

Aus dem  
CharitéCentrum 13 für Innere Medizin mit Gastroenterologie und Nephrologie  
Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Nephrologie und Internistische Intensivmedizin

Direktor: Professor Dr. med. Kai-Uwe Eckardt

# **Habilitationschrift**

## **Einfluss hochdurchlässiger Dialysemembranen auf den Prozess der Inflammation und vaskulären Kalzifikation in chronischen Dialysepatient\*innen**

zur Erlangung der Lehrbefähigung

für das Fach Innere Medizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät

Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Daniel Zickler

eingereicht: Mai 2022

Dekan: Prof. Dr. Axel Radlach Pries

1. Gutachter\*in: Prof. Dr. Timm Westhoff
2. Gutachter\*in: Prof. Dr. Alexander Rosenkranz

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>3</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>4</b>
<b>2 Fragestellung.....</b>	<b>8</b>
<b>3 Zusammenfassung der Ergebnisse eigener Arbeiten .....</b>	<b>9</b>
3.1 Einfluss hochdurchlässiger Membranen im In-Vitro-Dialyse-Modell.....	9
3.2 Einfluss von HCO-Membranen auf die Inflammation in Dialysepatienten.....	17
3.3 Einfluss von HCO-Membranen auf die Verkalkung in Dialysepatienten .....	27
3.4 Effekt von Medium Cut-Off Membranen auf Inflammation in chronischen Dialysepatienten.....	36
3.5 Effekt von Medium Cut-Off Membranen auf die In Vitro Gefäßverkalkung .....	53
<b>4 Diskussion.....</b>	<b>63</b>
<b>5 Zusammenfassung.....</b>	<b>71</b>
<b>6 Literatur .....</b>	<b>72</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>77</b>
<b>Erklärung .....</b>	<b>78</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Da	Dalton
kDA	Kilodalton
MCO	Medium Cut-Off
HCO	High Cut-Off
HDF	Hämodiafiltration
HD	Hämodialyse
IL	Interleukin
PD	Peritonealdialyse
PERCI	Permeability enhancement reduces chronic inflammation

# 1 Einleitung

Die Mortalität chronischer Dialysepatienten ist im Vergleich zur gesunden Bevölkerung deutlich erhöht. Auch wenn die Gesamtmortalität der Dialysepopulation in den letzten Jahren leicht zurückgegangen ist, verbleibt sie insgesamt auf einem hohen Niveau mit 164.6 Todesfällen pro 1000 Patientenjahren im Jahr 2018. Im Vergleich zur Normalbevölkerung hatten männliche Dialysepatienten in der Altersgruppe von 66-74 ein mehr als zehnfach erhöhtes Sterberisiko. In der Altersgruppe 40-44jähriger Männer hatten chronische Dialysepatienten eine um 25 Jahre reduzierte Lebenserwartung im Vergleich zur Nicht-Dialysepopulation, bei den Frauen betrug der Unterschied sogar mehr als 30 Jahre.

Hauptursächlich hierfür ist die deutlich erhöhte Rate an kardiovaskulären Ereignissen. Die Gesamtprävalenz für kardiovaskuläre Begleiterkrankungen betrug in der Dialysepopulation bei 77%. (1) (2)

Zu der hohen Prävalenz kardiovaskulärer Begleiterkrankungen tragen die häufigsten renalen Grunderkrankungen, Diabetes mellitus und die arterielle Hypertonie entscheidend bei.

Aber auch unabhängig von diesen beiden Grunderkrankungen ist die Prävalenz kardiovaskulärer Erkrankungen in Dialysepopulation deutlich erhöht.

Neben den klassischen Risikofaktoren, die bei Dialysepatienten naturgemäß eine höhere Prävalenz haben, befördern andere Faktoren, die mit voranschreitender chronischer Niereninsuffizienz und entsprechendem Retentionsniveau urämischer Toxine einhergehen, das Voranschreiten von Arterio- und Atherosklerose sowie die Herzinsuffizienz.

Das urämische Syndrom ist definiert als Retention harnpflichtiger Substanzen. Mit zunehmender Einschränkung der Nierenfunktion kommt es zu einer Akkumulation von Urämietoxinen mit weitreichenden Konsequenzen auf Homöostase und Organfunktion.

Urämietoxine sind nach einer Definition der EuTOX Gruppe in drei Gruppen eingeteilt. (3) Wasserlösliche Substanzen mit einem Molekulargewicht <500 Dalton (Da) werden als kleine Moleküle bezeichnet. Eine weitere Gruppe stellen die Proteingebundenen Solute dar, die der Dialyse nur sehr eingeschränkt zugänglich sind.

Die dritte Gruppe besteht aus mittelmolekularen Urämietoxinen, die im Bereich 500 Da -60 KDa liegen. In diesem Bereich liegen zahlreiche proinflammatorisch wirkender Moleküle wie IL-6, TNF alpha, Interleukin 1 und viele mehr.

Chronische Dialysepatienten haben ein deutlich erhöhtes Inflammationsniveau. (4) (5) Hierzu tragen zahlreiche Umstände bei. Auf der einen Seite liegen sie in der reduzierten renalen

<b>Molekül (Molekulargewicht)</b>	<b>Assoziation</b>	<b>Pathomechanismus</b>
IL-18 (24 kDa)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kardiovaskuläre Mortalität</li> <li>• Aortale Pulswellengeschwindigkeit</li> <li>• Plaqueinstabilität</li> <li>• Aortenverkalkung (thorakal)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Induktion von Interferon-<math>\gamma</math></li> <li>• Kollagen- und Lipidablagerung</li> </ul>
IL-6 (25 kDa)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kardiovaskuläre Mortalität</li> <li>• Linksventrikuläre Hypertrophie</li> <li>• Systolische Dysfunktion</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Koordination lokaler proinflammatorischer Zellen</li> <li>• Lymphozytenproliferation</li> </ul>
IL-1 $\beta$ (31kDa)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Linksventrikuläre Hypertrophie</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Verstärkung lokaler Inflamationsreaktion</li> </ul>
TNF- $\alpha$ (17 kDa)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Linksventrikuläre Hypertrophie</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Verstärkung kardialer Inflammation</li> </ul>
Pentraxin-3 (40 kDa)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Plaqueinstabilität</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infiltration Neutrophiler in atherosklerotische Plaques, prothrombotische Effekte</li> </ul>
Prolactin (22kDa)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kardiovaskuläre Mortalität</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proliferation glatter Muskelzellen</li> <li>• Vasokonstriktion</li> </ul>
AGEs (12 kDa)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kardiovaskuläre Mortalität</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Induktion von oxidativem Stress</li> <li>• Inflammation</li> <li>• Endotheliale Dysfunktion</li> </ul>
Visfatin (53 kDa)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Instabile atherosklerotische Plaques</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Induktion inflammatorischer Makrophagen</li> </ul>
Adiponectin (30kDa)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Atherosklerotische Plaques</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Expression von Adhäsionsmolekülen</li> </ul>
Leptin (16 kDa)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Atherosklerotische Plaques</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Expression von Adhäsionsmolekülen,</li> </ul>

## Einleitung

		Produktion von MCP-1, IL-6, TNF $\alpha$
FGF-2 (17 kDa)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kardiale Hypertrophie</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kardiomyozyten Hypertrophie</li> </ul>
FGF-23 (22 kDa)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kardiale Hypertrophie</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kardiomyozyten Hypertrophie</li> </ul>

Zytokinclearance begründet. Weiterhin können renale Grunderkrankungen sowie andere Komorbiditäten die chronische Inflammation unterhalten. Den wesentlichen Beitrag jedoch tragen dialyse-assoziierte Faktoren bei, da Urämie, das Vorhandensein von Endotoxin in der Dialysierflüssigkeit sowie Katheterinfektionen und vieles mehr zur chronischen Aktivierung von Monozyten mit entsprechender Zytokinproduktion führen. Diesbezüglich sind in den letzten Jahrzehnten mit der Reduktion an Kathetern, der Einführung von ultrareinem Dialysat große Fortschritte gemacht worden. (6) Nichtsdestotrotz bleibt die Mikroinflammation ein prävalentes Phänomen in der Dialysepopulation. Ein entscheidender Faktor ist hierbei die mangelnde Entfernung mittelmolekularer Urämietoxine durch die konventionelle Dialysetherapie. Hier handelt es sich um eine heterogene Gruppe an Moleküle, von denen viele proinflammatorische und pro-arteriosklerotische Effekte zeigen. Eine Übersicht findet sich in Tabelle 1 modifiziert nach Wolley et al. (7)

Mit der Einführung von poröseren High-Flux-Membranen hoffte man, eine bessere Clearance dieser Mittelmoleküle und möglicherweise auch eine Reduktion der Mortalität erreichen zu können. Primäres Zielmolekül war bei der Entwicklung der High-Flux-Membranen das Beta-2-Mikroglobulin, welches eine Molekülmasse von 11800 Dalton aufweist. Jedoch zeigten die beiden prospektiven randomisierten Studien, die den Einsatz von High-Flux-Membranen vs. Low-Flux-Membranen untersuchten, enttäuschende Ergebnisse.

