

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I
der Universität Würzburg**

Abteilung Nephrologie

Leiter: Professor Dr. med. Wanner

**EINFLUSS VERSCHIEDENER EXTRAKORPORALER
DIALYSEVERFAHREN AUF ENDOTHELIALE VORLÄUFERZELLEN**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Regina Maria Fischer

aus Schaffhausen, CH

Würzburg, Juni 2011

Referent:	Prof. Dr. med. C. Wanner
Korreferent:	Prof. Dr. med. R. Bargou
Dekan:	Prof. Dr. med. M. Frosch
Tag der mündlichen Prüfung:	06.06.2012

Die Promovendin ist Ärztin

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Übersicht	1
1.2.	Kardiovaskuläre Risikofaktoren bei chronisch dialysepflichtiger Niereninsuffizienz	1
1.3.	Endotheliale Progenitorzellen als kardiovaskuläre Risikomarker	2
1.4.	Endotheliale Progenitorzellen bei Dialysepatienten	4
1.5.	Heterogenität bei der Bestimmung endothelialer Vorläuferzellen	4
1.6.	Ziel der Studie	5
2.	Material und Methoden.....	6
2.1.	Votum des Ethik-Komitees	6
2.2.	Kurzbeschreibung der Studie	6
2.3.	Studienein- und -ausschlusskriterien	6
2.4.	Charakterisierung der Studienteilnehmer	7
2.4.1.	Patientencharakterisierung	7
2.4.2.	Charakterisierung der Kontrollgruppe	8
2.5.	Dialysegeräte/ extrakorporales System/ Wasseraufbereitung	8
2.6.	Versuchsdialysatoren	15
2.7.	Versuchsdurchführung	16
2.7.1.	Blutentnahme	17
2.8.	Bestimmung der endothelialen Vorläuferzellen	17
2.8.1.	Isolation der mononukleären Zellfraktion	18
2.8.2.	Kultivierung der endothelialen Vorläuferzellen	18
2.8.3.	Bestimmung der Kolonien am Phasenkontrastmikroskop	20
2.8.4.	Durchflusszytometrische Quantifizierung und Qualifizierung der Zellen	20
2.9.	Messung der Laborparameter im Plasma	21
2.10.	Berechnung der Dialysebehandlungseffizienz	22
2.11.	Statistische Auswertung	22
3.	Ergebnisse	24
3.1.	Die Dialyseverfahren im Vergleich	24
3.1.1.	Effektivität der Dialyseverfahren	24
3.1.2.	Verlauf und Vergleich der Laborparameter	24
3.2.	Ergebnisse der Zellkulturen	27
3.2.1.	Zellkulturen auf Fibronectin (CFU-Hill)	27
3.2.1.1.	CFU-Hill-Gesamtzellzahlen	27
3.2.1.2.	CFU-Hill-Koloniezahlen	29
3.2.1.3.	Subpopulationen der CFU-Hill-Kolonien	30
3.2.1.4.	Zellvitalität	32
3.2.2.	Zellkulturen auf Kollagen (ECFCs)	34
3.2.2.1.	ECFCs, Gesamtzellzahlen	34
3.2.2.2.	ECFCs, Koloniezahlen	36

3.2.2.3.	Subpopulationen der ECFC-Kolonien	37
3.2.2.4.	Zellvitalität auf Kollagen	39
3.3.	C-reaktives Protein (CRP) vs. EPCs	40
3.4.	Quantitativer Vergleich der CFU-Hill- und der ECFC-Kolonien	41
3.5.	Besonderheiten im Studienverlauf	41
4.	Diskussion	44
4.1.	CFU-Hill-Kolonien (Colony forming unit)	47
4.2.	Zirkulierende angiogene Zellen (CACs)	49
4.3.	Endotheliale Kolonie-bildende Zellen (ECFCs)	50
4.4.	Immunphänotypisierung der endothelialen Progenitorzellen	52
4.5.	Endotheliale Progenitorzellen im zeitlichen Verlauf	56
4.6.	Inflammatorische Prozesse und EPCs	58
4.7.	ECFCs vs. CFU-Hill-EPCs	59
4.8.	Schlussfolgerung	59
5.	Zusammenfassung	61
6.	Literaturverzeichnis.....	61

Liste der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
acLDL	acetyliertes Low Density Lipoprotein
ANOVA	Analysis of variances between groups
BMI	Body mass index (Körpergewichtsindex)
CFU	Colony forming unit
CD	Cluster of differentiation (Oberflächenmolekül)
EBM-2	Endothelial cell basal medium 2 (basales Endothelzellmedium)
ECFC	Endothelial Cell Forming Colony (endotheliale Kolonie-bildende Zelle)
EGM-2	Endothelial cell growth medium (endotheliales Wachstumsmedium)
EPC	Endotheliale Progenitorzelle
FACS	Fluorescence activated Cell Sorter, Durchflusszytometer
FCS	Fetal calf serum (Fetales Kälberserum)
HDF	Hämodiafiltration
HF-HD	High-Flux-Hämodialyse
Ig	Immunglobulin
KDR	Kinase-insert domain containing receptor (VEGF-Rezeptor 2)
KHK	koronare Herzkrankheit
LDL	Low-Density Lipoprotein
LF-HD	Low-Flux-Hämodialyse
MNC	Mononuclear cell (Mononukleäre Zellen)
n.s.	nicht signifikant
NYHA	New York Heart Association, Stadium I bis IV, Einteilung der kongestiven Herzinsuffizienz
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
SD	Standard Deviation (Standardabweichung)
Tab.	Tabelle
UEA-1	Ulex europaeus agglutinin-1 (Lektin)
VEGF	Vascular endothelial growth factor (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor, auch KDR genannt)

1. Einleitung

1.1. Übersicht

Die Niere ist das einzige Organ des menschlichen Körpers, dessen Funktion über Jahre hinweg durch apparative und medikamentöse Therapie ersetzt werden kann. Seit der ersten experimentellen Hämodialyse am Menschen 1924 durch Georg Haas hat sich das Verfahren der extrakorporalen Blutwäsche im klinischen Alltag etabliert und ist längst Routinebehandlung der dialysepflichtigen Niereninsuffizienz geworden. Die „Qualitätssicherung der Nierenersatztherapie“ (Quasi-Niere) verzeichnete 2006 in Deutschland über 66.000 Dialysepatienten. Die Lebenserwartung dieser Patienten bleibt allerdings gegenüber der Normalbevölkerung deutlich reduziert [1]. Ursache der erhöhten Morbidität und Mortalität sind dabei in erster Linie kardiovaskuläre Erkrankungen [2] auf dem Boden einer Artherosklerose. Dabei zeigten experimentelle Studien, dass bereits eine leichte Einschränkung der Nierenfunktion zu einer dramatischen Beschleunigung artherosklerotischer Prozesse führt [3].

1.2. Kardiovaskuläre Risikofaktoren bei chronisch dialysepflichtiger Niereninsuffizienz

Laut Quasi-Niere stellten 2006 in Deutschland kardiovaskuläre Erkrankungen in allen Altersgruppen der Dialysepatienten die Haupttodesursache (51,5%) dar. Die erhöhte Mortalität gründet dabei nicht nur auf der erhöhten Inzidenz klassischer Risikofaktoren wie z.B. Alter, linksventrikuläre Hypertrophie oder Diabetes mellitus, sondern auch auf spezifisch Urämie-assoziierten Risikofaktoren wie der chronischen systemischen Inflammation, der Hyperphosphatämie oder eines gestörten Kalzium-Phosphat-Metabolismus [4]. Die für die Allgemeinbevölkerung etablierten Risikofaktoren stehen teils in scheinbar paradoxer Beziehung zur Morbidität und Mortalität der Dialysepatienten. So konnten Wanner *et al.* 2005 und Fellström *et al.* 2009 in

groß angelegten prospektiven Studien eine Statin vermittelte LDL-Senkung bei chronischen Hämodialysepatienten nicht mit einer Reduktion der erhöhten Sterblichkeit in Zusammenhang bringen [5, 6], obwohl ein derartiger Effekt von mehreren Studien an Normalkollektiven bekannt war [7]. Auch die Hypertonie lässt bei Patienten im terminalen Nierenversagen nicht zwangsläufig eine Vorhersage zur Mortalität zu. Stidley *et al.* [8] fanden 2006 in einer Kohortenstudie mit 16.959 Hämodialysepatienten niedrige systolische Blutdruckwerte (<120 mmHg) mit einer erhöhten Ein- bis Zweijahresmortalität assoziiert. Zwar scheint hinsichtlich der Inzidenz kardiovaskulärer Ereignisse die Hämodialyse mit High-Flux-Membranen zumindest in gewissen Patientenkollektiven gegenüber der Behandlung mit Low-Flux-Membranen einen Vorteil zu präsentieren, die Ursache hierfür konnte jedoch nicht vollständig geklärt werden [9, 10].

1.3. Endotheliale Progenitorzellen als kardiovaskuläre Risikomarker

Auf der Suche nach neuen, allgemein gültigen Biomarkern für die Mortalität ist seit einiger Zeit das Endothel in den Focus wissenschaftlichen Interesses geraten. Das Endothel spielt in der Entstehung der Atherosklerose eine entscheidende Rolle. Mechanische, toxische und immunologische Stimuli induzieren Gefäßschäden und führen so zu einer chronischen Entzündung der Gefäßwand, einer Monozyteninfiltration und der Proliferation glatter Muskelzellen [11]. Das Ergebnis sind Zellschäden, endotheliale Dysfunktion und am Ende atherosklerotische Läsionen und Gefäßverschlüsse. Während man noch vor wenigen Jahren glaubte, Neoangiogenese wäre nur durch Proliferation und Migration reifer Endothelzellen aus bereits existenten Gefäßen möglich, fanden Asahara *et al.* 1997 eine Leukozytensubpopulation, die *in vitro* zu Endothelzellen ausdifferenzierten und an der Gefäßneubildung teilnahmen [12]. Dies zeigte, dass auch im Erwachsenen noch Vaskulogenese durch knochenmarksstämmige, im Blut zirkulierende Zellen stattfindet.

Zirkulierende endotheliale Progenitorzellen (EPCs) können aus Knochenmark, Nabelschnur- oder peripherem Blut isoliert werden [13, 14]. In Tierstudien konnte gezeigt werden, dass EPCs sich sowohl in neu gebildete als auch bereits bestehende Gefäße integrieren [15, 16, 17, 18]. Die intravenöse bzw. intrakardiale Gabe von humanen EPCs verbesserte durch Gefäßneubildung (Vaskulogenese) und Proliferation bestehender Gefäße (Angiogenese) im infarzierten Bereich die myokardiale Funktion nach experimentell induziertem Myokardinfarkt am Rattenmodell [16, 19]: Durch Chemokine aus dem ischämischen Gewebe werden EPCs angezogen, die dann die myokardiale Neovaskularisation, den Schutz vor vermehrter Apoptose der Kardiomyozyten und die funktionelle Wiederherstellung des Herzmuskels regulieren [18]. Atherosklerotischen Mäusen, denen wiederholt EPCs gesunder Artgenossen injiziert wurden, zeigten trotz weiterhin bestehender Hypercholesterinämie eine verminderte Plaquebildung, wobei die Spender-EPCs sich in atherosklerotisch prädisponierten Bereichen von Arterien einfügten [17].

In klinischen Studien zeigte sich, dass eine Vielzahl von Faktoren einen Einfluss auf Zahl und Funktion der endothelialen Progenitorzellen haben [20]. Frühere Studien deuten auf einen Zusammenhang zwischen traditionellen Risikofaktoren einer koronaren Herzkrankheit und verminderten zirkulierenden EPCs [21]. Sowohl bei jungen, noch gesunden Probanden als auch bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit scheint ein umgekehrt proportionaler Zusammenhang zwischen der Zahl endothelialer Vorläuferzellen und dem Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse nachweisbar [21, 22]. Umgekehrt könnte bei einer verringerten Anzahl von EPCs ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse bestehen [22, 23]. Im Gegensatz dazu, scheint es im Rahmen akuter ischämischer Ereignisse zu einem vorübergehenden Anstieg zirkulierender EPCs zu kommen [24].

All diese Studienergebnisse deuten daraufhin, dass endotheliale Vorläuferzellen nicht nur in der Gefäßneubildung eine Rolle spielen, sondern auch für die Integrität und Funktion des Endothels von entscheidender Bedeutung sind.

Daraus entstand das Konzept, dass zirkulierende EPCs eine gefäßprotektive und regenerative Funktion erfüllen und dass eine Verminderung mit Krankheitsprozessen und gehäuften kardiovaskulären Ereignissen assoziiert ist.

1.4. Endotheliale Progenitorzellen bei Dialysepatienten

Patienten mit chronischem Nierenversagen verfügen über eine im Vergleich zur Normalbevölkerung deutlich geringere Anzahl im Blut zirkulierender EPCs [25, 26]. Dabei scheint die Retention von Urämietoxinen im Körper eine hemmende Wirkung auf die Ausdifferenzierung sowie die funktionelle Aktivität der EPCs zu haben [25, 27]. Nach Einleitung der Dialysetherapie und der damit verbundenen Besserung der Urämie zeigte sich eine signifikante Vermehrung der EPCs [27]. Diese Zunahme war bereits nach einer einzigen Hämodialysebehandlung zu beobachten [28]. Neben der verabreichten Dialysedosis scheint auch die Häufigkeit und Qualität der Toxinentfernung Einfluss auf die Zahl der EPCs zu haben [28-31].

1.5. Heterogenität bei der Bestimmung endothelialer Vorläuferzellen

Ursprünglich wurde die Population der EPCs anhand der Oberflächenmarker CD34 (ein Oberflächenmolekül, das sich auf hämatopoetischen Vorläuferzellen sowie auf reifen Endothelzellen befindet) und des Rezeptors für vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor 2 (VEGFR2 oder auch KDR für „kinase-domain-related receptor“) identifiziert [12]. Nachfolgende Studien nutzten zur Bestimmung von EPCs weitere Marker wie beispielsweise CD133, ein Oberflächenmolekül, welches von Stammzellen exprimiert wird, nicht aber von ausdifferenzierten Zellen [32]. Andere Forschungsgruppen entfernten sich gänzlich von der rein morphologischen Charakterisierung und konzentrierten sich stattdessen auf das Verhalten der Zellen *in vitro*. Untersucht wurde dabei unter anderem die Fähigkeit, Kolonien auszubilden, acetyliertes LDL aufzunehmen oder Lektin (*Ulex europaeus* agglutinin-1, UEA-1) zu binden.

All diese Methoden identifizieren möglicherweise EPCs oder auch andere unreife Frühformen von Endothelzellen, deshalb ist die Spezifität der Methoden als unzureichend zu bewerten. Derzeit wird von verschiedenen Arbeitsgruppen die reine FACS-analytische Charakterisierung der Oberflächenantigene (siehe oben) als unzureichend angesehen und es entwickelt sich zunehmend Konsensus über die Notwendigkeit einer kulturellen Anzucht von EPCs. Die Wertigkeit der bisherigen Studien, die ausschließlich auf der Identifikation der EPCs anhand von Oberflächenantigenen basieren, muss daher kritisch betrachtet werden.

1.6. Ziel der Studie

Die bisher im Bereich der Nierenersatztherapie durchgeführten Studien weisen auf einen positiven Einfluss intensivierter Behandlungsverfahren wie der täglichen Hämodialyse und der Hämodiafiltration bezüglich der EPCs hin [29, 30]. Leider sind die beiden hierzu verfügbaren Studien mit einigen methodischen Schwächen behaftet, die ihre uneingeschränkte Gültigkeit erheblich in Frage stellen. Der Einfluss einer unterschiedlichen Toxinentfernung durch ein Nierenersatzverfahren, ob hinsichtlich der Quantität als auch der Qualität, auf die Ausprägung von wichtigen Mortalitätsbiomarkern, wie EPCs von vielen Forschungsgruppen angesehen werden, ist jedoch ein hochinteressanter Ansatz, den die vorliegende Studie untersucht. Hierzu wurde der Einfluss der drei unterschiedlichen Dialyseverfahren Low-Flux- und High-Flux-Hämodialyse sowie Online-Hämodiafiltration auf die Zahl von EPCs bestimmt. Dabei wurde besonderes Augenmerk auf die Verwendung einer zum Studienzeitpunkt als adäquat erachteten EPC-Bestimmungsmethode gelegt.

2. Material und Methoden

2.1. Votum des Ethik-Komitees

Die vorliegende Studie wurde der „Freiburger Ethik-Kommission International“ zur Begutachtung vorgelegt und ohne Einschränkung genehmigt (Antragsnummer 08/1875).

2.2. Kurzbeschreibung der Studie

In einer prospektiven, randomisierten „Cross-over“-Studie an 18 prävalenten Hämodialysepatienten wurde der Einfluß von drei verschiedenen Dialyseverfahren (Low-Flux-Hämodialyse, High-Flux-Hämodialyse und Hämodialfiltration) auf zirkulierende endotheliale Vorläuferzellen untersucht. Jeder Patient wurde während jeweils vier Wochen mit jedem der Dialyseverfahren behandelt. Am Anfang und am Ende jeder Behandlungsart wurden endotheliale Vorläuferzellen aus dem Blut isoliert und kultiviert. Die Ergebnisse wurden mit denen einer nierengesunden Kontrollgruppe verglichen.

2.3. Studienein- und -ausschlusskriterien

In die vorliegende Studie wurden 18 Patienten eingeschlossen, die alle regelmäßig im Dialysezentrum Elsenfeld, Deutschland hämodialysiert wurden. Sie wurden vor Beginn der Studie über den Ablauf und die damit verbundenen Blutentnahmen und möglichen Risiken eingehend informiert und wurden nach schriftlicher Einwilligung in die Studie aufgenommen. Dabei gab es folgende Einschlusskriterien:

- Alter \geq 18 Jahre
- Chronisch dialysepflichtige Niereninsuffizienz

- Extrakorporale Hämodialyse seit mehr als 3 Monaten
- Hämatokrit > 30 %
- Stabile Antikoagulation und bedarfsgerechte Erythropoietingabe während der Dialysebehandlung
- Funktionstüchtiger Dialysezugang (A/V-Fistel oder permanenter doppellumiger Dialysekatheter)
- Keine aktuellen Infektionen
- Schriftliche Einwilligung zur Studienteilnahme

Demgegenüber standen folgende Ausschlusskriterien:

- Nicht erfüllte Einschlusskriterien
- Bekannte HIV- oder Hepatitis B- oder C-Infektion
- Schwangerschaft
- Klinisch instabile Patienten
- Bekannte Koagulationsprobleme
- Lebenserwartung unter 12 Monaten
- Gleichzeitige Teilnahme an anderen Studien, die potentiell mit der vorliegenden Studie interferieren
- Patientenwunsch

2.4. Charakterisierung der Studienteilnehmer

2.4.1. Patientencharakterisierung

Fünfzehn männliche und drei weibliche Patienten nahmen an der Studie teil. Ihr Alter lag zwischen 36 und 80 Jahren (Mittelwert 59,7 (\pm 13,6) Jahren; Median 57 Jahre). Ihr BMI lag zwischen 19,9 und 37,3 (Mittelwert 27,8 \pm 4,3; Median 28,7). Die Dialysepflichtigkeit bestand seit 11 bis 114 Monaten (Mittelwert 45,9 \pm 28,6 Monate; Median 36 Monate). Zum dialysepflichtigen Nierenversagen führten eine hypertensive Nephropathie (5 Patienten), eine diabetische Nephropathie (1 Patient) bzw. eine hypertensiv/diabetische Nephropathie (2

Patienten), eine autosomal dominante Nierenerkrankung (3 Patienten), ein postrenales Nierenversagen (2 Patienten), eine Glomerulonephritis (2 Patienten), eine tubulointerstitielle Nephritis (2 Patienten) bzw. eine Tumornephrektomie (1 Patient). Insgesamt 14 Patienten wiesen kardio- oder peripher-vaskuläre Nebenerkrankungen auf, acht von ihnen litten an einer hypertensiven Kardiomyopathie. Fast alle Patienten (17 von 18) wiesen eine arterielle Hypertonie auf, sieben eine Hyperurikämie, sechs einen Diabetes mellitus Typ 2 und drei Patienten eine Hypercholesterinämie. Eine detaillierte Charakterisierung der einzelnen Patienten zeigt Tabelle 1.

Der überwiegende Teil der in der Studie eingeschlossenen Patienten stand unter einer ausschließlich subkutan applizierten Erythropoietintherapie. Der Bereich der wöchentlichen Erythropoietindosis lag zwischen 0 und 15000 Einheiten mit einem Median von 4000 Einheiten. Nähere Einzelheiten sind der Tabelle 2 zu entnehmen.

Wie Tabelle 3 zeigt, erhielten 16 Patienten studienunabhängig Antihypertensiva, jeweils elf Patienten Diuretika bzw. gerinnungsmodulierende Pharmaka (Thrombozytenaggregationshemmer, Cumarinderivate), sieben Lipidsenker und vier Xantinoxidasehemmer.

2.4.2. Charakterisierung der Kontrollgruppe

Die Kontrollgruppe bestand aus 16 nierengesunden Probanden (9 Männer, 7 Frauen) im Alter von 22 bis 59 Jahren (Mittelwert 54 ± 10 Jahre; Median 56 Jahre). Es waren keine kardiovaskulären Vorerkrankungen bekannt. Tabelle 4 zeigt weitere Charakteristika der Probanden.

2.5. Dialysegeräte/ extrakorporales System/ Wasseraufbereitung

Im Rahmen der Studie wurden für die Low-Flux- sowie für die High-Flux-Hämodialyse Gambro-Hämodialysegeräte des Typs AK 200S, für die Hämodiafiltration Gambro-Hämodialysegeräte vom Typ AK 200S Ultra benutzt

(Gambro AB, Lund, Schweden). Das Dialysat wurde mittels Gambro® Ultrafilter U8000S gereinigt und unter Verwendung von Natriumhydrogencarbonat-Kartuschen (Gambro, DiaCart® 720g,) und in Einwegkanistern vorgefertigter Dialysekonzentratlösung (saures Dialysekonzentrat, MTN Neu-Brandenburg, Deutschland) aufbereitet. Das Dialysewasser wurde mittels eines Gambro-Wasseraufbereitungssystems CWP 100, Modell WRO 102 H (Gambro Lundia AB, Monitor Division, Lund, Schweden) produziert. Als extrakorporaler Kreislauf kamen Blutschlauchsysteme der Firma Gambro zum Einsatz (bei der Hämodialyse Gambro medical line BL 226, 6189500 A, bzw. bei der Hämodiafiltration Gambro medical line BL 149, 6189815 A, Gambro Dasco S.p.A., Medolla, Italien).

