

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin II
des Universitätsklinikums Halle (Saale)
(Direktor: Prof. Dr. Matthias Girndt)

**Der Einfluss der neuen HCO-1100 Dialysemembran auf das kardiovaskuläre
Entzündungsgeschehen bei Dialysepatienten mit CRP Erhöhung.**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von: Felix Neugebauer
geboren am: 12.04.1987 in Halle/Saale

Gutachter:

Prof. Dr. med. Jens Lutz (Universitätsklinikum Mainz)

Prof. Dr. med. Ralf Schindler (Charité Universitätsklinikum Berlin)

Prof. Dr. med. Matthias Girndt (Universitätsklinikum Halle)

Tag der Verteidigung: 19.05.2014

Referat

Mehrere Studien haben gezeigt, dass Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz, welche dauerhaft dialysiert werden, ein höheres kardiovaskuläres Risiko als die Allgemeinbevölkerung aufweisen. Einer der Gründe dafür ist die mangelnde Elimination proinflammatorischer Zytokine und die Anhäufung bestimmter Monozytensubpopulationen (Mo2). Das Ziel dieser Arbeit ist zu untersuchen, ob die großporigere High-Cut-off Dialysemembran (HCO 1100 Firma Gambro) in der Lage ist, bestimmte proinflammatorische Zytokine besser herauszufiltern als eine konventionelle High-Flux Dialysemembran (Polyflux 11s Firma Gambro). Vor allem ob sie in der Lage ist, die Anzahl der Gesamtmonozyten, deren Subpopulationen oder deren ACE-Besatz zu verändern. Des Weiteren soll geprüft werden, ob der Einsatz dieser Membran, in Bezug auf die Albuminverluste, bei chronischen Dialysepatienten unbedenklich ist. In einer zweiarmigen, doppelblind randomisierten Crossover-Studie wurden innerhalb eines Zeitraumes von über 8 Monaten 19 Patienten in die Studie eingeschlossen, wovon 17 Patienten vollständig ausgewertet werden konnten.

Diese wurden jeweils 2 Wochen mit einer High-Flux Membran und 2 Wochen mit der HCO 1100 Membran dialysiert und entsprechend nachbeobachtet.

Es wurden in bestimmten Abständen im Plasma die Zytokine CRP, IL-1, IL-6, IL-10, TNF-alpha, weitere paraklinische Parameter, sowie die Monozytensubpopulationen (Mo1, Mo2, Mo3) und deren ACE-Expressionen bestimmt.

Es konnte weder ein signifikanter Effekt auf die Zytokine noch auf die Monozytensubpopulationen Mo2 und Mo3 und deren ACE-Besatz nachgewiesen werden. Ein wahrscheinlich reaktiver Anstieg der Absolutzahlen der Mo1 Subpopulation nach Behandlung mit der HCO-Membran weist auf mögliche Effekte hin.

Es zeigte sich eine signifikante Verminderung der Serumalbuminkonzentration durch die HCO-Membran, die allerdings nicht substituierungspflichtig wurde. Ein tendenzieller Anstieg der Cholinesterase wies auf die gesteigerte Albuminsyntheseleistung der Leber hin. Bis auf ein gehäuftes Auftreten von Schwindel und Hypotonie zeigte die HCO-Membran eine gute Verträglichkeit.

Die Ergebnisse dieser Pilotstudie rechtfertigen die Weiterentwicklung selektiverer Dialysatoren sowie weitere längere und größere Studien, wobei möglicherweise eine signifikante Senkung der Inflamationsparameter erreicht werden kann.

Neugebauer, Felix: Der Einfluss der neuen HCO-1100 Dialysemembran auf das kardiovaskuläre Entzündungsgeschehen bei Dialysepatienten mit CRP Erhöhung.
Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 77 Seiten, 2013.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Definition und Stadieneinteilung der chronischen Niereninsuffizienz	1
1.2	Ursachen und Komplikationen der chronischen Niereninsuffizienz	2
1.3	Nierenersatzverfahren	4
1.4	Kardiovaskuläres Risiko bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz	5
1.5	Die chronische Inflammation als kardiovaskulärer Risikofaktor	8
1.6	An der Inflammation beteiligte Zytokine	8
1.7	Monozytensubpopulationen und deren ACE-Besatz	11
1.8	Andere beeinflussende Moleküle	12
1.9	Dialysemembranen	12
1.10	Die HCO 1100 Membran	13
2.	Zielstellung	18
3.	Patienten, Material und Methodik	19
3.1	Patientenrekrutierung	19
3.2	Studiendesign, Behandlungsplan und Aufgabenverteilung	20
3.3	Die verwendeten Dialysemembranen	24
3.4	Vollblutprobengewinnung und Lagerung	24
3.5	Externe Laboranalysen	25
3.6	Durchflusszytometrische Messungen	26
3.6.1	Funktionsweise	26
3.6.2	Arbeitsmaterial, Chemikalien und Arbeitsschritte	27
3.6.3	Analyse und Auswertung	30
3.7	ELISA-Messungen	33
3.7.1	Funktionsweise	34
3.7.2	Arbeitsmaterial, Chemikalien und Arbeitsschritte	35
3.7.3	Analyse und Auswertung	39
3.8	Statistik	39
4.	Ergebnisse	40
4.1	Patientendemographie	40
4.2	Einfluss der Reihenfolge der Studienphasen im Crossover-Design	42
4.3	Beeinflussung der Inflammation	42
4.3.1	Effekte auf proinflammatorische Mediatoren	42

4.3.2	Effekte auf antiinflammatorische Zytokine	43
4.3.3	Effekte auf Monozytensubpopulationen und deren ACE-Besatz	43
4.4	Albuminverluste	45
4.5	Cholinesterase	47
4.6	Patientensicherheit	48
4.7	Dialyseeffektivität	49
4.8	Beta-2-Mikroglobulin	52
4.9	Dialysatmessung	52
5.	Diskussion	53
5.1	Interpretation der Ergebnisse	53
5.1.1	Patientenverteilung	53
5.1.2	Effekte auf inflammationsrelevante Mediatoren	53
5.1.3	Effekte auf Monozytensubpopulationen und deren ACE-Besatz	55
5.1.4	Patientensicherheit	56
5.1.5	Albuminverluste	57
5.1.6	Dialyseeffektivität	58
5.1.7	Beta-2-Mikroglobulin	59
5.2	Methodenkritik	59
5.3	Ausblick	60
6.	Zusammenfassung	62
7.	Literaturverzeichnis	64
8.	Anhang	74
8.1	Strukturierter Anamneseerhebungsbogen	74
9.	Thesen	76
10.	Lebenslauf	
11.	Selbstständigkeitserklärung	
12.	Erklärung über frühere Promotionsversuche	
13.	Danksagung	

Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ADMA	Asymmetrisches Dimethylarginin
Ag	Antigen
AGE's	Advanced Glycation End Products
Ak	Antikörper
AT	Angiotensin
B-2-M	Beta-2-Mikroglobulin
BSA	Bovines Serum-Albumin
CCR5	CC-Motiv-Chemokin-Rezeptor 5
CCS- Klasse	Klassifikation der Canadian Cardiovascular Society für Angina pectoris
CD	Cluster of Differentiation
CI	Konfidenzintervall
CKD	Chronic Kidney Disease
CRF	Case Report Form
CRP	C-reaktives Protein
CVD	Chronic Vascular Disease
CVVH	Kontinuierliche Venovenöse Hämofiltration
CVVHD	Kontinuierliche Venovenöse Hämodialyse
CVVHDF	Kontinuierliche Venovenöse Hämodiafiltration
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ERKD	End Stage Renal Kidney Disease (dialysepflichtige Niereninsuffizienz)
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FMC	Fluoreszenz Minus one Control
FSC	Forward Side Scatter
G-BA	Gemeinsamer Bundesausschuss
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
HCO	High Cut-Off Membran
HD	herkömmliche Polyflux 170 H Membran
HDL	High Density Lipoprotein
HF	Polyflux 11s Membran / Kontrollmembran

HRP	Horseradish Peroxidase
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kD	Kilodalton
KDIGO	Kidney Disease Improving Global Outcomes
KDOQI	Kidney Disease Outcomes Quality Initiative
KKS	Koordinierungszentrum für klinische Studien
LDL	Low Density Lipoprotein
Li-Hep	Lithium-Heparin
MFI	Mean Fluorescence Intensity
Mo1	Monozytensubgruppe 1 (CD14 ⁺⁺ , CD16 ⁻)
Mo2	Monozytensubgruppe 2 (CD14 ⁺⁺ , CD16 ⁺)
Mo3	Monozytensubgruppe 3 (CD14 ⁺ , CD16 ⁺⁺)
MW	Mittelwert
NKF	National Kidney Foundation
NO	Stickstoffmonoxid
NYHA-Klasse	New York Heart Association - Klassifikation für Herzinsuffizienz
pAVK	peripher arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphate Buffered Saline
PFA	Paraformaldehyd
PTCA	Perkutane Transluminale Coronare Angioplastie
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
SA	Standardabweichung
SK	Siebkoefizient
SSC	Side Scatter
TNF	Tumor Nekrose Faktor
UF	Ultrafiltration
Z.n.	Zustand nach

1. Einleitung

1.1 Definition und Stadieneinteilung der chronischen Niereninsuffizienz

Die chronische Nierenerkrankung wird laut den KDIGO-Leitlinien 2012 als abnorme Struktur- oder Funktionsveränderung der Nieren, die über 3 Monate anhält, definiert. Einer der folgenden Fakten muss definitionsgemäß > 3 Monate für eine chronische Nierenerkrankung vorliegen (Eknoyan et al., 2012):

- Albuminurie >30mg/24h
- Urinsedimentveränderungen
- Elektrolytstörungen durch tubuläre Veränderungen
- Histologische Veränderungen der Nierenstruktur
- Strukturelle Veränderung bei medizinischer Bildgebung
- Erfolgte Nierentransplantation
- GFR < 60 ml/min/1,73m²

Durch die chronische Nierenerkrankung entsteht früher oder später eine Niereninsuffizienz. Folgende Tabelle fasst die Stadien der Niereninsuffizienz nach K/DOQI inklusive empfohlener Therapie zusammen (Levey et al., 2002):

Tabelle1: Stadien der Niereninsuffizienz nach K/DOQI

Stadium	Beschreibung	GFR (ml/min pro 1,73m ²)	Therapie
0	Erhöhtes Risiko durch vorhandene Risikofaktoren (art. Hypertonie, Diabetes mellitus)	>90	Screening, Risikoreduktion
1	Nierenschädigung mit normaler oder erhöhter GFR	>90	Diagnostik, Therapie von Risikofaktoren/Begleiterkrankungen, Progression verhindern
2	Nierenschädigung mit geringer GFR Senkung	60-89	siehe Stadium 1
3	Moderate Einschränkung der GFR	30-59	Diagnostik und Behandlung von Folgeerkrankungen
4	Schwer eingeschränkte GFR	15-29	Vorbereitung auf Nierenersatztherapie
5	Nierenversagen	<15	Nierenersatztherapie

Nach aktueller Leitlinie der KDIGO von 2012 wurde das Stadium 3 zusätzlich in a und b unterteilt und die Albuminkonzentration im Urin als prognostischer Faktor hinzugefügt. Folgende Grafik veranschaulicht die neue Klassifikation und zeigt anhand der Farbstufen das Risiko auf Progression der Erkrankung sowie die Anzahl der jährlich empfohlenen Routinekontrollen in den farbigen Feldern (Eknoyan et al., 2012).

Tabelle 2: Stadieneinteilung der Niereninsuffizienz nach KDIGO

Stadium der Niereninsuffizienz	GFR (ml/min/1,73m ²)	Albuminlevel 1	Albuminlevel 2	Albuminlevel 3
		Normal oder leicht erhöht <30mg/g <3mg/mmol	Deutlich erhöht 30-300mg/g 3-30mg/mmol	Stark erhöht >300mg/g >30mg/mmol
1	≥90	1 wenn CKD	1	2
2	60-89	1 wenn CKD	1	2
3a	45-59	1	2	3
3b	30-44	2	3	3
4	15-29	3	3	4+
5	<15	4+	4+	4+

(grün = niedriges Risiko, gelb = mäßiges Risiko, orange = hohes Risiko, rot = sehr hohes Risiko auf Progression)

1.2 Ursachen und Komplikationen der chronischen Niereninsuffizienz

Die häufigsten Grunderkrankungen, die zu chronischer Niereninsuffizienz und letztendlich im Stadium 5 zur Dialyse führen, fasst Abbildung 1 zusammen.

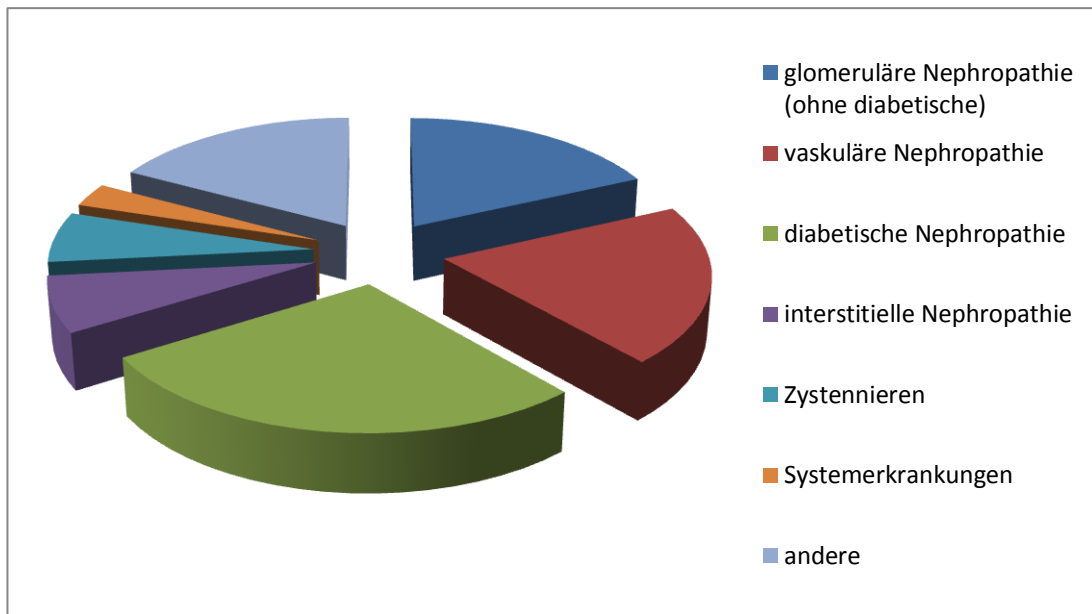


Abb. 1: Renale Grunderkrankung ständig dialysierter Patienten im Jahr 2011 (Potthoff et al., 2011) .

Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz erleiden neben den kardiovaskulären Problemen, die später näher erläutert werden, eine Reihe anderer Komplikationen. Diese werden vor allem durch die Urämie, also die Anhäufung harnpflichtiger Substanzen ausgelöst. Die meisten dieser Störungen sind durch eine erfolgreiche Nierentransplantation wieder reversibel. Viele Störungen lassen sich aber auch durch die Dialyse verbessern. Hierunter zählen zum Beispiel Störungen des Volumenhaushaltes, der Elektrolyte (Na^+ , K^+ , Phosphat, Ca^{2+}), des Säure-Base-Haushaltes und neuromuskuläre Störungen, wie z.B. muskuläre Übererregbarkeit und komatöse Zustände. Außerdem bessern sich gastrointestinale Störungen wie Übelkeit, Erbrechen, urämischer Foetor und Gastroenteritiden (Skorecki et al., 2005). Durch zusätzlich optimale medikamentöse Therapie lassen sich auch endokrine Störungen wie Vitamin-D-Mangelosteomalazie und Anämie weitestgehend therapieren. Allerdings gibt es auch Störungen, die sich trotz optimaler Therapie verschlechtern oder gerade erst durch die Dialyse entstehen. Hierunter zählen zum Beispiel Amyloidosen, Muskelkrämpfe, Myopathien, Hyperpigmentierungen, Gerinnungsstörungen, Leukopenien und ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko (Skorecki et al., 2005).

1.3 Nierenersatzverfahren

Seit 1995 ist laut den Berichten der Quasi-Niere ein erheblicher Anstieg der Prävalenz von Dialysepatienten, von ehemals etwas über 500 pro Millionen Einwohner, nachgewiesen. Der zuletzt veröffentlichte Bericht über Nierenersatztherapie in Deutschland der Quasi-Niere gab an, dass es Ende 2006 66508 Dialysepatienten in Deutschland gab. Dies entsprach einer Prävalenz von 808 pro eine Million Einwohner (Frei und Schober-Halstenberg, 2006). Im Jahresbericht Datenanalyse Dialyse 2011 für den G-BA wurden 82388 Fälle übermittelt. Dies entspricht einer Prävalenz von ca. 993 pro einer Million Einwohner (Potthoff et al., 2011). Dieser seit Jahren anhaltende Anstieg zeigt die zunehmende Bedeutung der Nierenersatzverfahren.

Die beste Therapieform des terminalen Nierenversagens ist in der Regel die Nierentransplantation. Wenn es nicht zu der gefürchteten chronischen Transplantatdysfunktion durch z.B. immunologische oder durchblutungsbedingte Störungen kommt, haben die Patienten im Vergleich zu Dialysepatienten eine längere Lebenserwartung und eine höhere Lebensqualität. Allerdings ist eine mehrjährige Wartezeit und der Überbedarf an Spenderorganen von entscheidenden Nachteil (Carpenter et al., 2005).

Das am häufigsten angewandte Nierenersatzverfahren ist die Hämodialyse. Hier erfolgt der Stoffaustausch hauptsächlich über Diffusion durch eine semipermeable Membran. Dadurch können harnpflichtige Stoffe, wie zum Beispiel Harnstoff, aus dem Blutkreislauf in das Dialysat gelangen. Je nach Membrantyp können Moleküle bis zu einer Größe von 50kD eliminiert werden. Ein ähnlicher Weg toxische Metaboliten aus dem Blut zu entfernen, ist die Hämofiltration. Hierbei findet der Stoffaustausch aber vor allem über Konvektion statt. Es lassen sich hierbei Moleküle bis zu einer Größe von 60kD entfernen. Allerdings werden durch die Ultrafiltration große Mengen Plasmaflüssigkeit entzogen, welche durch eine Elektrolytlösung ersetzt werden muss. Oft werden auch beide Verfahren kombiniert, wobei man dann von der Hämodiafiltration spricht. Hierbei kann man die Effektivität der Nierenersatztherapie weiter steigern, da man über die Diffusion optimal die kleinmolekularen Substanzen und über die Konvektion optimal höhermolekulare Substanzen herausfiltern kann. Dies kann unter bestimmten Voraussetzungen sogar zu einer verbesserten Überlebensrate führen (Singh und Brenner, 2005; Geberth und Nowack, 2011; Ok et al., 2013).

Bei schwerkranken Patienten mit akutem Nierenversagen auf Intensivstationen setzt man aufgrund der guten Kreislaufverträglichkeit und der höheren Clearanceleistung gegenüber Hämodialyse und Hämofiltration teilweise auch die kontinuierliche veno-venöse Hämofiltration (CVVH), -Hämodialyse (CVVHD) oder -Hämodiafiltration (CVVHDF) ein (Voiculescu, 2010).

Die Peritonealdialyse, als weiteres Verfahren, betrifft v.a. jüngere und nicht-multimorbide Patienten, die noch berufstätig sind oder die Unabhängigkeit bzw. Flexibilität dieser Behandlung bevorzugen. Allerdings wird die Peritonealdialyse im Vergleich zur Hämodialyse nur an einem geringen Anteil von 4,74% der Patienten angewendet (Potthoff et al., 2011). Dies rührt vor allem daraus, dass ein hohes Maß an Eigenverantwortung der Patienten und ein gutes technisches Verständnis vorausgesetzt werden. Außerdem ist das, in diesem Verfahren, erhöhte Peritonitisrisiko eine gefürchtete Komplikation (Singh und Brenner, 2005; Morgado et al., 2011).

Die Blutreinigungsverfahren Hämo-perfusion und Plasmapherese spielen eher bei akuten Intoxikationen beziehungsweise immunologischen Erkrankungen oder dem Hyperviskositätssyndrom eine Rolle (Ghannoum and Gosselin, 2013).

1.4 Kardiovaskuläres Risiko bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz

Ca. 50% der Dialysepatienten sterben durch eine kardiovaskuläre Krankheit. Dabei liegt ein 15 bis 30-fach höheres Risiko im Vergleich mit der Allgemeinbevölkerung des gleichen Alters vor. Bei den 25-34 jährigen Dialysepatienten steigt das Risiko sogar um das 500-fache (Schiffrin et al., 2007). Ein 30-jähriger Dialysepatient hat statistisch gesehen, dasselbe Risiko ein kardiovaskuläres Ereignis zu erleiden, wie ein 70-80 jähriger Patient ohne Nierenerkrankung (Stenvinkel et al., 2003). Aber nicht nur Dialysepatienten, sondern auch Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz eines niedrigeren Stadiums haben ein 1,5 bis 50-faches Risiko, ein kardiovaskuläres Ereignis zu erleiden (Schiffrin et al, 2007). Go et al. zeigten in einer groß angelegten Studie mit über 1,1 Million Patienten, dass mit dem Abfall der GFR das kardiovaskuläre Risiko ansteigt. Bei einer GFR von 45-59 ml/min/1,73m² beträgt die Hazard-Ratio noch 1,4. Wenn die GFR aber unter 15 ml/min/1,73m² absinkt, liegt die Hazard Ratio schon bei 3,4 ein kardiovaskuläres Ereignis zu erleiden (Go et al., 2004).

Albuminurie ist seit Längerem nicht nur ein Indikator für Nierenschäden, sondern auch für kardiovaskuläres Risiko. Denn je höher die Albuminausscheidung im Urin, desto höher das kardiovaskuläre Risiko. Einige Studien zeigten auch, dass die Therapie der Albuminurie das Risiko senkt, ein kardiovaskuläres Ereignis zu erleiden (De Zeeuw, 2004). Dies beweist um ein weiteres den Zusammenhang zwischen CKD (chronic kidney disease) und CVD (chronic vascular disease). In der Änderung der Leitlinien der KDIGO 2012 wurde deshalb die Albuminurie in der Stadieneinteilung der chronischen Niereninsuffizienz für die Risikostratifizierung berücksichtigt (siehe 1.1).

Mann et al. konnte in der HOPE-Studie beweisen, dass Patienten, die bereits Zeichen einer CVD oder Diabetes mellitus als Risikofaktor für CVD mitbrachten, durch die CKD noch eine weitere Risikosteigerung erfuhren (Mann et al., 2001). Allerdings kann man nicht alle der typischen Risikofaktoren der CVD auf die Patienten mit CKD übertragen. In einer Studie von Cheung et al. wurde der Zusammenhang von klassischen Risikofaktoren mit CVD bei über 900 Dialysepatienten untersucht. Rauchen und Diabetes waren auch hier als starke Risikofaktoren genannt. Gesamtcholesterin und Blutdruck korrelierten allerdings überraschenderweise nicht mit CVD bei den Dialysepatienten (Cheung et al., 2000).

Nun ergibt sich natürlich die Frage, ob es bei Patienten mit CKD eigene spezielle Risikofaktoren gibt, beziehungsweise was die Ursachen für die erhebliche Risikosteigerung sind. Bisher sind bei Weitem nicht alle Risikofaktoren bekannt und erforscht. Im folgenden Text wird eine Auswahl der wichtigsten Faktoren beschrieben.

Zum einen zeigt sich eine Verminderung von Stickstoffmonoxid (NO) in den Gefäßen (Baylis, 2006), welches für die Dilatation von Arterien nötig ist. Dafür verantwortlich ist die vermehrte Konzentration an Asymmetric Dimethyl Arginine (ADMA). Dies ist ein Retentionsprodukt bei CKD Patienten und hemmt die NO-Synthase, welche zur NO-Produktion nötig ist (Kielstein et al., 1999). Zum anderen kommt es zur vermehrten Produktion freier Radikale und somit zum oxidativen Stress an den Gefäßwänden (Chen et al., 1998). Diese Kombination führt zur Endotheldysfunktion und kann in Endothelschäden enden, die wiederum Angriffspunkte für die Atheroskleroseentstehung sind (Girndt and Seibert, 2010).

Auch ist bekannt, dass durch den sekundären Hyperparathyreoidismus der Calcium- und Phosphathaushalt durcheinandergerät und dies zu verstärkter Kalzifizierung der Gefäßwände und somit zu vermehrter Arteriosklerose führt (McCullough et al., 2009).

Weiterhin gibt es Belege dafür, dass Patienten mit CKD mehr gelbe Plaques in den Koronararterien besitzen als Patienten ohne CKD. Es gibt Berechnungen, die eine Odds Ratio von 3,49 für Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ergaben, mehr gelbe Plaques zu entwickeln (Wada et al., 2011). Gelbe Plaques haben einen höheren Cholesterinanteil, sind für Rupturen anfälliger und erhöhen somit das Risiko auf kardiovaskuläre Ereignisse (Othani et al., 2006).

