichnet) abgibt. Die Energie erhalten die Sonden, die sich für die Übertragung der Energie in genügender Nähe zueinander befinden müssen, über eine Lichtquelle. Die

TaqMan Sonde besitzt also an einem Ende einen Quencher-, am anderen Ende einen Reporter-Fluoreszenzfarbstoff. Die Taq-Polymerase beinhaltet neben ihrer Polymerase-Aktivität zusätzlich eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität. Diese sorgt während der Synthese des Gegenstranges dafür, dass die TaqMan Sonde abgebaut wird und sich dadurch Reporter und Quencher voneinander entfernen. Das Donor-Fluorochrom gibt nun weniger Energie an den Quencher ab, so dass eine ansteigende Reporter-Fluoreszenz am Ende jedes Zyklus gemessen werden kann. Die verwendeten TaqMan-Sonden sind in Tabelle 12 aufgeführt.

### 3.3.6 Beschreibung der cDNA-Synthese

500 ng RNA wurden von jedem Probanden mittels „Quantitect Reverse Transcription Kit“ (Qiagen, Hilden, D) umgeschrieben. Zunächst wurde 2x der Ansatz des Reverse Transkriptase Master Mixes wie folgt bereitgestellt:

Tabelle 3: Zusammensetzung des RT Master Mixes

		<b>MIX</b>
<b>Faktor</b>		9.9
10x RT - Puffer	2,0 µl	19.8
25x dNTP Mix	0.8 µl	7.92
10x RT Random Primers	2,0 µl	19.8
MultiScribe™ RT	0,5 µl	4.95
Nuklease freies H <sub>2</sub> O	4,7 µl	46.53
Gesamt Volumen	<b>10,0 µl</b>	

Um die Reverse-Transkriptase-Reaktion zur Bereitstellung der cDNA zu starten, wurde eine „96-Well-Reaktions-Platte“ zunächst mit 10 µL des RT Master Mixes befüllt. Anschließend wurde in jedes befüllte „Well“ (englisch für Vertiefung) 10 µL der jeweiligen RNA-Probe zusammen mit Nuklease freiem H<sub>2</sub>O eines Probanden pipettiert und die Flüssigkeiten durch zweimaliges Auf- und Abpipettieren vermischt. In der folgenden Tabelle (siehe Tabelle 4) ist ein Beispiel für die Befüllung der Wells auf der Reaktions-Platte dargestellt.

**Tabelle 4:** Beispiel für die Befüllung der „Wells“ auf der Reaktionsplatte

Probanden - NR: z.B		1	2
RNA Menge		500ng	500ng
<b>2x RT Master Mix</b>	10 µl	10	10
TemRNAplate (RNA)	µl	2.63	2.76
Nuklease freies H <sub>2</sub> O	µl	7.37	7.24
Gesamt	<b>20µl</b>		

Nach Verschluss der Reaktions-Platte wurde diese mit niedriger Geschwindigkeit zentrifugiert, um den Inhalt an den Boden der Platten-Vertiefungen zu befördern sowie evtl. vorhandene Luftblasen zu eliminieren. Die Platte mit den Proben wurde auf Eis gelagert, bis der Thermocycler (Tabelle 8) zum Beladen bereit war. Die Einstellungen am Thermocycler wurden auf das entsprechende Volumen von 20 µL eingestellt und der Cycler mit der Reaktions-Platte beladen. Nachdem der Reverse Transkriptase Lauf gestartet war, wurden folgende Schritte durchlaufen und anschließend die Proben bei -20 °C gelagert.

**Tabelle 5:** Darstellung der Zeit und Temperatur der einzelnen Schritte, die im Thermocycler durchlaufen wurden

	1.Schritt	2. Schritt	3. Schritt	4. Schritt
Temperatur (°C)	25	37	85	4
Zeit (Minuten)	10	120	5	∞

### 3.3.7 Beschreibung der quantitativen PCR

Um die Ausbeute an cDNA aus der oben beschriebenen Reverse Transkriptase Reaktion der Gesamt-RNA zu bestimmen, wurde die quantitative PCR angewendet. Es sollten die verschiedenen eingebrachten RNA-Proben im Hinblick auf die cDNA Ausbeute der beiden Zielgene untersucht werden (ACE und Lp-PLA2). Für die qPCR wurden folgende Gene verwendet: Lp-PLA2 (PLA2G7 (Hs099999903\_m1), ACE (Hs00174179\_m1) und Actin B als house-keeping-Gen (ACTB (Hs00965831\_m1)). Die mRNA-Expression der Zielgene (Lp-PLA2 (PLA2G7) und ACE) wurden durch den Gebrauch von TaqMan®-Sonden (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) analysiert. Die Proben wurden durch einen „StepOnePlus Cycler“ (Life Technologies, Darmstadt, D) verarbeitet.

Die Daten wurden auf die Donor- RNA gesunder Probanden bezogen und als x - facher Unterschied (RQ) ausgedrückt.

Als Einstellung an dem Cyclyer verwendete ich den Fast Modus (Aktivierung: 10 min bei 95°C / 40 Zyklen: 10 sec bei 95°C; 30 sec bei 60°C). Die Messungen wurden als Doppelwerte erfasst. Eine entsprechende Negativ-Kontrolle und eine interne Kontrolle (ICO) ist auf jeder „96-Well- Platte“ mitgeführt worden. Als Auswertungssoftware wurde die DataAssist™ Software Version 3.0 (Life Technologies) verwendet. Die Datenberechnung erfolgte erstens nach Normalisierung auf das House-keeping-Gen ( $dCt: Ct (Target) - Ct (house-keeping)$ ) und zweitens nach der Normalisierung auf die interne Kontrolle ( $2^{-dCt (Target)} / 2^{-dCt (ICO)}$ ).

### 10µl Ansatz:

**Tabelle 6:** Pipettieransatz für die qPCR

Gene von TaqMan		ACE	PLA2G7	ACTB
	<b>1x</b>			
TaqMan Fast Advanced MM (2x)	5,0µl	ACE (Hs00174179_m1)	Lp-PLA2 (Hs099999903_m1)	Actin B (Hs00965831_m1)
20xProbe Assay	0,5µl			
<b>cDNA</b>	<b>1,0µl</b>			
RNasefreies H2O	3,5µl			

### 3.3.8 Messung der LP-PLA2-Aktivität

Der Plättchenaktivierende Faktor (PAF) ist ein biologisch aktives Phospholipid, das von einer Vielzahl von Zellen produziert wird. Das Enzym PAF-Acetylhydrolase (Synonym für Lp-PLA2) spaltet PAF in das inaktive lyso-PAF. PAF-AH's findet man intra- (Cytosol) wie extrazellulär (Plasma). Plasma-PAF-AH ist selektiv für Phospholipide mit einer sehr kurzen Acyl-Gruppe an der sn-2-Position.

Die Lipoprotein-assoziierte-Phospholipase-A2-Aktivität wurde mittels ELISA, unter Verwendung des Cayman Chemical Company Assay-Kit (MI, USA) gemessen. Der Test benutzt 2-thio-PAF als Substrat. Nach Hydrolyse der Acetyl-Thioesterbindung an der sn-2-Position durch PAF-AH können frei werdende Thiole unter Verwendung von DTNB-Reagenz (Ellman's-Reagenz, 5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure)) nachgewiesen werden (Verwendete Reagenzien siehe Anhang Tabelle 10).

Aus einer 4,5 ml-Lithium-Heparin-Gel-Monovette®, die allen Teilnehmern dieser Studie abgenommen wurde, wurde durch Zentrifugation (1000 g\*) für 10 Min. bei 4 °C Plasma gewonnen. Die Lagerung erfolgte anschließend bei -80 °C. Die LP-PLA2-Aktivität im Plasma der Probanden bleibt so für mindestens 4 Wochen stabil. Da die Plasma LP-PLA2-Aktivität unter den beschriebenen Bedingungen normalerweise nur sehr gering ist, wurden die Proben aufkonzentriert. Dies ist durch Zentrifugation über „Amicon centrifuge concentrator“ mit einem MW cutoff von 30000 möglich.

Es wurden dazu 500 µl Plasma aufgetaut und davon ca. 300 µl in das Amicon Ultra Filter Röhrchen pipettiert. Anschließend wurde dieses Ultra Filter Röhrchen für 5 Min. bei 14000 g\* zentrifugiert und damit eine Aufkonzentrierung um das 12fache der anfänglichen Lp-PLA2-Aktivität erreicht. Anschließend wurde der Amicon Ultra Filter aus dem Tube genommen, umgedreht in ein frisches Eppendorf Gefäß gestellt und für weitere 2 Min. mit offenem Deckel bei 1000 g\* zentrifugiert. Das Gesamtvolumen im 96-Well-Format betrug 225 µl. Es war ratsam, für das Pipettieren von Substrat, DTNB und Proben verschiedene Pipetten zu benutzen. Die leere Kontrolle (ohne Enzym-Zusatz) wurde zu je 10µl DTNB + 15µl Assay-Puffer 1 in 2 Wells pipettiert. Ebenfalls in 2 Wells wurden die Positiv-Kontrollen (Humanes PAF-AH) zu je 10µl DTNB + 10µl PAF-AH + 5µl Assay-Puffer 1 pipettiert. Die Plasma Proben der teilnehmenden Probanden wurden in je ein Well des 96-Well-Formates pipettiert. Dazu wurden je 10 µl DTNB + 10µl aufkonzentrierte Probe + 5µl Assay-Puffer 1 in je ein Well der Platte gegeben. Zum Reaktionsstart wurde so schnell wie möglich je 200 µl Substratlösung pro Well (Benutzung einer 8-Kanal-Pipette) pipettiert. Die Platte wurde anschließend für 30 Sekunden gemischt und direkt im Anschluss die Absorption jede Minute bei 414 nm für 10 Minuten gemessen.

Die Berechnung der LP-PLA2-Aktivität erfolgte über folgende Formel:  $\Delta A_{414}/\text{min} = \frac{A_{414}(\text{Time2}) - A_{414}(\text{Time1})}{\text{Time2 (min)} - \text{Time1 (min)}}$ .

### 3.4 Statistische Methoden

Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± SD ausgedrückt, es sei denn, es wird etwas anderes angegeben. Alle kontinuierlichen Variablen wurden für die Normalverteilung mit dem Kolomogorov-Smirnov-Test analysiert. Nicht normalverteilte Parameter wie CRP und RQ Lp-PLA2 wurden logarithmisch umgewandelt  $[(\log\text{CRP})+1; (\log\text{RQ Lp-PLA2})+5]$ . Kategorische Variablen wurden als Prozentsatz ausgedrückt und durch den Chi-Quadrat-Test verglichen. Kontinuierliche Daten wurden gegebenenfalls durch einen Student's - t - Test oder Mann-Whitney-U-Test mittels One-way-ANOVA verglichen. Falls es angebracht war, wurden die Signifikanzen durch eine Post-hoc Analyse überprüft. Die Korrelationskoeffizienten wurden durch einen Spearman-Test berechnet. Eine lineare Regressionsanalyse wurde verwendet, um mögliche Beeinflussungen auf die Messungen der Lp-PLA2-Aktivität, der Lp-PLA2- und ACE-mRNA-Expressionsanalyse sowie der Monozytenmessungen zu überprüfen. So konnte eine Abhängigkeit, bzw. Unabhängigkeit der signifikanten Unterschiede bei den gemessenen Parametern, von möglichen Einflussfaktoren wie Alter, Geschlecht, LDL- und HbA1c-Wert, verifiziert werden. Als abhängige Variablen bei den linearen Regressionsanalysen wurden die Lp-PLA2-Aktivität,

die Lp-PLA2- und ACE-mRNA-Expression sowie die monozytären Subpopulationen festgelegt. Im Vergleich zwischen CKD-5D- und KO-Gruppe sollten Alter, geschlechtsspezifische Unterschiede und das LDL-Profil (unabhängige Variablen) adjustiert und die Unabhängigkeit der abhängigen Variable von diesen Werten nachgewiesen werden. Unter den Lipidparametern wurde LDL aufgrund seiner Funktion als Haupttransportträger von Lp-PLA2 ausgewählt. Um die geschlechtsspezifische Unterschiede in das Regressionsmodell einzubauen, wurde der Term auf folgende Weise konstruiert: Patienten Gruppe (CKD-D5=0; CO=1) \* Geschlecht (Männlich=0, weiblich=1) als unabhängige Variable. Im Vergleich innerhalb der CKD-5D-Gruppe, zwischen A+ und A- Patienten ist die Lp-PLA2-Aktivität als abhängige, das Alter und die HbA1c-Werte (einzigen signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen), als unabhängige Variablen adjustiert worden, um so die Unabhängigkeit der Lp-PLA2-Aktivität nachweisen zu können.

Alle Berechnungen wurden mit dem SPSS 21.0 (SPSS Inc., Chicago, USA), oder GraphPad Prism 6.0 Statistik-Software (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA) durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p < 0,05$  festgelegt.

### 3.5 Material

#### 3.5.1 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 7:** Verbrauchsmaterialien, die im Rahmen der Studien zum Einsatz kamen

0,5 ml Reaktionsgefäße	NeoLab, Heidelberg, D
1,5 ml Reaktionsgefäße	Brand, Wertheim, D
15 ml Röhrchen	Greiner, Frickenhausen, D
50 ml Röhrchen	Greiner, Frickenhausen, D
Einmalplastikpipetten (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Cornig Costar, Wiesbaden
FACS Röhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Filterpipettenspitzen (10µl, 20µl, 100µl, 1000µl)	Greiner, Frickenhausen, D
4,7 ml Lithium-Heparin Gel-, 4,7 ml Serum-Gel-,	Sarstedt, Nümbrecht, D
5 ml Citrat-, 2,7 ml Kalium-EDTA-Monovetten	
Multi-Adapter	Sarstedt, Nümbrecht, D
Sheath Fluid	Dako, Cytomation, Hamburg, D
Parafilm ``M``	Roth, Karlsruhe, D

Pipettenspitzen für Kolbenhubpipetten	Greiner, Frickenhausen, D
---------------------------------------	---------------------------

### 3.5.2 Geräte

**Tabelle 8:** Geräte, die im Rahmen der Studien zum Einsatz kamen

Mikrofilter Zentrifuge (Gerätetyp: 2022)	Hettich GmbH, Tuttlingen, D
Microzentrifuge (Gerätetyp: UniFuge)	Roth / CE , Karlsruhe, D
Kühlschrank (Gerätetyp: Spezial-468)	Kirsch GmbH, Offenburg, D
Kühlschrank (GT: Labo-100)	Kirsch GmbH, Offenburg, D
Tiefkühlschrank -20°C (GT: SN-T)	Libherr GmbH, Biberach an der Riss , D
Tiefkühlschrank -80°C (GT: HERAFreeze)	HERAEUS Instruments, Hanau, D
Tiefkühlschrank -80°C (GT: MDF-U74V)	Sanyo, München, D
Sicherheitswerkbank Labgard Klasse II,I (GT: NU-437-400)	NuAire, Inc. Plymouth, USA
Vortexer (GT: Q1)	VWR, Radnor, USA
Computermaus (links) (GT: L100)	DELL GmbH, Frankfurt a.M., D
Thermo Schüttler (Thermocycler)	HLC BioTech; München
Thermocycler PCR Express (GT: Hybaid)	Thermo Life Sciences, Waltham, USA
Gelelektrophoresekammer (horizontal)	Thermo Life Sciences, Waltham, USA
MACSQuant TM Analyser (GT: MACSQuant)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Computertastatur (GT: L100)	DELL GmbH, Frankfurt a.M., D
Computermaus (GT: RX250)	Logitech, Newark, USA
Mikroplate Reader (GT: 450)	BioRad
Kopierer (GT: CD1015)	Utax GmbH
QuantiTect Reverse-Transkription-Kit	Qiagen, Hilden, D
Zymo-Spin IIC Column aus Kit	Zymo Research, Freiburg, D
Zymo-Spin IIIC Column aus Kit	Zymo Research, Freiburg, D

DNA- / RNA-freies Tube aus Kit = Collections Tube	Zymo Research, Freiburg, D
---	----------------------------

### 3.5.3 Monoklonale Antikörper

**Tabelle 9:** Monoklonale Antikörper zur Charakterisierung der Monozytenheterogenität. Es handelt sich um murine anti-humane Antikörper

<u>Monoklonale Antikörper</u>	<u>Klon</u>	<u>Hersteller</u>
Anti-CD15eFluor450	HI98	eBioscience, Frankfurt, D
Anti-CD45 APC-Vio770	5B1	BD Biosciences, Heidelberg, D
Anti-CD45 (alternativ)	J33	Beckman Coulter, Krefeld, D
Anti-CD14 Pe-Cy7	61D3	eBioscience, Frankfurt, D
Anti-CD16 APC	3G8	BD Biosciences, Heidelberg, D
Anti-HLA-DR PerCP	L243	BD Biosciences, Heidelberg, D

### 3.5.4 Substanzen

**Tabelle 10:** Substanzen, die im Rahmen der Studien verwendet wurden

Aqua injectabile	Braun, Melsungen, D
BD FACS™ Lysing Solution	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Ethidiumbromidlösung 1%	ROTH, Karlsruhe, D
Agarose	ROTH, Karlsruhe, D
Albumin Fraktion V (BSA)	ROTH, Karlsruhe, D
Albumin Fraktion V (BSA)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Agarose NEEO Ultra Qualität	ROTH, Karlsruhe, D
FCR Blocking Reagent Human	Miltenyi GmbH, Bergisch Gladbach, D
FACS Lysing Solution	Becton Dickinson, Heidelberg, D
FACS Flow	Becton Dickinson, Heidelberg, D

FACS Rinse	Becton Dickinson, Heidelberg, D
FACS Clean	Becton Dickinson, Heidelberg, D
FCS	Seromed, Berlin, D
NaN <sub>3</sub>	Serva, Heidelberg
PBS	Biochrom, Berlin, D
PFA	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Ethanol; absolut	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Ethanol 70%, vergällt mit 1% MEK	Walter CMP
PAXgene Blood RNA Kit(50),CE	Qiagen
Quantitec Reverse Transkription (50)	Qiagen
Sterillium	Bode, Hamburg, D
PAF Acetylhydrolase Assay Kit	Biomol GmbH, Hamburg, D
Alkaline Phosphatase Colorimetric Assay Kit	Abcam, Milton, GB
EDTA	
DTNB (Ellman's Reagenz)	Cayman Chemical Company, USA
2-thio-PAF (Substrat)	Cayman Chemical Company, USA
Humanes PAF-AH (Standard)	Cayman Chemical Company, USA
RNasefreies H <sub>2</sub> O	Life Technologies, Carlsbad USA

Abkürzungen: BSA = Albumin Bovine Fraction IV; PBS = Phosphate Buffered Saline; PFA = Paraformaldehyd

### 3.5.5 Puffer und Medien

**Tabelle 11:** Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Medien. BSA = Albumin Bovine Fraction IV; PBS = Phosphate Buffered Saline; PFA = Paraformaldehyd

<u>Name</u>	<u>Ingredienz</u>
<b>MACS-Puffer</b> (filtriert)	BSA (0,1%) /Fraktion V, pH: 7,0, Standard grade (Serva)

	NaN <sub>3</sub> (0,07%)
	PBS (wo Mg <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup> )
	EDTA (2mM)
<b>BD Lysing Solution</b>	BD-Lysing Solution 1:10 in Aqua injectabila (Braun)
<b>FcR – Block</b>	Miltenyi Biotec
<b>PAF-Acetylhydrolase-Assay-Puffer 1</b>	0,1 M Tris-HCL, pH:7,2, 1mM EDTA (Cayman Chemical Company, USA)
<b>PAF-Acetylhydrolase Assay-Puffer 2</b>	0,1 M Tris-HCL, pH: 7,2 (Cayman Chemical Company, USA)
<b>RT - Puffer</b>	Reverse Transkriptase Puffer
<b>BR1</b>	Resuspendierungspuffer
<b>BR2</b>	Bindungspuffer
<b>BR3</b>	Waschpuffer 1
<b>BR4</b>	Waschpuffer 2
<b>BR5</b>	Elutionspuffer
<b>RNA Wasch Puffer</b>	48 ml 100% Ethanol + 12 ml RNA Wasch Puffer Konzentrat
<b>RNA Prep Puffer</b>	MiniPrep Kit (Zymo Research, Freiburg, D)

### 3.5.6 Verwendete Gene von TaqMan

**Tabelle 12:** Verwendete Gene von TaqMan

Gene von TaqMan		ACE	PLA2G7	ACTB
	5,0µl	ACE (Hs001741 79_m1)	Lp-PLA2 (Hs099999 903_m1)	Actin B (Hs009658 31_m1)

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Charakteristika des Gesamtkollektivs

Tabelle 13 zeigt die klinischen, laborchemischen sowie immunphänotypischen Charakteristika des untersuchten Kollektivs. Insgesamt wurden 99 Personen in die Untersuchung eingeschlossen, davon 60 chronisch nierenkranke dialysepflichtige Patienten des Stadiums 5 (CKD-5D) sowie 39 nierengesunde Kontrollpersonen (KO). Die Kontrollgruppe bestand aus Personen, die keine Anzeichen von Entzündungen oder bekannte atherosklerotische Krankheiten (KHK, pAVK, Apoplex etc.) aufwiesen.