Tabelle 1: Detaillierte Charakterisierung der in der Studie eingeschlossenen Patienten

Patient	Alter	m/w	Dialyse seit	BMI	Dialyse-zugang	Dialyse-art zuvor	RRF	Ursache term. Niereninsuff.	Nebendiagnosen	Risikofaktor	Raucher
[Initialen]	[Jahre]	[m/f]	[Monate]			[HD/HDF]	[ml]				
SD	56	m	69	24	AVF li UA	HD	0	diabetische Nephropathie	HTN CM, PAH II	DM II, HC	nein
GW	54	m	24	37,3	AVF li UA	HD	0	Z.n. TU-Nephrektomie	-	HTN, HU	nein
JB	49	m	71	24,8	AVF li. UA	HD	250	hypertensive Nephropathie	1-KHK, Z.n. Melanom	HTN, HU	ja
HBö	55	m	72	29	AVF li UA	HD	0	hypertensive Nephropathie	HTN CM, Oligophrenie	HTN, HLP, HC, HU	ja
HBr	48	m	20	29,8	AVF li UA	HD	200	hypertensive Nephropathie	HTN CM, HI NYHA II	HTN, HLP, HU, Ad	nein
EW	79	m	16	29,9	AVF re UA	HD	450	GN	KHK, Z.n. AKE, Interm. VHF, BAA, Z.n.Blasen-NPL	HTN, HLP, HU	nein
KW	80	f	35	28,4	AVF li UA	HD	700	tubulointerstitielle Nephritis	KHK, HTN CM, AA bei VHF, PAH	DM II, HTN	nein
RB	70	m	11	30,4	AVF li UA	HD	565	hypertensive und diabetische Nephropathie	Z.n.NSTEMI, KHK, Z.n.Thyroid-EX	DM II, HTN	nein
HB	77	m	29	32,8	AVF li UA	HD	1700	autosomal dominante polyzystische Nierenerkrankung	HTN CM, AI Grad I	HTN, DM II, HU	nein
RS	57	m	114	28,1	AVF re UA	HD	0	Nephrektomie bei retrogradem Nierenversagen	HTN CM	HTN, HC	nein
MF	61	m	33	30,4	AVF li UA	HD	400	hypertensive und diabetische Nephropathie	HTN CM, KHK, COPD, MI Grad I	DM II, HTN	ja

Patient	Alter	m/w	Dialyse seit	BMI	Dialyse-zugang	Dialyse-art	RRF	Ursache term. Niereninsuff.	Nebendiagnosen	Risikofaktor	Raucher
[Initialen]	[Jahre]	[m/f]	[Monate]			[HD/HDF]	[ml]				
HS	36	f	31	19,9	AVF li OA	HDF	340	hypertensive Nephropathie	Urämie, mittelgradig eingeschränkte EF	HTN	nein
WF	41	m	37	23,3	AVF li UA	HD	0	tubulointerstitielle Nephritis	Aorteninsuff. Grad I	HTN	nein
GU	65	m	89	24,1	AVF li. UA	HD	0	ADPKD	HI NYHA II, Z.n. HWI, Z.n.ACVB-OP, 3-KHK	HTN	nein
HG	57	m	38	21,9	AVF li. UA	HD	500	hypertensive Nephropathie	-	HTN	ja
PK	71	m	61	28,9	AVF li. OA	HDF	800	GN	ACI-Sten, pAVK, PNP	HTN, DM II	nein

Verwendete Abkürzungen: AA, Arrhythmia absoluta; ACI-Sten, Arteria Carotis interna Stenose; Ad, Adipositas; ADPKD, autosomal dominante polyzystische Nierendegeneration; AI, Aorteninsuffizienz; AKE, Aortenklappenersatz; Aorteninsuff., Aorteninsuffizienz; AVF, Arteriovenöse Fistel; BAA, Bauchaortenaneurysma; CM, Kardiomyopathie; COPD, Chronisch Obstruktive Lungenerkrankung; DM II, Diabetes mellitus Typ 2; DN-ZVK, Doppelnadel-Zentralvenenkatheter; EF, Ejektionsfraktion; f, female; GN, Glomerulonephritis; HC, Hypercholesterinämie; HD, Hämodialyse; HDF, Hämodiafiltration; HI, Herzinsuffizienz; HLP, Hyperlipoproteinämie; HTN, Hypertonie; HU, Hyperurikämie; HWI, Hinterwandinfarkt; KHK, koronare Herzkrankheit; li., links; m, männlich; MI, Mitralinsuffizienz; NPL, Neoplasie; NYHA, New York Heart Association; OA, Oberarm; pAVK, periphere arterielle Verschlusskrankheit; PNP, periphere Polyneuropathie; re., rechts; RRF, Restnierenfunktion; Thyroid-EX, Thyroidektomie; UA, Unterarm; w, weiblich; Z.n., Zustand nach.

Tabelle 2: Relevante Laborparameter zu Studienbeginn und konstante subkutane Erythropoietindosis während der Studiendauer

Patient [Initialen]	EPO [U/Woche]	Hämatokrit [%]	Hämoglobin [g/dl]	PO ₄ [mmol/l]	Ca [mmol/l]	CaxP [mg ² ·x ^{ml} ²]	Albumin [g/l]	Gesamt- cholesterin [mg/dl]	HDL- cholesterin [mg/dl]	Triglyceride [mg/dl]	PTH [pg/ml]
<i>SD</i>	3000	33	10,8	1,96	2,56	62,2	42,7	159	24,6	86	186
<i>GW</i>	9000	39	13,1	1,74	2,23	48,2	42,6	188	26,7	247	205
<i>JB</i>	8000	40	13,2	1,83	2,44	55,4	43,8	160	50,6	115	111
<i>HBö</i>	3000	33	11,2	1,20	2,62	39,0	35,0	150	32,2	183	241
<i>HBr</i>	6000	37	12,5	1,63	2,42	49,0	39,3	133	39,1	217	308
<i>EW</i>	4000	37	12,3	1,20	2,02	30,1	39,2	170	43,6	183	311
<i>KW</i>	2000	39	12,2	1,33	2,11	34,9	39,7	168	56,8	112	179
<i>RB</i>	2000	37	12,5	1,58	2,07	40,6	43,0	124	28,8	131	278
<i>HB</i>	4000	37	12,0	1,18	2,31	33,8	43,6	140	39,2	118	176
<i>RS</i>	2000	39	13,3	1,71	2,54	54,0	39,3	220	68,9	136	199
<i>MF</i>	4000	33	10,8	1,98	2,24	55,2	36,8	157	28,6	60	633
<i>EB</i>	15000	26	8,7	1,42	2,18	38,4	39,9	132	70,9	59	130
<i>UP</i>	0	38	12,8	2,61	2,44	79,1	41,4	169	31,4	99	34,9
<i>HS</i>	2000	38	12,6	1,66	2,33	48,0	41,3	277	44,9	252	305
<i>WF</i>	4000	41	12,9	1,80	2,67	59,7	39,7	103	48,8	159	307
<i>GU</i>	5000	39	12,5	1,92	2,28	54,4	37,9	170	39,0	176	189
<i>HG</i>	4000	35	12,1	2,68	2,41	80,2	45,0	135	53,0	121	44
<i>PK</i>	4000	37	12,2	1,41	2,24	39,3	42,6	137	30,9	268	163

In der Tabelle verwendete Abkürzungen: CaxP, Kalziumphosphatprodukt; EPO, Erythropoietin; PO₄, Phosphat; PTH, Parathormon.

Tabelle 3: Medikation während der Studiendauer

Patient	Medikation
<i>SD</i>	ASS, Bisoprolol, Enalapril, Minoxidil, Allopurinol
<i>GW</i>	Simvastatin
<i>JB</i>	ASS, Metoprolol, Torasemid, Xipamid, Enalapril, Candesartan
<i>HBö</i>	ASS, Allopurinol
<i>HBr</i>	Carvedilol, Ramipril, Candesartan, Lercanidipin, Simvastatin, Allopurinol
<i>EW</i>	ASS, Torasemid, Pravastatin, Xipamid, Valsartan, Glyceroltrinitrat
<i>KW</i>	Phenprocoumon, Metoprolol, Digitoxin, Isosorbidmononitrat, Torasemid, Glimepirid
<i>RB</i>	ASS, Metoprolol, Furosemid, Losartan, Minoxidil, Lercanidipin, Clonidin, Allopurinol
<i>HB</i>	ASS, Bisoprolol, Spironolacton, Torasemid, Simvastatin, Cetirizin
<i>RS</i>	Enalapril, Clonidin, Verapamil
<i>MF</i>	ASS, Metoprolol, Furosemid, Ramipril, Amlodipin
<i>EB</i>	Torasemid, Enalapril, Amlodipin, Dihydralazin
<i>UP</i>	Metoprolol, Valsartan, Hydrochlorthiazid, Doxazosin, Torasemid
<i>HS</i>	Metoprolol, Candesartan, Minoxidil, Amlodipin, Clonidin, Torasemid, Simvastatin
<i>WF</i>	ASS, Metoprolol
<i>GU</i>	ASS, Carvedilol, Candesartan, Amlodipin, Simvastatin
<i>HG</i>	Nebivolol, Torasemid, Valsartan, Lercanidipin, Moxonidin, Minoxidil
<i>PK</i>	Clopidogrel, Celiprolol, Torasemid, Candesartan, Amlodipin, Moxonidin, Simvastatin

In der Tabelle verwendete Abkürzung: ASS, Acetylsalicylsäure.

Tabelle 4: Charakterisierung der Kontrollgruppe

Patient	Geschlecht	Alter	Raucher	Risikofaktoren	Medikation
[initialen]	[m/f]	[Jahre]	[ja/nein]		
<i>UK</i>	f	56	nein	Hypertonie	Lisinopril
<i>JW</i>	w	22	nein		
<i>PB</i>	m	58	ja		
<i>RO</i>	m	59	nein		
<i>HAT</i>	w	55	ja	Hypertonie	Torasemid
<i>ER</i>	w	55	nein		
<i>LK</i>	w	54	nein	Hypertonie	
<i>BB</i>	w	39	nein		
<i>DU</i>	m	52	nein		
<i>GA</i>	w	45	nein		
<i>RA</i>	m	57	nein	Hypertonie	Ramipril
<i>HH</i>	m	56	nein		
<i>PD</i>	m	56	nein		
<i>NG</i>	m	59	ja		
<i>WL</i>	m	57	nein		
<i>LG</i>	m	59	nein	Hypertonie, Hypercholesterin- ämie, Hyperurikämie	Ramipril, Allopurinol, Pravastatin, Lercanidipin

2.6. Versuchsdialysatoren

In der vorliegenden Studie kamen drei verschiedene synthetische Hohlfaserdialysatoren zum Einsatz, die sich im Wesentlichen nur durch die Permeabilität für Mittelmoleküle und Wasser, d.h. im Ultrafiltrationskoeffizienten, unterschieden. Im Einzelnen waren dies der mit einer Low-Flux-Polysulfonmembran ausgestattete F 8 HPS-Dialysator, der mit einer High-Flux-Polysulfonmembran ausgestattete HF 80 S-Dialysator (jeweils Fresenius, Bad Homburg, Deutschland) sowie der High-Flux-Polyethersulfondialysator NIPRO Pureflux[®]-170H (NIPRO Corporation, Osaka, Japan). Die beiden High-Flux-Dialysatoren unterschieden sich deutlich in den Ultrafiltrationskoeffizienten. Weitere Details sind Tabelle 4 zu entnehmen. Während der HF 80 S-Dialysator für die High-Flux-Hämodialyse verwendet wurde, kam der Pureflux[®]-170H-Dialysator ausschließlich bei der Hämodiafiltration zum Einsatz.

Tabelle 5: Technische Daten der verwendeten Dialysemembranen

	Fresenius F8HPS	Fresenius HF80S	NIPRO Pureflux[®] 170H
<i>Membranmaterial</i>	Polysulfon/ Polyvinylpyrrolidon	Polysulfon/ Polyvinylpyrrolidon	Polyethersulfon/ Polyvinylpyrrolidon
<i>Kapillarlumen [μm]</i>	200	200	200
<i>Kapillarwandstärke [μm]</i>	40	40	30
<i>Oberfläche [m^2]</i>	1,8	1,8	1,7
<i>Sterilisationsverfahren</i>	Dampf	Dampf	γ -Strahlen
<i>Ultrafiltrationskoeffizient [ml / mmHg*h]</i>	18	55	74

2.7. Versuchsdurchführung

Entsprechend des individuellen Dialyserhythmus wurde jeder Patient jeweils vier Wochen (12 Behandlungen) mit jedem der drei Dialyseverfahren in randomisierter Reihenfolge behandelt. Die Blutentnahmen erfolgten zu Beginn jedes Dialyseverfahrens sowie am Ende jedes vierwöchigen Intervalls. Für die Isolation der EPCs wurde die Abnahme jeweils vor Behandlungsbeginn und zur Messung der zusätzlichen Parameter jeweils vor und nach der Behandlung durchgeführt. Die einzelne Dialysebehandlung dauerte, den individuellen Bedürfnissen der Patienten angepasst, zwischen 255 und 300 min, durchschnittlich bei allen drei Verfahren 268 ± 15 min., wobei der einzelne Patient immer gleich lange behandelt wurde. Der Dialysatfluss war konstant auf 500 ml/min eingestellt, der Blutfluss variierte je nach Patient und lag durchschnittlich für die LF-HD bei $385,3 \pm 29,5$ ml/min, für die HF-HD bei $381,0 \pm 35,7$ ml/min und für die HDF bei $382,5 \pm 28,0$ ml/min. Die individuelle Antikoagulation wurde unverändert aus der Routinedialysebehandlung übernommen und erfolgte bei 16 Patienten mit unfraktioniertem Heparin-Natrium (Heparin-Natrium-25.000-ratiopharm[®], ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland); zwei Patienten erhielten fraktioniertes Heparin (Dalteparin-Natrium, FRAGMIN[®] 10 ml MULTIDOSE, PHARMACIA GmbH, Karlsruhe, Deutschland). Vor Dialysebeginn wurde der extrakorporale Kreislauf mit 1500 ml isotoner Kochsalzlösung (1500 ml 0,9% Natriumchlorid-Lösung, Gambro Dasco S.p.A. Sondalo, Italien) im „Single Pass“-Verfahren entlüftet und gespült. Am Versuchsende wurde zur Blutrückgabe ebenfalls mit isotoner Kochsalzlösung (250 bis 350 ml 0,9% Natriumchlorid-Lösung, Gambro Dasco S.p.A. Sondalo, Italien) gespült. Bei der Online-Hämodiafiltration wurde den Patienten mit einer Flussrate von 50% der Blutflussrate sterilfiltrierte Dialysierflüssigkeit im Prädilutionsmodus, d.h. vor dem Dialysator, infundiert, im Mittel $49,5 \pm 16,9$ l pro Dialysebehandlung. Angepasst an die jeweilige Gewichtszunahme der einzelnen Patienten zwischen den Dialysebehandlungen wurde die Ultrafiltrationsrate, d.h. der Flüssigkeitsentzug, festgelegt. Sie betrug pro Dialysebehandlung zwischen 0 und 5,9 l und lag damit im Mittel bei der Low-Flux-Dialyse bei $2,78 \pm 1,78$ l, bei der High-Flux-Dialyse bei $2,62 \pm 1,41$ l und bei der Hämodiafiltration bei $2,51 \pm 1,20$ l.

2.7.1. Blutentnahme

Die Blutentnahmen vor der Dialyse wurden steril direkt aus der Dialylenadel durchgeführt. Anschließend wurde dem Patient gemäß Verordnung Heparin bzw. Fragmin verabreicht, dann wurde der arterielle Schenkel des Blutschlauchsystems an die Maschine angeschlossen, wobei die Blutpumpe auf eine Geschwindigkeit von 100 ml/min eingestellt war. Nach vollständiger Füllung des extrakorporalen Systems mit Blut wurde auch der venöse Schenkel des Blutschlauchsystems mit dem Patienten verbunden. Danach erfolgte die Erhöhung des Blutflusses auf Werte zwischen 295 bis 415 ml/min.

Post-Dialyseentnahmen erfolgten nach Dialyseende 120 Sekunden nachdem die Blutpumpe auf 50ml/min reguliert und der Dialysatfluß gestoppt worden waren.

Die Blutproben zur Isolation der endothelialen Vorläuferzellen wurden bei Raumtemperatur gelagert und innerhalb von 6-20 h verarbeitet.

Die Monovetten mit dem Blut für alle weiteren Parameter wurden innerhalb von 30 min nach der Entnahme für 10 min bei 6000 Umdrehungen/min zentrifugiert; das überstehende Plasma wurde abpipettiert und bei -20°C bis zur Weiterbearbeitung eingefroren.

2.8. Bestimmung der endothelialen Vorläuferzellen

Die Bestimmung der EPCs wurde aus 50 ml heparinisiertem Vollblut vorgenommen. Zunächst wurden hieraus Blutbild und Hämatokrit nach dem Prinzip der Volumenimpedanz am Hämatologiediagnostik-Analysegerät ABX Pentra 60, Axon Lab AG, Stuttgart, Deutschland, bestimmt. Anschließend erfolgte die Abtrennung der mononukleären Zellfraktion aus der Probe bei Raumtemperatur und unter sterilen Bedingungen mittels Dichtegradientenzentrifugation.

2.8.1. Isolation der mononukleären Zellfraktion

Die 50 ml-Blutproben wurden im Labor in sterile Probenbecher (Becton Dickinson, FALCON®, NJ, USA) umgefüllt, mit einer serologischen Pipette (Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland) volumetrisch bestimmt und mit 40 ml PBS der Firma Promocell, Heidelberg, Deutschland, verdünnt. Der PBS waren das Antibiotikum PenStrep (StemCell Technologies, St. Katharinen, Deutschland) sowie das Antimykotikum Amphotericin B zugesetzt worden. 15 ml Ficoll-Paque™ PLUS (GE Healthcare Ltd., München, Deutschland) wurden mit jeweils 30 ml des verdünnten Patientenbluts überschichtet. Anschließend folgte eine 30-minütige Zentrifugation bei 800 g.

Mittels Dichtezentrifugation erfolgte die Auftrennung des Blutes in seine Bestandteile. Die sich bildende Zwischenschicht aus mononukleären Zellen (MNC; „buffy coat“) wurde mit einer serologischen Pipette vorsichtig entnommen und in ein neues 50 ml Polypropylenröhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde mit PBS/2 % FCS (Promocell, Heidelberg, Deutschland) auf 50 ml aufgefüllt und für 20 min bei 300 g (1100 Umdrehungen/Minute) zentrifugiert. Um Verunreinigungen durch Thrombozyten und basophile Granulozyten möglichst vollständig zu entfernen wurde danach der Überstand abgenommen, die Zellen erneut mit PBS/2 % FCS auf 50 ml verdünnt und wiederum 20 min bei 300 g zentrifugiert. Diese Reinigungsschritte wurden einmal wiederholt, bevor die MNC in 10 ml PBS/2 % FCS resuspendiert wurden.

2.8.2. Kultivierung der endothelialen Vorläuferzellen

Die Kultivierung der MNCs erfolgte zum einen auf Fibronectin-beschichteten Platten nach dem Versuchsprotokoll von Hill *et al.* aus dem Jahr 2003 (CFU-Hill-Kolonien) [33], zum anderen auf Kollagen I nach der von Ingram *et al.* 2004 beschriebenen Methode (ECFCs) [13].

Für die CFU-Hill-Kolonien wurden 1×10^7 mononukleäre Zellen in 4 ml EndoCult® Liquid Medium Kit (StemCell Technologies, St. Katharinen, Deutschland) resuspendiert und je 2 ml in zwei Wells ($2 \times 5 \times 10^6$ Zellen/Well) einer mit Fibronectin

beschichteten BioCoat™-6-Well-Platte (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) ausgebracht. Anschließend wurden die Zellen 42 bis 48 h bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit im Inkubator (SANYO CO₂ Incubator, Typ MCO-20AIC, biomedis®, Gießen, Deutschland) kultiviert. Nach dieser Zeit erfolgte eine Passage der Primärkulturen. Zahlreiche Zellpopulationen, unter anderem auch reife Endothelzellen und einige Monozyten, adhärten am Boden der Wells. Die nicht-adhärenen Zellen wurden mithilfe einer Pipette entnommen und in 5 ml Falcon™-Teströhrchen (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) gefüllt; die am Boden adhärenen Zellen wurden verworfen. Die Zellzahl wurde erneut am ABX Pentra 60 bestimmt und mithilfe von EndoCult® Liquid-Medium auf 1 x 10⁶ Zellen/ml eingestellt. Vier Wells einer 24-Well-fibronectinbeschichteten Platte (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) wurden mit je 1 ml Medium befüllt, anschließend wurden die Zellen erneut bei 37°C, 5 % CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von mindestens 95 % weitere 72 h inkubiert.

Die Kultivierung endothelialer kolonie-bildender Zellen (ECFCs) fand auf BD BioCoat™-6-Well-Platten statt, die mit Rattenschwanzkollagen vom Typ I gleichförmig beschichtet waren (BD 354400, Heidelberg, Deutschland). Als Endothelzellmedium wurde EGM-2 (Promocell, Heidelberg, Deutschland) mit Supplementmix (Promocell, Heidelberg) benutzt. Das EGM2-Medium der EPCs enthielt fetales Kälberserum, epidermalen Wachstumsfaktor, Hydrocortison, vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor, Fibroblasten-Wachstumsfaktor, Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor, Ascorbinsäure, Heparin sowie Penicillin, Streptomycin und Amphotericin-B. In 5 ml EGM-2 wurden 4x10⁷ Zellen suspendiert und in zwei Wells ausgesät. Nach 22 bis 24 Stunden wurde der Zellüberstand abgesaugt und die nicht adhärenen Zellen verworfen. Die adhärenen Zellen wurden zwei Mal mit EGM-2-Medium gewaschen und mit je 2,5 ml frischem Medium versorgt. In den Wells dieser Zellen wurde täglich der Überstand abgesaugt und jeweils 2,5 ml frisches Medium zugesetzt. Nach insgesamt sieben Tagen erfolgte die Auswertung.