Gross et al. verglichen die Plaquehäufigkeit bei in Autopsien gewonnenen Koronararterien bei 23 Patienten mit CKD und 23 Patienten ohne CKD. Hierbei zeigten sich signifikante Häufungen von kalzifizierenden Plaques in der Media bei Patienten mit CKD. Zusätzlich zeigte sich eine vermehrte Expression von Osteocalcin und CRP um diese Plaques bei dieser Patientengruppe (Gross et al., 2007).

Ein weiterer Risikofaktor für CVD stellt das gehäufte Auftreten von Dyslipoproteinämien dar. Durch das verminderte HDL und das erhöhte LDL im Serum wird das Gefäßendothel anfällig für Atherosklerose (Schiffrin et al., 2007).

Mehrere Studien zeigten außerdem, dass es bei Patienten mit CKD zu einer Sympathikusüberstimulation kommt. Diese führt dann wiederum zu arterieller Hypertonie, linksventrikulärer Hypertrophie, Herzrhythmusstörungen und weiterer Verschlechterung der Nierenfunktion sowie zu Vasokonstriktion der Koronararterien (Park, 2012).

Sowohl bei der Aktivierung des Sympathikus als auch bei dem fibrotischen Umbau der Arterien durch Angiotensin II, spielt die Aktivierung des RAAS eine entscheidende Rolle (Brewster et al. 2003).

Auch die erhöhte Rate an Schlafapnoen, die wiederum zur Aktivierung des Sympathikus, des RAAS und arterieller Hypertonie führt, ist ein Risikofaktor. Nicholl et al. stellten nämlich in ihrer Studie fest, dass ca. 50% der 254 untersuchten Patienten mit CKD unter nächtlicher Hypoxie litten (Küçüköylü und Rump, 2012; Nicholl et al., 2012).

Gerade die erhöhte Prävalenz von Vorhofflimmern, am ehesten durch schnelle Änderungen von Elektrolytspiegeln und zeitweiser Volumenüberladungen des Herzens, erhöht mitunter das Schlaganfallrisiko bei Dialysepatienten (Winkelmayer et al., 2011; Küçüköylü und Rump, 2012).

Auch die chronische Anämie ist ein Faktor, der einen Teil zur Herzschädigung beiträgt, indem sie das Risiko für Herzinsuffizienz und Arteriosklerose erhöht (Aryamuthu et al., 2012).

Ein weiterer wichtiger Faktor ist, dass bei niereninsuffizienten Patienten oft keine leitliniengerechte Therapie bei Herzinfarkten erfolgt. Wahrscheinlich aus Angst vor Komplikationen erfahren Patienten mit CKD weniger invasive Therapiemethoden (PTCA), obwohl sie auch davon profitieren würden (Mann et al., 2008). Auch werden Medikamente wie Aspirin, Beta-Blocker und Thrombolytika weniger oft in dieser Patientengruppe eingesetzt, obwohl gerade hier der Einsatz so wichtig ist (Shlipak et al., 2002).

Hinzu kommen Probleme wie eine Clopidogrel-Resistenz (Park et al., 2009) und die schwierigere und komplikationsreichere Antikoagulantien-Einstellung mit Warfarin (Limdi et al., 2009), wodurch die Therapie kardiovaskulärer Komplikationen erschwert wird.

1.5 Die chronische Inflammation als kardiovaskulärer Risikofaktor

Die chronische Inflammation ist einer der wichtigsten nicht-klassischen Risikofaktoren für CVD bei Patienten mit CKD (Girndt and Seibert, 2010). Dies zeigt auch die deutlich gestiegene Anzahl an Publikationen zu diesem Thema in den letzten 10 Jahren.

Inflammation kann man definieren als eine komplexe entzündliche Antwort des Immunsystems auf schädigende Stimuli wie zum Beispiel Krankheitserreger, defekte Zellen oder Irritationen. Eigentlich soll die Inflammation den Körper vor schädlichen Substanzen schützen. Allerdings führt die chronische Inflammation bei Patienten mit CKD zu deutlich negativen Effekten. Sowohl die vermehrte Produktion proinflammatorischer Stoffe als auch die gestörte Ausscheidung dieser Stoffe bei den Patienten führt zur Akkumulation und somit zur langfristig persistierenden Inflammation im Körper (Carrero and Stenvinkel, 2009).

Gründe für die gesteigerte Inflammation bei Dialysepatienten sind vor allem die schlechte Eliminationsleistung der insuffizienten Niere als physiologischen Abbauort für Zytokine (Kudo and Goto, 1999). Des weiteren existieren dialyseabhängige Faktoren wie Biokompatibilität der Dialysemembran, verunreinigtes Dialysat und Backfiltration bei der High-Flux Dialyse. Dialyseunabhängige Faktoren sind oxidativer Stress, Infektionen, Volumenüberlastung des Kreislaufs, Komorbiditäten, eingeschränkte Ausscheidung proinflammatorischer Zytokine über die Niere, Urämie, das oft hohe Alter und genetische Faktoren (Stenvinkel et al., 2005).

Die chronische Inflammation ist einer der Gründe für kalzifizierende Gefäßprozesse bei Dialysepatienten (Carrero and Stenvinkel, 2009). Es kommt sowohl durch eine lokale Entzündungsreaktion durch Monozytenaktivierung zur Kalzifizierung der Intima und der Plaques und folglich zur Atherosklerose. Ebenso führt eine systemische Entzündungsreaktion zu einer Kalzifizierung der Media, was als Arteriosklerose bezeichnet wird (Stenvinkel, 1999, 2003, 2005).

Kimmel et al. zeigte, dass erhöhte IL-1, IL-6 und TNF-alpha Werte als Zeichen der Inflammation mit erhöhter Mortalität einhergehen (Kimmel et al., 1998).

1.6 An der Inflammation beteiligte Mediatoren

Die nun folgenden Inflammationsmediatoren und deren Effekte verdeutlichen nochmals den erheblichen Einfluss der chronischen Inflammation auf das kardiovaskuläre Risiko.

CRP

Zimmermann et al. untersuchten 280 Dialysepatienten über 2 Jahre und zeigten ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko bei Patienten mit CRP Erhöhung gegenüber den Patienten ohne CRP Erhöhung (23% zu 5%), (Zimmermann et al., 1999). Das C-reaktive Protein dient also nicht nur als Marker für Entzündungen und Infektionen, sondern auch zur Risikoabschätzung bei CVD. Dies gilt sowohl für Patienten mit oder ohne CKD (Ridker et al., 2002). Für die Abschätzung der Mortalität ist es laut der Studie von Honda et al. weniger geeignet. Allerdings ist es auch ein guter Marker für Unterernährung und Muskelabbau (Honda et al., 2006), was auch die Morbidität und Mortalität bei Dialysepatienten steigert und in engem Zusammenhang mit Atherosklerose und Inflammation bei Patienten mit CKD steht (Stenvinkel et al., 1999). Wenn man bedenkt, dass Dialysepatienten durchschnittlich 10 bis 20-mal höhere CRP-Werte aufweisen als die Normalbevölkerung (Girndt and Seibert, 2010) wird auch hier wieder das höhere kardiovaskuläre Risiko bei Patienten mit CKD bestätigt.

Interleukin-6

Interleukin-6 ist ein guter Marker für Malnutrition, Mortalität und laut Honda et al. sogar der beste Marker zur Risikoabschätzung für kardiovaskuläre Ereignisse bei Patienten mit ESRD (End Stage Renal Kidney Disease), (Honda et al., 2006). Allerdings ist CRP noch immer ein beliebter Inflammationsmarker aufgrund seiner Verlässlichkeit, der besseren Verfügbarkeit und der geringeren Kosten (Carrero and Stenvinkel, 2009). Laut Stenvinkel et al. trägt IL-6 einen entscheidenden Teil zur Kalzifizierung von Gefäßen, Muskelabbau, Anorexie, oxidativen Prozessen, Zellalterung und Störung der endothelialen Funktion bei (Carrero and Stenvinkel, 2009).

TNF-alpha

TNF-alpha ist ein wichtiges Zytokin bezüglich Inflammation, Beeinflussung der Endothelfunktion und Apoptose von Tumorzellen. Außerdem beeinflusst es den Lipidstoffwechsel, die Gerinnung, die Insulinresistenz und ist mit Malnutrition und Anorexie assoziiert (Stenvinkel et al., 2005).

Weiterhin besteht eine inverse Korrelation zwischen der Nierenfunktion und der TNF-alpha Konzentration (Dounousi et al., 2012). In Tiermodellen wurde nachgewiesen, dass TNF-alpha die NO-Produktion in den Gefäßen senkt und somit zu verstärkter renaler Vasokonstriktion und Verschlechterung der Nierenfunktion führt (Shahid et al., 2008). Außerdem konnte

nachgewiesen werden, dass TNF-alpha in vitro die osteoplastische Differenzierung in Gefäßen vorantreibt und somit zur Kalzifizierung dieser führt (Tintut et al., 2000).

Interleukin-10

Interleukin-10 ist der Gegenspieler der durch IL-1, IL-6 und TNF-alpha ausgelösten Inflammation und senkt die Entzündungsreaktion (Moore et al., 1993). Laut Stenvinkel ist es sogar eines der wichtigsten antiinflammatorischen Zytokine überhaupt (Stenvinkel et al., 2005). Patienten mit einer niedrigeren IL-10 Produktion haben demzufolge eine höhere kardiovaskuläre Morbidität und umgekehrt (Girndt et al., 2002). Die Produktion dieses Zytokins wird zum Beispiel durch entzündliche Prozesse, Katecholamine, Stress und TNF-alpha induziert. Hauptsächlich erfolgt die Produktion bei Dialysepatienten in Monozyten und Makrophagen (Stenvinkel et al., 2005).

Interleukin-1

Grundsätzlich ist zu sagen, dass die Interleukin-1 Wirkung zum einen durch die Anzahl von IL-1 Rezeptoren und zum anderen durch die Menge an IL-1 Rezeptorantagonisten, dem natürlichen Gegenspieler, beeinflusst wird (Abbate et al., 2011).

In vielen Arbeiten liest man, dass IL-1 in Tiermodellen als proinflammatorisches Zytokin die Plaquebildung vermehrt und das Atheroskleroserisiko erhöht (Chamberlain et al., 2009; Elhage et al., 1998). Außerdem zeigte ein Tierversuch von Abbate et al., dass eine Ungleichheit von IL-1 Rezeptor zu dem IL-1 Rezeptorantagonisten, der vom Körper als natürlicher Gegenspieler zum IL-1 Rezeptor gebildet wird, zu einem schlechteren Heilungsprozess nach Myokardinfarkt bei Mäusen führte. Die Mäuse mit ausgeschaltetem Gen für den IL-1 Rezeptor hatten ein besseres Outcome nach Herzinfarkt als die Mäuse mit ausgeschaltetem IL-1 Rezeptorantagonist (Abbate et al., 2011). Aus diesem Versuch kann man schließen, dass eine hohe Expression von IL-1 RA besser für das kardiovaskuläre Outcome ist.

Auf der anderen Seite konnte allerdings in einem Tierversuch nachgewiesen werden, dass IL-1 die Plaquestabilität erhöht und das Gefäßremodelling vermindert (Alexander et al., 2012).

1.7 Monozytensubpopulationen und deren ACE-Besatz

Monozyten und Makrophagen haben einen entscheidenden Einfluss auf die Atheroskleroseentstehung. Sie beschleunigen das Plaqueswachstum und führen zu Lipidablagerungen und Leukozytenmigration (Ross, 1999; Girndt and Seibert, 2010). Vor nicht allzu langer Zeit unterschied man nur 2 Monozytengruppen anhand ihrer CD16 Expression. Hierbei wurde den Monozyten mit CD16 Expression eine entscheidende negative Rolle im Inflammationsgeschehen zugesprochen (Ziegler-Heitbrock, 2007). Diese haben die Eigenschaft, mehr proinflammatorische Zytokine wie TNF-alpha und weniger antiinflammatorische Zytokine wie IL-10 zu produzieren. Außerdem steigt Ihre Anzahl deutlich bei chronischer Inflammation an (Heine et al., 2008).

Heute unterscheidet man bei den Monozyten 3 Gruppen je nach Besatz mit CD 14 und CD 16. Die Monozyten der Gruppe mit starkem CD14 und fehlenden CD16 Besatz (CD14⁺⁺, CD16⁻) werden als klassische Monozyten oder Mo1 bezeichnet. Die mit starkem CD14 und mäßigen CD16 Besatz (CD14⁺⁺, CD16⁺) werden als Zwischenstufe oder Mo2 benannt. Monozyten mit mäßigen CD14 und starkem CD16 Besatz (CD14⁺, CD16⁺⁺) werden als Nicht-klassisch oder als Mo3 bezeichnet (Ziegler-Heitbrock et al., 2010).

Heine et al. fanden heraus, dass gerade bei Dialysepatienten die Monozyten der Subgruppe 2 eine entscheidende Rolle für die hohe kardiovaskuläre Mortalität einnehmen. Wohingegen die absolute Leukozyten- und Monozytenzahl keine Rolle spielt (Heine et al., 2008). Rogacev et al. zeigten, dass Patienten, die bei der Dialyse einen geringeren Abfall an Mo2 hatten, ein deutlich höheres kardiovaskuläres Risiko aufwiesen als Patienten, die einen höheren Abfall der Mo2 bei der Dialyse erfuhren (Hazard Ratio = 2,4), (Rogacev et al., 2009). Dies zeigt die positive Korrelation der Mo2 mit dem kardiovaskulären Risiko.

Weiterhin fand man heraus, dass vor allem die Mo2 bei Dialysepatienten eine deutlich gesteigerte ACE-Expression aufweisen und dass diese ACE-Expression positiv mit dem kardiovaskulären Risiko korreliert (Ulrich et al., 2006). Dieses Ergebnis passt zu den Fakten, dass ACE im RAAS eine entscheidende Rolle spielt, indem es Angiotensin I (ATI) in AT II spaltet und dieses zum Beispiel den oxidativen Stress, die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und die Leukozytenadhäsion vorantreibt (Ulrich et al., 2006). Eine weitere Studie von Ulrich et al. bestätigte dies. Patienten mit vielen Mo2 und einem ausgeprägten ACE-Besatz der Mo2 hatten eine deutlich höhere Mortalität (Hazard Ratio von 4,86), (Ulrich et al., 2010). Eine andere Studie zeigte, dass kardiovaskuläre Risikopatienten mit einem CCR5 Defekt eine bessere Prognose aufweisen. CCR5 ist ein für die Mo2 spezifischer Chemokinrezeptor, wodurch deren Wirkung vermittelt wird. Dies bestätigt damit indirekt den negativen Einfluss von Mo2 auf das kardiovaskuläre System (Carrero and Stenvinkel, 2009).

1.8 Andere beeinflussende Moleküle

Es sei nur erwähnt, dass es neben den eben beschriebenen Zytokinen und Monozytensubpopulationen noch zahlreiche andere mittelgroße und proteingebundene Urämie bedingte schädliche Moleküle wie zum Beispiel Resistin oder Advanced Glycation End-Products (AGE's) gibt, die zu dem erhöhten kardiovaskulären Risiko und der Inflammation beitragen (Gondouin and Hutchison, 2011). Auf diese näher einzugehen, würde allerdings den Rahmen dieser Arbeit sprengen.

1.9 Dialysemembranen

Dialysemembranen haben einen entscheidenden Einfluss auf die Qualität der Dialyse. Man unterscheidet Platten- und Kapillardialysatoren, in denen sich die Membranen in unterschiedlicher Anordnung befinden. Aufgrund höherer Sicherheit, besserer Clearance-Leistung und geringerem Blut-Füllvolumen, werden heute ausschließlich Kapillardialysatoren eingesetzt (Nowack et al., 2009). Man unterteilt die Membranen in bioinkompatible Membranen, welche zellulosebasiert und meist aus Cuprophan sind, und in biokompatible Membranen, welche rein synthetisch sind. Die semisynthetischen Membranen bestehen aus einem Zellulosegrundstoff, der mittels chemischer Liganden modifiziert ist, um die Biokompatibilität zu erhöhen. Aufgrund der nachgewiesenen Aktivierung von Komplementfaktoren und Leukozyten durch nicht modifizierte Zellulosemembranen werden diese heute deutlich weniger verwendet. Am häufigsten werden in Deutschland vollsynthetische Membranen eingesetzt, die aus polymeren Kunststoffen bestehen. Diese haben zum Beispiel eine höhere Permeabilität für größere Moleküle und teilweise absorptive Eigenschaften für Proteine und Toxine (Boure and Vanholder, 2004; Schmaldienst und Hörl, 2004; Geberth und Nowack, 2011; Schwenger, 2008).

Weiterhin kann man die Membranen in Low- und High-Flux-Membranen einteilen. High-Flux-Membranen haben einen höheren Ultrafiltrationskoeffizienten (= Maß für Wasserdurchlässigkeit = wichtige Eigenschaft für konvektiven Transport (Geberth und Nowack, 2011)) und sollen den Filtereigenschaften der glomerulären Basalmembran ähnlicher sein, da sie größere Poren als Low-Flux-Membranen besitzen. Daraus resultiert ein höherer Cut-off-Wert. Somit ist der Siebkoeffizient (Filtratkonzentration eines Moleküls/Plasmakonzentration eines Moleküls, $SK=1$ heißt alle Moleküle werden durch die Membran gelassen (Geberth und Nowack, 2011)) zum Beispiel für Beta-2-Mikroglobulin größer und es ist ein schnellerer Flüssigkeitsentzug möglich. Es kommt durch ein hohes Ultrafiltratvolumen zu einem verbesserten konvektiven Transport, wodurch hochmolekulare Toxine besser entfernt werden.

Jedoch ist die Behandlung insgesamt kostenintensiver, da auch höhere Ansprüche an die Dialysegeräte gestellt werden müssen. Zum Beispiel müssen durch direkte Ultrafiltrationsmessungen etwaige Bilanzierungsfehler vermieden werden. Außerdem kommt es zu der umstrittenen Rückfiltration von Dialysat in den Blutkreislauf (Koda, 2011; Geberth und Nowack, 2011).

Es existieren unterschiedliche Definitionen, ab wann man von High-Flux-Membranen spricht. Einige sehen die Kombination von einem Ultrafiltrationskoeffizienten von $> 20\text{ml/h/mmHg}$ und einen Siebkoeffizienten von $\beta\text{-2-M} > 0,6$ als ausschlaggebend. Andere sehen die $\beta\text{-2-M Clearance} > 20\text{ml/min}$ oder den Cut-off-Wert als maßgebend (Low-Flux $< 5\text{kD}$, High-Flux $< 35\text{kD}$), (Geberth und Nowack, 2011). Palmer et al. sprach von einer High-Flux Dialyse ab einem Ultrafiltrationskoeffizienten $> 12\text{ml/h/mmHg}$ oder einer Beta-2-Mikroglobulin Clearance $> 20\text{ml/min}$ (Low-Flux: UFK $< 12\text{ml/h/mmHg}$, $\beta\text{-2-M Clearance} < 10\text{ml/min}$), (Palmer et al., 2012). Am häufigsten wird von einer HF bei einer UF $\geq 10\text{ml/h mmHg}$ gesprochen.

Es gibt geteilte Meinungen und Studienergebnisse, ob die High-Flux-Membranen das Überleben von Langzeitdialysepatienten verlängern können. Die MPO-Studie zeigte einen signifikanten Überlebensvorteil für Diabetiker und Patienten mit einem Serumalbumin $\leq 4\text{g/dl}$ (Locatelli et al., 2009). Die HEMO-Studie konnte keinen signifikanten Vorteil der High-Flux Membranen zeigen (Eknoyan et al., 2002). Die Hämodiafiltration zeigte als Alternative in einigen Studien, teilweise unter bestimmten Voraussetzungen ein besseres Outcome als die alleinige Dialyse mit High-Flux Membranen (Ok et al., 2013). Palmer et al. werteten 33 Studien aus und errechneten, dass wenn man 100 Dialysepatienten über 2 Jahre mit High-Flux Membranen dialysiert, 3 kardiovaskuläre Todesfälle verhindert werden können (Palmer et al., 2012).

1.10 Die HCO 1100 Membran

HCO steht für High-Cut-off. Der Cut-off Wert steht für die Molekulargewichtsgröße, bei der der Siebkoeffizient 0,1 ist, d.h. nur noch 10% eines Stoffes durch die Membran treten. Dies ist wichtig, da der Begriff eine absolute Grenze suggeriert, aber so nicht definiert ist.

Ursprünglich wurde die Porengröße von Dialysemembranen vergrößert, um Beta-2-Mikroglobulin besser aus dem Blut zu entfernen und die dialyseassoziierte Amyloidose zu verhindern. Dieses Mittelmolekül mit seiner Größe von $11,7\text{kD}$ war nämlich nicht effektiv mit den herkömmlichen Low-Flux-Membranen herauszufiltern. Der Einsatz der High-Flux-Membranen führte dann zu einem erfolgreichen Rückgang der Inzidenz der dialyseassoziierten Amyloidose. Ein Grund, den Cut-off-Wert von Dialysemembranen weiter zu erhöhen, war bei Sepsispatienten die starke und teilweise schädigende Entzündungsreaktion (z.B. durch IL-6 mit

17kD oder TNF-alpha mit 26kD Größe) zu begrenzen, indem man proinflammatorische Zytokine durch die Dialyse mit sogenannten High-Cut-off-Membranen entfernt (Gondouin and Hutchinson, 2011).

Der natürliche Cut-off-Wert der Niere liegt bei ca. 65kD. Die meisten High-Flux-Membranen haben allerdings nur einen Cut-off von 10-20 kD. Bei den HCO-Membranen sind die Poren mit einer Größe von 0,008-0,01 μm^2 bis 3-mal größer. Ihr Cut-off-Wert liegt in vitro bei 100kD und im Blut bei bis zu ca. 60kD (Gondouin and Hutchinson, 2011).

Die am besten untersuchte High-Cut-off-Membran ist die HCO 1100 der Firma Gambro, Hechingen, die auch in dieser Arbeit verwendet wurde (siehe Abb. 2). Sie hat einen Porenradius von 8nm und einen Ultrafiltrationkoeffizienten von 33 ml/h/mmHg/m². Die Siebkoeffizienten liegen für Beta-2-Mikroglobulin bei 1,0, für Myoglobin bei 0,9 und für Albumin bei 0,1. Ihr Cut-off Wert liegt bei 45kD. Da sie ursprünglich für die kontinuierliche veno-venöse Hämofiltration gedacht war, hat sie allerdings nur eine vergleichsweise kleine Oberfläche von nur 1,1 m². Um dies auszugleichen, muss, wie auch in dieser Studie, die Dialysezeit etwas verlängert werden (Gondouin and Hutchinson, 2011).

Die HCO-Membran ist derzeit nur für die Leichtkettennephropathie zugelassen, wofür sie im klinischen Alltag auch hauptsächlich verwendet wird.



Abb. 2: Die HCO 1100 Membran der Firma Gambro, Hechingen

(http://www.gambro.com/en/Germany/Produkte/HCO_Dialyse/HCO_1100/, Stand 30.1.2012).

Hämodialyse oder Hämofiltration mit der HCO-Membran

Da man die HCO-Membran sowohl für Hämodialyse, als auch für die Hämofiltration einsetzen kann, gibt es kontroverse Diskussionen über das Verfahren, indem die Membran verwendet wird. Allerdings wird darauf erst im Diskussionsteil genauer eingegangen. Zusammenfassend kann man anhand einiger ex vivo und in vivo Studien sagen, dass die Hämofiltration bessere Clearanceleistungen der Zytokine zeigt, jedoch mit deutlich höheren Albuminverlusten einhergeht (Uchino et al., 2002a, b; Morgera et al., 2003a, b).

Klinische Anwendung bei Sepsis mit akutem Nierenversagen

Es gibt einige klinische Studien, die belegen, dass bei dem Einsatz der HCO-Membran bei Patienten mit akutem Nierenversagen und Sepsis eine signifikante Clearanceerhöhung proinflammatorischer Zytokine beziehungsweise ein Abfall des Plasmaspiegels stattfindet. Haase et al. zeigte in einer kleinen Crossover-Studie mit 10 Patienten, die an Sepsis und akuten Nierenversagen litten, dass durch die Dialyse mit der HCO-Membran im Vergleich zu einer High-Flux-Membran der IL-6 Spiegel im Plasma um mehr als 30% gesenkt werden konnte. Allerdings nur in der Messung direkt nach der 4-stündigen Dialyse. Weiterhin wurde ein deutlicher Clearanceanstieg bei IL-6, IL-10 und Albumin nachgewiesen (Haase et al., 2007). Morgera et al. zeigten in einer Studie mit 30 intensivpflichtigen an Sepsis erkrankten Patienten, dass durch die Hämofiltration mit der HCO-Membran im Vergleich zum herkömmlichen Hämofiltrationsverfahren ein Abfall von IL-6 und IL-1RA über 48 Stunden im Plasma zu verzeichnen war (Morgera et al., 2006).

Die HICOSS Studie war eine doppelblinde, europaweite, multizentrische Studie, die den Einsatz der HCO-Membran bei Patienten mit akutem Nierenversagen bei SIRS untersuchte. Hierbei wurde das Verfahren der CVVHD angewandt. Primäre Endpunkte waren zum Beispiel die Menge der eingesetzten vasokonstriktorisch wirksamen Medikamente, der mittlere arterielle Blutdruck und die Pulsfrequenz, um die Wirksamkeit der Zytokinelimination beurteilen zu können. Allerdings wurde die Studie ohne signifikante Ergebnisse vorzeitig beendet, weil ein Erreichen des Endpunktes mit der geplanten Patientenzahl nicht möglich war (Gondouin and Hutchinson, 2011).