### 4.2 Stratifikation bezüglich manifester Atherosklerose

Anhand des beidseitigen sonografischen Befundes der Aa. Carotides wurde ein Punktescore verwendet, der die Einteilung der Probanden in Atherosklerose – positive (A+) und -negative Personen (A-) erlaubte.

- Manifeste Atherosklerose: Punktescore  $\geq$  4 Punkte
- Ausschluss Atherosklerose: Punktescore  $<$  4 Punkte

Insgesamt bis zu 8 Punkte wurden in dem sonografischen Befund der Halsschlagadern vergeben (siehe Methoden-Teil). Bei der Gruppe der nierenkranken Patienten wurden 23 der 60 eingeschlossenen Patienten als Atherosklerose positiv eingestuft. Bei den nierengesunden Kontrollpersonen waren es 0 von 39 Personen, die als Atherosklerose positiv bewertet wurden.

#### 4.2.1 Erfassung relevanter Unterschiede zwischen der CKD-5D- und der Kontrollgruppe

Wie in Tabelle 13 nachzuvollziehen, zeigten sich im Vergleich der beiden Gruppen signifikante Unterschiede bei Alter ( $p=0,001$ ) und Geschlecht ( $p=0,002$ ). In der insgesamt jüngeren Kontrollgruppe fiel ein signifikant höherer

Anteil an weiblichen Probanden auf. Es zeigte sich weiterhin eine zu erwartende, statistisch relevante Erhöhung der Parameter der Nierenfunktion in der CKD-5D-Gruppe (Kreatinin:  $p = <0,001$ , Harnstoff:  $p = <0,001$ ).

Ein hochsignifikant höherer Anteil an Personen mit manifester Atherosklerose stellte sich im Kollektiv der Dialysepatienten ( $p = <0,001$ ) dar. Dies war auf der einen Seite zu erwarten, da Dialysepatienten überdurchschnittlich häufig kardiovaskulär erkranken (siehe Einleitung), auf der anderen Seite müssen auch der Alters- und Geschlechtsunterschied berücksichtigt werden.

Bei klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren zeigte der BMI-Wert keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen ( $p = 0,147$ ). Obwohl ein signifikant höherer Anteil der Personen in der CKD-5D-Gruppe an Hypertonie litt ( $p = <0,001$ ), waren die gemessenen Blutdruckwerte in der klinischen Untersuchung an Armen ( $p = 0,947$ ) und Beinen ( $p = 0,077$ ) nicht signifikant unterschiedlich. Bei allen Parametern des Fettstoffwechsels konnten statistisch relevante Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden. HDL, LDL und das Gesamt-Cholesterin zeigten einen hoch signifikanten höheren Durchschnittswert bei der gesunden Kontrollgruppe ( $p = <0,001$ ), die Triglyzeride wiederum waren signifikant in der CKD-5D-Gruppe erhöht ( $p = 0,012$ ). Eine Hypertriglyzeridämie ist ein charakteristisches Merkmal der urämischen Dyslipidämie bei chronisch niereninsuffizienten Patienten.

Obwohl die CKD-5D-Gruppe eine deutlich signifikant höhere Zahl an Patienten mit Diabetes Mellitus beinhaltete ( $p = <0,001$ ), stellte sich der HbA1c Wert nicht signifikant unterschiedlich ( $p = 0,964$ ) dar. Bei dem Vergleich an aktiven Rauchern konnten keine relevanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden ( $p = 0,102$ ).

Wie zu erwarten ergaben sich deutliche Unterschiede im Bereich des Entzündungsprofils zwischen den beiden Gruppen (siehe Tabelle 14). In der CKD-5D-Gruppe stellten wir höhere CRP-Werte ( $p < 0,001$ ), erniedrigte Albumin-Werte ( $p = 0,008$ ) und eine Erhöhung des prozentualen Anteils an inflammatorischen Mo2- und Mo3-Monozyten fest (s.u.). Ein erhöhtes Entzündungsprofil wurde im Rahmen mikroinflammatorischer Vorgänge in dieser Population erwartet.

#### **4.2.2 Vergleich der Monozytensubpopulationen, der LP-PLA2 - Aktivität sowie der mRNA -Expression von Lp-PLA2 und ACE zwischen der CKD-5D-Gruppe und der gesunden Kontrollgruppe (KO-Gruppe)**

In Tabelle 15 ist der Vergleich der Spezialmessungen der CKD-5D -Gruppe mit der Kontrollgruppe dargestellt. Die Frequenz klassischer Monozyten (Mo1) war bei Nierenkranken signifikant niedriger ( $p < 0,001$ ) im Vergleich zu gesunden Probanden. Die als proinflammatorisch beschriebenen CD16+ Monozyten-Subpopulationen Mo2 (CD14++CD16+) und Mo3 (CD14+CD16++) waren beide hoch signifikant erhöht innerhalb der CKD-5D-Gruppe (Mo2:  $p < 0,001$ , Mo3 :  $p < 0,001$ ). Sowohl die Lp-PLA2-Aktivität (siehe Abbildung 3) als auch die leukozytäre Expression von Lp-PLA2 (siehe Abbildung 2) und ACE (siehe Abbildung 4) waren allesamt hoch signifikant erhöht in der CKD-5D-Gruppe.

Es musste aber, trotz der sehr eindeutigen Ergebnisse, die unterschiedliche Zusammensetzung der beiden Gruppen (CKD-5D und Kontrollgruppe) v.a in Bezug auf Alter, Lipidprofil und Geschlecht berücksichtigt werden. Bei den Lipiden sind insbesondere die signifikanten Unterschiede beim LDL-Cholesterin, dem Hauptträgermolekül der freien Lp-PLA2, zu berücksichtigen.

**Tabelle 13:** Vergleich der Demografie und Anamnese der CKD-5D -Gruppe mit der Kontrollgruppe; die Werte stellen Mittelwert  $\pm$  SD dar, die Unterschiede in den beiden Gruppen wurden durch t-Test, Mann-Whitney-U-Test oder Chi-Quadrat-Analyse untersucht; \***fett** = statistisch signifikant

	<b>CKD5-D (N=60)</b>	<b>Kontrollen (N=39)</b>	<b>Statistik</b>
Alter (Jahre)	62.3 $\pm$ 15.5	54.0 $\pm$ 8.4	<b>0.001*</b>
Geschlecht (weiblich, %)	38.3	71.8	<b>0.002*</b>
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	26.1 $\pm$ 5.0	24.6 $\pm$ 3.9	0.147
Atherosklerose (%)	38.0	0	<b>&lt;0.001*</b>
Diabetes (%)	35.0	0	<b>&lt;0.001*</b>
Hypertonie (%)	93.3	20.5	<b>&lt;0.001*</b>
KHK (%)	43.3	5.1	<b>&lt;0.001*</b>
pAVK (%)	16.7	5.1	0.118
Apoplex (%)	6.7	2.6	0.645
Raucher (%)	63.4	46.1	0.102
Systolischer RR Arm (mmHG)	126 $\pm$ 28	126 $\pm$ 13	0.947
Systolischer RR Bein (mmHG)	159 $\pm$ 66	141 $\pm$ 19	0.077
TBQ	1.3 $\pm$ 0.6	1.1 $\pm$ 0.07	<b>0.049*</b>

**Tabelle 14:** Vergleich des Routinelabors der CKD-5D -Gruppe mit der Kontrollgruppe; die Werte stellen Mittelwert  $\pm$  SD dar, die Unterschiede in den beiden Gruppen wurden durch t-Test, Mann-Whitney-U-Test oder Chi-Quadrat-Analyse untersucht; \***fett** = statistisch signifikant

	<b>CKD5-D (N=60)</b>	<b>Kontrollen (N=39)</b>	<b>Statistik</b>
Log CRP (mg/l)	1.6 $\pm$ 0.5	1.0 $\pm$ 0.5	<b>&lt;0.001*</b>
[Median (range)]	[4.9 (0.3-41.9)]	[1.2 (0.3-6.3)]	
Leukozyten (G/L)	7.1 $\pm$ 2.8	6.1 $\pm$ 1.8	0.052
Kreatinin ( $\mu$ mol/l)	783.2 $\pm$ 275.0	70.4 $\pm$ 12.1	<b>&lt;0.001*</b>
Harnstoff (mmol/l)	22.0 $\pm$ 7.0	4.3 $\pm$ 1.3	<b>&lt;0.001*</b>
Albumin (g/dl)	3.9 $\pm$ 0.5	4.1 $\pm$ 0.3	<b>0.008*</b>
Gesamt Protein (g/l)	65.6 $\pm$ 5.8	70.9 $\pm$ 5.3	<b>&lt;0.001*</b>
HbA1c (mmol/mol)	39.8 $\pm$ 9.1	39.9 $\pm$ 5.3	0.964
Gesamt-Cholesterin (mmol/l)	4.4 $\pm$ 1.1	6.1 $\pm$ 0.9	<b>&lt;0.001*</b>
Triglyzeride (mmol/l)	2.1 $\pm$ 1.3	1.4 $\pm$ 1.1	<b>0.012*</b>
HDL-C (mmol/l)	1.3 $\pm$ 0.6	1.8 $\pm$ 0.5	<b>&lt;0.001*</b>
LDL-C (mmol/l)	2.4 $\pm$ 0.9	3.6 $\pm$ 1.2	<b>&lt;0.001*</b>

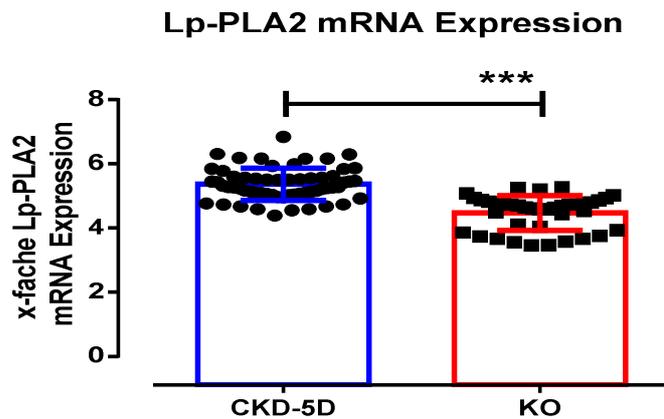
**Tabelle 15:** Vergleich der Spezialmessungen der CKD-5D -Gruppe mit der Kontrollgruppe; die Werte stellen Mittelwert  $\pm$  SD dar, die Unterschiede in den beiden Gruppen wurden durch t-Test, Mann-Whitney-U-Test oder Chi-Quadrat-Analyse untersucht; \***fett** = statistisch signifikant

	<b>CKD5-D (N=60)</b>	<b>Kontrollen (N=39)</b>	<b>Statistik</b>
Mo1 (%)	80.8 $\pm$ 8.0	90.2 $\pm$ 3.2	<b>&lt;0.001*</b>
Mo2 (%)	8.4 $\pm$ 2.7	2.7 $\pm$ 0.9	<b>&lt;0.001*</b>
Mo3 (%)	10.8 $\pm$ 6.1	7.1 $\pm$ 3.2	<b>&lt;0.001*</b>
Log RQ Lp-PLA2 (leukozytär)	5.4 $\pm$ 0.5	4.5 $\pm$ 0.5	<b>&lt;0.001*</b>
[Median (range)]	[1.9 (0.2-69.6)]	[0.4 (0.03-1.9)]	

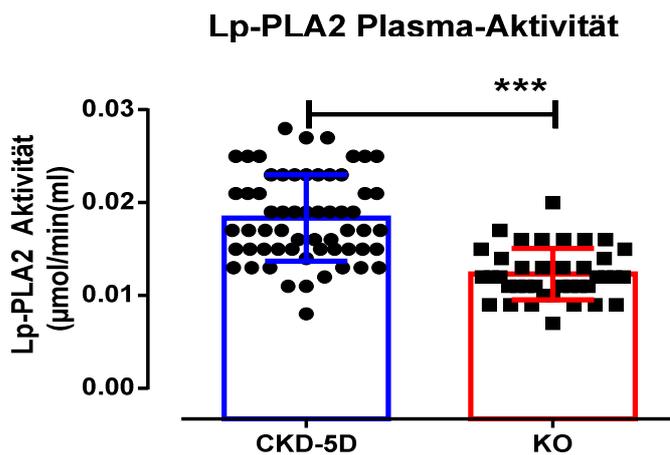
Lp-PLA2-Aktivität (nmol/ml/min)	18.3±5.0	12.3±2.6	<b>0.001*</b>
Log RQ ACE (leukozytär)	4,9±0,4	4,4±0,5	<b>&lt;0,001*</b>

Abkürzungen: RQ = leukozytäre Expression

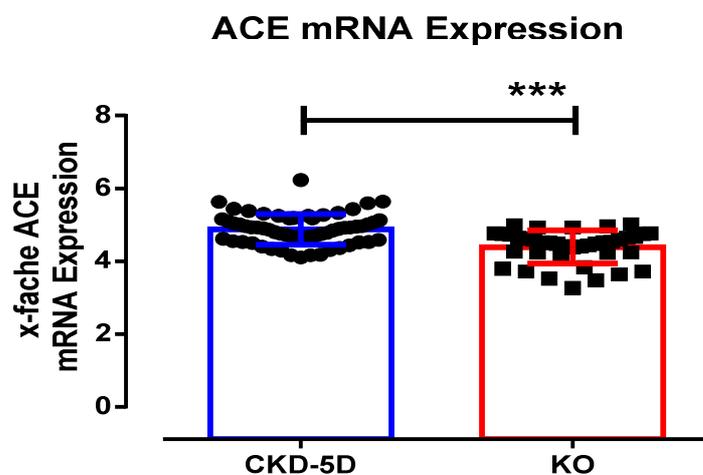
#### 4.2.3 Grafiken



**Abb. 2:** Leukozytäre Lp-PLA2 mRNA Expression bei chronischen Dialysepatienten (CKD-5D) und gesunden Probanden (KO)



**Abb. 3:** Plasmatische Lp-PLA2 Aktivität bei chronischen Dialysepatienten (CKD-5D) und gesunden Probanden (KO)



**Abb. 4:** Leukozytäre ACE mRNA Expression bei chronischen Dialysepatienten (CKD-5D) und gesunden Probanden (KO)

#### 4.3 Lineares Regressionsmodell: Betrachtung der Lp-PLA2-Aktivität und –Expression, der drei Monozyten-Subpopulationen sowie der ACE-mRNA-Expression nach Adjustierung für Alter, Geschlecht und LDL-Profil zwischen CKD-5D und Kontrollen

Aufgrund der deutlichen Inhomogenität bezüglich der Altersstruktur, dem Lipidprofil und dem Geschlecht zwischen den beiden Gruppen wurde eine Adjustierung dieser Parameter mittels eines Linearen Regressionsmodells vorgenommen. Diese Analyse war ein wichtiger Schritt, um den Einfluss von sich signifikant unterscheidenden Parametern auf die Ergebnisse zu minimieren. Neben der Alters- und Geschlechtsadjustierung war insbesondere die Überprüfung des Einflusses der LDL-Werte wichtig für diese Arbeit. LDL als Hauptträger für Lp-PLA2 und wichtigstes Fettmolekül bei der Initiierung von Schaumzellen in der Gefäßwand sollte in jedem Falle in die Adjustierung einbezogen werden.

Die adjustierte Analyse bestätigte die Unterschiede zwischen gesunden Kontrollen und den Patienten mit Nierenversagen im Endstadium. Die Lp-PLA2- Aktivität zeigte einen im Mittel höheren Wert von +0,006 nmol/ml/min (95% KI: 0,004 – 0,008 nmol/ml/min; siehe Tabelle 16), die Lp-PLA2-mRNA-Expression von +0,526 log RQ (95% KI: 0,236 – 0,817 log RQ; siehe Tabelle 17) bei CKD-5D-Patienten. Bei beiden Parametern blieb der Unterschied, auch nach der Adjustierung, signifikant unterschiedlich zwischen den beiden Gruppen. Ebenso stellten sich die Ergebnisse der ACE-mRNA-Expression nach der Adjustierung dar. Im Mittel wurde der Wert innerhalb der CKD-5D-Gruppe um +0,368 Log RQ (95% KI: 0,141 – 0,595 log RQ; siehe Tabelle 18) höher gemessen.

Auch bei der Betrachtung der Unterschiede in Bezug auf die Monozyten-Subpopulationen zwischen KO-Gruppe und CKD-5D- Gruppe konnten die signifikanten Unterschiede nach der Adjustierung für Alter, Geschlecht und

LDL-Profil bestätigt werden. Die Mo1-Population wurde im Mittel bei den CKD-5D Patienten um 8,3 % geringer gemessen als bei den Kontrollpersonen (95% KI: 4,9 – 11,7%; siehe Tabelle 19). Die Mo2-Population war mit mittleren 4,1 % (95% KI: 2,8-5,4%, siehe Tabelle 20), die Mo3-Population mit 4,2 % (95% KI: 1,7 -6,7%, siehe Tabelle 21) deutlich häufiger im Plasma der Dialysepatienten zu finden. Auch für die Monozyten-Frequenzen schien eine Adjustierung des LDL-Wertes im Hinblick auf die Bedeutung des Fettstoffwechsels für die Atheroskleroseentstehung sehr sinnvoll. Gewebsmakrophagen, also aus dem Blutstrom ausgewanderte Monozyten, die oxidierte LDL-Partikel über den Scavenger-Rezeptor aufnehmen, entwickeln sich zu Schaumzellen, der Grundlage für atheromatöse Plaques.

Brilakis et al. beschreiben in ihrer Arbeit von 2008 die Beobachtung, dass die Lp-PLA2 – Masse bei Männern, nicht aber bei Frauen eine unabhängige Korrelation zu der koronaren Kalzifikation der Patienten aufgewiesen hat (Brilakis et al., 2008). In unserer Arbeit konnte ein geschlechtsabhängiger Unterschied nur innerhalb der Kontrollgruppe für die Lp-PLA2-Aktivität bestätigt werden, nicht aber innerhalb der CKD-5D - Gruppe (KO: Männer:  $14,2 \pm 2,7$  vs. weiblich:  $11,6 \pm 2,3$  [nmol / ml / min] ,  $p < 0,003$  ; CKD-5D: Männer:  $18,4 \pm 5,3$  vs. weiblich:  $18,2 \pm 4,1$  [ nmol / ml / min ] ,  $p = 0,894$  ).