2.8.3. Bestimmung der Kolonien am Phasenkontrastmikroskop

Die CFU-Hill-Kolonien wurden am Tag 5 des Versuchs mithilfe des Axiovert 40 CFL der Firma Zeiss, Göttingen, Deutschland, bei einer 40-fachen Vergrößerung gezählt. Dabei waren die Kolonien als zentrale Häufung runder Zellen und spindelförmiger, länglicher Zellen in der Peripherie definiert [33]. Kolonien ohne diese typische Morphologie von CFU-Hill-Kolonien wurden nicht gewertet.

Die ECFCs stellten sich nach sieben Tagen in Kultur als klar umschriebene Monoschicht pflastersteinartiger Zellen dar, die morphologisch Endothelzellen verwandt sind [13]. Die quantitative Erfassung der Kolonien erfolgte ebenfalls bei einer 40-fachen Vergrößerung am Phasenkontrastmikroskop.

2.8.4. Durchflusszytometrische Quantifizierung und Qualifizierung der Zellen

Da sich verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe bei gemeinsamer Wellenlänge anregen lassen, dabei aber unterschiedliche, charakteristische Emissionsspektren zeigen, ermöglichte eine Dreifachmarkierung gegen CD34, CD45 sowie KDR die Identifikation endothelialer Vorläuferzellen am Durchflusszytometer. Das Glykoprotein CD34 stellt den vorrangigen Detektionsparameter hämatopoetischer Vorläuferzellen dar, dessen Expression im Verlauf der Zelldifferenzierung kontinuierlich abnimmt und schließlich vollkommen verloren geht [34]. Das CD45-Antigen (Leukozyte Common Antigen) wird auf sämtlichen Zellen hämatopoetischen Ursprungs exprimiert, mit Ausnahme der Erythrozyten und Thrombozyten [35]. KDR, oder auch VEGFR-2, ist ein transmembranärer Rezeptor für vaskulär-endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF), und findet sich weit verbreitet auf Zellen mesodermalen Ursprungs, darunter Blut-, Endothel- und Herzzellen [36].

Zur Auszählung der CFU-Hill-Zellen wurde das Medium mitsamt nicht-adhärenenten Zellen entnommen und verworfen. Die Wells wurden mit 1 ml PBS (mit 0,5 % FCS und 1 µg/50 µl IgG) gewaschen. Dann wurde Immunglobulin G zur Minimierung unspezifischer Bindungen der VEGFR-2-Antikörper zugesetzt. Zur Ablösung der Zellen vom Untergrund wurden 0,5 ml Accutase pro Well zu den Zellen zugegeben und 30 min im Brutschrank wirken gelassen. Anschließend wurde die Zellsuspension

während vier Minuten bei 1000 Umdrehungen/min zentrifugiert und in 250 µl PBS aufgenommen. Nach mindestens 15 min bei Raumtemperatur wurden die Zellen markiert. Als Farbstoffe kamen dabei Fluoresceinisothiocyanat (FITC) mit einem Emissionsmaximum von 519 nm, Phycoerythrin (PE, Emissionsmaximum bei 578 nm) sowie Phycoerythrin-Cy5 (PE-CyTM5, 670 nm) zum Einsatz. Zur Bestimmung unspezifischer Antikörperbindungen wurde im Vorfeld des Versuchs eine „Blocking“-Kontrolle durchgeführt. Dazu wurde die Probe mit den gleichen unkonjugierten Antikörpern vorinkubiert, die auch als Direktkonjugat verwendet wurden. Die Probe wurde als positiv gewertet, wenn die markierten Antikörper nicht gebunden waren und im Durchflusszytometer daher kein Signal erkennbar war.

Für die Zellzählung wurden 20 µl Zellsuspension mit 200 µl PBS aufgefüllt. Die Messung wurde über die Zeit gesteuert; innerhalb von 120 sec wurden 180 µl Zellsuspension (60 µl/min) analysiert. Zur Untersuchung der Coexpression von CD34, CD45 und VEGFR-2-KDR wurden 50 µl Zellsuspension mit 20 µl PE-CyTM5-konjugierten CD34-Antikörpern (Maus anti-human IgG₁, BD PharmingenTM, Heidelberg), 20 µl FITC-konjugierte CD45-Antikörper (BD PharmingenTM, Maus anti-human, IgG₁, Heidelberg) sowie 50 µl VEGFR2 (Maus anti-human VEGFR R2 (KDR)-PE, R&D Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) markiert. Apoptotische Zellen wurden in einer gesonderten Probe mit einer „Cell Viability Solution“ (7-Amino-Aktinomycin D, BD Via-ProbeTM, Becton Dickinson) angefärbt. Die Inkubationszeit der Proben betrug 45 min bei 4 °C. Für die Messung am FACScan (Becton Dickinson Biosciences, Heidelberg) wurden den Proben je 500 µl PBS zugesetzt und 5.000 Ereignisse gezählt. Zur Auswertung der Ergebnisse kam die BD CellQuestTMPro-Software zur Anwendung.

2.9. Messung der Laborparameter im Plasma

Die Bestimmung des Harnstoffs im Plasma erfolgte photometrisch mittels eines Cobas C 111 analyzer (Roche Diagnostics Ltd., Rotkreuz, Schweiz). Die Werte für β₂-Mikroglobulin, C-reaktives Protein und Albumin wurden mit einem Behring Nephelometer (BNProSpec, Behring GmbH, Marburg, Deutschland) ermittelt.

2.10. Berechnung der Dialysebehandlungseffizienz

Zur Bestimmung der Dialyседosis wurde der eKt/V für Harnstoff benutzt. eKt/V meint das Verhältnis zwischen dem pro Zeiteinheit von einem Stoff gereinigten Plasmavolumen zum Harnstoffverteilungsvolumen [37, 38]:

$$eKt/V = \text{art } Kt/V_{sp} - (0,6 \times \text{art } Kt/V_{sp}/t) + 0,03 \text{ bei AV-Zugängen}$$

(Gleichung 1a),

$$eKt/V = \text{ven } Kt/V_{sp} - (0,47 \times \text{ven } Kt/V_{sp}/t) + 0,02 \text{ bei venösem Dialysekatheter}$$

(Gleichung 1b), [37].

K stellt dabei die Clearance des Dialysators dar [l/h], t die Behandlungsdauer [h], und V das Verteilungsvolumen [l]; art und ven beziehen sich dabei auf die arterielle bzw. venöse Abnahme der Probe.

Die Reduktionsratio (RR) wurde nach Gleichung 2 [39] errechnet.

$$RR = (1 - C_{\text{post}}/C_{\text{pre}}) \times 100 \text{ [\%]} \quad (\text{Gleichung 2})$$

C_{pre} meint die Konzentration der gemessenen Substanz vor Beginn der Behandlung und C_{post} die Konzentration nach der Behandlung. Der C_{post} -Wert wurde für die Berechnung der Mittelmolekül-Reduktionsrate (β 2-Mikroglobulin) zuvor nach der von Bergström und Wehle beschriebenen Formel für Veränderungen des extrazellulären Flüssigkeitsvolumens korrigiert [38].

2.11. Statistische Auswertung

Zur deskriptiven Statistik wurde der Mittelwert +/- Standardabweichung und/oder der Median und Bereich angegeben. Zum Vergleich der Gruppen untereinander sowie mit der Kontrollgruppe wurde bei Normalverteilung der Daten die einfaktorielle ANOVA verwendet, bei nicht-normalverteilten Datensätzen kam der Kruskal-Wallis-Test zur Anwendung. Der Vergleich sämtlicher Proben der Dialysepatienten (alle vor und nach 4 Wochen abgenommenen Werte) mit der Kontrollgruppe erfolgte mittels eines t-Tests für nicht-paarige Stichproben, der Vergleich der Parameter vorher/nachher innerhalb einer Behandlung (wie z.B. CRP) mittels des t-Tests für

paarige Stichproben. Der Grad des linearen Zusammenhangs zwischen zwei verschiedenen Merkmalen wurde mit dem Korrelationskoeffizienten nach Pearson angegeben. Unterschiede wurden ab einem Signifikanzniveau $p < 0,05$ als statistisch signifikant gewertet. Zur statistischen Analyse wurde die Software Minitab® 15 für Windows (Additive GmbH, Friedrichsdorf) verwendet.

3. Ergebnisse

3.1. Die Dialyseverfahren im Vergleich

3.1.1. Effektivität der Dialyseverfahren

Für die verschiedenen untersuchten Dialyseverfahren lag eKt/V bei $1,48 \pm 0,3$ (Low-Flux-Hämodialyse), $1,42 \pm 0,3$ (High-Flux-HD) bzw. $1,38 \pm 0,2$ (Hämodiafiltration). Damit unterschieden sich die Low-Flux-Hämodialyse und die Hämodiafiltration deutlich voneinander ($p < 0,05$). Im mittelmolekularen Bereich präsentierten die Verfahren ebenfalls Differenzen untereinander. Während bei der Low-Flux-Hämodialyse das Mittelmolekül β_2 -Mikroglobulin nicht aus dem Blut entfernt wurde, erreichten wir mit der High-Flux-Dialyse und der Hämodiafiltration Reduktionsraten von $61,0 \pm 5,1$ % bzw. $68,2 \pm 9,3$ %. Damit war die Low-Flux-Hämodialyse in diesem Bereich den beiden anderen Verfahren hochsignifikant unterlegen (jeweils $p < 0,001$). Die Differenz in der β_2 -Mikroglobulin-Entfernung zwischen High-Flux-Hämodialyse und Hämodiafiltration war geringer ausgeprägt, erreichte aber ebenfalls statistische Signifikanz ($p < 0,05$).

3.1.2. Verlauf und Vergleich der Laborparameter

Die Tabellen 6 bis 8 geben eine Zusammenfassung der relevanten Laborparameter wieder. Die drei Verfahren waren bezüglich ihres Einflusses auf die Albumin-, Gesamteiweiß- und Phosphatkonzentrationen äquivalent. Die CRP-Konzentrationen zeigten zwischen den Studienteilnehmern zwar große Variabilität, signifikante Unterschiede zeigten sich jedoch nur zwischen der Gesamtzahl der Proben der Dialysepatienten und der Kontrolle (Median $2,87$ mg/dl bzw. $1,8$ mg/dl; $p < 0,01$).

Tab. 6: Laborparameter im Behandlungsverlauf (vor und nach jeweils der ersten Dialysebehandlung jedes Verfahrens); Dialyседosis eKt/V und Mittelmolekül β 2-Mikroglobulin. * $p < 0,05$ vs. HDF, ** $p < 0,001$ vs. HF-HD und HDF, *** $p < 0,05$ vs. HDF

	Alb [g/l]	TP [g/l]	PO₄ [mg/dl]	β2-M [mg/l]	eKt/V	β2-M-RR [%]
<i>LF-HD pre</i>	39,0 \pm 4,9	72,2 \pm 13,2	4,9 \pm 1,5	23,3 \pm 9,4	1,48*	2,27
<i>LF-HD post</i>	42,2 \pm 6,5	79,6 \pm 16,7	2,1 \pm 0,6	27,5 \pm 11,5	\pm 0,25	\pm 7,20 **
<i>HF-HD pre</i>	37,5 \pm 3,3	70,1 \pm 12,1	4,9 \pm 1,5	22,4 \pm 8,9	1,42	61,03
<i>HF-HD post</i>	41,3 \pm 6,1	77,9 \pm 15,8	2,0 \pm 0,7	10,0 \pm 4,0	\pm 0,26	\pm 5,15***
<i>HDF pre</i>	38,3 \pm 3,9	71,5 \pm 11,8	4,5 \pm 1,5	29,0 \pm 14,5	1,38	68,22
<i>HDF post</i>	42,0 \pm 5,2	79,4 \pm 15,5	2,0 \pm 0,8	9,7 \pm 3,5	\pm 0,23	\pm 9,30

Alb, Albumin; β 2-M, Beta-2-Mikroglobulin; PO₄, Phosphat; TP, Gesamteiweiß.

Tab. 7: Laborparameter im Gruppenvergleich, gemessen jeweils zu Beginn und am Ende jedes Vier-Wochen-Intervalls. * $p < 0,001$ vs. LF-HD, HF-HD und HDF; + $p < 0,001$ vs. Tag 28; # $p < 0,001$ vs. HF-HD und HDF; ° $p < 0,001$ vs. LF-HD und HF-HD.

	Alb [g/l]	TP [g/l]	PO₄ [mg/dl]	β2-M [mg/l]
<i>Gesunde</i>	34,2 \pm 2,5	68,5 \pm 5,0	5,8 \pm 0,5	1,7 \pm 0,5*
<i>LF-HD Tag 0</i>	39,0 \pm 4,9	72,2 \pm 13,2	4,9 \pm 1,5	23,3 \pm 9,4 ⁺
<i>LF-HD Tag 28</i>	39,3 \pm 2,5	75,5 \pm 6,0	5,1 \pm 1,6	34,2 \pm 15,5 [#]
<i>HF-HD Tag 0</i>	37,5 \pm 3,3	70,1 \pm 12,1	4,9 \pm 1,5	22,4 \pm 8,9
<i>HF-HD Tag 28</i>	39,1 \pm 5,0	73,8 \pm 13,8	4,8 \pm 1,5	24,6 \pm 12,9
<i>HDF Tag 0</i>	38,3 \pm 3,9	71,5 \pm 11,8	4,5 \pm 1,5	29,0 \pm 14,5 ^{+°}
<i>HDF Tag 28</i>	38,0 \pm 3,3	72,2 \pm 12,3	4,9 \pm 1,5	22,7 \pm 9,5

Alb, Albumin; β 2-M, Beta-2-Mikroglobulin; PO₄, Phosphat; TP, Gesamteiweiß.

Tab. 8: CRP-Werte in [mg/l] im Gruppenvergleich, gemessen jeweils zu Beginn und am Ende jedes Vier-Wochen-Intervalls. * $p < 0,01$ vs. Gesamtzahl der Dialysepatienten (Median 2,87 mg/l).

	Gesunde	LF-HD Tag 0	LF-HD Tag 28	HF-HD Tag 0	HF-HD Tag 28	HDF Tag 0	HDF Tag 28
<i>MW</i>	2,47	5,84	6,10	10,49	6,50	9,97	10,10
<i>SD</i>	4,2	7,9	7,6	22,93	7,8	28,2	22,6
<i>Median</i>	1,8*	2,5	2,7	3,6	3,5	1,9	3,0
<i>Min</i>	0,26	0,46	1,00	0,86	0,50	0,57	0,90
<i>Max</i>	18,0	26,3	26,3	96,2	26,3	118,0	96,2

3.2. Ergebnisse der Zellkulturen

3.2.1. Zellkulturen auf Fibronektin (CFU-Hill)

Nach fünf Tagen in Kultur stellen sich die CFU-Hill-Kolonien als zentrale Häufung runder Zellen mit spindelförmig in die Peripherie ausstrahlenden Zellen dar. Abbildung 1 zeigt eine typische CFU-Hill-Kolonie am Tag 5 der Kultur.

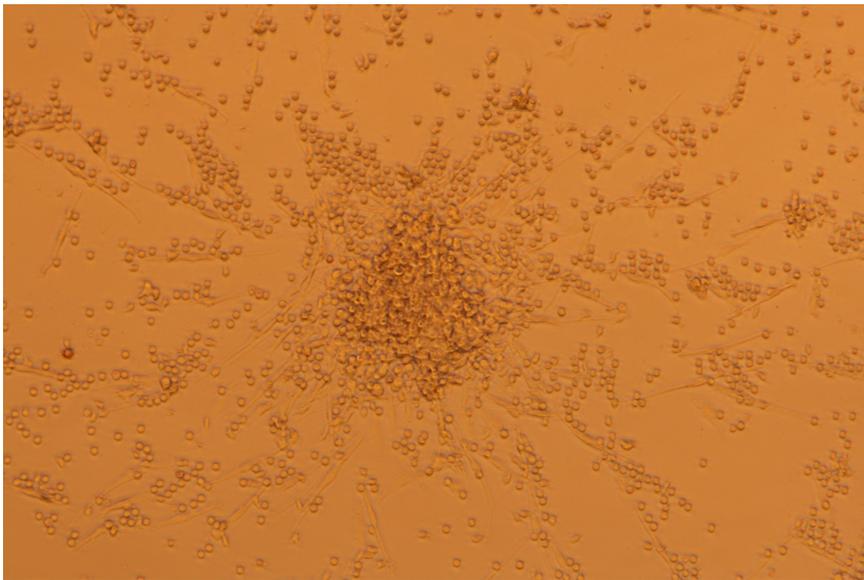


Abb. 1:
Am Phasenkontrast-
mikroskop bei 40-
facher Vergrößerung
gewonnenes Bild
einer CFU-Hill-Kolonie
am Tag 5.

3.2.1.1. CFU-Hill-Gesamtzellzahlen

Für keines der untersuchten Dialyseverfahren ergab sich eine signifikante Differenz zwischen Tag 0 und Tag 28. Aufgrund einer hohen interindividuellen Streubreite in beiden Gruppen waren die Werte nicht vergleichbar. In der Kontrollgruppe lag der Median bei 162×10^4 Zellen je 10^7 MNCs, in den Patientenkollektiven variierten die absoluten Zellzahlen zwischen 85 und 114×10^4 Zellen pro 10^7 MNCs. Die Ausgangswerte am Anfang eines Behandlungsabschnitts setzen sich dabei zusammen aus Werten, die vor der ersten Studienbehandlung bzw. am Ende des vorangegangenen Vier-Wochen-Intervalls gemessen wurden. Abbildung 2 und Tabelle 9 illustrieren die Ergebnisse aus dem CFU-Hill-Ansatz.

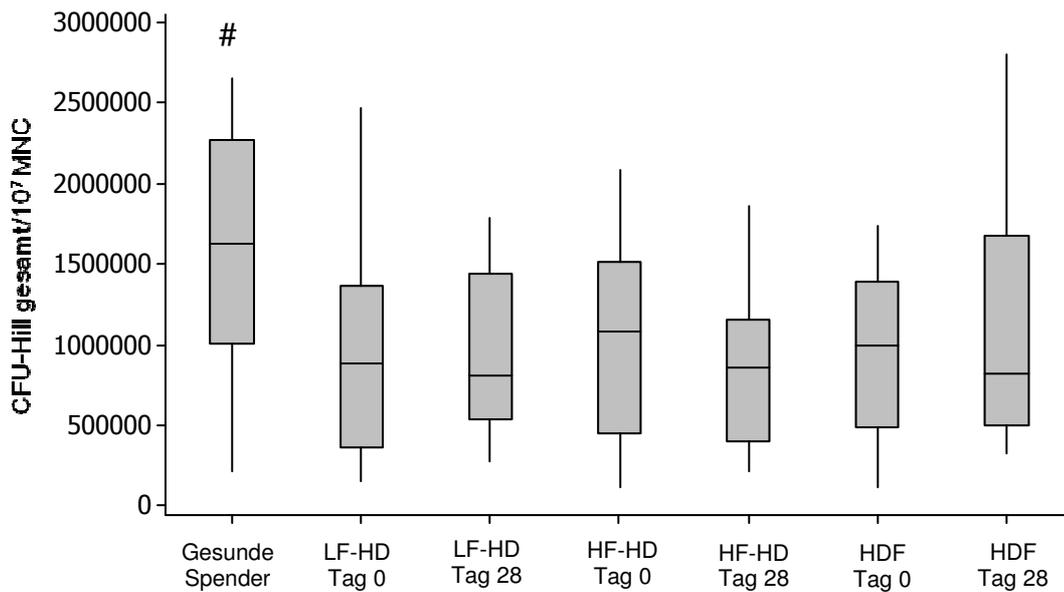


Abb. 2: Gesamtzellzahlen pro 10^7 MNC nach fünf Tagen in Kultur auf Fibronectin. # $p < 0,005$ vs. Gesamtzahl der Patientengruppen.

Signifikante Differenzen ergaben sich nur im Vergleich der Spendergruppe mit dem Kollektiv der Dialysegruppen ($972 \pm 583 \times 10^3$ bzw. $1590 \pm 723 \times 10^3$; $p = 0,0017$).

Tab. 9: Auf Fibronectin aus 10^7 mononukleären Zellen entstandene Gesamtzellzahlen. * $p = 0,0017$ vs. Gesamtzahl der Patientengruppen.

	Gesunde	LF-HD	LF-HD	HF-HD	HF-HD	HDF	HDF
	Spender	Tag 0	Tag 28	Tag 0	Tag 28	Tag 0	Tag 28
<i>MW</i> $\times 10^3$	1.590*	952	939	1.037	850	915	1.136
<i>SD</i> $\times 10^3$	723	674	509	629	447	497	729
<i>Median</i> $\times 10^3$	1.620	882	807	1.080	857	985	816
<i>Min</i> $\times 10^3$	213	139	265	110	201	108	315
<i>Max</i> $\times 10^3$	2.659	2.471	1.781	2.078	1.856	1.739	2.809

3.2.1.2. CFU-Hill-Koloniezahlen

Für die CFU-Hill-Kolonien ergaben sich in der statistischen Auswertung keine signifikanten Differenzen. Auch die Gegenüberstellung der Ergebnisse aus dem gesunden Spenderkollektiv mit dem Patientenkollektiv brachte keine eindeutigen Unterschiede zwischen den Gruppen. Erneut war eine große interindividuelle Streubreite besonders in den Patientenkollektiven zu beobachten (siehe auch Abbildung 3 und Tabelle 10).