Anwendung bei Patienten mit Leichtkettennephropathie

Ca. 10% aller Patienten mit Myelomkrankung entwickeln einen dialysepflichtigen, tubulointerstitiellen Nierenschaden aufgrund der unkontrollierten monoklonalen Produktion von

Leichtketten durch Plasmazellen. Diese Antikörperteile bestehen aus 2 Proteinketten. Diese sind Lambda mit einer Größe von 45kD und Kappa mit einer Größe von 22,5 kD. Es zeigten sich Erfolge bei dem Versuch, Leichtketten durch Plasmaaustausch zu entfernen (Zucchelli et al., 1988). Allerdings hat man festgestellt, dass sich 80% der Leichtketten extravaskulär befinden und eine kontinuierliche, langsame Entfernung aus dem Plasma notwendig ist, um die extravaskulären Depots zu mobilisieren und zu entfernen. Es hat sich gezeigt, dass bei der Dialyse mit der HCO-Membran mit Verlängerung der Dialysezeit auf über 8 Stunden eine effektive Entfernung der Leichtketten möglich war. Durch eine Hämodiafiltration oder die Schaltung zweier Dialysatoren in Reihe war eine weitere Clearancesteigerung möglich. Allerdings kam es hierbei, wie erwartet, zu starken Albuminverlusten. Man stellte auch fest, dass eine effektive und andauernde Senkung der Plasmaspiegel der Leichtketten nur in Kombination mit einer wirksamen Chemotherapie möglich war (Hutchison et al., 2009). Bei dieser Kombination kam es auch zur deutlichen Besserung der Nierenfunktion. Die HCO-Membran wurde nun bei mehr als 500 Patienten mit Leichtkettennephropathie weltweit eingesetzt. Ein mögliches Therapieschema ist das Birmingham Schema. Hierbei werden die Patienten 5 Tage lang, täglich 8 Stunden, mit der HCO-Membran dialysiert. Danach folgt die Dialyse alle 2 Tage bis zum 21. Tag. Wichtig sind hierbei, vor allem die tägliche Albuminsubstitution und die Kontrolle des Elektrolyt- und Flüssigkeitshaushaltes. Großangelegte Studien wie die laufende EuLITE-Studie (European trial of free light chain removal by extended haemodialysis in cast nephropathy) werden zeigen, wie sehr die HCO-Membran bei der Therapie der Leichtkettennephropathie den herkömmlichen High-Flux-Membranen überlegen ist (Gondouin and Hutchison, 2011; Hutchinson et al., 2008a, b).

Anwendung bei Patienten mit Rhabdomyolyse

Eine weitere Indikation zur Anwendung der HCO-Membran ist die Rhabdomyolyse mit akuter Niereninsuffizienz. Bei der Rhabdomyolyse werden große Mengen von dem Mittelmolekül Myoglobin mit einer Größe von 16kD freigesetzt, welches unter anderem im proximalen Tubulus freie Radikale bildet und so die Niere schädigt. Teilweise konnten schon signifikante Mengen per Hämodiafiltration mit High-Flux-Membranen entfernt werden. Allerdings zeigten sich sowohl im CVVH-Verfahren (Naka et al., 2005) als auch bei der Hämodialyse (Basnayake et al., 2009) unter der HCO-Membran deutlich bessere Clearanceraten von Myoglobin. Zukünftig folgende Studien müssen zeigen, ob dies auch zu einem besseren Outcome der Patienten bezüglich Nierenfunktion und Behandlungsdauer der Patienten führt (Gondouin and Hutchison, 2011).

Klinische Anwendung zur Bekämpfung der chronischen Inflammation bei Langzeitdialysepatienten

Die Ergebnisse der ex vivo- und der in vivo Studien an septischen Patienten, bezüglich der Clearanceeigenschaften proinflammatorischer Zytokine, weckten die Hoffnungen, durch die HCO-Membran, auch bei Langzeitdialysepatienten das kardiovaskuläre Risiko dauerhaft senken zu können. Bisher gibt es kaum Studien, die die Anwendung dieser Membran bei Langzeitdialysepatienten getestet haben.

Lee et al. untersuchte an 8 Patienten, welchen Effekt der 2 wöchige Einsatz der HCO-Membran auf β -2-M und Albumin hat. Hierbei sah man eine Clearanceerhöhung für beide Parameter im Vergleich zur High-Flux-Membran. Andere inflammatorisch relevante Parameter wurden allerdings nicht untersucht (Lee et al., 2009).

Zickler et al. wendeten die HCO-Membran über 3 Wochen im Crossover-Design im Vergleich zu einer herkömmlichen High-Flux-Membran an. Hierbei zeigten sich keine signifikanten Änderungen der CRP und IL-6 Werte. Publiziert wurden diese Ergebnisse nur als Abstract (Zickler et al., 2009).

In der hier vorliegenden Arbeit wurde erstmals untersucht, ob man mit der HCO-Membran in der Lage ist, einige ausgewählte, schwierig zu eliminierende, proinflammatorische Mediatoren im Plasma und die Monozytensubpopulationen, sowie deren ACE-Expression bei Langzeitdialysepatienten zu beeinflussen. Zusätzlich wurde der Sicherheitsaspekt zur klinischen Anwendung bei dieser Patientengruppe erstmals ausführlich untersucht.

2. Zielstellung

Als Pilotstudie soll diese Arbeit zeigen:

- Ob Inflammationsmediatoren und Zytokine wie CRP, IL-1, IL-6, IL-10, und TNF-alpha durch die HCO-Membran im Plasma von chronischen Dialysepatienten gesenkt werden können.
- Ob der Einsatz der HCO-Membran die Anzahl der Gesamtmonozyten bzw. deren Subpopulationen Mo1, Mo2, Mo3 und deren ACE-Besatz beeinflusst.
- Ob der klinische Einsatz der HCO-Membran über 2 Wochen unbedenklich ist.
- Wie hoch die Albuminverluste ausfallen, ob der Verlust über den Studienzeitraum tolerabel ist, beziehungsweise ob eine Albuminsubstitution nötig ist.

3. Patienten, Material und Methodik

3.1 Patientenrekrutierung

Zwischen November 2009 und Juni 2010 wurden alle zirka 100 Patienten des KfH-Nierenzentrums Halle hinsichtlich der folgenden Ein- und Ausschlusskriterien beurteilt (aus Prüfplan Vers.2.4 vom 3.11.2009).

Einschlusskriterien

- Dialysebehandlung seit mindestens 3 Monaten
- Dialyse 3x wöchentlich
- Dialyse mit High-Flux-Dialysator seit mindestens 4 Wochen
- Alter > 18 und < 85 Jahre
- mindestens einmal innerhalb von 8 Wochen vor Einschluss ein CRP-Wert >5mg/L
- Einwilligungsfähigkeit
- schriftliches Einverständnis nach Aufklärung

Ausschlusskriterien

- fehlendes Einverständnis
- Klinisch manifeste Infektion
- CRP im Plasma über 50mg/L
- Serum-Albumin unter 35g/L
- zentraler Venenkatheter als Dialysezugang
- Einnahme immunsuppressiver Medikamente
- Schwangerschaft oder Stillzeit
- Zeitgleiche Teilnahme an einer anderen klinischen Studie

In diesem Zeitraum konnten 19 Patienten des KfH nach Zustimmung der Ethik Kommission der MLU Halle-Wittenberg in die experimentell-klinische Studie eingeschlossen werden. Durch das Studiendesign wurden 2 randomisierte Patientengruppen gebildet.

3.2 Studiendesign, Behandlungsplan und Aufgabenverteilung

Studiendesign

Bei dieser monozentrischen Pilotstudie handelt es sich um eine zweiarmig, doppelblind, randomisierte Crossover-Studie. Das heißt, es gab zwei identisch aussehende Studienmembranen. „Studienmembran A“ (HF) war eine Standard High-Flux-Membran (Polyflux 11s Firma Gambro Hechingen) und „Studienmembran B“ (HCO) war die großporigere High-Cut-off Dialysemembran (HCO 1100 Firma Gambro, Hechingen). Randomisiert wurde über Briefe mit der Beschriftung der Patientenummer, die entsprechend der Reihenfolge des Patienteneinschlusses geöffnet wurden. Daraus ergab sich, ob der Patient die Behandlung mit Kontrollmembran A (Gruppe AB) oder Studienmembran B (Gruppe BA) beginnen sollte.

Die Studie sollte die Effekte der HCO 1100 Membran bezüglich bestimmter chronischer Inflammationsmarker, sowie den Sicherheitsaspekt in der klinischen Anwendung untersuchen. Das Design wurde so gewählt, um zunächst mögliche Effekte erkennbar zu machen, da eine Dauerbehandlung aufgrund der angenommenen deutlichen Albuminverluste nicht vertretbar erschien. Insbesondere die Albuminwerte wurden von einer der Studie unabhängigen Person überwacht und bei einem Unterschreiten der Grenze von 28 g/L beziehungsweise einen Abfall von >20% zum Ausgangswert an die Studienärzte gemeldet.

Während der Behandlungsphasen gab es keine Entblindungen. Die ermittelten Daten wurden während der Studie in CRF's (Case Report Form) erfasst.

Behandlungsplan

Patienten in der Gruppe AB wurden 2 Wochen lang (3x die Woche) mit der Kontrollmembran Polyflux 11s (HF) dialysiert. Darauf folgte eine 2 wöchige Wash-out-Phase. Das heißt, die Patienten wurden wie gewohnt 3x die Woche mit der herkömmlichen Polyflux 170H Membran (HD) dialysiert. Danach wurden die Patienten 2 Wochen lang mit der HCO 1100 Membran dialysiert. Nach weiteren 2 Behandlungswochen mit der herkömmlichen Membran wurden die Patienten nochmals untersucht.

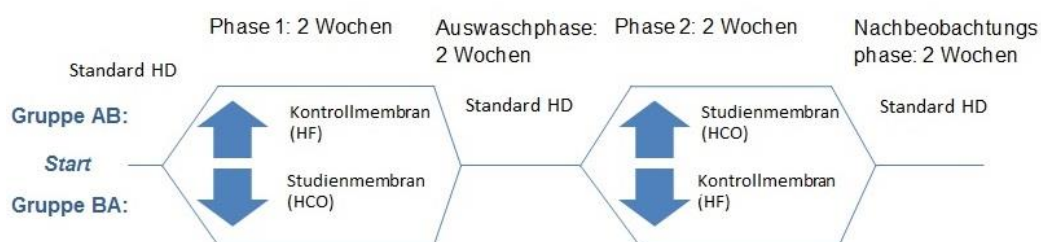
Während jeder Studienphase wurden also 6 aufeinanderfolgende Dialysen mit der jeweils randomisiert zugeordneten Dialysemembran durchgeführt.

Die Patienten der Gruppe BA begannen mit der HCO 1100 Membran und wechselten dann auf die Kontrollmembran. Abbildung 3 veranschaulicht den Studienablauf.

Die erste Studienvisite und somit der Studienstart erfolgte immer zwischen Mittwoch und Samstag, jedoch nicht am Montag oder Dienstag, um nicht nach langem interdialytischen Intervall die Studie beginnen zu müssen. Es wurde bei jeder Dialyse ein, für den Dialysehunt,

maximal möglicher Blutfluss und ein Dialysatfluss von 500ml/min eingestellt. Die Ultrafiltration wurde nach klinischer Indikation (Gewichtsänderung des Patienten) gewählt. Die Dialysezeit wurde während der beiden Hauptstudienphasen (nicht bei Wash-out und Nachbeobachtungsphase) um 30 min gegenüber der üblichen Behandlungszeit des jeweiligen Patienten verlängert, da sowohl die HCO- als auch die Kontrollmembran eine kleinere Gesamtoberfläche von 1,1 m² hatte. Insgesamt wurden pro Patient 11 Studienvisiten nach dem Zeitplan in Tabelle 3 durchgeführt. Zu Beginn jeder Studienvisite wurde nach Beschwerden (insbesondere nach Dyspnoe, kardialen Beschwerden und Allgemeinzustandsveränderungen im Vergleich zu Studienbeginn) gefragt. In der ersten Studienvisite wurde zusätzlich der unter Punkt 8.1 beschriebene Fragenkatalog abgefragt. Wie in Tabelle 3 ersichtlich wurden teils kurze Untersuchungsbefunde erhoben, wobei insbesondere auf Knöchel- bzw. Unterschenkelödeme, Anasarka und die Vitalparameter Blutdruck und Puls eingegangen wurde. Bei den teils ausführlicheren Untersuchungen wurde zusätzlich die kardiale und pulmonale Auskultation durchgeführt. Details der Blutabnahmen inklusive untersuchter Parameter werden im Punkt 3.4. dargestellt. Aufgrund der strengen Ein- und Ausschlusskriterien, der häufigen Untersuchungen und Blutabnahmen sowie der verlängerten Dialysezeit war es schwierig, Patienten zu rekrutieren. Aufgrund dessen gab es 3 zeitversetzte Studiendurchläufe mit jeweils 9, 8 und 2 Patienten über jeweils 8 Wochen. Der Studienzeitraum erstreckte sich somit von Anfang November 2009 bis Ende Juni 2010.

Abb. 3: Behandlungsplan



Aufgabenverteilung

Die Studienplanung erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Matthias Girndt und dem Studienteam (Firma Gambro, KKS Halle, Ethikkommission, Dr. Roman Fiedler und Dr. Christof Ulrich). Die Patientenakquise war Aufgabe von Dr. R. Fiedler.

Es fand die selbstständige Durchführung der klinischen Arbeit unter Aufsicht der Studienärzte Dr. R. Fiedler und Prof. Dr. M. Girndt mit Unterstützung der Schwestern des KfH Halle, die selbstständige Durchführung der labortechnischen Analysen nach Einarbeitung durch Dr. C. Ulrich mit Unterstützung der MTA Beate Heinze und die eigenständige Erfassung und Aufarbeitung der Studiendaten durch mich statt. Des Weiteren vollzog ich eigenständig die Auswertung und Aufarbeitung der Laboranalysen im Programm MACS Quantify nach Einarbeitung durch Dr. C. Ulrich.

Die statistische Auswertung für Poster und Publikation erfolgte durch das KKS Halle. Anschließend erfolgte eine erneute, von mir eigenständige, statistische Auswertung, der in dieser Arbeit aufgeführten Ergebnisse, mit Beratung durch das Institut für Epidemiologie, Biometrie und Informatik (Prof. Dr. Andreas Wienke), mit Orientierung an der Auswertung des KKS. Die Verfassung der Publikation erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. R. Fiedler und Prof. Dr. M. Girndt.

Tabelle 3: Zeitplan (aus Prüfplan Vers.2.4 vom 3.11.2009)

Studien- visite		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Zeitpunkt		Tag 1	Tag 1	Tag 3	Tag 8	Tag 15	Tag 29	Tag 29	Tag 31	Tag 36	Tag 43	Tag 57
HD-Sitzung		vor Dialyse #1	<u>nach</u> Dialyse #1	vor Dialyse #2	vor Dialyse #4	vor Dialyse #7	vor Dialyse #13	<u>nach</u> Dialyse #13	vor Dialyse #14	vor Dialyse #16	vor Dialyse #19	vor Dialyse #25
Anamnese		A +	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Befund		B +		B	B	B +	B +		B	B	B +	
Medikation		Basis		Änderung	Änderung	Änderung	Änderung		Änderung	Änderung	Änderung	Änderung
Blutent- nahme												
SI	Serum 5,5ml	X		X	X	X	X		X	X	X	X
AG	EDTA 4,5ml	X			X		X			X	X	X
MO	Li-Hep 4,5ml	X		X	X	X	X		X	X	X	X
KC	Serum 2,6ml	X			X	X	X			X	X	X
KT	Serum 2,6ml		X					X				
BB	EDTA 2,7ml	X		X	X	X	X		X	X	X	X

A= kurze Anamnese, A + = kurze Anamnese mit ausführlichem Fragenkatalog (siehe 8.1), B= kurzer Befund, B + = ausführlicher Befund (siehe 3.2)

3.3 Die verwendeten Dialysemembranen

Alle Patienten wurden vor Beginn, in der Wash-out- und der Nachbeobachtungsphase der Studie mit der Polyflux 170H Membran (HD) dialysiert. Um die Verblindung der Studie zu gewährleisten, wurde die Polyflux 11s Membran als Kontrollmembran (HF) verwendet, da diese bezüglich der Dialysatoreigenschaften der Standardmembran möglichst ähnlich war und auch aufgrund der kleineren Gesamtoberfläche äußerlich identisch der HCO-Membran war. Folgende Tabelle zeigt die Eigenschaften der 3 Membranen.

Tabelle 4: Eigenschaften der verwendeten Membranen

	Polyflux 170H	Polyflux 11s	HCO 1100
Effektive Membranoberfläche (m²)	1,7	1,1	1,1
Membranmaterial	Mischung aus PAES, PVP und Polyamid	Mischung aus PAES, PVP und Polyamid	PAES/PVP
Cut-off (kD)	20	20	45
UF-Koeffizient in vitro ±20% (ml/h, mmHg)	70	53	36

UF= Ultrafiltrations-, PAES= Polyarylethersulfon, PVP= Polyvinylpyrrolidon

3.4 Vollblutprobengewinnung und Lagerung

Anhand des Zeitplans in Tabelle 3 sieht man den Umfang und den Zeitpunkt der Blutabnahmen. Die Blutabnahmen wurden immer über den durch die Dialyse bereits angestochenen Shunt entnommen. Im folgenden werden die Blutproben beschrieben (aus Prüfplan Vers.2.4 vom 3.11.2009).

Probe SI (Monovette braun Serum 5,5ml):

Das Röhrchen wurde durch Zentrifugation abgesert, das Serum aliquotiert (in 3 Aliquots á ~1ml) und in Kryoröhrchen bis zur Analyse eingefroren (bei -80°C). Später wurde mittels ELISA TNF-alpha, IL-1 und IL-10 bestimmt.

Probe AG (Monovette rot EDTA 4,5ml):

Das Röhrchen wurde durch Zentrifugation abgesert, das Serum aliquotiert (in 3 Aliquots á ~1ml) und in Kryoröhrchen bis zur Analyse eingefroren (bei -80°C), (für andere Studie verwendet).

Probe MO (Monovette orange Li-Hep 4,5ml):

Das Röhrchen wurde auf Eis gelagert und gekühlt innerhalb von 60min zur Analyse ins Labor der KIM II gebracht. Anschließend Bestimmung der Monozytengesamtzahl, Differenzierung der Subpopulationen und Bestimmung des ACE-Besatzes mittels Durchflusszytometrie.

Probe KC (Monovette braun Serum 2,6ml):

Die Probe wurde in das Zentrallabor des UKH gegeben (Anforderung: Na⁺, K⁺, Phosphat, Creatinin, Harnstoff vor Dialyse, Albumin, β 2-Mikroglobulin, CRP, IL-6, Cholinesterase).

Probe KT (Monovette braun Serum 2,6ml):

Die Probe wurde in das Zentrallabor des UKH gegeben (Anforderung: Harnstoff nach Dialyse zur

Berechnung der Kt/V).

Probe BB (Monovette rot EDTA 2,7ml):

Die Probe wurde in das Zentrallabor des UKH gegeben (Anforderung: Differentialblutbild).

3.5 Externe Laboranalysen

Folgende Laborparameter wurden in dem, nach DIN EN ISO 9001:2008 zertifizierten, Zentrallabor im UKH nach entsprechenden Ringversuchen analysiert: Na⁺, K⁺, Phosphat, Creatinin, Harnstoff, Albumin, β 2-Mikroglobulin, CRP, IL-6, Cholinesterase, Differentialblutbild, Harnstoff.

Am jeweils 1. Tag beider Studienphasen wurde das Dialysat eines Patienten gesammelt. Es wurden bei der Dialyse mit der Kontrollmembran 162,5 Liter und bei der Dialyse mit der HCO-Membran 165 Liter über eine Dialysezeit von 5 Stunden gesammelt. Das Dialysat beider Proben wurde auf ca. 1 Liter durch Low-Flux Filter konzentriert und bei -70°C bis zur Analyse eingefroren. Anschließend wurde Gesamtprotein, Albumin, Kappa-Leichtketten, Lambda-Leichtketten, Beta-2-Mikroglobulin, IL-6, IL-1, IL-10, TNF- α und α 1-Mikroglobulin gemessen. Die Bearbeitung der Proben erfolgte in einem Labor der Firma Gambro, Hechingen.

3.6 Durchflusszytometrische Messungen

Die Monozytensubpopulationen lassen sich durch die Expression ihrer jeweiligen Zelloberflächenmoleküle (Cluster of Differentiation [CD]) gut voneinander unterscheiden. Ein Durchflusszytometer eignet sich hierbei hervorragend zum Zählen und Differenzieren dieser Subpopulationen (Janeway et al., 2002a).

1934 wurde von Moldavan über eines der ersten Geräte zur Zellanalyse berichtet, welches den Entstehungsprozess der Durchflusszytometer einleitete. Hier wurden vor allem Blutzellen piezoelektronisch gezählt. Allerdings gab es noch eine Reihe von Problemen wie zum Beispiel das Verklumpen von Zellen und die mangelnde Zellspezifität beim Zählprozess (Moldavan, 1934). Mittlerweile sind Durchflusszytometer durch moderne Lasertechnik und neue Herstellungsmethoden von spezifischen Antikörpern soweit entwickelt, dass man eine immer größere Anzahl fluoreszenzmarkierter Antikörper einsetzen beziehungsweise mehrere Farbstoffe gleichzeitig mit einem Gerät messen kann (Janeway et al., 2002a).

3.6.1 Funktionsweise

Zuerst werden die zu untersuchenden Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Hier unterscheidet man die direkte Methode (siehe Abb.4.1) wobei ein mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierter Antikörper an die zu untersuchende Zelle bindet von der indirekten Methode, wobei ein fluoreszierender Antikörper an einen anderen Antikörper bindet, der wiederum an der untersuchenden Zelle gebunden ist (siehe Abb.4.2). Für bestimmte Untersuchungen ist auch eine Doppelfluoreszenz-Markierung möglich (Janeway et al., 2002a).

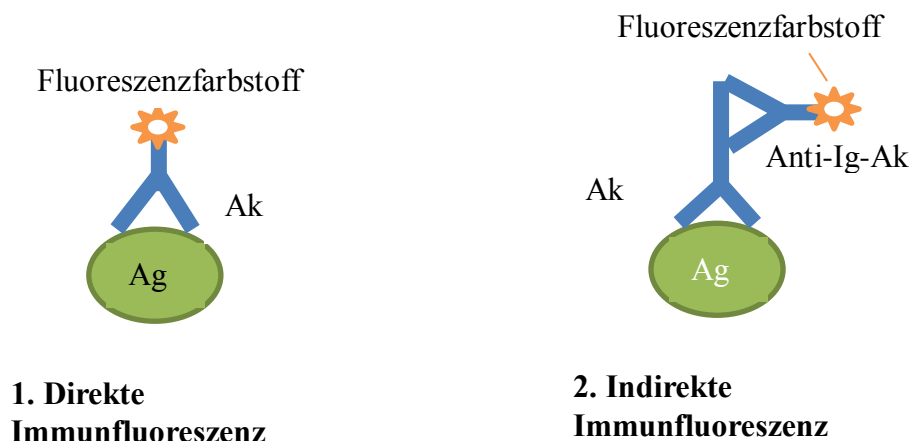


Abb. 4: Veranschaulichung zur direkten und indirekten Immunfluoreszenzmethode (Ak=Antikörper, Ag=Antigen, Ig=Immunglobulin).

Die markierten Zellen werden nun so durch eine dünne Kapillare gedrückt, dass diese einzeln nacheinander von einem Laser erfasst werden. Durch die unterschiedliche Größe und Granularität der Zellen, sowie durch die unterschiedlichen Emissionen der Fluoreszenzfarbstoffe wird eine jeweils andere Lichtstreuung von Fotodetektoren gemessen (siehe Abb. 5.1). Diese Daten werden dann von einem Computerprogramm ausgewertet und geben Informationen über Anzahl, Größe und Granularität der Zellen, sowie über die Expressionsrate verschiedener Oberflächemoleküle von Zellen (Janeway et al., 2002a, b). Die Zellfraktionen lassen sich dann z.B. in einem Dotplot (siehe Abb.5.2) abgrenzen.

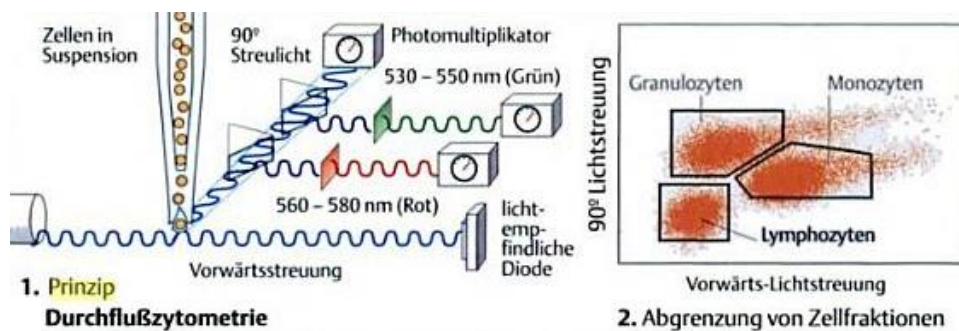


Abb. 5: Schema zum Funktionsprinzip der Durchflusszytometrie und zur Abgrenzung der Zellfraktionen (Pezutto et al., 2006).