So zeigte die prospektive HEMO-Studie keinen Unterschied im Hinblick auf die Gesamtmortalität. In Post Hoc Analysen zeigte sich jedoch ein möglicher Benefit für kardiovaskuläre Ereignisse und Hospitalisierungen. (8)

Die zweite prospektive randomisierte Studie, die Membrane Permeability Outcome Study, zeigte ebenfalls keinen eindeutigen Effekt für die gesamte Dialysepopulation. Jedoch konnte hier eine Mortalitätsreduktion für Patienten mit Albumin <4 g/dl und Diabetiker gezeigt werden. (9)

Auch wenn die beiden Studien keinen eindeutigen Effekt zeigten, so finden High-Flux-Membranen in Europa mittlerweile große Verbreitung.

## Einleitung

Als weitere Möglichkeit, mittelmolekulare Substanzen verbessert zu entfernen wurde der Effekt der Hämodiafiltration untersucht und mit Highflux-Hämodialyse verglichen.

Hier zeigte sich in verschiedenen Studien ebenfalls kein eindeutiger Vorteil im Hinblick auf Mortalität. Lediglich in Subgruppen, bei denen ein großes Substitutionsvolumen umgesetzt wurde, konnte ein Benefit nachgewiesen werden. (10) (11) (12) (13) (14) (15)

Da Inflammation und kardiovaskuläre Mortalität trotz aller oben genannten Maßnahmen und Fortschritte weiterhin in der Dialysepopulation stark prävalent sind, wurden Dialysefilter mit einem größeren Cut-Off mit dem Ziel der verbesserten Clearance mittelmolekularer Substanzen entwickelt.

Es wurden High-Cut-Off-Membranen entwickelt, deren Porengröße die Clearance von Molekülen mit einer Größe von bis zu 45 kDa ermöglicht. (16) Später wurden Medium Cut-Off Membranen mit einem steileren Cut-Off entwickelt, in der Hoffnung einerseits ähnlich den High-Cut-Off Membranen die Clearance andererseits eine geringere Durchlässigkeit für Albumin zu erzielen. (17)

Ob der Einsatz von HCO – bzw. MCO Membranen die chronische Inflammation und die Gefäßverkalkung in Dialysepatienten beeinflusst, ist aktuell nicht eindeutig geklärt.

## 2 Fragestellung

Es ergeben sich daher für diese Arbeit folgende Fragen:

1. Kann die Entfernung von Zytokinen mittels großporiger Dialysefilter im In-Vitro-Dialyse-Modell erreicht werden und damit die prokalzifizierende Wirkung abschwächen?
2. Kann mit HCO- bzw. MCO-Dialyse eine stärkere Reduktion der Mikroinflammation erzielt werden als mit High-Flux-Dialyse?
3. Kann mit HCO- bzw. MCO-Dialyse die prokalzifizierende Wirkung von Urämieserum auf glatte Muskelzellen in vitro reduziert werden?
4. Sind im mittelmolekularen Bereich Urämietoxine enthalten, die in besonderer Weise die In Vitro Verkalkung induzieren bzw. verstärken?



### **3 Zusammenfassung der Ergebnisse eigener Arbeiten**

#### **3.1 Einfluss hochdurchlässiger Membranen im In-Vitro-Dialyse-Modell**

Das Niveau proinflammatorischer Interleukine ist bei chronischen Dialysepatienten deutlich erhöht. Sie tragen maßgeblich zur Arteriosklerose der Dialysepopulation bei. Um den In Vitro Effekt unterschiedlicher Dialysemembranen auf die Konzentration proinflammatorischer Interleukine und deren Auswirkung auf die Gefäßverkalkung in vitro zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit Vollblut gesunder Probanden mit Endotoxin inkubiert. Das hieraus gewonnene Plasma wurde in einem Mini-Dialyse-Kreislauf mit unterschiedlichen Dialysemembranen behandelt. Anschließend wurde das Plasma im Hinblick auf prokalzifizierende Effekte in einem In Vitro Kalzifizierungsmodell untersucht.

Der nachfolgende Text entspricht dem Abstrakt aus der Arbeit 1.

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

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

„Recently developed high-flux (HF) dialysis membranes with extended permeability provide better clearance of middle-sized molecules such as interleukins (ILs). Whether this modulation of inflammation influences the procalcific effects of septic plasma on vascular smooth muscle cells (VSMCs) is not known. To assess the effects of high cut-off (HCO) and medium cut-off (MCO) membranes on microinflammation and in vitro vascular calcification we developed a miniature dialysis model. Plasma samples from lipopolysaccharide-spiked blood were dialyzed with HF, HCO, and MCO membranes in an in vitro miniature dialysis model. Afterwards, IL-6 concentrations were determined in dialysate and plasma. Calcifying VSMCs were incubated with dialyzed plasma samples and vascular calcification was assessed. Osteopontin (OPN) and matrix Gla protein (MGP) were measured in VSMC supernatants. IL-6 plasma concentrations were markedly lower with HCO and MCO dialysis. VSMC calcification was significantly lower after incubation with MCO- and HCO-serum compared to HF plasma. MGP and OPN levels in supernatants were significantly lower in the MCO but not in the HCO group compared to HF. In vitro dialysis of cytokine-enriched plasma samples with MCO and HCO membranes reduces IL-6 levels. The induction of vascular calcification by cytokine-enriched plasma is reduced after HCO and MCO dialysis.“

## Zusammenfassung der Ergebnisse eigener Arbeiten

## Zusammenfassung der Ergebnisse eigener Arbeiten

## Zusammenfassung der Ergebnisse eigener Arbeiten

## Zusammenfassung der Ergebnisse eigener Arbeiten

## Zusammenfassung der Ergebnisse eigener Arbeiten

## Zusammenfassung der Ergebnisse eigener Arbeiten

## Zusammenfassung der Ergebnisse eigener Arbeiten



### 3.2 Einfluss von HCO-Membranen auf die Inflammation in Dialysepatienten

Um nach diesen ex vivo -Untersuchungen auch die In vivo Auswirkungen von HCO-Dialysemembranen zu untersuchen, wurde eine prospektive, randomisierte klinische Studie mit 43 prävalenten Dialysepatienten durchgeführt und zahlreiche inflammatorische Testparameter unter HCO und High-Flux-Bedingungen untersucht.

Auch wenn der primäre Endpunkt, die CD 162 Expression auf Monozyten keinen statistisch signifikanten Unterschied zeigte, so war beispielsweise die Konzentration des löslichen TNF-Rezeptors sowie die Expression proinflammatorischer Gene in Leukozyten nach HCO-Dialyse deutlich niedriger.