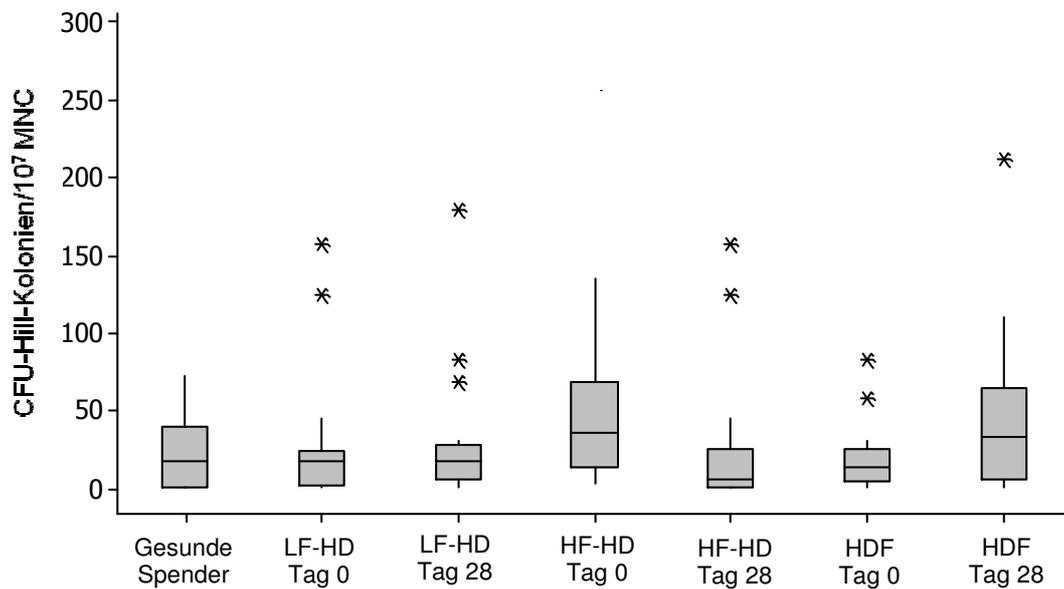


Abb. 3: CFU-Hill-Kolonien, nach Kultur von 10⁷ mononukleären Zellen. Gefundene Differenzen erreichten nicht Signifikanzniveau.

Tab. 10: CFU-Hill-Kolonien aus 10^7 mononukleären Zellen. Gefundene Differenzen erreichten nicht Signifikanzniveau.

	Gesunde	LF-HD Tag 0	LF-HD Tag 28	HF-HD Tag 0	HF-HD Tag 28	HDF Tag 0	HDF Tag 28
<i>MW</i>	21,7	28,4	30,9	53,7	26,6	18,7	43,2
<i>SD</i>	23,5	44,6	45,9	65,9	45,4	21,8	53,4
<i>Median</i>	18	18	18	35	5	13	33
<i>Min</i>	0	0	0	2,5	0	0	0
<i>Max</i>	72,5	157,5	180,0	262,5	157,5	82,5	212,5

3.2.1.3. Subpopulationen der CFU-Hill-Kolonien

In der vorliegenden Studie wurde eine CD34⁺KDR⁺CD45⁻-Population von einer CD34⁺KDR⁺CD45⁺-Population unterschieden. Erstere repräsentierte dabei eine Untergruppe der zweiten. Sowohl die CD34⁺KDR⁺CD45⁻- als auch die CD34⁺KDR⁺CD45⁺-Zellpopulation präsentierten zwischen den gesunden Spendern und dem Kollektiv der einzelnen Patientengruppen signifikante Differenzen (jeweils $p < 0,01$). Tabelle 11 zeigt die zugehörigen Messwerte, Abbildung 4 illustriert diese.

Tab. 11: Aus 10^7 mononukleären Zellen kultivierte CD34⁺KDR⁺CD45⁻-Zellen im CFU-Hill-Ansatz. * $p < 0,01$ vs. Gesamtzahl der Dialysepatienten.

	Gesunde	LF-HD Tag 0	LF-HD Tag 28	HF-HD Tag 0	HF-HD Tag 28	HDF Tag 0	HDF Tag 28
<i>MW</i>	448	929	820	1157	1040	727	1347
<i>STABW</i>	537	821	548	1339	737	691	1288
<i>Median</i>	304*	757	748	664	775	644	943
<i>Min</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>Max</i>	1.591	2.590	1.835	4.575	2.590	2.434	4.575

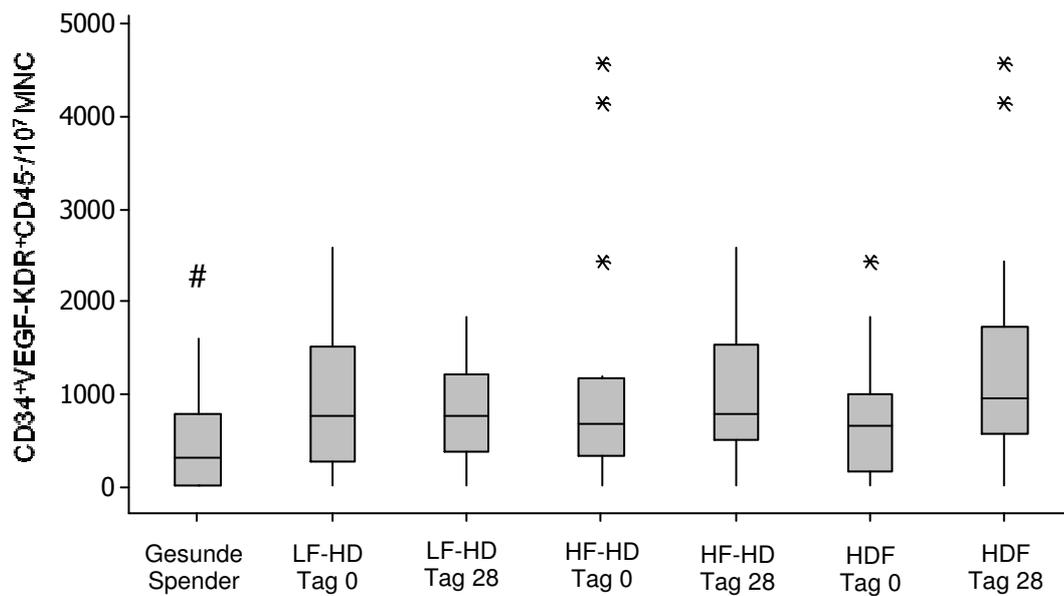


Abb. 4: Absolute Zahl der CD34⁺KDR⁺CD45⁻-Zellen bezogen auf 10⁷ MNCs nach fünf Tagen in Kultur auf Fibronectin. # p<0,01 vs. Gesamtzahl der Patientengruppen.

In der CD34⁺KDR⁺CD45⁺-Zellpopulation fanden sich zwischen den einzelnen Verfahren keine statistisch signifikanten Unterschiede. Die Gesamtzahl der Dialysepatienten lag aber deutlich über der der Kontrollgruppe (p<0,05). Abbildung 5 präsentiert diese Ergebnisse.

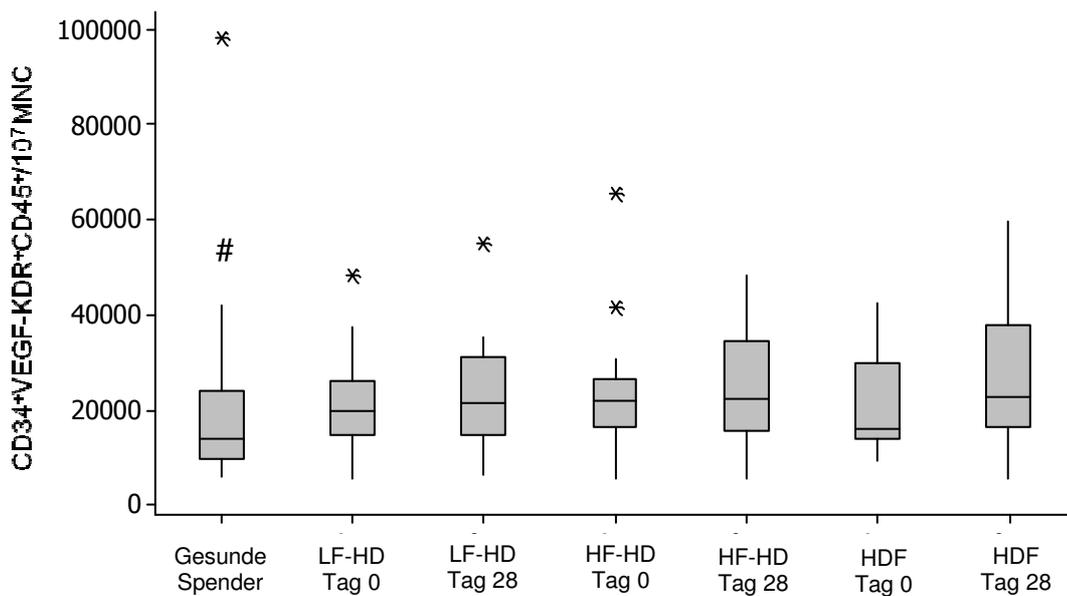


Abb. 5: Absolute Zahl der CD34⁺KDR⁺CD45⁺-Zellen bezogen auf 10⁷ MNCs auf Fibronectin. # p<0,05 für Gesunde Spender vs. Gesamtzahl der Patientengruppen.

3.2.1.4. Zellvitalität

Der Anteil vitaler CFU-Zellen lag in der Kontrollgruppe mit 97 ± 4 % nur gering über dem Durchschnitt in der Patientengruppe (Mittelwert 95 ± 6 %). Zwischen den verschiedenen Dialyseverfahren ließen sich keine signifikanten Differenzen in der Zellvitalität nachweisen, bei allen drei Verfahren lag der prozentuale Anteil der vitalen Zellen zwischen 93 und 96 %. Interindividuelle Schwankungen waren sowohl in der Kontroll- als auch in der Patientengruppe zu beobachten. Abbildung 6 gibt die Zellvitalität auf Fibronectin wieder.

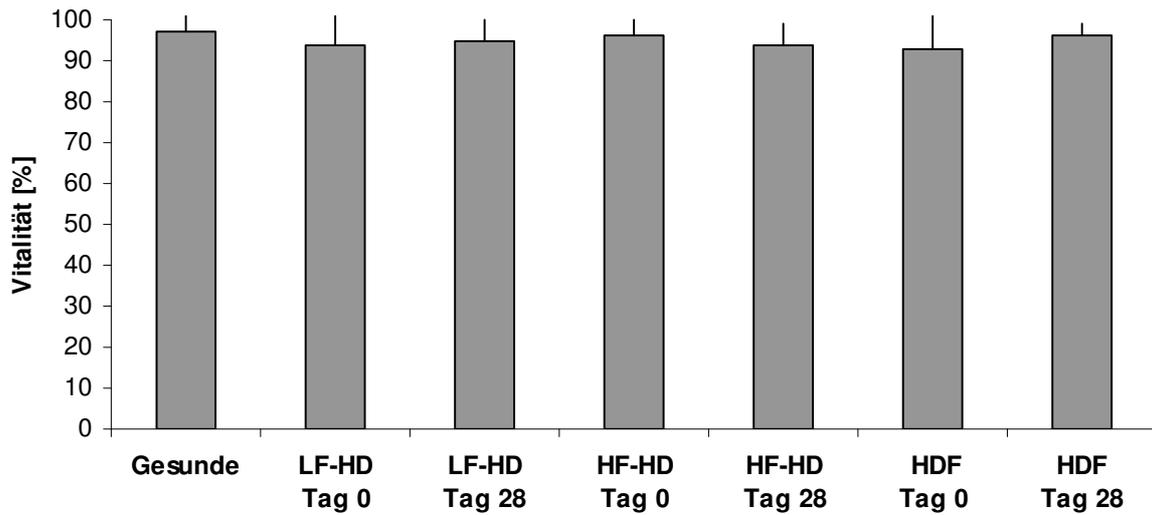


Abb. 6: Relativer Anteil der vitalen CFU-Zellen nach fünf Tagen in Kultur. Dargestellt sind die Mittelwerte mit jeweiliger Standardabweichung. Gefundene Differenzen erreichten nicht Signifikanzniveau.

3.2.2. Zellkulturen auf Kollagen (ECFCs)

Die im ECFC-Ansatz kultivierten Zellen gleichen mit ihrem pflastersteinartigen Aussehen morphologisch reifen Endothelzellen. Abbildung 7 zeigt eine ECFC-Kolonie am Tag 7.

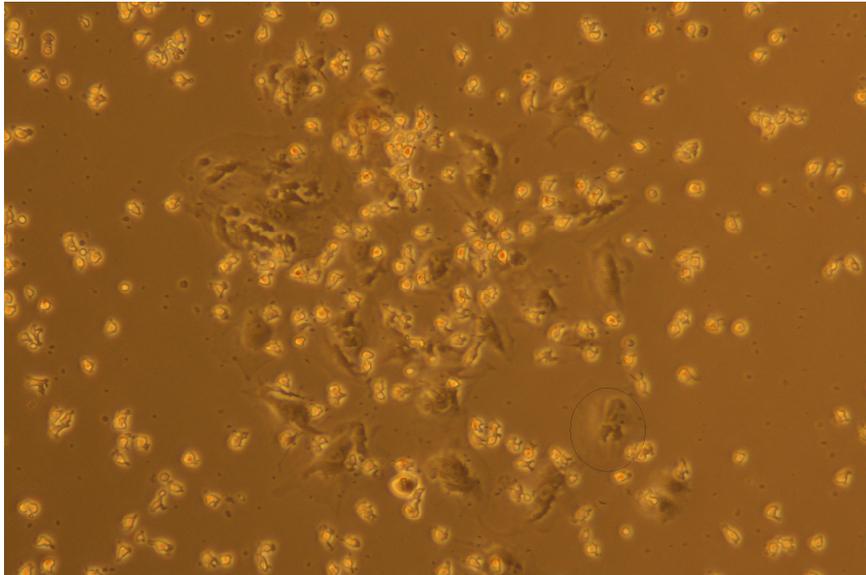


Abb. 7:
Am Phasenkontrast-
mikroskop bei 40-
facher Vergrößerung
gewonnenes Bild
einer ECFC-Kolonie
am Tag 7.

3.2.2.1. Endotheliale Kolonie-bildende Zellen (ECFCs), Gesamtzellzahlen

Nach sieben Tagen in Kultur lag im Patientenkollektiv die durchflusszytometrisch gefundene Gesamtzellzahl deutlich unter dem Niveau der nierengesunden Studienteilnehmer ($p < 0,0001$). So lag der Median der Zellzahl in der Kontrollgruppe bei 75.854 pro 10^7 MNCs, in der Gesamtzahl der Dialysepatienten jedoch nur bei 13.292 pro 10^7 MNCs.

Die Mittelwerte der in Kultur gewachsenen Zellen ließen keine Rückschlüsse auf Einflüsse der einzelnen Dialyseverfahren auf die Quantität im Blut zirkulierender ECFCs erkennen. Anhand der Medianwerte konnten allenfalls Tendenzen beobachtet werden. Bemerkenswert jedoch ist die Tatsache, dass die Zellzahlen zwischen den verschiedenen Studienteilnehmern um einen Faktor von bis zu 440 variierten. Abbildung 8 illustriert die Ergebnisse der Gesamtzellzahlen im ECFC-Ansatz, während Tabelle 13 die absoluten Werte wiedergibt.

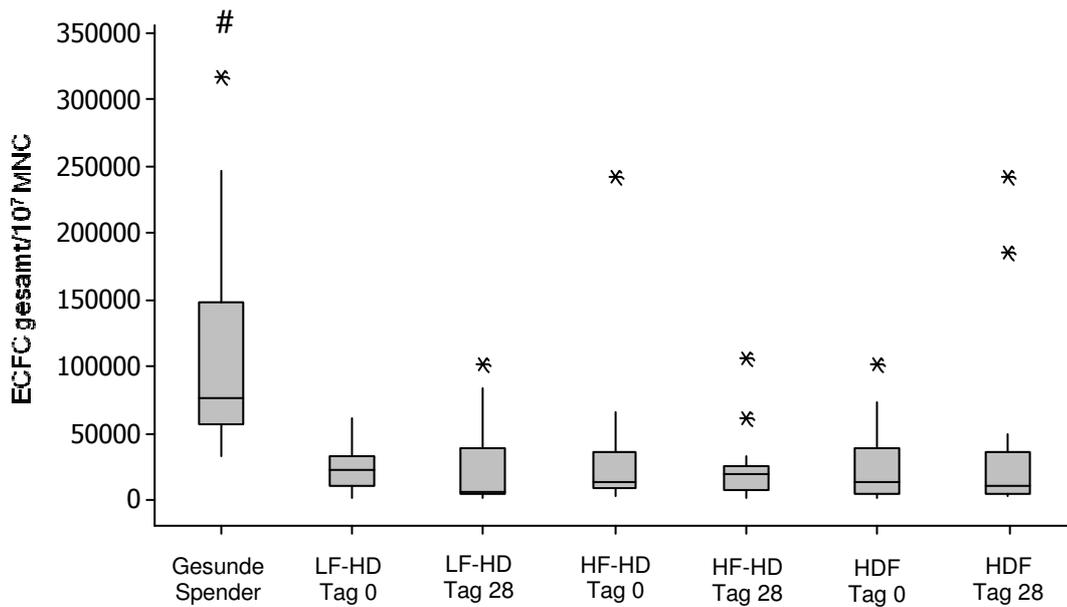


Abb. 8: Absolute Zellzahlen nach sieben Tagen in Kultur auf Typ I Kollagen. # $p < 0,05$ vs. Gesamtzahl der Patientengruppen.

Tab. 12: Aus 10^7 mononukleären Zellen nach sieben Tagen in Kultur entstandene Gesamtzellzahl auf Kollagen. * $p < 0,05$ vs. Gesamtzahl der Patientengruppen.

	Gesunde	LF-HD Tag 0	LF-HD Tag 28	HF-HD Tag 0	HF-HD Tag 28	HDF Tag 0	HDF Tag 28
<i>MW</i> $\times 10^3$	108*	22	23	33	23	24	37
<i>SD</i> $\times 10^3$	80	17	314	57	26	28	695
<i>Median</i> $\times 10^3$	76	22	5	12	19	13	10
<i>Min</i> $\times 10^3$	32,0	0,9	0,2	0,2	0,6	0,2	1,4
<i>Max</i> $\times 10^3$	318	63	101	243	105	101	243

3.2.2.2. Endotheliale Kolonie-bildende Zellen (ECFCs), Koloniezahlen

Auf Kollagen zeigte sich anhand der ECFC-Kolonien eine signifikante Differenz zwischen dem Median der Kontrollgruppe (0 Kolonien) und dem Median aus allen Patientenkollektiven von 0,25 Kolonien ($p < 0,001$). Große interindividuelle Unterschiede kamen im Gegensatz zu den Dialysepatienten in der nierengesunden Gruppe nicht vor (siehe Tab. 13). Bezüglich der Mittelwerte bei den einzelnen Verfahren präsentierte sich eine große, aber dennoch nicht signifikante Differenz im Verlauf der HDF-Behandlung ($1,8 \pm 3,6$ Kolonien zu Beginn bzw. $5,2 \pm 8,7$ zum Ende). Signifikante Unterschiede bestanden zwischen der Kontrollgruppe und jeder Gruppe der Dialysepatienten ($p < 0,05$). Eine grafische Darstellung sowie weitere Details können Abbildung 9 und Tabelle 12 entnommen werden.

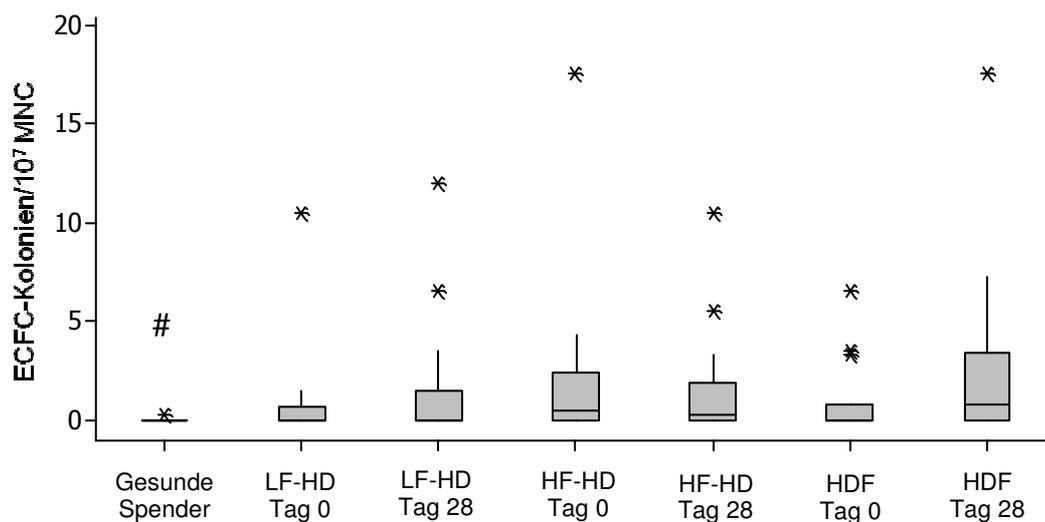


Abb. 9: Anzahl der nach sieben Tagen in Kultur auf Kollagen entstandenen ECFC-Kolonien. # $p < 0,05$ vs. LF-HD Tag 0, LF-HD Tag 28, HF-HD Tag 0, HF-HD Tag 28, HDF Tag 0, HDF Tag 28.

Tab. 13: Aus 10^7 mononukleären Zellen entstandene Anzahl der ECFC-Kolonien. * $p < 0,05$ vs. LF-HD Tag 0, LF-HD Tag 28, HF-HD Tag 0, HF-HD Tag 28, HDF Tag 0, HDF Tag 28.

	Gesunde	LF-HD Tag 0	LF-HD Tag 28	HF-HD Tag 0	HF-HD Tag 28	HDF Tag 0	HDF Tag 28
<i>MW</i>	0,0	0,9	1,6	2,0	1,6	0,9	2,6
<i>SD</i>	0,1	2,5	3,3	4,2	2,8	1,8	4,3
<i>Median</i>	0*	0	0	1,0	0	0	1,0
<i>Min</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>Max</i>	0,3	10,5	12,0	17,5	10,5	6,5	17,5

3.2.2.3. Subpopulationen der ECFC-Kolonien

Tabelle 14 gibt einen Überblick über die absoluten $CD34^+KDR^+CD45^-$ -Zellzahlen. Zwar zeigten sich zwischen den untersuchten Dialyseverfahren keine signifikanten Unterschiede, auch die Differenz zwischen den gesunden Spendern und den Patientenkollektiven erreichten nicht statistische Bedeutung, dennoch waren vor allem im Patientenkollektiv höhere Werte von bis zu 1.401 $CD34^+KDR^+CD45^-$ -Zellen vorhanden.

