

Aus der Klinik für Nephrologie und internistische Intensivmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Der Einfluss von Dialysemembranen mit erhöhter Permeabilität
auf Inflammation und vaskuläre Verkalkung

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Kevin Kurt Willy
aus Detmold

Datum der Promotion: 07.12.2018

Inhaltsverzeichnis

Abstract (english)	3
Zusammenfassung (deutsch)	4
Einleitung	6
Wissenschaftlicher Hintergrund	6
Zielstellung	7
Referenzen des Autors	7
Methoden	8
Materialien	8
Zellkultur	8
Kalzifizierungsinduktion	8
Messung der Kalzifizierung	9
In Vitro-Dialyse	9
Interleukinmessungen in Serum, Dialysat und Zellkulturüberständen	9
Klinische Studie PERCI I	9
Klinische Studie PERCI II	10
Primäre und sekundäre Endpunkte der Studie PERCI II und deren Messung	11
Statistik	11
Ergebnisse	12
Diskussion	15
Limitationen	16
Ausblick	17
Literaturverzeichnis	18
Eidesstattliche Versicherung	22
Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen	23
Publikation 1	25
Publikation 2	32
Publikation 3	39
Lebenslauf	54
Publikationsliste	58
Danksagung	59

Abstract (english)

This thesis contains three peer-reviewed publications dealing with the influence of dialysis membranes with a higher permeability than conventional High-Flux (HF) filters on inflammation and calcification in dialysis patients *in vitro* and *in vivo*.

The main causes for mortality in chronic dialysis patients are cardiovascular diseases which are at least partially caused by inflammatory processes. Conventional HF filters do not remove proinflammatory and procalcific cytokines effectively so that they could be responsible for this situation. To address this problem, membranes with a higher cut-off have been developed. In scope of this work, these filters were tested concerning their ability to reduce inflammation and calcification *in vitro* and also later on *in vivo* in a clinical trial, PERCI II.

Serum for the *in vitro* experiments came from the PERCI I trial, in which a high cut-off (HCO) membrane was compared to a conventional HF membrane. This serum was examined regarding its procalcific characteristics in a cell culture model with vascular smooth muscle cells (VSMC). While the *in vitro* results showed a strongly reduced calcification with HCO serum and that VCAM could potentially play a role in this process, the clinical study was limited by a significant loss of albumin during haemodialysis.

Therefore, a second membrane with a pore size between HF and HCO has been developed and tested in an *in vitro* dialysis model, the medium cut-off (MCO) membrane. In this trial, MCO- and HCO-membranes were superior to the HF membrane regarding IL-6 clearance as well as *in vitro* calcification.

Following these findings, a second clinical trial, PERCI II, was conducted, which proved a significantly lower level of inflammation compared to HF, manifesting in a reduced concentration of mRNA of IL-6, TNF α and other important proinflammatory cytokines. In addition, albumin levels were stable compared to the start of the study after twelve weeks of MCO-dialysis, despite of initial drops after four weeks.

In conclusion, this work showed that membranes with a higher cut-off can influence the cytokine profile of dialysis serum and can also ameliorate vascular calcification *in vitro*. The MCO-membrane has also been evaluated *in vivo* over a 12-week period and can be used safely. These results encourage further research regarding the *in vitro* mechanism of vascular calcification as well as clinical trials with membranes with higher permeability.

Zusammenfassung (deutsch)

Diese Publikationspromotion umfasst drei in internationalen Fachzeitschriften veröffentlichte Artikel, die sich mit der Wirkung von Dialysemembranen mit erhöhter Permeabilität auf das Inflammationsniveau und die Gefäßmuskelverkalkung von Dialysepatienten *in vitro* und *in vivo* befassen.

Der Hauptgrund für die hohe Mortalität von chronischen Dialysepatienten sind die kardiovaskulären Folge- und Begleiterkrankungen, an deren Entstehung proinflammatorische Zytokine beteiligt sind. Herkömmliche High-Flux (HF)-Filter sind nicht ausreichend in der Lage, die chronisch erhöhte Konzentration von proinflammatorischen und prokalzifizierenden Zytokinen effektiv zu senken. Als mögliche Lösung für dieses Problem wurden Dialysemembranen mit höherer Permeabilität entwickelt. Diese wurden im Rahmen dieser Promotion auf ihre Fähigkeit zur Senkung von Inflammation und Kalzifizierung sowie später auch im Rahmen einer klinischen Studie, PERCI II, auf ihre Tauglichkeit in der klinischen Praxis getestet.

Patientenseren aus der klinische Studie PERCI I, die den klinischen Einsatz von High Cut-Off (HCO)-Membranen untersuchte, wurden im Zellkulturmodell auf ihre kalzifizierenden Eigenschaften geprüft. Während die *in vitro* Ergebnisse eine reduzierte Kalzifizierung glatter Gefäßmuskelzellen unter HCO-Serum zeigten und VCAM als ein möglicher verantwortlicher Akteur identifiziert werden konnte, war ein hoher Albuminverlust für den klinischen Einsatz dieser Membran limitierend. Um diesem Problem zu begegnen, wurde eine neue Membran (Medium Cut-Off (MCO)-Membran) entworfen, deren Porengröße zwischen HF und HCO liegt. Diese wurde zuerst in einem *in vitro*-Dialyse-Modell im Hinblick auf ihre IL-6 Clearance und ihre Wirkung auf die Kalzifizierung mit der HCO- und der HF-Membran verglichen. Es zeigte sich, dass beide größerporigen Membranen sowohl eine bessere IL-6 Clearance aufwiesen als auch die Gefäßmuskelkalzifizierung reduzieren konnten. In einer anschließenden, zweiten klinischen Studie, PERCI II, in der die MCO-Membran mit einem HF-Filter verglichen wurde, wurden die *in vitro* beobachteten Befunde *in vivo* bestätigt. Nach zwölf Wochen Dialyse mit dem MCO-Filter ließen sich signifikant niedrigere Spiegel von IL-6- und TNF α -mRNA im Serum der Patienten messen. Auch andere wichtige proinflammatorische Zytokine konnten effektiv gesenkt werden. Zudem war der Albuminverlust zwar in den ersten vier Wochen der Studie signifikant, normalisierte sich aber, sodass am Ende der Verlängerungsphase nach zwölf Wochen kein signifikanter Albuminverlust zu verzeichnen war.

Die Ergebnisse zeigen, dass Membranen mit höherer Permeabilität die Zytokinzusammensetzung in Dialysatoren verändern und sich damit auch positiv auf das Inflammationsniveau und die Verkalkungsneigung auswirken. Zudem kann die MCO-Membran sicher im klinischen Alltag eingesetzt werden. Die vorliegenden Ergebnisse rechtfertigen sowohl weitere klinische Studien mit härteren Endpunkten, als auch eine intensivere Erforschung der Beeinflussung von Inflammation und vaskulärer Verkalkung.

Einleitung

Wissenschaftlicher Hintergrund

Zurzeit sind in Deutschland ca. zwei Millionen Menschen chronisch niereninsuffizient und 80.000 Patienten dialysepflichtig [1]. Die Niereninsuffizienz ist meist Folge eines langjährigen Verlaufs von häufigen Krankheiten wie Bluthochdruck oder Diabetes mellitus. Die häufigsten Todesursachen unter Dialysepatienten sind kardiovaskulär oder infektiös bedingt [2, 3].

Inflammatorische Prozesse, die bei Niereninsuffizienten durch verschiedene Faktoren, wie zum Beispiel den ständigen Kontakt des Blutes mit Fremdmaterial während der Dialysesitzung, bedingt sind, scheinen kausal an der Pathogenese kardiovaskulärer Probleme bei Dialysepatienten beteiligt zu sein [4].