**Tabelle 16:** Lineares Regressionsmodell: Betrachtung der Lp-PLA2 Aktivität nach Adjustierung für Alter, Geschlecht und LDL-Profil ; **abhängige Variable: Plasma Lp-PLA2-Aktivität; \*fett** = statistisch signifikant; \*\*95% Konfidenzintervall

	Regression-Koeffizient B	SE	p-Wert	95% KI** (Exp (B))	
				Untergrenze	Obergrenze
<b>Konstante</b>	0.013 (nmol/ml/min)	0.002	<b>1E-006*</b>	0,008	0.017
<b>Patienten Gruppe*Geschlecht</b>	-0.006 (nmol/ml/min)	0.001	<b>1E-006*</b>	-0,008	-0.004
<b>Alter</b>	6E-005 (nmol/ml/min)	3E-005	0.062	3E-006	0.0001
<b>LDL</b>	0.0004 (nmol/ml/min)	0,0004	0,286	-0.0004	0.001

**Tabelle 17:** Lineares-Regressionsmodell: Betrachtung der Lp-PLA2- mRNA-Expression nach Adjustierung für Alter, Geschlecht und LDL-Profil; **abhängige Variable: leukozytäre Lp-PLA2-mRNA-Expression**, \*fett = statistisch signifikant; \*\*95% Konfidenzintervall

	Regression- Koeffizient B	SE	p-Wert	95% KI** (Exp (B))	
				Untergrenze	Obergrenze
<b>Konstante</b>	4.637 log RQ	0.335	<b>1E-007*</b>	3.971	5.302
<b>Patienten Gruppe*Geschlecht</b>	-0.526 log RQ	0.146	<b>0.001*</b>	-0.817	-0.236
<b>Alter</b>	0.011 log RQ	0.005	<b>0.019*</b>	0.002	0.020
<b>LDL</b>	-0.045 log RQ	0.055	0.416	-0.154	0.064

**Tabelle 18:** Lineares-Regressionsmodell: Betrachtung der ACE- mRNA- Expression nach Adjustierung für Alter, Geschlecht und LDL-Profil; **abhängige Variable: leukozytäre ACE- mRNA - Expression**, \*fett = statistisch signifikant, \*\* 95% Konfidenzintervall

	Regression- Koeffizient B	SE	p-Wert	95% KI** (Exp (B))	
				Untergrenze	Obergrenze
<b>Konstante</b>	4,687 log RQ	0,262	<b>&lt;0,001*</b>	4,166	5,208
<b>Patienten Gruppe*Geschlecht</b>	-0,368 log RQ	0,114	<b>0,002*</b>	-0,595	0,141
<b>Alter</b>	0,002 log RQ	0,004	0,611	-0,005	0,009
<b>LDL</b>	3,1 E-04 log RQ	0,043	0,994	-0,085	0,086

**Tabelle 19:** Lineares-Regressionsmodell: Betrachtung der Mo1 - Population nach Adjustierung für Alter, Geschlecht und LDL-Profil; **abhängige Variable: Mo1 (%)**; \*fett = statistisch signifikant; \*\*95% Konfidenzintervall

	Regression-Koeffizient B	SE	p-Wert	95% KI** (Exp (B))	
				Untergrenze	Obergrenze
<b>Konstante</b>	84,0 %	4,0	<0,001*	76,2	91,8
<b>Patienten Gruppe*Geschlecht</b>	8,3 %	1,7	<0,001*	4,9	11,7
<b>Alter</b>	-0,05 %	0,05	0,401	-0,2	0,06
<b>LDL</b>	0,3 %	0,6	0,665	-1,0	1,6

**Tabelle 20:** Lineares-Regressionsmodell: Betrachtung der Mo2 - Population nach Adjustierung für Alter, Geschlecht und LDL-Profil; **abhängige Variable: Mo2 (%)**; \*fett = statistisch signifikant; \*\*95% Konfidenzintervall

	Regression-Koeffizient B	SE	p-Wert	95% KI** (Exp (B))	
				Untergrenze	Obergrenze
<b>Konstante</b>	6,5 %	1,5	<0,001*	3,5	9,6
<b>Patienten Gruppe*Geschlecht</b>	-4,1 %	0,7	<0,001*	-5,4	-2,8
<b>Alter</b>	0,04 %	0,05	0,40	-0,004	0,08
<b>LDL</b>	-0,51 %	0,3	<b>0,045*</b>	-1,0	-0,01

**Tabelle 21:** Lineares-Regressionsmodell: Betrachtung der Mo3 - Population nach Adjustierung für Alter, Geschlecht und LDL-Profil; **abhängige Variable: Mo3 (%)**; \*fett = statistisch signifikant; \*\*95% Konfidenzintervall

	Regression-Koeffizient B	SE	p-Wert	95% KI** (Exp (B))	
				Untergrenze	Obergrenze
<b>Konstante</b>	9,5 %	2,9	<b>0,002*</b>	3,7	15,3
<b>Patienten Gruppe*Geschlecht</b>	-4,2 %	1,3	<b>0,001*</b>	-6,7	-1,7
<b>Alter</b>	0,008 %	0,04	0,851	-0,07	0,09
<b>LDL</b>	0,23 %	0,5	0,635	-0,7	1,2

#### 4.4 Korrelationen der Lp-PLA2-Gen-Expression und der LP-PLA2-Aktivität

Eine weitere statistische Auswertung zeigt Tabelle 22. Es handelt sich u.a. um die Korrelation der Lp-PLA2-Gen-Expression mit der Lp-PLA2-Aktivität. Weiterhin wurden verschiedene Parameter (Alter, Mo2, HDL, LDL, CRP) mit der Expression und der Aktivität korreliert.

Zunächst betrachteten wir die Beziehung zwischen der Lp-PLA2-Aktivität und der –mRNA-Expression innerhalb der Leukozyten. Es konnte weder in der CKD-5D-, noch in der KO-Gruppe eine signifikante Korrelation gefunden werden. Die Signifikanzniveaus wurden deutlich verfehlt (CKD-5D:  $p=0,981$ , KO:  $p=0,741$ ). Dies könnte sich im Hinblick auf weitere Analysen hinsichtlich der extra-leukozytären Lp-PLA2-Expression als äußerst wertvolle Information erweisen.

Eine positive Korrelation zeigte sich zwischen LDL und der Lp-PLA2-Aktivität (siehe Abbildung 7) innerhalb des Kontrollkollektivs ( $p=0,001$ ), im Hinblick auf die Kopplung der Lp-PLA2 an LDL-Partikel im Blut ein nachvollziehbares Ergebnis. Überraschenderweise lässt sich diese Tendenz aber innerhalb des CKD-5D-Kollektivs nicht nachweisen.

Bei der Betrachtung der Lp-PLA2-mRNA-Expression konnte innerhalb der Dialysegruppe (CKD-5D) eine signifikante Beziehung zu Inflammationsmarkern gefunden werden. Zu der proinflammatorischen Monozytengruppe Mo2 (siehe Abbildung 5) und vor allem auch zu CRP (siehe Abbildung 6) kristallisierten sich deutliche positive Korrelationen heraus. Diese Korrelationen bestätigten sich innerhalb der KO-Gruppe mit ihrem insgesamt geringeren inflammatorischem Profil nicht.

Zum Alter konnte in beiden Gruppen keine relevante Korrelation der Expression und Aktivität von Lp-PLA2 gefunden werden, wobei innerhalb der CKD-5D-Gruppe eine positive Korrelation mit der Aktivität nur knapp das Signifikanzniveau verfehlte ( $p=0,054$ ).

Innerhalb des Kontrollkollektivs konnten wir eine deutliche negative Korrelation der Lp-PLA2-Aktivität zu HDL feststellen. Die CKD-5D-Gruppe wies eine negative Korrelation bezüglich des HDL nicht zu der Aktivität von Lp-PLA2 auf, sondern zu der mRNA-Expression.

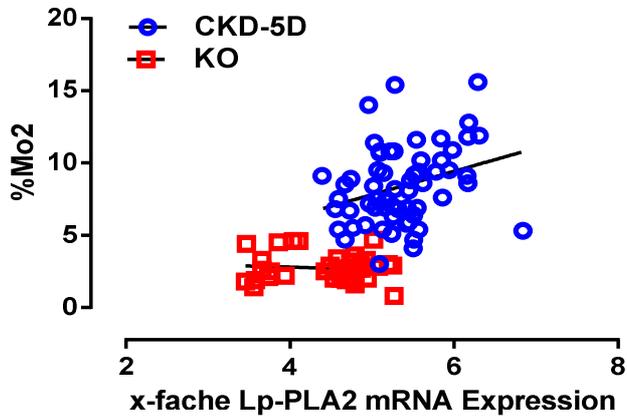
**Tabelle 22:** Korrelation der Lp-PLA2-Gen-Expression und der Lp-PLA2 Aktivität mit inflammatorischen Zellen (Mo2), dem Entzündungsmarker CRP sowie Lipidparameter (LDL und HDL) und Alter bei CKD-5D Patienten und Kontrollpersonen; \*fett = statistisch signifikant =  $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$

			Alter	Mo2	HDL	LDL	CRP	RQ Lp-PLA2	Lp-PLA2 Aktivität	
CKD-5D	RQ Lp-PLA2	r	0.241	<b>0.317*</b>	<b>-0.317*</b>	0.112	<b>0.404**</b>	1.000	0.003	
		p	0.064	<b>0.014</b>	<b>0.024</b>	0.401	<b>0.001</b>		0.981	
	Lp-PLA2 Aktivität	r	0.250	0.101	-0.140	0.126	0.033	0.003	1.000	
		p	0.054	0.445	0.229	0.344	0.801	0.981		
	KO	RQ Lp-PLA2	r	0.119	0.096	0.155	-0.132	-0.087	1.000	0.055
			p							
			0.470	0.562	0.359	0.437	0.597		0.741	
Lp-PLA2 Aktivität		r	-0.224	0.153	<b>-0.041*</b>	<b>0.597**</b>	-0.187	0.055	1.000	
		p	0.170	0.351	<b>0.011</b>	<b>.0001</b>	0.254	0.741		

Abkürzungen: RQ = leukozytäre Expression, r = Korrelationskoeffizient

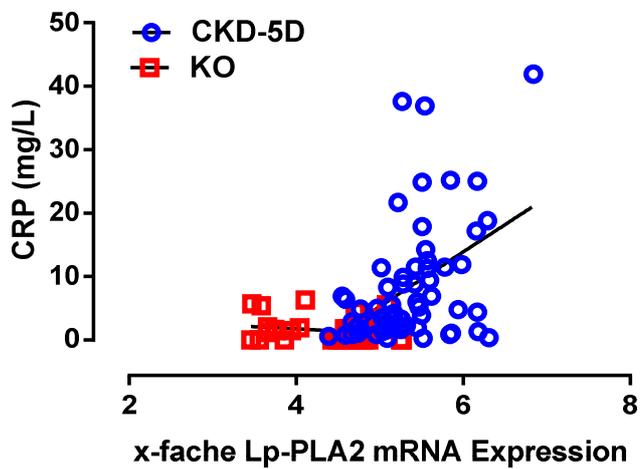
## 4.4.1 Grafiken

## Korrelation Lp-PLA2 Expression und Mo2-Frequenz



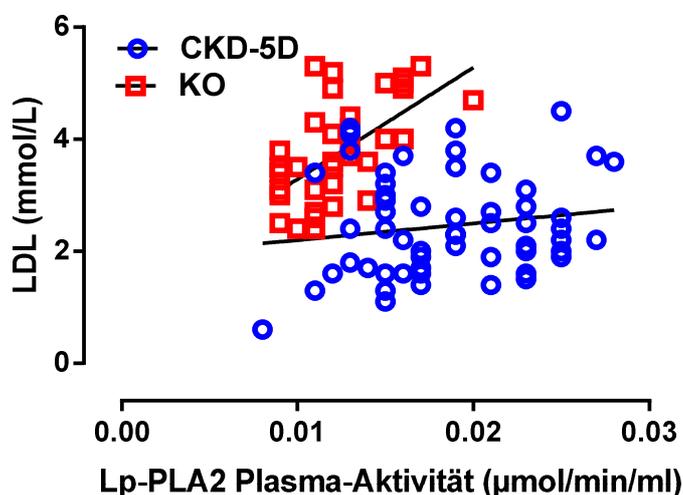
**Abb. 5:** Korrelation zwischen der Lp-PLA2 mRNA Expression und der Mo2-Frequenz bei CKD-5D und gesunden Kontrollen (KO)

## Korrelation Lp-PLA2 Expression und CRP-Spiegel



**Abb. 6:** Korrelation zwischen der Lp-PLA2 mRNA Expression und der Plasma-CRP-Konzentration bei CKD-5D und gesunden Kontrollen (KO)

## Korrelation Lp-PLA2 Aktivität und LDL-Spiegel



**Abb. 7:** Korrelation zwischen der Lp-PLA2 Plasma-Aktivität und der Plasma-LDL-Konzentration bei CKD-5D und gesunden Kontrollen (KO)

### 4.5 Stratifizierung innerhalb des Ausgangskollektivs (CKD-5D-Gruppe) hinsichtlich des Atherosklerosegrades

Die Dialysepatienten wurden nach dem im Methodenteil beschriebenen Score in eine Atherosklerose - Positive (A+) und eine - Negative (A-) Gruppe dichotomisiert (siehe Tabelle 23). Die beiden Gruppen unterschieden sich signifikant hinsichtlich ihres Alters ( $p=0,040$ ). Dieses Ergebnis konnte im Hinblick auf die höhere Wahrscheinlichkeit, im Alter eine Atherosklerose zu entwickeln, erwartet werden. Überraschenderweise konnten keine relevanten Unterschiede bei vielen der klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren zwischen den Gruppen gefunden werden. Nicht signifikant waren die Unterschiede bspw. beim Geschlecht, den Fettstoffwechselfparametern (Cholesterin, Triglyceride, LDL, HDL; siehe Tabelle 24), der durchschnittlichen Anzahl an Rauchern, der Patienten mit Hypertonie und Z.n. Apoplex sowie dem Anteil an Diabetikern innerhalb der beiden Gruppen. Der zu bedenkende Aspekt, dass möglicherweise die Länge der Dialysebehandlung selbst einen inflammatorisch fördernden Effekt haben könnte, wurde ebenfalls einbezogen. Obwohl das Dialysealter, also die mit einer Dialysebehandlung verbrachte Lebenszeit der Patienten, sich nicht signifikant zwischen den Gruppen unterschied ( $p=0,500$ ), so wurden erstaunlicherweise die Atherosklerose - Positiven Patienten durchschnittlich 1 Jahr kürzer dialysiert (Athero+:  $6.4 \pm 4.3$  (Jahre); Athero-:  $7.4 \pm 5.5$  (Jahre)). Dies ist insbesondere bemerkenswert, da bereits eine einzige Dialysesitzung zu erhöhten CRP-Werten und einer erhöhten Lp-PLA2-Aktivität führen kann (potentielle Atherosklerose-Risikofaktoren).

Der Anteil an Patienten mit einer manifesten Hypertonie und Diabetes Mellitus unterschied sich kaum. Das Medikamenten-Regime war in beiden Gruppen vergleichbar (siehe Tabelle 27). Dennoch hatte die A+ -Gruppe

etwas höhere mittlere arterielle Blutdruck-Werte und die Höhe von glykiertem Hämoglobin (HbA1c) wurde in der A+ -Gruppe signifikant höher gemessen als in der A- -Gruppe. Wie zu erwarten, war die Plasma Lp-PLA2 -Aktivität signifikant erhöht in der A+ -Gruppe im Vergleich zu der A- -Gruppe ( $p=0,042$ ) (siehe Tabelle 25 und Abbildung 9), während sich die Lp-PLA2-mRNA-Expression zwischen den beiden Gruppen nicht signifikant unterschied (Abbildung 8). Die monozytären Frequenzen (Mo1, Mo2, Mo3) zeigten keine statistisch relevanten Unterschiede, allerdings gab es einen Trend zu höheren Mo2- und Mo3- Zellen in der A + -Gruppe. Die Messung der leukozytären ACE - mRNA - Expression erwies sich ebenfalls ohne signifikante Unterschiede.

Bei Betrachtung dieser Ergebnisse ist der statistisch relevante Unterschied zwischen A+ und A- hinsichtlich des Alters und des HbA1c-Wertes zu beachten.

**Tabelle 23:** Vergleich der Demografie und Anamnese zwischen Atherosklerose - Positiven (A+) und Atherosklerose - Negativen (A-) CKD-5D-Patienten; die Werte stellen den Mittelwert  $\pm$  SD dar, die Unterschiede in den beiden Gruppen wurden durch t-Test, Mann-Whitney-U-Test oder Chi-Quadrat-Analyse untersucht; \***fett** = statistisch signifikant

	CKD-5D (A-) (N=37)	CKD-5D (A+) (N=23)	Statistik
Alter (Jahre)	59.0 $\pm$ 15.5	67.5 $\pm$ 14.4	<b>0.040*</b>
Geschlecht (%weiblich)	40.5	34.8	0.786
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	25.5 $\pm$ 4.2	27.1 $\pm$ 6.0	0.219
IMT (mm)	0.7 $\pm$ 0.2	1.0 $\pm$ 0.2	<b>&lt;0.0001*</b>
Diabetes (%)	37.8	39.1	1.0
Hypertonie (%)	89.2	100	0.288
KHK (%)	40.5	47.8	0.603
pAVK (%)	13.5	21.7	0.485
Apoplex (%)	8.1	4.3	1.0
Raucher (%)	62.2	65.2	1.0
Systolischer RR Arm (mmHg)	121 $\pm$ 26	135 $\pm$ 30	0.083
Systolischer RR Bein (mmHg)	152 $\pm$ 60	170 $\pm$ 76	0.383
TBQ	1.3 $\pm$ 0.6	1.3 $\pm$ 0.5	0.931
Dialyse- Alter	7.4 $\pm$ 5.5	6.4 $\pm$ 4.3	0.500

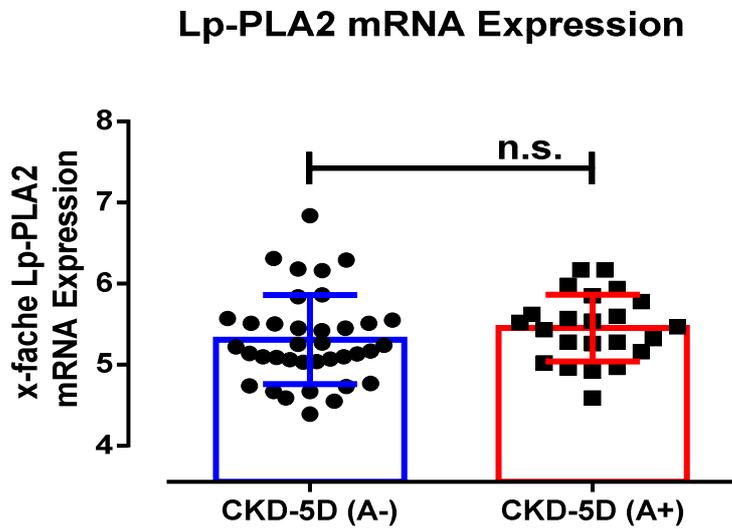
**Tabelle 24:** Vergleich des Routinelabors zwischen Atherosklerose - Positiven (A+) und Atherosklerose - Negativen (A-) CKD-5D-Patienten; die Werte stellen Mittelwert  $\pm$  SD dar, die Unterschiede in den beiden Gruppen wurden durch t-Test, Mann-Whitney-U-Test oder Chi-Quadrat-Analyse untersucht; **\*fett** = statistisch signifikant

	CKD-5D (A-) (N=37)	CKD-5D (A+) (N=23)	Statistik
Log CRP (mg/l)	1.6 $\pm$ 0.6	1.8 $\pm$ 0.5	0.226
Leukozyten (G/L)	6.9 $\pm$ 2.3	7.3 $\pm$ 3.6	0.609
Kreatinin ( $\mu$ mol/l)	783.1 $\pm$ 277.7	783.3 $\pm$ 276.9	0.997
Harnstoff (mmol/l)	22.2 $\pm$ 7.6	21.5 $\pm$ 6.0	0.699
Albumin (g/dl)	3.9 $\pm$ 0,5	3.8 $\pm$ 0,4	0.462
Gesamt Protein (g/l)	64.9 $\pm$ 6,2	66.6 $\pm$ 4.9	0.259
HbA1c (mmol/mol)	37.9 $\pm$ 7.9	42.9 $\pm$ 10.3	<b>0.038*</b>
Gesamt-Cholesterin (mmol/l)	4.2 $\pm$ 1.1	4.7 $\pm$ 1.1	0.093
Triglyzeride (mmol/l)	1.9 $\pm$ 1.2	2.4 $\pm$ 1.5	0.187
HDL-C (mmol/l)	1.3 $\pm$ 0.7	1.2 $\pm$ 0.5	0.351
LDL-C (mmol/l)	2.3 $\pm$ 0.8	2.7 $\pm$ 1.0	0.098