Tab. 14: Im ECFC-Ansatz aus 10^7 mononukleären Zellen entstandene $CD34^+KDR^+CD45^-$ -Zellzahlen. Gefundene Differenzen erreichten nicht Signifikanzniveau.

	Gesunde	LF-HD Tag 0	LF-HD Tag 28	HF-HD Tag 0	HF-HD Tag 28	HDF Tag 0	HDF Tag 28
<i>MW</i>	208	272	318	381	326	315	331
<i>STABW</i>	167	296	223	350	348	224	366
<i>Median</i>	163	231	371	241	237	415	202
<i>Min</i>	32	38	17	25	50	17	13
<i>Max</i>	565	1.319	687	1.401	1.319	651	1.401

Der Boxplot in Abbildung 10 verdeutlicht die Streubreite der einzelnen Messungen. Es finden sich nicht nur einzelne Ausreißerwerte, auch der 50 %-Bereich erstreckt sich teils über 500 Zellen.

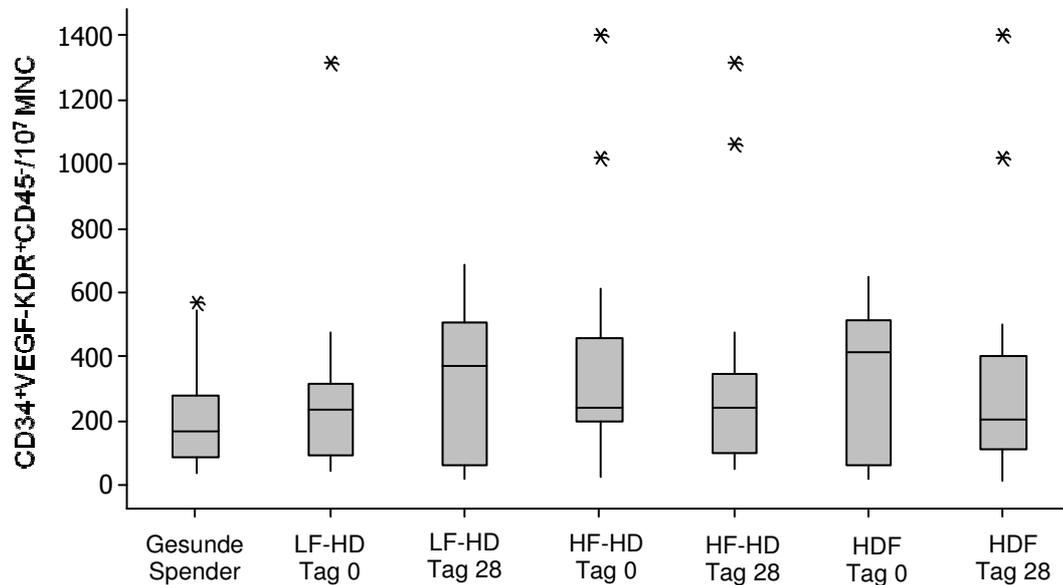


Abb. 10: Absolute Zahl CD34⁺KDR⁺CD45⁻-Zellen auf Kollagen. Gefundene Differenzen zwischen den einzelnen Gruppen erreichten nicht Signifikanzniveau.

Der Anteil CD34⁺KDR⁺CD45⁺-Zellen lag deutlich über dem der CD34⁺KDR⁺CD45⁻-Zellen: in der Kontrollgruppe bei durchschnittlich $12,1 \pm 7,8$ %, in der Patientengruppe bei $33,4 \pm 19,3$ % ($p < 0,001$). Die Dialysepatienten präsentierten prozentual einen höheren Anteil von CD34⁺KDR⁺CD45⁺-Zellen an der ECFC-Gesamtzellzahl. Vermeintliche Unterschiede zwischen den Verfahren erreichten nicht Signifikanzniveau; die Differenz zwischen der Spendergruppe und dem gesamten Patientenkollektiv war jedoch statistisch relevant ($p < 0,05$). Abbildung 11 resümiert die Ergebnisse aus der CD34⁺CD45⁺KDR⁺-Zellpopulation.

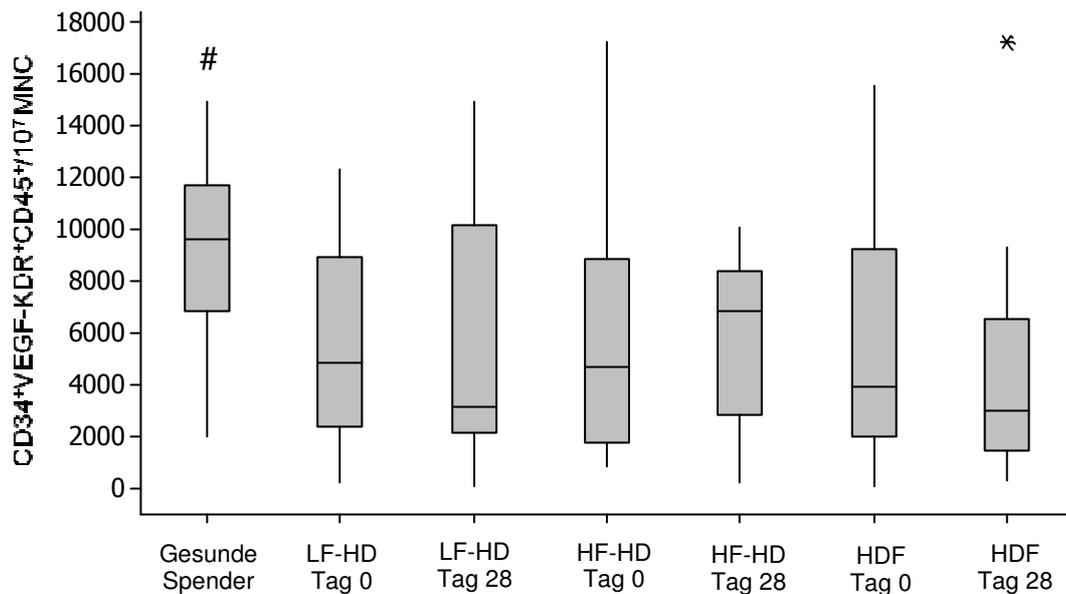


Abb. 11: Absolute Zahl der CD34⁺KDR⁺CD45⁺-Zellen auf Kollagen. # p<0,05 vs. Gesamtzahl der Dialysegruppen.

3.2.2.4. Zellvitalität auf Kollagen

In den ECFC-Kulturen auf Kollagen proliferierten bei den Dialysepatienten die Zellen zwar stark, die Zahl der avitalen Zellen nahm dabei nach insgesamt sieben Tagen in Kultur allerdings ebenfalls zu. Der Anteil der vitalen Zellen in der Kontrollgruppe betrug $86 \pm 9 \%$, im Patientenkollektiv unter den verschiedenen Dialyseverfahren im Mittel hingegen nur $63 \pm 21 \%$ ($p < 0,05$). Interindividuelle Schwankungen waren vermehrt im Patientenkollektiv zu beobachten. Im Vergleich der Dialyseverfahren untereinander präsentierte sich die geringste Zellvitalität in den Proben, die aus dem Blut der Patienten am Ende des Low-Flux-Hämodialyseintervalls isoliert worden waren ($54 \pm 19\%$). Insgesamt waren die beobachteten Differenzen jedoch nicht signifikant. Ferner fiel ohne statistische Signifikanz bei den ECFC-Zellen ein insgesamt höherer Anteil avitaler Zellen auf verglichen mit der Vitalität der CFU-EPCs.

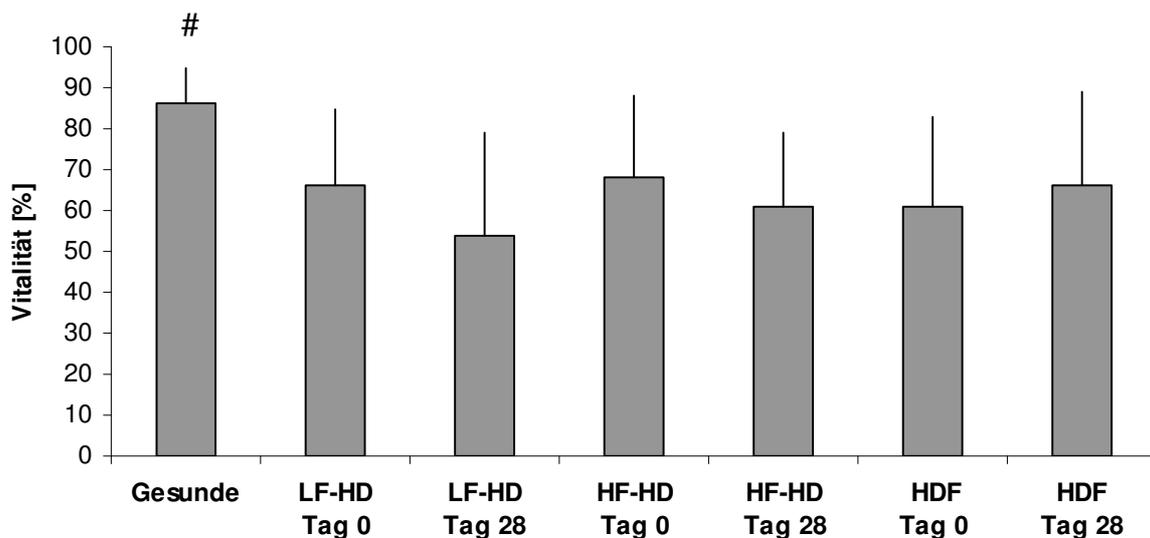


Abb. 12: Relativer Anteil der vitalen ECFC-Zellen auf Kollagen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit jeweiliger Standardabweichung. # $p < 0,05$ vs. Gesamtzahl der Dialysegruppen.

3.3. C-reaktives Protein vs. EPCs

Als typischer Entzündungsparameter wurde das C-reaktive Protein (CRP) mit den verschiedenen untersuchten Zellpopulationen korreliert. In die Analyse flossen sowohl die Daten der Patientengruppen als auch des Kontrollkollektivs ein. Die Korrelation zwischen CRP und Zellzahl fiel dabei stets positiv aus. Tabelle 15 zeigt den Pearson-Koeffizient mit dazugehörigem p-Wert der Korrelationsanalysen, die Signifikanzniveau erreichten.

Tab. 15: Korrelation zwischen CRP-Werten und verschiedenen Zellpopulationen.

CRP vs.	Pearson-Koeffizient	Signifikanzniveau
<i>CFU-Hill-Koloniezahl</i>	$r=0,223$	$p < 0,05$
<i>CD34⁺ VEGF2-KDR⁺ CD45 CFU-Hill-EPCs</i>	$r=0,372$	$p < 0,001$
<i>ECFC-Koloniezahl</i>	$r=0,556$	$p < 0,001$
<i>CD34⁺ VEGF2-KDR⁺ CD45 ECFCs</i>	$r=0,364$	$p < 0,001$

3.4. Quantitativer Vergleich der CFU-Hill-Kolonien und der ECFC-Kolonien

Im direkten Vergleich der normierten Koloniezahlen untereinander zeigen sich im CFU-Hill-Ansatz eindeutig höhere Koloniezahlen, sowohl in der Kontrollgruppe als auch im Patientenkollektiv ($p < 0,001$). ECFC-Kolonien waren in den Patientenkollektiven nur selten anzuzüchten, im Kontrollkollektiv waren ECFC-Kolonien kaum anzuzüchten. Die Korrelation zwischen der Zahl der Kolonien aus den beiden Kulturansätzen war schwach, aber signifikant ($r = 0,245$; $p < 0,05$).

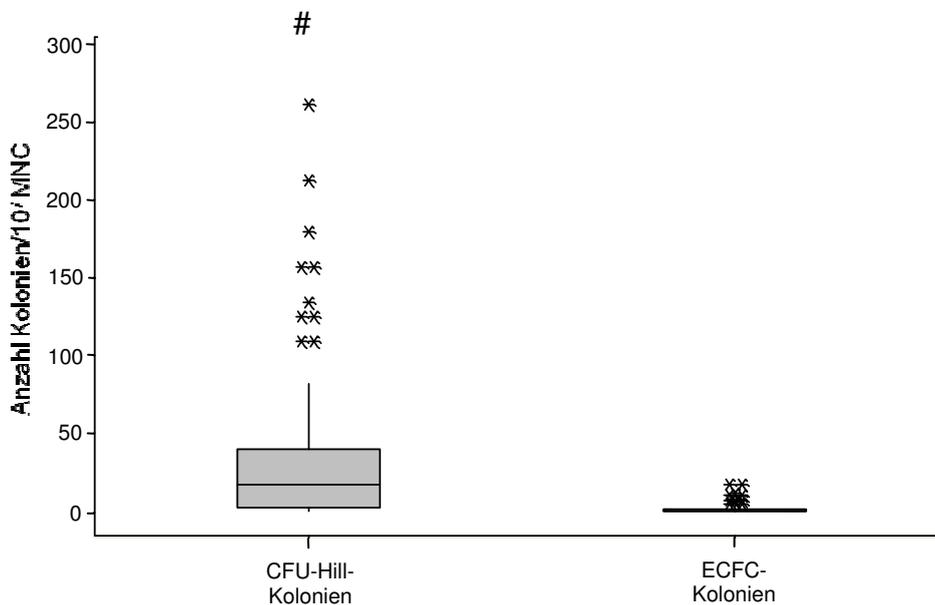


Abb. 13: Normierte Koloniezahlen je 10^7 Zellen. # $p < 0,001$ vs. ECFC-Kolonien.

3.5. Besonderheiten im Studienverlauf

Auf eigenen Wunsches brach ein Teilnehmer die Studie vorzeitig ab, seine Daten wurden aus der Auswertung genommen.

Im Verlauf der Studie verstarb ein Patient (HBr) an einem akuten kardiovaskulären Ereignis, ein anderer (EW) musste wegen einer transitorisch ischämischen Attacke vorübergehend hospitalisiert werden. Beide Patienten hatten in der Bestimmung

unmittelbar zuvor Auffälligkeiten hinsichtlich der endothelialen Vorläuferzellen gezeigt.

Patient HBr verstarb im Laufe des Low-Flux-Behandlungsintervalls. Patient EW erlitt eine transitorisch ischämische Attacke (TIA) nach der ersten Messung in der Hämodiafiltrations-Periode.

Wie Abbildung 14 illustriert, pendelten sich die Zahlen der CFU-Hill-Kolonien ca. 4 Wochen vor dem klinischen Ereignis auf ähnlich erhöhte Werte im Vergleich zu den übrigen Dialysepatienten ein und stiegen nahezu parallel zueinander im letzten Intervall vor dem Ereignis an. Nach der Hospitalisierungsphase aufgrund der TIA zeigte sich bei EW am Phasenkontrastmikroskop eine quantitative Normalisierung (in Abbildung 14 nicht dargestellt).

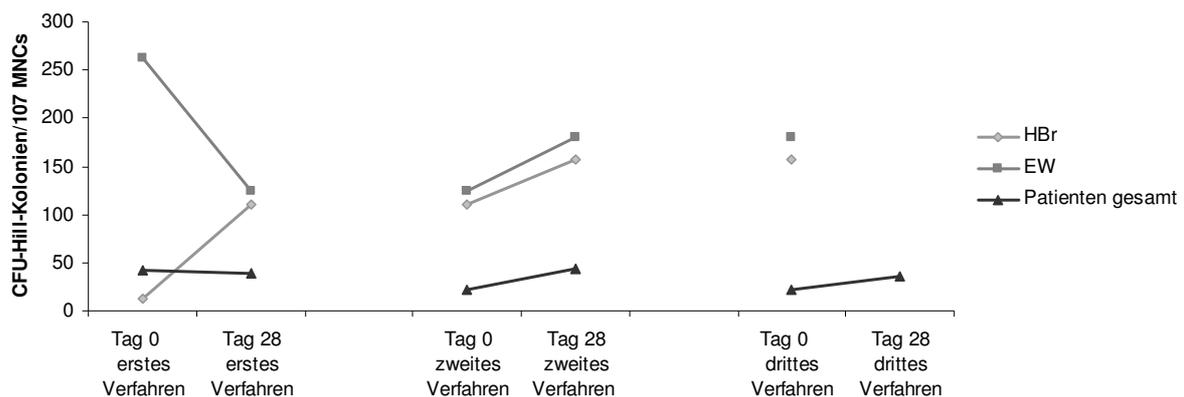


Abb. 14: Exemplarische Darstellung der beiden klinisch auffälligen Patienten HBr und EW. CFU-Hill-Koloniezahl in Abhängigkeit der zeitlichen Abfolge der untersuchten Dialyseverfahren.

Die Anzahl der ECFCs, die nach sieben Tagen in EGM-2 auf Kollagen abgelöst und am Durchflusszytometer gemessen wurde, lag bei beiden Patienten bei sämtlichen Messungen vor den Ereignissen unter dem Gesamtniveau der übrigen Dialysepatienten. Beim Patienten EW, der die Studie nach der transitorisch ischämischen Attacke fortsetzen konnte, war eine Zunahme der Zellzahl auf Kollagen zu beobachten. Abbildung 15 gibt den Verlauf der ECFCs vor den klinischen Ereignissen wieder.

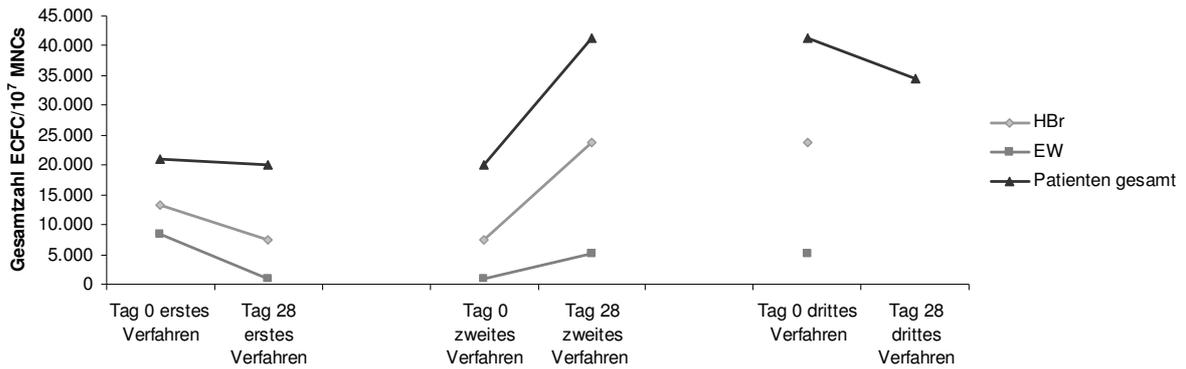


Abb. 15: Exemplarische Darstellung der beiden klinisch auffälligen Patienten HBr und EW. ECFC-Gesamtzellzahl aufgetragen in Abhängigkeit zur Zeit.

Im Unterschied zur Gesamtzahl der ECFCs, die vor den klinischen Ereignissen bei beiden Patienten im Vergleich zur übrigen Patientengruppe erniedrigt waren, fand sich in den letzten Messungen vor den Ereignissen in der CD34⁺KDR⁺CD45⁻ - Subpopulation ein überdurchschnittlich hohes Niveau an Zellen. Abbildung 16 illustriert diese Messwerte. Während die Gesamtzellzahl bei EW nach der transitorisch ischämischen Attacke mit einem schnellen Anstieg imponierte, fiel in der CD34⁺KDR⁺CD45⁻-Subpopulation ein Abfall unter das mittlere Niveau aller Dialysepatienten auf.

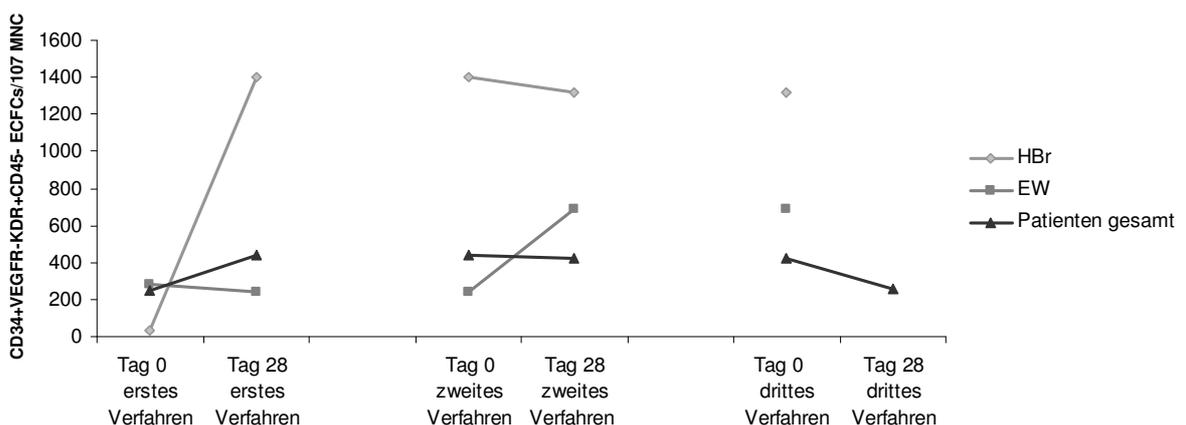


Abb. 16: Exemplarische Darstellung der beiden klinisch auffälligen Patienten HBr und EW. Werte der CD34⁺KDR⁺CD45⁻-Subpopulation aus dem ECFC-Zellkollektiv, aufgetragen in Abhängigkeit vom jeweiligen Dialyseverfahren.

4. Diskussion

Ziel der vorliegenden Studie war es zu prüfen, ob extrakorporale Dialyseverfahren, die sich bezüglich des Spektrums und der Masse der entfernten Urämietoxine signifikant unterscheiden, zu einer quantitativen Veränderung zirkulierender endothelialer Progenitorzellen als Maß der Reparaturvorgänge am Endothel führen. Hierzu wurden 18 chronisch dialysepflichtige Patienten über jeweils vier Wochen in randomisierter Reihenfolge mit Low-Flux-Dialyse, High-Flux-Dialyse und Online-Prädilutions-Hämodiafiltration behandelt und mit einer nierengesunden Kontrollgruppe verglichen. Die Messungen erfolgten dabei am Anfang und am Ende jedes Behandlungsabschnittes. Nach Isolation der mononukleären Zellfraktion und ihrer kulturellen Anreicherung wurden am Phasenkontrastmikroskop CFU-Hill-Kolonien und ECFC-Kolonien anhand ihrer typischen Morphologie quantitativ bestimmt; Gesamtzellzahlen und relativer Anteil der CD34⁺KDR⁺CD45⁻- und CD34⁺KDR⁺CD45⁺-Zellen wurden, ebenso wie der Anteil der vitalen Zellen, anschließend am Durchflusszytometer quantitativ erfasst.