Im folgenden Abstrakt der Arbeit 2 sind die entscheidenden Ergebnisse zusammengefasst:

**High cut-off dialysis in chronic haemodialysis patients.** Girndt M, Fiedler R, Martus P, Pawlak M, Storr M, Bohler T, Glomb MA, Liehr K, Henning C, Templin M, Trojanowicz B, Ulrich C, Werner K, Zickler D, Schindler R. *European Journal of Clinical Investigation*. 2015 Dec;45(12):1333-40.

<https://doi.org/10.1111/eci.12559> PMID: 26519693 *Clinical Trial*.

**„Background:** Haemodialysis patients suffer from chronic systemic inflammation and high incidence of cardiovascular disease. One cause for this may be the failure of diseased kidneys to eliminate immune mediators. Current haemodialysis treatment achieves insufficient elimination of proteins in the molecular weight range 15-45 kD. Thus, high cut-off dialysis might improve the inflammatory state.

**Design:** In this randomized crossover trial, 43 haemodialysis patients were treated for 3 weeks with high cut-off or high-flux dialysis. Inflammatory plasma mediators, monocyte subpopulation distribution and leucocyte gene expression were quantified.

**Results:** High cut-off dialysis supplemented by a low-flux filter did not influence the primary end-point, expression density of CD162 on monocytes. Nevertheless, treatment reduced multiple immune mediators in plasma. Such reduction proved - at least for some markers - to be a sustained effect over the interdialytic interval. Thus, for example, soluble TNF-receptor 1 concentration predialysis was reduced from median 13·3 (IQR 8·9-17·2) to 9·7 (IQR 7·5-13·2) ng/mL with high cut-off while remaining constant with high-flux treatment. The expression profile of multiple proinflammatory genes in leucocytes was significantly dampened. Treatment was well tolerated although albumin losses in high cut-off dialysis would be prohibitive against long-term use.

**Conclusions:** The study shows for the first time that a dampening effect of high cut-off dialysis on systemic inflammation is achievable. Earlier studies had failed due to short study duration or insufficient dialysis efficacy. Removal of soluble mediators from the circulation influences cellular activation levels in leucocytes. Continued development of less albumin leaky membranes with similar cytokine elimination is justified.”

## Zusammenfassung der Ergebnisse eigener Arbeiten

## Zusammenfassung der Ergebnisse eigener Arbeiten

## Zusammenfassung der Ergebnisse eigener Arbeiten

## Zusammenfassung der Ergebnisse eigener Arbeiten

## Zusammenfassung der Ergebnisse eigener Arbeiten

## Zusammenfassung der Ergebnisse eigener Arbeiten



## Zusammenfassung der Ergebnisse eigener Arbeiten

## Zusammenfassung der Ergebnisse eigener Arbeiten

### 3.3 Einfluss von HCO-Membranen auf die Verkalkung in Dialysepatienten

Der positive Einfluss von HCO-Membranen im Hinblick auf wichtige Inflammationsparameter in Dialysepatienten wurde also in o.g. Studie gut belegt. Ob diese Reduktion der Mikroinflammation auch Auswirkungen auf die prokalzifizierenden Einflüsse im Kalzifikationsmodell hat, sollte durch Proben aus dieser Studie im Kalzifikations-Zellkulturmodell untersucht werden.

Der nachfolgende Text entspricht dem Abstrakt der Arbeit 3:

**High cut-off dialysis in chronic haemodialysis patients reduces serum procalcific activity.** Zickler D, Willy K, Girndt M, Fiedler R, Martus P, Storr M, Schindler R. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2016 Oct;31(10):1706-12.

<https://doi.org/10.1093/ndt/gfw293> Epub 2016 Jul 20.PMID: 27445317 Clinical Trial.

**“Background:** Vascular calcification is enhanced in chronic dialysis patients, possibly due to the insufficient removal of various intermediate molecular weight uraemic toxins such as interleukins with conventional membranes. In this study, we assessed the modulation of in vitro vascular calcification with the use of high cut-off (HCO) membranes in chronic dialysis patients.

**Methods:** In a PERCI trial, 43 chronic dialysis patients were treated with conventional high-flux and HCO filters for 3 weeks in a randomized order following a 2-period crossover design. After each phase, serum predialysis samples were drawn. Calcifying human coronary vascular smooth muscle cells (VSMCs) were incubated with the patient's serum samples. Calcification was assessed with alkaline phosphatase (ALP) and alizarin red staining. In the clinical trial, HCO dialysis reduced the serum levels of the soluble tumour necrosis factor receptor (sTNFR) 1 and 2, vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) and soluble interleukin-2 receptor (sIL2R). We therefore investigated the in vitro effects of these mediators on vascular calcification.

**Results:** VSMCs incubated with HCO dialysis serum showed a 26% reduction of ALP with HCO serum compared with high-flux serum. Alizarin was 43% lower after incubation with the HCO serum compared with the high-flux serum. While sIL2R and sTNFR 1 and 2 showed no effects on VSMC calcification, VCAM-1 caused a dose-dependent enhancement of calcification.

**Conclusions:** The use of HCO dialysis membranes in chronic dialysis patients reduces the procalcific effects of serum on VSMC in vitro. The mechanisms of the strong effect of HCO on

## Zusammenfassung der Ergebnisse eigener Arbeiten

in vitro calcification are not completely understood. One factor may be lower levels of VCAM-1 in HCO serum samples, since VCAM-1 was able to induce vascular calcification in our experiments. Neither sTNFR 1, sTNFR 2 nor sIL2R enhance vascular calcification in vitro. Regardless of the mechanisms, our results encourage further studies of highly permeable filters in chronic dialysis patients.”

## Zusammenfassung der Ergebnisse eigener Arbeiten

## Zusammenfassung der Ergebnisse eigener Arbeiten

## Zusammenfassung der Ergebnisse eigener Arbeiten

## Zusammenfassung der Ergebnisse eigener Arbeiten





## Zusammenfassung der Ergebnisse eigener Arbeiten

## Zusammenfassung der Ergebnisse eigener Arbeiten

### 3.4 Effekt von Medium Cut-Off Membranen auf Inflammation in chronischen Dialysepatienten

Der langfristige Einsatz von HCO-Dialysemembranen in chronischen Dialysepatienten ist aufgrund des relevanten Albuminverlustes nicht möglich. Um jedoch die vorteilhaften Eigenschaften dieser Dialysemembranen im Hinblick auf Entfernung proinflammatorischer Moleküle zu erhalten ohne dabei Albumin zu eliminieren, wurde eine Dialysemembran mit einem steileren Cut-Off entwickelt. In einer weiteren prospektiven randomisierten Studie wurde diese Membran an 48 Dialysepatienten getestet und in der Folge viele inflammatorische Marker untersucht. Als sekundärer Endpunkt wurden die Albuminspiegel untersucht.

Im Folgenden ist der Abstrakt aus Arbeit 4 abgedruckt:

***Medium Cut-Off (MCO) Membranes Reduce Inflammation in Chronic Dialysis Patients- A Randomized Controlled Clinical Trial.*** 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. *PLoS One.* 2017 Jan 13;12(1):e0169024.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169024>

*eCollection2017.PMID: 28085888 Clinical Trial.*

**Background:** To increase the removal of middle-sized uremic toxins a new membrane with enhanced permeability and selectivity, called Medium Cut-Off membrane (MCO-Ci) has been developed that at the same time ensures the retention of albumin. Because many middle-sized substances may contribute to micro-inflammation we hypothesized that the use of MCO-Ci influences the inflammatory state in hemodialysis patients.

**Methods:** The randomized crossover trial in 48 patients compared MCO-Ci dialysis to High-flux dialysis of 4 weeks duration each plus 8 weeks extension phase. Primary endpoint was the gene expression of TNF- $\alpha$  and IL-6 in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), secondary endpoints were plasma levels of specified inflammatory mediators and cytokines.