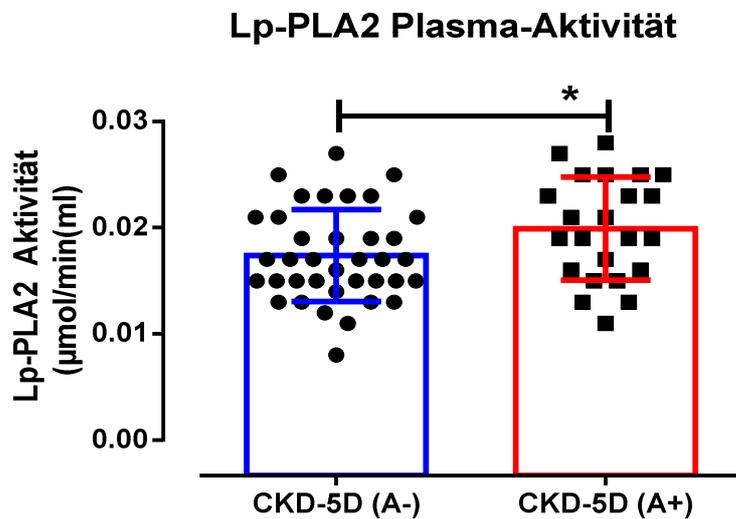
**Tabelle 25:** Vergleich der Spezialmessungen zwischen Atherosklerose - Positiven (A+) und Atherosklerose - Negativen (A-) CKD-5D-Patienten; die Werte stellen den Mittelwert  $\pm$  SD dar, die Unterschiede in den beiden Gruppen wurden durch t-Test, Mann-Whitney-U-Test oder Chi-Quadrat-Analyse untersucht; **\*fett** = statistisch signifikant; Abkürzungen: RQ = leukozytäre Expression

	CKD-5D (A-) (N=37)	CKD-5D (A+) (N=23)	Statistik
Mo1%	82.0 $\pm$ 7.8	79.0 $\pm$ 8.2	0.136
Mo2%	8.0 $\pm$ 2.3	9.0 $\pm$ 2.5	0.160
Mo3%	10.0 $\pm$ 5.9	12.1 $\pm$ 6.4	0.186
Log RQ Lp-PLA2*(leukozytär)	5.3 $\pm$ 0.5	5.5 $\pm$ 0.4	0.292
Lp-PLA2 Aktivität (nmol/ml/min)	17.3 $\pm$ 4.5	20.0 $\pm$ 5.1	<b>0.042*</b>
Log RQ ACE* (leukozytär)	4,9 $\pm$ 0,45	4,9 $\pm$ 0,38	0,443

## 4.5.1 Grafiken



**Abb. 8:** Leukozytäre Lp-PLA2 mRNA Expression bei chronischen Dialysepatienten ohne (A-) und mit (A+) Zeichen einer subklinischen Atherosklerose



**Abb. 9:** Lp-PLA2 Plasma-Aktivität bei chronischen Dialysepatienten ohne (A-) und mit (A+) Zeichen einer subklinischen Atherosklerose

#### 4.6 Lp-PLA2-Genexpression und Lp-PLA2-Aktivität bei CKD-5D-Patienten mit (A+) und ohne Atherosklerose (A-)

##### 4.6.1 Lineares Regressionsmodell: Die Lp-PLA2-Aktivität unterscheidet sich zwischen Patienten mit (A+) und ohne Atherosklerose (A-) auch nach Adjustierung für Alter und HbA1c

Die Dialysegruppe wurde, wie bereits beschrieben, anhand des Atherosklerosescores in Athero positiv (A +) und negativ (A -) unterteilt.

Da es bei dem Vergleich der A+ und A- Patienten signifikante Unterschiede hinsichtlich des Alters sowie des HbA1c-Profiles gab, betrachteten wir die Unterschiede nach Adjustierung dieser beider Parameter durch ein Lineares Regressionsmodell (siehe Tabelle 26).

Das Lineare Regressionsmodell zeigte nach Adjustierung für Alter und HbA1c, dass sich der Wert für die Lp-PLA2-Aktivität weiterhin signifikant unterschied. Im Mittel zeigten A+ Patienten +0,005 nmol/ml/min höhere Werte (95% KI:0,002 – 0,007 nmol/ml/min).

Die Lp-PLA2-Aktivität stellt damit einen von anderen Atherosklerose-Risikofaktoren unabhängigen Prädiktor für subklinische Atherosklerose bei CKD-5D – Patienten dar.

**Tabelle 26:** Lineares Regressionsmodell; Abhängige Variable: Lp-PLA2 Aktivität, **\*fett** = statistisch signifikant; \*\*95% KI

	Regression-Koeffizient B	SE	p-Wert	95% KI (Exp (B))	
				Obere	Untere
<b>Konstante</b>	0.017	0.003	<b>1E-006*</b>	0.011	0.022
<b>Patienten Gruppe</b>	0.005	0.001	<b>0.0001*</b>	0.002	0.007
<b>Alter</b>	7.7E-005	4E-005	<b>0.030*</b>	8E-006	0.00015
<b>HbA1c</b>	-0.0002	6E-005	<b>0,010*</b>	-0.0003	-4E-005

##### 4.6.2 Korrelation der Plasma Lp-PLA2-Aktivität und Lp-PLA2-mRNA-Expression mit Lipidparametern bei CKD-5D-Patienten mit (A+) und ohne (A-) Atherosklerose

Die Auswertung (Tabelle 27) stellt die Korrelationen der leukozytären Lp-PLA2-Expression und der Lp-PLA2-Aktivität mit Lipidparametern (Triglyzeride, Gesamt-Cholesterin, HDL, LDL) innerhalb des gesamten CKD-5D-Kollektivs (vergleiche dazu Tabelle 22) sowie unterteilt anhand des Atherosklerosegrades (A+ und A-) dar. Außerdem zeigt die Tabelle die Korrelationen zu den Monozytenpopulationen. Wie in 4.4 beschrieben und in Tabelle 22 und 27 zu sehen, korreliert die Lp-PLA2-Aktivität mit keinem der untersuchten Parameter innerhalb

der gesamten CKD-5D-Gruppe (N=60). Auch nach der Unterteilung in A+ und A- sind keine Korrelationen der Lp-PLA2-Aktivität zu den beschriebenen Parametern zu erkennen (Tabelle 27).

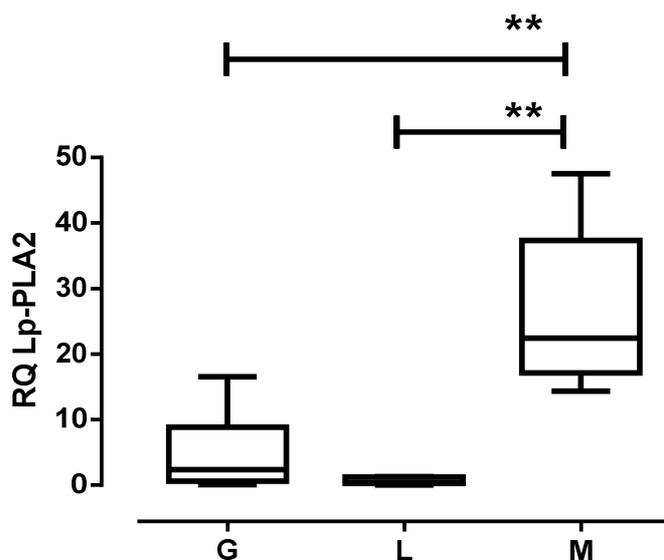
Betrachtet man die Beziehungen der Expression der Lp-PLA2-mRNA-Transkripte, fallen bereits innerhalb der CKD-5D-Gruppe (siehe Tabelle 22 + 27) auffällige Korrelationen auf. Die Expression scheint mit dem Fettstoffwechsel assoziiert zu sein. Innerhalb der gesamten CKD-5D-Gruppe zeigt sich eine positive Korrelation zu Triglyceriden sowie eine negative Korrelation zu HDL. Diese auffälligen Wechselbeziehungen setzen sich innerhalb des gesplitteten Kollektivs bei den A+ Personen deutlich ausgeprägt fort (siehe Tabelle 27), wenngleich nicht signifikant. Die genaue Bedeutung der negativen Korrelation zwischen den Lp-PLA2-Transkripten und HDL bleibt fraglich. Die bereits in Tabelle 22 beschriebene signifikant gemessene Korrelation der Lp-PLA2-mRNA-Expression mit den inflammatorischen CD16+ Mo2-Zellen setzt sich deutlich bei den A+ CKD-5D-Patienten fort (siehe Tabelle 27).

**Tabelle 27:** Korrelationen der Lp-PLA2- Aktivität und –mRNA-Expression innerhalb der gesamten CKD-5D-Gruppe sowie unterteilt nach dem Atherosklerosegrad; die Daten repräsentieren den Spearman Rang Koeffizienten (r) \*fett = p<0.05

	Lp-PLA2 Aktivität CKD-5D (N=60)	mRNA Lp- PLA2 (leukozytär) CKD-5D (N=60)	Lp-PLA2 Aktivität CKD-5D (A-) (N=37)	mRNA Lp- PLA2 (leukozytär) CKD-5D (A-) (N=37)	Lp-PLA2 Aktivität CKD-5D (A+) (N=23)	mRNA Lp- PLA2 (leukozytär) CKD-5D (A+) (N=23)
<b>Triglyzeride</b>	0.131	<b>0.332*</b>	0.254	0.285	-0.077	0.328
<b>Cholesterol</b>	0.039	0.131	0.094	-0.001	-0.238	0.387
<b>HDL</b>	-0.140	<b>-0.317*</b>	-0.114	-0.271	-0.133	-0.317
<b>LDL</b>	0.126	0.112	0.172	-0.047	-0.073	0.304
<b>%Mo1</b>	-0.147	-0.165	-0.077	-0.048	-0.144	-0.230
<b>%Mo2</b>	0.101	<b>0.317*</b>	-0.084	0.209	0.262	<b>0.436*</b>
<b>%Mo3</b>	0.141	0.074	0.107	-0.014	0.097	0.100

#### 4.7 Lp-PLA2-mRNA-Expression in verschiedenen Zellpopulationen

Da die Lp-PLA2-mRNA-Expression in Leukozyten signifikant unterschiedlich zwischen HD-Patienten und Kontrollen gemessen wurde (siehe Tabelle 13), wurde bestimmt, welcher leukozytäre Zelltyp welchen Anteil an der Expression der Lp-PLA2-mRNA-Transkripte hat. Wie in Abbildung 10 dargestellt, wird in Lymphozyten praktisch keine Lp-PLA2-mRNA exprimiert. Innerhalb der granulozytären Frequenz ist eine geringe Expression gemessen worden. Die Lp-PLA2-Expression zeigte sich innerhalb der Monozyten-Population ca. 10-fach höher als in den anderen leukozytären Zellen, so dass die Monozyten als die Hauptquelle für Lp-PLA2-Transkripte unter den Leukozyten im Plasma bezeichnet werden können. Somit konnte die leukozytär gemessene Lp-PLA2-mRNA-Expression mit der monozytären Expression gleichgesetzt werden.



**Abbildung 10:** Lp-PLA2-mRNA-Expression in: G= Granulozyten, L= Lymphozyten, M= Monozyten

#### 4.8 Erfassung der Medikamenteneinnahme innerhalb des CDK-5D-Kollektivs

In Tabelle 28 ist der prozentuale Anteil der Patienten erfasst, die das jeweilige Medikament in der ärztlich angeordneten Medikamentenliste des KfH in Halle zu der Zeit der Untersuchung aufwiesen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede bei der Medikation zwischen Athero+ und Athero- Patienten gefunden werden. Insgesamt zeigte sich eine sehr homogene Medikamenteneinnahme innerhalb der CKD-5D-Gruppe.

Ein Fokus der Untersuchung lag in der Überprüfung der entzündlichen Parameter in Bezug auf eine Statintherapie. Ein möglicher Einfluss einer Statintherapie auf die Werte unseres Dialysekollektivs (60 HD-

Patienten) sollte verifiziert werden. Durch unsere Querschnittstudie konnten zum Zeitpunkt der Untersuchung keine signifikanten Einflüsse auf inflammatorische Parameter und Monozytenverteilung durch eine Statintherapie gefunden werden (siehe Tabelle 29).

Bei der Betrachtung des CKD-5D-Kollektivs, unterteilt nach ACE-I- (siehe Tabelle 30) bzw. ARB-Einnahme (siehe Tabelle 31), zeigten sich insgesamt wenige Unterschiede zwischen den jeweiligen Gruppen. Ein signifikanter Unterschied fällt zwischen Dialysepatienten mit und ohne ACE-I-Einnahme auf. Bei Patienten, die zum Zeitpunkt der Analyse ACE-Hemmer in ihrer Medikation aufwiesen, wurden signifikant höhere Werte für die leukozytäre Lp-PLA2-mRNA-Expression festgestellt (Tabelle 30).

**Tabelle 28:** Medikation der CKD-5D Patienten mit (A +) und ohne (A-) Atherosklerose

	<b>CKD-5D A (-) (N=37)</b>	<b>CKD-5D A (+) (N=23)</b>	<b>Statistik</b>
<b>ACE-I (%)</b>	24.3	17.4	0.7486
<b>ARB (%)</b>	43.2	52.2	0.431
<b>Statine (%)</b>	43.2	39.1	0.7936
<b>Diuretika (%)</b>	75.5	60.9	0.5750
<b>β-Blocker (%)</b>	83.8	82.6	1.0
<b>CCB (%)</b>	35.1	30.4	0.783
<b>Allopurinol (%)</b>	8.1	13.0	0.666
<b>Clonidin/Moxonidin (%)</b>	13.5	17.4	0.7215
<b>ASS (%)</b>	56.8	56.5	1.0
<b>Minoxidil (%)</b>	8.1	8.7	1.0
<b>Azetidone (%)</b>	0	4.3	0.3833
<b>VitD (%)</b>	91.9	91.3	1.0
<b>Corticosteroide (%)</b>	21.6	8.7	0.134

**Tabelle 29:** Splittung des CKD-5D-Kollektivs nach Statinmedikation und Überprüfung von inflammatorischen Parametern (\*Statistik: T-Test für die Mittelwertgleichheit)

Statin-Einnahme	Keine Einnahme (St-) (N=35)	Einnahme (St+) (N=25)	Statistik(*)
RQ LpPLA (*leukozytär)	5,4 ± 0,57	5,3 ± 0,40	0,760
RQ ACE (*leukzytär)	4,9 ± 0,50	4,9 ± 0,29	0,622
Log CRP	1,6 ± 0,56	1,7 ± 0,50	0,657
Lp-PLA2 Aktivität (µmol/ml/min)	0,0189 ± 0,0048	0,0176 ± 0,0049	0,323
Mo1 (%)	81,0 ± 6,9	80,5 ± 9,5	0,806
Mo2 (%)	8,4 ± 2,6	8,4 ± 2,9	0,894
Mo3 (%)	10,6 ± 5,1	11,2 ± 7,5	0,704

Abkürzungen: RQ = leukozytäre Expression

**Tabelle 30:** Splittung des CKD-5D-Kollektivs nach ACE-Hemmern und Überprüfung von inflammatorischen Parametern (\*Statistik: T-Test für die Mittelwertgleichheit); **\*\*fett** = statistisch signifikant

ACE-Einnahme	Keine Einnahme (ACE-I -) (N=47)	Einnahme (ACE-I +) (N=13)	Statistik(*)
RQ LpPLA (*leukozytär)	5,3 ± 0,47	5,6 ± 0,56	<b>0,023**</b>
RQ ACE (*leukzytär)	4,9 ± 0,42	4,9 ± 0,45	0,599
Log CRP	1,6 ± 0,52	1,8 ± 0,55	0,571
Lp-PLA2 Aktivität (µmol/ml/min)	0,0182 ± 0,0048	0,0190 ± 0,0054	0,571
Mo1 (%)	80,0 ± 7,8	83,9 ± 8,3	0,117
Mo2 (%)	8,6 ± 2,5	7,7 ± 3,4	0,290
Mo3 (%)	11,5 ± 6,2	8,4 ± 5,4	0,114

Abkürzungen: RQ = leukozytäre Expression

**Tabelle 31:** Splittung des CKD-5D-Kollektivs nach ARB - Medikation und Überprüfung von inflammatorischen Parametern (\*Statistik: T-Test für die Mittelwertgleichheit)

ARB-Einnahme	Keine Einnahme (ARB-) (N=33)	Einnahme (ARB+) (N=27)	Statistik(*)
RQ LpPLA (*leukozytär)	5,4360	5,2765	0,225
RQ ACE (*leukzytär)	4,8629	4,9019	0,725
Log CRP	1,6884	1,5979	0,519
Lp-PLA2 Aktivität (µmol/ml/min)	0,01889	0,01767	0,334
Mo1 (%)	81,630	79,743	0,369
Mo2 (%)	8,256	8,581	0,647
Mo3 (%)	10,114	11,676	0,331

Abkürzungen: RQ = leukozytäre Expression

#### 4.9 Splittung der CDK5-Gruppe anhand einer Diabetes- Mellitus- Erkrankung

Um einen möglichen Einfluss auf die CKD-5D-Gruppe durch eine Diabetes-Mellitus-Erkrankung zu überprüfen, wurde das Kollektiv in Personen mit (D+) und ohne (D-) Diabetes-Erkrankung aufgeteilt (siehe Tabelle 32). D+ - Probanden litten signifikant häufiger an Atherosklerose ( $p=0,042$ ), was bei einer bestehenden Diabetes-Mellitus-Erkrankung, als klassischer kardiovaskulärer Risikofaktor bekannt, nicht überraschte. Es konnten keine weiteren signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen gefunden werden.

Die Vermutung, eine Diabetes-Mellitus-Erkrankung als wichtiger kardiovaskulär relevanter Einflussfaktor könnte Einflüsse auf die untersuchten proinflammatorischen Parameter haben, konnte in diesem Vergleich nicht bestätigt werden. Die beiden Gruppen unterscheiden sich nicht im Hinblick auf das Alter und das Geschlecht. Die Lp-PLA2 – Aktivität, die leukozytäre Lp-PLA2 – und ACE-mRNA-Expression sowie die Monozytenmessungen unterscheiden sich nicht statistisch relevant zwischen diabetischen und nicht-diabetischen CKD-5D Patienten (siehe Tabelle 32).