Signifikante Unterschiede in den untersuchten Dialyseverfahren fanden sich dabei keine. Zwischen den gesunden Spendern und der Gesamtmenge der Patientengruppen hingegen waren fast durchgehend signifikante Differenzen erkennbar ($p < 0,05$), lediglich bezüglich der CFU-Hill-Koloniezahl sowie der Zellvitalität im CFU-Hill-Ansatz erreichten die gefundenen Differenzen keine Signifikanz. ECFC-Kolonien zeigten signifikante Unterschiede zwischen jeder der Patientengruppen gegenüber den nierengesunden Spendern ($p < 0,05$). Die untersuchten Hämodialyseverfahren stellen demnach bezüglich der hier untersuchten, an der Neoangiogenese und Neovaskularisation beteiligten Zellen weitgehend äquivalente Verfahren dar.

Damit stehen die Ergebnisse der vorliegenden Studie in Kontrast zu Arbeiten von Ramirez und Chan, die beide im Zusammenhang mit unterschiedlichen Dialysemethoden signifikante Differenzen in der Anzahl putativer EPCs nachwiesen [29, 30].

Um zunächst die qualitative Gleichwertigkeit der verwendeten Dialyseverfahren zu überprüfen, untersuchten wir die Dialyседosis. Tatsächlich lag diese für alle drei Verfahren (Mittelwerte eKt/V für LF-HD $1,48 \pm 0,3$; für HF-HD $1,42 \pm 0,3$ und für HDF $1,38 \pm 0,2$) weit über der empfohlenen Minimaldosis ($eKt/V > 1,2$). Wie die HEMO-Studie aus dem Jahr 2002 zeigt, sind Unterschiede oberhalb dieser Empfehlung nicht mit einem Mortalitätsvorteil verbunden [40]. In der vorliegenden Studie fanden sich signifikante Unterschiede zwischen den Verfahren in der Reduktionsrate des mittelmolekularen Proteins β 2-Mikroglobulin (β 2M-RR bei LF-HD $- 4,9 \pm 15,8$ %, bei HF-HD $61,0 \pm 5,1$ %, bei HDF $68,2 \pm 9,3$ %). Die Differenz zwischen High-Flux-Hämodialyse und der stärker konvektiven Hämodiafiltration wurde dabei bewusst verstärkt durch die Verwendung von zwei High-Flux-Dialysatoren, die sich in ihren Ultrafiltrationsraten deutlich unterschieden (55 ml/mmHg^*h gegen 74 ml/mmHg^*h) und dadurch bekanntermaßen über eine unterschiedliche Entfernung der Mittelmoleküle verfügen [41]. Die übrigen Laborparameter wie Albumin, Gesamteiweiß und Phosphat zeigten unter den Behandlungsverfahren keine signifikanten Unterschiede.

Die Messung des CRP im Behandlungsverlauf sollte Information über den inflammatorischen Stimulus der verschiedenen Dialysebehandlungen geben. Tatsächlich zeigten die CRP-Werte im vorliegenden Studienkollektiv interindividuell eine zu große Streubreite, um valide Rückschlüsse aus den Ergebnissen zu zulassen. Die untersuchten Dialyseverfahren schienen daher hinsichtlich ihrer Beteiligung an inflammatorischen Prozessen äquivalent.

Um chronisch niereninsuffizienten Patienten bei bestmöglicher Biokompatibilität eine adäquate Entgiftung zukommen zu lassen und so die mit der Urämie assoziierte, erhöhte kardiovaskuläre Mortalität zu reduzieren, stellt der direkte Vergleich verschiedener extrakorporalen Nierenersatztherapien nach wie vor ein Gebiet intensiver klinischer Forschung dar. Als Asahara und Kollegen mit der Erstbeschreibung endothelialer Vorläuferzellen den Grundstein zu einem neuen Verständnis der postnatalen Vaskulogenese legten, war es daher nahe liegend, diese neu beschriebene Zellpopulation im kardiovaskulären Risikokollektiv chronischer Hämodialysepatienten zunächst nachzuweisen, um sie später für die Gegenüberstellung verschiedener, im klinischen Alltag gebräuchlicher

Nierenersatzverfahren einzusetzen. Unterschiede in der Effektivität zwischen den verschiedenen Dialysemethoden würden so möglicherweise Aufschluss geben über die Möglichkeiten des Körpers, bestehende Endotheldefekte auszubessern, sowie über auf diese Reparaturvorgänge einwirkende hemmende oder begünstigende Einflüsse verschiedener Dialysemethoden.

1997 folgerte Asahara dass Zelloberflächenmoleküle, die sowohl auf embryonalen Angioblasten als auch auf hämatopoetischen Stammzellen exprimiert werden, die Möglichkeit zur Identifikation mutmaßlicher Angioblasten beim Erwachsenen böten [1]. Mit dieser unscharf umrissenen Zellpopulation begründete er zwar das Paradigma der Vaskulogenese und Neoangiogenese beim Erwachsenen, doch stiftete er durch die sehr vage Definition dieser so genannten endothelialen Progenitorzellen große Verwirrung in der Forschungsgemeinschaft. Eine Vielzahl von Studien wurde mit putativen EPCs geführt, doch durch die Verwendung verschiedener Methoden zur Bestimmung von EPCs bleibt eine große Unsicherheit in der Interpretation der teilweise auch widersprüchlichen Ergebnisse.

Besonders in größeren Studien wurden putative EPCs anhand ihrer Oberflächenmoleküle als Subpopulation der mononukleären Zellfraktion bestimmt [12, 23, 25, 27-30, 32, 42-45]. Diese rein immunphänotypische Identifikation muss jedoch als mangelhaft betrachtet werden, da bis zum heutigen Tag kein spezifischer EPC-Marker beschrieben werden konnte. Zwar sind zahlreiche Kombinationen verschiedener Oberflächenmoleküle zur Bestimmung putativer EPCs in Gebrauch, doch wurde zumeist versäumt, anhand einer funktionellen *In vivo*-Analyse das Potential zur Neovaskulogenese der durchflusszytometrisch bestimmten EPCs nachzuweisen. Selbst die Oberflächenmoleküle CD34 und KDR, zwei Epitope, die auf proliferierenden ECFCs nachgewiesen werden konnten und daher in ihrer Kombination als unspezifischer EPC-Marker gelten, sind für die ausschließlich durchflusszytometrische Identifikation endothelialer Vorläuferzellen ungeeignet, da die Expression dieser beiden Antigene lediglich eine nötige Voraussetzung doch keine hinreichende Bedingung darstellt [46, 47]. Oftmals wurde daher zusätzlich der Stammzellmarker CD133 bestimmt [12, 23, 42, 27-30, 43-45]. Tatsächlich zeigten aber verschiedene Arbeitsgruppen, dass CD34⁺KDR⁺CD133⁺-Zellpopulationen reich an hämatopoetischen Vorläuferzellen sind, wobei > 98 % der untersuchten Zellen

auch das hämatopoetische Oberflächenmolekül CD45 exprimieren [46, 47]. Diesen Zellen fehlt das Potential, sich *in vivo* zu Endothelzellen zu differenzieren und sich in bereits bestehende Gefäße einzulagern. Dabei zeigten CD34⁺KDR⁺CD133⁺-Zellen bereits morphologisch keine Ähnlichkeit mit Endothelzellen. Das Verhalten der isolierten Zellen in Kultur kann bereits Anhaltspunkte zur Bestimmung des Zelltypus geben und sollte daher in die Analyse einfließen.

Im Allgemeinen werden zur kulturellen Anzucht von putativen EPCs drei verschiedene Ansätze verwandt:

1. CFU-Hill-Kolonien
2. Zirkulierende angiogene Zellen (CACs)
3. Endotheliale Kolonie-bildende Zellen (ECFCs)

4.1. CFU-Hill-Kolonien (Colony forming unit)

Die ursprüngliche Methode von Asahara [12] wurde nachträglich von Ito [48] und Hill [49] modifiziert und ist inzwischen kommerziell erhältlich (Endocult, StemCell Technologies, St. Katharinen, Deutschland, siehe auch Teil 2, Material und Methodik). Die unfraktionierte mononukleäre Zellfraktion aus Peripherblut eines Spenders wird auf Fibronectin beschichteten Wells ausgebracht. Nach 48 h wird der zelluläre Überstand abgenommen und erneut in frischem Medium ausgebracht. Mit diesem Zwischenschritt wird in der gezüchteten Zellpopulation die Anzahl an Monozyten, Makrophagen und adulter Endothelzellen dezimiert. Nach fünf bis neun Tagen in Kultur entstehen „Zell-Cluster“, so genannte CFU-Hill-Kolonien, ehemals als EPCs definiert. Tatsächlich besteht der Koloniekern aus einer Häufung runder hämatopoetischer Zellen (Myeloide Progenitorzellen, Monozyten und T-Lymphozyten). Die spindelförmigen Zellen um den Kern konnten inzwischen als Makrophagen identifiziert werden, die in Kultur zwar Endothelzellepitope exprimieren und endotheliales Stickoxid produzieren, *in vivo* aber keine Blutgefäße bilden, sondern Bakterien aufnehmen und verdauen [33]. Der CFU-Hill-Ansatz kann also als ein Maß der hämatopoetischen Zell-Zell-Interaktion gelten, nicht jedoch als Maß für die Anzahl endothelialer Progenitorzellen. Dennoch ließ sich in klinischen Studien

eine inverse Korrelation zwischen der Anzahl der CFU-Hill-Kolonien und dem kardiovaskulären Framingham Risiko-Score nachweisen [49].

Im vorliegenden Studienkollektiv war es nicht möglich, anhand der CFU-Hill-Kolonien eine Aussage zum kardiovaskulären Risiko des Probanden bzw. Patienten zu treffen. Zwischen den prävalenten Hämodialysepatienten mit dokumentierten kardiovaskulären Nebendiagnosen und der als gesund zu betrachtenden Probandengruppe (keine dokumentierte kardio- oder periphervaskulären Erkrankungen) zeigten sich anhand der CFU-Hill-Koloniezahl keine statistisch signifikanten Unterschiede (Median im Kontrollkollektiv bei 18 Kolonien aus 10^7 MNCs, in den Patientenkollektiven Medianwerte zwischen 5 und 35 Kolonien aus 10^7 MNCs). Damit stehen die Ergebnisse in Kontrast zu früheren Studien, die bei Hämodialysepatienten eine reduzierte Anzahl CFU-Hill-Kolonien im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe nachwiesen [50]. Eine mögliche Erklärung für die scheinbare Widersprüchlichkeit der Resultate könnte die durchweg hohe Qualität der Hämodialysebehandlung im vorliegenden Patientenkollektiv sein, die eine Proliferation der benötigten CFU-Hill-Kolonien überhaupt erst ermöglicht. Wahrscheinlich aber sprechen die vorliegenden Resultate schlicht gegen die Verwendung der CFU-Hill-Kolonien zur kardiovaskulären Risikostratifizierung [21]. Seit Hill *et al.* bei gesunden Probanden, die zum Zeitpunkt der Studie lediglich kardiovaskuläre Risikofaktoren, jedoch keine manifeste Erkrankung aufwiesen, eine inverse Korrelation zwischen der Anzahl traditioneller Risikofaktoren und der Menge an CFU-Hill-Kolonien nachwies, scheint dieser Zusammenhang allgemein anerkannt [21]. Tatsächlich aber lässt die vorliegende Studie eher vermuten, dass die vermehrte Bildung von CFU-Hill-Kolonien für einen akut kritischen Gefäßstatus mit erhöhtem kardiovaskulärem Risiko spricht. Besonders deutlich wird dies im zeitlichen Verlauf an den beiden klinisch auffälligen Patienten (siehe auch Abschnitt 4.5., EPCs im zeitlichen Verlauf). Arbeiten von Valgimigli *et al.*, die bei Patienten mit kongestiver Herzinsuffizienz in frühen Stadien (NYHA I und II) eine erhöhte Zahl CFU-EPCs nachwiesen, stützen unsere Beobachtungen [51]. In ihrem Studienkollektiv erfassten sie erst im Stadium III und IV einen Abfall der CFU-Hill-Kolonien unter die Durchschnittswerte des gesunden Kontrollkollektivs. Die CFU-Hill-Kolonien könnten in ernsten, aber noch nicht kritischen Situationen (NYHA I und II) als Antwort auf eine vermehrte Belastung des Endothels in ihrer Proliferation stimuliert sein, wobei

schließlich im Stadium III und IV die Kapazität der zirkulierenden CFU-Hill-EPCs erschöpft schien. In den beiden letzten Stadien zeigte sich in Kultur eine reduzierte Zahl von CFU-Hill-Kolonien. Auf die Dialysepatienten übertragen sprachen vermehrte CFU-Hill-Kolonien für stärker ablaufende Reparaturvorgänge am beschädigten Endothel.

Die Gesamtzellzahl auf Fibronektin lag in der Kontrollgruppe im Vergleich zu den gemittelten Durchschnittswerten des Patientenkollektivs auf höherem Niveau (Median in der Kontrollgruppe 162×10^4 , in der Patientengruppe 86×10^4 je 10^7 MNCs). Zellen aus dem Blut chronisch dialysepflichtiger Patienten proliferieren insgesamt im CFU-Hill-Ansatz weniger als Zellen aus dem Blut gesunder Spender. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit Resultaten von Schlieper *et al.*, die in einem dialysepflichtigen Kollektiv weniger EPCs fanden als in einem KHK-Patientenkollektiv und einer gesunden Kontrollgruppe [45]. In früheren Studien war vermutet worden, dass die reduzierte Zahl von EPCs auf einen Mangel an Erythropoietin bei niereninsuffizienten Patienten zurückzuführen sei [43], doch weder die Ergebnisse der vorliegenden Studie noch die von Schlieper *et al.* stützen diese Hypothese [45]. Daher scheint es wahrscheinlicher, dass in der Niereninsuffizienz akkumulierende Toxine eine schädigende Wirkung auf das Proliferationspotential der CFU-Hill-EPCs ausüben [27, 28]. In diesem Kontext lässt sich auch der geringfügig erhöhte Anteil avitaler Zellen in den Patientenkollektiven erklären. Insgesamt äußerte sich in der vorliegenden Studie die Beeinträchtigung der CFU-Hill-Zellen aus dem Patientenblut jedoch stärker in der reduzierten Proliferationsrate als in der erhöhten Apoptoseneigung.

4.2. Zirkulierende angiogene Zellen (CACs)

Eine zweite Methode, EPCs zu isolieren und zu kultivieren, wurde 2001 von Vasa *et al.* beschrieben und findet seither weiten Einsatz [15, 22, 24]. Hierbei wird die mononukleäre Zellfraktion in angereichertem endothelialeem Wachstumsmedium während vier Tagen kultiviert, anschließend wird die nicht-adhärenente Zellfraktion entfernt und die adhärenenten Zellen werden auf ihre Fähigkeit zur Aufnahme von acetyliertem LDL und *Ulex europaeus agglutinin-1* untersucht. Rein morphologisch zeigen die gezüchteten Zellen Ähnlichkeit mit Endothelzellen, bilden jedoch keine

Kolonien. Dieser Zelltypus wird in der Literatur oft als zirkulierende angiogene Zelle (circulating angiogenic cell, CAC) bezeichnet, da sie im Tiermodell die Neovaskularisation nach Myokardinfarkt fördern [15]. Auch bei dieser Methode konnte eine inverse Korrelation zwischen der Zellzahl und kardiovaskulären Risikofaktoren nachgewiesen werden [22]. Da sich CACs und CFU-EPCs sowohl in ihren *In-vitro*-Charakteristika als auch in ihren Oberflächenepitopen ähneln, konzentrierten wir unsere Untersuchungen auf CFU-EPCs und ECFCs [52].

4.3. Endotheliale Kolonie-bildende Zellen (ECFCs)

Der dritte und von uns neben den CFU-Hill-Kolonien untersuchte EPC-Typus wird oft als endotheliale Kolonie-bildende Zellen (endothelial colony-forming cells, ECFCs) bezeichnet. Diese Zellpopulation stammt ebenfalls aus der mononukleären Zellfraktion und wächst in endotheliale WachstumsmEDIUM auf Typ I Kollagen. Nicht adhärierende Zellen werden durch tägliche WaschschrITte entfernt, nach sieben bis 21 Tagen bilden sich Kolonien mit der bereits beschriebenen pflastersteinartigen Endothelzellmorphologie (siehe auch Teil 2, Material und Methodik, [13]). Diese Zellen mit dem Phänotyp $CD34^{+}KDR^{+}CD45^{-}$ sind nicht nur morphologisch von reifen Endothelzellen nicht zu unterscheiden, sondern sie bilden auch *de novo* Blutgefäße *in vitro* und exprimieren von Willebrand Faktor (vWF) [13, 14]. Als wahrscheinlich wichtigstes Merkmal jedoch verfügen sie über das Potential, *in vivo* an der Neoangiogenese teilzunehmen [33, 53]. Sie werden daher derzeit als echte endotheliale Progenitorzellen betrachtet [14, 33, 46, 53-56].

Am Phasenkontrastmikroskop zeigte sich, dass aus der mononukleären Zellfraktion der Dialysepatienten im Vergleich zum Kontrollkollektiv insgesamt deutlich weniger Zellen wuchsen (Median in der Kontrollgruppe 76×10^3 aus 10^7 MNCs, in den Patientenkollektiven zwischen 5 und 22×10^3 aus 10^7 MNCs). Diese quantitative Reduktion im Patientenkollektiv entspricht den Beobachtungen aus dem CFU-Hill-Ansatz und hängt vermutlich mit der anhaltend inhibierenden bzw. prolongiert apoptotischen Wirkung des Urämiemilieus auf im Blut zirkulierende Zellen zusammen.

Während die Gesamtzellzahl auf Kollagen im Patientenkollektiv deutlich kleiner war als die Zellzahl in der Kontrollgruppe, überragte die ECFC-Koloniezahl im Patientenkollektiv die der Kontrollgruppe. Während sich bei den Probanden fast durchweg keine Kolonien entwickelten, bildeten sich in den Patientenkollektiven häufiger Kolonien (Mittelwert in der Kontrollgruppe 0 Kolonien aus 10^7 MNCs, in den Patientenkollektiven im Mittel 1,6 Kolonien aus 10^7 MNCs). Besonders in Kulturen mit vielen ECFC-Kolonien fanden sich kaum andere Zellen außerhalb der Kolonien. Es stellten sich vereinzelt Kolonien auf nahezu unbesiedelten Nährböden dar. Daher wäre vorstellbar, dass ECFCs der Dialysepatienten in der Blutbahn im Sinne einer Vorstimulation einen Proliferationsreiz erhalten, den sie dann unter optimierten Wachstumsbedingungen (wie in Kultur *in vitro*) verstärkt umsetzen. Möglicherweise ist eine spezifische Aktivierung der ECFCs in Antwort auf vermehrt arteriosklerotische Prozesse im Gefäßsystem der Dialysepatienten die Ursache für das selektive ECFC-Wachstum. Zellen anderer Zellreihen unterlägen unter Umständen im Blut einem negativen Stimulus, der ihr Wachstum auch noch in Kultur inhibieren würde, während ECFCs den positiven Stimulus umsetzen würden. Unter suboptimalen Bedingungen, wie beispielsweise im mit Urämietoxinen belasteten Blut dialysepflichtiger Patienten, scheint es der Gesamtheit der Zellen jedoch nicht zu gelingen, auf die Anforderungen des Körpers adäquat zu reagieren und potentielle Wachstumsstimuli umzusetzen.

Der Anteil vitaler Zellen im ECFC-Ansatz ist gegenüber der gesunden Kontrollgruppe in den Patientenkollektiven deutlich reduziert (im Mittel 86 % in der Kontrollgruppe, in den Patientenkollektiven durchschnittlich 63 %), wobei apoptotische Zellen während der kulturellen Anreicherung bereits durch tägliche Waschschriffe fortwährend entfernt werden. Der dennoch große Anteil avitaler Zellen in den Patientenkollektiven könnte direkte Folge der Ablösung mit Accutase der Zellen vom Boden der Wells sein. Vermutlich aufgrund eines veränderten intrazellulären Milieus zeigen die Zellen aus den Patientenkulturen eine stark erhöhte Anfälligkeit zum verfrühten programmierten Zelltod. Frühere Studien konnten bei Hämodialysepatienten bereits in verschiedenen anderen Zellreihen eine erhöhte Apoptoseneigung nachweisen [25, 45, 57]. Als Ursache wird ein Ungleichgewicht zwischen oxidierenden Substanzen und anti-oxidativen Systemen vermutet, dass in verstärktem oxidativen Stress resultiert [57]. Die Resultate der vorliegenden Studie unterstützen die Theorie der

lang anhaltend schädigenden Wirkung der im Stadium der Urämie kumulierenden Toxine auf im Blut zirkulierende Zellen.

4.4. Immunphänotypisierung der endothelialen Progenitorzellen

Da eine sehr heterogene Zellpopulation die Ausgangssituation für die kulturelle Anzucht endothelialer Vorläuferzellen darstellt, ist es schwer zu entscheiden, welcher Zelltypus schließlich zu den kultivierten EPCs führt. Der einfache Umkehrschluss, kultivierte und durchflusszytometrisch untersuchte EPC gäben Aufschluss über den Immunphänotyp der in der Blutbahn zirkulierenden EPCs, ist nicht möglich, da im Differenzierungsprozess Oberflächenantigene verloren gehen oder neu entstehen. So bleibt der genaue Phänotyp der EPCs nach wie vor unbekannt.