Zytokine und inflammatorische Mediatoren, die zu diesem Prozess beitragen, haben eine Molekülgröße von 15-45 kDa. Insbesondere TNF α und IL-6 sind zentrale Akteure im Prozess der Verkalkung von glatten Gefäßmuskelzellen (eng: vascular smooth muscle cells, VSMC) [5-8]. Kalzifizierungsinhibitoren wie das Matrix Gla Protein (MGP) oder Osteopontin (OPN) sind ebenfalls Teil dieses komplexen Prozesses. So konnte sowohl ein direkter inhibitorischer Effekt von MGP auf die Kalzifizierung nachgewiesen [9] als auch ein MGP-Mangel mit verstärkter *in vivo* Kalzifizierung assoziiert werden [10]. Auch Osteopontin konnte über die Inhibierung von Calciumphosphatablagerungen die Verkalkung reduzieren [11]. Da die derzeit verwendeten Hämodialysemembranen eine Entfernung der Moleküle wie zum Beispiel Interleukine, die in diesem Molekülgrößenbereich liegen, nur unzureichend abdecken, kann die Dialyse das chronisch erhöhte Inflammationsniveau der Patienten nur unzureichend absenken. Ein möglicher Ansatz, diesem Problem entgegenzutreten, ist der Einsatz von Dialysemembranen mit veränderter Porengröße. Ein Vertreter dieser Klasse, die HCO-Membran, kommt bisher nur in Patienten mit multiplem Myelom zur Reduktion der freien Leichtketten zum Einsatz [12]. In einer aktuellen Untersuchung konnte ein sehr guter Effekt von HCO-Membranen in dieser Fragestellung gezeigt werden [13], während die Ergebnisse großer Studien wie EuLite und Myre noch nicht publiziert sind. Dies ist auch unter kardiovaskulären Aspekten interessant, da das bei Patienten mit multiplem Myelom erhöhte Beta2-Mikroglobulin mit kardiovaskulären Erkrankungen in urämischen Patienten assoziiert ist und effektiv durch HCO gesenkt werden kann [14-16]. In einer kleinen Pilotstudie konnten Fiedler et al. außerdem zeigen, dass ein sicherer Gebrauch

der HCO-Membran auch über drei Wochen möglich ist und dass das CRP-Level im Serum der Patienten nach HCO-Dialyse gesenkt werden konnte [17].

Hieran schloss sich eine größere, randomisierte Studie (PERCI I) an, in der die HCO-Membran mit einer konventionellen HF Membran verglichen wurde. Hier zeigte sich, dass einige proinflammatorische Moleküle wie sVCAM oder die löslichen TNF α Rezeptoren 1 und 2 (sTNFR1 und 2) signifikant besser mit HCO entfernt werden konnten. Allerdings führte ein signifikanter Albuminverlust unter HCO zu einer erhöhten Rate an Albuminsubstitutionen und Dropouts aus diesem Arm der Studie [18]. Aus den Ergebnissen dieser Studie, PERCI I, resultierten die Hauptfragestellungen für die vorliegende Arbeit.

Zielstellung

Das übergeordnete Ziel der Promotion war zu untersuchen, ob und inwiefern es einen Einfluss von Dialysemembranen mit einer höheren Permeabilität auf die vaskuläre Verkalkung und den inflammatorischen Status von Dialysepatienten gibt. Um sich dieser Fragestellung widmen zu können, wurden zuerst ein Zellkulturmodell und die dazugehörigen Kalzifizierungsmessungen und Proteinbestimmungen in VSMC etabliert. Zusätzlich ging es auch um die Auflage einer zweiten klinischen Studie (PERCI II), um herauszufinden, ob es möglich ist, eine Membran mit erhöhter Porengröße zu konstruieren, ohne einen erhöhten Albuminverlust in Kauf nehmen zu müssen. Dieser Faktor ist essentiell, um einen sicheren Einsatz der Membran im klinischen Alltag zu ermöglichen.

Referenzen des Autors

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden, wie nachfolgend aufgeführt, veröffentlicht:

1. Zickler D, **Willy K**, Girndt M, Fiedler R, Martus P, Storr M, Schindler R: High cut-off dialysis in chronic haemodialysis patients reduces serum procalcific activity. *Nephrol Dial Transplant*. 2016 Oct;31(10):1706-12. doi: 10.1093/ndt/gfw293.
2. **Willy K**, Hulko M, Storr M, Speidel R, Gauss J, Schindler R, Zickler D: In Vitro Dialysis of Cytokine-Rich Plasma With High and Medium Cut-Off Membranes Reduces Its Procalcific Activity. *Artif Organs*. 2017 Sep;41(9):803-809. doi: 10.1111/aor.12884.

- Zickler D, Schindler R, **Willy K**, Martus P, Pawlak M, Storr M, Hulko M, Boehler T, Glomb MA, Liehr K, Henning C, Templin M, Trojanowicz B, Ulrich C, Werner K, Fiedler R, Girndt M: Medium Cut-Off (MCO) Membranes Reduce Inflammation in Chronic Dialysis Patients-A Randomized Controlled Clinical Trial. PLoS One. 2017 Jan 13;12(1):e0169024. doi: 10.1371/journal.pone.0169024.

Methoden

Materialien

Die in der Studie verwendeten Dialysatoren waren der Revaclear 400, Gambro Dialysatoren GmbH, Hechingen, Deutschland als Vertreter eines konventionellen HF Dialysefilters sowie der MCO-Ci 400, Gambro Dialysatoren GmbH, Hechingen, Deutschland. Die genaue Herkunft der Materialien kann dem Methodenteil des jeweiligen Manuskripts entnommen werden.

Zellkultur

Die humanen koronaren, glatten Gefäßmuskelzellen wurden von Lifeline Cell Technology (Frederick, MD, USA) erworben und im Labor passagiert. Die Kultivierung der VSMC erfolgte bei 37°C, 5% CO₂ in einem befeuchteten Inkubator. Die Zellen wurden in 100.000 Zellen/Well auf einer 24 Well-Platte ausgesät. Ein Mediumwechsel fand an jedem zweiten Tag statt. Zellkulturüberstände wurden am siebten Tag der Inkubation asserviert.

Kalzifizierungsinduktion

Um ein prokalzifizierendes Milieu zu schaffen, wurden, modifiziert nach Louvet et al. [19], dem Vasculife-Medium folgende Substanzen zugesetzt:

1,58 mM/L Calciumgluconat, 0,1 µM/L Dexamethason, 0,5 mM/L Ascorbinsäure und 2,5 mM/L Beta-Glycerolphosphat.

Zu diesem Medium wurde dann 5%ig Studienserum bzw. FCS als Kontrollmedium zugegeben.

Zur Überprüfung des kalzifizierenden Effektes der jeweiligen Substanz wurden sIL2R, sTNFR1, sTNFR2, VCAM1 und TNFα in unterschiedlichen Konzentration zum bestehenden Medium gegeben.

Messung der Kalzifizierung

Zur Quantifizierung der Kalzifizierung der VSMC nutzten wir zwei unterschiedliche Methoden. Die Aktivität der alkalischen Phosphatase (ALP) wurde am siebten Tag, die Alizarinfärbung am zehnten Tag der Inkubation gemäß den Herstelleranweisungen durchgeführt. Alizarin Rot (AZR) ist ein Farbstoff, der die Calciumablagerung je nach Konzentration anfärbt, sodass sich die Calciummenge quantifizieren lässt. Die Ergebnisse des jeweiligen Assays wurden mit der Zellviabilität zu diesem Zeitpunkt ins Verhältnis gesetzt. Die Zellviabilität wurde mit Hilfe eines wasserlöslichen Tetrazoliumsalzes (WST-8) gemessen.

In Vitro-Dialyse

Für die *in vitro*-Dialyse wurde Blut von gesunden Spendern entnommen, gepoolt und mit Escherichia Coli-Lipopolysaccharid stimuliert. Anschließend wurden 220 mL Humanplasma mit 10 mL/min und Dialyselösung mit 220 mL mit 25 mL/min auf der Dialysatseite im Gegenstrom unter Verwendung des entsprechenden Filters zirkuliert. Es wurde keine Ultrafiltration genutzt. Die *in vitro*-Dialyse wurde für 90 min fortgeführt, anschließend wurden die Proben tiefgefroren [20].