**Tabelle 32** Spaltung der CKD-5D-Gruppe anhand einer Diabetes Mellitus Erkrankung (\*Chi-Quadrat-Test; \*\*fett = signifikant)

	CKD-5D (D-) Diabetes negativ (N=38)	CKD-5D (D+) Diabetes positiv (N=22)	Statistik
Alter	59,4±14,7	67,3±15,9	0,056
Geschlecht m/f	25/13	12/10	0,781
BMI	25,8±4,3	26,8±6,2	0,466
CRP	8,2±9,1	8,8±10,8	0,836
Leukozyten (G/L)	7,2±2,9	6,9±2,8	0,699
Kreatinin	785,6±292,0	779,1±249,6	0,931
Harnstoff	21,0±7,4	23,7±6,0	0,148
Albumin	3,9±0,6	3,9±0,3	0,926
Gesamteiweiß	64,9±6,3	66,8±4,7	0,228
HbA1c	38,5±8,7	42,1±9,6	0,133
Cholesterin	4,5±1,1	4,3±1,3	0,502
Triglyceride	2,0±1,4	2,3±1,3	0,535
HDL	1,4±0,7	1,2±0,5	0,161
LDL	2,5±0,9	2,4±1,0	0,589
Athersklerose (J/N)	11/27	12/10	<b>0,042**</b>
Hypertonie (J/N)	35/3	21/1	1,0
KHK (J/N)	14/24	12/10	0,280
HI/BY/PTCA(J/N)	4/2/32	4/2/16	0,765*
pAVK	5/33	5/17	0,474
Apoplex	2/36	2/20	0,619
ASS-Einnahme (J/N)	18/20	16/6	0,065
Statine (J/N)	16/22	9/13	1,0
ACE-Hemmer (J/N)	6/32	7/15	0,197
ARB (J/N)	14/24	13/9	0,113
Beta-Blocker (J/N)	30/8	20/2	0,299
Raucher J/N	18/20	7/15	0,239*
systolischer RR Arm (mmHg)	122±29	133±26	0,188
systolischer RR Bein (mmHg)	144±56	180±71	0,054

<b>TBQ</b>	1,3±0,6	1,4±0,5	0,504
<b>Dialysealter</b>	6,8±4,7	7,5±5,7	0,596
<b>Mo1 (%)</b>	81,7±6,6	79,1±9,9	0,235
<b>Mo2 (%)</b>	8,1±2,7	8,9±2,8	0,334
<b>Mo3 (%)</b>	10,1±4,9	12,0±7,9	0,260
<b>RQ LpPLA (*leukozytär)</b>	5,3±0,5	5,4±0,5	0,691
<b>RQ ACE (*leukozytär)</b>	4,8±0,4	5,0±0,5	0,170
<b>Lp-PLA2 Aktivität (µmol/ml/min)</b>	0,018±0,005	0,019±0,005	0,560

Abkürzungen: RQ = leukozytäre Expression

## 5 Diskussion

### 5.1 Die Rolle der Monozyten

#### 5.1.1 Monozytensubpopulationen bei Dialysepatienten

In der vorliegenden Studie unterschieden sich Patienten mit dialysepflichtiger Nierenerkrankung beim prozentualen Anteil zirkulierender CD16+ Monozyten gegenüber gesunden Kontrollpersonen deutlich. Diese Ergebnisse bestätigen die gewonnenen Erkenntnisse von Heine et al., die bereits ein erhöhtes Vorkommen dieser Zellen bei CKD-5D-Patienten nachweisen konnten (Heine et al. 2007). Diese Ergebnisse wurden später u.a. durch Ramirez et al. aufgegriffen und bestätigt (Ramirez et al., 2011). Unsere Daten zeigen im Plasma der CKD-5D-Patienten sowohl bei der Mo2- (CD14++CD16+) als auch Mo3-Monozytenpopulation (CD14+CD16++) deutlich signifikant erhöhte Werte. Die signifikanten deutlichen Unterschiede bezüglich der CD16+ Zellen bleiben auch nach Adjustierung für Alter, Geschlecht und LDL-Profil bestehen. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Annahme, dass die CD16+ Monozyten eine proinflammatorische Rolle einnehmen und aufgrund der urämisch/inflammatorischen Stoffwechsellage bei Dialysepatienten mit deutlich höheren Anteilen gemessen werden können. Ein typisches Charakteristikum dieser Zellen ist es, inflammatorische Zytokine zu sezernieren, die bei der Entstehung der endothelialen Dysfunktion eine entscheidende Rolle spielen könnten. Die genaue Rolle der CD16+ Monozyten und deren Zytokinprofil bleibt aber weiterhin unklar (Ramirez et al., 2011). Ramirez et al. unterschieden in ihrer Arbeit lediglich CD16+ und CD16- Monozyten. Die Unterscheidung in drei Subgruppen (Mo1, Mo2, Mo3) ist heute allgemein anerkannt (Ancuta et al., 2003; Ulrich et al., 2010). Eine Erklärung für diese Ergebnisse könnte in prägenden Mikroumweltbedingungen innerhalb des entzündlichen/urämischen Milieus der dialysepflichtigen Patienten zu suchen sein. Insbesondere CD14++ CD16+ (Mo2) scheinen mit einem urämischen atherosklerotischen Hintergrund verbunden zu sein (Heine et al., 2008; Ulrich et al., 2008; Rogacev et al., 2010). In diesen prospektiven Studien wurde überprüft, ob ein

bestimmter Wert (hohe Mo2- Zellzahl, hohe ACE-Expression) mit dem Auftreten eines kardiovaskulären Ereignisses verknüpft ist. Die Messung der Monozytenwerte innerhalb einer Person, zu einem bestimmten Zeitpunkt in einer Querschnittstudie untersucht, wurde bisher nicht durchgeführt.

Bei klassischen Monozyten (CD14 ++ CD16-, Mo1) wird der Fc $\gamma$ III Rezeptor (CD16) unter verschiedenen prägenden Mikro-Umweltbedingungen hochreguliert. Krankheitsassoziierte prägende Faktoren, wie beispielsweise Dyslipidämie mit niedrigem HDL-, hohem LDL- und niedrigem ApoA-1-Anteil, sind potentielle Mechanismen, die zur Differenzierung von Monozyten mit einem CD16-positiven Phänotyp beitragen könnten (Rogacev et al., 2014). Um mögliche Einflussfaktoren auf die Zusammensetzung der Monozyten-Untergruppen zu reduzieren, wurde neben den wichtigen Einflussgrößen Alter und Geschlecht auch für die LDL-Werte adjustiert. Nach dieser Anpassung blieben die Mo2-Anteile bei durchschnittlich 4,0 %, die Mo3-Anteile bei 4,2 % hoch signifikant höher innerhalb der Dialysegruppe. Man kann also konstatieren, dass die inflammatorisch/urämische Stoffwechsellage der Dialyspatienten in deutlichem Ausmaß die CD16+ Monozyten einschließt.

Diese Ergebnisse ließen nun vermuten, dass diese Unterschiede auch innerhalb der CKD-5D-Gruppe zwischen Patienten mit (A+) und ohne Atherosklerose (A-) nachweisbar sein müssten. Wenn die CD16+-Monozyten eine entscheidende Rolle bei der Initiierung der endothelialen Schäden spielen, die schlussendlich zur Bildung von atherosklerotischen Plaques führen können, sollte sich dies in den Ergebnissen innerhalb der CKD-5D-Gruppe widerspiegeln. Tatsächlich aber zeigten sich keine relevanten Unterschiede bezüglich der Monozytenfrequenzen beim Vergleich der A+ und A- Patienten innerhalb der CKD-5D-Gruppe. Diese Ergebnisse verwunderten, da die Annahme, dass die Entstehung der Atherosklerose auf inflammatorischen Prozessen u.a. in Verbindung mit der CD16+ Monozytenzellreihe beruht, vermuten ließ, dass wir zwischen den Patienten relevante Unterschiede finden würden. Es konnte lediglich ein Trend zu einer höheren Mo3-Population bei A+ beobachtet werden.

Es ist bekannt, dass Monozyten an allen Stadien der Atherosklerose teilnehmen. Die unterschiedliche Funktion jeder Untergruppe in verschiedenen Stadien der Erkrankung ist aber noch nicht geklärt. Die Rolle der nicht-klassischen Monozyten (Mo2 und Mo3) wird weiterhin diskutiert. Die Monozyten der CD16+ Zellreihe sind potente Produzenten von inflammatorischen Zytokinen und mit einem hohen Potenzial für die subendotheliale Migration ausgestattet (Skrzeczyńska-Moncznik et al., 2008). Möglicherweise ist es die Hauptaufgabe dieser Zellen, entlang des vaskulären Endothels zu patrouillieren. Die Endothelzellen rekrutieren unter bestimmten Bedingungen diese Zellen. Durch diese Rekrutierung könnte somit das inflammatorische Milieu und damit die fokalen Nekrosen im Endothel induziert werden (Nahrendorf und Swirski 2013; Carlin et al., 2013). Der gefundene, in unserer Untersuchung nicht signifikant gemessene Trend zu höheren Mo3-Zell-Anteilen sollte in nachfolgenden Studien weiter verfolgt werden.

## 5.2 Die Rolle der Lp-PLA2

### 5.2.1 Plasma Lp-PLA2-Aktivität und Lp-PLA2-mRNA-Expression im Kontext der dialysepflichtigen Niereninsuffizienz

Wir untersuchten in dieser Studie, wie sich die Lp-PLA2-Aktivität und die Lp-PLA2-mRNA-Expression bei Patienten mit endgradig eingeschränkter Nierenfunktion unter einer Hämodialysebehandlung im Vergleich zu den Parametern bei gesunden Kontrollpersonen verhalten. Aufgrund seiner Funktionalität, proinflammatorische Mediatoren zu erzeugen, wurde Lp-PLA2 als Risikomarker für die Entstehung von Atherosklerose in verschiedenen Studien benannt (Caslake et al., 2000; Corson et al., 2008; Anderson 2008). Bei Patienten mit Karotisstenose wurde bereits nachgewiesen, dass die Schwere dieser Atherosklerosemanifestation mit Lp-PLA2 korreliert (Charniot et al. 2013). Ebenso ist die besondere Bedeutung der inflammatorischen Komponente bei der Entstehung atherosklerotischer Plaques bekannt, insbesondere bei Patienten mit urämischer Stoffwechsellage (Betjes, Michiel G H 2013). In unserem Patientengut (Dialysebehandlung) ist die genaueste Erforschung der Vorgänge bei der Atherosklerosemanifestation von hervorragender Bedeutung.

In unserer Studie zeigte sich, dass sowohl die Lp-PLA2-Aktivität als auch die mRNA-Expression bei Patienten mit dialysepflichtiger Nierenerkrankung im Vergleich zu gesunden Kontrollpatienten stark erhöht ist. Diese Ergebnisse hielten auch der Adjustierung für Alter, Geschlecht und LDL-Profil, also Parametern, die sich signifikant zwischen den beiden Gruppen unterschieden, stand. Insbesondere die Adjustierung für das LDL-Profil erschien unserer Arbeitsgruppe sehr sinnvoll. LDL-Partikel sorgen innerhalb des Plasmas für den Transport der Lp-PLA2, welches auf der Oberfläche der Fettpartikel gebunden vorliegt und entscheidend an der oxidativen Modifikation der Lipoproteine beteiligt ist (Steinbrecher und Pritchard, 1989; Tew et al., 1996; Macphee et al., 1999).

Die eindeutigen Ergebnisse erscheinen plausibel, da die urämische Stoffwechsellage der Dialysepatienten spezielle Risikofaktoren, wie beispielsweise chronische inflammatorische Vorgänge, fördert und so die Entstehung atherosklerotischer Plaques begünstigt wird (Cai et al., 2013). Unsere Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass Lp-PLA2 ein entscheidender Faktor inflammatorischer Vorgänge ist und somit möglicherweise auch an der Entstehung atherosklerotischer Plaques beteiligt sein könnte. Die genaue pathophysiologische Rolle des Enzyms bleibt aber, trotz deutlicher Anzeichen, weiter ungeklärt.

Die Unterteilung innerhalb der Dialysegruppe in Patienten mit (A+) und ohne (A-) Anzeichen subklinischer Atherosklerose zeigte, dass die Lp-PLA2-Aktivität bei den HD-Patienten mit Anzeichen für Atherosklerose (A+) im Plasma erhöht war. Für die Expression der mRNA-Transkripte konnte dies nicht bestätigt werden. Der Grund für diese fehlenden Unterschiede bei der Expression der Transkripte liegt möglicherweise im Expressionsort des Enzyms verborgen. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass ausgewanderte Gewebsmakrophagen und die sich innerhalb der Gefäßwand aus diesen Makrophagen entwickelnden

Schaumzellen die Hauptquelle für Lp-PLA2 und damit auch der mRNA-Transkripte darstellen (Stafforini et al., 1990; Ferguson et al., 2012). Diese Expressionsquelle kann natürlich in den Zellen des Blutes nicht von uns erfasst werden. Weiterhin ist die Bedeutung der extraleukozytären Lp-PLA2-Expression beispielsweise im Lungengewebe (Salluh et al., 2007; Howard, 2009) nicht geklärt.

Ein weiterer interessanter Unterschied zwischen A+ und A- zeigte sich bei der Betrachtung der HbA1c-Werte und des Alters der Patienten. Im Plasma der insgesamt älteren Athero+ Gruppe wurden signifikant höhere HbA1c-Werte gemessen. Die beiden Gruppen unterschieden sich also in wesentlichen Punkten, die das kardiovaskuläre Risikoprofil der Patienten beeinflussen konnten. Zum einen schienen die A+ -Patienten eine z.T. gestörte Glukosetoleranz aufzuweisen, zum anderen sind ältere Menschen natürlich gefährdeter, atherosklerotische Veränderungen zu entwickeln. Die Annahme, die Lp-PLA2-Aktivität könnte aus diesen Ergebnissen als unabhängiger Risikomarker für eine subklinische Atherosklerose hervorgehen, musste also zunächst einer Adjustierung dieser Unterschiede standhalten. Da die Ergebnisse nach der Adjustierung sowohl für das Alter als auch für die Unterschiede im HbA1c –Profil bestätigt werden konnten, kann die Lp-PLA2-Aktivität in unserer Studie als unabhängiger Prädiktor für eine subklinische Atherosklerose bei Patienten mit endgradig eingeschränkter Nierenfunktion und Dialysebehandlung (CKD-5D) bezeichnet werden.

Die erhöhten HbA1c-Werte ließen zunächst den Einfluss einer gestörten Glukosetoleranz auf die Ergebnisse vermuten. Tatsächlich zeigten bereits Winkler et al. , dass das kardiovaskuläre Outcome und die Gesamtmortalität bei Patienten mit Diabetes Mellitus Typ 2 unter Hämodialyse mit der Lp-PLA2-Aktivität korreliert (Winkler et al. 2012a). Aufgrund dieser Ergebnisse führten wir eine weitere Auswertung innerhalb der HD-Gruppe durch. Stratifiziert nach einer Diabetes-Mellitus-Erkrankung, zeigten die Patienten mit gestörtem Glukosestoffwechsel zwar erwartungsgemäß höhere HbA1c-Spiegel (knapp nicht signifikant), Unterschiede bei Lp-PLA2-Aktivität und –Expression konnten in unserer Studie nicht nachgewiesen werden. Die Arbeitsgruppe um Winkler et al. untersuchte über 1200 Patienten in einer Post-hoc-Analyse einer kontrollierten Studie, der „German Diabetes Dialysis Study“, mit einem 4-Jahres-Follow-up. Die Korrelationen der Lp-PLA2-Aktivität mit der Mortalität und dem kardiovaskulärem Outcome der Diabetes-Patienten, die in dieser über einen langen Zeitraum angelegten und mit einer großen Teilnehmerzahl arbeitenden Studie gefunden wurden, warfen die Frage nach einer Beeinflussung des Lp-PLA2-Profiles durch ein diabetische Stoffwechsellage bei Dialysepatienten auf. Unsere Arbeitsgruppe ging nun dieser Frage in einer Momentaufnahme im Rahmen einer Querschnittstudie nach. Unsere Ergebnisse zeigen, dass es keine Beeinflussung des inflammatorischen Profils bei Dialysepatienten durch eine diabetische Stoffwechsellage zu geben scheint.

Insgesamt stehen unsere Ergebnisse, die nun zum ersten Mal die plasmatische Lp-PLA2-Aktivität als unabhängigen Prädiktor für eine subklinische Atherosklerose bei niereninsuffizienten Dialysepatienten beschreiben, im Einklang mit Studien, die die Lp-PLA2-Aktivität als einen unabhängiger Prädiktor für kardiovaskuläre Ereignisse bei Nierengesunden postulieren (Packard et al., 2000; Charniot et al., 2013). Die

Höhe der Lp-PLA2 – Aktivität scheint also mit der atherosklerotischen Belastung der Dialysepatienten verbunden zu sein. Diese Verbindungen wurden aber auch für andere inflammatorische Biomarker wie z.B für CRP gefunden, allerdings nicht unabhängig von anderen kardiovaskulären Risikofaktoren, nicht spezifisch untersucht in einem reinen CKD-5D-Kollektiv und nur in sehr schwacher Ausprägung (Khera et al., 2006). Es muss die Möglichkeit in die Überlegungen einbezogen werden, dass die gemessenen Werte neben der atherosklerotischen Belastung, auch die Atherosklerose - Aktivität und - Anfälligkeit widerspiegeln könnten. Ähnliche Vermutungen sind auch der Arbeit von Brilakis et al. in Bezug auf die Lp-PLA2 – Masse zu entnehmen (Brilakis et al., 2008). Ob Lp-PLA2 im Gebrauch als klinischer Parameter geeignet ist, der, einmalig gemessen, eine kardiovaskuläre Risikoabschätzung erlauben könnte, bleibt fraglich.

### **5.2.2 Korrelationen der Lp-PLA2-Aktivität sowie der Lp-PLA2-mRNA-Expression**

Interessanterweise korreliert die Lp-PLA2-Aktivität nicht mit der der Messung der Lp-PLA2-mRNA- Expression innerhalb von Leukozyten. Die Messung der Expression von Lp-PLA2-mRNA ergab, dass die Transkripte dieses Enzyms innerhalb der leukozytären Zellen im Blut zum größten Teil in Monozyten bereitgestellt werden. Wie in 5.7 beschrieben, konnte die leukozytär gemessene Lp-PLA2-Expression direkt mit der monozytären-Expression gleichgesetzt werden. Dass Zellen monozytären Ursprungs die entscheidende Quelle der Lp-PLA2-Produktion darzustellen scheinen, konnte mit unseren Ergebnissen untermauert werden.

Die fehlende Korrelation zwischen der gemessenen Aktivität des Enzyms und der leukozytären mRNA-Expression könnte durch die relativ geringe Menge von Lp-PLA2 erklärt werden, welche von Monozyten im Vergleich zu differenzierten Gewebsmakrophagen und Schaumzellen produziert wird. Tatsächlich liefern verschiedene Studien den Nachweis, dass während der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen die Expression von Lp-PLA2 in den Zellen hochreguliert wird. Besonders hohe Werte wurden während des Prozesses der Atherosklerose-Entstehung innerhalb von Schaumzellen gemessen (Stafforini et al., 1990; Ferguson et al., 2012). Sollte die Annahme zutreffen, dass erst mit der Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen eine Hochregulierung der Lp-PLA2-Expression stattfindet, kann eine Korrelation zwischen monozytärer Lp-PLA2- Expression und der plasmatischen Aktivität nur unzureichend einen Zusammenhang widerspiegeln. Die Korrelation der Lp-PLA2-Aktivität mit der Messung der Transkripte des Enzyms sollte in nachfolgenden Arbeiten auf die Monozyten-Subpopulationsebene ausgeweitet werden, um möglicherweise hier genauere Hinweise auf Zusammenhänge zu bekommen. Ein Hinweis auf einen möglichen Zusammenhang in dieser Richtung liefert die starke Korrelation der gemessenen leukozytären Lp-PLA2-Expression mit entzündlichen Mo2-Zellen sowohl in der gesamten CKD-5D-Gruppe als auch bei den A+ Patienten. Dieser Trend unterstützt die Annahme, dass vor allem die Mo2-Population mit einem urämisch/atherosklerotischen Hintergrund bei Dialysepatienten assoziiert zu sein scheint (Heine et al., 2008; Ulrich et al., 2008; Rogacev et al., 2010). Auch hier ist es für zukünftige Arbeiten wichtig, innerhalb der Monozytensubpopulationen die Expressionshäufigkeit der Lp-PLA2-Transkripte zu spezifizieren, da ein genauer Nachweis der für die Lp-PLA2-Expression mitverantwortlichen Monozytenzellreihen bisher nicht erbracht wurde. Die Haupt-LP-PLA2-

Aktivitätsquelle sind höchstwahrscheinlich Makrophagen und sich daraus entwickelnde Schaumzellen, deren Ursprung wiederum vermutlich in erster Linie in Mo1 und Mo2 zu finden ist. Sie könnten die wahren Quellen der Enzymaktivität nach Differenzierung der Vorläuferzellen darstellen. Interessant wäre weiterhin, welche der Monozytensubpopulationen sich zu der Hauptquelle, also Lp-PLA2 produzierenden Makrophagen und Schaumzellen, differenziert, oder ob Schaumzellen sogar möglicherweise zufällig aus allen Subpopulationen entstehen.