Frühere Studien an Dialysepatienten nutzten verschiedenste Epitopkombinationen zur Bestimmung putativer EPCs. Eizawa *et al.* und Sturiale *et al.* fanden bei chronischen Hämodialysepatienten direkt vor Beginn der Dialysebehandlung eine im Vergleich zu einem gesunden Kontrollkollektiv reduzierte Anzahl CD34⁺- bzw. CD34⁺KDR⁺CD133⁺-Zellen im Nativblut [25, 26]. Maruyama *et al.* bestätigten die verringerte Menge CD34⁺-Zellen bei Dialysepatienten und propagierten die Nutzung dieser Zellpopulation zur Einschätzung des kardiovaskulären Risikos bei Dialysepatienten [58]. Choi *et al.* definierten EPCs als CD144⁺KDR⁺vWF⁺-Zellpopulationen und wiesen auch diesen Zelltypus in reduzierter Zahl bei chronischen Dialysepatienten im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe nach [28]. Eine Korrelation zwischen der Anzahl putativer EPCs und der Dialyседosis Kt/V ließ sich dabei nicht nachweisen [28].

Chan *et al.* untersuchten in einem dialysepflichtigen Studienkollektiv putative EPCs sowohl durchflusszytometrisch als auch funktionell anhand ihres Migrationspotential nach viertägiger Kultur. Ziel war der quantitative und funktionelle Vergleich von nächtlicher Heimdialyse (mit bis zu acht Stunden Dialyse sechs Mal pro Woche) mit der konventionellen Klinikdialyse von vier Stunden dreimal pro Woche bezüglich ihres Einflusses auf zirkulierende EPCs [29]. Während die Patienten, die nur dreimal die Woche dialysiert wurden, in der Anzahl der endothelialen Vorläuferzellen deutlich

hinter den gesunden Kontrollen zurückblieben, erreichten die Patienten aus dem Nachtdialysekollektiv das Niveau der Kontrollgruppe. Dieser Vergleich zwischen Heimdialyse- und Dialysezentrumpatienten, auf dem diese Studie basiert, ist jedoch nur sehr eingeschränkt valide, da Patienten, die selbstständig zuhause dialysieren, in der Regel besser rehabilitiert sind und weniger Begleiterkrankungen aufweisen. Im Übrigen muss die Studie, wie auch andere, aufgrund der Methodik kritisch betrachtet werden, da die quantitative Bewertung sich auf die ausschließlich phänotypische Bestimmung der EPCs ohne vorherige kulturelle Anreicherung stützte. Die Kombination der verwendeten Epitope (CD34/CD144) als ausreichender Nachweis endothelialer Vorläuferzellen sollte ebenfalls angezweifelt werden, da zum derzeitigen Stand der Forschung das Potential CD34⁺CD144⁺-Zellen zur Proliferation und Gefäßneubildung *in vivo* noch nicht bestätigt wurde. Ob die Untersuchung der Migrationsfähigkeit eine Abgrenzung endothelialer Vorläuferzellen von ebenfalls zur Migration befähigten Monozyten und Makrophagen gestattet, ist gleichfalls fraglich.

Ramirez *et al.* konzentrierten ihre Untersuchungen auf den Vergleich zwischen Online-Hämodialyse und der High-Flux-Hämodialyse. Dafür dialysierten sie 15 chronische High-Flux-Hämodialysepatienten (Durchschnittsalter 55 Jahre, zwischen 22 und 77 Jahre) jeweils vier Monate mit Online-Hämodialyse und High-Flux-Hämodialyse [30]. Als Kontrolle dienten fünf augenscheinlich gesunde Patienten im Alter von 49 ± 6 Jahren. Ramirez mutmaßte, dass eine Reduktion der Entzündungsparameter, wie sie unter Online-Hämodialyse bereits beschrieben wurde [59], einen positiven Effekt auf die Quantität endothelialer Vorläuferzellen haben müsste. Die putativen EPCs identifizierte er am FACScan anhand des Immunphänotyps CD14⁺CD31⁺VEGF2-KDR⁺. Dabei muss jedoch nach heutigem Stand der Forschung eine ausschließlich durchflusszytometrische Bestimmung der EPCs als unzureichend betrachtet werden. Im Weiteren analysierten Ramirez *et al.* die vermeintlichen EPCs anhand von Oberflächenantigenen, die weder per se noch in ihrer Kombination als spezifisch für EPCs anzusehen sind. So ist CD14 ein Glykoprotein, das vor allem auf Makrophagen zu finden ist, wo es als Co-Rezeptor für bakterielle Lipopolysaccharide fungiert [60]. CD31, oder auch PECAM-1 für *platelet endothelial cell adhesion molecule*, wird zwar sowohl auf frühen als auch auf reifen Endothelzellen exprimiert, kann aber ebenso auf Thrombozyten, Makrophagen, Granulozyten und Lymphozyten gefunden werden [61]. Einzig der

Tyrosin-Kinase-Rezeptor KDR gilt als zuverlässiger Endothelzellmarker [62]. Alle drei Oberflächenmoleküle wurden zwar bereits von zahlreichen Arbeitsgruppen zur durchflusszytometrischen Identifikation putativer EPCs herangezogen, sie dürfen dennoch weder allein noch in dieser Kombination mit tatsächlichen endothelialen Vorläuferzellen gleichgesetzt werden [63]. Der in Ramirez' Studie während der Hämodiafiltrationsperiode beschriebene parallele Rückgang von putativen EPCs und Entzündungszellen (als CD14⁺CD16⁺-Zellpopulationen definiert) ist daher in seiner Aussagekraft stark eingeschränkt und sollte möglicherweise mehr als Denkanstoß denn als Faktum verstanden werden [30].

Um tatsächlich endotheliale Vorläuferzellen im Studienkollektiv zu bestimmen, wurden in der vorliegenden Studie aus Peripherblut isolierte mononukleäre Zellen in zwei verschiedenen Ansätzen, dem CFU-Hill-Ansatz auf Fibronectin sowie dem ECFC-Ansatz auf Typ I Kollagen, kultiviert. Nach einer fünf- bzw. siebentägigen Passagezeit in Kultur wurden die Zellen immunphänotypisch anhand der Epitope CD34, CD45 und KDR analysiert. Timmermann *et al.* sowie Case *et al.* gelang es mit funktionellen Assays zu zeigen, dass CD34⁺KDR⁺CD45⁻ -Zellen aus dem ECFC-Ansatz das Potential zur Weiterdifferenzierung zu Endothelzellen besitzen [46, 47]. Daher sind ECFCs mit dem Phänotyp CD34⁺KDR⁺CD45⁻ als endotheliale Progenitorzellen im eigentlichen Sinn gewertet zu werden.

Zwischen den untersuchten Dialyseverfahren (Low-Flux- und High-Flux-Hämodialyse sowie Hämodiafiltration) fanden sich anhand der Immunphänotypisierung nach kultureller Anreicherung in der vorliegenden Studie keine signifikanten Unterschiede. Die verschiedenen Verfahren sind demnach auch in ihrem Einfluss auf EPCs im eigentlichen Sinn gleichwertig. Wie auch bei den Kolonie- und Gesamtzellzahlen zeigte sich interindividuell eine beachtliche Variabilität, die möglicherweise den unterschiedlichen Gefäßstatus der verschiedenen Patienten reflektiert. Aufgrund der großen Streubreite erreichten nicht alle durchflusszytometrisch bestimmten Subpopulationen statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe. Tendenziell zeigten sich die CD34⁺-Populationen im Kontrollkollektiv eher reduziert verglichen mit den Patientenkollektiven. Diese Resultate stehen scheinbar in Kontrast mit oben zitierten Arbeiten von Eizawa, Sturiale und Maryuama [25, 26, 58], die eine verringerte Zahl CD34⁺-Zellen im Patientenkollektiv fanden.

Tatsächlich legen die Ergebnisse nahe, dass die zirkulierenden Zellen der Dialysepatienten einem verstärkten Wachstumsreiz unterliegen, den sie erst in Kultur adäquat umsetzen können. Im Nativblut liegen sie zwar im Vergleich zur Kontrollgruppe in geringerer Zahl vor, in fünf (CFU-Hill) bzw. sieben (ECFC) Tagen unter optimierten Bedingungen in Kultur holen sie diesen quantitativen Rückstand aber auf und lassen sich schließlich sogar in größerer Zahl in den Patientenkollektiven nachweisen.

Unter der Prämisse, der Phänotyp $CD34^+KDR^+CD45^-$ definiere in der ECFC-Population die eigentlichen EPCs, wurden in der vorliegenden Studie auch Zellen aus dem CFU-Hill-Ansatz auf diese Oberflächenantigene untersucht. Dabei fanden sich tatsächlich in beiden Kulturen $CD34^+KDR^+CD45^-$ -Zellen (im CFU-Hill-Ansatz entstanden aus 10^7 MNCs 924 ± 852 $CD34^+KDR^+CD45^-$ -Zellen, im ECFC-Ansatz 307 ± 282 $CD34^+KDR^+CD45^-$ -Zellen). Im CFU-Hill-Ansatz entsprach die Zellmorphologie jedoch weder im Koloniezentrum noch in der Peripherie der Morphologie einer Endothelzelle. Auch differenzieren diese Zellen *in vivo* nicht zu reifen Endothelzellen [33]. Es scheint sich zwar grundsätzlich bei beiden Populationen um den gleichen Zelltypus zu handeln, dabei fehlt den $CD34^+KDR^+CD45^-$ -Zellen auf Fibronectin jedoch in ihrem Reifungsprozess ein für die Differenzierung zu Endothelzellen obligater Aktivierungsschritt. Denkbar wäre in diesem Zusammenhang eine notwendige Interaktion der Zellen mit den Kollagenfibrillen im ECFC-Ansatz, aber auch unbekannte Faktoren aus dem Nährmedium könnten für die nötige Stimulation verantwortlich sein. Der Zelltypus $CD34^+KDR^+CD45^-$ allein stellt offensichtlich keine ausreichende Bedingung zur Bestimmung endothelialer Vorläuferzellen dar. Weitere, bisher unbekannte Größen nehmen Einfluss auf die Entwicklung der EPCs.

Bei 13 Proben aus dem Patientenkollektiv fand sich im ECFC-Ansatz eine spezielle Subpopulation $CD45^+KDR^{++}CD34^-$. Dieser Zelltypus war bei keinem der gesunden Spender nachweisbar, und auch nur sieben der Dialysepatienten präsentierten zu verschiedenen Zeitpunkten der Studie diesen besonderen Zelltypus. In einer kürzlich erschienenen Studie beschreiben Jung *et al.* $CD34^-CD133^+KDR^+$ -Zellen als neu entdeckte Subpopulation zirkulierender EPCs, die bei Diabetes und vaskulären Erkrankungen reduziert seien [64]. Die Vermutung liegt nahe, dass es sich hierbei

um den gleichen Zelltyp handelt. Auf jeden Fall exprimieren die CD34⁻CD133⁺KDR⁺-Zellen den Stammzellmarker CD133 und zeigen eine hohe Rezeptordichte für das endotheliale Wachstumshormon VEGF. Einige Arbeitsgruppen halten KDR für den wichtigsten Indikator des endothelialen Potentials einer Zelle, während CD34 nur eine untergeordnete Rolle zu kommen [62]. Tendenziell zeigen Proben, in denen CD34⁻CD133⁺KDR⁺-Zellen nachgewiesen werden können, eine höhere Zellvitalität. Über Herkunft und Funktion dieser neuen Zellpopulation kann jedoch vorerst nur spekuliert werden, weitere Arbeiten werden nötig sein, um ihre Identität schließlich zu verifizieren.

Der Effekt von Erythropoietin (EPO) auf zirkulierende EPCs wurde in verschiedenen Studien untersucht [43, 45]. Dabei konnte gezeigt werden, dass bei chronischen Hämodialysepatienten die Gabe von 5.000 Einheiten EPO wöchentlich die Anzahl von EPCs innerhalb von acht Wochen um 200 % steigerte [43]. Andere Studien widerlegten jedoch diese Korrelation zwischen zirkulierenden EPCs und EPO-Dosis und -Konzentration [45]. Da EPO jedoch potentiell einen Stimulus für die quantitative Zunahme endothelialer Vorläuferzellen im zirkulierenden Blut darstellt, wurde in der vorliegenden Studie die Erythropoietindosis der Dialysepatienten während der gesamten Studiendauer unverändert beibehalten, um einen potentiell störenden Einfluss zu vermeiden.

4.5. Endotheliale Progenitorzellen im zeitlichen Verlauf

Die Beobachtungen an den beiden Dialysepatienten, die im Lauf der Studie kardiovaskuläre Ereignisse erlitten, regen zu verschiedenen Vermutungen an. Diese Mutmaßungen stellen eher Denkanstöße dar als wissenschaftlich fundierte Hypothesen.

Bezüglich der CFU-Hill-Kolonien zeigten die beiden Patienten EW und HBr im Vorfeld der klinischen Ereignisse eine langsame aber stete Zunahme der Kolonien. Diese Beobachtung steht im Einklang mit Arbeiten von Adams und Kollegen, die in einem Kollektiv von KHK-Patienten eine vorübergehende Erhöhung der Zahl zirkulierender angiogener Zellen (CACs) in Folge einer belastungsinduzierten Ischämie nachwiesen [24]. Wie bereits beschrieben entsprechen dabei CACs in ihren

Charakteristika weitgehend den Zellen aus dem CFU-Hill-Ansatz [52]. Bei Patienten mit instabiler Angina pectoris-Symptomatik fanden George *et al.* eine höhere Anzahl CFU-Hill-Kolonien im Vergleich zu Patienten mit stabiler Angina pectoris [65]. Konnte die instabile Angina pectoris Problematik klinisch stabilisiert werden, fiel innerhalb von drei Monaten auch das Niveau der CFU-Hill-Kolonien auf nahezu 50 % des Ursprungswerts ab [65]. Eine zelluläre Ischämie, wie sie vor dem Akutereignis bei beiden Patienten durchaus vorstellbar ist, stellt also einen Proliferationsstimulus für zirkulierende CFU-EPCs dar.

Ebenfalls vor den klinischen Ereignissen fiel ein Anstieg der CD34⁺KDR⁺CD45⁻-Zellen im ECFC-Ansatz auf. Koc *et al.* wiesen ebenso bei chronischen Dialysepatienten vor kardiovaskulären Geschehnissen eine erhöhte Anzahl zirkulierender Endothelzellen nach [66]. Wie auch die zirkulierenden reifen Endothelzellen lassen die CD34⁺KDR⁺CD45⁻-Zellen bereits vor der klinischen Manifestation Aussagen zur Integrität des Endothels zu. Die Zunahme der CD34⁺KDR⁺CD45⁻-Zellen repräsentiert den Versuch des Körpers, Endothelläsionen auszubessern. Dass Patient EW nach der transitorisch ischämischen Attacke einen starken Abfall in der CD34⁺KDR⁺CD45⁻-Zellpopulation präsentierte, könnte entweder für eine Erschöpfung der körpereigenen Reparaturmechanismen sprechen oder die veränderte Nachfrage des Körpers nach dem Ereignis reflektieren.

Die Gesamtzellzahl auf Kollagen stieg in den Wochen nach dem zerebro-vaskulären Ereignis an. Auch Massa *et al.* berichteten bei Patienten nach akutem Myokardinfarkt über einen schnellen, kräftigen Anstieg der ECFC-Zellzahl [67]. Bemerkenswert bleibt jedoch die gegensätzliche Entwicklung der CD34⁺KDR⁺CD45⁻-Zellen und der Gesamtzellzahl auf Kollagen. Zwar proliferieren die Zellen im ECFC-Ansatz nach den Ereignissen verstärkt, die eigentlichen endothelialen Vorläuferzellen lassen sich aber nur in geringerer Zahl nachweisen. Dies legt nahe, dass in Folge des vaskulären Ereignisses CD34⁺KDR⁺CD45⁻-Zellen verbraucht wurden, und dadurch zunächst ein relativer Mangel an eigentlichen EPCs besteht. Die erhöhte Gesamtzellzahl könnte dabei Zeichen eines Kompensationsversuches des Körpers sein.

4.6. Inflammatorische Prozesse und EPCs

Bei der Entstehung von arteriosklerotischen Läsionen spielen inflammatorische Prozesse bekanntermaßen eine bedeutende Rolle [11]. Sowohl in der Allgemeinbevölkerung als auch in chronisch dialysepflichtigen Patientenkollektiven konnte eine Korrelation zwischen erhöhten Entzündungsparametern und arteriosklerotischen Veränderungen nachgewiesen werden [11; 68]. In der vorliegenden Studie fand sich eine starke Korrelation der CRP-Werte mit den ECFC-Koloniezahlen ($r=0.556$; $p<0.001$) sowie eine schwächere Korrelation der Werte mit den CFU-Hill-Koloniezahlen ($r=0.223$; $p=0.016$). Im Weiteren korrelierte der CRP-Spiegel mit den CD34⁺/VEGFR2-KDR⁺/CD45⁻-Subpopulationen sowohl aus dem ECFC- ($r=0.364$; $p<0.001$) als auch dem CFU-Hill-Ansatz ($r=0.372$; $p<0.001$).

In früheren Studien konnte bereits eine positive Korrelation zwischen CRP-Spiegeln und zirkulierenden EPCs bei Patienten mit Angina-pectoris-Symptomatik nachgewiesen werden [65]. Dies deutet daraufhin, dass neben der Sekretion von Wachstumshormonen wie VEGF möglicherweise auch eine generalisierte Entzündungsreaktion an der Mobilisation von EPCs aus dem Knochenmark beteiligt ist [65]. Rafat *et al.* beobachteten dazu in einem intensivpflichtigen Patientenkollektiv, dass eine akute, septische Entzündung mit einem Anstieg der zirkulierenden EPCs verbunden ist [69]. Fan *et al.* konnten *in vitro* zeigen, dass EPCs IL-6 Rezeptoren auf ihrer Oberfläche exprimieren und auf die Gabe von IL-6 mit verstärkter Proliferation, Migration und Gefäßbildung reagieren [70].

Obwohl in früheren Studien immer wieder ein vermeintlicher Unterschied bezüglich inflammatorischer Stimuli bei verschiedenen Dialyseverfahren beschrieben wurde [59; 71; 74], führte in der vorliegenden Studie keines der untersuchten Verfahren zu einer Veränderung der entzündlichen Situation der Patienten. Dies mag an der Verwendung von ultrareinem Dialysat bei allen drei Verfahren liegen. Aufgrund ihrer Gleichwertigkeit in Bezug auf eine Inflammationsinduktion erstaunt es daher nicht, dass sich hinsichtlich ihres Einflusses auf EPCs keine Unterschiede nachweisen ließen.

4.7. ECFCs vs. CFU-Hill-EPCs

Sowohl für den CFU-Hill- als auch den ECFC-Ansatz werden mononukleäre Zellen aus Spenderblut isoliert und anschließend kultiviert. Dabei bilden die nach 48 h nicht adhätierenden Zellen den Ausgangspunkt für die CFU-Hill-Kolonien, während die ECFC-Kolonien ihren Ursprung in einer von Anfang an adhätierenden Zellpopulation nehmen. Die beiden Zelltypen stellen dabei unterschiedliche Progenitorpopulationen dar, die auf klonaler Ebene nicht verwandt sind [33]. Bereits Asahara *et al.* beobachteten in den ersten Arbeiten mit putativen EPCs, dass weniger Zellen an Typ-I-Kollagen adhätierten als an Fibronektin [12]. Diese Beobachtung fanden wir in der vorliegenden Studie bestätigt (Median der Koloniezahlen im CFU-Hill-Ansatz zwischen 5 und 35 Kolonien aus 10^7 MNCs, im ECFC-Ansatz zwischen 0 und 1 Kolonie aus 10^7 MNCs). Dabei entstehen quantitativ mehr $CD34^+KDR^+CD45^-$ -Zellen im CFU-Hill-Ansatz, doch fehlte diesen Zellen die typische Endothelzellmorphologie. Andere Arbeitsgruppen konnten zudem zeigen, dass diese Zellen auch *in vivo* sich nicht zu Endothelzellen weiterentwickelten [33]. Signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Dialyseverfahren fanden sich in keinem der verwendeten Ansätzen, im ECFC-Ansatz waren Abweichungen der Patientenkollektive von der Kontrollgruppe deutlicher sichtbar. Insgesamt scheint die ECFC-Population sensibler auf äußere Einflüsse zu reagieren als die CFU-Hill-Zellen.

Dass kulturelle Methoden zur Bestimmung von putativen EPCs nicht mit durchflusszytometrischen Verfahren korrelieren, zeigten bereits andere Arbeitsgruppen [72, 73]. Die Anzahl der CFU-Hill-Kolonien ist dabei unabhängig von der Größe der $CD34^+KDR^+$ -Population [72]. Damit übereinstimmend zeigte auch die vorliegende Arbeit, dass die verschiedenen Verfahren zur quantitativen Einschätzung zirkulierender EPCs (kulturelle Anzucht als CFU-Hill und ECFC, Koloniezählung am Phasenkontrastmikroskop sowie Zellzählungen am Durchflusszytometer anhand der Epitope CD34, CD45 und KDR) nicht miteinander korrelieren.

4.8. Schlussfolgerung

Obwohl Studien der letzten Jahre unter Hämodiafiltration eine verbesserte Mortalitätsrate im Vergleich zur Hämodialyse nahe zu legen versuchen [59, 71, 74],

konnte in der vorliegenden Studie kein entsprechendes Korrelat zu solchen klinischen Beobachtungen gefunden werden. Die verschiedenen extrakorporalen Dialyseverfahren, wie sie in der vorliegenden Studie zum Einsatz kamen, sind hinsichtlich ihres Einflusses auf endotheliale Progenitorzellen als weitgehend gleichwertig zu betrachten. Zwischen den einzelnen Studienteilnehmern zeigten sich zwar starke Schwankungen in den Kolonie- und Zellzahlen sowohl im CFU-Hill- als auch ECFC-Ansatz, doch stand diese interindividuelle Variabilität nicht in Zusammenhang mit den verschiedenen Dialyseverfahren und blieb intraindividuell über die Zeit der Studiendauer relativ konstant.