3.6.2 Arbeitsmaterial, Chemikalien und Arbeitsschritte

Geräte

- FACSCAN, Becton Dickinson Heidelberg (mit einem Laser (488nm) ausgestattet, kann bis zu 3 Fluoreszenzen parallel messen)
- Auswertungssoftware (MACS Quantify 2.0, Miltenyi Biotec Bergisch Gladbach)
- Zentrifuge (Megafuge 11R, Heraeus Hanau)
- Vortexer (Q1, VWR Darmstadt)
- Pipettiergeräte inklusive Aufsätze (Hirschmann Laborgeräte Eberstadt)
- Kühlschrank (Labo-100, Kirsch Offenburg)
- Tiefkühlschrank -80°C (HERAfreeze, Heraeus Hanau)

Bestimmung der Monozytensubpopulationen

FACS-Puffer:

- 1x PBS (Phosphate Buffered Saline), Biochrom Berlin
- 5% FCS (Fetal Calf Serum), PAA Pasching
- 0,5% BSA (Bovines Serum-Albumin) Fraktion V, pH 7,0, Standard grade, Serva Heidelberg
- 0,07% Natriumsäure, Roth Karlsruhe

Fc-Block-Mix:

- 46 µl FACS-Puffer
- 4 µl Fc-Block, Miltenyi Biotec Gladbach

Antikörpermix:

- 5 µl CD 86 PE (Klon: ITS2.2, Beckman Coulter Krefeld)
- 5 µl CD 14 PerCP (Klon: M-Phi-P9, BD Bioscience Heidelberg)
- 8 µl CD 16 FITC (Klon: eBioCB16, ebioscience Frankfurt)

- BD-lysing solution: 50ml Lysing-Konzentrat (Becton Dickinson Heidelberg) in 450ml Aqua ad injectabilia gelöst
- PFA (Paraformaldehyd, Roth Karlsruhe) in PBS bei 56°C gelöst

Pro Messung und Patient wurden 100 µl Vollblut der Probe MO verwendet. Zunächst wurden die Proben 2x mit FACS Puffer gewaschen (2ml FACS Puffer hinzugegeben, gevortext und 5min bei 15°C mit 1300rpm zentrifugiert). Dann wurden unspezifische Bindungsstellen mit dem Fc Block-Mix blockiert. Anschließend wurde der Antikörpermix pipettiert, gevortext, zu pelletierten Zellen gegeben und wieder gevortext. Darauf folgte die Lyse und Fixierung der Zellen (2 ml BD Lysierlösung pro 100 µl hinzugegeben, gevortext, 15min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und 5 min. bei 1300rpm zentrifugiert).

Anschließend wurde die oben beschriebene Wäsche wiederholt. Zuletzt wurde das Pellet in 200 µl 1% PFA gegeben und bei 4°C bis zur Messung, welche am selben Tag stattfand, gelagert.

Bestimmung des ACE-Besatzes der Monozytensubpopulationen

FACS-Puffer:

- 1x PBS, Biochrom Berlin
- 5% FCS, PAA Pasching
- 0,5% BSA Fraktion V, pH 7,0, Standard grade, Serva Heidelberg
- 0,07% Natriumsäure, Roth Karlsruhe

Fc-Block-Mix:

- 46 µl FACS-Puffer
- 4 µl Fc-Block, Miltenyi Biotec Gladbach

Antikörpermix 1:

- 5 µl CD 16 PE (Klon: ebioscCB16 ebioscience Frankfurt)
- 5 µl CD 14 PerCP (Klon: M-Phi-P9, BD-Bioscience Heidelberg)
- 10 µl CD 143 FITC (Klon: 9B9 Serotec Düsseldorf)

Antikörpermix 2 (dient als Fluoreszenz Minus one Control [FMC]):

- 5 µl CD16 PE (#15) (Klon: ebioscCB16 ebioscience)
- 5 µl CD14 PerCP (#08) (Klon: M-Phi-P9, BD-Bioscience Heidelberg)
- 10 µl FACS-Puffer

- Sphero Rainbow Calibrite beads 6-6,4 µm, BD Biosciences
- BD-lysing solution: 50ml Lysing-Konzentrat (Becton Dickinson Heidelberg) in 450ml Aqua ad injectabilia gelöst
- PFA (Roth Karlsruhe) in PBS bei 56°C gelöst

Pro Patient und Messung wurden hier 2x 100 µl Vollblut der Probe MO verwendet, welche später jeweils mit einem anderen Antikörpermix versetzt wurden. Dies war nötig, da mit dem verwendeten FACS-Gerät nur maximal 3 Fluoreszenzen gleichzeitig messbar waren, jedoch mit der FMC 4 Parameter gemessen werden mussten. Somit wurden die Messungen auf 2 Proben aufgeteilt. Die FMC-Messung diente als Kontrolle auf Messfehler, welche bei MFI (Mean Fluorescence Intensity) Messungen vorkommen können. Die Proben wurden wie oben beschrieben 2x mit FACS Puffer gewaschen. Anschließend wurden die unspezifischen Bindungsstellen wie oben beschrieben mit dem Fc-Block-Mix blockiert. Nun wurde die eine Probe mit Antikörpermix 1 und die andere Probe mit Antikörpermix 2 versetzt, gevortext, zu pelletierten Zellen gegeben und nochmal gevortext. Daraufhin wurden alle Proben bei 4°C über

20 min im Dunkeln gelagert. Zuletzt wurden die Proben wie oben beschrieben lysiert, fixiert, nochmals mit FACS-Puffer gewaschen, in 1% PFA gegeben und bis zur Messung bei 4°C gelagert.

3.6.3 Analyse und Auswertung

Auswertung der Monozytensubpopulationen

Im Anschluss an die durchflusszytometrische Messung mit dem FACSCAN (Becton Dickinson Heidelberg) wurden die Monozyten als CD86 hochpositive Zellpopulation entsprechend Größe und Granularität (Forward Side Scatter [FSC]/Side Scatter [SSC]) manuell in dem Programm MACS Quantify 2.0 gated und aufgrund der Expression von CD 14 und CD 16 in 3 Subpopulationen eingeteilt (CD14⁺⁺, CD16⁻ [Mo1]; CD14⁺⁺, CD16⁺ [Mo2]; CD 14⁺, CD16⁺⁺ [Mo3]). Abbildung 6 zeigt die Gatingstrategie zur Messung der Monozyten.

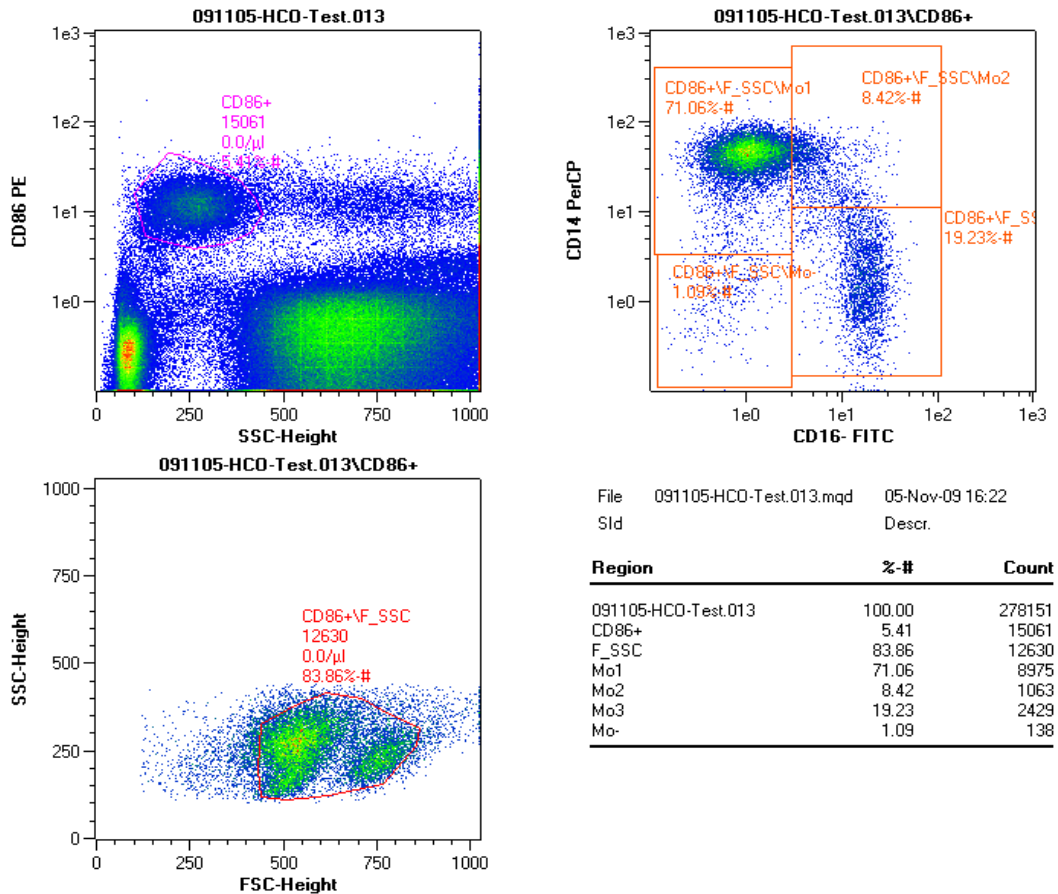


Abb.6: Veranschaulichung zum Gating der Monozyten (Screenshot aus dem Programm MACS Quantify 2.0). Panel 1 links oben zeigt das Gating der CD86 positiven Zellen, Panel 2 links unten zeigt das Gating der Gesamtmonozyten durch die Parameter FSC/SSC, Panel 3 rechts oben zeigt die Unterteilung der Monozyten in ihre 3 Subgruppen, die Tabelle rechts unten zeigt die prozentuale Aufteilung und die Absolutzahlen der Monozytensubgruppen.

Zum Ausschluss von CD 14, CD 16 doppelt-negativen Zellen wurden alle Counts, die sich in den definierten Mo1 bis Mo3 Gates befanden, addiert und als Mo Absolut definiert. Mittels dieser absolut gemessenen Monozytenzahl wurden die relativen Frequenzen (P-Mo1, P-Mo2 und P-Mo3 in %) neu berechnet.

Zur Berechnung der absoluten Monozytensubpopulationzellzahl wurden die berechneten relativen Frequenzen (P-Mo1,P-Mo2,P-Mo3) in Bezug zur absoluten Monozytenzahl der Patienten gesetzt.

Auswertung der CD 143 – Expression auf den Monozytensubpopulationen

Die Monozyten wurden hierbei über ihre CD 14 Expression (high bis intermediate Expression) erfasst. Dabei geht innerhalb der Subgruppe Mo3 eine Fraktion an Zellen (CD14+[schwachpositiv], CD16++) verloren. Dies ist jedoch bei der CD143 Analyse vernachlässigbar, da Mo3 nur äußerst schwach beziehungsweise gar nicht CD143 exprimieren. In der Abbildung 7 sieht man die Subpopulationen nach Einsetzen der Gatingfenster.

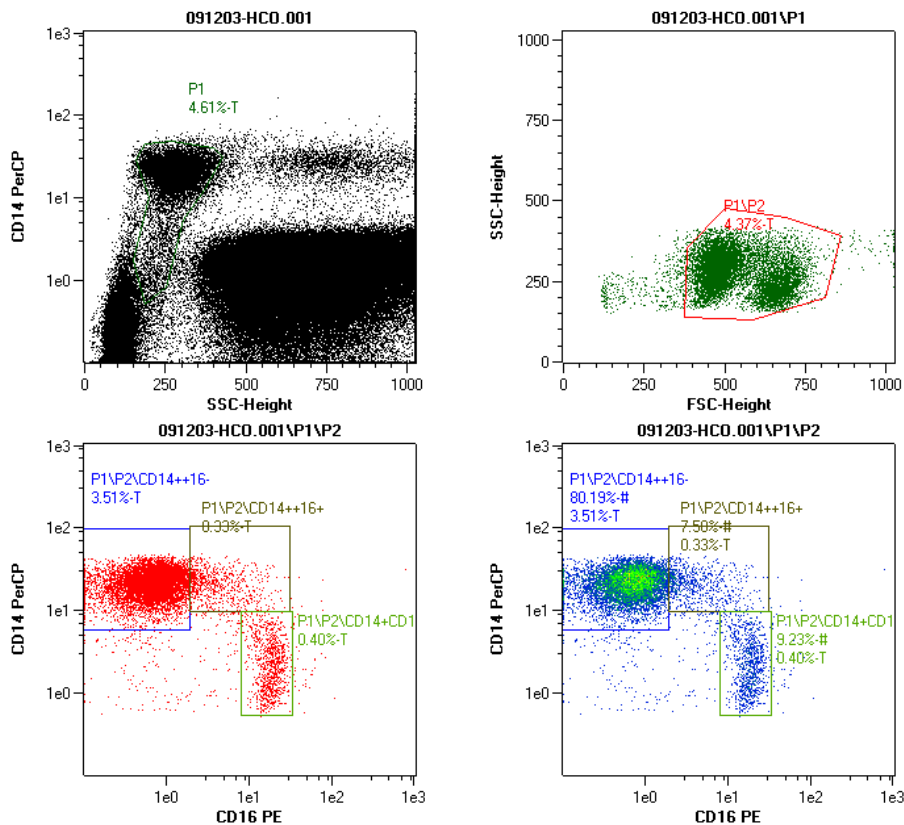
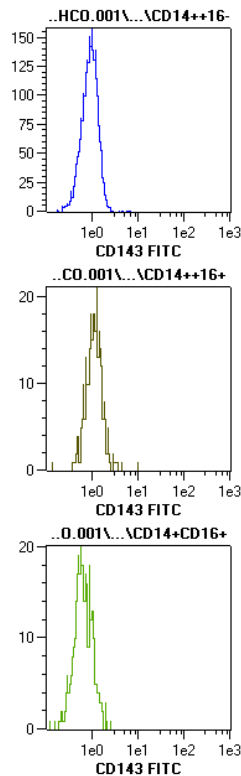


Abb. 7: Veranschaulichung des Gatings CD14 positiver Zellen (Screenshot aus dem Programm MACS Quantify 2.0). Panel 1 links oben zeigt das Gating der CD 14 positiven Zellen versus Granularität, Panel 3 rechts oben zeigt das Gating nach Größe und Granularität (FSC/SSC), Panel 2 und 4 (beide unten) zeigen das Gating der 3 Monozytensubpopulationen in unterschiedlichen Darstellungsformen zur besseren Differenzierbarkeit anhand der CD14 und CD16 Expression.

Nach dem eben beschriebenen Gating erfolgte die Messung der MFI (Mediane Fluoreszenzintensität) von CD 143 auf den 3 Monozytensubpopulationen. Die Abbildung 8 veranschaulicht exemplarisch das Ergebnis einer Messung der oben gegateten Subpopulationen.



Region	%-#	%-T	Count	CD143 FITC Median
091203-HCO.001	100.00	100.00	218418	0.46
CD14++16-	80.19	3.51	7658	0.88

Region	%-#	%-T	Count	CD143 FITC Median
091203-HCO.001	100.00	100.00	218418	0.46
CD14++16+	7.58	0.33	724	1.08

Region	%-#	%-T	Count	CD143 FITC Median
091203-HCO.001	100.00	100.00	218418	0.46
CD14+CD16+	9.23	0.40	881	0.61

Abb. 8: MFI-Messung auf CD143 von Mo1, Mo2 und Mo3 (Screenshot aus dem Programm MACS Quantify 2.0). Panel 1 ganz oben zeigt die Fluoreszenzintensizität bei Mo1, Panel 2 zeigt die Fluoreszenzintensizität bei Mo2 und Panel 3 zeigt die Fluoreszenzintensizität bei Mo3.

Um die Qualität der Messung zu gewährleisten wurden an jedem Messtag Spherobeadmessungen (Sphero Rainbow Calibrite Beads 6-6,4 µm, BD Biosciences) durchgeführt. Die Spherobeadlösung enthielt 6 Beads mit unterschiedlichen Fluoreszenzexpressionsniveaus und zeigte eventuelle Veränderungen der Laserleistung an. Da diese Messungen sehr stabil waren, wurde auf eine lineare Regressionsanalyse verzichtet und stattdessen ein relativer Korrekturfaktor über alle Fluoreszenzintensitäten ermittelt. Dieser bezog sich auf die jeweils ersten Messungen der 3 Studienabschnitte.

3.7 ELISA-Messungen

Der Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ist ein direkter Bindungstest für Antikörper oder Antigene. Er gehört wie der Radioimmune Assay (RIA) zur Gruppe der Immunassay-Verfahren, allerdings ohne radioaktive Markierung des Antikörpers (Janeway et al., 2002b). Er eignet sich zum Nachweis bestimmter Antigene, beziehungsweise deren Antikörper in Körperflüssigkeiten. Er findet somit zum Beispiel Anwendung beim HIV-

Suchtest (Waheed et al., 2013) oder wie in dieser Arbeit zur quantitativen Bestimmung von IL-1, IL-10 und TNF-alpha.

3.7.1 Funktionsweise

Nachdem das Antigen an den Capture-Antikörper der Festphase gebunden wurde, wird der primäre Antikörper hinzugegeben. Nun folgt das Abwaschen der überschüssigen Antikörper. Aufgrund von Kopplung eines Enzyms an die primären Antikörper (z.B. Peroxidase) folgt nach Zugabe einer Testsubstanz die Umwandlung in ein farbiges Substrat. Die Stärke der farbigen Umwandlung und somit die Konzentration des zu bestimmenden Antigens, wird mit einem Photometer bestimmt. Um Antigene an die Festphase zu binden, wurden Antikörper eingesetzt, welche bereits an die Festphase gebunden sind und an ein anderes Epitop binden als der primäre Antikörper (Kaufmann, 2004). Abbildung 9 veranschaulicht das Prinzip.

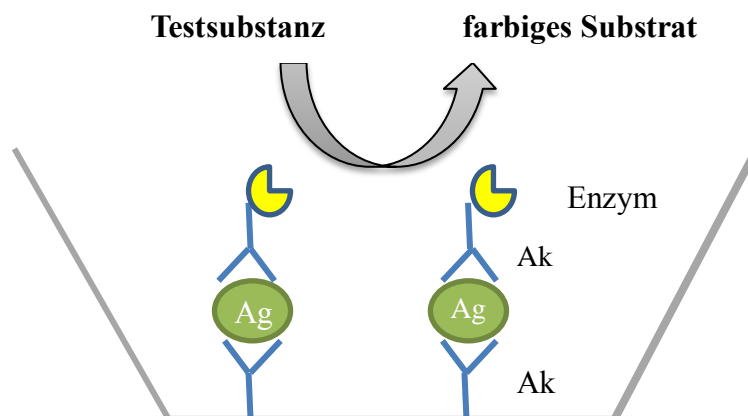


Abb. 9: Schema eines ELISA (Ag=Antigen, AK=Antikörper)

3.7.2 Arbeitsmaterial, Chemikalien und Arbeitsschritte

Bei allen Schritten war es wichtig einen Mundschutz und Handschuhe zu tragen, damit keine alkalische Phosphatase aus dem Speichel die Enzymaktivität verfälscht.

Geräte

- Kreisschüttler Varishaker, Dynatech Denkendorf
- FACS-Röhrchen
- Vortexer (Q1, VWR Darmstadt)
- Pipettiergeräte inklusive Aufsätze (Hirschmann Laborgeräte Eberstadt)

Interleukin-1 Messung

Messkit Quantikine HS Human IL-1ra/IL-1F3 ELISA, R&D Systems Wiesbaden-Nordenstadt beinhaltet:

- Waschpuffer 21ml
- Kalibrierlösung RD6-3 Fertiglösung 21ml
- Assay Verdünnung RD1-S Fertiglösung 11ml
- Reagenz A 12,5ml (Hydrogenperoxid)
- Reagenz B 12,5ml (Tetramethylbenzidine)
- IL-1ra Standard 20ng
- Konjugat Fertiglösung 21ml (polyklonale Antikörper gegen IL-1RA konjugiert mit Peroxidase)
- Stopp-Lösung Fertiglösung 6ml (Schwefelsäure)
- IL-1RA Mikropplatten, 96 Well (12x8), mit monoklonalen Antikörpern gegen IL-1ra beschichtet
- Klebefolien

Vorbereitung:

Die zu messenden Proben SI wurden aufgetaut, gevortext und auf Eis gelagert.

Nun wurden 20 ml Waschpuffer-Konzentrat mit destilliertem Wasser auf 500ml verdünnt. 15 min. vor Verwendung wurde Reagenz A und B zu gleichen Teilen gemischt, gründlich gevortext und dunkel gelagert (=Substratlösung).

IL-1ra Standard wurde in 1ml Aqua injectabilia aufgelöst (20000 pg/ml). Anschließend wurde die Stammlösung 15 Minuten bei leichter Bewegung durch den Varishaker gelagert.

Nun wurde die Verdünnungsreihe aus 900 µl Kalibrierlösung RD6-3 zu 100 µl IL-1ra Standard/Wasser Gemisch (= 2000pg) im ersten FACS-Röhrchen begonnen. In 6 weiteren FACS-Röhrchen wurde so verdünnt, das 1000pg, 500pg, 250pg, 125pg, 62,5pg und 31,2pg IL-1ra vorhanden war. Zusätzlich wurde eine Leerkontrolle angesetzt.

Durchführung:

Jedem Well wurde 100 µl Assay Verdünnung RD1S hinzugefügt. Anschließend wurden 100 µl der Standardverdünnungen (in 2-facher Ausführung als interne Kontrolle) und der Proben in jeweils andere Wells, nach vorher festgelegter Platzzuweisung, pipettiert. Die Well-Platte wurde mit Folie abgedeckt und 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgten 4 Waschdurchgänge (Flüssigkeit durch Umkippen und leichtes Beklopfen der Platte entfernt und Wells mit je 400 µl Waschpuffer gefüllt, welche dann wieder zu entfernen war). Anschließend wurden 200 µl der Konjugatlösung in jedes Well gefüllt. Diese wurden mit Folie abgedeckt und 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nun folgten wieder 4 Waschdurchgänge, um ungebundene Antikörper zu entfernen. In jedes Well wurde jetzt 200 µl Substratlösung (Reagenz A+B) pipettiert, die Platte mit Folie abgedeckt und 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Zuletzt wurde 50 µl Stopp-Lösung in jedes Well pipettiert.

TNF-alpha Messung

Messkit Quantikine HS Human TNF-alpha ELISA (High-sensitivity), R&D Systems
Wiesbaden-Nordenstadt beinhaltet:

- TNF-alpha Mikroplatten, 96 Well (12x8), mit monoklonalen Antikörpern gegen TNF-alpha beschichtet
- TNF-alpha Konjugat 21ml, polyklonale Antikörper gegen TNF-alpha mit alkalischer Phosphatase konjugiert
- TNF-alpha Standard (32pg/ml im Gemisch mit Kalibrierlösung)
- Assay Verdünner RD1F, 6ml
- Kalibrierlösung RD6-13, 21ml
- Waschpufferkonzentrat 100ml
- Substrat: lyophilisiertes NADPH mit Stabilisator
- Substrat Verdünnung 7ml
- Verstärker: lyophilisiertes Verstärkerenzym mit Stabilisator
- Verstärker Verdünnung 7ml
- Stopp-Lösung, 6ml (Schwefelsäure)
- Klebefolien

Vorbereitung:

Die zu messenden Proben SI wurden aufgetaut, gevortext und auf Eis gelagert. Nun wurden 100ml Waschpuffer-Konzentrat mit Aqua dest. auf 1000ml verdünnt. Dann wurde 15 min. vor Verwendung lyophilisiertes Substrat in 6 ml Substrat-Verdünnung aufgelöst und gevortext. Das gleiche geschah mit der Verstärkerlösung. Anschließend wurde TNF-alpha Standard mit der Kalibrierlösung gemischt und bei leichter Bewegung 15 min. im Varishaker gelagert. Zuletzt wurde die Verdünnungsreihe hergestellt. Hierbei wurden 7 FACS-Röhrchen mit je 750 µl Kalibrierlösung gefüllt. Dann wurden immer 750 µl, begonnen bei der Stammlösung, weiterpipettiert. So entstanden die Verdünnungen von 32 pg/ml Stammlösung über 16, 8, 4, 2, 1, 0,5 pg/ml und 0 pg/ml (als Leerkontrolle).