Um genauere Aussagen über die Korrelationen zwischen Lp-PLA2 und den monozytären Subpopulationen treffen zu können, erscheint möglicherweise das Patientenkollektiv zu klein. Größere Studien könnten die beobachteten Ergebnisse weiter verfolgen.

Weiterhin bleibt zu diskutieren, inwiefern andere Gewebe die systemische Lp-PLA2-Aktivität und –Masse beeinflussen. Ein nicht unerheblicher Anteil der Lp-PLA2-Aktivität könnte bspw. aus der Produktion des Lungengewebes stammen (Salluh et al., 2007).

### **5.3 Die Rolle des ACE**

#### **5.3.1 ACE-mRNA-Expression im Kontext der Dialysebehandlung**

Unsere Arbeitsgruppe konnte in zwei verschiedenen prospektiven Untersuchungen bei endgradig niereninsuffizienten Patienten bereits die Bedeutung der ACE-Expression auf der monozytären Oberfläche nachweisen: als Prädiktor für die Mortalität einerseits, sowie in Assoziation mit der Mo2-Zellfraktion als Prädiktor für kardiovaskuläre Erkrankungen andererseits (Ulrich et al., 2010; Ulrich et al., 2011). Das Ziel der vorliegenden Querschnittstudie war es nun, mit einer Messung der leukozytären ACE-mRNA-Expression den Nachweis zu erbringen, dass diese als unabhängiger Prädiktor für eine subklinische Atherosklerose bei niereninsuffizienten Patienten fungieren kann. Ähnlich der Ergebnisse für die Lp-PLA2-Aktivität sowie für die –mRNA-Expression zeigte auch die leukozytäre ACE-mRNA-Expression einen hoch signifikanten Unterschied beim Vergleich der CKD-5D-Gruppe zu den gesunden Kontrollpersonen. Die erhöhte ACE-Expression scheint neben den erhöhten Werten der inflammatorischen Mo2/Mo3-Populationen, der Lp-PLA2-Aktivität und der erhöhten Lp-PLA2-mRNA-Expression die chronisch entzündlich/urämische Stoffwechsellage der CKD-5D-Patienten zum Teil widerzuspiegeln (Moradi et al., 2013). Auch nach Adjustierung der Ergebnisse im Linearen Regressionsmodell für das Alter, das Geschlecht und das LDL-Profil der Probanden blieben die Ergebnisse für die ACE-mRNA-Expression statistisch signifikant. Die im Durchschnitt um 0,368 Log RQ höher gemessenen Werte innerhalb des CKD-5D-Kollektivs bedeuten auch absolut gesehen einen sehr deutlichen Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Die Expression der ACE-Transkripte stellt einen weiteren Baustein des inflammatorischen Profils von Dialysepatienten dar, deren genaue Bedeutung zwar weiterhin nicht bekannt ist, in deren Gesamtheit aber wahrscheinlich das hohe kardiovaskuläre Risiko zu suchen ist. Unsere Arbeitsgruppe konnte nun zum ersten Mal in einer Querschnittstudie die erhöhte leukozytäre ACE-mRNA-Expression bei Dialysepatienten gegenüber gesunden Kontrollen nachweisen.

Nach der Splittung der CKD-5D-Gruppe in A+ und A- konnten keine Unterschiede bezüglich der leukozytären ACE-mRNA-Expression gefunden werden. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass die leukozytäre ACE-Expression in unserer Querschnittstudie keinen starken unabhängigen Prädiktor für Atherosklerose bei CKD-5D-Patienten darstellt. Bei dieser Momentaufnahme der plasmatischen Expression der ACE-Transkripte war kein Zusammenhang zum Atherosklerosegrad zu erkennen. Einen so aufwendig zu bestimmenden Parameter prospektiv über einen längeren Zeitraum mehrere Male zu bestimmen, macht in der klinischen Routine keinen Sinn, sollte aber, um die genauen Zusammenhänge der Expression dieses Enzyms innerhalb der Monozyten-Frequenzen genauer zu verstehen, ähnlich der Lp-PLA2 in folgenden Arbeiten spezifisch in den Monozyten-Subpopulationen nachgewiesen werden.

#### **5.4 Einfluss der Medikamenteneinnahme bei den Dialysepatienten**

Bei der Medikamenteneinnahme zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen A+ und A- innerhalb der CKD-5D-Gruppe. Gerade im Hinblick auf die Ergebnisse von McConnell et al., die eine Senkung der Lp-PLA2-Konzentration im Plasma durch die Einnahme von Statinen in ihrer Arbeit beschrieben haben (McConnell und Hoefner, 2006) und die Ergebnisse von Winkler et al., die in ihrer prospektiven Studie von 2012 den Einfluss einer Atorvastatin Therapie auf die Lp-PLA2-Werte innerhalb eines großen Studienkollektivs (1202 Patienten) nachweisen konnten, betrachteten wir die Statineinnahme ebenfalls mit besonderem Interesse. In dieser Studie wurde neben der prädiktiven Validität der LpPLA2-Aktivität für das kardiovaskuläre Outcome und die Gesamtmortalität auch die Reduktion der LpPLA2-Aktivität durch eine Atorvastatin–Therapie beschrieben. Diese Reduktion ging mit einer verminderten Mortalität bei Patienten unter Hämodialyse einher (Winkler et al. 2012a). Es zeigte sich bei unseren Patienten eine leicht höhere Einnahmefrequenz unter den A- Patienten. Unsere Ergebnisse können den gezeigten Trend einer erniedrigten Lp-PLA2-Aktivität durch Statineinnahme nicht bestätigen. Innerhalb des inflammatorischen Profils der CKD-5D-Patienten konnten keinerlei signifikante Beeinflussungen gefunden werden.

Auch mit der Einnahme von ACE-I und ARB scheint die Lp-PLA2-Aktivität assoziiert zu sein (Charniot et al. 2013). Bei der Überprüfung der Korrelationen zwischen den entzündlichen Parametern und der Einnahme von ACE-I sowie ARB zeigten sich, ähnlich den Ergebnissen bei den Statinen, keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Lp-PLA2-Aktivität innerhalb der CKD-5D-Gruppe. Für die genaue Überprüfung der medikamentösen Einflüsse auf das inflammatorische Profil sollten größere Studien diese sehr interessanten Ansätze weiter verfolgen. Der Fokus sollte hier auf die drei o.g. Medikamentengruppen gelegt werden.

Ein Grund für die fehlenden Beeinflussungen der Lp-PLA2-Werte durch Statine, ACE-I und ARB könnte unser kleines Studienkollektiv sein. Winkler et. al. untersuchten 1202, Charniot et al. 494 Patienten und konnten evtl. durch diese sehr viel größere Anzahl untersuchter Teilnehmer auch weniger eindeutige Unterschiede innerhalb der Gruppe nachweisen.

## 5.5 Einfluss einer Diabetes- Mellitus- Erkrankung auf die Ergebnisse

Um weitere mögliche Einflussfaktoren auf den Stoffwechsel und damit auch auf unsere Ergebnisse zu überprüfen, führten wir eine Auswertung innerhalb der CKD-5D-Gruppe bezüglich einer Diabetes-Mellitus Erkrankung durch. Winkler et al. konnten 2012 zeigen, dass die Lp-PLA2-Aktivität bei Dialysepatienten mit Diabetes-Mellitus-Erkrankung einen prädiktiven Wert für das kardiovaskuläre Outcome sowie die Gesamtmortalität bietet (Winkler et al. 2012b). In unserer Auswertung wollte unsere Arbeitsgruppe nun überprüfen, ob möglicherweise eine Diabetes-Mellitus-Erkrankung selbst Einfluss auf Monozytensubpopulationen, Lp-PLA2 und ACE haben könnte. Es zeigt sich ein statistisch signifikanter Unterschied im Hinblick auf das Vorliegen einer Atherosklerose. Patienten, die an Diabetes Mellitus litten, zeigten häufiger atherosklerotische Veränderungen. Dies ist für einen der Hauptrisikofaktoren kardiovaskulärer Erkrankungen nicht weiter verwunderlich. Ein erhöhter HbA1c Wert konnte innerhalb der D+ Gruppe erwartet werden ( $42,1 \pm 9,6$  vs.  $38,5 \pm 8,7$ ). Ein leichter Trend zu erhöhten Mo3-Zahlen ist zu erkennen, der aber deutlich das Signifikanzniveau verfehlt.

## 5.6 Einschränkungen

Die Hauptbeschränkung der Studie ist die kleine Gruppe von HD-Patienten, bei denen eine Expressionsanalyse durchgeführt werden konnte. Trotzdem geben unsere Daten einen Einblick in den Bereich der leukozytären Lp-PLA2- und ACE-mRNA-Expression. Weiterhin konnten wir kein genaues Bild vom Lipidprofil der untersuchten Probanden liefern (Apo AI, Apo B, Lp (a) -Spiegel wurden nicht gemessen). Eine hundertprozentige Abnahme der Blutfettwerte in nüchternem Zustand konnte aufgrund der teilweise erst am Nachmittag stattfindenden Dialysebehandlung nicht immer garantiert werden, so dass hier Verfälschungen wahrscheinlich sind. Eine sehr viel genauere Untersuchung des Lipidprofils im Zusammenhang mit den Monozytensubpopulationen, der Lp-PLA2-mRNA-Expression, der LP-PLA2-Aktivität sowie der ACE-Expression wäre für zukünftige Arbeiten wünschenswert.

Eine weitere Einschränkung in Bezug auf die Auswertung der Daten sehe ich in der Einteilung in Atherosklerose positiv (A+) und -negativ (A-). Eine genaue Trennschärfe kann durch die beidseitigen Ultraschalluntersuchungen der Aa. Carotides kaum erreicht werden. Die Beurteilung der Plaques innerhalb der Gefäßwand, die Messung der IMT sowie die genaue Bestimmung der Einengung des Gefäßes unterliegt subjektiven Eindrücken, die in gewisser Weise trotz standardisierten Vorgehens zu Verfälschungen geführt haben könnten. Eine weitere Einschränkung der Trennschärfe liegt in der wenig feinen Unterscheidung zwischen A+ und A- ( $\geq 4$  Punkte= A+;  $< 4$  Punkte= A-). Es sollten hier weitere Faktoren berücksichtigt werden. Beispielsweise könnten gesicherte kardiovaskuläre Diagnosen wie KHK, pAVK, Z.n. Herzinfarkt etc. mit in den Score und damit die Einteilung, ob der Patient als A+ oder A- eingestuft wird, einbezogen werden. So könnten Patienten, bei denen zwar kardiovaskuläre Veränderungen im Körper vorliegen, diese sich aber nicht zwangsläufig innerhalb der Halsschlagadern widerspiegeln, trotzdem als A+ erfasst werden. Patienten, die in

der vorliegenden Arbeit als A- eingestuft wurden, sind keineswegs sicher völlig atherosklerosefrei. So würde ich vorschlagen, Punkte für gesicherte kardiovaskuläre Erkrankungen (KHK, pAVK, Z.n. Herzinfarkt etc.) zu vergeben, um zu verhindern, dass diese Patienten als A- eingestuft werden.

## **6 Zusammenfassung**

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in unserer Studienkohorte die Lp-PLA2-Aktivität bei CKD-5D-Patienten gegenüber gesunden Kontrollpersonen erhöht ist. Weiterhin konnten in diesem Vergleich bei Dialysepatienten erhöhte Werte für die leukozytäre mRNA-Expression von Lp-PLA2 und ACE festgestellt werden. Die Überprüfung der Monozytenfrequenzen zeigte eine deutlich erhöhte Anzahl an CD16+ - Monozyten (Mo2 und Mo3) bei den CKD-5D-Patienten. Diese Ergebnisse hielten auch einer Adjustierung für das Alter, das Geschlecht und das LDL-Profil stand.

Bei der Gegenüberstellung von Patienten mit und ohne atherosklerotischen Veränderungen innerhalb der Dialysegruppe konnten keine signifikanten Unterschiede bei den Monozyten-subpopulationen gefunden werden. Auch die leukozytäre Expression der Lp-PLA2 und der ACE zeigten keine Unterschiede zwischen A+ und A- Patienten.

Die Lp-PLA2-Aktivität wurde bei Patienten mit Atherosklerose (A+) signifikant höher gemessen, als bei Patienten, die als A- eingestuft wurden. Dieses Ergebnis blieb auch nach Adjustierung für Alter und das HbA1c-Profil bestehen. Die Lp-PLA2-Aktivität kann somit als unabhängiger Prädiktor für eine subklinische Atherosklerose bei Dialysepatienten betrachtet werden.

Die leukozytäre Lp-PLA2- und ACE-mRNA-Expression sind bei Dialysepatienten gegenüber gesunden Kontrollpersonen zwar stark erhöht, stellen aber keine unabhängigen Prädiktoren für eine subklinische Atherosklerose bei Dialysepatienten dar.

Die beschriebenen Ergebnisse im Hinblick auf die Monozyten-Subpopulationen untermauern die Ergebnisse anderer Arbeiten, die den inflammatorischen CD16+ Monozyten im urämisch/inflammatorischen Stoffwechsel der CKD-5D-Patienten besondere Bedeutung beimessen. Die Annahme, dass dieser Trend sich auch bei den A+ Patienten innerhalb der CKD-5D-Gruppe fortsetzt, konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

In nachfolgenden Arbeiten sollte eine Überprüfung der Lp-PLA2-mRNA-Expression innerhalb der drei Monozyten-Subpopulationen angestrebt werden. Um die vollständige Bedeutung der Lp-PLA2-mRNA exprimierenden Zellen im Plasma bei CKD-5D-Patienten zu klären, ist es wichtig, das Expressionsprofil innerhalb der monozytären Subpopulationen zu überprüfen. Mit diesen Ergebnissen könnten Aussagen über die Verteilung der Expressionshäufigkeit innerhalb der im Plasma zirkulierenden Monozyten gemacht und auf eine eventuelle Konzentration der Transkription innerhalb einer Gruppe geschlossen werden.

Wie neueste Ergebnisse andeuten, scheinen die selektiven oralen Lp-PLA2-Inhibitoren (Darapladib) die in sie gesteckten Hoffnungen nicht zu bestätigen (White et al., 2014). O'Donoghue et. al zeigten in der SOLID-TIMI

---

52-Studie, dass Darapladib bei 13026 Patienten mit Zustand nach ACS keine Auswirkungen auf schwere koronare Ereignisse im Vergleich zur Placebogabe hatte (O'Donoghue et al., 2014).

Allerdings stehen Untersuchungen zu der Wirksamkeit bei Dialysepatienten bisher aus. Es bleibt abzuwarten, ob die Medikamente in unserem untersuchten Patientengut (Dialysepatienten) überhaupt zugelassen werden und positive Ergebnisse zeigen können.

Die genaue Rolle von Lp-PLA2 in der Initiierung und Destabilisierung von atheromatösen Plaques muss weiter erforscht und präzisiert werden. Interessante Arbeiten von Stafforini et. al postulieren eine mögliche protektive Funktion von Lp-PLA2 bei der vaskulären Inflammation (Rosenson und Stafforini, 2012a). Ob sich Lp-PLA2 als unabhängiger kardiovaskulärer Prädiktor neben den klassischen Risikofaktoren etablieren kann, wird sich zeigen. Ein interessanter Ansatzpunkt für zukünftige Arbeiten ergibt sich bei der geschlechtsspezifischen Auswertung. Es gilt, die Assoziation der Rauchgewohnheiten bei Dialysepatienten mit dem Inflamationsprofil genauer zu untersuchen.

Insbesondere die Unterteilung der CD16+ Monozyten in Mo2 und Mo3 stellt einen wichtigen weiteren Schritt dar, um die genaue Bedeutung der inflammatorischen monozytären Zellen besser zu verstehen. Zweifelsohne sind die CD16+ Monozyten bei dialysepflichtigen Patienten ein wichtiger und weiter zu verfolgender Ansatzpunkt, da die deutlichen Unterschiede dieser Zellreihen zu gesunden Kontrollpersonen mit relevanten Unterschieden im Stoffwechsel verknüpft sein könnten.

**Literaturverzeichnis**

Ancuta, Petronela; Rao, Ravi; Moses, Ashlee; Mehle, Andrew; Shaw, Sunil K.; Luscinskas, F. William; Gabuzda, Dana (2003): Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes. *J Exp Med* 197 (12), 1701–1707. 10.1084/jem.20022156.

Anderson, Jeffrey L. (2008): Lipoprotein-Associated Phospholipase A2: An Independent Predictor of Coronary Artery Disease Events in Primary and Secondary Prevention. *The American Journal of Cardiology* 101 (12), S23-S33. DOI: 10.1016/j.amjcard.2008.04.015.

Astor, Brad C.; Shafi, Tariq; Hoogeveen, Ron C.; Matsushita, Kunihiro; Ballantyne, Christie M.; Inker, Lesley A.; Coresh, Josef (2012): Novel markers of kidney function as predictors of ESRD, cardiovascular disease, and mortality in the general population. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 59 (5), 653–662. 10.1053/j.ajkd.2011.11.042.

Belge, Kai-Uwe; Dayyani, Farshid; Horelt, Alexia; Siedlar, Maciej; Frankenberger, Marion; Frankenberger, Bernhard et al. (2002): The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol* 168 (7), 3536–3542.

Benitez, Sonia; Sanchez-Quesada, Jose Luis; Ribas, Vicent; Jorba, Oscar; Blanco-Vaca, Francisco; Gonzalez-Sastre, Francesc; Ordonez-Llanos, Jordi (2003): Platelet-activating factor acetylhydrolase is mainly associated with electronegative low-density lipoprotein subfraction. *Circulation* 108 (1), 92–96. 10.1161/01.CIR.0000072791.40232.8F.

Betjes, Michiel G H (2013): Immune cell dysfunction and inflammation in end-stage renal disease. *Nat Rev Nephrol* 9 (5), 255–265. 10.1038/nrneph.2013.44.

Bitla, Aparna R.; Reddy, Prabhakar E.; Manohar, Suchitra M.; Vishnubhotla, Sivakumar V.; Pemmaraju Venkata Lakshmi Narasimha, Srinivasa Rao (2010): Effect of a single hemodialysis session on inflammatory markers. *Hemodial Int* 14 (4), 411–417. 10.1111/j.1542-4758.2010.00491.x.

Breit, Samuel N.; Carrero, Juan J.; Tsai, Vicky Wang-Wei; Yagoutifam, Nasreen; Luo, Wei; Kuffner, Tamara et al. (2012): Macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1/GDF15) and mortality in end-stage renal disease. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 27 (1), 70–75. 10.1093/ndt/gfr575.

Brilakis, Emmanouil S.; Khera, Amit; Saeed, Bilal; Banerjee, Subhash; McGuire, Darren K.; Murphy, Sabina A.; de Lemos, James A (2008): Association of lipoprotein-associated phospholipase A2 mass and activity with coronary and aortic atherosclerosis: findings from the Dallas Heart Study. *Clinical chemistry* 54 (12), 1975–1981. 10.1373/clinchem.2008.107359.

Cacciagiú, Leonardo D.; González, Ana I.; Rosso, Leonardo Gomez; Meroño, Tomás; Marziani, Guillermo de; Elbert, Alicia et al. (2012): HDL-associated enzymes and proteins in hemodialysis patients. *Clinical Biochemistry* 45 (3), 243–248. 10.1016/j.clinbiochem.2011.12.008.

Cai, Qiangjun; Mukku, Venkata K.; Ahmad, Masood (2013): Coronary artery disease in patients with chronic kidney disease: a clinical update. *Curr Cardiol Rev* 9 (4), 331–339.

Carlin, Leo M.; Stamatiades, Efsthios G.; Auffray, Cedric; Hanna, Richard N.; Glover, Leanne; Vizcay-Barrena, Gema et al. (2013): Nr4a1-dependent Ly6C(low) monocytes monitor endothelial cells and orchestrate their disposal. *Cell* 153 (2), 362–375. 10.1016/j.cell.2013.03.010.

Caslake, M. J.; Packard, C. J.; Suckling, K. E.; Holmes, S. D.; Chamberlain, P.; Macphee, C. H. (2000): Lipoprotein-associated phospholipase A(2), platelet-activating factor acetylhydrolase: a potential new risk factor for coronary artery disease. *Atherosclerosis* 150 (2), 413–419.