**Results:** After four weeks of MCO-Ci the expression of TNF- $\alpha$  mRNA (Relative quantification (RQ) from  $0.92 \pm 0.34$  to  $0.75 \pm 0.31$ , -18.5%,  $p < 0.001$ )- $\alpha$  and IL-6 mRNA (RQ from  $0.78 \pm 0.80$  to  $0.60 \pm 0.43$ , -23.1%,  $p < 0.01$ ) was reduced to a significantly greater extent than with High-flux dialyzers (TNF mRNA-RQ: -14.3%; IL-6 mRNA-RQ: -3.5%). After retransformation of logarithmically transformed data, measurements after MCO were reduced to 82% of those after HF (95% CI 74%-91%). 4 weeks use of MCO-Ci resulted in long-lasting change in plasma levels of several cytokines and other substances with a significant decrease for sTNFR1, kappa and lambda free light chains, urea and an increase for Lp-PLA2 (PLA2G7) compared to High-flux. Albumin levels dropped significantly after 4 weeks of MCO dialysis but increased after additional 8 weeks of MCO dialysis. Twelve weeks treatment with MCO-Ci was well

tolerated regarding the number of (S)AEs. In the extension period levels of CRP, TNF- $\alpha$ -mRNA and IL-6 mRNA remained stable in High-flux as well as in MCO-Ci.

**Conclusions:** MCO-Ci dialyzers modulate inflammation in chronic HD patients to a greater extent compared to High-flux dialyzers. Transcription of pro-inflammatory cytokines in peripheral leukocytes is markedly reduced and removal of soluble mediators is enhanced with MCO dialysis. Serum albumin concentrations stabilize after an initial drop. These results encourage further trials with longer treatment periods and clinical endpoints.

## Zusammenfassung der Ergebnisse eigener Arbeiten

## Zusammenfassung der Ergebnisse eigener Arbeiten

## Zusammenfassung der Ergebnisse eigener Arbeiten



## Zusammenfassung der Ergebnisse eigener Arbeiten

## Zusammenfassung der Ergebnisse eigener Arbeiten

## Zusammenfassung der Ergebnisse eigener Arbeiten

## Zusammenfassung der Ergebnisse eigener Arbeiten

## Zusammenfassung der Ergebnisse eigener Arbeiten

## Zusammenfassung der Ergebnisse eigener Arbeiten

## Zusammenfassung der Ergebnisse eigener Arbeiten

## Zusammenfassung der Ergebnisse eigener Arbeiten



## Zusammenfassung der Ergebnisse eigener Arbeiten







### 3.5 Effekt von Medium Cut-Off Membranen auf die In Vitro Gefäßverkalkung

Auch nach Modulation des Cut-Offs der Dialysemembran konnten mit den Medium Cut-Off-Membranen günstige Effekte im Hinblick auf Inflammation erzielt werden. Als nächstes stellte sich nun also die Frage, ob auch die prokalzifizierenden Eigenschaften des Serums von Dialysepatienten durch Medium Cut-Off-Membranen positiv beeinflusst werden können. Daher wurden Serumproben aus der PERCI-II-Studie auch im Kalzifikations-Zellkulturmodell untersucht.

Nachfolgend ist der Abstrakt der Arbeit Nummer 5 abgedruckt:

***Expanded Haemodialysis Therapy of Chronic Haemodialysis Patients Prevents Calcification and Apoptosis of Vascular Smooth Muscle Cells in vitro.*** Willy K, Girndt M, Voelkl J, Fiedler R, Martus P, Storr M, Schindler R, Zickler D. *Blood Purification.* 2018;45(1-3):131-138.

<https://doi.org/10.1159/000484925> Epub 2017 Dec 22. PMID: 29402827

**Background:** Vascular calcification is a common phenomenon in patients with chronic kidney disease and strongly associated with increased cardiovascular mortality. Vascular calcification is an active process mediated in part by inflammatory processes in vascular smooth muscle cells (VSMC). These could be modified by the insufficient removal of proinflammatory cytokines through conventional high-flux (HF) membranes. Recent trials demonstrated a reduction of inflammation in VSMC by use of dialysis membranes with a higher and steeper cut-off. These membranes caused significant albumin loss. Therefore, the effect of high retention Onset (HRO) dialysis membranes on vascular calcification and its implications in vitro was evaluated.

**Methods:** In the PERCI II trial, 48 chronic dialysis patients were dialyzed using HF and HRO dialyzers and serum samples were collected. Calcifying VSMC were incubated with the serum samples. Calcification was determined using alizarin red staining (AZR) and determination of alkaline phosphatase (ALP) activity. Furthermore, apoptosis was evaluated, and release of matrix Gla protein (MGP), osteopontin (OPN) and growth differentiation factor 15 (GDF-15) were measured in cell supernatants.

**Results:** Vascular calcification in vitro was significantly reduced by 24% (ALP) and 36% (AZR) after 4 weeks of HRO dialysis and by 33% (ALP) and 48% (AZR) after 12 weeks of dialysis using HRO membranes compared to HF dialysis. Apoptosis was significantly lower in the HRO group. The concentrations of MGP and OPN were significantly elevated after incubation with HF serum compared to HRO serum and healthy controls. Similarly, GDF-15 release in the

## Zusammenfassung der Ergebnisse eigener Arbeiten

supernatant was elevated after incubation with HF serum, an effect significantly ameliorated after treatment with HRO medium.

**Conclusions:** Expanded haemodialysis therapy reduces the pro-calcific potential of serum from dialysis patients in vitro. With a markedly reduced albumin filtration compared to high cut-off dialysis, use of the HRO dialyzers may possibly provide a treatment option for chronic dialysis patients to reduce the progression of vascular calcification.

## Zusammenfassung der Ergebnisse eigener Arbeiten











## Zusammenfassung der Ergebnisse eigener Arbeiten

## Zusammenfassung der Ergebnisse eigener Arbeiten

## Zusammenfassung der Ergebnisse eigener Arbeiten

## 4 Diskussion

Die unverändert hohe Prävalenz kardiovaskulärer Erkrankungen und Ereignisse in chronischen Dialysepatienten ist multifaktorieller Genese und wird im Wesentlichen zurückgeführt auf eine deutlich erhöhte Inflammation und vaskuläre Kalzifikation. Die unzureichende Clearance mittelmolekularer Substanzen mit herkömmlichen High-Flux-Dialysemembranen zu denen auch proinflammatorische Moleküle zählen, spielt hierbei eine mögliche Rolle.

Nachdem in den 90er Jahren zur Reduktion der Mikroinflammation ultrareines Dialysat mit deutlich reduzierten Konzentrationen an Endotoxin eingeführt wurde, wurden Anstrengungen unternommen, die Membranporengröße von Dialysefiltern dem Glomerulum anzunähern und damit auch die Entfernung Moleküle, die ein höheres Gewicht als 5 kDa aufweisen, zu ermöglichen.

Ob dies tatsächlich auch zu einer Verbesserung der Mikroinflammation führt war zu diesem Zeitpunkt weitgehend unklar. Empfehlungen seitens der Fachgesellschaften zu dem Einsatz von Dialysemembranen sind ebenso rar wie überzeugende Studien.

In den Leitlinien der Renal Association Clinical Practice Guidelines von 2019 wird empfohlen, chronische Dialysepatienten mit High-Flux Dialysemembranen zu behandeln. (18)

Die Leitlinien der KDIGO hingegen stammen aus dem Jahre 2012 und geben zur Wahl des Dialysefilters keine eindeutige Empfehlung ab.

Gegenstand dieser Arbeit war die Frage, ob der Einsatz von hoch- und mittelhochdurchlässigen Dialysemembranen den Zustand der Inflammation und der In Vitro Gefäßverkalkung beeinflussen kann.