Durchführung:

Zu jedem Well wurden 50 µl Assay Verdünnung RD1F hinzugefügt. Dann wurden 200 µl der Verdünnungsreihe (in 2 facher Ausführung als interne Kontrolle) und der Proben gemäß eines Platzplanes in die Wells pipettiert, die Platte mit Folie abgedeckt und 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nun erfolgten wie oben beschrieben 4 Waschdurchgänge. Anschließend wurden 200 µl TNF-alpha Konjugat in jedes Well gefüllt, die Platte mit Folie abgedeckt und 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nun erfolgten wieder 4 Waschdurchgänge. Danach wurde 50 µl Substratlösung in jedes Well gefüllt, die Platte mit Folie abgedeckt und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem 50 µl Verstärker-Lösung jedem Well hinzugegeben wurde und diese 30 min. bei Raumtemperatur inkubiert wurde, folgte die Hinzugabe von 50 µl Stopp-Lösung in jedes Well.

Interleukin -10 Messung

Messkit eBioscience Human IL-10 ELISA (High-sensitivity), eBioscience San Diego beinhaltet:

- Mikrowell-Platte (beschichtet mit monoklonalen Antikörpern gegen IL-10)
- Biotin – Konjugat 100 µl (monoklonale Antikörper gegen IL-.10)
- Streptavidin – HRP 150 µl
- IL-10 Standard lyophilisiert 400pg/ml
- Lyophilisierte Kontrolle
- Assay-Puffer Konzentrat (PBS mit 1% Tween 20 und 10% BSA) 5ml
- Verstärker Konzentrat 7ml
- Verstärker Reagenz I 2x75 µl (1:100 verdünnen)
- Verstärker Reagenz II 2x15 µl (1:5000 verdünnen)

- Waschpuffer Konzentrat (PBS mit 1% Tween 20) 50ml
- Substratlösung (Tetramethylbenzidine) 15ml
- Stopp-Lösung (1M Phosphorsäure) 15ml
- Klebefolien

Vorbereitung:

Die zu messenden Proben SI wurden aufgetaut, gevortext und auf Eis gelagert.

Dann wurde 50ml Waschpuffer-Konzentrat mit Aqua dest. auf 1000 ml verdünnt. Weiterhin wurde 5 ml Assay-Puffer Konzentrat mit Aqua dest. auf 100 ml verdünnt. Die benötigte Menge Biotin-Konjugat (0,06 ml pro 5,94 ml Puffer) und Streptavidin-HRP (0,06 ml pro 11,94 ml Puffer) wurde jeweils in Assay Puffer gelöst. Anschließend wurde IL-10 Standard im Verhältnis 1:8 mit Assay-Puffer verdünnt, so dass sich eine Stammlösung mit 50 pg/ml ergab. Nun wurde eine Verdünnungsreihe in 8 FACS-Röhrchen hergestellt (25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,562, 0,78, 0,39 pg und 0 pg (reiner Assaypuffer)).

Anschließend wurde die benötigte Menge Verstärker-Konzentrat im Verhältnis 1:1 in Aqua dest. verdünnt. Kurz vor Gebrauch wurde die benötigte Menge Verstärker-Reagenz I (0,12 ml pro 11,88 ml Lösung) in Verstärkerlösung und die Verstärker-Reagenz II (0,024 ml pro 11,976 ml Puffer) in Assay-Puffer gelöst.

Durchführung:

In 2 x 8 Wells wurden je 100 µl der IL-10 Standard Verdünnungsreihe inklusive der Leerprobe (reiner Assaypuffer) pipettiert. In die anderen Wells wurden 50 µl Assay-Puffer und 50 µl Probe hinzugegeben. Nun wurde in alle Wells 50 µl Biotinkonjugat hinzupipettiert.

Die Platte wurde mit Folie abgedeckt und 2 Stunden auf dem Varishaker bei Raumtemperatur geschüttelt. Nun folgten, wie oben schon beschrieben, 6 Waschdurchgänge. Anschließend wurde 100 µl Streptavidin-HRP auf alle Wells pipettiert. Nachdem die Platte wieder mit Folie geschützt wurde, wurde sie bei Raumtemperatur eine Stunde wie oben erwähnt geschüttelt.

Nach weiteren 6 Waschdurchgängen wurde 100 µl Verstärkerlösung I auf alle Wells pipettiert. Nachdem die Platte weitere 15min. geschüttelt wurde, folgten wieder 6 Waschdurchgänge und es wurden 100 µl der Verstärkerlösung II auf alle Wells gegeben. Nun folgte ein letzter 30 minütiger Schüttelprozess und weitere 6 Waschungen. Zuletzt wurden 100 µl Substratlösung auf alle Wells pipettiert, die Platte mit Folie bedeckt, 10 min. bei Raumtemperatur inkubiert und 100 µl Stopp-Lösung pro Well hinzugegeben.

3.7.3 Analyse und Auswertung

Nach erfolgreicher Versuchsdurchführung würden die 96-Well Platten im ELISA-Reader innerhalb von 30 min. bei 450nm (IL-1, IL-10) bzw. 490nm (TNF-alpha), (teilweise gegen spezielle Referenzwellenlängen) über die optische Dichte ausgewertet. Anhand von standardisierten Eichkurven wurden die realen Werte durch Regressionsanalysen mittel der Software GraphPad Prism 5, California ermittelt.

3.8 Statistik

Die HCO-Studie ist als Pilotstudie geplant worden und wurde aufgrund des hohen zeitlichen und technischen Aufwandes und der strengen Ein- und Ausschlusskriterien an einem kleinen Patientenkollektiv durchgeführt.

Die Studie sollte zunächst einmal untersuchen, ob überhaupt ein positiver Effekt durch die 2-wöchige Anwendung der HCO-Membran bezüglich der Inflammation erreichbar ist. Das Verhalten des Serumalbumins über den Studienzeitraum sollte zeigen, wie lange die HCO-Membran kontinuierlich einsetzbar ist oder in welcher Frequenz sie phasenweise mit Routinemembranen verwendet werden kann.

Aufgrund dieser Rahmenbedingungen wurde auf eine förmliche Fallzahlschätzung verzichtet. Die statistische Auswertung wurde in Zusammenarbeit mit dem Koordinierungszentrum für klinische Studien Halle (KKSH) durchgeführt.

Die gemessenen Daten wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben und mittels gemischten linearen Modell in IBM Statistics SPSS Version 19 ausgewertet.

Hier wurden die Zielgrößen (z.B. CRP zu Beginn und zum Ende einer 2 wöchigen Behandlungsphase mit der HCO-Membran) und der Membrantyp als feste Effekte gewertet. Die Variable Patient wurde als zufällige Variable einbezogen. Die Kt/V-Werte wurden durch wiederholte Varianzanalyse (One-Way ANOVA) und durch Dunn's multiplen Vergleich (postHoc) ausgewertet.

Daten, die nicht normalverteilt waren, wurden vor der Auswertung logarithmiert.

Relevante Ausgabegrößen waren der Effektschätzer mit 95% Konfidenzintervall und der zugehörige p-Wert. Das Signifikanzniveau von p wurde mit $<0,05$ festgelegt.

Die Datenverteilung zu Beginn und Ende jeder Studienphase inklusive Nachbeobachtungsphase, für jede Gruppe bzw. Membran veranschaulichen Boxplots mit teils logarithmischer Ordinatenachse.

Es wurde zusätzlich durch ein linear gemischtes Modell untersucht, ob die zeitliche Abfolge, welche Studienmembran im Rahmen der Randomisierung zuerst verwendet wurde, einen Einfluss auf das Ergebnis hat.

4. Ergebnisse

4.1 Patientendemographie

In die Studie wurden 19 Patienten eingeschlossen. Alle Patienten wurden hinsichtlich der Sicherheit der Behandlung ausgewertet (Sicherheitspopulation). Aufgrund des verfrühten Ausscheidens von 2 Patienten (1 je Gruppe durch Pneumonie und Shuntthrombose) konnten hinsichtlich des Behandlungseffekts nur 17 statt anfänglich 19 Patienten ausgewertet werden (Auswertungspopulation). Dies waren 11 Männer und 6 Frauen im Alter von 47 bis 83 Jahren (MW= 68,1 ± 10,9 Jahre). Diese Patienten waren durchschnittlich seit 3,7 ± 2,8 Jahren dialysepflichtig. Die durchschnittliche Dialysezeit pro Sitzung je Patienten vor Studienbeginn betrug 264.6 ± 22.2 Minuten. Unter den Patienten waren 9 Diabetiker, 10 ehemalige Raucher, 2 Raucher und 5 Nichtraucher. Die gruppenspezifische Aufteilung des gesamten Patientenkollektives nach Geschlecht, Alter, Dialysedauer, renaler Grunderkrankung, Diabetes mellitus, Rauchstatus und kardiovaskulärem Vorereignis zeigt Tabelle 4.

Tabelle 4: Patientencharakteristik

	Gruppe AB n=10	Gruppe BA n=9	Total n=19
Männlich	8	5	13
Weiblich	2	4	6
Alter MW ± SA in Jahren	67,0±10,0	71,6±11,9	68,2±10,9
Dialysepflichtig seit MW ± SA in Jahren	2,48±1,85	5,37±2,66	3,85±2,66
Diabetische Nephropathie	3	3	6
Glomerulonephritis	1	0	1
Zystennieren	0	1	1
Postrenaler Reflux	0	3	3
Hypertonie/Glomerulosklerose	5	1	6
Unklar/Schrumpfnieren	1	1	2
Diabetes mellitus (nicht insulinpflichtig)	0	3	3
Diabetes mellitus (insulinpflichtig)	4	2	6
Aktuelle Raucher	2	0	2
Ehemalige Raucher	8	6	14

	Gruppe AB n=10	Gruppe BA n=9	Total n=19
Nichtraucher	2	3	5
Herzinfarkt in Anamnese	3	4	7
Schlaganfall in Anamnese (Symptomatik > 24h)	3	1	4
Luftnot nein	5	5	10
NYHA II	3	1	4
NYHA III	0	3	3
NYHA IV	1	1	2
Angina pectoris nein	7	9	16
CCS II	2	0	2
CCS III	0	0	0
CCS IV	1	0	1
pAVK nein	6	5	11
IIa	2	0	2
IIb	2	2	4
III	0	2	2
Z.n. Amputation	1	1	2
Positive Anamnese Herzinfarkt oder Schlaganfall bei Eltern v. 65Lj	3	1	4
Positive Anamnese Herzinfarkt oder Schlaganfall bei Geschwistern v. 65 Lj	1	2	3
Z.n. PTCA Herz	3	4	7
Z.n. Bypass Herz	3	0	3
Z.n. A. carotis Intervention	2	1	3
Z.n. PTCA Becken-/ Beingefäße	0	1	1
Z.n. Bypass Becken-/Beingefäße	2	2	4

4.2 Einfluss der Reihenfolge der Studienphasen im Crossover-Design

Mittels linear gemischtem Modell wurde vom KKS untersucht, ob die zeitliche Abfolge, welche Studienmembran im Rahmen der Randomisierung zuerst verwendet wurde, einen Einfluss auf das Ergebnis hat. Hierbei zeigte sich bei keinem der gemessenen Parameter ein Einfluss ($p=0,46 - 0,81$).

4.3 Beeinflussung der Inflammation

4.3.1 Effekte auf proinflammatorische Mediatoren

Die Behandlung mit der HCO-Membran zeigte keine signifikante Änderung der Entzündungsmarker. CRP, Interleukin-1, Interleukin-6 und TNF-alpha zeigten weder eine signifikante Senkung noch einen Anstieg im Plasmaspiegel. Tabelle 5 gibt eine zusammenfassende Übersicht der gemessenen Werte in den wichtigsten Studienphasen. Trotz des Crossover-Designs wurden die Ergebnisse der Studienphasen gemäß der verabreichten Behandlung zwecks einer besseren Übersichtlichkeit zusammengefasst.

Tabelle 5: Effekte auf proinflammatorische Mediatoren.

	St HD	Nach 6xHF	NBP/ AWP HF	St HD	Nach 6xHCO	NBP/ AWP HCO	*
CRP (mg/L)	16,4±17,9	14,0±9,4	20,5±18,5	18,3± 19,3	30,9±67,8	47,1±95,7	0,89
IL-1ra (pg/mL)	644±438	624±411	654±400	579± 413	676±458	678±526	0,35
IL-6 (pg/mL)	10.1±7.1	8.5±5.5	13,8±18,2	13.8± 18.1	10.9±10.5	33,6±72,6	0,67
TNF-α (pg/mL)	3.5±1.6	3.0±0.9	3,6±0,9	3.5± 1.1	3.3±1.2	3,3±1,0	0,45

* (Signifikanz $p=$ für Änderung nach 6x HCO zu Standard HD), St = Standard, NBP/AWP = Nachbeobachtungsphase/Auswaschphase

4.3.2 Effekte auf antiinflammatorische Zytokine

Interleukin-10

Auch hier zeigte sich keine signifikante Änderung.

Tabelle 6: Effekte auf IL-10.

	St HD	Nach 6xHF	NBP/ AWP HF	St HD	Nach 6xHCO	NBP/ AWP HCO	*
IL-10 (pg/mL)	0,7±0,6	0,6±0,3	0,7±0,7	0,6±0,5	0,6±0,6	0,7±0,6	0,96

* (Signifikanz p= für Änderung nach 6x HCO zu Standard HD), St = Standard, NBP/AWP = Nachbeobachtungsphase/Auswaschphase

4.3.3 Effekte auf Monozytensubpopulationen und deren ACE-Expression

Sowohl die CD14⁺⁺, CD16⁻ Monozyten (Mo1), die CD14⁺⁺, CD16⁺ Monozyten (Mo2) und auch die CD14⁺, CD16⁺⁺ Monozyten (Mo3) zeigten keine signifikante Änderung, was die prozentuale Verteilung untereinander und den ACE-Besatz betraf.

Tabelle 7: Effekte auf Monozytensubpopulationen und deren ACE-Besatz

	St HD	Nach 6xHF	NBP/ AWP HF	St HD	Nach 6xHCO	NBP/ AWP HCO	*
Mo1 (Zellen/μL)	973 \pm 390	956 \pm 425	897 \pm 409	871 \pm 310	851 \pm 499	975 \pm 429	0,76
Mo2 (Zellen/μL)	158 \pm 119	152 \pm 105	188 \pm 126	159 \pm 85	178 \pm 148	179 \pm 100	0,69
Mo3 (Zellen/μL)	242 \pm 202	230 \pm 145	236 \pm 163	243 \pm 159	214 \pm 130	259 \pm 207	0,38
Mo gesamt (Zellen/μL)	9588 \pm 2240	10156 \pm 2271	9456 \pm 1939	10946 \pm 3542	9383 \pm 2452	9052 \pm 2790	0,12
Mo1 (%)	73,1 \pm 10,0	70,6 \pm 10,3	68,2 \pm 9,8	69,1 \pm 9,6	68,3 \pm 7,9	70,5 \pm 9,7	0,67
Mo2 (%)	10,7 \pm 4,5	11,5 \pm 4,7	13,9 \pm 5,0	12,2 \pm 4,0	13,3 \pm 3,9	12,7 \pm 4,0	0,41
Mo3 (%)	16,2 \pm 7,7	17,9 \pm 9,0	17,9 \pm 7,6	18,7 \pm 7,4	17,7 \pm 7,1	17,3 \pm 9,1	0,45
ACE Mo1 (MFI)	17,0 \pm 10,4	14,6 \pm 6,3	17,0 \pm 10,8	15,6 \pm 6,1	16,1 \pm 10,0	19,7 \pm 16,0	0,58
ACE Mo2 (MFI)	20,6 \pm 10,8	18,9 \pm 7,7	21,6 \pm 12,6	19,8 \pm 7,6	20,1 \pm 11,4	23,9 \pm 17,8	0,76
ACE Mo3 (MFI)	12,5 \pm 5,1	12,0 \pm 5,4	14,5 \pm 10,5	11,2 \pm 3,8	12,1 \pm 5,5	15,8 \pm 14,2	0,23

* (Signifikanz p= für Änderung nach 6x HCO zu Standard HD), St = Standard, NBP/AWP = Nachbeobachtungsphase/Auswaschphase

Allerdings zeigte sich in der Wash-out Phase nach Behandlung mit der HCO-Membran ein signifikanter Anstieg der Absolutzahlen der Mo1-Subpopulation von 851 \pm 499 zu 975 \pm 429 (p= 0,029, 95% CI log= 0,009 bis 0,143).

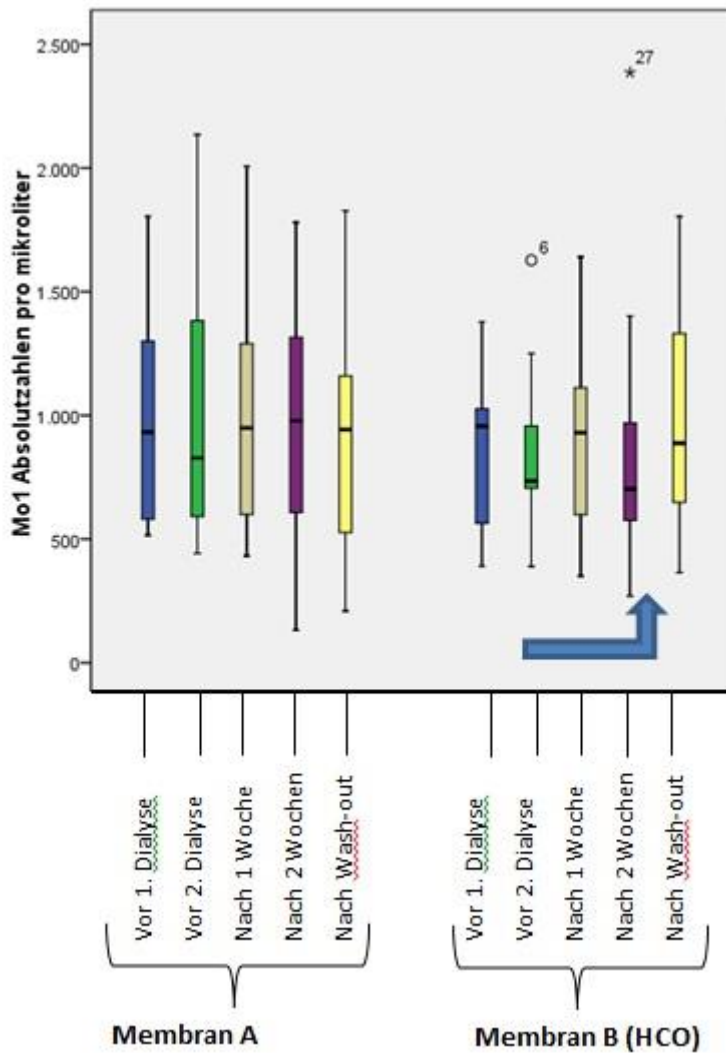


Abb. 10: Boxplot zur Veranschaulichung der Entwicklung der Mo1-Absolutzahlen. Der blaue Pfeil kennzeichnet den signifikanten Anstieg der Mo1 nach Behandlung mit der HCO-Membran.

4.4 Albuminverluste

Für den Albuminspiegel zeigte sich unter der Behandlung mit der HCO-Membran eine signifikante Absenkung. Mit dem Effektschätzer wurde ein Verlust von - 4,10 g/L bei einem 95% Konfidenzintervall von - 6,1 g/L bis - 2,09 g/L und einem p-Wert von 0,0006 errechnet.

Bei der Polyflux 11s Membran zeigte sich keine signifikante Absenkung ($33,6 \pm 3,3$ g/L zu $33,4 \pm 4,2$ g/L). Bei der HCO-Membran fiel der Albuminwert von $34,1 \pm 2,7$ auf $29,6 \pm 3,0$.

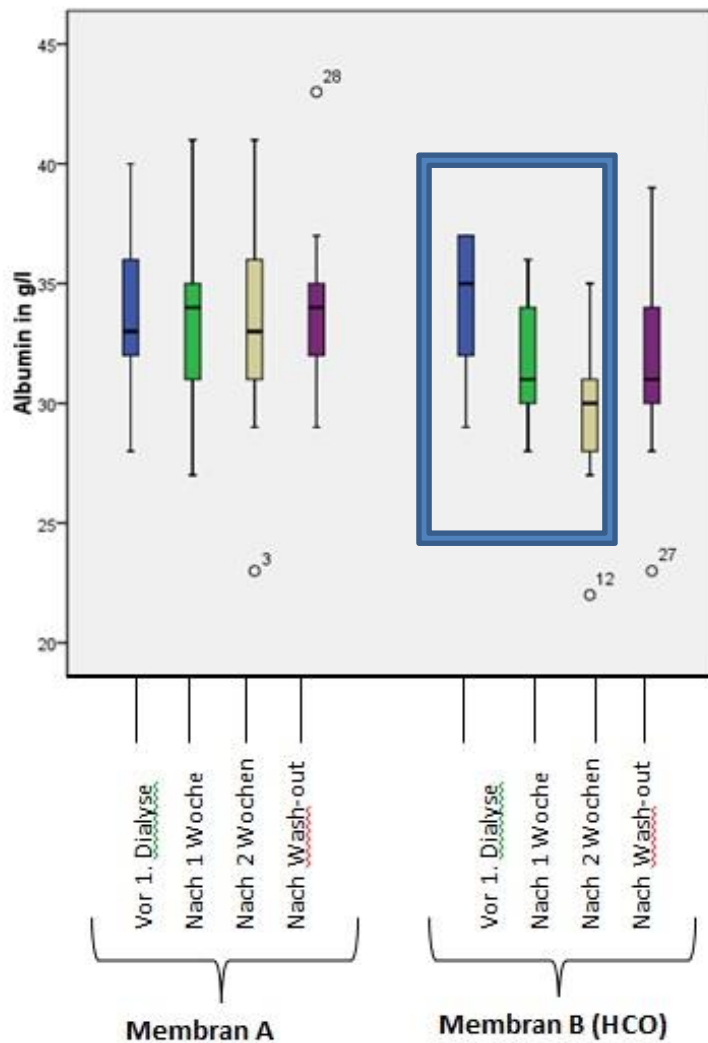


Abb. 11: Boxplot zur Veranschaulichung der Entwicklung der Albuminwerte unter Behandlung mit der HCO-Membran (mit blauem Rahmen markiert).

Insgesamt hatten unter der HCO-Membran 2 Patienten einen Albuminabfall von >20% nach 6 Dialysen. Bei der Kontrollmembran betraf dies nur einen Patienten. Eine Albuminsubstitution war jedoch zu keinen Zeitpunkt nötig.

4.5 Cholinesterase

Tabelle 8: Effekte auf die Cholinesterase

	St HD	Nach 6xHF	NBP/ AWP HF	St HD	Nach 6xHCO	NBP/ AWP HCO	*
CHE ($\mu\text{mol/L/s}$)	141,4 \pm 32,6	138,1 \pm 36,9	140,4 \pm 38,3	143,3 \pm 40,2	148,5 \pm 38,6	136,8 \pm 37,6	0,066

* (Signifikanz $p=$ für Änderung nach 6x HCO zu Standard HD), St = Standard, NBP/AWP = Nachbeobachtungsphase/Auswaschphase

Der Anstieg in der HCO-Phase ($p= 0,066$, 95% CI $\log= -0,002$ bis $0,065$) zeigte sich annähernd signifikant. Der Abfall in der Nachbeobachtungsphase nach HCO-Membran Behandlung war signifikant ($p= 0,026$, 95% CI $\log= -0,086$ bis $-0,006$).

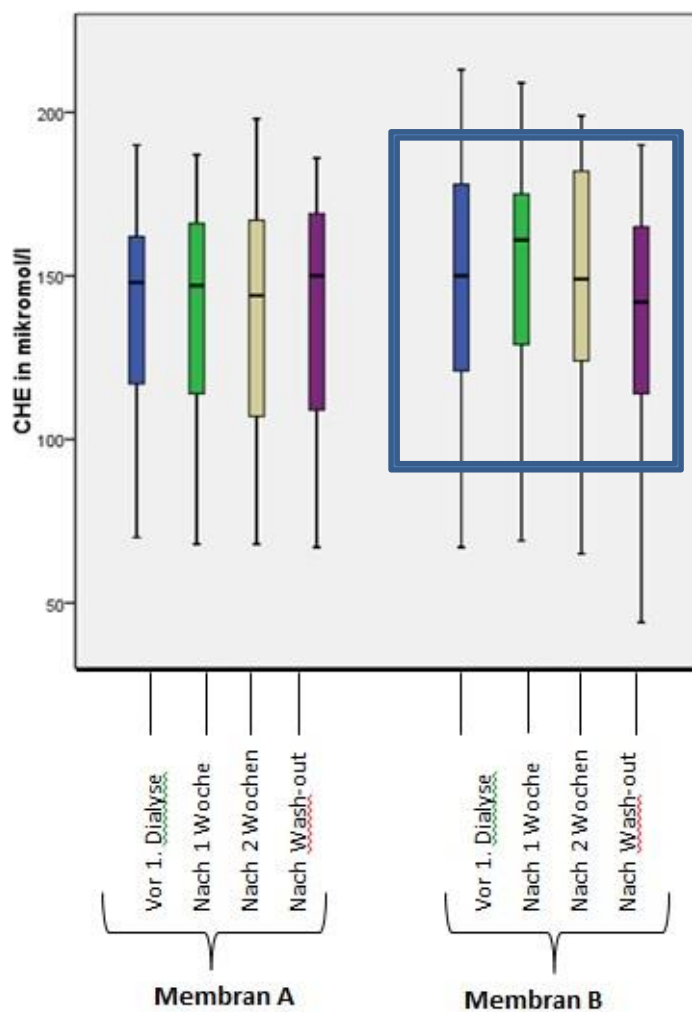


Abb. 12: Boxplot zur Veranschaulichung der Entwicklung der Cholinesterase unter Verwendung der HCO-Membran (durch blauen Rahmen markiert).