- Caslake, Muriel J.; Packard, Chris J.; Robertson, Michele; Cooney, Josephine; Nelson, Jeanenne J.; Ford, Ian et al. (2010): Lipoprotein-associated phospholipase A2, inflammatory biomarkers, and risk of cardiovascular disease in the Prospective Study of Pravastatin in the Elderly at Risk (PROSPER). *Atherosclerosis* 210 (1), 28–34. 10.1016/j.atherosclerosis.2009.10.041.
- Charniot, J. C.; Khani-Bittar, R.; Albertini, J. P.; Giral, P.; Cherfils, C.; Cosson, C. et al. (2013): Interpretation of lipoprotein-associated phospholipase A2 levels is influenced by cardiac disease, comorbidities, extension of atherosclerosis and treatments. *International journal of cardiology* 168 (1), 132–138. 10.1016/j.ijcard.2012.09.054.
- Cheung, A. K.; Sarnak, M. J.; Yan, G.; Dwyer, J. T.; Heyka, R. J.; Rocco, M. V. et al. (2000): Atherosclerotic cardiovascular disease risks in chronic hemodialysis patients. *Kidney Int* 58 (1), 353–362. 10.1046/j.1523-1755.2000.00173.x.
- Corson, Marshall A.; Jones, Peter H.; Davidson, Michael H. (2008): Review of the evidence for the clinical utility of lipoprotein-associated phospholipase A2 as a cardiovascular risk marker. *The American Journal of Cardiology* 101 (12A), 41F-50F. 10.1016/j.amjcard.2008.04.018.
- Danesh, John; Wheeler, Jeremy G.; Hirschfield, Gideon M.; Eda, Shinichi; Eiriksdottir, Gudny; Rumley, Ann et al. (2004): C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease. *N Engl J Med* 350 (14), 1387–1397. 10.1056/NEJMoa032804.
- Diet, F.; Pratt, R. E.; Berry, G. J.; Momose, N.; Gibbons, G. H.; Dzau, V. J. (1996): Increased accumulation of tissue ACE in human atherosclerotic coronary artery disease. *Circulation* 94 (11), 2756–2767.
- E. Hoberg, J.-C. Galle, et al. (2007): Umsetzungsempfehlungen von Diagnose- und Therapieleitlinien bei chronischen Nierenerkrankungen. *herzmedizin 24 @ JÜRGEN HARTMANN VERLAG GMBH, Heßdorf-Klebheim* 2007 (3), 136–146, zuletzt geprüft am 06.01.2014.
- Ferguson, Jane F.; Hinkle, Christine C.; Mehta, Nehal N.; Bagheri, Roshanak; Derohannessian, Stephanie L.; Shah, Rhia et al. (2012): Translational studies of lipoprotein-associated phospholipase A<sub>2</sub> in inflammation and atherosclerosis. *Journal of the American College of Cardiology* 59 (8), 764–772. 10.1016/j.jacc.2011.11.019.
- Foley, R. N.; Parfrey, P. S.; Sarnak, M. J. (1998): Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 32 (5 Suppl 3), S112-9.
- Grau, Armin J.; Boddy, Alexander W.; Dukovic, Deborah A.; Buggle, Florian; Lichy, Christoph; Brandt, Tobias; Hacke, Werner (2004): Leukocyte count as an independent predictor of recurrent ischemic events. *Stroke* 35 (5), 1147–1152. 10.1161/01.STR.0000124122.71702.64.
- Gurm, H. S.; Bhatt, D. L.; Lincoff, A. M.; Tcheng, J. E.; Kereiakes, D. J.; Kleiman, N. S. et al. (2003): Impact of preprocedural white blood cell count on long term mortality after percutaneous coronary intervention: insights from the EPIC, EPILOG, and EPISTENT trials. *Heart* 89 (10), 1200–1204.
- Hansson, Goran K. (2005): Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 352 (16), 1685–1695. 10.1056/NEJMra043430.
- Hasselwander, O.; McEneny, J.; McMaster, D.; Fogarty, D. G.; Nicholls, D. P.; Maxwell, A. P.; Young, I. S. (1999): HDL composition and HDL antioxidant capacity in patients on regular haemodialysis. *Atherosclerosis* 143 (1), 125–133.

- Heine, G. H.; Ulrich, C.; Seibert, E.; Seiler, S.; Marell, J.; Reichart, B. et al. (2007): CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes but not total monocyte numbers predict cardiovascular events in dialysis patients. *Kidney International* 73 (5), 622–629. 10.1038/sj.ki.5002744.
- Heine, G. H.; Ulrich, C.; Seibert, E.; Seiler, S.; Marell, J.; Reichart, B. et al. (2008): CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes but not total monocyte numbers predict cardiovascular events in dialysis patients. *Kidney Int* 73 (5), 622–629. 10.1038/sj.ki.5002744.
- Howard, Katherine M. (2009): Differential expression of platelet-activating factor acetylhydrolase in lung macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 297 (6), L1141-50. 10.1152/ajplung.00022.2009.
- Hume, David A. (2006): The mononuclear phagocyte system. *Curr Opin Immunol* 18 (1), 49–53. 10.1016/j.coi.2005.11.008.
- Kawanaka, Norikuni; Yamamura, Masahiro; Aita, Tetsushi; Morita, Yoshitaka; Okamoto, Akira; Kawashima, Masanori et al. (2002): CD14<sup>+</sup>,CD16<sup>+</sup> blood monocytes and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* 46 (10), 2578–2586. 10.1002/art.10545.
- Kendrick, Jessica; Cheung, Alfred K.; Kaufman, James S.; Greene, Tom; Roberts, William L.; Smits, Gerard; Chonchol, Michel (2011): FGF-23 associates with death, cardiovascular events, and initiation of chronic dialysis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 22 (10), 1913–1922. 10.1681/ASN.2010121224.
- Khera, Amit; de Lemos, James A; Peshock, Ronald M.; Lo, Hao S.; Stanek, Harold G.; Murphy, Sabina A. et al. (2006): Relationship between C-reactive protein and subclinical atherosclerosis: the Dallas Heart Study. *Circulation* 113 (1), 38–43. 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.575241.
- Longenecker, J. C. (2002): Traditional Cardiovascular Disease Risk Factors in Dialysis Patients Compared with the General Population: The CHOICE Study. *Journal of the American Society of Nephrology* 13 (7), 1918–1927. 10.1097/01.ASN.0000019641.41496.1E.
- Lonn, E. M.; Yusuf, S.; Jha, P.; Montague, T. J.; Teo, K. K.; Benedict, C. R.; Pitt, B. (1994): Emerging role of angiotensin-converting enzyme inhibitors in cardiac and vascular protection. *Circulation* 90 (4), 2056–2069.
- Macphee, C. H.; Moores, K. E.; Boyd, H. F.; Dhanak, D.; Ife, R. J.; Leach, C. A. et al. (1999): Lipoprotein-associated phospholipase A<sub>2</sub>, platelet-activating factor acetylhydrolase, generates two bioactive products during the oxidation of low-density lipoprotein: use of a novel inhibitor. *Biochem J* 338 (Pt 2), 479–487.
- Madjid, Mohammad; Awan, Imran; Willerson, James T.; Casscells, S. Ward (2004): Leukocyte count and coronary heart disease: implications for risk assessment. *J Am Coll Cardiol* 44 (10), 1945–1956. 10.1016/j.jacc.2004.07.056.
- Mallat, Ziad; Lambeau, Gérard; Tedgui, Alain (2010): Lipoprotein-associated and secreted phospholipases A<sub>2</sub> in cardiovascular disease: roles as biological effectors and biomarkers. *Circulation* 122 (21), 2183–2200. 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.936393.
- McConnell, Joseph P.; Hoefner, Daniel M. (2006): Lipoprotein-associated phospholipase A<sub>2</sub>. *Clin Lab Med* 26 (3), 679-97, vii. 10.1016/j.cll.2006.06.003.
- Milionis, H. J.; Elisaf, M. S.; Karabina, S. A.; Bairaktari, E.; Tselepis, A. D.; Siamopoulos, K. C. (1999): Plasma and Lp(a)-associated PAF-acetylhydrolase activity in uremic patients undergoing different dialysis procedures. *Kidney Int* 56 (6), 2276–2285. 10.1046/j.1523-1755.1999.00788.x.
- Moradi, Hamid; Sica, Domenic A.; Kalantar-Zadeh, Kamyar (2013): Cardiovascular burden associated with uremic toxins in patients with chronic kidney disease. *Am J Nephrol* 38 (2), 136–148. 10.1159/000351758.

- Nahrendorf, Matthias; Swirski, Filip K. (2013): Monocyte and macrophage heterogeneity in the heart. *Circulation research* 112 (12), 1624–1633. 10.1161/CIRCRESAHA.113.300890.
- O'Donoghue, Michelle L.; Braunwald, Eugene; White, Harvey D.; Lukas, Mary Ann; Tarka, Elizabeth; Steg, P. Gabriel et al. (2014): Effect of darapladib on major coronary events after an acute coronary syndrome: the SOLID-TIMI 52 randomized clinical trial. *JAMA* 312 (10), 1006–1015. 10.1001/jama.2014.11061.
- Ortiz, Alberto; Covic, Adrian; Fliser, Danilo; Fouque, Denis; Goldsmith, David; Kanbay, Mehmet et al. (2014): Epidemiology, contributors to, and clinical trials of mortality risk in chronic kidney failure. *The Lancet* 383 (9931), 1831–1843. 10.1016/S0140-6736(14)60384-6.
- Packard, C. J.; O'Reilly, D. S.; Caslake, M. J.; McMahon, A. D.; Ford, I.; Cooney, J. et al. (2000): Lipoprotein-associated phospholipase A2 as an independent predictor of coronary heart disease. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *New England Journal of Medicine* 343 (16), 1148–1155. 10.1056/NEJM200010193431603.
- Passlick, B.; Flieger, D.; Ziegler-Heitbrock, H. W. (1989): Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* 74 (7), 2527–2534.
- Rajagopalan, S.; Kurz, S.; Munzel, T.; Tarpey, M.; Freeman, B. A.; Griending, K. K.; Harrison, D. G. (1996): Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest* 97 (8), 1916–1923. 10.1172/JCI118623.
- Rajavashisth, T. B.; Andalibi, A.; Territo, M. C.; Berliner, J. A.; Navab, M.; Fogelman, A. M.; Lusis, A. J. (1990): Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins. *Nature* 344 (6263), 254–257. 10.1038/344254a0.
- Ramirez, Rafael; Carracedo, Julia; Merino, Ana; Soriano, Sagrario; Ojeda, Raquel; Alvarez-Lara, Maria Antonia et al. (2011): CD14+CD16+ monocytes from chronic kidney disease patients exhibit increased adhesion ability to endothelial cells. *Contrib Nephrol* 171, 57–61. 10.1159/000327134.
- Rammos, Christos; Hendgen-Cotta, Ulrike B.; Sobierajski, Julia; Adamczyk, Sarah; Hetzel, Gerd R.; Kleophas, Werner et al. (2013): Macrophage migration inhibitory factor is associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal disease. *International journal of cardiology* 168 (6), 5249–5256. 10.1016/j.ijcard.2013.08.021.
- Ribichini, Flavio; Pugno, Francesco; Ferrero, Valeria; Bussolati, Gianni; Feola, Mauro; Russo, Paolo et al. (2006): Cellular immunostaining of angiotensin-converting enzyme in human coronary atherosclerotic plaques. *J Am Coll Cardiol* 47 (6), 1143–1149. 10.1016/j.jacc.2005.12.022.
- Ridker, P. M.; Cushman, M.; Stampfer, M. J.; Tracy, R. P.; Hennekens, C. H. (1997): Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med* 336 (14), 973–979. 10.1056/NEJM199704033361401.
- Rogacev, K. S.; Ulrich, C.; Blomer, L.; Hornof, F.; Oster, K.; Ziegelin, M. et al. (2010): Monocyte heterogeneity in obesity and subclinical atherosclerosis. *European Heart Journal* 31 (3), 369–376. 10.1093/eurheartj/ehp308.
- Rogacev, Kyrill S.; Zawada, Adam M.; Emrich, Insa; Seiler, Sarah; Böhm, Michael; Fliser, Danilo et al. (2014): Lower Apo A-I and lower HDL-C levels are associated with higher intermediate CD14++CD16+ monocyte counts that predict cardiovascular events in chronic kidney disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 34 (9), 2120–2127. 10.1161/ATVBAHA.114.304172.

- Rosenson, Robert S.; Hurt-Camejo, Eva (2012): Phospholipase A2 enzymes and the risk of atherosclerosis. *European Heart Journal* 33 (23), 2899–2909. 10.1093/eurheartj/ehs148.
- Rosenson, Robert S.; Stafforini, Diana M. (2012a): Modulation of oxidative stress, inflammation, and atherosclerosis by lipoprotein-associated phospholipase A2. *J Lipid Res* 53 (9), 1767–1782. 10.1194/jlr.R024190.
- Rosenson, Robert S.; Stafforini, Diana M. (2012b): Modulation of oxidative stress, inflammation, and atherosclerosis by lipoprotein-associated phospholipase A2. *Journal of lipid research* 53 (9), 1767–1782. 10.1194/jlr.R024190.
- Ross, R. (1999): Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340 (2), 115–126. 10.1056/NEJM199901143400207.
- Saionji, K.; Ohsaka, A. (2001): Expansion of CD4+CD16+ blood monocytes in patients with chronic renal failure undergoing dialysis: possible involvement of macrophage colony-stimulating factor. *Acta haematologica* 105 (1), 21–26.
- Salluh, Jorge I.; Pino, Alexandre V.; Silva, Adriana R.; Gomes, Rachel N.; Souza, Heitor S.; e Silva, Jose Roberto Lapa et al. (2007): Lung production of platelet-activating factor acetylhydrolase in oleic acid-induced acute lung injury. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 77 (1), 1–8. 10.1016/j.plefa.2007.04.001.
- Schlitt, Axel; Heine, Gunnar H.; Blankenberg, Stefan; Espinola-Klein, Christine; Dopheide, Joern F.; Bickel, Christoph et al. (2004): CD14+CD16+ monocytes in coronary artery disease and their relationship to serum TNF-alpha levels. *Thromb. Haemost.* 92 (2), 419–424. 10.1267/THRO04080419.
- Scialla, Julia J.; Xie, Huiliang; Rahman, Mahboob; Anderson, Amanda Hyre; Isakova, Tamara; Ojo, Akinlolu et al. (2014): Fibroblast growth factor-23 and cardiovascular events in CKD. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 25 (2), 349–360. 10.1681/ASN.2013050465.
- Skrzeczyńska-Moncznik, J.; Bzowska, M.; Loseke, S.; Grage-Griebenow, E.; Zembala, M.; Pryjma, J. (2008): Peripheral blood CD14<sup>high</sup> CD16<sup>+</sup> monocytes are main producers of IL-10. *Scandinavian journal of immunology* 67 (2), 152–159. 10.1111/j.1365-3083.2007.02051.x.
- Stafforini, D. M.; Elstad, M. R.; McIntyre, T. M.; Zimmerman, G. A.; Prescott, S. M. (1990): Human macrophages secrete platelet-activating factor acetylhydrolase. *J Biol Chem* 265 (17), 9682–9687.
- Stafforini, Diana M. (2009): Biology of platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH, lipoprotein associated phospholipase A2). *Cardiovascular drugs and therapy / sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy* 23 (1), 73–83. 10.1007/s10557-008-6133-8.
- Steinbrecher, U. P.; Pritchard, P. H. (1989): Hydrolysis of phosphatidylcholine during LDL oxidation is mediated by platelet-activating factor acetylhydrolase. *J Lipid Res* 30 (3), 305–315.
- Svensson-Färbom, P.; Ohlson Andersson, M.; Almgren, P.; Hedblad, B.; Engström, G.; Persson, M. et al. (2014): Cystatin C identifies cardiovascular risk better than creatinine-based estimates of glomerular filtration in middle-aged individuals without a history of cardiovascular disease. *Journal of internal medicine* 275 (5), 506–521. 10.1111/joim.12169.
- Sztanek, Ferenc; Seres, Ildikó; Harangi, Mariann; Lócsy, Lajos; Padra, János; Paragh, György J R et al. (2012): Decreased paraoxonase 1 (PON1) lactonase activity in hemodialyzed and renal transplanted patients. A novel cardiovascular biomarker in end-stage renal disease. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 27 (7), 2866–2872. 10.1093/ndt/gfr753.

- Tew, D. G.; Southan, C.; Rice, S. Q.; Lawrence, M. P.; Li, H.; Boyd, H. F. et al. (1996): Purification, properties, sequencing, and cloning of a lipoprotein-associated, serine-dependent phospholipase involved in the oxidative modification of low-density lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16 (4), 591–599.
- Thieblemont, N.; Weiss, L.; Sadeghi, H. M.; Estcourt, C.; Haeffner-Cavaillon, N. (1995): CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>: a cytokine-producing monocyte subset which expands during human immunodeficiency virus infection. *Eur J Immunol* 25 (12), 3418–3424. 10.1002/eji.1830251232.
- Thompson, Alexander; Gao, Pei; Orfei, Lia; Watson, Sarah; Di Angelantonio, Emanuele; Kaptoge, Stephen et al. (2010): Lipoprotein-associated phospholipase A(2) and risk of coronary disease, stroke, and mortality: collaborative analysis of 32 prospective studies. *Lancet* 375 (9725), 1536–1544. 10.1016/S0140-6736(10)60319-4.
- Ulrich, C.; Heine, G. H.; Gerhart, M. K.; Köhler, H.; Girndt, M. (2008): Proinflammatory CD14+CD16+ monocytes are associated with subclinical atherosclerosis in renal transplant patients. *Am J Transplant* 8 (1), 103–110. 10.1111/j.1600-6143.2007.02035.x.
- Ulrich, C.; Heine, G. H.; Gerhart, M. K.; Köhler, H.; Girndt, M. (2007): Proinflammatory CD14+CD16+ Monocytes Are Associated With Subclinical Atherosclerosis in Renal Transplant Patients. *Am J Transplant* 0 (0), 071117175452008. 10.1111/j.1600-6143.2007.02035.x.
- Ulrich, C.; Heine, G. H.; Seibert, E.; Fliser, D.; Girndt, M. (2010): Circulating monocyte subpopulations with high expression of angiotensin-converting enzyme predict mortality in patients with end-stage renal disease. *Nephrology Dialysis Transplantation* 25 (7), 2265–2272. 10.1093/ndt/gfq012.
- Ulrich, C.; Seibert, E.; Heine, G. H.; Fliser, D.; Girndt, M. (2011): Monocyte Angiotensin Converting Enzyme Expression May Be Associated with Atherosclerosis Rather than Arteriosclerosis in Hemodialysis Patients. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 6 (3), 505–511. 10.2215/CJN.06870810.
- Ulrich, Christof; Heine, Gunnar H.; Garcia, Patric; Reichart, Birgit; Georg, Thomas; Krause, Matthias et al. (2006): Increased expression of monocytic angiotensin-converting enzyme in dialysis patients with cardiovascular disease. *Nephrol Dial Transplant* 21 (6), 1596–1602. 10.1093/ndt/gfl008.
- Vadas, Peter; Gold, Milton; Perelman, Boris; Liss, Gary M.; Lack, Gideon; Blyth, Thomas et al. (2008): Platelet-activating factor, PAF acetylhydrolase, and severe anaphylaxis. *N Engl J Med* 358 (1), 28–35. 10.1056/NEJMoa070030.
- van der Wal, A C; Das, P. K.; Bentz van de Berg, D; van der Loos, C M; Becker, A. E. (1989): Atherosclerotic lesions in humans. In situ immunophenotypic analysis suggesting an immune mediated response. *Lab Invest* 61 (2), 166–170.
- Vaziri, Nosratola D.; Norris, Keith (2011): Lipid Disorders and Their Relevance to Outcomes in Chronic Kidney Disease. *Blood Purif* 31 (1-3), 189–196. 10.1159/000321845.
- Vivona, Nicoletta; Bivona, Giulia; Noto, Davide; Lo Sasso, Bruna; Cefalu, Angelo B.; Chiarello, Gaia et al. (2009): C-reactive protein but not soluble CD40 ligand and homocysteine is associated to common atherosclerotic risk factors in a cohort of coronary artery disease patients. *Clin Biochem* 42 (16-17), 1713–1718. 10.1016/j.clinbiochem.2009.08.014.
- Wang, Thomas J.; Gona, Philimon; Larson, Martin G.; Tofler, Geoffrey H.; Levy, Daniel; Newton-Cheh, Christopher et al. (2006): Multiple biomarkers for the prediction of first major cardiovascular events and death. *N Engl J Med* 355 (25), 2631–2639. 10.1056/NEJMoa055373.