Interleukin-6- ist ein anerkannter Surrogatparameter in Dialysepatienten. Es ist ferner mit dem Ernährungszustand aber auch psychologischen Zustand und speziell dem Vorliegen von depressiver Symptomatik assoziiert. (19)

Darüber hinaus korreliert Interleukin-6 gut mit Mortalität sowohl in HD als auch PD Patienten aber auch in der nierengesunden Population. (20) IL-6 korreliert ferner gut mit dem Voranschreiten von Atherosklerose der Carotiden in Dialysepatienten. (21)

Neben seiner Rolle als Surrogatparameter scheint IL-6 aber auch eine aktive Rolle in der Pathogenese im Prozess der Atherosklerose zuzukommen. Die Injektion von IL-6 in ApoE-defiziente Mäuse beispielsweise hat eine stark proatherogene Wirkung zur Folge. (22)

## Diskussion

Es befördert die inflammationsreaktion im Gefäß durch verschiedene Mechanismen. Neben der Aktivierung von Endothelzellen, der Induktion von Chemokinen und Adhäsionsmolekülproduktion und der VEGF-Produktion induziert es auch eine Akute-Phase-Reaktion, die den Prozess der Inflammation weiter befördert. (23) (24)

Andererseits werden IL-6 auch eine Reihe antiinflammatorischer Effekte attestiert, so z.B.

Die Induktion von IL-1 Rezeptor Antagonist, aber auch der Inhibition von IL-1. (25)

Aufgrund dieser vielfältigen Effekte von IL-6 auf Inflammation ist es schwer vorherzusagen, wie sich eine mögliche verbesserte Clearance von IL-6 auf Prozesse der Atherosklerose auswirken.

Diese Frage wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst in einem In Vitro Dialyse Modell untersucht. In einem Labor wurde ein Mini-Dialyse-Kreislauf nachempfunden mit der Möglichkeit, verschiedene Dialysatoren auf ihre Clearance hin zu untersuchen.

Bei dieser Arbeit gelang es uns, zu zeigen, dass es mit den HCO und MCO-Membranen möglich ist, deutlich mehr IL-6 zu entfernen als mit herkömmlichen High-Flux-Filtern. Hiermit ist auch gleichzeitig die Frage geklärt, ob Schwankungen in IL-6 Konzentrationen vor und nach Dialyse möglicherweise lediglich einer veränderten IL-6 Produktion durch Monozyten geschuldet sein könnten. Tatsächlich findet also eine IL-6-Clearance statt, die mit HCO und MCO-Filtern deutlich effektiver ist. Gleichwohl muss konstatiert werden, dass die Konzentrationen in unserem In Vitro-experiment deutlich höher waren, als es in Patienten der Fall wäre. Außerdem wurde hier Serum dialysiert und kein Vollblut, so dass sich die Bedingungen von der in Vivo Situation unterscheiden haben. Ferner wurde lediglich die Konzentration von IL-6 gemessen, weitere wichtige Mediatoren im Prozess der Atherosklerose wurden nicht untersucht.

Im zweiten Schritt gelang es uns mit dieser Arbeit, die Effekte des mit verschiedenem Cut-Off dialysierten Serums im In Vitro Verkalkungs-Modell zu untersuchen. Ein weiterer Vorteil dieses Experiments war, dass wir isoliert den Einfluss proinflammatorischer Interleukine also ohne den Einfluss von anderen Urämietoxinen untersuchen konnten. Das Blut war von nierengesunden Spendern gewonnen und mit Endotoxin versetzt worden. Hieraus wurden also Seren mit hohen Konzentrationen proinflammatorischer Interleukine, gewonnen, so dass im hiernach folgenden In Vitro Dialyseexperiment der isolierte Effekt der verschiedenen Dialysemembranen auf die Inflammation untersucht werden konnte. Proben aus ein und demselben Serumpool wurden mit den verschiedenen Dialysatoren behandelt und anschließend wurden Serum und Dialysat auf IL-6 untersucht.



## Diskussion

Die aus dem In Vitro Dialyse-Modell gewonnenen Seren induzierten nach Dialyse mit MCO und HCO deutlich weniger Verkalkung als nach High-Flux- Dialyse. Und auch das Genexpressionsmilieu der Gefäßmuskelzellen zeigte sich verändert, es kam zu deutlich weniger Expression der Kalzifikationsinhibitoren Osteopontin und Matrix Gla Protein. Dies belegt erneut, dass erhöhte Inflammation Gefäßverkalkung zur Folge hat und durch Dialyse mit hoch bzw. mittelhochdurchlässigen Dialysemembranen abgemildert werden kann.

Einschränkend muss jedoch festgestellt werden, dass es sich in diesem In Vitro Experiment um extrem hohe Interleukin-Konzentrationen handelte. Eine 1:1 Übertragung ist wie bei allen In Vitro Versuchen auf die In Vivo Situation nicht möglich, bietet aber in diesem Falle wichtige Hinweise auf die Effekte der HCO- und MCO- Membranen.

Um einen möglichen In Vivo Effekt großporiger Dialysemembranen zu untersuchen, wurde eine klinische Cross-Over-Studie mit chronischen Dialysepatienten durchgeführt, in der die Effekte von HCO-Membranen auf die Inflammation untersucht werden sollten. Mit der PERCI-I-Studie wurden eine Reihe von inflammatorischen Faktoren untersucht. Der primäre Endpunkt, die Expression von CD162 auf Monozyten, dem P-Selectin-Ligand, der aufgrund von vorherigen Untersuchungen gewählt wurde, wurde durch die eingesetzte Dialysemembran nicht beeinflusst.

Verschiedene mittelmolekulare Substanzen hingegen, von denen viele eine proinflammatorische Wirkung haben, konnten durch die HCO-Membranen besser entfernt werden als mit High-Flux-Membranen. Der lösliche TNF-Rezeptor 1 und der IL2-Rezeptor beispielsweise waren nach HCO-Dialyse signifikant niedriger als nach High-Flux-Dialyse.

Eine Reduktion mit HCO wurde aber längst nicht für alle Moleküle, die im Bereich von 15-45 kd liegen, erzielt. So ergab sich für IL-6 (28 kD), TNF-Alpha (17kD) und IL-10 ( 36 kD) kein Unterschied. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die mögliche Bindung an Zellen, Transportproteine oder andere Makromoleküle, wodurch sie einer verbesserten Clearance unzugänglich gemacht wurden und somit nicht dialysabel waren.

In einer weiterführenden Analyse derselben Studie gelang uns der Nachweis, dass sich die Wahl der Dialysemembranen auch die Eigenschaften des Genexpressionsmilieus in Leukozyten verändert. (26) Nach Inkubation mit Serum, welches nach HCO-Dialyse gewonnen wurde, exprimierten die Monozyten weniger TNF und IL-6, sowie Osteopontin und Osteokalzin.

Die Inkubation derselben Zellen mit dem aus der Studie gewonnenen Dialysat riefen eine verstärkte Apoptose hervor, so dass eine höhere Toxinlast in diesen Dialysaten postuliert werden kann.

## Diskussion

Die Ergebnisse dieser Studie belegen also eindeutig, dass Substanzen, die die Inflammation befördern, durch HCO besser entfernt werden, als High-Flux-Membranen.

Die in der PERCI-I-Studie generierten Serumproben wurden in der Folge auch im In Vitro-Verkalkungs-Modell untersucht. Hier zeigte sich eine statistisch signifikante Reduktion der prokalzifizierenden Wirkung nach Dialyse mit einer HCO-Membran.

Welches Molekül jedoch durch die HCO-Membran verbessert entfernt wurde, und nun für die Reduktion der Verkalkung verantwortlich war, blieb jedoch zunächst offen.

Daher führten wir weitere Untersuchungen an vaskulären Progenitorzellen durch, die die Auswirkungen einzelner urämischer Toxine auf die In Vitro Gefäßverkalkungen genauer untersuchten. (27) Hier zeigte sich, dass gerade Moleküle aus dem Bereich der Mittelmoleküle prokalzifizierende Wirkungen entfalten. Dies waren vornehmlich Interleukin 1, TNF-alpha Fibroblast Growth Factor-2 und Parathyroid Hormone 7-34.

Die Inkubation von Urämieserum führte in demselben Modell wie erwartet zu einer Verkalkung. Die selektive Blockade von IL-1, TNF Alpha, FGF-2 und PTH 7-34 wiederum reduzierte die Verkalkung drastisch, so dass ein prokalzifizierender Effekt dieser vier Mittelmoleküle belegt ist.