4.6 Patientensicherheit

Anhand von CRF-Bögen wurden die Patienten zu den geplanten Studienvisiten gezielt nach Beschwerden befragt, die detailliert protokolliert wurden. Des Weiteren diente die unter im Anhang 1 beschriebene klinische Untersuchung und die Kontrolle der unter Punkt 3.4 fixierten paraklinischen Parameter (v.a. Albumin und Elektrolyte), durch einen unabhängigen Arzt, der Patientensicherheit.

Die nun folgenden Auswertungen beziehen sich auf alle 19 in die Studie aufgenommenen Patienten (sog. Sicherheitspopulation). Insgesamt gab es 3 schwere und 52 nicht-schwere unerwünschte Ereignisse. Es gaben 17 der 19 Patienten zumindest einmal Beschwerden an. Zwei schwere Zwischenfälle traten in Studienphase B auf (partielle und vollständige Shuntthrombose). Das dritte schwere Ereignis trat in Phase A auf (fiebrhafte Pneumonie). Der Patient mit der partiellen Shuntthrombose wurde chirurgisch erfolgreich behandelt und konnte somit, im Gegensatz zu den anderen beiden Patienten, die Studie fortsetzen. Ein Zusammenhang der schweren Zwischenfälle mit der HCO-Membran wurde nach eingehender Beratung der Studienärzte nicht angenommen.

Es gab 16 nicht-schwere Zwischenfälle in der Phase A und 36 Zwischenfälle der gleichen Kategorie in Phase B. Die häufigsten Beschwerden waren Schwindel und Hypotonie. Ein kausaler Zusammenhang der Zwischenfälle mit den Studienmembranen wurde, bis auf eine hypotone Blutdruckkrise, von den Studienärzten nicht gesehen.

Tabelle 9: Überblick über Beschwerden und Zwischenfälle.

Beschwerden	Unter Kontrollmembran + 15 Tage Nachbeobachtung n=19	Unter HCO Membran + 15 Tage Nachbeobachtung n=19
<u>Schwere</u>	1	2
Pneumonie	1	-
Partielle Shuntthrombose	-	1
Shuntthrombose	-	1
<u>Nicht-schwere</u>	16	36
Infektionen	4	4
Neurologische Symptome (v.a. Schwindel)	2	10
Kreislaufbeschwerden (v.a. Hypotonie)	0	6
Pulmonale Symptome	1	1
Dermatologische Symptome	1	0
Muskuläre Symptome	3	5
Dysurie	1	1
Andere	4	9

4.7 Dialyseeffektivität

Wie bereits im Studiendesign beschrieben wurde, verlängerten wir die Dialysezeit in der Studienphase A und B um 30min, da bei der kleineren Dialysatoroberfläche von 1,1m² eine weiterhin suffiziente Dialyseleistung erreicht werden musste. In der Wash-out und Nachbeobachtungsphase war dies nicht nötig, da hier ja wieder die herkömmliche Polyflux 170H Membran mit der größeren Oberfläche verwendet wurde.

Creatinin

Der Creatininwert zeigte keine signifikanten Änderungen in jeglicher Studienphase.

Tabelle 10: Effekte auf die Creatinin-Werte.

	St HD	Nach 6xHF	NBP/ AWP HF	St HD	Nach 6xHCO	NBP/ AWP HCO	*
Creatinin ($\mu\text{mol/L}$)	685,4 \pm 218,9	666,1 \pm 172,2	743,2 \pm 280,9	736,1 \pm 265,1	753,0 \pm 254,7	717,5 \pm 267,2	0,13

* (Signifikanz $p=$ für Änderung nach 6x HCO zu Standard HD), St = Standard, NBP/AWP = Nachbeobachtungsphase/Auswaschphase

Harnstoff

Tabelle 11: Effekte auf die Harnstoff-Werte.

	St HD	Nach 6xHF	NBP/ AWP HF	St HD	Nach 6xHCO	NBP/ AWP HCO	*
Harnstoff	16,3 \pm 4,7	17,1 \pm 4,4	18,1 \pm 5,9	18,2 \pm 5,1	18,0 \pm 4,9	16,1 \pm 4,5	0,99

* (Signifikanz $p=$ für Änderung nach 6x HCO zu Standard HD), St = Standard, NBP/AWP = Nachbeobachtungsphase/Auswaschphase

Bei den Harnstoffwerten zeigte sich eine signifikante Absenkung in der Wash-out Phase nach Behandlung mit der HCO-Membran von $18,0 \pm 4,9$ mmol/L zu $16,1 \pm 4,5$ mmol/L. Der Effektschätzer beträgt $- 2,36$ mmol/L und der p -Wert 0,018 (95% Konfidenzintervall: $- 4,24$ bis $- 0,48$ mmol/L). Folgendes Boxplot veranschaulicht dies.

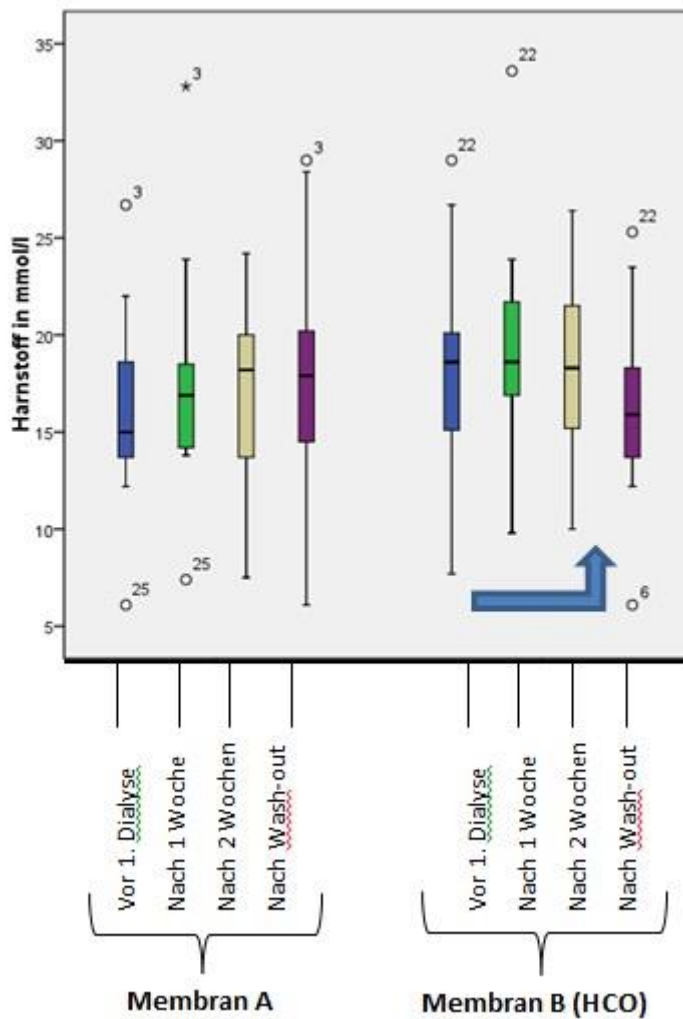


Abb. 13: Boxplot zur Veranschaulichung der Entwicklung der Harnstoff-Werte. Der blaue Pfeil kennzeichnet den signifikanten Harnstoffabfall nach Behandlung mit der HCO-Membran.

Kt/V-Werte

Als Maß für die Dialyseeffektivität ist der Kt/V-Wert gut dazu geeignet, die verwendeten Dialysemembranen hinsichtlich ihrer Dialyseleistung zu vergleichen (Alayoud et al., 2012). Anhand der Daugirdas-Formel wurde der Kt/V-Wert aller Patienten anhand der gemessenen Werte vor und nach der ersten Dialyse der jeweiligen Studienphase errechnet und die Unterschiede auf Signifikanz geprüft.

Es wurde hierbei ein signifikant niedrigerer Kt/V-Wert unter der HCO-Membran ($1,21 \pm 0,31$) als unter der Kontrollmembran (Polyflux 11s), ($1,59 \pm 0,42$) mit $p < 0,001$ gemessen.

4.8 Beta-2-Mikroglobulin

Es zeigten sich keine signifikanten Änderungen während der Studienphasen.

Tabelle 12: Effekte auf β -2-M.

	St HD	Nach 6xHF	NBP/ AWP HF	St HD	Nach 6xHCO	NBP/ AWP HCO	*
Beta-2-Mikroglobulin (mg/L)	18,2±7,5	18,7± 8,7	20,5±6,8	18,4±6,3	19,4±7,4	20,0±7,7	0,68

* (Signifikanz p= für Änderung nach 6x HCO zu Standard HD), St = Standard, NBP/AWP = Nachbeobachtungsphase/Auswaschphase

4.9 Dialysatmessung

Deutliche Mengen an Proteinen, welche das Immunsystem beeinflussen, konnten aus dem Blutkreislauf mit der HCO-Membran entfernt werden.

Tabelle 13: Ergebnisse der Dialysatmessung. Die Tabelle zeigt die nachweisbare Menge einiger eliminiertes Substanzen des Dialysats.

	Polyflux 11s	HCO
Gesamtprotein (g)	0,19	11,04
Albumin (g)	0,17	9,02
Kappa-Leichtketten (mg)	4,4	552
Lambda-Leichtketten (mg)	6,75	154,5
Beta-2-Mikroglobulin (mg)	0,965	>11,92
IL-6 (ng)	n.w.	21,8
IL-1	n.w.	n.w.
IL-10	n.w.	n.w.
TNF-α	n.w.	n.w.
α1-Mikroglobulin (mg)	n.w.	378

n.w. = nicht nachweisbar gering

Wie sich auch paraklinisch bestätigte, wurden deutliche Mengen an Albumin herausgefiltert. Jedoch war auch eine höhere Filtrationsleistung bei den Leichtketten, dem Gesamtprotein, Beta-2-Mikroglobulin, α 1-Mikroglobulin und IL-6 nachweisbar. IL-1, IL-10 und TNF-alpha wurden auch hier nicht nachweislich eliminiert.

5. Diskussion

5.1 Interpretation der Ergebnisse

Wie bereits in der Einleitung ausführlich erklärt, trägt die chronische Mikroinflammation einen entscheidenden Teil zu dem erhöhten kardiovaskulärem Risiko bei Langzeitdialysepatienten bei. Eine Möglichkeit diese Inflammation einzudämmen, sahen wir in der Elimination von daran beteiligten Zytokinen und der Reduktion von proentzündlichen Monozytensubpopulationen durch die Verwendung einer neuartigen Membran mit einem höheren Cut-off-Wert.

5.1.1 Patientenverteilung

Aufgrund der geringen Patientenzahl waren 2 exakt gleichverteilte Gruppen bezüglich Alter, Geschlecht, Rauchstatus und bisheriger Dialysezeit durch Randomisation nicht gegeben. Da aber im Crossover-Design jeder Patient mit sich selbst als eigene Kontrolle verglichen wurde, war dies zweitrangig. Insgesamt waren mehr Männer als Frauen vorhanden (11 vs. 6). Es wurde bisher aber kein geschlechterspezifischer Einfluss auf eine mögliche Wirkung der HCO-Membran beschrieben.

5.1.2 Effekte auf inflammationsrelevante Mediatoren

Warum im Vergleich zu anderen Studien keines der gemessenen Zytokine signifikant gesenkt werden konnte, liegt vor allem an dem verwendeten Blutreinigungsverfahren und an den Messzeitpunkten.

In den prädialytischen Messungen lag der Beginn der letzten Dialyse mit der jeweiligen Studienmembran ca. 48 Stunden zurück. Es ist also möglich, dass etwaige Effekte der Dialyse in dieser Zeit kompensiert worden und somit nicht mehr nachweisbar waren. Im Studiendesign wurde sich jedoch gegen postdialytische Messungen entschieden, da rein postdialytisch veränderte Zytokinwerte keine nachhaltigen Effekte zeigen würden (Fiedler et al., 2012). Dass

die HCO-Membran rein technisch in der Lage ist, zumindest IL-6 nachweisbar zu entfernen, zeigte die einmalige Dialysatmessung. Warum IL-1 und IL-10 bei dieser Messung nicht nachweisbar eliminiert werden konnten, lag mit hoher Wahrscheinlichkeit an den deutlich geringeren Plasmaspiegeln dieser Zytokine. Zumindest der fehlende Eliminationsanstieg von IL-10 ist als positiv anzusehen, da ein Abfall dieses antiinflammatorisch wirksamen Zytokins nicht erwünscht ist.

Uchino et al. konnten in einer ex-vivo Studie zeigen, dass bei der Hämofiltration mit einer HCO-Membran eine deutliche Steigerung des Siebkoeffizienten bezüglich IL-1beta, IL-6, IL-8, IL-10, TNF-alpha und Albumin, in Vergleich zu herkömmlichen Membranen, möglich ist (Uchino et al., 2002a). Morgera et al. zeigten in einer anderen ex-vivo Studie, dass bei Hämofiltration mit der HCO-Membran im Vergleich zur Hämodialyse mit derselben Membran deutlich bessere Clearanceleistungen bezüglich IL-6 und TNF-alpha erreicht wurden. Allerdings hatte die Hämodialyse mit der HCO-Membran immer noch eine bessere Clearance dieser Zytokine als mit herkömmlichen Membranen. Bezüglich des niedrigeren Albuminverlustes war das Hämodialyseverfahren deutlich vorteilhafter. Aufgrund der hohen Albuminverluste bei Hämofiltration wurde auch das Hämodialyseverfahren für längere klinische Studien mit der HCO-Membran empfohlen (Morgera et al., 2003a, b). Dies war auch in unserer Studie der Grund, zunächst die Effekte und die Sicherheit der Membran unter dem Hämodialyseverfahren zu testen. In klinischer Anwendung zeigte Morgera et al. an 16 Sepsispatienten mit akuter Niereninsuffizienz, dass durch intermittierende Hämofiltration mit einer HCO-Membran eine deutliche Beeinflussung von IL-6 möglich war. Die Patienten wurden über 5 Tage jeden Tag 12 Stunden mit einer HCO-Membran hämofiltriert und es zeigte sich ein Siebkoeffizient für IL-6 nahe 1 inklusive einer signifikanten Plasmaabsenkung. Allerdings kam es zu keiner Änderung der Absolutwerte für IL-6 im Plasma am Ende der Behandlung. TNF-alpha konnte kaum nachweisbar eliminiert werden (Morgera et al., 2003b). In einer anderen klinisch experimentellen Studie bewies Morgera et al. nochmals, dass die HCO-Hämofiltration der Standard Hämofiltration bezüglich der IL-6 Clearance aber auch der IL-1RA Clearance überlegen war. Sogar kam es hierbei zu signifikanten Plasmaabsenkungen der eben genannten Zytokine (Morgera et al., 2006).

Die bereits in der Einleitung beschriebene Studie von Haase et al. zeigte, dass auch beim Hämodialyseverfahren mit der HCO-Membran eine signifikante Clearancesteigerung und Plasmaspiegelsenkung von IL-6 möglich ist. Allerdings wurde dies direkt nach der Dialyse gemessen und nicht, wie bei der hier vorliegenden Studie, vor der nächsten Dialyse (Haase et al., 2007). Zickler et al. konnten in der 3-wöchigen Dialysephase mit der HCO-Membran (3 Dialysen die Woche) keine signifikanten Plasmasenkungen von IL-6 und CRP messen (Zickler et al., 2009).

Die abweichenden Ergebnisse zeigen, dass die Studienergebnisse bezüglich der Zytokinelimination mit Einsatz der HCO-Membran stark vom verwendeten Verfahren abhängen. Außerdem zeigten mehrere Studien, dass die Clearances nicht nur von der Porengröße und dem Verfahren abhängig sind, sondern auch von den Blutfluss- und Dialysatflussraten (Naka et al., 2010).

In weiteren Studien sollte also versucht werden, die Clearances durch eine längere Studienphase, längere Dialysedauer, Änderung der Blutfluss- oder Dialysatflussraten oder durch Änderung des Verfahrens zu steigern. Als oberstes Ziel sollte die langfristige Senkung der Zytokine gesehen werden und der Erfolg nicht nur an direkt postdialytischen Messungen ermittelt werden.

Allerdings ist auch zu beachten, dass ein Zytokinwert an sich nicht sehr aussagekräftig ist, da er durch Rezeptoren, Antagonisten oder auch anderen Zytokine beeinflusst wird. Das heißt, es kann nicht gleich von Höhe eines Wertes oder der Konzentration eines Zytokins auf die Wirkung geschlossen werden (Stenvinkel et al., 2005). Zum anderen ist zu beachten, dass Bindeproteine, wie α -2-Makroglobulin, als extrazelluläre Zytokinreserve dienen und den Körper vor schneller Zytokineliminierung schützen (Stenvinkel et al., 2005; Bonner and Brody, 1995). Außerdem haben einige Studien gezeigt, dass die vermehrte Zytokin-clearance nicht gleich zu verminderten Plasmaspiegeln dieser führt (Fiedler et al., 2012).

5.1.3 Effekte auf Monozytensubpopulationen und deren ACE-Besatz

Bisher wurde noch nicht untersucht, ob die HCO-Membran einen Einfluss auf die Monozytensubpopulationen beziehungsweise deren ACE-Besatz hat. Aufgrund der, in der Einleitung beschriebenen, enormen Bedeutung vor allem der Mo2 auf das kardiovaskuläre Risiko, wäre eine Beeinflussung sehr erfreulich gewesen. Allerdings konnten keine signifikanten Absenkungen der Zellzahlen durch die HCO-Membran herbeigeführt werden. Interessant ist jedoch, dass es in der Wash-out bzw. Nachbeobachtungsphase 2 Wochen nach Therapie mit der HCO-Membran zu einem signifikanten Anstieg der Mo1 Zellzahl gekommen ist. Wenn tatsächlich die Monozytenexpression durch die HCO-Membran aufgrund einer Veränderung des Zytokinmilieus vermindert wurde, diese jedoch anschließend kompensatorisch vermehrt nachproduziert worden sind, könnte sich dies in einem reaktiven Anstieg nach Behandlung mit der HCO-Membran bemerkbar gemacht haben. Eine postdialytische Messung der Monozytenzahlen hätte theoretisch kurzzeitige Effekte aufzeigen können. Jedoch wurde diese nicht durchgeführt, da durch die Hämodialyse die Monozyten in das Endothel wandern

und somit postdialytisch schlechter nachweisbar sind und dies die Messung verfälscht hätte (Fiedler et al., 2012).

Da alle Subgruppen erst seit wenigen Jahren bekannt sind und auch die Interaktion und Beeinflussung durch Zytokine nicht vollständig verstanden ist, können eine Reihe an Kompensationsmechanismen und beeinflussenden Faktoren eine eventuell erfolgreiche Elimination verbergen.

5.1.4 Patientensicherheit

Bisherige publizierte Studien zeigten nur, dass bei Patienten mit bestimmten Begleiterkrankungen (Multiples Myelom, Rhabdomyolyse oder Sepsis) eine gute Verträglichkeit der HCO-Membran gegeben war. Unsere Studie publizierte als Erste die Verträglichkeit der Membran an Langzeitdialysepatienten, ohne die eben genannten Begleiterkrankungen (Fiedler et al., 2012). Auch hier zeigte sich insgesamt eine gute Verträglichkeit.

Die 2 aufgetretenen Shuntthrombosen wurden von keinem der Studienärzte in Zusammenhang mit der HCO-Membran gestellt. Einer der beiden Patienten hatte in der Vergangenheit schon zahlreiche Shuntthrombosen, welche mehrere Interventionen erforderten. Der andere Patient wurde vor der Studie über längere Zeit mit einem separaten Katheter dialysiert. Somit hatten beide Patienten vordringlichere Gründe, eine Shuntthrombose zu entwickeln (Fiedler et al., 2012).

Bei den nicht-schweren Zwischenfällen zeigten sich einige Unterschiede. Die neurologischen Beschwerden (v.a. Schwindel) traten mit 10 zu 2 Fällen genau wie die Kreislaufbeschwerden (v.a. Hypotonien) mit 6 zu 0 Fällen unter der HCO-Membran häufiger auf. Die Beschwerden traten v.a. zu Beginn der HCO-Phase auf und nahmen dann ab. Allein durch die gesunkenen Albuminwerte sind die Beschwerden nicht erklärbar, da sich diese erst im Verlauf der Behandlung verminderten und die Beschwerden ja zu Beginn auftraten. Bei den 2 Patienten, die einen deutlicheren Albuminverlust von über 20% erlitten, zeigten sich auch unter der Kontrollmembran asymptomatisch, hypotensive Blutdruckwerte. Grund für die Gruppenunterschiede könnte bei der kleinen Studienteilnehmerzahl auch ein Randomisierungseffekt sein. In anderen Studien mit Einsatz der HCO-Membran wurden solche Beschwerden nicht beschrieben. In künftigen Studien sollte man trotzdem vermehrt auf diese Beschwerden achten. Typische Unverträglichkeitsreaktionen, wie Fieber, Ödeme, Urtikaria oder Exantheme zeigten sich unter keiner der verwendeten Membranen (Fiedler et al., 2012).

5.1.5 Albuminverluste

Wie erwartet, erlitten die Patienten in der HCO-Phase deutliche Albuminverluste. Im Mittelwert waren dies am Ende der HCO-Phase 4,5 g/L Albumin. Jedoch war zu keinem Zeitpunkt eine Substitution nötig. Die einmalige Dialysatmessung ergab eine herausgefilterte Albuminmenge von 9 g bei einer 5 stündigen Dialyse. Dies war mit anderen Studien, die den Albuminverlust unter der HCO-Membran beleuchteten, stimmig.

Hutchison et al. untersuchten an 5 Patienten mit Multiplen Myelom und akutem Nierenversagen die Albuminverluste unter verschiedenen Behandlungsformen mit der HCO-Membran. Hierbei zeigte sich, dass die größten Verluste zu Beginn der Dialyse auftreten und die Verluste im Verlauf der Dialyse abnehmen. Beim Hämodialyseverfahren zeigten sich Albuminverluste von 1,5 g pro Stunde, bei der Hämodiafiltration erhöhte sich der Wert auf schon 2,3 g pro Stunde und bei der Dialyse mit 2 hintereinandergeschalteten Dialysatoren zeigten sich fast 4-mal so hohe Albuminverluste mit 5,7 g pro Stunde (Hutchison et al., 2008b).

Uchino et al. maßen in einer ex-vivo Studie eine Albumin clearance von 1,2 bis 2,4 ml/min, wobei sich die Albumin clearance mit gesteigerter Dialysatflussrate verminderte. Dies wäre bei einem Serumalbumin von 20 g/L ein stündlicher Abfall von 1,4 g bis 2,9 g pro Stunde (Uchino et al., 2002).

Interessant ist eine Studie von Morgera et al.. Diese zeigte, dass zwar die Albuminverluste im Verlauf der Dialyse abnehmen aber die Zytokin clearances für z.B. IL-1RA und IL-6 erst nach über 4-stündiger Dialyse absanken. Somit würde eine verlängerte Dialysezeit für ein besseres Nutzen-Risiko-Verhältnis bezüglich dieser Parameter sprechen (Morgera et al., 2004; Fiedler et al., 2012).

Da eine gesteigerte Syntheseleistung der Leber von Albumin mit einer Erhöhung der Cholinesterase einhergeht (Dancygier, 2010), konnte man gut anhand der steigenden Cholinesterase-Werte im Serum sehen, dass der vermehrte Albuminverlust zu einer kompensatorisch gesteigerten Produktion von Albumin führte. Dies ist einer der Gründe, warum nur 2 Patienten einen Albuminabfall von über 20% ihres Ausgangswertes erlitten und keine eindeutigen Symptome, wie zum Beispiel Ödeme, einer Hypoalbuminämie vorkamen. Generell sah man, dass die Albuminverluste über den getesteten Studienzeitraum tolerabel sind. Die Studie von Balafa et al. zeigte, dass Patienten mit Peritonealdialyse einen Albuminverlust von ca. 4 g in 24 Stunden erleiden und die gesteigerte Albumin clearance nicht die Überlebenszeit beeinflusst. Im Gegensatz dazu korreliert Alter, Komorbiditäten und CRP > 10mg/L positiv mit der Mortalität. Jedoch korreliert auch der sinkende Serum Albuminwert mit steigender Mortalität (Balafa et al., 2011). Deshalb sollte bei längeren Anwendungen der HCO-Membran

auf eine ausreichende Proteinzufuhr mit der Nahrung beziehungsweise durch Substitution geachtet werden, damit der Serumalbuminwert nicht zu stark beziehungsweise nicht über einen längeren Zeitraum abfällt (Fiedler et al., 2012).