Interleukinmessungen in Serum, Dialysat und Zellkulturüberständen

Die Konzentrationen der unterschiedlichen Mediatoren wurden allesamt mit kommerziell erworbenen ELISAs gemäß dem jeweiligen Herstellerprotokoll durchgeführt. Zusätzlich zur Kalzifizierungsmessung mittels ALP und AZR wurde in diesem Versuch die Konzentration von Osteopontin und Matrix Gla-Protein im Zellkulturüberstand nach sieben Tagen Inkubation bestimmt. Diese beiden Proteine sind mit vaskulärer Verkalkung bzw. der Verhinderung dieser assoziiert. In der Literatur ist eine inhibitorische Wirkung von beiden Proteinen auf die vaskuläre Verkalkung beschrieben, sodass wir unser Modell auf eine mögliche Beteiligung dieser Proteine prüfen wollten [9, 11, 21-25].

Klinische Studie PERCI I

Die Blutproben wurden aus der klinischen Studie PERCI I gewonnen. In diese Studie wurden 43 chronische Dialysepatienten an zwei Standorten, Berlin und Halle an der Saale, eingeschlossen und für drei Wochen einem Cross-over-Design folgend, entweder mit einer HCO- oder einer HF-Membran dialysiert. Die Blutabnahme fand jeweils vor jeder

ersten Dialysesitzung nach dem Wochenende statt. Die Studie wurde im Einklang mit der Erklärung von Helsinki durchgeführt und von den Ethikkomitees der beiden Fakultäten genehmigt. Einschlusskriterien waren eine chronische Dialysepflichtigkeit seit mindestens drei Monaten und ein permanenter Dialysezugang. Ausschlusskriterien waren u.a. kein Vorliegen der schriftlichen Einwilligung, Schwangerschaft oder Stillzeit, klinisch manifeste Infektionen oder ein CRP-Wert >50 mg/L in den letzten zwei Wochen vor Studienbeginn. Außerdem waren Ausschlusskriterien: Immunsuppressive Medikation und gleichzeitige Teilnahme an einer Interventionsstudie. Die Seren von zwei Patienten wurden wegen Hepatitis in der Anamnese ausgeschlossen.

Klinische Studie PERCI II

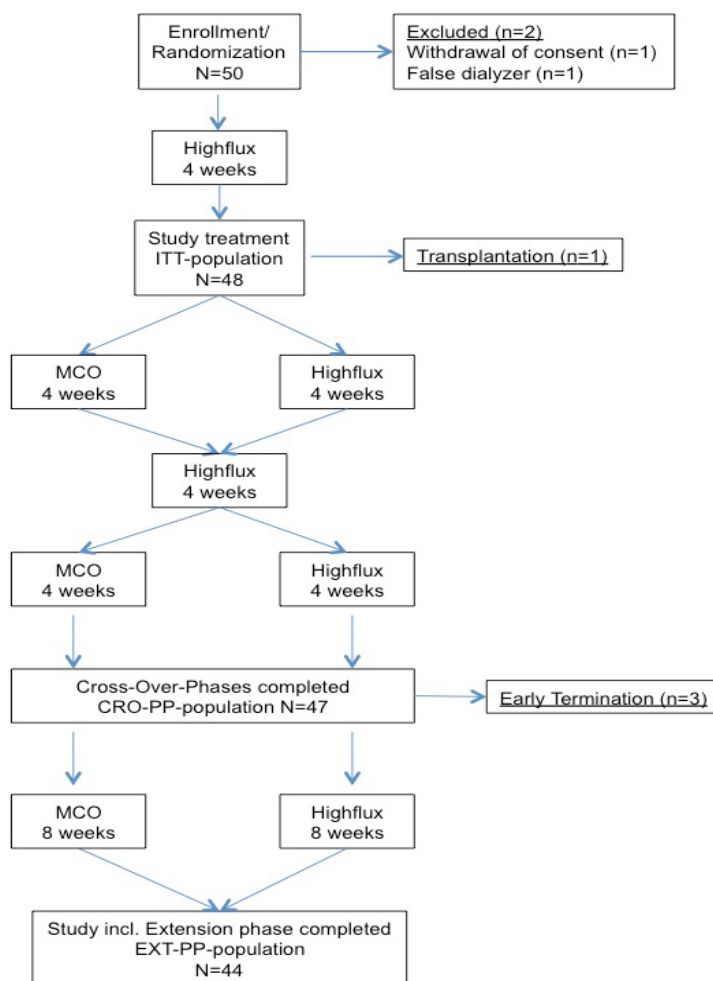


Abbildung 1: Studienablauf der Studie PERCI II [26]

Die klinische Studie PERCI II umfasste 50 chronische Hämodialysepatienten, die in den KfH Dialysezentren Halle an der Saale und Berlin randomisiert wurden. Die Intention-to-treat-Population bestand aus 48 Patienten, 47 beendeten die Cross-over-Phase, 44 Patienten auch die Extensionsphase (s. Abbildung 2). Die Studie wurde im Register ClinicalTrials.gov (NCT02084381) angemeldet. Die Studie wurde im Einklang mit der Erklärung von Helsinki durchgeführt und von den Ethikkomitees der beiden Fakultäten genehmigt.

Die Ein- und Ausschlusskriterien waren analog der Studie PERCI II.

Primäre und sekundäre Endpunkte der Studie PERCI II und deren Messung

Primäre Endpunkte der Studie waren die mRNA-Level von TNF α und IL-6 in peripheren mononukleären Zellen (PBMC) vor und nach jeder 4 Wochen Cross-over-Phase.

Sekundäre Endpunkte waren viele weitere pro- und antiinflammatorische Mediatoren, deren genaue methodische Bestimmung dem Hauptartikel entnommen werden kann [26].

Statistik

Die statistischen Analysen der ersten beiden Arbeiten wurden mit Graphpad Prism 6 durchgeführt [20, 27]. Die Analyse der klinischen Studie wurde mit SPSS für Windows (Version 21) am Institut für klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie an der Universität Tübingen vorgenommen [26].

Das Signifikanzniveau lag bei allen Erhebungen bei 0,05.

Ergebnisse

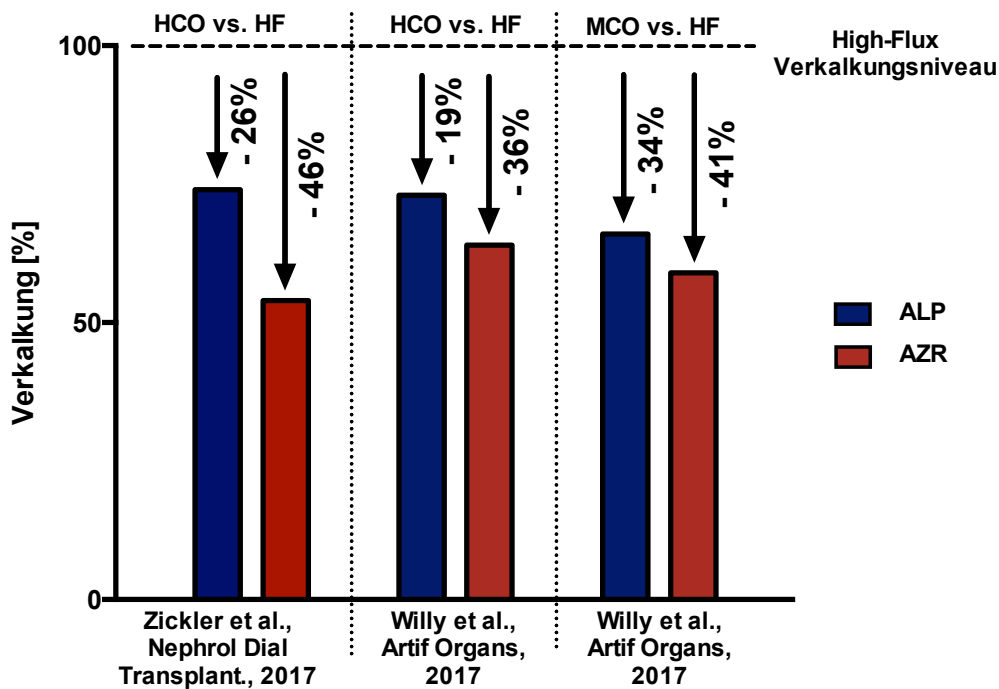


Abbildung 2: Prozentuale Reduktion der *in vitro* Gefäßverkalkung in den durchgeführten Studien im Vergleich der jeweiligen hochpermeablen Membran (HCO bzw. MCO) zu HF. Die Verkalkung in der HF-Gruppe ist jeweils als 100% definiert. Die Reduktion war in jeder einzelnen Untersuchung statistisch signifikant. In blau sind die ALP-Ergebnisse, in rot die AZR-Ergebnisse der jeweiligen Messung dargestellt.