Auch in diesem Zellkultur-Modell induzierte das nach HCO-Dialyse entnommene Serum deutlich weniger Verkalkung als die High-Flux-Kontroll-Seren. (28)

Zusammenfassend hat uns die PERCI-I-Studie also einen eindeutigen Effekt von High Cut-Off Dialysatoren im Hinblick auf Reduktion sowohl der Inflammation als auch der Verkalkung gezeigt.

Zentrale Fragestellung an diese Studie waren neben der möglichen Modulation der Mikroinflammation aber auch Sicherheitsaspekte und der Albuminverlust.

Erwartet wurde eine deutlich erhöhte Albuminclearance, so dass bei dem Studiendesign eine kleinere Membranoberfläche bei den HCO-Membranen gewählt wurde. Um durch eine zu kleine Oberfläche die Dialyseudosis nicht zu schmälern wurde hinter den HCO-Filter ein zusätzlicher Highflux-Filter, der zu dem HCO-Filter in Serie geschaltet wurde, ergänzt.

Wie erwartet kam es nach dreiwöchiger HCO-Dialyse zu einem signifikanten Abfall des Serumalbumins von durchschnittlich mehr als 5g (von 36,2g/l  $\pm$  3,5 auf 31,0 g/l  $\pm$  4,7 g/L,  $P < 0,01$ ), während es in der High-Flux-Phase stabil blieb.

## Diskussion

Hypoalbuminämie in chronischen Dialysepatienten ist jedoch assoziiert mit schlechtem Outcome. (29) Ein so hoher dialyse-assoziiertes Albuminabfall verbietet daher den längerfristigen Einsatz von HCO-Dialysatoren in Dialysepatienten.

Um jedoch die positiven Eigenschaften hochdurchlässiger Membranen zu erhalten und gleichzeitig den Albuminverlust zu reduzieren wurde der Effekt von MCO-Membranen in dieser Arbeit ebenfalls untersucht.

Daher wurde eine weitere randomisierte Studie durchgeführt, in der chronische Dialysepatienten in einem Cross-Over-Design 4 Wochen mit MCO- und High-Flux-Dialysatoren dialysiert wurden. Um mittelfristige Effekte zu untersuchen, wurde die zweite Phase um eine 8-wöchige dritte Phase ergänzt.

Die Ergebnisse im Hinblick auf Mikroinflammation ähnelten den Ergebnissen aus PERCI-I sehr. Erneut wurde eine Reduktion der Expression von IL-6 und TNF-mRNA nach MCO-Dialyse gesehen. Diese war statistisch hochsignifikant versus High-Flux. Somit wurde der primäre Endpunkt erreicht. Weiterhin kam es erneut zu einer verstärkten Entfernung von sTNFr-1.

Die Ergebnisse unserer Studien belegen, dass auch die modulierte Dialysemembran mit Anpassung des Cut-Offs die Mikroinflammation in chronischen Dialysepatienten positiv beeinflussen kann. Sie bestätigen damit viele andere Studien, die ebenfalls einen positiven Effekt auf verschiedene Biomarker fanden.

In der PERCI-II- Studie blieben die Albuminkonzentrationen nach vier und nach 8 Wochen MCO-Dialyse stabil.

Diese Ergebnisse decken sich mit den Ergebnissen einer Studie, die in Australien und Neuseeland durchgeführt wurde. Hier wurde nach einem Behandlungszeitraum von 28 Wochen kein statistisch signifikanter Abfall der Serumalbuminkonzentrationen gemessen. (30)

In einer weiterführenden Metaanalyse, in der alle publizierten Daten analysiert wurden, zeigten sich keine Abfälle des Serumalbumins unterhalb der Normgrenze. (31) Der Albuminverlust pro MCO-Dialysesitzung wurde hier auf 2.1g beziffert. Es zeigte sich bei der Analyse aller Studien ein vorübergehender Abfall mit einem spontanen Wiederanstieg im Verlauf. Albuminsubstitution war in keiner der analysierten Studien erforderlich. Vergleicht man dies mit den in der Literatur beschriebenen Verlusten bei der Peritonealdialyse, die sich auf 5 – 15g / Tag belaufen, so erscheinen die Albuminverluste bei der MCO-Dialyse im Vergleich hierzu eher moderat. (32)

Somit kann das Hauptgegenargument gegen dieses Verfahren entkräftet werden.

## Diskussion

In weiteren Untersuchungen analysierten wir ferner, ob sich auch die mit HCO nachgewiesenen Effekte im Hinblick auf prokalzifizierende Wirkung auch mit MCO reproduzieren ließen.

Im Zellkulturmodell induzierte das nach MCO-Dialyse gewonnene Serum erneut statistisch signifikant weniger Verkalkung als das High-Flux-Serum. Auch die Expression von Verkalkungsassozierten Markern wie Osteopontin und Matrix Gla Protein fiel nach MCO Dialyse geringer aus.

Dies kann als wichtiger Beleg dafür gesehen werden, dass die MCO-Dialysatoren auch verkalkungsinduzierende Substanzen vermehrt filtrieren. Unsere Arbeiten belegen somit einen positiven Effekt hochdurchlässiger Dialysemembranen auf den Prozess der Inflammation sowie der In Vitro Verkalkung.

Diese Ergebnisse wurden ergänzt durch eine Studie in Korea an 20 Patienten, in der die therapeutischen Effekte der MCO-Membran mit High-Flux-Membranen mittels Proteomanalysen verglichen wurden (33). Auch hier zeigte sich, dass manche Toxine im mittelmolekularen Bereich besser entfernt wurden wie z.B. Retinol-binding Protein-4 (22kDa) und Fetuin-B (41 kDa) aber auch verschiedene Bestandteile des Komplementsystem. In der Zusammenschau wurde eine eindeutige Beeinflussung des Metabolom und Proteoms durch MCO Dialyse festgestellt.

Eine weitere Bestätigung der These, dass mit MCO Dialyse die Inflammation beeinflusst wird lieferte die randomisierte Studie von Lim et al. (34) Hier zeigte sich eine bessere Reduktion von TNF alpha. Weiterhin zeigte sie ein besseres Ansprechen auf Erythropoese-stimulierende Agentien.

Auch in der randomisierten Studie von Weiner et al konnte neben einer verbesserten Clearance für freie Leichtketten selbiges auch für TNF alpha und Complement factor D nicht aber für IL-6 gezeigt werden. (35)

Unsere Resultate und die Ergebnisse anderer Studien belegen also, dass eine bessere Clearance mittelmolekularer Substanzen mit MCO möglich ist. Einschränkend muss jedoch gesagt werden, dass für manche Urämietoxine aus dem mittelmolekularen Bereich keine bessere Entfernung erfolgt, die sich an Serumspiegeln bemerkbar macht. Nicht alle Proteine, die nominell über dem Cut-Off liegen, werden auch nachhaltig gesenkt. Bindung an Transportproteine, Shift aus dem Gewebe sowie Nachproduktion während der Dialyse durch Monozyten spielen hier eine mögliche Rolle.

Anhand der Analyse der Plasmaspiegel entfernter Moleküle ist eine Bewertung der möglichen Pathomechanismen und der klinischen Effekte nicht möglich.

## Diskussion

Eine besser geeignete Meßmethode für Beeinflussung möglicher Pathomechanismen und Effekte unterschiedlicher Dialysemembranen sind Zellkultursysteme, in denen die Reaktion des urämischen Serums In Vitro analysieren kann. Hier konnte diese Arbeit auch bei der Etablierung von Untersuchungsmethoden zur Evaluation von Nierenersatzverfahren einen Beitrag leisten. Ähnliche Untersuchungen wären sicher auch für die biologischen Effekte der Hämodiafiltration oder Peritonealdialyse interessant.

Einschränkend muss angemerkt werden, dass es sich bei unseren Untersuchungen lediglich um Surrogatparameter und In Vitro Untersuchungen handelt.