5.1.6 Dialyseeffektivität

Anhand der Berechnung des Kt/V-Wertes zeigte sich eine etwas schlechtere Dialyseeffektivität unter der HCO-Membran im Vergleich zu der Kontrollmembran. Da beide eine kleine Oberfläche von 1,1 m² besitzen, scheint dies nicht der vorrangige Grund zu sein. Am ehesten ist die Membranstruktur dafür verantwortlich, da die HCO-Membran ursprünglich für die kontinuierliche veno-venöse Hämofiltration mit niedrigen Dialysatflussraten vorgesehen war (Fiedler et al., 2012). Würde es gelingen, eine HCO-Membran mit einer größeren Oberfläche bzw. besserer Dialyseeffektivität zu entwickeln, könnte nicht nur Dialysezeit gespart, sondern auch eine höhere Clearance von Zytokinen erreicht werden. Allerdings könnte das neue Design auch zu noch mehr Albuminverlusten führen, welche dann eventuell nicht mehr klinisch vertretbar wären oder einer Substitution bedürften. Ein weiterer Versuch die Dialyseeffektivität zu steigern wäre, die HCO-Membran mit einer Standard High-Flux-Membran in Reihe zu schalten. Allerdings müssten auch hier die höheren, eben bereits erläuterten, Albuminverluste beachtet werden.

Für Creatinin und Harnstoff zeigten sich während der Studienphasen keine signifikanten Veränderungen. Allerdings zeigte sich in der Wash-out bzw. Nachbeobachtungsphase nach Behandlung mit der HCO-Membran ein signifikanter Abfall des Harnstoffs. Dies war am ehesten durch eine etwas schlechtere Harnstoff-Clearance der HCO-Membran bedingt. Nachdem die Patienten wieder 6 Dialysen mit der herkömmlichen Polyflux 170H Membran samt größerer Membranoberfläche erhalten haben, sanken die Harnstoffwerte am ehesten reaktiv ab.

Lee et al. konnten sogar einen signifikanten Unterschied in den postdialytischen Messungen bezüglich der kleinmolekularen Substanzen feststellen. Hier zeigte sich, dass Creatinin und Harnstoff unter der HCO-Membran schlechter eliminiert wurden. Der Grund dafür wurde in den großen Poren bei der verhältnismäßig kleinen Membranoberfläche gesehen. β -2-M könnte in den Poren akkumulieren und die kleinen Moleküle am Durchtritt hindern (Lee et al., 2009). Dies ist ein weiterer Grund die Membran, wie oben beschrieben, zu optimieren.

5.1.7 Beta-2-Mikroglobulin

β -2-Mikroglobulin ist ein bekanntes Mittelmolekül, welches bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz akkumuliert und durch Fibrillenbildung zum gehäuften Auftreten von Amyloidosen führt. Die Harnstoff-Clearance korreliert negativ mit dem β -2-M Serumspiegel, somit sagt der β -2-M Serumspiegel auch etwas über die Nierenfunktion aus. Es gibt Hinweise, dass die chronische Mikroinflammation die Produktion dieses Mittelmoleküls vorantreibt. Allerdings sind die Ursachen dafür unklar. β -2-M dient als Stellvertreter der urämischen Mittelmoleküle. Der prädialytische Serumwert von β -2-M korreliert positiv mit der Mortalität bei Dialysepatienten. Somit ist eine vermehrte β -2-M-Clearance wünschenswert (Cheung et al., 2006).

Aufgrund der Größe von 11,7kD sollte die HCO-Membran natürlich in der Lage sein, dieses Mittelmolekül herauszufiltern. Unter der Behandlung zeigten sich aber keine signifikanten Änderungen der Plasmaspiegel. Dies rührt am ehesten daher, dass die Kontrollmembran und auch die ursprüngliche High-Flux-Membran bereits in der Lage waren, gewisse Mengen aus dem Blut zu eliminieren (Gondouin and Hutchinson, 2011). Nun besitzt der Körper aber einige Reservepools für dieses Molekül (Ward et al., 2006), welche zum Wiederanstieg innerhalb von 48 Stunden nach der Dialyse führen. Wohlmöglich hätte die höhere Clearance für β -2-M der HCO-Membran über einen längeren Zeitraum zu einem Verbrauch dieser Reserven geführt und somit zu geringeren Plasmawerten. Für Erkenntnisse diesbezüglich war der Behandlungszeitraum wahrscheinlich zu kurz.

Lee et al. zeigte in einer Crossover-Studie mit 8 Patienten, dass die HCO-Membran im Vergleich zur High-Flux-Membran eine höhere β -2-M-Clearance hat und nachweisbar geringere β -2-M-Spiegel nach der Dialyse im Serum messbar waren. Jedoch zeigten sich prädialytisch nach 48 Stunden diese Senkungen auch hier nicht mehr (Lee et al., 2009).

5.2 Methodenkritik

Es wurden gezielt Patienten ausgewählt, die mindestens einmal innerhalb 8 Wochen vor Studieneinschluss ein CRP-Wert $> 5\text{mg/L}$ aufwiesen. Zusätzlich hatten einige Patienten ein hohes Alter, lange Dialysezeit und bereits kardiovaskuläre Ereignisse. Somit war also bei fast allen Patienten eine Neigung zur Inflammation deutlich vorhanden. Dies sollte eventuelle Effekte deutlicher zeigen. Anderenfalls könnten aber auch die damit verbundenen Komorbiditäten als erschwerende Confounder gedient haben und somit mögliche Effekte verschleiert haben (Fiedler et al., 2012).

Ein weiterer Kritikpunkt ist die geringe Patientenzahl. Wie bereits erwähnt, war es schwierig aufgrund der zahlreichen, technisch aufwendigen und teuren Laborkontrollen, die verlängerten Dialysezeiten, den strengen Ein- und Ausschlusskriterien und der häufigen Visiten viele Patienten einzuschließen. Die Pilotstudie sollte zunächst zeigen, ob der klinische Einsatz der HCO-Membran bei Langzeitdialysepatienten sicher ist und ob bereits positive Effekte abzusehen sind. In Zukunft sollten, nachdem nun vor allem der Sicherheitsaspekt an einem kleinen Patientenkollektiv erfolgreich getestet wurde, größere Studien folgen.

Aufgrund der wenigen bzw. fehlenden klinischen Erfahrungen der HCO-Membran bei Langzeitdialysepatienten wurden in dieser Studie eher kurze Studienphasen von jeweils 2 Wochen gewählt. Dies könnte nicht lang genug gewesen sein, um mögliche Effekte aufzuzeigen. Nachdem man nun weiß, dass die intermittierende Dialyse mit der HCO-Membran über 2 Wochen mit 3 Behandlungen pro Woche klinisch vertretbar ist, kann man in zukünftigen Studien versuchen, mögliche Effekte durch längere Dialysezeit oder Verlängerung der Studienphasendauer zu erreichen.

5.3 Ausblick

Diese Arbeit zeigt als Pilotstudie, dass die HCO 1100 Membran über einen Zeitraum von 2 Wochen mit 6 konsekutiven Dialysen sicher anwendbar ist. Auch die zu erwartenden Albuminverluste waren tolerabel und man hat nun neue Erfahrungswerte, in welcher Größenordnung diese zu erwarten sind. Bezüglich der Reduktion an der Inflammation beteiligter Zytokine und Monozytensubpopulationen zeigten sich leider keine signifikanten Effekte. Jedoch gab die einmalige Dialysatmessung die Hoffnung, dass die Membran, rein technisch in der Lage ist, einige Zytokine zu eliminieren. In Zukunft müssen vor allem Kompensationsmechanismen besser verstanden werden, die zur Regeneration und dem Wiederanstieg der eliminierten Zytokine und Zellen führen, nachdem sie eliminiert worden sind. Die Erkenntnisse dieser Studie belegen, dass der Einsatz der HCO-Membran über den Studienzeitraum zu keinen schweren Zwischenfällen führte und die Albuminverluste tolerabel waren. In weiteren Studien sollten die Studienphasen verlängert und das Patientenkollektiv erweitert werden, um signifikante Effekte und Ergebnisse zu erzielen. Die bereits angesprochene Verlängerung der Dialysezeit und die Optimierung des Blutreinigungsverfahrens durch die Anwendung von Hämodiafiltration oder die Nacheinanderschaltung zweier Dialysatoren ist eine weitere Möglichkeit. Allerdings müssen die hier höher zu erwartenden Albuminverluste bei klinischen Studien unbedingt berücksichtigt werden. In zukünftigen Studien sollte auch auf das vermehrte Auftreten von Schwindel und Hypotonien geachtet werden, wobei es wenig wahrscheinlich ist, dass diese Beschwerden durch die HCO-Membran

bedingt waren. Zusätzlich sollte versucht werden, die HCO-Membran so weiterzuentwickeln, dass sie durch eine größere Oberfläche eine bessere Dialyseeffektivität erreicht und so womöglich eine höhere Zytokin-clearance aufweist. Wünschenswert wäre auch eine noch selektivere Membran, die noch weniger Albumin, als bisher, herausfiltert und somit noch länger eingesetzt werden kann. Auch eine bessere Clearance der kleinmolekularen Substanzen wie Harnstoff und Creatinin wäre wünschenswert (Fiedler et al., 2012).

Aktuell läuft die Nachfolgestudie mit deutlich mehr Patienten multizentrisch in Zusammenarbeit mit der Klinik Charité Berlin, wofür diese Arbeit den Grundstein legte. Hierbei wird versucht, die Dialyseeffektivität durch Zuschaltung einer High-Flux-Membran zu steigern. Außerdem wurde die HCO-Studienphase auf 3 Wochen verlängert und somit die Studienmembran für 9 konsekutive Dialysen verwendet. Diese und weitere Studien werden zeigen, ob sich die HCO-Membran, welche sich bei Patienten mit Leichtkettennephropathie etabliert hat, auch bei Langzeitdialysepatienten zur Senkung des kardiovaskulären Risikos durchsetzen kann.

6. Zusammenfassung

Das erhöhte kardiovaskuläre Risiko bei Langzeithämodialysepatienten ist einer der Hauptgründe für die erhöhte Mortalität und die geringere Lebenserwartung dieser Patientengruppe. Dafür verantwortlich ist vor allem das chronische Inflammationsgeschehen. Dieser Entzündungsprozess führt zur Vermehrung bestimmter proinflammatorischer Zytokine und bestimmter Monozytensubpopulationen. Dadurch wird vor allem die Athero- und Arterioskleroseentstehung begünstigt. Ein möglicher Ansatz dies zu bekämpfen ist die Optimierung der Dialysetechnik durch eine großporigere Membran. Wir untersuchten die High-Cut-off-Membran (HCO 1100) der Firma Gambro, welche bisher hauptsächlich zur Therapie des akuten Nierenversagens bei Patienten mit Leichtkettennephropathie zum Einsatz kam.

In einer zweiarmig, doppelblind randomisierte Crossover-Studie wurden innerhalb eines Zeitraumes von über 8 Monaten 19 Patienten in die Studie eingeschlossen, wovon 17 Patienten vollständig ausgewertet werden konnten. Diese wurden im Crossover-Design 2 Wochen mit einer High-Flux-Membran und 2 Wochen mit der HCO 1100 Membran dialysiert und weitere 2 Wochen nachbeobachtet. Zwischen beiden Studienphasen erfolgte eine 2-wöchige Wash-out Phase mit der ursprünglichen High-Flux-Membran. In bestimmten Abständen wurden die Zytokine CRP, IL-1, IL-6, IL-10, TNF-alpha, die Monozytensubpopulationen (Mo1, Mo2, Mo3) und deren ACE-Expression bestimmt. Zusätzlich wurden paraklinische Parameter, wie Creatinin, Harnstoff, Albumin, Cholinesterase, Elektrolyte und β -2-M bestimmt, um Aussagen über die Dialyseeffektivität und die Patientensicherheit zu treffen. Eine einmalige Dialysatmessung sollte zeigen, was die Membran imstande war zu eliminieren.

Es zeigte sich leider keine signifikanten Absenkungen der gemessenen Zytokine oder der Monozytensubpopulationen beziehungsweise deren ACE-Besatz. Allerdings weist ein am ehesten reaktiver Anstieg der Absolutzahlen der Mo1 Subpopulation nach Behandlung mit der HCO-Membran auf mögliche Effekte hin. Die Dialysatmessung zeigte, dass die Membran rein technisch in der Lage ist, zumindest IL-6 zu eliminieren. Dass sich dies nicht in niedrigeren Serumspiegeln widerspiegelte, liegt am ehesten an körpereigenen Kompensationsmechanismen und einer zu kurzen Behandlungsdauer. Bis auf ein gehäuftes Auftreten von Schwindel und Hypotonie, was in zukünftigen Studien weiter beachtet werden sollte, zeigte die HCO-Membran eine gute Verträglichkeit. Es zeigte sich eine signifikante Albuminsenkung durch die HCO-Membran, die allerdings nicht substitutionspflichtig wurde. Der beinahe signifikante Anstieg der Cholinesterase weist auf die kompensatorisch gesteigerte Albuminsyntheseleistung der Leber hin. Die verlorene Albuminmenge stimmt mit vorherigen Studien weitgehend überein. Ein niedrigerer Kt/V-Wert der HCO-Membran und ein signifikanter Harnstoffabfall in der Wash-out beziehungsweise Nachbeobachtungsphase nach Behandlung mit der Studienmembran

zeigte eine schlechtere Dialyseeffektivität der HCO-Membran. Dies liegt an der kleinen Oberfläche und dem relativ unselektiven Porendesign.

Diese Studie untersuchte, als eine der Ersten, die klinische Anwendung der HCO-Membran an Langzeitdialysepatienten. Die Ergebnisse dieser Pilotstudie fordern die Weiterentwicklung selektiverer High-Cut-off-Dialysatoren mit einer größeren Membranoberfläche. Somit kann die Dialyseeffektivität gesteigert und Albuminverluste gesenkt werden, wodurch die Membran über einen längeren Zeitraum anwendbar ist. Längere Studienphasen und größere Patientenzahlen in zukünftigen Studien werden zeigen, ob eine signifikante Senkung der Inflammationsparameter erreicht werden kann. Eine Modifikation des Dialyseverfahrens, zum Beispiel durch das Hintereinanderschalten einer High-Flux- mit einer High-Cut-off-Membran, könnte eine weitere Verbesserung bringen, wobei hier jedoch auf den noch höheren Albuminverlust geachtet werden muss. Die Albuminsubstitution und eine proteinreiche Ernährung sollten dabei frühzeitig in Betracht gezogen werden.

7. Literaturverzeichnis

Abbate, A., Salloum, F. N., Van Tassell, B. W., Vecile, E., Toldo, S., Seropian, I., Mezzaroma, E., Dobrina, A. (2011). Alterations in the Interleukin-1/Interleukin-1 Receptor Antagonist Balance Modulate Cardiac Remodeling following Myocardial Infarction in the Mouse. *PLoS ONE*, 6(11), e27923.

Alayoud, A., Montassir, D., Hamzi, A., Zajjari, Y., Bahadi, A., Kabbaj, D. E., Maoujoud, O., Aatif, T., Hassani, K., Benyahia, M., Oualim, Z. (2012). The Kt/V by ionic dialysance: Interpretation limits. *Ind J of Nephrol*, 22(5), 333–339.

Alexander, M. R., Moehle, C. W., Johnson, J. L., Yang, Z., Lee, J. K., Jackson, C. L., & Owens, G. K. (2012). Genetic inactivation of IL-1 signaling enhances atherosclerotic plaque instability and reduces outward vessel remodeling in advanced atherosclerosis in mice. *J of Clin Invest*, 122(1), 70–79.

Ariyamuthu, V. K., Balla, S., & Chaudhary, K. (2012). Ischemic heart disease in patients undergoing dialysis. *Hosp Pract*, 40(4), 33–39.

Balafa, O., Halbesma, N., Struijk, D. G., Dekker, F. W., & Krediet, R. T. (2011). Peritoneal Albumin and Protein Losses Do Not Predict Outcome in Peritoneal Dialysis Patients. *Clin J of the Am Soc of Nephrol*, 6(3), 561–566.

Basnayake, K., Cockwell, P., Hutchison, C. A. (2009). Rhabdomyolysis and Acute Kidney Injury. *New Engl J of Med*, 361(14), 1411–1413.

Baylis, C. (2006). Arginine, arginine analogs and nitric oxide production in chronic kidney disease. *Nature Clin Pract Nephrol*, 2(4), 209–220.

Bonner, J. C., & Brody, A. R. (1995). Cytokine-binding proteins in the lung. *The Am J of Physiol*, 268(6 Pt 1), L869–878.

Bouré, T., & Vanholder, R. (2004). Which dialyser membrane to choose? *Nephrol Dialysis Transpl*, 19(2), 293–296.

Brewster, U. C., Setaro, J. F., & Perazella, M. A. (2003). The renin-angiotensin-aldosterone system: cardiorenal effects and implications for renal and cardiovascular disease states. *The Am J of the Med Scienc*, 326(1), 15–24.

Carpenter, C. B., Milford, E.L., Sayegh, M.H.: Transplantation in der Therapie des Nierenversagens. In: Kasper, D.L., Braunwald, E., Fauci, A., Hauser, S. L., Longo, D. L., Jameson, J. L., Dietel, M. (Hrsg), Suttorp, N. (Hrsg), Zeitz, M. (Hrsg): *Harrisons Innere Medizin*, 16. Auflage, Band 2, ABW Wissenschaftsverlag, Berlin, 2005, S. 1789-1797

Carrero, J. J. and Stenvinkel, P. (2009). Persistent inflammation as a catalyst for other risk factors in chronic kidney disease: a hypothesis proposal. *Clin J of the Am Soc of Nephrol*, 4 Suppl 1, S49–55.

Chamberlain, J., Francis, S., Brookes, Z., Shaw, G., Graham, D., Alp, N. J., Dower, S., Crossman, D. C. (2009). Interleukin-1 regulates multiple atherogenic mechanisms in response to fat feeding. *PLoS one*, 4(4), e5073.

Chen, M. F., Chang, C. L., & Liou, S. Y. (1998). Increase in resting levels of superoxide anion in the whole blood of uremic patients on chronic hemodialysis. *Blood Purif*, 16(5), 290–300.

Cheung, A K, Sarnak, M. J., Yan, G., Dwyer, J. T., Heyka, R. J., Rocco, M. V., Teehan, B. P., Levey, A. S. (2000). Atherosclerotic cardiovascular disease risks in chronic hemodialysis patients. *Kidney Internat*, 58(1), 353–362.

Cheung, A. K., Rocco, M. V., Yan, G., Leypoldt, J. K., Levin, N. W., Greene, T., Eknoyan, G. (2006). Serum β -2 Microglobulin Levels Predict Mortality in Dialysis Patients: Results of the HEMO Study. *J of the Am Soc of Nephrol*, 17(2), 546–555.

Dancygier H.: *Clinical Hepatology: Principles and Practice of Hepatobiliary Diseases*. 1. Auflage, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, 2010, S. 327-328

De Zeeuw, D. (2004). Albuminuria, not only a cardiovascular/renal risk marker, but also a target for treatment? *Kidney Internat Suppl*, (92), S2–6.

Dounousi, E., Kolioussi, E., Papagianni, A., Ioannou, K., Zikou, X., Katopodis, K., Kelesidis, A., Tsakiris, D., Siamopoulos, K. C. (2012). Mononuclear leukocyte apoptosis and inflammatory markers in patients with chronic kidney disease. *Am J of Nephrol*, 36(6), 531–536.

Eknoyan, G., Beck, G. J., Cheung, A. K., Daugirdas, J. T., Greene, T., Kusek, J. W., Allon, M., Bailey, J., Delmez, J. A., Depner, T., Dwyer, J., Levey, A. S., Levin, N. W., Milford, E., Ornt, D.B., Rocco, M. V., Schulman, G., Schwab, S. J., Teehan, B. P., Toto, R. (2002). Effect of Dialysis Dose and Membrane Flux in Maintenance Hemodialysis. *New Engl J of Med*, 347(25), 2010–2019.

- Eknoyan, G., Eckardt, K.U., Kasiske, B.I., Wheeler, D.C. (2012). Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. KDIGO, http://www.kdigo.org/clinical_practice_guidelines/pdf/CKD/KDIGO_2012_CKD_GL.pdf, Stand: 26.1.2013.
- Elhage, R., Maret, A., Pieraggi, M. T., Thiers, J. C., Arnal, J. F., & Bayard, F. (1998). Differential effects of interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor binding protein on fatty-streak formation in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*, 97(3), 242–244.
- Fiedler, R., Neugebauer, F., Ulrich, C., Wienke, A., Gromann, C., Storr, M., Böhrer, T., Seibert, E., Girndt, M. (2012). Randomized Controlled Pilot Study of 2 Weeks' Treatment With High Cutoff Membrane for Hemodialysis Patients With Elevated C-Reactive Protein. *Artif Org*, 36(10), 886–893.
- Frei und Schober-Halstenberg (2007). QuaSi-Niere Jahresbericht 2006-2007, Bundesverband-Niere, http://www.bundesverband-niere.de/files/QuaSi-Niere-Bericht_2006-2007.pdf, Stand: 7.10.2013.
- Geberth S. und Nowack R.: Praxis der Dialyse. 1. Auflage, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, 2011, S.26-39.
- Ghannoum, M. and Gosselin, S. (2013). Enhanced poison elimination in critical care. *Adv in CKD*, 20(1), 94–101.
- Girndt, M., Kaul, H., Sester, U., Ulrich, C., Sester, M., Georg, T., & Köhler, H. (2002). Anti-inflammatory interleukin-10 genotype protects dialysis patients from cardiovascular events. *Kidney Internat*, 62(3), 949–955.
- Girndt, M. and Seibert, E. (2010). Premature cardiovascular disease in chronic renal failure (CRF): A model for an advanced ageing process. *Exp Gerontol*, 45(10), 797–800.
- Go, A. S., Chertow, G. M., Fan, D., McCulloch, C. E., & Hsu, C. (2004). Chronic Kidney Disease and the Risks of Death, Cardiovascular Events, and Hospitalization. *New Engl J of Med*, 351(13), 1296–1305.
- Gondouin, B. and Hutchison, C. A. (2011). High Cut-off Dialysis Membranes: Current Uses and Future Potential. *Adv in Chron Kidney Dis*, 18(3), 180–187.

- Gross, M.-L., Meyer, H.-P., Ziebart, H., Rieger, P., Wenzel, U., Amann, K., Berger, I., Adamczak, M., Schirmacher, P., Ritz, E. (2007). Calcification of coronary intima and media: immunohistochemistry, backscatter imaging, and x-ray analysis in renal and nonrenal patients. *Clin J of the Am Soc of Nephrol*, 2(1), 121–134.
- Haase, M., Bellomo, R., Baldwin, I., Haase-Fielitz, A., Fealy, N., Davenport, P., Morgera, S., Goehl, H., Storr, M., Boyce, N., Neumayer, H. H. (2007). Hemodialysis membrane with a high-molecular-weight cutoff and cytokine levels in sepsis complicated by acute renal failure: a phase 1 randomized trial. *Am J of Kidney Dis*, 50(2), 296–304.
- Heine, G. H., Ulrich, C., Seibert, E., Seiler, S., Marell, J., Reichart, B., Krause, M., Schlitt, A., Köhler, H., Girndt, M. (2008). CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes but not total monocyte numbers predict cardiovascular events in dialysis patients. *Kidney Internat*, 73(5), 622–629.
- Honda, H., Qureshi, A. R., Heimbürger, O., Barany, P., Wang, K., Pecoits-Filho, R., Stenvinkel, P., Lindholm, B. (2006). Serum albumin, C-reactive protein, interleukin 6, and fetuin A as predictors of malnutrition, cardiovascular disease, and mortality in patients with ESRD. *Am J of Kidney Dis*, 47(1), 139–148.
- Hutchison, C. A., Bradwell, A. R., Cook, M., Basnayake, K., Basu, S., Harding, S., Hattersley, J., Evans, N., Chappel, M., Sampson, P., Foggensteiner, L., Adu, D., Cockwell, P. (2009). Treatment of acute renal failure secondary to multiple myeloma with chemotherapy and extended high cut-off hemodialysis. *Clin J of the Am Soc of Nephrol*, 4(4), 745–754.
- Hutchison, C. A., Cook, M., Heyne, N., Weisel, K., Billingham, L., Bradwell, A., & Cockwell, P. (2008a). European trial of free light chain removal by extended haemodialysis in cast nephropathy (EuLITE): A randomised control trial. *Trials*, 9(1), 55.
- Hutchison, C. A., Harding, S., Mead, G., Goehl, H., Storr, M., Bradwell, A., & Cockwell, P. (2008b). Serum Free-Light Chain Removal by High Cutoff Hemodialysis: Optimizing Removal and Supportive Care. *Artif Org*, 32(12), 910–917.
- Janeway, C., Mahlke, K., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M.: *Immunologie*, 5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Berlin-Heidelberg, 2002a, S.681-682
- Janeway, C., Mahlke, K., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M.: *Immunologie*, 5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Berlin-Heidelberg, 2002b, S.664
- Kaufmann, S.H.E.: *Immunologie*. In: Hahn, H., Kaufmann, S. H. E., Schulz, T. F., Suerbaum, S.: *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, 5. Auflage, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, 2004, S. 84-85.

Kielstein, J. T., Böger, R. H., Bode-Böger, S. M., Schäffer, J., Barbey, M., Koch, K. M., & Frölich, J. C. (1999). Asymmetric dimethylarginine plasma concentrations differ in patients with end-stage renal disease: relationship to treatment method and atherosclerotic disease. *J of the Am Soc of Nephrol*, 10(3), 594–600.