Ein Zusammenhang fand sich hingegen jeweils zwischen dem Ausmaß inflammatorischer Prozesse, bestimmt anhand der CRP-Werte, und den Kolonie- sowie den CD34⁺KDR⁺CD45⁻-Zellzahlen in beiden kulturellen Ansätzen. Entzündungsmediatoren stellen offenbar sowohl beim dialysepflichtigen als auch beim nierengesunden Patienten einen Proliferationsstimulus für EPCs dar [45, 69, 71]. Da im Gegensatz zur Literatur [71] in der vorliegenden Studie kein Effekt der Hämodiafiltration auf die Inflammation nachweisbar war, was mit der Verwendung von ultrareinem Dialysat auch bei den Low- und High-flux-Hämodialyseverfahren zu erklären sein könnte, ist es nicht verwunderlich, dass zwischen den verschiedenen Dialyseverfahren auch kein Unterschied bei den EPCs nachweisbar war.

Die großen Unterschiede zwischen der nierengesunden Kontrollgruppe und den niereninsuffizienten Patienten zeigen, dass EPCs durch relative Urämie, gravierende Begleiterkrankungen und/oder die Dialysetherapie selbst in Qualität und Quantität verändert werden.

Signifikante Unterschiede der extrakorporalen Dialyseverfahren bezüglich des Spektrum und der Masse der entfernten Urämietoxine, die – angewendet über einen begrenzten Zeitraum von jeweils vier Wochen – Gegenstand der vorliegenden Studie waren, hatten hingegen keinen zusätzlichen Effekt auf das Proliferationsvermögen bzw. die Anzahl von EPCs.

5. Zusammenfassung

Zirkulierende EPCs werden als Biomarker für kardiovaskuläre Erkrankungen genutzt [21-24]. Im urämischen Milieu ist ihre Differenzierung gestört, wodurch chronische Dialysepatienten über weniger EPCs verfügen [25-28]. In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss verschiedener extrakorporaler Hämodialyseverfahren auf EPCs untersucht.

Dazu wurden in einer prospektiven, randomisierten Studie 18 chronisch dialysepflichtige Patienten jeweils vier Wochen mit LF-HD, HF-HD und „Online“-Prädilutions-HDF behandelt. EPCs wurden vor der ersten sowie vor der letzten Dialysebehandlung jedes vierwöchigen Intervalls bestimmt. 16 nierengesunde Probanden dienten als Kontrolle. EPCs wurden aus der mononukleären Zellfraktion im Blut isoliert und nach kultureller Anreicherung auf Fibronektin (CFU-Hill) bzw. auf Kollagen (ECFC) als Kolonien und Zellen quantitativ erfasst. Anschließend wurden die Zellen nach Immunphänotypisierung für CD34, CD45 und VEGFR2-KDR durchflusszytometrisch analysiert.

Dabei fanden sich zwischen den drei verwendeten Verfahren hinsichtlich ihres Einflusses auf die Kolonie- und Gesamtzellzahlen (CFU-Hill und ECFC) keine signifikanten Differenzen. Mit Ausnahme der CFU-Hill-Kolonien fielen hingegen Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den gesunden Spendern und den Dialysepatienten auf. Hinsichtlich der verschiedenen EPC-Subpopulationen stellten sich die untersuchten Verfahren ebenfalls äquivalent dar. Erneut zeigten sich hier signifikante Differenzen zwischen dem Kontroll- und dem Patientenkollektiv ($p < 0,05$). Auch die Zellvitalität auf Kollagen war im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant reduziert ($p < 0,05$); zwischen den Verfahren ergaben sich erneut keine relevanten Unterschiede.

Zwischen den CRP-Werten als Maß der Inflammation und den Kolonie- und Zellzahlen der CD34⁺VEGFR-KDR⁺CD45⁻-Subpopulationen (CFU-Hill und ECFC) fanden sich jeweils positive Korrelationen ($p < 0,05$).

Die vermehrte Bildung von ECFC-Kolonien aus dem Blut der Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe lässt an eine Voraktivierung dieser Zellpopulationen beim chronischen Hämodialysepatienten denken. In den verschiedenen mononukleären Zellpopulationen bestehen signifikante Differenzen zwischen nierengesunden Spendern und chronisch dialysepflichtigen Patienten. Die Zahl dieser putativen EPCs und hämatopoetischen Zellen scheint dem Einfluss von Inflammation zu unterliegen, nicht jedoch dem unterschiedlich effektiver Hämodialyseverfahren, die bezüglich des verwendeten Dialysats mikrobiologisch gleichwertig sind. Ob diese Schlussfolgerung auch für einen längeren Zeitraum als in der vorliegenden Untersuchung Gültigkeit hat, müssen weitere Studien zeigen.

6. Literaturverzeichnis

1. Eknoyan G. On the epidemic of cardiovascular disease in patients with chronic renal disease and progressive renal failure: a first step to improve the outcomes. *Am J Kidney Dis*, 1998;32:S1-S4
2. Levey AS, Eknoyan G: Cardiovascular disease in chronic renal disease. *Nephrol Dial Transplant*, 1999;14(4):828-33
3. Bro S, Bentzon JF, Falk E, Andersen CB, Olgaard K, Nielsen LB. Chronic renal failure accelerates atherogenesis in apolipoprotein e-deficient mice. *J Am Soc Nephrol*, 2003;14:2466-78
4. Shishehbor MH, Oliveira LP, Lauer MS, Sprecher DL, Wolski K, Cho L, Hoogwerf BJ, Hazen SL: Emerging cardiovascular risk factors that account for a significant portion of attributable mortality risk in chronic kidney disease. *Am J Cardiol*, 2008;101(12):1741-6
5. Wanner C, Krane V, März W, Olschowski M, Mann JF, Ruf G, Ritz E, German Diabetes and Dialysis Study Investigators. Atorvastatin in patients with type 2 diabetes mellitus undergoing hemodialysis. *N Engl J Med*, 2005;353(3):238-48
6. Fellström B, Jardine A, Schmieder R, Holdaas H, Bannister K, Beutler J, Chae D, Chevaile A, Cobbe S, Grönhagen-Riska C, De Lima J, Lins R, Mayer G, McMahon A, Parving H, Remuzzi G, Samuelsson O, Sondoki S, Süleymanlar G, Tsakiris D, Tesar V, Todorov V, Wiecek A, Wüthrich R, Gottlow M, Johnsson E, Zannad F. Rosuvastatin and Cardiovascular Events in Patients undergoing Hemodialysis. *N Engl J Med*, 2009;360(14):1395-1407
7. Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Isles CG, Lorimer AR, MacFarlane PW, McKillop JH, Packard CJ. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. *N Engl J Med*, 1995;333(20):1301-7

8. Stidley CA, Hunt WC, Tentori F, et al. Changing relationship of blood pressure with mortality over time in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol*, 2006;17:513-520
9. Locatelli F, Martin-Malo A, Hannedouche T, Loureiro A, Papadimitriou M, Wizemann V, Jacobson S, Czekalski S. Effect of Membrane Permeability on Survival of Hemodialysis Patients. *J Am Soc Nephrol*, 2009;(20)3:645-54
10. Krane V, Krieter D, Olschewski M, März W, Mann J, Ritz E, Wanner C. Dialyzer Membrane Characteristics and Outcome of Patients with Type 2 Diabetes on Maintenance Hemodialysis. *Am J Kidney Dis*, 2007;49:267-75
11. Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 1999;340:115-26
12. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner J. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 1997;275:964-967
13. Ingram DA, Mead LE, Tanaka H, Meade V, Fenoglio A, Mortell K, Pollok K, Ferkowicz MJ, Gilley D, Yoder MC: Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood*, 2004;104:2752-2760
14. Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, Hebbel RP. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest*, 2000;105:71-77
15. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, Magner M, Isner J, Asahara T. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med*, 1999;5:434-8

16. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, Homma S, Edwards NM, Itescu S. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med*, 2001;7:430-6
17. Rauscher FM, Goldschmidt-Clermont PJ, Davis BH, Wang T, Gregg D, Ramaswami P, Phippen AM, Annex BH, Dong C, Taylor DA. Aging, progenitor cell exhaustion, and atherosclerosis. *Circulation*, 2003;108:457-63
18. Kocher AA, Schuster MD, Bonaros N, Lietz K, Xiang G, Martens TP, Kurlansky PA, Sondermeijer H, Witkowski P, Boyle A, Homma S, Wang SF, Itescu S. Myocardial homing and neovascularization by human bone marrow angioblasts is regulated by IL-8/Gro CXC chemokines. *J Mol Cell Cardiol*, 2006;40(4):455-64
19. Schuh A, Liehn EA, Sasse A, Hristov M, Sobota R, Kelm M, Merx MW, Weber C. Transplantation of endothelial progenitor cells improves neovascularization and left ventricular function after myocardial infarction in a rat model. *Basic Res Cardiol*, 2008;103(1):69-77
20. Hristov M, Weber C. Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance. *J Cell Mol Med*, 2004;8:498-508
21. Hill JM, Zalos G, Halcox JPJ, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T: Circulating endothelial progenitor cells, vascular function and cardiovascular risk. *N Engl J Med*, 2003;348:593-600
22. Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K, Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary disease. *Circulation*, 2001;103:2885-90

23. Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, Böhm M, Nickenig G. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J med*, 2005;353:999-1007
24. Adams V, Lenk K, Linke A, Lenz D, Erbs S, Sandri M, Tarnok A, Gielen S, Emmrich F, Schuler G, Hambrecht R. Increase of circulating endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease after exercise-induced ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004;24:684-90
25. Sturiale A, Coppolino G, Loddo S, Criseo M, Campo S, Crascì E, Bolignano D, Nostro L, Teti D, Buemi M: Effects of haemodialysis on circulating endothelial progenitor cell count. *Blood Purif*, 2007;25:242-251
26. Eizawa T, Murakami Y, Matsui K, Takahashi M, Muroi K, Amemiya M, Takano R, Kusano E, Shimada K, Ikeda U. Circulating endothelial progenitor cells are reduced in hemodialysis patients. *Curr Med Res Opin*, 2003;19:627-33
27. de Groot K, Bahlmann FH, Sowa J, Koenig J, Menne J, Haller H, Fliser D: Uremia causes endothelial progenitor cell deficiency. *Kidney Int*, 2004;66:641-646
28. Choi JH, Kim KL, Huh W, Kim B, Byun J, Suh W, Sung J, Jeon ES, Oh HY, Kim DK: Decreased number and impaired angiogenic function of endothelial progenitor cells in patients with chronic renal failure. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004;24:1246-1252
29. Chan CT, Li SH, Verma S: Nocturnal hemodialysis is associated with restoration of impaired endothelial progenitor cell biology in end-stage renal disease. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2005;289:F679-684
30. Ramirez R, Carracedo J, Merino A, Nogueras S, Alvarez-Lara MA, Rodríguez M, Martín-Malo A, Tetta C, Aljama P: Microinflammation induces endothelial damage in hemodialysis patients: the role of convective transport. *Kidney Int*, 2007;72:108-113

31. Ueno H, Koyama H, Fukumoto S, Tanaka S, Shoji T, Shoji T, Emoto M, Tahara H, TSujimoto Y, Tabata T, Nishizawa Y. Dialysis modality is independently associated with circulating endothelial progenitor cells in end-stage renal disease patients. *NDT*, 2010;(25)2:581-6
32. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MAS, Rafii S. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34+ cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*, 2000;95:952-958
33. Yoder M, Ingram D et al.: Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood*, 2007;109:1801-1809
34. Civin CI, Strauss LC, Brovall C, Fackler MJ, Schwartz JF, Shaper JH. Antigenic analysis of hematopoiesis III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG1a cell. *J Immunol*, 1984;133:157-63
35. Dalchau R, Kirkley J, Fabre JW. Monoclonal antibody to a human leucocyte specific membrane glycoprotein probably homologous to the leucocyte-common antigen of the rat. *Eur J Immuno*, 1980;10:737-44
36. Keller G. Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine. *Genes Dev*, 2005;19:1129-55
37. Basile G, Casino F, Lopez T. Percent reduction in blood urea concentration during dialysis estimates Kt/V in a simple and accurate way. *Am J Kidney Dis*, 1990;15:40–45
38. Daugirdas JT. Second generation logarithmic estimates of single-pool variable volume Kt/V: an analysis of error. *J Am Soc Nephrol*, 1993;4(5):1205-13

39. Bergström J, Wehle B. No change in corrected β_2 -microglobulin concentration after cuprophane haemodialysis. *Lancet*, 1987;1:628–29
40. Eknoyan G, Beck GJ, Cheung AK, Daugirdas JT, Greene T, Kusek JW, Allon M, Bailey J, Delmez JA, Depner TA, Dwyer JT, Levey AS, Levin NW, Milford E, Ornt DB, Rocco MV, Schulman G, Schwab SJ, Teehan BP, Toto R; Hemodialysis (HEMO) Study Group. Effect of dialysis dose and membrane flux in maintenance hemodialysis. *N Engl J Med*, 2002;347(25):2010-9
41. Krieter DH, Hunn E, Morgenroth A, Lemke HD, Wanner C. Matching efficacy of online hemodiafiltration in simple hemodialysis mode. *Artif Organs*, 2008;32(12):903-9
42. Schmidt-Lucke C, Rössig L, Fischtlischerer S, Vasa M, Britten M, Kämper U, Dimmeler S, Zeiher A. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events. *Circulation*, 2005;111:2981-87
43. Bahlmann FH, De Groot K, Spandau JM, Landry AL, Hertel B, Duckert T, Boehm SM, Menne J, Haller H, Fliser D: Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells. *Blood*, 2004(1);103:921-926
44. Herbrig K, Pstrosch F, Oelschlaegel U, Wichmann G, Wagner A, Foerster S, Richter S, Gross P, Passauer J. Increased total number but impaired migratory activity and adhesion of endothelial progenitor cells in patients on long-term hemodialysis. *Am J Kidney Dis*, 2004;44:840-49
45. Schlieper G, Hristov M, Brandenburg V, Krüger T, Westenfeld R, Mahnken A, Yagmur E, Boecker G, Heussen N, Gladziwa U, Ketteler M, Weber C, Floege J. Predictors of low circulating endothelial progenitor cell numbers in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*, 2008;23:2611-18
46. Timmermans F, Van Hauwermeiren F, De Smedt M, Raedt R, Plasschaert F, De Buyzere ML, Gillebert TC, Plum J, Vandekerckhove B. Endothelial

Outgrowth cells are not derived from CD133+ cells or CD45+ hematopoietic precursors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007;27:1572-79

47. Case J, Mead LE, Bessler WK, Prater D, White HA, Saadat zadeh MR, Bhavsar JR, Yoder MC, Haneline LS, Ingram DA. Human CD34+AC133+VEGFR-2+ cells are not endothelial progenitor cells but distinct, primitive hematopoietic progenitors. *Exp Hematol*, 2007;35:1109-18
48. Ito H, Rovira II, Bloom ML, Takeda K, Ferrans VJ, Quyyumi AA, Finkel T. Endothelial progenitor cells as putative targets for angiostatin. *Cancer Res*, 1999;59:5875-77
49. Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Wacliwiw MAm Quyyumi AA, Finkel T. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function and cardiovascular risk. *N Engl J Med*, 2003;348:593-600
50. Zavada J, Kideryova L, Pytlik R, Vankova Z, Tesai V. Circulating endothelial progenitor cells in patients with ANCA-associated vasculitis. *Kidney Blood Press Res*, 2008;31:247-54
51. Valgimigli M, Rigolin GM, Fucili A, Porta MD, Soukhomovskaia O, Malagutti P, Bugli AM, Bragotti LZ, Francolini G, Mauro E, Castoldi G, Rerrari R. CD34+ and endothelial progenitor cells in patients with various degrees of congestive heart failure. *Circulation*, 2004;110(10):1209-12
52. Case J, Ingram DA, Haneline LS. Oxidative stress impairs endothelial progenitor cell function. *Antioxid Redox Signal*, 2008;10(11):1895-907
53. Melero-Martin JM, Khan ZA, Picard A, Wu X, Paruchuri S, Bischoff J. In vivo vasculogenic potential of human blood-derived endothelial progenitor cells. *Blood*, 2007;109:4761-68
54. Güven H, Shepherd R, Bach R, Capoccia B, Link D. The number of endothelial progenitor cell colonies is increased in patients with

- angiographically significant coronary artery disease. *JACC*, 2006;48(8):1579-87
55. Mead LE, Prater D, Yoder MC, Ingram DA. Isolation and characterization of endothelial progenitor cells from human blood. *Curr Protoc Stem Cell Biol*, 2008;2:Unit 2C.1.
 56. Rhode E, Bartmann C, Schallmoser K, Reinisch A, Lanzer G, Linkesch W, Guelly C, Strunk D. Immune cells mimic the morphology of endothelial progenitor colonies in vitro. *Stem Cells*, 2007;25:1746-52
 57. Buemi M, Corica F, Marino D, Medici MA, Aloisi C, Di Pasquale G, Ruello A, Sturiale A, Senatore M, Frisina N. Cardiovascular remodelling, apoptosis, and drugs. *Am J Hypertens*, 2000;13:450-54
 58. Maruyama S, Taguchi A, Iwashima S, Ozaki T, Yasuda K, Kikuchi-Taura A, Soma T, Ishii H, Murohara T, Takahashi H, Kasuga H, Kumada Y, Toriyama T, Ito Y, Kawahara H, Yuzawa Y, Matsuo S. Low circulating CD34+ cell count is associated with poor prognosis in chronic hemodialysis patients. *Kidney Int*, 2008;74:1603-09
 59. Canaud B, Bragg-Gresham JL, Marshall MR, Mortality risk for patients receiving hemodiafiltration versus hemodialysis: European results from the DOPPS. *Kidney Int*, 2006;69:2087-93
 60. Distler JH, Allanore Y, Avouac J, Giacomelli R, Guiducci S, Moritz F, Akhmetshina A, Walker UA, Garielli A, Müller-Ladner U, Tyndall A, Matucci-Cerinic M, Distler O. EULAR Scleroderma Trials and Research group statement and recommendations on endothelial precursor cells. *Ann Rheum Dis*, 2009;68:163-8
 61. Mariappan D, Winkler J, Chen S, Schulz H, Hescheler J, Sachinidis A. Transcriptional profiling of CD31(+) cells isolated from murine embryonic stem cells. *Genes Cells*, 2009;14(2):243-60

62. Markway BD, McCarty OJ, Marzec UM, Courtman DW, Hanson SR, Hinds MT. Capture of flowing endothelial cells using surface-immobilized anti-kinase insert domain receptor antibody. *Tissue Eng Part C Methods*, 2008;14(2):97-105
63. Lopez-Holgado N, Alverca M, Sanchez-Guijo F, Villaron E, Almeida J, Martin A, Armellini A, Garcia C, Blanco B, Sanchez-Abarca I, Martin S, Perez-Simon JA, Garcia-Sanz R, San Miguel JF, del Canizo MC. Short-term endothelial progenitor cell colonies are composed of monocytes and do not acquire endothelial markers. *Cytotherapy*, 2007;9(1):14-22
64. Jung C, Rafnsson A, Shemyakin A, Böhm F, Pernow J. Different subpopulations of endothelial progenitor cells and circulating apoptotic progenitor cells in patients with vascular disease and diabetes. *Int J Cardiol* 2009;134(2): Epub ahead of print
65. George J, Goldstein E, Abashidze S, Deutsch V, Shmilovich H, Findelstein A, Herzl I, Miller H, Keren G. Circulating endothelial progenitor cells in patients with unstable angina: association with systemic inflammation. *Eur Heart J*, 2004;25:1003-8
66. Koc M, Richards HB, Bihorac A, Ross EA, Schold JD, Segal MS. Circulating endothelial cells are associated with future vascular events in hemodialysis patients. *Kidney Int*, 2005;67(3):1078-83
67. Massa M, Campanelli R, Bonetti E, Ferrario M, Marinoni B, Rosti V. Rapid and large increase of the frequency of circulating endothelial colony-forming cells (ECFCs) generating late outgrowth endothelial cells in patients with acute myocardial infarction. *Exp Hematol*, 2009;37(1):8-9
68. Wanner C, Drechsler C, Krane V: C-reactive protein and uremia. *Semin Dial*, 2009;22:438-441

69. Rafat N, Hanusch C, Brinkkoetter PT, Schulte J, Brade J, Zijlstra JG, van der Woude FJ, van Ackern K, Yard BA, Beck GCh. Increased circulating endothelial progenitor cells in septic patients: correlation with survival. *Crit Care Med*, 2007;35(7):1677-84
70. Fan Y, Ye J, Shen F, Zhu Y, Yeghiazarians Y, Zhu W, Chen Y, Lawton MT, Young WL, Yang GY: Interleukin-6 stimulates circulating blood-derived endothelial progenitor cell angiogenesis in vitro. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2008; 28:90-98
71. Panichi V, Rizza GM, Paoletti S, Bigazzi R, Aloisi M, Barsotti G, Rindi P, Donati G, Antonelli A, Panicucci E, Tripepi G, Tetta C, Palla R, RISCVID Study Group. Chronic inflammation and mortality in haemodialysis: effect of different renal replacement therapies. Results from the RISCVID study. *Nephrol Dial Transplant*, 2008;23(7):2337-43
72. George J, Shmilovich H, Deutsch V, Miller H, Keren G, Roth A. Comparative analysis of methods for assessment of circulating endothelial progenitor cells. *Tissue Engineering*, 2006;12:2
73. Tura O, Robin Barclay G, Roddie H, Davies J, Turner M. Absence of a relationship between immunophenotypic and colony enumeration analysis of endothelial progenitor cells in clinical haematopoietic cell sources. *Journal of translational medicine*, 2007;5:37
74. Jirka T, Cesare S, Di Benedetto A, Perera Chang M, Ponce P, Richards N. The impact of on-line haemodiafiltration (HDF) on patient survival: results from a large network database. *Nephrol Dial Transplant*, 2005;20(5):18-19

Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Christoph Wanner für die freundliche Überlassung des Themas und die raschen Rückmeldungen.

Besonderer Dank gilt meinem Betreuer, Dr. med. Detlef Krieter, der mir sowohl während der Datenauswertung als auch beim späteren Niederschreiben der Studienergebnisse jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Die Studie wurde am Dialysezentrum Elsenfeld/Erlenbach, Dr. med. Andreas Morgenroth, sowie im Labor EXcorLab GmbH, Obernburg, durchgeführt. Mein herzlicher Dank gilt hierbei allen, die am Zustandekommen dieser Arbeit beteiligt waren, namentlich Dr. rer. nat. Horstdieter Lemke, CEO ExcorLab GmbH, sowie Karin Merget für die tatkräftige Unterstützung bei der Kultivierung der Zellen.