Ob sich diese in Vorteile für die Patienten übersetzen lassen, bleibt zum jetzigen Zeitpunkt offen.

Eine Metaanalyse hat nun zahlreiche Studien zusammengefasst und auf verschiedene klinische Endpunkte hin analysiert. (36) In acht untersuchten Studien, hiervon vier randomisiert, zeigte sich kein relevanter Effekt von MCO auf die Mortalität. Die Metaanalyse zeigte jedoch, dass MCO zu einer Reduktion der Zahl an Hospitalisierungen sowie zu einer Reduktion der Krankenhausdauer führen könnte. (37) Weiterhin wurde in der Metaanalyse unter MCO-Dialyse eine niedrigere Zahl an Infektionen registriert.

Eine weitere Studie zeigte eine relevante Verbesserung der Quality of Life sowie eine Reduktion des Juckreizes untersucht durch MCO. (38)

Recovery time wurde in einer nicht-randomisierten Studie durch Switch auf MCO um 420 Minuten reduziert. (39)

Ferner zeigte eine Studie eine Verbesserung des Erythropoetin—Resistance-Indexes sowie einen niedrigeren Eisensubstitutionsbedarf mit MCO. (37)

Die Prävalenz von Restless legs Syndrom sank deutlich in einer nicht-randomisierten Studie von 22,1% auf 10% (40) während sie in einer anderen Studie nicht beeinflusst wurde. (30)

Hinsichtlich der Verträglichkeit des Verfahrens zeigte sich in 130601 HD-Sitzungen keine allergische Reaktion auf den Dialysator.

All diese Studien geben erste Hinweise auf die genannten Endpunkte. Insgesamt ist die Anzahl der Studienteilnehmer jeweils aber eher klein. Aus den bisherigen Studien kann jedoch festgehalten werden, dass es sich um sicheres Verfahren handelt, welches verschiedene wichtige Endpunkte positiv beeinflusst.

Ob auch harte Endpunkt wie Mortalität und kardiovaskuläre Ereignisse reduziert werden, kann auf Grundlage der aktuellen Studienlage nicht sicher gesagt werden.

## Diskussion

In weiteren Studien werden die Effekte der MCO-Dialyse an größeren Populationen in einem multizentrischen Setting zu untersuchen sein. Von hoher Bedeutung sein wird die genauere Identifikation derjenigen Urämietoxine, deren Entfernung die positiven Effekte insbesondere im Hinblick auf die Gefäßverkalkung hervorgerufen hat. Ziel sollte möglicherweise eine noch gezieltere Anpassung der Dialysatoren sein, um eine effektivere Elimination zu ermöglichen.

Zur weiteren Abklärung des Effekts und der Mechanismen der MCO-Dialyse auf die Gefäßverkalkung wären außerdem Untersuchungen der Calcification propensity erstrebenswert.

Hierbei wird die In Vitro Kalzifikationsneigung untersucht, sie korreliert sehr gut mit kardiovaskulärer Mortalität in der Gesamtbevölkerung aber auch in der CKD Kohorte. (41) (42)

In der Folge sollten auch Coronar-CT-Untersuchungen, Puls-Wellen-Geschwindigkeitsuntersuchungen und Untersuchungen der In Vivo Endothelfunktion erfolgen.

Als wichtigster primärer Endpunkt sollte jedoch das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse und die Mortalität in größeren Populationen in randomisierten prospektiven Studien untersucht werden.

## 5 Zusammenfassung

In der Population der chronischen Dialysepatienten ist die Inzidenz an kardiovaskulären Ereignissen gegenüber der gesunden Bevölkerung signifikant erhöht. Dies liegt auch an einer insuffizienten Clearance von proinflammatorischen Mittelmolekülen durch aktuell verwendeten Dialysemembranen, wodurch chronische Mikroinflammation und damit Arteriosklerose begünstigt werden.

Es wurden daher High Cut-Off und Medium Cut-Off-Dialysemembranen entwickelt, die eine bessere Clearance für Mittelmoleküle bis zu 45 kd ermöglichen. Bei der MCO Membran wurde durch einen steileren Cut-Off die Albumin-clearance reduziert.

In dieser Arbeit wurde der Einsatz dieser Dialysemembranen innerhalb zwei klinischer Studien untersucht.

In der PERCI-I-Studie wurde der Einsatz der HCO-Membran untersucht. Es zeigte sich eine Reduktion verschiedener Mittelmoleküle wie sTNR-1 und sTNFR-2, sowie eine Reduktion der TNF alpha und IL-6-Expression in Leukozyten. Ferner wurde eine Reduktion der In Vitro-Verkalkung beobachtet. Allerdings kam es auch zu einem relevanten Abfall des Serumalbumins.

In der PERCI-II-Studie wurde die MCO-Membran untersucht. Auch in dieser Studie konnten benefizielle Effekte auf die Mikroinflammation sowie die Gefäßverkalkung beobachtet werden. Es kam zu keinem Abfall des Serumalbumins.

Mit Einsatz von HCO- und MCO-Membranen ist es möglich, verschiedene Parameter der Inflammation und In Vitro Verkalkung in chronischen Dialysepatienten zu senken.

Aufgrund des deutlich reduzierten Albuminverlustes erscheint ein Einsatz von MCO-Membranen auch längerfristig möglich. Weitere Studien müssen einen Effekt auf kardiovaskuläre Ereignisse und Überleben untersuchen.

## 6 Literatur

1. Fox CS, Matsushita K, Woodward M, Bilo HJ, Chalmers J, Heerspink HJ, et al. Associations of kidney disease measures with mortality and end-stage renal disease in individuals with and without diabetes: a meta-analysis. *Lancet*. 2012;380(9854):1662-73.
2. Johansen KL, Chertow GM, Foley RN, Gilbertson DT, Herzog CA, Ishani A, et al. US Renal Data System 2020 Annual Data Report: Epidemiology of Kidney Disease in the United States. *Am J Kidney Dis*. 2021;77(4 Suppl 1):A7-A8.
3. Vanholder R, De Smet R, Glorieux G, Argiles A, Baurmeister U, Brunet P, et al. Review on uremic toxins: classification, concentration, and interindividual variability. *Kidney Int*. 2003;63(5):1934-43.
4. Stenvinkel P, Heimbürger O, Paulter F, Diczfalusy U, Wang T, Berglund L, et al. Strong association between malnutrition, inflammation, and atherosclerosis in chronic renal failure. *Kidney Int*. 1999;55(5):1899-911.
5. Tsirpanlis G, Bagos P, Ioannou D, Bleta A, Marinou I, Lagouranis A, et al. Exploring inflammation in hemodialysis patients: persistent and superimposed inflammation. A longitudinal study. *Kidney Blood Press Res*. 2004;27(2):63-70.
6. Lederer SR, Schiff H. Ultrapure dialysis fluid lowers the cardiovascular morbidity in patients on maintenance hemodialysis by reducing continuous microinflammation. *Nephron*. 2002;91(3):452-5.
7. Wolley M, Jardine M, Hutchison CA. Exploring the Clinical Relevance of Providing Increased Removal of Large Middle Molecules. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2018;13(5):805-14.
8. Eknoyan G, Beck GJ, Cheung AK, Daugirdas JT, Greene T, Kusek JW, et al. Effect of dialysis dose and membrane flux in maintenance hemodialysis. *N Engl J Med*. 2002;347(25):2010-9.
9. Locatelli F, Martin-Malo A, Hannedouche T, Loureiro A, Papadimitriou M, Wizemann V, et al. Effect of membrane permeability on survival of hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20(3):645-54.
10. Grooteman MP, van den Dorpel MA, Bots ML, Penne EL, van der Weerd NC, Mazairac AH, et al. Effect of online hemodiafiltration on all-cause mortality and cardiovascular outcomes. *J Am Soc Nephrol*. 2012;23(6):1087-96.