Dialyse mit HCO Membranen reduziert die Verkalkung *in vitro*.

Die Verkalkung von glatten Muskelzellen ist nach Inkubation im ALP-Assay mit post-HCO-Dialyse-Serum 26% geringer als mit post-HF-Dialyse-Serum. In der AZR-Messung war die Verkalkung nach Inkubation mit HCO-Serum 46% geringer als nach Inkubation mit HF-Serum.

VCAM führt im *in vitro* Modell zu verstärkter Verkalkung glatter Muskelzellen.

Signifikant mit HCO gesenkt wurden in der PERCI I-Studie sIL2R, sTNFR1 und sTNFR2 und VCAM. [18] Während in unserem Zellkulturmodell sIL2R, sTNFR1 und 2 nicht zu einer verstärkten Kalzifizierung führten, zeigte sich für VCAM ein dosisabhängiger Anstieg der Kalzifizierung *in vitro*. Bei 10 µg/mL sVCAM, der höchsten getesteten Dosis, war die Kalzifizierung im ALP-Assay im Vergleich zur Kontrolle mehr als dreifach erhöht.

In vitro-Dialyse mit HCO- und MCO-Membranen verstärkt Clearance von IL-6.
In der *in vitro*-Dialyse zeigte sich für HCO und für MCO Membranen gleichermaßen ein signifikanter Abfall von IL-6 im Plasma mit korrespondierendem Anstieg von IL-6 auf der Dialysatseite. Während die IL-6 Konzentration mit der HF-Dialyse um 6% reduziert wurde, erreichten der HCO-Filter eine Reduktion von 21% und der MCO-Filter 20%.

Dialyse mit HCO- und MCO-Membranen reduziert die Verkalkung in vitro.
Die ALP-Messung zeigte eine starke Verkalkung nach Inkubation der VSMC mit prädialytischem Serum und mit HF Serum. Inkubation mit MCO- und HCO-Seren führte zu signifikant geringerer Kalzifizierung von VSMC. Ähnlich fiel das Ergebnis mit AZR aus. Zusätzlich war hier auch kein signifikanter Unterschied von HCO und MCO im Vergleich zum gesunden Plasma mehr festzustellen. Zudem zeigte sich im Zellkulturüberstand eine niedrigere Konzentration kalzifizierungsassoziierter Proteine wie MGP und OPN. Dies galt allerdings nur für die mit MCO, nicht für die mit HCO inkubierten Zellen.

Dialyse mit MCO-Membranen senkt die Konzentration mehrerer proinflammatorischer Zytokine in vivo signifikant ohne zu einem therapielimitierenden Albuminverlust zu führen.
Sowohl die Dialyse mit MCO- als auch mit HF-Dialysatoren führte zu einer Reduktion der mRNA Konzentrationen von TNF α und IL-6. MCO-Dialyse reduzierte diese allerdings deutlich stärker als die HF-Dialyse, womit der primäre Endpunkt der Studie erreicht wurde. Die prozentuale Reduktion der TNF α -mRNA lag für MCO bei 18,5% und für HF bei 14,3% nach vier Wochen und für die IL-6-mRNA bei 23,1% mit MCO und nur 3,5% mit HF. In der achtwöchigen Verlängerungsphase blieb diese Reduktion stabil, es kam zu keinem signifikanten Wiederanstieg der TNF α - und IL-6-mRNA. Zudem zeigten die Ergebnisse der Verlängerungsphase, dass die Konzentrationen anderer Solute, beispielsweise des sTNFR1, der freien Leichtketten und des Harnstoffes nach zwölf Wochen signifikant durch MCO gesenkt wurden, während es mit der HF-Dialyse zu keiner signifikanten Änderung kam. Die Albuminwerte fielen in den ersten vier Wochen mit MCO signifikant ab ($37,0 \pm 3,6$ auf $35,3 \pm 3,7$ g/L, $p < 0,01$), während die Werte für HF stabil blieben ($36,6 \pm 3,2$ auf $37,5 \pm 2,7$ g/L, $p > 0,05$). In der Verlängerungsphase wiederum stieg in der MCO-Gruppe die Albuminkonzentration an ($35,7$ auf $36,4$ g/L) und war hiermit nahezu auf Studienausgangsniveau. Die Albuminkonzentration von HF blieb auch in der Verlängerungsphase weiterhin stabil ($37,6$ auf $37,9$ g/L).). Es gab 16 schwerwiegende

Komplikationen, von denen keine auf den Albuminmangel oder auf das Studienprodukt zurückzuführen waren.