Kimmel, P. L., Phillips, T. M., Simmens, S. J., Peterson, R. A., Weihs, K. L., Alleyne, S., Cruz, I., Janovski, J. A., Veis, J. H. (1998). Immunologic function and survival in hemodialysis patients. *Kidney Internat*, 54(1), 236–244.

Koda, Y. (2011). Clinical Outcomes of the High-Performance Membrane Dialyzer. *Contrib to Nephrol* Vol. 173, pp. 58–69.

Kudo, S. and Goto, H. (1999). Intrarenal handling of recombinant human interleukin-1alpha in rats: mechanism for proximal tubular protein reabsorption. *J of Interf & Cyt Res*, 19(10), 1161–1168.

Küçüköylü, D. S. und Rump, L. C. (2012). Niereninsuffizienz und kardiovaskuläre Erkrankungen. *Der Internist*, 53(7), 791–801.

Lee, D., Haase, M., Haase-Fielitz, A., Paizis, K., Goehl, H., & Bellomo, R. (2009). A Pilot, Randomized, Double-Blind, Cross-Over Study of High Cut-Off versus High-Flux Dialysis Membranes. *Blood Purif*, 28(4), 365–372.

Levey, A.S., Coresh, J., Eknoyan, G. (2002). K/DOQI Clinical Practice Guidelines For Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification and Stratification. NKF, http://www.kidney.org/professionals/kdoqi/pdf/ckd_evaluation_classification_stratification.pdf, Stand: 26.1.2013.

Limdi, N. A., Beasley, T. M., Baird, M. F., Goldstein, J. A., McGwin, G., Arnett, D. K., Acton, R. T., Allon, M. (2009). Kidney function influences warfarin responsiveness and hemorrhagic complications. *J of the Am Soc of Nephrol*, 20(4), 912–921.

Locatelli, F., Martin-Malo, A., Hannedouche, T., Loureiro, A., Papadimitriou, M., Wizemann, V., Jacobson, S. H., Czekalski, S., Ronco, C., Vanholder, R. (2009). Effect of Membrane Permeability on Survival of Hemodialysis Patients. *J of the Am Soc of Nephrol*, 20(3), 645–654.

Mann, J. F., Gerstein, H. C., Pogue, J., Bosch, J., & Yusuf, S. (2001). Renal insufficiency as a predictor of cardiovascular outcomes and the impact of ramipril: the HOPE randomized trial. *Ann of Intern Med*, 134(8), 629–636.

- Mann, P. D. J., Hilgers, K. F., Veelken, R., Lenhardt, C., & Schiffrin, E. L. (2008). Chronische Nierenerkrankungen und kardiovaskuläres System. *Der Internist*, 49(4), 413–421.
- Mccullough, P. A., Agarwal, M., & Agrawal, V. (2009). Risks of coronary artery calcification in chronic kidney disease: Do the same rules apply? *Nephrology*, 14(4), 428–436.
- Moldavan, A. (1934). Photo-electric technique for the counting of microscopical cells. *Science New York*, 80(2069), 188–189.
- Moore, K. W., O'Garra, A., De Waal Malefyt, R., Vieira, P., & Mosmann, T. R. (1993). Interleukin-10. *Ann Rev of Immunol*, 11, 165–190.
- Morgado, T., Castro, R., Oliveira, L., Prata, C., & Fructuoso, M. (2011). Quality of life in chronic kidney disease. *Nefrologia*, 31(1), 91-6.
- Morgera, S., Haase, M., Kuss, T., Vargas-Hein, O., Zuckermann-Becker, H., Melzer, C., Krieg, H., Wegner, B., Bellomo, R., Neumayer, H. H. (2006). Pilot study on the effects of high cutoff hemofiltration on the need for norepinephrine in septic patients with acute renal failure. *Crit Care Med*, 34(8), 2099–2104.
- Morgera, S., Klonower, D., Rocktäschel, J., Haase, M., Priem, F., Ziemer, S., Wegner, B., Göhl, H., Neumayer, H. H. (2003a). TNF- α elimination with high cut-off haemofilters: a feasible clinical modality for septic patients? *Nephrol Dial Transplant*, 18(7), 1361–1369.
- Morgera, S., Rocktäschel, J., Haase, M., Lehmann, C., Von Heymann, C., Ziemer, S., Priem, F., Hocher, B., Göhl, H., Kox, W. J., Bruder, H.W., Neumayer, H. H. (2003b). Intermittent high permeability hemofiltration in septic patients with acute renal failure. *Intens Care Med*, 29(11), 1989–1995.
- Morgera, S., Slowinski, T., Melzer, C., Sobottke, V., Vargas-Hein, O., Volk, T., Zuckermann, H., Wegner, B., Müller, J. M., Baumann, G., Kox, W. J., Bellomo, R., Neumayer, H. H. (2004). Renal replacement therapy with high-cutoff hemofilters: Impact of convection and diffusion on cytokine clearances and protein status. *Am J of Kidney Dis*, 43(3), 444–453.
- Naka, T., Haase, M., Bellomo, R. (2010). “Super high-flux” or “high cut-off” hemofiltration and hemodialysis. *Contrib to Nephrol*, 166, 181–189.
- Naka, T., Jones, D., Baldwin, I., Fealy, N., Bates, S., Goehl, H., Morgera, S., Neumayer, H. H., Bellomo, R. (2005). Myoglobin clearance by super high-flux hemofiltration in a case of severe rhabdomyolysis: a case report. *Crit Care London*, 9(2), R90–95.

Nicholl, D. D. M., Ahmed, S. B., Loewen, A. H. S., Hemmelgarn, B. R., Sola, D. Y., Beecroft, J. M., Turin, T. C., Hanly, P. J. (2012). Declining kidney function increases the prevalence of sleep apnea and nocturnal hypoxia. *Chest*, 141(6), 1422–1430.

Nowack, R., Birck, R., Weinreich, T.: *Dialyse und Nephrologie für Fachpersonal*. 3. Auflage, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, 2009, S.94-96.

Ohtani, T., Ueda, Y., Mizote, I., Oyabu, J., Okada, K., Hirayama, A., & Kodama, K. (2006). Number of yellow plaques detected in a coronary artery is associated with future risk of acute coronary syndrome: detection of vulnerable patients by angiography. *J of the Am Coll of Cardiol*, 47(11), 2194–2200.

Ok, E., Asci, G., Toz, H., Ok, E. S., Kircelli, F., Yilmaz, M., Hur, E., Demirci, M. S., Demirci, C., Duman, S., Basci, A., Adam, S. M., Isik, I. O., Zengin, M., Suleymanlar, G., Yilmaz, M. E., Ozkahya, M. (2013). Mortality and cardiovascular events in online haemodiafiltration (OL-HDF) compared with high-flux dialysis: results from the Turkish OL-HDF Study. *Nephrol Dial Transplant*, 28(1), 192–202.

Palmer, S. C., Rabindranath, K. S., Craig, J. C., Roderick, P. J., Locatelli, F., & Strippoli, G. F. (2012). High-flux versus low-flux membranes for end-stage kidney disease. In *Cochrane Database of Syst Rev*, The Cochrane Lib 2012, Issue 9, Art. No.: CD005016.

Park, J. (2012). Cardiovascular Risk in Chronic Kidney Disease: Role of the Sympathetic Nervous System. *Cardiol Res and Pract*, Vol. 2012, Article ID 319432.

Park, S. H., Kim, W., Park, C. S., Kang, W. Y., Hwang, S. H., & Kim, W. (2009). A comparison of clopidogrel responsiveness in patients with versus without chronic renal failure. *The Am J of Cardiol*, 104(9), 1292–1295.

Pezzutto, A., Ulrichs, T., Burmester, G. R. : *Taschenatlas der Immunologie: Grundlagen, Labor, Klinik*. 2. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2006, S. 97.

Potthoff, F., Münscher, C., Berendes, A. (2012). Jahresbericht Datenanalyse Dialyse 2011. G-BA, http://www.g-ba.de/downloads/17-98-3294/2012-08-16_QSD-RL_Datenanalyst-Jahresbericht_2011_Bericht.pdf, Stand 7.10.2013.

Ridker, P. M., Rifai, N., Rose, L., Buring, J. E., & Cook, N. R. (2002). Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *The New Engl J of Med*, 347(20), 1557–1565.

- Rogacev, K. S., Ziegelin, M., Ulrich, C., Seiler, S., Girndt, M., Fliser, D., & Heine, G. H. (2009). Haemodialysis-induced transient CD16+ monocytopenia and cardiovascular outcome. *Nephrol Dial Transplant*, 24(11), 3480–3486.
- Ross, R. (1999). Atherosclerosis - An Inflammatory Disease. *New Engl J of Med*, 340(2), 115–126.
- Schiffrin, E. L., Lipman, M. L., & Mann, J. F. E. (2007). Chronic Kidney Disease Effects on the Cardiovascular System. *Circulation*, 116(1), 85–97.
- Schmaldienst, S. und Hörl, W. H.: Biokompatibilität. In: Hörl, W.H., Wanner, C.: *Dialyseverfahren in Klinik und Praxis: Technik und Klinik*. 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2004, S. 224-226
- Schwenger, V.: Praxis der extrakorporalen Eliminationsverfahren. In: Herth, F., Messmann, H., Haverkamp, W.: *Internistische Intensivmedizin: Methoden - Diagnose - Therapie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2008, S. 541-542.
- Shahid, M., Francis, J., Majid, D. S. A. (2008). Tumor necrosis factor-alpha induces renal vasoconstriction as well as natriuresis in mice. *Am J of Physiol. Renal Physiol*, 295(6), F1836–1844.
- Shlipak, M. G., Heidenreich, P. A., Noguchi, H., Chertow, G. M., Browner, W. S., & McClellan, M. B. (2002). Association of renal insufficiency with treatment and outcomes after myocardial infarction in elderly patients. *Ann of Intern Med*, 137(7), 555–562.
- Singh A. K. und Brenner B. M.: Dialyse in der Behandlung des Nierenversagens. In: Kasper, D.L., Braunwald, E., Fauci, A., Hauser, S. L., Longo, D. L., Jameson, J. L., Dietel, M. (Hrsg), Suttrop, N. (Hrsg), Zeitz, M. (Hrsg): *Harrisons Innere Medizin*, 16. Auflage, Band 2, ABW-Wissenschaftsverlag, Berlin, 2005, S. 1783-1788.
- Skorecki, K., Green, J., Brenner, B.M.: Chronische Niereninsuffizienz. In: Kasper, D.L., Braunwald, E., Fauci, A., Hauser, S. L., Longo, D. L., Jameson, J. L., Dietel, M. (Hrsg), Suttrop, N. (Hrsg), Zeitz, M. (Hrsg): *Harrisons Innere Medizin*, 16. Auflage, Band 2, ABW-Wissenschaftsverlag, Berlin, 2005, S. 1771-1782.
- Stenvinkel, P, Heimbürger, O., Paulre, F., Diczfalusy, U., Wang, T., Berglund, L., & Jogestrand, T. (1999). Strong association between malnutrition, inflammation, and atherosclerosis in chronic renal failure. *Kidney Internat*, 55(5), 1899–1911.

Stenvinkel, Peter, Ketteler, M., Johnson, R. J., Lindholm, B., Pecoits-Filho, R., Riella, M., Heimbürger, O., Cederholm, T., Girndt, M. (2005). IL-10, IL-6, and TNF- α : Central factors in the altered cytokine network of uremia - The good, the bad, and the ugly. *Kidney Internat*, 67(4), 1216–1233.

Stenvinkel, Peter, Pecoits-Filho, R., & Lindholm, B. (2003). Coronary Artery Disease in End-Stage Renal Disease: No Longer a Simple Plumbing Problem. *J of the Am Soc of Nephrol*, 14(7), 1927–1939.

Tintut, Y., Patel, J., Parhami, F., & Demer, L. L. (2000). Tumor necrosis factor-alpha promotes in vitro calcification of vascular cells via the cAMP pathway. *Circulation*, 102(21), 2636–2642.

Uchino, S, Bellomo, R., Goldsmith, D., Davenport, P., Cole, L., Baldwin, I., Panagiotopoulos, S., Tipping, F., Ronco, C., Everard, P. (2002a). Cytokine removal with a large pore cellulose triacetate filter: an ex vivo study. *The Internat J of Artif Org*, 25(1), 27–32.

Uchino, Shigehiko, Bellomo, R., Morimatsu, H., Goldsmith, D., Davenport, P., Cole, L., Baldwin, I., Panagiotopoulos, S., Tipping, P., Morgera, S., Neumayer, H. H., Goehl, H. (2002b). Cytokine dialysis: an ex vivo study. *Am Soc for Artif Intern Org*, 48(6), 650–653.

Ulrich, C., Heine, G. H., Garcia, P., Reichart, B., Georg, T., Krause, M., Köhler, H., Girndt, M. (2006). Increased expression of monocytic angiotensin-converting enzyme in dialysis patients with cardiovascular disease. *Nephrol Dial Transplant*, 21(6), 1596–1602.

Ulrich, C., Heine, G. H., Seibert, E., Fliser, D., & Girndt, M. (2010). Circulating monocyte subpopulations with high expression of angiotensin-converting enzyme predict mortality in patients with end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant*, 25(7), 2265–2272.

Voiculescu, A.: Nierenersatzverfahren. In: Marx, G., Trappe, H.-J., Leuwer, M., Zuzan, O.: *Checkliste Intensivmedizin*. 3. Auflage, Georg Thieme Verlag, 2010, S.225-229.

Wada, M., Ueda, Y., Higo, T., Matsuo, K., Nishio, M., Hirata, A., Asai, M., Nemoto, T., Kashiyama, T., Murakami, A., Kashiwase, K., Kodama, K. (2011). Chronic Kidney Disease and Coronary Artery Vulnerable Plaques. *Clin J of the Am Soc of Nephrol*, 6(12), 2792–2798.

Waheed, U., Hayat, K., Ahmad, B., Waheed, Y., & Zaheer, H. A. (2013). Evaluation of HIV/AIDS diagnostics kits and formulation of a testing strategy for Pakistan. *J of Clin Virol*. 56 (4) , 367-369.

- Ward, R. A., Greene, T., Hartmann, B., & Samtleben, W. (2006). Resistance to intercompartmental mass transfer limits beta2-microglobulin removal by post-dilution hemodiafiltration. *Kidney Internat*, 69(8), 1431–1437.
- Winkelmayr, W. C., Patrick, A. R., Liu, J., Brookhart, M. A., & Setoguchi, S. (2011). The Increasing Prevalence of Atrial Fibrillation among Hemodialysis Patients. *J of the Am Soc of Nephrol*, 22(2), 349–357.
- Zickler, D., Epple, C., Lun, A., Storr, M., Beck, W., Hampel, DJ., Schindler, R. (2009). Randomized Controlled Trial with High-Cutoff-Membranes in Chronic Hemodialysis Patients: Humoral and Cellular Markers of Inflammation. *J Am Soc Nephrol*, 20, 90A (Abstract).
- Ziegler-Heitbrock, L. (2007). The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J of Leuko Biol*, 81(3), 584–592.
- Ziegler-Heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D. N., Leenen, P. J. M., Liu, Y. J., MacPherson, G., Randolph, G., Scherberich, J., Schmitz, J., Shortman, K., Sozzani, S., Strobl, H., Zembala, M., Austyn, J., Lutz, M. B. (2010). Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*, 116(16), e74–e80.
- Zimmermann, J., Herrlinger, S., Pruy, A., Metzger, T., & Wanner, C. (1999). Inflammation enhances cardiovascular risk and mortality in hemodialysis patients. *Kidney Internat*, 55(2), 648–658.
- Zucchelli, P., Pasquali, S., Cagnoli, L., & Ferrari, G. (1988). Controlled plasma exchange trial in acute renal failure due to multiple myeloma. *Kidney Internat*, 33(6), 1175–1180.

8. Anhang

8.1 Strukturierter Anamneseerhebungsbogen (aus Prüfplan Vers.2.4 vom 3.11.2009)

Patientenname: _____

Befragung am: ____ . ____ . 20__

- Frage 1: Haben Sie jemals geraucht? Ja Nein
- Frage 1 a: Rauchen Sie aktuell? Ja Nein
- Frage 1 b: Wann haben Sie das Rauchen beendet? _____
- Frage 1 c: Wie viele Jahre haben Sie insgesamt geraucht? _____
- Frage 1 d: Wie viele Päckchen Zigaretten haben Sie
durchschnittlich am Tag geraucht? _____
- Frage 2: Hat Ihr Vater oder Ihre Mutter einen Herzinfarkt
oder einen Schlaganfall vor dem 65. Lebensjahr
erlitten? Ja Nein Unbekannt
- Frage 3: Haben Geschwister von Ihnen einen Herzinfarkt
oder einen Schlaganfall vor dem 65. Lebensjahr
erlitten? Ja Nein Unbekannt
- Frage 4: Ist bei Ihnen ein Diabetes mellitus bekannt? Ja Nein
- Frage 4 a: Benutzen Sie Insulin, Blutzucker senkende
Medikamente, oder halten Sie eine Diät?
Insulin/Medikamente/Diät/gar nichts
- Frage 5: An wie vielen Tagen in der Woche betätigen Sie
sich mindestens 30 Minuten mittels Ausdauersportarten
wie Joggen, Fahrradfahren oder Walken? _____mal
- Frage 6 a: Hatten Sie jemals einen Schlaganfall mit Störungen
des Sprachzentrums oder Lähmungen der
Gliedmaßen, die länger als einen Tag anhielten? Ja Nein
- Frage 6 b: Hatten Sie jemals einen Schlaganfall mit Störungen
des Sprachzentrums oder Lähmungen der
Gliedmaßen, die kürzer als einen Tag anhielten? Ja Nein
- Frage 7: Hatten Sie jemals einen Herzinfarkt? Ja Nein
- Frage 8: Hatten Sie jemals eine Aufdehnung von
Herzkranzgefäßen mittels Herzkatheter? Ja Nein
- Frage 9: Haben Sie eine Bypass-OP am Herzen hinter sich? Ja Nein

- Frage 10: Sind ihre Halsschlagadern operativ oder durch Katheter aufgedehnt worden? Ja Nein
- Frage 11: Hatten Sie jemals eine Aufdehnung von Becken- oder Bein Gefäßen? Ja Nein
- Frage 12: Sind Sie an den Becken- oder Beinschlagadern mittels Bypass operiert?
(Dies umfasst keine Krampfader-OP) Ja Nein
- Frage 13: Haben Sie eine Amputationsoperation erlitten? Ja Nein
- Frage 14: Sind Sie in Ihrem Alltagsleben durch Luftnot eingeschränkt?

- Nein
- nicht in Ruhe, nur bei größerer körperlicher Belastung (> 200 m in der Ebene, > 1 Etage im Treppenhaus; NYHA II)
- nicht in Ruhe, bei geringer körperlicher Belastung (< 200m in der Ebene, < 1 Etage im Treppenhaus; NYHA III)
- in Ruhe (NYHA IV)

Frage 15: Sind Sie in Ihrem Alltagsleben durch einen Druckschmerz in der Brust eingeschränkt?

- Nein
- nicht in Ruhe, nur bei größerer körperlicher Belastung (> 200 m in der Ebene, > 1 Etage im Treppenhaus; CCS II)
- nicht in Ruhe, bei geringer körperlicher Belastung (< 200m in der Ebene, < 1 Etage im Treppenhaus; CCS III)
- in Ruhe (CCS IV)

Frage 16: Sind Sie in Ihrem Alltagsleben durch Schmerzen im Bereich der Waden- oder Oberschenkelmuskulatur eingeschränkt, die bei körperlicher Belastung zunehmen und bei Belastungspausen pausieren?

- Nein (pAVK I)
- nicht in Ruhe, nur bei Gehstrecken > 200m (pAVK II a)
- nicht in Ruhe, bei Gehstrecken < 200 m (pAVK II b)
- Schmerzen in Ruhe (pAVK III)

9. Thesen

1. Langzeitdialysepatienten haben, vor allem aufgrund des verstärkten chronischen Inflammationsgeschehens, ein stark erhöhtes kardiovaskuläres Risiko, welches entscheidend zu der geringeren Lebenserwartung und der höheren Mortalität beiträgt.
2. Durch die größeren Poren hat die HCO-Membran einen höheren Cut-off-Wert als herkömmliche High-Flux-Membranen und ist somit in der Lage, höhermolekulare Stoffe aus dem Blut zu entfernen.
3. Es wurde eine prospektiv randomisierte doppelt-blinde klinische Studie zur Bewertung der antiinflammatorischen Wirkung der HCO-Membran an 19 Patienten durchgeführt, die Behandlungsphasen betragen jeweils 2 Wochen und umfassten 6 konsekutive Dialysen.
4. Es zeigte sich in dieser Studie keine signifikante Erniedrigung der gemessenen Entzündungsparameter im Serum (CRP, IL-1, IL-6, IL-10 und TNF-alpha) durch die HCO-Membran.
5. Weder die Anzahl der Gesamtmonozyten, weder die Monozytensubpopulationen noch der ACE-Enzymbesatz der Monozyten wurde signifikant in der HCO-Studienphase beeinflusst. Ein signifikanter, möglicherweise reaktiver, Anstieg der Absolutzahlen der Mo1-Subpopulation, zwei Wochen nach Behandlung mit der HCO-Membran, weist jedoch auf mögliche Effekte der Behandlung hin.
6. Es ist möglich, dass bei längeren Studienphasen und größeren Patientenzahlen die HCO-Membran eine signifikante Reduktion der Entzündungswerte bewirkt.
7. Über den HCO-Studienzeitraum zeigte sich ein signifikanter Albuminverlust, der jedoch klinisch vertretbar ist. Dadurch kam es zu einem beinahe signifikanten Anstieg der Cholinesterase aufgrund körpereigener Kompensationsmechanismen gegen den Albuminverlust.
8. Die HCO-Membran zeigte bis auf ein gehäuftes Auftreten von Schwindel und Hypotonie eine gute Verträglichkeit.

9. Der niedrigere Kt/V -Wert und ein am ehesten reaktiver Harnstoffabfall in der Wash-out beziehungsweise Nachbeobachtungsphase nach Einsatz der HCO-Membran beweist eine schlechtere Dialyseeffektivität des verwendeten HCO-Membranmoduls.

10. Diese Pilotstudie rechtfertigt die Durchführung einer längeren und größeren Studie sowie die Weiterentwicklung selektiverer High-Cut-off-Dialysatoren mit einer größeren Membranoberfläche.

10. Lebenslauf

Vor- und Zuname Felix Neugebauer
Geburtsdatum / Geburtsort 12.04.1987 / Halle (Saale)
Familienstand ledig
Hauptwohnsitz Reilstraße 120, 06114 Halle/S.

Schulbildung

1993-1997 Grundschule Heide-Nord/Halle
1997-1999 Förderstufe des Sportgymnasiums Halle
1999-2006 Sportgymnasium Halle

Hochschulbildung

10/2006 – 11/2012 Studium der Humanmedizin an der MLU Halle-Wittenberg
9/2008 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
11/2012 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
12/2012 Approbation als Arzt

Praktisches Jahr

8/2011 - 12/2011 Innere Medizin KH Martha-Maria Halle/Dölau
12/2011 – 3/2012 Diagnostische Radiologie KH Martha-Maria Halle/Dölau
3/2012 – 7/2012 Allgemein- und Viszeralchirurgie Helios Klinikum
Lutherstadt Eisleben

Sonstige Nebentätigkeiten

1999 – 2004 Leistungssport der Leichtathletik
11/2009 Beginn der hier vorliegenden klinisch-experimentellen
Doktorarbeit
10/2009 - 02/2011 Studentische Hilfskraft der neurologischen
Station des UKH

Arzt in Weiterbildung

Seit 1.3.2013 Assistenzarzt für Orthopädie und Unfallchirurgie Helios
Klinikum Lutherstadt Eisleben

Felix Neugebauer Halle (Saale), 16.10.2013

11. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die hier vorliegende Arbeit selbstständig und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Felix Neugebauer

Halle (Saale), 16.10.2013

12. Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit erkläre ich, dass ich nur diesen Antrag auf Zulassung zum Promotionsverfahren eingereicht habe. Die Arbeit wurde bisher weder im In- oder Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Felix Neugebauer

Halle (Saale), 16.10.2013

13. Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. M. Girndt für die Vergabe des Themas meiner Doktorarbeit und das in mich gesetzte Vertrauen bedanken. Er beantwortete stets engagiert meine zahlreichen Fragen und unterstützte mich mit der Durchsicht meiner Arbeit sehr.

Auch bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. R. Fiedler für die tatkräftige und nette Unterstützung bei der klinischen Arbeit im Dialysezentrum KfH Halle. Er war stets an meiner Arbeit interessiert und beriet mich in zahlreichen fachlichen Gesprächen.

Ein großer Dank geht auch an Dr. C. Ulrich und Beate Heinze, welche mich sehr bei den Laborarbeiten unterstützt haben. Die Teamarbeit war, über diesen langen Zeitraum, sehr hilfreich und studienfördernd.

Zuletzt möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern und meinen Großeltern für die enorme mentale und finanzielle Unterstützung bedanken, ohne die ich nicht in der Lage gewesen wäre, mein Studium und diese Arbeit zu absolvieren.