## Literatur

11. Ok E, Asci G, Toz H, Ok ES, Kircelli F, Yilmaz M, et al. Mortality and cardiovascular events in online haemodiafiltration (OL-HDF) compared with high-flux dialysis: results from the Turkish OL-HDF Study. *Nephrol Dial Transplant*. 2013;28(1):192-202.
12. Davenport A, Peters SA, Bots ML, Canaud B, Grooteman MP, Asci G, et al. Higher convection volume exchange with online hemodiafiltration is associated with survival advantage for dialysis patients: the effect of adjustment for body size. *Kidney Int*. 2016;89(1):193-9.
13. Mostovaya IM, Blankestijn PJ, Bots ML, Covic A, Davenport A, Grooteman MP, et al. Clinical evidence on hemodiafiltration: a systematic review and a meta-analysis. *Semin Dial*. 2014;27(2):119-27.
14. Mercadal L, Franck JE, Metzger M, Urena Torres P, de Cornelissen F, Edet S, et al. Hemodiafiltration Versus Hemodialysis and Survival in Patients With ESRD: The French Renal Epidemiology and Information Network (REIN) Registry. *Am J Kidney Dis*. 2016;68(2):247-55.
15. Maduell F, Moreso F, Pons M, Ramos R, Mora-Macia J, Carreras J, et al. High-efficiency postdilution online hemodiafiltration reduces all-cause mortality in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol*. 2013;24(3):487-97.
16. Boschetti-de-Fierro A, Voigt M, Storr M, Krause B. Extended characterization of a new class of membranes for blood purification: the high cut-off membranes. *Int J Artif Organs*. 2013;36(7):455-63.
17. Boschetti-de-Fierro A, Voigt M, Storr M, Krause B. MCO Membranes: Enhanced Selectivity in High-Flux Class. *Sci Rep*. 2015;5:18448.
18. Ashby D, Borman N, Burton J, Corbett R, Davenport A, Farrington K, et al. Renal Association Clinical Practice Guideline on Haemodialysis. *BMC Nephrol*. 2019;20(1):379.
19. Bossola M, Di Stasio E, Giungi S, Rosa F, Tazza L. Fatigue is associated with serum interleukin-6 levels and symptoms of depression in patients on chronic hemodialysis. *J Pain Symptom Manage*. 2015;49(3):578-85.
20. Pecoits-Filho R, Barany P, Lindholm B, Heimbürger O, Stenvinkel P. Interleukin-6 is an independent predictor of mortality in patients starting dialysis treatment. *Nephrol Dial Transplant*. 2002;17(9):1684-8.

## Literatur

21. Stenvinkel P, Heimbürger O, Jogestrand T. Elevated interleukin-6 predicts progressive carotid artery atherosclerosis in dialysis patients: association with *Chlamydia pneumoniae* seropositivity. *Am J Kidney Dis.* 2002;39(2):274-82.
22. Huber SA, Sakkinen P, Conze D, Hardin N, Tracy R. Interleukin-6 exacerbates early atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19(10):2364-7.
23. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014;6(10):a016295.
24. Cohen T, Nahari D, Cerem LW, Neufeld G, Levi BZ. Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem.* 1996;271(2):736-41.
25. Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei XF, et al. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest.* 1998;101(2):311-20.
26. Trojanowicz B, Ulrich C, Fiedler R, Storr M, Boehler T, Martus P, et al. Impact of serum and dialysates obtained from chronic hemodialysis patients maintained on high cut-off membranes on inflammation profile in human THP-1 monocytes. *Hemodial Int.* 2017;21(3):348-58.
27. Hegner B, Schaub T, Janke D, Zickler D, Lange C, Girndt M, et al. Targeting proinflammatory cytokines ameliorates calcifying phenotype conversion of vascular progenitors under uremic conditions in vitro. *Sci Rep.* 2018;8(1):12087.
28. Schaub T, Janke D, Zickler D, Lange C, Girndt M, Schindler R, et al. High cut-off dialysis mitigates pro-calcific effects of plasma on vascular progenitor cells. *Sci Rep.* 2021;11(1):1144.
29. Owen WF, Jr., Lew NL, Liu Y, Lowrie EG, Lazarus JM. The urea reduction ratio and serum albumin concentration as predictors of mortality in patients undergoing hemodialysis. *N Engl J Med.* 1993;329(14):1001-6.
30. Krishnasamy R, Hawley CM, Jardine MJ, Roberts MA, Cho Y, Wong M, et al. A tRial Evaluating Mid Cut-Off Value Membrane Clearance of Albumin and Light Chains in HemoDialysis Patients: A Safety Device Study. *Blood Purif.* 2020;49(4):468-78.
31. Kandi M, Brignardello-Petersen R, Couban R, Wu C, Nesrallah G. Effects of Medium Cut-Off Versus High-Flux Hemodialysis Membranes on Biomarkers: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Can J Kidney Health Dis.* 2022;9:20543581211067090.

## Literatur

32. Dulaney JT, Hatch FE, Jr. Peritoneal dialysis and loss of proteins: a review. *Kidney Int.* 1984;26(3):253-62.
33. Kim HJ, Seong EY, Lee W, Kim S, Ahn HS, Yeom J, et al. Comparative analysis of therapeutic effects between medium cut-off and high flux dialyzers using metabolomics and proteomics: exploratory, prospective study in hemodialysis. *Sci Rep.* 2021;11(1):17335.
34. Lim JH, Jeon Y, Yook JM, Choi SY, Jung HY, Choi JY, et al. Medium cut-off dialyzer improves erythropoiesis stimulating agent resistance in a hepcidin-independent manner in maintenance hemodialysis patients: results from a randomized controlled trial. *Sci Rep.* 2020;10(1):16062.
35. Weiner DE, Falzon L, Skoufos L, Bernardo A, Beck W, Xiao M, et al. Efficacy and Safety of Expanded Hemodialysis with the Theranova 400 Dialyzer: A Randomized Controlled Trial. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2020;15(9):1310-9.
36. Kandi M, Brignardello-Petersen R, Couban R, Wu C, Nesrallah G. Clinical Outcomes With Medium Cut-Off Versus High-Flux Hemodialysis Membranes: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Can J Kidney Health Dis.* 2022;9:20543581211067087.
37. Ariza JG, Walton SM, Suarez AM, Sanabria M, Vesga JI. An initial evaluation of expanded hemodialysis on hospitalizations, drug utilization, costs, and patient utility in Colombia. *Ther Apher Dial.* 2021;25(5):621-7.
38. Lim JH, Park Y, Yook JM, Choi SY, Jung HY, Choi JY, et al. Randomized controlled trial of medium cut-off versus high-flux dialyzers on quality of life outcomes in maintenance hemodialysis patients. *Sci Rep.* 2020;10(1):7780.
39. Lindsay RM, Heidenheim PA, Nesrallah G, Garg AX, Suri R, Daily Hemodialysis Study Group London Health Sciences C. Minutes to recovery after a hemodialysis session: a simple health-related quality of life question that is reliable, valid, and sensitive to change. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2006;1(5):952-9.
40. Alarcon JC, Bunch A, Ardila F, Zuniga E, Vesga JI, Rivera A, et al. Impact of Medium Cut-Off Dialyzers on Patient-Reported Outcomes: COREXH Registry. *Blood Purif.* 2021;50(1):110-8.
41. Eelderink C, Te Velde-Keyzer CA, Frenay AS, Vermeulen EA, Bachtler M, Aghagolzadeh P, et al. Serum Calcification Propensity and the Risk of Cardiovascular and All-Cause Mortality in the General Population: The PREVEND Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2020;40(8):1942-51.

## Literatur

42. Smith ER, Ford ML, Tomlinson LA, Bodenham E, McMahon LP, Farese S, et al. Serum calcification propensity predicts all-cause mortality in predialysis CKD. *J Am Soc Nephrol.* 2014;25(2):339-48.

Danksagung

## **Danksagung**

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird auf die Veröffentlichung meiner Danksagung in der elektronischen Version verzichtet.

Erklärung

## Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde, die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden, mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

21.5.2022

.....

Datum

.....

Unterschrift