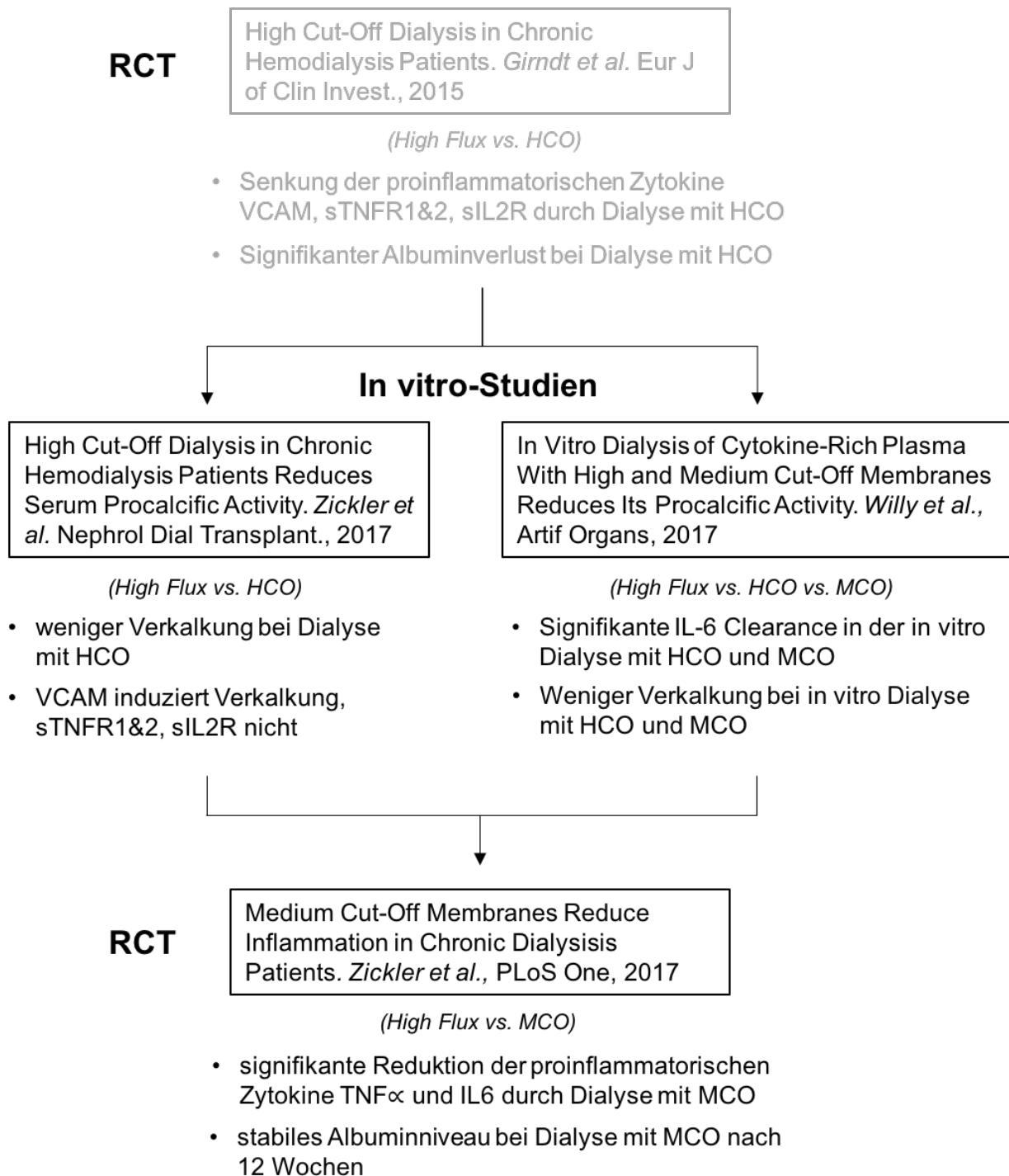


Abbildung 3: Übersicht über die einzelnen Teilarbeiten des Projektes in ihrer zeitlichen Abfolge und Darstellung der wichtigsten Ergebnisse. In verblaster Schrift abgebildet ist die dem Projekt vorausgegangene Studie, die nicht unmittelbar Teil dieser Arbeit ist.

Diskussion

Es lässt sich festhalten, dass alle Arbeiten zeigen, dass vaskuläre Verkalkung durch Dialyse mit neuartigen, größerporigen Membranen reduziert werden kann und dass die MCO-Membran für den längerfristigen klinischen Gebrauch sicher ist (vgl. Abb.3).

Die erste Arbeit zur HCO-Membran zeigte für *in vitro* Versuche mit Studienserum, dass HCO-Serum weniger Verkalkung im VSMC-Zellkulturmodell induziert als HF-Serum [27]. Darüber hinaus konnte für die Zytokine sIL2R und sTNFR1&2 *in vitro* kein kalzifizierungsinduzierender Effekt nachgewiesen werden, wohl aber für VCAM. Hier konnte eine dosisabhängige prokalzifizierende Wirkung festgestellt werden [28].

VCAM ist als Marker für subklinische Inflammation in Patienten mit KHK bereits beschrieben [29, 30] und könnte möglicherweise einen größeren Einfluss auf die progrediente Gefäßverkalkung bei Dialysepatienten haben als bisher angenommen. Um der erhöhten Albuminfiltration, einer Anwendungslimitation der HCO-Membran, zu begegnen, wurde eine neue Membran mit einer Porengröße entwickelt, die zwischen HCO und HF anzusiedeln ist [31]. Diese MCO-Membran soll die positiven Effekte der Zytokinreduktion, die in den *in vitro* Versuchen mit der HCO-Membran bereits zu beobachten waren, mit einer verminderten Albuminfiltration kombinieren. Die erstmalige Austestung dieser neuen Membran hinsichtlich ihrer Zytokin-clearance erfolgte in einem hierfür entworfenen *in vitro* Dialyse-Modell. Verglichen wurden MCO, HCO und HF bezüglich ihrer IL-6-Clearance sowie hinsichtlich ihrer verkalkungsinhibierenden Eigenschaften im bereits etablierten Zellkulturmodell. Hier zeigte sich, dass MCO genau wie HCO eine gesteigerte IL-6-Clearance im Vergleich zu HF aufweist und auch in der Lage ist, die verkalkungsinduzierende Wirkung des Dialyseserums zu senken [32]. Zusätzlich zur reduzierten Kalzifizierung kam in diesem Versuch auch eine reduzierte Konzentration der kalzifizierungsassoziierten Proteine MGP und OPN im Zellkulturüberstand hinzu. Diese waren im Falle von MCO-Dialyse mit den Ergebnissen der Kontrollseren gesunder Spender vergleichbar. Ein entscheidender Vorteil des *in vitro*-Dialyse-Modells war hierbei, dass der Effekt von Inflammation auf die *in vitro* Verkalkung isoliert betrachtet werden konnte.

Da durch den Versuchsaufbau die Entstehung von Urämietoxinen und anderen möglicherweise pathogenetisch relevanten Phänomenen wie Elektrolytverschiebungen oder Vitaminmangelercheinungen per se ausgeschlossen waren, war erhöhte Inflammation die einzige Erklärung für die beobachteten Ergebnisse [19, 33], sodass ein

kausaler Zusammenhang von reduzierter Inflammation und reduzierter Kalzifikation postuliert werden kann.

Anknüpfend an diese vielversprechenden *in vitro* Versuche wurde die klinische Studie PERCI II mit dem MCO-Filter durchgeführt. In dieser wurde der primäre Endpunkt erreicht. Als Ergebnis zeigte sich eine signifikante bessere Senkung der mRNA von TNF α und IL-6 durch MCO gegenüber HF, erreicht. Einige sekundäre Endpunkte, die ebenfalls für eine effektive Absenkung des proinflammatorischen und prokalzifizierenden Niveaus in Dialysepatienten sprechen, wurden ebenfalls erreicht.

Auch das in der PERCI I Studie aufgetretene Problem des Albuminverlustes konnte in PERCI II mit der MCO-Membran adäquat adressiert werden. Ein Albuminverlust trat zwar in der Frühphase bis zu vier Wochen nach Dialysebeginn mit statistisch signifikanten Verlusten auf, führte allerdings bei keinem Patienten zur Notwendigkeit eines Therapieabbruchs. In der Verlängerungsphase über zwölf Wochen stabilisierte sich der Albuminspiegel und stieg sogar wieder an, sodass das Serumalbumin am Ende der Studie wieder nahe des Ausgangsniveaus lag. Somit konnte die Studie PERCI II zeigen, dass ein sicherer klinischer Einsatz der MCO-Dialysemembran über einen längeren Zeitraum möglich ist und sie so eine sichere und potenziell vorteilhafte Alternative zu herkömmlichen Dialysemembranen darstellt [26, 34].

Insgesamt konnte also in allen drei Untersuchungen übereinstimmend nachgewiesen werden, dass die Gefäßverkalkung als Nebenwirkung der Dialyse durch neue Dialysemembranen mit größeren Poren *in vitro* reduziert werden kann. Außerdem konnte durch diese Membranen das Inflammationsniveau der Dialysepatienten auch *in vivo* deutlich gesenkt werden, wie die Studie PERCI II deutlich macht.

Die Ergebnisse unserer Studien stützen den bereits bekannten Befund, dass chronische Inflammation und das Ausmaß der Gefäßverkalkung in chronischen Dialysepatienten zu korrelieren scheinen [35-37].

Diese positiven Ergebnisse sollten Grundlage sowohl für weitere klinische Studien mit härteren Endpunkten, als auch für weiterführende Laborarbeiten zur Detektion kausaler Zusammenhänge in der Gefäßmuskelzellverkalkung sein.

Limitationen

Die vorliegenden Untersuchungen weisen auch einige Limitationen auf. In die beiden klinischen Studien PERCI I und II wurden mit jeweils ca. 40-50 Patienten recht wenige

Probanden eingeschlossen. Auch weisen die Studien keine harten klinischen Endpunkte, wie Mortalität oder Hospitalisierungsrate, auf. Dies ist allerdings in so einer frühen Phase der Einführung eines neuartigen Medizinproduktes nicht weiter erstaunlich und sollte Gegenstand weiterführender Studien sein.

Auch bezüglich der *in vitro* Untersuchungen gibt es Einschränkungen.

Ein kausaler Zusammenhang von VCAM und der Entstehung von vaskulärer Kalzifizierung konnte bisher, auch in unserer Untersuchung, nicht nachgewiesen werden. Der pathomechanistische Einfluss von VCAM auf vaskuläre Kalzifizierung wurde bisher noch nicht hinreichend untersucht.

Die oben genannte Tatsache, dass viele Faktoren Einfluss auf die VSMC Verkalkung haben könnten, und dass in unserem *in vitro* Dialysemodell nur die Inflammation untersucht wurde, vereinfacht den komplexen Vorgang der Verkalkung und ist somit schwierig mit der *in vivo* Situation zu vergleichen.