- Wheeler, Jeremy G.; Mussolino, Michael E.; Gillum, Richard F.; Danesh, John (2004): Associations between differential leucocyte count and incident coronary heart disease: 1764 incident cases from seven prospective studies of 30,374 individuals. *Eur Heart J* 25 (15), 1287–1292. 10.1016/j.ehj.2004.05.002.
- White, Harvey D.; Held, Claes; Stewart, Ralph; Tarka, Elizabeth; Brown, Rebekkah; Davies, Richard Y. et al. (2014): Darapladib for preventing ischemic events in stable coronary heart disease. *N Engl J Med* 370 (18), 1702–1711. 10.1056/NEJMoa1315878.
- White, Harvey D.; Simes, John; Stewart, Ralph A H; Blankenberg, Stefan; Barnes, Elizabeth H.; Marschner, Ian C. et al. (2013): Changes in lipoprotein-Associated phospholipase A2 activity predict coronary events and partly account for the treatment effect of pravastatin: results from the Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischemic Disease study. *J Am Heart Assoc* 2 (5), e000360. 10.1161/JAHA.113.000360.
- Winkler, Karl; Hoffmann, Michael M.; Krane, Vera; Drechsler, Christiane; WANNER, CHRISTOPH (2012a): Lipoprotein-associated phospholipase A2 and outcome in patients with type 2 diabetes on haemodialysis. *European Journal of Clinical Investigation* 42 (7), 693–701. 10.1111/j.1365-2362.2011.02634.x.
- Winkler, Karl; Hoffmann, Michael M.; Krane, Vera; Drechsler, Christiane; WANNER, CHRISTOPH (2012b): Lipoprotein-associated phospholipase A2 and outcome in patients with type 2 diabetes on haemodialysis. *Eur J Clin Invest* 42 (7), S. 693–701. 10.1111/j.1365-2362.2011.02634.x.
- Wu, I-Wen; Hsu, Kuang-Hung; Hsu, Heng-Jung; Lee, Chin-Chan; Sun, Chiao-Yin; Tsai, Chi-Jen; Wu, Mai-Szu (2012): Serum free p-cresyl sulfate levels predict cardiovascular and all-cause mortality in elderly hemodialysis patients--a prospective cohort study. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 27 (3), 1169–1175. 10.1093/ndt/gfr453.
- Yla-Herttuala, S. (1991): Macrophages and oxidized low density lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis. *Ann Med* 23 (5), 561–567.
- Yusuf, S.; Sleight, P.; Pogue, J.; Bosch, J.; Davies, R.; Dagenais, G. (2000): Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 342 (3), 145–153. 10.1056/NEJM20001203420301.
- Zalewski, A.; Macphee, C.; Nelson, J. J. (2005): Lipoprotein-associated phospholipase A2: a potential therapeutic target for atherosclerosis. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 5 (6), 527–532.
- Ziegler-Heitbrock, H. W. (1996): Heterogeneity of human blood monocytes: the CD14+ CD16+ subpopulation. *Immunol Today* 17 (9), 424–428.
- Ziegler-Heitbrock, Loems (2007): The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol* 81 (3), 584–592. 10.1189/jlb.0806510.

**Thesen**

- 1) Die Lp-PLA2-Aktivität ist bei Dialysepatienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen erhöht. Es zeigt sich ein stark signifikanter Unterschied, der auch der Adjustierung für Alter, Geschlecht und LDL-Profil standhält.
- 2) Die leukozytäre mRNA-Expression der Gene für die Enzyme Lp-PLA2 und ACE ist bei Dialysepatienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen erhöht. Es zeigt sich ein stark signifikanter Unterschied, der auch der Adjustierung für Alter, Geschlecht und LDL-Profil standhält.
- 3) Die Messung der inflammatorischen CD16+ Monozyten ist bei Dialysepatienten gegenüber gesunden Probanden erhöht. Es zeigt sich ein stark signifikanter Unterschied, der auch der Adjustierung für Alter, Geschlecht und LDL-Profil standhält.
- 4) Die Messung der CD16+ Monozyten ist bei Patienten mit Atherosklerose (A+) innerhalb der CKD-5D-Gruppe gegenüber Patienten ohne Atherosklerose (A-) nicht erhöht. Es konnten keine statistisch relevanten Unterschiede zwischen den Gruppen gefunden werden.
- 5) Die Lp-PLA2-Aktivität unterscheidet sich innerhalb der CKD-5D-Gruppe bei Patienten mit Atherosklerose (A+) von dem Level bei Patienten ohne Atherosklerose (A-). Bei Patienten mit Atherosklerose (A+) wurden signifikant höhere Werte gemessen.
- 6) Die Lp-PLA2-mRNA-Expression sowie die ACE-mRNA-Expression unterscheiden sich nicht innerhalb der CKD-5D-Gruppe bei Patienten mit Atherosklerose (A+) von dem Level bei Patienten ohne Atherosklerose (A-). Die mRNA-Expressionen für ACE und Lp-PLA2 auf leukozytärer Ebene zeigten keine statistisch relevanten Unterschiede zwischen den Gruppen.
- 7) Die Messung der leukozytären Lp-PLA2-Aktivität stellt einen unabhängigen Prädiktor für eine subklinische Atherosklerose bei endgradig niereninsuffizienten dialysepflichtigen Patienten dar.
- 8) Die leukozytäre Lp-PLA2-Expression im zirkulierenden Blut findet fast ausschließlich in Monozyten statt.  
Damit kann die leukozytäre Lp-PLA2-Expression mit der monozytären Expression gleichgesetzt werden.
- 9) Die leukozytäre/monozytäre Lp-PLA2-mRNA-Expression und die Lp-PLA2-Aktivität korrelieren bei Dialysepatienten nicht. Die Haupt-LP-PLA2-Aktivitätsquelle sind höchstwahrscheinlich gewebständige Makrophagen, deren Ursprung wiederum in erster Linie in Mo1 und Mo2 zu finden ist. Sie könnten die wahren Quellen dieser Enzymaktivität nach Differenzierung der Vorläuferzellen darstellen.

## Anhang

## Fragebogen zur Erhebung von Herz Kreislaufbeschwerden sowie kardiovaskulären Risikofaktoren



Universitätsklinikum  
Halle (Saale)

Universitätsklinik und  
Poliklinik für Innere Medizin  
II

Standardisierter Erhebungsbogen Herz-Kreislauf-Anamnese

Patientenname: \_\_\_\_\_

Befragung am: \_\_\_\_ . \_\_\_\_ . \_\_\_\_

Frage 1	Haben Sie jemals geraucht?	Ja Nein
Frage 1a	Rauchen Sie aktuell?	Ja Nein
Frage 1b	Wann haben Sie das Rauchen beendet?	
Frage 1c	Wieviele Jahre haben Sie insgesamt geraucht?	
Frage 1d	Wie viele Päckchen Zigaretten haben Sie durchschnittlich an einem Tag geraucht?	
Frage 2	Hat Ihr Vater oder Ihre Mutter einen Herzinfarkt oder Schlaganfall vor dem 65. Lebensjahr erlitten?	Ja Nein Unbekannt
Frage 3	Haben Geschwister von Ihnen einen Herzinfarkt oder Schlaganfall vor dem 65. Lebensjahr erlitten?	Ja Nein Unbekannt
Frage 4	Ist bei Ihnen eine Zuckerkrankheit (Diabetes mellitus) bekannt?	Ja Nein
Frage 4a	Benutzen Sie Insulin, blutzuckersenkende Medikamente oder halten Sie eine Diät?	Insulin Medikamente  Diät keines

Frage 5	An wie vielen Tagen in der Woche betätigen Sie sich mindestens 30 Minuten mittels Ausdauersportarten wie Joggen, Fahrradfahren oder Walken?	Tage/Woche
Frage 6a	Hatten Sie jemals einen Schlaganfall mit Störungen des Sprachzentrums oder Lähmungen der Gliedmaßen, die <u>länger als einen Tag</u> anhielten?	Ja Nein
Frage 6b	Hatten Sie jemals einen Schlaganfall mit Störungen des Sprachzentrums oder Lähmungen der Gliedmaßen, die <u>kürzer als einen Tag</u> anhielten?	Ja Nein
Frage 7	Hatten Sie jemals einen Herzinfarkt?	Ja Nein
Frage 8	Hatten Sie jemals eine Aufdehnung von Herzkrankgefäßen mittels Herzkatheter?	Ja Nein
Frage 9	Haben Sie eine Bypass-OP am Herzen hinter sich?	Ja Nein
Frage 10	Sind Ihre Halsschlagadern durch Operation oder Katheter erweitert worden?	Ja Nein
Frage 11	Hatten Sie jemals eine Aufdehnung von Becken- oder Beinschlagadern?	Ja Nein
Frage 12	Haben Sie eine Operation (Bypass oder Erweiterung) der Becken- oder Beinschlagadern hinter sich?	Ja Nein
Frage 13	Musste bei Ihnen eine Amputation vorgenommen werden?	Ja Nein
Frage 14	Sind Sie in Ihrem Alltagsleben durch Luftnot eingeschränkt?	Nein  Nicht in Ruhe, aber bei stärkerer körperlicher Belastung (>200m in der Ebene, >1 Etage im Treppenhaus; NYHA II)  Nicht in Ruhe, aber bei geringer körperlicher Belastung (<200m in der Ebene, <1 Etage im Treppenhaus; NYHA III)

		In Ruhe (NYHA IV)
Frage 15	Sind Sie in Ihrem Alltagsleben durch Druckschmerzen in der Brust eingeschränkt?	Nein  Nicht in Ruhe, aber bei stärkerer körperlicher Belastung (>200m in der Ebene, >1 Etage im Treppenhaus; CCS II)  Nicht in Ruhe, aber bei geringer körperlicher Belastung (<200m in der Ebene, <1 Etage im Treppenhaus; CCS III)  In Ruhe (CCS IV)
Frage 16	Sind Sie in Ihrem Alltagsleben durch Schmerzen im Bereich der Waden- und Oberschenkelmuskulatur eingeschränkt, die bei körperlicher Belastung zunehmen und bei Belastungspausen nachlassen?	Nein  Nicht in Ruhe, nur bei Gehstrecken >200m (pAVK IIa)  Nicht in Ruhe, nur bei Gehstrecken <200m (pAVK IIb)  Schmerzen in Ruhe (pAVK III)

## Einverständniserklärung – Dialysepatienten



Universitätsklinik und Poliklinik für  
Innere Medizin II  
Direktor: Prof. Dr. med. Matthias  
Girndt

### Patienteninformation: Wissenschaftliche Untersuchung zur Arterienverkalkung (Atherosklerose) bei Patienten mit Nierenfunktionsstörungen (Studie LP-PLA2)

Die Arterienverkalkung stellt eines der vordringlichsten Gesundheitsprobleme bei Dialysepatienten und Personen mit eingeschränkter Nierenfunktion dar. Sie führt letztlich zu so schwerwiegenden Krankheitsbildern wie dem Herzinfarkt, dem Schlaganfall oder der Durchblutungsstörung der Beine. Alle diese Zweitkrankheiten betreffen den Dialysepatienten häufiger und in jüngerem Lebensalter als den Nierengesunden. Unser Ziel ist es herauszufinden, warum die Arterienverkalkung (Atherosklerose) gerade bei Nierenkranken so rasch voranschreitet. Wir erhoffen uns von einem Verständnis der Grundlagen der Krankheitsentstehung, bald auch Behandlungsmöglichkeiten entwickeln zu können, die diese Begleiterkrankungen verzögern oder verhindern.

Um dieses Ziel zu erreichen, bitten wir Sie um Unterstützung bei einem wissenschaftlichen Projekt. Hierbei sollen bestimmte Eigenschaften der weißen Blutkörperchen gemessen werden, die wahrscheinlich für die Entstehung der Atherosklerose

---

bedeutsam sind. Durch Vergleich von Patienten, die bereits eine der oben genannten Begleiterkrankungen erlitten haben, und solchen, die davon verschont blieben, hoffen wir, die Eigenschaften aufdecken zu können, die besonders bedeutsam sind.

Wir bitten Sie daher um Ihr Einverständnis zu:

einer Blutentnahme aus dem Dialyseshunt bei Dialysebeginn (max. 20 ml Blut)

einer Ultraschalluntersuchung der Halsschlagadern (während der Dialyse)

Aufzeichnung und anonymisierter statistischer Auswertung von Informationen über Herz-Kreislauf-Erkrankungen aus Ihrem Krankenblatt

Die Blutentnahme wird bei der regulären Dialysebehandlung durchgeführt, eine zusätzliche Gefäßpunktion ist nicht erforderlich. Die benötigte Menge liegt bei max. 20 ml und ist somit auch bei schwerer Nierenfunktionsstörung unbedenklich. Mögliche Risiken der Blutentnahme sind:

- \* Ausbildung eines Hämatoms (Bluterguß) an der Punktionsstelle
- \* Vorübergehende Schmerzen an der Punktionsstelle
- \* Veneninfektion
- \* Shuntinfektion
- \* Kreislaufkollaps

#### Datenschutzhinweis

Die im Rahmen dieser Untersuchung erhobenen Daten werden in anonymisierter Form, also ohne Namensnennung, ausgewertet. Die Bestimmungen der ärztlichen Schweigepflicht und des Datenschutzes werden hierbei in vollem Umfang berücksichtigt. Wir weisen jedoch darauf hin, dass zu Kontrollzwecken den Überwachungsbehörden eine Einsichtnahme in Ihre Krankenakte gestattet wird. Mit Ihrem Einverständnis zur Teilnahme an der Studie stimmen Sie auch dieser Offenlegung zu. Wir versichern Ihnen jedoch, dass Ihre personenbezogenen Daten absolut vertraulich behandelt werden und nicht an die Öffentlichkeit gelangen.

---

Ich bin über den wissenschaftlichen Charakter der Blutentnahme und Ultraschalluntersuchung aufgeklärt worden und stimme ihr zu. Mir ist bekannt, dass ich mein Einverständnis zur Studienteilnahme jederzeit ohne Angabe von Gründen zurückziehen kann und dass dies selbstverständlich keinen Einfluß auf die Fortsetzung der vertrauensvollen medizinischen Betreuung hat.

Vorname, Name

Unterschrift

Datum

aufklärender Arzt

Unterschrift

Datum

## Tabellarischer Lebenslauf

### Persönliche Angaben:

Geburtsdatum                      4. Januar 1986

Nationalität                        deutsch

Familienstand                      ledig, keine Kinder

### Eltern:

Vater: Dr. med Johannes Kohler (Facharzt für Chirurgie, Orthopädie und Unfallchirurgie)

Mutter: Beate Kohler (Lehrerin für Deutsch und Englisch)

### Ausbildung:

**Seit Juni 2015**                      Facharztweiterbildung Orthopädie und Unfallchirurgie

**November 2014**                      Abschluss mit dem Zweiten Staatsexamen (Note: 1,00)

**10/2008 – 11/2014**                  Martin-Luther-Universität ,Halle (Saale), Deutschland

- Medizin Studium
- Abschluss: Erstes Staatsexamen 10/2010 (Note 1,0)

**10/2006 10/2008**                  Universität zu Köln

- Naturwissenschaftliche Fakultät - Biologiestudium

**7/2005 – 3/2006**                      Sanitätsdienst bei der Deutschen Bundeswehr

**1997 – 7/2005**                        Stiftsgymnasium, Xanten, Deutschland

- Abitur (2005) in Biologie, Deutsch, Mathematik und Sozialwissenschaften

### Arbeitserfahrung:

**Seit 06/2015**                      Arbeit als Assistenzarzt in Weiterbildung für Unfallchirurgie und Orthopädie im  
Krankenhaus Martha Maria Halle-Dölau

**Seit 3/2011**                        Arbeit als Dozent bei der Firma „Medi-Learn“, Marburg

- Vorbereitung von Studenten auf das Erste Staatsexamen in Biochemie und Anatomie

**11/2011 - 12/2012** Arbeit in der Notaufnahme "BG-Kliniken Bergmannstrost" Halle als studentische Hilfskraft

**2010 - 2013** Famulaturen im Bereich: Anästhesie (2 Wochen) , Orthopädie und Unfallchirurgie (4 Wochen) , Radiologie (4 Wochen), Plastische Chirurgie (2 Wochen), Innere Medizin/Nephrologie (4 Wochen)

**Sprachen:**

Englisch fließend

Latein Großes Latinum

**Thema der Doktorarbeit:**

„Lipoprotein assoziierte Phospholipase A2 als Prädiktor für subklinische Atherosklerose bei chronisch nierenkranken dialysepflichtigen Patienten“

**Auslandsaufenthalte:**

**02/2014 – 04/2014** Praktisches Jahr in der Klinik für Innere Medizin am Kantonspital in Luzern (Schweiz)

**08/2014 – 12/2014** Praktisches Jahr in der Klinik für Allgemein Chirurgie und Traumatologie am Tygerberg Hospital in Kapstadt (Südafrika)

### **Selbstständigkeitserklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Die Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis wurden beachtet.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder anderer Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Halle/Saale, den

Felix C. Kohler

### **Erklärung über frühere Promotionsversuche**

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

Halle/Saale, den

Felix C. Kohler

## **Danksagung**

Den folgenden Personen möchte ich für ihre Unterstützung bei meiner Promotionsarbeit danken:

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Matthias Girndt, möchte ich meinen besonderen Dank aussprechen. Er hat mir ein interessantes Thema zur Verfügung gestellt, sich in sehr hohem Maße für diese Arbeit engagiert und meine Arbeit jederzeit mit konstruktiven Anregungen begleitet.

Ein großer Dank gebührt meinem Betreuer der Arbeit, Herrn Dr. rer. nat. Christof Ulrich. Ich danke ihm sehr für die große Hilfe und die vielen Stunden, die wir mit der Arbeit an der Studie verbracht haben. Vielen Dank auch für die konstruktive Kritik und das kritische Lesen meiner Arbeit.

Ich danke Herrn PD Dr. med. Roman Fiedler, Oberarzt der Klinik für Innere Medizin II – Nieren- und Hochdruckkrankheiten, dass er mir die Promotionsarbeit in seiner Klinik und speziell im KfH-Nierenzentrum (Dialysezentrum) ermöglicht hat.

Ich bedanke mich sehr bei Frau Beate Heinze, Frau Manuela Hajri und Herrn Dr. rer. medic. B. Trojanowicz für die hervorragende, über das normale Maß hinaus gehende Unterstützung meiner Arbeit im Labor. Ein großer Dank gebührt dem gesamten Team des KfH-Nierenzentrum in Halle für die Unterstützung vor allem beim klinischen Teil der Studie.

Vielen Dank an das gesamte Team der Chirurgischen Abteilung des St. Josef Hospitals in Xanten für die großartige Unterstützung. Insbesondere möchte ich die Hilfe der Leiterin des Labors, Frau Gammerschlag, hervorheben.

Dank an Frau Sylvia Hanika für das Bereitstellen von Fragebogendaten der Dialysepatienten des KfH.

Ein großer Dank gebührt meiner Freundin Luise, die mir immer unterstützend mit Rat und Tat zur Seite steht.

Zum Schluss möchte ich meinen Eltern danken. Die Unterstützung, die sie mir nicht nur während des Studiums, sondern schon immer haben zuteil werden lassen, ist in Worte nicht zu fassen. Ihnen widme ich diese Arbeit und möchte ihnen so danken, dass sie immer für mich da sind.