Außerdem wurde im *in vitro* Modell nur Plasma ohne Zellen dialysiert. Dies ist methodisch gut geeignet, um die isolierte Wirkung der unterschiedlichen Membranen auf die Clearance von IL-6 zu betrachten. Andererseits könnte es sein, dass Entzündungszellen während der Dialyse ebenfalls zu einer weiteren Zytokinsynthese stimuliert werden, was in unserem Modell nicht abgebildet wird.

Ausblick

Die positiven Ergebnisse der Untersuchungen und auch neue Entwicklungen auf diesem Forschungsgebiet bieten mehrere Anknüpfungspunkte für weitere Projekte.

Die Untersuchung des Einflusses dieser neuen Dialysemembranen, insbesondere der MCO-Membran, auf die Gefäßverkalkung *in vivo* war nicht Teil dieser Arbeit, wäre aber sicherlich von klinischer Bedeutung. Eine mögliche Option, dieser Fragestellung näher zu kommen, könnte die Messung der Pulswellengeschwindigkeit eines Dialysepatienten als Parameter für den Gefäßzustand sein. Die Pulswellengeschwindigkeit nimmt mit zunehmender Gefäßsteifigkeit zu, da die Gefäße ihre Windkesselfunktion verlieren. Hier konnten De Micco et al. bereits zeigen, dass eine tägliche Dialyse die Pulswellengeschwindigkeit senken kann [38]. Interessant wäre es nun auch zu sehen, ob der verwendete Filtertyp ebenfalls einen Einfluss auf die Pulswellengeschwindigkeit und damit auf die Gefäßverkalkung *in vivo* nehmen kann.

Zudem wurden für die Studien laborchemische Endpunkte gewählt, die adäquate Surrogatparameter für das Inflammationsniveau des Patienten sind. Für eine weiterführende klinische Studie wären allerdings eine größere Stichprobe sowie die Auswahl klinischer Endpunkte wie kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität wünschenswert und sind bei den vielversprechenden Ergebnissen der bisherigen Studien auch gerechtfertigt.

Bezüglich der Rolle von VCAM ist eine weitergehende pathomechanistische Untersuchung des Einflusses auf die Gefäßverkalkung anzustreben. Interessant wäre zudem, wie groß die Rolle von VCAM bei der Gefäßverkalkung von Dialysepatienten *in vivo* tatsächlich ist.

Literaturverzeichnis

1. Girndt M, Trocchi P, Scheidt-Nave C, Markau S, Stang A. The Prevalence of Renal Failure. Results from the German Health Interview and Examination Survey for Adults, 2008-2011 (DEGS1). *Dtsch Arztebl Int.* 2016;113(6):85-91. doi: 10.3238/arztebl.2016.0085. PubMed PMID: 26931624; PubMed Central PMCID: PMC4782264.
2. Vanholder R, Massy Z, Argiles A, Spasovski G, Verbeke F, Lameire N, Group EUTW. Chronic kidney disease as cause of cardiovascular morbidity and mortality. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association.* 2005;20(6):1048-56. doi: 10.1093/ndt/gfh813. PubMed PMID: 15814534.
3. Weiner DE, Tighiouart H, Amin MG, Stark PC, MacLeod B, Griffith JL, Salem DN, Levey AS, Sarnak MJ. Chronic kidney disease as a risk factor for cardiovascular disease and all-cause mortality: a pooled analysis of community-based studies. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN.* 2004;15(5):1307-15. PubMed PMID: 15100371.
4. Zimmermann J, Herrlinger S, Pruy A, Metzger T, Wanner C. Inflammation enhances cardiovascular risk and mortality in hemodialysis patients. *Kidney international.* 1999;55(2):648-58. doi: 10.1046/j.1523-1755.1999.00273.x. PubMed PMID: 9987089.
5. Aghagolzadeh P, Bachtler M, Bijarnia R, Jackson C, Smith ER, Odermatt A, Radpour R, Pasch A. Calcification of vascular smooth muscle cells is induced by secondary calciprotein particles and enhanced by tumor necrosis factor-alpha. *Atherosclerosis.* 2016. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.05.044. PubMed PMID: 27289275.
6. Tintut Y, Patel J, Parhami F, Demer LL. Tumor necrosis factor-alpha promotes in vitro calcification of vascular cells via the cAMP pathway. *Circulation.* 2000;102(21):2636-42. PubMed PMID: 11085968.
7. Deuell KA, Callegari A, Giachelli CM, Rosenfeld ME, Scatena M. RANKL enhances macrophage paracrine pro-calcific activity in high phosphate-treated smooth muscle cells: dependence on IL-6 and TNF-alpha. *Journal of vascular research.* 2012;49(6):510-21. doi: 10.1159/000341216. PubMed PMID: 22948607; PubMed Central PMCID: PMC4001814.

8. Callegari A, Coons ML, Ricks JL, Rosenfeld ME, Scatena M. Increased calcification in osteoprotegerin-deficient smooth muscle cells: Dependence on receptor activator of NF-kappaB ligand and interleukin 6. *Journal of vascular research*. 2014;51(2):118-31. doi: 10.1159/000358920. PubMed PMID: 24642764; PubMed Central PMCID: PMC4057981.
9. O'Young J, Liao Y, Xiao Y, Jalkanen J, Lajoie G, Karttunen M, Goldberg HA, Hunter GK. Matrix Gla protein inhibits ectopic calcification by a direct interaction with hydroxyapatite crystals. *Journal of the American Chemical Society*. 2011;133(45):18406-12. doi: 10.1021/ja207628k. PubMed PMID: 21961692.
10. Tantisattamo E, Han KH, O'Neill WC. Increased vascular calcification in patients receiving warfarin. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2015;35(1):237-42. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.304392. PubMed PMID: 25324574.
11. Steitz SA, Speer MY, McKee MD, Liaw L, Almeida M, Yang H, Giachelli CM. Osteopontin inhibits mineral deposition and promotes regression of ectopic calcification. *The American journal of pathology*. 2002;161(6):2035-46. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64482-3. PubMed PMID: 12466120; PubMed Central PMCID: PMC1850905.
12. Hutchison CA, Heyne N, Airia P, Schindler R, Zickler D, Cook M, Cockwell P, Grima D. Immunoglobulin free light chain levels and recovery from myeloma kidney on treatment with chemotherapy and high cut-off haemodialysis. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2012;27(10):3823-8. doi: 10.1093/ndt/gfr773. PubMed PMID: 22273664.
13. Gerth HU, Pohlen M, Gorlich D, Tholking G, Kropff M, Berdel WE, Pavenstadt H, Brand M, Kumpers P. Impact of High-Cut-Off Dialysis on Renal Recovery in Dialysis-Dependent Multiple Myeloma Patients: Results from a Case-Control Study. *PloS one*. 2016;11(5):e0154993. doi: 10.1371/journal.pone.0154993. PubMed PMID: 27152520; PubMed Central PMCID: PMC4859546.
14. Liabeuf S, Lenglet A, Desjardins L, Neiryck N, Glorieux G, Lemke HD, Vanholder R, Diouf M, Choukroun G, Massy ZA, European Uremic Toxin Work G. Plasma beta-2 microglobulin is associated with cardiovascular disease in uremic patients. *Kidney international*. 2012;82(12):1297-303. doi: 10.1038/ki.2012.301. PubMed PMID: 22895515.
15. Haase M, Bellomo R, Baldwin I, Haase-Fielitz A, Fealy N, Morgera S, Goehl H, Storr M, Boyce N, Neumayer HH. Beta2-microglobulin removal and plasma albumin levels with high cut-off hemodialysis. *The International journal of artificial organs*. 2007;30(5):385-92. PubMed PMID: 17551901.
16. Buus NH, Rantanen JM, Krag SP, Andersen NF, Jensen JD. Hemodialysis Using High Cut Off Filters in Light Chain Cast Nephropathy. *Blood purification*. 2015;40(3):223-31. doi: 10.1159/000439239. PubMed PMID: 26376291.
17. Fiedler R, Neugebauer F, Ulrich C, Wienke A, Gromann C, Storr M, Bohler T, Seibert E, Girndt M. Randomized controlled pilot study of 2 weeks' treatment with high cutoff membrane for hemodialysis patients with elevated C-reactive protein. *Artificial organs*. 2012;36(10):886-93. doi: 10.1111/j.1525-1594.2012.01479.x. PubMed PMID: 22845695.
18. Girndt M, Fiedler R, Martus P, Pawlak M, Storr M, Boehler T, Glomb MA, Liehr K, Henning C, Templin M, Trojanowicz B, Ulrich C, Werner K, Zickler D, Schindler R. High cut-off dialysis in chronic hemodialysis patients. *European journal of clinical investigation*. 2015. doi: 10.1111/eci.12559. PubMed PMID: 26519693.
19. Louvet L, Buchel J, Steppan S, Passlick-Deetjen J, Massy ZA. Magnesium prevents phosphate-induced calcification in human aortic vascular smooth muscle cells. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant*

- Association - European Renal Association. 2013;28(4):869-78. doi: 10.1093/ndt/gfs520. PubMed PMID: 23229924; PubMed Central PMCID: PMC3611891.
20. Willy K, Hulko M, Storr M, Speidel R, Gauss J, Schindler R, Zickler D. In Vitro Dialysis of Cytokine-Rich Plasma With High and Medium Cut-Off Membranes Reduces Its Procalcific Activity. *Artificial organs*. 2017. doi: 10.1111/aor.12884. PubMed PMID: 28524237.
21. Cassidy-Bushrow AE, Bielak LF, Levin AM, Sheedy PF, 2nd, Turner ST, Boerwinkle E, Lin X, Kardina SL, Peyser PA. Matrix gla protein gene polymorphism is associated with increased coronary artery calcification progression. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2013;33(3):645-51. doi: 10.1161/ATVBAHA.112.300491. PubMed PMID: 23307874; PubMed Central PMCID: PMC3586431.
22. Viegas CS, Rafael MS, Enriquez JL, Teixeira A, Vitorino R, Luis IM, Costa RM, Santos S, Cavaco S, Neves J, Macedo AL, Willems BA, Vermeer C, Simes DC. Gla-rich protein acts as a calcification inhibitor in the human cardiovascular system. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2015;35(2):399-408. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.304823. PubMed PMID: 25538207.
23. Speer MY, McKee MD, Guldberg RE, Liaw L, Yang HY, Tung E, Karsenty G, Giachelli CM. Inactivation of the osteopontin gene enhances vascular calcification of matrix Gla protein-deficient mice: evidence for osteopontin as an inducible inhibitor of vascular calcification in vivo. *The Journal of experimental medicine*. 2002;196(8):1047-55. PubMed PMID: 12391016; PubMed Central PMCID: PMC2194039.
24. Paloian NJ, Leaf EM, Giachelli CM. Osteopontin protects against high phosphate-induced nephrocalcinosis and vascular calcification. *Kidney international*. 2016;89(5):1027-36. doi: 10.1016/j.kint.2015.12.046. PubMed PMID: 27083280.
25. Giachelli CM, Speer MY, Li X, Rajachar RM, Yang H. Regulation of vascular calcification: roles of phosphate and osteopontin. *Circulation research*. 2005;96(7):717-22. doi: 10.1161/01.RES.0000161997.24797.c0. PubMed PMID: 15831823.
26. Zickler D, Schindler R, Willy K, Martus P, Pawlak M, Storr M, Hulko M, Boehler T, Glomb MA, Liehr K, Henning C, Templin M, Trojanowicz B, Ulrich C, Werner K, Fiedler R, Girndt M. Medium Cut-Off (MCO) Membranes Reduce Inflammation in Chronic Dialysis Patients-A Randomized Controlled Clinical Trial. *PloS one*. 2017;12(1):e0169024. doi: 10.1371/journal.pone.0169024. PubMed PMID: 28085888.
27. Zickler D, Willy K, Girndt M, Fiedler R, Martus P, Storr M, Schindler R. High cut-off dialysis in chronic haemodialysis patients reduces serum procalcific activity. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2016. doi: 10.1093/ndt/gfw293. PubMed PMID: 27445317.
28. Zickler D, Willy K, Girndt M, Fiedler R, Martus P, Storr M, Schindler R. High cut-off dialysis in chronic haemodialysis patients reduces serum procalcific activity. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2016;31(10):1706-12. doi: 10.1093/ndt/gfw293. PubMed PMID: 27445317.
29. van Eupen MG, Schram MT, Colhoun HM, Scheijen JL, Stehouwer CD, Schalkwijk CG. Plasma levels of advanced glycation endproducts are associated with type 1 diabetes and coronary artery calcification. *Cardiovasc Diabetol*. 2013;12:149. doi: 10.1186/1475-2840-12-149. PubMed PMID: 24134530; PubMed Central PMCID: PMCPMC4015708.
30. Rabb H, Calderon E, Bittle PA, Ramirez G. Alterations in soluble intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in hemodialysis patients. *American journal of*

kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation. 1996;27(2):239-43. PubMed PMID: 8659500.

31. Boschetti-de-Fierro A, Voigt M, Storr M, Krause B. MCO Membranes: Enhanced Selectivity in High-Flux Class. *Scientific reports*. 2015;5:18448. doi: 10.1038/srep18448. PubMed PMID: 26669756; PubMed Central PMCID: PMC4680880.
32. Willy K, Girndt M, Storr M, Fiedler R, Martus P, Schindler R, Zickler D. SP463HEMODIALYSIS WITH HIGH CUT-OFF DIALYSIS MEMBRANES PREVENTS CALCIFICATION AND APOPTOSIS OF VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELLS. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2016;31(suppl_1):i247-i. doi: 10.1093/ndt/gfw172.03.
33. Yamada S, Tokumoto M, Tatsumoto N, Taniguchi M, Noguchi H, Nakano T, Masutani K, Ooboshi H, Tsuruya K, Kitazono T. Phosphate overload directly induces systemic inflammation and malnutrition as well as vascular calcification in uremia. *American journal of physiology Renal physiology*. 2014;306(12):F1418-28. doi: 10.1152/ajprenal.00633.2013. PubMed PMID: 24808541.
34. Kirsch AH, Lyko R, Nilsson LG, Beck W, Amdahl M, Lechner P, Schneider A, Wanner C, Rosenkranz AR, Krieter DH. Performance of hemodialysis with novel medium cut-off dialyzers. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2016. doi: 10.1093/ndt/gfw310. PubMed PMID: 27587605.
35. Tbahriti HF, Meknassi D, Moussaoui R, Messaoudi A, Zemour L, Kaddous A, Bouchenak M, Mekki K. Inflammatory status in chronic renal failure: The role of homocysteinemia and pro-inflammatory cytokines. *World J Nephrol*. 2013;2(2):31-7. doi: 10.5527/wjn.v2.i2.31. PubMed PMID: 24175263; PubMed Central PMCID: PMC3782222.
36. Sun J, Axelsson J, Machowska A, Heimburger O, Barany P, Lindholm B, Lindstrom K, Stenvinkel P, Qureshi AR. Biomarkers of Cardiovascular Disease and Mortality Risk in Patients with Advanced CKD. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. 2016;11(7):1163-72. doi: 10.2215/CJN.10441015. PubMed PMID: 27281698; PubMed Central PMCID: PMC4934843.
37. Panichi V, Rizza GM, Paoletti S, Bigazzi R, Aloisi M, Barsotti G, Rindi P, Donati G, Antonelli A, Panicucci E, Tripepi G, Tetta C, Palla R, Group RS. Chronic inflammation and mortality in haemodialysis: effect of different renal replacement therapies. Results from the RISCAVID study. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2008;23(7):2337-43. doi: 10.1093/ndt/gfm951. PubMed PMID: 18305316.
38. Di Micco L, Torraca S, Sirico ML, Tartaglia D, Di Iorio B. Daily dialysis reduces pulse wave velocity in chronic hemodialysis patients. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension*. 2012;35(5):518-22. doi: 10.1038/hr.2011.230. PubMed PMID: 22278627.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Kevin Kurt Willy, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

Der Einfluss von Dialysemembranen mit erhöhter Permeabilität auf Inflammation und vaskuläre Verkalkung

selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet. Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen

Kevin Kurt Willy hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Zickler D, **Willy K**, Girndt M, Fiedler R, Martus P, Storr M, Schindler R: High cut-off dialysis in chronic haemodialysis patients reduces serum procalcific activity. Nephrol Dial Transplant. 2016 Oct;31(10):1706-12. doi: 10.1093/ndt/gfw293

Beitrag im Einzelnen:

- Mitarbeit bei der Planung der experimentellen Arbeiten
- Koordination und Durchführung der experimentellen Arbeiten
- Statistische Auswertung der Ergebnisse und Erstellung aller Abbildungen
- Literaturrecherche
- Mitarbeit beim Verfassen des Artikels und Bearbeitung der Revision

Publikation 2: **Willy K**, Hulko M, Storr M, Speidel R, Gauss J, Schindler R, Zickler D: In Vitro Dialysis of Cytokine-Rich Plasma With High and Medium Cut-Off Membranes Reduces Its Procalcific Activity. Artif Organs. 2017 Sep;41(9):803-809. doi: 10.1111/aor.12884

Beitrag im Einzelnen:

- Planung der experimentellen Arbeiten
- Koordination und Durchführung
- Statistische Auswertung der Ergebnisse und Erstellung aller Abbildungen
- Literaturrecherche
- Verfassen des Artikels und Bearbeitung der Revision

Publikation 3: Zickler D, Schindler R, **Willy K**, Martus P, Pawlak M, Storr M, Hulko M, Boehler T, Glomb MA, Liehr K, Henning C, Templin M, Trojanowicz B, Ulrich C, Werner K, Fiedler R, Girndt M: Medium Cut-Off (MCO) Membranes Reduce Inflammation in Chronic Dialysis Patients-A Randomized Controlled Clinical Trial. PLoS

Beitrag im Einzelnen:

- Mitarbeit bei Planung sowie Durchführung der klinischen Studie (Verarbeitung der Patientenseren, Dokumentation von Adverse Events)
- Mitarbeit bei der Auswertung und Interpretation der Daten sowie bei der Erstellung von Abbildungen und Tabellen
- Literaturrecherche
- Mitarbeit beim Verfassen des Artikels und Bearbeitung der Revision

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden

Publikation 1

Zickler D, **Willy K**, Girndt M, Fiedler R, Martus P, Storr M, Schindler R. *High cut-off dialysis in chronic haemodialysis patients reduces serum procalcific activity*. Nephrol Dial Transplant. 2016, Oct; 31(10):1706-12. doi:10.1093/ndt/gfw293

<https://doi.org/10.1093/ndt/gfw293>

Publikation 2

Willy K, Hulko M, Storr M, Speidel R, Gauss J, Schindler R, Zickler D. *In Vitro Dialysis of Cytokine Rich Plasma With High and Medium Cut-Off Membranes Reduces Its Procalcific Acitivity*, *Artif Organs*. 2017 May 19. doi: 10.1111/aor.12884

<https://doi.org/10.1111/aor.12884>

Publikation 3

Zickler D, Schindler R, **Willy K**, Martus P, Pawlak M, Storr M, Hulko M, Boehler T, Glomb MA, Liehr K, Henning C, Templin M, Trojanowicz B, Ulrich C, Werner K, Fiedler R, Girndt M. *Medium Cut-Off (MCO) Membranes Reduce Inflammation in Chronic Dialysis Patients – A Randomized Controlled Clinical Trial*, PLoS One. 2017 Jan13; 12(1). doi:10/1371/journal.pone.0169024

<https://doi.org/10/1371/journal.pone.0169024>

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

Willy K, Kevin Willy, Matthias Girndt, Jakob Voelkl, Roman Fiedler, Peter Martus, Markus Storr, Ralf Schindler, Daniel Zickler. *Expanded Hemodialysis Therapy of Chronic Hemodialysis Patients Prevents Calcification and Apoptosis of VSMC In Vitro*. *Blood Purif* 2018;45:131–138. doi: 10.1159/000484925, IF 1.535

Zickler D, Luecht C, **Willy K**, Chen L, Witowski J, Girndt M, Fiedler R, Storr M, Kamhieh-Milz J, Schoon J, Geissler S, Ringdén O, Schindler R, Moll G, Dragun D, Catar R. *TNF-alpha in uraemic serum promotes osteoblastic transformation and calcification of vascular smooth muscle cells via ERK and AP-1/c-FOS-mediated induction of IL-6 expression*. *Nephrol Dial Transplant*. 2017 Dec 8. doi: 10.1093/ndt/gfx316, IF 4.470

Trojanowicz B, Ulrich C, Fiedler R, Martus P, Storr M, Boehler T, Werner K, Hulko M, Zickler D, **Willy K**, Schindler R, Girndt M. *Modulation of leucocytic angiotensin-converting enzymes expression in patients maintained on high-permeable haemodialysis*. *Nephrol Dial Transplant*. 2017 Jul 19. doi:10.1093/ndt/gfx206, IF 4.470

Willy K, Hulko M, Storr M, Speidel R, Gauss J, Schindler R, Zickler D. *In Vitro Dialysis of Cytokine Rich Plasma With High and Medium Cut-Off Membranes Reduces Its Procalcific Activity*, *Artif Organs*. 2017 May 19. doi: 10.1111/aor.12884, IF 2.403

Zickler D, Schindler R, **Willy K**, Martus P, Pawlak M, Storr M, Hulko M, Boehler T, Glomb MA, Liehr K, Henning C, Templin M, Trojanowicz B, Ulrich C, Werner K, Fiedler R, Girndt M. *Medium Cut-Off (MCO) Membranes Reduce Inflammation in Chronic Dialysis Patients – A Randomized Controlled Clinical Trial*, *PLoS One*. 2017 Jan 13; 12(1). doi:10.1371/journal.pone.0169024, IF 3.057

Trojanowicz B, Ulrich C, Fiedler R, Storr M, Boehler T, Martus P, Pawlak M, Glomb MA, Henning C, Templin M, Werner K, Zickler D, **Willy K**, Schindler R, Girndt M. *Impact of serum and dialysates from chronic hemodialysis patients maintained on high cut-off membranes on inflammation profile in human THP-1 monocytes*. *Hemodial Int*. 2016 Sep 26. doi:10.1111/hdi.12494, IF 1.353

Zickler D, **Willy K**, Girndt M, Fiedler R, Martus P, Storr M, Schindler R. *High cut-off dialysis in chronic haemodialysis patients reduces serum procalcific activity*. *Nephrol Dial Transplant*. 2016, Oct; 31(10):1706-12. doi:10.1093/ndt/gfw293, IF 4.470

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich unterstützt und mir diese Arbeit ermöglicht haben.

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. Ralf Schindler, meinen Doktorvater, für die Überlassung des sehr spannenden Forschungsthemas, die vielen anregenden Diskussionen und insbesondere die Hilfestellung bei der stetigen Verbesserung der Dissertationsschrift.

Ein großes Danke an Dr. Daniel Zickler, der mir tolle Einblicke in die klinische Forschung gegeben hat und von dem ich sehr viel lernen konnte und der mir die Mitarbeit in schönen Projekten ermöglicht hat. In der langen gemeinsamen Zusammenarbeit ist er mir nicht nur Kollege, sondern auch Freund geworden.

Danke auch an alle Mitglieder der AG Dragun für den regen Austausch und die gute Zusammenarbeit.

Ganz lieben Dank auch an meine Eltern für die Ermöglichung des Studiums und die stetige, nie nachlassende Unterstützung und den Zuspruch.

Vielen, vielen Dank auch an meine Partnerin Daniela Deharde, die mich sowohl mit Ihrem sachkundigen Rat als auch mit Ihrer Liebe immer unterstützt.